

Institut für Pflanzenzüchtung von Pflanzenschutz  
der Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg



**“Transkriptomanalyse mehлтаubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des  
*mlo*-Resistenzgenes”**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von:

Diplombiologe Uwe Zierold  
geb. am 20.11.1969

Gutachter:  
Prof. Dr. Holger Deising  
Prof. Dr. Andreas Graner  
Dr. Patrick Schweizer

Verteidigung am: 20.06.2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000009668**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009668>]

Halle/Saale 01/2005



---

Institut für Pflanzenzüchtung von Pflanzenschutz

**Zusammenfassung**

**“Transkriptomanalyse mehлтаubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des *mlo*-Resistenzgenes”**

Die pflanzliche Epidermis ist von grundlegender Bedeutung für die Wirts- und Nichtwirts-Abwehr einer großen Anzahl von Pilzkrankheiten, einschließlich des Gerstenmehltaus, der durch *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer *f.sp.* hordei verursacht wird. Um die Mechanismen in der Epidermis, die letztlich zu Anfälligkeit oder dauerhafter Resistenz führen, besser zu verstehen, wurde das Transkriptom der isogenen Linien Ingrid *Mlo* (anfällig) und Ingrid BC *mlo5* (resistent) charakterisiert. Ein cDNA-Array, das mit 3.136 Genen die mRNA-Population der Epidermis mehltaugestresster resistenter Gerste (Ingrid BC *mlo5*) repräsentiert, wurde erstellt und mit cDNA-Sonden aus inokulierter und nichtinokulierter Sprossepidermis beider isogener Linien hybridisiert. 233 differentiell exprimierte Gene wurden bei dem Vergleich von Kontrolle und inokulierter Epidermis gefunden, von denen 26 Gene pilzlichen Ursprungs waren. Die pflanzlichen Gene des Kandidatengensets wurden bevorzugt in der Epidermis reguliert, wie aus *split-sample* Experimenten hervorging. Transkripte der meisten abwehrkorrelierten Gene akkumulierten in Anwesenheit des *mlo5* Resistenzgenes stärker als in der anfälligen Interaktion. Dies deutet darauf hin, dass die *mlo*-vermittelte Resistenz auf einem komplexen Abwehrmechanismus beruht. Möglicherweise lässt sich damit auch die Dauerhaftigkeit der *mlo*-vermittelten Resistenz im Feld erklären. Das ermittelte Kandidatengenset von in der Epidermis exprimierten Genen stellt eine wertvolle Ressource für nachfolgende Studien von Abwehrmechanismen der Pflanze im Allgemeinen und für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der *mlo*-vermittelten-Resistenz im Speziellen dar. Das gesamte Kandidatengenset wurde in einem systematischen TIGS-Screening (*Transient Induced Gene Silencing*) getestet, wobei ein Gen gefunden wurde, welches die Resistenz der vollständig resistenten Gerstenlinie Ingrid BC *mlo5* durchbricht. Hierbei handelt es sich um das am Vesikeltransport beteiligte t-SNARE-Protein HvSNAP34. In ersten weiterführenden Experimenten wurden einzelne in *mlo5* stärker exprimierte Kandidatengene auf ihre mögliche Funktion im Resistenzmechanismus untersucht. Die Glutamat-Decarboxylase als Schlüsselenzym der GABA-Synthese ist ein solches Kandidatengene. GABA-Konzentrationen wurden gemessen und Resistenzinduktionsexperimente durchgeführt. Die Daten deuten darauf hin, dass GABA möglicherweise eine Rolle bei der anaplerotischen Reaktion, nicht aber bei der Signaltransduktion in der Zelle, spielt.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor agriculturarum (Dr. agr.) der  
Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplombiologe Uwe Zierold  
geb. am 20.11.1969 in Meerane

Halle/Saale 01/2005

---

Institut für Pflanzenzüchtung von Pflanzenschutz

**Abstract**

**“Gene expression in the epidermis of powdery mildew-attacked barley carrying the *mlo* resistance gene”**

The shoot epidermis of plants is of prime importance for host and nonhost defence against a large number of fungal diseases including powdery mildew of barley, caused by *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer *f.sp.* hordei. In order to better understand mechanisms within the epidermis leading to susceptibility as well as durable host resistance, we characterized the transcriptome of two *Blumeria*-attacked, near isogenic barley lines differing in the presence of the *mlo5* resistance gene. A cDNA array from epidermal tissue of pathogen-attacked resistant barley plants was established containing 3.136 unique sequences that was then hybridized with cDNA probes from pathogen-challenged epidermis. Expression analysis resulted in the identification of 233 candidate genes that were differentially expressed in a reproducible manner in control and inoculated epidermis. Among the upregulated genes 26 of fungal origin were found. Split-sample-experiments revealed a bias for expression of defence-related genes in the epidermis. Transcripts of many defence-related genes accumulated to higher levels in the presence of the *mlo5* resistance gene, as compared to a susceptible interaction. This suggests that *mlo*-mediated resistance is based on multiple defence mechanisms leading to durable resistance even under field conditions. The identified set of epidermally expressed host genes represents a valuable resource for further studies of plant defence mechanisms in general and especially the molecular mechanisms involved in *mlo* mediated resistance. TIGS (transient induced gene silencing) approaches were used for candidate genes in order to identify genes which are essentially responsible for *mlo*-resistance. HvSNAP34 was identified as a first candidate leading to the offset of resistance in Ingrid BC *mlo5* in the silencing approach. HvSNAP34 encodes a vesicel trafficking associated t-SNARE protein. Further experiments to elucidate the functional relevance of interesting candidate genes in this plant pathogen interaction were initiated. In the context of these analyses glutamate decarboxylase producing  $\gamma$ -aminobutyric acid was found to be induced in epidermal tissue. Therefore we measured  $\gamma$ -aminobutyric acid concentrations and carried out resistance induction experiments. The data suggest a possible role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in the anaplerotic reaction rather than in signal transduction.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor agriculturarum (Dr. agr.) der  
Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplombiologe Uwe Zierold  
geb. am 20.11.1969 in Meerane

Halle/Saale 01/2005

### Lebensabschnitt

Ich mache eine Amnestie  
Aus herzlichem Verlangen.  
Und sei auch Du und sein auch Sie  
Zu mir ganz unbefangen.

Das Leben ist ein Rutsch-Vorbei.  
Nur das, was echt gewesen,  
Nährt weiterhin. –Ein Besen,  
Zu wild geschwenkt, schlägt viel enzwei.

Seid gut zu mir und macht Radau,  
Verzeihend und auch Reue!  
Wollt ihr? Wer reist aufs neue  
Mit mir ins Himmelblau?

Joachim Ringelnatz

## Vorwort

An dieser Stelle soll es nicht um Stress bei Pflanzen sondern vielmehr um Stress in meinem sozialen Umfeld gehen. Ich weiß, dass ich positiven als auch negativen Stress induziert habe. Egal, um welche Art Stress es sich handelte, möchte ich mich für das bedanken, was bei den Pflanzen als Pathogenantwort bezeichnet wird.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Dr. Patrick Schweizer danken, von dem die Idee für diese Arbeit stammt und der mich stets freundschaftlich betreut hat. Er wird mir mit seiner Beharrlichkeit immer Vorbild bleiben. Herrn Professor Dr. Holger Deising möchte ich für die Betreuung in der Endphase meiner Arbeit und die Begutachtung der Arbeit danken. Herrn Professor Dr. Andreas Graner möchte ich ebenfalls für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. Lothar Altschmied, der mir bei schwierigen Problemen der Arrayerstellung und Auswertung stets behilflich war, Herrn Dr. Volodja Radschuk, der mich bei der Erstellung der cDNA-Bank unterstützte, Herrn Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei, in dessen Labor die GABA-Messungen durchgeführt wurden, Herrn Dr. Uwe Scholz und Matthias Lange mit denen ich bei der Sequenzanalyse der HO-EST-Bank zusammenarbeitete und Herrn Dr. Mitko Douchkov der mir sein *know how* für die Erstellung der RNAi-Bibliothek weitergab.

Ich möchte mich recht herzlich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken. Großen Anteil am Gelingen meiner Arbeit hatte Frau Gabi Brandtin. Ich möchte mich bedanken bei Frau Ines Walde, die den Array und ab und an mit mir spottete, bei Frau Susanne König, bei Frau Sonja Genz, bei Frau Stefanie Lück, bei Manuela Knauff, bei Frau Bettina Brückner, bei Herrn Roland Schnee, bei Mr. Vasu Kumanduri und bei Thomas Münch.

Für die Durchsicht des Manuskriptes möchte ich mich bei Herrn Dr. Patrick Schweizer, bei meiner Freundin Astrid Vorwieger, bei Ines Walde, Anja Hahnemann, Sebastian Eulenstein und Corinn Espig bedanken.

Ich möchte mich bei allen Freunden/innen bedanken die mir Mut zugesprochen und die zu mir gestanden haben. Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Großvater danken, die mir in einer Zeit finanzieller und persönlicher Abhängigkeit Sicherheit und Optimismus gegeben haben.

Wäre interessant, welche Gene bei positivem als auch negativem Stress induziert bzw. reprimiert werden. Manche Leute sind ja bekanntlich resistent und manche anfällig. Nichtsdestotrotz möchte ich mich bei allen nochmals recht herzlich bedanken, egal welche phänotypischen Ausprägungen charakteristisch waren. Und Dank denen, die ich in dieser kurzen Abhandlung vergessen habe. *You know, nobody is perfect* ☺.

Bemerkungen: Proteine (MLO), Gene (*Mlo*) und Mutanten (*mlo*) wurden entsprechend den *Arabidopsis*-Nomenklaturregeln dargestellt. Entlehnte fremdsprachliche Wörter wurden *kursiv* gedruckt. Die Arbeit wurde nach den Regeln der "neuen Rechtschreibung" verfasst.

## Eigene Veröffentlichungen

### Zeitschriften:

Zierold, U., Scholz, U. and Schweizer, P. (2004) Influence of the *mlo* resistance gene on gene expression in powdery mildew-attacked epidermal cells of barley; *Molecular Plant Pathology* 6 (2): 139-151

Temp, U., Zierold, U., Eggert, C. (1999) Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*; *Gene* 236, 169-177

Maucher, H., Stenzel, I., Miersch, O., Stein, N., Prasad, M., Zierold, U., Schweizer, P., Dorer, C., Hause, B., Wasternack, C. (2004) The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)-cloning and organ-specific expression; *Phytochemistry* 65(7): 801-811

Zhang, H., Sreenivasulu, N., Weschke, W., Stein, N., Rudd, S., Radchuck, V., Potokina, E., Scholz, U., Schweizer, P., Zierold, U., Langridge, P., Varshney, R. K. and Graner, A. (2004) Determination of Structure and Size for the Barley Transcriptome Based on Expressed Sequence Tag (EST); *The Plant Journal* 40, 276-290

Douchkov, D., Nowara, D., Zierold, U., Schweizer, P. (2005) A high-throughput gene silencing system for the functional assessment of defence related genes in barley epidermal cells; *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (8): 755-761

### Vorträge:

Zierold, U.; Schweizer, P., (2004) Transkriptomanalyse mehltaubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des *mlo*-Resistenzgens. Tagung der DPG Arbeitskreise Mykologie und Wirt-Parasit-Beziehungen

Zierold, U.; Schweizer, P., (2003, 2004) Transkriptomanalyse mehltaubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des *mlo*-Resistenzgens. Kolloquien für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz

### Poster:

Zierold, U.; Schweizer, P., (2001) The interaction transcriptome of *mlo*-resistant barley “Durable Resistance in Cereals-SAR and other strategies to improve plant production”, SAR Workshop, Rauischholzhausen

Zierold, U.; Schweizer, P., (2002) The transcriptome of powdery mildew-attacked *mlo*-resistant barley, Plant Genomics European Meetings, Berlin

Zierold, U.; Schweizer, P., (2002) The interaction transcriptome of *mlo*-resistant barley, 6<sup>th</sup> Gatersleben Research Conference, Meisdorf

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Vorwort</b> .....	<b>IV</b>
<b>Eigene Veröffentlichungen</b> .....	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Abwehrsystem der Pflanzen.....	1
1.1.1 Pathogenerkennung .....	2
1.1.2 Unspezifische Elizitoren.....	2
1.1.3 Spezifische Elizitoren und R-Protein-vermittelte Resistenz .....	3
1.1.4 Reaktionen der Pflanze nach Pathogenkontakt .....	4
1.1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies.....	5
1.1.4.2 Hypersensitive Reaktion .....	5
1.1.4.3 Induktion von pathogenassoziierten Genen .....	5
1.1.4.4 Induzierte Resistenz .....	6
1.2 Die Interaktion zwischen Gerste und <i>Blumeria graminis</i> .....	6
1.2.1 Die Kulturpflanze Gerste.....	7
1.2.2 Die Echten Mehltaupilze .....	7
1.2.3 Resistenzen in Gerste .....	7
1.2.4 Entwicklung von <i>Blumeria graminis</i> auf Gerste.....	9
1.2.5 Physiologie, Genexpression und Enzyme in <i>Blumeria graminis</i> .....	12
1.2.6 Antwort der Gerste nach Inokulation mit <i>Blumeria graminis</i> .....	12
1.2.6.1 Frühe zelluläre Ereignisse .....	12
1.2.6.2 Papillenbildung.....	13
1.2.6.3 Hypersensitive Reaktion .....	13
1.2.7 Induzierte Resistenz in Gerste.....	14
1.2.8 Expression von pathogenregulierten Komponenten der Gerste .....	14
1.2.9 Bedeutung des Pathosystems Echter Mehltau und Gerste .....	15
1.3 Die <i>mlo</i> -vermittelte Breitband-Resistenz .....	16
1.3.1 Der <i>mlo</i> -Resistenz-Phänotyp.....	16
1.3.2 Die Gen- und Protein Struktur von <i>Mlo</i> und <i>mlo</i> .....	16
1.3.3 Die biologische Funktion von MLO .....	18
1.3.4 <i>Downstream</i> -Komponenten der <i>mlo</i> -Resistenz.....	18
1.4 Genomforschung in Gerste.....	19
1.4.1 Strukturelle Genomforschung .....	19
1.4.2 cDNA-Banken und EST-Datenbanken .....	20
1.4.3 Funktionelle Genomforschung .....	21
1.4.3.1 Transkriptomanalysen .....	22

1.4.3.2 Revers-genetische Ansätze.....	23
1.5 Ziel der Dissertation.....	25
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1 Das Pathosystem Gerste und Mehltau.....	27
2.1.1 Versuchsorganismen.....	27
2.1.2 Anzucht der Versuchspflanzen.....	27
2.1.3 Erhaltung und Konidienproduktion von <i>Blumeria graminis</i> .....	27
2.1.4 Inokulation der Versuchspflanzen im Pflanztopf.....	28
2.1.5 Biologisches Material für HO-cDNA-Bank und für Expressionsanalysen.....	28
2.2 Die HO-cDNA-Bank.....	29
2.2.1 Erstellung der HO-cDNA-Bank.....	29
2.2.1.1 RNA-Isolation.....	29
2.2.2 mRNA-Isolation.....	30
2.2.1.3 cDNA-Synthese, Klonierung und Transformation.....	30
2.2.1.4 Etablierung der HO-cDNA-Bank.....	31
2.2.3 EST-Sequenzierung und Analyse der HO-cDNA-Bank.....	31
2.3 Transkriptomanalyse der Interaktion Gerste und <i>Bgh</i> mittels Makroarray.....	32
2.3.1 Herstellung der HO-Array Membran.....	32
2.3.1.1 Neuordnung der cDNA-Klone des Unigensets.....	32
2.3.1.2 PCR-Amplifikation der cDNA-Klone des Unigensets.....	33
2.3.1.3 Übertragen der DNA-Fragmente auf die Arraymembran.....	33
2.3.1.4 Anordnung der <i>Spots</i> auf der Membran.....	34
2.3.1.5 Nachbehandlung der hergestellten Arraymembranen.....	34
2.3.2 Herstellung von cDNA-Sonden aus Epidermis- und Blattmaterial.....	35
2.3.2.1 RNA-Isolation.....	35
2.3.2.2 mRNA-Isolation.....	35
2.3.2.3 Synthese von cDNA.....	35
2.3.2.4 Radioaktive Markierung der cDNA mit <sup>33</sup> P.....	36
2.3.3 Hybridisierung des Makroarrays mit <sup>33</sup> P-markierten cDNA-Sonden.....	36
2.3.4 Datenerfassung- und -analyse des <sup>33</sup> P-markierten cDNA-Makroarrays.....	37
2.3.4.1 Array-Scanning.....	37
2.3.4.2 Quantitative Bildanalyse.....	37
2.3.4.3 Normalisierung.....	38
2.3.4.4 Qualitätskontrolle.....	38
2.3.4.5 Genexpressions-Clusteranalyse.....	38
2.3.5 Entfernen von cDNA-Sonden von der Arraymembran.....	38
2.4 <i>Northern-Blots</i> .....	39
2.4.1 RNA-Isolation aus Blattmaterial der Gerste für <i>Northern-Blots</i> .....	39
2.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese zur Trennung von RNA.....	39
2.4.3 RNA-Transfer auf positiv geladene Nylonmembran ( <i>Blotten</i> ).....	40
2.4.4 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten für <i>Northern-Hybridisierung</i> ....	40
2.4.5 Hybridisierung der <i>Northern-Blots</i> .....	41
2.4.6 Detektion der mRNA-Transkripte.....	41
2.5 Unterscheidung zwischen <i>Blumeria</i> - und Gerste-Transkripten.....	41
2.5.1 Isolation genomischer DNA von Gerste und <i>Bgh</i> .....	41

2.5.2 PCR-Amplifikation aus genomischer DNA von Ingrid <i>mlo5</i> und <i>Bgh</i> .....	42
2.6 Funktionelle Untersuchung der Kandidatengene mittels TIGS .....	43
2.6.1 Herstellung der RNAi-Konstrukte für TIGS .....	45
2.6.1.1 PCR-Amplifikation der HO-cDNA-Templates und Aufreinigung der Fragmente.....	46
2.6.1.2 Subklonierung der DNA-Fragmente in pIPKTA33 .....	48
2.6.1.3 Klonierung in RNAi-Kassette pIPKTA30N .....	48
2.6.2 TIGS: Vom Biolistischen Gentransfer bis zur Detektion transformierter Zellen ...	49
2.6.2.1 Präparation der Gold-Suspension.....	50
2.6.2.2 Vorbereiten der Blattsegmente für den Beschuss .....	50
2.6.2.3 Beschichtung der Goldpartikel.....	51
2.6.2.4 Vorbereitung der Makrocarrier-Scheiben und der Zerreischeibe.....	51
2.6.2.5 Bombardementformation der Genkanone .....	51
2.6.2.6 Inkubation und Inokulation bombardierter Blattsegmente.....	52
2.6.2.7 GUS-Färbung transformierter Zellen .....	52
2.6.2.8 Coomassie-Färbung der Blattsegmente.....	52
2.6.2.9 Entfärbung der Blattsegmente.....	53
2.6.2.10 Mikroskopie der Blattsegmente .....	53
2.7 Messung von Aminosäure-Gehalten in der Epidermis und im ganzen Blatt.....	53
2.8 Standardprotokolle und -lösungen .....	54
2.8.1 Bakterienstämme .....	54
2.8.2 Oligonukleotidprimer .....	54
2.8.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA und DNA .....	54
2.8.4 Gelelektrophorese zur Trennung von DNA nach der Fragmentgröße .....	54
2.8.5 Präparation transformations-kompetenter Bakterienzellen.....	55
2.8.6 Transformation von kompetenten Bakterienzellen .....	55
2.8.7 Plasmid-Präparationen.....	56
2.8.8 Restriktionsverdau.....	56
2.8.9 Arbeiten mit RNA .....	56
2.8.10 Mikroskopie und Fotografie.....	56
2.8.11 Standardlösungen .....	57
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
3. 1 Die HO-cDNA-Bank aus der Epidermis mehлтаubfallener Gerste.....	59
3.1.1 Sequenzvergleiche gegenüber Gen- bzw. Proteindatenbanken.....	60
3.1.2 Die Komplexität der HO-cDNA-Bank: Definition des Unigensets .....	61
3.1.3 Vergleich der HO-cDNA-Bank mit der IPK-EST-Kollektion (135031 ESTs).....	61
3.1.4 Pilzgene in der HO-cDNA-Bank.....	62
3.2 Transkriptomanalyse .....	63
3.2.1 Globale Transkriptmusteranalyse.....	65
3.2.2 Kandidatengenset .....	66
3.2.2.1 Kriterien für die Auswahl des Kandidatengensets .....	66
3.2.2.2 Zeitlicher Verlauf der Genexpression nach Pathogenbefall.....	67
3.2.2.3 Bildung von funktionellen Kategorien innerhalb des Kandidatengensets .....	68
3.2.2.4 Transkriptmusteranalyse der pflanzlichen Kandidatengene .....	69
3.2.2.5 Regulationsfaktoren innerhalb der funktionellen Kategorien .....	70
3.2.2.6 Detektion genotypspezifisch exprimierter Gene .....	72

3.2.2.7 Elektronischer <i>Northern</i> des Kandidatengensets .....	75
3.2.3 Lokalisierung der Genexpression .....	77
3.2.3.1 Theoretischer EM-Wert.....	77
3.2.3.2 Biologische und methodische Bestätigung der EM-Werte .....	78
3.2.3.4 Epidermissonden contra Mesophyllsonden.....	82
3.2.4 Qualität der hergestellten Arraymembranen .....	83
3.2.5 <i>Northern-Blots</i> zur Bestätigung der Arrayexperimente .....	86
3.2.6 Bestätigung der Arrayergebnisse in isogenen Linien Pallas und Pallas P22 .....	88
3.2.7 Unterscheidung zwischen pilzlichen und pflanzlichen ESTs.....	89
3.2.8 Bildung von Flavonoidderivaten, Indolalkaloiden und ligninartigen Substanzen ..	90
3.3 Systematisches TIGS- <i>Screening</i> aller Kandidatengene in <i>mlo</i> -resistenter Gerste.....	95
3.3.1 TIGS- <i>Screening</i> -Strategie .....	96
3.3.2 Klonierungsstrategie für RNAi-Konstrukte .....	96
3.3.3 Der Suszeptibilitätsindex (SI) .....	96
3.3.4 Auswertung der TIGS-Versuche und der Kontrollversuche .....	96
3.3.5 TIGS- <i>Screening</i> mit <i>Pools</i> von RNAi-Konstrukten.....	97
3.3.6 TIGS- <i>Screening</i> mit einzeln geschossenen RNAi-Konstrukten .....	98
3.3.7 Das RNAi-Konstrukt pIPKTA30_HO12F09 .....	99
3.4 Messung von $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und proteinogener Aminosäuren.....	100
3.4.1 Die Glutamat-Decarboxylase (GAD).....	100
3.4.2 GABA-Gehalte in Blättern von Gerste .....	101
3.4.3 Resistenzinduktionsexperimente: GABA als Signalmolekül.....	102
3.4.5 Gehalte proteinogener Aminosäuren.....	103
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>109</b>
4.1 Etablierung von Ressourcen.....	109
4.1.1 Die HO-cDNA-Bank.....	109
4.1.2 <i>Large-scale</i> -Transkriptomanalyse im Pathosystem Gerste und Mehltau.....	110
4.1.3 Das TIGS- <i>Screening</i> System.....	112
4.2 Das epidermale Transkriptom der Gerste nach Pathogenbefall.....	113
Suche nach genotypspezifischen Komponenten der <i>mlo</i> -vermittelten Resistenz bzw. der	
<i>Mlo</i> -vermittelten Anfälligkeit.....	115
Gewebespezifische Expression: pathogenregulierte Gene wurden stärker in der	
Epidermis exprimiert.....	117
4.3 Mechanismen der <i>mlo</i> - bzw. <i>Mla</i> -vermittelten Resistenz.....	123
4.4 Weiterführende funktionelle Analysen .....	126
4.4.1 TIGS- <i>Screening</i> für 128 pathogeninduzierte Kandidatengene .....	126
4.4.2 Die Rolle von $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) in der <i>mlo</i> -vermittelten Resistenz ..	128
4.4.3. Die Messung aller proteinogenen Aminosäuren .....	130
4.5 Ausblick .....	130
<b>Thesen.....</b>	<b>133</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>Werdegang .....</b>	<b>159</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>161</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	entionisiertes von organischen Bestandteilen befreites Wasser (MilliQ-Anlage)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Avr-Gen	Avirulenz-Gen (vom Pathogen exprimiert)
BC	Rückkreuzung ( <i>backcross</i> )
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
<i>Bgt</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. tritici</i> (Echter Weizenmehltau)
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BlastN	Nukleotidsequenz der Abfrage wird mit einer Nukleotiddatenbank verglichen
BlastX	Proteinsequenz der Abfrage wird mit einer Proteindatenbank verglichen
bp	Basenpaare ( <i>base paires</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus (cauliflower mosaik virus)
CC	<i>coiled-coil</i> -Anhang
cDNA	komplementäre-DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CR-EST	<i>Crop-EST</i> -Datenbank des IPK
CTP	Cytosintriphosphat
cv.	Sorte (cultivar)
CWA	Papillen ( <i>cell wall appositions</i> )
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure ( <i>2,6-dichloroisonicotinic acid</i> )
DI	Differentialindex
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EM-Wert	Verhältnis der Transkriptabundanz eines Gens von Epidermis und Mesophyll
ESH	Sekundärhype ( <i>elongating secondary hyphae</i> )
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
E-Werte	<i>E-value</i>
<i>f.sp.</i>	<i>forma specialis</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure ( <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> )
GABI	Genominitiative im biologischen System Pflanze
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GFP	grünes fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GLP	Germin ähnliches Protein ( <i>germin like proteine</i> )
GTP	Guanidintriphosphat
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
HAU	Haustorium
HMFM	<i>Hogness Modified Freezing Medium</i>
HO	Identifikationscode der „HO-cDNA-Bank“ des IKP
hpi	Stunden nach der Inokulation ( <i>hours post inoculation</i> )
HR	Hypersensitive Reaktion ( <i>hypersensitive response</i> )

ID	Identifikationscode
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
IR	Induzierte Resistenz
ISR	<i>Induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonat
kB	Kilobase(n)
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LRR	Leucin reiche Wiederholung ( <i>leucin rich repeat</i> )
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
Mb	Megabasen
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MOPS	Morpholin-3-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBS	<i>Nukleotide binding site</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat (Zucker: Ribose; ATP, GTP, CTP, UTP)
OD	Optische Dichte
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PGRC	<i>Plant genome resources centre</i>
psi	<i>pounds per square inch</i>
R-Gen	resistenzvermittelndes Gen
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen spesies</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	<i>Real-time-PCR</i>
SA	Salizylsäure
SAGE	<i>Serial analysis of gene expression</i>
SAR	SA-abhängige Resistenz ( <i>systemic acquired resistance</i> )
SCRI	<i>Scottish Crop Research Institute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
SNAP	<i>Synaptosome associated protein</i>
SNARE	SNAP-Rezeptor
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Natriumchlorid und -citrat ( <i>sodium-salt-citrat</i> )
TIGS	<i>Transient induced gene silencing</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-SNARE	<i>Target-SNARE</i>
TTP	Thymidintriphosphat
U	enzymatische Einheit ( <i>Unit</i> )
UV	ultraviolett
VIGS	<i>Virus induced gene silencing</i>
v-SNARE	<i>Vesikel-SNARE</i>



# 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit handelt von Stress bei Pflanzen, Stress der in diesem Fall von dem obligat biotrophen Pathogen, dem Verursacher des Echten Mehltaus an Gerste (*Blumeria graminis* hordei) verursacht wird. Das charakteristische durch den Echten Mehltau verursachte Schadbild, dem der Mehltau seinen Namen verdankt, ist ein dichter weißer Belag aus Myzel und massiv produzierten, mehlig rieselnden Konidiosporen auf der Sprosssepidermis der befallenen Pflanzen. Echter Mehltau verursacht einen enormen wirtschaftlichen Schaden. Bis zu 10% der Ernteaufträge bei Gerste werden auf Mehltau zurückgeführt (Jørgensen 1994). Neben der wirtschaftlichen Bedeutung des Pathosystems, handelt es sich bei Gerste und Mehltau um eines der bestuntersuchteten Pflanze-Pathogen-Interaktionssysteme überhaupt.

Pflanzen reagieren auf Pathogene mit der Ausbildung verschiedenster Abwehrmechanismen, die sich unter anderem auf transkriptioneller Ebene zeigen. Einleitend wurde das Abwehrsystem von Pflanzen im Allgemeinen (Kapitel 1.1) und das im Rahmen der Arbeit verwendete Modellsystem *Blumeria* und Gerste betrachtet (Kapitel 1.2). Fokussiert wurde dabei auf die papillenassoziierte *mlo*-vermittelte Resistenz in Gerste, welche in der vorliegenden Arbeit auf transkriptioneller Ebene näher untersucht wurde (Kapitel 1.3). Da mit der Erstellung der HO-cDNA-Bank und der Untersuchung des Transkriptoms grundlegende Ressourcen für die Genomforschung im Pathosystem Gerste und Mehltau geschaffen wurden, wurde ein umfassenderes Kapitel über die Genomforschung in Gerste in die Einleitung integriert (Kapitel 1.4).

## 1.1 Das Abwehrsystem der Pflanzen

Neben den präformierten Abwehrmechanismen (Kutikula, Enzyminhibitoren, Sekundärmetabolite, etc.) existiert bei Pflanzen ein dem angeborenem Immunsystem der Säuger (*innate immunity system*) (Medzhitov und Janeway 1997), ähnelndes aktives Abwehrsystem. Ein spezifisches Immunsystem, wie es von Wirbeltieren bekannt ist, existiert hingegen nicht. Basis des Abwehrsystems ist die Fähigkeit zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden. Verantwortlich hierfür sind Rezeptoren des Wirtes, die sogenannte Elizitoren erkennen. Elizitoren sind Moleküle, die vom eindringenden Organismus abgegeben werden oder die

durch Abbau pflanzlicher Substanz entstehen. Sie lassen sich in spezifische und allgemeine Elizitoren unterscheiden. Interessanterweise wurden in Pflanzen Elizitoren und Rezeptoren gefunden, die denen der Tiere ähneln (Nürnberger und Brunner 2002; Panstruga und Schulze-Lefert 2003). Wie bei der inflammatorischen Reaktion bei Tieren kommt es auch in Pflanzen zu einer Reihe von Abwehrreaktionen. So wurde die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reaktive oxygen spezies*) (Hückelhoven und Kogel 2003) und die Akkumulation von Stickstoffmonoxid (NO) gezeigt (Wendehenne *et al.* 2004). Weiterhin kommt es zur hypersensitiven Reaktion (HR), die Parallelen zur Apoptose in tierischen Zellen aufweist (Lam *et al.* 2001). Auch die Signalweitergabe durch MAPK-Kaskaden (*mitogen activated protein kinases cascades*) (Zhang und Liu 2001) und Bildung von Phytoalexinen (Hammerschmidt und Kagan 2001) sind typische Abwehrreaktionen. Die Zellwand, ein charakteristisches Merkmal von pflanzlichen Zellen, kann nach Pathogenbefall durch Abgabe von extrazellulären Substanzen, wie zum Beispiel Kallose (Jacobs *et al.* 2003) und Lignin (von Röpenack *et al.* 1998) verstärkt werden. Für die Signalübertragung bei der Pathogenabwehr in Pflanzen werden verschiedene, sich zum Teil überlagernde Signalwege diskutiert in denen Signalmoleküle wie Jasmonsäure (JA), Ethylen oder Salizylsäure (SA) eine wichtige Rolle spielen (Conrath *et al.* 2002).

Pflanzen werden in Bezug auf Pathogene in Wirtspflanzen und Nichtwirtspflanzen eingeteilt. Pflanzliche Resistenzen werden dementsprechend in Nichtwirtsresistenzen und Wirtsresistenzen unterschieden. Mit Nichtwirtsresistenz wird die Tatsache bezeichnet, dass Pflanzenarten generell von der großen Mehrzahl verschiedenster Mikroorganismen nicht befallen werden. Dies ist natürlich die häufigste Form der pflanzlichen Resistenz. Nichtwirtsresistenz basiert auf präformierten Abwehrbarrieren oder, wie die Wirtsresistenz, auf induzierbaren Abwehrmechanismen (Mysore und Ryu 2004). Demgegenüber steht die Wirtsresistenz (Basiskompatibilität) gegenüber Mikroorganismen: Wirtspflanzenarten werden je nach Varietät oder Rasse der Pflanze und des Mikroorganismus befallen bzw. sind resistent. Bei den bekannten R-Gen vermittelten Resistenzen handelt es sich um derartige Wirtsresistenzen (McDowell und Woffenden 2003).

### 1.1.1 Pathogenerkennung

Neben der Erkennung durch physikalische Veränderungen der Pflanzenzellen während des Befallsprozesses, erkennen Pflanzen Pathogene durch Signalmoleküle, die als Elizitoren bezeichnet werden. Elizitoren stimulieren die Pathogenabwehr über eine Reihe von Signalkaskaden. Molekulare und physiologische Funktionen von Elizitoren sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Elizitorstrukturen sind (Glyko)Proteine, Peptide und Kohlenhydrate, die einzig in verschiedenen Pathogenen, nicht aber in der Pflanze vorkommen. Es kann sich auch um spezifische Abbauprodukte handeln, die nur durch Interaktion mit Pathogenen entstehen (Nürnberger und Scheel 2001). Elizitoren lassen sich in spezifische und unspezifische Elizitoren unterscheiden, wobei es sich im ersten Fall um Produkte von *Avr*-Genen (*Avirulenz-Genen*) der Pathogene handelt, auf die im Kapitel 1.1.3 „R-Gen-vermittelte Resistenz“ eingegangen wird.

### 1.1.2 Unspezifische Elizitoren

Typische, aus der pilzlichen Zellwand bekannte, unspezifische Elizitoren, sind Peptidoglycane aus grampositiven Bakterien, das bakterielle Geißelprotein Flagellin, Chitinfragmente, Mannane, Ergosterol und Proteine (Boller und Keen 1999). Eine Reihe dieser Substanzen wurden sowohl in Pflanzen als auch in Tieren beschrieben. Unspezifische

Elizitoren, die im Wirt nicht vorkommende molekulare Muster aufweisen, für das Pathogen essentiell und für ganze Pathogengattungen charakteristisch sind, werden im Vergleich mit dem angeborenen Immunsystem der Tiere als PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) bezeichnet (Medzhitov und Janeway 1997).

Ein gut untersuchter unspezifischer Elizitor mit typischen PAMP-Merkmalen ist PEP13, ein internes Peptidfragment eines Glycoproteins (42 kDa), das für eine kalziumabhängige Transglutaminase kodiert und aus der Zellwand von *Phytophthora sojae* isoliert wurde. Das auf Arten der Gattung *Phytophthora* beschränkte Motiv PEP13 induziert zahlreiche Abwehrgene und Phytoalexine in Zellen der Nichtwirtspflanzen Petersilie und Kartoffel (Nürnberger und Brunner 2002).

Weitere prominente Beispiele von Elizitoren mit PAMP-Struktur sind das bakterielle Flagellin flg 22 (Zipfel *et al.* 2004) und pilzliches Chitin (Ramonell *et al.* 2002). Kohlenhydratmoleküle (Schweizer *et al.* 2000) bzw. Cutinmonomere wurden ebenfalls beschrieben (Schweizer *et al.* 1996). Während zahlreiche hochaffine Bindungsstellen für PAMPs (zum Beispiel Elizitine, Chitin, PEP13, Hepta- $\beta$ -glukosid) beschrieben wurden (Nürnberger und Brunner 2002), ist nur ein molekular charakterisierter PAMP-Rezeptor bekannt. Dieser mit FLS2 bezeichnete Rezeptor erkennt Flagellin. FLS2 ist eine transmembrane Rezeptorkinase mit externer LRR-Domäne (*leucin rich repeat*, Leucin reiche Wiederholung) und cytosolischer Serin-Threonin-Kinase-Domäne, die dem R-Protein Xa21 aus Reis ähnelt (Gomez-Gomez *et al.* 2001). Die Signalweitergabe des FLS2 Rezeptors erfolgt in einer MAPK-Kaskade (Asai *et al.* 2002) und mündet beim intakten Rezeptor in der Induktion von zahlreichen Abwehrgenen (Zipfel *et al.* 2004). Möglicherweise erfolgt die Signalübertragung bei PAMP-Rezeptoren ähnlich wie bei R-Proteinen (siehe GUARD-Hypothese).

### 1.1.3 Spezifische Elizitoren und R-Protein-vermittelte Resistenz

R-Proteine, die Produkte der R-Gene, vermitteln kultivarspezifische Wirtsresistenz gegenüber einer ganzen Reihe von Krankheiten, die von Bakterien, Viren, Pilzen und Nematoden ausgelöst werden. Die genetische Basis des Phänomens der R-Gen vermittelten Resistenz wurde von Flor, nach Untersuchungen des Pathosystems Flachs und Flachsrost (*Melampsora lini*) erkannt und mit der Gen-für-Gen Hypothese beschrieben (Flor 1971). Die Gen-für-Gen Hypothese besagt, dass es zu jedem Resistenzgen (*R-Gen*) der Pflanze ein Avirulenzgen (*Avr-Gen*) des Pathogens gibt (korrespondierende Gene). Fehlt eines der beiden Gene bzw. Genprodukte kommt es zur Besiedelung der Pflanze. Biochemisch betrachtet ergibt sich daraus folgendes hypothetisches Szenario. AVR-Proteine (spezifische Elizitoren) werden vom Pathogen abgegeben und von sogenannten R-Proteinen, die sich an der Zelloberfläche bzw. im Zellinneren befinden, erkannt.

Durch molekularbiologische Ansätze konnte die Struktur, Lokalisation und Funktion der R-Proteine teilweise aufgeklärt werden. Es wurde gezeigt, dass R-Proteine im Zytoplasma oder in der Zellmembran lokalisiert sind (Schulze-Lefert und Vogel 2000). Die große Mehrzahl der R-Gen-Allele kodiert für NBS-LRR-Proteine (*nucleotide-binding-site-leucin rich-repeat-proteins*) die eine Nukleotid-Bindungsstelle und eine Wiederholung von leucin-haltigen Motiven aufweisen. Das charakteristischste Merkmal von LRRs ist, dass sie als Protein-Protein- oder Protein-Kohlenhydrat-Interaktionsstellen funktionieren (Kobe und Deisenhofer 1994). NBS-LRR-Proteine haben unterschiedliche N-terminale Enden, entweder einen CC-Anhang (*coiled-coil-Anhang*) oder eine Domäne des Toll-Rezeptors aus *Drosophila* beziehungsweise des aus Säugern bekannten IL-1 Rezeptors. Derartige Rezeptoren werden auch als TIR-Rezeptoren (*Toll/Interleukin 1 resistance domain*) bezeichnet.

Aufgrund ihrer Struktur lassen sich R-Gene in fünf Gruppen einteilen. Gut untersuchte NBS-LRR-Proteine aus *Arabidopsis* sind zum Beispiel RPM1, das Resistenz gegen *Pseudomonas*

*syringae* und *Mi*, das Resistenz gegen Nematoden und Blattläuse vermittelt. Weitere charakteristische Vertreter von R-Proteinen sind *Pto* aus Tomate und *Xa21* aus Reis. Beide weisen eine Serin-Threonin-Kinase-Domäne auf, wobei *Xa21* im Gegensatz zu *Pto* eine Transmembrandomäne sowie einen LRR besitzt. Den R-Proteinen Cf-9 bzw. Cf-2 in Tomate fehlt dagegen die Serin-Threonin-Kinase, eine Transmembrandomäne sowie ein LRR sind vorhanden (Dangl und Jones 2001). Auch *Mla* aus Gerste, das Mehlauresistenz vermittelt, gehört wie die meisten R-Gene zur Gruppe der NBS-LRR-Proteine (Shen *et al.* 2003).

Durch die vollständigen Genomanalysen von Reis und *Arabidopsis* wurde bekannt, dass Pflanzen ein beträchtliches Arsenal an R-Genen aufweisen. So wurden in *Arabidopsis* ca. 130 und in Reis ca. 600 verschiedene R-Gene der NBS-LRR Gruppe gefunden. Während von den *Arabidopsis*-Genen 85 ein TIR Motiv aufwiesen, fehlt dieses in Reis (Goff *et al.* 2002).

Jedes R-Protein hat die Aufgabe, ein AVR-Signal zu erkennen und *downstream*-Komponenten zu aktivieren, die letztlich die Abwehrreaktion der Pflanze auslösen. Das einfachste Modell für das Zusammenspiel zwischen dem intrazellulär bzw. membranständig lokalisierten R-Protein und dem AVR-Protein ist eine direkte Interaktion (Ligand-Rezeptor-Modell) (Bent 1996). Obwohl in *in vitro* Studien von wenigen R/AVR Paaren gezeigt werden konnte, dass dies geschieht (die PTO-Kinase der Tomate interagiert direkt mit dem AVR-PTO-Protein von *P. syringae* (Pedley und Martin 2003); ein AVR-PITA/PITA-Komplex entsteht bei der Interaktion von Reis und *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.* 2000)), ist es unwahrscheinlich, dass AVR- und R-Proteine allein für die Erkennung und Signalübertragung stehen, da in zahlreichen detaillierten Untersuchungen von anderen AVR-R-Paaren keine direkte Interaktion gefunden werden konnte.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen gibt die Guard-Hypothese. Danach existieren im Wirt sogenannte Virulenz-Targets, an welche die AVR-Proteine zunächst binden. Durch Konformationsänderung werden die Virulenz-Target-AVR-Komplexe aktiviert. Diese Komplexe wirken als Elizitoren sortenspezifischer Resistenzreaktionen, die von R-Proteinen erkannt werden (Van der Hoorn *et al.* 2002). Die Guard-Hypothese konnte durch Untersuchungen in verschiedenen Pflanze-Pathogen-Interaktionen erhärtet werden. Van der Hoorn *et al.* (2002) zeigen 9 R-Protein-Komplexe, die nach der Guard-Hypothese zu funktionieren scheinen (zum Beispiel Cf-2/Rcr3/Avr2 sowie RPM1/RIN4AvrRPM1).

Wie genau Signale nach der Erkennung durch R-Gene bzw. PAMP-Rezeptoren weitergegeben werden, kann noch nicht schlüssig erklärt werden. Möglicherweise ähneln PAMP-Rezeptoren den R-Gen-Rezeptoren, wie für den FLG2-Rezeptor und die LRR-Rezeptorkinase *Xa21* aus Reis gezeigt werden konnte. (Gomez-Gomez *et al.* 2001). Offensichtlich ist, dass sich die Abwehrreaktionen, die durch unspezifische Elizitoren bzw. AVR-Proteine ausgelöst werden, stark ähneln, wenngleich erstere selten HR auslösen (Mysore und Ryu 2004).

### 1.1.4 Reaktionen der Pflanze nach Pathogenkontakt

Eine der frühesten pflanzlichen Reaktionen auf ein Pathogen ist die Öffnung spezifischer Ionenkanäle, die zur Depolarisation der Plasmamembran und zum Influx von Kalziumionen und zum Efflux von Kalium- und Chloridionen führt. Der Kalzium-Ioneneinfluss scheint für die Bildung von ROS notwendig zu sein (Scheel 1998). Es kommt zur Aktivierung von MAPK (Asai *et al.* 2002) und Phytooxylin-Kaskaden (Blee 2002). Der Pathogenerkennung folgen eine Reihe von Abwehrreaktionen der Pflanze. Im Mittelpunkt der Forschung stehen dabei die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (siehe Kapitel 1.1.5), die hypersensitive Reaktion (siehe Kapitel 1.1.6), die Verstärkung der Zellwand durch extrazelluläre Substanzen wie zum Beispiel Kallose (Jacobs *et al.* 2003) und Lignin (von Röpenack *et al.* 1998), die Bildung von Phytoalexinen (Hammerschmidt und Kagan 2001) und die Akkumulation von

PR-Proteinen, die mit den zuvor genannten Phänomenen in Zusammenhang steht (siehe Kapitel 1.1.4.3). Induzierte Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance* und ISR, *induced systemic resistance*, siehe Kapitel 1.1.4.4), Suberisation (Bolwell *et al.* 1997), Hydroxyprolin reiche Glykoproteine (HRGPs, *hydroxyprolin rich glycoproteins*) (Raggi 2000) und die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO, *nitric oxide*) (Wendehenne *et al.* 2004) sind weitere untersuchte Phänomene.

#### 1.1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Die schnelle Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Wasserstoffperoxid: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Superoxidradikale: O<sub>2</sub><sup>-</sup> und freie Hydroxylradikale: OH<sup>·</sup>) nach Kontakt mit einem pflanzlichen oder tierischen Pathogen wird als oxidativer Ausbruch (*oxidative burst*) bezeichnet. Verantwortlich dafür ist möglicherweise eine NADPH-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase), die durch Depolarisation der Plasmamembran aktiviert wird. Die frühen aktiven ROS dienen möglicherweise als *Second-Messenger* für das Auslösen der HR und weiterer Abwehrreaktionen. ROS werden als Auslöser von SAR diskutiert, sind möglicherweise direkt toxisch für das Pathogen und sind an der Verstärkung der Zellwand durch Insolubilisieren und Quervernetzen (*crosslinken*) von Zellwandproteinen beteiligt (Wojtaszek 1997; Keller und Feuillet 2000; Hückelhoven und Kogel 2003).

#### 1.1.4.2 Hypersensitive Reaktion

Die hypersensitive Reaktion (*hypersensitive response*, hypersensitiver Zelltod, HR) ist ein Abwehrmechanismus von Pflanzen, der sich nach Infektion mit Pilzen, Bakterien oder Viren ereignet. An der Infektionsstelle sterben Zellen bzw. stirbt Gewebe ab, und es erscheinen manchmal braune, makroskopisch sichtbare Flecken. In einzelnen Zellen ist die HR nur mikroskopisch zu beobachten. Es wird angenommen, dass durch die HR das Wachstum und die Ausbreitung des Pathogens eingedämmt wird. Der Mechanismus der HR ähnelt dem apoptotischen Zelltod in Tieren, der sich beispielsweise durch Fragmentierung von DNA oder Anhäufung apoptotischer Zellkörper zeigt. Die HR-vermittelte Resistenz wird nach den Regeln der Gen-für-Gen Hypothese monogenetisch vererbt, wie aus der Untersuchung einer Reihe von Pflanzen/Pathogen-Interaktionen hervorging (Thordal-Christensen *et al.* 1997; Gilchrist 1998). Viele bekannte R-Gene vermitteln HR-Resistenz.

#### 1.1.4.3 Induktion von pathogenassoziierten Genen

In der vorliegenden Arbeit werden Gene, deren Transkripte nach Kontakt mit einem Pathogen bzw. einem Elizitor verstärkt akkumulieren (induzierte Gene) bzw. verschwinden (reprimierte Gene), mit dem Term pathogenregulierte Gene bezeichnet. Gene, die mit Resistenz bzw. Anfälligkeit assoziiert sind werden als resistenzassoziierte bzw. anfälligkeitsassoziierte Gene beschrieben. Andere aus der Literatur bekannte Bezeichnungen für Abwehrgene sind „*pathogen-responsive-genes*“, „*defence-responsive-genes*“ oder „*defence-related-genes*“. Eine ursprünglich identifizierte Kollektion von pathogenassoziierten Genen wurde mit dem Begriff „PR-Gene“ (*pathogenesis-related-genes*) bezeichnet und genauer untersucht. PR-Gene kodieren beispielsweise für Enzyme, welche die pilzliche Zellwand abbauen, für antimikrobiell wirkende Polypeptide, für Komponenten aus Signalübertragungskaskaden, für  $\beta$ -1-3-Glucanasen, Chitinasen, Peroxidasen, Defensine, Thionine, Lipid-Transfer-Proteine

und Proteine mit unbekannter Funktion. Insgesamt wurden 19 Familien von PR-Proteinen vorgeschlagen (Van Loon und Van Strien 1999).

Weitaus umfangreicher ist ein kürzlich erschienener Übersichtsartikel, in dem 113 Abwehrfamilien aus Pflanzen beschrieben werden (Rushton und Somssich 1998). Dazu zählen Gene, die für Enzyme kodieren, die Primär- und Sekundärmetabolismus verbinden (zum Beispiel Shikimat- und Phenylpropanoidstoffwechselweg), an der Bildung von phenolischen, antimikrobiell wirkenden Substanzen beteiligt sind (Phytoalexinen, Lignine) sowie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Hydrolasen, die mit verschiedenen Stoffwechselwegen verbunden sind.

Durch *large scale* Transkriptomanalysen, wie beispielsweise in der vorliegenden Arbeit für die Interaktion von *Bgh* und *mlo*-resistenter Gerste beschrieben, erhöht sich die Zahl pathogenregulierter Gene in Pilz-Pflanze-Interaktionen beträchtlich und geht weit über die bisher beschriebenen pathogenassoziierten Gene und Genfamilien hinaus (siehe auch 1.4.3.1 und Diskussion Kapitel 4.2)

### 1.1.4.4 Induzierte Resistenz

Während sich die beschriebenen Formen der Signalweitergabe auf die Zelle beschränken, existiert bei Pflanzen ein weiterer Abwehrmechanismus, der zu Resistenz in benachbarten Geweben bzw. der gesamten Pflanze führt und als induzierte Resistenz bezeichnet wird. Induzierte Resistenz kann lokal oder systemisch (SAR) wirken und wurde vor allem in den dikotyledonen Pflanzen Tabak, *Arabidopsis* und Gurke sehr gut untersucht. Bei der Signalübertragung scheint Salizylsäure eine entscheidende Rolle zu spielen. Das systemisch wandernde Signal bei der Ausbreitung der SAR konnte aber bisher nicht gefunden werden. Durch SAR werden zahlreiche Abwehrgene induziert (Willits und Ryals 1998). SAR ist ein unspezifisches Phänomen, das heißt Resistenz gegen ein Pathogen ist durch verschiedene inkompatible Pathogene induzierbar. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Abwehrreaktion der Pflanzen ähnlich dem angeborenen Immunsystem der Tiere funktioniert. Der Effekt der induzierbaren Resistenz kann auch durch nicht pathogene Bakterien der Rhizosphäre und Mykorrhizapilze ausgelöst werden. Eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung spielen hier die Pflanzenhormone Ethylen und Jasmonsäure. Induzierte Resistenz die durch Ethylen bzw. Jasmonsäure vermittelt wird und die nicht durch die Akkumulation von Abwehrgenen begleitet ist, wurde auch als ISR (*induced systemic resistance*) bezeichnet (Pieterse *et al.* 1998; Verhagen *et al.* 2004).

## 1.2 Die Interaktion zwischen Gerste und *Blumeria graminis*

Das Pathosystem Gerste und Gerstenmehltau (*Blumeria graminis*) stellt eine typische Interaktion zwischen einem obligat biotroph lebenden phytopathogenen Pilz und seiner Wirtspflanze dar und ist heute eines der wichtigsten Modellsysteme bei der Erforschung von Pflanzenkrankheiten. Umfangreiche Forschungsergebnisse zu Morphologie, Physiologie, Zytologie, Verbreitung, Molekularbiologie und Resistenzzüchtung wurden im Laufe von Jahrzehnten erarbeitet.

### 1.2.1 Die Kulturpflanze Gerste

Die Gerste (*Hordeum vulgare*) ist die am frühesten kultivierte Getreideart und leitet sich von der Wildform *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* ab. Ursprünglich kommt die Gerste aus dem vorderasiatischen Raum, wie aus der Analyse von DNA-Fragmentmustern hervorgeht. Heute gedeiht Gerste vorwiegend im gemäßigten Klima, aber auch in den Subtropen und den Hochländern der Tropen. Gerste ist eine monokotyledone, diploide und selbstbefruchtende Pflanze und gehört zur Familie der Gräser (Poaceae). Zusammen mit Weizen (*Triticum*), Roggen (*Secale*) und einigen weiteren Gräsern zählt Gerste zu dem Tribus Triticeae. Es gibt Sommer- und Wintergerstensorten, welche sich in Vegetationsdauer und Temperaturansprüchen unterscheiden. Sommergerste wird im Frühjahr gesät, benötigt etwa 95 Tage bis zur Reifung und ist daher auch für den Anbau im hohen Norden geeignet. Wintergerste wird schon im vorjährigen Herbst gesät, hat eine längere Vegetationsdauer und ist allgemein für wärmere Regionen geeignet. Weltweit steht Gerste, nach Weizen, Reis und Mais, an vierter Stelle aller landwirtschaftlich genutzten Fruchtarten. In Deutschland ist Gerste, nach Weizen, die wichtigste Getreideart. Sommer- als auch Wintergerste werden nebeneinander angebaut. Gerste wird als Futtermittel in der Geflügel- und Schweinemast (Wintergerste), als Nahrungsmittel (Fladenbrot, Graupen, Grütze) und als Braugerste beim Bierbrauen verwendet (Sommergerste) (Franke 1997).

### 1.2.2 Die Echten Mehltaupilze

*Blumeria graminis*, der Echte Mehltau der Gerste, ist eine von ca. 650 Arten der Echten Mehltaupilze (Erysiphales), die in sieben Gattungen (*Blumeria*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Microsphaera*, *Podosphaera*, *Spaerotheca* und *Uncinula*) eingeteilt werden. Zur Gattung *Blumeria* gehört nur eine Art mit acht Formae speciales (*f.sp.*). Die Getreidearten befallenden *f.sp.* sind *avenae* an Hafer (*Avena*), *hordei* an Gerste (*Hordei*), *secalis* an Roggen (*Secalis*) und *tritici* an Weizen (*Tritici*). Weitere vier *f.sp.* befallen Wildgräser. Die Echten Mehltaupilze sind auf Blütenpflanzen spezialisiert und in der Regel sehr wirtsspezifisch. Bis auf die kürzlich beschriebene Gattung *Blumeria*, die in Europa auf ca. 45 Gräsergattungen vorkommt, zählen ausschließlich dikotyle Angiospermen zu den Wirtspflanzen (Braun 1995; Wyand und Brown 2003).

### 1.2.3 Resistenzen in Gerste

Die Gerste wird, wie alle anderen untersuchten Pflanzen auch, von den meisten potentiellen Pathogenen (zum Beispiel *Blumeria graminis f.sp. tritici*, *Bgt*) nicht befallen, was als Nichtwirtsresistenz bezeichnet wird und worauf an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll. Andererseits sind Pathogene (Bakterien, Viren und Pilze) bekannt, die Krankheiten auslösen und gegenüber denen Wirtsresistenzen bestehen. Neben *Bgh* werden Pilzkrankheiten der Gerste vor allem durch die Pathogene *Bipolaris sorokina*, *Pyrenophora graminea*, *Ustilago nuda*, *Ustilago hordei*, *Drechslera graminea*, *Drechslera teres*, *Rhynchosporium secalis*, *Fusarium spec.* und *Puccinia graminis* ausgelöst (Brandenburger 1985).

Aus der Züchtungsforschung sind zahlreiche klassische rassenspezifische R-Gene gegen verschiedene Gerstenpathogene bekannt, die nach der Gen-für-Gen Hypothese vererbt werden. Im Pathosystem Gerste und *Bgh* sind dies derzeit 85 R-Gene die sich auf 10 Loci verteilen (Jørgensen 1994), die beispielsweise mit *Mla*, *MLK*, *MLH* und *MLG* bezeichnet wurden (Abbildung 1.1). Die R-Gene wurden entweder von der Wildgerste *Hordeum vulgare* ssp.

*spontaneum* oder aus anderen resistenten Gerstensorten eingekreuzt. Eingekreuzt in resistente Sorten finden rassenspezifische R-Gene in der Landwirtschaft Anwendung. Charakteristisch an rassenspezifischer Resistenz ist, dass sie teilweise bereits nach kurzer Zeit (*Mlg* ca. 10 Jahre, *Rph12* zwei Jahre) durch neue Pathogenrassen evolutionär überwunden wird (Deising *et al.* 2002).

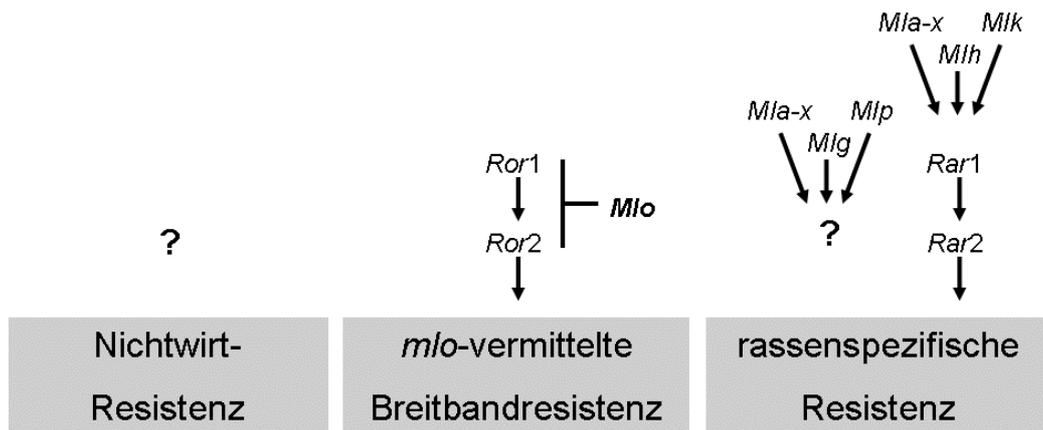
Einige dieser R-Gen spezifischen Loci bzw. R-Gene wurden auf molekularer Ebene näher untersucht. Am besten untersucht ist der *Mla-Locus* an welchem 32 verschiedene Gene auf Chromosom 5 (1H) beschrieben wurden (Jørgensen 1994). Der *Mla-Locus* wurde mittels *map-based-cloning* kloniert und sequenziert, dabei wurden 11 verschiedene Gene die sich in drei verschiedene Gruppen homologer Gene aufteilen, aber von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, gefunden (Wei *et al.* 1999; Wei *et al.* 2002; Shen *et al.* 2003). Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Gene ist das CC-NBS-LRR-Motiv.

Einige *Mla*-Resistenzen sind von den *downstream*-Komponenten RAR1 und SGT1 des SCF-Ubiquitin-Ligase Komplexes abhängig (Azevedo *et al.* 2002). Höchstwahrscheinlich sind die MLA- als auch das RAR1 Proteine im Cytoplasma lokalisiert. Durch *site directed mutagenesis* konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Abhängigkeit von RAR1 durch einen einzigen AS-Austausch bewirkt wird (Haltermann und Wise 2004)

*Mla*-vermittelte Resistenz ist mit HR gekoppelt, die sich in der betroffenen Epidermiszelle bzw. in den darunterliegenden Mesophyllzellen ereignet. Beispielsweise vermittelt *Mla1*, *Mla6* und *Mla13* schnelle und absolute Resistenz, wobei andere wie zum Beispiel *Mla7*, *Mla10* und *Mla12* eine intermediäre Resistenz vermitteln (Caldo *et al.* 2004). Während es bei den *Mla*-vermittelten rassenspezifischen Resistenzen zumindest zur ansatzweisen Ausbildung eines Haustoriums kommt, kann der Pilz bei der *Mlg*-vermittelten Resistenz die Zelle nicht penetrieren (Gorg *et al.* 1993). In der epidermalen Zelle ereignet sich die HR. Die *Mlg*-vermittelte Resistenz ähnelt der Mehлтаuresistenz die durch den chemischen *Inducer* DCINA (2,6-Dichlorisonikotinsäure) ausgelöst wird (Kogel *et al.* 1994). Die Funktion einiger *Mla*-vermittelter Resistenzen ist an *Rar1* und *Rar2* gekoppelt, die von *Mlg*-vermittelten Resistenzen jedoch nicht.

Durch *map-based-cloning* wurde ein weiteres R-Gen (*Rpg1*) der Gerste kloniert, welches Resistenz gegenüber den meisten Pathotypen von *Puccinia graminis* (Schwarzrost) vermittelt. Hierbei handelt es sich um ein membrangebundenes Rezeptorprotein. *Rpg1* ist ein *single copy* Gen und kodiert für eine S-Rezeptor-Kinase (*membran spanning serine-threonine-kinase*), die strukturelle Ähnlichkeit zu den aus Tomate bekannten *Pto*-Gen aufweist (Staples 2003). Kürzlich wurde die anfällige Gerstenlinie Golden Promise mit *Rpg1* transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Resistenz durch dieses eine *single copy* Gen vermittelt wird (Horvath *et al.* 2003). Weiterhin wird derzeit versucht, das *Rph7*-Gen, das Resistenz gegen *Puccinia hordei* (Scherrer *et al.* 2004), das *Rdg2*-Gen, das Resistenz gegen *Pyrenophora graminea* (Bulgarelli *et al.* 2004) und das *Rh2*-Gen, das Resistenz gegen *Rhynchosporium secalis* (Röder, persönliche Mitteilung) vermittelt, zu klonieren.

Eine Ausnahme von den oben beschriebenen dominant oder semidominant vererbbaaren, rassenspezifischen Resistenzen der Gerste bildet die sogenannte rezessiv vererbbaare, *mlo*-vermittelte Breitbandresistenz (siehe Kapitel 1.3 *mlo*-vermittelte Resistenz). Gemeinsame *downstream*-Komponenten von *Mla*-vermittelter und *mlo*-vermittelter Resistenz sind bisher nicht bekannt.



**Abbildung 1.1:** Mehltauresistenzen in Gerste. Mindestens zwei unabhängige Wege führen in Gerste zu rassenspezifischer Resistenz. (*Mla*-vermittelte Resistenz). Die *mlo*-vermittelte Resistenz wirkt dagegen gegen alle Pathotypen des Mehltaus (nach Schulze-Lefert und Vogel, 2000)

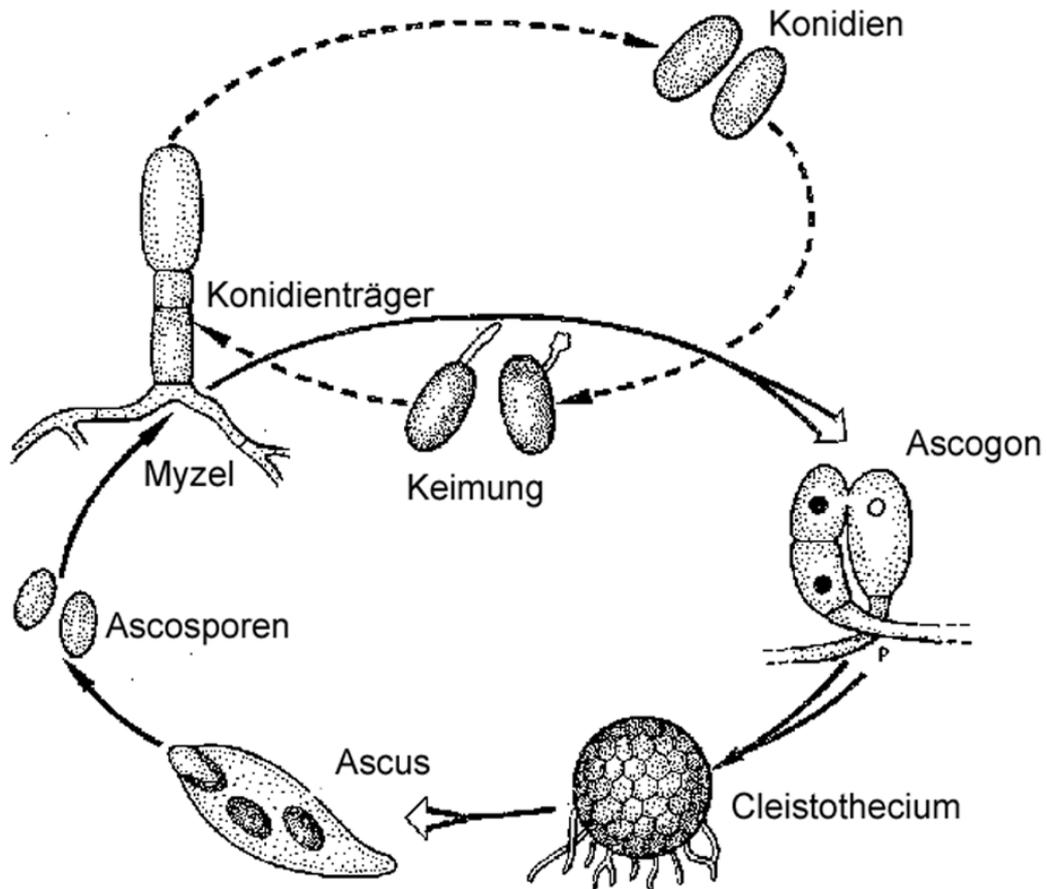
### 1.2.4 Entwicklung von *Blumeria graminis* auf Gerste

Der Entwicklungszyklus von *Blumeria* kann in einen asexuellen und einen sexuellen unterteilt werden (Abbildung 1.2; 1.3), wobei der für diese Arbeit relevante asexuelle Zyklus hier genauer betrachtet werden soll (Abbildung 1.4). Die Entwicklung von *Bgh* ist auf die Epidermis beschränkt.

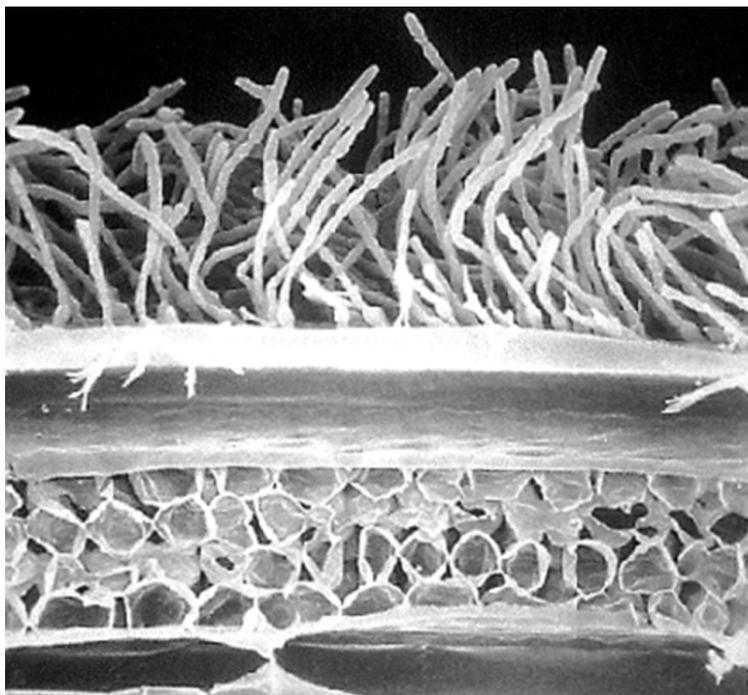
Während einer Epidemie im Feld verbreitet sich der Mehltau mit Hilfe von Konidiosporen, die über relativ weite Entfernungen durch den Wind transportiert werden (Limpert et al., 1999). Im Labor werden die Pflanzen künstlich inokuliert, wobei viele Konidien gleichzeitig auf den Blättern auftreffen. Die Entwicklung des Pilzes erfolgt dabei relativ synchron.



**Abbildung 1.2:** Die asexuelle Erscheinungsform gibt dem Mehltau seinen Namen, die Pflanze erscheint wie mit Mehl überpudert (links). Ursache hierfür ist ein dichter weißer Belag aus hyalinem Myzel und Konidienträgern mit Konidien auf der Blattepidermis. Typisches Merkmal für die sexuelle Erscheinungsform sind die schwarzen kugelförmigen Fruchtkörper, die als Cleistothecien bezeichnet werden (rechts).



**Abbildung 1.3:** Der asexuelle und der sexuelle Entwicklungszyklus von *Blumeria graminis*. Nach dem Zusammentreffen zweier Hyphen bilden sich die Ascomata. Die Ascosporen liegen in den sogenannten Ascis (Schläuchen) (Abbildung: Uwe Braun, 1985).



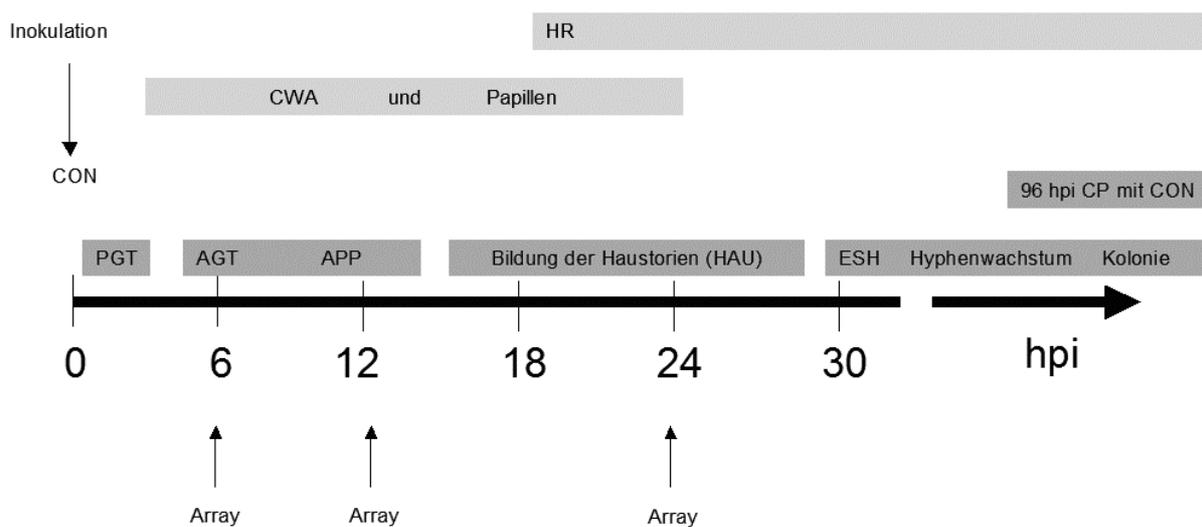
Konidienträger  
mit Konidien

Epidermiszelle  
mit Haustorien

Mesophyllzellen

**Abbildung 1.4:** Der asexuelle Entwicklungszyklus ist auf die Epidermis des Blattes beschränkt, wie in dem Längsschnitt durch ein mehltreubefallenes Blatt (120 hpi) zu erkennen ist (Foto: Schweizer und Dudler 1999).

Nach dem Auftreffen des Konidiums auf die Blattoberfläche sondert dieses eine Flüssigkeit ab, die mit dem Abbau epikutikulärer Wachskristalle assoziiert ist. Ein bis zwei Stunden später bildet sich der primäre Keimschlauch aus, eine Struktur, die nur bei der Gattung *Blumeria* bekannt ist. Dieser durchdringt die Zellwand mit einer Penetrationshyph, dann hört die weitere Entwicklung auf. Zweck und Funktion des primären Keimschlauchs ist möglicherweise die Aufnahme von Kutinmonomeren, niedermolekularen Substanzen und Wasser. Aufgrund der Tatsache, dass ausschließlich Mehltaupilze der Gattung *Blumeria* einen primären Keimschlauch besitzen und die Verbreitung der asexuellen Form des Pilzes bei Trockenheit erfolgen kann, wird vermutet, dass vom Konidium über den primären Keimschlauch Wasser aufgenommen werden kann. Von Nachteil für den Pilz dürfte die Induktion von Abwehrmechanismen sein, die bereits durch den primären Keimschlauch ausgelöst werden (Thordal-Christensen *et al.* 1999; Green *et al.* 2002).



**Abbildung 1.5:** Der Asexuelle Entwicklungszyklus von *Bgh* (dunkelgrau unterlegt). Ein bis zwei Stunden nach der Inokulation (hpi) bildet sich der primäre Keimschlauch. 4 hpi entsteht der appressoriale Keimschlauch an dessen Ende nach 9 Stunden ein Appressorium (Anhaftungsorgan) entsteht. Danach wird die Zellwand, durch eine Kombination von Tugordruck und Zellwandhydrolyse, durchbrochen und das Haustorium wird ausgebildet. Das führt zur Einstülpung der Plasmamembran. Ab ca. 28 hpi sind die Haustorien reif und es bilden sich elongier-ende, sekundäre Hyphen. Dies ist der Startpunkt für die Kolonieentwicklung. Mit der Bildung von Konidien und Konidiophoren schließt sich der asexuelle Zyklus. Je nach Abwehrstrategie der Pflanze (hellgrau unterlegt) bilden die Gerstenpflanzen Papillen oder reagieren mit HR, was zu Resistenz führen kann. AGT: appressorialer Keimschlauch; APP: Appressorien; CON: Konidien; CP: Konidiophoren; CWA: Zellwandablagerungen (Papillen); ESH: elongierende sekundäre Hyphen; HAU: Haustorien; HR: hypersensitive Reaktion; PGT: primärer Keimschlauch

Das Haustorium entsteht 12 bis 22 Stunden nach der Inokulation (hpi). Es stülpt das pflanzliche Plasmalemma so ein, dass es den haustorialen Komplex gegen das pflanzliche Zytoplasma hin abschließt. Die pilzliche innenliegende und die, lichtmikroskopisch wesentlich dicker erscheinende, pflanzliche außenliegende Membran (extrahaustoriale Membran) liegen eng beieinander und umschließen die extrahaustoriale Matrix. Die erfolgreiche Etablierung der Haustorien wird von sekundären elongierenden Hyphen an der Blattoberfläche begleitet. Ab diesem Schritt ist die Entstehung von Kolonien wahrscheinlich. 96 Stunden nach dem Auftreffen der Konidiosporen auf die Blattoberfläche bilden sich neue Konidiosporen an aufrecht stehenden Konidienträgern. Der asexuelle Zyklus ist geschlossen (Thordal-Christensen *et al.* 1999; Green *et al.* 2002).

Die sexuelle Entwicklung des Pilzes beginnt mit zunehmender Seneszenz des Pflanzengewebes unterhalb alternder Myzelien. Hierbei entstehen aus befruchteten Ascogonien Cleistothecien (geschlossene Fruchtkörper von Ascomyzeten), die aus einem dichten Geflecht von Hyphen bestehen. Reife Cleistothecien enthalten ca. 25 diploide Asci mit jeweils 8 haploiden Ascosporen. Die Ascosporen werden durch Aufquellen herausgeschleudert. Die Cleistothecien werden nicht wie bei anderen Gattungen der Erysiphales im Herbst, sondern im Sommer gebildet. Möglicherweise geschieht dies, um die Trockenperiode zu überbrücken (Braun 1995).

### 1.2.5 Physiologie, Genexpression und Enzyme in *Blumeria graminis*

Von *Blumeria graminis*, dem pilzlichen Partner der Interaktion, sind bisher nur wenige Informationen zu Proteinmustern und Genexpression vorhanden, da die Präparation von brauchbarem Material aus appressorialen und haustorialen Stadien, die sich auf der Wirtspflanze entwickeln, sehr schwierig ist. Expressionsstudien von pilzlichen Genen mit abgezogener inokulierter Epidermis wurden bisher nicht durchgeführt. Gleichwohl existieren cDNA-Banken, die aus Material von nicht gekeimten Konidien, gekeimten Konidien und Appressorien, die auf künstlichem Untergrund (Zellulosemembran) wuchsen, präpariert wurden. Von diesen cDNA-Banken wurden 4.908 ESTs erstellt und analysiert, wobei 1.669 Gene beschrieben wurden (Thomas *et al.* 2001). Außerdem wurde dieses Material in einer SAGE Analyse (*serial analysis of gene expression*) untersucht, wobei Daten produziert wurden, die frühe Veränderungen der Transkriptabundanzen pilzlicher Gene bei der Infektion der Pflanze zeigen (Thomas *et al.* 2002). Eine genetische Karte von *Bgh* wurde erstellt (Pedersen *et al.* 2002). Weiterhin wurden in *Blumeria* Gene gefunden, die nur in pathogenen, filamentösen Pilzen vorkommen und die mit Egh16H bezeichnet wurden. Egh16H-Gene bilden eine 10 Mitglieder zählende Genfamilie und werden im Penetrationsstadium und während der Entwicklung der Haustorien exprimiert (Grell *et al.* 2003).

Auf Proteinebene wurden in den Konidien von *Bgh* mittels IEF (isoelektrische Fokussierung) die Enzyme Malat-Dehydrogenase, Phosphoglucanat-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Esterasen, saure Phosphatase, Triose-Phosphat-Isomerase, Glucose-Phosphat-Isomerase und NADH-Diaphorase nachgewiesen (Koch und Kohler 1991). Außerdem wurde ein löslicher Kohlenhydrat-Elizitor gefunden, der im Entwicklungsstadium vor der Penetration der Pflanze von den Konidien abgegeben wird (Schweizer *et al.* 2000). AVR-Gene bzw. AVR-Proteine von *Blumeria* konnten bisher nicht beschrieben werden.

### 1.2.6 Antwort der Gerste nach Inokulation mit *Blumeria graminis*

Prinzipiell werden zwei verschiedene, sich überlagernde, Abwehrstrategien von Gerste gegenüber *Blumeria graminis* postuliert: die Papillenbildung und die HR. Mittels immunologischer Techniken, Enzymaktivitätsmessungen und Transkriptanalysen wurden zahlreiche Gene bzw. Substanzen gefunden, die durch *Bgh* induziert werden und die entweder allgemein mit Stress oder spezifischer mit Papillenbildung, HR, Resistenz, Anfälligkeit oder mit der Entwicklung des Pilzes assoziiert wurden.

#### 1.2.6.1 Frühe zelluläre Ereignisse

Infolge der Inokulation von Gerste mit *Bgh* sind sehr früh zytologische Veränderungen in den Epidermiszellen sichtbar. Vier Stunden nach Inokulation kommt es zur Akkumulation von

Zytoplasmaaggregaten unterhalb der pilzlichen Strukturen. Außerdem wandern die Zellkerne, die ursprünglich zentral liegen, unter die Interaktionsstellen der Keimschläuche und vergrößern ihr Volumen um das Doppelte. Dabei verdoppeln sich ebenfalls die Kern-DNA-Gehalte. Die Wanderung des Zellkerns ist begleitet von einer Umordnung der Zytoskelett-Mikrotubuli und Veränderungen der Chromatin-Struktur (Zeyen *et al.* 2002).

### 1.2.6.2 Papillenbildung

Die Papillen (*CWA, cell wall apposition*) sind Zellwandverdickungen, die nach Auftreffen des Konidiums auf der Blattoberfläche unterhalb des primären Keimschlauches bzw. des entstehenden Appressoriums, auf der Innenseite der äußeren Epidermiszellwand entstehen. Die Entwicklung des Pilzes kann in der Papille gestoppt werden, oder die Penetration ist erfolgreich. Nach der Penetration entsteht in der Papille ein sogenannter Collar (Hals), in dem sich die „*neck region*“ des Haustoriums bildet. Es wird postuliert, dass die Papillen eine physikalische Barriere gegenüber dem Pathogen darstellen und dessen Wachstum abbremsen.

In den Papillen und den umgebenden Halos (Höfen) konnte eine große Anzahl von akkumulierten Substanzen nachgewiesen werden. Hauptbestandteil der Papillen ist Kallose. Kallose ist ein Cellulose ähnliches Polymer, bestehend aus  $\beta$ -1-3-verknüpften Glucan-Resten, dessen Synthese durch biotischen sowie abiotischen Stress induzierbar ist (Zeyen *et al.* 2002). Eine eindeutige resistenzvermittelnde Rolle von Kallose konnte bisher nicht gezeigt werden (Jacobs *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass Kallose ausschließlich als Matrixmaterial dient (Zeyen *et al.* 2002). Charakteristisch für die Papillen ist die Bildung von Wasserstoffperoxid, wie mit einer DAB-Färbung von Gerstenblattabschnitten gezeigt werden konnte (Thordal-Christensen *et al.* 1997). Außerdem wurden in den Papillen hydrolytische Enzyme sowie eine Peroxidase gefunden (Zeyen *et al.* 2002). Neben seiner Funktion als Signalmolekül könnte Wasserstoffperoxid an der Quervernetzung von Proteinen und der Polymerisation von Phenolen zu ligninolytischen Verbindungen beteiligt sein (Thordal-Christensen *et al.* 1997). Allerdings ist noch unklar, ob tatsächlich Lignin in den Papillen von Gerste vorkommt. Lignin konnte in Weizenpapillen, nicht aber in Gerstenpapillen nachgewiesen werden (Wei *et al.* 1994). Die Anreicherung von Silizium in den Papillen wurde ebenfalls gezeigt. Obwohl Hydrokulturen von Gerste mit steigenden Siliziumgehalten erhöhte Resistenz gegenüber *Bgh* zeigen, korrelieren hohe Siliziumgehalte in den Papillen nicht mit der Resistenz (Zeyen *et al.* 2002). Die Papillenbildung ist ein charakteristisches Merkmal, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, *mlo*-vermittelten Resistenz.

### 1.2.6.3 Hypersensitive Reaktion

Die Hypersensitive Reaktion (HR, hypersensitive response) ist ein pflanzlicher Abwehrmechanismus, der bei rassenspezifischer Resistenz in Gerste gegen *Bgh* wirksam wird. Die HR setzt erst nach dem Durchbruch der Papillen bzw. nach der Entstehung der Haustorien ein. Abhängig vom R-Gen sterben bei der HR einzelne epidermale Zellen (*Single-Cell-HR*) bzw. ganze Bereiche im Mesophyll (*necrotic lesion, Multi-Cell-HR*). Mit *Single-Cell-HR* und *Multi-Cell-HR* werden minimale und maximale Ausprägungen der HR beschrieben. Dazwischen liegen diverse Abstufungen. Die *Single-Cell-HR* wird 15-24 Stunden nach der Penetration durch die Penetrationshyphe ausgelöst. Die Entwicklung des Haustoriums erreicht hierbei höchstens das Stadium des Zentralzylinders. Bei der *Multi-Cell-HR* entstehen zunächst Haustorien, danach sterben die Mesophyllzellen unterhalb der befallenen Epidermiszelle ab. Inwieweit die HR bei der *mlo*-vermittelten Resistenz eine Rolle spielt ist unklar. Nachdem die Entwicklung des Pilzes aufgehört hat, kommt es hierbei zu einer

späten hypersensitiven Reaktion im Mesophyllgewebe (Thordal-Christensen *et al.* 1997; Hückelhoven und Kogel 2003).

### 1.2.7 Induzierte Resistenz in Gerste

In Monokotyledonen, speziell in Getreiden, ist im Vergleich zu Dikotyledonen bisher nur sehr wenig über das Phänomen der induzierten Resistenz bekannt. Ouchi *et al.* (1976) konnten im Pathosystem Gerste und *Bgh* zeigen, dass Anfälligkeit gegenüber einer ursprünglich inkompatiblen Rasse oder Resistenz gegenüber einer ursprünglich kompatiblen Rasse, durch vorherige Inokulation mit der kompatiblen bzw. der inkompatiblen Rasse induziert werden kann. SAR im engeren Sinn konnte im Pathosystem Gerste und *Bgh* bisher nicht gezeigt werden. Ebenso konnten keine steigenden Salizylsäuregehalte nach *Bgh*-Befall bzw. unterschiedliche Gehalte in den Genotypen *mlo/Mlo* gefunden werden (Hückelhoven *et al.* 1999). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Applikation der Salizylsäureanaloge 2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester (BTH) die Pflanzen vor einer Infektion mit *Bgh* schützt. Dieses Phänomen wurde als chemisch induzierte Resistenz beschrieben und führt gleichzeitig zur Expression eines Sets chemisch induzierter Gene (Kogel *et al.* 1995). Ein weiteres Resultat im Zusammenhang mit induzierter Resistenz sind erhöhte Gehalte von Jasmonsäure bei gleichzeitiger Induktion von Abwehrgenen in Reiskeimlingen nach Verwundung (Schweizer *et al.* 1998).

### 1.2.8 Expression von pathogenregulierten Komponenten der Gerste

Bis heute sind im Pathosystem *Bgh* und Gerste ca. 50 Gene bzw. mRNA Transkripte des Wirtes beschrieben, die mit der Abwehr bzw. mit Anpassung bei der erfolgreichen Besiedlung assoziiert sind. Eine gute Zusammenfassung geben Collinge *et al.* (2002). Der Verlauf der Transkription von pathogenregulierten Komponenten der Gerste erfolgt prinzipiell in zwei Phasen: In der ersten Phase 2-6 hpi akkumulieren Transkripte als Antwort auf den Kontakt mit dem primären Keimschlauch und in der zweiten Phase akkumulieren Transkripte als Antwort auf die Penetrationsversuche des appressorialen Keimschlauches (12-24 hpi). Ein weiteres Maximum von pathogenregulierten Transkripten bildet sich drei bis fünf Tage nach Inokulation (Boyd *et al.* 1994; Clark *et al.* 1995). Es wurde versucht, Gene HR- sowie papillenvermittelter Resistenz und Gene die mit Anfälligkeit assoziiert sind, zu unterscheiden (Thordal-Christensen *et al.* 1999).

Zunächst zu den Genen, die für klassifizierte PR-Proteine (Collinge *et al.* 2002) kodieren: In Gerstebältern wurden bisher die PR-Proteine PR-1; PR-2 ( $\beta$ -1-3-Glucanasen); PR-3 (Chitinasen); PR-4 (biochemische Funktion unklar); PR-5 (Thaumatococcus ähnliche Proteine, biochemische Funktion unklar); PR-9 (Peroxidasen); PR-13 (Thionine) und PR-14 (Lipid Transfer Proteine) nach Inokulation mit *Blumeria graminis* gefunden.

Als PR-17 wurden die Transkripte BH6-12 und BH6-17 beschrieben (Gregersen *et al.* 1997). WCI-5 ist ein PR17-Homolog, welches aus Weizen bekannt ist (Schweizer *et al.* 1999). Bisher konnte die biochemische Funktion nicht aufgeklärt werden. Die Transkripte kodieren für Proteine mit N-terminalen Signalpeptiden, die in den Apoplasten sekretiert werden (Okushima *et al.* 2000).

Ebenfalls induziert sind Transkripte von Oxalat-Oxidase und einem Germin-ähnlichen Protein (HvGLP4) mit Mangan-Superoxid-Dismutase-Aktivität (Christensen *et al.* 2004). HvGLP4 wird mit strukturellen Veränderungen in Zusammenhang gebracht und ist ausschließlich in der Epidermis exprimiert (Wei *et al.* 1998).

14-3-3 Proteine und Endoplasmin (GRP94, *endoplasmic heat shock protein*) sind regulatorische Proteine, die nach Befall mit *Bgh* induziert sind (Gregersen *et al.* 1997). 14-3-3 Proteine sind epidermisspezifisch exprimiert, besitzen ein Molekulargewicht von 30 kDa und bilden Homo oder Heterodimere. In Pflanzen sind sie an der Bindung und Aktivierung der Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase beteiligt. GPR94 ist ein molekulares Chaperon (Roberts 2003).

*Blumeria*-induzierte Transkripte, die den ersten Schritt bei der Bildung von Phenylpropansäuren katalysieren, kodieren auch für Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (Boyd *et al.* 1995). Von einem der PAL-Gene ist bekannt, dass es bereits 0,5 hpi induziert wird (Shiraishi *et al.* 1995). Möglicherweise spielt es eine Rolle bei der Signalweitergabe nach Erkennung von *Bgh*. Weitere induzierte Transkripte aus dem Sekundärstoffwechsel, die möglicherweise mit der Bildung von Flavonoiden oder der Bildung von ligninartigen Substanzen im Zusammenhang stehen, sind eine Chalcone-Synthase (CHS) (Gregersen *et al.* 1997) und Flavonoid- bzw. Kaffeesäure-O-Methyltransferasen (COMT) (Christensen *et al.* 1998).

Neben der Induktion zahlreicher mRNA-Transkripte von Genen diverser Stoffwechselwege sind in Gerste auch einige niedermolekulare Komponenten beschrieben, die mit Pathogenbefall assoziiert sind. Hierbei handelt es sich um die Stoffklassen der Hordatine (Hordatin, p-Cumaroylagmatin, p-Cumaroylhydroxyagmatin), der Thionine und des Indolalalkaloids Gramin (Matsuo *et al.* 2001; Burhenne *et al.* 2003). Enzymaktivitätsmessungen im Apoplasten von Gerstenblättern ergeben außerdem erhöhte Gehalte von Ascorbat-Peroxidasen (APX) und Katalasen nach Inokulation mit *Bgh* (Vanacker *et al.* 1998).

### 1.2.9 Bedeutung des Pathosystems Echter Mehltau und Gerste

In der phytopathologischen Forschung existieren eine Reihe von Pflanze-Pathogen-Interaktionen mit Modellcharakter von unterschiedlicher wirtschaftlicher Bedeutung (zum Beispiel *Cladosporium vulvum* und Tomate, *Magnaporthe grisea* und Reis oder *Pseudomonas syringae* und *Arabidopsis*). Eines der wichtigsten Modellsysteme, das entscheidende experimentelle Vorteile aufweist, ist Gerste und *Bgh*.

Ursache dafür ist die Verfügbarkeit isogener Linien von Sorten mit rassenspezifischer Resistenz (zum Beispiel *Mla*) oder *mlo*-vermittelter Resistenz, ferner die schnelle, gleichmäßige und synchrone Entwicklung von *Bgh* (Konidien keimen synchron, Keimschläuche entwickeln sich in etwa gleicher Länge, Penetrationsversuche ereignen sich in einem definierten Zeitraum, kein zeitliches Überlappen der individuellen Entwicklungsstadien). Die Interaktion eignet sich auch sehr gut für mikroskopisch-morphologische Untersuchungen, da sich der Lebenszyklus auf die hyaline Epidermis beschränkt. Außerdem lässt sich die Epidermis sehr gut vom restlichen Gewebe abtrennen, was die separate Untersuchung dieses Gewebes ermöglicht. Mit der Erweiterung des Modellsystems auf *Arabidopsis* und das Wirtspathogen *Erysiphe cichoracearum* bzw. *Erysiphe cruciferarum* als auch das Nichtwirtspathogen *Bgh* sind vergleichende Untersuchungen vor allem auf molekularem Niveau sehr gut möglich (Somerville und Vogel 2002). Außerdem existiert ein etabliertes transientes Überexpressions- und TIGS-System (*transient induced gene silencing*), welches Genfunktionsanalysen in der Gerste-*Bgh*-Interaktion erlaubt (Panstruga 2004).

Nachteilig an dem Pathosystem ist, dass der Pilz aufgrund seiner obligat biotrophen Lebensweise nur auf Wirtspflanzen kultivierbar ist. Dadurch ist unter anderem die Mutantenforschung massiv erschwert. Ein weiterer Nachteil des Modells ist, dass das Genom der Gerste bisher nicht sequenziert wurde.

### 1.3 Die *mlo*-vermittelte Breitband-Resistenz

Das Fehlen von MLO führt zu Resistenz von Sommergerste gegenüber allen getesteten, natürlich vorkommenden *Bgh*-Isolaten. Dieses Phänomen wird als *mlo*-vermittelte Resistenz oder Breitband-Resistenz bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen der *mlo*-vermittelten Resistenz untersucht. Im Gegensatz dazu steht die ebenfalls gut untersuchte rassenspezifische Resistenz. Die *mlo*-vermittelte Resistenz, die in der europäischen Gerstenzüchtung seit mehr als 20 Jahren genutzt wird, ist nach wie vor äußerst effektiv (Schulze-Lefert und Vogel 2000). Allerdings sind auch zwei Mehlausisolate bekannt, welche die *mlo*-vermittelte Resistenz durchbrechen können. Eines davon wurde im Labor mit dem Ziel einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *mlo*-resistenten Pflanzen selektiert, ein anderes ist ein Feldisolat aus Japan (Collins *et al.* 2002). Die *mlo*-vermittelte-Resistenz ist eine monogenetisch, rezessiv vererbte Resistenz, die nicht der Gen-für-Gen Hypothese entspricht. Entdeckt wurde das Phänomen während einer deutschen Exkursion in den Jahren 1937 bis 1938 in Äthiopien, bei der Gersten-Accessionen gesammelt wurden, die gegenüber allen getesteten *Bgh*-Isolaten resistent waren. Unabhängig davon wurden später EMS- und Röntgenbestrahlungs-Mutanten hergestellt, die eine ähnliche monogenetische Breitbandresistenz zeigten (Schulze-Lefert und Vogel 2000).

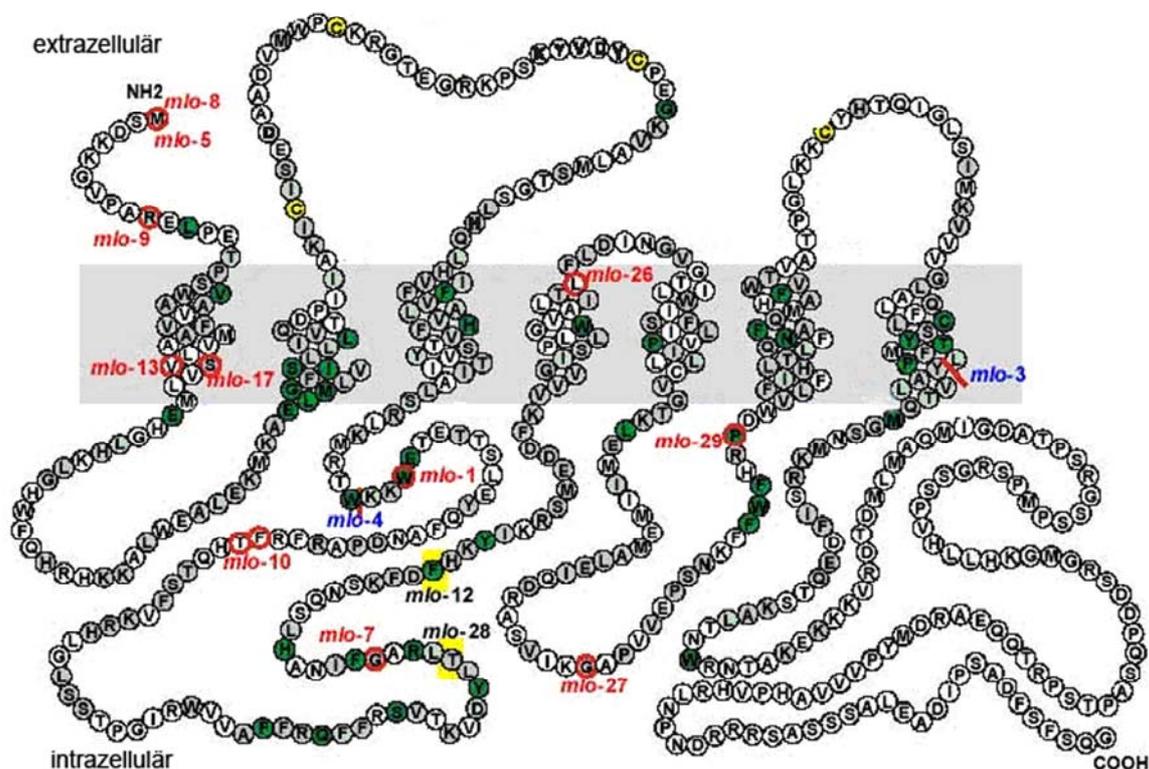
#### 1.3.1 Der *mlo*-Resistenz-Phänotyp

Der offensichtliche Unterschied zwischen *mlo*- und *Mlo*- tragenden Gerstensorten ist die Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber Mehltau. Während in *mlo*-resistenten Linien die Penetrationsraten auf unter 1% fallen, weisen *Mlo*-anfällige Gerstenlinien eine Penetrationseffizienz von 50-70% auf (Freialdenhoven *et al.* 1996). Lichtmikroskopisch betrachtet bleibt in *mlo*-resistenten Pflanzen die Entwicklung des Pilzes während des Penetrationsprozesses bzw. im prähaustorialen Stadium stehen und ist verbunden mit der verstärkten Bildung von Papillen. Weiterhin wurde in *mlo*-resistenten-Pflanzen verstärkte Neigung zu spontanen Zelltod im Mesophyllgewebe und beschleunigte Blattseneszenz (Wolter *et al.* 1993; Peterhänsel *et al.* 1997; Piffanelli *et al.* 2002), erhöhte Akkumulation von Chitinase-, Peroxidase- und PR-1- Transkripten (Peterhänsel *et al.* 1997) und erhöhte Akkumulation der phenolischen Substanz p-Cumaroylhydroxyagmatin (von Röpenack *et al.* 1998) gefunden. Außerdem wurden Ertragsminderungen im Vergleich zum Wildtyp in Feldversuchen beobachtet (Jørgensen 1992). Ein Merkmal *mlo*-resistenter Linien sind die größeren und schneller gebildeten Papillen, in denen Wasserstoffperoxid verstärkt akkumuliert. Dies wurde kürzlich mit einer wasserstoffperoxidnachweisenden *in situ* Färbung, bei der DAB (3,3'-Diaminobenzidine) als Substrat für wasserstoffperoxidkatalysierte Peroxidation von den Pflanzen aufgenommen wurde, gezeigt (Hückelhoven *et al.* 1999). Neben der Tatsache, dass Wasserstoffperoxid direkt toxisch auf Mikroorganismen wirken kann (Lamb und Dixon 1997), ist es möglicherweise an einem peroxidasekatalysierten *crosslinking* von Proteinen und ligninartigen Substanzen in den Papillen beteiligt.

#### 1.3.2 Die Gen- und Protein Struktur von *Mlo* und *mlo*

*Mlo* wurde 1997 durch *map-based-cloning* isoliert. Es liegt auf Chromosom 4H im Gerstengenom. MLO ist ein 60 kDa großes Protein von 533 Aminosäuren mit sieben Transmembrandomänen und extrazellulären N-terminalen- und intrazellulären C-terminalen-Ende (Buschges *et al.* 1997) (Abbildung 1.6). Der intrazelluläre C-terminale-Schwanz ähnelt

G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteinen (GCRP) (Devoto *et al.* 1999), ist aber wahrscheinlich nicht mit der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit in Zusammenhang zu bringen. Das MLO-Protein interagiert mit dem Kalziumsensor Calmodulin (Kim *et al.* 2002).



**Abbildung 1.6:** Topologie und Konservierung des Siebentransmembranproteins MLO. Die graue Fläche stellt die Plasmamembran dar. Grüne Kreise sind unveränderliche AS, hellgrüne sind konservative AS-Austausche (50% Identität), hellviolette sind nicht-konservative AS-Austausche und gelbe Kreise sind konservierte Cysteinreste, rote Umrandungen zeigen die Lokalisierung der Mutationsallele (Elliott 2003).

15 der 17 durch Einwirkung von EMS-, Nitrosomethylharnstoff, Natriumazid oder Röntgenstrahlung entstandenen, molekular charakterisierten Mutanten weisen totale Resistenz gegenüber *Bgh* auf (zum Beispiel *mlo5*), während nur zwei partielle Resistenz zeigen (*mlo12*, *mlo28*). Während einige der Mutationen höchstwahrscheinlich zum Abbruch der Translation führen (Totalmutanten), kommt es bei anderen zum einfachen Austausch von Aminosäuren. Bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten isogenen Linie Ingrid *mlo5* befindet sich die Mutation am N-terminalen-Ende des Proteins. Das Protein wird also höchstwahrscheinlich nicht translatiert. Guanin wird durch Adenin ersetzt, wobei auf der Ebene der Aminosäuren Methionin durch Isoleucin ersetzt wird (Buschges *et al.* 1997; Piffanelli *et al.* 2002; Piffanelli *et al.* 2004).

Kürzlich wurde das MLO-Gen der einzig bekannten natürlich entstandenen Mutante „*mlo11*“ inklusive regulatorischer Bereiche sequenziert. Dabei konnte innerhalb des MLO-Gens keine Mutation gezeigt werden, wohl aber wurden komplexe tandemartige Wiederholungen in *upstream* liegenden regulatorischen Bereichen identifiziert. Die tandemartigen Wiederholungen bestehen aus 3,5 kb langen regulatorischen Bereichen und 1.1 kb langen kodierenden Sequenzen von *Mlo* (Piffanelli *et al.* 2004).

Auch in anderen monokotyledonen als auch in dikotyledonen Pflanzen existieren zahlreiche Homologe von *Mlo* (Devoto *et al.* 1999). In *Arabidopsis* wurden 15 und in Mais 9 paraloge Sequenzen, basierend auf den nahezu vollständig sequenzierten Genomen bzw. auf der Mais-EST-Datenbank der Firma DuPont, gezählt. Außerdem wurden in EST-Datenbanken vier sehr

ähnliche Sequenzen in Reis, drei in Weizen und zwei in Gerste gefunden (Devoto *et al.* 2003). Homologe von *Mlo* existieren an syntenischen Positionen in allen drei Genomen von hexaploiden Weizen (*Triticum aestivum*) und in Reis (*Oryza sativa*) (Elliott *et al.* 2002). Homologe in Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*) oder Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) wurden nicht gefunden.

### 1.3.3 Die biologische Funktion von MLO

Die biologische Funktion des auf Pflanzen beschränkten Proteins MLO wird in zweierlei Kontexten diskutiert. Zum einen stellt sich die Frage, welche molekulare Funktion *mlo* in Bezug auf die Breitbandresistenz von Gerste gegenüber *Blumeria graminis* hat. Zum anderen stellt sich die Frage nach der allgemeinen biologischen Funktion, der in Monokotyledonen und Dikotyledonen vorkommenden, hochkonservierten, MLO-Proteinfamilie. Bisher waren Funktionen, die über die Regulation von Abwehrreaktionen in Gerste gegenüber Pathogenen hinausgehen, nicht bekannt. Kürzlich konnte aber mit *Arabidopsis mlo*-Mutanten in *AtMlo2* gezeigt werden, dass *mlo* auch in der Interaktion von *Arabidopsis* und Mehltau Resistenz vermittelt (Patent WO 98/04586, 2004).

Für das *Mlo*-Gen wurde als Funktion in Bezug auf Pathogenresistenz vorgeschlagen, dass es als negativer Regulator, das unkontrollierte Überschießen von Abwehrreaktionen und Zelltod bei Stress verhindert (Schulze-Lefert und Panstruga 2003). Diese Hypothese wurde durch Experimente, bei denen Gerstenblattabschnitte transient transformiert wurden, gestützt. Durch Überexpression von *Mlo* in Gerstenblattabschnitten des *Mlo*-Wildtyps wurde Überanfälligkeit auslöst (Kim *et al.* 2002). Das deutet darauf hin, dass MLO die Abwehrreaktionen nicht vollständig unterdrücken kann und vielmehr für eine Feinabstimmung der Pathogenabwehr verantwortlich ist. Möglicherweise limitiert *Mlo* auch die Dauer der Abwehrreaktion, wie aus Untersuchungen hervorgeht, bei denen die mRNA-Abundanzen von *Mlo* gemessen wurden. Drei Stunden nach Pathogenbefall (*Bgh*, *Magnaporthe grisea*) bzw. Stress (Verwundung, Paraquat-Behandlung, während Seneszenz) steigt die MLO und die *Mlo*-mRNA-Konzentration, des normalerweise relativ niedrig exprimierten *Mlo*-Gens stark an (Piffanelli *et al.* 2002). Ob MLO spezifische Abwehrreaktionen oder die räumliche Koordination von Abwehrreaktionen steuert ist noch unklar.

Die Tatsache, dass die Expression von *Mlo* auch von anderen Stressfaktoren beeinflusst wird, zeigt, dass MLO nicht ausschließlich für die Resistenz gegenüber Mehltau verantwortlich ist, sondern vielmehr weitere Stressantworten reguliert. Am C-terminalen-Ende von MLO aus Gerste konnte eine Calmodulinbindungsstelle identifiziert werden. Das Fehlen der CaM-Bindungsstelle in gezielten *Mlo*-Mutanten vermindert die negative Regulation von Abwehrreaktionen durch MLO. Durch transiente Expression von Calmodulin RNAi-Konstrukten in Blattsegmenten von *Mlo*-Pflanzen wurden diese weniger anfällig und nach Überexpression mehr anfällig gegenüber *Bgh* (Kim *et al.* 2002).

### 1.3.4 Downstream-Komponenten der *mlo*-Resistenz

Über einen genetischen Ansatz wurden zwei Gene die für die *mlo*-vermittelte Resistenz wichtig sind, *HvRor1* und *HvRor2* (*required for mlo resistance*), identifiziert. Diese wurden durch Remutagenese *mlo*-resistenter Gerste gefunden. Die Doppelmutanten *mlo/ror* werden teilweise vom Pilz befallen und bilden vermindert CWAs im Vergleich zu *mlo*-resistenten Linien (Freialdenhoven *et al.* 1996). Die Funktion, Sequenz und Proteinstruktur von HvROR1 konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Dagegen wurde *HvRor2* kürzlich erfolgreich isoliert

und als Syntaxin identifiziert (t-SNARE Rezeptor) (Collins *et al.* 2003). SNARE Proteine sind an Vesikeltransport und Proteinzielsteuerung beteiligt.

Außerdem wurden mit TIGS- (*transient induced gene silencing*) und Überexpressionsexperimenten drei weitere Gene gefunden, die zum Durchbrechen der *mlo*-vermittelten Resistenz beitragen. Eines davon ist ein sogenannter BAX-Inhibitor, ein Membranprotein, das in die Zelltodregulation bei Säugern verwickelt ist (Hückelhoven *et al.* 2003; Eichmann *et al.* 2004). Weitere Gene sind der Actin-depolymerisierende Faktor *Adf3*, der am Umbau oder der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist (persönliche Mitteilung Panstruga, MPI Köln) und das mit Vesikeltransport assoziierte Protein HvSNAP34 (Collins *et al.* 2003) (siehe auch Diskussion).

## 1.4 Genomforschung in Gerste

Genomforschung in Gerste findet in Deutschland hauptsächlich im Rahmen des Programms GABI (Genominitiative im biologischen System Pflanze, <http://www.gabi.de>) des BMBF statt. Die Genomforschung wird allgemein in zwei verschiedene Bereiche unterteilt. Ein Bereich ist die strukturelle Genomforschung (*structural genomics*), wobei die Struktur und Sequenz ganzer Genome untersucht wird. Der andere Bereich ist die funktionelle Genomforschung (*functional genomics*), welche die Genfunktionen auf globaler Ebene untersucht. Funktionelle Genomforschung umfasst die Analyse des Transkriptom, des Proteoms und des Metaboloms, das heißt die Analyse aller mRNA-Transkripte, Proteine und Metaboliten. Die vorliegende Arbeit ist damit in den Bereich der funktionellen Genomforschung einzuordnen.

### 1.4.1 Strukturelle Genomforschung

Grundlage der Genomforschung sind die mehr oder weniger vollständig sequenzierten Genome von Modellorganismen wie *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans*. Pflanzliche Modellorganismen mit vollständig sequenzierten Genomen sind die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und der Reis (*Oryza sativa*) (Anon 2000; Goff *et al.* 2002; Yu *et al.* 2002). *Arabidopsis* wurde aufgrund der kurzen Vegetationszeit, des relativ kleinen Genoms (110 Mb) und des kleinen Habitus zur bestuntersuchtsten Modellpflanze der Genomforschung.

Gründe für die vollständige Sequenzierung von Reis, der sich durch seine herausragende agronomische Bedeutung und seine Zugehörigkeit zu der für die menschliche Ernährung wichtigen Pflanzenfamilie der Gramineae auszeichnet, sind die monokotyledone Entwicklung und die geringe Genomgröße (ca. 3 x *Arabidopsis* und 40 x weniger als Weizen). Weiterhin besteht eine hohe Colinearität zu anderen Genomen von Gräsern, nicht aber zwischen Gräsern und *Arabidopsis* (Keller und Feuillet 2000).

Mit Hilfe der vollständig sequenzierten Genome wird es möglich, für weitere wichtige Modellpflanzen genetische und physikalische Genomkarten zu erstellen. Während physikalische Kartierungen die physischen Abstände zwischen einzelnen Markern im Genom beschreiben, beruhen genetische Karten oder Kopplungskarten auf der Analyse von Rekombinationshäufigkeiten zwischen Markern. Genetische und physikalische Genomkarten stellen zusammen mit sequenzspezifischen Markern eine wichtige Grundlage für die zukünftige Züchtungsforschung dar. Diese ermöglichen Gene über ihre Kartenposition zu isolieren (*map-based-cloning*), die exakte Größe von Teilen der Genome zu bestimmen und die Anzahl der Gene abzuschätzen. Der finanzielle Aufwand der Sequenzierung und die geschätzte Größe der Genome (Reis 430 Mbp; Tomate 950 Mbp; Mais 2.670 Mbp; Gerste 5.400 Mbp; Weizen 14.000 Mbp) lassen es aber unwahrscheinlich erscheinen, dass in nächster Zukunft weitere

Genome von Getreidearten vollständig sequenziert werden (Rudd 2003). Aufgrund dieser Tatsache sind Alternativen erforderlich, die es ermöglichen, die Genomorganisation zu untersuchen und Gene aus Getreide zu beschreiben.

### 1.4.2 cDNA-Banken und EST-Datenbanken

Eine Alternative zur Sequenzierung ganzer Genome liegt in der Erstellung repräsentativer EST-Kollektionen, die durch Sequenzierung von cDNA-Banken generiert werden. ESTs sind uneditierte, unterschiedlich lange, in EST-Datenbanken gespeicherte, automatisch prozessierte und einmalig erzeugte Teilsequenzen von Genen, die ausgehend von cDNA-Klonen sequenziert werden (Abbildung 1.7).

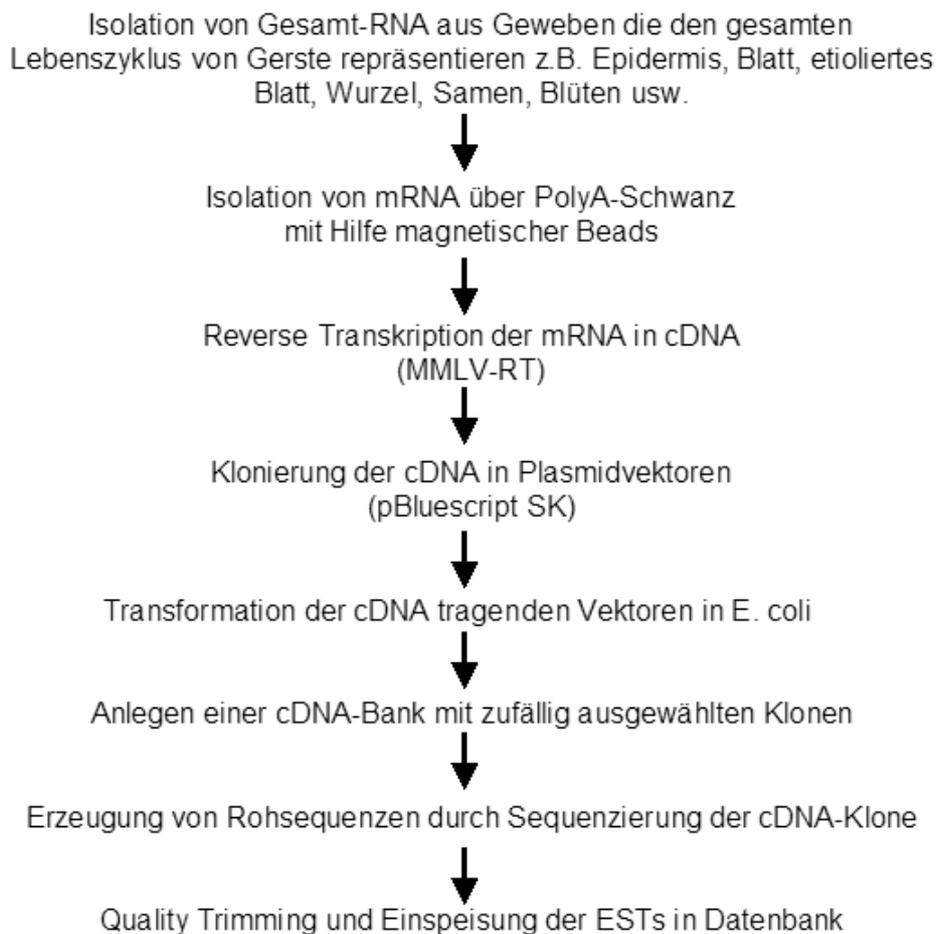
cDNA-Banken, welche die Grundlage für die EST-Kollektionen bilden, lassen sich aus einzelnen Zellen, Geweben oder einem ganzen Organismus erstellen. Grundlage für die Erstellung einer cDNA-Bank sind mRNA-Populationen aus Zellen, Geweben oder ganzen Organismen, die durch *reverse* Transkription in cDNA-Populationen umgeschrieben werden. Jede mRNA bzw. cDNA repräsentiert ein exprimiertes Gen. Die cDNAs werden in Plasmid-Vektoren inseriert, die in Bakterien (*Escherichia coli*) transformiert und kloniert werden. Mit zufällig ausgewählten Klonen wird eine cDNA-Bank angelegt. Jede EST-Kollektion und jede cDNA-Bank repräsentiert also eine Momentaufnahme des Transkriptoms einer einzelnen Zelle, eines Gewebes oder eines ganzen Organismus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Transkriptom von mit *Bgh* und *Bgt* interagierenden Gerstenepidermiszellen der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* aufgenommen.

ESTs haben gegenüber vollständig sequenzierten Genomen den Vorteil, dass sie sich wesentlich kostengünstiger produzieren lassen. Von ESTs existieren in der Regel sogenannte 3'-EST- und 5'-EST-Varianten. Das heißt die Sequenzen entstanden entweder vom 3'-Ende oder vom 5'-Ende der entsprechenden cDNA innerhalb des jeweiligen Klons. Erkennbar ist die Richtung aus der sequenziert wurde an der Struktur der ESTs: „Nukleotide/PolyA-Schwanz“ ist gleich 5'-EST, „PolyT-Schwanz/Nukleotide“ ist gleich 3'-EST. Nachteilig an ESTs ist, dass wichtige regulatorische Bereiche von Genen nicht sequenziert werden und dass teilweise fehlerhafte Sequenzen in die Datenbanken eingehen.

Weltweit sind zurzeit 24.536.626 ESTs öffentlich verfügbar. Die meisten pflanzlichen ESTs stammen von agronomisch bedeutsamen Pflanzen bzw. von Modellpflanzen (zum Beispiel *Arabidopsis*). Bei Getreiden sind 352.924 von *Triticum aestivum*, 367.798 von *Hordeum vulgare*, 416.886 von *Zea mays*, 298.857 von *Oryza sativa* und 190.949 von *Sorghum bicolor* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html), 06.12.2004) bekannt. Die größten pflanzlichen EST-Kollektionen sind in den Datenbanken „TIGR *Plant gene indices*“, „NCBI *Unigenes*“, „MIPS *Sputniks*“ und „*Plant GDB*“ über das Internet verfügbar.

Die am IPK Gatersleben erzeugten ESTs sind in der CR-EST-Datenbank (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/menu.php>) abgelegt, hier sind zurzeit 187.281 ESTs der Gerste, 8.414 der Erbse, 2.079 der Kartoffel und 2.824 des Weizens verfügbar (Stand Februar 2004). Die in CR-EST enthaltenen ESTs der Gerste entstammen 33 verschiedenen cDNA-Banken, die aus einer Reihe von Geweben und Entwicklungszuständen präpariert wurden, um möglichst viele Gene zu erfassen und den gesamten Lebenszyklus von Gerste abzubilden. Themenkomplexe für die Erstellung der cDNA-Banken waren vegetative Organe (grüne Blätter, etiolierte Blätter, Wurzeln), Samenentwicklung (Karyopse, keimende Samen), Kallusentwicklung, weibliche und männliche Blütenstände und nicht zuletzt Pathogenbefall (Stand Februar, 2004). Unter [http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/cdna\\_lib.php](http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/cdna_lib.php) wurde die ausführliche Beschreibung zu Präparation und technischen Details der cDNA-Banken abgelegt. Die in der vorliegenden Arbeit erstellte und analysierte cDNA-Bank mit dem Identifikationscode (ID) „HO“ ist eine dieser cDNA-Banken. Aufgrund der bisher analysierten vorläufigen EST-

Kollektion (CR-EST; 110.981 ESTs) wurden für Gerste 25.224 Unigene ermittelt, die sich aus 14.151 Primärconsensi und 11.073 Singletons zusammensetzen (Zhang *et al.* 2004). Mit Hilfe von EST-Kollektionen ist es möglich Untersuchungen zur Synthänie (Colinarität) gegenüber Modellgenomen, wie zum Beispiel Reis, durchgeführten. Außerdem dienen EST-Kollektionen als Tool für Gen- und Genomannotationen und zum Finden von Spleißvarianten eines Genes. SNP- und Mikrosatelliten-Marker für die molekulare Züchtungsforschung lassen sich entwickeln. Die Kombination von cDNA-Banken und EST-Kollektionen gestattet Transkriptomanalysen mit cDNA-Makroarrays, -Mikroarrays und oligonukleotidbasierten Arrays. Mit der wachsenden Zahl von Sequenzdaten und vollständig sequenzierten Genomen verschiebt sich der Schwerpunkt der Genomforschung in Richtung funktioneller Analyse.



**Abbildung 1.7:** Herstellung einer cDNA-Bank zur Generierung von EST-Sequenzen

### 1.4.3 Funktionelle Genomforschung

Aspekte funktioneller Genomforschung in Gerste sind: 1) Die Untersuchung der Gen-expression, 2) das gezielte Ausschalten bzw. Überexprimieren von Genen in transient- bzw. stabiltransformierten Pflanzenteilen bzw. ganzen Pflanzen und 3) die gezielte Suche nach mutierten Allelen bekannter Gene durch TILLING und Transposon-Mutagenese.

### 1.4.3.1 Transkriptomanalysen

Die Transkriptabundanzen von einzelnen Genen lassen sich sehr gut mit *Northern-Blots* oder *Real-time-PCR* bestimmen. Methoden um die Transkriptabundanzen ganzer mRNA-Populationen (ganzer Transkriptome) zu analysieren sind dagegen Makroarrays, Mikroarrays, Oligonukleotid-Arrays (Freeman *et al.* 2000), SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (Velculescu *et al.* 1997; Thomas *et al.* 2002), AFLP *Transkript Profiling* (Polverari *et al.* 2003) und *Electronic Northern* (Zhang *et al.* 2004).

Transkriptomanalysen in Gerste wurden bisher unter verschiedenen Aspekten wie zum Beispiel Photosynthese, Kornentwicklung und Malzqualität durchgeführt. In Pflanze-Pathogen-Interaktionen wurden seit 1999 ca. 20 Transkriptomanalysen auf der Basis von Arrays bekannt. Verschiedene Themen wie elizitorinduzierte Basalresistenz, R-Gen-vermittelte Resistenz, SAR, ISR, Mykorrhizza-Symbiosen oder mechanischer Stress durch saugende Insekten wurden untersucht (Tabelle 1.1). Etwa die Hälfte der Analysen wurde im Modellorganismus *Arabidopsis* durchgeführt. Kürzlich wurde eine erste Transkriptomanalyse zum Thema *Mla*-vermittelte-Resistenz im Pathosystem Gerste und *Blumeria* veröffentlicht (Caldo *et al.* 2004) (siehe auch Diskussion Kapitel 4.1).

**Tabelle 1.1:** Transkriptomanalysen auf der Basis von Makroarray-, Mikroarray- und Oligonukleotid-Arrays in Pflanze-Pathogen-Interaktionen.

Wirtspflanze	Pathogen bzw. Behandlung	Untersuchung	Plattform	Anzahl Gene	Autor(en)
<i>Arabidopsis</i>	14 verschiedene Behandlungen	SAR	Microarray	ca. 7.000 Unigene	Maleck <i>et al.</i> , 2000
<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	Rpp4,Rpp7,Rpp8-vermittelte Resistenz	Affymetrix AtGenome1 Array	ca. 8.000 Unigene	Eulgem <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	RPS2, RPM1 NahG, ndr1	Affymetrix AtGenome1 Array	ca. 8.000 Unigene	Tao <i>et al.</i> , 2003
<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae pv.tomato</i>	RPS2-vermittelte Resistenz	Makroarray auf Nylonmembran	ca. 13.000 Unigene	Scheideler <i>et al.</i> , 2002
<i>Arabidopsis</i>	Chitin-Elizitor	Basalresistenz	Mikroarray	2.375 Unigene	Ramonell <i>et al.</i> , 2002
<i>Arabidopsis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	Nichtwirts-resistenz	Microarray	11.000 Gene	Huitema <i>et al.</i> , 2003
<i>Arabidopsis</i>	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	RCH1-vermittelte Resistenz	Mikroarray	ca. 7.000 Unigene	Narusaka <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis</i>	Verwundung und Larve von <i>Pieris rapae</i>	mechanischer Stress	Mikroarray	ca. 150 bekannte Abwehrgene	Reymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Arabidopsis</i>	<i>Rhizobacteria</i>	ISR	Affymetrix AtGenome1 Array	ca. 8.000 Unigene	Verhagen <i>et al.</i> , 2004
Baumwolle Hypokotyl und Wurzeln	<i>Fusarium oxysporium</i> f. sp. <i>vasinfektum</i>	kompatible Interaktion	Mikroarray	6.000 Gene aus (nicht)infizierten und Gewebe	Dowd <i>et al.</i> , 2004
Gersten-keimlinge	<i>Bgh</i>	<i>mlo</i> -vermittelte Resistenz und Basalresistenz	Makroarray auf Nylonmembran	3.136 epidermale Unigene	Zierold <i>et al.</i> , 2005
Gersten-keimlinge	<i>Bgh</i>	<i>Mla</i> -vermittelte Resistenz	Affymetrix Barley1 Chip	22.792 Unigene aller Gewebe	Caldo <i>et al.</i> , 2004
<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>	kompatible Interaktion	Mikroarray	ca. 4.000 Unigene	Moy <i>et al.</i> , 2004
Kartoffel	<i>Phytophthora infestans</i>	kompatible Interaktion	Makroarray	182 Gene aus normalisierten cDNA-Banken	ROS <i>et al.</i> , 2004

<i>Medicago truncata</i>	Elizitor von Grünalge	Basalresistenz	Makroarray auf Nylonmembran	152 bekannte Abwehrgene	Cluzet <i>et al.</i> , 2004
<i>Medicago truncata</i>	<i>Glomeromycota</i> bzw. <i>Rhizobiaceae</i>	AM-Mykorrhizza bzw. Wurzelknöllchen	Makro- und Mikroarrays	5.648 Gene aus Knöllchen bzw. Mykorrhizza	Manthey <i>et al.</i> , 2004
<i>Nicotina attenuata</i>	<i>Manduca sexta</i>	Vaccination durch Herbivoren	Mikroarray und Oligonukleotidarray	234 Gene aus normalisierten cDNA-Banken	Voelkel und Baldwin, 2004
Reis	<i>Nilaparvata lugens</i>	Antwort auf saugendes Insekt	Makroarray auf Nylonmembran	105 bekannte Unigene	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Reis-Zellen	Flagellin <i>Acidovorax avenae</i>	Basalresistenz	Mikroarray	3.353 Gene	Fujiwara <i>et al.</i> , 2004
Reis-Kallus	Abcisinsäure und Gibberillin	Induktion durch Hormon	Mikroarray	8.987 Gene	Yazaki <i>et al.</i> , 2003

### 1.4.3.2 Revers-genetische Ansätze

Revers-genetische Ansätze, um Gene des Genoms von Gerste in hohem Durchsatz systematisch auszuschalten und funktionell zu analysieren, sind VIGS (*virus induced gene silencing*) und TIGS (*transient induced gene silencing*), TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*) und die Mutagenisierung durch springende Gene (*Transposon induced mutagenesis*). Während sich mit den mutagenisierenden Methoden einzelne Gene ausschalten lassen, haben Methoden die auf interferierender RNA (RNAi) beruhen den Vorteil, dass sich auch duplizierte Gene ausschalten lassen.

#### VIGS

VIGS (*virus induced gene silencing*) ist eine *gene silencing* Methode, bei der interferierende RNA (RNAi) durch Viren in Pflanzenzellen eingeschleust wird. Bei ausreichender Sequenzhomologie zur Ziel-RNA wird diese im Zytoplasma abgebaut. In Monokotyledonen wie Gerste, Hafer, Weizen und Mais wird derzeit der Plus-Strang RNA-Virus BSMV (*Barley stripe mosaic virus*) verwendet (Holzberg *et al.* 2002). Für Gerste wird ein Projekt am SCRI (Scottish Crop Research Institut) bearbeitet (Lacomme *et al.* 2003).

#### TIGS

Analog zu dem Begriff VIGS wurde der Begriff TIGS (*Transient induced gene silencing*) geschaffen. Das transiente „Ausschalten“ von Genen bzw. das transiente Überexprimieren von Genen in einzelnen epidermalen Zellen von Blattabschnitten, vermittelt durch biologisches Bombardement, hat sich in den letzten Jahren als eine attraktive Alternative zur stabilen Pflanzentransformation bei der Untersuchung von Getreide-Pathogen-Interaktionen erwiesen, da sich transiente Tests schnell und reproduzierbar durchführen lassen und hochdurchsatztauglich sind. In einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel wurden Vor- und Nachteile des transienten Systems ausführlich dargelegt und 35 TIGS- bzw. Überexpressionsexperimente in Gerste bzw. in Weizen beschrieben, in denen die Resistenz respektive Anfälligkeit der Pflanzen beeinflusst wurde (Panstruga 2004). Untersuchungen zur Übertragbarkeit der Ergebnisse von transienten Systemen auf die gesamte Pflanze sind noch sehr limitiert. Bisher konnten die *Mla*-vermittelten Resistenzen durch Überexpression von *Mla* und die *mlo*-vermittelte Resistenz durch TIGS von *Mlo* im transienten System phänokopiert werden (Panstruga 2004). Transgene Weizenpflanzen existieren von einer im Überexpressionstest gefundenen, resistenzvermittelnden Peroxidase, die mit WIR3 respektive TAPERO bezeichnet wurde (Schweizer *et al.* 1999) Hier wurde eine erhöhte Resistenz

gegenüber *Bgh* im Fahnenblatt transgener Pflanzen der T2 Generation gezeigt (Altpeter und Varshney *et al.*, eingereicht). TIGS ist ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit.

### **TILLING**

Mit TILLING wird nach EMS-induzierten Punkt-Mutationen in bekannten Genen gesucht, wobei es möglich ist ganze Bibliotheken von M2-Pflanzen abzusuchen. Es lassen sich subletale Mutationen zur phänotypischen Analyse ermitteln. Die DNA der M2 Pflanzen wird dazu extrahiert und in *Pools* zur Verfügung gestellt. Anschließend werden die Polymorphismen durch Heteroduplexanalysen von Wildtyp-DNA und Mutanten-DNA entweder durch denaturierende HPLC oder durch *mismatch*-spezifische Spaltung mittels einer Einzelstrang spezifischen Endonuclease (Cel1) und anschließende Gelelektrophorese detektiert. Colbert *et al.* beschreiben eine *Screening*-Methode, die auf *mismatch*-spezifischer Spaltung beruht und mit der sich ein Gen pro Woche in einer Pflanzenpopulation analysieren lässt (McCallum *et al.* 2000; Colbert *et al.* 2001). Ein großes Projekt, in dem mit TILLING mutagenisierte und charakterisierte M2 Gersten-Accessionen erzeugt wurden, ist am SCRI (*Scottish Crop Research Institute*, <http://www.scri.sari.ac.uk>) etabliert und soll durch ein Projekt am IPK (GABI-TILL) ergänzt werden.

### **Transposon induzierte Mutagenese**

Eine weitere revers-genetische Methode, die bei der Isolation und Untersuchung der Genfunktion in Gerste Anwendung findet, ist die *Transposon induced mutagenesis* oder *Insertional mutagenesis*. Hierbei werden sogenannte Transposons („springende Gene“) genutzt, die in kodierende Regionen von Genen gezielt inserieren. Koprak *et al.* (2000) etablierten ein funktionelles *two-element transposon tagging system* für Gerste, dass sich der Transposons Ac/Ds aus Mais in Gerste bedient.

### **Stabile Transformationssysteme**

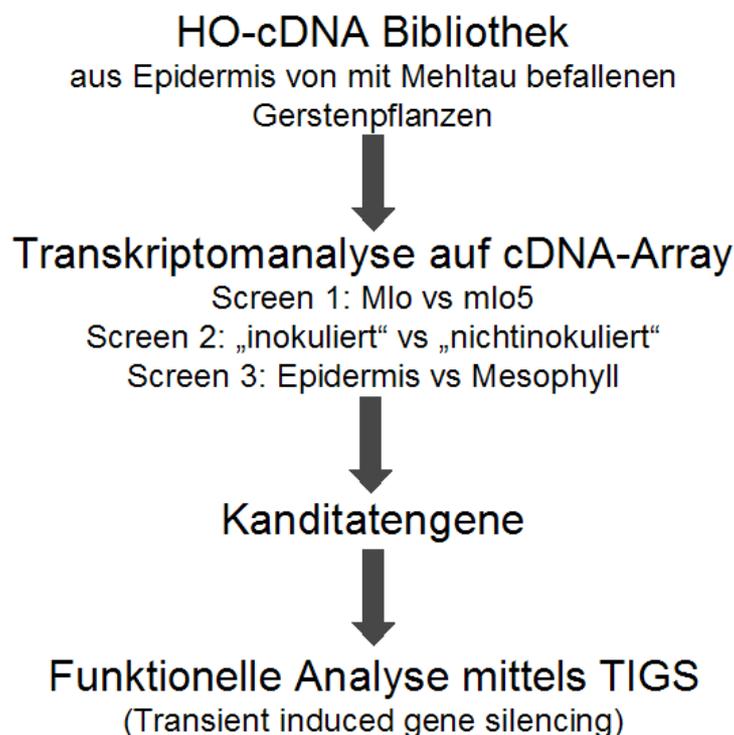
Im Zusammenhang mit der funktionellen Untersuchung von Genen wird derzeit erfolgreich an der Etablierung von *Agrobacterium* basierten Transformationssystemen der Gerste gearbeitet (persönliche Mitteilung Kumlehn, IPK Gatersleben). Derartige Systeme erlauben es unter anderem große genomische Fragmente in Gerste routinemäßig stabil zu klonieren. Andere Transformationssysteme auf der Basis von Protoplastentransfektion, viraler Vektoren oder biolistischem Bombardement hatten bisher nur wenig Erfolg.

## 1.5 Ziel der Dissertation

Ziel der Dissertation war die Charakterisierung des epidermalen Transkriptoms mehltaubefallener *mlo*-resistenter Gerste mittels cDNA-basierter Makroarraytechnologie. Als Modellsystem sollten die beiden isogenen Sommergerstenlinien Ingrid und Ingrid BC *mlo5* dienen. Damit verbunden war die mögliche Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der *mlo*-vermittelten-Resistenz bzw. von Komponenten der Basalresistenz.

Folgendes Vorgehen war geplant (Abbildung 1.8): Zunächst sollte eine cDNA-Bank aus Epidermen von mehltaubefallenen Gerstenkeimlingen der Sorte Ingrid BC *mlo5* erstellt werden, mit der unter anderem das cDNA-Bank Sortiment des IPK ergänzt werden sollte. Die erstellte cDNA-Bank sollte aber auch als Grundlage für die Transkriptomanalyse mittels cDNA-basierter Makroarraytechnologie dienen. Dazu sollte das aus dieser cDNA-Bank resultierende Unigenet auf eigens zu erstellende Makroarraymembranen gespottet werden.

Mit den in der Transkriptomanalyse durchgeführten Vergleichen „*Mlo versus mlo5*“ sollten mit der *mlo*-vermittelten Resistenz assoziierte Gene, mit den Vergleichen „inokuliert“ versus nicht „inokuliert“ allgemein pathogen induzierte Gene und mit den Vergleichen Epidermis versus „Restblatt“ gewebespezifisch exprimierte Gene gefunden werden. Aus der Transkriptomanalyse sollten Zusammenstellungen von Kandidatengen resultieren. Diese sollten anschließend mittels TIGS (*Transient Induced Gene Silencing*), einer im Labor etablierten Methode um Gene zeitlich beschränkt auszuschalten, auf ihre Funktion bei der *mlo*-vermittelten Resistenz untersucht werden.



**Abbildung 1.8:** Schema des experimentellen Vorgehens.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Das Pathosystem Gerste und Mehltau

#### 2.1.1 Versuchsorganismen

Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> )	Sommergerste Sorte „Ingrid“
Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> )	Sommergerste Sorte „Ingrid <i>mlo5</i> “
Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> )	Sommergerste Sorte „Golden Promise“
Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> )	Sommergerste Sorte „Pallas“
Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> )	Sommergerste Sorte „Pallas P22“
Weizen ( <i>Triticum</i> subsp. <i>aestivum</i> )	Winterweizen Sorte „Kanzler“

Gerstenmehltau ( <i>Blumeria graminis</i> (DC) Speer f. sp. hordei)	Rasse 4.8
Weizenmehltau ( <i>Blumeria graminis</i> (DC) Speer f. sp. tritici)	Rasse FAL 92315

Die isogene Sommergerstenlinie „Ingrid *mlo5*“ entstand durch Einkreuzung der Mutante Risoe 5678 (Carlsberg II = *mother variety*) und sieben Rückkreuzungen mit Ingrid. Bei der Gerstenmehltaukultur handelt es sich um ein helvetisches Feldisolat mit dem Avirulenzgen *avrMla9*, bei der Weizenmehltaukultur um ein helvetisches Feldisolat ohne bekanntes Avirulenzgen.

#### 2.1.2 Anzucht der Versuchspflanzen

Zur Anzucht der Versuchspflanzen wurden Plastiktöpfe mit Pikiererde locker gefüllt, die mit einer Holzscheibe bis 2 cm unterhalb des Randes leicht verdichtet wurde. Dann wurden etwa 60 Gerstenkörner pro Topf ausgesät, mit einer 1 cm dicken Erdeschicht abgedeckt und anschließend mit Leitungswasser gegossen.

Pflanzen für TIGS-Experimente wuchsen in einer Klimakammer (SIEMENS; SIMATIC OP7; 16 Stunden Metallhologenlicht/Halogenlicht 1:1; 8 Stunden Dunkelheit; Temperatur konstant 20°C; relative Luftfeuchtigkeit 60%; Pflanztopfe in Schalen mit 1 cm Wasser). Pflanzen für alle übrigen Experimente und für die Präparation der cDNA-Bank wuchsen im Gewächshaus auf Pikiertischen mit täglich befeuchteten Matten (16 Stunden Licht von Natriumhalogenlampen und 21±1°C; 8 Stunden und 17,5±0,5°C°).

#### 2.1.3 Erhaltung und Konidienproduktion von *Blumeria graminis*

*B. graminis* ist ein obligat biotropher Pilz. Erhaltung und Konidienproduktion sind daher nur auf lebenden anfälligen Pflanzen möglich. Für die Erhaltung des Gerstenmehltaus (*Bgh*) wurde die Gerstensorte „Golden Promise“, für die Erhaltung des Weizenmehltaus (*Bgt*) die Weizensorte „Kanzler“ verwendet. Beides sind stark anfällige Sorten, der Pilz kann reichlich Konidien bilden. Die Aussaat der Pflanzen erfolgte wie unter Kapitel 2.1.2 beschrieben. Die Anzucht erfolgte in Klimaschränken (SANYO Biomedical MLR-350; Tokio, Japan) (16 Stunden Licht Fluoreszenzröhren FL40SS W/37; 8 Stunden Dunkelheit; 20°C konstant;

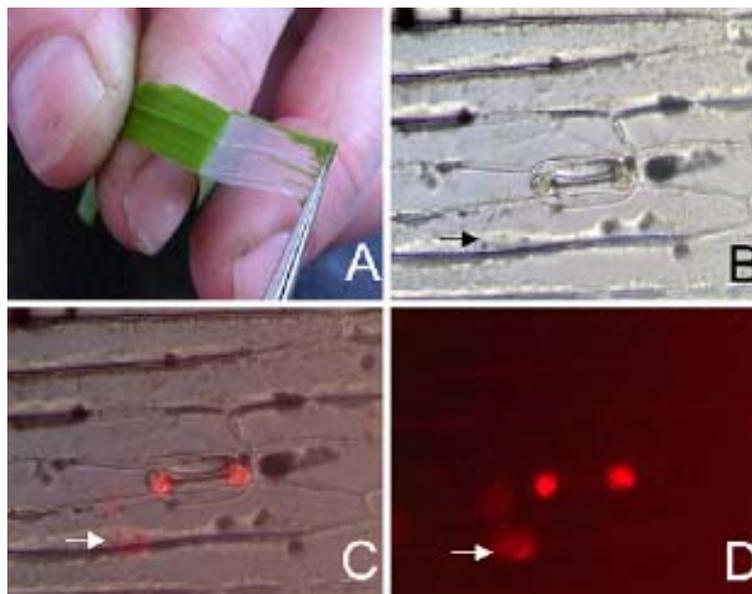
ca. 60% relative Luftfeuchtigkeit, Pflanztöpfe in Schalen mit 1 cm Wasser). Nach jeweils sieben Tagen wurden die Pflanzen durch Abschütteln von mehлтаubefallenen Pflanzen inokuliert und weiter in den Klimaschränken inkubiert. Als Spenderpflanzen für die Inokulation der Experimente wurden sieben bis 11 Tage gewachsene Mehлтаukulturen verwendet, wobei die Konidien ab sieben Tagen nach dem Überimpfen etwa alle zwei Tage abgeschüttelt wurden. Dadurch wurde gewährleistet, dass immer genügend virulente (frische) Sporen vorhanden waren.

### 2.1.4 Inokulation der Versuchspflanzen im Pflanztopf

Die Versuchspflanzen für die Genexpressionsanalysen und die Erstellung der cDNA-Bank wurden jeweils sieben Tage nach Aussaat inokuliert. Die Pflanztöpfe wurden dazu in einen Inokulationsturm (55x55x55 cm) gestellt und durch Abschütteln der Konidiosporen von Spenderpflanzen inokuliert. Die Inokulationsdichte betrug 150 bis 200 Sporen/mm<sup>2</sup>.

### 2.1.5 Biologisches Material für HO-cDNA-Bank und für Expressionsanalysen

Ausgangsmaterial für die HO-cDNA-Bank waren abgezogene Epidermen von Primärblättern sieben Tage alter Ingrid BC *mlo5*-Pflanzen, die mit *Bgt* oder *Bgh* inokuliert wurden. Im Zeitraum von 4-8 Stunden und nach 22–28 Stunden wurden die Epidermen der abaxialen Seite mittels Skalpell und Präparierpinzette abgezogen und in flüssigem Stickstoff gesammelt (Abbildung 2.1). Insgesamt wurden sieben Inokulationsexperimente durchgeführt. Das Epidermismaterial wurde dabei im Gewichtsverhältnis 1:1:1:1 gemischt. Insgesamt wurden 2 g Epidermismaterial gewonnen. Teilweise blieben Mesophyllreste an der Epidermis haften (Abbildung 2.1 C). Für die Arraysonden und die HPLC-Messungen wurden jeweils ca. 300 mg Epidermisgewebe, und das verbliebene „Restblatt“ gesammelt. Für *Northern-Blot*-Experimente wurden dagegen ganze Blätter verwendet.



**Abbildung 2.1:** Die Epidermis wurde mit Hilfe einer Pinzette abgezogen. (A) Mesophyllreste wurden mit einem Skalpell entfernt. Dennoch blieben Reste von Mesophyllzellen (Pfeile) mit der epidermalen Zellschicht verbunden, wie in den mikroskopischen Aufnahmen zu sehen ist (B Hellfeld, C Phasenkontrast, D Grünfilter). Die beiden grünen (B) sowie die roten (D) Punkte zeigen das Chlorophyll in den Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates.

## 2.2 Die HO-cDNA-Bank

Eine cDNA-Bank ist eine rekombinante DNA-Bank, die alle exprimierten mRNA-Moleküle mit PolyA-Schwanz eines Organismus bzw. eines Gewebes in Form von cDNA (komplementäre DNA) enthält. Die cDNA-Klone repräsentieren die Häufigkeit der entsprechenden mRNA-Moleküle eines Gewebes bzw. einer ganzen Pflanze. Die HO-cDNA-Bank wurde aus Epidermis von Primärblättern siebentägiger Gerstenkeimlinge der isogenen Linie Ingrid *mlo5* 6 und 24 hpi mit *Bgh* bzw. *Bgt* erstellt (siehe Kapitel 2.1.5).

### 2.2.1 Erstellung der HO-cDNA-Bank

Für die Konstruktion der HO-cDNA-Bank wurde zunächst RNA und dann mRNA isoliert. Alle weiteren Klonierungsschritte wurden mit einem Kit (pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit, STRATAGEN, La Jolla, USA) durchgeführt. Folgende Arbeitsschritte wurden ausgeführt:

- (1) Gesamt-RNA-Isolation (Kapitel 2.2.1.1)
- (2) mRNA-Isolation (Kapitel 2.2.1.2)
- (3) cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.1.3)
- (4) Klonierung in pBluescript (Kapitel 2.2.1.3)
- (5) Transformation in *E. coli* (Kapitel 2.2.1.3)
- (6) Anlegen der cDNA-Bank (Kapitel 2.2.1.4)

#### 2.2.1.1 RNA-Isolation

2 g in flüssigem Stickstoff pulverisierte Epidermen (siehe Kapitel 1.7) wurden in 3 ml RNA-Extraktions-Puffer und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol in Röhrcchen (15 ml; PP, Greiner, Nürtingen) suspendiert und anschließend auf einem Rotationsschüttler (30 min, 150 rpm) liegend geschüttelt. Nun wurde die Suspension zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) und mit 1,5 ml Chloroform versetzt. Das Röhrcchen wurde dann fünf mal vorsichtig umgedreht und erneut zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues Röhrcchen (15 ml; PP-Röhrcchen, Greiner, Nürtingen) abgegossen, mit 3 ml 6 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt und gut geschüttelt. Über Nacht wurde die RNA bei 4°C gefällt und dann abzentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet in 450 µl TE aufgenommen. Um das verbliebene Lithiumchlorid zu beseitigen wurde die RNA mit 70%igem Ethanol und 0,3 M Na-Acetat gefällt und einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in 500 µl Aqua dest. aufgenommen.

#### RNA Extraktions-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	0,5 M
Na-EDTA	0,25 M
SDS	5 % g/v

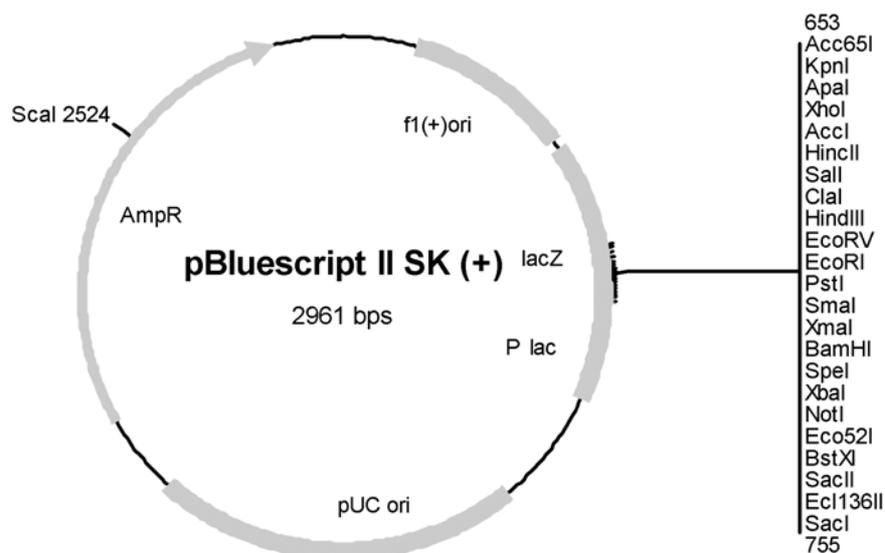
### 2.2.2.2 mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolation erfolgte mit Hilfe von magnetischen Polystyren-Kügelchen (Dynabeads mRNA Purification Kit; Dynal, Oslo, Norwegen), an die Oligo-(dT)<sub>25</sub>Nukleotide kovalent gebunden sind. Diese werden kurz als „Dynabeads“ bezeichnet. Das Anreichern der mRNA-Moleküle beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung zwischen den für mRNA typischen Poly(A)-Schwänzen und den Oligo-(dT)<sub>25</sub>-Nukleotiden sowie der Separation der „Dynabeads“ durch einen Magneten. RNA-Moleküle ohne Poly(A)-Schwanz werden anschließend gewaschen.

Die mRNA Isolation erfolgte unter Verwendung von 1 ml „Dynabead“-Suspension. Die „Dynabeads“ wurden zweimal mit 500 µl Binde-Puffer gewaschen, in 500 µl Binde-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die RNA (300 µg in 500 µl Aqua dest.) 2 min bei 65°C inkubiert und zu der „Dynabead“-Suspension gegeben. Um die RNA zu binden, wurde die Mischung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die „Dynabeads“ an den Magneten gebunden und zweimal mit jeweils 1 ml Wasch-Puffer gewaschen. Die mRNA wurde mit 40 µl Tris-HCl (2 mM, 65°C, 2 min) eluiert. Die verwendeten Puffer sind Bestandteile des Kits.

### 2.2.1.3 cDNA-Synthese, Klonierung und Transformation

Die cDNA-Synthese, die Klonierung und die Transformation wurden mit einem Kit (pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit, STRATAGEN, La Jolla, USA) durchgeführt. Die Größenfraktionierung erfolgte abweichend vom Statagene Protokoll mit Sephacryl-Säulen (cDNA Size Fractionation Columns, GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien), um möglichst große cDNA-Moleküle zu klonieren und verbliebene *EcoRI*-Adaptoren zu entfernen. Kloniert wurden die Fragmente durch Ligation in den mit *EcoRI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pBluescriptSK+ (Abbildung 2.2). Die Transformation wurde mit den kompetenten Zellen XL10-Gold laut der Arbeitsanleitung (pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit) durchgeführt.



**Abbildung 2.2:** pBluescript II SK (+) ist ein 2.961 bp großer Vektor der sich von pUC19 ableitet. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; f1(+)-ori: Replikationsursprung für Helferphage; *LacZ*:  $\alpha$ -Komplementation für Blau-Weiß-Selektion; P lac: *LacZ* Promotor, pUCori: Replikationsursprung des Plasmides

### 2.2.1.4 Etablierung der HO-cDNA-Bank

Die transformierten Bakterienkulturen enthalten ein Gemisch von verschiedenen cDNA-Klonen. Um Einzelzellkolonien die ein cDNA-Insert tragen zu präparieren, wurde die Bakterien-Suspension mit Hilfe von sterilen Glaskugeln (100 Stück/Platte, Durchmesser 4 mm) auf quadratische Petrischalen (24x24x2 cm LB-Agar-Medium, 0,5 cm Füllhöhe) ausplattiert. Dem LB-Agar-Medium wurde IPTG und X-Gal zugegeben (siehe Kapitel 2.8.11). Dann wurde 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Bis zum Picken der Kolonien wurden die Platten bei 4°C gelagert. Das Picken und Selektionieren der Kolonien erfolgte mit einem Roboter (BiopickI; Genomic Solutions, Huntingdon, England), der die weißen Kolonien in 384er Mikrotiterplatten (Genetix X6001, New Milton, England) übertrug. In jedem Loch der Mikrotiterplatten befanden sich 50 µl Lagermedium. Ausschließlich weiße Kolonien wurden gepickt, da diese ein cDNA-Insert tragen (Blau-Weiß-Selektion). Die Kolonien wuchsen 18 Stunden bei 37°C und wurden anschließend bei -80°C eingelagert.

#### Lagermedium

Bacto-Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
ad 2 M NaOH	pH 7,4
ad Aqua dest.	900 ml
10 x HMF-Medium	100 ml
Ampicillin	(Endkonzentration 50 µg/ml)

#### 10 x HMF-Medium\*

##### Lösung A)

MgSO <sub>4</sub> + 7 H <sub>2</sub> O	3 mM
Na <sub>3</sub> -Citrat + 2 H <sub>2</sub> O	15 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	68 mM
Glycerin**	56%
Aqua dest.	ad 800 ml

##### Lösung B)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	270 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130 mM
Aqua dest.	ad 200 ml

\*10 x HMF-Medium=4/5 Lösung A + 1/5 Lösung B. \*\*Glycerin separat autoklavieren.

### 2.2.3 EST-Sequenzierung und Analyse der HO-cDNA-Bank

Die Sequenzierung der cDNA-Klone erfolgte vom 5'-Ende mit dem Primer SK (5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3') ausgehend von Plasmid-Präparationen und wurde im Sequenzierlabor des IPK bzw. von der Firma AGOWA (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Um eine vergleichbare Qualität der Sequenzen zu gewährleisten und um *Clustering*-Prozesse zu ermöglichen, wurden von allen Sequenzen die Vektorreste und die qualitativ minderwertigen Enden mittels der Software Seqman II (DNASTAR Inc., Madison, USA) (vorgegebene Einstellungen) entfernt. In einem weiteren Schritt wurden alle Sequenzen von der Analyse ausgeschlossen die kürzer als 100 bp waren (EST Trimmer, Thomas Thiel 2002, IPK Gatersleben).

Die 5'-Sequenzen aller HO-Klone wurden untereinander mit der Software StackPack 2.1 (Electric Genetics PTY Ltd., Reston, USA) verglichen, um die Redundanz der HO-cDNA-Bank zu untersuchen, ein Unigenet zu definieren und paraloge Sequenzen zu identifizieren

und statistisch zu erfassen. Mit Hilfe dieser Software wurden Sequenz-Cluster gebildet, die sich in Contigs und diese wieder in Primärconsensi und alternative Consensi aufteilen (Miller *et al.* 1999).

Um homologe Nukleotid- oder Proteinsequenzen der ESTs zu identifizieren, wurden die Sequenzen mittels Blast-Algorithmen (Altschul *et al.* 1990) mit denen der Datenbank EMBL Plant (BlastN; alle öffentlich verfügbaren Gene aus Pflanzen), der Datenbank EMBL Fungi (BlastN; alle öffentlich verfügbaren Gene aus Pilzen) und den Datenbanken SwissProt und SwissPir (BlastX, alle Protein-Sequenzen) auf dem Server Husar des DKFZ in Heidelberg (<http://genome.dkfz-heidelberg.de>) verglichen. Um die anfallenden großen Datenmengen in excelkompatible und durch Tabulator gegliederte Dateien umzuwandeln, wurden hausinterne Perl *Skripts* des IPK verwendet (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/owntools.php>). Außerdem wurde die Sequenzanalyse-Software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, USA) verwendet.

## 2.3 Transkriptomanalyse der Interaktion Gerste und *Bgh* mittels Makroarray

Die Transkriptomanalyse der Interaktion Gerste und *Bgh* wurde mit Hilfe eines auf Nylonmembran gespotteten Makroarrays durchgeführt. In einem ersten sehr zeitaufwendigen Arbeitsschritt wurden die HO-Array-Membranen erzeugt (Kapitel 2.3.1). Dann wurden die cDNA-Sonden hergestellt (Kapitel 2.3.2), mit denen die Membranen hybridisiert wurden (Kapitel 2.3.3). Im Anschluss wurden die Daten analysiert (Kapitel 2.3.4). Methodische Kontrollexperimente wurden mit Hilfe von *Northern-Blots* (Kapitel 2.4) durchgeführt.

### 2.3.1 Herstellung der HO-Array Membran

Auf die HO-Arraymembran wurden 3.595 Unigene, in Form von PCR-Fragmenten, übertragen (gespottet). Dazu waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- (1) Neuordnung der cDNA-Klone (Kapitel 2.3.1.1)
- (2) PCR-Amplifikation der cDNAs (Kapitel 2.3.1.2)
- (3) „Spotting“ auf die Trägermembran (Kapitel 2.3.1.3)

#### 2.3.1.1 Neuordnung der cDNA-Klone des Unigenesets

Die physische Umsetzung des definierten Unigenesets (3.595 Unigene), aus den ursprünglichen Plasmid-Präparationen (Platten HO01-HO15), in neue 384er Mikrotiterplatten (X6001, Genetix, New Milton, England) erfolgte mit einem Pipettier-Roboter (GENISIS Workstation 100; TECAN Co., Männedorf, Schweiz). Dieser Prozess wird als Rearranging bezeichnet. Dabei wurde von verdünnten Plasmid-Präparationen ausgegangen. Verdünnt wurde mit Hilfe eines Stempels (BioRad, Hercules, Kalifornien), der je einmal in die ursprünglichen Lösungen und dann in neue 384er Mikrotiterplatten (X6001, Genetix, New Milton, England) eingetaucht wurde. In den neuen Mikrotiterplatten waren je 80 µl Aqua dest. vorgelegt. Kontaminationen wurden durch Abflammen des Stempels vermieden.

### 2.3.1.2 PCR-Amplifikation der cDNA-Klone des Unigensets

Die Amplifikation der cDNA-Klone erfolgte, ausgehend von den verdünnten neuangeordneten Plasmid-Präparationen, mit den Universalprimern M13-20 (5'-CAT TTT GCT GCC GGT CA-3') und SK (5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3') und wurde im 96er Plattenformat in 50 µl Ansätzen durchgeführt.

Endkonzentration der PCR Reagenzien: 1xPCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 µM dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland); 1 µM M13-20 Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland); 1 µM SK Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland); 1 U Taq Polymerase (Roche Co., Basel, Schweiz).

Folgendes Temperatur-Zeit Profil wurde verwendet: Nach dem Vorheizen des Heizdeckels auf 110°C wurden die PCR Platten in den Thermoblock (94°C) gestellt. Danach wurde das PCR Programm mit einem vierminütigen Denaturierungsschritt (94°C) gestartet. Diesem folgten 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung der DNA (94°C; 30 s), Primer-Anlagerung (50°C, 30 s) und Primer-Extension (72°C, 80 s). Mit einem letzten Extensionsschritt (72°C, 5 min) wurde die PCR beendet. Alle DNA-Fragmente wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

Ca. 87,8% der Amplifikationen zeigten eine einzelne Bande im Größenbereich 300-2.000 bp. Bei 10,6% der Amplifikationen war keine Bande, bei 1,6% eine Doppelbande sichtbar. Die DNA-Ausbeute lag bei 40 µg bis 80 µg DNA pro Reaktion. Die DNA-Fragmente wurden bis zur Übertragung auf die Arraymembran bei -20°C gelagert.

### 2.3.1.3 Übertragen der DNA-Fragmente auf die Arraymembran

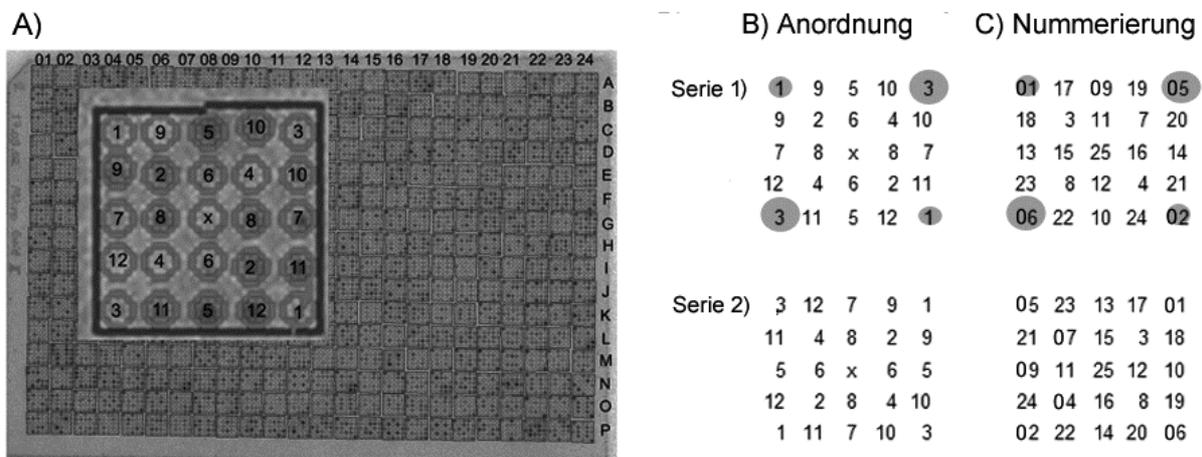
Die DNA-Fragmente aus den PCR wurden mit dem Roboter Biogrid II (Genomic Solutions, Huntingdon, England) auf eine 9x12 cm große, positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membrane; PALL Co., Dreieich, Deutschland) übertragen, die als „Arraymembran“ verwendet wurde. Das Übertragen wird als „Spotten“, die punktuell aufgebracht DNA-Fragmente werden als „Spots“ bezeichnet. Insgesamt wurden 72 Membranen hergestellt, 48 in Serie (1) und 24 in Serie (2) (Abbildung 2.3). Für das *Spotting* mit dem Roboter wurden je 30 µl PCR-Produkte, manuell mit einer 12-Kanalpipette, aus dem 96er Plattenformat der PCR in das 384er Mikrotiterplattenformat (Mikrotiterplatte X6001, Genetix, New Milton, England) übertragen. Anschließend wurden die DNA-Doppelstränge durch Zugabe von 40 µl basischer Denaturierungs-Lösung aufgeschmolzen. Für das *Spotting* wurde ein Pintool verwendet, das 384 Nadeln mit einem Spitzendurchmesser von 0,2 mm hatte. Jeder Klon wurde durch fünfmaliges Eintauchen des Pintools in die denaturierte DNA-Lösung und anschließendes Aufsetzen auf die Arraymembran, die auf einer Moosgummiunterlage lag, übertragen. Pro Durchgang wurden so ca. 0,2 µl übertragen, was bei fünfmaligen Aufsetzten ca. 250 ng DNA entsprach.

#### Denaturierungs-Lösung

NaOH	0,5 M
NaCl	2,5 M
Bromphenolblau	Spatelspitze

### 2.3.1.4 Anordnung der Spots auf der Membran

Der Array war in 384 Subarrays unterteilt (Abbildung 2.3 A). Jedes Subarray bestand aus 25 Spots. Diese wurden im 5x5 Muster mit dem Roboter aufgetragen. Jeder cDNA-Klon wurde von zwei Spots innerhalb eines Subarrays repräsentiert. Das heißt, jeder Subarray repräsentiert 12 verschiedene cDNA-Klone bzw. Gene des Unigensets. Dieses Auftragsverfahren wird als Doppelspotting bezeichnet. Jeder Spot ist mit einer Spotnummer in der „Spotting“-Liste ([http://www.pgrc.ipk-gatersleben/epidermis\\_mlo](http://www.pgrc.ipk-gatersleben/epidermis_mlo)) eindeutig zu identifizieren. Insgesamt wurden zwei verschiedene Membranserien mit jeweils unterschiedlicher Anordnung der cDNA-Klone in den Subarrays gespottet. Die Anordnung der cDNA-Klone in den Subarrays ist in Abbildung 2.3 B dargestellt. Jeder Spot besitzt eine „Spotting“-Nummer (zum Beispiel A-01:01) in der „Spotting“-Liste. A-01:01 bedeutet beispielsweise Subarray A01 und cDNA-Klon-Position 01. Dasselbe Gen befindet sich noch in Position 02 (Abbildung 2.3 A und 2.3 B).



**Abbildung 2.3:** Anordnung der cDNA-Klone auf dem Array. A) Beispielmembran. B) Anordnung der cDNA-Klone in einem Subarray. Pro Subarray wurde jeder Klon zweimal gespottet. C) Nummerierung der cDNA-Klone in der „Spotting“-Liste.

### 2.3.1.5 Nachbehandlung der hergestellten Arraymembranen

Folgende Nachbehandlungen wurden durchgeführt: Zunächst wurden die Membranen je 5 min auf mit Fixierungs-Puffer und dann mit Neutralisations-Puffer getränktes Filter-Papier (0,4 mm; Whatman; Brentford, England) gelegt. Dann wurde die DNA auf der Membran durch UV Licht gebunden (1.200 J; UV Stratalinker 2400; Stratagene, La Jolla, USA), mit Wasch-Puffer (2 x SSC) für 5 min gewaschen und anschließend 30 min bei 80°C gebacken. Die getrockneten Membranen wurden zwischen Filterpapier (0,2 mm, Whatman, Brentford, England) gelegt und bei Raumtemperatur bis zur Hybridisierung gelagert.

#### Fixierungs-Puffer

NaOH                    0,5 M  
 NaCl                    1,5 M  
 add HCl                pH 7,5

#### Neutralisations-Puffer

NaCl                    1,5 M  
 Tris-HCl               0,5 M  
 add NaOH            pH 7,4

### 2.3.2 Herstellung von cDNA-Sonden aus Epidermis- und Blattmaterial

Die Herstellung der cDNA-Sonden erfolgte in vier Arbeitsschritten. Die cDNA-Sonden eines Zeitpunktes wurden jeweils parallel hergestellt.

- 1) RNA-Isolation (Kaptitel 2.3.2.1)
- 2) mRNA-Isolation (Kaptitel 2.3.2.2)
- 3) cDNA-Synthese (Kaptitel 2.3.2.3)
- 4) <sup>33</sup>P-Markierung (Kapitel 2.3.2.4)

#### 2.3.2.1 RNA-Isolation

Aus ca. 200 mg, in flüssigem Stickstoff homogenisierten, Epidermis- bzw. „Restblatt“-Material wurden zwischen 50 und 100 µg RNA isoliert (NucleoSpin-RNA L Kit Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Die RNA-Lösungen wurden in einer Vakuumentrifuge (SpeedVac SC110, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) bis auf ein Volumen von ca. 60 µl einrotiert, dann photometrisch bei 260 nm/280 nm vermessen und auf eine Konzentration von 0,75 µg/µl eingestellt. Zusätzlich wurde die Integrität der isolierten RNA in einem FA-Agarose Gel beurteilt (siehe Kapitel 2.4.2).

#### 2.3.2.2 mRNA-Isolation

Für die mRNA-Isolation wurde ein Kit basierend auf *magnetic beads* verwendet (Dynabead mRNA Purification Kit, Dynal, Oslo, Norwegen) (siehe auch Kaptitel 2.2). Mit einem speziellen Magnethalter (MPC-S; Dynal, Oslo, Norwegen) war es möglich jeweils vier mRNAs gleichzeitig zu isolieren.

1) Jeweils 100 µl resuspendierte „Dynabead“-Suspension wurde eingesetzt. Die „Dynabeads“ wurden mit 50 µl Binde-Puffer gewaschen, in 50 µl Binde-Puffer wieder aufgenommen und auf Eis gestellt. 2) 50 µl RNA-Lösung (0,75 µg/µl) wurde 2 min bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. 3) Die RNA-Lösung wurde zu der „Dynabead“-Suspension gegeben. 4) Die Mischung wurde 5 min mit den Händen gerollt, um die mRNA an Oligo (dT)<sub>25</sub> Nukleotide der „Dynabeads“ zu binden. 5) Die „Dynabeads“ mit der anhybridisierten mRNA wurden zweimal mit 100 µl Wasch-Puffer und zweimal mit 250 µl RT-Puffer gewaschen und anschließend auf Eis gestellt.

#### 2.3.2.3 Synthese von cDNA

Für die cDNA-Synthese wurde das Enzym Reverse Transkriptase, eine modifizierte MMLV-RT, verwendet. Die MMLV-RT wurde aus dem *Moloney murine leukemia virus* isoliert und ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. SuperScript™ II besitzt keine intrinsische RNase Aktivität, was sehr lange Transkripte ermöglicht.

1) Die „Dynabeads“ mit der gebundenen mRNA wurden in 50 µl RT-Mix suspensiert und für 2 min bei 42°C inkubiert. 2) Durch Zugabe von 1 µl RT (200 U/µl; Superscript; GibcoBRL; Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) wurde die Reverse Transkription gestartet. Dazu wurde die Mischung 60 min bei 42°C inkubiert, wobei die „Dynabeads“ alle 15 min aufgeschüttelt wurden. 3) Nun wurde der RT-Mix von den „Dynabeads“ mit kovalent gebundenen mRNA::cDNA-Heteroduplexen entfernt. Anschließend wurde zweimal mit 250 µl 1xRT-Puffer gewaschen. 4) Die „Dynabeads“ wurden in 50 µl Elutions-Puffer aufgenommen und

2 min bei 95°C inkubiert, um die mRNA von der entstandenen cDNA abzuschmelzen. 5) Danach wurden die „Dynabeads“ magnetisch separiert. Der Überstand mit der gelösten mRNA wurde verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. 6) Anschließend wurden die „Dynabeads“ mit der anhybridisierten cDNA in 250 µl Aqua dest. gewaschen.

### RT-Mix

H <sub>2</sub> O	34,8 µl
5 x RT-Puffer	10,0 µl
100 mM DTT	1,0 µl
10 mM dNTP	2,5 µl
RNAse Inhibitor	1,3 µl

### Elutions-Puffer

Na-EDTA	2 mM
add NaOH	pH 8,0

### 2.3.2.4 Radioaktive Markierung der cDNA mit <sup>33</sup>P

Die cDNA wurde mittels *random priming* radioaktiv markiert, einer Methode bei der Zufallshexamere „*random primers*“ als Primer für die DNA-Polymerase während der Synthese des zweiten DNA-Stranges verwendet werden. Als DNA-Polymerase wurde exonucleasefreies Klenow-Fragment (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), zur Markierung [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet.

1) Die „Dynabeads“ mit der gebundenen cDNA wurden in 18 µl Aqua dest. und 6 µl dNTP-Mix (0,5 mM dATP; 0,5 mM dGTP; 0,5 mM dTTP; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) resuspendiert, 3 min auf 95°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gestellt, um Sekundärstrukturen der cDNA aufzulösen. 2) Zur Synthese des zweiten Stranges wurden 4 µl Hexanucleotid-Mix (Roche Co., Basel, Schweiz), 6 µl [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP (10 mCi/ml) und 2 µl Klenow Fragment (10 U/µl, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) dazu pipettiert. Anschließend wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. 3) Die „Dynabeads“ mit den synthetisierten Sonden wurden magnetisch separiert. Der Überstand mit den nichteingebauten Nukleotiden wurde abgenommen und zur Bestimmung der Einbauraten aufbewahrt. 4) Zu den „Dynabeads“ wurden 50 µl Elutions-Puffer gegeben. Dann wurde 2 min bei 95°C inkubiert, um die cDNA-Sonden vom Erststrang zu lösen. 5) Anschließend wurde wieder magnetisch separiert. Im Überstand befinden sich nun die cDNA-Sonden. 6) Durch Zentrifugation (2 min, 805 g) über einen Filter (0,2 µm Ausschlussvolumen, Anapore, Whatman, Brentford, England) wurde der Überstand von den noch verbliebenen „Dynabeads“ befreit. 7) Der Einbau radioaktiver Nukleotide wurde mittels eines Geiger-Müller-Zählrohres (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland), über das Verhältnis freier Nukleotide im Überstand zu eingebauten Nukleotiden in den cDNA-Sonden abgeschätzt.

### 2.3.3 Hybridisierung des Makroarrays mit <sup>33</sup>P-markierten cDNA-Sonden

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte in vier Arbeitsschritten: 1) Zunächst wurden die Membranen in Hybridisierungsrohre (5 x15 cm) gegeben und 4 Stunden mit 7 ml Dextransulfat-Puffer in einem Drehofen (65°C und 7 rpm) vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. 2) Die <sup>33</sup>P-markierten-cDNA-Sonden und je 100 µl Lachsperma-DNA (10 mg /ml); (Salmon Sperm DNA; Stratagene, La Jolla, USA) wurden denaturiert (3 min 95°C, 5 min nasses Eisbad). 3) Der Dextransulfat-Puffer auf den Membranen wurde durch 7 ml neuen Puffer (65°C) ersetzt. Dann wurden die denaturierten cDNA-Sonden und die denaturierte Lachsperma-DNA zugegeben. Die Hybridisierung dauerte 18 Stunden (65°C und 7 rpm). 4) Die Membranen wurden, jeweils zweimal für 20 min, mit Wasch-Puffer (0,1 x SSC/0,1% SDS) bei 65°C gewaschen.

Dextransulfat-Puffer\*

Dextransulfat	10% w/v
SDS	0,8% w/v
NaCl	1 M

\*Vor Gebrauch wurde der Puffer auf 65°C erwärmt um eventuell präzipitiertes SDS zu lösen.

**2.3.4 Datenerfassung- und -analyse des <sup>33</sup>P -markierten cDNA-Makroarrays**

Zur Datenerfassung und -analyse des <sup>33</sup>P-markierten cDNA-Makroarrays waren prinzipiell fünf Arbeitsschritte notwendig:

- (1) Array-Scanning (Kaptitel 2.3.4.1),
- (2) Quantitative Bildanalyse (Kaptitel 2.3.4.2)
- (3) Normalisierung (Kaptitel 2.3.4.3).
- (4) Qualitätskontrolle (Kaptitel 2.3.4.4)
- (5) Genexpressions-Clusteranalyse (Kaptitel 2.3.4.5)

**2.3.4.1 Array-Scanning**

Zur Detektion der <sup>33</sup>P-Signale auf den Makroarraymembranen und deren Umwandlung in Bildpunkte wurde ein PhosphoImager™-System (BAS3000 Reader; Fuji, Tokio, Japan) verwendet. Die zugrunde liegende „*storage phosphor*“ Technik wandelt radioaktive Strahlung in Licht um, was eine densitometrische Auswertung ermöglicht und 10 bis 100x empfindlicher als herkömmliche Röntgenfilme ist (Johnston *et al.* 1990).

Die Membranen wurden auf befeuchtetes *Blotting*-Papier (Gel Blotting-Papier, 0,4 mm, Whatman; Brentford, England) gelegt, welches mit Wasch-Puffer (0,1 x SSC/0,1% SDS) getränkt war, anschließend zusammen mit dem *Blotting*-Papier in PE-Folie (SARAN) eingeschlagen und für 96 Stunden gegen einen Phosphoimager-Screen (23 x 40 cm; MS40080022 Fuji, Tokio, Japan) in einer Kassette (Biomax) exponiert. Die Bilder wurden mit den Einstellungen *IP Reading*, 16 Bits/Pixel und 100 µm Pixelgröße mit dem PhosphoImager™ System gescannt und gespeichert.

**2.3.4.2 Quantitative Bildanalyse**

Zur Detektion der Bildpunkte und deren Quantifizierung wurden die entstandenen Bilder, mit der Software *Array Vision* (Image Research, St. Catharines, Ontario, Canada) analysiert. Die Intensität der Bildpunkte entspricht den Hybridisationssignalen auf der Membran. Die Software erkennt und definiert alle *Spots* und alle im Muster 5x5 gespotteten Subarrays. Um den Mittelpunkt der *Spots* wird ein definierter Kreis und um die Subarrays ein definierter Rahmen gelegt. Der definierte Rahmen um die Subarrays ermöglicht die Messung der lokalen Hintergrund-Intensitäten. Folgende Software-Einstellungen (*Array Vision*) wurden verwendet: *study type: expression; array type: radio isotopic arrays; measure type: density*,

spot parameters: 5 pixel, spot shape: cycle; background: surrounding spot groups; alignment: spot search parameters: sensitivity 4 und serach radius 7.

### 2.3.4.3 Normalisierung

Die Normalisierung der Arraydaten wurde mit „Normalizer“, einem speziellen R-Skript (Altschmied, IPK Gatersleben), durchgeführt. Dabei wurden die Daten folgendermaßen bearbeitet: 1) Von allen Intensitäten wurde die jeweilige lokale Hintergrundintensität des Subarrays subtrahiert. 2) Intensitäten, die kleiner bzw. bis zu 0,2 x über dem lokalen Hintergrund lagen, wurden durch einen Wert, der 0,2 x dem lokalen Hintergrund entspricht ersetzt. 3) Von den hintergrundkorrigierten, logarithmierten Signalintensitäten wurde der logarithmierte Median der Signalintensitäten dieser Membran subtrahiert. Die Differenz wurde anschließend entlogarithmiert. Ausgehend von den so normalisierten Werten wurden alle weiteren Berechnungen angestellt.

### 2.3.4.4 Qualitätskontrolle

Es wurden nur Gene in die Analyse einbezogen deren Hybridisierungssignale (nicht normalisiert) auf mindestens zwei von 24 möglichen Membranen die lokale Hintergrundintensität um das 2,5-fache überstiegen, um zu schwache schlecht reproduzierbare Signale auszuschließen. Stark abweichende Doppelpotverhältnisse wurden durch den Minimalwert der doppelt gespotteten Gene ersetzt (siehe Kapitel 3.2.4 Qualität der hergestellten Arraymembranen).

### 2.3.4.5 Genexpressions-Clusteranalyse

Ähnliche Expressionsmuster von Genen wurden mit der Software „J-Express“ (Dysvik und Jonassen 2001) nach dem „K-means“-Algorithmus errechnet und detektiert. Die membrannormalisierten Werte wurden dazu zusätzlich genzentriert: 1) Die normalisierten Werte wurden logarithmiert. 2) Der logarithmierte Mittelwert der Signalintensitäten eines Genes auf den Membranen wurde subtrahiert. 3) Die Differenz wurde entlogarithmiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Cluster (16), *Squared Euclidian*, *Random initialisation*. Alle weiteren Berechnungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel durchgeführt.

### 2.3.5 Entfernen von cDNA-Sonden von der Arraymembran

Die Entfernung von cDNA-Sonden wird notwendig, um die Membranen ein weiteres Mal zu markieren. Dazu sind folgende Arbeitsschritte notwendig: 1) Die Membranen wurden mit kochendem Wasch-Puffer I (0,1 x SSC/0,1% SDS) übergossen und 15 min langsam im Wasserbad geschüttelt. 2) Wasch-Puffer I wurde durch einen basischen Puffer (0,4 M NaOH/0,1% SDS) ersetzt, anschließend wurde weitere 15 min bei 65°C langsam geschüttelt (Rotationsschüttler; Belly dancer, Stovall Life Science Inc, New York, USA). 3) Dann wurden die Membranen 15 min bei RT in Wasch-Puffer II (0,1 x SSC/0,1% SDS/0,2 M Tris pH 7,5) geschüttelt. Benutzte Membranen müssen ständig feucht gehalten werden! Zur längerfristigen Lagerung wurden die Membranen bei -20°C tiefgefroren.

## 2.4 Northern-Blots

Für *Northern-Blots* wird RNA in denaturierenden Agarose-Elektrophoresegelen aufgetrennt (Kapitel 2.4.2), auf eine Trägersubstanz (Nylonmembran) übertragen (Kapitel 2.4.3) und immobilisiert. Die gemäß ihrer Größe aufgetrennten mRNA-Moleküle können anschließend durch Hybridisierung (Kapitel 2.4.5) mit radioaktiv markierten Sonden (Kapitel 2.4.4) nachgewiesen (Kapitel 2.4.6) werden. Die RNA-Isolation wurde in leicht modifizierter Form gemäß Vallelian-Bindschedler *et al.* (1998) durchgeführt (Kapitel 2.4.1).

### 2.4.1 RNA-Isolation aus Blattmaterial der Gerste für *Northern-Blots*

1) 1,5 g in flüssigem Stickstoff homogenisiertes Pulver aus Blattmaterial der Gerste wurde in 3 ml RNA-Extraktions-Puffer und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol in Röhrchen (15 ml; PP, Greiner, Nürtingen, Deutschland) suspendiert und anschließend auf einem Rotationsschüttler (30 min, 150 rpm) liegend geschüttelt. 2) Die Suspension wurde zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) und mit 1,5 ml Chloroform versetzt. Das Röhrchen wurde dann fünf mal vorsichtig umgedreht und erneut zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). 3) Der Überstand, der durch einen Zelltrümmer-Pfropfen von der organischen Phase getrennt war, wurde dann vorsichtig in ein neues Röhrchen (15 ml) abgegossen, mit 3 ml 6 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt und gut geschüttelt. 4) Über Nacht wurde die RNA bei 4°C gefällt und dann abzentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). 5) Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet in 300 µl TE aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Um die RNA wieder vollständig zu lösen wurden die Reaktionsgefäße 10 min bei 75°C inkubiert.

#### RNA-Extraktions-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	0,5 M
Na-EDTA	0,25 M
SDS	5% g/v

### 2.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese zur Trennung von RNA

Um die RNA gemäß ihrer Größe zu trennen wurden denaturierende Gelelektrophoresen mit Formamid durchgeführt (Sambrook *et al.*, 2002). Jeweils 10 µg RNA wurden mit 2,5 Vol Proben-Puffer gemischt und für 10 min auf 75°C erhitzt, 5 min in ein nasses Eisbad gestellt und anschließend in die Geltaschen eines FA-Agarosegels gefüllt. Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte bei 120 V; 80 mA für jeweils 90 min in 1x MOPS-Puffer. Alle Gele wurden unter Bestrahlung mit UV-Licht fotografisch dokumentiert.

#### 10 x MOPS-Puffer

MOPS	0,2 M; pH 7,0
Natriumacetat	80 mM
Na-EDTA	5 mM; pH 8,0

<u>FA-Agarosegel (denaturierend)*</u>		<u>Proben-Puffer</u>	
Agarose	1,2% (w/v)	Formamid	57,4% (v/v)
Formaldehyd (37%)	18% (v/v)	Formaldehyd (37%)	20,3% (v/v)
10 x MOPS-Puffer	10% (v/v)	Glycerin (86%)	6% (v/v)
		10 x MOPS-Puffer	10% (v/v)
*Formaldehyd erst nach abkühlen (ca. 65°C) zugeben		Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)	3% (v/v)
		EtBr-Lösung (10g/l)	3% (v/v)

### 2.4.3 RNA-Transfer auf positiv geladene Nylonmembran (Blotten)

Die nach Größe und Ladung im denaturierenden Agarosegel getrennte RNA wurde durch Kapillartransfer über Nacht auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) übertragen. Folgender *Blotting*-Aufbau wurde gewählt (von oben gegen unten):

- (1) Gewicht (1 kg)
- (2) Stapel *Blotting*-Papier
- (3) fünf Lagen Whatman Papier 0,4 mm
- (4) neutrale Nylonmembran
- (5) denaturiertes Elektrophoresegel
- (6) *Blotting*-Brücke: Filterpapier (0,4 mm, Whatman Brentford, England)

Als Transfer-Puffer wurde Na-Phosphat-Puffer (25 mM, pH 6,5) verwendet. Nach der Übertragung wurden die RNA-Moleküle auf der noch feuchten Nylonmembran durch UV-Bestrahlung (1.200 Units, Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, USA) kovalent gebunden. Bis zur Hybridisierung wurden die Membranen bei -20°C gelagert.

### 2.4.4 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten für *Northern*-Hybridisierung

Für die radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten waren folgende Arbeitsschritte erforderlich: 1) Zunächst wurde Plasmid-DNA der entsprechenden cDNA-Klone in PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.3.1.2). 2) Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. 3) Die entsprechenden Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktions Kit (Qiaquick Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. 4) Die radioaktive Markierung mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP erfolgte mit *Random priming* (Random Prime Labelling Kit, Boehringer, Mannheim). Hierbei wird die doppelsträngige Template-DNA denaturiert und mit hexameren Zufallsprimern hybridisiert, welche als Primer für die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) dienen. Für die Markierung wurden je 5  $\mu$ l PCR-Fragmente (25-50 ng), 3  $\mu$ l dNTP-Mix (0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dTTP) und 6  $\mu$ l Aqua dest. zusammen pipettiert und denaturiert (3 min 95°C, 5 min nasses Eisbad). Dann wurden 2  $\mu$ l Hexanucleotidmix, 1  $\mu$ l Klenow Enzym und 3  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (10 mCi/ml) zu den denaturierten DNA-Doppelsträngen gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert, ein zweiter markierter DNA-Strang wurde gebildet. 5) Im Anschluss wurden die Sonden von nichteingebauten Nukleotiden befreit. Je 20  $\mu$ l markierte Sonde und 50  $\mu$ l TE wurden dazu auf Sephadex-Säulen (MicoSpin<sup>TM</sup>, S200 HR Columns, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) pipettiert. Dann wurde 2 min bei 805 g zentrifugiert.

### 2.4.5 Hybridisierung der *Northern-Blots*

Die Membranen wurden in Hybridisierungsrohre (5 x 15 cm) gegeben und zunächst eine Stunde in 7 ml Hybridisierungs-Puffer (Church-Puffer) in einem Drehofen (65°C und 7 rpm) vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Zur Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Sonden wurde der Hybridisierungs-Puffer durch 7 ml neuen Puffer ersetzt. Anschließend wurde die denaturierte cDNA-Sonde (3 min 95°C, 5 min Eisbad) und je 100 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml, Salmon Sperm DNA; Stratagene, La Jolla, USA) dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Im Anschluss wurden die Membranen jeweils zweimal für 20 min mit Wasch-Puffer (0,1 x SSC/0,1% SDS) bei 65°C gewaschen.

#### 0.5 M Natriumphosphat-Puffer

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            1 M  
add 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>    pH 6,8

#### Hybridisierungs-Puffer (Church)

Natriumphosphat (pH 6,8)    0.5 M  
SDS                                7%  
Na-EDTA                         1 mM

### 2.4.6 Detektion der mRNA-Transkripte

Zur Detektion der gebundenen, radioaktiv markierten DNA-Sonden auf den Membranen wurde ein Phosphoimager System (BAS2000; Fuji, Tokio, Japan) verwendet. Die Membranen wurden dazu in Klarsichtfolie (PE, SARAN) eingeschlagen und 12 Stunden bis 96 Stunden exponiert. Bilder wurden mit folgenden Einstellungen aufgenommen: IP *Reading*; 8 Bit pro Pixel; 100 µm Pixelgröße.

## 2.5 Unterscheidung zwischen *Blumeria*- und Gerste-Transkripten

Die cDNA-Bank wurde aus den interagierenden Organismen, Gerste Sorte Ingrid BC *mlo5* und *Bgh*, hergestellt. Für weiterführende Untersuchungen war es notwendig, cDNA-Klone nach ihrer pflanzlichen oder pilzlichen Herkunft, zu unterscheiden. Daher wurden PCR mit genspezifischen Primern und genomischer DNA aus *Blumeria* und Gerste für eine Auswahl an Kandidatengenomen durchgeführt. Nach Vergleich der Bandenmuster konnte auf Pflanze bzw. *Blumeria* rückgeschlossen werden.

### 2.5.1 Isolation genomischer DNA von Gerste und *Bgh*

Ausgangsmaterial für die Isolation genomischer DNA waren nicht-inokulierte Gerstenblätter (Ingrid BC *mlo5*) bzw. Konidiosporen von *Bgh*. Die Konidiosporen der Mehltaukulturen wurden über einer Petrischale (15x15 cm) befüllt mit 20 ml Aqua dest. abgeschüttelt und anschließend abzentrifugiert (1811 g, 30 min, Raumtemperatur). Jeweils 50 mg Konidien- bzw. Blattmaterial wurden dann in flüssigem Stickstoff homogenisiert und jeweils in bis zur Hälfte gefüllte Reaktionsgefäße mit Glasperlen (0,25-0,5 mm, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 1 ml QBT-Puffer, 1 µl RNase A (10 mg/ml) und 1 µl Proteinase K (10 mg/ml) gegeben, 90 s mit Vortex geschüttelt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert (1 min; 2300 g, 4°C). Der Überstand wurde auf eine mit 2 ml QBT-Puffer equilibrierte Anionenaustauschersäule (Qiagen Tipp-20, Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Um die an die Anionenaustauschersäule gebundene DNA von den restlichen Bestandteilen zu trennen, wurde mit 4 ml QC Wasch-Puffer gewaschen. Dann wurde die DNA mit 2 ml Elutions-Puffer von der Säule gewaschen, mit 0,8 Vol Isopropanol (2 Stunden bei Raumtemperatur) ausgefällt und abzentrifugiert (9300 g, 20 min). Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (9300 g, 20 min), dann unter dem Abzug getrocknet und in 10 µl TE aufgenommen.

<u>QBT-Puffer</u>		<u>QC-Wasch-Puffer</u>		<u>QF-Elutions-Puffer</u>	
NaCl	750 mM	NaCl	1 M	NaCl	1,25 M
MOPS	50 mM	MOPS	50 mM	Tris-HCl	50 mM
add NaOH	pH 7,0	Isopropanol	15%	add NaOH	pH 8,5
Isopropanol	15%			Isopropanol	15%
Triton X-100	0,15%				

## 2.5.2 PCR-Amplifikation aus genomischer DNA von Ingrid *mlo5* und *Bgh*

Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit spezifischen Primerpaaren (Tabelle 2.1), ausgehend von genomischer DNA (Ingrid *mlo5* bzw. *Bgh*; 0,1 ng/ml). Die PCR wurde in 25 µl Ansätzen durchgeführt. Endkonzentration der PCR-Reagenzien: 1 x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 µM dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland); 2 µM *sense* Primer; 2 µM *antisense*-Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland); 1 U Taq-Polymerase (Roche Co., Basel, Schweiz).

Folgendes Temperatur-Zeit-Profil wurde verwendet: Nach dem Vorheizen des Heizdeckels auf 110°C wurden die PCR-Platten in den Thermoblock (94°C) gestellt. Danach wurde das PCR-Programm mit einem vierminütigen Denaturierungsschritt (94°C) gestartet. Diesem folgten 32 bzw. 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung der DNA (94°C; 30 s), Primeranlagerung [(A) *touch down* von 61°C auf 54,8°C, (B) 58°C konstant; (C) *touch down* von 59°C auf 52,2°C] und Extension (72°C, 30 s). Mit einem letzten Extensionsschritt (72°C, 5 min) wurde die PCR beendet.

**Tabelle 2.1:** Genspezifische *sense* bzw. *antisense*-Primer für Zuordnung *Bgh* und Pflanze

<b>ID</b>	<b><i>sense</i> Primer</b>	<b><i>antisense</i>-Primer</b>
HO07O11	5'-CAAGCTGACTGTGCCATTCT-3'	5'-GGCCGTGTCCATCTTGTTA-3'
HO09I03	5'-CTCGTACAGTGGTGATTCCGT-3'	5'-GAAGCGAAGACCGGAATGTA-3'
HO01C21	5'-GACGAGATCGGCTGAAGAAC-3'	5'-TTCCTTCGTTTCATTCCCAG-3'
HO04M11	5'-GTCATCGACACATGGCTCAG-3'	5'-GATTAGCAGGGGCCACAA-3'
HO14D22	5'-GGACACGGCATATAACAGCA-3'	5'-GCCGTTTTTAAGCTCGATTG-3'
HO02I03	5'-GTTCTAGAGCGTTCGGCAC-3'	5'-CTCCGAGCTGTACACCCAC-3'
HO14N21	5'-TGACACATCCTCCAAGTCCA-3'	5'-TGGATCAACACTCCTGGTTG-3'
HO02B06	5'-ACAGTAATGGGTCCCCTGAA-3'	5'-TGGATTCGTTTTCGTTTGAA-3'
HO04A02	5'-TTTGACTAGACGAATCGCTCC-3'	5'-CACAGTCAACGCCTGATTTG-3'
HO09E08	5'-CGCGGGTACATTATTGATTACA-3'	5'-TTTCCCAACTCCACTATCGC-3'
HO09F06	5'-CCCTCGCTGCAATCAACTA-3'	5'-TGCTTCCTCTACTGCACCG-3'

HO06F12	5'-GTTATCAGTGGTTGTCCGCC-3'	5'-AAAACATGAATCGGTGTCCC-3'
HO04F20	5'-TCTTTGGTTTGGTGCCCT-3'	5'-TCCTCGCACAGCTCAGTT-3'
HO12P05	5'-GTTTTCTCTTGCAGCCGT-3'	5'-TGATTCTTCGATTCCGCTG-3'
HO02P04	5'-GTGTGCTACTGCGAAAGGAA-3'	5'-GAGCTGCGGGTTGTAGGT-3'
HO06G10	5'-GCGACATGTTCCAGAAGGT-3'	5'-CAGGATGCACTCCACGAG-3'
HO09M16	5'-CCAAGAGGAGCTTGACATCG-3'	5'-GCGGCTGACATCACCATAG-3'
HO09I06	5'-ACTGTTTGAGCCCATCTACGA-3'	5'-TTTATGTACACATTGGGGCG-3'
HO10M21	5'-CGCAATGCTCAAGTCAGTTC-3'	5'-CTCTCTCCGGGTCTATGTGG-3'
HO12N23	5'-TTGTCTGGGATTTCTGTGGA-3'	5'-TCAAAGAAGCCATCCAAACC-3'
HO14F24	5'-AGCGAAGTGAGAGCTTTTGC-3'	5'-GAGAAGGACCTGCAGTTGTTG-3'
HO11H17	5'-ATTGGTCTCATGGCAGGC-3'	5'-ATCCTTGGCTTGTGCGAGATT-3'
HO13H24	5'-CAGGAGCTTCGTGCAATGT-3'	5'-CTAGTCTTCTCGCCGGTCAA-3'
HO03M02	5'-AGCATAATGGAGGGATGGC-3'	5'-AGGTTCCCTATCGTCGTGGG-3'
HO14M23	5'-CCACTATGATGGGCGTGTG-3'	5'-CCCCAAGGTCTTCATCCC-3'
HO12F18	5'-CGTGCAGATGTTCCCTGTCG-3'	5'-GTCTCGCTCGGGATCAGC-3'
HO02F02	5'-AGGGAGAACAAGAGCGACAG-3'	5'-ACCAGATGCACCTCCAGAAG-3'
HO09F07	5'-TTATGAGGTTGCCCAGAAGC-3'	5'-TCACCAAGAGCCAAAAGAAAA-3'
HO14F03	5'-CGGAAATTGTCAAGGCTGAT-3'	5'-GCGTCATCAATTTCCCGTAG-3'
HO14P06	5'-AAGGTTTGGGTCGTAAGAAATG-3'	5'-CTCATGCGGATGGTTTTTCT-3'
HO06K04	5'-TACTGCTCGCCTTCTTGTG-3'	5'-GACACTGTTGTTGGTCCCAG-3'
HO06J21	5'-ACTCACAGCTCACAAGGCAGT-3'	5'-ACGGTTAGGGTCCAGAGTCC-3'
HO12G01	5'-GGAGGGTTACACACATTCCG-3'	5'-GCTGGTTTTTGAACCTTCTTG-3'
HO06M04	5'-CCTATTCGTGTGGCAGTTC-3'	5'-TATCGGAGATCCGTGAGCAT-3'
HO14J02	5'-ACGAACACGGTTCCGGACT-3'	5'-CGAGGGTGACCGAGTCGT-3'
HO11H08	5'-AACATGGACCTTGTCTTCGG-3'	5'-AACGTAATCATCGCCGAGAA-3'
HO11N14	5'-GGAGCAACACAACCAAGATG-3'	5'-CGTTCTTGACATTCTCCTCG-3'
HO07H20	5'-CTGTTCCGAGCTTCAGTTC-3'	5'-CGACCAAAAATGTCGAGGAC-3'
HO07K06	5'-GACCGCGGAATATCATCCTA-3'	5'-CTGTGGGTGAACCATGGAC-3'
HO05L14	5'-GGATTTGTACAGTCCAACCT-3'	5'-ATTGGCAATTGTGATAGCCC-3'
HO02E07	5'-GCTTCTCGAGGTCATGCAA-3'	5'-TAAGCAGCATCGACATGGAC-3'
HO01I09	5'-CGACAGCTCCAAGATGACAA-3'	5'-ACGGTCAGGAGCTTGTTCAC-3'
HO02K10	5'-GCTGTACATGTTCTTCTGTCAGC-3'	5'-CAGGTCTGAATAGAGTGCCG-3'
HO02A01	5'-CATTTGAAAACCTCTCCA-3'	5'-TGCTGCACTCTCCTGCATAG-3'
HO07H15	5'-GAGCCGTTCAAGGTCAAGTC-3'	5'-CCATCCTTGTGCGATGGTGT-3'
HO10N20	5'-ATCGACAAGGCCAAGATGAC-3'	5'-CGGTCCAATAGTTCACCACC-3'
HO05A19	5'-GTGGGTACGGGAGTCATACG-3'	5'-GTTTGTGCTACCGGCATCT-3'
HO11A09	5'-CCAGCATCGACAAACATCAC-3'	5'-CCCTGTAGTTGCCACCTGT-3'

## 2.6 Funktionelle Untersuchung der Kandidatengene mittels TIGS

TIGS (*transient induced gene silencing*) ist ein transientes RNAi-Testsystem (siehe auch Schweizer *et al.*, 2000), das bei der molekularen Analyse von Genen in Getreide-*Blumeria*-Interaktionssystemen seit ca. vier Jahren Anwendung findet (Panstruga 2004). Die für das Pathosystem Gerste und *Blumeria* angepasste Methode funktionierte folgendermaßen (Abbildung 2.5):

Segmente siebentägiger Primärblätter der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* wurden zunächst durch biolistisches Bombardement mit Goldpartikeln, die ein Reportergenkonstrukt und ein RNAi-Konstrukt trugen, transformiert. In der Zeit von 0 bis 96 Stunden nach dem Beschuss wurde das unter Kontrolle des Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotors (CamV35S) stehende Reportergenkonstrukt in den getroffenen Epidermiszellen exprimiert und im Anschluss translatiert. Das Reportergen kodierte für das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase (GUS), welches nach

der GUS-Färbung die türkisblaue Farbe der Zelle ausbildet und zusätzlich den Kontrast von Zelle und eventuell vorhandenen Haustorien über einen unbekanntem Mechanismus verstärkt. Parallel zu dem Reportergergenkonstrukt wurden ein oder mehrere RNAi-Konstrukt(e), die nach ihrer Expression Haarnadelstrukturen ausbilden sollten, exprimiert (Abbildung 2.6).

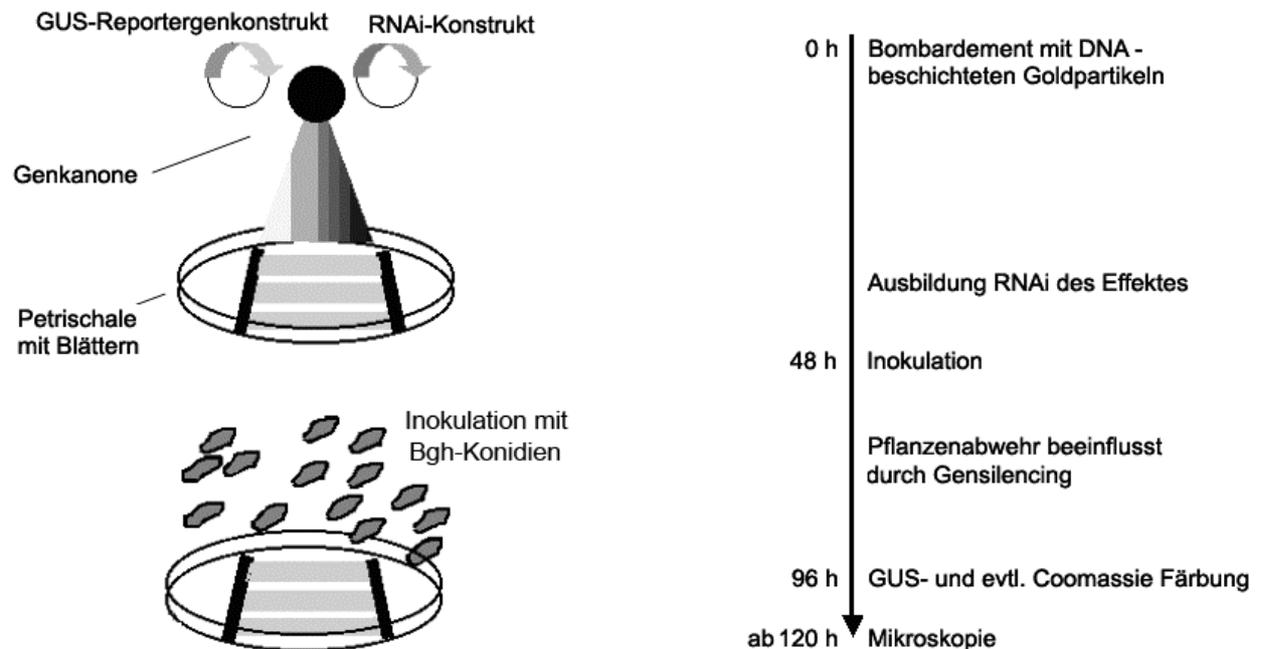


Abbildung 2.5: TIGS (*Transient induced gene silencing*).

Die Blätter wurden erst 48 Stunden nach Beschuss inkubiert, um den RNAi-Effekt vollständig auszubilden. Die Inkubation erfolgte in feuchten Kammern, auf Phytoagar liegend, bei Tageslicht (Nordfenster) und einer Temperatur von 18°C bis 22°C. Nach 48 Stunden wurden die transformierten Blattsegmente mit *Bgh*-Konidien inokuliert. Der Pilz wuchs nun 48 Stunden auf den Blättern, einschließlich auf den Zellen, die durch gezieltes Ausschalten von Genen in ihrer Abwehr möglicherweise gestört waren, und bildete in anfälligen Zellen Haustorien.

Jetzt wurden die Reportergergenprodukte ( $\beta$ -Glucuronidase) in den erfolgreich transformierten Zellen mittels GUS-Färbung detektiert. Die pilzlichen Strukturen auf der Blattoberfläche wurden mittels Coomassie-Färbung alternativ detektiert. Da *Bgh* neben nicht-transformierten auch transformierte Zellen befällt, erlaubt die mikroskopische Analyse von GUS- und Kandidatengen exprimierenden Epidermiszellen, Rückschlüsse auf die Funktion des Kandidatengens.

Es wird erwartet, dass sich in den normalerweise vollständig resistenten Zellen von Ingrid BC *mlo5* Haustorien durch das Ausschalten eines wichtigen, resistenzassoziierten Gens etablieren können. Für die funktionelle Untersuchung der Kandidatengene mittels TIGS wurden zunächst die RNAi-Konstrukte erstellt (Kapitel 2.6.1). In einem zweiten Arbeitsabschnitt wurde das biolistische Bombardement durchgeführt (Kapitel 2.6.2).

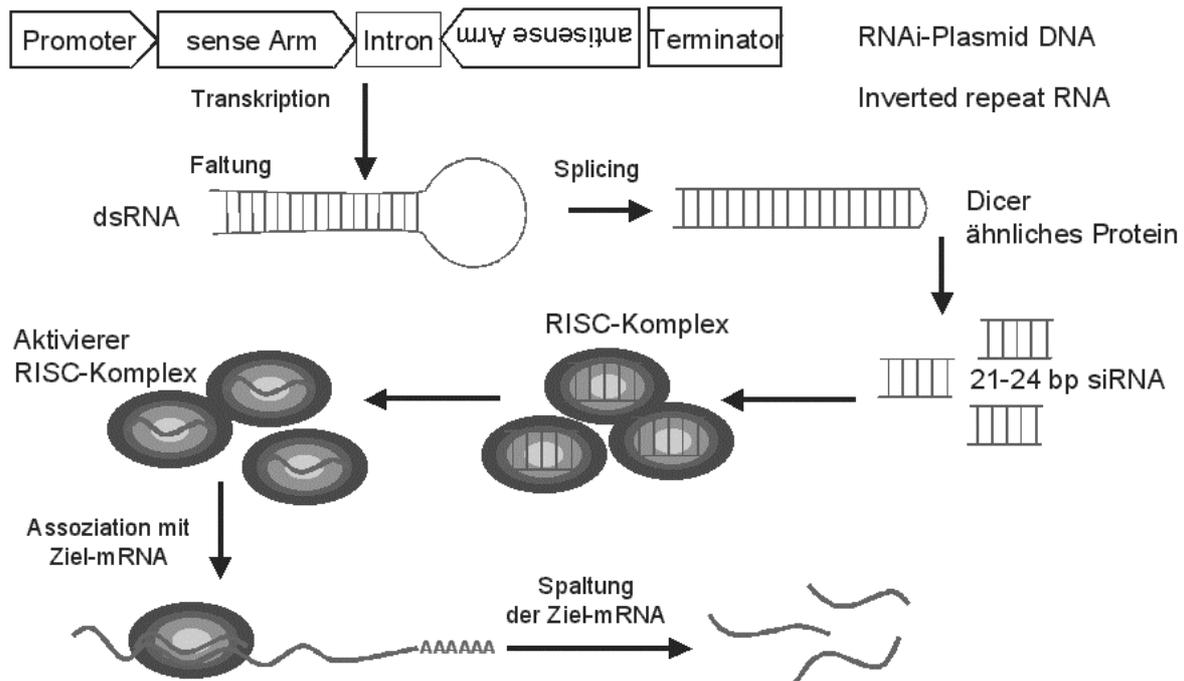


Abbildung 2.6: RNAi mit Haarnadelkonstrukten.

### 2.6.1 Herstellung der RNAi-Konstrukte für TIGS

Basis für die Herstellung der RNAi-Konstrukte war eine Technologie die auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$  beruht (Gateway, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien). Mit Hilfe des Rekombinase-Systems lassen sich DNA-Fragmente zwischen verschiedenen Vektoren des Systems, die spezielle Erkennungssequenzen aufweisen, gerichtet austauschen. Die Erkennungssequenzen, die auch als Rekombinationsstellen (*attB* und *attP* Integration; *attL* und *attR* Excision) bezeichnet werden, können spezifisch mit Hilfe von Rekombinationsproteinen (Integrase und Excisionase aus dem Bakteriophagen  $\lambda$  und den *Integration Host Factor* aus *E. coli*) miteinander rekombiniert werden. Als negativer Selektionsmarker befindet sich in jedem „Gateway“-Vektor das *ccdB*-Killergen, das von den Rekombinationsstellen eingerahmt ist. Das Gen kodiert für eine wachstumshemmende bakterielle DNA-Gyrase. Bei einer Rekombination wird das *ccdB*-Gen und das einzubringende Gen ausgetauscht (Wesley *et al.* 2001). Bei dem hier verwendeten Ansatz wurden *attL*-Stellen (pIPKTA33, *entry vector*) und *attR*-Stellen (pIPKTA30N, *destination vector*) rekombiniert. Aus dieser Rekombination ergibt sich eine sogenannte *attB*-Stelle. Zunächst wurden die cDNA-Fragmente aus der HO-cDNA-Bank also in einen „Gateway“-kompatiblen Vektor (pIPKTA33) (Douchkov und Schweizer nicht veröffentlicht) kloniert, da die HO-cDNA-Bank in einem Vektor erstellt wurde, der nicht mit dem „Gateway“-System kompatibel ist. Bis zu 500 bp lange cDNA-Fragmente wurden durch Verwendung eines sequenzspezifischen Primers in PCR amplifiziert (Kapitel 2.6.1.1) und konventionell mittels Ligase in pIPKTA33 kloniert (Kapitel 2.6.1.2). Die Verwendung von sequenzspezifischen Primern hatte auch den Vorteil, dass so auf die 3'-Bereiche der Gene selektiert werden konnte. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente von pIPKTA33 in den RNAi-Vektor pIPKTA30N (*destination vector*) (Douchkov und Schweizer, nicht veröffentlicht) durch genetische Rekombination überführt (Abbildung 2.7).

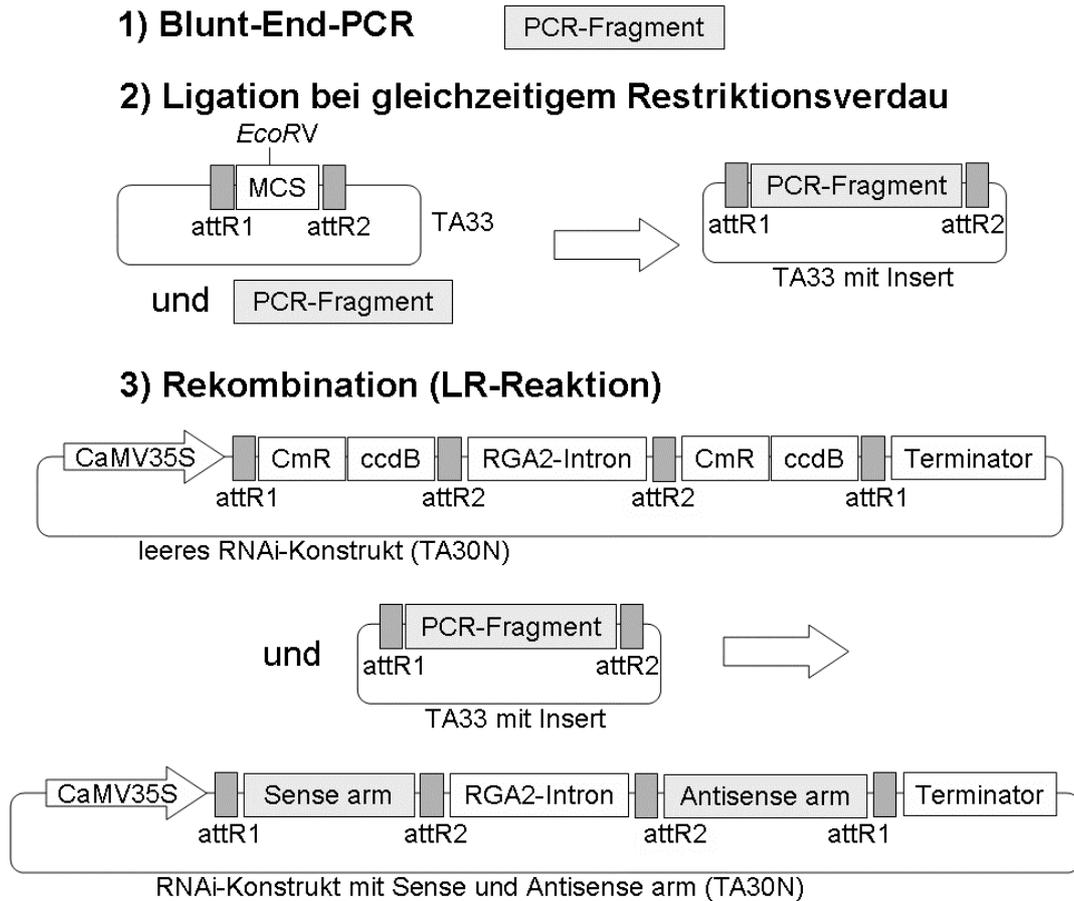


Abbildung 2.7: Klonierungsstrategie bei der Erstellung der RNAi Konstrukte.

### 2.6.1.1 PCR-Amplifikation der HO-cDNA-Templates und Aufreinigung der Fragmente

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in 25 µl Ansätzen mit spezifischen *antisense*- (3'-Ende der EST's, siehe Tabelle) und den unspezifischen *sense*-Primer (Uniprimer) MVR-26 (5'-CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AG-3'), ausgehend von Verdünnungen der Plasmid-Präparationen (1:100). Für ESTs die kürzer als 200 bp waren, wurde der Standardprimer M13-20 (5'-CAT TTT GCT GCC GGT CA-3') eingesetzt. Durch die Verwendung der thermostabilen Thermal-Ace-Polymerase (Thermal Ace Kit, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) wurden PCR Produkte mit glatten Enden amplifiziert.

Endkonzentration der PCR-Reagenzien: 1 x Puffer (Thermal Ace Kit); 200 µM dNTP (Thermal Ace Kit); 2 µM *antisense*-Primer; 2 µM *sense* Primer; 1 U Polymerase (Thermal Ace Kit). Folgendes Temperatur-Zeit-Profil wurde verwendet: Nach dem Vorheizen des Heizdeckels auf 110°C wurden die PCR-Platten in den Thermoblock (94°C) gestellt. Danach wurde das PCR-Programm mit einem vierminütigen Denaturierungsschritt (94°C) gestartet. Diesem folgten 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung der DNA (94°C; 30 s), Primer-Anlagerung (65°C; 45 s) und Primer-Extension (74°C, 45 s). Mit einem letzten Extensionsschritt (72°C, 10 min) wurde die PCR beendet. Im Anschluss an die PCR wurden die DNA-Fragmente durch Ultrafiltration (MinElute 96 UF PCR-Purification-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) von Salzen, nichteingebauten Nukleotiden und Primern befreit. Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

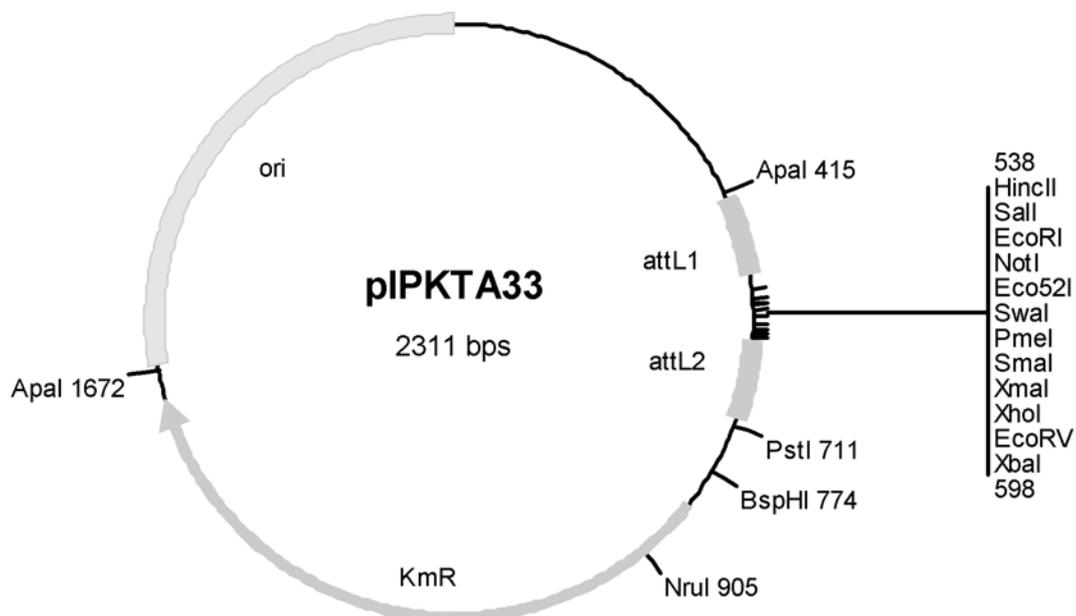
**Tabelle 2.2:** Genspezifische Primer für cDNA-Amplifikation (RNAi-Konstrukte)

Klon-ID	Primer
pIPKTA30_HO11F10	5'-GGAAAACGTGAAGAGCCCAG-3'
pIPKTA30_HO06F18	M13-21 PE
pIPKTA30_HO14H18	5'-ATCTGCATTCACGATGGCAA-3'
pIPKTA30_HO03K07	5'-AAACGAGCTGCAGCAAAAGC-3'
pIPKTA30_HO14K08	5'-TCAACGATCAGGGGAACTGG-3'
pIPKTA30_HO04F20	5'-CCTAGCCAGCAAAGTGTGCG-3'
pIPKTA30_HO14K07	5'-CGTGTAGTAGCCGATGCGGT-3'
pIPKTA30_HO03C22	5'-GGGAGCTAGTGGCTCGTTCA-3'
pIPKTA30_HO13M15	5'-AGCCAGATTCAAGCGAGGTG-3'
pIPKTA30_HO01P12	5'-ACCGTGAGGATCTCAGTGGC-3'
pIPKTA30_HO09L22	5'-GTATGTGGCGGGTTCTGACC-3'
pIPKTA30_HO11H17	5'-TGGAAGTGAATGAGGCCAC-3'
pIPKTA30_HO15E16	5'-GGTGCGTATGTGGTGGGTTT-3'
pIPKTA30_HO15O20	5'-CAGCACACCCTTGAGCCTCT-3'
pIPKTA30_HO13I11	5'-CTACCTTGTACGCACGCACG-3'
pIPKTA30_HO12F09	5'-GCAACAAGAAAACGAACCGC-3'
pIPKTA30_HO06G10	5'-AGCGAGCAAGAGCAAGATGG-3'
pIPKTA30_HO15I12	5'-CTTCCGAAACGGAGGACTT-3'
pIPKTA30_HO02A01	5'-TGACTCTCCAGCTAGGCACG-3'
pIPKTA30_HO09M16	5'-TCGTCGATCTGGATCACCTG-3'
pIPKTA30_HO09F07	5'-TATTTGGCCTTCTTGCCCCT-3'
pIPKTA30_HO11H08	5'-GCTTCATGCAGAAAGGTAGCG-3'
pIPKTA30_HO13D15	5'-GATTGTGTGTGCACCGGAGA-3'
pIPKTA30_HO03B04	5'-TTGCAATGTGACGTGATAACCA-3'
pIPKTA30_HO07B06	5'-CTCCATCAGGCAAGACCCTG-3'
pIPKTA30_HO10N20	5'-TGCTCAAACATCCGACTCA-3'
pIPKTA30_HO11C08	5'-CGCGAATTTTTCCCAACGTA-3'
pIPKTA30_HO12P14	5'-AGCTAGGACACGGGTGTTGC-3'
pIPKTA30_HO10N20	5'-TGCTCAAACATCCGACTCA-3'
pIPKTA30_HO08B09	5'-TGCTGCTGCTTGTGTTGGTGT-3'
pIPKTA30_HO06N14	5'-GAGCAACCGCAGAGAGCTACA-3'
pIPKTA30_HO12J07	5'-TGGCATGTAAGTGAAGAACGAGTG-3'
pIPKTA30_HO13M17	5'-GTAGCCCATCGTGCCTCTTG-3'
pIPKTA30_HO14K07	5'-CGTGTAGTAGCCGATGCGGT-3'
pIPKTA30_HO15N01	5'-GGGAAGTTGCTCTCCACGAA-3'
pIPKTA30_HO05C04	5'-TTCGCCACCAGGAGTACGTT-3'
pIPKTA30_HO10M21	5'-GCCTTGAAGTCTCTGCCGTG-3'
pIPKTA30_HO14K19	5'-AAAGCCGTGCGGTGTTTCAGAG-3'
pIPKTA30_HO08G22	5'-CAAACACGAAATGCTTCTGGC-3'

### 2.6.1.2 Subklonierung der DNA-Fragmente in pIPKTA33

Die Ligation der PCR-Fragmente in pIPKTA33 (Abbildung 2.8) wurde in 10 µl Ansätzen im 96er Plattenformat, in Anwesenheit des glatt schneidenden Restriktionsenzym *EcoRV* durchgeführt. Dadurch wurde eine Religation des Vektors verhindert, was eine hohe Inserationsrate zur Folge hatte und so die Klonierung im 96er Plattenmaßstab ermöglichte.

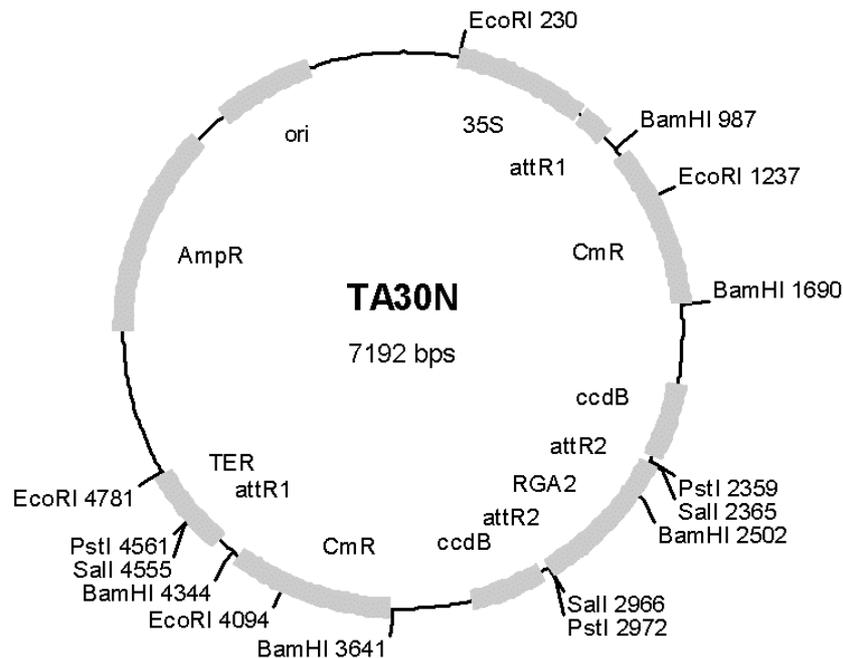
Der Ligationsmix wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert. In 25 µl Ansätzen wurden folgende Mengen/Volumina an Ligationsreagenzien (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet: 5 U *EcoRV*, 1 U T4-DNA-Ligase, 2,5 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 150 ng Plasmid-DNA (pIPKTA33) und ca. 300 ng des jeweiligen PCR-Fragmentes. Die Transformation und die Plasmid-Isolation erfolgten wie unter Kapitel 2.8.6 und 2.8.7 beschrieben. Selektioniert wurde auf Kanamycin-LB-Medium.



**Abbildung 2.8:** IPKTA33: ori: Replikationsursprung von *E.coli*; KmR: Kanamycin-Resistenz; *attL1* und *attL2*: Rekombinationsstellen

### 2.6.1.3 Klonierung in RNAi-Kassette pIPKTA30N

Die Umklonierung in die RNAi-Kassette pIPKTA30N (Abbildung 2.9) erfolgte durch genetische Rekombination in einer sogenannten LR-Reaktion (Nomenklatur „Gateway“-System). In 10 µl Ansätzen wurden folgende Mengen bzw. Volumina an Rekombinationsreagenzien verwendet: 100 ng der jeweiligen Plasmid-DNA (pIPKTA33); 1 µl LR Enzymmix; 15 ng pIPKTA30N; 1 µl LR-Puffer. Die LR-Reaktionen wurden sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation und die Plasmid-Isolation erfolgten wie unter 8.6 und 8.7 beschrieben. Es wurde positiv auf Ampicillin-LB-Medium und negativ mittels *ccdB*-Killergen selektioniert.



**Abbildung 2.9:** IPKTA30N; 7.192 bp; ori: Replikationsursprung von *E.coli*; AmpR: Ampicillin-Resistenz; TER: CaMV35S Terminator; CmR: Chloramphenicol-Resistenz; *ccdB*: negativer Selektionsmarker; *attR1* und *attR2*: Rekombinationsstellen; RGA2: Intron RGA2; 35S: CaMV35S: Promotor aus Blumenkohl-Mosaik-Virus.

### 2.6.2 TIGS: Vom Biolistischen Gentransfer bis zur Detektion transformierter Zellen

Die transiente Transformation der Plasmide in abgeschnittene Gerstenblatt-Segmente wurde durch biolistisches Bombardement mit Goldpartikeln in der Kanone (Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System; BioRad, Hercules, Kalifornien) (Abbildung 2.10) ausgeführt, wozu folgende Arbeitsschritte notwendig waren. Als erstes wurde die Gold-Suspension hergestellt und beschichtet, dann wurden die Mikro- und Makrocarrierscheiben und die Blattsegmente vorbereitet. Nach der vollständigen Beladung der Kanone wurde der eigentliche biolistische Gentransfer durchgeführt. Die Blattsegmente wurden dann 48 Stunden inkubiert und anschließend inokuliert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die GUS-Färbung die Coomassie-Färbung bzw. die Chlorophyll-Entfärbung durchgeführt.

- 1) Herstellung der Gold-Suspension
- 2) Beschichtung der Goldpartikel
- 3) Vorbereitung der Mikro- und Makrocarrierscheiben
- 4) Vorbereitung der Blattsegmente
- 5) Biolistischer Gentransfer
- 6) Inkubation und Inokulation
- 7) GUS-Färbung
- 8) Coomassie-Färbung (optional)
- 9) Chlorophyll-Entfärbung
- 10) Mikroskopie



**Abbildung 2.10:** Die Genkanone wurde zur Transformation von RNAi- und Reporter-genkonstrukten in Gerstenblattsegmente verwendet Kanone (Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System; BioRad, Hercules, Kalifornien).

### 2.6.2.1 Präparation der Gold-Suspension

Zur Präparation der Gold-Suspension wurden 25 mg Goldpartikel (Microcarrier, 1.0  $\mu\text{m}$  Durchmesser; BioRad) in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen. Anschließend wurden die Goldpartikel zweimal mit Aqua dest. und einmal mit Ethanol (96%) gewaschen (vortexen; 20 s Ultraschallbad; 30 s, 16100 g), für 10 min bei 50°C getrocknet und jeweils in 1 ml Glycerol (50% v/v) aufgenommen. Die Suspension wurde bei -20°C gelagert.

#### Gold-Suspension

Goldpartikel	25 mg/ml
Glycerol (86%)	50% v/v

### 2.6.2.2 Vorbereiten der Blattsegmente für den Beschuss

Pro geplantem Schuss wurden jeweils je sieben Primärblattsegmente (ca. 7 cm lang) vorsichtig mit einer Pinzette auf eine Petrischale (9 cm Durchmesser), befüllt mit einer 0,5 cm dicken Schicht aus Phytoagar A, aufgelegt (adaxiale Seite oben, parallele Anordnung). Auf die Blätter wurden Magnetrührstäbe so gelegt, dass sie einander abstoßen und die Blätter auf den Phytoagar drücken.

#### \*Phytoagar A

Phytoagar	0,5% w/v
Benzimidazol	0,002% w/v

#### \*Phytoagar B

Phytoagar	1% w/v
Benzimidazol	0,002% w/v

\*Die Phytoagar-Suspension wurde 10 min gekocht. Nach dem Abkühlen (ca. 50°C) wurde Benzimidazol zugegeben. Benzimidazol Stammlösung in Ethanol: 4% w/v.

### 2.6.2.3 Beschichtung der Goldpartikel

Die Fixierung der Plasmide auf den Goldpartikeln funktionierte wie folgt: 1) Pro Schuss wurden jeweils 87,5 µl Gold-Suspension und 7 µl pUbiGUS DNA mit jeweils X µl Plasmid-DNA (7 µg) eines oder mehrerer RNAi-Konstrukte gemischt. 2) Anschließend wurden unter schütteln (vortexen) Y µl Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung tröpfchenweise zugeben (siehe Beschichtungsschema). 3) Die Suspension wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dabei mehrmals aufgeschüttelt und dann zentrifugiert (15 sec, 16100 g). 4) Die beschichteten Goldpartikel wurden zweimal mit je 1 ml Aqua dest. und einmal mit 1 ml reinstem Ethanol gewaschen, letztlich in 30 µl Ethanol aufgenommen.

#### Beschichtungsschema

Gold-Suspension	87,5 µl
Plasmid-DNA pIPKTA33	X µl*
pUBIGUS	7 µl
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Lösung	Y µl*

#### Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 M
add 0,1 M KOH Lösung	pH 10

\*Y µl = 94,5 µl + X µl

### 2.6.2.4 Vorbereitung der Makrocarrier-Scheiben und der Zerreischeibe

Die Makrocarrier-Scheiben (BioRad, Hercules, Kalifornien) und die Zerreischeibe (900 psi, BioRad, Hercules, Kalifornien) wurden in Ethanol (96%) 30 s gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zerreischeibe wurde dann in die Sprühkopfvorrichtung mit einer Pinzette eingesetzt. Auf die Makrocarrier-Scheiben wurden die plasmidbeschichteten Goldpartikel aufgetragen. Dazu wurde das jeweilige Reaktionsgefäß mit der Suspension plasmidbeschichteter Goldpartikel für 10 s in ein Ultraschallbad gehalten und anschließend gut mit einer Pipette gemischt. Pro Scheibe wurden jeweils 3 µl Suspension in kreisförmigen Bewegungen mit der Pipette auf jeden Makrocarrier auftragen.

### 2.6.2.5 Bombardementformation der Genkanone

Pro Schuss wurden zunächst jeweils sieben vollständig abgetrocknete Makrocarrier-Scheiben mit plasmidbeschichteten Goldpartikeln in den BioRad Hepta-Adaptor eingesetzt. Dann wurde der BioRad Hepta-Adaptor zusammen mit einem Stopgitter (Hepta Stop Screen) in den dritten Einschub von oben, eine Petrischale mit Blättern in den fünften Einschub und eine Zerreischeibe (Rupture disc; 900 psi, BioRad), in die Sprühkopfvorrichtung der Kanone eingesetzt. Mittels einer Membranvakuumpumpe wurde ein Vakuum von 27 mm Hg in der Kammer angelegt. Bei 900 psi zerrissen die Zerreischeiben und die Makrocarrier-Scheiben wurden gegen das Stopnetz geschleudert. Durch die wirkenden Trägheitskräfte wurden die beschichteten Goldpartikel in die Kammer geschleudert und drangen in die Epidermiszellen der Blattsegmente ein.

### 2.6.2.6 Inkubation und Inokulation bombardierter Blattsegmente

Die Blattsegmente in den Petrischalen (9 cm Durchmesser) wurden nach dem Beschuss zunächst ca. vier Stunden mit leicht geöffnetem Deckel inkubiert, um die Bildung von Exudationströpfchen an Mikroverwundungen der Blätter zu vermeiden. Dann wurden die Deckel geschlossen und die Blattsegmente wurden so über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Blattsegmente auf viereckige Petrischalen (24 x 24 x 2 cm) umgelegt, die mit einer 1 cm dicken Schicht aus Phytoagar B ausgegossen waren. Die Blattsegmente wurden mit jeweils zwei Reißzwecken an den Enden befestigt. Die Inokulation der Blätter erfolgte in einem Inokulationsturm durch Abschütteln der Konidien von Spenderpflanzen. 10 cm über den Blättern wurde ein Gazenetz (0,1 mm Maschenweite, Millipore, Billerica, USA) angebracht, um Konidien-Aggregate auf den Blättern zu vermeiden. Die Inokulationsdichte wurde mikroskopisch ausgezählt. Optimal waren 150 bis 200 Sporen/mm<sup>2</sup>. Gegebenenfalls wurde ein weiteres Mal inokuliert, um die gewünschte Inokulationsdichte zu erreichen. Die inokulierten Blätter wurden bei natürlichem Tag/Nacht Rhythmus bei indirektem Tageslicht (Nordfenster) und einer Temperatur von 18°C-22°C inkubiert. Diese Inkubationsbedingungen verhindern im Gegensatz zu allen bisher getesteten Bedingungen in Klimaschränken eine verfrühte Blattseneszenz.

### 2.6.2.7 GUS-Färbung transformierter Zellen

Die Blätter wurden 48 Stunden nach Inokulation vorsichtig mit einer Pinzette eingesammelt, übereinander gelegt, an den Blattenden auf gleiche Länge geschnitten und in die GUS-Färbelösung (PP-Röhrchen; 15 ml, Greiner, Nürtingen) überführt, um diese zu infiltrieren. Die Röhrchen mit den Blättern wurden in eine Saugflasche gestellt. Das Vakuum wurde zweimal so anlegt, dass die Färbelösung fast überkochte. Dann wurde die Saugflasche sofort wieder belüftet. Sobald die Blätter durchsichtig waren und absanken war die Infiltration der Blätter vollständig. Im Anschluss wurden die Röhrchen auf 14 ml mit GUS-Lösung aufgefüllt, verschlossen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

#### GUS-Färbelösung

Na-Phosphat End.-pH 7,0	100 mM
Na-EDTA	10 mM
K-hexacyanoferrat(II)	1,4 mM
K-hexacyanoferrat(III)	1,4 mM
Triton X-100	0,1%
Methanol	20%
X-Gluc	1 mg/ml

### 2.6.2.8 Coomassie-Färbung der Blattsegmente

Um Pilzstrukturen auf den Blättern anzufärben wurde zunächst die X-Gluc-Lösung vorsichtig abgegossen und durch 8 ml Coomassie-Lösung ersetzt. Anschließend wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde zweimal mit Aqua dest. vorsichtig gewaschen.

Coomassie-Färbelösung

- A) 1,5 g Coomassie R 250 (0,3%) in 250 ml Methanol lösen  
 B) 37,5 g Trichloressigsäure (7,5%) in H<sub>2</sub>O vorlösen

A und B mischen und mit H<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 500 ml auffüllen  
 Lösung durch Papierfilter in Blaukappen-Flaschen filtrieren

**2.6.2.9 Entfärbung der Blattsegmente**

Falls keine Coomassiefärbung durchgeführt wurde, wurden die Blattsegmente für 8 min in TCA-Entfärbelösung inkubiert. Dadurch wird das Chlorophyll aus den Blättern herausgelöst und die GUS gefärbten Zellen erscheinen beim Mikroskopieren kontrastreicher gegenüber dem Hintergrund. Anschließend wurden die Blattsegmente zweimal vorsichtig mit Aqua dest. gewaschen.

TCA-Entfärbelösung

TCA            7,5% w/v  
 Methanol     50%

**2.6.2.10 Mikroskopie der Blattsegmente**

Nach erfolgter Färbung wurden die Blätter aus dem Röhrchen genommen und mit der adaxialen Seite nach oben auf Objektträger gelegt. Pro Objektträger wurden 200 µl Aqua dest. zugegeben und dann mit einem Deckglas abgedeckt. Aufbewahrt wurden die Deckgläser in feuchten Kammern bei 4°C. Mikroskopiert wurde mit Auflicht und 20-facher Vergrößerung an einem Zeiss Forschungsmikroskop (Axioplan 2 bzw. Axiolab, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

**2.7 Messung von Aminosäure-Gehalten in der Epidermis und im ganzen Blatt**

Die Konzentrationsmessungen der AS GABA und aller proteinogenen AS in der Epidermis- und „Restblatt“-fraktion von Gerstenblättern wurde mittels HPLC in der AG: Molekulare Pflanzenphysiologie des IPK Gatersleben durchgeführt. HPLC (*high pressure liquid chromatography*) ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu analysierende Substanz (aufgearbeitete Epidermisfraktion und „Restblatt“-fraktion) zusammen mit einem flüssigen Laufmittel (mobilen Phase) auf eine sogenannte Trennsäule (stationäre Phase) gegeben und gemäß Affinität und Größe aufgetrennt wird.

Für die HPLC-Messungen wurden die Epidermis bzw. „Restblatt“-Proben in flüssigem Stickstoff homogenisiert (100-200 mg), in Extraktions-Puffer (80% Ethanol; 20 mM Hepes-KOH; pH 7,5) aufgenommen, 90 min bei 80°C inkubiert und dann abzentrifugiert (16100 g, Raumtemperatur). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, bis zur Trockne eingedampft und in Aqua dest. resuspendiert. Vor der Messung wurden die präparierten Proben mit dem fluoreszierenden Reagenz AQC (6-aminoquinoly1-N-hydroxysuccinimidylcarbamate) derivatisiert. Die Derivatisierung mit AQC wurde nach dem Protokoll des verwendeten Kits durchgeführt (ACCQ FLUOR™ REAGENT KIT; Waters Co., Milford, USA). Das gelöste Reagenz wurde bei 4°C bis zu sechs Wochen aufbewahrt.

Die AS Messungen wurden mit einem Reversed-Phase-HPLC-System (Waters Co., Milford, USA) durchgeführt. Das System bestand aus einer Gradientenpumpe (600), einer Entgasungseinheit, einem Autosampler (717) und einem Fluoreszenz-Detektor (474). Die Chromatogramme wurden mit der Software Millennium 32 ausgewertet. Als HPLC-Säule diente eine Silicamatrix mit apolarer C18 Gruppe (*reversed phase colum*, AccQ Tag, 3,9x 150 mm).

Der Druckgradient wurde mit Puffer A (140 mM Natriumacetat, pH 5,8, Suprapur, Merk, 7 mM Triethanolamin Sigma, München, Deutschland) ausgebildet. Die Equilibrierung der Säule erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min und bei einer Temperatur von 37°C, die während der gesamten Messung konstant blieben. Eluiert wurde mit Acetonitril (Roti C Solv HPLC, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und Aqua dest. (HPLC Water, Baker Co., Phillipsburg, USA), wobei ein Konzentrationsgradient ausgebildet wurde. Die Konzentration wurde dabei folgendermaßen variiert: 1% 0,5 min; 5% 27 min; 9% 28,5 min; 18% 44,5 min; 60% 47,5 min; 0% 50,5 min. Zur Regeneration der Säule zwischen den Messungen wurde jeweils 10 min mit Puffer A gespült.

## 2.8 Standardprotokolle und -lösungen

### 2.8.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i>	XL Gold (Stratagene, La Jolla, USA)
<i>Escherichia coli</i>	DH10B
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1 Competent Cells (Invitrogen, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien)

### 2.8.2 Oligonukleotidprimer

SK	5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'
M13-20	5'-CAT TTT GCT GCC GGT CA-3'
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
MVR26	5'-CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AG-3'

### 2.8.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA und DNA

Zur photometrischen Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration wurden 5 µl der RNA- bzw. DNA-Lösung in 495 µl Aqua dest. gegeben und anschließend bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette vermessen (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die Nukleinsäurekonzentration ist das Produkt aus  $OD_{260nm}$ , Verdünnungsfaktor und dem spezifischen Multiplikationsfaktor der Nukleinsäure.

### 2.8.4 Gelelektrophorese zur Trennung von DNA nach der Fragmentgröße

Die DNA wurde mit 0,2 Volumen Proben-Puffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Trennung der DNA erfolgte bei 120 V. Alle Gele wurden mit einem DNA-Größenmarker (Smart Ladder, Eurogentec, Liège, Belgien) durchgeführt und fotografisch

durch UV-Transillumination bei 312 nm mit der einer Bildverarbeitungssoftware (E.a.s.y.Win32; Herolab, Wiesloch, Deutschland) dokumentiert. Für die Auftrennung von sehr kleinen DNA-Molekülen mit Fragmentgrößen zwischen 100 und 400 bp wurde eine Spezialagarose (Agarose 50-1.000 bp; Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

<u>Agarosegel</u>		<u>50 x TAE-Puffer</u>		<u>5 x Proben-Puffer</u>	
Agarose*	0,8%-1,5% w/v	Tris-HCl	2 M	Bromphenolblau	0,001% w/v
50 x TAE-Puffer	2%	Natriumacetat	50 mM	Glycerin	30% v/v
Ethidiumbromid	0,5 µg/ml	Na-EDTA (pH 8,0)	50 mM	Na-EDTA (pH 8,0)	50 mM

\* *Elektrophoresis grade*, Invitrogen

### 2.8.5 Präparation transformations-kompetenter Bakterienzellen

Kompetente Zellen von *E. coli* wurden routinemäßig nach einer modifizierten Methode von (Hanahan, 1983) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer Einzelzell-Kultur von *E. coli*, DH10B angeimpft und auf einem Schüttler bei 37°C solange inkubiert bis die Suspension eine OD<sub>550</sub> von 0,6 erreichte (ca. 3 Stunden). Dann wurde die Suspension auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (10 min; 800 g; 0°C). Das Pellet wurde in 7,5 ml TFB1-Puffer aufgenommen und resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde zentrifugiert (10 min, 800 g, 0°C). Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TFB2-Puffer aufgenommen, resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Die kompetenten Zellen wurden in 200 ml Aliquots abgefüllt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

<u>TFB1-Puffer*</u>		<u>TFB2-Puffer*</u>	
RbCl	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl	245 mM	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
K-acetat	35 mM	RbCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	Glycerin	15%
LiCl	0,5 mM	add 0,1 M NaOH	pH 7,0
Glycerin	15%		
add 0,2 M Essigsäure	pH 5,8		

\*sterilfiltrieren

### 2.8.6 Transformation von kompetenten Bakterienzellen

1 µl Plasmid-DNA (0,001-1 µg/µl) und 50 µl Suspension von kompetenten Zellen wurden auf Eis vermischt und inkubiert. Die Mischung wurde einem Hitzeschock (42°C; 45 s) ausgesetzt und mindestens 2 min auf Eis gestellt. Die Suspension der nun transformierten Zellen wurde in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen, 30 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (3 min; 2300 g). Der Überstand wurde bis auf 50 µl verworfen.

Im restlichen Überstand wurden die Bakterien resuspendiert. Die Suspension wurde ausgestrichen.

### 2.8.7 Plasmid-Präparationen

Einzelne Plasmid-Präparationen im kleinen bzw. mittleren Maßstab wurden mit Kits (JETstar 2.0 Plasmid MINI Kit 200 bzw. MIDI Kit50, GENOMED, Löhne, Deutschland) durchgeführt. Plasmid-Präparationen im 96er Platten Format wurden mit einem Kit (NucleoSpin Robot-96 Plasmid, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Beide Kits basieren auf Silica Anionenaustauschersäulen, die positiv geladene Gruppen enthalten und DNA, Proteine und RNA unterschiedlich stark binden.

### 2.8.8 Restriktionsverdau

Alle Restriktionsverdau wurden unter denen vom Hersteller (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) empfohlenen Pufferbedingungen, Enzymkonzentrationen und Temperaturen durchgeführt. Inkubiert wurde eine Stunde. Folgender Standardansatz wurde verwendet.

#### Restriktionsverdau

DNA	1 µl
Restriktionsenzym	2 µl
Puffer	2 µl
Aqua dest.	15 µl

### 2.8.9 Arbeiten mit RNA

Um RNase Kontaminationen beim Arbeiten mit RNA zu vermeiden, wurden die allgemein üblichen Vorkehrungen getroffen (Sambrook und Russell 2002). Alle RNA-Arbeiten wurden mit DEPC-Wasser ausgeführt.

#### DEPC-Wasser\*

DEPC	0,1% v/v
------	----------

\*Die Lösung wurde 40 min bei 121°C autoklaviert.

### 2.8.10 Mikroskopie und Fotografie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss Forschungsmikroskop (Axioplan 2 bzw. Axiolab, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) durchgeführt. Für das TIGS *Screening* wurde mit der 200-facher Vergrößerung gearbeitet. Mikroskopische Fotos wurden mit der Digital-Kamera (Axiocam HRc, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) aufgenommen. Für makroskopische Fotos wurde die Kleinbild Digital-Kamera (Nikon Coolpix SQ 3,1) verwendet.

### 2.8.11 Standardlösungen

#### 1) LB-Medium

NaCl	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
Agar	15 g/l
add NaOH	pH 7,5

#### Selektionsmarker

Ampicillin-Resistenz:	100 µg Ampicillin (Roth)/ml LB-Medium
Kanamycin-Resistenz:	50 µg Kanamycin (Roth)/ml LB-Medium
Blau-Weiß-Selektion:	60 µg X-Gal (Roth)/ml LB-Medium
	60 µg IPTG (Roth)/ml LB-Medium

\*Die Mischung wurde autoklaviert und anschließend, bis zum Gießen, bei einer Temperatur von 65°C gehalten. Für LB-Medium (flüssig) wurde kein Agar zugesetzt. Dem Medium wurden bei Bedarf folgende Selektionsmarker zugesetzt.

#### 2) TE-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
Na-EDTA, pH 8,0	1 mM

#### 3) SOC-Medium

Bacto-Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl (1M)	2,5 ml/l
add NaOH	pH 7,0
MgCl <sub>2</sub> (1M)*	10 ml/l
Glucose (1M)*	20 ml/l

\* Die Lösung wurde autoklaviert. Die MgCl<sub>2</sub>- und die Glucoselösung wurden gesondert sterilfiltriert.

#### 4) 50 x TAE

Tris-Base	2 M
Eisessig	5,7%
add 0,5 M Na-EDTA-Lösung	pH 8,0



### 3. Ergebnisse

Die pflanzliche Epidermis ist von grundlegender Bedeutung für die Wirts- und Nichtwirtsabwehr einer großen Anzahl von Pilzkrankheiten, einschließlich des Gerstenmehltaus, der durch *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer *f.sp.* hordei verursacht wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das epidermale Transkriptom der isogenen Gerstenlinien Ingrid *Mlo* (anfällig) und Ingrid BC *mlo5* (resistent) charakterisiert, um molekulare Mechanismen von Anfälligkeit bzw. dauerhafter Resistenz in der Epidermis der Gerste besser zu verstehen. Dazu wurde zunächst eine cDNA-Bank aus der Epidermis mehltauattackierter Gerste erstellt, die mit dem Identifikationscode „HO“ gekennzeichnet wurde (Kapitel 3.1). Die HO-cDNA-Bank war die Grundlage der makroarraybasierten Transkriptomanalyse (Kapitel 3.2) und der Erstellung einer RNAi-Konstrukt-Bibliothek für das TIGS-Screening, welches in *mlo*-resistenter Gerste (Kapitel 3.3) und im Nichtwirtssystem Gerste und *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer *f.sp.* tritici durchgeführt wurde. Des Weiteren ergänzen die von der cDNA-Bank abgeleiteten ESTs die bestehende EST-Kollektion des IPK. Unter den pathogeninduzierten Genen wurde eine epidermal exprimierte Glutamat-Decarboxylase gefunden, weshalb weiterführende Untersuchungen zur Rolle von  $\gamma$ -Aminobuttersäure durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3.4).

#### 3.1 Die HO-cDNA-Bank aus der Epidermis mehltaubefallener Gerste

Die Interaktion zwischen *Blumeria* und Gerste ist auf die Sprossepidermis beschränkt. Aus diesem Grund wurde die HO-cDNA-Bank aus der Epidermis siebentägiger Gerstenkeimlinge der isogenen Linie Ingrid *mlo5* präpariert, die mit *Bgh* bzw. *Bgt* inokuliert waren. Die Epidermis wurde zu den Zeitpunkten 5-7 Stunden und 23-25 Stunden nach der Inokulation (hpi) abgezogen und im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt. In der HO-cDNA-Bank sind folglich cDNAs der drei Organismen *Bgh*, *Bgt* und Gerste (Ingrid *mlo5*) enthalten. Gene, die ausschließlich in der Epidermis der Gerste exprimiert werden, wurden in der HO-cDNA-Bank angereichert (siehe dazu Kalkulation zur Anreicherung von mRNA-Transkripten 3.2.3). Insgesamt besteht die HO-cDNA-Bank aus 14.592 cDNA-Klonen (Tabelle 3.1), von denen 5.952 Klone innerhalb dieses Projektes vom 5'Ende her sequenziert wurden (5'ESTs). 5.163 Sequenzen (86,7%) wurden weiter analysiert. Diese Sequenzen hatten eine Mindestlänge von 100 bp und erfüllten die *Trimming*-Kriterien der Software Seqman (DNASTAR Inc., Madison, USA), mit der terminale Sequenzbereiche von geringer Qualität und Plasmid-Reste von pBluescript entfernt wurden (vorgegebene Einstellungen). Die durchschnittliche Länge der cDNA-Fragmente in den Klonen betrug 1.200 bp, wie aus PCR-Amplifikationen der Inserts hervor-ging.

**Tabelle 3.1:** Übersicht HO-cDNA-Bank

<b>HO-cDNA-Bank</b>	
cDNA-Bank-ID	HO
vorhandene Klone	14.592
5'-sequenzierte Klone	5.952
5'-EST	5.163 (86,7%)
mittlere Länge der cDNA-Inserts	1.200 bp
<b>Sequenzvergleich (5.163) März 2003</b>	
BlastX-E-Wert kleiner $1 \cdot 10^{-10}$	3.390 (65,7%)
BlastN-E-Wert (EMBL Plant) kleiner $1 \cdot 10^{-10}$	2.387 (46,2%)
BlastN-E-Wert (EMBL Fungi) kleiner $1 \cdot 10^{-10}$	256 (4,9%)
<b>Komplexität (Sequenz-Cluster-Analyse)</b>	
Singletons	2.959
EST in Cluster	2.204
Multisequenz-Cluster	646
ausgewählte Unigene	3.595
<b>Vergleich mit CR-EST (135031 ESTs)</b>	
HO-spezifische Singletons	1.452
HO-spezifische Multisequenz-Cluster	294
HO-spezifische Unigene	1.746
HO-spezifische Multisequenz-Cluster (>5)	13
cDNA-Bank spezifische Multisequenz-Cluster (>5)	132

### 3.1.1 Sequenzvergleiche gegenüber Gen- bzw. Proteindatenbanken

Durch Blast-Analysen wurden Sequenzhomologe der ESTs in Proteindatenbanken und Nukleotiddatenbanken ermittelt und analysiert. Von den 5.163 ESTs passten 65,7% zu einem Datenbankeintrag in den Datenbanken SwissProt bzw. SwissPir (BlastX), die alle verfügbaren Proteinsequenzen repräsentieren, 46,2% zu einem Datenbankeintrag in EMBL Plant (BlastN), die pflanzliche Nukleotidsequenzen enthalten und 4,9% zu einem Datenbankeintrag in EMBL Fungi (BlastN), die alle bekannten pilzlichen Nukleotidsequenzen repräsentieren (Dezember 2002). Für alle Blast-Analysen gilt, dass ausschließlich Homologien mit einem E-Wert kleiner gleich  $1 \cdot 10^{-10}$  ausgewertet wurden.

Die aufgeführten Blast-Analysen wurden in unterschiedlichen Stadien des Projektes durchgeführt. Während die Blast-Analysen der ermittelten Kandidatengene erst kürzlich auf den neuesten Stand gebracht wurden (März 2004), wurden die Analysen für alle ESTs der HO-cDNA-Bank zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt. Diese wurden jeweils mit Monat und Jahr der Analyse gekennzeichnet. Die in den Datenbanken SwissProt bzw. SwissPir ermittelte Sequenzhomologie und die Sequenz der ESTs ist unter [http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/cdna\\_lib.php](http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/cdna_lib.php) ersichtlich. Die Sequenzhomologien der ESTs werden innerhalb des CREST-EST-Datenbanksystems jährlich auf den neuesten Stand gebracht.

Eine sehr frühe Blast-Analyse, bei der die Gesamtheit der HO-ESTs (5.163) mit allen monokotyledonen ESTs (400.000) verglichen wurde, zeigte eine hohe Exklusivität der hier erzeugten ESTs im Vergleich zu anderen cDNA-Banken. Die Analyse wurde mittels lokalem BlastN durchgeführt. Dabei wurden 3.584 (entsprechend 69,4%) ESTs gefunden, die 90% oder mehr Sequenzidentität mit einem HO-EST zeigten. 1.579 (entsprechend 30,6%) der in

der HO-cDNA-Bank repräsentierten Klone waren demnach im März 2001 noch nicht bekannt, was die Sequenzierung von weiteren ESTs rechtfertigte. Bis heute wurden die Klone der HO-cDNA-Bank vollständig in 3'- und 5'-Richtung sequenziert. Die Sequenzen stehen für weiterführende Analysen und Untersuchungen zur Verfügung, sind aber nicht in das hier dargelegte Projekt eingeflossen.

### 3.1.2 Die Komplexität der HO-cDNA-Bank: Definition des Unigensets

Alle 5.163 ESTs wurden untereinander mit der Sequenz-Clustering-Software StackPack 2.1 (Miller *et al.*, 1999) verglichen, um die Komplexität der HO-EST-Kollektion zu beurteilen. Ausgabeformate des Sequenz-Clustering sind drei verschiedene Kategorien von zusammengehörigen (homologen) ESTs, die als Cluster (Multisequenz-Cluster), Contigs und Consensi bezeichnet werden. Cluster entsprechen per Definition einer Genfamilie, Contigs bzw. Primärconsensi entsprechen einzelnen Genen einer Genfamilie und alternative Consensi entsprechen beispielsweise unterschiedlichen Spleißvarianten eines Gens. Allerdings wurden innerhalb der Consensi eines Contigs auch Sequenzen gefunden, die verschiedenen Genen entsprechen (Zhang *et al.* 2004).

Mit dem Sequenzvergleich wurden 2.959 Singletons und 646 Multisequenz-Cluster mit 2.204 ESTs gefunden (Tabelle 3.1). Per Definition wurde jeder Consensus dieser Sequenz-Cluster-Analyse als ein Gen betrachtet und als Unigen bezeichnet. Aus den Singletons und den Consensi ergab sich ein Unigenet bestehend aus 3.595 ESTs bzw. Unigenen, welches später auf einen Makroarray aufgebracht wurde. Der Makroarray bildete die Grundlage für die Transkriptomanalyse.

Die größten Consensi der HO-cDNA-Bank (mehr als 20 Mitglieder) waren homolog zu zwei Genen der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (LSU *large subunit* und SSU *small subunit*) (Rubisco), zu 26S-rRNA und zu einem Lipid-Transfer-Protein. Ein Consensus repräsentiert ein bisher unbekanntes Gen (Tabelle 3.2). Rubisco stellt ein chloroplastenspezifisches Protein dar. Ursache für das Vorkommen von Rubisco-ESTs in der HO-EST-Kollektion könnten Verunreinigungen der Epidermispräparationen mit Resten von Mesophyllgewebe sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Rubiscotranskripte aus den chloroplastenhaltigen Stomata stammen.

**Tabelle 3.2:** Die fünf größten HO-Consensi. Sequenz-Cluster-Analyse mit 135.031 ESTs (Consensi: siehe zum Beispiel <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/external.php?cn=cl21ct1285cn1647g03>).

Homologie	Beispiel ID	CONSENSUS_SEQ_ID	Anzahl ESTs
Rubisco (LSU)	HO15H03	cl21ct1285cn1647g03	76
Rubisco (SSU)	HO14F14	cl21ct1278cn1629g03	32
26S-rRNA	HO16O19	cl227ct379cn503g03	22
kein Treffer	HO15A18	cl7375ct9326cn11467g03	22
LTP	HO16G23	cl87ct154cn202g03	21

### 3.1.3 Vergleich der HO-cDNA-Bank mit der IPK-EST-Kollektion (135031 ESTs)

In einer Sequenzclusteranalyse (StackPack 2.1) mit 135.031 ESTs der EST-Kollektion des IPK (September, 2003), die ESTs von 26 cDNA-Banken der Gerste inklusive der HO-cDNA-Bank repräsentiert, wurde unter anderem der Anteil HO-spezifischer ESTs an der gesamten EST-Kollektion ermittelt. Außerdem war diese Analyse die Grundlage für den dargestellten

elektronischen *Northern* (siehe 3.2.2.7). Es wurden 294 HO-spezifische Multisequenz-Cluster und 1.452 HO-spezifische Singletons, insgesamt 1.746 HO-spezifische Unigene gefunden (Tabelle 3.1). Das bedeutet, dass 34,6% der in der HO-cDNA-Bank enthaltenen Sequenzen zu diesem Zeitpunkt nicht im EST-Set des IPK vertreten waren. Insgesamt wurden in der CREST-EST-Kollektion mit 135.031 ESTs 12.849 Singletons und 16.903 Consensi gezählt. Es entstanden 132 bankenspezifische Multisequenz-Consensi mit mehr als fünf Mitgliedern (Zhang, persönliche Mitteilung, IPK Gatersleben).

Von den 132 bankenspezifischen Multisequenz-Consensi entstammen 13 der HO-EST-Kollektion. Diese repräsentieren 9 Gene aus Gerste und vier Gene aus *Blumeria* (Tabelle 3.3). Unter den gerstespezifischen Consensi wurde ein Consensus der als pathogeninduziert bekannten Germin-ähnlichen Proteine (HvGLP4) gefunden, die spezifisch in der Epidermis exprimiert werden. Des weiteren repräsentieren zwei Consensi Proteinkinasen, ein Consensus ein LRR-Protein, ein Consensus ein Resistenzgen aus Tomate (cf-2.1), ein Consensus Rubisco (in den Thyllakoiden der Chloroplasten lokalisiert), ein Consensus PSII-10K-Protein und zwei Consensi Gene die bisher unbekannt waren. Abgesehen von den photosyntheseassoziierten Genen, die für Rubisco und PS II 10 K Protein kodieren, handelt es sich ausschließlich um Gene, die im Zusammenhang mit Stress diskutiert werden. Möglicherweise werden die HO-spezifisch exprimierten Proteine Rubisco und PSII-10K nach Pathogenbefall speziell in den Schließzellen der Stomata exprimiert.

**Tabelle 3.3:** HO-spezifische Consensi mit mehr als fünf Mitgliedern. Sequenz-Cluster-Analyse mit 135.031 ESTs (Consensi: siehe z.B. <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/external.php?cn=cl10231ct12370cn14691g03>).

Homologie	Beispiel ID	CONSENSUS_SEQ_ID	Anzahl ESTs
HvGLP4	HO00T01	cl10231ct12370cn14691g03	17
Proteinkinase	HO02B11	cl10292ct12438cn14765g03	6
unbekannt	HO05A16	cl10392ct12545cn14879g03	6
Rubisco	HO02F23	cl21ct1038cn1294g03	6
cf 2.1	HO01L21	cl10276ct12421cn14747g03	5
LRR (ähnlich)	HO02E23	cl10303ct12449cn14777g03	5
unbekannt	HO16M17	cl10305ct12451cn14780g03	5
Proteinkinase	HO05B14	cl10393ct12546cn14880g03	5
PSII-10K-Protein	HO01J17	cl4295ct5899cn7760g03	5
<i>Bgh</i> -EST	HO00D11	cl10234ct12372cn14693g03	10
<i>Bgh</i> -EST	HO01F10	cl10254ct12396cn14721g03	7
<i>Bgh</i> -EST	HO01K12	cl10269ct12412cn14738g03	6
<i>Bgh</i> -EST	HO01O14	cl10285ct12431cn14757g03	6

### 3.1.4 Pilzgene in der HO-cDNA-Bank

Die cDNA-Bank wurde aus der Epidermis von Gerstenblättern hergestellt, die mit Sporen von *Bgh* und *Bgt* inokuliert waren. Folglich enthält die cDNA-Bank ESTs aus drei verschiedenen Organismen: Gerste, *Bgh* und *Bgt*. Eine Möglichkeit, um pflanzliche und pilzliche ESTs voneinander zu unterscheiden, sind Blast-Analysen.

ESTs mit geringer Ähnlichkeit zu einer pflanzlichen bzw. pilzlichen Sequenz lassen sich nicht eindeutig durch Blast-Analysen gegenüber Nukleotid-, Protein- und EST-Datenbanken pilzlicher oder pflanzlicher Herkunft zuordnen. Wohl aber lassen sich Aussagen über die Wahrscheinlichkeit treffen, ob es sich um ein pflanzliches oder pilzliches Gen handelt. Daher wurden die BlastX-Treffer von 300 zufällig ausgewählten ESTs der HO-cDNA-Bank und von 300 zufällig ausgewählten HO-spezifischen ESTs, resultierend aus der StackPack Analyse mit

135.031 ESTs, im Hinblick auf ihre Herkunft analysiert (Tabelle 3.4). Der Vergleich von Proteinsequenzen hat gegenüber Nukleotidvergleichen den Vorteil, dass hierbei die pilz- bzw. pflanzentypische Codon-Präferenz (*codon usage*) und der pilz- bzw. pflanzentypische GC-Gehalt berücksichtigt wird.

Innerhalb aller 5.163 ESTs wurden 8% pilzliche und innerhalb der HO-spezifischen ESTs wurden 32% ESTs gefunden, deren translatierte Proteinsequenz besser mit einem pilzlichen als mit einem pflanzlichen Protein übereinstimmten (Tabelle 3.4). Der Anteil von pilzlichen ESTs in der Auswahl „HO-spezifische ESTs“ ist erwartungsgemäß höher, da in den anderen cDNA-Banken keine pilzlichen ESTs enthalten sind. Aus Nukleotidsequenzvergleichen mittels BlastN, gegenüber pilzlichen und pflanzlichen EST-Datenbanken, resultierten sehr ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Der Vorteil von Sequenzvergleichen in pilzlichen EST-Datenbanken ist, dass sich hiermit ESTs eindeutig Pilzen bzw. Pflanzen zuordnen lassen, da zahlreiche ESTs perfekt an einen pilzlichen oder pflanzlichen EST passen. Dasselbe gilt auch für Gendatenbanken pilzlicher bzw. pflanzlicher Gene. Daher wurden alle Gene des Kandidatengensets zusätzlich in EST- und Gendatenbanken auf ihre pflanzliche Herkunft kontrolliert. Bei vereinzelt pflanzlichen Kandidatengenen, die keinen eindeutigen Treffer in der Datenbankanalyse zeigten, dürfte es sich um weitere Pilzgene handeln. Eine Alternative, um unklare Zuordnungen aufzuklären, sind PCR mit EST-spezifischen Primern und Template-DNA aus *Bgh* bzw. Gerste, wie sie für einige Kandidaten durchgeführt wurden (Kapitel 3.2.7).

**Tabelle 3.4:** Anteil pilzlicher und pflanzlicher ESTs in jeweils 300 zufällig ausgewählten ESTs von allen HO-ESTs bzw. von allen HO-spezifischen ESTs

	5.163 ESTs	HO-spezifische ESTs
homologe Proteine	208	146
Pflanzenprotein	191	99
Pilzprotein	17	47
homologe Proteine	69%	49%
Pflanzenprotein	92%	68%
Pilzprotein	<b>8%</b>	<b>32%</b>

### 3.2 Transkriptomanalyse

In der vorliegenden makroarraybasierten Transkriptomanalyse mit 3.136\* Unigenen des epidermalen Transkriptoms der isogenen Gerstenlinie Ingrid BC *mlo5* (resistent) sollten prinzipiell drei Fragestellungen beantwortet werden:

- 1) Welche Gene werden durch den Befall mit Mehltau (*Bgh*) in Gerste reguliert? (Vergleich: „inokuliert“ *versus* „nichtinokuliert“);
- 2) Welche Gene sind in der resistenten bzw. in der anfälligen isogenen Linie spezifisch exprimiert? (Vergleich: Ingrid *Mlo* *versus* Ingrid BC *mlo5*);
- 3) Welche Gene haben ihren Expressionsschwerpunkt in der Epidermis und welche im Mesophyll? Welche Gene sind spezifisch in der Epidermis bzw. im Mesophyll exprimiert? (Vergleich: Epidermis *versus* „Restblatt“).

In der folgenden Tabelle sind alle durchgeführten Experimente im Überblick dargestellt.

**Tabelle 3.5:** Übersicht: Experimente.

Sorte: (Ingrid)	Inokulum	Zeitpunkt (hpi)	Gewebe	Vergleich	n Exp.	Membran Nr. Experiment 1	Membran Nr. Experiment 2
<i>Mlo</i>	-	6	Epidermis	1	2	20	28
<i>Mlo</i>	-	12	Epidermis	1	2	32	36
<i>Mlo</i>	-	24	Epidermis	1	2	15	24
<i>Mlo</i>	<i>Bgh</i>	6	Epidermis	1; 2	2	21	29
<i>Mlo</i>	<i>Bgh</i>	12	Epidermis	1; 2	2	33	37
<i>Mlo</i>	<i>Bgh</i>	24	Epidermis	1, 2	2	16	25
BC <i>mlo5</i>	-	6	Epidermis	1	2	18	26
BC <i>mlo5</i>	-	12	Epidermis	1	2	30	34
BC <i>mlo5</i>	-	24	Epidermis	1	2	13	22
BC <i>mlo5</i>	<i>Bgh</i>	6	Epidermis	1; 2	2	19	27
BC <i>mlo5</i>	<i>Bgh</i>	12	Epidermis	1; 2	2	31	35
BC <i>mlo5</i>	<i>Bgh</i>	24	Epidermis	1; 2	2	14	23
BC <i>mlo5</i> + <i>Mlo</i>	<i>Bgh</i>	12; 24	Mesophyll	3	3	4	5
BC <i>mlo5</i> + <i>Mlo</i>	<i>Bgh</i>	12; 24	Epidermis	3	3	2	3

Für die Markierung des Arrays wurden  $^{33}\text{P}$ -markierte cDNA-Sonden eingesetzt, die wie auch die HO-cDNA-Bank aus abgezogener Epidermis von siebentägigen Gerstenkeimlingen präpariert wurden. 73% (2.306 von 3.136\*) der auf dem Array befindlichen Gene wurden bezüglich ihrer Genexpressionsmuster analysiert. Dabei wurden die Gene in die Analyse einbezogen, deren Hybridisierungssignale auf mindestens zwei von 24 möglichen Membranen die lokale Hintergrundintensität um das 2,5-fache überstiegen.

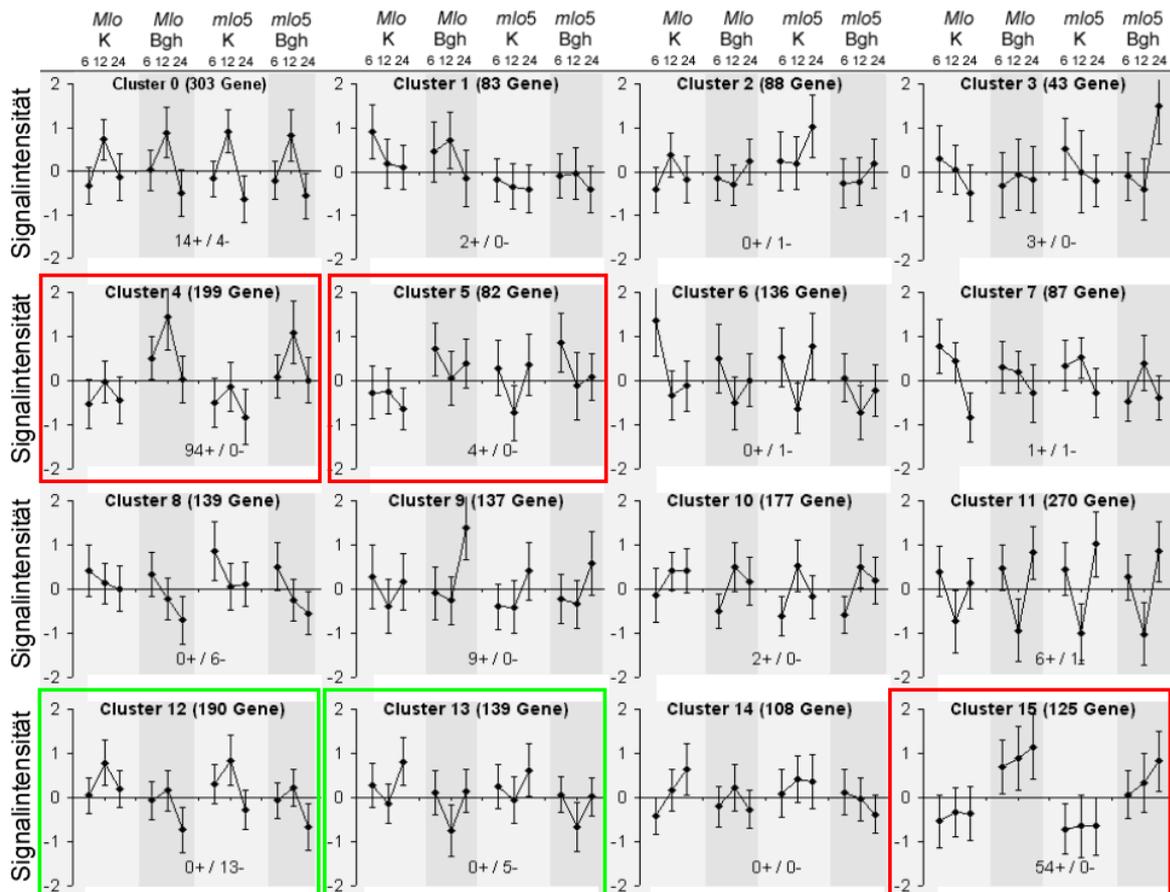
Von allen Experimenten wurden zwei biologische Wiederholungen zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 hpi durchgeführt (Tabelle 3.5), wobei der Zeitpunkt 6 hpi mit der Auskeimung des appressorialen Keimschlauches, der Zeitpunkt 12 hpi mit dem Durchbrechen der Zellwand unterhalb des Appressoriums und der Zeitpunkt 24 hpi mit der Ausbildung von Haustorien (in anfälligen Pflanzen) korreliert. Die Wahl der Zeitpunkte erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung zweier Expressionsmaxima von Abwehrgentranskripten (2-6 hpi und 12-24 hpi) im Pathosystem Gerste und *Bgh* (Collinge *et al.* 2002).

Eine äußerst vorteilhafte Gegebenheit ist, dass die Entwicklung des Pilzes in allen befallenen Zellen nahezu synchron verläuft (Panstruga 2004). Infolge einer möglichst hohen Inokulationsdichte kann eine enorme Anzahl von Interaktionen gleichzeitig berücksichtigt werden.

\*Insgesamt wurden alle 3.595 Unigene gespottet. Durch einen Fehler in der „Spotting“-Liste fehlen 130 Gene in der Auswertung. Weiterhin wurden nur 90% der cDNA-Klone mittels PCR erfolgreich amplifiziert (siehe Kapitel 2.3.1.2). Aufgrund dieser Tatsachen wurde eine Anzahl von 3.136 erfolgreich gespotteten Unigenen abgeschätzt.

### 3.2.1 Globale Transkriptmusteranalyse

Um einen Überblick vom analysierten, auf dem Array repräsentierten Interaktionstranskriptom von Gerste und Mehltau zu erhalten, wurde ein sogenanntes „K-means“-Clustering durchgeführt. Dazu wurden array- und genzentrierte Mittelwerte aus beiden in die Auswertung eingegangenen biologischen Experimenten verwendet. Die Einstellungen wurden dabei so gewählt, dass 16 Cluster von *co*-regulierten Genen entstanden. Es wurden 406 (entsprechend 17,6%) pathogeninduzierte bzw. 329 (entsprechend 14,3%) pathogenreprimierte Gene, insgesamt also 735 (entsprechend 31,9%) pathogenregulierte Gene gefunden (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** Globale Expressionsmusteranalyse („K-means“) mit arrayzentrierten logarithmierten (Basis zwei) Mittelwerten der Signalintensitäten aus beiden biologischen Replikaten. Insgesamt wurden 2.306 Gene analysiert. Die Streuungsbalken zeigen die Standardabweichung an. +/-: Anzahl induzierter (+) bzw. reprimierter (-) Kandidatengene aus der stringenteren Analyse, siehe Kapitel 3.2.2, *Bgh*: mit Sporen von *Bgh* inokuliert, K: Kontrolle, *mlo5*: Pflanzen der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5*; *Mlo*: Pflanzen der isogenen Linie Ingrid *Mlo*

Pathogeninduzierte Gene scheinen sich in den Clustern 4, 5 und 15 zu befinden. Im Gegensatz zu den Clustern 4 und 5 wurden die Gene in Cluster 15 nicht transient induziert. In Cluster 12 und 13 befinden sich pathogenreprimierte Gene, die ebenfalls einem transienten Muster folgen, wobei die Repressionsfaktoren im Vergleich zu den Induktionsfaktoren schwächer waren. Unterschiede im Expressionsmuster zwischen der anfälligen isogenen Linie Ingrid und der resistenten Linie Ingrid BC *mlo5* werden in den Clustern 1, 2 und 3 vermutet. In Cluster 1 sind Gene zu finden, die in Ingrid BC *mlo5* unabhängig vom Inokulationsstatus stärker exprimiert werden (resistenzassoziierte Gene). Cluster 2 repräsentiert Gene, die in nichtinokulierten Pflanzen von Ingrid *Mlo* stärker exprimiert werden als in inokulierten Pflanzen von

Ingrid *Mlo* bzw. als in inokulierten und nichtinokulierten resistenten Pflanzen (Ingrid BC *mlo5*). In Cluster 3 befinden sich Gene, die in inokulierten Pflanzen von Ingrid *Mlo* im Vergleich zu den anderen drei Situationen am stärksten exprimiert sind (anfälligkeitsassoziiert). In beiden biologischen Experimenten wurden die Pflanzen zur gleichen Tageszeit (zu Beginn der Lichtphase) inokuliert, um Artefakte durch *circadian* regulierte Gene zu vermeiden. Nach 16 Stunden Lichtphase setzte die Dunkelphase ein. Während Gene in Cluster 6, 9, 11 und 13 ihr Expressionsmaximum in der Dunkelphase hatten, erreichten Gene in Cluster 0, 4, 10 und 12 ihr Maximum am Ende der Lichtphase.

### 3.2.2 Kandidatengenset

Unter Kapitel 3.2.1 wurde eine globale Clusteranalyse des epidermalen Transkriptom gezeigt, wobei 735 Kandidaten für pathogenregulierte Gene gefunden wurden. Im Gegensatz dazu wurde nun in einer wesentlich stringenteren Analyse ein kleineres, aber in beiden biologischen Experimenten reproduzierbares Kandidatengenset ermittelt, welches aus 233 pathogenregulierten Genen besteht (Auswahlkriterien siehe Kapitel 3.2.2.1). Das hier präsentierte Kandidatengenset wurde weiter analysiert und war Grundlage für zahlreiche weiterführende Untersuchungen. 171 (entsprechend 73%) pflanzliche Gene des Kandidatengensets waren induziert und 36 (entsprechend 15%) Gene waren reprimiert. Alle 26 (entsprechend 11,2%) pilzlichen Gene des Kandidatengensets waren erwartungsgemäß ebenfalls induziert, da sich die Regulationsfaktoren aus dem Quotient der Signalintensitäten von „inokuliert“ und Kontrolle berechneten. Die hier getroffene Auswahl von Kandidatengenen korreliert weitgehend mit der globalen Transkriptmuster-Analyse (Abbildung 3.1). Zusammenfassend wurde das Kandidatengenset mit Annotationen, Transkriptomdaten, den erforderlichen Identifikationsnummern und einem Vergleich mit Transkriptabundanzen weiterer cDNA-Banken (elektronischer *Northern*) im beiliegenden Übersichtsplan dargestellt (Tabelle 3.0).

#### 3.2.2.1 Kriterien für die Auswahl des Kandidatengensets

Insgesamt standen pro Genotyp (Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*) sechs Vergleichspaare von Datensätzen „inokuliert/Kontrolle“ zur Verfügung (drei Zeitpunkte x zwei Experimente) (Tabelle 3.4). Für die Auswahl des Kandidatengensets wurden folgende Kriterien in Kombination angewendet:

- 1) Um Gene zu erfassen, die reproduzierbar auf das Pathogen reagieren, wurden solche ausgewählt, deren Induktions- bzw. Repressionsfaktor bei mindestens einem Zeitpunkt in beiden biologisch unabhängigen Experimenten größer zwei bzw. kleiner 0,5 war.
- 2) Um robuster regulierte Gene zu finden, wurden solche ausgewählt deren Induktions- bzw. Repressionsfaktor zusätzlich in jeweils vier von sechs Fällen über 1,25 bzw. unter 0,8 lag. Die Analyse wurde genotypspezifisch durchgeführt.
- 3) Um Kandidatengene mit stark variablen, „stochastischen“ Signalintensitäten auszuschließen, wurden innerhalb eines Genotyps und eines biologischen Experiments solche ausgewählt, deren Quotienten aus den maximalen Signalintensitäten von inokuliertem bzw. Kontrolleexperiment mindestens 1,5 betrug. Analog wurde mit den reprimierten Genen verfahren.
- 4) Es wurden Gene ausgewählt, deren mittlere, normalisierte Signalintensität in allen 24 Ansätzen mindestens zwei Einheiten der Intensitätsskala der Software „Arrayvision“

betrug. Dies beruht auf der allgemein anerkannten Tatsache, dass die Signale schwach exprimierter Gene artefaktanfälliger sind (Sreenivasulu *et al.* 2002).

Insgesamt wurden mit den genannten Kriterien 233 Gene ausgewählt, die weiter analysiert und getestet wurden. Für die Signalintensitäten von 172 Kandidatengenomen waren alle vier Kriterien zutreffend. Weitere 61 Gene erfüllten drei der vier Kriterien, davon allerdings immer Kriterium 1.

### 3.2.2.2 Zeitlicher Verlauf der Genexpression nach Pathogenbefall

Für die Auswahl der hier gezeigten Gene wurde ausschließlich Kriterium 1 verwendet (siehe Kapitel 3.2.2.1). Ziel war es, den zeitlichen Verlauf der Genexpression in der kompatiblen Interaktion im Vergleich zur inkompatiblen Interaktion und den Anteil „induzierter“ pilzlicher Gene zu den untersuchten Zeitpunkten 6, 12 und 24 hpi zu dokumentieren.

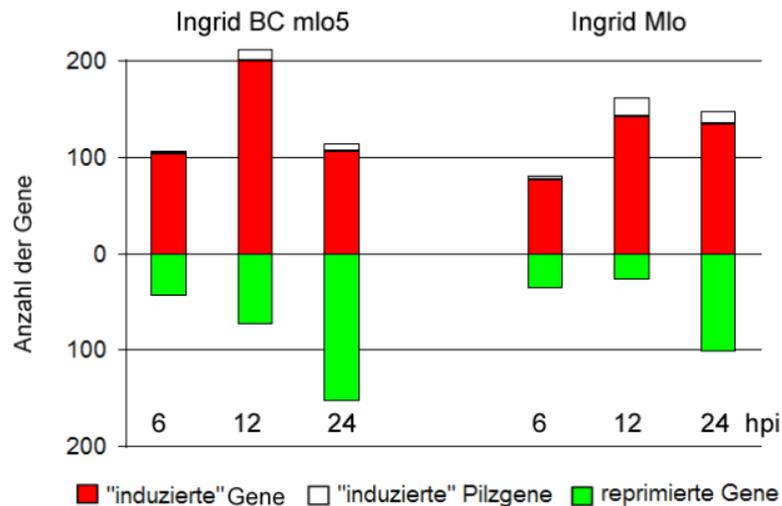
Sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion waren die meisten Gene 12 hpi induziert. In der inkompatiblen Interaktion war dieser Effekt stärker ausgebildet (Tabelle 3.6 und Abbildung 3.2). Die Anzahl reprimierter Gene war insgesamt geringer. Die meisten reprimierten Gene wurden 24 hpi in der inkompatiblen Interaktion gefunden. (Abbildung 3.2).

**Tabelle 3.6:** Anzahl pathogenregulierter Gene nach „Kriterium 1“ (6, 12 und 24 hpi).

	Ingrid BC <i>mlo5</i>			Ingrid Mlo		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
regulierte Gene nach Kriterium 1	150	285	267	116	188	249
induzierte Gene nach Kriterium 1	106	211	114	80	161	147
reprimierte Gene nach Kriterium 1	44	74	153	36	27	102
induziert in <i>mlo5</i> und <i>Mlo</i>	23	90	45	23	90	45
reprimiert in <i>mlo5</i> und <i>Mlo</i>	1	1	12	1	1	12
Anteil induzierter Pilzgene	3%	5%	7%	4%	11%	9%
regulierte Gene (ohne Pilzgene)	147	274	258	112	170	236

Bei Anwendung der weiteren Kriterien wurden viele der hier als reprimiert gezeigten Gene aussortiert. Möglicherweise würde sich das Verhältnis von reprimierten und induzierten Genen bei der Analyse eines weiteren Zeitpunktes zugunsten der reprimierten Gene verschieben.

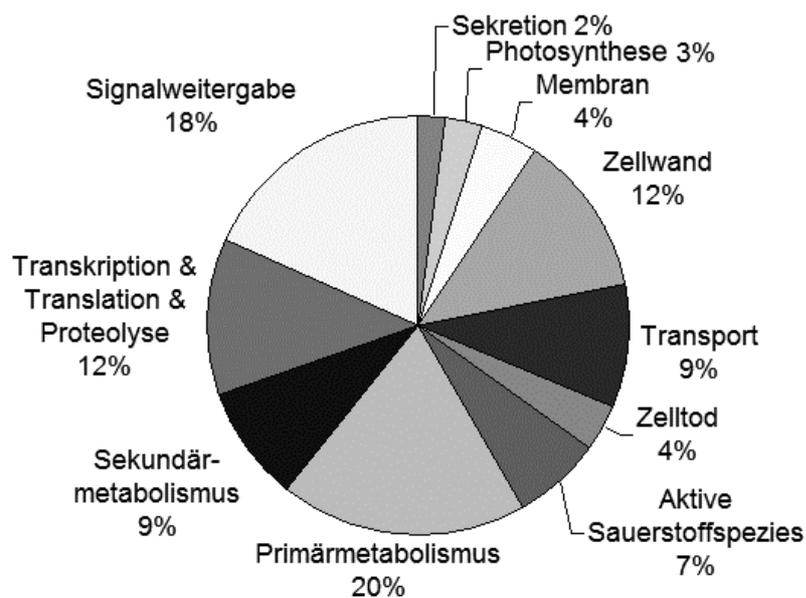
6 hpi war der geschätzte Anteil „induzierter“ pilzlicher Gene in der inkompatiblen und der kompatiblen Interaktion noch unter 4%. 12 hpi stieg der Anteil in der inkompatiblen Interaktion auf 5% und in der kompatiblen Interaktion auf 11%, bzw. stieg/fiel 24 hpi auf 7% und 9%. Die Abschätzung pilzlicher Gene wurde anhand der BlastX-Homologien, wie unter 3.1.4. beschrieben, durchgeführt. Unter den reprimierten Genen betrug der Anteil pilzlicher Gene ca. 1%. Diese wurden in der Darstellung vernachlässigt.



**Abbildung 3.2:** Zeitlicher Verlauf der Genexpression in der kompatiblen Interaktion im Vergleich zur inkompatiblen Interaktion. Für die Auswahl der Gene wurde ausschließlich Kriterium 1 verwendet (siehe Kapitel 3.2.2.1).

### 3.2.2.3 Bildung von funktionellen Kategorien innerhalb des Kandidatengensets

Das unter stringenteren Kriterien ausgewählte Kandidatengenset (siehe Kapitel 3.2.2.1) besteht aus insgesamt 233 Genen, die zunächst in 207 (89%) pflanzliche und 26 pilzliche Gene (11%) unterschieden wurden (siehe Kapitel 3.1). Die Zahl pilzlicher Gene lag mit 11% erwartungsgemäß über der geschätzten Anzahl von 8% (Tabelle 3.4). Transkripte pilzlicher Gene können nur in inokulierten Blättern nachgewiesen werden und sollten demnach durch hohe Induktionsfaktoren charakterisiert sein.



**Abbildung 3.3:** Kategorisierung der Kandidatengenauswahl (137 pflanzliche Gene).

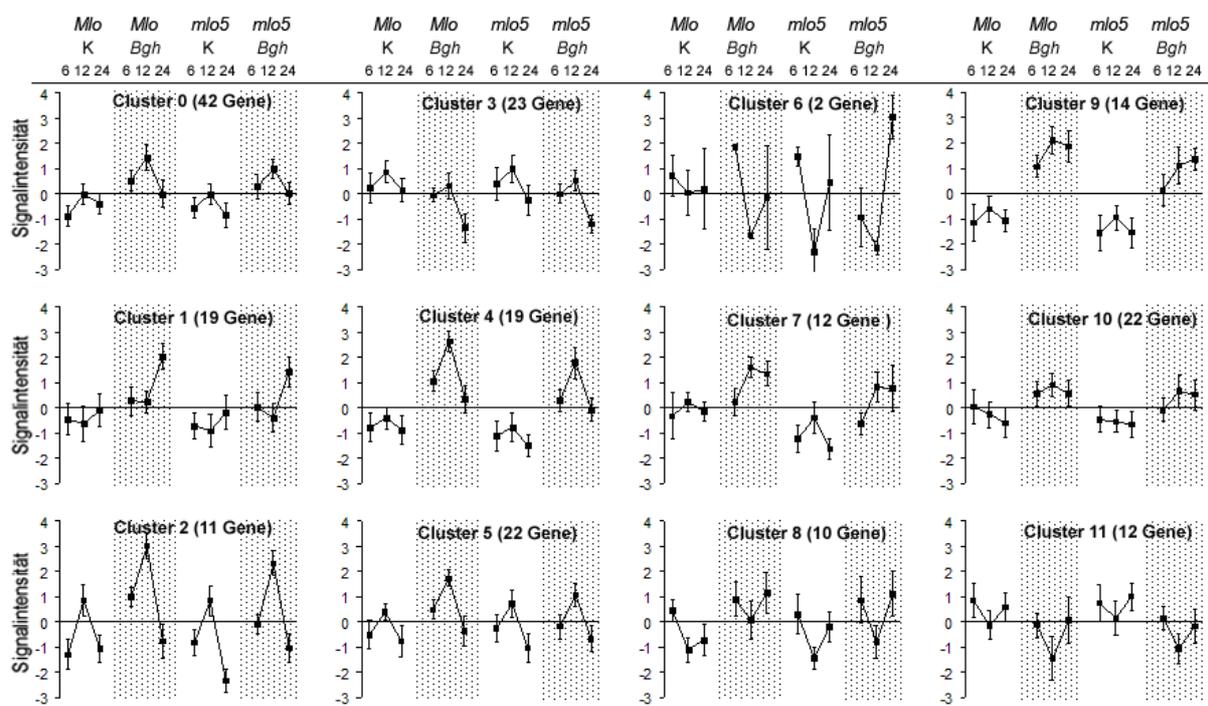
137 pflanzliche Gene konnten aufgrund der Sequenzhomologien in EMBL Plant sowie SwissProt/SwissPir in funktionelle Kategorien eingeteilt werden (Tabelle 3.0). 47 Gene

wurden aufgrund fehlender Sequenzhomologien zu annotierten Genen nicht gruppiert (Tabelle 3.0 „kein Treffer“ und „unbekannt“). Weitere 28 Gene passten in keine der genannten Kategorien (Tabelle 3.0 „Funktion unklar“). Auch pilzliche Gene wurden nicht kategorisiert. Es wird angenommen, dass sich die nicht kategorisierten Gene gleichmäßig auf die einzelnen Kategorien verteilen.

Die größte Gruppe wird von den Genen gebildet, die mit Primärmetabolismus (20%) assoziiert sind, gefolgt von der Kategorie Signalübertragung (18%), Transkription & Translation & Proteolyse (12%), Zellwand (12%), Transport (9%), Sekundärmetabolismus (9%), Aktive Sauerstoffspezies (7%), Membran (4%), Zelltod (4%), Photosynthese (3%) und Sekretion (2%) (Abbildung 3.3).

### 3.2.2.4 Transkriptmusteranalyse der pflanzlichen Kandidatengene

Für die pflanzlichen Gene (207) der Kandidatengenauswahl wurde eine Transkriptmusteranalyse („K-means“-Analyse) mit gen- und arrayzentrierten Signalintensitäten (Kapitel 2.3.4.5) durchgeführt, wobei 12 Cluster zugelassen wurden. Dabei entstanden 9 Cluster, die induzierte Gene (0; 1; 2; 4; 5; 7; 8; 9; 10) und zwei Cluster (3, 11), die reprimierte Gene repräsentieren (Abbildung 3.4).

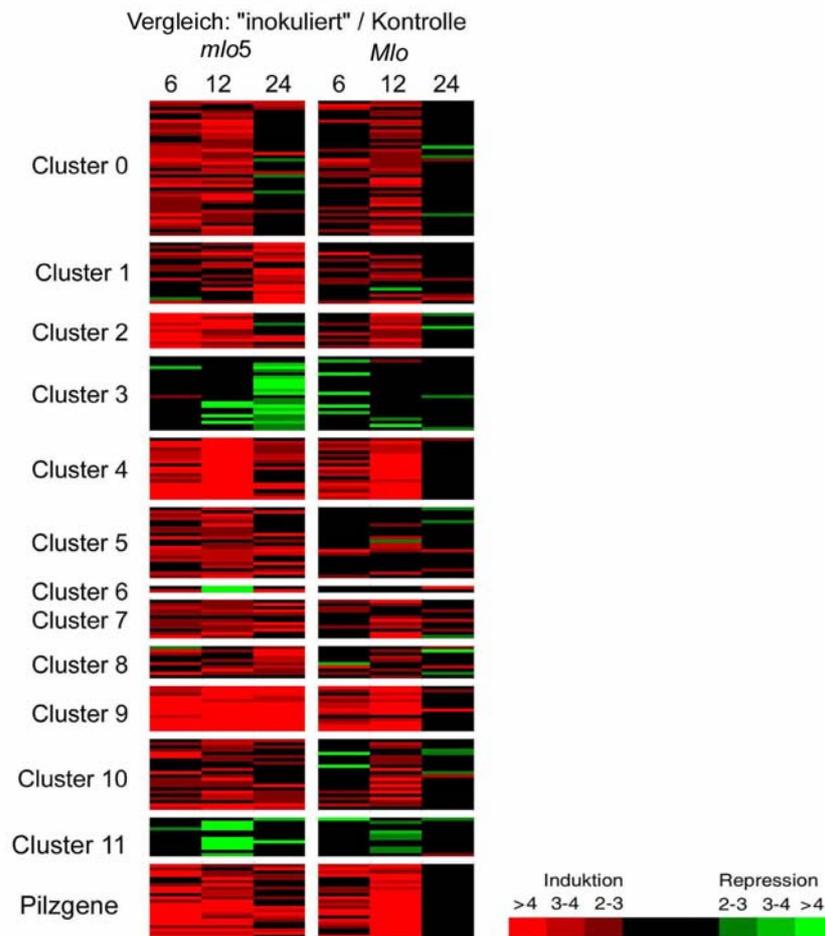


**Abbildung 3.4:** Expressionsmusteranalyse des Kandidatengensets („K-means“-Analyse) mit arrayzentrierten, logarithmierten (Basis zwei) Mittelwerten der Signalintensitäten aus beiden biologischen Replikaten. Insgesamt wurden 207 pflanzliche Gene des Kandidatengensets analysiert. 12 Cluster *co*-regulierter Gene wurden zugelassen. Die Streuungsbalken zeigen die Standardabweichung an. (*Bgh*: mit Sporen von *Bgh*-inokuliert, *K*: Kontrolle, *mlo5*: Pflanzen der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5*; *Mlo*: Pflanzen der isogenen Linie Ingrid *Mlo*)

Die meisten induzierten bzw. reprimierten Gene haben ihr Expressionsmaximum bei 12 hpi. Ein frühes Expressionsmaximum (6 hpi) war in keinem Cluster festzustellen. Spät induzierte Gene mit einem Expressionsmaximum zu 24 hpi sind in Cluster 1 und 9 (*Mlo*) zusammen abgebildet. Innerhalb der einzelnen Cluster bildeten sich für alle vier zu vergleichenden Zustände (*mlo5* und *Mlo* inokuliert; *Mlo* und *mlo5* Kontrolle) fast ausschließlich zeitlich phasengleiche Muster, wobei es sich möglicherweise um eine Überlagerung von pathogenabhängiger

und *circadianer* Regulation handelt. Gene, die ausschließlich zu einem Zeitpunkt hoch- bzw. herunterreguliert waren und in direktem Zusammenhang mit spezifischen Entwicklungsstadien des Pilzes stehen könnten, wurden nicht gefunden.

Funktionelle Zusammenhänge aufgrund der vermuteten Genfunktion und der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Cluster konnten bisher nicht erkannt werden. Beim Betrachten der Induktions- bzw. Repressionsstärken (*Bgh*/Kontrolle) der einzelnen Cluster (Abbildung 3.5) fällt auf, dass die am stärksten induzierten Gene in Cluster 2 (11 Gene), 4 (19 Gene) und 9 (14 Gene) zu finden sind. Gene dieser Cluster, einschließlich des Clusters 0, werden im resistenten Genotyp schneller als im anfälligen Genotyp induziert (6 hpi). Die beiden Cluster der reprimierten Gene haben die stärksten Repressionsfaktoren im resistenten Genotyp. Die Gene in Cluster 3 haben ihr Expressionsminimum zu 24 hpi, die in Cluster 11 zu 12 hpi.

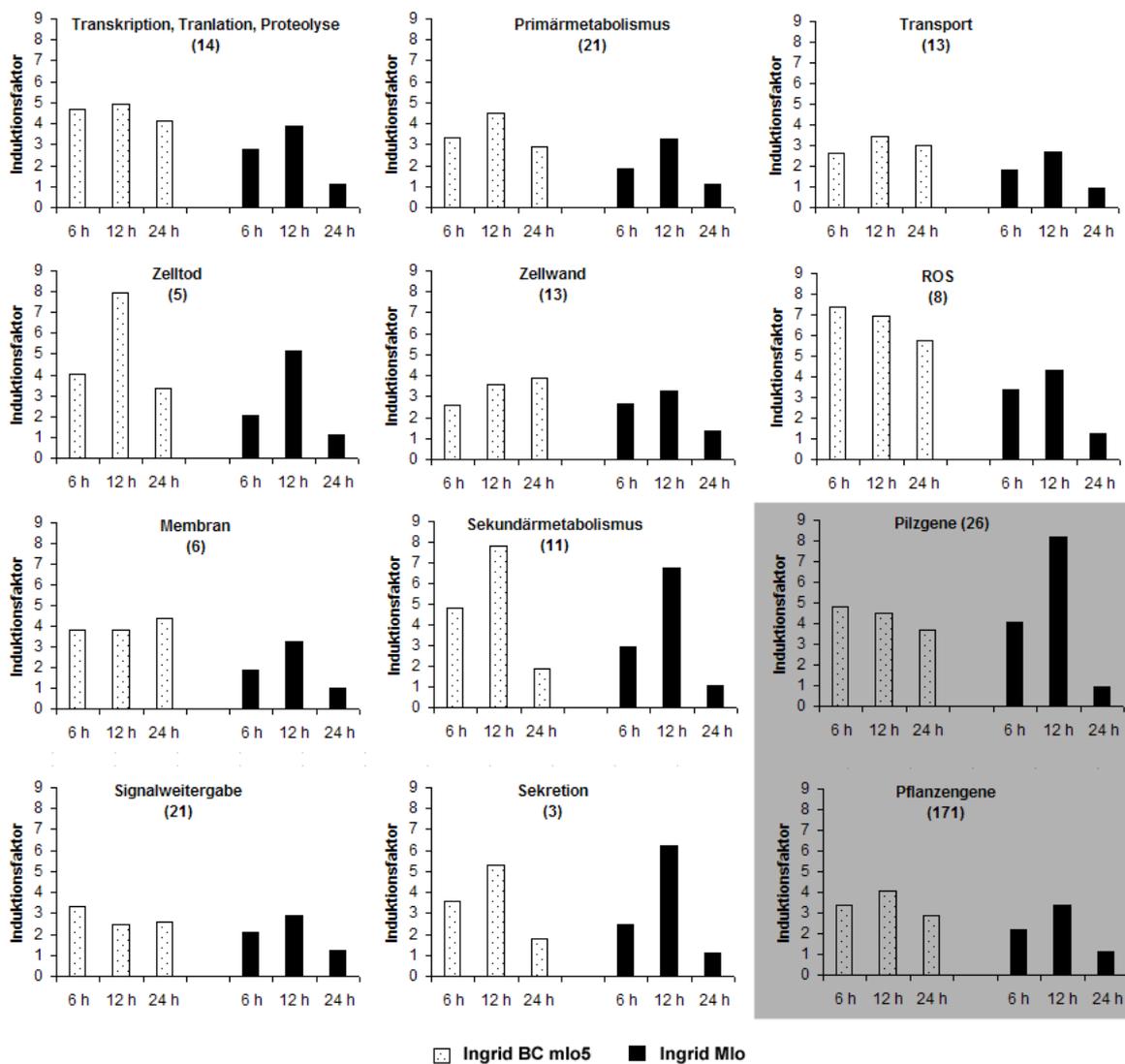


**Abbildung 3.5:** Gene der Kandidatengenauswahl – dargestellt mittels Farbcode. Die Sortierung der Gene erfolgte entsprechend der unter Abbildung 3.4. gezeigten Expressionsmusteranalyse. Dabei wurden 12 Cluster *co*-regulierter Gene gebildet. Zusätzlich wurden alle „regulierten“ pilzlichen Gene dargestellt.

### 3.2.2.5 Regulationsfaktoren innerhalb der funktionellen Kategorien

Für die induzierten Gene jeder funktionellen Kategorie wurden für jeden Zeitpunkt der Untersuchung die Mittelwerte aus den Induktionsfaktoren berechnet, um Korrelationen zwischen Expressionsstärke und funktioneller Kategorie aufzuzeigen. Aufgrund der geringen Anzahl wurden reprimierte Gene nicht berücksichtigt (Abbildung 3.6). Bei dieser Betrachtung fällt zunächst auf, dass Gene vieler Kategorien in Ingrid BC *mlo5* stärker als Gene in Ingrid *Mlo*

induziert sind (siehe hierzu Detektion genotypspezifischer Gene Kapitel 3.2.2.6). Die Gene fast aller Kategorien erreichen ein Expressionsmaximum 12 hpi. Ausnahmen bilden nur Gene der Kategorien Signalweitergabe und ROS, die die höchsten Induktionsfaktoren 6 hpi aufweisen. In der Kategorie ROS wird dieser frühe Effekt von vier Genen, die für HvGLP4 kodieren, verursacht. Bemerkenswert sind die Mittelwerte der Induktionsfaktoren der Kategorie „Pilzgene“ (Abbildung 3.6, Tabelle 3.0). Erwartungsgemäß sind hier ausschließlich „induzierte“ Gene zu finden, da zwischen Blättern ohne und mit *Bgh*-Inokulation verglichen wurde.



**Abbildung 3.6:** Mittlere Induktionsfaktoren pathogeninduzierter Gene der definierten Kategorien. In Klammern steht die Anzahl der Gene einer Kategorie.

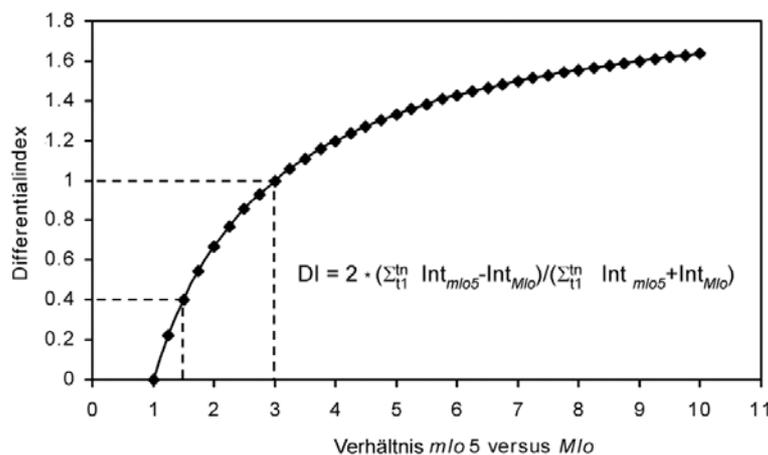
Während die Entwicklung des Pilzes auf den resistenten Pflanzen (Ingrid BC *mlo5*) nach Ausbildung eines sekundären Keimschlauches zum Stillstand kommt, kann sich der Pilz in anfälligen Pflanzen (Ingrid *Mlo*) entwickeln. Vermutlich handelt es sich daher bei den Genen, die auf Ingrid *Mlo* stärker als auf Ingrid BC *mlo5* exprimiert wurden, um entwicklungsbedingt induzierte Gene des Pilzes (Maximum bei 12 hpi) bzw. um Gene die aufgrund der Zunahme an pilzlicher Biomasse induziert erscheinen.

### 3.2.2.6 Detektion genotypspezifisch exprimierter Gene

Eine der wichtigsten Fragestellungen der vorliegenden Arbeit war, ob sich die *mlo*-vermittelte Resistenz im epidermalen Transkriptom der Gerste manifestiert. Mit dem Vergleich der isogenen Linien „Ingrid *Mlo* versus Ingrid BC *mlo5*“ wurde diese Frage angegangen.

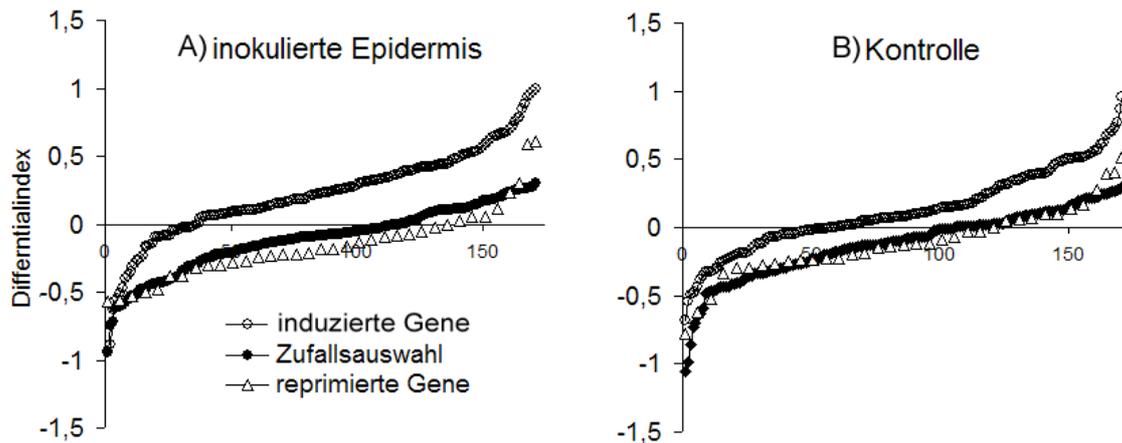
Gene, die nach Inokulation in nur einem Genotyp (Ingrid *Mlo* oder Ingrid BC *mlo5*) induziert bzw. reprimiert waren, wurden nicht gefunden. Die Unterschiede der Genexpression zwischen den isogenen Linien Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo* schienen ausschließlich quantitativer Natur zu sein. In Ingrid BC *mlo5* kam es im Vergleich zu Ingrid *Mlo* zu einer verstärkten Expression von „Abwehrgentranskripten“. Im Gegensatz zum Vergleich zwischen inokulierten und Kontrollpflanzen waren die quantitativen Unterschiede hier aber wesentlich subtiler. Die verstärkte Induktion von Genen in Ingrid BC *mlo5* wurde in beiden biologischen Experimenten gleichermaßen beobachtet und ließ sich nicht auf Unterschiede in den Inokulationsdichten zurückführen. Pflanzen von Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo* wurden immer gleichzeitig inokuliert.

Basis für die hier gemachten Aussagen zu quantitativen Unterschieden zwischen den beiden Genotypen war ein Differentialindex (DI), der sich aus dem Quotienten des Mittelwertes der Signalintensitätsdifferenzen eines Genes zwischen Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo* (6; 12 und 24 hpi) und des Mittelwertes aller sechs Signalintensitäten berechnet. Dieser Index stellt ein empfindliches Maß für die Detektion von Genen dar, die mit Resistenz und Anfälligkeit assoziiert sind (genotypspezifische Expressionsmuster). Der DI wurde sowohl für inokulierte Pflanzen als auch für Kontrollpflanzen für beide biologischen Experimente separat berechnet.  $DI > 0$  bedeutet für induzierte Gene, dass das Gen in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert wurde.  $DI < 0$  bedeutet, dass das Gen stärker in Ingrid *Mlo* exprimiert ist (Abbildung 3.7). Für reprimierte Gene ist es umgekehrt.



**Abbildung 3.7:** Der Differentialindex wurde nach abgebildeter Formel berechnet. Der DI wurde für verschiedene Verhältnisse der Signalintensitäten simuliert.

Bereits bei dem Vergleich der mittleren Induktionsfaktoren der funktionellen Kategorien von Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo* fällt auf, dass diese in der isogenen Linie Ingrid *mlo5* in fast allen Kategorien erhöht sind (Abbildung 3.6). Diese allgemeine Tendenz wurde durch den Vergleich der DI von zufällig ausgewählten Gensets sowie der Kandidatengenauswahl bestätigt. Die DI der pathogeninduzierten Kandidatengene lagen signifikant höher, als die von zufällig ausgewählten Genen (Abbildung 3.8). Der Unterschied wurde in inokulierten Pflanzen (Abbildung 3.8 A) als auch in nichtinokulierten Kontrollpflanzen (Abbildung 3.8 B) sichtbar, wobei inokulierte Pflanzen deutlichere Unterschiede aufwiesen.



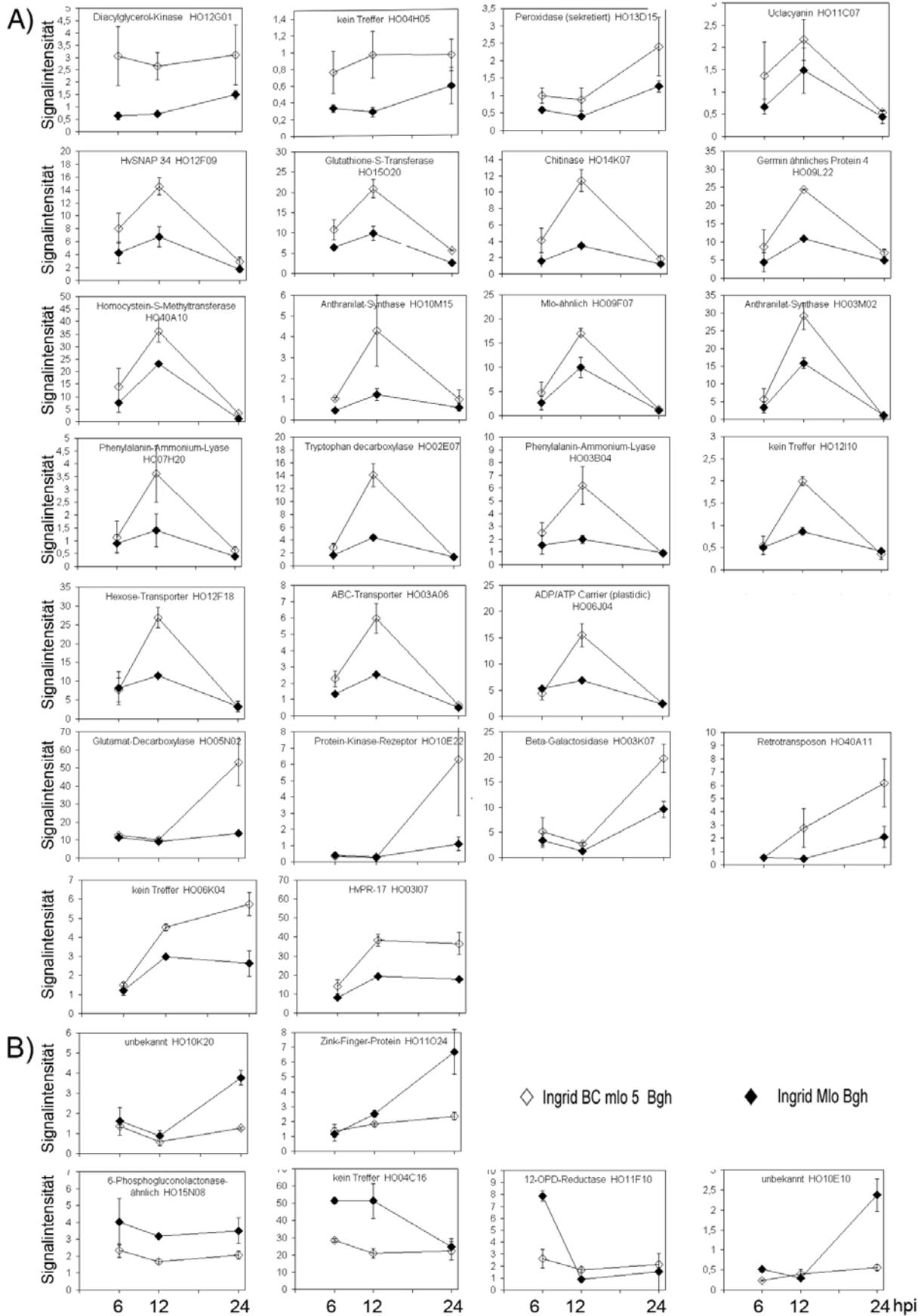
**Abbildung 3.8:** Differentialindices (DI) der induzierten und reprimierten pflanzlichen Kandidatengene im Vergleich zu zufällig ausgewählten Referenzgensets (Mittelwerte aus zwei biologischen Experimenten). Sowohl die inokulierten (A) als auch die nichtinokulierten Versuche (B) wurden miteinander verglichen.

Bei 79% der induzierten Kandidatengene lag der DI über Null, bei 21% lag er unter Null. Für die nichtinokulierten Pflanzen ergab sich ein Verhältnis von 66% zu 34%. Folglich wurden in Ingrid BC *mlo5* Gene der Basalabwehr verstärkt exprimiert. Die Transkriptabundanz wurden durch die Inokulation mit *Bgh* zusätzlich positiv beeinflusst. Pathogenreprimierte Gene in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* hatten im Vergleich zu den zufällig ausgewählten Gensets niedrigere DI. Das heißt, diese Gene waren in Ingrid BC *mlo5* möglicherweise stärker reprimiert. Dieser Effekt war allerdings wesentlich schwächer ausgebildet und ist aufgrund des geringen Stichprobenumfangs schwierig zu interpretieren.

Um Gene mit den größten genotypspezifischen Unterschieden zu detektieren, wurden solche mit  $DI > 0,4$  bzw.  $DI < -0,4$  ausgewählt, die in beiden biologischen Experimenten (inokulierte Pflanzen) reproduzierbar waren. Zusätzlich sollten die Signalintensitäten eines Genotyps in beiden Experimenten mindestens fünf mal höher liegen als im anderen Genotyp. Gene, die diese Kriterien erfüllen wurden als „genotypspezifisch exprimiert“ bezeichnet. Insgesamt wurden mit diesen Kriterien 25 „resistenzassoziierte Gene“ ( $DI > 0,4$ ) und 6 „anfälligkeitsassoziierte Gene“ ( $DI < -0,4$ ) definiert (Abbildung 3.9). Bis auf zwei Gene, waren alle genotypspezifisch exprimierten Gene pathogeninduziert (Klon HO15N08 und Klon HO04C16 waren reprimiert).

Bei den „resistenzassoziierten“ Genen sind die stärksten Unterschiede zwischen den Genotypen 12 hpi zu sehen (Abbildung 3.9 A). Dieser Zeitpunkt korreliert mit dem Durchdringen der Penetrationshyphe durch die Zellwand. Interessanterweise konnten aber auch drei resistenzassoziierte Gene (Diacylglycerolkinase: Klon HO12G01, kein Treffer: Klon HO04H05, Peroxidase: Klon HO13D15) gezeigt werden, die bereits nach 6 hpi und über den gesamten Zeitraum (bis 24 hpi) in Ingrid *mlo5* stärker exprimiert waren. Außerdem waren je drei Gene erst 12 bzw. 24 hpi stärker in Ingrid BC *mlo5* exprimiert. Ein großer Teil der beschriebenen Gene wurde bereits im Zusammenhang mit Pathogenstress diskutiert.

Dagegen wurden nur sechs „anfälligkeitsassoziierte Gene“ gemäß oben stehender Definition gezeigt (Abbildung 3.9 A). Drei der Gene zeigten bereits 6 hpi deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen (6-Phosphogluconolactonase-ähnlich: Klon HO15N08; kein Treffer: Klon HO04C16 und 12-OPD-Reduktase: Klon HO11F10. Die drei anderen wiesen Unterschiede erst 24 hpi auf (2 x unbekannt: Klon HO10E10 und Klon HO10K20; Zink-Finger-Protein: Klon HO11O24). Möglicherweise ist die geringe Anzahl „anfälligkeitsassoziierten“ Genen dem Umstand zu schulden, dass die cDNA-Bank aus der Epidermis der inkompatiblen Gerstenlinie Ingrid BC *mlo5* präpariert wurde.



### 3.2.2.7 Elektronischer *Northern* des Kandidatengensets

Für die Gene des Kandidatengensets wurde ein sogenannter elektronischer *Northern* (Anhang Abbildung 3.0) erstellt, um die Verteilung und Abundanz der ESTs im Vergleich zu 16 weiteren EST-Kollektionen der EST-Datenbank des IPK darzustellen. Für diese Analyse wurden 135.031 ESTs mit der Clusteranalysesoftware StackPack 2.1 geclustert und ausgewertet (Kapitel 3.1.3). Es wurden ausschließlich cDNA-Banken mit mehr als 3.000 ESTs für die Analyse verwendet. Die EST-Abundanzen der Banken wurden nach den Formeln (1) und (2) normalisiert, um die absoluten Zahlen der ESTs in den einzelnen Banken zu relativieren. Für jede EST-Bank wurde zunächst ein Normalisierungsfaktor ( $NF_{BankX}$ ) errechnet (1), der sich aus der Anzahl der HW-ESTs (Referenz) dividiert durch die Anzahl der ESTs der jeweiligen Bank ( $n_{BankX}$ ) errechnet. Anschließend wurde die Anzahl der ESTs eines Clusters ( $n_{ClusterX}$ ) in einen normalisierten Expressionswert ( $EW_{ClusterX}$ ) umgerechnet (2). Dazu wurde der Normalisierungsfaktor von der jeweiligen Bank durch die Anzahl ESTs des jeweiligen Clusters dividiert. Der EW-Wert wurde im elektronischen *Northern* für jedes Gen dargestellt.

$$NF_{BankX} = \frac{n_{HW-ESTs}}{n_{BankX}} \quad (1)$$

$$EW_{ClusterX} = \frac{NF_{BankX}}{n_{ClusterX}} \quad (2)$$

Insgesamt wurden innerhalb des Kandidatengensets (233 Gene) 105 Sequenzen (67 Singletons und 38 Cluster) ausschließlich in der HO-cDNA-Bank gefunden. Alle anderen ESTs befanden sich in gemischten Clustern mit ESTs von mindestens einer anderen cDNA-Bank. Von den 105 HO-spezifischen Genen waren 25 pilzlichen Ursprungs. Erwartungsgemäß waren bis auf eine Ausnahme alle pilzlichen Gene HO-spezifisch. Die Ausnahme bildete ein hochkonserviertes Gen, welches für 26S-rRNA (Klon HO08B23) kodiert. 38,6% (80 Gene) der pflanzlichen Kandidatengene waren demnach HO-spezifisch (51 Singletons und 30 Contigs) (Abbildung 3.0). Dies sind Gene, die möglicherweise aufgrund der Anreicherung von epidermalen Genen in der cDNA-Bank zum ersten Mal beschrieben wurden. Im Vergleich der funktionellen Kategorien ist die hohe Zahl an HO-spezifischen Singletons bzw. Clustern in den Kategorien „kein Treffer“, „Aktive Sauerstoffspezies“, „Membran“ und „Signalübertragung“ auffällig. In den Kategorien, in denen grundlegende Funktionen der Zelle repräsentiert sind („Primärmetabolismus“ und „Transkription & Translation & Proteolyse“), sind zahlreiche homologe ESTs in den EST-Banken anderer Gewebe zu finden. Gene, die in nahezu allen cDNA-Banken gefunden wurden, kodieren für eine Adenosylhomocysteinase (Klon HO11O07), für eine  $\beta$ -Kette einer ATP-Synthase (Klon HO13A03) und zwei ribosomale Proteine (Klone HO05K04, HO07B06). Eines dieser Proteine (Klon HO07B06) gehört zur Familie der QM-Proteine, die eine Rolle bei der Tumorsuppression spielen (Lillico *et al.* 2002).

Durch einen Fehler im StackPack-Clustering-Prozess wiesen zwei ESTs (Klon HO09I07: ADP/ATP-Carrier; Klon HO13G09: ANT-Gen) im elektronischen *Northern* eine identische Anzahl von homologen ESTs in den einzelnen cDNA-Banken auf. Dieser Fehler wurde nicht weiter analysiert.

Da in den elektronischen *Northern* eine limitierte Anzahl von ESTs eingeht und einzelne EST-Banken schwer vergleichbar erscheinen (unterschiedliche Genotypen, unterschiedliche Anzucht etc), hat die Darstellung des elektronischen *Northern* nur begrenzten Wert, gibt aber

dennoch Aussagen zu mRNA-Abundanzen einzelner Gene in bestimmten Geweben und wird mit zunehmender Anzahl von neu sequenzierten ESTs und cDNA-Banken immer präziser und empfindlicher.

### 3.2.3 Lokalisierung der Genexpression

Histologisch betrachtet ist das Wachstum von *Bgh* auf die Sprosseepidermis der Gerste beschränkt. Daher ist zu vermuten, dass sich die entscheidenden pathogeninduzierten Veränderungen bei der pflanzlichen Abwehr in der Epidermis ausbilden bzw. bestimmte Gene ausschließlich in der Epidermis exprimiert werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Transkriptomanalyse mit Epidermismaterial durchgeführt und die cDNA-Bank ebenfalls aus Epidermismaterial präpariert. Dennoch repräsentiert die cDNA-Bank auch Gene, die im Mesophyll exprimiert werden. Ursachen dafür könnten sein: 1) eine vermutlich große Anzahl von Genen, die in beiden Geweben exprimiert werden, 2) Gene, die in chloroplastenhaltigen Schließzellen exprimiert werden und 3) Mesophyllreste, die bei der Präparation der Epidermis an dieser haften blieben (Abbildung 2.1.).

Um die mRNA-Konzentration eines Gens in der Epidermis mit der in tiefer liegenden Schichten des Blattes zu vergleichen, wurden Arrays mit Sonden aus abgezogener Epidermis und der übriggebliebenen „Restblatt“-Fraktion von inokulierten Blättern hybridisiert. Insgesamt wurden drei Versuche mit dem gleichem biologischen Material (Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5*; 6 und 24 hpi mit *Bgh*; Verhältnis 1:1:1:1; unabhängige Sonden-Präparationen) durchgeführt. Bei der Hybridisierung wurden nahezu identische Mengen an radioaktiv markierter Sonde eingesetzt.

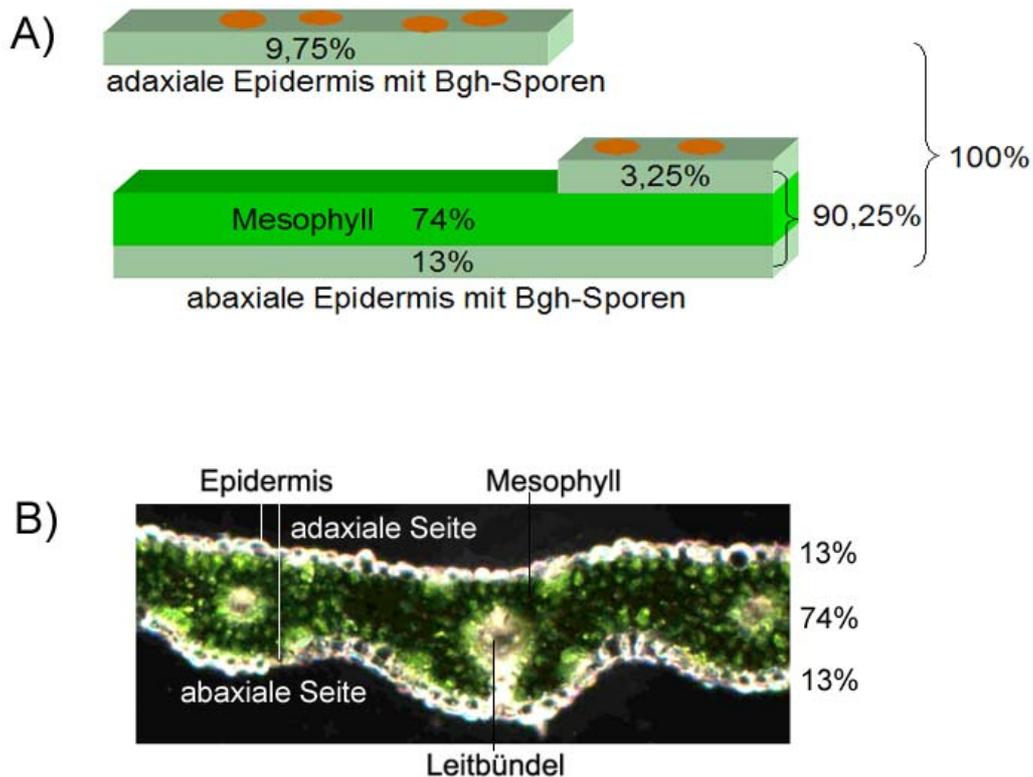
Aus dem Verhältnis der normalisierten Signalintensitäten von Epidermis zu „Restblatt“ ergab sich für jedes Unigen ein Wert, der als EM-Wert (Epidermis-Mesophyll-Wert) bezeichnet wurde. Der EM-Wert wurde, wenn nicht anders beschrieben, zur Basis zwei logarithmiert dargestellt und gibt Auskunft über die relative mRNA-Konzentration eines Gens in der Epidermis im Vergleich zu den nichtepidermalen Schichten des Blattes. Da es sich bei den nichtepidermalen Schichten hauptsächlich um Mesophyll handelt, werden diese vereinfacht als Mesophyllgewebe bezeichnet. Je extremer der EM-Wert ist, um so höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Transkripte ausschließlich in der Epidermis ( $EM > 0$ ) bzw. im Mesophyll ( $EM < 0$ ) exprimiert werden.

#### 3.2.3.1 Theoretischer EM-Wert

Theoretisch sollte der EM-Wert für Gene, die ausschließlich in der Epidermis exprimiert werden ( $EM_{Gerste}$ ) bei schätzungsweise 22,2 ( $\log_2=4,47$ ) liegen. mRNAs, die ausschließlich in der Epidermis exprimiert werden, würden demzufolge in der Epidermisfraktion um den Faktor 22,2 aufkonzentriert. mRNAs von pilzlichen Genen, die zusammen mit der Epidermisfraktion angereichert werden, sollten um einen Faktor 5,5 ( $EM_{Bgh}$ ) ( $\log_2=2,47$ ) in der epidermalen RNA-Präparation aufkonzentriert werden (Formel 1 und 2).

Berechnet wurden diese Werte aus den Gewichtsverhältnissen von abgezogener adaxialer Epidermis (9,75%) und dem restlichen Blatt (90,25%) unter der Annahme, dass sich Mesophyll, adaxiale und abaxiale Epidermis in der Dichte nicht unterscheiden, die Konidienanzahl auf beiden Seiten vergleichbar ist und das 25% der adaxialen Epidermis nicht abgezogen wurde (Abbildung 3.10 A).

Für pflanzliche mRNAs ist weiterhin zu beachten, dass Mesophyllzellen aufgrund des etwa vierfach geringeren Zellvolumens eine geringere mRNA-Konzentration als Epidermiszellen aufweisen. Daher wurde in Formel (2) ein Korrekturfaktor von vier in die Berechnung einbezogen. Im Gegensatz dazu sollten Gene, die ausschließlich im Mesophyll exprimiert werden, einen EM-Wert nahe Null aufweisen (nicht logarithmiert).



**Abbildung 3.10** **A:** Längsschnitt durch ein Gerstenblatt (schematisch). Das Gewichtsverhältnis von abgezogener Epidermis zum restlichen Blatt betrug 9,75:90,25. **B:** Querschnitt eines sieben Tage alten Gerstenblattes. Die Epidermis hat einen geschätzten Gewichtsanteil von ca. 26%. ( $E_{ad}$ : adaxiale Epidermis;  $E_{ab}$  abaxiale Epidermis; M: Mesophyll)

$$EM_{Bgh} = \frac{1}{16,25/90,25} = 5,55 \quad (1)$$

$$\log_2 EM_{Bgh} = 2,47$$

$$EM_{Gerste} = EM_{Bgh} * 4 = 22,22 \quad (2)$$

$$\log_2 EM_{Gerstekorr} = 4,47$$

### 3.2.3.2 Biologische und methodische Bestätigung der EM-Werte

Um die aus den Signalintensitäten berechneten EM-Werte zu bestätigen, wurden die EM-Werte von nachweislich gewebespezifisch sowie konstitutiv exprimierten Kandidatengenen analysiert (Tabelle 3.6). Als mesophyllspezifische Gene wurden chlorophyllbindende Proteine und Rubisco postuliert. Als konstitutiv exprimierte Gene gelten Actin, Ubiquitin-konjugierendes Enzym und die cytoplasmatische Isoform von GAP-DH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase).

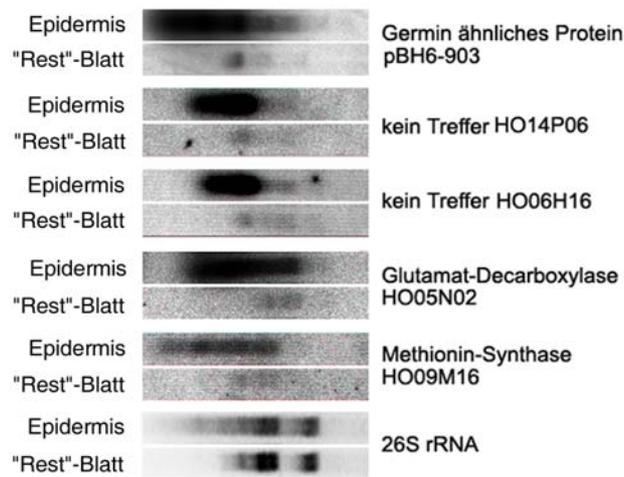
Ein epidermal exprimiertes Kandidatengenset ergab sich aus experimentellen Untersuchungen (Abbildung 3.11). Dazu wurden in *Northern-Blots* RNA-Proben aus Epidermis und

„Restblatt“, mit Sonden von vermeintlich epidermisspezifisch exprimierten Kandidatengen (laut Arrayanalyse) hybridisiert. Zusätzlich ist ein Kandidatengenset mit allen pilzlichen ESTs dargestellt, die gleichzeitig den Kriterien für pathogeninduzierte Gene entsprachen. In allen Kandidatengensets sind ausschließlich Unigene dargestellt.

**Tabelle 3.6:** Kandidatengensets für epidermis-, mesophyllspezifische sowie konstitutiv exprimierte Referenzgene. Außerdem wurden alle vermeintlichen pathogeninduzierten Pilzgene dargestellt. (EM: Mittelwert aus drei Versuchen, logarithmiert zur Basis 2, \*für die Bildung des Mittelwertes wurden die Werte entlogarithmiert, anschließend wieder logarithmiert)

ID	Acc. Nr.	Annotation	E-Wert	EM
<b><i>mesophyllspezifisch exprimierte Gene</i></b>				
HO05I10	CD058207	Chlorophyll bindendes Protein	0E+00	-4,7
HO10E04	CD055789	Chlorophyll b Synthase	1E-138	-4,3
HO12D09	CD056429	Chlorophyll a/b bindendes Protein	0E+00	-2,9
HO09G06	CD055489	Chlorophyll a/b bindendes Protein	0E+00	-4,5
HO01D10	CD054520	Chlorophyll a/b bindendes Protein	1E-159	-3,8
HO12M12	CD056617	Chlorophyll a/b bindendes Protein	7E-94	-2,9
HO07B11	CD054703	Rubisco	0E+00	-1,7
HO03B17	CD053889	Rubisco-Activase	0E+00	-4,9
HO04E03	CD053535	Rubisco	0E+00	-3,7
HO15I09	CD057569	RcaA2	0E+00	-6,5
		Mittelwert des Referenzgens*		-3,48
<b><i>konstitutiv exprimierte Gene</i></b>				
HO014E17	CD054057	GAP-DH	5E-70	-2,5
HO05G13	CD058277	GAP-DH	3E-25	-1,1
HO15A21	CD057409	GAP-DH	1E-99	-1,2
HO05C15	CD058359	Ubiquitin konjugierendes Enzym	6E-82	-0,3
HO07B13	CD054705	Ubiquitin konjugierendes Enzym	4E-76	-0,4
HO15A02	CD057395	Ubiquitin konjugierendes Enzym	2E-87	-0,8
HO14B22	CD057086	Ubiquitin konjugierendes Enzym	2E-83	-1,2
HO08O20	CD055328	Ubiquitin konjugierendes Enzym	7E-57	-1,3
HO07E05	CD054760	Ubiquitin konjugierendes Enzym	3E-81	-1,7
HO15F08	CD057503	Ubiquitin konjugierendes Enzym	1E-80	-2,3
HO06O01	CD054663	Actin	1E-65	1,7
HO10F24	CD055831	Actin	9E-70	0,3
HO10H11	CD055862	Actin	1E-59	-0,7
HO08O02	CD055312	Actin	1E-15	-1,3
HO01C14	CD054535	Actin	2E-40	-2,2
		Mittelwert des Referenzgens*		-0,54
<b><i>Epidermis-Markergene aus Northern-Blots</i></b>				
HO15E16	CD057490	HvGLP4	1E-155	3,7
HO09M16	CD055634	Methionin -Synthase	1E-117	0,5
HO14P06	CD057376	kein Treffer		1,3
HO05N02	CD058128	Glutamat-Decarboxylase	1E-125	-0,1
HO03H16	CD053787	kein Treffer		2,7
		Mittelwert des Referenzgens*		2,31
<b><i>pilzliche Gene</i></b>				
HO14N21	CD057347	HSP 70	1,E-78	1,7
HO08J20	CD055129	Retrotransposon	1,E-170	3,1
HO05G22	CD058283	14-3-3-Protein	3,E-54	2,2
HO16M07	CD057785	14-3-3-Protein	9,E-92	2,4

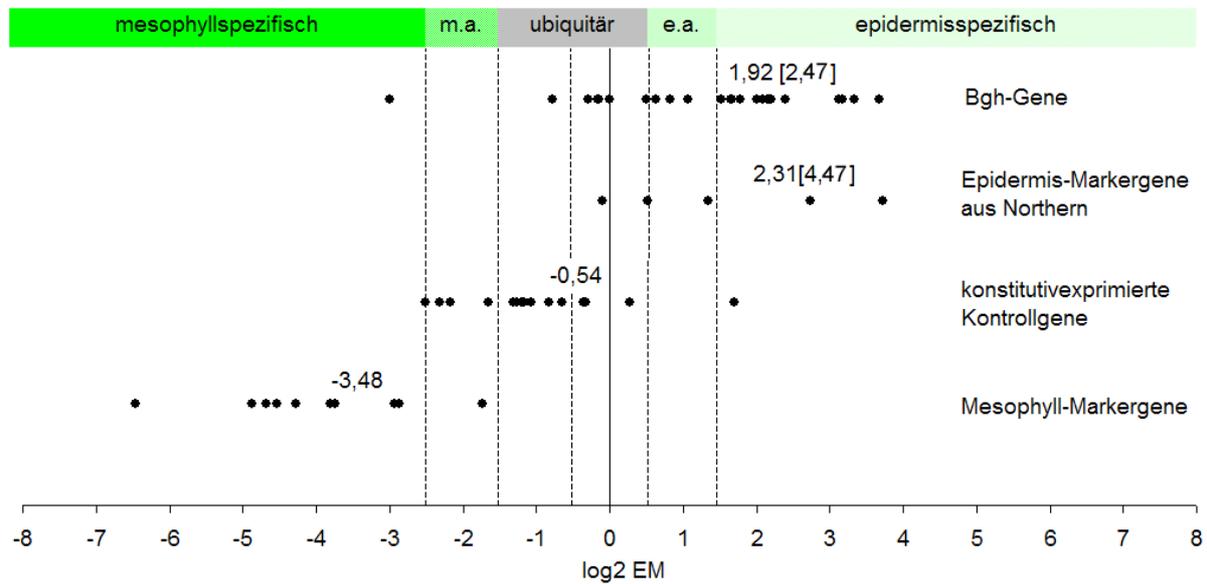
HO08B23	CD055171	18S ribosomale RNA	1,E-159	1,1
HO03N20	CD053635	Chitinase	0,E+00	1,6
HO07O11	CD054986	Elongationsfactor 1- $\alpha$	1,E-104	2,2
HO08J10	CD055120	GAP-Dehydrogenase	1,E-176	2,0
HO04A02	CD053626	kein Treffer		3,2
HO09I03	CD055533	Serin-Carboxypeptidase	7,E-84	2,2
HO11C09	CD056086	Tetraspanin	9,0E-34	0,8
HO09E08	CD055449	Ras-Transkriptionsfaktor	5,E-77	1,8
HO04A11	CD053606	unbekannt	5,0E-44	1,5
HO06N16	CD054656	unbekannt	2,E-69	3,7
HO01C21	CD054508	unbekannt	1,E-127	3,3
HO08O06	CD055316	unbekannt	0,E+00	2,2
HO16O01	CD057794	unbekannt	1,E-159	2,1
HO05D13	CD058315	unbekannt	2,E-142	-0,3
HO10M16	CD055978	kein Treffer		0,0
HO05L15	CD058180	kein Treffer		0,6
HO15J13	CD057592	$\beta$ -1,3-Glucanosyltransferase	2,0E-51	0,5
HO04M11	CD053367	unbekannt	2,E-88	-0,2
HO02A18	CD054260	unbekannt	1,E-120	-0,1
HO14D22	CD057130	Ribonucleoprotein	3,E-32	-3,0
HO08B21	CD055169	unbekannt	0,E+00	-0,8
HO02B19	CD054201	unbekannt	1,E-120	1,2
		Mittelwert des Referenzgens*		1,92



**Abbildung 3.11:** Kandidaten epidermisspezifisch exprimierter Gene. *Northern-Blot* mit RNA aus Epidermis bzw. „Restblatt“. (Ingrid BC *mlo5* und Ingrid 1:1; 24 hpi)

Entsprechend den Erwartungen bestätigten die EM-Werte der Referenzgensets weitgehend die aus den Signalintensitäten berechneten EM-Werte. Die aus den *Northern-Blots* resultierenden, epidermalen Markergene und die pilzlichen Gene wiesen hohe EM-Werte auf (Mittelwert EM=1,92 bzw. 2,31). Mesophyll-Markergene zeichneten sich durch niedrige EM-Werte aus (Mittelwert EM=-3,48). Auch der Vergleich der theoretischen EM-Werte mit den Mittelwerten der Kandidatengensets für *Bgh*-Gene (EM=1,92 bzw. 2,47) und epidermale Gene (EM=2,31 bzw. 4,47) bestätigte die Erwartungen, wobei die theoretischen Werte allerdings höher lagen (Abbildung 3.12, theoretische Werte in eckigen Klammern). Der mittlere EM-Wert des konstitutiv exprimierten Kandidatengensets lag mit 0,54 in der Mitte dieses Spektrums, aber nicht bei Null. Daher wurden alle EM-Werte um 0,54 nach oben korrigiert (Abbildung 3.12).

Gene mit einem korrigierten EM-Wert im Bereich  $-1 < EM < 1$  wurden als ubiquitär (in beiden Geweben) exprimiert betrachtet. Liegt der korrigierte EM-Wert im Bereich  $1 < EM < 2$ , wurden die Gene als epidermisangereichert bezeichnet. Entsprechend sind Gene mit einem EM-Wert im Bereich  $-2 < EM < -1$  im Mesophyll angereichert. Gene mit extremeren EM-Werten werden als epidermisspezifisch ( $EM > 2$ ) bzw. mesophyllspezifisch ( $EM < -2$ ) angenommen.



**Abbildung 3.12:** Gewebespezifische Referenzgensets (IDs und Werte siehe Tabelle 3.6). Die Punkte sind die mittleren logarithmierten Verhältnisse der Signalintensitäten von Epidermis und “Restblatt“ (EM-Werte) aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Über den Punkteverteilungen sind die Mittelwerte des jeweiligen Referenzgensets dargestellt. In eckigen Klammern sind die theoretisch ermittelten EM-Werte angegeben. (m.a.: mesophyllangereichert, e.a.: epidermisangereichert)

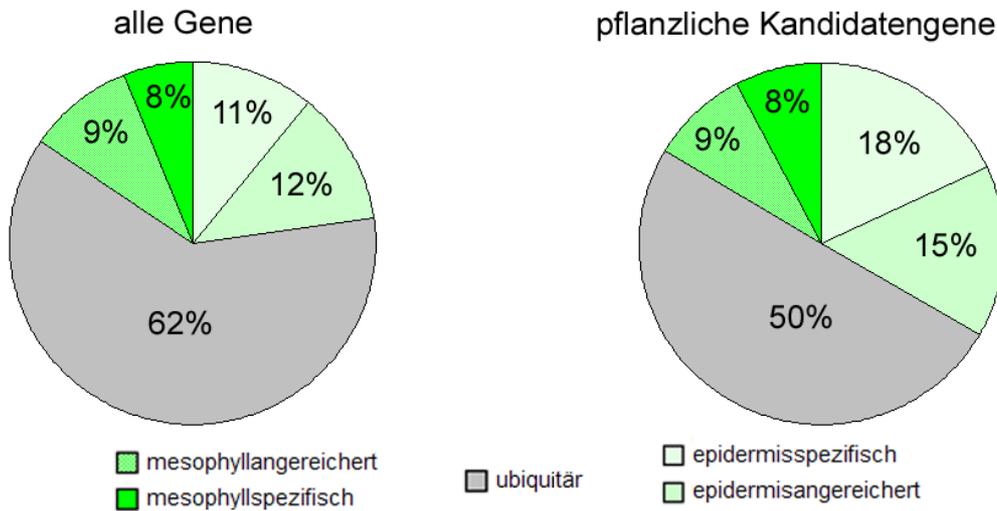
### 3.2.3.3 Gewebespezifische Genexpression im Blatt

Insgesamt konnte bei Einhaltung des folgenden Qualitätskriteriums für 2.676 von 3.136 Genen abgeschätzt werden, in welchem Gewebe diese Gene exprimiert werden. Dabei sollte das Verhältnis von Signalintensität zu lokalem Hintergrund bei wenigstens einem der drei Experimente über 2,5 liegen. Die EM-Werte für alle Gene sind unter [http://pgrc.ipk-gatersleben.de/epidermis\\_mlo](http://pgrc.ipk-gatersleben.de/epidermis_mlo)) zu finden.

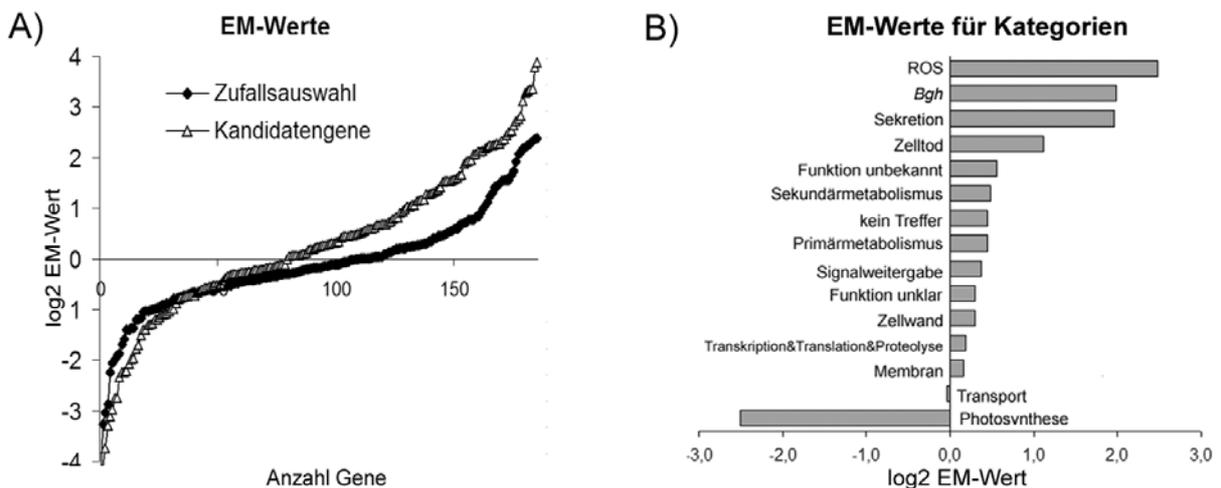
62% der Gene waren laut ihrem EM-Wert in beiden Geweben nahezu gleich stark (ubiquitär) exprimiert (Abbildung 3.12). 9% der Gene waren mesophyllangereichert, 8% mesophyllspezifisch, 12% epidermisangereichert und 11% epidermisspezifisch exprimiert. Demnach weisen das Transkriptom von Epidermis und Mesophyll einen sehr hohen Überlappungsgrad auf. Nur wenige Gene sind spezifisch in der Epidermis (290 Gene) oder im Mesophyll exprimiert (164 Gene) (Abbildung 3.13).

Bei Betrachtung der EM-Werte für die pflanzlichen Kandidatengene fällt auf, dass diese, verglichen mit einer zufälligen Auswahl von Genen (Abbildung 3.14 A) bzw. allen analysierten Genen (Abbildung 3.13), insgesamt stärker in der Epidermis exprimiert wurden. Während von den pflanzlichen Kandidatengenen 18% epidermisspezifisch exprimiert wurden, waren es bei allen analysierten Genen nur 11% ( $EM > 2$ ). Hierbei ist zu beachten das mit 11% die Anzahl epidermisspezifischer Gene noch überschätzt wird, da in dieser Auswahl die pilzlichen Gene enthalten sind.

Die Transkripte von Genen der Superkategorien ROS, *Bgh*, Sekretion und Zelltod waren am stärksten in der Epidermis angereichert bzw. wiesen die meisten epidermisspezifisch exprimierten Gene auf. Die Kategorie Photosynthese wies dagegen erwartungsgemäß die geringsten EM-Werte auf (Abbildung 3.14 B).



**Abbildung 3.13:** Lokalisierung der Expression der pflanzlichen Kandidatengene im Vergleich zu allen 2.676 analysierten Genen.



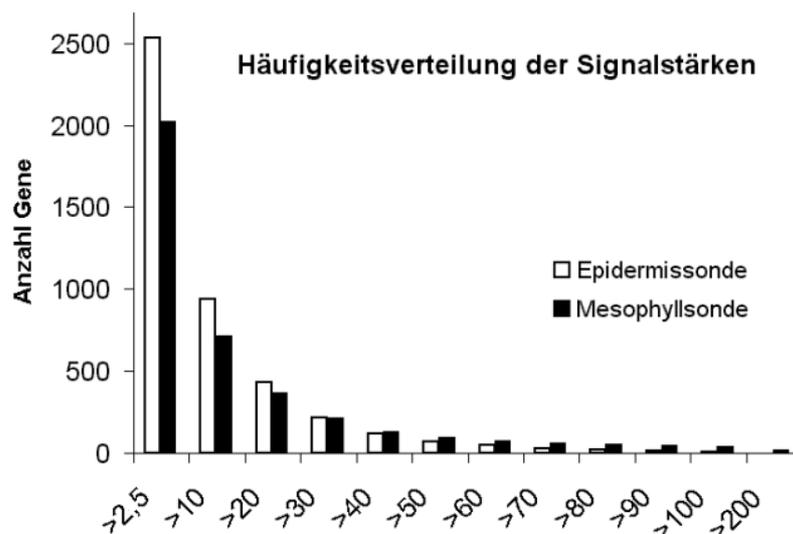
**Abbildung 3.14 A:** EM-Werte von 193 pflanzlichen Kandidatengenen. EM>0 bedeutet stärkere Genexpression in der Epidermis, EM<0 bedeutet stärkere Genexpression im Mesophyll. **B:** Mittlere EM-Werte für funktionelle Kategorien des Kandidatengensets.

### 3.2.3.4 Epidermissonden contra Mesophyllsonden

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Vergleich nicht normalisierter Signalintensitäten von Membranen, die mit Epidermis- und Mesophyllsonden sehr ähnlicher spezifischer Aktivität hybridisiert wurden. Dies gibt Auskunft darüber inwiefern die Sonden, die aus Epidermis

präpariert wurden, mit epidermisspezifisch exprimierten Genen angereichert wurden, die mit „Gesamtblatt“-Sonden möglicherweise nicht nachweisbar wären. Außerdem sind Rückschlüsse auf die Anreicherung der cDNA-Bank mit epidermisspezifisch exprimierten Genen möglich, da die cDNA-Bank wie bereits beschrieben ebenfalls aus Epidermismaterial präpariert wurde.

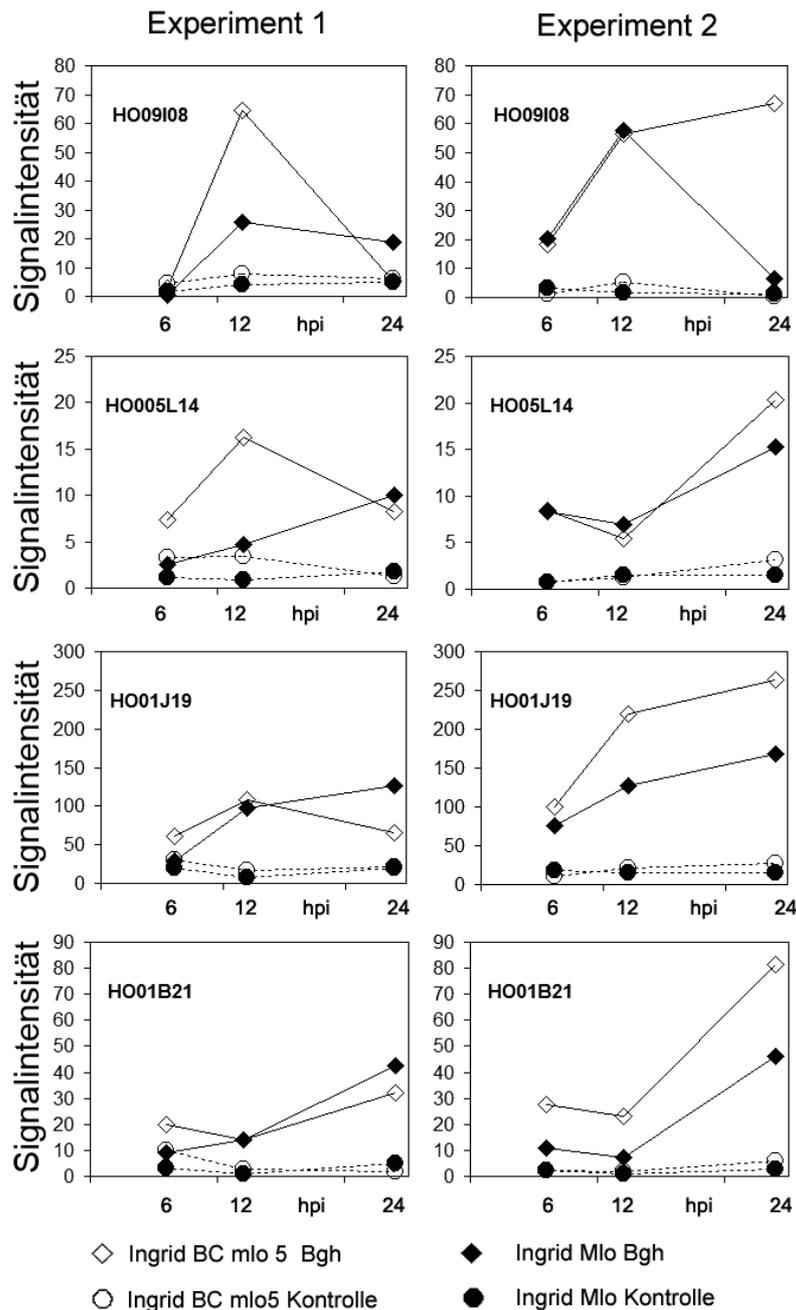
Mit den Epidermissonden konnten im Vergleich zu den Mesophyllsonden wesentlich mehr Gene nachgewiesen werden. Während auf den Membranen, die mit Mesophyllsonden hybridisiert wurden, einzelne starke *Spots* sichtbar waren, entstand mit den Epidermissonden ein wesentlich komplexeres Muster. In Abbildung 3.15 ist die Häufigkeitsverteilung der Signalstärken dargestellt, die nach Hybridisierung der Membranen mit Epidermis- bzw. Mesophyllsonden gemessen wurden. In den unteren Signalintensitätsbereichen (>2,5 bis 40) konnten durch die Hybridisierung mit Epidermissonden mehr Gene nachgewiesen werden. Die stärksten Signalintensitäten (>50 bis 200) wurden jedoch mit Mesophyllsonden gemessen. Hierbei handelt es sich beispielsweise um hochabundante Rubisco-Transkripte, die mesophyllspezifisch akkumulieren. Bei Betrachtung eines Vergleichspaares von Membranen, die mit Epidermis- (Membran 3) bzw. Mesophyllsonden (Membran 5) hybridisiert wurden, ergibt sich folgendes Bild: mit Epidermissonden waren 121 Gene und mit Mesophyllsonden 994 Gene nicht nachweisbar, die mit der jeweils anderen Sonde nachweisbar gewesen wären. Als nachweisbar gelten Signalintensitäten >2,5.



**Abbildung 3.15:** Häufigkeitsverteilung der nicht normalisierten Signalstärken von Epidermis/Mesophyll-Vergleichspaares (gemittelte Werte aus drei Versuchen).

### 3.2.4 Qualität der hergestellten Arraymembranen

Die in den hier beschriebenen Arrayexperimenten ermittelten Genexpressionsmuster konnten in unabhängigen biologischen Experimenten (siehe auch Kapitel „Northern-Blots“ 3.2.5) und unabhängig vom verwendeten cDNA-Klon eines Gens bestätigt werden. Dies ist hier exemplarisch anhand des HvGLP4-Gens gezeigt, von welchem vier verschiedene Klone (HO09I08, HO05L14, HO01J19, HO01B21) auf die Membran gespottet wurden. Alle ESTs der Klone gehören zu einem Contig der StackPack-Sequenzclusteranalyse (Abbildung 3.16).

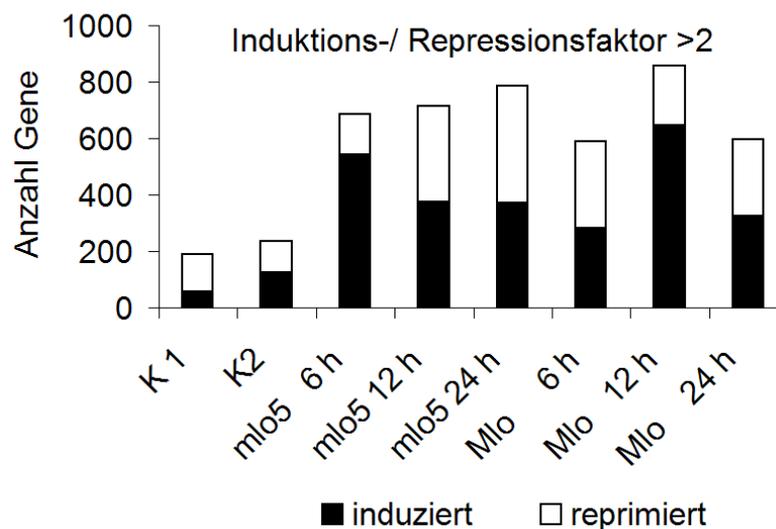


**Abbildung 3.16:** Biologische und technische Reproduzierbarkeit der Arrayexperimente: Normalisierte Signalintensitäten von Klonen unterschiedlicher Länge. Alle abgeleiteten ESTs gehören zu einem Primärcontig (cn19, StackPack-Analyse 5.163) und kodieren für HvGLP4. Die Membranen wurden mit Sonden aus Epidermis hybridisiert (6, 12 und 24 hpi).

Die Hybridisierungssignale aller Klone dieses Gens ergaben ein ähnliches, wenn auch nicht vollkommen identisches Expressionsmuster. Der Klon HO01J19 zeigte in beiden Experimenten die höchsten Signalintensitäten, was möglicherweise aus unterschiedlichen DNA-Konzentrationen der gespotteten DNA-Fragmente resultiert. Unterschiedliche Expressionsmuster der einzelnen Klone sind möglicherweise durch die unterschiedlichen Längen der verwendeten cDNA-Fragmente zu erklären, da die Sonden umso genspezifischer werden, je mehr diese im 3'-Bereich des Gens liegen. Für vier Mitglieder der HvGLP4-Genfamilie konnte dies kürzlich mit *Northern-Blots* gezeigt werden. Mit genspezifischen Sonden aus dem 3'-Bereich ließen sich diese klar unterscheiden. Lagen die Sonden im

5'-Bereich, wurden alle vier Gene erfasst (persönliche Mitteilung Zimmermann, IPK Gatersleben).

Um die Variabilität der einzelnen Membranen zu untersuchen, wurden zwei Testhybridisierungen (K1 und K2) durchgeführt und mit einem exemplarisch ausgewählten Experiment verglichen (Abbildung 3.17). Für Testhybridisierung K1 wurden zwei Membranen im identischen Hybridisierungsmix hybridisiert. Um zusätzlich die Variabilität der Sondenpräparationen zu untersuchen, wurden bei K2 zwei cDNA-Sonden vom gleichen biologischen Material hergestellt und separat mit zwei verschiedenen Membranen hybridisiert. In Experiment K1 erscheinen 8,2% und in Experiment K2 10,3% der ausgewerteten Gene fälschlicherweise induziert bzw. reprimiert. Im Vergleichsexperiment (Experiment 2) erschienen dagegen 25,6% bis 37,2% der Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten entweder pathogeninduziert oder -reprimiert. Aufgrund dieser Fehlerquote wurden ausschließlich Gene in das Kandidatengenset aufgenommen, die in beiden biologischen Experimenten reproduzierbare Ergebnisse zeigten. (siehe auch Kontrollexperimente mit *Northern-Blots* 3.2.5)



**Abbildung 3.17:** Anzahl „pathogenregulierter Gene“ im biologischen Experiment 2 im Vergleich zu zwei Kontrollversuchen (K1; K2). K1 und K2 zeigen die Anzahl der Gene, die aufgrund der methodischen Variabilität in den Kontrollversuchen als reguliert betrachtet werden. K1: beide Membranen wurden im identischen Hybridisierungsmix hybridisiert (Sonde: *Bgh*-inokulierte Blätter). K2: beide cDNA-Sonden wurden separat vom gleichen biologischen Material (Sonde: *Bgh*-inokulierte Blätter) hergestellt und mit zwei verschiedenen Membranen hybridisiert. Insgesamt wurden 2.306 Gene analysiert.

Die Identität der DNA-Spots auf der Arraymembran wurde durch Sequenzierung und Größenvergleich der neu angeordneten PCR-Produkte überprüft. Drei von 40 zufällig ausgewählten Genen konnten dabei nicht bestätigt werden, wobei das Problem auf die HO-Klon-IDs HO01A01-HO05P24 eingegrenzt wurde. Die genaue Ursache des Fehlers wurde nicht gefunden. Möglicherweise handelt es sich um Fehler beim *Lanetracking* der im IPK Sequenzierlabor erzeugten Sequenzen bzw. Probleme beim Rearrangingprozess dieser Platten. Aufgrund dieses Problems wurden die PCR-Fragmente aller gespotteten Kandidatengene mit entsprechenden Klon-IDs nachsequenziert. Bei 15 von 94 Sequenzen wurde eine andere Sequenz gefunden und eine neue Klon-ID vergeben (HO40A01-HO40A17).

Jedes Gen wurde doppelt innerhalb eines Subarrays auf die Membran gespottet. Aus dem Quotienten der beiden Signalintensitäten ergibt sich das sogenannte Doppelspotverhältnis

(DS). Das DS liegt normalerweise bei 95-99% aller gespotteten Gene unter zwei (Sreenivasulu *et al.* 2002). Bei den hier durchgeführten Experimenten ergab sich für nur ca. 90% ein Wert unter zwei. Genauere Analysen ergaben, dass unbefriedigende DS-Werte zu erhöhten Signalintensitäten führten. Daher wurde folgende Korrektur standardmäßig für alle Arraydaten durchgeführt: Wenn  $DS > 2$  war, wurde der Mittelwert der Signalintensität der doppelt gespotteten Gene durch den Minimalwert ersetzt. Die unbefriedigenden DS-Werte konnten auf die nicht durchgeführte Aufreinigung der gespotteten DNA zurückgeführt werden, die seither standardmäßig erfolgt.

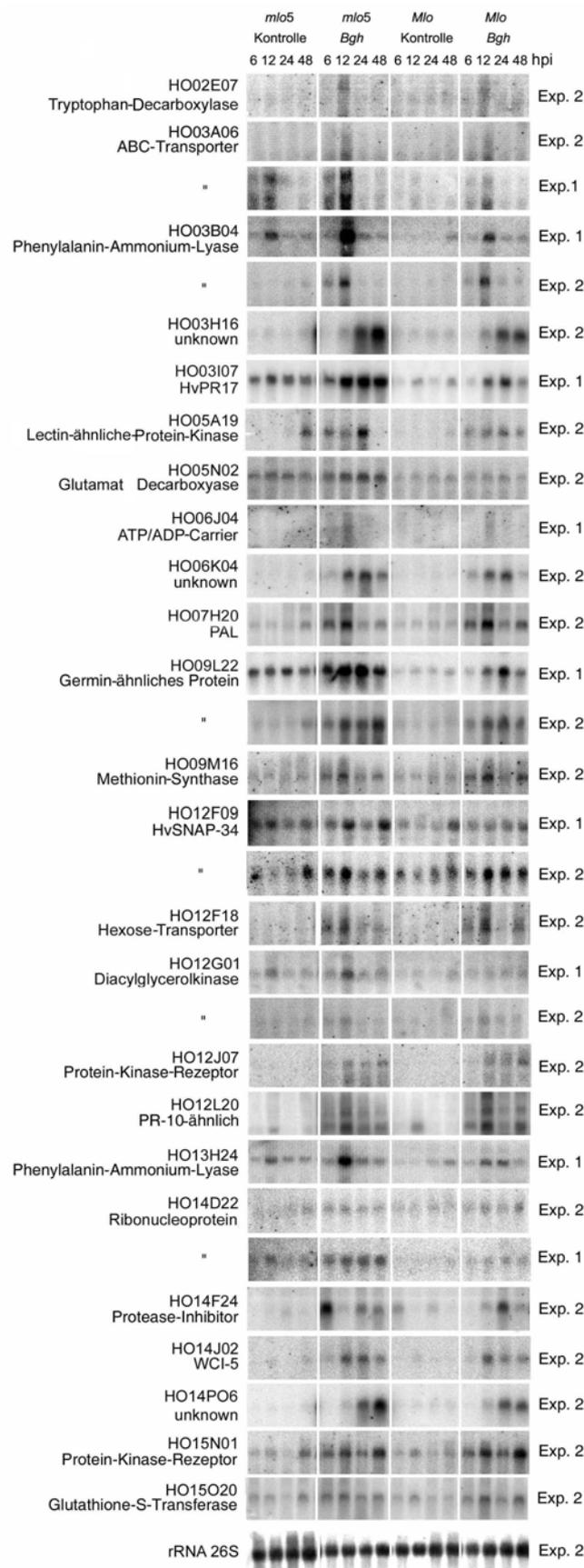
### 3.2.5 Northern-Blots zur Bestätigung der Arrayexperimente

Die *Northern-Blots* und die Arrayexperimente wurden mit demselben Pflanzenmaterial durchgeführt, um die Ergebnisse methodisch unabhängig zu bestätigen. Im Gegensatz zu den Arrayexperimenten wurden für die *Northern-Blots* anstelle von Epidermen ganze Blätter verwendet. Dies ist beim Vergleich der Experimente zu beachten. Zusätzlich zu den im Array analysierten Zeitpunkten (6; 12 und 24 hpi) wurden RNA-Proben zu 48 hpi analysiert. Als pathogeninduziert konnten 24 der 33 aus dem Kandidatengenset zufällig ausgewählten Gene bestätigt werden (Abbildung 3.18). Bleiben die *Northern Blots* ohne Signal unberücksichtigt, ergibt sich eine Bestätigungsrate von 85%.

Ursache für nicht bestätigte *Northern Blots* sind möglicherweise Kreuzhybridisierungen mit Transkripten von Genen, die im Mesophyll konstitutiv exprimiert werden und nur in der Epidermis reguliert sind. Ein Beispiel hierfür ist Klon HO12F09, der für HvSNAP34 kodiert. In diesem Fall konnte die Induktion durch *Bgh* mit Blattmaterial nicht bestätigt werden. Das gleiche gilt auch für den Klon der Glutamat-Decarboxylase (HO05N02).

Die wesentlich feineren Unterschiede zwischen den isogenen Linien konnten durch die *Northern-Blots* ebenfalls reproduziert werden, wobei in Experiment 1 zwischen Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo* deutlichere Unterschiede als in Experiment 2 festgestellt wurden (zum Beispiel PAL: Klon HO03B03).

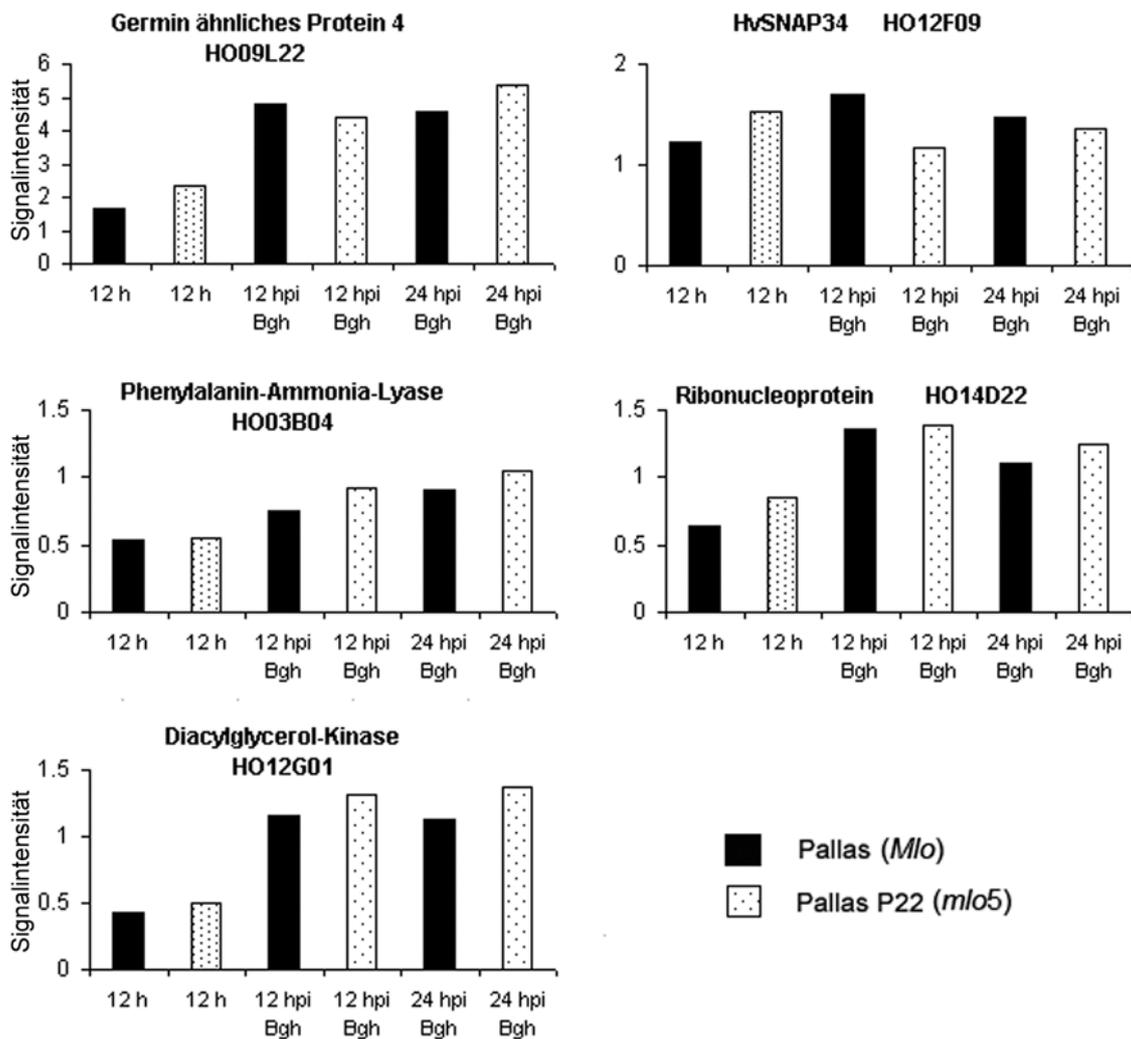
Sechs *Northern-Blots* wurden in einem weiteren, biologisch unabhängigen Experiment wiederholt (Experiment 2) wiederholt, wobei die Ergebnisse aus dem ersten Experiment (Experiment 1) reproduziert werden konnten (ABC-Transporter: Klon HO03A06, PAL: Klon HO03B04, GLP4: Klon HO09L22, HvSNAP34: Klon HO1209, Diacylglycerolkinase: HO12G01 und Ribonucleoprotein: Klon HO14D22).



**Abbildung 3.18:** Reproduzierbarkeit: *Northern-Blots* mit Kandidatengen. *Northern-Blots* und Array-experimente wurden mit dem gleichen Pflanzenmaterial durchgeführt, wobei für die *Northern-Blots* anstelle von Epidermis „Gesamtblatt“ verwendet wurde. Die Probenahme erfolgte 6, 12, 24 und 48 hpi.

### 3.2.6 Bestätigung der Arrayergebnisse in isogenen Linien Pallas und Pallas P22

Die erhöhten mRNA-Gehalte pathogeninduzierter Gene in *mlo*-resistenten Pflanzen (Vergleich der isogenen Linien Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*) sollten in einem anderen genetischen Hintergrund der Gerste bestätigt werden. Dazu wurden für fünf pathogeninduzierte Kandidatengene, die als resistenzassoziiert eingestuft wurden (Differentialindex größer 0,4), *Northern-Blot*-Analysen mit Pflanzen der isogenen Linien Pallas (*Mlo*) und Pallas BC P22 (*mlo5*) durchgeführt (Abbildung 3.19). Analog zu den beschriebenen Experimenten mit den isogenen Linien der Sorte Ingrid wurden inokulierte als auch nichtinokulierte Pflanzen, zu den Zeitpunkten 12 und 24 hpi verglichen.



**Abbildung 3.19:** Signalintensitäten von resistenzassoziierten Kandidatengenen (*mlo5* höher), die die Transkriptabundanz aus *Northern Blot*-Analysen widerspiegeln. Die Versuche wurden mit Blattmaterial der isogenen Linien Pallas (*Mlo*) und Pallas P22 (*mlo5*), 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit *Bgh* bzw. Kontrolle (12 h) durchgeführt. Die Hybridisationssignale wurden mit 26S-rRNA normalisiert. Für die semiquantitative Auswertung wurde die Graustufenanalyse-Software TINA verwendet.

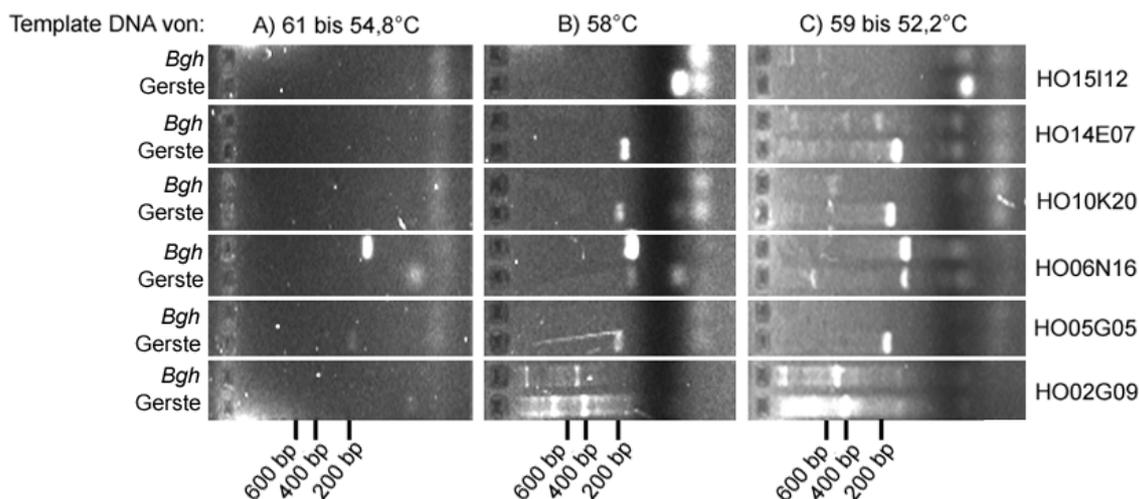
Vier der ausgewählten Gene (GLP4: Klon HO09L22; PAL: Klon HO03B04; Diacylglycerolkinase: Klon HO12G01; Ribonucleoprotein: Klon HO14P22) konnten in Pallas durch die *Northern-Blots* nochmals als pathogeninduziert bestätigt werden. HvSNAP34 (HO12F09) ließ sich, wie auch in den *Northern-Blots* mit „Gesamtblatt“-Material von Ingrid, nicht als

pathogeninduziert bestätigen, wofür höchstwahrscheinlich auch hier Kreuzhybridisierungen mit konstitutiv exprimierten Transkripten aus dem Mesophyll verantwortlich sind.

Die Unterschiede der Transkriptabundanzen zwischen Pallas (*Mlo*) und Pallas P22 (*mlo5*) waren gering. Es konnte aber bei 4 von 5 Genen gezeigt werden, dass diese in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert wurden. Die *Blots* wurden zur Normalisierung nachträglich mit Sonden von 26S-RNA hybridisiert.

### 3.2.7 Unterscheidung zwischen pilzlichen und pflanzlichen ESTs

cDNA-Klone und die davon abgeleiteten ESTs lassen sich durch Blast-Analysen mehr oder weniger gut pilzlicher oder pflanzlicher Herkunft zuordnen (Kapitel 3.1.4). Eine weitere Möglichkeit, ESTs bezüglich ihrer Herkunft zu unterscheiden, sind *touch down* PCR mit EST-spezifischen Primern und Template-DNA von *Bgh* oder Gerste (Ingrid BC *mlo5*). ESTs, bei denen mit pilzlicher oder pflanzlicher Template-DNA PCR-Produkte entstanden, wurden so *Bgh* oder Gerste zugeordnet. Die Methode wurde für 48 ESTs, die sich durch Blast-Analysen nicht eindeutig zuordnen ließen, exemplarisch getestet (Abbildung 3.20). Ferner wurden ESTs mit eindeutiger Homologie zu Pilz- oder Pflanzengenen als Positivkontrolle verwendet.



**Abbildung 3.20:** Beispielhafte Darstellung der Unterscheidung pilzlicher und pflanzlicher ESTs mittels *touch down* PCR unter Verwendung von EST-spezifischen Primerpaaren. HO06N16 ist ein *Blumeria*-EST, HO05G05, HO14E07, HO10K20, HO15I12 sind Gerste-ESTs und HO02G09 konnte nicht zugeordnet werden.

Mit Hilfe der 48 PCR konnten 25 Gerste und 11 *Bgt* zugeordnet werden. Durch die ständig wachsende Zahl von ESTs sind eine Vielzahl untersuchter ESTs nun auch durch Blast-Analysen zuzuordnen. Bis auf ein Gen bestätigten 25 Blast-Analysen die 36 eindeutigen Ergebnisse der PCR. In einem Fall handelt es sich trotz widersprüchlichem Ergebnis (HO02I03) um ein pflanzliches Gen, da der passende EST aus einer cDNA-Bank stammt, die aus nichtinokuliertem Blattmaterial von Gerste präpariert wurde. 25% der untersuchten Gene (12) konnten nicht durch PCR-Analysen zugeordnet werden. Davon ließen sich vier Gene weder mit pilzlicher noch pflanzlicher Template-DNA amplifizieren. Im Fall von 8 weiteren ESTs ergaben sich Banden in beiden PCR-Ansätzen (Tabelle 3.7). Drei Kandidatengene wurden aufgrund der Analyse in die Kategorie „Pilzgen“ eingeordnet.

**Tabelle 3.7:** Unterscheidung von Pilz- und Pflanzengen mit EST-spezifischen Primern in der PCR. Grau unterlegt sind eindeutige Zuordnungen durch Blast-Analyse bzw. PCR.

ID	PCR	Homologie	E-Wert	Accession
HO07O11	Bgh	Bgh EST	1,00E-175	AW790686
HO09I03	Bgh	Bgh EST	0,00E+00	AW792643
HO01C21	Bgh	Bgh EST	E-127	AW791897
HO04M11	Bgh	Bgh EST	1,00E-87	AW791359
HO14D22	Bgh	Bgh EST	E-108	AW791021
HO02I03	Bgh	Gerste EST	1,00E-117	HP04K10T
HO14N21	Bgh	Hypocrea jecorina HSP70	3,00E-82	AAP40020.1
HO02B06	Bgh	kein Treffer	-	-
HO04A02	Bgh	Lolium multiflorum	1,00E-26	U249714
HO09E08	Bgh	Neurospora crassa Rab7 protein	5,00E-79	XP_323013.1
HO09F06	Bgh	Neurospora crassa Protein	2,00E-15	XP_331935.1
HO06F12	Gerste	Aegilops speltoides EST	1,00E-143	BQ841547
HO04F20	Gerste	Gerste EST	1,00E-131	HD05P04
HO12P05	Gerste	Gerste EST	2,00E-99	HS01M19
HO02P04	Gerste	Gerste EST	4,00E-112	HU13D14
HO06G10	Gerste	Gerste EST	2,00E-105	HX05A22
HO09M16	Gerste	Gerste EST	3,00E-108	HM14F03
HO09I06	Gerste	Gerste EST	4,00E-106	HB22D22
HO10M21	Gerste	Gerste EST	2,00E-107	HW06J24
HO12N23	Gerste	Gerste EST	2,00E-114	HA14C16
HO14F24	Gerste	Gerste Gen Bsi 1	0,00E+00	Z48729
HO11H17	Gerste	Gerste Gen GLP4	0,00E+00	X93171
HO13H24	Gerste	Gerste Gen PAL	1,00E-136	X99482
HO03M02	Gerste	Reis EST	1,00E-132	Ak073501
HO14M23	Gerste	Reis EST	1,00E-139	Ak065445
HO12F18	Gerste	Reis Gen MST4	1,00E-168	Ay342321
HO02F02	Gerste	Secale cereale EST	1,00E-124	BE494134
HO09F07	Gerste	Weizen EST	0,00E+00	Bt009442
HO14F03	Gerste	Weizen EST	0,00E+00	Bt009287
HO14P06	Gerste	kein Treffer	-	-
HO06K04	Gerste	Gerste EST	8,00E-25	HF18M03r
HO06J21	Gerste	kein Treffer	-	-
HO12G01	Gerste	Gerste EST	2,00E-25	HY09E20
HO06M04	Gerste	Reis EST	4,00E-62	Ak101201
HO14J02	Gerste	Weizen Gen WCI5	3,00E-86	U32431
HO11H08	Gerste	Gerste EST	8,00E-54	HT06O24
HO11N14	unklar	Triticum turgidum EST	1,00E-156	AJ614614
HO07H20	unklar	Gerste Gen PAL	0,00E+00	Z49145
HO07K06	unklar	Reis BAC	9,00E-98	Ak099730
HO05L14	unklar	Gerste EST	2,00E-49	HP06J16
HO02E07	unklar	Citrus unshiu EST	7,00E-69	AU186294
HO01I09	unklar	Secale cereale EST	2,00E-24	BE586246
HO02K10	unklar	Gerste EST	1E -34	HF01F21
HO02A01	unklar	Gerste EST	4,00E-36	HA10C23
HO07H15	keine Bande	Lolium perenne Gen 4CL	e-170	Af052223
HO10N20	keine Bande	Reis EST	e-171	Ak067146
HO05A19	keine Bande	Gerste EST	9.5e-47	HP03O14
HO11A09	keine Bande	Gerste EST	9.5e-47	HP03O14

### 3.2.8 Bildung von Flavonoidderivaten, Indolalkaloiden und ligninartigen Substanzen

Aufgrund der Anhäufung pathogeninduzierter Gene aus dem Shikimat- bzw. Phenylpropanoidstoffwechsel, wurden die Transkriptabundanzen von Genen näher betrachtet, die für Enzyme dieser Stoffwechselwege kodieren. Dabei wurden auch Gene einbezogen, die nicht in der stringenten Kandidatengen-Auswahl enthalten waren (Abbildung 3.21 und

Abbildung 3.23). Die genannten Stoffwechselwege sind an der Synthese von Flavonoidderivaten, Indolalkaloiden und ligninartigen Substanzen beteiligt. Für diese Sekundärmetabolite werden neben zahlreichen anderen Funktionen auch antimikrobielle Eigenschaften beschrieben (Hammerschmidt und Kagan 2001) In einer Datenbanksuche innerhalb der HO-Arrayanalyse wurde mit entsprechenden Stichwörtern, die in den nachfolgenden Ausführungen benannt sind, nach weiteren pathogenregulierten Genen gesucht deren Produkte eine Rolle in diesen Stoffwechselwegen spielen. Daraus resultierende involvierte Gene wurden in die folgenden Betrachtungen einbezogen, auch wenn sie nur „Kriterium 1“ der Kandidatengenauswahl entsprachen (siehe Kapitel 3.2.2)



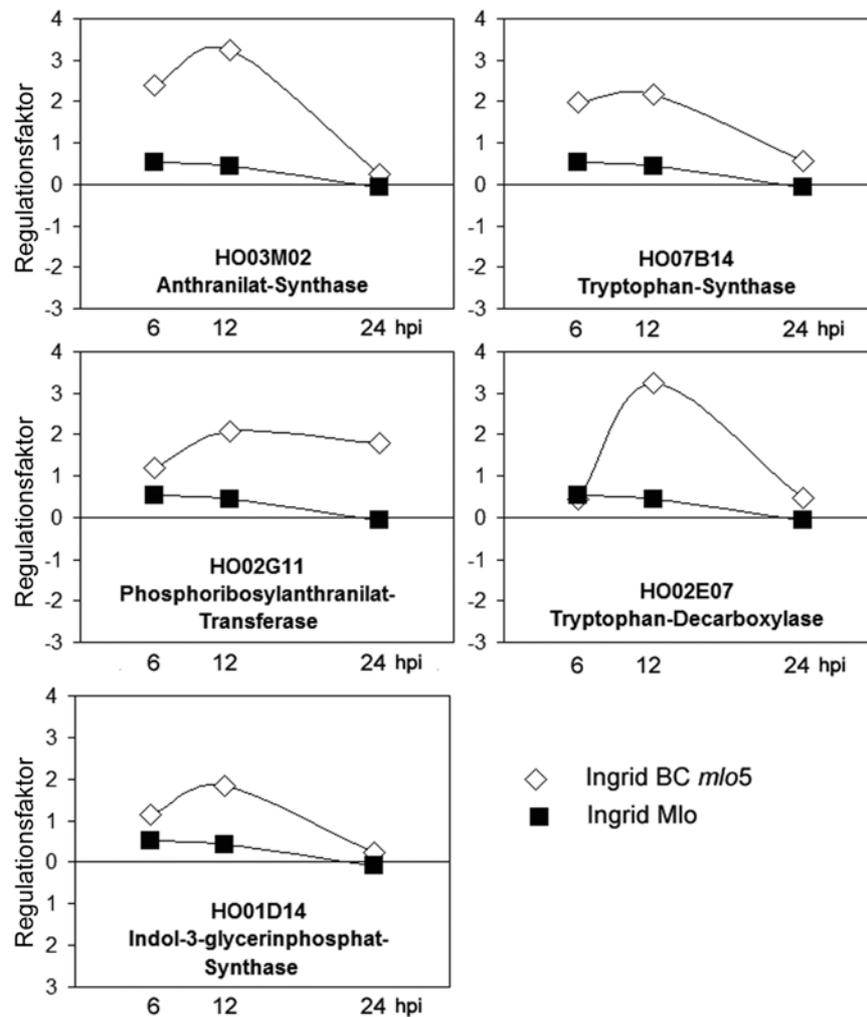
**Abbildung 3.21:** Gene bzw. kodierte Enzyme des Shikimat-Weges und der Biosynthese von Tryptophanalkaloiden, Zimtsäuren, Flavonoiden und Lignin. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Versuche. (+, \*): Gene, deren Regulationsfaktoren „Kriterium 1“ entsprachen, (\*): nicht reproduzierbar; siehe Kapitel 3.2.2)

Da die Stoffwechselwege sehr gut untersucht sind, war es möglich, ein vollständiges Flussschema mit nahezu allen Enzymen der Flavonoid-, Indolalkaloid- und Ligninbiosynthese zu erstellen (Buchanan *et al.* 2000).

Die Grundbausteine der beschriebenen Sekundärmetabolite entstehen aus den Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, die wiederum ihre Grundbausteine aus dem Shikimatweg beziehen. Der Shikimat-Weg beginnt mit einer Aldolkondensation in der Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) miteinander reagieren. Über die Verbindungen Chinat, 5-Dehydrochinat, 5-Dehydroshikimat, Shikimat und 3-Enolpyruvylshikimat entsteht schließlich Chorismat. Dies wird von den Enzymen DAHP-Synthetase (Aldolase), Dehydrochinat-Dehydratase, Shikimat-Dehydrogenase und Chorismat-Synthase katalysiert. Zwei Gene, die für Enzyme dieses Stoffwechselweges kodieren, konnten als pathogeninduziert gezeigt werden. Genprodukte sind eine Aldolase (Klon HO10L02) und zwei verschiedene Gene der Chorismat-Synthase (Klone HO13H19, HO06F12). Für die drei weiteren Enzyme des Shikimat-Weges konnte keine Aussage getroffen werden, weil die Gene dieser Enzyme nicht im HO-Unigenetset enthalten waren (Datenbanksuche: Chinat\*, Shikimat\*, Enolpyruvyl\*).

Der im Shikimat-Weg anfallende Enolester Chorismat kann nun in zwei verschiedene Reaktionswege einfließen. Im ersten Reaktionsweg, der in Richtung Flavonoid- und Ligninbiosynthese verläuft, wird in durch die Chorismatmutase sowie eine Aminotransferase katalysierten Reaktionen über Prephenat Arogenat gebildet. Aus Arogenat entsteht durch Dehydrogenierung und Decarboxylierung Tyrosin, welches durch Dehydrogenierung, Decarboxylierung und Transaminierung zu Phenylalanin umgesetzt wird. Gene der beiden dafür notwendigen Enzyme wurden in der HO-cDNA-Bank nicht gefunden (Datenbanksuche: Arogenat\*, Aminotransferase\*, Phenylalanin\*). Im zweiten Stoffwechselweg wird Chorismat zu Tryptamin umgewandelt, was möglicherweise als Vorstufe für Indolalkaloide dient.

Zunächst soll die Bildung von Tryptamin betrachtet werden, von dem sich die Stoffgruppe der Indolalkaloide ableitet. Alle Gene, die für Enzyme dieses Stoffwechselweges kodieren, waren pathogeninduziert. Dies sind zwei Gene der Anthranilat-Synthase (Klone HO01D14, HO03M02) und jeweils ein Gen der Indol-3-glycerinphosphat-Synthase (Klon HO07B14), der Phosphoribosylanthranilattransferase (Klon HO02G11), der Indol-3-glycerinphosphat-Synthase (Klon HO01D14), der Tryptophan-Synthase (Klon HO07B11) und der Tryptophan-Decarboxylase (Klon HO02E07). Außerdem wurden diese sechs Gene in *mlo*-resistenter Gerste stärker exprimiert, was eine Rolle von Tryptamin als Marker für die *mlo*-vermittelte Resistenz impliziert (Abbildung 3.22). Tryptamin wird durch Decarboxylierung aus Tryptophan gebildet und im Anschluss möglicherweise durch Demethylierung zu Gramin umgesetzt (Matsuo *et al.* 2001). Eine N-Methyltransferase war in der HO-cDNA-Bank allerdings nicht enthalten. Die Akkumulation von Gramin wurde nach Verwundung und Inokulation mit *Bgh* in Gerste beschrieben (Matsuo *et al.* 2001). Weiterhin erscheint interessant, dass aus dem Stoffwechselweg, der zu Tryptamin führt, möglicherweise Substanzen zur Bildung von Auxin (IES,  $\beta$ -Indolylessigsäure) abgezweigt werden. Für die Biosynthese von Auxin werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, die entweder direkt von Tryptophan oder von Indol-3-glycerinphosphat, Indol oder Tryptamin ausgehen und bisher nicht vollständig aufgeklärt sind (Dharmasiri und Estelle 2004). Weitere Enzyme die zur Bildung von Auxin führen (Datenbanksuche: Nitrilase, Myrosinase, Indol) bzw. die typischerweise von Auxin induziert werden (*Primary auxin responsive genes*, GH3, SAUR, AUX/IAA, ARF) wurden aber nicht gefunden. Interessanterweise wird Auxin im Zusammenhang mit Proteinabbau und Aktivierung der Gentranskription im Zusammenhang mit Abwehr diskutiert (Dowd *et al.* 2004).

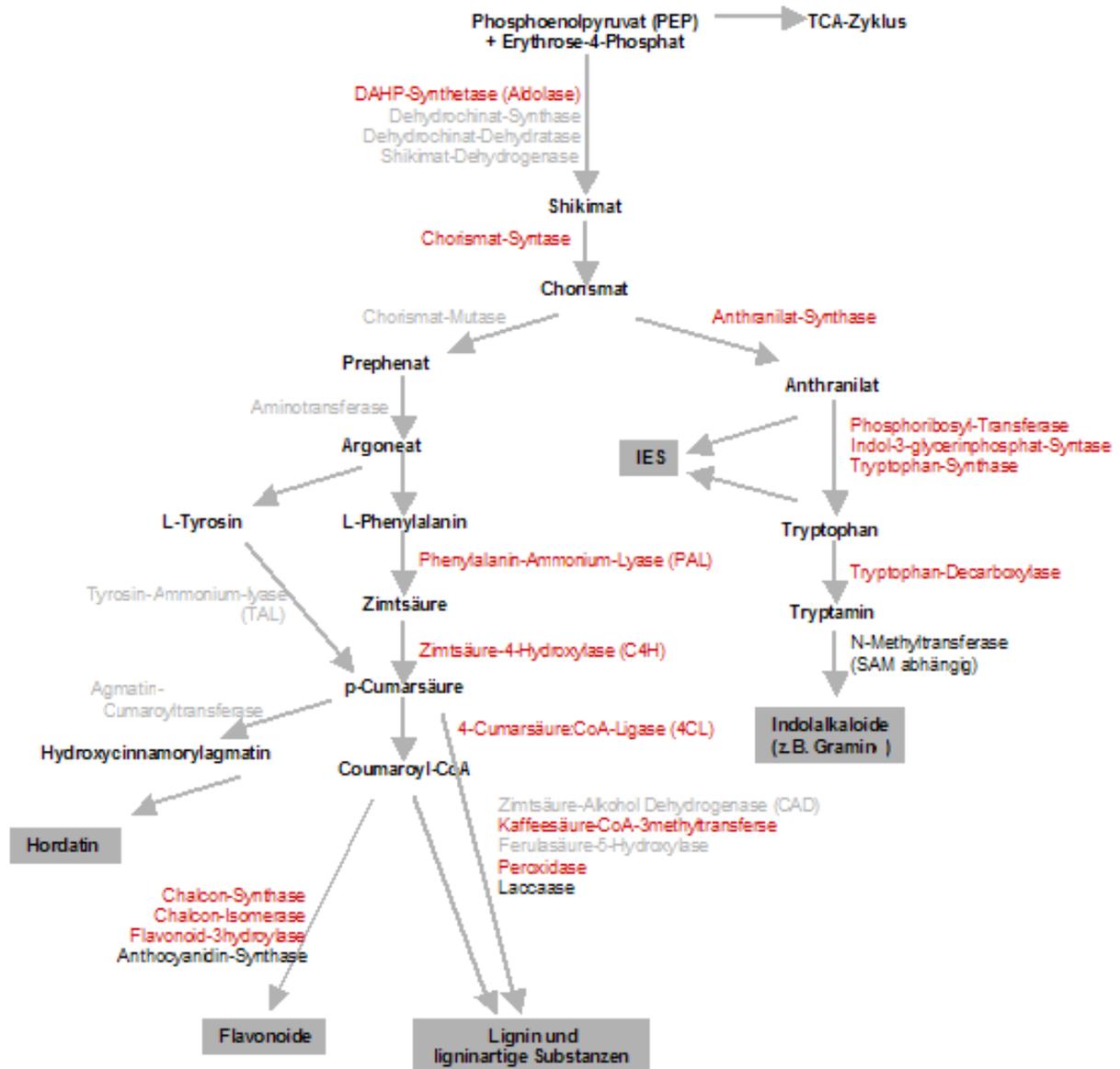


**Abbildung 3.22:** Regulationsfaktoren ( $\log_2$  „inokuliert“/Kontrolle) für Gene der Tryptamin-Biosynthese. Mittelwerte aus zwei biologischen Experimenten.

Für die Bildung von ligninartigen Substanzen und Flavonoiden sind Phenylpropanoidvorstufen erforderlich. Die Synthese der Phenylpropanoide beginnt mit der Bildung von Zimtsäure aus Phenylalanin bzw. mit der Bildung von p-Cumarsäure aus Tyrosin. Dieser erste Schritt stellt den Übergang vom Shikimat-Weg zum Phenylpropanstoffwechsel dar und wird von den Enzymen Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) bzw. der Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL) katalysiert. Durch die Aktivität der Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) bzw. der 4-Cumarsäure-CoA-Ligase (4CL) kommt es ausgehend von Zimtsäure zur Bildung von p-Cumarsäure bzw. Cumaroyl-CoA. Bis auf die TAL, die nicht in der HO-cDNA-Bank enthalten ist (Datenbanksuche), sind alle Gene, die für Enzyme dieses Stoffwechselweges kodieren pathogeninduziert. Es wurden vier verschiedene Gene gefunden, die für PAL (Klone HO02F15, HO03B04, HO07H20, HO15O04), drei, die für C4H (Klone HO09E09, HO07E09, HO14I10) und weitere drei, die für 4CL (Klone HO14H13, HO07H15, HO08E06) kodieren. Hierbei fällt auf, dass die Gene, die für PAL kodieren verstärkt in Ingrid BC *mlo5* exprimiert wurden.

Lignine sind pflanzliche Biopolymere, die aus den als Monolignole bezeichneten Zimtsäure-Derivaten p-Cumaryl-, Coniferyl-, und Sinapylalkohol gebildet werden. Durch die Zimtsäure-3-Hydroxylase (C3H), die Ferulasäure-5-Hydroxylase (F5H) und die O-Methyltransferasen (COMT) werden unterschiedliche Substitutionen am Phenylring der Zimtsäure katalysiert, die zur Bildung von 4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure führen. Es wurden zwei pathogeninduzierte Gene des Enzyms Kaffeesäure-CoA-3-Methyltransferase (Klon

HO06G10, HO11C11) gefunden. Ebenfalls pathogeninduziert bzw. reprimiert waren verschiedene Peroxidase-Gene (Klone HO07C04, HO10A24, HO04E21) und ein Gen, das eine Laccase kodiert (Klon HO03L10). Dies sind Enzyme, die möglicherweise Monolignole in Alkylradikale umwandeln. Über deren Substratspezifität konnte aber keine Aussage gemacht werden.



**Abbildung 3.23:** Biosynthese von Flavonoidderivaten, Indolalkaloiden und ligninartigen Substanzen (rot: induzierte Gene; schwarz: konstitutiv exprimierte Gene; grau: nicht in der HO-cDNA-Bank enthaltene Gene).

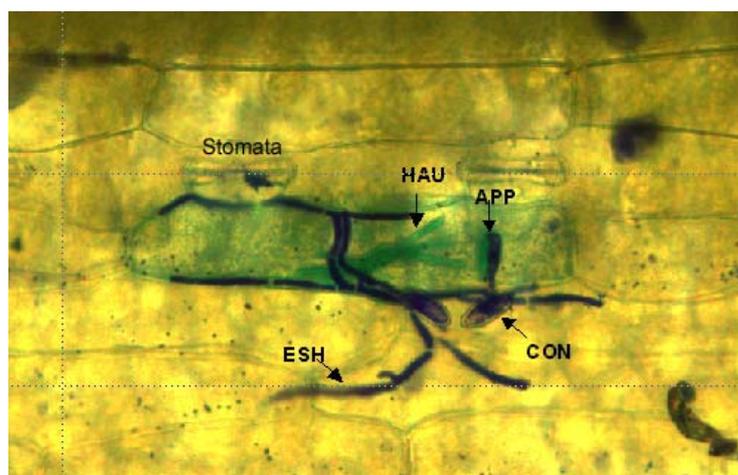
Ebenfalls pathogeninduziert waren zwei Gene der Chalcone-Synthase (Klon HO04K22, Klon HO03P11). Die Chalcone-Synthase ist das Schlüsselenzym bei der Bildung von Flavonoiden. Außerdem wurden zwei weitere Enzyme des Flavonoidwegs gefunden (Datenbanksuche: Chalcon\*, Flavone\*, Flavonol\*, Isoflavone\*Anthocyanidin\*, Vestitone\*, Agmatine\* und Coumaroyl\*). Diese sind an der Biosynthese von Anthocyanidin beteiligt. Ein Gen kodiert für die Flavon-3-Hydroxylase (Klon HO15F23), die die Bildung von Dihydroflavonolen katalysiert, aus denen sich die Anthocyanidine ableiten. Die Anthocyanidin-Synthase (Klon HO15J04) katalysiert die Bildung des Endproduktes Anthocyanidin aus Leucocyanidin (Abbildung 3.21).

Erst kürzlich wurde das Enzym Agmatin-Cumaroyl-Transferase (ACT) beschrieben, welches die Bildung der Hydroxycinnamoylagmatin aus Agmatin und Hydroxycinnamoyl-CoA katalysiert. Hydroxycinnamoylagmatin bilden direkte Vorstufen der antifungal wirkenden Hordatine (Burhenne *et al.* 2003). Obwohl kein ACT-Gen in der HO-cDNA-Bank gefunden wurde, ist die Stoffklasse der Hydroxycinnamoylagmatin im Zusammenhang mit *mlo*-vermittelter Resistenz dennoch äußerst interessant. p-Cumaroylhydroxyagmatin wird nach Pathogenbefall verstärkt in Gerste gebildet, wobei die Akkumulation in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* höher ist als in Ingrid *Mlo* (von Röpenack *et al.* 1998). Während die Stoffklasse der Hordatine möglicherweise auf die Gattung *Hordeum* beschränkt ist, wurden Hydroxyagmatin auch in anderen Gräsern gefunden (Wei *et al.* 1994). Hydroxycinnamoylagmatin-Derivaten wird eine Rolle bei der Zellwandverstärkung zugeschrieben und sie besitzen außerdem Phytoalexinaktivität (von Röpenack *et al.* 1998).

### 3.3 Systematisches TIGS-Screening aller Kandidatengene in *mlo*-resistenter Gerste

Wie aus der Transkriptomanalyse hervorgeht, verändert sich das Transkriptom der Epidermiszellen von Gerste nach Inokulation mit dem Pathogen *Bgh* enorm. Es wurden 171 pflanzliche Gene gezeigt, die reproduzierbar hochreguliert waren. Die meisten Gene waren in der inkompatiblen Interaktion (Ingrid BC *mlo5*) stärker induziert. Eine Vielzahl wurde bereits als allgemein stress- bzw. pathogeninduziert beschrieben und mit abwehrkorrelierten Stoffwechselwegen in Verbindung gebracht. Bis auf *HvRor1*, *HvRor2* und *HvSNAP34* wurden bisher aber keine *downstream*-Komponenten gefunden, die für *mlo*-vermittelte Resistenz benötigt werden. Daher wurde mit einem systematischen hochdurchsetzenden TIGS-Screening in Blattsegmenten von Gerste (Abbildung 3.24; siehe auch Material und Methoden Kapitel 2.5) versucht, die molekulare Funktion einzelner Komponenten bzw. ganzer Stoffwechselwege, die im Zusammenhang mit *mlo*-vermittelter- bzw. allgemeiner Pathogenresistenz stehen, aufzuklären.

Grundlage für das hier etablierte systematische TIGS-Screening waren RNAi-Konstrukte, die nach ihrer Expression in der Zelle doppelsträngige RNA-Moleküle ausbilden (*in vivo* Synthese). Diese wiederum sind für den nachfolgenden sequenzspezifischen Abbau von Ziel-mRNA notwendig (RNAi-Effekt).



**Abbildung 3.24:** TIGS-Screening in der adaxialen Epidermis von mehltaubefallenen Gerstenblättern (Ingrid *Mlo*). Die GUS-transformierte Zelle ist türkisblau gefärbt. Die Coomassie-gefärbten pilzlichen Strukturen sind blau. Anfällige Interaktion links: Ein Pilz (*Bgh*) konnte ein Haustorium (HAU) vollständig ausbilden, es entstanden elongierende, sekundäre Hyphen (ESH). Resistente Interaktion rechts: der Pilz konnte kein Haustorium ausbilden (CON: Konidium APP: Appressorium).

### 3.3.1 TIGS-Screening-Strategie

Ziel war es, zu testen ob durch „silencing“ pathogeninduzierter Gene mit Hilfe der erstellten RNAi-Konstrukte die *mlo*-vermittelte Resistenz in den Blättern durchbrochen werden kann und ob es folglich zur Ausbildung von Haustorien in den manipulierten, normalerweise resistenten Zellen kommt.

- 1) Um die Effizienz des Screenings zu erhöhen, sollten zufällig ausgewählte Pools zu je vier Genen getestet werden.
- 2) Getestet werden sollten aber auch funktionelle Pools, die Enzyme spezifischer Stoffwechselwege (zum Beispiel Sekundärmetabolismus, Photosynthese; Proteolyse) kodieren.
- 3) Die „interessantesten Kandidatengene“ des Screenings waren solche, die in Ingrid BC *mlo5* hochreguliert waren („resistenzassoziierte Gene“) bzw. die spezifisch in der Epidermis exprimiert wurden. Daher sollten Pools mit Genen dieser Kategorien getestet werden.

### 3.3.2 Klonierungsstrategie für RNAi-Konstrukte

Für die Erstellung der RNAi-Konstrukte wurde eine effiziente hochdurchsetzende Klonierungsstrategie verwendet. Basis der Klonierungsstrategie war das „Gateway“-Rekombinationssystem, welches modifiziert wurde (Douchkov *et al.* unveröffentlicht) (Vektorkarten und Klonierungsstrategie siehe Material und Methoden 2.6.1). Mit der Strategie wurde versucht, alle 171 hochregulierten, pflanzlichen Gene des Kandidatengensets zu klonieren. Bis zum Abschluss der Arbeit konnten von 128 der 171 Gene RNAi-Konstrukte erstellt werden. Die erstellten RNAi-Konstrukte, die nach ihrer Expression Haarnadelstrukturen mit einer Armlänge von ca. 400 bp ausbilden sollen, wurden als pIPKTA30\_HOXXXX bezeichnet.

### 3.3.3 Der Suszeptibilitätsindex (SI)

Als Maß für die Resistenz bzw. Anfälligkeit der transformierten Zellen wurde der Suszeptibilitätsindex (SI) berechnet. Der SI ergibt sich aus dem Quotient der absoluten Zahl transformierter Zellen ( $n$ ) und der Anzahl transformierter Zellen mit mindestens einem Haustorium ( $n_{HAU}$ ) (Formel 1).

$$SI(\%) = \frac{n_{HAU} * 100}{n} \quad (1)$$

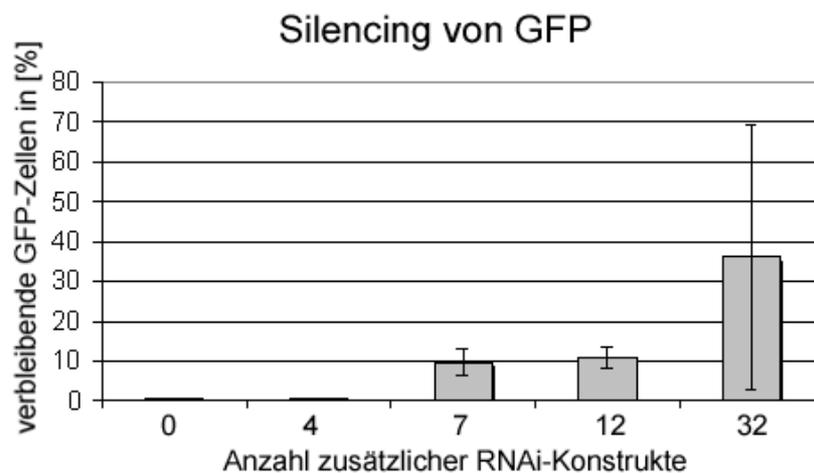
### 3.3.4 Auswertung der TIGS-Versuche und der Kontrollversuche

Pro biolistischem Bombardement (Beschuss) wurden durchschnittlich 285 transformierte Zellen ausgewertet (Grundlage 39 geschossene Gene). Als Negativkontrolle wurde die isogene Gerstenlinie Ingrid BC *mlo5* mit dem leeren RNAi-Konstrukt (pIPKTA30N) beschossen. Ingrid BC *mlo5* war nahezu vollständig resistent und der durchschnittliche (SI) lag bei 0,2%. Die isogene Linie Ingrid *Mlo* wurde als Positivkontrolle und somit als Maß für

die *Bgh*-Anfälligkeit des Testsystems verwendet. Die SI-Werte der entsprechenden Kontrollversuche sind in Tabelle 3.8. dargestellt und weisen zum Teil beträchtliche Schwankungen auf (3,4% bis 22,9%). Vereinzelt Versuchsserien wurden aufgrund zu geringer SI-Werte der Positivkontrollen (Ingrid Mlo) nicht ausgewertet und dargestellt. Problematisch war hierbei möglicherweise die Inokulationsstärke bzw. die Verwundung der Blätter durch Abschneiden.

### 3.3.5 TIGS-Screening mit Pools von RNAi-Konstrukten

Eine Voraussetzung für das geplante TIGS-Screening war, dass es möglich sein sollte mehrere Gene gleichzeitig auszuschalten. Douchkov *et al.* (unveröffentlicht) konnten dies durch den gleichzeitigen Beschuss mit dem Reporter- und Überexpressionskonstrukt GLP4::GFP, dem RNAi-Konstrukt GLP4RNAi und zufällig ausgewählten RNAi-Konstrukten zeigen. Da die Bildung des HvGFP::Fusionsproteins mit bis zu vier weiteren *co*-bombardierten RNAi-Konstrukten effizient unterbunden wurde, wurde angenommen das sich bis zu vier Gene gleichzeitig und vollständig unterdrücken lassen. Durch Zugabe von weiteren RNAi-Konstrukten wurde dieser Effekt sukzessive verringert (Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25:** Das Reporter- und Überexpressionskonstrukt GLP4::GFP, das RNAi-Konstrukt GLP4RNAi und null bis 32 zufällig ausgewählte RNAi-Konstrukte des Kandidatengensets wurden gleichzeitig in die Epidermiszellen geschossen. (Douchkov *et al.*, 2004; unveröffentlicht). Durch gleichzeitiges Einschleusen von GLP4::RNAi und GLP4::GFP und bis zu vier zufällig ausgewählten RNAi-Konstrukten wurde die Bildung von GFP verhindert.

Daher wurden die 128 RNAi-Konstrukte zunächst in zufällig ausgewählten *Pools* zu jeweils vier Genen getestet. Im Falle des Resistenzdurchbruchs sollten die Gene einzeln getestet werden. Allerdings wurden nur drei *Pools* gefunden, die einen minimalen Effekt zeigten. Diese Effekte waren weder durch den Beschuss mit den identischen *Pools* noch durch Beschuss mit den einzelnen RNAi-Konstrukten reproduzierbar. Mit bisher unvollständigen funktionellen *Pools* des Kandidatengensets (epidermisspezifische Gene, Gene *mlo5* höher, alle Gene *mlo5* höher und epidermisspezifisch) konnte die Resistenz ebenfalls nicht durchbrochen werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.6 TIGS-Screening mit einzeln geschossenen RNAi-Konstrukten

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurde mit der Testung einzelner Gene begonnen. Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die RNAi-Konstrukte im Testsystem funktionell wirksam sind. Insgesamt wurden bisher 39 Gene getestet (Tabelle 3.8).

Der Beschuss mit den RNAi-Konstrukten pIPKTA30\_HO12F09 (HvSNAP34), pIPKTA30\_HO11H17 (GLP4), pIPKTA30\_HO10N20 (Proteinkinase) und pIPKTA30\_HO15N01 (Proteinkinase-Rezeptor) führte bei den hier durchgeführten Experimenten erstmals zum Durchbrechen der Resistenz in Ingrid BC *mlo5*. pIPKTA30\_HO12F09 unterdrückt die Expression von HvSNAP34, einem t-SNARE, pIPKTA30\_HO11H17 die von GLP4, pIPKTA30\_HO10N20 die einer Proteinkinase und pIPKTA30\_HO15N01 die eines Proteinkinase-Rezeptors. Bei Wiederholungsversuchen mit diesen vier RNAi-Konstrukten zeigte sich allerdings, dass nur der Effekt von HvSNAP34 reproduzierbar war. Die Identität aller RNAi-Konstrukte wurde durch Sequenzierung kontrolliert.

**Tabelle 3.8:** Getestete Kandidatengene im TIGS-Screening. Als Kontrolle wurde die isogene Linie Ingrid *Mlo* verwendet (SI: Suszeptibilitätsindex, HAU: Haustorium, \*: Ergebnis war in Wiederholungsversuchen nicht reproduzierbar).

ID	Annotation	Anzahl	Anzahl	Anzahl	SI (%)	SI (%)	GUS-
		GUS-Zellen	HAU	Blätter		Kontrolle	Zellen
PIPKTA30_HO11F10	12-OPD-Reduktase	509	0	0	0,0	15,3	281
pIPKTA30_HO06F18	12-OPD-Reduktase	304	0	0	0,0	15,3	281
pIPKTA30_HO14H18	ARM-enthaltendes Protein	225	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO03K07	$\beta$ -Galactosidase	206	0	0	0,0	3,4	203
pIPKTA30_HO14K08	Zellulose-Synthase-artig	286	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO04F20	Ceramid-Synthase	217	0	0	0,0	8,9	167
pIPKTA30_HO14K07	Chitinase	275	0	0	0,0	8,9	167
pIPKTA30_HO03C22	Exo-1,3- $\beta$ -Glucanase	307	0	0	0,0	8,9	167
pIPKTA30_HO13M15	Exportin-7	167	0	0	0,0	3,6	388
pIPKTA30_HO01P12	GLP4	124	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO09L22	GLP4	362	0	0	0,0	15,3	281
pIPKTA30_HO11H17	GLP4	230	2*	1	0,9	15,3	281
pIPKTA30_HO15E16	GLP 4	172	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO15O20	Glutathion-S-Transferase	210	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO13I11	Glycin-reiches Protein	137	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP-34	258	3	2	1,2	8,9	167
pIPKTA30_HO06G10	COMT	207	0	0	0,0	8,9	167
pIPKTA30_HO15I12	kein Treffer	237	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO02A01	Lysophospholipase	260	0	0	0,0	8,9	167
pIPKTA30_HO09M16	Methionin-Synthase	414	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO09F07	Mlo-ähnlich	167	0	0	0,0	15,3	281
pIPKTA30_HO11H08	Nucellin	162	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO13D15	Peroxidase (sekretiert)	319	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO03B04	PAL	239	0	0	0,0	3,4	203
pIPKTA30_HO07B06	Protein der QM-Familie	227	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO10N20	Proteinkinase	667	2*	2	0,3	15,3	281
pIPKTA30_HO11C08	Proteinkinase	456	0	0	0,0	15,3	281
pIPKTA30_HO12P14	Proteinkinase	347	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO10N20	Proteinkinase	282	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO08B09	Proteinkinase-Rezeptor	801	1*	1	0,1	15,3	281
pIPKTA30_HO06N14	Proteinkinase-Rezeptor	276	0	0	0,0	15,3	281
pIPKTA30_HO12J07	Proteinkinase-Rezeptor	267	0	0	0,0	14,6	82

pIPKTA30_HO13M17	Proteinkinase-Rezeptor	395	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO14K07	Proteinkinase-Rezeptor	251	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO15N01	Proteinkinase-Rezeptor	199	3*	1	1,5	22,9	109
pIPKTA30_HO05C04	Rezeptor (Embryogenese)	265	0	0	0,0	22,9	109
pIPKTA30_HO10M21	Serin-Proteinase	183	0	0	0,0	15,3	281
pIPKTA30_HO14K19	Serin-Proteinase	258	0	0	0,0	14,6	82
pIPKTA30_HO08G22	Zelltodsupsressor	239	0	0	0,0	8,9	167
pIPKTA30	leer	2.810	5		0,2		

### 3.3.7 Das RNAi-Konstrukt pIPKTA30\_HO12F09

Mit dem RNAi-Konstrukt pIPKTA30\_HO12F09 (HvSNAP34) wurde die *mlo*-vermittelte Resistenz durchbrochen. Dies bestätigt frühere Ergebnisse von Collins et al. (2003). Der SI in Wiederholungsexperimenten lag abhängig von dem SI des jeweiligen Kontrollexperimentes zwischen 0 und 6,3 (Mittelwert 2) (Tabelle 3.9). Der RNAi-Effekt von HvSNAP34 (Klon HO12F09) konnte durch Einzelbeschuss aber nicht in *Pools* (Tabelle 3.10) gezeigt werden. RNAi-Konstrukte, die in *Pools* geschossen wurden, waren möglicherweise nicht funktionsfähig.

**Tabelle 3.9:** Wiederholungsversuche mit HvSNAP34. Jede Zeile zeigt ein biologisch unabhängiges Experiment. Als Positivkontrolle (PK) wurde der leere RNAi-Vektor in Ingrid *Mlo* geschossen.

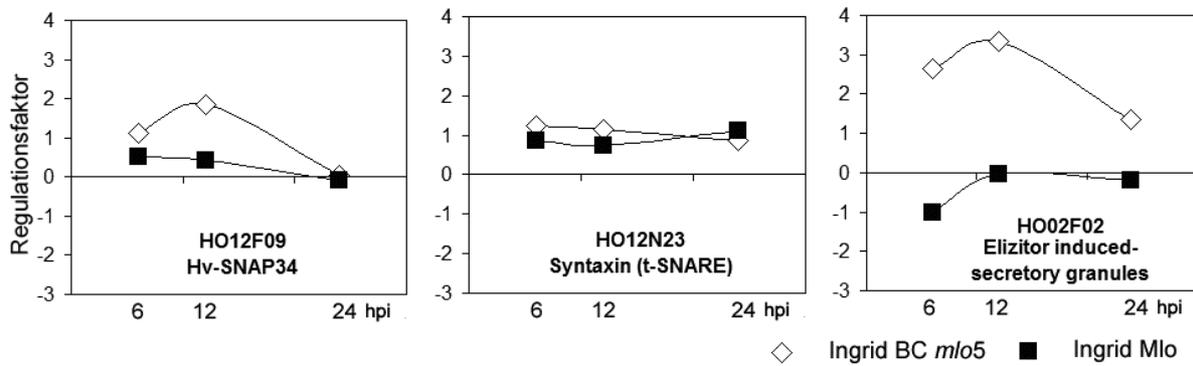
Klon-ID	Homologie	Anzahl GUS-Zellen	Anzahl HAU	Anzahl Blätter	SI	SI (PK)	GUS-Zellen (PK)
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	188	9	3 von 7	4,8	22,9	109
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	219	1	1 von 7	0,5	15,3	289
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	343	2	2 von 7	0,6	3,6	388
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	189	12	5 von 7	6,3	20,4	49
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	258	3	2 von 7	1,2	8,9	167
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	94	2	1 von 7	2,1	10,4	153
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	140	6	3 von 7	4,2	10,4	153
pIPKTA30_HO12F09	HvSNAP34	268	0	0 von 7	0	3,4	203
	Summe	1.699	35	17 von 56	2	16,2	1.511

**Tabelle 3.10:** HvSNAP34 wurde in *Pools* zusammen mit drei weiteren RNAi Konstrukten getestet. Als Positivkontrolle (PK) wurde ein *Mlo*-Überexpressionskonstrukt (*Mlo::Nos*) in Ingrid BC *mlo5* geschossen.

Klon-ID	Anzahl GUS-Zellen	Anzahl HAU	Anzahl Blätter	SI	SI (PK)	GUS-Zellen (PK)
pIPKTA30_HO12F09+3 Konstrukte	297	0	0	0	42,7*	145
pIPKTA30_HO12F09+3 Konstrukte	98	0	0	0	30,1*	159
pIPKTA30_HO12F09+3 Konstrukte	201	0	0	0	20,4	49
pIPKTA30_HO12F09+3 Konstrukte	90	1	1	1,1	57,8*	109

Beim Betrachten der Induktionsfaktoren von HvSNAP34 (Klon HO12F09) aus der Transkriptomanalyse fällt auf (Abbildung 3.26), dass diese in Ingrid BC *mlo5* signifikant höher als in Ingrid *Mlo* sind (DI=0,69) sind. Außerdem hatte HvSNAP34 seinen Expressionsschwerpunkt in der Epidermis (EM=1,13). Interessant ist, dass nach Inokulation mit *Bgh* zwei weitere Gene, die im Zusammenhang mit Vesikeltransport stehen, induziert sind. Bei einem der Gene handelt es sich wie auch bei HvSNAP34 um ein t-SNARE-Protein (Syntaxin; Klon HO12N23). Das zweite Gen repräsentiert ein elizitorinduziertes

granasekretierendes Protein (Klon HO02F02). Beide Gene werden ebenfalls bevorzugt in der Epidermis exprimiert (Klon HO02F02 EM=2,1; Klon HO12N23 EM=2,4).



**Abbildung 3.26:** Regulationsfaktoren ( $\log_2$  „inokuliert“/Kontrolle) für die Gene der Kategorie Sekretion. (Mittel-werte aus zwei biologischen Experimenten)

### 3.4 Messung von $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und proteinogener Aminosäuren

Die Glutamat-Decarboxylase (GAD) ist das Schlüsselenzym bei der Bildung der als Neurotransmitter bekannten nichtproteinogenen Aminosäure GABA ( $\gamma$ -Amino-Buttersäure), die auch in Pflanzen als Signalmolekül beschrieben wurde (Bouche und Fromm 2004). In der Transkriptomanalyse der Epidermis mehltaubefallener Gerste wurde gezeigt, dass die GAD pathogeninduziert, epidermal und resistenzassoziiert exprimiert wurde. Diese Resultate gaben Anlass für weiterführende Untersuchungen im Zusammenhang mit GAD und GABA. GABA wurde quantifiziert und Resistenzinduktionsexperimente wurden durchgeführt. Von großem Interesse war, ob GABA eine Rolle bei der Signalweitergabe in *mlo*-resistenten Pflanzen oder allgemein bei der Pathogenerkennung spielt. Bisher wurden in Gerste noch keine pathogenstressinduzierten/-vermittelnden Signalmoleküle, wie zum Beispiel Ethylen, Jasmonsäure oder Salizylsäure, gefunden (Vallelian-Bindschedler et al. 1998; Kogel et al. 1995).

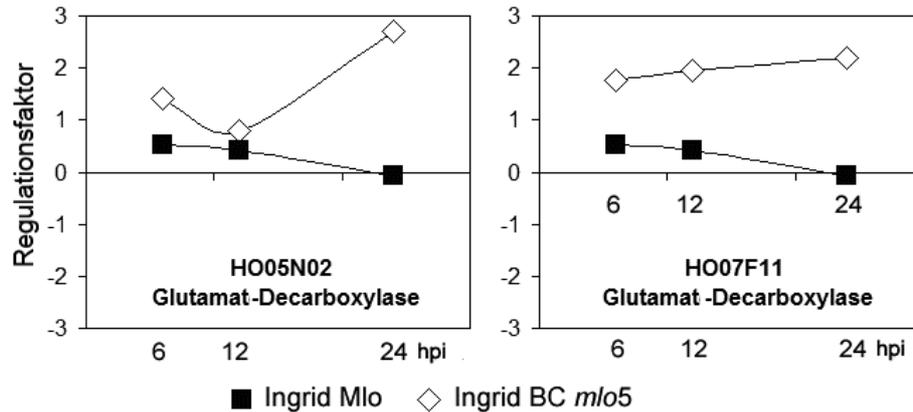
#### 3.4.1 Die Glutamat-Decarboxylase (GAD)

Die Transkripte der GAD waren pathogeninduziert, in der Epidermis angereichert (Klon HO05N02 EM=0,4 und Klon HO07F11 EM=3,3) und in der resistenten isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert, was sich zumindest in einem Fall in einem erhöhten Differentialindex ausdrückt (Klon HO05N02 DI=0,72 und Klon HO07F11 DI=0,07) (Abbildung 3.27). Das GAD-Gen der Gerste wurde auf der Arraymembran von den beiden Klone HO05N02 und HO07F11 repräsentiert. Beide Klone gehören zu einem *Consensus*, unterscheiden sich aber in der Insertlänge. Hieraus erklären sich möglicherweise die Unterschiede im beobachteten Expressionsmuster der beiden Klone (siehe auch Abbildung 3.16).

Die GAD ist ein kalziumabhängiges, Calmodulin (CaM)-bindendes Protein, dessen Aktivität durch  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-Komplexe beeinflusst wird (Baum et al. 1996). Kürzlich wurde in Reis eine GAD-Isoform (*OsGAD2*) gefunden, die keine CaM-Bindungsstelle (AS-Austausche in diesem Bereich) aufweist, während diese bei einer weiteren vorhanden ist (*OsGAD1*) (Akama et al. 2001).

Um herauszufinden, ob die HvGAD möglicherweise ebenfalls eine CaM-Bindungsstelle aufweist, wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen verglichen. Die HvGAD ist der *OsGAD1*

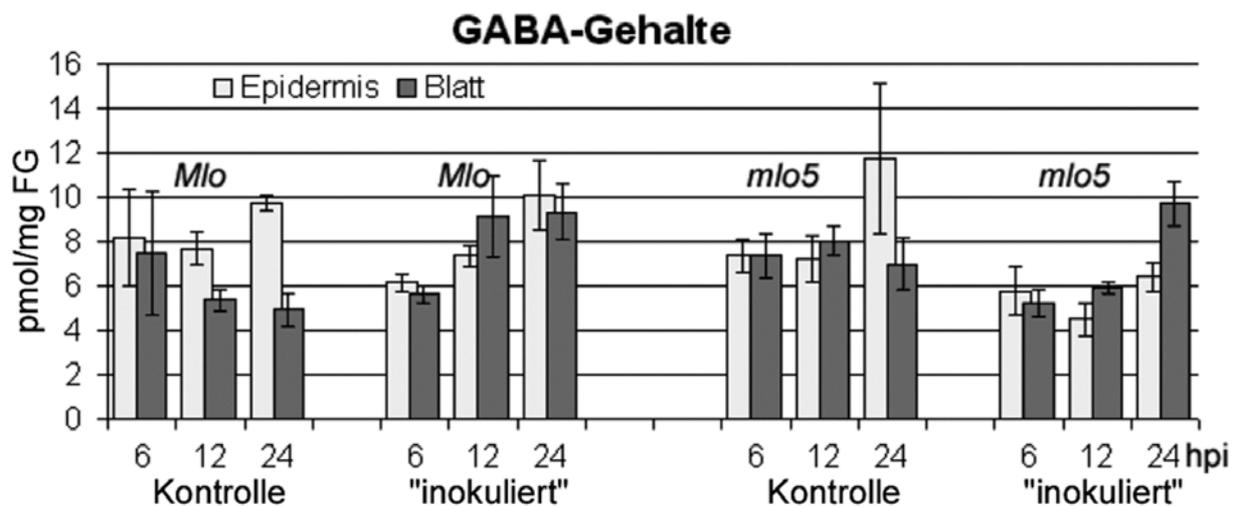
(71,6% Identität) mit CaM-Bindungsstelle ähnlicher als der OsGAD2 (65,1% Identität) ohne CaM-Bindungsstelle. Daher wird vermutet, dass die HvGAD ebenfalls eine CaM-Bindungsstelle besitzt. Die Sequenzbereiche der vermuteten CaM-Bindungsstelle hatten in beiden Fällen nur geringe Ähnlichkeit zu den OsGADs. Die abgeleitete HvGAD-Proteinsequenz wurde gegenüber der *conserved domain database* von NCBI verglichen. Da eine CaM-Bindungsstelle weder in den Gersten noch den Reissequenzen gefunden wurde, ist diese Analyse nicht informativ.



**Abbildung 3.27:** Regulationsfaktoren ( $\log_2$  „inokuliert“/Kontrolle) für ein Gen der Glutamat-Decarboxylase. (Mittelwerte aus zwei biologischen Experimenten)

### 3.4.2 GABA-Gehalte in Blättern von Gerste

Die GABA-Gehalte wurden in den isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5* nach Inokulation und gleichzeitig in Kontrollexperimenten mittels HPLC (*high pressure liquid chromatographie*) gemessen, um festzustellen, ob sich die Transkriptabundanz der GAD in den GABA-Gehalten widerspiegeln. Als Probenmaterial wurden abgezogene Epidermen und Blätter von sieben Tage alten Keimlingen (6, 12 und 24 hpi) verwendet.



**Abbildung 3.28:** GABA-Gehalte (pmol/mg Frischgewicht) in Epidermis und Blattmaterial in den isogenen Linien Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*. Die Streuungsbalken zeigen den Standardfehler an.

Zunächst sollen die beiden Gewebe Epidermis und Restblatt verglichen werden. Im Gegensatz zu den in der Analyse zusätzlich gemessenen, im Restblatt bis zu 20-fach höher konzentrierten, proteinogenen Aminosäuren, war GABA in der Epidermis und im Restblatt in etwa gleicher Konzentration vorhanden (Tabelle 3.12; Abbildung 3.28). Beim Vergleich der inokulierten Pflanzen mit den Kontrollen fällt auf, dass es nach Inokulation weder im Restblatt noch in der Epidermis zu gravierenden Veränderungen der GABA-Konzentrationen kommt. Bemerkenswert ist, dass in der Epidermis *mlo*-resistenter Gerste geringere GABA-Gehalte als im Wildtyp gemessen wurden. Im Vergleich zur HvGAD Transkriptabundanz ist hier ein gegenläufiger Trend zu sehen.

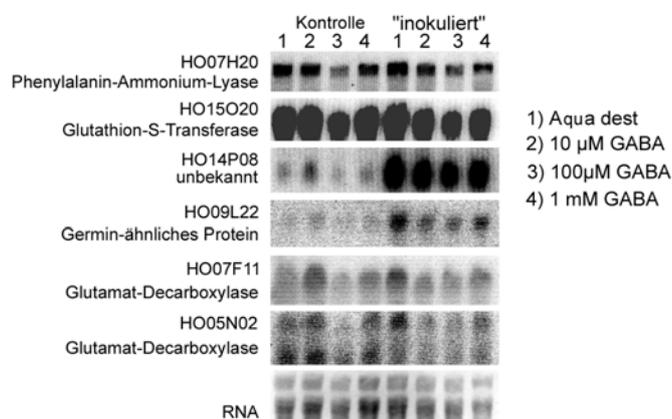
### 3.4.3 Resistenzinduktionsexperimente: GABA als Signalmolekül

Um herauszufinden, ob GABA eine Rolle bei der Signalweitergabe in den Pflanzen spielt, wurden weiterhin zwei Resistenzinduktionsexperimente mit siebentägigen Gerstenkeimlingen durchgeführt. Verschiedene GABA-Konzentrationen (Aqua dest., 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 1 mM) wurden getestet. In Experiment 1 wurde GABA auf die Pflanzen gesprüht, und in Experiment 2 wurde GABA von abgeschnittenen Blättern im Transpirationsstrom aufgenommen. 24 Stunden nach der GABA-Behandlung wurde inokuliert. Nach vier Tagen wurden die entstandenen Mehltaukolonien nach (Schweizer *et al.* 1995) bonitiert. In beiden Experimenten war kein Einfluss von GABA auf die Resistenz gegen *Bgh* festzustellen. Beide Genotypen verhielten sich wie die entsprechenden Kontrollen (Tabelle 3.11).

Parallel zu den Resistenzinduktionsexperimenten wurden von gleichzeitig inokulierten und GABA-behandelten Pflanzen (Aqua dest. 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 1 mM) Proben für *Northern-Blots* genommen. Probenmaterial für die in Abbildung 3.29 gezeigten *Northern-Blots* waren also Blattabschnitte, die 24 Stunden nach GABA-Behandlung inokuliert wurden (Experiment 2). Probennahme war 48 hpi.

**Tabelle 3.11:** Resistenzinduktionsexperimente mit Pflanzen der isogenen Linie Ingrid *Mlo* inokuliert mit *Bgh*. Die Prozentzahlen geben Auskunft über die Blattoberfläche, die mit Mehltau überwachsen war.

	Aqua dest.	10 $\mu$ M GABA	100 $\mu$ M GABA	1mM GABA
Experiment 1	7,8%	9,8%	10,2%	8,8%
Experiment 2	10,8%	11,8%	12,3%	10,8%



**Abbildung 3.29:** Einfluss von GABA auf die Transkription von zufällig ausgewählten pathogenregulierten Genen einschließlich GAD.

Während ein Gen unbekannter Funktion (Klon HO14P08) und das GLP4-Gen (Klon HO09L22) pathogeninduziert waren, war das PAL-Gen (Klon HO07H20) und das GST-Gen (Klon HO15O20) in den nichtinokulierten Pflanzen wahrscheinlich bereits durch Wundstress induziert. Die Expression des HvGAD-Gens selbst (Klone HO07F11 und HO05N02) war weder durch GABA noch durch das Pathogen induzierbar. Dies bestätigt die *Northern-Blot*-Experimente, die ebenfalls mit „Gesamtblatt“-Material gemacht wurden (siehe Abbildung 3.19). Möglicherweise wird das Signal der epidermal exprimierten HvGAD von kreuzhybridisierenden konstitutiv exprimierten GAD-Genen des Mesophylls überlagert. Eine Induktion durch GABA konnte also für keines der getesteten Gene in Experiment 1 und Experiment 2 (Daten nicht gezeigt) gezeigt werden.

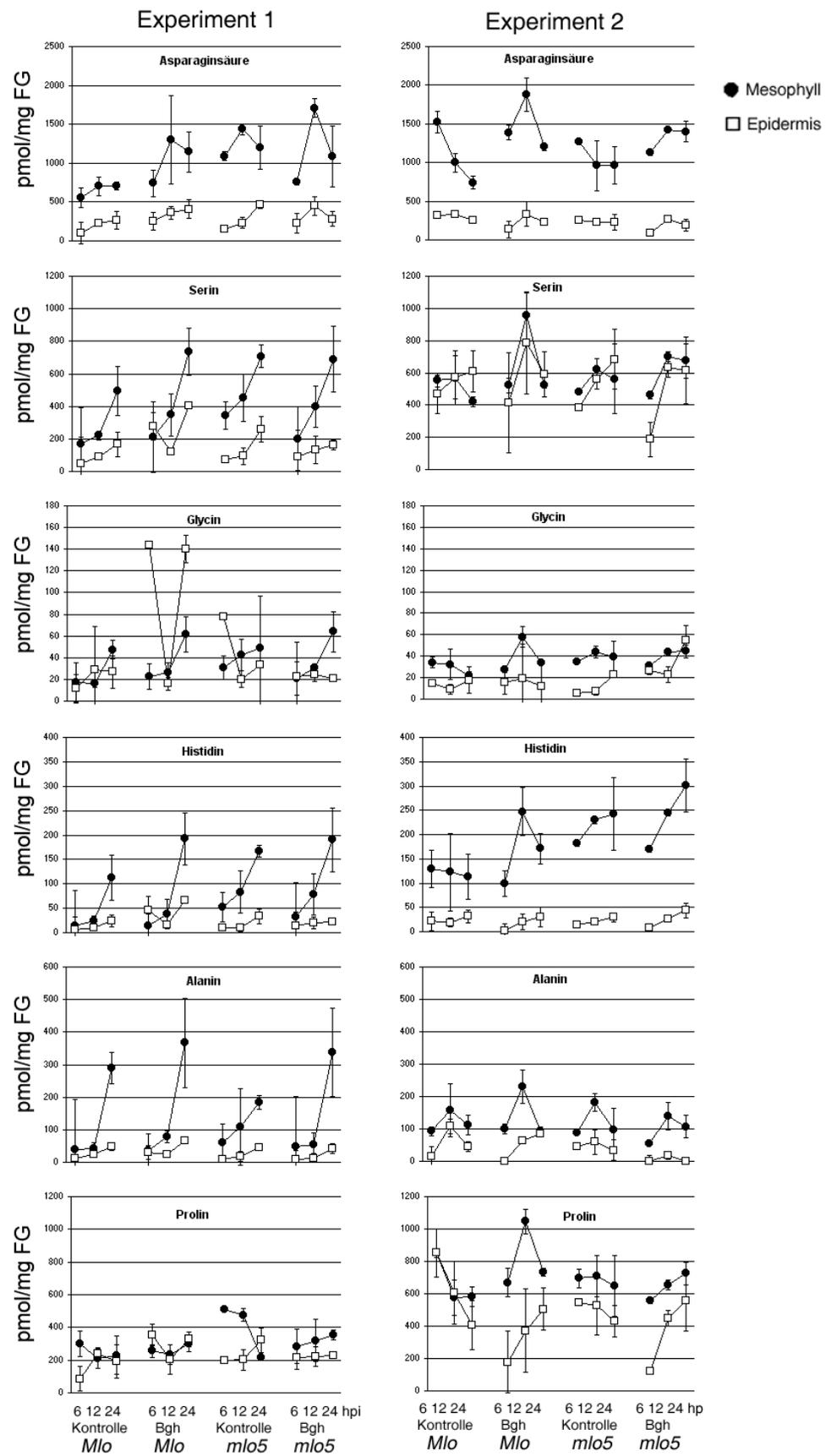
### 3.4.5 Gehalte proteinogener Aminosäuren

Im Rahmen der GABA-Messungen wurden außerdem alle proteinogenen Aminosäuren in den isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid *mlo5*, nach Inokulation und gleichzeitig in Kontrollexperimenten, in der Epidermis und im restlichen Blatt gemessen (Abbildung 3.30 A-C). Eine deutliche, reproduzierbare Veränderung der Gehalte bestimmter Aminosäuren nach Pathogenbefall konnte nicht beobachtet werden. Dennoch wurden die meisten Unterschiede in der Epidermis sichtbar (Tabelle 3.12 B). Während die meisten Aminosäuren im Mesophyll wesentlich höhere Konzentrationen aufweisen, waren Glycin, Serin und Prolin wie GABA in der Epidermis weniger stark verdünnt (Tabelle 3.12 A).

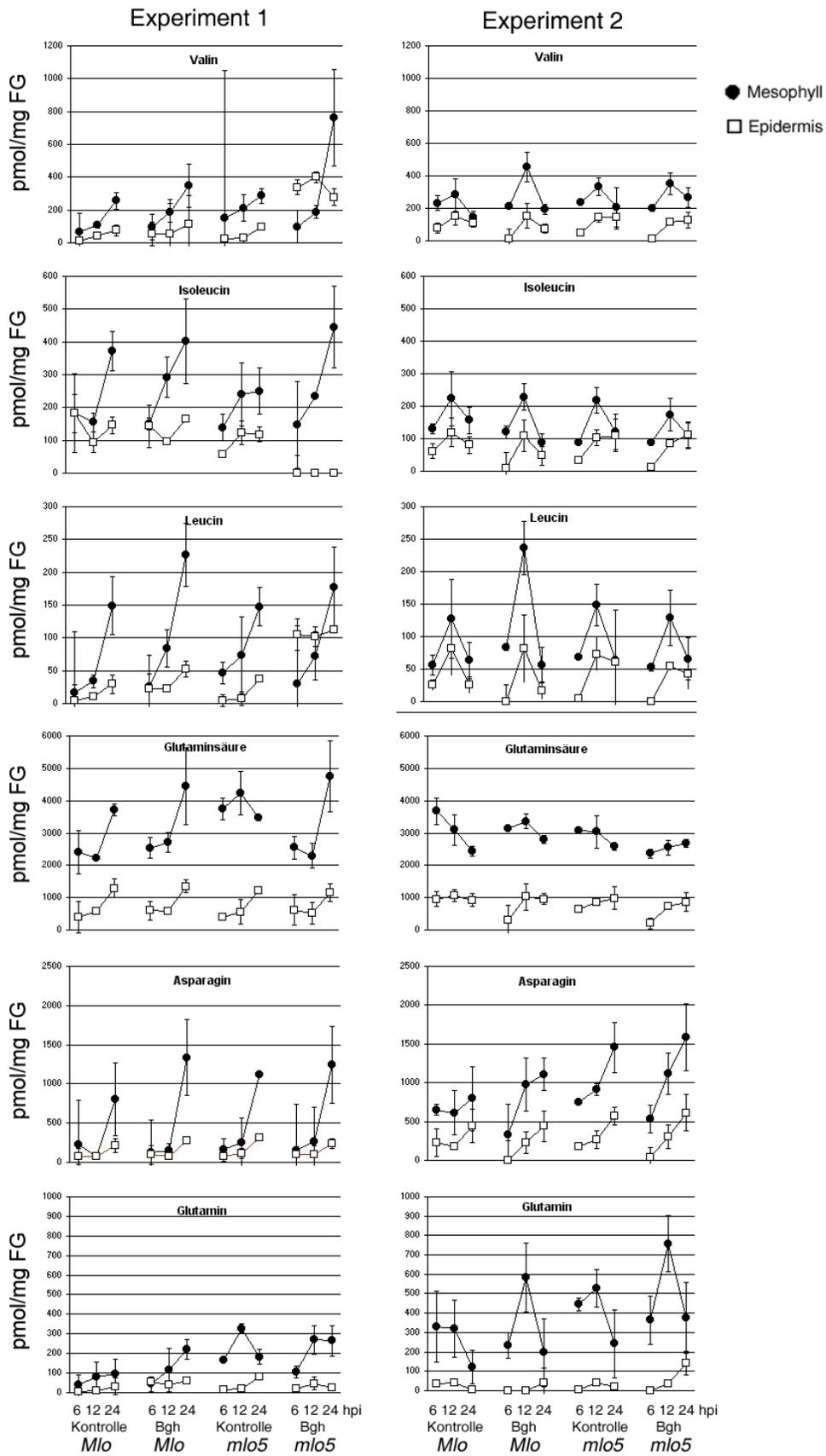
**Tabelle 3.12 A:** Verhältnis der AS-Gehalte von Mesophyll zu Epidermis. Grau unterlegt wurden Verhältnisse <2. **B:** Verhältnis der AS-Gehalte von inokulierten Pflanzen zu Kontrollpflanzen in der Epidermis und im restlichen Blatt in den isogenen Linien. Rot unterlegt wurden Verhältnisse >2, grün Verhältnisse <0,5. (Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Experimenten; \*Effekt nicht reproduzierbar)

Aminosäure	A) Mesophyll zu Epidermis				B) „inokuliert“/Kontrolle			
	Ingrid <i>Mlo</i>		Ingrid BC <i>mlo5</i>		Epidermis		Blatt	
	Kontrolle	<i>Bgh</i>	Kontrolle	<i>Bgh</i>	<i>Mlo</i>	<i>mlo5</i>	<i>Mlo</i>	<i>mlo5</i>
GABA	0,6	1	0,8	1,3	0,9	0,6	1,6	0,9
Methionin	3	1,9	5,2	0,1	2,0	95,8*	1,3	1,3
Glycin	1,5	0,7	1,3	1,4	3,2*	0,9	1,4	1,0
Serin	1,2	1,3	1,5	1,8	1,3	0,8	1,4	1,0
Prolin	1,2	1,7	1,5	1,7	0,8	0,8	1,1	0,9
Lysin	2,3	2,1	1,5	2,1	1,0	0,7	0,9	1,0
Leucin	2,5	3,1	2,8	1,2	1,3	2,3	1,6	1,0
Valin	2,3	3,2	2,9	1,4	1,0	2,8	1,4	1,3
Isoleucin	1,8	2,1	1,9	9,3	0,9	0,2*	1,0	1,1
Alanin	1,9	2,5	2,2	4,7	0,9	0,5	1,2	1,1
Threonin	1,9	2,7	2,7	3,5	0,9	0,7	1,3	1,0
Tyrosin	2	2,7	3,6	2,8	1,7	0,8	2,3*	0,6
Phenylalanin	2	2,7	2,9	4,3	1,14	0,62	1,5	0,9
Arginin	2,9	2,6	3,5	3,3	1,47	0,97	1,3	0,9
Asparagin	2,6	3,4	3	3,9	0,97	0,81	1,3	1,1
Glutaminsäure	3,4	3,9	4,3	4,2	0,92	0,87	1,1	0,8
Asparaginsäure	3,5	4,4	4,4	4,9	1,15	0,96	1,5	1,1
Histidin	4,6	4	8,2	8,1	1,7	1,07	1,5	1,1
Glutamin	8,5	5	9,3	8,4	2,37	1,26	1,4	1,1

Eindeutige Resistenzmarker, die mit *mlo*-vermittelter Resistenz in Verbindung stehen, konnten nicht gefunden werden (Tabelle 3.12 B). Lediglich für die Aminosäuren Valin und Leucin wurde eine Konzentrationsverdopplung (gemittelt für alle Zeitpunkte) in der Epidermis *mlo*-resistenter Gerste gemessen. Ein nicht reproduzierbarer, aber drastischer Effekt in der Epidermis *mlo*-resistenter Gerste wurde für Methionin gezeigt. In einem Experiment wurde ein hundertfacher Anstieg der Methioninkonzentration gemessen (Abbildung 3.30 C). Bemerkenswert ist, dass die Isoleucinkonzentration in der Epidermis inokulierter *mlo*-resistenter Gerste sehr niedrig ist, und im Mesophyll dagegen ansteigt (Tabelle 3.12 B). Allerdings war auch dieser Effekt nicht reproduzierbar (Abbildung 2.30 B).



**Abbildung 3.30 A:** AS-Gehalte (pmol/mg Frischgewicht) in Epidermis und Blattmaterial von Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*. Die Streungsbalken zeigen den Standardfehler.



**Abbildung 3.30 B:** AS-Gehalte (pmol/mg Frischgewicht) in Epidermis und Blattmaterial von Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*. Die Streungsbalken zeigen den Standardfehler.

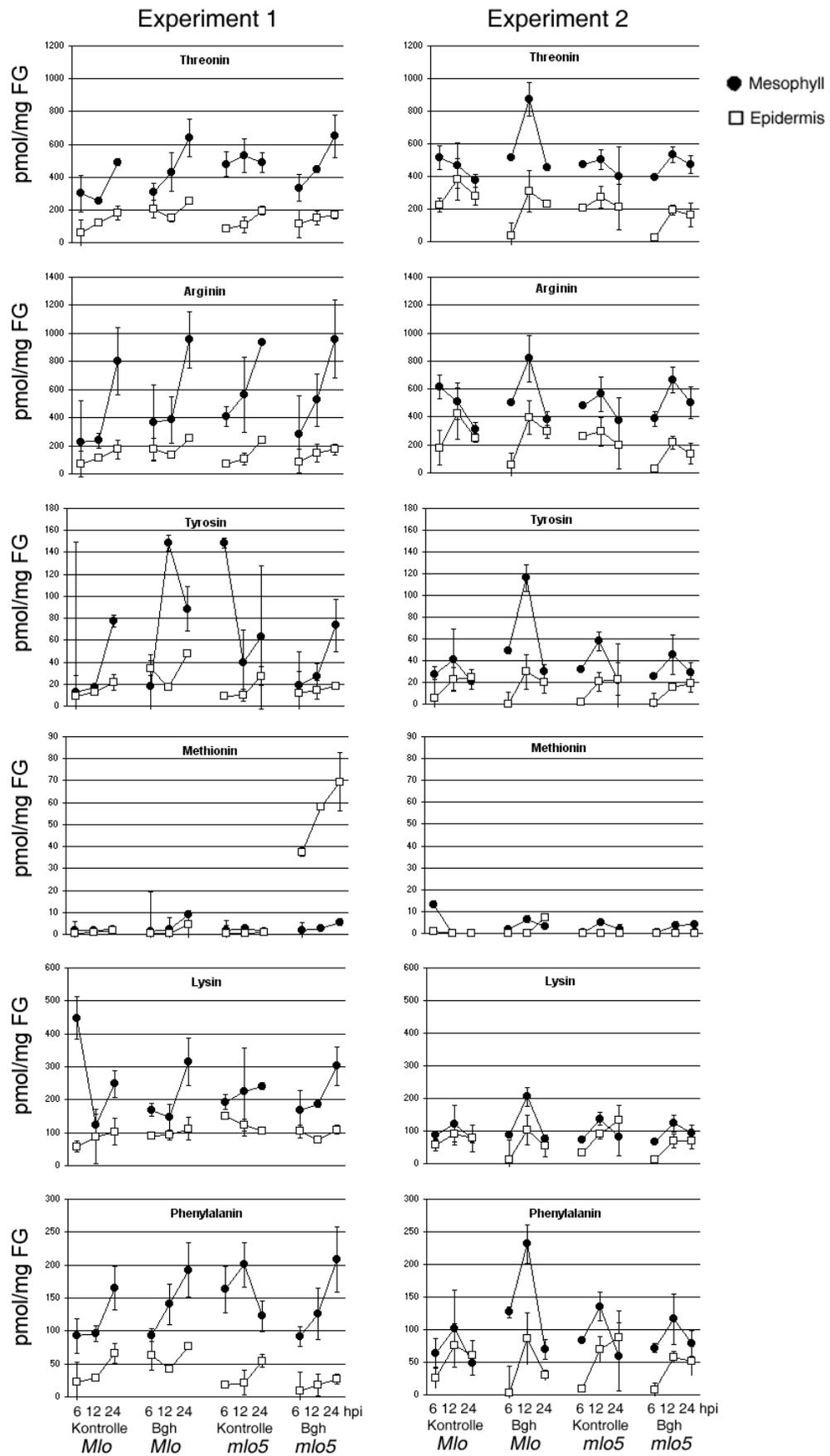


Abbildung 3.30 C: AS-Gehalte (pmol/mg Frischgewicht) in Epidermis und Blattmaterial von Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*. Die Streungsbalken zeigen den Standardfehler.



## 4. Diskussion

### 4.1 Etablierung von Ressourcen

Die Aufgabe der Arbeitsgruppe Transkriptomanalyse am IPK Gatersleben besteht darin, „Genfunktionen in der Gerste für Resistenz gegen Pilzkrankheiten in einem genomweiten Ansatz zu untersuchen“ (<http://www.ipk-gatersleben.de/de/02/04/04/index.html>). Im Mittelpunkt steht dabei das Modellsystem Gerste und *Bgh* (Schweizer *et al.* 1995; Schweizer *et al.* 1996; Schweizer *et al.* 1998; Schweizer *et al.* 1999; Schweizer *et al.* 1999; Schweizer *et al.* 2000; Schweizer *et al.* 2000; Christensen *et al.* 2004). Da die Arbeit in der Aufbauphase der Arbeitsgruppe entstand, wurden in diesem Rahmen grundlegende Ressourcen für die Transkriptomforschung im Modellsystem geschaffen. Dies waren:

- (1) eine cDNA-Bank (HO-cDNA-Bank) und eine EST-Kollektion (HO);
- (2) eine Plattform für Transkriptomanalysen im Modellsystem Gerste und *Bgh*; und
- (3) ein neu entwickeltes hochdurchsatztaugliches Klonierungsverfahren für RNAi-Konstrukte (Douchkov *et al.*, unveröffentlicht). Das Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals getestet und die Konstrukte wurden im TIGS-*Screening* eingesetzt (Kapitel 4.4).

#### 4.1.1 Die HO-cDNA-Bank

Die HO-cDNA-Bank repräsentiert das epidermale Transkriptom mehltauattackierter Gerste. Die Epidermis der Gerste ist ein hochspezialisiertes, differenziertes, nicht photoautotrophes Gewebe. Es wird angenommen, dass sich entscheidende physiologische und transkriptionelle Veränderungen nach Mehltaubefall in der Epidermis ausbilden. Die HO-cDNA-Bank, bestehend aus 14.592 Klonen, wurde aus den Epidermen von mehltauattackierten resistenten Gerstenkeimlingen der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* präpariert. Gründe für die Präparation der cDNA-Bank aus abgezogener Epidermis waren:

- 1) Die Interaktion von *Bgh* und Gerste bleibt in allen Entwicklungsstadien auf die Sprossepidermis beschränkt.
- 2) Das Epidermis-*Blumeria*-System ist ein System von reduzierter Komplexität.
- 3) Mit theoretischen Berechnungen wurde gezeigt, dass in cDNA-Banken, die aus dem gesamten Blatt präpariert wurden, nur jeder zwanzigste Klon ein in der Epidermis exprimiertes Gen repräsentiert. Ursache dafür ist, dass nur ca. fünf Prozent der mRNA eines Blattes aus der Epidermis stammen. Der restliche Anteil resultiert aus den wesentlich dichter gepackten Mesophyllzellen (Kapitel 3.2.3.1).

Die Anreicherung der cDNA-Bank mit epidermisspezifischen Transkripten konnte rückwirkend experimentell, auch anhand der Transkriptomanalysedaten mit Mesophyll- bzw. „Gesamtblatt“-Sonden, bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2.3.4).

Insgesamt wurden von der HO-cDNA-Bank im Rahmen dieses Projektes 5.952 Klone sequenziert. Dabei entstanden 5.163 5'-ESTs, die in die EST-Kollektion des IPK integriert wurden und diese ergänzen (Zhang *et al.* 2004). Innerhalb der sequenzierten ESTs wurden 3.595 Unigene gefunden. Zahlreiche Sequenzen waren bisher in keiner Sequenzdatenbank vorhanden. In einem *Clustering*-Projekt mit 135.031 ESTs der Gerste wurden beispielsweise 294 HO-spezifische Cluster gefunden (siehe Kapitel 3.1). Sowohl die cDNA-Klone als auch die ESTs stehen für zahlreiche weitere Projekte, unter anderem für die Erstellung von RNAi-Bibliotheken für TIGS-*Screening*-Ansätze, zur Verfügung.

### 4.1.2 Large-scale-Transkriptomanalyse im Pathosystem Gerste und Mehltau

Bei *large scale* Transkriptomanalysen auf der Basis von Arrays, wie sie im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, handelt es sich um erst kürzlich in der Pflanzengenomforschung etablierte Methoden, die entweder auf der Basis von cDNA- und Oligonukleotid-Mikroarrays oder auf Makroarrays beruhen. Erste Analysen in Pflanze-Pathogen-Modellsystemen wurden im Jahre 1999 bekannt. Seither wurden ca. 20 Analysen, darunter eine im Modellsystem *Gerste und Bgh* veröffentlicht (Maleck *et al.* 2000; Reymond *et al.* 2000; Ramonell *et al.* 2002; Scheideler *et al.* 2002; Huitema *et al.* 2003; Tao *et al.* 2003; Yazaki *et al.* 2003; Caldo *et al.* 2004; Cluzet *et al.* 2004; Dowd *et al.* 2004; Eulgem *et al.* 2004; Manthey *et al.* 2004; Moy *et al.* 2004; Narusaka *et al.* 2004; Ros *et al.* 2004; Verhagen *et al.* 2004; Voelckel und Baldwin 2004; Zhang *et al.* 2004). Eine Übersicht ist in Tabelle 1.1 gezeigt.

Auf dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Makroarray sind ca. 3.136 Unigene der HO-cDNA-Bank in Form von cDNA-Fragmenten vorhanden, die einen Teil des epidermalen Transkriptoms repräsentieren. Neben der hier vorliegenden Transkriptomanalyse in der Epidermis mehltaubefallener Gerste wurde der Array in Kooperationsprojekten des IPK mit Torben Gjetting (RISOE, Dänemark) und Pietro Piffanelli (CIRAD, Frankreich) genutzt. Hierbei wurde die Möglichkeit getestet, den Array für Untersuchungen einzelner Zellen bzw. zur Untersuchung des Transkriptoms von mit *Magnaporthe grisea* befallenen Reis zu nutzen. Von Gjetting *et al.* (2004) wurde eine Methode etabliert, die es möglich macht, RNA aus einzelnen Zellen zu gewinnen. Mit der daraus synthetisierten cDNA wurden PCR-amplifizierte Sonden für *Dot Blots* hergestellt, mit denen bekannte pathogeninduzierte Gene detektiert werden konnten (zum Beispiel GLP4, PR17a, PR17b, 14-3-3a, Prx7, Prx8) (Gjetting *et al.* 2004). In ersten Versuchen wurde der hier erstellte Array mit diesem Material getestet.

Anfang 2000 stand keine Plattform für Transkriptomanalysen in Gerstenepidermis zur Verfügung. Daher wurde beschlossen eine derartige Plattform auf der Basis von cDNA-Makroarrays aufzubauen. Der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erstellte Makroarray (5x5 *Spotting*) mit 3.136 Unigenen der HO-cDNA-Bank stellt den Vorläufer eines umfassenderen Makroarrays (6x6 *Spotting*) mit 10.480 Unigenen der Gerste dar. Von diesem wurden 600 Membranen hergestellt. Gründe für die Wahl der makroarraybasierten Plattform auf Nylonmembranen waren: 1) Makroarrays sind im Vergleich zu Mikroarrays, die auf Glasobjektträgern durchgeführt werden, einfacher und schneller herzustellen, da die Bindung der Nukleinsäuren an Nylonmembranen sehr effizient ist. 2) Makroarrays sind kostengünstiger, zumal die Methoden und die Robotertechnik in der Arbeitsgruppe Expressionskartierung des IPK bereits etabliert waren (Sreenivasulu *et al.* 2002; Potokina *et al.* 2004). *Know-how*-Transfer konnte so sehr effizient durchgeführt werden.

Eine weitere Plattform für Expressionsstudien in Gerste, die mit dem hier erstellten Array konkurriert, ist der kürzlich entwickelte, wesentlich teurere Oligonukleotid-basierte Mikroarray der Firma Affymetrix (Barley1 GeneChip) mit einem Unigeneset der Gerste, für dessen Design ca. 350.000 ESTs aus 84 EST-Kollektionen (einschließlich der am IPK erzeugten ESTs) und 1.145 bekannte cDNA- und Gensequenzen von Gerste verwendet wurden ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Mit Hilfe eines stringenten Sequenz-*Clusterings* (*CAP3-Clustering*) wurden hier 53,030 vorläufige Unigene (26,634 Contigs and 26,396 Singletons) ermittelt (Close *et al.* 2004). Tatsächlich wurden aber nur 22.600 Gene auf den Array gespottet. Außerdem überlappen sich der IPK-Unigen-Array und der Affymetrixchip nur teilweise. 30% der Gene des IPK-Unigen-Arrays sind nicht auf dem Affymetrixchip vorhanden (persönliche Mitteilung Scholz, IPK Gatersleben).

Allgemein konnte gezeigt werden, dass mit der verwendeten Makroarraytechnologie trotz einer gewissen Fehlerbehaftung (Abbildung 3.17) ein Pflanze-Pathogen-Interaktions-transkriptom analysiert werden kann. Hierfür lassen sich zahlreiche Belege anführen:

- (1) Mit den verwendeten Auswahlkriterien wurden 207 in beiden biologischen Experimenten reproduzierbare Transkriptmuster von pathogenregulierten Kandidatengenen gefunden (siehe Auswahlkriterien 3.2.2.1).
- (2) In der Kandidatengenauswahl befinden sich zahlreiche bekannte pathogenregulierte Gene der Gerste (zum Beispiel Chitinase 2b=PR-3 Klon: HO14K07; Protease-Inhibitor=PR-6 Klon: HO14F24; pBH6-12: Klon HO14D20; PAL: Klon HO13H24; GRP94=Endoplasmin Klon: HO05L01; GLP4=Klon HO09L22 (Gregersen *et al.* 1997)).
- (3) Etwa zwei Drittel der annotierten Kandidatengene wurden in der Literatur allgemein als stressinduziert beschrieben (Suchanfrage: „stress & plant“ und „pathogen & plant“, ISI Web of Science, [www.isinet.com](http://www.isinet.com)).
- (4) Mit *Northern-Blots* war es möglich ca. 90% der ausgewählten Kandidatengene zu bestätigen (siehe Kapitel 3.2.5).
- (5) Bekannte epidermis- und mesophyllspezifisch exprimierte Transkripte ließen sich über den EM-Wert korrekt zuordnen (Abbildung 3.12). Nahezu alle mehrfach vorhandenen Spots, die ein cDNA-Fragment von HvGLP4 enthielten, ergaben erwartungsgemäß eine epidermisspezifische Expression für das HvGLP4-Gen.
- (6) Verschiedene, auf dem Array vorhandene cDNA-Fragmente des gleichen Gens (Amplifikation von unterschiedlichen Klonen ausgehend) ergaben ähnliche Expressionsmuster (siehe Abbildung 3.16).

- (7) Erwartungsgemäß hatten *Bgh*-Transkripte ihren Expressionsschwerpunkt in der Epidermis (hohe EM-Werte), da sie in der Epidermispräparation angereichert wurden (Abbildung 3.12).
- (8) Durch Einführung des Differentialindex (DI) waren auch genotypspezifische Unterschiede der Genexpression nachzuweisen (Abbildung 3.9).

Im Vergleich zu genspezifischeren Oligonukleotid-Arrays stellt sich bei cDNA-basierten Arrays die Frage nach kreuzhybridisierenden Transkripten homologer Gene. Kreuzhybridisierungen von Gersten- und *Bgh*-Transkripten sollten aufgrund der geringen Abundanz der *Bgh*-Transkripte und des unterschiedlichen GC-Gehaltes kein Problem darstellen. Dagegen sind Kreuzhybridisierungen von stark homologen Genen möglich. Ein weiteres Problem stellen Mischsignale des gleichen Gens aus unterschiedlichen Geweben dar. Eine mögliche Fehlerquelle in der hier vorliegenden Transkriptomanalyse sind Verunreinigungen der Epidermissonden mit Mesophyllresten. Beispiele dafür, dass Gene in der Epidermis und im Mesophyll unterschiedlich reguliert zu sein scheinen, sind HvSNAP34 und HvGAD. Die reproduzierbaren Expressionsmuster in der Epidermis aus der Arrayanalyse ließen sich nicht mit „Gesamtblatt“-*Northern-Blots* bestätigen (Abbildung 3.18 bzw. Abbildung 3.8).

#### 4.1.3 Das TIGS-Screening System

Prinzipiell ist es möglich, die dsRNA für RNAi (RNA-Interferenz) in Pflanzen *in vitro* als auch *in vivo* zu synthetisieren. Die *in vivo* Synthese (in der Pflanze) der dsRNA hat sich in letzter Zeit mehr und mehr durchgesetzt, da so ständig neusynthetisierte genspezifische dsRNA in der Zelle zur Verfügung steht, was die *silencing*-Effizienz erhöht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neu entwickeltes hochdurchsatztaugliches Klonierungsverfahren für RNAi-Konstrukte auf der Basis von „Gateway“-Vektoren (Douchkov *et al.*, unveröffentlicht) erstmals getestet. Die Konstrukte wurden im TIGS-*Screening* eingesetzt (Kapitel 4.4).

- (1) Das neu entwickelte Klonierungssystem war effizient. Von 171 geplanten RNAi-Konstrukten konnten 128 gleichzeitig erstellt werden. Mittlerweile wurde das Klonierungsverfahren insofern verfeinert, dass anstelle von *EcoRV* ein 8 Basenpaar schneidendes Restriktionsenzym (*SwaI*) beim Ligationsschritt in den Zwischenvektor verwendet wird. Mit diesem ist es möglich, noch höhere Ausbeuten bei der Erzeugung der RNAi-Konstrukte zu erreichen (ca. 90%) (Douchkov *et al.*, unveröffentlicht).
- (2) Mit dem hier durchgeführten systematischen TIGS-*Screening* wurde die Funktionalität dieses neu etablierten Systems gezeigt, indem mit einem von 128 getesteten RNAi-Konstrukten (HvSNAP34: Klon pIPKTA30\_HO12F09) die *mlo*-vermittelte Resistenz im Testsystem durchbrochen werden konnte.
- (3) Mit *Pools* verschiedener RNAi-Konstrukte war es entgegen unserer Erwartungen allerdings nicht möglich die Resistenz zu durchbrechen.
- (4) Innerhalb einer Arbeitswoche (eine Arbeitskraft) war es möglich, 24 Kandidatengene in TIGS-Ansätzen zu testen und auszuwerten.
- (5) Problematisch waren TIGS-*Screening*-Serien mit Inokulationsstärken über 200 Sporen/mm<sup>2</sup>. Hierbei wurden normalerweise anfällige Kontrollpflanzen (Ingrid *Mlo*) bereits relativ resistent, sodass einige Versuche nicht auswertbar waren. Es ist allgemein bekannt, dass mit Verwundung (Abschneiden, Bombardement), Alter, zunehmender Inokulationsstärke und Länge der Blätter die Anfälligkeit der Gerste für *Bgh* abnimmt (Bushnell 2002).

Mit dem Durchbrechen der *mlo*-vermittelten Resistenz durch transiente Unterdrückung der Expression von HvSNAP34 (Klon HO12F09) konnte die Funktionalität von TIGS-Experimenten mit den klonierten RNAi-Konstrukten belegt werden. Der Effekt von HvSNAP34 konnte durch Einzelbeschuss mehrfach reproduziert werden. In *Pools* wurde aber niemals ein RNAi-Effekt des HvSNAP34-Gens gezeigt. Möglicherweise wird die zelluläre Maschinerie, die für den RNAi-Effekt notwendig ist, mit *co*-bombardierten RNAi-Konstrukten überfordert. So stellen zum Beispiel die für RNAi notwendigen DICER-Proteine und RISK-Komplexe möglicherweise limitierende Faktoren dar, die bei *co*-bombardierten RNAi-Konstrukten nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen könnten (Abbildung 2.6).

#### 4.2 Das epidermale Transkriptom der Gerste nach Pathogenbefall

Nach der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze werden zahlreiche Stressreaktionen ausgelöst. Die Pflanze stellt ihren Stoffwechsel von „housekeeping“ auf „Abwehr“ um. Hieraus resultieren eine Reihe von basalen Abwehrreaktionen, die in den verschiedenen Modellsystemen abhängig von der Lebensweise des Pathogens einerseits ähnlich ablaufen, andererseits aber auch für das Pathosystem spezifische Merkmale aufweisen.

*Blumeria graminis* ist ein obligat biotropher Organismus. Daher hat sich, im Gegensatz zu nekrotrophen bzw. hemibiotrophen Pathogenen, ein Infektionsmechanismus ausgebildet, der der Pflanze möglichst wenig Schaden zufügt und der möglicherweise auf Tarnung, Detoxifikation von pflanzlichen Substanzen oder der Blockade von Signalkomponenten der Abwehr beruht (Panstruga und Schulze-Lefert 2002). Innerhalb des Modellsystems Gerste und *Blumeria* lassen sich prinzipiell drei verschiedene Formen von Resistenz unterscheiden. Diese sind die papillenassoziierte Nichtwirtsresistenz, die HR-assoziierte, R-Gen vermittelte, rassenspezifische Resistenz und die SNARE- und papillenassoziierte, *mlo*-vermittelte Breitbandresistenz (Panstruga und Schulze-Lefert 2002; Schulze-Lefert und Panstruga 2003). Ein gemeinsames Merkmal der Resistenzen ist, dass Gene der Basalabwehr durch PAMPs in kompatiblen als auch inkompatiblen Interaktionen reguliert werden und eine Reihe von basalen Abwehrreaktionen auslösen (Schweizer *et al.* 2000; Zipfel *et al.* 2004). Mit Arraystudien konnten hier zahlreiche elizitorregulierte Gene in Monokotylen als auch Dikotylen Pflanzen gezeigt werden (Ramonell *et al.* 2002; Cluzet *et al.* 2004; Fujiwara *et al.* 2004). Andererseits sollten aber auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Resistenzformen existieren. Die vorliegende Transkriptomanalyse in mehltaubefallenen Gerstenblättern hatte daher drei Schwerpunkte:

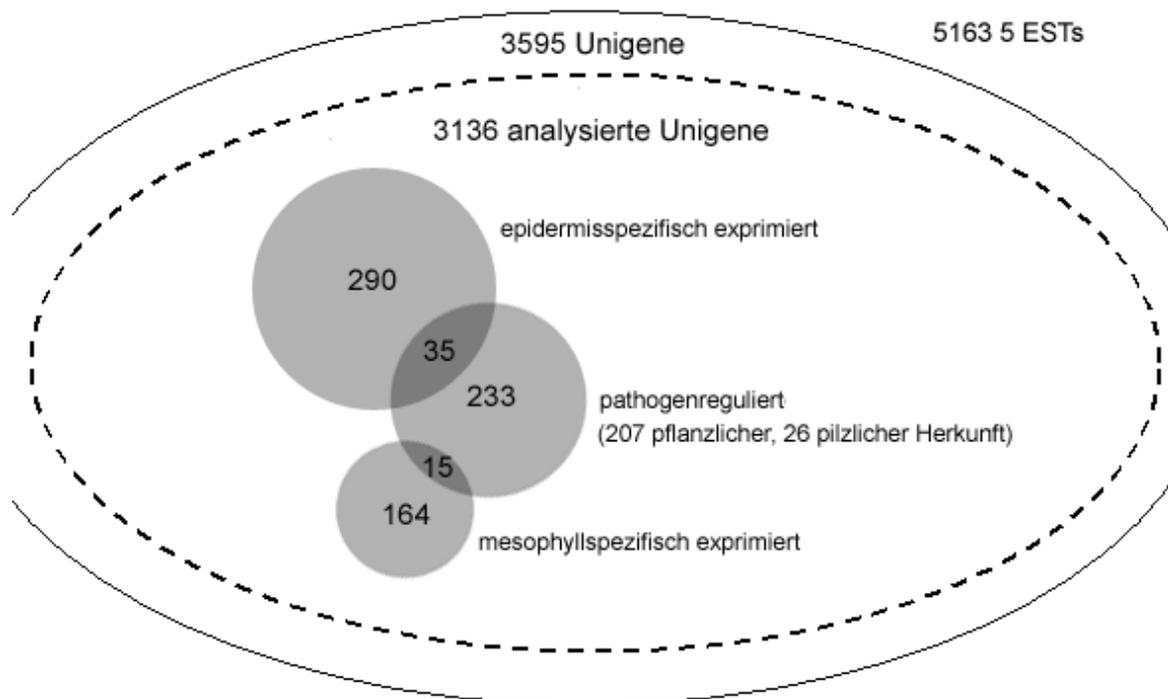
- (1) Beschreibung der basalen Abwehrmechanismen
- (2) Suche nach *downstream*-Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit
- (3) Lokalisierung der Genexpression im Blatt

#### Pathogenregulierte Gene im Pathosystem Gerste und *Bgh*

Arrayanalysen zu den oben beschriebenen Themenkomplexen wurden bisher im Pathosystem Gerste und *Blumeria* noch nicht durchgeführt. Die einzige kürzlich veröffentlichte Arrayanalyse beschränkt sich auf die Suche nach Komponenten der *Mla*-vermittelten Resistenz (Caldo *et al.* 2004).

Mit der vorliegenden Transkriptomanalyse konnte die bisher bekannte Anzahl von ca. 50 pathogenregulierten Genen (Christensen *et al.*, 2002) im Pathosystem Gerste und

*Blumeria* beträchtlich erhöht werden. Innerhalb von 3.136 analysierten Unigenen wurden 207 in beiden biologischen Experimenten reproduzierbare, pathogenregulierte, pflanzliche Gene gezeigt. Für zahlreiche Gene (47 Gene) wurden keine Sequenzhomologien zu annotierten Genen bekannter oder vermuteter Funktion gefunden, was bedeutet, dass es sich um völlig neue, unbekannte Gene handelt (Kategorien „unbekannt“ und „kein Treffer“). Die Gene mit Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen konnten in Gruppen wie Primär-, Sekundärmetabolismus, Photosynthese, Signalkomponenten, Transkription, Translation, Proteolyse, Zelltod, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Membran und Transport eingeteilt werden (Tabelle 3.0).



**Abbildung 4.1:** Circa 3.136 Unigene des epidermalen Interaktionstranskriptomts wurden analysiert. Es wurden 233 pathogenregulierte, 290 epidermisspezifisch exprimierte und 164 mesophyllspezifisch exprimierte Gene definiert.

Zusätzlich zu den 207 pflanzlichen Kandidatengenem wurden 26 pilzliche, vermeintlich „induzierte“ Gene detektiert. Bei einer geschätzten Anzahl von insgesamt 240 pilzlichen Genen auf dem Array (8 %), erscheint eine Zahl von 26 pilzlichen Genen relativ gering, da theoretisch alle pilzlichen Gene „induziert“ sein müssten. Ursache hierfür dürfte der geringe Anteil pilzlicher Biomasse im Vergleich zur Epidermis sein. Die Transkriptabundanz vieler Pilzgene dürften unterhalb der Detektionsgrenze liegen. In einer ähnlichen Transkriptomanalyse im Pathosystem Sojabohne und *Phytophthora sojae* waren von 820 induzierten Genen 517 pathogener Herkunft. Allerdings waren auf dem Array auch dreimal mehr Gene des Pathogens (ca. 800) vorhanden (Moy *et al.* 2004).

Mit 207 wird die Zahl pathogenregulierter Gene der Gerstenepidermis mit Sicherheit weit unterschätzt, da erstens nur ein Teil des epidermalen Transkriptomts (3.136 Gene) analysiert wurde und zweitens zahlreiche Transkripte unter der Nachweisgrenze lagen. Ferner waren die Auswahlkriterien für pathogenregulierte Gene relativ stringent, was sich in der hohen Bestätigungsrate von 90 % in den *Northern*-Experimenten widerspiegelt. In anderen Pflanze-

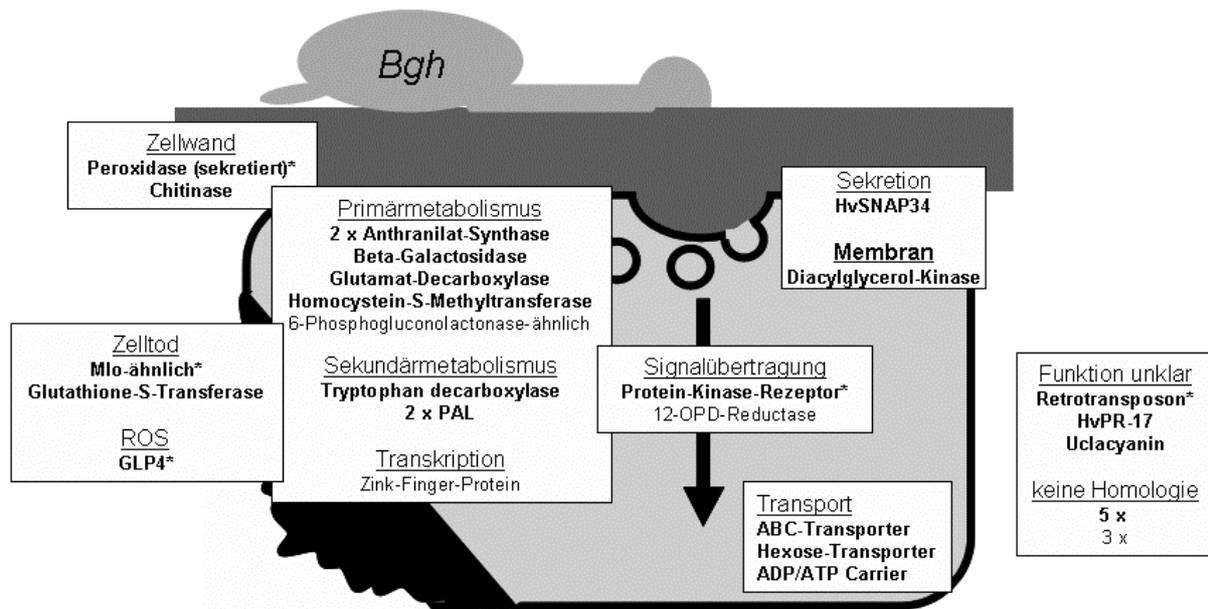
Pathogen-, Interaktionstranskriptomen“ wurden zum Teil Hunderte bis Tausende regulierter Gene beschrieben (Scheideler *et al.* 2002; Tao *et al.* 2003; Moy *et al.* 2004; Narusaka *et al.* 2004).

Von den 207 pathogenregulierten Genen waren 83% induziert und 17% reprimiert. Höchstwahrscheinlich werden in der Zeit von 6 bis 12 hpi zunächst mehr Gene induziert als reprimiert. 24 hpi kehrte sich dieser Trend zumindest in der inkompatiblen Interaktion um (Abbildung 3.2), sodass möglicherweise die Zahl reprimierter Gene mit den Auswahlkriterien des Kandidatengensets unterschätzt wird, da hier drei Zeitpunkte integrativ erfasst werden. Ein großer Teil der Gene wurde sowohl in der kompatiblen als auch der inkompatiblen Interaktion induziert (6 hpi 23 Gene, 12 hpi 90 Gene, 24 hpi 45 Gene; gemäß Auswahlkriterium 1; Kapitel 3.2.2.2, Tabelle 3.6). Die Amplituden der Regulation sind dabei in der inkompatiblen Interaktion stärker ausgebildet (Abbildung 3.4). Dies reflektiert die Tatsache, dass von beiden isogenen Linien das gleiche Set von PAMPS erkannt wird. Ähnliche Szenarien wurden auch in anderen Pathosystemen beschrieben, in denen inkompatible und kompatible Interaktionen miteinander verglichen wurden, so zum Beispiel im Pathosystem *Arabidopsis* und *P. syringae*. Auch hier wurde ein hoher Überlappungsgrad von Genen gefunden, die in beiden Interaktionen induziert waren. In der inkompatiblen Interaktion war auch hier, die stärkere pflanzliche Antwort auf das Pathogen zu sehen (Tao *et al.* 2003).

### **Suche nach genotypspezifischen Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit**

Der zweite Schwerpunkt der Untersuchung war die Suche nach *downstream*-Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit. Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) Die Abundanz pathogeninduzierter Transkripte war in *mlo*-resistenter Gerste erhöht. Der Effekt war sowohl in nichtinokulierten als auch in inokulierten Pflanzen zu sehen. In inokulierten Pflanzen war er stärker ausgebildet.
- (2) Es wurden 31 genotypspezifisch exprimierte Gene, bei denen es sich möglicherweise um Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit handelt, definiert (Abbildung 4.2, Abbildung 3.9). Genotypspezifisch exprimierte Gene, die nicht pathogenreguliert waren wurden nicht gefunden.
- (3) Von den 31 genotypspezifisch exprimierten Genen waren 25 resistenzassoziiert und nur sechs anfälligkeitsassoziiert. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Tatsache, dass die cDNA-Bank aus Epidermen *mlo*-resistenter Gerstenkeimlinge hergestellt wurde. Daher sind Komponenten, die in Zusammenhang mit Anfälligkeit stehen, möglicherweise unterrepräsentiert (Kapitel 4.2.1).
- (4) Funktionelle Zusammenhänge aufgrund von Sequenzhomologien innerhalb der Auswahl genotypspezifisch exprimierter Gene wurden nicht gefunden.
- (5) Es wurden keine qualitativen Unterschiede in den Genexpressionsmustern einzelner Gene der isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5* gefunden.



**Abbildung 4.2:** Epidermiszelle mit Genen, die als genotypspezifisch exprimiert eingestuft wurden. Resistenzassoziierte Gene wurden in Fettdruck und anfälligkeitsassoziierte Gene wurden dünn dargestellt. Fünf der pathogenregulierten Gene waren epidermisspezifisch und gleichzeitig in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert (siehe „\*“).

Aufgrund der parallel durchgeführten Inokulation der beiden isogenen Linien mit einer Pilzrasse sind Unterschiede, verursacht durch den genetischen Hintergrund des Pathogens oder die Inokulationsstärke, unwahrscheinlich. Die beiden isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5* sollten sich aufgrund von sieben Rückkreuzungen genetisch stark gleichen. Allerdings sind restliche Donor-Genom-Blöcke im Modell Ingrid BC *mlo5* nicht völlig ausgeschlossen. Die Ergebnisse konnten durch den Vergleich der isogenen Linien Pallas (*Mlo*) und Pallas P22 (*mlo5*) bestätigt werden.

Durch Verwendung eines robusten Algorithmus in Kombination mit statistischer Analyse (siehe Differentialindex Kapitel 3.2.2.5) konnte zunächst für die Mehrzahl der pathogenregulierten Gene in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* eine stärkere Induktion bzw. Repression im Vergleich zu Ingrid *Mlo* gezeigt werden (Abbildung 3.7 A). Interessanterweise wurde dieser quantitative Effekt in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* nicht nur in den inokulierten sondern auch in den nichtinokulierten Pflanzen gefunden (Abbildung 3.7 B). Die Maxima der Regulationsfaktoren lagen bei den inokulierten Pflanzen allerdings weitaus höher.

Mittlerweile wurde die mRNA-Expressionsanalyse mehltreifiger Gerstenepidermis mit einer neu entwickelten *Open-source*-Analysemethode namens iGentifier der Firma Gentana weitergeführt (www.gentana.de). Diese Methode wurde dabei zum ersten Mal in Pflanzen getestet (Schweizer *et al.*, unveröffentlicht). Der Trend zur Anreicherung von PR-Gen-Transkripten in *mlo*-resistenter Gerste konnte bestätigt werden.

Dieser allgemeine quantitative Trend wird ferner durch Berichte von Peterhänsel *et al.* (1997) und Maucher *et al.* (2003) bestätigt, die für das PR1-Protein, eine Peroxidase, eine Chitinase und eine Allene-Oxid-Cyclase (AOC) eine stärkere Expression in der *mlo*-resistenten Interaktion zeigen konnten. Die Tatsache, dass die pathogenregulierten Kandidatengene auch in nichtinokulierten Pflanzen der resistenten Linie Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert wurden, korreliert mit der verstärkten Neigung zu spontanen Abwehrreaktionen (Zelltod, Papillenbildung) in axenisch angezogenen Pflanzen (Peterhänsel *et al.*, 1997). Möglicherweise handelt es sich daher bei der *mlo*-vermittelten Resistenz also um einen Mechanismus, der einen sogenannten *Priming*-Effekt auslöst (Conrath *et al.* 2002). Damit ist

die Fähigkeit von Pflanzen gemeint, nach Kontakt mit einem nekrotischen Pathogen oder einer natürlichen oder synthetischen Signalkomponente wie zum Beispiel SA,  $\beta$ -Aminobuttersäure oder BTH verstärkt Abwehrkomponenten zu bilden. Das würde bedeuten, dass sich die *mlo*-Pflanzen in einem „Vorwarnstadium“ befinden und entsprechende Abwehrmechanismen schneller ausbilden.

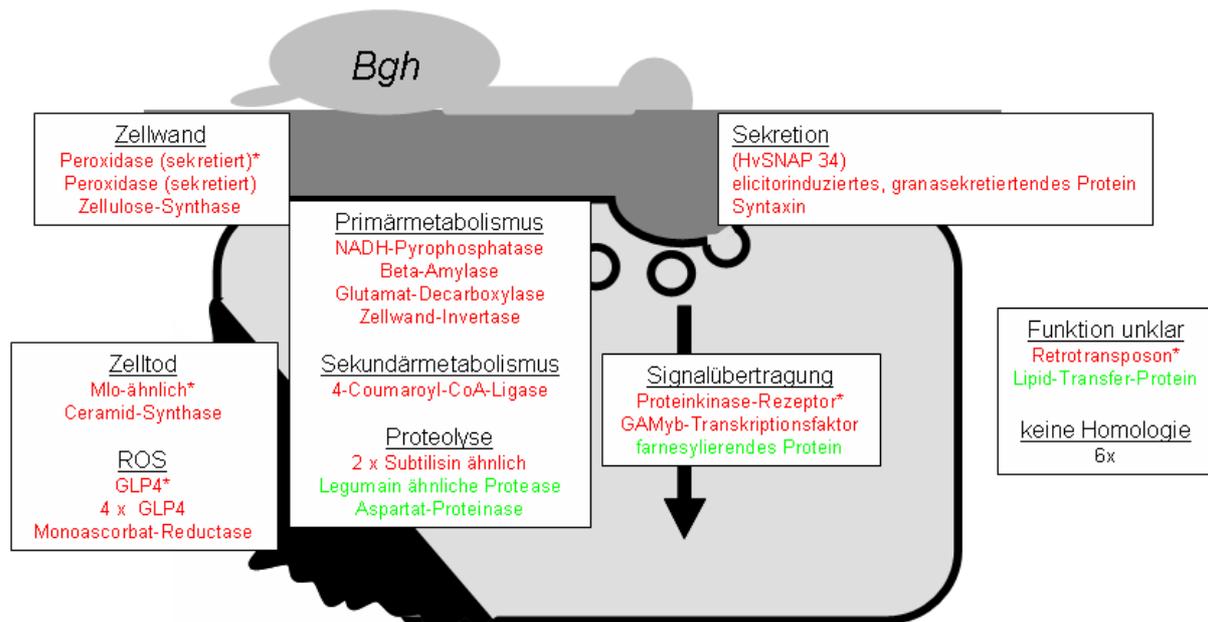
Entgegen unserer Erwartungen wurden keine qualitativen Unterschiede in den Genexpressionsmustern einzelner Gene der isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5* gefunden. Möglicherweise waren Spezifität und Sensitivität der Analyse zu gering, sodass entsprechende Gene entweder nicht ins Unigenet aufgenommen wurden oder durch eine zu geringe Transkriptabundanz auf dem Array nicht detektiert wurden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass keine qualitativen Unterschiede auf transkriptionellem Niveau existieren und die entscheidenden Weichenstellungen der *mlo*-vermittelten Resistenz durch posttranslationale Modifikationen von Proteinen ausgelöst werden, die in Signalkaskaden, Abwehr oder unbekannte Mechanismen verwickelt sind.

### **Gewebespezifische Expression: pathogenregulierte Gene wurden stärker in der Epidermis exprimiert**

Der dritte Schwerpunkt der Untersuchung war die Lokalisierung der Genexpression. Vermutlich werden viele Gene des Grundstoffwechsels etc. aufgrund ihrer physiologischen Funktion in der Epidermis und im Mesophyll gleichermaßen exprimiert. Andererseits sollten aber auch Gene existieren, die aufgrund ihrer Funktion ausschließlich in einem der beiden Gewebe exprimiert werden. Dies sind zum Beispiel Gene, die mit Photosynthese, Schließzellapparat oder Kutikulabildung assoziiert sind. Entscheidende pathogeninduzierte Veränderungen bei der pflanzlichen Abwehr werden im untersuchten Pathosystem Gerste und *Blumeria* höchstwahrscheinlich in der Epidermis ausgebildet, da die Interaktion auf die Epidermis beschränkt bleibt.

Die Lokalisierungsmethode konnte mit Markergenen, deren Expressionsort im Blatt bekannt ist, verifiziert werden. So wurden pilzliche und HvGLP4-Transkripte erwartungsgemäß in der Epidermis angereichert. Photosyntheseassoziierte Transkripte wurden dagegen im Mesophyll lokalisiert (Abbildung 3.11). Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) Die Mehrzahl der Gene wurde sowohl in der Epidermis als auch im Mesophyll exprimiert (Abbildung 3.13).
- (2) Die Vermutung, dass sich pathogeninduzierte Veränderungen im Transkriptom des Blattes verstärkt im epidermalen Teil ausbilden, konnte bestätigt werden (Abbildung 3.13 und Kapitel 3.2.3.4). Im Gegensatz zu einer Zufallsauswahl von Genen hatte die Mehrzahl der pathogenregulierten Kandidatengene ihren Expressionsschwerpunkt in der Epidermis ( $EM > 0$ ).
- (3) Insgesamt wurden 290 gemäss den festgelegten Kriterien epidermisspezifisch exprimierte Gene gefunden ( $EM > 2$ ). 35 dieser Gene waren pathogenreguliert (Abbildung 4.3). Ferner wurden 164 mesophyllspezifische Gene identifiziert ( $EM < -2$ ).
- (4) Es wurde gezeigt, dass Gene der Kategorien „Zellwand“, „Sekretion“ und „Reaktive Sauerstoffspezies“ hauptsächlich in der Epidermis exprimiert werden (Abbildung 3.13 B und 3.14). Möglicherweise reflektiert dies die Tatsache, dass bei der *mlo*-vermittelten Resistenz verstärkt Papillen gebildet werden, auf die die Resistenz vermutlich zurückzuführen ist.



**Abbildung 4.3:** Epidermiszelle pathogenregulierten Genen, die als epidermisspezifisch exprimierte Gene eingestuft wurden. Induzierte Gene wurden rot und reprimierte Gene wurden grün dargestellt. Fünf der pathogenregulierten Gene waren epidermisspezifisch und gleichzeitig in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert (siehe „\*“).

### **Reaktive Sauerstoffspezies, CWAs und die *mlo*-vermittelte Resistenz**

*mlo*-Pflanzen lassen die Entwicklung des Pilzes bis zur Ausbildung des PGT und des AGT zu. Im Penetrationsstadium (12 hpi) kommt es zum Abbruch der weiteren Entwicklung. Eine vermutliche Ursache hierfür sind die verstärkt gebildeten CWAs in *mlo*-Pflanzen, an denen bei der papillären *mlo*-vermittelten Resistenz wahrscheinlich verstärkt Wasserstoffperoxid an den Penetrationsstellen gebildet wird. Nachgewiesen wurde dies durch DAB-Färbung (3,3-diaminobenzidine) (Thordal-Christensen *et al.* 1997). Die Synthese von Wasserstoffperoxid wird im Zusammenhang mit Zellwand-crosslinking diskutiert. Das Protein HvGLP4 scheint aufgrund seiner extrazellulären Superoxiddismutase-Aktivität in die Bildung von Wasserstoffperoxid involviert zu sein (Christensen *et al.* 2004). Mit der vorliegenden Analyse konnte bestätigt werden, dass die sehr stark pathogeninduzierten Gene, die für HvGLP4 kodieren, ausschließlich in der Epidermis exprimiert sind. Es wurden vier verschiedene HvGLP4-Gene gezeigt (Tabelle 3.0). Insgesamt sind ca. ein Drittel der epidermalen, pathogenregulierten Gene im Zusammenhang (Zellwand, Sekretion und ROS) mit CWA-Bildung zu diskutieren (Abbildung 4.3).

In der Interaktion des hemibiotrophen Pilzes *Colletotrichum higginsianum* mit *Arabidopsis* kommt es gleichermaßen in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion zur Bildung von Papillen. Die resistente Interaktion korreliert, wie bei der *mlo*-vermittelten Resistenz auch mit der Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Das GLP4-Gen wurde hier interessanterweise nicht als pathogeninduziert beschrieben, wohl aber eine Superoxiddismutase und ein GLP3b-Gen (homolog zu HvGLP4) (Narusaka *et al.* 2004).

## ***Sekretion***

Im Zusammenhang mit der Papillenbildung sind auch die Komponenten der Kategorie „Sekretion“ zu sehen. Bei dem wohl bedeutsamsten Gen dieser Arbeit handelt es sich um HvSNAP34, das für ein in Sekretion involviertes t-SNARE Protein kodiert. Mit dem RNAi-Konstrukt gegen HvSNAP34 konnte in den TIGS-Versuchen die *mlo*-vermittelte Resistenz durchbrochen werden. HvSNAP34 wird in Kapitel 4.4.1 näher diskutiert.

## ***Sekundärmetabolismus und die mlo-vermittelte Resistenz***

Mit der vorliegenden Analyse war es möglich die Expressionsmuster vieler Gene, die für Enzyme des Shikimat-, des Phenylpropanoid- und des Tryptophan-Weges kodieren, zu untersuchen (Abbildung 3.21 und 3.23). Enzyme aus diesen Stoffwechselwegen sind höchstwahrscheinlich Komponenten der Basalabwehr, die in zahlreichen pflanzlichen Antworten auf Pathogene bzw. Elizitoren involviert sind (Reymond *et al.* 2000; Cluzet *et al.* 2004; Dowd *et al.* 2004; Moy *et al.* 2004; Voelckel und Baldwin 2004). Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) Es wurde gezeigt, dass der Stoffwechselweg, der zu Tryptamin führt, pathogeninduziert ist (mit einer Präferenz für stärkere Aktivierung in *mlo*-resistenter Gerste). Möglicherweise führt dies zur Bildung des Indolalkaloides Gramin (Abbildung 3.23 und 3.22).
- (2) Der Biosyntheseweg von Zimtsäurederivaten scheint in beiden isogenen Linien nach Pathogenbefall stark induziert zu sein (Abbildung 3.21).
- (3) Gene, die für Enzyme kodieren, die zur Bildung von Flavonoiden bzw. ligninartigen Substanzen führen, sind ebenfalls induziert (Abbildung 3.21 und 3.23).
- (4) Innerhalb der untersuchten Stoffwechselwege wurden ausschließlich induzierte Gene gefunden, was darauf hindeutet, dass entsprechende Sekundärmetabolite angereichert werden.

Die verstärkte Bildung von Zimtsäurederivaten wird möglicherweise durch die Induktion von Genen begleitet, die für Enzyme kodieren, welche an der Bereitstellung von Vorstufen des TCA-Zyklus beteiligt sind. Aus den Intermediate-Pools werden ständig Moleküle für den Shikimatweg und die Bildung phenolischer Verbindungen abgezogen. Derartige Enzyme sind zum Beispiel die stressinduzierte NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase (Klon: HO01P15) und die Glutamat-Decarboxylase (Klone HO05N02 und HO07F11). Während die GAD über ihr Produkt GABA möglicherweise eine anaplerotische Funktion im TCA-Zyklus erfüllt, (siehe Kapitel 4.4.2) entsteht bei der durch die plastidenständige Malat-Dehydrogenase katalysierten Reaktion aus Malat  $\text{CO}_2$  und Pyruvat. Pyruvat ist die Vorstufe von PEP, welches im TCA-Zyklus und bei der Synthese von Shikimat benötigt wird. Gleichzeitig entsteht bei dieser Reaktion NADPH, welches als Reduktionsäquivalent bei der Bildung von Phytoalexinen und Lignin bzw. ROS dienen könnte (Casati *et al.* 1999).

Die verstärkte Tryptaminsynthese steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Bildung des Indolalkaloides Gramin (N,N-dimethyl-3-aminomethylindol). Eine Tryptamin-N-Methyltransferase, die die notwendige Reaktion katalysiert, wurde in der HO-cDNA-Bank allerdings nicht gefunden. Matsuo *et al.* (2001) konnten aber zeigen, dass Gramingehalte ca. 12 Stunden nach Inokulation mit *Bgh* und Verwundung ansteigen und dass die Keimung von *Bgh*-Konidiosporen durch Gramin gehemmt wird. Gramin ist eine in Gerste konstitutiv vorhandene Substanz, die unter anderem eine resistenzvermittelnde Funktion gegenüber

Nematoden (Brandt *et al.* 1935) und Blattläusen (Zuniga *et al.* 1985) aufweist. Es wird vermutet, dass die steigenden Gramingehalte in Zusammenhang mit SAR stehen (Matsuo *et al.* 2001).

Mit pharmakologischen Untersuchungen, in denen Enzyminhibitoren gegen PAL und CAD eingesetzt wurden, wurde gezeigt, dass die Ablagerung von phenolischen Substanzen in den Papillen eine Barrierefunktion gegenüber der Penetration von Pathogenen hat (Zeyen *et al.* 1995). Ob die Lignin- bzw. Flavonoid-Biosynthese präferentiell in Ingrid BC *mlo5* hochreguliert ist, konnte anhand der Transkriptomdaten nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die verstärkte Bildung von Transkripten des Phenylpropanoidweges deutet aber darauf hin, dass ligninartige Substanzen bzw. Flavonoidderivate oder Hordatine verstärkt in *mlo*-resistenter Gerste gebildet werden. Von Röpenack *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die phenolische Substanz p-Cumaroylhydroxyagmatin, die eine Vorstufe der Hordatine darstellt, nach Pathogenbefall verstärkt in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* gebildet wurde. Ob die phenolische Verbindung p-Cumaroylhydroxyagmatin, die *in vitro* Phytoalexinaktivität besitzt (von Röpenack *et al.* 2000), oder Gramin tatsächlich eine Rolle bei der *mlo*-vermittelten-Resistenz oder bei der Basalresistenz in prinzipiell anfälligen Pflanzen die das *Mlo*-Gen tragen, spielen, bleibt unklar. Möglicherweise sind sie nur Nebenprodukte einer allgemein stärkeren Abwehrreaktion.

Interessanterweise beschreiben Caldo *et al.* (2004) ganz ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung *Mla*-resistenter bzw. *mlo*-anfälliger Gerste. Koordiniert regulierte Gene, die für Enzyme kodieren, welche an der Bildung von Tryptophan (Chorismat-Synthase, Anthranilat-Synthase) Phenylalanin und Tyrosin (Chorismat-Synthase, Chorismat-Mutase), phytoalexinen Phenylpropanoiden (Agmatin-Cumaroyl-Transferase, N-hydroxycinnamoyl/benzoyl-Transferase, Anthranilate-N-benzoyltransferase) und Lignin (Cinnamoyl-CoA-Reduktase) beteiligt sind, wurden gezeigt. 16 hpi geht die Bildung dieser Transkripte in der kompatiblen Interaktion zurück. Caldo *et al.* (2004) deuten dies als Unterdrückung von Komponenten der Basalabwehr durch den erfolgreichen Pilz.

### ***Photosynthese***

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse deuten darauf hin, dass die Photosynthese in den Schließzellen als Antwort auf das Pathogen reprimiert wird (innerhalb des Kandidatengensets waren vier Gene, die in Zusammenhang mit Photosynthese stehen reprimiert, Tabelle 3.0). Dies bestätigt Berichte über andere Pflanze-Pathogen-Interaktionen. Nach Befall von *Nicotiana attenuata* mit saugenden Insekten (Voelckel und Baldwin 2004) bzw. nach Fusariumbefall (*Fusarium oxysporum*) von Baumwolle (Dowd *et al.* 2004) kommt es beispielsweise ebenfalls zur Repression von Photosynthesegenen. Allerdings wurde hier nicht nach Geweben wie Epidermis und Mesophyll differenziert. Möglicherweise werden Energieressourcen nicht mehr für die Photosynthese verwendet sondern vielmehr zur Transkription und Translation von Abwehrkomponenten eingesetzt.

### ***Transport***

Von Interesse sind außerdem die vier pathogeninduzierten ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporter*), von denen drei zur Gruppe der PDR-ähnlichen (*pleiotropic drug resistance*) (Klone HO14E18; HO40A12; HO01L03) und einer (Klon HO03A06) zur Gruppe der MRP-ähnlichen Transporter (*multidrug resistance related protein*) gehören (Tabelle 3.0).

Der MRP-ähnliche Transporter (Klon HO3A06) war stärker in der isogenen Linie Ingrid BC *Mlo* exprimiert. ABC-Transporter sind ATP-getriebene Efflux-Pumpen, die in Detoxifikations- und Wachstumsprozesse verwickelt sind. Im Allgemeinen ist wenig über ihre Funktion und Substratspezifität bekannt (Martinoia *et al.* 2002). In phytopathogenen Pilzen allerdings wurden PDR-ähnliche ABC-Transporter beschrieben, die Resistenz gegenüber Phytoalexinen (Schoonbeek *et al.* 2001) und Fungiziden vermitteln (Deising *et al.* 2002). Möglicherweise funktionieren die hier gezeigten pflanzlichen ABC-Transporter in ähnlicher Weise, indem sie entweder an der Kompartimentierung der Zelle (Speicherung von Sekundärmetaboliten, wie zum Beispiel Phytoalexinen) oder aber am Transport von antifungalen Substanzen zu den Penetrationsorten beteiligt sind. Für AtPCR12 wird vermutet, dass dieser am Transport des Diterpenoids Sclareol beteiligt ist (Campbell *et al.* 2003). Die gezeigten Zuckertransporter spielen möglicherweise eine Rolle beim aktiven Transport von Zuckern durch die extrahaustoriale Membran. Verschiedene teilweise widersprüchliche Experimente zeigen, dass Glucose, Fructose und Sucrose von der Pflanze in den Pilz transportiert werden (Green *et al.* 2002). Möglicherweise haben die ABC- und Zucker-Transporter ein Potential für Resistenzzüchtung, da diese wahrscheinlich nicht an komplexen Reaktionen beteiligt, aber sehr substratspezifisch sind.

### ***Proteolysegene***

Proteinabbau hilft bei der Anpassung der Zelle an veränderte Umweltbedingungen, indem AS wiedergewonnen werden. Auffällig ist die große Anzahl von pathogenregulierten Genen (insgesamt sieben), die im Zusammenhang mit Proteolyse stehen. Vier der Gene waren epidermisspezifisch exprimiert, zwei reprimiert (Legumain-ähnliche Protease: Klon HO12H22; Aspartat-Proteinase: Klon HO13E23) und zwei weitere induziert (Serin-Proteasen: Klone HO10M21, HO14K19). Sechs der sieben Gene waren gemäß Definition genotypspezifisch exprimiert ( $-0,4 < DI < 0,4$ ). Dies reflektierte möglicherweise die unterschiedlichen Umbauprozesse innerhalb von anfälligen bzw. resistenten epidermalen Zellen.

Für die *downstream*-Komponente der *Mla*-vermittelten Resistenz HvRAR1 konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese mit HvSGT1 interagiert. HvSGT1 spielt eine Rolle im SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der möglicherweise in den Proteinabbau verwickelt ist (Azevedo *et al.* 2002).

### ***Signalweitergabe***

Eine der größten Gruppen der identifizierten pathogenregulierten Gene (Abbildung 3.3) bildet die Kategorie „Signalweitergabe“. Mit einem Anteil von 18% liegt diese Kategorie weit über der geschätzten Anzahl von 6,6% für alle ESTs (Zhang *et al.*, 2004). Auffällig ist, dass in der inkompatiblen Interaktion zu 6 hpi wesentlich mehr Gene induziert waren als in der kompatiblen Interaktion.

Bei dem größten Teil der Gene handelt es sich um Proteinkinasen und rezeptorähnliche Proteine, die in MAPK-Signalwege der Basalabwehr und der spezifischen Abwehr involviert sein dürften. Dies bestätigt frühere Berichte über pathogenregulierte Signalkomponenten (Haltermann *et al.*, 2003; Piffanelli *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 1998). Möglicherweise handelt es sich bei den rezeptorähnlichen Proteinen um ein Set verschiedener PAMP-Rezeptoren der Gerste (Tabelle 3.0).

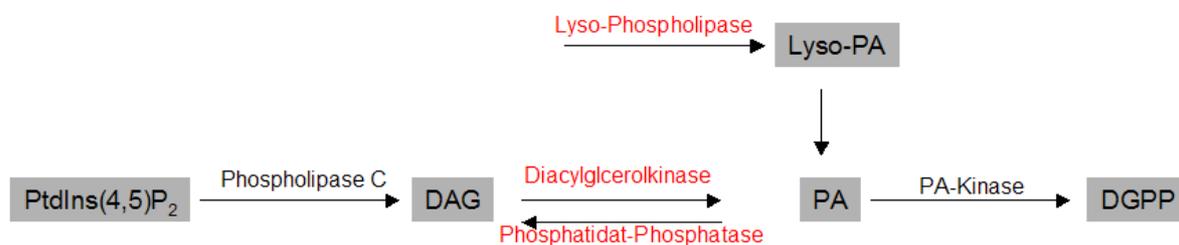
Signalkomponenten, die in Zusammenhang mit der Bildung von SA oder Ethylen stehen, wurden in der vorliegenden Analyse nicht gefunden, wohl aber zwei Komponenten die in Zusammenhang mit JA diskutiert werden. Dies sind zwei Gene der OPD-Reduktase.

Außerdem wurde ein Gen gefunden, das für einen GAMyb-Transkriptionsfaktor kodiert, von dem gezeigt werden konnte, dass er bei der Gibberellin-Signaltransduktion in Gerste eine entscheidende Rolle spielt (Gubler *et al.* 2002).

Eine weitere hochinteressante Komponente im Zusammenhang „Signalweitergabe“ ist die Glutamat-Decarboxylase, die die Bildung von GABA katalysiert (siehe Kapitel 4.4.2)

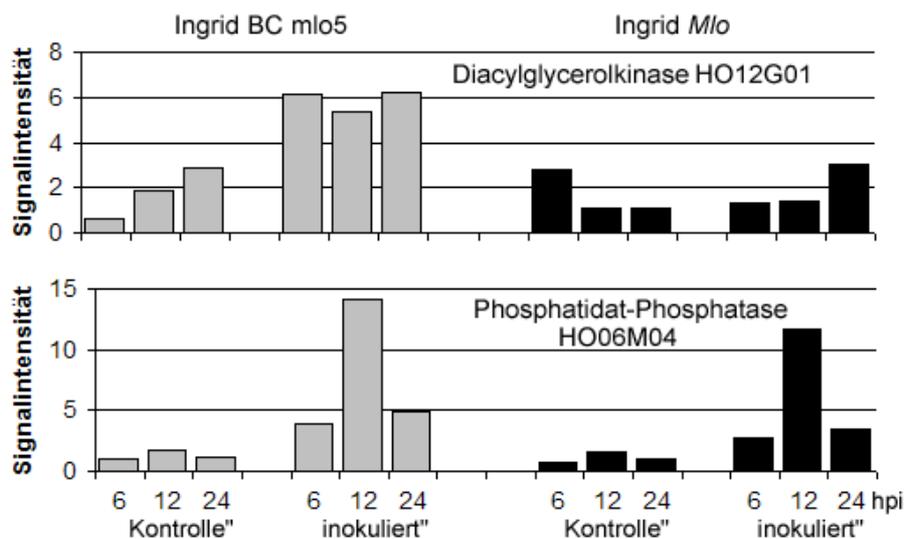
### Phospholipide

Die Diacylglycerolkinase (DAK) (Klon HO12G01) katalysiert die Bildung von Phosphatidylsäure (PA) aus Diacylglycerol (DAG). PA ist ein kleines Phospholipid, welches eine Schlüsselsubstanz bei der Biosynthese von Phosphoglyceriden darstellt. Daneben ist PA aber auch ein Lipid-*Second-Messenger*, der in Pflanzen bereits nach Minuten als Antwort auf Stress (Verwundung, osmotischer Stress, Elizitoren, Ethylen, Abscisinsäure) akkumuliert und dem in letzter Zeit viel Beachtung geschenkt wurde (Meijer und Munnik 2003). Kürzlich konnten zahlreiche Zielmoleküle der PA identifiziert werden. Dies sind ein 14-3-3-Protein, HSP90, PEP-Carboxylase (PEPC), SNF1 und Tubulin (Testerink *et al.* 2004). Aufgrund der stärkeren Genexpression (bereits 6 hpi) der pathogenregulierten Diacylglycerolkinase (DAK) in *mlo*-resistenter Gerste, wurden Gene, die in Zusammenhang mit dem Phospholipidstoffwechsel stehen, näher betrachtet (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5).



**Abbildung. 4.4:** Bildung der Phosphatidylsäure. Rot wurden pathogeninduzierte Gene dargestellt. (DAG: Diacyl-glycerol; PA: Phosphatidylsäure, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, DGPP: Diacylglycerol-pyrophosphat)

Zwei weitere Gene die im Zusammenhang mit PA stehen, waren pathogeninduziert. Diese kodieren für eine Phosphatidyl-Phosphatase (Klon HO06M04) und eine Lysophospholipase (Klon HO02A01). Während die Lysophospholipase zur Bildung von Lyso-PA führt, welches durch Anlagerung einer weiteren Fettsäure möglicherweise ebenfalls in PA überführt wird, katalysiert die Phosphatidat-Phosphatase die inverse Reaktion der Diacylglycerolkinase. Möglicherweise werden damit PA-Gehalte stringent kontrolliert. Aufgrund dieser Ergebnisse ist geplant, PA in der Epidermis und im Mesophyll mehltaubefallener Gerstenkeimlinge (Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*) zu messen und in Resistenzinduktionsexperimenten analog zur Untersuchung von GABA zu testen. Weitere Proteine, die mit der Bildung von PA assoziiert sind (Datenbanksuche: Phospholipase C und Phospholipase D), waren auf dem Array vorhanden, aber nicht pathogenreguliert.



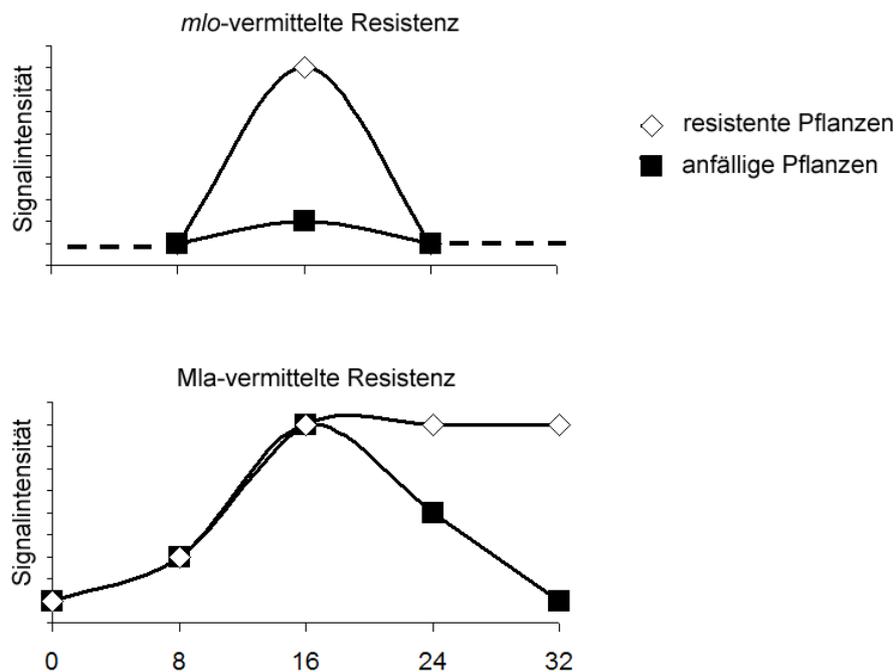
**Abbildung 4.5:** Signalintensitäten der pathogeninduzierten Diacylglycerolkinase und der Phosphatidat-Phosphatase.

### 4.3 Mechanismen der *mlo*- bzw. *Mla*-vermittelten Resistenz

Kürzlich wurde eine weitere Transkriptomanalyse im Pathosystem Gerste und *Bgh* bekannt, deren Ziel es unter anderem war, *downstream*-Komponenten der rassenspezifischen, HR-assoziierten, *Mla*-vermittelten Resistenz zu finden (Caldo *et al.* 2004). Während die hier vorliegende Analyse mit einem cDNA-basierten Makroarray (3.136 Unigene der Epidermis) durchgeführt wurde, verwendeten Caldo *et al.* den Barley 1 Chip von Affymetrix. Gene der Basalabwehr wurden in dieser Analyse nicht beachtet. Die Analyse bietet dennoch eine gute Vergleichsbasis für die hier vorliegende Analyse papillenassoziierter *mlo*-vermittelter Breitbandresistenz der Gerste.

Caldo *et al.* verglichen je zwei Paare von kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen (zwei isogene Linien und eine Pilzrasse bzw. eine isogene Linie und zwei Pilzrassen). Nach einer stringenten statistischen Analyse wurden 22 in beiden Vergleichspaaren hoch reproduzierbare induzierte Markergene der *Mla*-vermittelten Resistenz gezeigt. Bis 16 hpi stiegen die Transkriptabundanzen der Gene an. Ab 16 hpi kam es jeweils in der kompatiblen Interaktion zu einem Abfall der Transkriptabundanzen, während die Gene in der inkompatiblen Interaktion kontinuierlich weiter auf hohem Niveau exprimiert wurden (Abbildung 4.6).

Abgeleitet davon wurde ein Modell der *Mla*-vermittelten Resistenz vorgeschlagen, das nach Inokulation mit *Bgh* zunächst die Induktion von Abwehrgentranskripten durch PAMPS herausstellt. Aufgrund des koordinierten Abfallens der mRNA-Abundanzen der differentiell exprimierten Gene, ab dem Zeitpunkt zudem die haustoriale Membran in Kontakt mit der Plasmamembran tritt, wurde von Caldo *et al.* folgender Resistenzmechanismus vorgeschlagen (Abbildung 4.6 und 4.7): Mit dem Eindringen des Pilzes werden pilzliche Moleküle (Suppressoren) freigesetzt, die die Abwehr der Pflanze unterdrücken (Lyngkjaer und Carver 1999). Infolge der Unterdrückung der Pathogenabwehr kommt es in der kompatiblen Interaktion zur Ausbildung aller Lebensstadien des Pilzes. Laut des vorgeschlagenen Modells geschieht diese Unterdrückung durch den Verlust der spezifischen Erkennung des Pathogens über den *Mla/AvrMla*-Komplex (siehe auch Gen-für-Gen-Hypothese und GUARD-Hypothese



**Abbildung 4.6:** Markergene der *mlo*-vermittelten Resistenz im Vergleich zur *Mla*-vermittelten Resistenz

Kapitel 1.1.3). *m1a/AvrM1a* bzw. *M1a/Avrmla* kann demzufolge pilzliche Suppressoren nicht unterdrücken. Im Falle einer inkompatiblen Interaktion wird ein direkter oder indirekter funktioneller *AvrM1a/M1a*-Erkennungskomplex ausgebildet, der die Wirkung pilzlicher Suppressoren aufhebt. Hierbei kommt es zu einer aktiven Unterdrückung der pilzlichen Suppressoren (Derepression suppressorunterdrückter Gene), infolgedessen sich die pflanzliche Abwehr ausbildet. Dies würde mit dem späten Einsetzen von Abwehr (HR) korrelieren.

Für die *mlo*-vermittelte Resistenz wird dagegen aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse ein anderer Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 4.6 und 4.7). Dieser besagt, dass MLO als negativer Regulator der pflanzlichen Abwehr funktioniert und ein „Überschießen von Abwehr“ verhindert. Bei Wegfall von MLO scheinen die Pflanzen ständig vorgewarnt (*Priming*-Effekt) und können so schneller bzw. stärker auf das Pathogen reagieren. Diese Vermutung basiert auf den erhöhten Transkriptabundanz pathogenregulierter Gene in nicht-inokulierten Pflanzen. In dieses Bild passt auch die nichtparasitäre Verbräunung *mlo*-resistenter Gerste im Feld und die spontane Entstehung von Papillen auf den Blättern dieser Pflanzen (Wolter *et al.* 1993).

In der hier gezeigten Transkriptomanalyse mit *mlo*-resistenter Gerste wurden deutliche Unterschiede zwischen den isogenen Linien, bereits zu 6 hpi gezeigt, zu einem Zeitpunkt währenddessen sich der Pilz noch im Prä-Penetrationsstadium befindet (Abbildung 3.9, zum Beispiel Diacylglycerolkinase, Uclacyanin oder HvSNAP34). Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass die massiv stärkere Induktion von Abwehrgentranskripten in den *mlo*-resistenten Pflanzen durch den Wegfall pilzlicher Suppressoren unterdrückt wird. Hinzu kommt, dass die Entwicklung des Pilzes auf *mlo*-resistenten Pflanzen zu einem früheren Zeitpunkt aufhört als die vermutete Produktion von Suppressoren.

Insgesamt konnten in der hier vorliegenden Analyse 25 *downstream*-Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz vorgeschlagen werden (Abbildung 3.9, Abbildung 3.22). Die stärksten Unterschiede zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion waren zu 12 hpi zu sehen, wobei zu beachten ist, dass nur die Zeitpunkte 6, 12 und 24 hpi untersucht wurden (Abbildung 4.6). Allerdings gingen die Transkriptabundanzen im Gegensatz zur *Mla*-vermittelten Resistenz bereits 12 hpi wieder zurück.

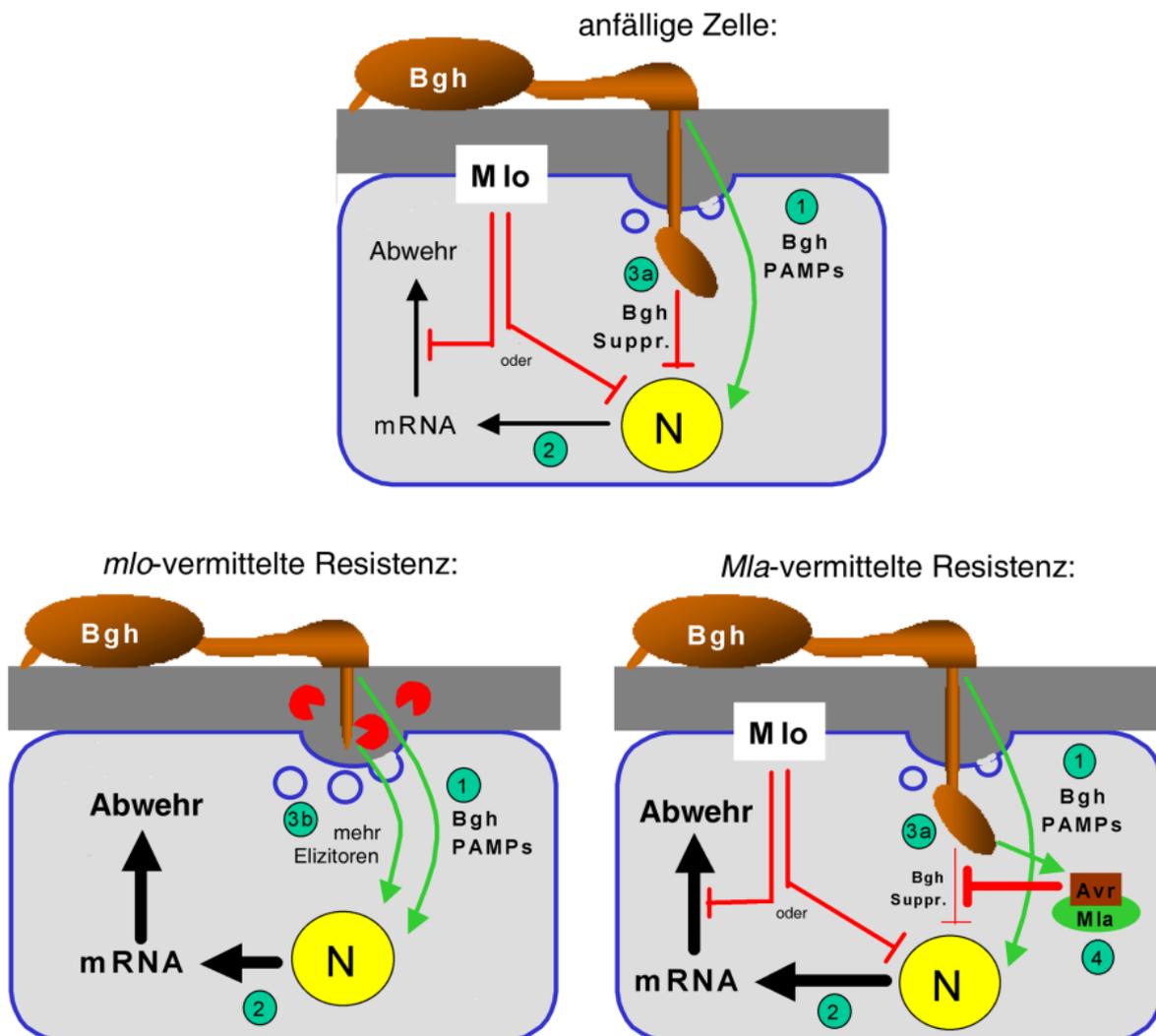


Abbildung 4.7: Modell der *mlo*-vermittelten und der *Mla*-vermittelten Resistenz

Sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion wurde ein sehr ähnliches Subset von Genen reguliert. Daher wird in Übereinstimmung mit Caldo *et al.* vermutet, dass zunächst zahlreiche Gene durch *Blumeria*-spezifische PAMPS induziert werden. Für die hier gezeigte ungedämpfte Abwehrreaktion in *mlo*-resistenten Pflanzen werden zwei mögliche Erklärungen vorgeschlagen (Abbildung 4.7).

Eine Möglichkeit ist, dass MLO die Abwehrreaktion der Pflanze durch Interaktion mit einer Komponente der Signalkaskade inhibiert. Die Signalkaskade erstreckt sich vom Elizitorsignal bis hin zur Induktion von Abwehrgentranskripten. Dies würde bei fehlender MLO-Aktivität zu dem massiven Anstieg von pathogenregulierten Transkripten in *mlo*-Pflanzen führen. Eine

zweite Möglichkeit, die den Mechanismus der negativen Regulation erklären könnte, ist die direkte Interaktion von MLO mit einer Abwehr-Komponente. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Mechanismus, der zur verminderten Abgabe von hydrolytischen Enzymen in den epidermalen Apoplasten führt. In Pflanzen ohne MLO-Aktivität führt dies zur verstärkten Freisetzung von Elizitoren an pilzlichen oder pflanzlichen Zellwänden. Dies wiederum führt zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus mit der induzierten Abwehr.

#### 4.4 Weiterführende funktionelle Analysen

Transkriptomanalysen geben nur in begrenztem Umfang Informationen zur Funktion der Gene. Perspektivisch sind weitergehende Untersuchungen notwendig, welche die Transkriptomdaten mit Daten aus revers-genetischen Ansätzen, Genom-, und Metabolomdaten bzw. Ergebnissen aus Untersuchungen einzelner Stoffwechselwege verknüpfen und korrelieren. Erste Schritte in dieser Richtung wurden mit dem revers-genetischen TIGS-*Screening*, und den Untersuchungen zur Funktion von GABA gegangen.

##### 4.4.1 TIGS-*Screening* für 128 pathogeninduzierte Kandidatengene

Es wurde versucht, alle 171 gefundenen pathogeninduzierten Gene durch TIGS (Abbildung 3.20 und Abbildung 2.5) systematisch in ihrer Expression zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu basieren bisher durchgeführte Untersuchungen auf rationellen Überlegungen, bei denen beispielsweise alle Gene, die mit Sekretion in Verbindung stehen, ausgeschaltet, oder bei denen bekannte Abwehrgene überexprimiert wurden (Panstruga 2004). Ziel des hier gewählten Ansatzes war es, das Transkriptom von Ingrid BC *mlo5* systematisch so zu beeinflussen, dass die Resistenz durchbrochen und es zur Ausbildung von Haustorien in den manipulierten, normalerweise resistenten Zellen kommt. Neben den Kandidatengenen, die in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert waren als in Ingrid *Mlo*, wurden auch Gene getestet, die in beiden Genotypen gleiche Expressionsmuster zeigten und die möglicherweise mit Basalresistenz assoziiert sind.

Weder die 128 RNAi-Konstrukte, die in zufällig zusammengesetzten *Pools* zu je vier Genen getestet wurden, noch die funktionellen *Pools* mit Genen verschiedener Kategorien zeigten reproduzierbare Effekte. In keinem der Ansätze konnte die *mlo*-vermittelte Resistenz aufgehoben werden. Im folgenden wurde auf Beschluss mit einzelnen Konstrukten umgestellt, sodass nunmehr alle 128 Kandidatengene einzeln getestet wurden. Es blieb allerdings bei der Entdeckung eines einzigen Genes (HvSNAP34, Klon HO12F09).

Aufgrund der geringen Zahl von funktionell wirksamen Genen im TIGS-*Screening* kann davon ausgegangen werden, dass für die *mlo*-vermittelte Resistenz nur wenige Komponenten essentiell sind. Eine weitere Erklärung wäre, dass essentielle Komponenten nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert oder äußerst niederabundant exprimiert werden und nicht detektiert wurden.

#### ***HvSNAP34***

HvSNAP34 kodiert ein membranständiges Protein der t-SNARE-Gruppe. t-SNARE-Proteine sind am Vesikeltransport beteiligt, vermitteln Membranfusionen und stellen Energie für Fusionen bereit. Möglicherweise handelt es sich bei HvSNAP34 um ein Protein, dass am Vesikeltransport hin zu den resistenzvermittelnden Papillen beteiligt ist. SNAPs binden an v-SNAREs und t-SNAREs (SNAREs sind SNAP Rezeptoren, v=Vesikel, t=Target) und sorgen

dafür, dass die richtigen Proteine miteinander in Kontakt treten. Das heißt, dass die Vesikel ihre Andockstelle in der Zielmembran finden (Pratelli *et al.* 2004).

Mit dem funktionellen Nachweis im TIGS-*Screening*-System, dass HvSNAP34 für die *mlo*-vermittelte Resistenz notwendig ist, wurden Ergebnisse von Collins *et al.* (2003) in einem unabhängigen methodischen Ansatz bestätigt. Collins *et al.* führten ebenfalls RNAi-Experimente in Ingrid *mlo5* durch, um gezielt Komponenten zu untersuchen, die mit der Funktion von HvROR2, einem Syntaxin, möglicherweise logisch assoziiert sind. Kandidaten waren SNARE und SNARE-assoziierte Proteine wie zum Beispiel HvSNAP34,  $\alpha/\gamma$ -SNAP, SEC1 und NSF. Diese Gene stehen mit Exozytose-Prozessen in Zusammenhang. Im Gegensatz dazu wurden im hier vorliegenden Ansatz alle pathogeninduzierten Gene der Interaktion Gerste und *Bgh* getestet (systematisches *Screening*).

Ausgangspunkt der Untersuchung von Collins war die Entdeckung der *Arabidopsis*-Penetrationsmutante *pen1*. Hier wurde die Nichtwirtsresistenz gegen *Bgh* durchbrochen. *AtPen1* wurde durch *map-based-cloning* isoliert und als Syntaxin-Homolog identifiziert. Interessanterweise handelte es sich bei den Proteinen HvPEN1 und HvROR2 um funktionell homologe Syntaxine mit 62% Sequenzhomologie (Collins *et al.* 2003). *HvRor2* ist eine seit langem bekannte *downstream*-Komponente der *mlo*-vermittelten Resistenz, die durch EMS-Mutagenisierung von *mlo*-resistenten Gerstenpflanzen gefunden wurde (Freialdenhoven *et al.* 1996). *HvRor2* wurde durch *map-based-cloning* identifiziert (Collins *et al.* 2003). Mit *Yeast-Two-Hybrid*-Protein-Assays konnte gezeigt werden, dass zytosolische Bereiche von HvROR2 und das vollständige HvSNAP34 Protein interagieren (Collins *et al.* 2003).

Auffallend ist, dass HvSNAP34 nur in der Epidermis pathogeninduziert war. Mit „Gesamtblatt“-Sonden konnte dagegen keine Induktion gefunden werden. Auch der hohe EM-Wert deutet darauf hin, dass das Protein ausschließlich in der Epidermis reguliert wird. Möglicherweise wurde also die Geninduktion in der Epidermis, bei den Untersuchungen mit Gesamtblattsonden, von ubiquitär sehr hoch exprimierten SNAP-Transkripten überdeckt. Interessanterweise waren zwei weitere pathogeninduzierte Proteine, die auch mit Vesikeltransport in Zusammenhang stehen, in der Epidermis exprimiert. Eines davon ist ein sogenanntes granulasekretierendes, elizitorinduziertes Protein (Klon HO02F02). Bei dem zweiten Protein handelt es sich wie bei HvROR2 um ein Syntaxin (Klon HO12N23). Homologie zu HvROR2 besteht allerdings nicht.

Nachdem das TIGS-*Screening* mit den pathogeninduzierten Kandidatengen in *mlo*-resistenter Gerste (Ingrid BC *mlo5*) beinahe abgeschlossen ist, sollen die RNAi-Konstrukte in anfälliger Gerste (Sorte: Golden Promise) getestet werden, um hier möglicherweise Supersuszeptibilität bzw. Resistenz zu erzeugen. Weiterhin werden alle Konstrukte in dem Nichtwirtssystem von Gerste und *Bgt* getestet, da es sich bei der Nichtwirtsresistenz gegen *Bgt* ähnlich wie bei *mlo* um eine papilläre Resistenz handelt. Beide Formen der Mehltau-Resistenz in Gerste werden auf die Bildung von Papillen zurückgeführt (Collins *et al.* 2003). Im Nichtwirtssystem wurden bisher drei Kandidaten, mit denen die Resistenz gegen *Bgt* durchbrochen werden konnte, gefunden. Bei einem der Gene handelt es sich um das bekannte HvSNAP34. Bei den beiden anderen um Proteine, die aus patentrechtlichen Gründen nicht genannt werden können. (Douchkov, persönliche Mitteilung).

#### 4.4.2 Die Rolle von $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) in der *mlo*-vermittelten Resistenz

Im Rahmen der Transkriptomanalyse mehлтаubefallener Gerstenepidermis wurde eine Glutamat-Decarboxylase (HvGAD) identifiziert, die epidermal und im resistenten Genotyp stärker exprimiert ist. Die HvGAD ist das Schlüsselenzym bei der Synthese des aus Tieren bekannten, im ZNS vorherrschenden, inhibierenden Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). GABA, GABA-Rezeptoren sowie GADs wurden aber auch in Pflanzen gefunden und mit allgemeinen Stressreaktionen in Verbindung gebracht. GABA scheint Stresssignale zu verstärken, die Ethylenbiosynthese zu induzieren und eine anaplerotische Funktion beim Stressmetabolismus einzunehmen (Bouche und Fromm 2004). Der GABA-Stoffwechsel, der als GABA-*Shunt* bezeichnet wird, ist in Pflanzen durch drei Enzyme katalysiert: 1) GAD (cytosolisch, kalzium- und calmodulinabhängig), 2) GABA-Transaminase (GABA-T, mitochondrial) und 3) Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH, mitochondrial). Dabei existieren zwei Verknüpfungspunkte mit dem TCA-Zyklus. Dies ist einerseits die Bildung von Glutamat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und andererseits die Bildung und Einspeisung von Succinat in den TCA-Zyklus über Glutamat, GABA und Succinat-Semialdehyd (SSA) (Shelp *et al.*, 1999) (Abbildung 4.6).

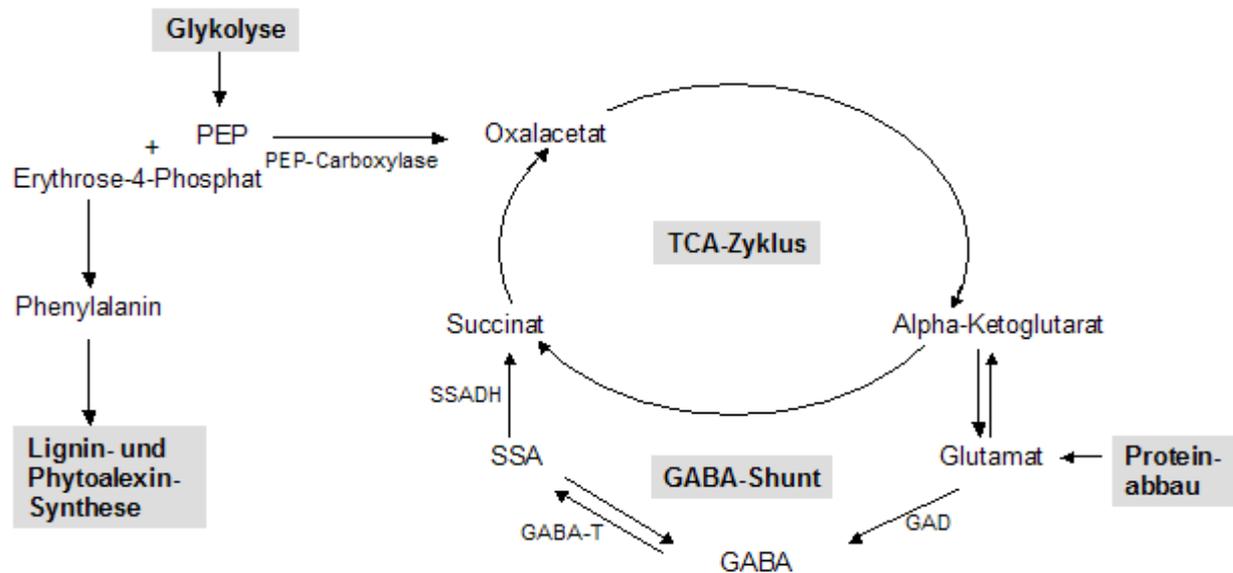
Um die Rolle von GABA in der *mlo*-vermittelten Resistenz näher zu untersuchen, wurden die Aminosäurekonzentrationen separat in der Epidermis und im Mesophyll in mehлтаubattackierten und mehлтаubefallenen Pflanzen von Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo* gemessen. Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) GABA war im Gegensatz zu allen proteinogenen Aminosäuren, die im Mesophyll höher konzentriert waren, in beiden untersuchten Geweben in ähnlicher Konzentration vorhanden.
- (2) Eine einfache Korrelation zwischen den GABA-Konzentrationen und den pathogeninduzierten HvGAD-Genen in *mlo*-resistenten Pflanzen existiert nicht. Trotz der hohen mRNA-Abundanzen von HvGAD in der Epidermis von *mlo*-resistenten Pflanzen, wurden weder in Epidermis noch im Mesophyll erhöhte GABA-Konzentrationen nach Pathogenbefall festgestellt.
- (3) Pflanzen der isogenen Linie Ingrid *Mlo*, die mit GABA behandelt wurden, zeigten keinerlei Veränderung in der Resistenz gegenüber *Bgh*. Abwehrgentranskripte wurden dabei nicht induziert.

GABA scheint vermutlich keine Rolle in der stressinduzierten Signaltransduktion in Gerste zu spielen. Allerdings konnten Kinnersley und Turano (2000) nach Behandlung von Weizen mit „AuxiGro“, einer Mischung aus 30% GABA und 30% Glutamat (*L-glutamic-acid*), eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Mehлтаub verbunden mit einer Akkumulation von Mangan nachweisen.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Transkriptabundanzen von GAD während des Pathogenbefalls geben Shelp *et al.* (1999), die eine anaplerotische Funktion von GABA vorschlagen. Dabei wird verstärkt gebildete GABA möglicherweise sofort über Succinat in den TCA-Zyklus eingespeist. Warum sollte dies aber passieren? Eine primäre Funktion des TCA-Zyklus in Pflanzen ist die Bereitstellung von Vorstufen für die Synthese zahlreicher proteinogener AS, die bei der Biosynthese von stressinduzierten Proteinen notwendig sind. Kommt es zum verstärkten Abzug von Intermediaten des TCA-Zyklus, müssen diese wieder aufgefüllt werden, da konstante Intermediat-Konzentrationen für das Funktionieren des TCA-Zyklus notwendig sind (Matthews und Van Holde 1996). Diese Auffüllreaktion des TCA-Zyklus erfolgt in Pflanzen unter anderem durch Oxalacetat, welches durch die PEP-Carboxylase aus Phosphoenolpyruvat (PEP) synthetisiert wird. Ein Faktor, der den TCA-Zyklus möglicherweise zum Stillstand bringt, ist der Abzug von PEP durch einen gesteigerten

Bedarf im Shikimat-Weg, der zu Phenylpropanoiden führt. Wie in der Transkriptomanalyse gezeigt werden konnte, scheint der Phenylpropanoidstoffwechsel nach Pathogenbefall in der Gerste deutlich gesteigert zu sein und in der Bildung von Phytoalexinen (von Röpneck *et al.* 1998), Flavonoidderivaten als auch Ligninverbindungen zu münden. Daher erscheint eine Rolle von GABA bei der anaplerotischen Bildung von TCA-Intermediaten in der Epidermis am wahrscheinlichsten.



**Abbildung 4.6:** Die anaplerotische Funktion von GABA. GABA-T: GABA-Transaminase, SSADH: Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase, SSA: Succinat-Semialdehyd, GABA:  $\gamma$ -Amino-Buttersäure, GAD: Glutamat-Decarboxylase, PEP: Phosphoenolpyruvat (nach Bouche und Fromm, 2004).

Bouche *et al.* (2003) konnten in *Arabidopsis* durch Unterbrechen des GABA-Shunts eine alternative Funktion von GABA zeigen, indem das Enzym SSADH ausgeschaltet wurde (GABA sollte hierbei theoretisch angereichert werden, gemessen wurden die GABA-Konzentrationen aber nicht). Dies führte bei Licht- und Hitzestress zu einer verstärkten Bildung von  $H_2O_2$  und spricht für eine Rolle von GABA beim *Scavenging* von ROS bzw. bei der Regulation des Zelltods.

Im Zusammenhang mit der Funktion von GABA und HvGAD sind weitere Untersuchungen notwendig, wobei die transienten Überexpressions- und RNAi-Versuche weiteren Aufschluss über die Funktion von GABA bzw. GAD bei der Resistenz gegenüber Mehltau geben sollen. Im durchgeführten TIGS-Screening in *mlo*-resistenter Gerste (Ingrid BC *mlo5*) wurden bisher keine RNAi-Konstrukte gegen HvGAD getestet.

Interessant dürfte weiterhin sein, ob die HvGAD wie zahlreiche andere GADs eine CaM-Bindungstelle besitzt (Baum *et al.* 1996) und ihre Aktivität durch  $Ca^{2+}$ -CaM-Komplexe reguliert wird (Bouche und Fromm 2004). In Reis wurden kürzlich zwei verschiedene OsGAD-Isoformen beschrieben, die sich unter anderem in der Anwesenheit einer CaM-Bindungstelle unterscheiden (Akama *et al.* 2001). Hierzu sind Protein-Bindungsstudien erforderlich.

#### 4.4.3. Die Messung aller proteinogenen Aminosäuren

Im Zusammenhang mit der Messung der Aminosäure GABA wurden zusätzlich die Gehalte aller proteinogenen Aminosäuren gemessen, die als interne Standards verwendet wurden. Proteinogene AS, die nach Pathogenbefall verstärkt oder vermindert gebildet werden, wurden nicht gefunden. Während alle proteinogenen AS sich vorwiegend im Mesophyllgewebe (ca. Faktor 2-10) anreicherten, war GABA im Mesophyll und in der Epidermis in etwa gleicher Konzentration vorhanden. Interessante, aber im zweiten Experiment, nicht reproduzierbare Ergebnisse wurden für die AS Methionin, Leucin und Isoleucin gefunden. Weitere Experimente wären notwendig, um präzisere Aussagen zu treffen.

#### 4.5 Ausblick

Momentan wird das Transkriptom *mlo*-resistenter Gerstenepidermis mit weiteren Analysemethoden (iGentifier und Barley-Chip von Affymetrix) untersucht. Dies stellt, zusammen mit rund 20.000 ESTs der HO cDNA-Bank und der vorliegenden Transkriptomanalyse, eine wichtige Ressource für die detaillierte Untersuchung einzelner Stoffwechselwege und Proteinfamilien in mehltreuerresistenter Gerste dar.

Die bioinformatische Zusammenführung der Transkriptomdaten von Gerste und *Bgh* mit solchen aus anderen Pathosystemen eröffnet zusätzliche Möglichkeiten der Erkenntnis. So ist zum Beispiel der Vergleich des Wirtssystems Gerste und *Bgh* und des Nichtwirtssystems Gerste und *Bgt* naheliegend und wird im Projekt GABI-Nonhost bearbeitet. Ein hoher Überlappungsgrad pathogenregulierter Gene wird erwartet. Möglicherweise lassen sich hier Gene finden, die für die Wirtsanfälligkeit verantwortlich sind. Weiterhin wäre es von Interesse, welches Subset von pathogeninduzierten Genen der Gerste bereits mit Elizitoren (Chitin, Cutin, KH-Elizitor) induzierbar ist. Auch ein Vergleich der Transkriptome verschiedener Pflanze-Pilz-Interaktionen (nekrotrophe Pilze, hemibiotrophe Pilze, biotrophe Pilze, vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilze) dürfte weiteren Einblick in den allgemeinen und den pathogenspezifischen Teil des Gerstentranskriptoms geben. Bioinformatische Projekte sollten sich außerdem mit der Zusammenführung von Transkriptom-, Proteom- und Metabolomdaten befassen.

Da es sich bei den hier diskutierten Kandidatengenen um gemeinsam regulierte Gene handelt, die wahrscheinlich im Zusammenspiel wirken, hat es kaum Sinn, einzelne Gene einzukreuzen, um Pflanzen mit erhöhten Resistenzen zu züchten. Es sei denn, es gelänge Schlüsselkomponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz wie zum Beispiel HvSNAP34 oder ROR2 und evtl. weitere Kandidaten, die aus funktionellen Ansätzen resultieren, einzukreuzen.

Um epidermisspezifisch pathogeninduzierbare Promotoren zu identifizieren, wurde mit einigen pathogeninduzierten Genen bereits eine erste Promotoranalyse durchgeführt. 3-5 kb lange Promotorfragmente von 11 Genen liegen vor (persönliche Mitteilung Maucher, IPK Gatersleben). Epidermisspezifische Promotoren haben den Vorteil, dass sich damit Gene ausschließlich in der Epidermis überexprimieren lassen. Abwehrgene könnten so mit weniger pleiotropen Nebenwirkungen überexprimiert werden. Dies brächte erhebliche Vorteile für gentechnisch erzeugte Resistenz in Pflanzen. Im Pro-GABI-Projekt sollen weitere Promotoranalysen durchgeführt werden. Hierfür stehen auch die gezeigten 290 epidermisspezifischen Gene zur Verfügung.

Direkt fortgeführt werden die Arbeiten in einem neuen Projekt des IPK mit dem Titel: „Modifikation der Basalresistenz im Pathosystem Gerste und Bgh mittels RNAi“. Die gefundenen Kandidatengene und das TIGS-System sind hierbei die Grundlage. Aufgrund ihrer Homologie bzw. aufgrund erster funktioneller Daten von Kandidatengenen ist die Erzeugung von transgenen RNAi *Knock-down*- oder TILLING-Mutanten für einzelne Gene denkbar und sinnvoll. Ein erstes Beispiel wäre das t-SNARE kodierende Gen HvSNAP34.

Weitere direkt aus der Arbeit abzuleitende und bereits im Kontext diskutierte Untersuchungen sind die Messung von Gramin und Tryptamin in *mlo*-resistenter Gerste, die weitere molekulare Untersuchung der Stoffwechselwege von GABA und die Untersuchung der Rolle von Phosphatidinsäure. Im TIGS-*Screening* sollen alle restlichen pathogeninduzierten Kandidatengene getestet werden.



## Thesen

- (1) Mit der verwendeten Makroarraytechnologie war es möglich das Pflanze-Pathogen-Interaktionstranskriptom von Gerste und Mehltau zu analysieren. Zahlreiche methodische und biologische Kontrollen bestätigten, dass reproduzierbare und verlässliche Daten erhoben wurden.
- (2) Im epidermalen Transkriptom (3.136 Unigene) der Interaktion von Gerste und *Bgh* wurden 207 pathogenregulierte Gene gefunden.
- (3) In *mlo*-resistenter Gerste kommt es, im Vergleich zu anfälliger Gerste, zu einer massiveren Anhäufung von PR-Gen-Transkripten. Der Unterschied ist quantitativer und nicht qualitativer Natur. Es wurden 26 resistenzassoziiert und sechs anfälligkeitsassoziiert exprimierte Markergene identifiziert. Die Grundgehalte von pathogenassoziierten Transkripten sind in nichtinokulierter, *mlo*-resistenter Gerste erhöht.
- (4) Der überwiegende Anteil der untersuchten Gene wurde sowohl in der Epidermis als auch im Blatt exprimiert. Die Mehrzahl der pathogenregulierten Gene hatte ihren Expressionsschwerpunkt in der Epidermis, 35 wurden als epidermisspezifisch definiert. Insgesamt wurden 290 epidermisspezifisch und 164 mesophyllspezifisch exprimierte Gene vorgeschlagen.
- (5) Die Transkriptomdaten deuten darauf hin, dass nach Pathogenbefall Stoffwechselwege, die zur Bildung von Zimtsäurederivaten und Tryptamin führen, induziert wurden. Möglicherweise führt dies zur Bildung der antifungalen Substanzen Gramin und Hordatol. In *mlo*-resistenter Gerste scheinen diese Stoffwechselwege stärker aktiviert zu sein.
- (6) HvSNAP34 wurde im TIGS-Screening als eine *downstream*-Komponente der *mlo*-vermittelten Resistenz bestätigt. Die Funktionsfähigkeit des hochdurchsatztauglichen TIGS-Systems im Pathosystem Gerste-*Bgh* wurde gezeigt.
- (7) GABA scheint keine Bedeutung bei der Signalweitergabe nach Pathogenstress zu haben. Vielmehr ist eine anaplerotische Funktion von GABA für den TCA-Zyklus denkbar.



## Literaturverzeichnis

- Akama, K., T. Akihiro, M. Kitagawa and F. Takaiwa (2001).** "Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus." *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression* 1522(3): 143-150.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990).** "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Anon (2000).** "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* 408(6814): 796-815.
- Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M. R. Willmann, W. L. Chiu, L. Gomez-Gomez, T. Boller, F. M. Ausubel and J. Sheen (2002).** "MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity." *Nature* 415(6875): 977-983.
- Azevedo, C., A. Sadanandom, K. Kitagawa, A. Freialdenhoven, K. Shirasu and P. Schulze-Lefert (2002).** "The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance." *Science* 295(5562): 2073-2076.
- Baum, G., S. LevYadun, Y. Fridmann, T. Arazi, H. Katsnelson, M. Zik and H. Fromm (1996).** "Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants." *Embo Journal* 15(12): 2988-2996.
- Bent, A. F. (1996).** "Plant disease resistance genes: Function meets structure." *Plant Cell* 8(10): 1757-1771.
- Blee, E. (2002).** "Impact of phyto-oxylipins in plant defense." *Trends in Plant Science* 7(7): 315-321.
- Boller, T. and N. T. Keen (1999).** "Resistance genes and the perception and transduction of elicitor signals in host-pathogen interactions." *Mechanisms of Resistance of Plant Diseases*: 189-229.
- Bolwell, G. P., C. Gerrish and J. P. Salaun (1997).** "Changes in enzymes involved in suberisation in elicitor-treated French bean cells." *Phytochemistry* 45(7): 1351-1357.
- Bouche, N. and H. Fromm (2004).** "GABA in plants: just a metabolite?" *Trends in Plant Science* 9(3): 110-115.
- Boyd, L. A., P. H. Smith, E. M. Foster and J. K. M. Brown (1995).** "The Effects of Allelic Variation at the Mla Resistance Locus in Barley on the Early Development of *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* and Host Responses." *Plant Journal* 7(6): 959-968.
- Boyd, L. A., P. H. Smith, R. M. Green and J. K. M. Brown (1994).** "The Relationship between the Expression of Defense-Related Genes and Mildew Development in Barley." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7(3): 401-410.
- Brandenburger, W. (1985).** "Parasitische Pilze an Gefäßpflanzen in Europa." SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG; FISCHER (GUSTAV).
- Brandt, K., H. Euler, H. Hellstorm and N. Lofgren (1935).** "Gramin und zwei Begleiter desselben in Laubblättern von Gerstensorten." *Z. Physiol. Chem*(235): 37-42.
- Braun, U. (1995).** "The powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe." G. Fischer-Verlag Jena.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem and R.L. Jones (2000).** "Biochemistry and Molecular Biology of Plants."
- Bulgarelli, D., N. C. Collins, G. Tacconi, E. Dellaglio, R. Brueggeman, A. Kleinhofs, A. M. Stanca and G. Vale (2004).** "High-resolution genetic mapping of the leaf stripe resistance gene *Rdg2a* in barley." *Theoretical and Applied Genetics* 108(7): 1401-1408.

- Burhenne, K., B. K. Kristensen and S. K. Rasmussen (2003).** "A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases - Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (Ec 2.3.1.64)." *Journal of Biological Chemistry* 278(16): 13919-13927.
- Buschges, R., K. Hollricher, R. Panstruga, G. Simons, M. Wolter, A. Frijters, R. vanDaelen, T. vanderLee, P. Diergaarde, J. Groenendijk, S. Topsch, P. Vos, F. Salamini and P. SchulzeLefert (1997).** "The barley mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance." *Cell* 88(5): 695-705.
- Bushnell, W. R. (2002).** "The Formation and Function of Infection and Feeding Structures." *The Powdery Mildews A Comprehensive Treatise*: 1-12.
- Caldo, R. A., D. Nettleton and R. Wise (2004).** "Interaction-Dependent Gene Expression in Mla-Specified Response to Barley Powdery Mildew." *The Plant Cell* 16: 2514-2528.
- Campbell, E. J., P. M. Schenk, K. Kazan, I. Penninckx, J. P. Anderson, D. J. Maclean, B. P. A. Cammue, P. R. Ebert and J. M. Manners (2003).** "Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 133(3): 1272-1284.
- Casati, P., M. F. Drincovich, G. E. Edwards and C. S. Andreo (1999).** "Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense." *Photosynthesis Research* 61(2): 99-105.
- Christensen, A. B., P. L. Gregersen, C. E. Olsen and D. B. Collinge (1998).** "A flavonoid 7-O-methyltransferase is expressed in barley leaves in response to pathogen attack." *Plant Molecular Biology* 36(2): 219-227.
- Christensen, A. B., H. Thordal-Christensen, G. Zimmermann, T. Gjetting, M. F. Lyngkjaer, R. Dudler and P. Schweizer (2004).** "The germin-like-protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(1): 109-117.
- Clark, T. A., R. J. Zeyen, T. L. W. Carver, A. G. Smith and W. R. Bushnell (1995).** "Epidermal-Cell Cytoplasmic Events and Response Gene Transcript Accumulation During Erysiphe-Graminis Attack in Isogenic Barley Lines Differing at the MI-O Locus." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46(1): 1-16.
- Close, T. J., S. I. Wanamaker, R. A. Caldo, S. M. Turner, D. A. Ashlock, J. A. Dickerson, R. A. Wing, G. J. Muehlbauer, A. Kleinhofs and R. P. Wise (2004).** "A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age." *Plant Physiology* 134(3): 960-968.
- Cluzet, S., C. Torregrosa, C. Jacquet, C. Lafitte, J. Fournier, L. Mercier, S. Salamagne, X. Briand, M. T. Esquerre-Tugaye and B. Dumas (2004).** "Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp." *Plant Cell and Environment* 27(7): 917-928.
- Colbert, T., B. J. Till, R. Tompa, S. Reynolds, M. N. Steine, A. T. Yeung, C. M. McCallum, L. Comai and S. Henikoff (2001).** "High-throughput screening for induced point mutations." *Plant Physiology* 126(2): 480-484.
- Collinge, D. B., P. L. Gregersen and A. B. Christensen (2002).** "The Nature and Role of Defence Response Genes in Cereals." *The Powdery mildews: A Comprehensive Treatise*: 77-99.
- Collins, N. C., A. Sadanandom and P. Schulze-Lefert (2002).** "Genes and Molecular Mechanisms Controlling Powdery Mildew Resistance in Barley." *The Powdery Mildews A Comprehensive Treatise*: 134-145.
- Collins, N. C., H. Thordal-Christensen, V. Lipka, S. Bau, E. Kombrink, J. L. Qiu, R. Hükelhoven, M. Stein, A. Freialdenhoven, S. C. Somerville and P. Schulze-**

- Liefert (2003).** "SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall." *Nature* 425(6961): 973-977.
- Conrath, U., C. M. J. Pieterse and B. Mauch-Mani (2002).** "Priming in plant-pathogen interactions." *Trends in Plant Science* 7(5): 210-216.
- Dangl, J. L. and J. D. G. Jones (2001).** "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *Nature* 411(6839): 826-833.
- Deising, H., S. Reimann, A. Peil and W. E. Weber (2002).** "Disease Management of Rusts and Powdery Mildew." *The Mycota XI Agricultural Applications*, Springer Verlag 243-269.
- Devoto, A., H. A. Hartmann, P. Piffanelli, C. Elliott, C. Simmons, G. Taramino, C. S. Goh, F. E. Cohen, B. C. Emerson, P. Schulze-Liefert and R. Panstruga (2003).** "Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family." *Journal of Molecular Evolution* 56(1): 77-88.
- Devoto, A., P. Piffanelli, I. Nilsson, E. Wallin, R. Panstruga, G. von Heijne and P. Schulze-Liefert (1999).** "Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants." *Journal of Biological Chemistry* 274(49): 34993-35004.
- Dharmasiri, N. and M. Estelle (2004).** "Auxin signaling and regulated protein degradation." *Trends in Plant Science* 9(6): 302-308.
- Dowd, C., L. W. Wilson and H. McFadden (2004).** "Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(6): 654-667.
- Dysvik, B. and I. Jonassen (2001).** "J-Express: exploring gene expression data using Java." *Bioinformatics* 17(4): 369-370.
- Eichmann, R., H. Schultheiss, K. H. Kogel and R. Hüchelhoven (2004).** "The barley apoptosis suppressor homologue *bax* inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(5): 484-490.
- Elliott, C. (2003).** "A molecular and functional analysis of the MLO gene family." *Dissertation University of East Anglia*.
- Elliott, C., F. S. Zhou, W. Spielmeier, R. Panstruga and P. Schulze-Liefert (2002).** "Functional conservation of wheat and rice Mlo orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(10): 1069-1077.
- Eulgem, T., V. J. Weigman, H. S. Chang, J. M. McDowell, E. B. Holub, J. Glazebrook, T. Zhu and J. L. Dangl (2004).** "Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance." *Plant Physiology* 135(2): 1129-1144.
- Flor, H. H. (1971).** "Current status of the gene-for-gene concept." *Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Franke, W. (1997).** "Nutzpflanzenkunde." Thieme Verlag.
- Freeman, W. M., D. J. Robertson and K. E. Vrana (2000).** "Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis." *Biotechniques* 29(5): 1042-+.
- Freialdenhoven, A., C. Peterhänsel, J. Kurth, F. Kreuzaler and P. SchulzeLiefert (1996).** "Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley." *Plant Cell* 8(1): 5-14.
- Fujiwara, S., N. Tanaka, T. Kaneda, S. Takayama, A. Isogai and F. S. Che (2004).** "Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(9): 986-998.
- Gilchrist, D. G. (1998).** "Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide." *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414.

- Gjetting, T., T. L. W. Carver, L. Skot and M. F. Lyngkjaer (2004).** "Differential gene expression in individual papilla-resistant and powdery mildew-infected barley epidermal cells." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(7): 729-738.
- Goff, S. A., D. Ricke, T. H. Lan, G. Presting, R. L. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchinson, C. Martin, F. Katagiri, B. M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. P. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. P. Zhang, M. Colbert, W. L. Sun, L. L. Chen, B. Cooper, S. Park, T. C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. S. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sahasrabudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R. M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant and S. Briggs (2002).** "A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp japonica)." *Science* 296(5565): 92-100.
- Gomez-Gomez, L., Z. Bauer and T. Boller (2001).** "Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis." *Plant Cell* 13(5): 1155-1163.
- Gorg, R., K. Hollricher and P. Schulze-Lefert (1993).** "Functional-Analysis and Rflp-Mediated Mapping of the Mlg Resistance Locus in Barley." *Plant Journal* 3(6): 857-866.
- Green, J. R., T. L. W. Carver and S. J. Gurr (2002).** "The Formation and Function of Infection and Feeding Structures." *The Powdery Mildews A Comprehensive Treatise*: 66-82.
- Gregersen, P. L., H. Thordal-Christensen, H. Forster and D. B. Collinge (1997).** "Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. hordei (syn. *Erysiphe graminis* f.sp. hordei)." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51(2): 85-97.
- Grell, M. N., P. Mouritzen and H. Giese (2003).** "A *Blumeria graminis* gene family encoding proteins with a C-terminal variable region with homologues in pathogenic fungi." *Gene* 311: 181-192.
- Gubler, F., P. M. Chandler, R. G. White, D. J. Llewellyn and J. V. Jacobsen (2002).** "Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression." *Plant Physiology* 129(1): 191-200.
- Halterman, D. A. and R. P. Wise (2004).** "A single-amino acid substitution in the sixth leucine-rich repeat of barley MLA6 and MLA13 alleviates dependence on RAR1 for disease resistance signaling." *Plant Journal* 38(2): 215-226.
- Hammerschmidt, R. and I. A. Kagan (2001).** "In This Issue "Phytoalexins into the 21st century"." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59(2): 59-61.
- Holzberg, S., P. Brosio, C. Gross and G. P. Pogue (2002).** "Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant." *Plant Journal* 30(3): 315-327.
- Horvath, H., N. Rostoks, R. Brueggeman, B. Steffenson, D. von Wettstein and A. Kleinhofs (2003).** "Genetically engineered stem rust resistance in barley using the Rpg1 gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(1): 364-369.
- Hückelhoven, R., C. Dechert and K. H. Kogel (2003).** "Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9): 5555-5560.
- Hückelhoven, R., J. Fodor, C. Preis and K. H. Kogel (1999).** "Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation." *Plant Physiology*

119(4): 1251-1260.

- Hückelhoven, R. and K. H. Kogel (2003).** "Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance?" *Planta* 216(6): 891-902.
- Huitema, E., V. Vleeshouwers, D. M. Francis and S. Kamoun (2003).** "Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*." *Molecular Plant Pathology* 4(6): 487-500.
- Jacobs, A. K., V. Lipka, R. A. Burton, R. Panstruga, N. Strizhov, P. Schulze-Lefert and G. B. Fincher (2003).** "An *Arabidopsis* callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation." *Plant Cell* 15(11): 2503-2513.
- Jia, Y., S. A. McAdams, G. T. Bryan, H. P. Hershey and B. Valent (2000).** "Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance." *Embo Journal* 19(15): 4004-4014.
- Johnston, R. F., S. C. Pickett and D. L. Barker (1990).** "Autoradiography Using Storage Phosphor Technology." *Electrophoresis* 11(5): 355-360.
- Jorgensen, J. H. (1992).** "Discovery, Characterization and Exploitation of Mlo Powdery Mildew Resistance in Barley." *Euphytica* 63(1-2): 141-152.
- Jorgensen, J. H. (1994).** "Genetics of Powdery Mildew Resistance in Barley." *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(1): 97-119.
- Keller, B. and C. Feuillet (2000).** "Colinearity and gene density in grass genomes." *Trends in Plant Science* 5(6): 246-251.
- Kim, M. C., S. H. Lee, J. K. Kim, H. J. Chun, M. S. Choi, W. S. Chung, B. C. Moon, C. H. Kang, C. Y. Park, J. H. Yoo, Y. H. Kang, S. C. Koo, Y. D. Koo, J. C. Jung, S. T. Kim, P. Schulze-Lefert, S. Y. Lee and M. J. Cho (2002).** "Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein - Isolation and characterization of a rice Mlo homologue." *Journal of Biological Chemistry* 277(22): 19304-19314.
- Kim, M. C., R. Panstruga, C. Elliott, J. Muller, A. Devoto, H. W. Yoon, H. C. Park, M. J. Cho and P. Schulze-Lefert (2002).** "Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley." *Nature* 416(6879): 447-450.
- Kinnersley, A. M. and F. J. Turano (2000).** "Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress." *Critical Reviews in Plant Sciences* 19(6): 479-509.
- Kobe, B. and J. Deisenhofer (1994).** "The Leucine-Rich Repeat - a Versatile Binding Motif." *Trends in Biochemical Sciences* 19(10): 415-421.
- Koch, G. and W. Kohler (1991).** "Isozyme Variation and Genetic Diversity of the European Barley Powdery Mildew Population." *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 131(4): 333-344.
- Kogel, K. H., U. Beckhove, J. Dreschers, S. Munch and Y. Romme (1994).** "Acquired-Resistance in Barley - the Resistance Mechanism Induced by 2,6-Dichloroisonicotinic Acid Is a Phenocopy of a Genetically Based Mechanism Governing Race-Specific Powdery Mildew Resistance." *Plant Physiology* 106(4): 1269-1277.
- Kogel, K. H., B. Ortel, B. Jarosch, R. Atzorn, R. Schiffer and C. Wasternack (1995).** "Resistance in Barley against the Powdery Mildew Fungus (*Erysiphe graminis* f.sp.hordei) Is Not Associated with Enhanced Levels of Endogenous Jasmonates." *European Journal of Plant Pathology* 101(3): 319-332.
- Koprek, T., D. McElroy, J. Louwerse, R. Williams-Carrier and P. G. Lemaux (2000).** "An efficient method for dispersing Ds elements in the barley genome as a tool for determining gene function." *Plant Journal* 24(2): 253-263.
- Lacomme, C., K. Hrubikova and I. Hein (2003).** "Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats." *Plant Journal* 34(4): 543-553.

- Lam, E., N. Kato and M. Lawton (2001).** "Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response." *Nature* 411(6839): 848-853.
- Lamb, C. and R. A. Dixon (1997).** "The oxidative burst in plant disease resistance." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Lillico, S. G., J. C. Mottram, N. B. Murphy and S. C. Welburn (2002).** "Characterisation of the QM gene of *Trypanosoma brucei*." *Fems Microbiology Letters* 211(2): 123-128.
- Limpert, E., F. Godet and K. Muller (1999).** "Dispersal of cereal mildews across Europe." *Agricultural and Forest Meteorology* 97 (4): 293-308
- Lyngkjaer, H. F. and T. L. W. Carver (1999).** "Modification of mlo5 resistance to *Blumeria graminis* attack in barley as a consequence of induced accessibility and inaccessibility." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(3): 163-174.
- Maleck, K., A. Levine, T. Eulgem, A. Morgan, J. Schmid, K. A. Lawton, J. L. Dangl and R. A. Dietrich (2000).** "The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance." *Nature Genetics* 26(4): 403-410.
- Manthey, K., F. Krajinski, N. Hohnjec, C. Firnhaber, A. Puhler, A. M. Perlick and H. Kuster (2004).** "Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(10): 1063-1077.
- Martinoia, E., M. Klein, M. Geisler, L. Bovet, C. Forestier, U. Kolukisaoglu, B. Muller-Rober and B. Schulz (2002).** "Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers." *Planta* 214(3): 345-355.
- Matsuo, H., K. Taniguchi, T. Hiramoto, T. Yamada, Y. Ichinose, K. Toyoda, K. Takeda and T. Shiraishi (2001).** "Gramine increase associated with rapid and transient systemic resistance in barley seedlings induced by mechanical and biological stresses." *Plant and Cell Physiology* 42(10): 1103-1111.
- McCallum, C. M., L. Comai, E. A. Greene and S. Henikoff (2000).** "Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics." *Plant Physiology* 123(2): 439-442.
- McDowell, J. M. and B. J. Woffenden (2003).** "Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications." *Trends in Biotechnology* 21(4): 178-183.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway (1997).** "Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition." *Cell* 91(3): 295-298.
- Meijer, H. J. G. and T. Munnik (2003).** "Phospholipid-based signaling in plants." *Annual Review of Plant Biology* 54: 265-306.
- Miller, R. T., A. G. Christoffels, C. Gopalakrishnan, J. Burke, A. A. Ptitsyn, T. R. Boveak and W. A. Hide (1999).** "A comprehensive approach to clustering of expressed human gene sequence: The sequence tag alignment and consensus knowledge base." *Genome Research* 9(11): 1143-1155.
- Moy, P., D. Qutob, B. P. Chapman, I. Atkinson and M. Gijzen (2004).** "Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(10): 1051-1062.
- Mysore, K. S. and C. M. Ryu (2004).** "Nonhost resistance: how much do we know?" *Trends in Plant Science* 9(2): 97-104.
- Narusaka, Y., M. Narusaka, P. Park, Y. Kubo, T. Hirayama, M. Seki, T. Shiraishi, J. Ishida, M. Nakashima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, M. Kobayashi and K. Shinozaki (2004).** "RCH1, a locus in *Arabidopsis* That confers resistance to the hemibiotrophic fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(7): 749-762.
- Nürnberg, T. and F. Brunner (2002).** "Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns." *Current Opinion in Plant Biology* 5(4): 318-324.

- Nürnberg, T. and D. Scheel (2001).** "Signal transmission in the plant immune response." *Trends in Plant Science* 6(8): 372-379.
- Okushima, Y., N. Koizumi, T. Kusano and H. Sano (2000).** "Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins." *Plant Molecular Biology* 42(3): 479-488.
- Ouchi, S., C. Hibino and H. Oku (1976).** "Effect of Earlier Inoculation on Establishment of a Subsequent Fungus as Demonstrated in Powdery Mildew of Barley by a Triple Inoculation Procedure." *Physiological Plant Pathology* 9(1): 25-32.
- Panstruga, R. (2004).** "A golden shot: how ballistic single cell transformation boosts the molecular analysis of cereal-mildew interactions." *Molecular Plant Pathology* 5(2): 141-148.
- Panstruga, R. and P. Schulze-Lefert (2002).** "Live and let live: insights into powdery mildew disease and resistance." *Molecular Plant Pathology* 3(6): 495-502.
- Panstruga, R. and P. Schulze-Lefert (2003).** "Corruption of host seven-transmembrane proteins by pathogenic microbes: a common theme in animals and plants?" *Microbes and Infection* 5(5): 429-437.
- Pedersen, C., S. W. Rasmussen and H. Giese (2002).** "A genetic map of *Blumeria graminis* based on functional genes, avirulence genes, and molecular markers." *Fungal Genetics and Biology* 35(3): 235-246.
- Pedley, K. F. and G. B. Martin (2003).** "Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato." *Annual Review of Phytopathology* 41: 215-243.
- Peterhänsel, C., A. Freialdenhoven, J. Kurth, R. Kolsch and P. Schulze-Lefert (1997).** "Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death." *Plant Cell* 9(8): 1397-1409.
- Pieterse, C. M. J., S. C. M. van Wees, J. A. van Pelt, M. Knoester, R. Laan, N. Gerrits, P. J. Weisbeek and L. C. van Loon (1998).** "A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 10(9): 1571-1580.
- Piffanelli, P., L. Ramsay, R. Waugh, A. Benabdelmouna, A. D'Hont, K. Hollricher, J. H. Jorgensen, P. Schulze-Lefert and R. Panstruga (2004).** "A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew." *Nature* 430(7002): 887-891.
- Piffanelli, P., F. S. Zhou, C. Casais, J. Orme, B. Jarosch, U. Schaffrath, N. C. Collins, R. Panstruga and P. Schulze-Lefert (2002).** "The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli." *Plant Physiology* 129(3): 1076-1085.
- Polverari, A., B. Molesini, M. Pezzotti, R. Buonauro, M. Marte and M. Delledonne (2003).** "Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(12): 1094-1105.
- Potokina, E., M. Caspers, M. Prasad, R. Kota, H. Zhang, N. Sreenivasulu, M. Wang and A. Graner (2004).** "Functional association between malting quality trait components and cDNA array based expression patterns in barley (*Hordeum vulgare* L.)." *Molecular Breeding* 14(2): 153-170.
- Pratelli, J., J. U. Sutter and M. R. Blatt (2004).** "A new catch in the SNARE." *Trends in Plant Science* 9(4): 187-195.
- Raggi, V. (2000).** "Hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in tobacco leaves protected against *Erysiphe cichoracearum* by potato virus Y infection." *Plant Pathology* 49(2): 179-186.
- Ramonell, K., B. Zhang, R. Ewing, Y. Chen, D. Xu, G. Stacey and S. Sommerville (2002).** "Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*." *Molecular Plant Pathology*.

- Reymond, P., H. Weber, M. Damond and E. E. Farmer (2000).** "Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis." *Plant Cell* 12(5): 707-719.
- Roberts, M. R. (2003).** "14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signalling." *Trends in Plant Science* 8(5): 218-223.
- Ros, B., F. Thummler and G. Wenzel (2004).** "Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection." *Molecular Plant Pathology* 5(3): 191-201.
- Rudd, S. (2003).** "Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences?" *Trends in Plant Science* 8(7): 321-329.
- Rushton, P. J. and I. E. Somssich (1998).** "Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens." *Current Opinion in Plant Biology* 1(4): 311-315.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2002).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Scheel, D. (1998).** "Resistance response physiology and signal transduction." *Current Opinion in Plant Biology* 1(4): 305-310.
- Scheideler, M., N. L. Schlaich, K. Fellenberg, T. Beissbarth, N. C. Hauser, M. Vingron, A. J. Slusarenko and J. D. Hoheisel (2002).** "Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays." *Journal of Biological Chemistry* 277(12): 10555-10561.
- Scherrer, B., S. Brunner, E. Isidore, B. Chalhoub, B. Keller and C. Feuillet (2004).** "The barley RPH7 leaf rust resistance gene: A new type of r-gene." *Plant and animal genomes XII conference, San Diego, CA*.
- Schoonbeek, H., G. Del Sorbo and M. A. De Waard (2001).** "The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(4): 562-571.
- Schulze-Lefert, P. and R. Panstruga (2003).** "Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance." *Annual Review of Phytopathology* 41: 641-667.
- Schulze-Lefert, P. and J. Vogel (2000).** "Closing the ranks to attack by powdery mildew." *Trends in Plant Science* 5(8): 343-348.
- Schweizer, P., A. Buchala, R. Dudler and J. P. Metraux (1998).** "Induced systemic resistance in wounded rice plants." *Plant Journal* 14(4): 475-481.
- Schweizer, P., A. Christoffel and R. Dudler (1999).** "Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance." *Plant Journal* 20(5): 540-552.
- Schweizer, P., A. Jeanguenat, D. Whitacre, J. P. Metraux and E. Mosinger (1996).** "Induction of resistance in barley against *Erysiphe graminis f. sp. hordei* by free cutin monomers." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49(2): 103-120.
- Schweizer, P., A. Kmecl, N. Carpita and R. Dudler (2000).** "A soluble carbohydrate elicitor from *Blumeria graminis f. sp. tritici* is recognized by a broad range of cereals." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56(4): 157-167.
- Schweizer, P., J. Pokorny, O. Abderhalden and R. Dudler (1999).** "A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(8): 647-654.
- Schweizer, P., J. Pokorny, P. Schulze-Lefert and R. Dudler (2000).** "Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals." *Plant Journal* 24(6): 895-903.
- Schweizer, P., L. Valletianbindschledler and E. Mosinger (1995).** "Heat-Induced Resistance in Barley to the Powdery Mildew Fungus *Erysiphe graminis f. sp. hordei*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47(1): 51-66.

- Shelp, B. J., A. W. Bown and M. D. McLean (1999).** "Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid." *Trends in Plant Science* 4(11): 446-452.
- Shen, Q. H., F. S. Zhou, S. Bieri, T. Haizel, K. Shirasu and P. Schulze-Lefert (2003).** "Recognition specificity and RAR1/SGT1 dependence in barley Mla disease resistance genes to the powdery mildew fungus." *Plant Cell* 15(3): 732-744.
- Shiraishi, T., T. Yamada, R. L. Nicholson and H. Kunoh (1995).** "Phenylalanine Ammonia-Lyase in Barley - Activity Enhancement in Response to Erysiphe graminis F-Sp Hordei (Race-1), a Pathogen, and Erysiphe pisi, a Nonpathogen." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46(2): 153-162.
- Somerville, S. and J. Vogel (2002).** "Powdery Mildew of Arabidopsis: A model system for Host-Parasite Interactions." *The Powdery Mildews A Comprehensive Treatise* 161-168: 161-168.
- Sreenivasulu, N., L. Altschmied, R. Panitz, U. Hahnel, W. Michalek, W. Weschke and U. Wobus (2002).** "Identification of genes specifically expressed in maternal and filial tissues of barley caryopses: A cDNA array analysis." *Molecular Genetics and Genomics* 266(5): 758-767.
- Staples, R. C. (2003).** "A novel gene for rust resistance." *Trends in Plant Science* 8(4): 149-151.
- Tao, Y., Z. Y. Xie, W. Q. Chen, J. Glazebrook, H. S. Chang, B. Han, T. Zhu, G. Z. Zou and F. Katagiri (2003).** "Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*." *Plant Cell* 15(2): 317-330.
- Testerink, C., H. L. Dekker, Z. Y. Lim, M. K. Johns, A. B. Holmes, C. G. de Koster, N. T. Ktistakis and T. Munnik (2004).** "Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants." *Plant Journal* 39(4): 527-536.
- Thomas, S. W., M. A. Glaring, S. W. Rasmussen, J. T. Kinane and R. P. Oliver (2002).** "Transcript profiling in the barley mildew pathogen *Blumeria graminis* by serial analysis of gene expression (SAGE)." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(8): 847-856.
- Thomas, S. W., S. W. Rasmussen, M. A. Glaring, J. A. Rouster, S. K. Christiansen and R. P. Oliver (2001).** "Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence tag analysis." *Fungal Genetics and Biology* 33(3): 195-211.
- Thordal-Christensen, H., P. L. Gregersen and D. B. Collinge (1999).** "A case Study: Barley and Powdery Mildew." *Mechanisms of Resistance of Plant Diseases*: 77-99.
- Thordal-Christensen, H., Z. G. Zhang, Y. D. Wei and D. B. Collinge (1997).** "Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction." *Plant Journal* 11(6): 1187-1194.
- Vallelian-Bindschedler, L., P. Schweizer, E. Mosinger and J. P. Mettraux (1998).** "Heat-induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. hordei) is associated with a burst of active oxygen species." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52(3): 185-199.
- Van der Hoorn, R. A. L., P. De Wit and M. Joosten (2002).** "Balancing selection favors guarding resistance proteins." *Trends in Plant Science* 7(2): 67-71.
- Van Loon, L. C. and E. A. Van Strien (1999).** "The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2): 85-97.
- Vanacker, H., J. Harbinson, J. Ruisch, T. L. W. Carver and C. H. Foyer (1998).** "Antioxidant defences of the apoplast." *Protoplasma* 205(1-4): 129-140.

- Velculescu, V. E., L. Zhang, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1995).** "Serial analysis of gene expression (SAGE)." *American Journal of Human Genetics* 61(4): A36-A36.
- Verhagen, B. W. M., J. Glazebrook, T. Zhu, H. S. Chang, L. C. van Loon and C. M. J. Pieterse (2004).** "The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(8): 895-908.
- Voelckel, C. and I. T. Baldwin (2004).** "Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from stress combinations." *Plant Journal* 38(4): 650-663.
- von Röpenack, E., A. Parr and P. Schulze-Lefert (1998).** "Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley." *Journal of Biological Chemistry* 273(15): 9013-9022.
- Wei, F. S., K. Gobelmann-Werner, S. M. Morroll, J. Kurth, L. Mao, R. Wing, D. Leister, P. Schulze-Lefert and R. P. Wise (1999).** "The Mla (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley." *Genetics* 153(4): 1929-1948.
- Wei, F. S., R. A. Wong and R. P. Wise (2002).** "Genome dynamics and evolution of the Mla (powdery mildew) resistance locus in barley." *Plant Cell* 14(8): 1903-1917.
- Wei, Y. D., E. Deneergaard, H. Thordalchristensen, D. B. Collinge and V. Smedegaardpetersen (1994).** "Accumulation of a Putative Guanidine Compound in Relation to Other Early Defense Reactions in Epidermal-Cells of Barley and Wheat Exhibiting Resistance to *Erysiphe graminis* F Sp *Hordei*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45(6): 469-484.
- Wei, Y. D., Z. G. Zhang, C. H. Andersen, E. Schmelzer, P. L. Gregersen, D. B. Collinge, V. Smedegaard-Petersen and H. Thordal-Christensen (1998).** "An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus." *Plant Molecular Biology* 36(1): 101-112.
- Wendehenne, D., J. Durner and D. F. Klessig (2004).** "Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses." *Current Opinion in Plant Biology* 7(4): 449-455.
- Wesley, S. V., C. A. Helliwell, N. A. Smith, M. B. Wang, D. T. Rouse, Q. Liu, P. S. Gooding, S. P. Singh, D. Abbott, P. A. Stoutjesdijk, S. P. Robinson, A. P. Gleave, A. G. Green and P. M. Waterhouse (2001).** "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." *Plant Journal* 27(6): 581-590.
- Willits, M. G. and J. A. Ryals (1998).** "Determining the relationship between salicylic acid levels and systemic acquired resistance induction in tobacco." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(8): 795-800.
- Wojtaszek, P. (1997).** "Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection." *Biochemical Journal* 322: 681-692.
- Wolter, M., K. Hollricher, F. Salamini and P. Schulze-Lefert (1993).** "The Mlo Resistance Alleles to Powdery Mildew Infection in Barley Trigger a Developmentally Controlled Defense Mimic Phenotype." *Molecular & General Genetics* 239(1-2): 122-128.
- Wyand, R. A. and J. K. M. Brown (2003).** "Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution." *Molecular Plant Pathology* 4(3): 187-198.
- Yazaki, J., N. Kishimoto, Y. Nagata, M. Ishikawa, F. Fujii, A. Hashimoto, K. Shimbo, Z. Shimatani, K. Kojima, K. Suzuki, M. Yamamoto, S. Honda, A. Endo, Y. Yoshida, Y. Sato, K. Takeuchi, K. Toyoshima, C. Miyamoto, J. Z. Wu, T. Sasaki, K. Sakata, K. Yamamoto, K. Iba, T. Oda, Y. Otomo, K. Murakami, K. Matsubara, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki and S. Kikuchi (2003).** "Genomics approach

- to abscisic acid- and gibberellin-responsive genes in rice.” *DNA Research* 10(6): 249-261.
- Yu, J., S. N. Hu, J. Wang, G. K. S. Wong, S. G. Li, B. Liu, Y. J. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Q. Zhang, M. L. Cao, J. Liu, J. D. Sun, J. B. Tang, Y. J. Chen, X. B. Huang, W. Lin, C. Ye, W. Tong, L. J. Cong, J. N. Geng, Y. J. Han, L. Li, W. Li, G. Q. Hu, X. G. Huang, W. J. Li, J. Li, Z. W. Liu, J. P. Liu, Q. H. Qi, J. S. Liu, T. Li, X. G. Wang, H. Lu, T. T. Wu, M. Zhu, P. X. Ni, H. Han, W. Dong, X. Y. Ren, X. L. Feng, P. Cui, X. R. Li, H. Wang, X. Xu, W. X. Zhai, Z. Xu, J. S. Zhang, S. J. He, J. G. Zhang, J. C. Xu, K. L. Zhang, X. W. Zheng, J. H. Dong, W. Y. Zeng, L. Tao, J. Ye, J. Tan, X. D. Ren, X. W. Chen, J. He, D. F. Liu, W. Tian, C. G. Tian, H. G. Xia, Q. Y. Bao, G. Li, H. Gao, T. Cao, W. M. Zhao, P. Li, W. Chen, X. D. Wang, Y. Zhang, J. F. Hu, S. Liu, J. Yang, G. Y. Zhang, Y. Q. Xiong, Z. J. Li, L. Mao, C. S. Zhou, Z. Zhu, R. S. Chen, B. L. Hao, W. M. Zheng, S. Y. Chen, W. Guo, G. J. Li, S. Q. Liu, M. Tao, L. H. Zhu, L. P. Yuan and H. M. Yang (2002).** “A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*).” *Science* 296(5565): 79-92.
- Zeyen, R. J., T. L. W. Carver and H. F. Lyngkjaer (2002).** “Epidermal Cell Papillae.” *The Powdery Mildews A Comprehensive Treatise*: 107-125.
- Zhang, F., L. Zhu and G. C. He (2004).** “Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice.” *Journal of Plant Physiology* 161(1): 53-62.
- Zhang, H., N. Sreenivasulu, W. Weschke, N. Stein, S. Rudd, V. Rudchuk, E. Potokina, U. Scholz, P. Schweizer, U. Zierold, P. Langridge, R. K. Varshney, U. Wobus and A. Graner (2004).** “Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags.” *The Plant Journal*.
- Zhang, S. Q. and Y. D. Liu (2001).** “Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco.” *Plant Cell* 13(8): 1877-1889.
- Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E. J. Oakeley, J. D. G. Jones, G. Felix and T. Boller (2004).** “Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception.” *Nature* 428(6984): 764-767.
- Zuniga, G. E., E. S. Salgado and L. J. Corcuera (1985).** “Role of an indole alkaloid in the resistance of barley seedlings to aphids.” *Phytochemistry* 24: 945-947.

## Anhang:

**Tabelle 3.0:** Kandidatengenset (siehe auch 3.2.2): **ID:** Identifikationsnummer des cDNA-Klons; **Acc. Nr.:** Accessionnummer des ESTs in der Genbank; **Homologie:** zeigt den besten BlastX-Treffer in SwissProt bzw. SwissPir (Stand Februar 2004); **R(+/-):** (Regulation) gibt an ob das Gen induziert (+) oder reprimiert (-) ist; **RF:** (Regulationsfaktor) Mittelwert aus beiden biologischen Experimenten von „inokuliert“/Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt; **C:** Cluster der Expressionsmusteranalyse („K-means“-Analyse), (siehe Abbildung 3.4); **DI:** mittlerer Differentialindex der inokulierten Versuche (siehe Abbildung 3.7) (**n.a.** nicht analysiert; \* 5 von 6 Verhältnissen waren größer bzw. kleiner 0). Gene mit **DI>0,4** wurden **rot** und Gene mit **DI<-0,4** wurden **blau** unterlegt; **EM:** (EM-Wert) gibt an ob das Gen ubiquitär oder gewebespezifisch exprimiert wird (siehe Abbildung 3.12).; **EM>2** heißt epidermisspezifisch exprimiert (**gelb** unterlegt). **EM<2** heißt mesophyllspezifisch exprimiert (**grün** unterlegt).

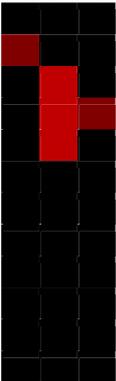
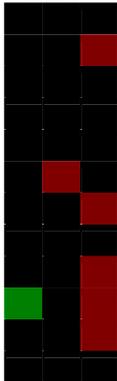
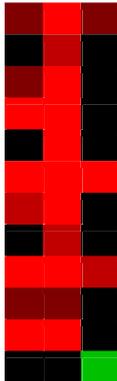
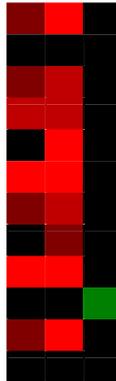
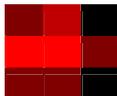
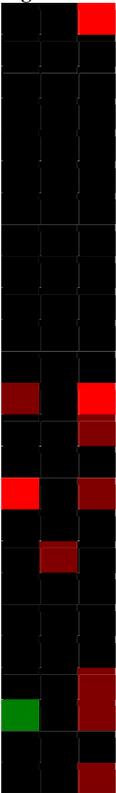
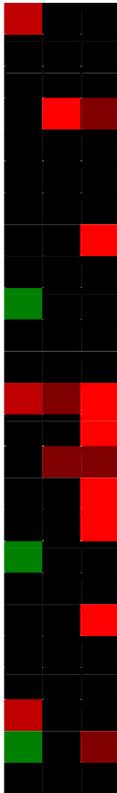
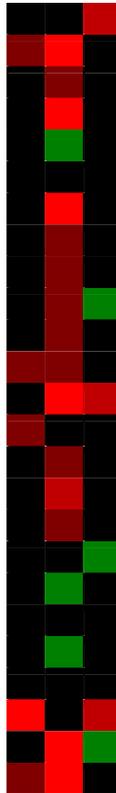
BlastX-Analyse Swissprot und Swisspir					Expressionsdaten:				
<u>ID</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>Homologie</u>	<u>E-Wert</u>	<u>Funktionelle Klasse</u>	<u>R</u>	<u>RF</u>	<u>C</u>	<u>DI</u>	<u>EM</u>
<b>Zelltod:</b>									
HO09F07	CD055469	Mlo-ähnlich	2,0E-56	Zelltod-Regulation	+	9,9	2	0,52*	4,0
HO04F20	CD053484	Ceramid-Synthase	2,0E-78	Sphingolipid-Metabolismus	+	4,4	9	0,26	4,0
HO15O20	CD057701	Glutathion-S-Transferase	1,0E-76	Detoxifikation	+	8,4	4	0,64*	-1,5
HO12P05	CD056673	Glutathion-S-Transferase	1,0E-170	Detoxifikation	+	7,9	4	0,28	-0,4
HO40A04	CF542235	Glutathion-S-Transferase	3,0E-47	Detoxifikation	+	5,9	4	0,41	-0,6
<b>Zellwand:</b>									
HO13D15	CD056766	Peroxidase (sekretiert)	4,0E-56	Lignifizierung	+	3,0	1	0,61*	2,4
HO16C19	<i>submitted</i>	Peroxidase (sekretiert)	8,0E-39	Lignifizierung	+	12,1	9	0,1	2,3
HO02P04	CD053965	Peroxidase (sekretiert)	2,0E-20	Lignifizierung	+	9,5	9	0,18	1,9
HO14K08	CD057271	Zellulose-Synthase	3,0E-59	Zellwand-Metabolismus	+	4,6	0	0,09	2,7
HO14B14	CD057078	(1-3,1-4)-β-D-glucanase	0,0E+00	Zellwand-Metabolismus	-	2,3	3	-0,07	1,6
HO06G10	CD057946	Kaffeesäure-3-O-Methyltransferase	1,0E-73	Lignifizierung	+	7,6	5	0,27	0,5
HO12P08	CD056676	Zellwand assoziierte Ser/Thr Kinase	4,0E-48	Zellwand-Metabolismus	+	2,7	0	-0,38	0,6
HO16G15	<i>submitted</i>	Zellwand assoziierte Ser/Thr Kinase	1,0E-33	Zellwand-Metabolismus	+	5,7	1	0,23	1,0
HO08F24	CD055054	Glucan-1,3-β-Glucosidase	1,0E-72	Zellwand-Metabolismus	+	3,3	1	0,39	-0,3
HO03C22	CD053913	Exo-1,3-β-Glucanase	2,0E-61	Zellwand-Metabolismus	+	3,5	#	0,32	-1,0
HO40A02	CF542233	dTDP-Glucose 4-6-Dehydratase	6,0E-54	Zellwand-Metabolismus	+	2,4	#	0,1	0,2
HO10F22	CD055829	Peroxidase (sekretiert)	1,0E-82	Lignifizierung	-	4,7	3	-0,24	1,0
HO08L11	CD055151	Xyloglucan-Endotransglycosylase	1,0E-140	Zellwand-Metabolismus	-	3,0	3	0	-1,7
HO03F11	CD053849	α-Galactosidase	2,0E-91	Zellwand-Metabolismus	-	2,9	3	-0,23	1,2
HO14K07	CD057270	Chitinase	0,0E+00	Zellwand-Metabolismus	+	7,3	4	0,95*	-3,0
HO09K20	CD055594	Peroxidase (sekretiert)	0,0E+00	Lignifizierung	+	9,3	1	0,45	-4,7
HO13I11	CD056875	Glycin-reiches-Protein	1,0E-118	Zellwand-Metabolismus	+	3,5	8	-0,26	
<b>Membran:</b>									
HO02A01	CD054246	Lysophospholipase	9,0E-51	Lipid-Metabolismus	+	6,8	7	0,3	0,7
HO12G01	CD056482	Diacylglycerol-Kinase	7,0E-19	Lipid-Metabolismus	+	10,0	8	0,97*	0,1
HO06M04	CD057837	Phosphatidat-Phosphatase	7,0E-38	Lipid-Metabolismus	+	8,0	4	0,18	1,3
HO06D23	CD057973	Ca <sup>2+</sup> -ATPase	0,0E+00	regul. Membranprotein	+	5,5	2	0,19	0,5
HO03G05	CD053795	Lipoxygenase	2,0E-63	Lipid-Metabolismus	+	3,6	#	0,33	-1,3
HO08F05	CD055238	Membranprotein (mehrf. verankert)	6,0E-74	regul. Membranprotein	+	2,4	5	0,37	-0,2
<b>Photosynthese:</b>									
HO07B11	CD054703	Rubisco LSU	1,0E-115	Calvin-Zyklus	-	4,7	3	-0,11	-1,2
HO12D09	CD056429	Chlorophyll a/b bindendes Protein	0,0E+00	Licht-Reaktion	-	14,5	#	0,3	-2,3
HO04N12	CD058436	Rubisco SSU	1,0E-47	Calvin-Zyklus	-	4,0	3	0,06	-3,7
HO01I01	CD054417	Photosystem II 10 kda Polypeptid	0,0E+00	Licht-Reaktion	-	2,3	#	-0,16	-2,7



<u>ID</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>Homologie</u>	<u>E-Wert</u>	<u>Funktionelle Klasse</u>	<u>R</u>	<u>RF</u>	<u>C</u>	<u>DI</u>	<u>EM</u>
<b>Primärmetabolismus:</b>									
HO14D18	CD057126	NADH-Pyrophosphatase	5,0E-70	Nukleotid-Metabolismus	+	5,3	7	0,42	3,1
HO13E12	CD056786	β -Amylase	0,0E+00	Zucker-Metabolismus	+	6,0	6	-0,94	5,5
HO07F11	CD054787	Glutamat-Decarboxylase	2,0E-85	GABA- <i>Shunt</i>	+	3,9	5	0,07	3,3
HO06B11	CD058061	Zellwand-Invertase	1,0E-146	Zucker-Metabolismus	+	2,1	5	0,07	2,2
HO03M02	CD053679	Anthranilat-Synthase	1,0E-132	Tryptophan-Metabolismus	+	9,6	2	0,53*	-0,5
HO10M15	CD055977	Anthranilat-Synthase	4,0E-77	Tryptophan-Metabolismus	+	5,3	4	0,88*	-0,7
HO03K07	CD053728	β -Galactosidase	3,0E-26	Zucker-Metabolismus	+	6,9	1	0,63*	-1,1
HO05N02	CD058128	Glutamat-Decarboxylase	1,0E-136	GABA- <i>Shunt</i>	+	5,5	1	0,72*	0,4
HO11O07	CD056326	Adenosylhomocysteinase	1,0E-156	Methionin-Metabolismus	+	6,1	4	0,38	-1,4
HO16A19	<i>submitted</i>	Aldose-1-Epimerase-ähnlich	2,0E-20	Zucker-Metabolismus	+	5,3	9	0,39	-0,3
HO06F12	CD057966	Chorismat-Synthase	5,0E-43	Shikimat-Weg	+	5,2	0	0,44	-0,1
HO13H19	CD056859	Chorismat-Synthase	2,0E-49	Shikimat-Weg	+	3,1	0	0,06	1,0
HO06G20	CD057905	Cytochrome P450 Reduktase	0,0E+00	Electronentransport	+	7,2	2	0,39	-0,7
HO01D14	CD054482	Indol-3-Glycerin-P-Synthase	5,0E-77	Tryptophan-Metabolismus	+	3,2	0	0,23	-0,2
HO01P15	CD054236	Malat-Dehydrogenase	1,0E-110	Malat- <i>shuttle</i>	+	3,9	0	0,24	-0,2
HO40A13	CF542234	Methionin-Synthase	9,0E-47	Methionin-Metabolismus	+	8,2	9	0,32	0,4
HO09M16	CD055634	Methionin-Synthase	1,0E-113	Methionin-Metabolismus	+	5,5	0	-0,02	1,1
HO07K06	CD054886	Polyphosphat/ATP-NAD-Kinase	7,0E-97	Cofactor-Synthese	+	8,5	4	0,13	0,8
HO09I06	CD055536	Transaldolase	7,0E-93	Glykolyse-Pentose-P-Weg	+	3,3	0	-0,02	0,3
HO14J07	CD057248	Transaldolase	3,0E-61	Glykolyse-Pentose-P-Weg	+	2,9	0	0,12	-0,3
HO06I23	CD057867	Mannose-6-phosphat-Isomerase	1,0E-44	Zucker-Metabolismus	-	7,7	3	-0,05	0,6
HO10E23	CD055807	Diphosphatase	0,0E+00	allgemein	-	4,8	3	-0,19	0,1
HO06B04	CD058054	ATP-Synthase UE b (vakuolär)	1,0E-78	unbekannt	-	3,3	3	-0,49	-0,2
HO13A03	CD056687	ATP-Synthase β- <i>Chain</i>	0,0E+00	Erzeugung von Energie	-	2,4	5	0,59	0,2
HO15N08	CD057671	6-Phosphogluconolactonase-ähnl.	9,0E-84	oxidativer Pentose-P Met.	-	2,7	#	-0,52*	-2,2
HO40A10	CF542227	Homocystein-S-Methyltransferase	5,0E-34	Methionin-Metabolismus	+	15,2	2	0,51*	-
<b>Transkription &amp; Translation &amp; Proteolyse:</b>									
HO10M21	CD055983	Serin-Proteinase (Subtilisin ähnlich)	2,0E-58	Proteinabbau	+	12,8	9	0,52	3,8
HO14K19	CD057280	Serin-Proteinase (Subtilisin ähnlich)	3,0E-41	Proteinabbau	+	8,1	4	0,43	3,4
HO10K23	CD055938	Transformer-2-ähnlich	1,0E-35	“Spleißen”	-	11,3	3	-0,22	-1,1
HO12H22	CD056515	Legumain-ähnliche Protease	2,0E-45	Proteinabbau	-	6,4	3	0,61	2,3
HO13E23	CD056796	Aspartat-Proteinase	5,0E-98	Proteinabbau	-	4,0	3	-0,57	2,1
HO11O24	CD056338	Zink-Finger-Protein	9,0E-19	Transkription	+	2,8	#	-0,56*	0,3
HO08P18	CD055348	Subtilisin-Chymotrypsin-Inhibitor	0,0E+00	Proteinabbau	+	5,1	0	-0,51	-1,3
HO05L01	CD058171	Endoplasmin	0,0E+00	molekulares Chaperone	+	4,9	7	0,22	-0,3
HO14H07	CD057204	Anthocyanin-Gen-Regulator PAC1	5,0E-88	Transkription	+	4,4	0	0,24	-0,2
HO05K04	CD058184	40S ribosomales Protein	7,0E-80	Translation	+	3,8	0	0,01	-0,9
HO07G09	CD054807	Aleuron-Ribonuclease	0,0E+00	RNA-Metabolismus	+	3,1	5	-0,05	0,3
HO08O05	CD055315	<i>Scarecrow</i> -ähnliches Protein 9	3,0E+00	Transkription	+	2,5	5	0,22	-0,2
HO04H06	CD053473	Exostosin-2	2,0E-64	Protein-N-Glycosylierung	+	2,5	5	0,31	-0,3
HO07B06	CD054698	Protein der QM-Familie	1,0E-179	Translation	+	9,1	6	0,1	-2,2
HO14F24	CD057176	Protease-Inhibitor	0,0E+00	Proteinabbau	+	5,6	4	0,4	-2,7
HO11H08	CD056192	Nucellin	7,0E-23	Proteinabbau	+	4,3	0	-0,02	-
HO10I08	CD055881	DNA-bindendes Protein	5,0E-55	Transkription	+	4,3	8	0,78	-
<b>Aktive Sauerstoffspezies:</b>									
HO09L22	CD055617	Germin-ähnliches Protein 4	0,0E+00	ROS-Bildung	+	7,5	9	0,66*	4,1
HO15E16	CD057490	Germin-ähnliches Protein 4	1,0E-149	ROS-Bildung	+	15,3	9	0,07	4,3
HO01P12	CD054282	Germin-ähnliches Protein 4	0,0E+00	ROS-Bildung	+	13,5	9	0,15	4,0
HO11H17	CD056200	Germin-ähnliches Protein 4	0,0E+00	ROS-Bildung	+	12,9	9	0,51	4,2
HO05L14	CD058179	Germin-ähnliches Protein 4	1,0E-122	ROS-Bildung	+	7,8	9	0,35	4,5
HO14F03	CD057158	Monodehydroascorbat-Reduktase	1,0E-112	ROS-Scavenging	+	3,4	#	0,07	2,1
HO11P16	CD056353	gp91-Phox	4,0E-86	ROS-Bildung	+	2,7	0	0,1	-0,1
HO14P21	CD057390	Fe/Ascorbat-abh. Oxidoreduktase	6,0E-74	ROS-Scavenging	+	3,9	7	0,44	0,1
HO03E01	CD053875	Glutaredoxin	6,0E-39	ROS-Scavenging	-	3,8	3	-0,1	-0,7



<u>ID</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>Homologie</u>	<u>E-Wert</u>	<u>Funktionelle Klasse</u>	<u>R</u>	<u>RF</u>	<u>C</u>	<u>DI</u>	<u>EM</u>
<b>Sekundärmetabolismus:</b>									
HO13H24	CD056864	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	1,0E-132	Phenylpropan-Weg	+	7,3	10	-0,03	1,3
HO08E06	CD055215	4-Cumaroyl-CoA-Ligase	1,0E-81	Phenylpropan-Weg	+	3,4	5	0,11	2,3
HO03B04	CD053877	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	1,0E-80	Phenylpropan-Weg	+	11,9	4	0,66*	0,8
HO07H20	CD054839	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	0,0E+00	Phenylpropan-Weg	+	8,1	0	0,75*	-0,3
HO02E07	CD054136	Tryptophan-Decarboxylase	7,0E-69	Indolalkaloid Metab.	+	9,5	4	0,84*	0,0
HO40A06	CF542248	4-Cumaroyl-CoA-Ligase	1,0E-10	Phenylpropan-Weg	+	23,7	4	0,43	1,2
HO07H15	CD054835	4-Cumaroyl-CoA-Ligase	1,0E-169	Phenylpropan-Weg	+	4,0	0	0,1	0,3
HO14I10	CD057227	Zimtsäure-Hydroxylase	0,0E+00	Phenylpropan-Weg	+	3,7	0	0,11	-0,1
HO15O04	CD057687	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	2,0E-95	Phenylpropan-Weg	+	18,0	4	0,11	0,1
HO15F23	CD057523	Flavanon-3-Hydroxylase	2,0E-56	Flavonoid-Biosynthese	+	4,1	10	-0,09	-0,5
HO11N14	CD056310	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	0,0E+00	Phenylpropan-Weg	+	9,4	4	0,3	0,1
HO02K06	CD054075	Lycopene- $\beta$ -Cyclase	2,0E-42	Carotinoid-Synthese	-	3,9	3	-0,38	0,7
<b>Sekretion:</b>									
HO12F09	CD056469	HvSNAP 34	5,0E-49	Sekretion	+	3,5	5	0,69*	1,3
HO02F02	CD054150	Elicitor induced/secretory granules	8,0E-51	Sekretion	+	15,8	4	0,15	2,1
HO12N23	CD056658	Syntaxin	2,0E-32	Sekretion	+	2,3	0	0	2,4
<b>Signalweitergabe:</b>									
HO10E22	CD055806	Protein-Kinase-Rezeptor	1,0E-61	Signalerkennung	+	21,9	1	0,93*	3,9
HO15I04	CD057574	GMP-Kinase	2,0E-49	Signalweitergabe	+	5,1	4	0,18	1,4
HO04P08	CD058416	GAMyb-Transkription-Faktor	0,0E+00	Gibberellin-Signalweg	+	3,3	0	0,11	2,8
HO14G19	CD057186	Protein-Kinase-Rezeptor	0,0E+00	Signalweitergabe	+	2,8	0	0,32	1,6
HO03N23	CF542254	farnesylierendes Protein	6,0E-52	Signalweitergabe	-	2,9	11	-0,03	2,1
HO06F18	CD057932	12-OPD-Reduktase	2,0E-62	Jasmonat-Signalweg	+	3,3	5	0,42	-0,5
HO14H18	CD057214	ARM-Motiv enthaltendes Protein	2,0E-36	Signalweitergabe	+	3,2	0	0,07	0,9
HO10E18	CD055803	NBS-LRR ähnlich	1,0E-67	Signalerkennung	+	3,6	0	0,14	1,3
HO01K17	CD054355	NBS-LRR ähnlich	2,0E-35	Signalerkennung	+	2,8	0	0,34	-0,8
HO11C08	CD056085	Protein-Kinase	1,0E-116	Signalweitergabe	+	2,9	0	-0,31	0,3
HO08H24	CD055073	Protein-Kinase	3,0E-25	Signalweitergabe	+	2,8	10	0,16	0,3
HO12P14	CD056679	Protein-Kinase	1,0E-50	Signalweitergabe	+	2,4	0	-0,15	0,5
HO12J07	CD056548	Protein-Kinase-Rezeptor	2,0E-40	Signalerkennung	+	5,5	7	0,57	0,3
HO15N01	CD057664	Protein-Kinase-Rezeptor	7,0E-52	Signalerkennung	+	4,1	7	0,36	-1,4
HO13M17	CD056972	Protein-Kinase-Rezeptor	0,0E+00	Signalerkennung	+	3,6	10	0,25	0,9
HO08B09	CD055157	Protein-Kinase-Rezeptor	5,0E-37	Signalerkennung	+	3,4	5	0,49	0,5
HO06N14	CD054654	Protein-Kinase-Rezeptor	1,0E-32	Signalerkennung	+	3,4	2	0,35	-1,2
HO05C04	CD058348	<i>Somatic embryog. receptor-like</i>	2,0E-67	Signalerkennung	+	3,2	5	0,42	-0,7
HO04G13	CD053499	Protein-Kinase	1,0E-107	Signalweitergabe	-	7,3	11	-0,32	-0,1
HO04M04	CD058522	Protein-Kinase	1,0E-76	Signalweitergabe	-	6,9	3	-0,3	-0,5
HO08E05	CD055214	Adenylyl-Cyclase	6,0E-55	Signalweitergabe	-	2,5	11	0,23	-1,3
HO01O12	CD054291	Protein-Kinase-Rezeptor	9,0E-16	Signalerkennung	+	3,3	1	0,48	-2,0
HO11F10	CD056154	12-OPD-Reduktase	7,0E-49	Jasmonat-Signalweg	+	11,1	8	-0,46*	-
HO10N20	CD056000	Protein-Kinase	3,0E-92	Signalweitergabe	+	7,0	7	-0,02	-
HO05A19	CD058363	Protein-Kinase-Rezeptor	4,0E-23	Signalerkennung	+	4,4	1	0,26	-

<u>6</u> <u>12</u> <u>24</u>			<u>6</u> <u>12</u> <u>24</u>			<u>6</u> <u>12</u> <u>24</u>			<u>6</u> <u>12</u> <u>24</u>			<u>HZ</u>	<u>HA</u>	<u>HB</u>	<u>HF</u>	<u>HY</u>	<u>HS</u>	<u>HT</u>	<u>HU</u>	<u>HV</u>	<u>HC</u>	<u>HX</u>	<u>HM</u>	<u>HI</u>	<u>HD</u>	<u>HW</u>	<u>HP</u>	<u>HO</u>
<b>Sekundärmetabolismus:</b>																												
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	8
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
				-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	6	-	-	-	10	-	8
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	11
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	6	6	-	-	-	3	40	-	-	5
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	8
				-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<b>Sekretion:</b>																												
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
				3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<b>Signalweitergabe:</b>																												
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				5	-	3	-	4	-	6	-	-	-	3	3	-	7	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	5
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3	-	-	5
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S

<u>ID</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>Homologie</u>	<u>E-Wert</u>	<u>Funktionelle Klasse</u>	<u>R</u>	<u>RF</u>	<u>C</u>	<u>DI</u>	<u>EM</u>
<b>Transport:</b>									
HO03A06	CD053942	ABC-Transporter (MRP-ähnlich)	3,0E-95	Transporter	+	4,3	5	0,68*	-0,6
HO14E18	CD057149	ABC-Transporter (PDR-ähnlich)	3,0E-28	Transporter	+	5,4	10	0,33	0,4
HO40A12	CF542226	ABC-Transporter (PDR-ähnlich)	1,0E-24	Transporter	+	4,0	5	-0,09	-0,1
HO01L03	CD054363	ABC-Transporter (PDR-ähnlich)	1,0E-44	Transporter	+	3,3	0	0,15	-0,6
HO09I07	CD055537	ADP/ATP-Carrier (mitochondrial)	0,0E+00	Transporter	+	2,9	5	-0,05	-0,6
HO06J04	CD057871	ADP/ATP-Carrier (plastidär)	4,0E-68	Transporter	+	5,3	5	0,42*	-0,3
HO01I10	CD054402	Aminosäure-Permease 1	5,0E-37	Transporter	+	2,9	0	0,06	0,1
HO13G09	CD056830	ANT-Gen	3,0E-49	Transporter	+	4,4	1	-0,09	-0,2
HO13M15	CD056970	Exportin-7	1,0E-32	Transporter	+	5,6	1	-0,05	0,7
HO12F18	CD056476	Hexose-Transporter	4,0E-71	Transporter	+	10,5	4	0,52*	-0,2
HO02I03	CD054089	Zucker-Transporter	2,0E-35	Transporter	+	4,1	1	0,42	0,7
HO15G24	CD057539	Zucker-Transporter	1,0E-76	Transporter	+	3,1	5	0,28	1,1
HO09E02	CD055443	Zucker-Transporter	3,0E-86	Transporter	+	2,4	10	0,21	-1,0
<b>Funktion unklar:</b>									
HO40A11	CF542236	Retrotransposon	5,0E-65	unklar	+	8,8	1	0,99*	2,1
HO14J02	CD057243	WCI-5 (TaPR-17)	1,0E-80	unklar	+	9,4	9	0,13	1,7
HO09G22	CD055505	Lipid-Transfer-Protein	3,0E-11	unklar	+	9,2	0	0,09	1,5
HO40A05	CF542232	kupferbindendes Protein (blau)	1,0E-46	unklar	+	5,4	2	0,16	1,3
HO04B17	CD053582	Salztoleranz-Protein	2,0E-40	unklar	+	11,8	1	-0,14	1,6
HO03I07	CD053768	HvPR-17	0,0E+00	unklar	+	5,3	7	0,64*	-1,0
HO11C07	CD056107	Uclacyanin	3,0E-23	unklar	+	4,4	0	0,47*	1,1
HO40A01	CF542230	Hydrolase ( $\alpha$ - $\beta$ "fold")	7,0E-26	unklar	+	3,9	0	0,35	0,6
HO05N22	CD058116	kupferbindendes Protein (blau)	1,0E-34	unklar	+	9,8	4	-0,04	0,2
HO03O03	CD053640	FIERG2-Protein	3,0E-54	unklar	+	6,5	0	0,44	-1,8
HO06P13	CD058506	Oxidoreduktase	3,0E-44	unklar	+	7,3	2	0,44	-0,7
HO09F06	CD055468	RNA bindendes Protein 2	4,0E-15	unklar	+	4,6	0	-0,25	0,7
HO12L20	CD056603	SRG1-Protein (PR10)	8,0E-38	unklar	+	6,0	2	0,36	-0,8
HO04M23	CD058448	Heparanase	2,0E-61	unklar	+	3,7	2	0,09	-0,3
HO09K14	CD055589	TaWIR1	3,0E-47	unklar	+	4,6	9	0,67	-2,2
HO14K22	CD057283	LRR-enthaltendes Protein	1,0E-52	unklar	+	4,4	7	0,6	-2,1
HO15M05	CD057646	Lipid-Transfer-Protein	3,0E-20	unklar	+	4,0	8	-0,3	-
HO09H23	CD055529	Lipid-Transfer-Protein	4,0E-20	unklar	-	3,7	11	0,03	2,5
HO01D23	CD054490	paf93-Gen	0,0E+00	unklar	-	2,7	11	-0,29	1,9
HO07P16	CD055010	Trockenheit induziertes Protein	7,0E-48	unklar	-	2,3	3	-0,48	-
HO09F19	CD055478	Nodulin-ähnliches Protein	4,0E-32	unklar	-	4,0	3	-0,19	0,2
HO14B10	CD057074	$\beta$ -Glucosidase	1,0E-49	unklar	-	5,1	3	-0,3	-0,3
HO11B12	CD056077	Aldehyd-Dehydrogenase	1,0E-152	unklar	-	4,6	3	-0,23	-0,1



<u>ID</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>Homologie</u>	<u>E-Wert</u>	<u>Funktionelle Klasse</u>	<u>R</u>	<u>RF</u>	<u>C</u>	<u>DI</u>	<u>EM</u>
<b>Funktion unbekannt:</b>									
HO07G15	CD054816	unbekannt	8,0E-72	unbekannt	+	2,5	5	0,25	2,6
HO02D24	CD054171	unbekannt	2,0E-53	unbekannt	+	3,8	5	-0,08	3,3
HO12E03	CD056444	unbekannt	2,0E-50	unbekannt	+	2,3	10	0,18	2,3
HO03M03	CD053680	unbekannt	9,0E-63	unbekannt	+	2,2	0	-0,09	1,6
HO07I05	CD054848	unbekannt	5,0E-77	unbekannt	-	2,8	11	-0,13	2,2
HO10E10	CD055796	unbekannt	3,0E-68	unbekannt	+	4,3	8	-0,88*	-1,2
HO10B14	CD055734	unbekannt	1,0E-81	unbekannt	+	11,0	8	0,26	0,3
HO01I09	CD054401	unbekannt	6,0E-24	unbekannt	+	5,8	0	0,32	0,5
HO14M23	CD057327	unbekannt	6,0E-97	unbekannt	+	5,3	10	0,17	0,7
HO01C15	CD054536	unbekannt	5,0E-33	unbekannt	+	5,2	0	0,24	-0,2
HO12B19	CD056393	unbekannt	3,0E-46	unbekannt	+	5,1	1	0,09	-0,5
HO01B13	CD054542	unbekannt	1,0E-30	unbekannt	+	3,9	1	0,41	0,1
HO40A03	CF542228	unbekannt	3,0E-18	unbekannt	+	4,7	2	0,18	-0,3
HO12I08	CD056524	unbekannt	3,0E-29	unbekannt	+	2,9	10	-0,4	1,1
HO06L17	CD057826	unbekannt	8,0E-50	unbekannt	+	2,7	5	0,15	-0,4
HO04M10	CD053366	unbekannt	9,0E-85	unbekannt	-	5,8	3	-0,21	-0,7
HO10B22	CD055741	unbekannt	6,0E-89	unbekannt	-	3,9	11	-0,38	1,0
HO06D14	CD058003	unbekannt	1,0E-65	unbekannt	-	2,6	3	-0,08	-0,8
HO02H12	CD054111	unbekannt	4,0E-47	unbekannt	-	2,4	3	-0,28	-1,1
HO10K20	CD055931	unbekannt	2,0E-11	unbekannt	+	4,2	8	-0,63*	-
<b>kein Treffer:</b>									
HO14P06	CD057376	kein Treffer		kein Treffer	+	13,6	7	0,51	1,9
HO40A09	CF542247	kein Treffer		kein Treffer	+	9,3	0	-0,55	2,2
HO05I14	CD058210	kein Treffer		kein Treffer	+	8,4	10	-0,36	2,2
HO03H16	CD053787	kein Treffer		kein Treffer	+	8,1	1	0,39	3,3
HO15I12	CD057572	kein Treffer		kein Treffer	+	4,9	10	0,07	2,8
HO12P18	CD056682	kein Treffer		kein Treffer	+	4,3	5	0,2	1,5
HO02K10	CD054078	kein Treffer		kein Treffer	+	4,0	0	0,15	1,5
HO15C07	CD057435	kein Treffer		kein Treffer	+	3,4	1	-0,1	1,4
HO02G09	CD054120	kein Treffer		kein Treffer	+	3,1	0	-0,23	1,5
HO02O10	CD053972	kein Treffer		kein Treffer	+	2,9	0	0,05	1,9
HO12I10	CD056525	kein Treffer		kein Treffer	+	3,2	0	0,47*	0,6
HO40A16	CD053463	kein Treffer		kein Treffer	+	3,2	0	0,27	0,2
HO06N01	CD054644	kein Treffer		kein Treffer	+	11,9	10	-0,16	0,7
HO11A09	CD056058	kein Treffer		kein Treffer	+	4,3	7	0,22	0,5
HO09L02	CD055599	kein Treffer		kein Treffer	+	4,1	10	0,58	-0,5
HO07F18	CD054800	kein Treffer		kein Treffer	+	3,9	10	-0,09	0,6
HO12C06	CD056404	kein Treffer		kein Treffer	+	3,5	0	0,05	0,3
HO14E07	CD057139	kein Treffer		kein Treffer	+	3,3	10	0,23	-0,3
HO02B06	CD054228	kein Treffer		kein Treffer	+	3,2	1	0,09	0,1
HO02H02	CD054101	kein Treffer		kein Treffer	+	3,2	8	0,31	0,8
HO04C16	CD053551	kein Treffer		kein Treffer	-	3,4	3	-0,56*	0,4
HO06K04	CD057851	kein Treffer		kein Treffer	+	5,6	9	0,54*	-3,3
HO06J21	CD057887	kein Treffer		kein Treffer	+	7,3	7	0,07	-4,1
HO11D06	CD056112	kein Treffer		kein Treffer	-	15,3	11	0,05	-3,1
HO14E24	CD057155	kein Treffer		kein Treffer	-	3,6	11	0,12	-2,0
HO04H05	CD053472	kein Treffer		kein Treffer	+	4,2	10	0,78*	-
HO40A15	CD053549	kein Treffer		kein Treffer	+	3,4	8	-0,17	-



<u>ID</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>Homologie</u>	<u>E-Wert</u>	<u>Funktionelle Klasse</u>	<u>R</u>	<u>RF</u>	<u>C</u>	<u>DI</u>	<u>EM</u>
		<b>Bgh-Gene</b>							
HO14N21*	CD057347	HSP 70	1,0E-78	molekulares Chaperone	+	14,7	n.a.		2,2
HO08J20	CD055129	Retrotransposon	1,0E-170	Transposon	+	12,9	n.a.		3,7
HO05G22	CD058283	14-3-3-Protein	3,0E-54	regul. Membranprotein	+	14,1	n.a.		2,7
HO16M07	<i>submitted</i>	14-3-3-Protein	9,0E-92	regul. Membranprotein	+	13,5	n.a.		2,9
HO08B23	CD055171	18S ribosomale RNA	1,0E-159	RNA-Metabolismus	+	5,0	n.a.		1,6
HO03N20	CD053635	Chitinase	0,0E+00	Zellwand-Metabolismus	+	3,8	n.a.		2,2
HO07O11	CD054986	Elongationsfaktor-1- $\alpha$	1,0E-104	Translation	+	5,6	n.a.		2,7
HO08J10	CD055120	GAP-Dehydrogenase	1,0E-176	Glykolyse	+	9,6	n.a.		2,5
HO04A02*	CD053626	kein Treffer		kein Treffer	+	26,3	n.a.		3,7
HO09I03	CD055533	Serin-Carboxypeptidase	7,0E-84	Proteinabbau	+	9,0	n.a.		2,7
HO11C09	CD056086	Tetraspanin	9,0E-34	Entwicklung	+	4,5	n.a.		1,4
HO09E08*	CD055449	Ras-Transkriptionsfaktor	5,0E-77	Transkription	+	10,0	n.a.		2,3
HO04A11	CD053606	unbekannt	5,0E-44	unbekannt	+	4,9	n.a.		2,1
HO06N16	CD054656	unbekannt	2,0E-69	unbekannt	+	15,8	n.a.		4,2
HO01C21	CD054508	unbekannt	1,0E-127	unbekannt	+	14,5	n.a.		3,9
HO08O06	CD055316	unbekannt	0,0E+00	unbekannt	+	12,4	n.a.		2,7
HO16O01	<i>submitted</i>	unbekannt	1,0E-159	unbekannt	+	10,7	n.a.		2,6
HO05D13	CD058315	unbekannt	2,0E-142	unbekannt	+	14,6	n.a.		0,2
HO10M16	CD055978	kein Treffer		kein Treffer	+	14,1	n.a.		0,5
HO05L15	CD058180	kein Treffer		kein Treffer	+	2,8	n.a.		1,2
HO15J13	CD057592	$\beta$ -1,3-Glucanosyltransferase	2,0E-51	Zellwand-Metabolismus	+	5,4	10		1,0
HO04M11	CD053367	unbekannt	2,0E-88	unbekannt	+	7,2	n.a.		0,4
HO02A18	CD054260	unbekannt	1,0E-120	unbekannt	+	5,0	n.a.		0,4
HO14D22	CD057130	Ribonucleoprotein	3,0E-32	unklar	+	5,5	n.a.		-2,5
HO08B21	CD055169	unbekannt	0,0E+00	unbekannt	+	7,9	n.a.		-





---

## Werdegang

### Schulbildung:

- 09/1976-07/1986      Grundschule (POS) Meerane
- 09/1986-02/1988      Ausbildung zum Funkmechaniker
- 09/1991-07/1993      Allgemeine Hochschulreife (Erwachsenenkolleg Breitenbrunn)

### Studium:

- 10/1993-02/1999      Friedrich Schiller Universität Jena  
Hauptstudium mit der Fachrichtung Mikrobiologie, Nebenfächer  
Biochemie, Ökologie, Lebensmitteltoxikologie
- Thema der Diplomarbeit:** Regulation der Laccasebildung im  
Weißfäulepilz *Pycnoporus cinnabarinus*: Transkriptanalyse zweier  
Laccasegene mittels kompetitiver PCR
- Thema der Promotionsarbeit:** Transkriptomanalyse  
mehltaubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des  
*mlo*-Resistenzgenes.

### Berufspraxis:

- 08/1999-03/2000      wissenschaftlicher Mitarbeiter am UfZ Leipzig-Halle in der Abteilung  
Chemische Ökotoxikologie (Dr. Rolf Altenburger)
- 04/2000-09/2000      wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Botanischen Staatssammlung  
München (Dr. Dagmar Triebel)
- 12/2000-06/2004      wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Transkriptom-  
analyse am IPK Gatersleben (Dr. Patrick Schweizer)



---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle/Saale, den 10.01.2005