

**Germin-ähnliche Proteine der Gerste: Expression und Funktion in der  
Basalresistenz gegen den Mehltaupilz  
*Blumeria graminis f.sp. hordei***



**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Grit Astrid Zimmermann  
geb. am: 18.06.1974 in Aschersleben

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Wobus, Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Holger Deising, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), 07.02.08

**urn:nbn:de:gbv:3-000013548**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013548>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nichtwirtsresistenz und Wirtsresistenz.....	1
1.2 Basalresistenz und R-Gen spezifische Resistenz.....	2
1.3 Erkennung und Signaltransduktion.....	4
1.4 Das Gersten-Mehltau-Pathosystem .....	6
1.4.1 Kulturpflanze Gerste .....	6
1.4.2 <i>Blumeria graminis</i> .....	7
1.4.3 Der Infektionsweg und die Entwicklung von <i>B. graminis</i> (f.sp.) <i>hordei</i> .....	7
1.5 Resistenzen der Gerste gegen <i>B. graminis</i> .....	9
1.6 Resistenzmechanismen der Gerste .....	11
1.7 Die Germine und Germin-ähnlichen Proteine .....	14
1.7.1 Eine kurze Übersicht zur Entdeckung von Germin.....	14
1.7.2 Einordnung der Germine und Germin-ähnlichen Proteine in die Cupin-Superfamilie .....	15
1.7.3 Nomenklatur der Germine und Germin-ähnlichen Proteine (GLPs).....	16
1.7.4 Germine und GLPs werden durch Multigenfamilien verschlüsselt .....	17
1.7.5 Struktureigenschaften der Germine und GLPs.....	17
1.7.6 Enzymatische Aktivitäten der Germine und GLPs .....	19
1.7.7 GLPs und die Extrazelluläre Matrix (EZM).....	21
1.7.8 Rolle der GLPs in der Entwicklung der Zellwand .....	23
1.8 Ziele der Arbeit.....	23
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1 Material.....	25
2.1.1 Organismen .....	25
2.1.2 Antibiotika.....	25
2.1.3 Vektoren.....	26
2.1.4 Antiseren .....	26
2.1.5 Oligonukleotide.....	26
2.1.6 Enzyme und Kits .....	28

2.1.7 Molekulare Marker und Biochemikalien .....	29
2.1.8 Laborgeräte.....	30
2.1.9 Puffer.....	30
2.1.10 Bakterien-Kultur-Medien.....	31
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Anzucht der Gersten- und Weizensorten.....	31
2.2.2 Der Erhalt des Mehltaus .....	31
2.2.3 Anzucht der Gerstensorte Ingrid für die RNA-Extraktion aus verschiedenen Entwicklungsstadien.....	32
2.2.4 Stressbehandlungen an der Gerste für die RNA-Extraktion .....	32
2.2.5 Isolierung von Gerstenmehltau-inokulierter Epidermis .....	33
2.2.6 Standard Klonierungsmethoden, Plasmid Isolation und Sequenzierung .....	34
2.2.7 Isolation von Repräsentanten der HvGER Unterfamilien.....	34
2.2.8 Klonierung der HvGER Gene in den Überexpressionsvektor pIPKTA9.....	35
2.2.9 Northernblotanalyse .....	36
2.2.10 Dot Blot Analyse .....	39
2.2.11 Das Herstellen von RNAi-Konstrukten gerichtet gegen Repräsentanten der HvGER Unterfamilien.....	39
2.2.12 Biolistischer Gentransfer in die Epidermiszellen von Gerste und Weizen.....	42
2.2.13 <i>Site Directed Mutagenesis</i> .....	45
2.2.14 Klonierung der HvGER Expressionskassette in den binären Vektor pBINPLUS für die Pflanzentransformation.....	45
2.2.15 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	46
2.2.16 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
2.2.17 Oberflächensterilisation der Samen und Anzucht der transgenen <i>A. thaliana</i> Keimlinge .....	47
2.2.18 Isolierung säurelöslicher Proteine aus der Zellwand von <i>A. thaliana</i> .....	48
2.2.19 Die Westernblotanalyse .....	48
2.2.20 Oxalatoxidase-Nachweis in transformierten Gerstenblättern.....	49
2.2.21 Nachweis von Superoxiddismutase (SOD) im nativem Gel.....	49
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
3.1 Identifizierung von Genen der HvGER Multigenfamilie .....	50

3.1.1	Suche nach beinahe-voll-Längen-cDNA Klonen kodierend für HvGER Proteine in einer EST-Datenbank .....	50
3.1.2	Identifizierung der Genvertreter aus den Unterfamilien HvGER3 und HvGER6.	52
3.1.3	Sequenzalignment der 6 HvGER Unterfamilienvertreter .....	53
3.1.4	Identifizierung von 4 paralogen Genen aus der HvGER4 Unterfamilie .....	55
3.1.5	Identifizierung neuer HvGER Mitglieder und Identifizierung von GLPs aus Reis und <i>Arabidopsis thaliana</i> für eine phylogenetische Analyse.....	56
3.1.6	Die Evolution der kodierenden Sequenzen paraloger HvGER Gene.....	59
3.2	Expressionsstudien mittels quantitativer Northernblotanalyse.....	61
3.2.1	Überprüfung auf Kreuzhybridisierung der sechs HvGER Subfamilien.....	61
3.2.2	Entwicklungsspezifische Regulation der HvGER Multigenfamilie.....	62
3.2.3	Die Expression der HvGER-Subfamilien wird durch Umweltreize und durch Pathogenbefall reguliert. ....	68
3.2.4	Nachweis der HvGER Transkripte in mehltauinokulierter Epidermis.....	71
3.2.5	Genexpression von vier HvGER4 Genen zur Untersuchung der differentiellen Regulation innerhalb einer Subfamilie.....	72
3.3	Untersuchung der Bedeutung von 6 HvGER Subfamilien in der Basalresistenz gegen <i>B. graminis</i> unter Verwendung des transienten Expressionssystems .....	78
3.3.1	Die absolute und die relative Haustoriumhäufigkeit als Maß zur Bestimmung von Resistenz und Anfälligkeit .....	78
3.3.2	Auswahl von geeigneten Sorten .....	79
3.3.3	Transiente Überexpression von HvGER1 bis HvGER6 in der Gerste .....	81
3.3.4	Untersuchung der Wirkung von RNA Interferenz (RNAi) der HvGER Gene auf die Resistenz epidermaler Zellen gegen <i>Blumeria graminis</i> fsp. <i>hordei</i> . ....	83
3.3.5	„Site directed“ Mutagenese .....	85
3.4	Expression der <i>HvGER</i> Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	87
3.4.1	Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine GF-2.8 und GF-2.8(H112).....	88
3.4.2	Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine HvGER2a und HvGER2a(H103S).....	90
3.4.3	Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine HvGER4d und HvGER4d(H110S) .....	92
3.4.4	Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine HvGER5a und HvGER5a(H109S).....	92

3.4.5 Nachweis der wildtyp- und der mutierten Formen der HvGER-Proteine unter denaturierenden Bedingungen.....	93
3.5 Nachweis enzymatischer Aktivität der HvGER Proteine.....	94
3.5.1 Test auf Oxalatoxidase Aktivität.....	94
3.5.2 Test auf Superoxiddismutase-Aktivität.....	95
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>97</b>
4.1 Diversität der GLP-Familien .....	97
4.2 Die Bedeutung der Duplikation von HvGER Genen.....	98
4.2.1 Subfunktionalität <i>versus</i> Neofunktionalität duplizierter Gene.....	100
4.3 Expressionsstudien .....	102
4.3.1 HvGER Gene als Marker der frühen Keimlingsentwicklung .....	102
4.3.2 Beteiligung der HvGER Subfamilien an der Stressantwort.....	106
4.4 Die mögliche Rolle der HvGER Subfamilien während des Pathogenbefalls.....	110
4.4.1 Die HvGERs als resistenz- oder anfälligkeitsvermittelnde Faktoren gegen Bgh	111
4.5 SOD-Funktion <i>versus</i> Strukturfunktion.....	116
4.5.1 Elektrophoretische Eigenschaften mutierter und wildtyp HvGER Proteine.....	117
4.5.2 Enzymatische Funktionen der HvGER Proteine.....	118
4.5.3 Die SOD Funktion des HvGER5a Proteins wird in der Basalresistenz gegen Bgh benötigt.....	119
4.6 Schlussfolgerungen.....	119
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>121</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>124</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>140</b>
8.1 Klonierungskarte.....	140
8.2 Sequenzen.....	141
8.3 Alignment.....	146
8.4 Phylogenetischer Baum .....	148
<b>9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>149</b>

<b>10. Danksagung.....</b>	<b>151</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>152</b>
<b>12. Erklärung.....</b>	<b>154</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
aa	<i>amino acid</i> , Aminosäure
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
Avr	Avirulenz-
BC	<i>backcross</i> (Rückkreuzung)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> , Blumenkohlmosaikvirus
CC	<i>coiled-coil</i> , superspiralisierte Helix
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Km <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>g</i>	Schwerkraftkonstante (9,81 ms <sup>-1</sup> )
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
kPa	Kilopascal
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli

M	Molar (mol/l)
MOPS	Morpholin-3-propansulfonsäure
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	Negativ dezimaler Logarithmus der H <sup>+</sup> Konzentration.
PR	<i>pathogenesis related</i> , Pathogen-assoziiert
psi	<i>pounds per square inch</i>
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPM	<i>resistance to Pseudomonas syringae pathovar Maculicola</i>
RPS	<i>resistance to Pseudomonas syringae</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg Einheit, Sedimentationskonstante
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
t-SNARE	<i>target synaptosome-associated protein receptor</i>
TIGS	<i>Transient induced gene silencing</i>
U	<i>Unit</i> (Enzymmenge)
UV	Ultraviolett
WRKY	definierte konservierte Aminosäuresequenz
WT	Wildtyp



## 1. Einleitung

Der Mensch betreibt die Kultivierung von Pflanzen seit der Jungsteinzeit, und eine Vielzahl an diversen Kulturpflanzen ist aus diesen Bemühungen hervorgegangen. Kulturpflanzen können unter verschiedensten Aspekten genutzt werden, wobei der wesentlichste nach wie vor die Sicherung der Ernährung weltweit darstellt. Auf der anderen Seite stellen Pflanzenkrankheiten eine Bedrohung für die Landwirtschaft dar und führen zur Verringerung von Ernteerträgen oder zur Minderung der Qualität. Trotz intensiver Pflanzenschutzmaßnahmen, wie die Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel in den letzten 30 Jahren, sind deutliche Ernteverluste durch Viren, Bakterien und Pilze zu verzeichnen, sodass ein unverminderter Bedarf an einer Verbesserung und Erneuerung der Schutzmaßnahmen besteht. Eine der Möglichkeiten besteht darin, das natürliche Abwehrsystem der Pflanzen gegen potentielle Pathogene besser auszunutzen. Voraussetzung für die Schaffung neuer Konzepte sind daher genauere Kenntnisse über physiologisch-biochemische Vorgänge von Wirt-Parasit-Interaktionen sowie Kenntnisse über deren genetische Determinanten. Durch diese Kenntnisse kann das Abwehrsystem von Kulturpflanzen günstig beeinflusst und die Landwirtschaft durch verbesserte Erntequalitäten und –quantitäten stabilisiert werden.

### 1.1 Nichtwirtsresistenz und Wirtsresistenz

Im Laufe von Millionen Jahren haben Pflanzen und Mikroorganismen sich stammesgeschichtlich weiter entwickelt. Einige Mikroorganismen werden dabei versucht haben Pflanzen als Nährstoffquelle nutzen zu können. Als Antwort haben Pflanzen Abwehrstrategien entwickelt, welche wiederum vom Pathogen durchbrochen werden können. Die Folge ist, dass sich die stammesgeschichtliche Entwicklung beider Organismen in Abhängigkeit voneinander vollzogen hat (Co-Evolution). Aufgrund dieser gemeinsamen Entwicklung haben Pflanzen ein mehrschichtiges Immunsystem ausgebildet, dass sie vor einer Mehrzahl an potentiellen Pathogenen schützt. Ist die Pflanze gegen verschiedene Pathogenarten mit allen dazugehörenden Rassen resistent, so wird dies als *Nichtwirtsresistenz* bezeichnet (Nürnberger et al., 2004). Im Laufe der Co-Evolution ist es Pathogenen aber gelungen Virulenzfaktoren zu erzeugen, wodurch das pflanzliche Immunsystem supprimiert oder umgangen werden kann. Als Folge davon kann das Pathogen Nährstoffe aus der Pflanze (Wirt) für seine eigene erfolgreiche Reproduktion

verwenden. Der Wechsel zum virulenten Pathogen und die Ausprägung der Krankheitssymptome auf der Pflanze begünstigten die Entwicklung von Strukturen/Molekülen in der Pflanze, welche die Virulenzfaktoren des Pathogens spezifisch erkennen. Erst durch diese neue Erkennung können wiederum Abwehrmechanismen eingeleitet werden, die zur Resistenz der Pflanze führen. Diese Resistenz wird als *Wirtsresistenz* bezeichnet, da sie sich gegen eine bestimmte oder mehrere virulente Rassen innerhalb einer Art richtet (*rassenspezifische Resistenz*; Nürnberger et al., 2004).

## 1.2 Basalresistenz und R-Gen spezifische Resistenz

Das pflanzliche Immunsystem läßt sich durch zwei wesentliche Abwehrsysteme beschreiben: eine basale Abwehr und eine R-genspezifische Abwehr. Beide Abwehrsysteme sind in der Nichtwirtsresistenz als auch in der Wirtsresistenz involviert. In Abhängigkeit von den Interaktionspartnern, kann jedoch die Gewichtigkeit zu Gunsten einer Basalresistenz (z.B. in einer Nichtwirtsinteraktion) oder zur R-genspezifischen Resistenz (z.B. in der Rassenspezifischen Resistenz) hin verschoben werden. Klar ist, dass beide Abwehrsysteme in ihrer Integrität im pflanzlichen Immunsystem nicht von einander zu trennen sind, da sie sich wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen oder begünstigen.

Basalresistenz: Pflanzen besitzen ein sehr breites, basales Erkennungssystem für Strukturen/Muster charakteristisch für alle Klassen von Mikroorganismen. Diese Strukturen werden als „allgemeine Elizitoren“ bezeichnet (Boller et al., 1995) und werden begrifflich den „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMP) gleichgestellt. Die erfolgreiche Abwehr, die über die Erkennung von PAMPs induziert und über Signaltransduktionskaskaden zur Verarbeitung kommt, wird auch als Basalresistenz bezeichnet (Nürnberger et al., 2004). Vor allem in der Nichtwirtsresistenz spielt die PAMP- induzierte Abwehr eine große Rolle da, ein breites Spektrum allgemeiner Elizitoren von potentiellen Pathogenen erkannt werden muß.

Bei einer Wirtsinteraktion ist es dem Pathogen gelungen diese Form der Abwehr zu umgehen oder zu unterdrücken (Chang et al., 2004). Jedoch haben Experimente gezeigt, dass selbst in einer anfälligen Wirtsinteraktion diese Basalresistenz noch wirksam ist. Obwohl die Entwicklung des Pathogens und der Krankheitssymptome nicht unterdrückt wird, ist doch die Ausdehnung der Krankheit limitiert (Eulgem, 2005). Verschiedene „*enhanced disease susceptibility*“ (*eds*) Mutanten, die Defekte in der Basalresistenz in *A. thaliana* verursachen wurden identifiziert und zeigten, verglichen zum anfälligen Wildtyp,

eine Hyperanfälligkeit zum Pathogen *Pseudomonas syringae* (Eulgem, 2005). Somit konnte gezeigt werden, dass die Basalresistenz eine extreme Kolonisierung von anfälligen Pflanzen durch das Pathogen unterbindet.

R-genspezifische Resistenz: Nach Überwindung der Basalresistenz durch Pathogenrassen gibt es zwei mögliche Formen der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen, welche im Zuge der Co-Evolution zustande gekommen sind: (1) die kompatible Interaktion bei der die Pflanze anfällig ist (durch Suppression der Basalresistenz) und (2) die inkompatible Interaktion bei der die Pflanze resistent gegen das Pathogen ist (Xiao, 2006). Die Letztere wird oft über R-Genprodukte der Pflanze vermittelt, die sich spezifisch in einem Ökotyp einer ansonsten anfälligen Wirtspflanze entwickelt haben. Ein vom Pathogen stammender Virulenzfaktor (Avr-Genprodukt), der für eine Kolonisierung benötigt wird, kann in dieser Pflanze spezifisch vom R-Genprodukt erkannt werden, was zur Aktivierung physiologischer Abwehrreaktionen in der Pflanze führt. Dieser Resistenzmechanismus ist in der „Gen-für-Gen“ Hypothese beschrieben (Flor, 1971) und wird durch das Vorhandensein komplementärer Paare von bestimmten Avr-Genen im Pathogen und R-Genen in der Pflanze genetisch determiniert. Laut dieser Hypothese würde das Fehlen oder eine Veränderung durch Mutation im R-Gen nicht zu einer erfolgreichen Abwehr führen (Dangl and Jones 2001). Auch Mutationen im Avr-Gen könnten letztlich die Erkennung des Avr-Genprodukts durch das R-Genprodukt maskieren oder zur Bildung neuer Virulenzfaktoren führen. In all diesen Fällen wäre die Pflanze anfällig (kompatibel) gegenüber dem Pathogen. Die breit akzeptierte „Gen-für-Gen“ Hypothese wird durch das Ligand-Rezeptor Model unterstützt (Keen et al., 1990), bei welcher Avr-Proteine als Ligand („spezifische Elizitoren“ oder „Effektoren“) und die R-Proteine als Rezeptoren direkt miteinander agieren.

Direkte Interaktionen von Avr- und R-Protein wurden bisher z.B. im Flachs (*Linum usitatissimum*)-Flachsrost (*Melampsora lini*)-Pathosystem nachgewiesen (Dodds et al., 2006). Allerdings konnten für die meisten typischen R- und den dafür entsprechenden Avr-Proteinen keine direkte Interaktion nachgewiesen werden, sodass vermutlich eine Erkennung oft indirekt erfolgt. Dies wurde durch die „guard“-Hypothese erklärt, die eine Erweiterung zur Gen-für-Gen-Hypothese darstellt (Dangl and Jones 2001). So wird angenommen, dass R-Proteine ein Wirtsprotein (*guard*) überwachen, das ein Virulenzziel für das korrespondierende Effektormolekül ist. Das Effektormolekül modifiziert ein Wirtsprotein, um die Pathogenvirulenz zu erhöhen, jedoch wird diese

Modifizierung durch das korrespondierende R-Protein erkannt und die Abwehr eingeleitet (Dangl and Jones 2001).

### 1.3 Erkennung und Signaltransduktion

Die Unterscheidung in einem potentiellen Wirt zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ ist ein Schlüsselereignis um Abwehrmechanismen zu aktivieren, als Antwort auf versuchte Infektionen durch Mikroorganismen. Für die Erkennung von „Nicht-Selbst“ und von durch Pathogene „modifiziertem Selbst“ können zwei Gruppen von Rezeptoren im pflanzlichen Immunsystem unterschieden werden (Jones and Dangl, 2006). Die Einen sind die Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), welche transmembranständig mit der Plasmamembran assoziiert sind. Diese Rezeptoren erkennen hochkonservierte PAMPs von Pathogenen (Chisholm et al., 2006). Diese PAMPs sind meist für das Pathogen essentiell. Typische PAMPs sind z.B. bakterielle, methylierte DNA, diverse Zelloberflächenstrukturen wie Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien, Peptidoglykane von gram-positiven Bakterien, eubakterielles Flagellin und pilzliche Zellwandbestandteile wie Chitine, Glukane, Mannane und Proteine (Nürnberger and Lipka, 2005).

PAMPs können von Pathogenen selbst stammen oder durch mikrobielle Aktivität aus pflanzlichem Material (z.B. Zellwanddegradationsprodukte) freigesetzt werden (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Schweizer et al., 2000). Ein typischer transmembranständiger PRR ist der Flagellinrezeptor FLS2 in *A. thaliana*. Dieser erkennt Flagellin über seine extrazelluläre LRR (*leucine riche repeat*) Domäne und leitet dieses Signal zu seiner zytoplasmatischen (Serin/Threonin-Proteinkinase) -Domäne weiter (Gomez-Gomez and Boller, 2002). In Tieren werden PAMPs über plasmamembrangebundene Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) erkannt. Diese besitzen einerseits eine extrazelluläre LRR Domäne und verfügen andererseits über eine zytoplasmatische TIR (Toll/Interleukin I-ähnliche Rezeptoren) –Domäne (Girardin et al., 2002).

Die andere Gruppe von Rezeptoren agiert dagegen größtenteils innerhalb der Zelle, im Zytoplasma und im Zellkern (Jones and Dangl, 2006). Diese Rezeptoren werden durch R-Gene verschlüsselt und erkennen besonders schnell evolvierende Effektormoleküle (komplementäre Avr-Proteine) vom Pathogen oder Wirtsproteine, die durch diese Effektormoleküle verändert wurden. Charakteristisch für diese Rezeptoren ist eine NB-LRR Struktur, benannt nach ihrer Nukleotid-bindenden (NB) und ihrer LRR Domäne. Die NB-LRR zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu den Nukleotid-bindenden

Oligomerisierungsdomänen (NOD Rezeptoren) in Tieren (Girardin et al., 2002). In Pflanzen können aufgrund struktureller Verschiedenheit im N-terminalen Bereich der NB-LRRs diese in die zwei Klassen der TIR-NB-LRR und CC-NB-LRR (*coiled-coil*) unterteilt werden (Dangl and Jones, 2001). Die TIR Domänen in Pflanzen sind homolog zu den zytoplasmatischen TIR Domänen in *Drosophila* und in Säugern. Während in den Dicotyledonen TIR- und CC -NB-LRRs vorkommen, sind bisher in den Monokotyledonen nur CC-NB-LRRs bekannt. Vermutlich deutet dies auf eine divergierende Evolution beider Gruppen hin.

R-Proteine schützen einige Wirtsproteine (Wirtsproteine, die beispielsweise in Signaltransduktionskaskaden benötigt werden) gegen Effektormoleküle (Jones and Dangl, 2006). Die hohe Variabilität in der LRR-Domäne unterstützt die Erkennung neuer Effektormoleküle. Erkennung erfolgt direkt über Protein-Protein Interaktion (zum Beispiel die NB-LRR-Allele für AvrL kodierend, auf dem L-Locus von Flachs). Ein Beispiel für indirekte Interaktion stellt RIN4 (*RPM1-interacting protein 4*) dar, ein Wirtsfaktor, der ein Virulenzziel von Effektormolekülen aus *Pseudomonas syringae* ist (Mackey et al., 2003). Diese Effektoren verursachen die Phosphorylierung oder Spaltung des Wirtsproteins RIN4 und dadurch werden die R-Proteine RPM1 respektive RPS2 aktiviert (Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006).

Die Signaltransduktion verbindet schließlich die Signalerkennung und die Abwehrantwort miteinander. In der basalen und in der R-Gen spezifischen Resistenzantwort sind ähnliche Signalkomponenten an der Signalübertragung involviert (Nürnberger, 2004). Erkennung eines Elizitors durch einen Rezeptor führt zum Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in das Zytoplasma (Gelli et al., 1997a, b; Lecourieux et al., 2002). Diese transiente Akkumulation an zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen führt zur massiven Erzeugung (*oxidative burst*) von reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im extrazellulärem Raum (Apoplasten). Die ROS wie Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Superoxidanion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) und Hydroxylradikale ( $\bullet\text{OH}$ ) werden durch membrangebundene NADPH-Oxidasen, sowie durch apoplastische Peroxidasen, Oxalatoxidasen und Superoxiddismutasen erzeugt (Low and Merida, 1996; Scheel, 1998). ROS haben direkt antimikrobielle Wirkung, tragen zur strukturellen Verstärkung der Zellwand bei oder induzieren spätere Ereignisse (z.B. Salizylsäure-abhängige Signalwege) in der Abwehrreaktion (Nimchuk et al., 2003).

Die Bedeutung von Stickoxid (NO) als induziertes Signal für die Aktivierung von Abwehrmechanismen konnte unter anderem in *A. thaliana* gezeigt werden (Delledonne et al., 1998; Zeidler et al., 2004).

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) spielen eine bedeutende Rolle in der Signalübertragung in eukaryotischen Zellen, wo sie zelluläre Ereignisse (wie z.B. Zellteilung, Zellbewegung und Zelltod) modulieren (Zhang and Klessig, 2001). Diese Modulation kann in Pflanzen entwicklungs- und/oder stressbedingt (durch Pathogene) sein.

MAPKs sind in beiden, in der Basalresistenz als auch in der R-Gen - vermittelten Resistenz involviert sind (Menke et al., 2004). Verschiedene MAPKs aus Tabak und Tomate wurden identifiziert, welche positiv die Signalwege von verschiedenen NB-LRR Proteine (R-Proteine) beeinflussen (Jin et al., 2002; Liu et al., 2004). Andererseits identifizierten Asai et al., (2002) eine Flagellin-induzierte MAPK in *A. thaliana*, welche die Transkription von Abwehrverwandten Genen (PR-Gene) über die WRKY-Transkriptionsfaktoren aktiviert (Zhang et al., 2005b). Zusammenfassend lässt dies darauf schließen, dass sowohl die rassenspezifische Resistenz als auch die Basalresistenz wahrscheinlich dieselben Signaltransduktionwege benutzen.

## **1.4 Das Gersten-Mehltau-Pathosystem**

### **1.4.1 Kulturpflanze Gerste**

Die Kulturgerste (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) ist eine monocotyle, diploide, selbstbefruchtende Pflanze und gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*). Sie ist wohl die am frühesten kultivierte Getreideart und leitet sich wahrscheinlich von der Wildform der Gerste (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) ab. Funde belegen, dass die Gerste bereits vor 8000 Jahren im Zweistromland (vorderer Orient) angebaut wurde und ihr Anbau sich von dort nach Europa ausbreitete.

Heute zählt die Gerste zu den wichtigsten landwirtschaftlich genutzten Fruchtarten nach Weizen, Reis, Mais und Sojabohne. Die kultivierte Gerste teilt sich in Winter- und Sommergerste auf. Die Wintergerste wird im Herbst des Vorjahres ausgesät, hat eine längere Vegetationsperiode und höhere Ernteerträge als Sommergerste. Wintergerste verfügt über einen höheren Proteingehalt als Sommergerste und wird daher hauptsächlich als Viehfutter verwendet. Sommergerste wird im Frühjahr ausgesät und benötigt eine Vegetationsdauer von nur ca. 100 Tagen bis zur Ernte. Sommergerste wird für die menschliche Nahrung zur Herstellung von Bier, Graupen und Grütze verwendet.

Zu den wichtigsten Pilzen mit ihren Haupt- und Nebenfruchtformen, welche die Gerste befallen gehören *Blumeria graminis* (Getreidemehltau), *Bipolaris sorokiniana*/

*Cochliobolus sativus* (Braunfleckigkeit), *Rhynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit), *Fusarium culmorum* (partielle Weißährigkeit), *Drechslera teres/Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit) und *Puccinia* (Rost). Bei einem Mehлтаubefall der Gerste kann der Ernteverlust ohne Fungizidmaßnahmen in der gemäßigten Klimazone bei ca. 10% - 30% liegen (Jorgensen, 1988).

#### 1.4.2 *Blumeria graminis*

Der Verursacher des Getreidemehltaus *Blumeria graminis* (synonym *Erysiphe graminis*) ist ein Ascomycet und gehört zur Familie der *Erysiphaceae*. Er ist ein obligat biotropher Ektoparasit, da er auf das Überleben seines Wirts angewiesen ist, und sich sein Wachstum auf die Sprossoberfläche beschränkt. *B. graminis* befällt die Familie der Gräser, wie Gerste, Weizen oder Roggen und werden daher je nach Spezialisierung auf ihrer Wirtspflanze in die *forma specialis* (f.sp.) unterteilt. So hat z.B. *B. graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) die Gerste als ihren Wirt. Eine Übertragung von einer Gräsergattung auf eine andere ist praktisch nicht möglich. Für jede Spezialform gibt es eine Vielzahl von Rassen mit sortentypischen Virulenzunterschieden.

Das Gersten-Bgh-Pathosystem ist eine der best untersuchten Wirts-Parasit-Interaktionen auf zytologischer Ebene. Da Bgh die äußere Zellschicht, die Epidermis befällt, kann diese Interaktion durch das Lichtmikroskop leicht verfolgt werden. Wachstum auf der Oberfläche des Wirts, synchrone Konidienbildung und Konidienkeimung in einem definierten Zeitfenster, erleichtern die Studien solcher Interaktionen (Thordal-Christensen et al., 2000).

Die asexuellen Konidien werden durch den Wind einige hundert Meter bis einige hundert Kilometer verbreitet (Jørgensen, 1988a). Dieser Pilz hat ein enormes epidemiologisches Potential, da er selbst unter trockenen Bedingungen seinen Wirt infizieren kann, während andere Pflanzenpathogene auf 100 % Luftfeuchtigkeit oder freies Wasser angewiesen sind (Thordal-Christensen et al., 2000).

#### 1.4.3 Der Infektionsweg und die Entwicklung von *B. graminis* (f.sp.) *hordei*

Die Konidien von *B. graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) keimen bereits 1-2h nach Auftreffen auf die Blattoberfläche (Inokulation) der Gerste mit einem primären Keimschlauch (*primary germ tube*, PGT) aus. Tatsache ist, dass nur *B. graminis*, der die Familie der Gräser befällt, einen PGT besitzt (Kunoh et al., 1979). Die Funktion dieses Organs ist unklar. Es wird vermutet, dass er zur Aufnahme von Wasser oder von

Kutinmonomeren dient, um die Differenzierung des apressorialen Keimschlauches (*apressorial germ tube*, AGT) einzuleiten (Francis et al., 1996). Ein Effekt des PGT ist, dass er bereits zu einem frühen Zeitpunkt Abwehrreaktionen der attackierten Pflanze aktiviert (Thordal-Christensen et al., 2000; Green et al., 2002). Abwehrreaktionen sind z.B. die Bildung von Zellwandverdickungen (Papillen) in der Epidermis unterhalb des PGTs.

Das AGT keimt ca. 4 h nach Inokulation und ist nach ca. 9-12 h als Appressorium voll entwickelt (Zhang et al., 2005a). Auch hier erfolgt oft die Papillenbildung an der Zellwand unterhalb des Appressoriums als Antwort des Wirts auf das eindringende Pathogen. Die Spitze des reifen Appressoriums formt sich zu einem Haken, aus dem sich der Penetrationsfuß und schließlich die Penetrationshyphne entwickeln.

Die Penetration durch die Kutikula, Epidermiszellwand und Papille erfolgt durch die enzymatische Aktivität einiger Kutinasen und Zellulasen des Pilzes und durch mechanischen Druck, der durch das Appressorium und den Penetrationsfuß verursacht werden (Zhang et al., 2005a). Ist die Penetration erfolgt, bildet sich ein Kragen (*neckband*) um die Penetrationshyphne und die Bildung des Haustoriums innerhalb der Epidermiszelle kann eingeleitet werden.

Das Haustorium entwickelt sich als zentraler Körper, aus dem sich fingerförmige Fortsätze erstrecken. Es dient dem Pilz zur Aufnahme von Wasser und organischen Nährstoffen aus dem Wirt. Das Haustorium ist eine apoplastische Struktur, da bei dessen Entstehung die Plasmamembran des Wirts eingestülpt, aber nicht durchbrochen wird (Smith and Smith 1990). Diese extrahaustoriale Membran unterscheidet sich durch den Einfluß des Pilzes in ihrer Funktion (Nährstoffaufnahme) von der übrigen Wirts-Plasmamembran.

Nach erfolgreicher Etablierung des Haustoriums bildet der Pilz sekundäre Hyphen aus mit denen er die Blattoberfläche kolonisiert. Aus diesem Mycel werden (nach ca. 4-7 Tagen) an den Hyphen die Konidienträger gebildet, an denen Ketten miteinander verbundener Konidien hängen, womit der asexuelle Reproduktionszyklus geschlossen wird.

Die sexuelle Entwicklung des Pilzes beginnt mit zunehmender Alterung des Pflanzengewebes und des Mycels. Aus heterothallischen Hyphen entwickeln sich die Ascogonien und Antheridien im inneren eines Fruchtkörpers (Kleistothezium), der aus knäuelartig, verflochtenen Hyphen besteht. Reife Kleistothezien enthalten bis zu 25 diploide Asci mit jeweils 8 haploide Ascosporen. Die reifen Kleistothezien fallen als schwarze, kugelförmige Gebilde auf den betreffenden Gerstenblättern auf, und überdauern



die Winterzeit oder die Trockenperiode. Zum Ende dieser Zeit reißen die Kleistothezien auf und die Ascosporen werden aktiv herausgeschleudert (Schlösser 1997).

## 1.5 Resistenzen der Gerste gegen *B. graminis*

### *Rassenspezifische Resistenz der Gerste*

Die rassenspezifische Resistenz ist genetisch durch die komplementären Genpaare eines R- und eines Avr Gens determiniert. Das phänotypische Merkmal rassenspezifischer Resistenz ist ein rapider hypersensitiver Zelltod (Jørgensen, 1994). Die befallenen Epidermiszellen sterben ab, und Wachstum und Ausbreitung von *B. graminis* werden gehemmt. Diese Interaktion zwischen R-Protein und Avr-Protein führt somit immer zur Inkompatibilität (Keller, 2000).

R-Gen übermittelte rassenspezifische Resistenz ist genetisch relativ instabil. R-Gene unterliegen einem ständigen Selektionsdruck, da das Avr-Gen durch Mutation eine neue Virulenz erhalten kann. Dieser Selektionsdruck hat eine enorme Bedeutung im plötzlichen epidemiologischen Auftreten neuer virulenter Rassen. In der Landwirtschaft wird neuerdings auf das Einkreuzen von nur einem Resistenzgen in anfällige Kultursorten verzichtet, da genetische Ressourcen nur verschwendet werden. Beispiele aus der Vergangenheit haben gezeigt, dass z.B. die Resistenz des R-Gens *Mlg* aus der Gerste bereits nach 10 Jahren und die Resistenz des *Rph12* Gens sogar nach zwei Jahren durch neue virulente Rassen überwunden wurde (Walther, 2000).

Mehr als 85 rassenspezifische R-Gene gegen Bgh wurden in der Gerste beschrieben, die sich auf 10 verschiedene Resistenzgen-Cluster (*Loci*, z.B. *Mla*, *Mlg*, *Mlk*) verteilen. Zum bestuntersuchten *Mla-Locus* (*mildew resistance locus a*) gehören allein 28 R-Gene (Allele). Sechs davon (*Mla1*, *Mla6*, *Mla7*, *Mla10*, *Mla12*, *Mla13*) wurden bereits molekular analysiert (Halterman et al., 2003; Halterman and Wise, 2004). Sie kodieren für die typischen CC-NB-LRR Proteine. Einige dieser Proteine sind funktionell abhängig von weiteren *downstream*-Komponenten wie RAR1 (*required for Mla-12 specified resistance*) und SGT1 (Freialdenhoven et al., 1994; Azevedo et al., 2002). *Mla* -vermittelte Resistenz wirkt sich auf die hypersensitive Reaktion (*Hypersensitiv Reaction*, HR) aus (s. auch Abschnitt 1.6.). So entscheiden die verschiedenen *Mla*-Allele über die räumliche Verbreitung der HR (Epidermis, Mesophyll) und über die Dauer und Intensität der HR (Hückelhoven et al., 1999, Hückelhoven et al., 2000; Vanacker, 2000).

### *mlo-vermittelte Breitbandresistenz der Gerste*

Eine andere Resistenz, welche durch rezessive (mutierte) Allele des *Mlo*-Gens vermittelt wird, ist die Penetrationsresistenz gegen *Bgh*. Die *mlo*-vermittelte Penetrationsresistenz ist rassenunspezifisch und führt zu übergroßen Zellwandverdickungen (Zellwandappositionen, Papillen) unterhalb einer versuchten Penetration durch *Bgh* und ist eindeutig abhängig von der Nicht-Funktion des Wildtyp *Mlo*-Allels (Jørgensen, 1992).

Das Wildtyp *Mlo*-Allel dient vermutlich als negativer Regulator oder als Suppressor der sogenannten Basalresistenz (Kim et al., 2002a, b). Resistenzen, welche durch *mlo*-Allele vermittelt werden, wurden in den letzten 20 Jahren eingehend untersucht. Rückkreuzungsversuche von *mlo*-Allelen in verschiedene Getreidesorten führten zu beinahe-isogenen Linien. Unter Feldbedingungen vermitteln *mlo*-Allele dauerhafte Resistenz gegen ein breites Spektrum an *Bgh* Isolate (Jørgensen, 1992). Jedoch wurde auch über nachteilige Effekte der *mlo*-Allele in einigen Gerstensorten berichtet, wie die verstärkte Neigung zu spontanem Zelltod im Mesophyllgewebe und beschleunigte Blattseneszenz, erhöhte Akkumulation von PR-Proteinen, Hydrogenperoxid und Phytoalexinen, sowie Ertragsminderungen durch Förderung anderer Pathogene, wie die hemibiotrophen und necrotrophen Pilze *Magnaporthe grisea* und *Bipolaris sorokiniana* (Jarosch et al., 1999; Kumar et al., 2001; Piffanelli et al., 2002; Kumar et al., 2002).

Die *mlo*-vermittelte Resistenz ist von den Genen *Ror1* und *Ror2* (*required for mlo-specific resistance*) als *downstream*-Komponenten abhängig (Freialdenhoven et al., 1996). Mutationen in einem der beiden Gene führen zum partiellen Verlust der *mlo*-vermittelten Resistenz. *Ror2* kodiert für ein Syntaxin (t-SNARE Rezeptor) der SNARE Familie und ist wahrscheinlich an der Vesikelfusion während der Exozytose beteiligt (Collins et al., 2003).

### *Induzierte Resistenz der Gerste*

Chemikalien oder Pathogenbefall können die Resistenz in der Pflanze induzieren, die dann resistenter gegen Folgeinfektionen werden. Diese erhöhte Abwehrbereitschaft wird Sensibilisierung oder auch *priming* genannt und dauert ein bis mehrere Tage an (Conrath et al., 2002; Kohler et al., 2002). Die Induktion der Resistenzantwort kann lokal oder systemisch (über die gesamte Pflanze) erfolgen. Induzierte Resistenz (IR) wurde sehr gut in den Dicotyledonen (z.B. Gurke, Tabak, *A. thaliana*) untersucht, jedoch ist nur wenig über die IR in den Monocotyledonen (z.B. Getreide) bekannt.

*Systemic Acquired Resistance* (SAR) ist eine der am besten untersuchten Formen der IR. SAR wird von Pathogenen induziert, welche den Zelltod als Abwehrreaktion in der Pflanze auslösen können und wirkt als Breitbandresistenz gegen verschiedene Pathogene. SAR ist abhängig von der Akkumulation der Salizylsäure und bestimmter PR- (*pathogenesis-related*) Proteine (Ryals et al., 1996). Transgener Tabak und transgene *A. thaliana*, welche ein bakterielles Salizylsäure-katabolisierendes Enzym, die Salicylathydroxylase (kodiert durch das *NahG*-Gen) akkumulieren, waren dagegen unfähig eine SAR-Antwort zu zeigen (Gaffney et al., 1993).

Im Weizen und in der Gerste führte die Inokulation mit einer avirulenten Rasse oder unangepassten *formae speciales* von *B. graminis* zur Induktion der Resistenz. Ob es sich dabei um SAR handelt ist unklar, da keine Salizylsäure akkumuliert (Vallelian-Bindschedler et al., 1998c; Hückelhoven et al., 1999). Eine Möglichkeit SAR in der Gerste gegen *Bgh* zu erzeugen ist eine vorherige Behandlung via Wurzeln mit 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA), einem funktionellen Salizylsäureanalogon (Kogel et al., 1994). In anderen Getreide-Pathosystemen, wie z.B. Reis und *Magnaporthe grisea* führte eine Behandlung der Blätter mit Jasmonsäure oder die Verwundung von Blättern zur induzierten Resistenz (Schweizer et al., 1998). Im Gersten-Mehltau-System führte hingegen Jasmonatbehandlung zu keiner induzierten Resistenz (Schweizer et al., 1993; Kogel et al., 1995).

Lokale IR konnte durch Behandlung von Blättern mit Kutinmonomeren (Elizitor) gegen *B. graminis* induziert werden (Schweizer et al., 1996). Hitzeschock induzierte ebenfalls die Resistenz der Gerste gegen *Bgh* durch Veränderung der Zellwandstruktur ohne Papillenbildung (Schweizer et al., 1995).

## 1.6 Resistenzmechanismen der Gerste

Resistenzmechanismen einer Pflanze können präformiert, d.h. bereits vor einem Pathogenbefall vorhanden sein. Diese können physikalischer oder chemischer Natur sein, wie epikutikuläre Wachsschichten, Kutikula, Zellwand oder antimikrobielle Metabolite des Sekundärstoffwechsels wie Phytoanticipine (z.B. Senföle, Saponine, Phenole) Heath, (2000), (Nürnberger et al., 2005). Andere Resistenzmechanismen werden erst durch den Pathogenbefall induziert, dazu gehören die folgenden:

### *Papillenbildung*

Papillen sind Zellwandverdickungen, die sich an der Innenseite der Epidermiszellwand unterhalb des primären Keimschlauches und des Appressoriums bilden. Die Bildung von Papillen tritt unter anderem als Reaktion während der Interaktion zwischen *B. graminis* und den Gräsern auf und wurde am genauesten im Gersten - Bgh Pathosystem untersucht. Papillen werden immer gebildet, unabhängig davon ob die Pflanze resistent oder anfällig gegen *B. graminis* ist. Die Papillenbildung ist eine rassenunspezifische Reaktion und tritt auch dann auf, wenn die Wirtszelle der hypersensitiven Reaktion (Zelltod) unterliegt, hervorgerufen durch rassenspezifische Avirulenzdeterminanten des Pathogens (Zeyen et al., 2002). In vielen Gerstensorten können die Papillen durch die Penetrationshyphen erfolgreich durchbrochen werden. Kann die Papille nicht durch die Penetrationshyphen penetriert werden, wird von einer papillen-assoziierten Penetrationsresistenz gesprochen.

Diese Resistenz hängt von verschiedenen Faktoren ab wie z.B. vom Genotyp der Pflanze. In beinahe-isogenen Gerstenlinien die sich im *Mlo/mlo* Allel unterscheiden, zeigt sich der *mlo*-resistente Phänotyp durch die schnellere und vergrößerte Bildung der Papillen (Jørgensen et al., 1992). Zusätzlich kann der primäre Keimschlauch bereits Resistenz induzieren, was zur Folge hat, dass sich durchschnittlich größere Papillen unter den sich später entwickelnden Appressorien bilden (Thordal-Christensen et al., 2000).

Papillen sind von Höfen (*halos*) umgeben, und in beiden akkumulieren verschiedene Substanzen. Kallose macht den größten Bestandteil der Papillen aus, desweiteren akkumulieren Phenole, Proteine und Silicon (Thordal-Christensen et al., 1997). Lignin konnte nur in den Weizenpapillen nachgewiesen werden (Wei et al., 1994). An Proteinen kommen hydrolytische Enzyme, Peroxidasen und Superoxiddismutasen vor. Charakteristisch ist das massive Vorkommen an  $H_2O_2$ , welches mittels DAB Färbung in und um den Papillen lokalisiert werden konnte. Untersuchungen haben gezeigt, dass lokale  $H_2O_2$  Akkumulation zur oxidativen Quervernetzung von Proteinen in den Papillen führt (Thordal-Christensen et al., 1997). HvGER4 eine  $H_2O_2$  generierende Superoxiddismutase (SOD) akkumuliert bereits 3 h nach Inokulation mit Bgh in der Epidermis und erreicht nach 15 h bis 24 h ein Maximum, das bis zu 96 h nach Inokulation stabil bleibt. Die räumliche und zeitliche Akkumulation korreliert mit der zeitlichen Entwicklung der Papillen. Daher wurde vermutet das HvGER4 an Quervernetzungsprozessen in der Papille beteiligt ist (Wei et al., 1998).

### *Die hypersensitive Reaktion (hypersensitive reaction, HR)*

Die hypersensitive Reaktion ist ein Abwehrmechanismus, welcher typischerweise in einer Gen-für-Gen Pflanzen-Pathogen-Interaktion vorkommt und zum Zelltod der infizierten Zellen führt. Eine entscheidende Rolle in der Induktion der HR dürfte wahrscheinlich der *oxidative burst* (eine rapide Akkumulation an reaktiven Sauerstoffspezies, wie  $O_2^{\bullet-}$  und  $H_2O_2$ ) spielen (Heitefuss, 2001). In Abhängigkeit von der Resistenzgen-/Avirulenzgen-Kombination kommt es zum Absterben einzelner Epidermiszellen (*Single-Cell HR*) oder zum Absterben von Zellverbänden des Mesophylls (*Multi-Cell HR*).

Bei der *Single-Cell HR* wird die Papille penetriert und dann der Zelltod eingeleitet oder der Zelltod erfolgt spätestens nach der Entwicklung des Zentralkörpers eines Haustoriums. Die *Single-Cell HR* erfolgt sehr schnell, bereits 15-24 h nach der Inokulation.

Die *Multi-Cell HR* wird erst nach mehreren Penetrationserfolgen bzw. erst einige Tage nach der Inokulation eingeleitet. Die von der HR betroffenen Zellverbände können mit dem bloßen Auge als kleine Nekrosen erkannt werden. In Abhängigkeit von der Infektionsrate variiert die Ausprägung der Nekrosen. In den Zellen, die dem Zelltod erliegen, konnten ähnlich wie in den Papillen die Akkumulation von Phenolen, sowie von Kallose, Guanidin-Komponenten, Silicon und  $H_2O_2$  nachgewiesen werden (Wei et al., 1994; Thordal-Christensen, 1997).  $H_2O_2$  wurde mittels DAB-Färbung bereits 15 h nach der Inokulation an der Berührungszone zwischen Mesophyllzellen und Epidermiszellen beobachtet. Bereits wenige Stunden später konnte zusätzlich  $H_2O_2$  in den darüber liegenden Epidermiszellen detektiert werden. Es wird spekuliert, dass die HR der Epidermiszelle durch pathogeninduzierte Signale aus den Mesophyllzellen eingeleitet wird (Thordal-Christensen, 1997). Es wird ferner vermutet, dass die Oxalatoxidase (HvGER1), die im Extrazellularraum der Mesophyllzellen vorkommt, an der Signalübertragung, die zur HR führt, beteiligt ist (Zhou et al., 1998; Zhou et al., 2000).

### *Expressio spezifischer pathogenregulierter Gene*

Für eine größere Anzahl an Proteinen wie z.B. für die PR-Proteine (*pathogenesis related proteins*) ist gezeigt worden, dass sie während des Befalls durch Bgh in der Gerste akkumulieren. Die mRNA-Transkripte einiger PR-Gene sind leicht (z.B. im Samen) zu detektieren, und die akkumulierten PR-Proteine sind z.B. durch enzymatische Tests einfach nachweisbar. Einige der PR-Proteine besitzen antimikrobielle Wirkung, andere

sind an Signalübertragungsprozessen beteiligt, während für weitere die Funktion noch unklar ist (Collinge et al., 2002). Zu den PR-Proteinen gehören hydrolytische Enzyme wie die  $\beta$ -1,3-Glukanasen (PR-2) und die Chitinasen (PR-3), (Gregerson et al., 1997). Zu den PR-Proteinen, welche die Fähigkeit besitzen die pilzliche Zellmembran zu destabilisieren gehören z.B. *Thaumatin-like protein* (PR-5) und Thionin (PR-13). PR-5 (Wir2) wurde mittels differentieller Hybridisierung auch im Weizen identifiziert (Schweizer et al., 1989) und PR-13 wurde zuerst im Weizensamen beschrieben (Bohlmann and Apel, 1991). Die regulatorischen Proteine wie die 14-3-3 Proteine haben viele abwehrverwandte Funktionen. So sind sie an der Bindung und Aktivierung der membrangebundenen Protonenpumpe (P-Typ,  $H^+$ -ATPase) beteiligt (Jahn et al., 1997; Finnie et al., 1999). Die Peroxidasen (PR-9) bewirken aufgrund ihrer enzymatischen Funktion wahrscheinlich strukturelle Veränderungen der Zellwand (Quervernetzung). Eine ähnliche Funktion wird bei extrazellulären Oxalatoxidasen (HvGER1) und Superoxiddismutasen (HvGER4) vermutet.

## 1.7 Die Germin- und Germin-ähnlichen Proteine

Die oben erwähnten „HvGER“ PR-Proteine gehören zur Gruppe der „Germin- und Germin-ähnlichen Proteine“ der Gerste. Ihr möglicher Einfluss auf die Basalresistenz der Gerste gegen Bgh bildete den Schwerpunkt meiner Arbeit. Daher wird folgend diese Gruppe der PR-Proteine eingeführt.

### 1.7.1 Eine kurze Übersicht zur Entdeckung von Germin

Nach Wässerung reifer Weizenkörner steigt bereits ca. 1h nach Wasseraufnahme (Quellung) der Anteil an Wasser in den Weizenembryonen von ca. 5% auf ca. 60% an. Danach folgt eine längere Periode (ca. 4 h) in der weder Wachstum des Embryos noch Wasseraufnahme erfolgen. In dieser Periode, als Keimung bezeichnet, verändert sich die Zusammensetzung der mRNA im Embryo (Marcus, 1969). Ca. 5 h nach der Quellung ist eine äußerst rasante Synthese einer translatierbaren mRNA zu verzeichnen, das für ein „Germin“ Protein kodiert (Lane et al., 1991). Ca. 5-24 h nach dem Quellen erhöht sich der Wassergehalt im Samen auf 85% und das erneute Wachstum des Embryos wird eingeleitet (Hanley-Bowdoin and Lane, 1983; Lane et al., 1991). Eine Zunahme an Frischgewicht des keimenden Samens beginnt bereits in dieser Phase (Marcus, 1969).

Ca. 24 h nach dem Quellen akkumuliert nicht nur die Germin mRNA, sondern auch das Germin Protein selbst im Embryo (Grzelczak et al., 1982, Grzelczak and Lane 1983,

1984). Das Germin und seine mRNA werden weder in unreifen noch in reifen Weizenembryonen, sondern erst mit Beginn der Keimung detektiert. Aus diesem Grund wurde das Germin auch als Markerprotein für Samenkeimung betrachtet (Grzelczak and Lane, 1984, Lane et al., 1992).

Mit der Isolierung des Germins aus keimenden Weizenembryonen und der Isolation einer Germin cDNA gelang eine teilweise funktionelle Charakterisierung des Proteins (Rhaman et al., 1988; Dratewka-Kos et al., 1989). Die Untersuchungen beschreiben Germin als ein zellwandassoziiertes und glykolisiertes Protein, welches ungewöhnlich resistent gegen Denaturierung in SDS und gegen Degradation durch Peptidasen ist (Lane et al., 1992).

Aus einer genomischen Weizenbibliothek wurden zwei zueinander sehr ähnliche germinkodierende Gene (*GF-2.8* und *GF-3.8*) mittels der Germin cDNA Sonde isoliert (Dratewka-Kos et al., 1989; Lane et al., 1991). Sequenzanalysen zeigen, dass der Promotor von *GF-2.8* eine Erkennungsstelle für Auxin enthält und dass beide Gene im kodierenden Bereich ein für Germin typisches Sequenzmotiv, die „Germinbox“, enthalten (Lane et al., 2000). Das Weizengermin stellte zu dieser Zeit das erste isolierte Germingen dar, sodass es nicht verwundert, dass eine Sequenzhomologie einzig zu Spherulin gefunden wurde. Die Germine *GF-2.8* und *GF-3.8* weisen auf Proteinebene eine Sequenzidentität von 40% bis 50% zu Spherulin auf (Lane et al., 1991). Für Spherulin wurde gezeigt, dass es spezifisch während des Prozesses der Sporulation im Plasmodium *Physarum polycephalum* akkumuliert (Bernier et al., 1986, 1987).

Besonders erwähnenswert ist, dass die Funktion des Germins als Oxalatoxidase erst im Jahr 1993 bekannt wurde, obwohl bereits 1911 das erste Mal über den Nachweis von Oxalatoxidase aus gemahlene Weizenkörnern berichtet wurde (Zaleski und Reinhard, 1911). In zwei parallelen Veröffentlichungen gelang zum einem der Nachweis des Germins aus Weizen (*GF-2.8*) und zum anderem der Nachweis des homologen Proteins aus Gerste als Enzym mit Oxalatoxidaseaktivität (Lane et al., 1993, Dumas et al., 1993).

### **1.7.2 Einordnung der Germine und Germin-ähnlichen Proteine in die Cupin-Superfamilie**

Der Name Cupin leitet sich aus dem lateinischen Wort „cupa“ (kleines Fass oder Gefäß) ab, welches auf die strukturelle Eigenschaft des Proteins zurückzuführen ist, das eine „ $\beta$ -Barrel“-Struktur aufweist (Dunwell, 1998). Diese Struktur (Domäne) ist kennzeichnend für Proteine, die zur Familie der Cupine gehören, sich aber funktionell

völlig voneinander unterscheiden können (Dunwell et al., 2004). Die Cupine werden aufgrund dieser strukturellen Domäne in die Einzeldomänen (*Single-Domain*) Cupine, in Multidomänen-Proteine mit einer einzelnen Cupindomäne und in die Bicupine unterteilt. Die Germinine und Germin-ähnlichen Proteine (*Germin-like proteins*, GLPs) gehören zu den „*Single-Domain*“ Cupinen genauso wie die Spheruline, die Phosphomannoseisomerasen, die Dioxygenasen, die Polyketidsynthasen und die Epimerasen (Dunwell et al., 2000). Zu den Multidomänen-Proteinen mit einer einzelnen Cupindomäne gehören die AraC-Typ Transkriptionsfaktoren. Dagegen schließen die Bicupine die Mitglieder der Samenspeicherproteine, der Dioxygenasen, der Oxalatdecarboxylasen und der saccharosebindenden Proteine ein (Dunwell et al., 2000).

### 1.7.3 Nomenklatur der Germinine und Germin-ähnlichen Proteine (GLPs)

Innerhalb der Literatur besteht keine einheitliche Namensgebung für die Germinine und für die GLPs. So wurde diejenige Gruppe von Proteinen als „Echte Germinine“ (*true germins*) bezeichnet, die Sequenzidentitäten (auf Proteinebene) von mehr als 90% zu dem erstentdeckten Weizengermin zeigen. Das orthologe Germinin in Gerste wies auf Proteinebene sogar eine Identität von mehr als 95% zum Weizengermin auf (Dunwell et al., 2000). Germinine konnten hauptsächlich in der Familie der Gräser, wie Roggen, Reis, Hafer und Mais identifiziert werden (Grzelczak and Lane, 1985; Lane et al., 2000). Für einige Germinproteine wurde eine Oxalatoxidaseaktivität nachgewiesen.

Die andere Proteingruppe, die keine so hohe Sequenzidentität (30%-70%) zum Weizengermin zeigte, wurde als Germin-ähnliche Proteine (GLPs), als Oxalatoxidase-ähnliche Proteine (*oxalate oxidase-like proteins*) oder als Germin-ähnliche Oxalatoxidasen (*germin-like oxalate oxidase*) bezeichnet (Bernier and Berna, 2001). Da dieser Gruppe alle weiteren Proteine zugeordnet wurden, ist sie heterogen und besitzt wahrscheinlich verschiedene vermutete Funktionen. Die Sequenzidentitäten innerhalb dieser Gruppe reichen daher von ca. 25% bis nahezu 100%. Die Gruppe der GLPs ist nicht nur in den *Angiospermae*, welche die Familie der Gräser einschließt, sondern auch in den *Gymnospermae* und *Bryophytae* zu finden (Bernier and Berna, 2001).

Dennoch kann diese begriffliche Trennung in zwei Gruppen nicht gerechtfertigt werden, da charakteristische Sequenzmotive beide Gruppen zu einer verbindet. Eine Überarbeitung alter Bezeichnungen für Germinine und GLPs der Gerste wurde erstmalig von Druka et al., (2002) durchgeführt. In Anlehnung an diese Nomenklatur werden daher in meiner Arbeit alle Germinine und GLP Gene der Gerste (*Hordeum vulgare*) als HvGER



bezeichnet. *HvGERX* beschreibt die Subfamilie und *HvGERX<sub>x</sub>* die zu dieser Subfamilie gehörenden Gene.

Im Gegensatz dazu wurde in allen anderen Spezies noch keine eindeutige Nomenklatur entwickelt, sodass für diese die alten Bezeichnungen beibehalten werden.

#### **1.7.4 Germine und GLPs werden durch Multigenfamilien verschlüsselt**

Die Gruppe der Germine oder der GLPs einer Pflanzenspezies wird durch eine Multigenfamilie verschlüsselt, die mehrere Subfamilien mit ein bis mehrere Genmitglieder pro Subfamilie beinhalten kann. Viele dieser Multigenfamilien wurden bisher nur unvollständig beschrieben. So wurden ausgehend von 39 ESTs (*Expressed Sequence Tags*), welche für GLPs in *Arabidopsis thaliana* kodieren, mindestens 12 Gene identifiziert, die sich in 4 Subfamilien unterteilen (Carter et al., 1998). Dagegen wurden in Reis bisher mindestens 6 GLP Gene anhand von ESTs identifiziert (Membre et al., 1998).

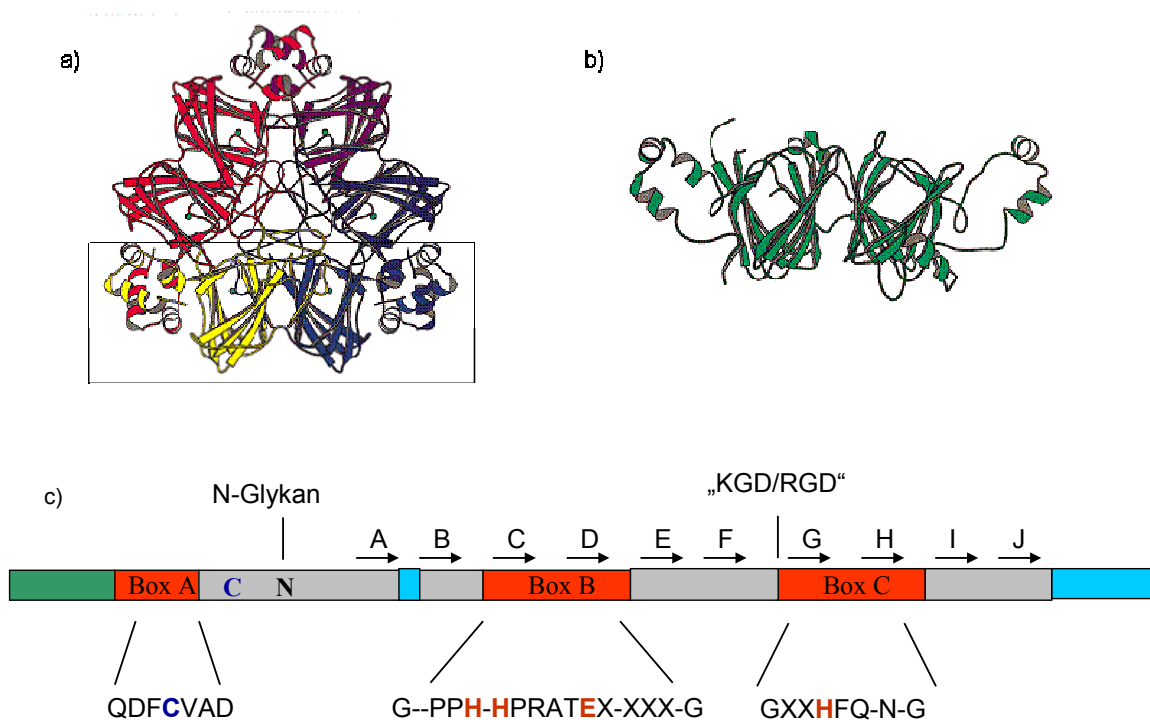
Kürzlich wurde für die Germine/GLP Gene der Gerste eine physikalische und genetische Kartierung durchgeführt (Druka, et al., 2002). Dabei konnten aus ca. 50'000 Gersten-ESTs 124 cDNAs identifiziert werden (kodierend für Germine und GLPs), die in 5 Gruppen, den Subfamilien HvGER1 bis HvGER5 gegliedert wurden (Druka, et al., 2002). Die Analyse dieser cDNAs führte zu einer geschätzten Anzahl von 18 Genen, kodierend für HvGER Proteine. So wurden den Subfamilien HvGER1 zwei Gene, HvGER2 und HvGER5 jeweils ein Gen, HvGER3 vier Gene und der Subfamilie HvGER4 sogar 9 Gene zugeordnet. Da alle diese Daten auf ESTs basieren, kann von einer größeren effektiven Komplexität der Genfamilien ausgegangen werden.

#### **1.7.5 Struktureigenschaften der Germine und GLPs**

Fast alle biochemischen Charakterisierungen der Germine und GLPs wurden am Weizen- und Gerstengermin durchgeführt, da diese die ersten bekannten Mitglieder dieser Familie darstellen. So sagen Röntgenstrukturanalysen von Kristallen des Weizengermins eine homohexamere Struktur vorher, welche als Trimer (bestehend aus drei Dimeren) organisiert ist (Abb. 1.1 a) (Woo et al., 1998, 2000). Das Dimer ist dabei strukturell sehr ähnlich zum Monomer des Globulins Vicillin (Abb. 1.1 b), was für einen gemeinsamen Vorfahren beider Proteine spricht (Woo et al., 2000).

Das Germin/GLP Monomer (Abb.1.1 c) wird durch eine Disulfidbindung zwischen zwei Cysteinresten stabilisiert. Die am C-terminalen Ende befindlichen  $\alpha$ -Helices der 6 Monomere interkalieren miteinander, sodass die Dimere und das Trimer stabilisiert

werden. Zusätzlich verstärken hydrophobe Interaktionen der  $\alpha$ -Helices den Komplex. Das Germin/GLP ist ein Protein mit vermutlich einem einfachen an einem Asparaginrest gebundenen Glykan (N-Glykan), obwohl eine weitere Stelle für eine mögliche N-Glykosylierung vorhanden ist (Woo et al., 2000, Lane et al., 2002). Der hoch konservierte Charakter der Cupin-Superfamilie basiert auf der „ $\beta$ -Barrel“ Struktur. Das „ $\beta$ -Barrel“ besteht aus den antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern A, B, I, D, G und C, H, E, F, J (Gane et al., 1998). Zwei der konservierten Motive (Box B und C) sind in den Faltblättern C, D, G und H lokalisiert. Ein drittes konserviertes Motiv (Box A) befindet sich außerhalb der „ $\beta$ -Barrel“ Struktur (Bernier, 2001).



**Abb. 1.1** Struktur der Germine und GLPs. (a) Zeigt die homohexamere Organisation der Proteine. Das Dimer (eingeschränkt) entspricht der Struktur des Phaseolinmonomers (b). (c) Schematische Repräsentation einer typischen Organisation des Germin/GLP Monomers: Rot kennzeichnet die hoch konservierten Bereiche (Box A, Box B, Box C), grau die variablen Regionen, grün das vorhergesagte Signalpeptid und blau die  $\alpha$ -Helices. Die zwei Cysteinreste, welche die Disulfidbrücke bilden sind blau markiert und die vier Aminosäurereste, die an der Metallbindung beteiligt sind, wurden rot gekennzeichnet. „X“ stellt eine beliebige hydrophobe und „-“ eine beliebige Aminosäure dar. Die Abbildungen (a) und (b) wurden aus Woo et al., (1998) entnommen und (c) in Anlehnung an Bernier (2001) modifiziert.

Die Box B enthält die von Lane et al., (1991) definierte „Germin Box“ (HIHPRATEI) welche auch die Strukturverwandtschaft der Germine und GLPs zu den Cupinen kennzeichnet. Das Germin oder GLP Homohexamer besitzt 6 vorhergesagte

katalytisch aktive Zentren, welche jeweils ein  $Mn^{2+}$  Ion binden. Die Metallbindung kommt durch drei Histidinreste und ein Glutamatrest in den konservierten Motiven des „ $\beta$ -Barrels“ zustande.

Das Tripeptid KGD oder RGD wurde in mehr als die Hälfte der GLPs, aber nicht in den Germinen beobachtet. Für ein GLP in der Erbse (*Pisum sativum*) wird vermutet, dass es als Adhäsionsprotein in der extrazellulären Matrix (EZM) mit Hilfe dieses Tripeptids der Erkennung von Rhicadhesin dient. Rhicadhesin vermittelt den ersten Schritt der Anheftung der Rhizobakterien an die Wurzeln der Erbse (Swart et al., 1994).

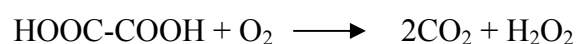
Ein Signalpeptid des Sekretionsweges wurde für alle Germine/GLPs vorhergesagt und durch N-terminale Sequenzierung bestätigt (Yamahara et al., 1999; Carter et al., 1999).

### 1.7.6 Enzymatische Aktivitäten der Germine und GLPs

Für einige GLPs konnte die enzymatische Aktivität identifiziert werden. So wurde z.B. ein HvGER2 Protein der Gerste (früher als HvGLP1 bezeichnet) als eine Nukleotid-Zucker Pyrophosphatase/Phosphodiesterase identifiziert (Rodrigues-Lopez et al., 2001), und ein zu HvGER2 nah verwandtes GLP aus Weizen wurde als Serinprotease Inhibitor identifiziert (Segarra et al., 2003). Besonders wichtig war jedoch die Entdeckung, dass Germine und GLPs für Enzyme kodieren, die  $H_2O_2$  produzieren. In einer Pflanzen-Pathogen-Interaktion haben  $H_2O_2$ -generierende Systeme eine große funktionelle Bedeutung: Hydrogenperoxid besitzt eine direkt antifungale Wirkung, verursacht Zellwandverstärkung durch Quervernetzungsreaktionen und dient als Botenmolekül in Signalübertragungsprozessen, welche z.B. die Genexpression von Proteinen zur Pathogenabwehr aktivieren. Zwei der bedeutendsten  $H_2O_2$  Erzeuger sind:

#### a) Oxalatoxidasen

Die Germinogene des Weizens (*GF-2.8*) und der Gerste *HvGER1* (früher als *HvOxO* bezeichnet) kodieren für Oxalatoxidasen (Lane et al., 1993; Dumas et al., 1993) Sie katalysieren die Umsetzung des Oxalats zu Hydrogenperoxid und Kohlendioxid:



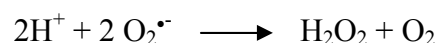
Obwohl Oxalatoxidaseaktivitäten in Banane, Mais, Zuckerrübe und Sojabohne beschrieben wurden, fehlen Hinweise zur Identifikation der katalytisch aktiven Proteine. Aus den Dicotylen wurde zwar ein GLP mit Oxalatoxidaseaktivität aus *Silene vulgaris*

beschrieben, allerdings wurde bisher nur der N-Terminus des Proteins sequenziert (Bringezu et al., 1999).

Transgene Pflanzen, welche die Oxalatoxidase aus Weizen überexprimieren, existieren und stellen eine Option zur Abwehr gegen Pathogene dar. Der Oxalatsekretierende, nekrotrophe Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* ist das bedeutendste Pathogen von Pflanzen mit ölhaltigem Samen. Transgene Expression der Weizenoxalatoxidase in der Sonnenblume und in der Sojabohne haben gezeigt, dass die durch *Sclerotinia* induzierten Läsionen reduziert und die Ausbreitung des Befalls signifikant vermindert werden konnte (Lu et al., 2003; Donaldson et al., 2001; Hu et al., 2003). Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass transgener Mais, welcher das Weizengermin exprimiert, gesteigerte Resistenz gegen Insektenbefall zeigte (Ramputh, 2002). Neben den transgenen Pflanzen konnte erstmalig in transienten Expressionsexperimenten eine Wirkung des Weizengermins (GF-2.8) gegen den biotrophen Mehltaupilz *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* durch Schweizer et al., (1999a) gezeigt werden. Transiente Überexpression der Weizenoxalatoxidase in der Epidermis von Weizenblättern führte signifikant zur Erniedrigung des Penetrationserfolges von *B. graminis* und dadurch zur Erhöhung der Resistenz. Zusätzlich hat Oxalatoxidase eine kommerzielle Bedeutung in der Analyse des Oxalatgehalts im Blutplasma und im Urin des Menschen (Dunwell et al., 2000).

#### *Superoxiddismutasen (SOD)*

Neben der Oxalatoxidaseaktivität können GLPs eine Superoxiddismutaseaktivität besitzen. Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ ) entsteht als Nebenprodukt von physiologischen Reaktionen aerober Organismen, wie z.B. dem Elektronenfluß in den Chloroplasten und Mitochondrien und in weiteren Redoxreaktionen in der Zelle. Reagiert Superoxidanion mit Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) entsteht radikales Hydroxylion ( $OH^{\bullet}$ ), welches die Peroxidation von Lipidmembranen und die Inaktivierung vieler Enzyme in der Zelle verursacht (Mehdy, 1994). Radikaler Sauerstoff, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikale werden daher auch als „*reactive oxygen species*“ (ROS) bezeichnet. Der Schaden der durch  $OH^{\bullet}$  entsteht, wird allerdings durch die Rolle der SOD als Sauerstoffradikalfänger begrenzt:



Superoxiddismutasen können somit zur Balance zwischen den ROS in der Zelle beitragen. Zwei GLPs konnten biochemisch als Mangan-SOD identifiziert werden. Das erste wurde aus *in vitro* kultivierten Zellen des Mooses *Barbula unguiculata* isoliert

(Yamahara, 1999). Das zweite konnte aus dem Nektar von Tabak isoliert werden und wird als „*nectarin I*“ bezeichnet (Carter and Thornburg, 2000). Für ein GLP der Gerste HvGER4 (früher als HvOxOLP bezeichnet) wurde erst neulich SOD Aktivität nachgewiesen (Christensen et al., 2004). HvGER4 ist im Zusammenhang mit der papillären Resistenz gegen *B. graminis* beschrieben worden (Wei et al., 1998). Thordal-Christensen et al., (1997) haben gezeigt, dass *HvGER4* explizit in der Epidermis von *B. graminis* inokulierten Gerstenblättern exprimiert wird. Interessanterweise korrelierte die räumliche und zeitliche Expression des HvGER4 Transkripts mit der Entwicklung der Papillen (Wei et al., 1998). Aufgrund der räumlich sehr begrenzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Bildung um die Papille herum und der Affinität einiger GLPs für die Zellwand wird vermutet, dass das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –erzeugende HvGER4 Protein in den Papillen akkumuliert, und wesentlich an oxidative Quervernetzungsreaktionen beteiligt sein kann (Thordal-Christensen et al., 1997). Experimente belegen, dass durch transiente Überexpression zweier SOD kodierender Gene (*HvGER4* und eines orthologen Weizengens) in der Epidermis von Gersten - bzw. Weizenblättern ein resistenzsteigernder Effekt gegen *Blumeria graminis* zu beobachten war, hingegen *silencing* des *HvGER4* Gens zur Überanfälligkeit gegenüber dem Pathogen führte (Schweizer et al., 1999, Christensen et al., 2004).

### 1.7.7 GLPs und die Extrazelluläre Matrix (EZM)

#### *Lokalisation der GLPs*

Für das Weizengermin wurde gezeigt, dass es nur lose mit der Zellwand durch ionische Bindungen assoziiert ist, und durch einen einfachen Waschschrift gewonnen werden kann (Lane et al., 1994). Expression des Weizengermingens und einiger GLP Gene aus *Arabidopsis thaliana* in transgenen Tabak haben gezeigt, dass die GLP Proteine verschieden stark an die EZM gebunden werden (Membre et al., 2000). Vor allem das Weizengermin und die AtGER3 Proteine aus *Arabidopsis* lagen auch in löslicher Form vor und wurden als die am meisten abundanten Proteine aus der Interzellularflüssigkeit von transgenen Tabak isoliert (Membre et al., 2000). Dagegen scheint ein anderes GLP Protein, HvGER2, nichtionisch an die Zellwand gebunden zu sein (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a).

*GLPs als Strukturproteine der EZM und ihre Rolle in der Pathogenabwehr*

Zellwandmodifikationen wie die oxidative Quervernetzung von phenolartigen Vorstufen zu Lignin und einiger Proteine dienen nicht nur der Stabilisierung sekundärer Zellwände, sondern werden auch durch Pathogenbefall induziert. Zellwandverstärkungen und Papillenbildung stellen biochemische und mechanische Barrieren gegen eindringende Pilze dar.

Für einige GLPs wurde erwiesen, dass sie nach Inokulation der Epidermis mit einem Pathogen nur schwer von der Zellwand zu lösen waren, was vermutlich auf eine Quervernetzung dieser Proteine in der Zellwand zurückzuführen war (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a).

Transiente Überexpression des Weizengermingens in mit *B. graminis* inokulierter Weizenepidermis führte z.B. zur Unlösbarkeit des Transgenprodukts auf der Seite der versuchten Penetration durch das Pathogen. Die Quervernetzung des Germinproteins wurde um die Papillen an der Hydrogenperoxid entstehenden Seite beobachtet (Schweizer et al., 1999a). Neben dieser Beobachtung konnte außerdem eine signifikante Reduktion der Penetrationseffizienz für *B. graminis* gezeigt werden (Schweizer et al., 1999a). Es wäre interessant über eine duale, neben einer enzymatischen auch über eine strukturelle Funktion des Proteins bei der Pathogenabwehr zu spekulieren.

Das HvGER2 Genprodukt ist in nicht-gestressten Geweben zu zwei Drittel an die Zellwand gebunden und zu einem Drittel löslich im Interzellularbereich. Die gebundene Fraktion konnte durch SDS aus den Zellwänden herausgelöst werden. Hitzebehandlung, Hydrogenperoxidbehandlung und Pathogeninfektion verursachten eine starke Abnahme des HvGER2 Proteins aus der löslichen Fraktion des Interzellularbereichs (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a). Diese Hitzebehandlung induzierte eine Resistenz gegen Bgh durch nachfolgende Bgh-Inokulation der Gerstenblätter. Diese erhöhte Resistenz war weder auf Papillenbildung, Bildung von PR-Genprodukten noch auf hypersensitiven Zelltod zurückzuführen, sondern auf eine Modifikation der Zellwand (Schweizer et al., 1995). Durch das reversible Verschwinden des HvGER2 Proteins aus dem Interzellularbereich wurde vermutet, dass es nichtkovalent, nichtionisch an die Zellwand gebunden (quervernetzt) wird und somit möglicherweise zur Stärkung der Zellwandstruktur beiträgt.

### 1.7.8 Rolle der GLPs in der Entwicklung der Zellwand

Im Getreide werden während der Zellwandstreckung Zellwandpolysaccharide wie z.B. Glukoronogalaktoarabinoxylan (GGAX) eingebaut, eine charakteristische Komponente in der Zellwand von Gräsern (Nevins et al., 1993). Da eine enge Assoziation zwischen Germin und den GGAX auftrat, wurde in Erwägung gezogen, dass das Germin am Transport und an der Integration der GGAX in die Zellwand beteiligt ist (Lane et al., 1994). Andererseits ist Germin als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Erzeuger an der oxidativen Quervernetzung von Proteinen und phenolartigen Vorstufen zu Lignin beteiligt, was zu einer Termination der Zellwandstreckung führt.

Das *GhGLP1* aus der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) ist wahrscheinlich an der Expansion von Baumwollfasern beteiligt (Kim et al., 2004a, b). Baumwollfasern sind Einzelzellen, die sich aus den Epidermiszellen des Baumwollsamens entwickeln. Die *GhGLP1* Transkriptakkumulation in den Baumwollfasern korrelierte mit der Zellfaserelongation und war dagegen mit dem Beginn der sekundären Zellwandbildung kaum noch detektierbar (Kim et al., 2004b). *GhGLP1* zeigte die höchste Sequenzidentität zu dem zellwandassoziierten GLP *ABP19* aus Pfirsich, welches für ein Auxin-bindendes Protein (ABP) kodiert (Ohmiya, et al., 1993, 1998). Auxin ist an der Zellwandstreckung in der Pflanze beteiligt, und die Konzentration an endogenem Auxin ist im Apoplasten höher als im Symplasten (Ohmiya, et al., 1993). Interessanterweise besitzt das Weizengermin eine Erkennungstelle für Auxin in der Promoterregion. Ohmiya et al., (1998) schlägt daher auch für das ABP19 eine ähnliche Funktion in Zellexpansionsprozessen vor.

### 1.8 Ziele der Arbeit

Ziel der Dissertation ist die Charakterisierung der HvGER Multigenfamilie der Gerste. Die Charakterisierung der HvGER Unterfamilien wurde bisher nur teilweise durchgeführt und soll in meiner Arbeit durch beschreibende und funktionelle Analysen vervollständigt werden. Folgende Schwerpunkte wurden vorgegeben:

- Detektierung der Expressionsschwerpunkte pro Unterfamilie während verschiedener Entwicklungsstadien und Geweben der Gerste. Dazu ergänzend die Analyse der Auswirkung von biotischem und abiotischem Stress auf die Genexpression der HvGER Unterfamilien.

- Der Einfluß veränderter HvGER Expression auf die Abwehr gegen das Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) unter Verwendung des biolistischen transienten

Transformationssystem. Zu diesem Zweck wurden Überexpressions als auch „*knock down*“ (*Transient induced gene silencing*, TIGS) Experimente durchgeführt.

- Zusätzliche Untersuchung, ob die HvGER Unterfamilien neben einer enzymatischen auch eine strukturelle Abwehrfunktion besitzen. Dies erfolgte durch *site directed mutagenesis* des katalytisch aktiven Zentrums und anschließender transienter Überexpression in der Gerste.

- Aufschluss über die Struktureigenschaften der HvGER Proteine mittels stabiler Expression rekombinanter HvGER Proteine in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen und Untersuchung möglicher struktureller Unterschiede zwischen mutierten Formen und Wildtypformen der HvGER Proteine.

- Test aller HvGER Unterfamilien auf enzymatische Aktivitäten als weiteren Bestandteil der rekombinanten Proteinexpression.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Organismen

##### Pflanzenmaterial:

<i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>aestivum</i>	Sorte: Kanzler (Winterweizen)
	Sorte: Fidel (Winterweizen)
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	Sorte: Golden Promise (Sommergerste)
	Sorte: Ingrid (Sommergerste)
	Sorte: Pallas (Sommergerste)
	Sorte: Hanna (Wintergerste)
<i>Arabidopsis thaliana</i> L. (Ackerschmalwand)	Ökotyp Columbia

##### Pilzmaterial:

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

Bei der Gerstenmehltaukultur handelt es sich um ein schweizer Feldisolat mit dem Avirulenzgen *Mla9*. Bei der Weizenmehltaukultur handelt es sich um ein schweizer Feldisolat ohne bekanntes Avirulenzgen.

##### Bakterienstämme:

###### *Escherichia coli:*

Stamm: DH10B  $\Delta$ (mrr-hsd RMS-mcrBC)mcrA recA1 (Sambrook et al., 2001)

###### *Agrobacterium tumefaciens:*

Stamm: C58C1 (Deblaere et al., 1985)

#### 2.1.2 Antibiotika

Ampicillin (ROTH, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Dt.)

Kanamycin (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

Rifampicin (Duchefa)

Carbenicillin (Duchefa)

### 2.1.3 Vektoren

pIPKTA9 (s. Anhang 8.1)	Amp <sup>r</sup>
pUbiGus (Schweizer et al., 1999a, b)	Amp <sup>r</sup>
pIPKTA5 (Christensen et al., 2004)	Amp <sup>r</sup>
pIPKTA19 (Christensen et al., 2004)	Amp <sup>r</sup>
pIPKTA30N (Douchkov et al., 2005)	Amp <sup>r</sup>
pIPKTA33 (Douchkov, et al., 2005)	Km <sup>r</sup>
pBINPLUS (van Engelen et al., 1995)	Km <sup>r</sup>

### 2.1.4 Antiseren

$\alpha$ HvGER1 aus Kaninchen	(Christensen et al., 2004)
$\alpha$ HvGER2 aus Kaninchen	(Vallelian-Bindschedler et al., 1998a)
$\alpha$ HvGER4 aus Kaninchen	(Christensen et al., 2004)

### 2.1.5 Oligonukleotide

Sequenzierprimer:

T3:	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
T7:	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
SK:	5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'
35Sprom:	5'-CAC TGA CGT AAG GGA TGA CG-3'
35Sterm:	5'-CTG GGA ACT ACT CAC ACA-3'
pBinform:	5'-AAC GAC GGC CAG TGA ATT C-3'
pBinrev:	5'-TGA CCA TGA TTA CGC CAA GC-3'

Primer benutzt in *nested* PCR:

Ger3Fnest1u:	5'-GCT CAC ATG CAA GTT CAT GCA TAT CA-3'
Ger3Fnest1r:	5'-GCT CAC ATG CAA GTT CAT GC-3'
Ger3Fnest2u:	5'-GCT CTG TCA ATC TAC GGC TAT-3'
Ger3Fnest2r:	5'-CTA GCA TTA CAT ATG AAC TTT CCA-3'
Ger6nest1u:	5'-TTG TAG GAC ACC ATG ATG ATG G-3'
Ger6nest1r:	5'-CGA CTG CAT TAG CAT GAC ATG-3'
Ger6nest2u:	5'-GAT GAT GGC ACG TGT TTC C-3'

Ger6nest2r: 5'-CGA ACC ACT GAG AAT GGT ACT-3'

Primer für die Unterfamilie HvGER4:

5'HO03H22: 5'-CGG AAT ATG AGT GCA TAA-3'

3'HO03H22: 5'-CAT AGG ACT GAA ATA CAT T-3'

5'HO11H17: 5'-GTC AGA CAT TGG TTG ACT T-3'

3'HO11H17: 5'-AAG GTT GAA ATA CAT TCA C-3'

5'HO01J19: 5'-CAG GCA TTG GGT GAT TA-3'

3'HO01J19: 5'-GGT ATT GTC AAT TAT TTG GAA-3'

5'HO08H12: 5'-TCA CAC ATT GGG TGA TTA-3'

3'HO08H12: 5'-AAG GTA GAA ATA CAT TCA C-3'

Primer für RNAi-Konstrukte:

5'RNAiGER2: 5'-GCC AAC GCA ATG TTG CTC-3'

3'RNAiGER2: 5'-CGC GTA GTC AGT GAT CTG GA-3'

5'RNAiGER3: 5'-GCG AGT CAA TGG ATT TGC TT-3'

3'RNAiGER3: 5'-GCC GTG GCT AGA ACA TCA TC-3'

5'RNAiGER4: 5'-CAA ACA GGA ACA CAA GAC AAG G-3'

3'RNAiGER4: 5'-ACC TTT GTT GAG CAC CTT CG-3'

5'RNAiGER5: 5'-TAG CAA GCA AGC ATT GAC CA-3'

3'RNAiGER5: 5'-CCC CTG TTT TGC TGG AAG T-3'

Primer für "site-directed mutagenesis":

5'GER1H112S:

5'-GGC ACC AAC CCG CCG **AGC** ATC CAC CCG CGG GCA ACC GAG ATC-3'

3'GER1H112S:

5'-GAT CTC GGT TGC CCG CGG GTG GAT **GCT** CGG CGG GTT GGT GCC-3'

5'GER4H110S:

5'-TTG GGT CAG AAC CCG CCA **AGC** ACG CAC CCG CGG GCC ACT GAG  
ATC CTCA-3'

3'GER4H110S:

5'-TGA GGA TCT CAG TGG CCC GCG GGT GCG **TGC TTG** GCG GGT TCT  
GAC CCA A-3'

5'GER2H103S:

5'-GGC GTC GTG CCG ATG **AGC** ACC CAC CCG GCC GCC-3'  
 3'GER2H103S:

5'-GGC GGC CGG GTG GGT **GCT** CAT CGG CAC GAC GCC-3'  
 5'GER5H109S:

5'-GGC CAG AAC CCG CCG **AGC** ACC CAC CCG CGC GCC-3'  
 3'GER5H109S:

5'-GGC GCG CGG GTG GGT **GCT** CGG CGG GTT CTG GCC-3'  
 5'pOXOXH111S:

5'-GGC ACC AAC CCA CCA **AGC** ATC CAC CCG CGT GCC-3'  
 3'pOXOXH111S:

5'-GGC ACG CGG GTG GAT **GCT** TGG TGG GTT GGT GCC-3'

Rote Buchstaben kennzeichnen die Stelle bei welcher ursprünglich das Codon (5'CAC3' bzw. 3'GTG5'), kodierend für Histidin, stand und gegen das Codon (5'AGC3' bzw. 3'GCT5'), kodierend für Serin, ausgetauscht wurde.

#### 2.1.6 Enzyme und Kits

Firma	Produkt
MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.	T4 DNA Ligase T4 DNA Polymerase Taq DNA Polymerase Pfu DNAPolymerase, Restriktionsenzyme
Genomed GmbH, Löhne, Dt.	JETstar (DNA Präparationskit)
Invitrogen™, life technologies Paisley, UK	TOPO TA Cloning® Kit, Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix, ThermalAce™ DNA PolymeraseKit, GeneRacer™ Kit, ThermoZyme™ DNA Polymerase
Macherey-Nagel GmbH, Düren, Dt.	Automated Plasmid-DNA Purification, NucleoSpin® Robot-96 Plasmid Plasmid-DNA Purification NucleoSpin® Plasmid Total RNA Isolation NucleoSpin® RNA L
Qiagen, Hilden, Dt.	QIAquick Gel Extraction Kit QIAquick PCR Purification Kit
Roche, Mannheim, Dt.	Rapid DNA Ligation Kit Phosphatase, alkalische, Shrimp Pwo DNA Polymerase

SIGMA, Deisenhofen, Dt.	Horseradish Superoxide Dismutase
Stratagene, La Jolla, CA, USA	QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, PfuTurbo® DNA Polymerase
USB, Cleveland, Ohio, USA	Klenow Enzym

### 2.1.7 Molekulare Marker und Biochemikalien

Firma	Produkt
Amersham Biosciences, Freiburg, Dt.	[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP, Nylonmembran "Hynond-N", Mikro Spin S-200 Columns,
Biorad, Hercules, CA, USA	Micron Gold, Makrocarrierscheiben, Zerreißscheibe, Nitrozellulosemembran; 0,45 $\mu\text{m}$
Biosynth, Staad, Schweiz	X-Gluc
Duchefa, Haarlem, Niederlande	Kanamycin, Rifampicin, Carbenicillin, Phytoagar, Hefe-Extrakt, MS-Salze,
Eurogentech, Seraing, Belgien	DNA Smart Ladder
Fluka	Benzimidazol, NBT, Vitamine, Oxalsäure, Riboflavine, 4-Chloro-1-Naphthol, Thiamin, Inosit, Na-freies EDTA
Heinemann, Labortechnik GmbH, Duderstadt	Blottingpapier B003, B004
Invitrogene, Paisley, UK	Agarose (Elektrophorese Grade), EDTA
Lanz-Anliker Ag, Rohrbach, Schweiz	Nylonnetz, 100 $\mu\text{m}$ (Inokulation)
MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.	Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder, dNTPs
Merck, Darmstadt, Dt.	Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), Peptone, Fleischextrakt
Metabion, Planegg-Martinsried, Dt.	DNA Oligonukleotide
OTTO NORD WALD, Hamburg, Dt.	Bacto™ Agar, Bacto™ Tryptone
Roche, Mannheim, Dt.	Hexanukleotide, Peroxidase
ROTH, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Dt.	Tris, Kaliumhexacyanoferrat II und III, TritonX-100, Formamid, Formaldehyd, SDS, BSA, Roti-Block, Ampicillin
SIGMA, Deisenhofen, Dt.	BCIP/NBT Gemisch für Membranen, Monoklonale Anti-Kaninchen Immunglobuline konjugiert mit alkalischer Phosphatase, TEMED, Bromphenolblau,

USB, Cleveland, Ohio, USA	MOPS
Stratagene, La Jolla, CA, USA	Sonicated Salmon Sperm DNA

### 2.1.8 Laborgeräte

Firma	Produkt
Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Dt.	PCR-cycler T-gradient
BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA	Particle Delivery System (Partikel Kanone), Model PDS-100/He Power Supply Power Pack 200, Agarose Gel Elektrophorese System, Mini Trans-Blot® Cell,
Carl Zeiss, Göttingen, Dt.	Axioplan 2 Durchlicht-und FL-Mikroskop Axiostar plus Durchlicht-Mikroskop AxioCam Digitalkamera
Dynatech Burlington, Massachusetts, USA	ELISA reader MR 7000
Eppendorf, Hamburg, Dt.	Zentrifuge 5417R: Rotortyp FA45-30-11 BioPhotometer Thermomixer compact
Fuji, Tokio, Japan	Phosphoimager, BAS 2000
Heraeus Holding GmbH, Hanau, Dt.	Zentrifuge: Heraeus Varifuge, swing out
Kendro, Osterode, Dt.	Multifuge3S-R, Rotortyp Sorvall Heraeus 75006445
Kodak, Rochester, NY, USA	Kodak BioMax cassette (Kassette) Kodak BioMax MS intensifying screen
Kühner, Birsfelden, Schweiz	Schüttler
Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA	Easycast™ (Horizontales Elektrophorese System)
Stratagene, La Jolla, CA, USA	UV Stratalinker® 2400

### 2.1.9 Puffer

#### 1x TE Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

#### 50x TAE Puffer:

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5M EDTA pH 8,0  
H<sub>2</sub>O ad 1l

20x SSC Puffer (auf pH 7.0 mit 10 M NaOH einstellen):

175,3 g l<sup>-1</sup> NaCl  
88,2 g l<sup>-1</sup> Natriumzitat

### **2.1.10 Bakterien-Kultur-Medien**

LB Medium (pH 7,0):

5 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt  
10 g l<sup>-1</sup> Tryptone  
10 g l<sup>-1</sup> NaCl  
10 g l<sup>-1</sup> Agar für Festmedium

SOC Medium (pH 7,0):

5g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt  
20g l<sup>-1</sup> Tryptone  
0,5g l<sup>-1</sup> NaCl  
0,186g l<sup>-1</sup> KCl  
20 mM Glucose (steril filtriert, Zugabe nach autoklavieren)

YEB Medium (pH 7,2):

5 g l<sup>-1</sup> Fleischextrakt  
1 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt  
5 g l<sup>-1</sup> Peptone  
5 g l<sup>-1</sup> Saccharose  
2 mM MgSO<sub>4</sub>

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Anzucht der Gersten- und Weizensorten**

Die Samen wurden in Töpfen auf gedämpfter Komposterde ausgesät. Die Anzucht erfolgte zum einen im Gewächshaus bei einer Temperatur von ca. 18°C (in der Nacht) bis ca. 21°C (am Tag). Neben dem Tageslicht dienten Natriumhalogenlampen als zusätzliche Lichtquelle. Direkte Sonneneinstrahlung wurde durch automatisierte Beschattung vermieden. Zum anderen erfolgte die Anzucht in der Klimakammer bei einer konstanten Temperatur von 20°C, einer relativen Luftfeuchte von ca. 70% und im Rhythmus von 16 h Licht (1000 Lux, Metallhalogenlampen) und 8 h Dunkelheit.

### **2.2.2 Der Erhalt des Mehлтаus**

Für den Erhalt des Gerstenmehltaus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) und des Weizenmehltaus *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Bgt) wurden die anfälligen Sorten: Golden

Promise (Gerste) und Kanzler (Weizen), in einem Gewächshaus, bis zu einem Alter von 7 Tagen angezogen.

Für die Erhaltung der obligat biotrophen Mehltaupilze wurden reife Konidien auf das sieben tägige Pflanzenmaterial übertragen. Nach Inokulation wurden Wirt und Pathogen sieben Tage im Klimaschrank (Sanyo Biomedical MLR-350, Tokio, Japan) bei einer konstanten Temperatur von 20°C, einer relativen Luftfeuchte von ca. 65%, bei 16 h Licht und 8 h Dunkelheit inkubiert.

Die sich nach dieser Zeit entwickelten Konidien wurden für die Erhaltung auf frisches Pflanzenmaterial übertragen oder für die Durchführung weiterer Experimente verwendet.

### **2.2.3 Anzucht der Gerstensorte Ingrid für die RNA-Extraktion aus verschiedenen Entwicklungsstadien**

Die Samen wurden wie folgt oberflächensterilisiert: 5 min in 70% Ethanol, 15 min in 0,8% Natriumhypochloridlösung und 4x für 10 min mit sterilem Wasser.

Die gewaschenen Samen wurden auf feuchtem Whatman-Papier in Bechergläsern ausgelegt, und zum Schutz vor Verdunstung mit einer perforierten Frischhaltefolie abgedeckt. Das Wasser wurde täglich erneuert, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Anzucht der jungen Keimlinge erfolgte in der Klimakammer (s. 2.2.1), die Ernte erfolgte nach 2, 4 und 6 Tagen. Zusätzlich wurden die Samen auf Erde ausgelegt und die Pflanzen im Gewächshaus angezogen. Von diesen wurden die älteren Keimlinge sowie die reifenden Pflanzen nach 8, 10, 20 Tagen und nach zwei Monaten geerntet. Nach dem sofortigen Einfrieren aller Pflanzenmaterialien in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung bei -80°C.

### **2.2.4 Stressbehandlungen an der Gerste für die RNA-Extraktion**

Die mit Stress zu behandelnden Pflanzen und die Kontrollpflanzen wurden in der Klimakammer (s. 2.2.1) angezogen. Für die Stressversuche kam 7 Tage alte Gerste der Sorte Ingrid zum Einsatz. Für die RNA-Extraktion wurde das Primärblatt, und aus den Versuchen des Salz- und Schwermetallstresses zusätzlich Wurzelmaterial geerntet. Das Material wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Gerste wurde folgenden Faktoren ausgesetzt:

Hitzeschock: Inkubation bei 40°C in einem Brutschrank, (durch Wasserzusatz Luftfeuchtigkeit erhöht), Entnahme von Blattmaterial nach 6 h und 10 h.



Trockenheit: 3 Tage ohne Bewässerung in der Klimakammer, 24 h nach Sichtbarwerden von Welkesymptomen erfolgte die Probenentnahme.

Kälte: Inkubation bei 5°C im Kühlraum unter Beibehaltung des Tag/Nacht Regimes (16 h Licht, 8 h Dunkel), Ernte nach 24 h Kältebehandlung.

Verwundung: erfolgte durch Quetschung der Primärblätter im Abstand von ca. 7 mm mittels Pinzette, Ernte nach 10 h und 24 h.

Reaktiver Sauerstoff: 4x-iges Besprühen der Pflanzen mit 100 mM Wasserstoffperoxid in 0.05% Tween 20, im Intervall von 2 h. Die Kontrollen wurden nur mit 0,05% Tween 20 besprüht. Die Entnahme von Blattmaterial erfolgte 8h und 24h nach dem ersten Besprühen.

Salz- und Schwermetallstress: Anzucht der Gerste auf Whatman-Papier (s. 2.2.3.). Nach 7 Tagen wurde ein Teil der Gerste mit 150 mM NaCl, der andere Teil mit 100 µM CdCl<sub>2</sub> und die Kontrollen mit Wasser gegossen. Die Probenentnahme erfolgte nach 24 h.

Zirkardiane Rhythmen: Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Rhythmus von 16 h Tag und 8 h Nacht. Am 7., 8. und 9. Tag wurden Proben zu verschiedenen Tages- und Nachtzeiten entnommen. Der erste Zeitpunkt (0 h) wurde zum Ende der Nachtperiode des 7. Tages im Dunkeln geerntet. Nach 6h und nach 12 h Licht wurde erneut Blattmaterial entnommen. Nach 24 h wurde im Dunkeln, nach 30 h und 36 h im Licht und nach 48 h wieder im Dunkeln geerntet.

Pathogenbefall: Die Gerstensorte Ingrid und die isogene, mehlauresistente Linie Ingrid BC *mlo5* wurden mit Bgh inokuliert. Vierundzwanzig Stunden nach Pathogenbefall wurde das Blattmaterial geerntet.

Die RNA von *Bipolaris sorokiniana*-infizierter Gerste wurde von Prof. Dr. Ralph Hückelhoven (Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, Freising) zur Verfügung gestellt. Verwendet wurde RNA aus Primärblättern 16 h, 48 h und 72 h nach Pathogenbefall.

### 2.2.5 Isolierung von Gerstenmehltau-inokulierter Epidermis

Die Gerstensorte Ingrid wurde wie oben beschrieben in der Klimakammer angezogen (s. 2.2.1) und nach 7 Tagen mit Bgh inokuliert (s. 2.2.2.). Ein Teil der Pflanzen wurde als Kontrolle nicht inokuliert. Vierundzwanzig Stunden nach Pathogenbefall wurden jeweils von der Probe und der Kontrolle die Epidermis von der abaxialen Seite des Primärblattes mit einem Skalpell abgezogen und verbleibende Mesophyllreste entfernt. Das von der

Epidermis teilweise befreite Blatt und die Epidermis wurden separat unter flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.2.6 Standard Klonierungsmethoden, Plasmid Isolation und Sequenzierung**

Die molekularen Standard Klonierungsmethoden wie Restriktionsanalyse, Ligation, und DNA Gelelektrophorese wurden nach Sambrook et al., (2001) durchgeführt. Die Transformation, unter Hitzeschock, in *E.coli* erfolgte nach Cohen et al., (1972). Die Isolation hochreiner Plasmid-DNA erfolgte nach den Gebrauchsanweisungen von JETstar (Genomed) und NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel). Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel und von PCR-Amplifikaten erfolgte entsprechend der Anleitung von QIAquick Gel Extraction Kit, und QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Die Zwischenklonierung von PCR Produkten erfolgte unter Verwendung des pCR®II-TOPO® Vektorsystems (Invitrogen).

Die DNA Sequenzierung wurde am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben nach der Dideoxynukleotid-Kettenabbruchmethode durchgeführt (Sanger et al., 1977).

### **2.2.7 Isolation von Repräsentanten der HvGER Unterfamilien**

Die Repräsentanten der HvGER Genunterfamilien standen als cDNA Klone in der Gersten EST Sammlung des IPK-Gatersleben zur Verfügung.

Diese Mitglieder wurden der EST Bank als Plasmid entnommen und in *E.coli* DH10B retransformiert. Von den cDNA Klonen, welche keinen vollständig kodierenden Bereich aufwiesen wie z.B für die *HvGER3* – und *HvGER6* Gene, wurde die Nukleotidsequenz mittels PCR aus genomischer DNA vervollständigt.

### **Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels *nested* PCR:**

Ausgehend von genomischer Gersten DNA wurde in einer ersten PCR-Reaktion DNA-Fragmente amplifiziert, die in einer zweiten PCR-Reaktion als Matritze für weiter führende Amplifikationen dienten. Dabei wurde die *nested* PCR mit *touch down* PCR kombiniert. Die Annealingtemperatur der Primer wurde mit jedem PCR-Zyklus um 1°C verringert, bis die optimale Annealingtemperatur erreicht wurde. Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem 50 µl-Gemisch bestehend aus 100 ng DNA, 1 µM Primer, 0,2 mM dNTP, 1 U DNA Polymerase (ThermoZyme™, Invitrogene) und 5 µl 10x Puffer (Invitrogen).

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung (95°C, 3 min), gefolgt von 35 Zyklen, Denaturierung (95°C, 1 min), Anlagerung der Primer bei einer Temperatur von 65°C bis auf konstant 58°C (0,2 min), Primer Extension (72°C, 2 min). Mit dem letzten Extensionsschritt wurde die Reaktion bei 72°C für 5min beendet. Die darauf folgende zweite PCR-Reaktion entsprach der Ersten nur mit dem Unterschied, dass die Primer-Anlagerung bei 62°C erfolgte mit einer anschließenden Temperaturverringering auf konstant 55°C.

Die Amplifikationsprodukte, hervorgegangen aus der PCR wurden in pCR®II-TOPO® Vektor ligiert und in *E. coli* DH10B transformiert.

Zur Analyse der DNA Sequenz wurden alle ausgewählten Repräsentanten der HvGER Unterfamilien als Übernachtskultur angezogen und die Plasmid-DNA isoliert (Machery-Nagel). Mit den Universellen Primern T3, T7, SK wurde die DNA ansequenziert und mit abgeleiteten sequenzspezifischen, internen Primern durchsequenziert (*primer walking*).

### 2.2.8 Klonierung der HvGER Gene in den Überexpressionsvektor pIPKTA9

Die cDNA der HvGER Unterfamilienrepräsentanten wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Fermentas) aus der Plasmid-DNA herausgeschnitten und richtungsorientiert (*sense*) in den Überexpressionsvektor pIPKTA9 ligiert (Vektorkarte s. Anhang 8.1).

Je 1 µg Plasmid-DNA der Vertreter der Unterfamilien HvGER1, HvGER3, HvGER4 und HvGER6 wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und ApaI verdaut. Für *HvGER6* wurde aufgrund einer internen Schnittstelle für BamHI ein partieller Verdau durchgeführt, bei dem die Enzymkonzentration schrittweise von 0,5 U, 0,25 U, 0,125 U, auf 0,06 U je Reaktionsansatz verringert wurde. Die Restriktion für *HvGER2* erfolgte mit den Enzymen NotI und ApaI und für HvGER5 mit den Enzymen SpeI und ApaI. Alle Restriktionsanalysen wurden nach Sambrook et al., (2001) durchgeführt. Für *HvGER3* und *HvGER6* wurde die DNA aus dem Plasmid pCR®II TOPO® isoliert. Für *HvGER1* und *HvGER5* wurde die cDNA aus dem Plasmid pBK-CMV, für *HvGER2* aus dem Plasmid pBluescript SK- und für *HvGER4* aus dem Plasmid pBluescript SK+ isoliert.

Je 1 µg DNA des pIPKTA9 Vektor wurde für die Ligation mit den oben beschriebenen Restriktionsenzymen gespalten und das 5' Ende mit 1 U Shrimps Phosphatase (30 min, 37°C) dephosphoriliert.

Die verdauten Restriktionsansätze und die vorgeschrittenen dephosphorilierten pIPKTA9 Vektoren wurden auf einem 1%-igen Agarosegel (Sambrook et al., 2001) aufgetragen und die Fragmentgröße überprüft. Nach Gelelution und Reinigung (QIAquick Gel Extraction, Qiagen) der DNA-Fragmente wurden diese in den pIPKTA9 Vektor aufgrund der vorgegebenen Restriktionsschnittstellen zwischen den 35S CaMV Promotor und dem 35S CaMV Terminator richtungsorientiert ligiert. Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook et al., (2001).

Da für *HvGER2* keine richtungsorientierte Ligation in den pIPKTA9 Vektor möglich war, wurden die durch Restriktion entstandenen 5' und 3' überhängenden Enden in einem 20 µl -Gemisch bestehend aus 1 U T4 Polymerase (Fermentas), 0,1 mM dNTP und 4 µl 5x Reaktionspuffer bei 11°C für 20 min „poliert“. Die Fragmente wurden dann in den SmaI-vorgeschrittenen und dephosphorilierten pIPKTA9 Vektor ligiert.

Anschließend erfolgte die Transformation aller ligierten Vektoren in *E.coli* DH10B. Die Bakterienkultur wurde angezogen, die Plasmid-DNA isoliert (NucleoSpin® Plasmid, Machery-Nagel) und zur Kontrolle mit den oben genannten Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA des Restriktionsansatzes wurde auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, und entsprechend zur Fragmentgröße wurden die positiven Klone selektiert. Durch Ansequenzierung mit Hilfe des 35S Promotor-Primers wurde die richtige Orientierung aller *HvGER* Gene im pIPKTA9 Vektor überprüft.

### **2.2.9 Northernblotanalyse**

#### **RNA-Extraktion:**

Die RNA aus inokulierter- und nicht-inokulierter Epidermis und Restblatt wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit dem NucleoSpin® RNA L Kit (Machery-Nagel) extrahiert. Dagegen wurde die RNA aus den verschiedenen Entwicklungsstadien der Gerste (s. 2.2.3) und aus den gestressten Gerstenpflanzen (s. 2.2.4) nach der Methode gemäß Vallelian-Bindschedler et al., (1998a) isoliert.

Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Von dem Homogenat wurden 1,5 g abgewogen, mit 4 ml RNA-Extraktionspuffer und 2 ml puffergesättigtem Phenol durchmischt und für 30 min bei RT geschüttelt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4000 rpm für 30 min bei RT (Zentrifuge Heraeus Varifuge, swing out, Heraeus). Zu diesem Ansatz wurden 1,5 ml Chloroform gegeben, durchmischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 3 ml 6M LiCl versetzt und gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte über

Nacht bei 4°C. Die RNA wurde durch zentrifugieren bei 4000 rpm, 4°C, 45 min pelletiert (Zentrifuge Heraeus Varifuge, swing out, Heraeus), und anschließend in 450 µl TE-Puffer gelöst. Durch Zugabe von 50 µl 3M Na-Acetat (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), pH 5,2 und 1 ml 96% Ethanol wurde die RNA erneut gefällt. Nach Zentrifugation (Zentrifuge 5417R: Rotortyp FA45-30-11, Eppendorf) bei 14000 rpm, 4°C und 10 min wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen, 5 min bei 37°C getrocknet, mit 100 µl TE-Puffer versetzt und 5-10 min bei 75°C rückgelöst. Die Einstellung der RNA erfolgte auf eine Konzentration von 1 µg/µl.

RNA-Extraktionspuffer:

0,5 M Tris-HCL, pH8,0

0,25 M Na-EDTA

5 % g/v SDS

**Transfer der RNA auf die Nylonmembran:**

Die RNA-Proben (2 µg - 10 µg) wurden mit dem dreifachen Volumen an Probenpuffer versetzt und bei 75°C für 5 min denaturiert. Die RNA-Proben wurden sofort in einem Eisbad abgekühlt und bis zum Auftragen auf ein denaturierendes Agarosegel im Eisbad belassen.

Das 1,2% ige Agarosegel (18% Formaldehyd (37%) und 10% 10 x MOPS) wurde vor der RNA Separation für 30 min in 1x MOPS Puffer equilibriert. Die elektrophoretische Separation der RNA erfolgte bei 120 V, 80 mA für 90 min in 1x MOPS Puffer. Nach ca. 12 min wurde der Lauf unterbrochen und die Ethidiumbromidbande über den Geltaschen herausgeschnitten. Nach der Separation der RNA im Formaldehyd-Agarosegel wurde diese auf die Nylonmembran (Hybond N, Amersham) durch kapillären Sog (über Nacht) im 0,025M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) übertragen. Die RNA wurde an die Nylonmembran unter UV-Licht kovalent gebunden (1200 units, UV Stratalinker®2400, Stratagene).

Probenpuffer:

56,3 % deionisiertes Formamid

19,9 % Formaldehyd (37%)

11,7 % 10x MOPS Puffer

2,3 % Ethidiumbromid (10mg/l)

4,0 % Glycerin

5,8 % Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)

10x MOPS Puffer:

200 mM Morpholinopropansulfonsäure, pH 7,0

80 mM Natriumacetat

10 mM Na<sub>2</sub>EDTA

### **Radioaktive Markierung der DNA:**

Die DNA-Fragmente die als Sonden verwendet werden sollten, wurden durch Restriktionsverdau oder durch PCR-Amplifizierung hergestellt.

Der vollständig kodierende DNA Bereich je eines Repräsentanten der 6 HvGER-Genunterfamilien wurde mit den unter (s. 2.2.8) beschriebenen Restriktionsenzymen aus dem entsprechenden Plasmid herausgeschnitten und die Fragmentgröße im Gel überprüft. Die Fragmente wurden unter Verwendung des Gel Extraktions Kit (Qiagen) aus dem 1% igen Agarosegel isoliert und anschließend radioaktiv markiert.

Aus dem untranslatierten 3' Bereich der cDNA kodierend für 4 Mitglieder der Genunterfamilie HvGER4 wurden sequenzspezifische Primer abgeleitet (s. 2.1.5). Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem Volumen von 50µl mit folgendem Ansatz: 0,5 µM der Primerpaare, 0,2 µM dNTP, 1,25 U Pfu Polymerase, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5µl 10x Pfu-Puffer. Die PCR-Reaktion wurde für 2 min denaturiert, gefolgt von Denaturierung (1min, 95°C), Annealing (0,5 min, 46°C), Primer Extension (1 min, 72°C) und beendet bei 72°C für 5 min. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 2% igen Agarosegel aufgetragen und ihre Größe mit Hilfe des 50 bp DNA molekularen Markers (Fermentas) verglichen. Nach Gelelution und Reinigung wurden die ca. 100-150 bp großen Fragmente als Sonden für die Northernblot Hybridisierungen verwendet. Alle Sonden wurden auch in der Dot Blot Analyse eingesetzt (s. 2.2.10), um zu testen, ob Kreuzhybridisierungen unter den Genen auftreten.

Von den gereinigten DNA-Fragmenten wurden 25 ng mit 1 µl 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP (Fermentas) versetzt und bei 95°C für 3 min denaturiert. Auf Eis wurden zu diesem Ansatz 2 µl Hexanukleotide (10x, Roche), 2 µl Klenow-Puffer (10x), 1 µl Klenow-Enzym (10 U/µl, USB) und 3µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (30 µCi, Amersham) hinzugegeben und auf ein Endvolumen von 20µl eingestellt. Der Einbau der radioaktiv markierten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP erfolgte bei 37°C für 30min. Die nicht-eingebauten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP Nukleotide wurden auf Sephadexsäulen (MicroSpin™ S-200 Columns, Amersham) abgetrennt.

### **Hybridisierung:**

Die Prähybridisierungen mit der an der Nylonmembran gebundenen RNA erfolgte in Church Puffer, versetzt mit 100 µg ml<sup>-1</sup> Lachssperma-DNA (Stratagene), bei 65°C für 2h. Die Hybridisierung der markierten und denaturierten (95°C für 3 min, 5 min Eisbad) HvGER-Sonden an die RNA erfolgte anschließend bei 65°C, über Nacht.

Nach Hybridisierung wurden die Membranen zweimal stringend in 0,1x SSC und 0,1% SDS für 20min bei 65°C gewaschen. Die Membranen wurden gegen einen *Phosphoimager-Screen* in einer Kassette (Kodak) exponiert und das radiographische Bild durch den PhosphoImager™ (BAS2000, Fuji, Tokio, Japan) detektiert. Die radiographischen Bilder wurden mit Tina v. 2.08 *software* (Raytest, Srockhow, Germany) und mit der Adobe Photoshop 6.0 *software* analysiert.

Church Puffer (Church and Gilbert, 1984):

0,5 M Natriumphosphatpuffer (0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,0

2 mM EDTA

1% BSA

7% SDS

### **2.2.10 Dot Blot Analyse**

Um die Spezifität aller erzeugten HvGER-Sonden zu prüfen, wurde in einem Ansatz die gereinigten DNA-Fragmente der 6 HvGER Unterfamilienrepräsentanten (s. 2.2.9) und in einem zweiten Ansatz die gereinigten DNA-Fragmente der 4 Repräsentanten der HvGER4 Unterfamilie jeweils auf eine Menge von 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng und 0.001 ng verdünnt. Das Endvolumen je Probe betrug 5 µl. Dazu wurden 5µl einer Lösung bestehend aus 0,5M NaOH und 2,5M NaCL pipettiert, um die DNA zu denaturieren. Alle Ansätze (10 µl) wurden anschließend nacheinander auf eine Nylonmembran aufgetragen und vollständig über Nacht getrocknet. Danach wurde die DNA unter UV-Licht an die Membran gebunden. Das Hybridisieren, Waschen und Exponieren der Membranen erfolgte wie oben beschrieben.

### **2.2.11 Das Herstellen von RNAi-Konstrukten gerichtet gegen Repräsentanten der HvGER Unterfamilien**

Unter Verwendung des Gateway™ Rekombinationssystems (Invitrogen) wurde eine Methode zur Erzeugung von RNAi-Konstrukten im Hochdurchsatzverfahren am IPK etabliert (Douchkov et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vorstufe dieser Methode verwendet und ist hier vollständig beschrieben. Für die Klonierungsschritte wurden die Vektoren pIPKTA33 und pIPKTA30N verwendet (Douchkov et al., 2005).

#### **(A) Amplifizierung von *blund end* PCR-Produkten:**

Für die HvGER Gene, die im pIPKTA9 Vektor vorlagen (s. 2.2.8), wurde aus dem 5' Bereich *sense* und *antisense* Primer (s. 2.1.5) abgeleitet. Die PCR-Amplifikation wurde in

einem Volumen von 20 µl mit den folgenden Komponenten durchgeführt: 100 ng Plasmid-DNA, je 1 µM beider Primerpaare, 0,4 µl 50x dNTP, 2 µl ThermalAce® Puffer, 0,8 U ThermalAce® DNA Polymerase (Invitrogen). Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt: 0,5 min 95°C, 0,5 min 52°C, 1 min 74°C. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion für 10 min, bei 74°C beendet. Die ca. 500 bp großen Amplifikationsprodukte wurden nach Anleitung des PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und im Agarosegel auf ihre Größe überprüft.

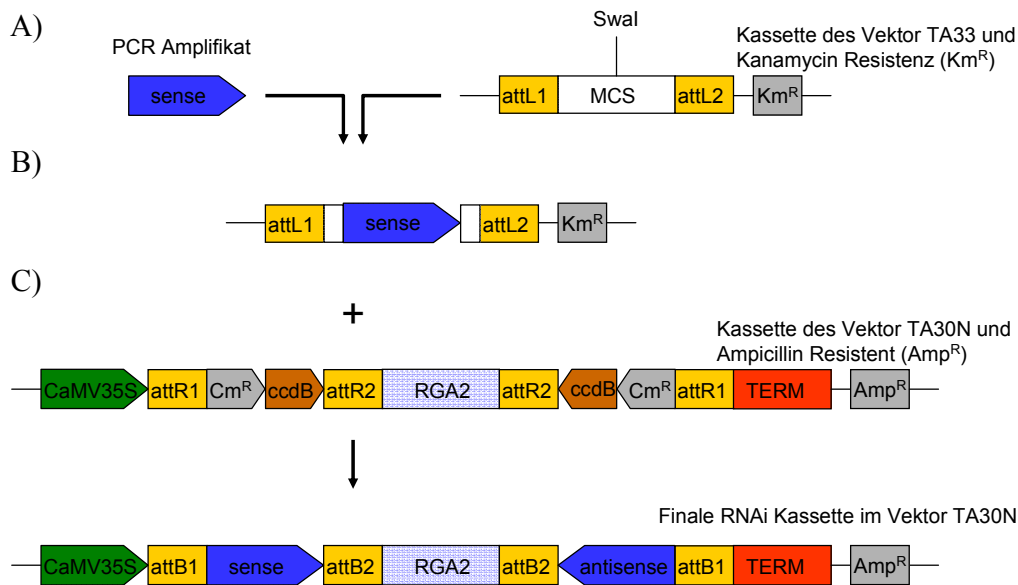
### **(B) Ligation in den *Entry Vector* pIPKTA33:**

In einem ersten Klonierungsschritt wurden die *blunt end* PCR-Produkte in die *Swa*I-Seite des Vektors pIPKTA33 ligiert (Abb. 2.1 A und B) Dabei wurde der *Swa*I-Verdau des Vektors und die Ligation des PCR-Amplifikates kombiniert und in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wie folgt: 150 ng Vektor pIPKTA33, 4µl PCR-Produkt, 1 µl T4 DNA Ligase Puffer (10x), 1 µl PEG 400, 1 µl NaCl (0,05M), 2,5 U T4 DNA Ligase (Fermentas), 5U *Swa*I (Fermentas) und auf 10µl Endvolumen eingestellt. Durch diese Kombination sollte eine Religation des Vektors vermieden und die Insertionsraten der DNA-Fragmente in den Vektor erhöht werden. Dieser Ligationsansatz wurde für 1h bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10min beendet. Um die religierten, leeren pIPKTA33 Vektoren aus diesem Ansatz zu eliminieren wurden anschließend 10U *Swa*I und 0,6 µl NaCl (0,1M) hinzugegeben und für 30min bei 25°C inkubiert. Von diesem Ligationsansatzes wurden 5 µl zu 50 µl chemisch kompetenten *E. coli* DH10B gegeben und unter Hitzeschock transformiert. Die frisch transformierten Zellen wurden in 800 µl SOC Medium inkubiert und auf LB Agar, welcher den selektiven Marker (Km<sup>R</sup>) enthielt ausplattiert.

Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C wurden einzelne Kolonien entnommen und in je 1,2 ml LB Medium einer „96-well“-Platte (*Deep Well Plate*, Heinemann Labortechnik, GmbH) übertragen. Die Anzucht der Klone erfolgte unter Verwendung des jeweiligen selektiven Markers, bei 37°C während 14 h, bei 1050 rpm (Plattenschüttler, Heidolph Titramax 1000, München, Dt.), unter einer luftdurchlässigen Folie. Die Platten wurden für 10 min bei 750 g zentrifugiert und die Pellets für die Plasmid-DNA Isolation verwendet. Die DNA Minipräparation erfolgte nach Anleitung des Nucleospin® Robot 96 Plasmid Kit, (Machery-Nagel), im 96er Plattenformat. Die DNA wurde zur Kontrolle mit dem Restriktionsenzym *Apa*I (Fermentas) gespalten und nach Auftrennung im Agarosegel konnten die positiven pIPKTA33 Klone (welche das PCR-Amplifikat enthalten) selektiert



werden. Die Plasmide der positiven pIPKTA33 Klone standen als Donorvektoren in der sich anschließenden LR Reaktion zur Verfügung.



**Abb. 2.1** Klonierungsstrategie für das Erzeugen von RNAi-Konstrukte

**A)** Amplifizierung von „*blund end*“ PCR Produkten **B)** Restriktionsverdau des pIPKTA33 Vektors und synchrone Ligation des PCR-Amplifikates in den Swal geschnittenen Vektor **C)** Rekombination (LR Reaktion) zwischen den attL und attR Rekombinationsstellen führt zum Austausch des *ccdB*-Gens mit dem PCR-Amplifikat. Als Ergebnis der LR Reaktion wird die Integrationsstelle als attB bezeichnet. Nur Plasmide ohne das *ccdB* Killergen und mit Ampicillinresistenz führen zu Kolonien. Terminologie in Anlehnung an das Gateway™ Klonierungssystem (Invitrogen) **attL1,2**, **attR1,2**, **attB1,2** Erkennungssequenzen für die Rekombination, **ccdB** Gen kodiert für bakterielle DNA-Gyrase (Killergen), **Cm<sup>R</sup>** Chloramphenicolresistenz, **RGA2** zweites Intron des *RGA2* Weizengens, **MCS** multiple Klonierungsstelle, **CaMV35S**, **TERM** Promotor und Terminator des Blumenkohlmosaikvirus

### (C) LR Reaktion:

In der LR Reaktion des Gateway™ Rekombinationssystems (Invitrogen) (Abb. 2.1 C) wurden durch Rekombination das attL-flankierte HvGER-Gen im pIPKTA33 Vektor (Donor) mit dem attR-flankierten *ccdB*-Gen im pIPKTA30N Vektor (Akzeptor) ausgetauscht. Für die LR Reaktion wurden 150 ng Plasmid-DNA pIPKTA30N, 150 ng Plasmid-DNA pIPKTA33, 1 µl (5x) LR Reaktionspuffer (LR Clonase™ Reaction buffer), 1 µl Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogene™) angesetzt und auf ein Reaktionsvolumen von 5 µl eingestellt. Die LR Reaktion wurde bei 22°C, für 6h inkubiert. Für die Transformation in *E. coli* DH10B wurde der gesamte LR Ansatz verwendet. Nach Ausplattieren auf die, den selektiven Marker (Amp<sup>R</sup>) enthaltenen Platten und der Inkubation (37°C, über Nacht) konnten Kolonien selektiert und für die DNA Minipräparation (Machery-Nagel) angezogen werden. Die so erzeugten RNAi-Konstrukte

wurden zur Kontrolle mit dem Restriktionsenzym XhoI (Fermentas) gespalten und die Fragmentgröße im Agarosegel überprüft. Von den positiven RNAi-Konstrukten wurden beide in *sense* und *antisense* liegende HvGER-Fragmente auf ihre Vollständigkeit sequenziert.

### **2.2.12 Biolistischer Gentransfer in die Epidermiszellen von Gerste und Weizen**

#### **Präparation der Mikroprojekteile:**

Für die Transformation der DNA in die Epidermis wurden als Trägermaterial Goldpartikel (Durchmesser 1  $\mu\text{m}$ , BioRad) verwendet. Je 27,5 mg Goldpartikel abgewogen, mit 500  $\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt, für 20 sec im Ultraschallbad gelöst und für 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Danach wurden die Goldpartikel in 500  $\mu\text{l}$  96% Ethanol aufgenommen und für 20 sec im Ultraschallbad gelöst und bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgehoben. Die Partikel wurden bei 50°C für 5-10 min getrocknet, in 1 ml 50% sterilem Glycerol aufgenommen und im Ultraschallbad für 20 sec durchmischt. Die Lagerung der Goldpartikel erfolgte bei -20°C.

#### **Vorbereitung des Pflanzenmaterials:**

Das Pflanzenmaterial (Gerste und Weizen) wurde in der Klimakammer und im Gewächshaus (s. 2.2.1) kultiviert. Für den biolistischen Gentransfer wurden 7 Tage alte Primärblätter (Länge ca. 7 cm) auf 0,5% Phytoagar (Duchefa), versetzt mit 0,17 mM Benzimidazol (Fluka), in Petrischalen gelegt. Die Anordnung der Blätter erfolgte parallel und mit der adaxialen Seite nach oben. Die Schichtdicke des Phytoagars in den Petrischalen betrug ca. 0,5 cm. Zur Befestigung der Primärblätter wurden Magnetührstäbe auf die Blattenden so gelegt, dass sie einander abstoßen und die Blätter auf den Agar drücken.

#### **Bindung der DNA an die Goldpartikel und Gentransfer:**

Die Plasmid-DNA aller verwendeten Konstrukte wurde für den biolistischen Gentransfer ausschließlich nach der Anleitung des JETstar Kits (Genomed) präpariert und auf 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 1x TE Puffer eingestellt.

Pro Bombardement wurde die Plasmid-DNA wie folgt an die Goldpartikel gebunden: Es wurden pro Ansatz 7  $\mu\text{g}$  des Reportergens und 7  $\mu\text{g}$  des Testgens mit 87,5  $\mu\text{l}$

Goldpartikel (27,5 mg/ml, 50% Glycerol) durchmischt und mit 1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (pH 10) versetzt (Endkonzentration 0,5 M). Dieser Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und mehrmals vorsichtig durchmischt. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 15 sec), wurde das Sediment in 500  $\mu\text{l}$  96% Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, um das verbleibende Calciumnitrat zu entfernen. Danach wurde das Sediment in 30  $\mu\text{l}$  96% Ethanol aufgenommen und vor dem Auftragen auf die Makrocarrierscheiben im Ultraschallbad für ca. 10 sec. gelöst.

Die Zerreischeiben (900 psi, Bio-Rad) und die Makrocarrierscheiben (Bio-Rad) wurden in 96% Ethanol gewaschen und vollständig getrocknet. Pro Bombardement wurden 7 Makrocarrierscheiben (Hepta-Adaptor) verwendet. Je Makrocarrierscheibe wurden 4  $\mu\text{l}$  der plasmidbeschichteten Goldpartikel gleichmäßig aufgetragen und vollständig getrocknet. Für den biolistischen Gentransfer kam die Partikel-Kanone, Model PDS-1000/He, *Biolistic Particle Delivery System* (Bio-Rad) zum Einsatz.

Aufbau und Durchführung erfolgte folgendermaßen: Einlegung der Zerreischeibe in den Sprühkopf, dem folgten der Hepta-Adaptor mit den beschichteten Makrocarrierscheiben, dann das Stoppgitter (Bio-Rad) und zuletzt die zu transformierenden Blätter. Mittels Membranpumpe wurde ein Vakuum von 27 mm Hg in der Transformationskammer erzeugt und gleichzeitig ein Heliumberdruck von ca. 1000 kPa auf die Zerreischeibe angelegt. Bei einem Druck über 900 psi platzte die Zerreischeibe und die Makrocarrierscheiben wurden gegen das Stoppnetz gedrückt. Durch die wirkenden Trägheitskräfte wurden die plasmidbeschichteten Goldpartikel von den Makrocarrierscheiben in die Epidermis der Primärblätter befördert.

### **Inokulation der Blätter mit Mehltau**

Nach dem Bombardement erfolgte je nach Experiment eine Inkubation von 4 h oder 48 h bei 18-20°C und indirektem Tageslicht. In Abhängigkeit des Experiments erfolgte nach der Inkubation die Inokulationen der Blätter mit Bgh oder Bgt.

Dazu wurden die transformierten Blätter auf 1% Phytoagar mit 0,34 mM Benzimidazol in Corning® Platten (245 mm<sup>2</sup>, Corning Costar, USA) umgelegt. Die Blätter wurden gekennzeichnet und die Blattenden befestigt. Die Blätter eines Bombardements wurden dabei nicht hintereinander gelegt, sondern es wurde je ein Blatt aus allen Bombardements entnommen und dann in Reihenfolge angeordnet. Durch die resultierende Durchmischung von Einzelblättern aller Bombardements auf den Schalen konnten Artefakte einer ungleichmäßigen Inokulationsdichte zwischen den Bombardements

weitestgehend ausgeschlossen werden. Über die transformierten Blätter wurde ein Nylonnetz mit der Maschenweite von 100 µm (Lanz-Anliker Ag, Schweiz) gespannt, um Konidienaggregationen auf den Blättern zu vermeiden. Die Inokulation mit Mehltau erfolgte durch Abschütteln der Konidien von Spenderpflanzen. Anschließend wurden die Konidien unter dem Mikroskop ausgezählt. Die optimale Inokulationsdichte lag bei 150 bis 200 Konidien/mm<sup>2</sup>.

Die Inkubation der inokulierten Blätter erfolgte in, mit Lüftungslöchern versehenen, geschlossenen Schalen für 40 h in einem klimatisierten Raum (18-20°C) und indirektem Tageslicht (Nordfenster). Nach der Inkubation wurden die transformierten Blätter mit GUS-Färbelösung infiltriert.

### **GUS-Färbung, Chlorophyllentfärbung und Licht-Mikroskopie**

Der Mehltau wurde 40 h nach Inokulation mit feuchtem Zellstoff von den transformierten Blättern entfernt, um die mikroskopische Auswertung zu erleichtern. Danach wurden die Enden der Blätter abgeschnitten und in die GUS-Färbelösung überführt. Die Vakuuminfiltration erfolgte zwei- bis dreimal, bis die Blätter vollständig mit Lösung getränkt waren. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24 h und danach bei 4°C für 24 h. Nach Entfernen der GUS-Färbelösung wurden die Blätter in einer Entfärbelösung (7,5% w/v Trichloressigsäure, 50% v/v Methanol) für 5-8 min bei RT inkubiert. Nachdem das Chlorophyll in den Blättern zerstört war, wurden diese 2x mit destilliertem Wasser gewaschen und mit der adaxialen Seite nach oben auf den Objektträger gelegt.

Die Auswertung der Experimente erfolgte durch die Licht-Mikroskopie. In Abhängigkeit von den Experimenten wurde entweder im Auflicht-Hellfeld oder im Auflicht-Fluoreszenzlicht unter Verwendung des Durchlicht- und FL-Mikroskops (Axioplan 2, Carl Zeiss) mikroskopiert. Die photographische Dokumentation erfolgte mit der Digitalkamera (AxioCam, Carl Zeiss).

#### GUS-Färbelösung:

100 mM Na-Phosphatpuffer (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0,5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,4)

10 mM Na-EDTA

1,4 mM Kaliumhexacyonoferrat (II)

1,4 mM Kaliumhexacyonoferrat (III)

0,1% Triton X-100

20% Methanol

1 mg/ml X-Gluc

### 2.2.13 *Site Directed Mutagenesis*

Die gezielte Punktmutation einzelner HvGER Gene im pIPKTA9 Vektor erfolgte durch PCR-Amplifikation des gesamten Vektors unter Verwendung von Mutagenese-Primern (s.h. 2.1.6.). PCR und Klonierung wurden gemäß der Anleitung des Herstellers mit dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) realisiert. Bei der PCR wurden 50 ng Plasmid-DNA (*HvGER* im pIPKTA9 Vektor), 1 µl 50x dNTP-Gemisch, 125 ng Mutagenese-Primer vermischt und auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl eingestellt. Es wurden 2,5 U PfuTurbo DNA Polymerase dazugegeben und der Reaktionsansatz in die vorgeheizte PCR Apparatur (Biometra) überführt.

Für den Austausch einer einzelnen Aminosäure wurden 16 PCR-Zyklen durchgeführt. Nach der Denaturierung (95°C, 1 min) folgten 16 Zyklen von: Denaturierung (95°C, 30 sec), Primeranlagerung (55°C, 1 min), Primer Extension (68°C, 5 min). Danach wurde das PCR-Amplifikat auf Eis abgekühlt und mit 10 U des Restriktionsenzym DpnI (Stratagene) bei 37°C für 1h inkubiert. Von der DpnI-behandelten DNA wurde 1 µl zu 50 µl XL1-Blue superkompetenter Zellen (Stratagene) pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation durch Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 sec. Die transformierten Zellen wurden mit 800 µl SOC Medium versetzt, bei 37°C für 1 h schüttelnd (225 rpm) inkubiert und bei 3000 rpm pelletiert. Nach Rücklösung in 100 µl SOC Medium wurden sie auf 100 µg/ml ampicillin-haltigem LB Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde von den Platten die mutierten Klone abgenommen, angezogen und die Plasmid-DNA präpariert (Machery-Nagel) Die Klone wurden sequenziert, um die Mutation in der Nukleotidsequenz nachzuweisen.

### 2.2.14 **Klonierung der HvGER Expressionskassette in den binären Vektor pBINPLUS für die Pflanzentransformation**

Der gesamte Klonierungsprozess wurde in Anlehnung an Sambrook et al., 2001 durchgeführt. Durch Restriktionsverdau mit EcoRI (Fermentas) wurde die vollständige Expressionskassette (35S<sub>Prom</sub>-HvGER-35S<sub>Term</sub>) aus dem pIPKTA9-Vektor isoliert. Der Restriktionsverdau wurden in einem 1 % igem Agarosegel elektrophoretisch separiert und die DNA-Fragmente mit der Größe von ca. 1800 bp nach Anleitung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert.

Der binäre Vektor pBINPLUS (Engelen et al., 1995) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten, mit 1U Schrimps Phosphatase versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Aufgrund von zusätzlichen EcoRI Schnittstellen zwischen Promotor-

Gen und Gen- Terminator - Sequenz wurde für *HvGER4* (mutierte - und unmutierte Form) ein partieller EcoRI-Verdau durchgeführt (wie beschrieben unter 2.2.8), um die vollständige Expressionskassette zu isolieren.

Die DNA Ligation erfolgte mit T4 DNA Ligase (Stratagene) nach Beschreibung des Herstellers. Zehn Mikroliter des Ligationsgemisches wurden in 50  $\mu\text{l}$  superkompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers transformiert. Die transformierten *E. coli* Zellen wurden auf 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin-haltigem LB Medium angezogen. Die durch Blau-Weiß-Selektion sichtbar gemachten transformierten Klone wurden für weitere Untersuchungen vermehrt.

### **2.2.15 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* Zellen**

Die Transformation von *Agrobacterium* erfolgte nach der Einfrier-Auftau-Methode (An et al., 1988). Ein Mikrogramm Plasmid-DNA wurden mit 100  $\mu\text{l}$  kompetenter *A. tumefaciens* Zellen für 5 min auf Eis inkubiert, für 5 min in flüssigem Stickstoff gefroren und für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml YEB Medium bei 28°C für 2-4 h leicht schüttelnd inkubiert, damit das Resistenzgen exprimiert werden konnte.

Diese Bakterienkultur wurde anschließend zentrifugiert (15 min, 3000 g), die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  YEB Medium resuspendiert und auf die mit den selektiven Markern (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Rifampicin, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Carbenicillin) behandelten YEB Platten verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 28°C für 2 Tage bis sichtbare Kolonien für eine weitere Vermehrung zur Verfügung standen. Einzelne Kolonien wurden selektiert und für die DNA-Plasmid-Minipäparation (Machery-Nagel) angezogen. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, um das Vorhandensein der korrekten Konstrukte zu überprüfen.

### **2.2.16 Transformation von *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia) wurde für 6 Wochen unter Langtagbedingungen bei 16 h Licht (ca. 1000 Lux), 8 h Dunkelheit, bei 20°C in der Klimakammer kultiviert. Die blühenden Pflanzen wurden, nach Entfernung der bereits gebildeten Schoten, transformiert (Bechthold et al., 1993).

Zehn Milliliter YEB Medium versetzt mit 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Rifampicin, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Carbenicillin wurden mit den transformierten *Agrobacterium tumefaciens* -Klonen inokuliert und bei 28°C schüttelnd über Nacht inkubiert. Von der

Übernachtskultur wurden 2 ml in 250 ml YEB Medium übertragen und bis zu einer  $OD_{600} > 2$  inkubiert. Die Bakterien wurden bei 3000 g für 20 min pelletiert und in 1 Liter Infektionsmedium resuspendiert ( $OD_{600}$ : 0,8).

Ca. 25 Pflanzen pro Transformationsansatz wurden mit den Blütenköpfen in das Infektionsmedium eingetaucht und ein paar Mal geschwenkt. Die Pflanzen wurden liegend auf feuchtem Filterpapier in abgedeckten Schalen für 24 h ruhen gelassen. Nach Regeneration wurden die Pflanzen für 6 Wochen bei 20°C (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) kultiviert und dann bis zur Samenreife für ca. 2 Wochen im Gewächshaus gehalten, danach Ernte der Samen und Lagerung bei 4°C.

### **2.2.17 Oberflächensterilisation der Samen und Anzucht der transgenen *A. thaliana* Keimlinge**

Die Oberflächensterilisation erfolgte für 3 min in 70% igem Ethanol und danach für 10 min in einer Lösung bestehend aus 5% Natriumhypochlorid und 2,5% Triton X100. Nach sieben aufeinander folgenden Wasch- und Zentrifugationsschritten mit sterilem Wasser, wurden die Samen auf einem mit 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin versetzten MS Vollmedium in Corning® Platten (150 mm x 25 mm) übertragen. Nach zweiwöchiger Inkubation im Klimaschrank wurden die überlebenden Kanamycin-resistenten Keimlinge selektiert und auf Erde vereinzelt, um transgene Pflanzen etablieren zu können. Die Kultivierung erfolgte in der Klimakammer bei 20°C (16h Licht/ 8h Dunkelheit).

#### Infektionsmedium (pH 5,7-6,0):

2,65 g l<sup>-1</sup> MS Salze (Murashige and Skoog, 1962)  
5,00 g l<sup>-1</sup> Saccharose  
10 ml l<sup>-1</sup> Vitaminlösung  
0,04% Silwet L-77

#### Vitaminlösung (100 ml):

10mg Thiamin-HCL  
5 mg Nicitinsäure  
5g Morpholinoethansulphonsäure  
1g Inosit  
(steril filtriert, Lagerung: -20°C)

#### MS Vollmedium (pH 5,8):

4,6 g l<sup>-1</sup> MS-Salze  
10 g l<sup>-1</sup> Saccharose  
10 ml l<sup>-1</sup> Vitaminlösung

### 2.2.18 Isolierung säurelöslicher Proteine aus der Zellwand von *A. thaliana*

Nach zweiwöchiger Kultivierung der transgenen Pflanzen auf Erde wurde das Blattmaterial für die Proteinisolation geerntet. Die Proteinisolation erfolgte nach der Methode von Schweizer et al., 1997. Das Blattmaterial wurde in einer Lösung bestehend aus 84 mM Zitronensäure und 32 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> (pH 2,8) homogenisiert. Die Homogenisierung wurde in einem Verhältnis von 100 mg Frischgewicht zu 1 ml Lösung durchgeführt. Eine Spatelspitze PVPP (Merck) wurden zu ca. 1,5 ml Extraktionsgemisch gegeben, durchmischt und bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand mit den säurelöslichen Proteinen wurde gesammelt und durch wiederholte Zentrifugation vom PVPP-Granulat gereinigt. In 1 ml Überstand wurden 0,5 g festes Ammoniumsulfat gelöst, um die säurelöslichen Proteine zu fällen. Diese wurden 15 min bei 13000 rpm pelletiert. Das Proteinpellet wurde in einem Puffer bestehend aus Tris-HCl pH 7,5 und 20 % Glycerin gelöst. Die Konzentrationbestimmung von Proteinen erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976).

### 2.2.19 Die Westernblotanalyse

Es wurden 5µg Protein pro Spur auf ein 12 % iges SDS-Polyacrylamidgel nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) separiert und nach der Methode von Borisjuk (Borisjuk et al., 1998) elektrophoresisch auf eine Nitrozellulosemembran (BioRad) transferiert. Nach dem Elektrotransfer wurden die Membranen in PBS gewaschen und über Nacht in Blockierungslösung (Roth) in der Verdünnung 1:10 inkubiert. Die Membran wurde anschließend für 2 h bei RT mit dem primären Antikörper (in Blockierungslösung, 1:10) inkubiert, mit Ausnahme des primären Antikörpers anti-HvGER4. Für diesen erfolgte die Inkubation bei 4°C für 16 h. Danach wurden die Membranen dreimal für 5 min in PBST gewaschen und einmal für 10 min in PBS. Die Membranen wurden für 2 h mit dem sekundären Antikörper (in Blockierungslösung, 1:10) konjugiert mit alkalischer Phosphatase (SIGMA) inkubiert, und anschließend wie oben erwähnt gewaschen. Das Anfärben der Membran zum Sichtbarmachen von Banden erfolgte durch das BCIP/NBT-Gemisch (SIGMA) nach Anleitung des Herstellers.

#### PBS (pH 7,4 mit HCl):

8 g l<sup>-1</sup> NaCl

0,2 g l<sup>-1</sup> KaCl

1,45 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>



0,24 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBST:

wie PBS + 0,1% Tween20

### 2.2.20 Oxalatoxidase-Nachweis in transformierten Gerstenblättern

Die Konstrukte im Überexpressionsvektor pIPKTA9 wurden durch Partikelbombardement in die Epidermis von Gerstenblättern überführt. Vierundzwanzig Stunden nach Beschuß erfolgte die Infiltration der Blätter mit dem Oxalatoxidase-Puffer. Für die Infiltration wurden 50 µg Peroxidase je 1 ml Oxalatoxidase-Puffer frisch zugegeben. Nachdem die Blätter vollständig infiltriert waren, wurden sie bei 37°C für 24 h und danach für 12 h bei 4°C inkubiert

Oxalatoxidase-Puffer:

3,5 mM (Na-freies) EDTA, (pH 8,0 mit Tris Base)  
2,5 mM Oxalat  
0,6 mg/ml 4-Chloro-1-Naphthol (in Ethanol gelöst)  
20 % Ethanol

} pH 4,0 mit HCl eingestellt

### 2.2.21 Nachweis von Superoxiddismutase (SOD) im nativem Gel

Der Nachweis von Superoxiddismutase im Gel erfolgte in Anlehnung nach Beauchamp and Fridovich, (1971). Die Herstellung der nativen Gele (5% Sammelgel, 13% Trenngel) und die elektrophoretische Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte nach der Methode von van Camp et al., (1994). Nach der Separation der Proteine wurden die Gele in eine SOD-Färbelösung für mindestens 30 min im Dunkeln inkubiert und anschließend auf die Lichtbank gelegt bis sich eine Farbreaktion zeigte. Danach wurden die Gele mit Wasser gespült und für die Dokumentation eingescannt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der *software* Adobe Photoshop 6.0.

SOD-Färbelösung:

50 mM Kaliumphosphatpuffer  
0,1 mM EDTA, pH 8,0  
0,2 % TEMED  
1/10 Volumen Riboflavinlösung (1mg/10ml H<sub>2</sub>O)  
1mg/ml NBT

### 3. Ergebnisse

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Charakterisierung aller Unterfamilien der HvGER-Multigenfamilie. Um einen Überblick über Regulationstrends und abwehrverwandte Funktionen der einzelnen HvGER Unterfamilien zu erhalten, wurde jeweils nur ein Gen als Repräsentant pro Unterfamilie untersucht, mit Ausnahme der HvGER4 Unterfamilie. Die Gene, die zu einer Unterfamilie gehören, sind zueinander sehr ähnlich (90%-95% Sequenzidentität auf Aminosäureebene s. Abschnitt 3.1.4) und wahrscheinlich funktionell redundant. Diese hohe Sequenzidentität führt in Standard-Northernblotanalysen zu Kreuzhybridisierungen. Aufgrund dessen war die Auswahl von je einem Gen pro Unterfamilie zur Untersuchung von Regulationstrends und abwehrverwandten Funktionen gerechtfertigt.

#### 3.1 Identifizierung von Genen der HvGER Multigenfamilie

Zunächst werden alle diejenigen Gene (kodierend für HvGER Proteine) beschrieben, deren Sequenzdaten zum Beginn der Arbeit öffentlich verfügbar waren, darauf folgen weitere HvGER und GLP Sequenzen (s. Abschnitt 3.1.4 und 3.1.5), die später aus Datenbanken identifiziert wurden. Diese Sequenzen beschreiben die Komplexität ihrer Multigenfamilie, sowie ihre evolutionäre Entwicklung (s. Abb. 3.3 und Abschnitt 3.1.6).

##### 3.1.1 Suche nach beinahe-voll-Längen-cDNA Klonen kodierend für HvGER Proteine in einer EST-Datenbank

Die CR-EST-Datenbank (CR = *Crop*, EST = *Expressed Sequence Tag*) des Leibniz-Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK; <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/databases.php>) beinhaltete zum Zeitpunkt der Untersuchung (Februar, 2002) 41'600 ESTs. Innerhalb der CR-EST Datenbank liegen neben den EST Sequenzen auch die dazugehörigen BlastX (*basic local alignment search tool*, Altschul et al., 1990) Ergebnisse vor. In den BlastX Resultaten wurden über Stichwortsuche alle die ESTs selektiert, die Sequenzähnlichkeit zu „Germin“ und „GLP“ mit einem E-Wert kleiner als  $1 \cdot 10^{-10}$  aufwiesen. Druka et al., (2002) haben gezeigt, dass die HvGER Multigenfamilie sich in 5 Unterfamilien (HvGER1 bis HvGER5) mit einem oder mehreren Genvertretern aufgliedert. Anhand dieser Veröffentlichung wurde stellvertretend für jede Unterfamilie die Sequenz eines Prototypen (Druka et al., 2002) ausgewählt und mit den Gersten EST-

Sequenzen einem multiplen *Alignment* (*Software DNA Star* und *Megalign*) unterzogen. Dabei ordneten sich die EST-Sequenzen in Gruppen mit den entsprechenden Prototypen. Dies ermöglichte die Zuordnung und die Benennung (in Anlehnung an die Nomenklatur von Druka) der EST-Gruppen in die Unterfamilien HvGER1, HvGER2, HvGER3, HvGER4 und HvGER5. Ein EST ordnete sich aufgrund zu geringer Sequenzhomologie zu keiner der anderen 5 bekannten Unterfamilien ein und wurde daher als Begründer einer neuen Unterfamilie, HvGER6, betrachtet. Um die Unterfamilien in ihrer Funktion näher beschreiben zu können, wurde jeweils ein EST aus den Gruppen HvGER1-HvGER6 ausgewählt, der einem beinahe-voll-Längen-cDNA Klon entspricht (Tab. 3.1) und der den vollständig kodierenden Bereich der mRNA einschließlich des Startcodons umfasst. Für die Unterfamilie HvGER3 wurden keine beinahe-voll-Längen-cDNA Klone und für die Unterfamilie HvGER6 wurde nur ein einziger, nicht vollständiger EST (HK04D11) identifiziert. Daher wurden die Gene für die Unterfamilien HvGER3 und HvGER6 aus genomischer DNA durch PCR amplifiziert (s. 3.1.2).

**Tab. 3.1:** Identifizierung von HvGER Genen für jede Unterfamilie. <sup>a</sup>Druka et al., 2002. <sup>b</sup>Anzahl der TC (EST) des TIGR Genindex der Gerste, welche mögliche Mitglieder je Unterfamilie repräsentieren. <sup>c</sup>TC-Identifikator des TIGR Genindex der Gerste, entspricht den für die vorliegende Arbeit ausgewählten Genen. <sup>d,e</sup>ungespleißte genomische DNA.

<sup>a</sup> Unterfamilie	ausgewähltes Gen	<sup>b</sup> Komplexität Unterfamilie	cDNA Klon/genomische DNA	Sorte	Länge der DNA	Länge des kodierenden Bereiches bp	aa	Accession Nummer	<sup>c</sup> TIGR TC
HvGER1	<i>HvGER1a</i>	5	HW09M16	Barke	990	675	225	DQ647619	140112
HvGER2	<i>HvGER2a</i>	2	HK03D12	Barke	809	639	213	DQ647620	146914
HvGER3	<i>HvGER3a</i>	2	genomische DNA	Steffi	<sup>d</sup> 1025	681	227	DQ647621	131410
HvGER4	<i>HvGER4c</i>	8	HO01J19	Ingrid	913	690	230	DQ647622	139504
HvGER5	<i>HvGER5a</i>	2	HW05P16	Barke	834	651	217	DQ647624	147527
HvGER6	<i>HvGER6a</i>	1	genomische DNA	Steffi	<sup>e</sup> 1580	657	219	DQ647625	141367

Der EST Klon HW09M16 ist ein beinahe-voll-Längen-Repräsentant der Unterfamilie HvGER1, und das entsprechende Gen wird in der vorliegenden Arbeit als *HvGER1a* bezeichnet. Genauso werden die Gene zu den EST Klonen HK03D12 als *HvGER2a*, HO01J19 als *HvGER4c* und HW05P16 als *HvGER5a* bezeichnet. Nach

Identifizierung dieser HvGER Gene wurden die dazugehörigen EST-Klone aus der EST-Kollektion selektiert und der cDNA-Bereich vollständig durchsequenziert. Die cDNA Sequenzen dieser HvGER Gene werden im Anhang 8.2 gezeigt.

### 3.1.2 Identifizierung der Genvertreter aus den Unterfamilien HvGER3 und HvGER6

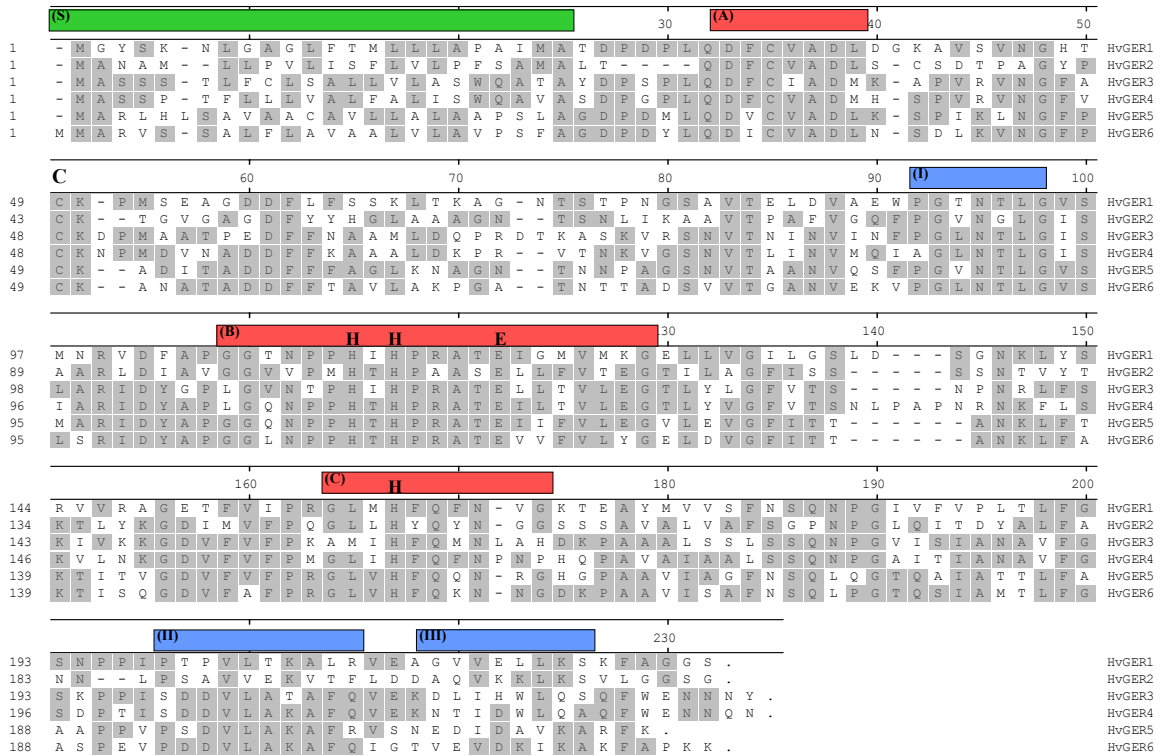
Für die Subfamilie HvGER3 wurde das Mitglied *GerF* (Wu et al., 2000) gewählt, dessen Nukleotidsequenz unter der *Accession* Nummer AF250935 in der Datenbank „GenBank“ vorliegt. Mit zwei außen liegenden Oligonukleotid-Primern (Ger3Fnest1u, Ger3Fnest1r) wurde mittels PCR ein DNA-Fragment aus genomischer Gersten-DNA (Sorte: Steffi) amplifiziert, das als Vorlage für eine weitere „*nested*“ PCR-Reaktion diente. Diese PCR mit den weiter innen liegenden Oligonukleotid-Primern (Ger3Fnest2u, Ger3Fnest2r) führte zur Amplifikation eines ca. 1025 bp großen DNA-Fragments. Dieses *GerF* – Fragment wurde anschließend in den pCRIITOPPO Vektor (Invitrogen™) zwischenligiert, und wird in der vorliegenden Arbeit als *HvGER3a* bezeichnet. *HvGER3a* ist ungespleißt und enthält ein Intron mit einer Länge von 233bp. Die Sequenz ist im Anhang 8.2 dargestellt.

Für den EST-Klon HK04D11 der neu gegründeten HvGER6 Subfamilie wurde zunächst die Suche nach ähnlichen Sequenzen in der Datenbank „GenBank“ durch Blast N mit Hilfe des EMBNET-Servers (<http://www.ch.embnet.org/software/>) realisiert. Das Blast N Ergebnis zeigte die höchste Sequenzhomologie (E-Wert  $1 \cdot 10^{-107}$ ) zu der Nukleotidsequenz mit der *Accession* Nummer BF25398 (GenBank). Aufgrund von fehlender Sequenzinformation im 5' Bereich des EST Klons HK04D11 wurden die Oligonukleotid-Primer (Ger6nest1r und Ger6nest2r) aus dem 3' Bereich von HK04D11 und die Primer (Ger6nest1u und Ger6nest2u) aus dem 5' Bereich des Klons BF25398 abgeleitet. Die PCR-Amplifikation erfolgte aus genomischer Gersten DNA (Sorte: Steffi) zunächst mit den außen liegenden Primern 1u und 1r. Das Amplifikationsprodukt diente danach als Vorlage für eine zweite „*nested*“ PCR-Reaktion mit den innen liegenden Primern (2u, 2r). Aus dieser PCR-Reaktion wurde ein ca. 1580 bp großes DNA-Fragment amplifiziert und anschließend in den pCRIITOPPO Vektor (Invitrogen™) kloniert und sequenziert. *HvGER6a* ist ungespleißt und enthält ein Intron mit einer Länge von 953 bp. Die vollständig durchsequenzierte Sequenz wird im Anhang 8.2 gezeigt.

### 3.1.3 Sequenzalignment der 6 HvGER Unterfamilienvertreter

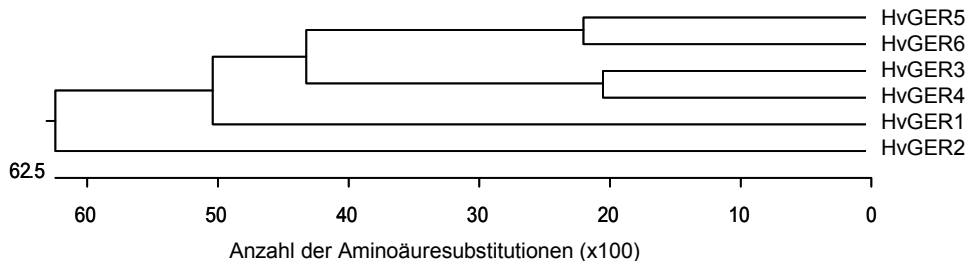
Ein multiples *Alignment* der Aminosäuresequenzen der 6 HvGER-Unterfamilienvertreter wurde mit Clustal W (Lasergene Version 6.0, DNASTAR Inc) erstellt (s.h. Abb. 3.1). Die aus der Clustal W Analyse berechneten Sequenzidentitäten der Unterfamilienvertäter betragen zueinander nur ca. 30% – 65%. Damit unterscheiden sich die Unterfamilien deutlich von einander.

Anhand des *Alignments* der 6 HvGER Aminosäuresequenzen wurde untersucht, wo Bereiche niedriger respektive hoher Sequenzidentität zu finden sind. In Übereinstimmung mit Vorhersagen von Bernier and Berna (2001) konnten hoch konservierte Domänen identifiziert werden. Diese sind durch die roten Boxen A, B und C gekennzeichnet. Innerhalb der Box B kann in Anlehnung an Lane, (2000) die sogenannte „Germin-Box“ mit zwei konservierten Histidinresten (H) und einem Glutamatrest (E) identifiziert werden, welche nebst einem dritten Histidinrest an der Bindung von  $Mn^{++}$  beteiligt sind (s.h. Einleitung). Der erste dieser Histidinreste (*upstream*) wurde in meiner Arbeit durch gezielte („*site directed*“) Mutagenese gegen einen Serinrest ausgetauscht (s. Abschnitt 2.2.13). Der dritte konservierte Histidinrest konnte innerhalb der Box C bestätigt werden. Neben den konservierten Bereichen ist die Sequenz der verbleibenden Oligopeptide mäßig konserviert (Bernier and Berna, 2001). Auf ihnen konnten z.B in Anlehnung an Gane et al., (2001) drei  $\alpha$ -Helices bestimmt werden (blaue Boxen). In Anlehnung an Zhou et al. (1997), konnte als weitere strukturelle Eigenschaft für HvGER Proteine je ein Signalpeptid identifiziert werden, was durch die grüne Box dargestellt wird. Zusätzlich werden für HvGER Proteine zwei konservierte Cysteinreste (C), welche eine interne Disulfidbrücke ausbilden, gezeigt (Bernier et al., 2001).



**Abb. 3.1** Strukturelle Organisation der HvGER Proteine anhand des Sequenzalignment der Repräsentanten aus den HvGER Unterfamilien. Grüne Box (S) = Signalpeptid, Rote Boxen (A, B, C) = hoch konservierte Oligopeptide, (B) beinhaltet die „Germin-Box“, Blaue Boxen (I, II, III) =  $\alpha$ -Helices, C = Cysteinrest, H = Histidinrest, E = Glutamatrest.

Die Verwandtschaftsbeziehungen der HvGER Unterfamilienvertreter zueinander ist in Abb. 3.2 dargestellt. So zeigen die Unterfamilien HvGER5 und HvGER6 eine engere Gruppierung genauso wie die Unterfamilien HvGER3 und HvGER4. HvGER1 und HvGER2 stehen dagegen verwandtschaftlich weiter entfernt von den anderen HvGER Unterfamilien.



**Abb. 3.2** Dendrogramm zeigt die Verwandtschaftsanalyse zwischen den HvGER Unterfamilien. Die phylogenetische Analyse der Proteinsequenz je eines Repräsentanten der HvGER Unterfamilien basiert auf Clustal W Analyse unter Verwendung der *neighbour-joining* Methode (Lasergene Version 6.0, DNASTAR Inc).

### 3.1.4 Identifizierung von 4 paralogen Genen aus der HvGER4 Unterfamilie

In meiner Arbeit wurden die Regulationstrends und abwehrverwandte Funktionen der HvGER Unterfamilien untersucht. Mit Ausnahme von HvGER4 wurden dabei die Untersuchungen nicht auf die einzelnen Genmitglieder erweitert. Für ein orthologes Weizengen der Subfamilie GER4 wurde gezeigt, dass es maßgeblich zur Pathogenabwehr des Weizens gegen *B. graminis* beiträgt (Schweizer et al., 1999a). Für nachfolgende funktionelle Analysen interessierte daher, ob weitere Mitglieder dieser Unterfamilie an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Die HvGER4-Subfamilie repräsentiert ein *Cluster* von mindestens neun duplizierten Genen und ist die wahrscheinlich umfangreichste HvGER Unterfamilie (Wei et al., 1998; Druka et al., 2002). Um möglichst viele Mitglieder zu erhalten, wurde eine *Cluster*-Analyse mit Sequenzen der CR-EST-Datenbank durchgeführt.

Aus den schnell wachsenden Datenbeständen der CR-EST Datenbank am IPK Gatersleben wurde auf der Basis von 134'903 ESTs eine *Cluster*-Analyse mit Hilfe der Software StackPACK™ v.2.1 (Miller et al., 1999) von der Arbeitsgruppe „Bioinformatik“ am IPK durchgeführt. Als Ergebnis einer *Cluster*-Analyse ordnen sich ähnliche EST-Sequenzen zu Gruppen an, die als *Cluster* (**cl**) bezeichnet und als Gen(sub)familien definiert werden können. Die *Cluster* bestehen wiederum aus Gruppen, welche als *Contigs* (**ct**) bezeichnet und den einzelnen Genen einer (Sub)Familie entsprechen. Die *Contigs*, welche sich aus einzelnen oder mehreren EST-Sequenzen zusammensetzen, haben ein oder mehrere *Consensus*-Sequenzen (**cn**), um alternative Expressionsformen (z.B. Spleißvarianten) zu repräsentieren. Die Analyse mit den 134'903 ESTs führte zu insgesamt 12'263 *Clustern*, 14'469 *Contigs*, 16'903 *Consensi*, wobei das Interesse dem *Cluster* mit der Nummer 10'231 galt, welcher der HvGER4 Unterfamilie entspricht. Dieser *Cluster* besteht insgesamt aus 5 *Contigs*. Diese *Contigs* entsprechen den Genen der Unterfamilie HvGER4 und werden daher als *HvGER4a*, *HvGER4b*, *HvGER4c* und *HvGER4d* bezeichnet. Der 5. *Contig* entsprach hingegen einer ungespleißten Form von *HvGER4d* und wurde nicht weiter bearbeitet. Tab. 3.2 stellt zusammenfassend das Ergebnis der *Cluster*-Analyse unter Verwendung von StackPack dar.

Wie in der Tabelle gezeigt wird, wurde für jedes Gen (*Contig*) stellvertretend ein beinahe-voll-Längen EST Repräsentant ausgesucht. Dieser wies den vollständig kodierenden Bereich der cDNA auf. Die ESTs welche die Gene von HvGER4 repräsentieren, werden fortan als *HvGER4 a*, *b*, *c* und *d* bezeichnet. Die EST Klone wurden

aus der EST-Sammlung selektiert und die cDNA Inserts vollständig sequenziert (s. Anhang 8.2).

**Tab. 3.2:** Identifizierung von vier *Contigs* (Genen) der HvGER4 Unterfamilie mittels *Cluster*-Analyse von 134'903 Gersten ESTs. (\*)Zuordnung nicht möglich, aufgrund partieller cDNA Sequenzen der TCs, (x) Eintrag in GenBank erfolgt noch, (n.b.) nicht bearbeitet.

<i>Consensus ID</i>	Genbezeichnung des <i>Contigs</i>	Anzahl an ESTs je <i>Contig</i>	EST Repräsentant	Länge des kodierenden Bereiches		<i>Accession Nummer</i>	<i>TIGR TC</i>
				bp	aa		
cl 10231 ct 12368 cn 14689	HvGER4a	2	HO03H22	690	230	x	139505
cl 10231 ct 12369 cn 14690	HvGER4b	3	HO11H17	690	230	x	*
cl 10231 ct 12370 cn 14691	HvGER4c	17	HO01J19	690	230	DQ647622	139504
cl 10231 ct 12371 cn 14692	HvGER4d	20	HO08H12	690	230	DQ647623	147149
cl 10231 ct 12367 cn 14688 (ungespleißt)	HvGER4d	2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Das hohe Maß an Sequenzidentität zwischen Genen einer HvGER Subfamilie wird am Beispiel von HvGER4 gezeigt. Ein multiples *Alignment* der Aminosäuresequenzen und der Nukleotidsequenzen der vier HvGER4 Gene wurde mit Clustal W (Lasergene Version 6.0, DNASTAR Inc) erstellt. Die aus der Clustal W Analyse berechneten Identitäten der Aminosäuresequenzen von HvGER4a, b, c und d sind mit 92,2 % – 94,3 % sehr hoch. Beide *Alignments* sind im Anhang 8.3 dargestellt.

### 3.1.5 Identifizierung neuer HvGER Mitglieder und Identifizierung von GLPs aus Reis und *Arabidopsis thaliana* für eine phylogenetische Analyse

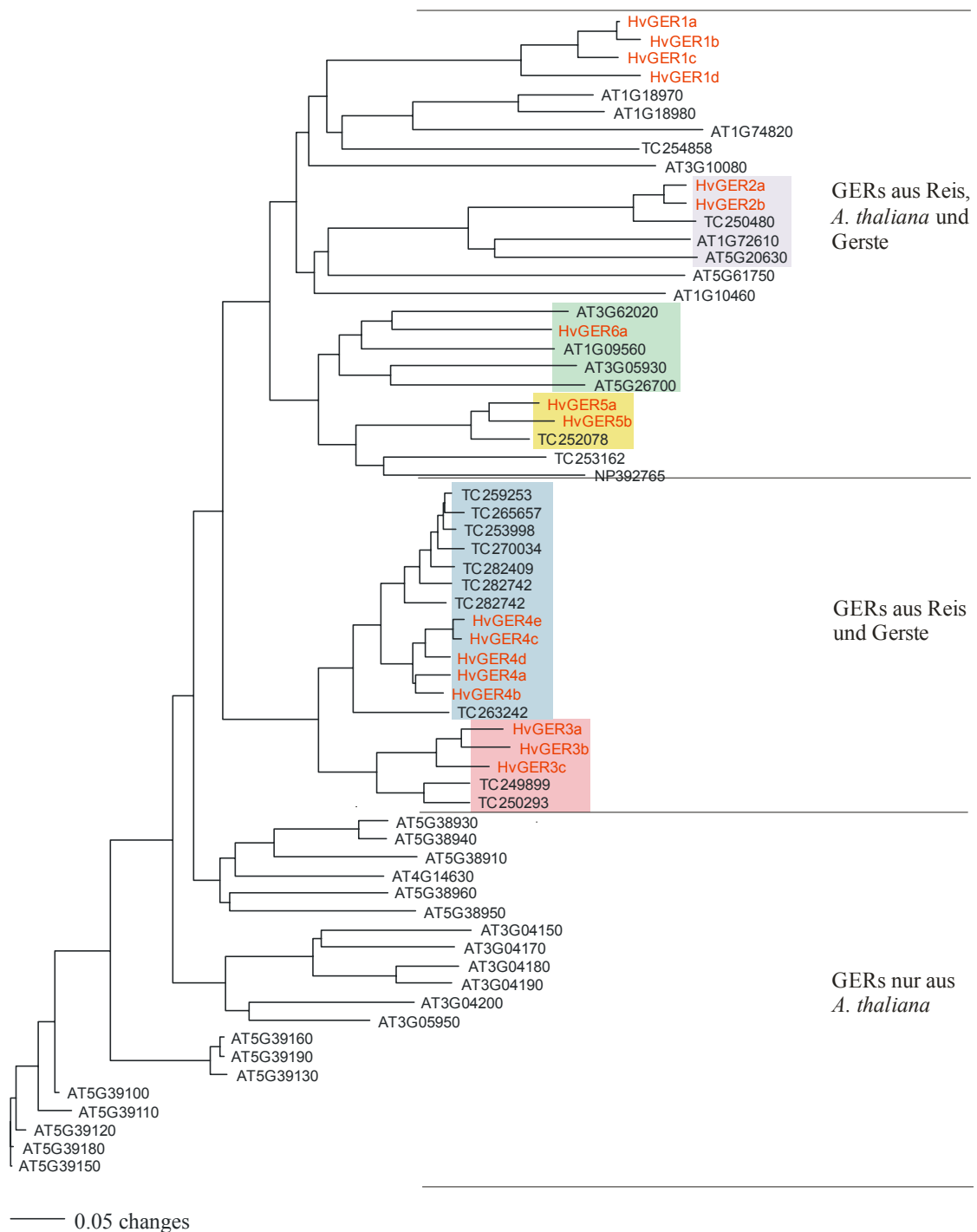
In der nachfolgenden Untersuchung soll ein Eindruck nicht nur über die Komplexität der HvGER Subfamilien der Gerste, sondern auch über die Subfamilien der OsGLPs in Reis und der AtGLPs in *A. thaliana* vermittelt werden. Um möglichst alle Sequenzen pro GLP Subfamilie zu erhalten wurde auf weitere Datenbanken, wie TIGR und TAIR zurückgegriffen. Mit Hilfe dieser Sequenzen sollte dann ein phylogenetischer Baum erstellt werden, um die Verwandtschaftsbeziehungen der GLPs zu verdeutlichen. Zusätzlich wird gezeigt, inwieweit GLP Sequenzen als Genorthologe zu GLP Subfamilien aus anderen Spezies verstanden werden können, ohne auf die einzelnen Mitglieder näher einzugehen.



Über Stichwortsuche „Germin“ und „GLP“ wurden in der Datenbank TIGR (Stand: 05/2006) in den Genindices für Gerste und Reis GLP-Sequenzen ausgewählt (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). Die Gensequenzen aus TIGR entsprechen sogenannten „*Tentative Consensi*“ (TCs). Diese „vorläufigen“ *Consensi* Sequenzen entstehen durch Ansammlung (*assembly*) mehrerer ESTs zu einem virtuellen Transkript. Bei den TCs eines Genindex handelt es sich um Uni-Gene. Für phylogenetische Analysen wurden nur die DNA-Sequenzen ausgewählt, welche den vollständig kodierten Bereich enthalten. Um für die Gerste möglichst alle GLP-Mitglieder pro Subfamilie identifizieren zu können, wurden alle HvGER cDNA Sequenzen (auch die partiellen) mit einer Sequenzidentität von mindestens 81% als paraloge Gene einer Subfamilie zugeordnet. Die HvGER cDNAs mit partieller Sequenz wurden jedoch für die phylogenetische Analyse nicht verwendet. Neben der Suche in der Datenbank TIGR wurde in der Datenbank TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) alle Genmodelle für putative GLPs aus dem Genom von *Arabidopsis thaliana* extrahiert.

Die Extraktion der Sequenzen aus den Datenbanken ergab, dass für die HvGER Multigenfamilie insgesamt 21 Gene vorhergesagt werden konnten, die sich auf die einzelnen Subfamilien verteilen. In dieser Analyse wurden für HvGER1 fünf Gene (4 Gene mit voller Länge und ein Gen mit partieller cDNA Sequenz), für HvGER2 zwei Gene (volle Länge), für HvGER3 drei Gene (volle Länge), für HvGER4 acht Gene (5 Gene volle Länge und 3 Gene mit partieller cDNA Sequenz), für HvGER5 zwei Gene (volle Länge) für HvGER6 ein Gen (volle Länge) identifiziert. Für die AtGLP Familie konnten 32 Gene und für die OsGLP Familie 15 Gene vorhergesagt werden.

Für die Erstellung eines phylogenetischen Baumes wurde ein multiples Sequenzalignment (*Clustal X*) mit den vollständigen Aminosäuresequenzen aller GLPs durchgeführt. Für die Sequenzen wurden in PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) paarweise genetische Distanzen (*mean character differences*) berechnet und aus der Distanzmatrix ein ungewurzelter phylogenetischer Baum mit dem *Neighbor-joining Cluster* Algorithmus erstellt (Abb.3.3). Um die statistische Unterstützung der Gruppen zu testen wurden in einer *Bootstrap*-Analyse 1000 zufällige Wiederholungen (*re-samples*) der Matrix durchgeführt. Die *Bootstrap*-Werte werden wegen der besseren Übersicht im Anhang 8.4 gezeigt. *Bootstrap*-Werte über 50% sind an den Ästen der Bäume angegeben. Sie zeigen an, wie oft in den 1000 errechneten Bäumen eine bestimmte Gruppe vorhanden war.



**Abb. 3.3** Phylogenetische Analyse der HvGER, der AtGLP und der OsGLP Proteinsequenzen. In die Berechnung sind nur Sequenzen mit vollständig kodiertem Bereich einbezogen. Fett hervorgehoben sind die HvGERs, die in Expressionsanalysen und in den funktionellen Daten verwendet wurden. TC Nummern entsprechen den Reissequenzen und die AT Nummern den *A. thaliana* Genmodellen. NP Nummer (Reissequenz) entspricht der *Accession* in GenBank.

Aus der Abb.3.3 geht hervor, dass ein Ast nur AtGLP Sequenzen enthält, während ein weiterer Ast nur die Verwandtschaft zwischen den HvGER und den OsGLP Sequenzen

zeigt. Zur besseren Erkennung orthologer Subfamilien zwischen den Spezies, wurden diese durch eine gemeinsame Hintergrundfarbe hervorgehoben.

In der Gerste wird die HvGER4 Subfamilie wahrscheinlich durch die größte Mitgliederzahl paraloger Gene repräsentiert. Interessanterweise konnte aus Reis eine orthologe Subfamilie zu HvGER4 identifiziert werden mit wahrscheinlich gleich vielen paralogen Genmitgliedern. Auch für die HvGER Subfamilien 2, 3 und 5 wurden orthologe Subfamilien aus Reis identifiziert. Hingegen wurden aus *Arabidopsis thaliana* vermutlich zwei Subfamilien als Orthologe zu HvGER2 und HvGER6 gefunden. Für HvGER1 wurde bisher noch keine orthologe Subfamilie zu den hier untersuchten Spezies identifiziert.

### 3.1.6 Die Evolution der kodierenden Sequenzen paraloger HvGER Gene

Aufgrund hoher Identitäten in den Aminosäuresequenzen zwischen den Genen einer Subfamilie wurde untersucht, inwieweit die duplizierten Gene im Laufe der Evolution divergiert sind. Die Divergenz zwischen zwei Genen wird über die Häufigkeit des erfolgten Nukleotidaustausches ermittelt. Dabei wird zwischen synonymen (*silent*) und nicht-synonymen (*non silent*) Substitutionen unterschieden. Bei synonymen Substitutionen (Ks) führt eine Änderung im Codon der Nukleotidsequenz nicht zu einer Änderung des Aminosäurerests, während bei nicht-synonymen Substitutionen (Ka) eine Änderung im Codon zu einem Austausch der Aminosäure führt. Unter Verwendung der *Software* DnaSP v. 4.10.4 wurden über paarweise Vergleiche zweier Sequenzen (Nei and Gojobori, 1986) die Ks- und Ka-Werte berechnet. Das Verhältnis von Ka zu Ks gibt die Form der Sequenzevolution wieder und diese wird in Tab.3.3 für die Gene der HvGER Unterfamilien gezeigt. Für den Vergleich der Sequenzevolution zwischen paralogen Genen wurden nur die ORFs berücksichtigt. Interessanterweise sind die meisten Ka-Werte sehr viel kleiner als die Ks-Werte ( $Ka/Ks \ll 1$ ), was darauf hindeutet, dass Mutationen ausselektiert werden, um das Protein in seiner ursprünglichen Form zu erhalten. Es wird von „säubernder“ Selektion (*purifying selection*) gesprochen. Interessant ist, dass nur für *HvGER1d* im Vergleich zu den anderen HvGER1 Genen das Verhältnis  $Ka/Ks > 1$  beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass Veränderungen des Proteins durch Mutationen positiv selektiert wurden (*diversifying selection*).

**Tab. 3.3** Die ORFs paraloger Gene einer HvGER Unterfamilie unterliegen fast ausschließlich einer „säubernder“ Selektion.

Sequenz 1	Sequenz 2	Ka	Ks	Ka/Ks
HvGER1a	HvGER1b	0,0048	0,0070	0,686
HvGER1a	HvGER1c	0,0194	0,3485	0,056
HvGER1a	HvGER1d	2,4302	1,1441	2,124
HvGER1b	HvGER1c	0,0243	0,3375	0,072
HvGER1b	HvGER1d	2,4004	1,1943	2,009
HvGER1c	HvGER1d	2,5327	1,0665	2,374
HvGER2a	HvGER2b	0,0250	0,2912	0,086
HvGER3a	HvGER3b	0,0229	0,4117	0,056
HvGER3a	HvGER3c	0,0399	0,5174	0,077
HvGER3b	HvGER3c	0,0465	0,7409	0,063
HvGER4a	HvGER4b	0,0291	0,2664	0,109
HvGER4a	HvGER4c	0,0391	0,3283	0,119
HvGER4a	HvGER4d	0,0351	0,3092	0,114
HvGER4a	HvGER4e	0,0392	0,3052	0,128
HvGER4b	HvGER4c	0,0391	0,3117	0,125
HvGER4b	HvGER4d	0,0271	0,2245	0,121
HvGER4b	HvGER4e	0,0391	0,3259	0,120
HvGER4c	HvGER4d	0,0292	0,1997	0,146
HvGER4c	HvGER4e	0,0077	0,0377	0,204
HvGER4d	HvGER4e	0,0292	0,2187	0,134
HvGER5a	HvGER5b	0,0658	0,1984	0,332

### 3.2 Expressionsstudien mittels quantitativer Northernblotanalyse

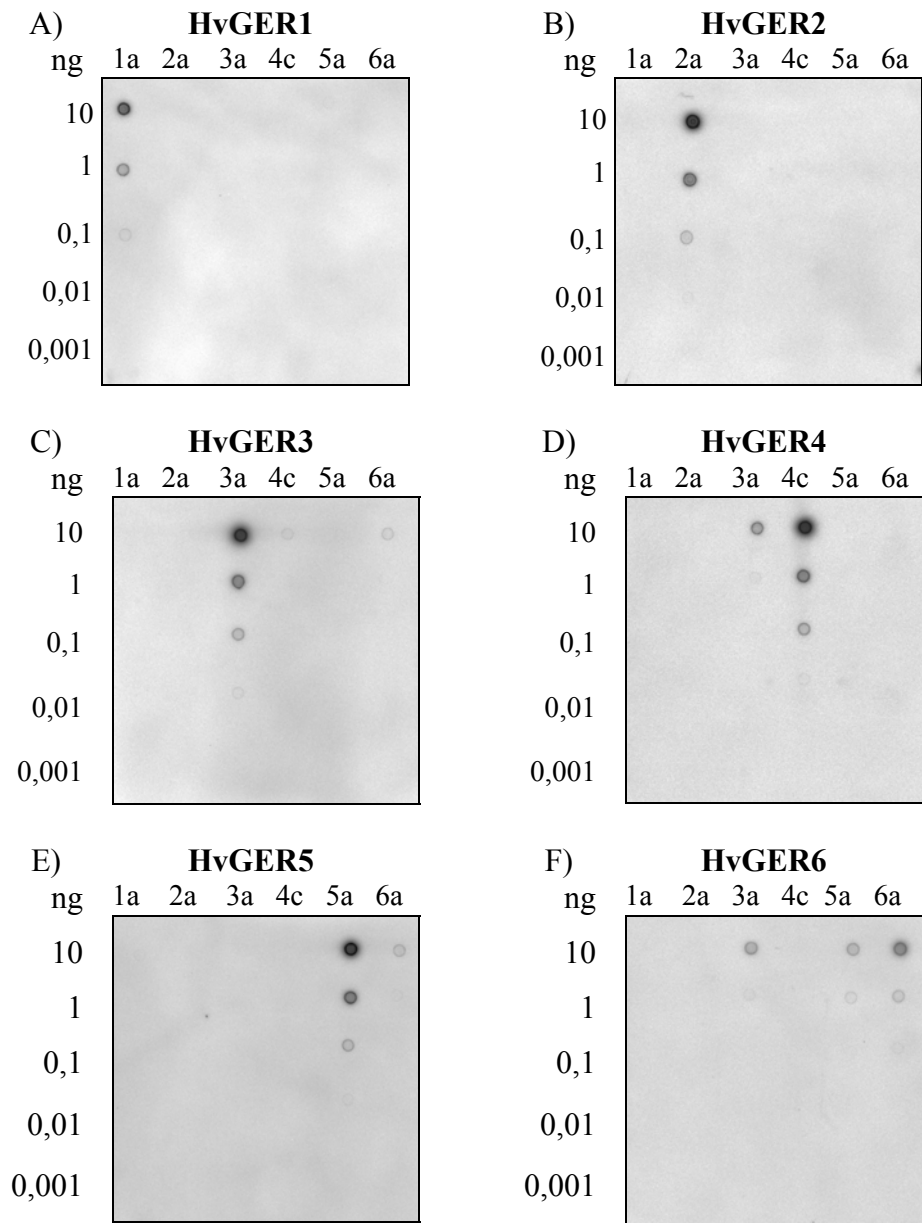
Die Expression der HvGER Subfamilien sollte durch quantitative Northernblots analysiert werden. Als erstes wurden *HvGER1a*, *HvGER2a*, *HvGER3a*, *HvGER4c*, *HvGER5a* und *HvGER6a* als ausgewählte Repräsentanten per Subfamilie gegeneinander hybridisiert, um Kreuzhybridisierungen ausschließen zu können und so das spezifische Expressionsprofil der Subfamilien diskutieren zu können.

Um die Transkripthäufigkeit der HvGER Gene in gestressten bzw. ungestressten Geweben zu detektieren wurde die beinahe-voll-Längen cDNAs, welche den vollständigen offenen Leserahmen für *HvGER1a*, *HvGER2a*, *HvGER4c* und *HvGER5a* enthalten mit den unter Abschnitt 2.2.8 verwendeten Restriktionsenzymen aus den dort erwähnten Vektoren herausgeschnitten und, nach Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP, als Sonde verwendet (Abschnitt 2.2.9). Für *HvGER3a* und *HvGER6a* wurde der vollständig kodierende Bereich mittels PCR aus genomischer Gersten DNA amplifiziert (Abschnitt 2.2.7), mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP markiert und als Sonde verwendet.

Pro Sonde stand jeweils ein frischer Northernblot für die Hybridisierung zur Verfügung. Nach Detektion der HvGER Signale erfolgte anschließend die Rehybridisierung mit einer ribosomalen 26S cDNA Sonde (aus *Phaseolus vulgaris*), um die Signalintensitäten intern normalisieren zu können.

#### 3.2.1 Überprüfung auf Kreuzhybridisierung der sechs HvGER Subfamilien

Die Dot Blot Analysen (Abb.3.4 A - F) zeigen, dass weitestgehend keine Kreuzhybridisierungen zwischen den HvGER Subfamilien aufgetreten sind. Allgemein ist eine spezifische Erkennung der 6 HvGER Sonden zu ihrer eigenen cDNA bis zu einer Menge von 0,1 ng detektierbar, außer für HvGER6. Die Hybridisierung der HvGER4-Sonde an die *HvGER3a* cDNA (Abb.3.4 D) führte nach Exposition zwar zu einem schwachen Signal, aber umgekehrt führte die Hybridisierung der HvGER3-Sonde (Abb.3.4 C) an die *HvGER4c* cDNA zu keiner nachweislichen Signaldetektion. In (Abb.3.4 F) zeigt der Dot Blot nach Hybridisierung mit der HvGER6-Sonde neben dem erwarteten Signal für die *HvGER6a* cDNA zusätzlich Signale für die *HvGER3a*- und die *HvGER5a* cDNA. Jedoch ist nach Hybridisierung der HvGER3- bzw. HvGER5-Sonde an ihre entsprechenden cDNAs (Abb.3.4 C und E) kaum Kreuzhybridisierung an die *HvGER6a* cDNA vorhanden.



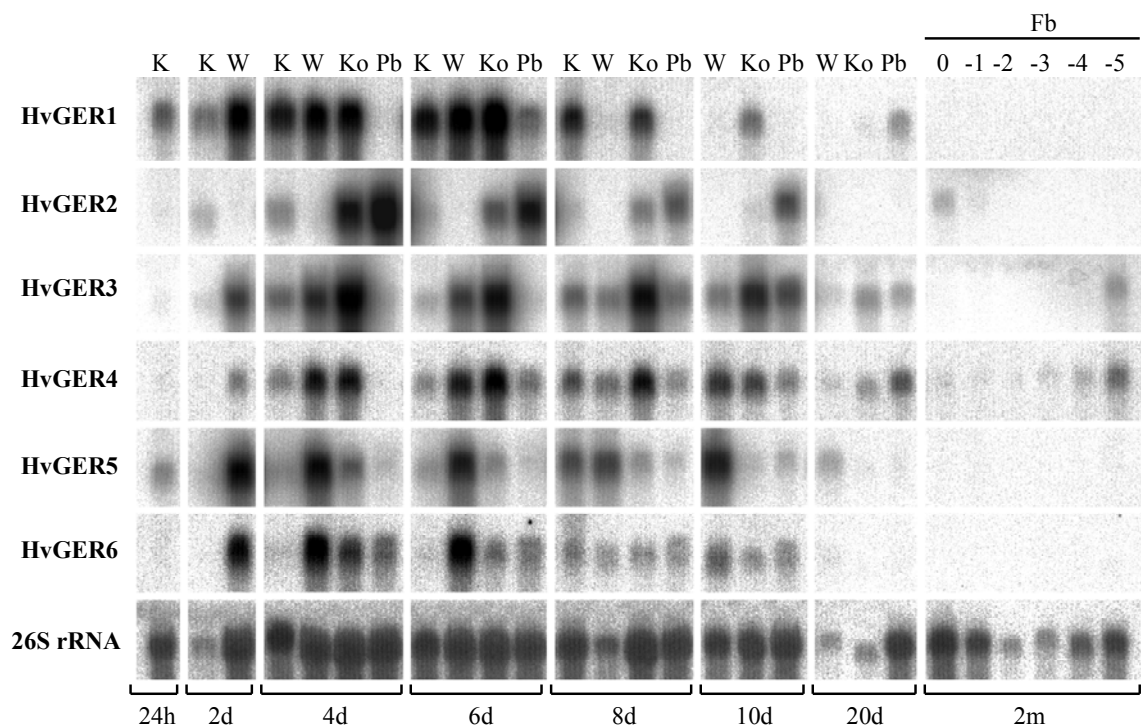
**Abb.3.4:** Dot Blot Analyse der 6 HvGER cDNAs. **A, B, C, D, E:** gezeigt sind die Hybridisierungen mit den entsprechenden **HvGER** Sonden. **1a, 2a, 3a, 4c, 5a, 6a:** HvGER cDNA punktförmig in den Konzentrationen 10 ng, 1 ng, 0,1 ng 0,01 ng und 0,001 ng aufgetragen.

### 3.2.2 Entwicklungsspezifische Regulation der HvGER Multigenfamilie

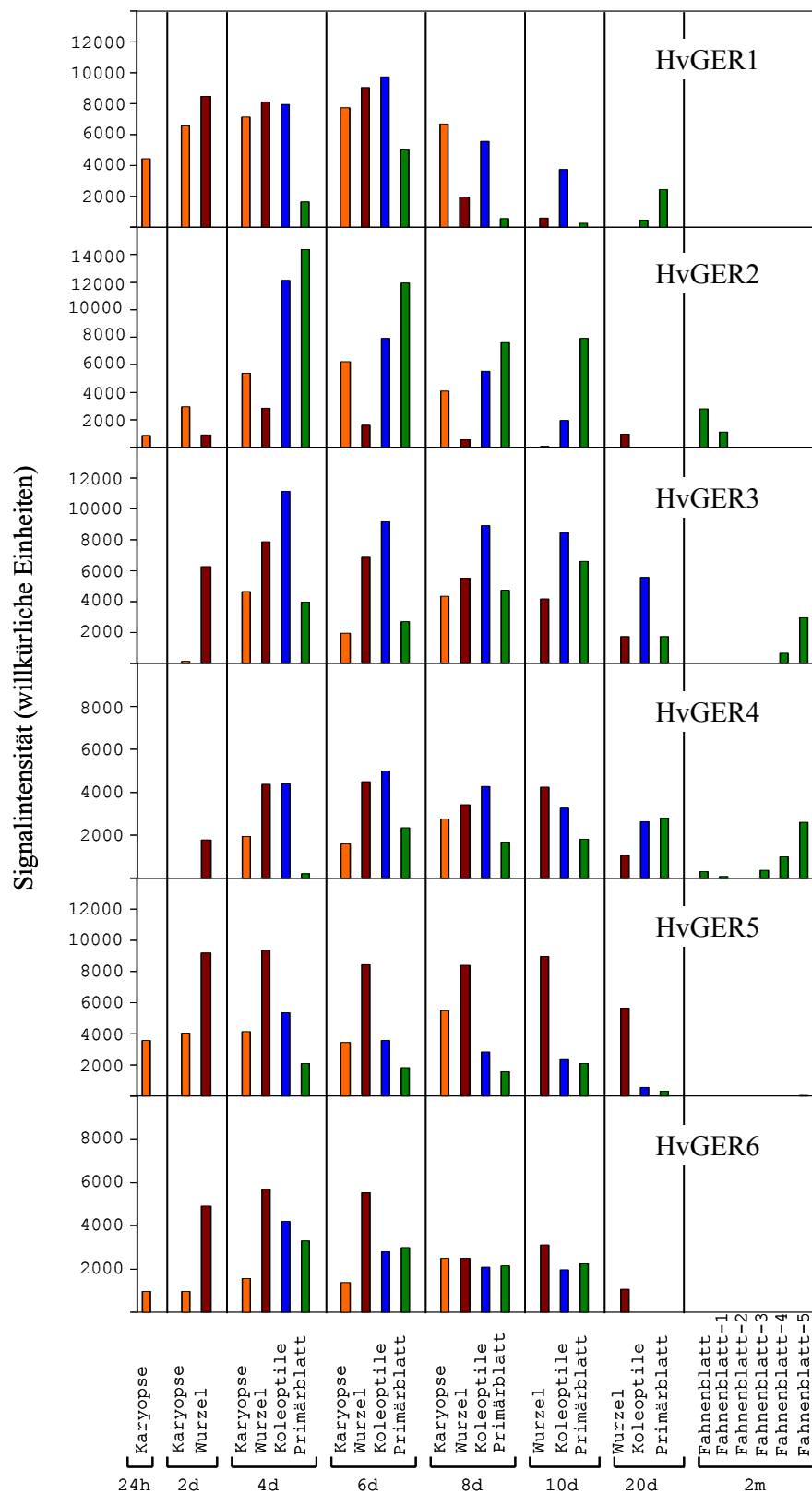
Von gequollenen Samenkörnern (24 h), von Keimlingen (2, 4, 6, 8, 10, 20 Tage nach Quellung) und von Adultpflanzen (2 Monate, „Blüte“) der Gerstensorte Ingrid wurden die Gewebematerialien Karyopse, Wurzel, Koleoptile, Primärblatt und Folgeblätter gesammelt und anschließend die totale RNA isoliert. Die RNA wurde im Agarosegel aufgetrennt und danach auf die Nylonmembran übertragen. Die quantitative Northernblotanalyse erfolgte durch unabhängige Hybridisierungen der HvGER Unterfamilienvertreter als Sonden.

Das Ergebnis (Abb. 3.5) zeigt, dass bereits nach 2 Tagen eine deutlich erkennbare Expression von *HvGER1*, *HvGER5* und *HvGER6* in der Wurzel zu verzeichnen ist. Die Expression der *HvGER* Gene erhöht sich dramatisch in den 4 und 6 Tage alten Keimlingen, hier besonders in Wurzel und Koleoptile (siehe auch Abb.3.6 und Abb.3.7). Hingegen fällt die Transkriptakkumulation fast aller *HvGER* Gene in den älter werdenden Pflanzen sehr stark ab und ist im älteren Blattmaterial (20d und 2m) kaum detektierbar.

Neben den Gemeinsamkeiten gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen der einzelnen *HvGER* Subfamilien. Die Transkripte von *HvGER1* akkumulieren besonders stark in Wurzel, Karyopse und Koleoptile der 2-6 Tage alten Keimlinge (Abb.3.7). Dagegen ist *HvGER2* fast ausschließlich im Blatt, nicht nur in den jungen, sondern auch in den etwas älteren Keimlingen exprimiert. Die Transkripte von *HvGER3* und *HvGER4* akkumulieren vor allen in der Koleoptile und auch in der Wurzel der jüngeren Gerstenkeimlinge. Im Gegensatz dazu ist eine extrem hohe Expression für *HvGER5* und *HvGER6* fast ausschließlich in der Wurzel, nicht nur in den jüngeren sondern auch für *HvGER5* in den älteren Keimlingen zu verzeichnen.

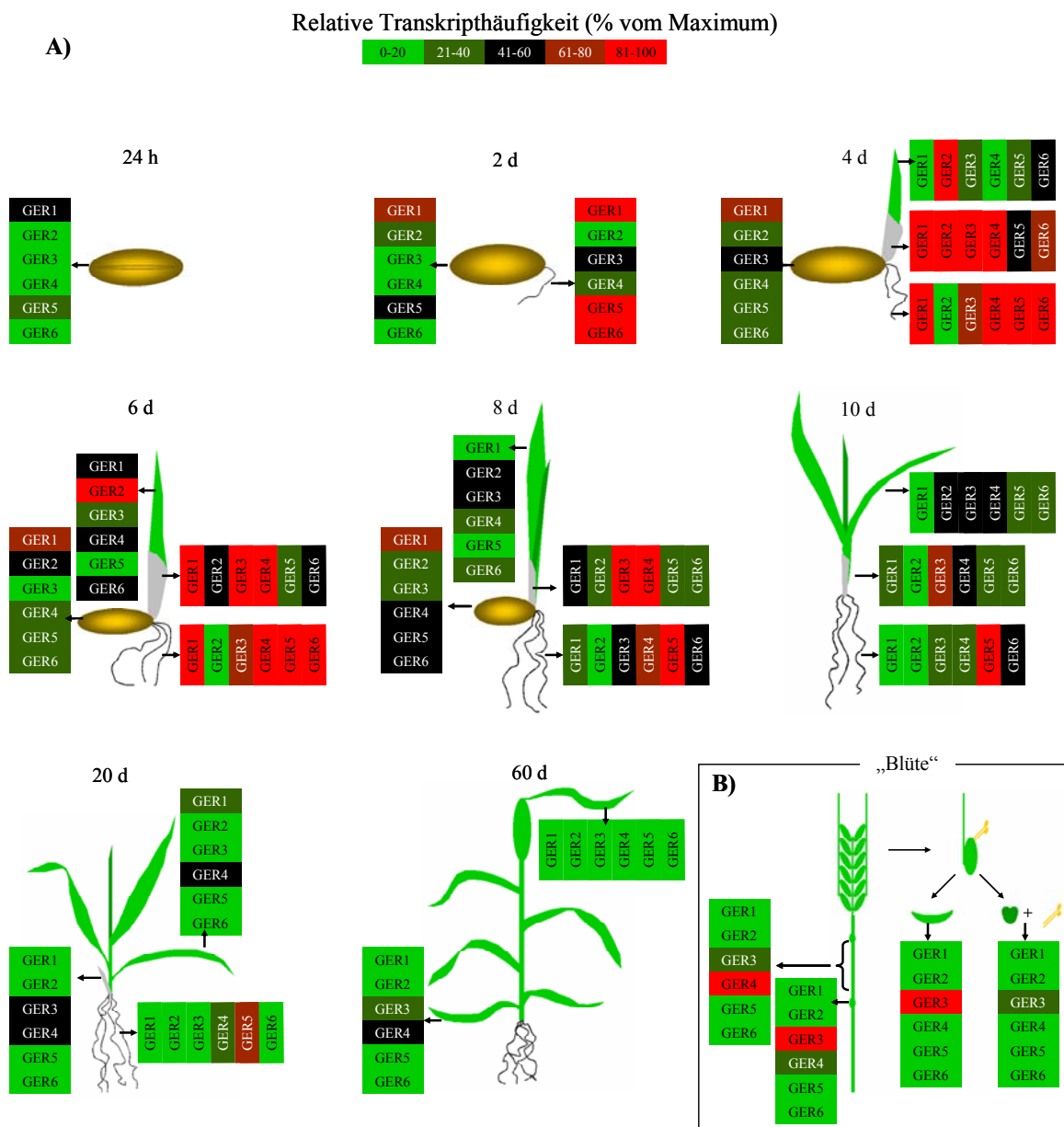


**Abb. 3.5:** Northernblotanalyse der Subfamilien *HvGER1-6* in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Gerste. Pro Spur wurden 10µg RNA im Agarosegel aufgetrennt und auf die Nylonmembran übertragen. Es erfolgten Hybridisierungen mit den **HvGER1-6** <sup>32</sup>P-dCTP markierten Sonden und Rehybridisierungen mit einer **26S rRNA** Sonde zwecks interner Normalisierung der Signale (unteres Panel als ein Beispiel). Gewebe: **K** = Karyopse, **W** = Wurzel, **Ko** = Koleoptile, **Pb** = Primärblatt, **Fb** = Fahnenblatt, **Fb-X** = vom Fahnenblatt abwärts gezählte ältere Blätter, Alter der Pflanzen (**h** = Stunde, **d** = Tag, **m** = Monat).



**Abb. 3.6:** Quantifizierung und Normalisierung der Transkripthäufigkeiten der HvGER Gene aus den Northernblotanalysen. Gezeigt auf der Y-Koordinate ist die Transkripthäufigkeit in willkürlichen Einheiten, normalisiert auf die Signale der 26S rRNA Sonde. Diese Analyse lässt Direktvergleiche innerhalb einer Subfamilie, aber nicht zwischen den Subfamilien zu.



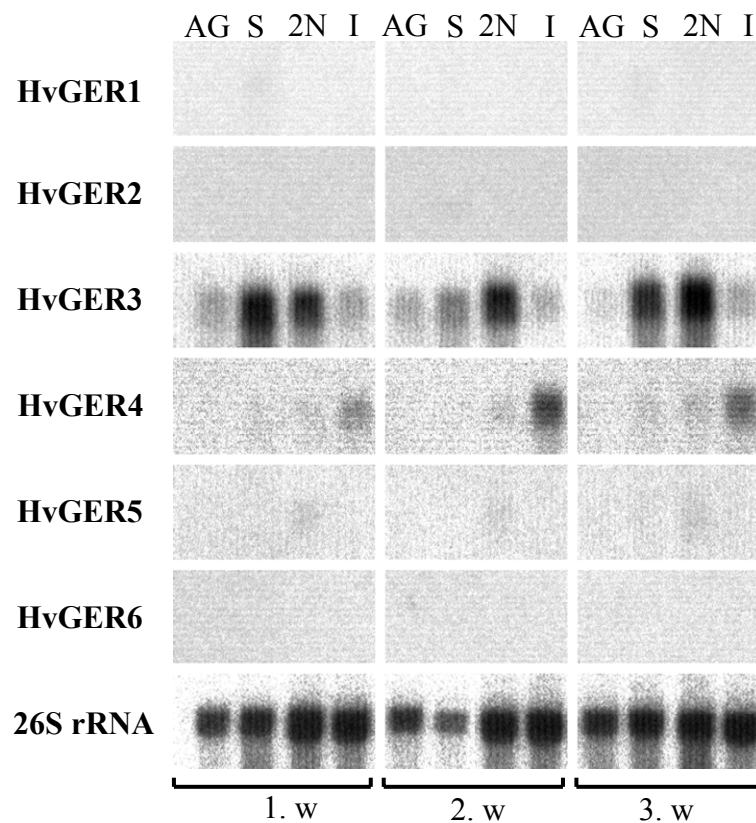


**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung der entwicklungsabhängigen Expression der 6 HvGER-Subfamilien. Die normalisierte Transkriptabundanz wurde hier in einem Farb-code als relative Transkriptabundanz in Prozent der maximalen Akkumulation pro Subfamilie angegeben. Abb. 3.7 A und Abb. 3.7 B entsprechen separat durchgeführten Experimenten. (Experiment zu Abb. 3.7 B siehe nachfolgende Seite).

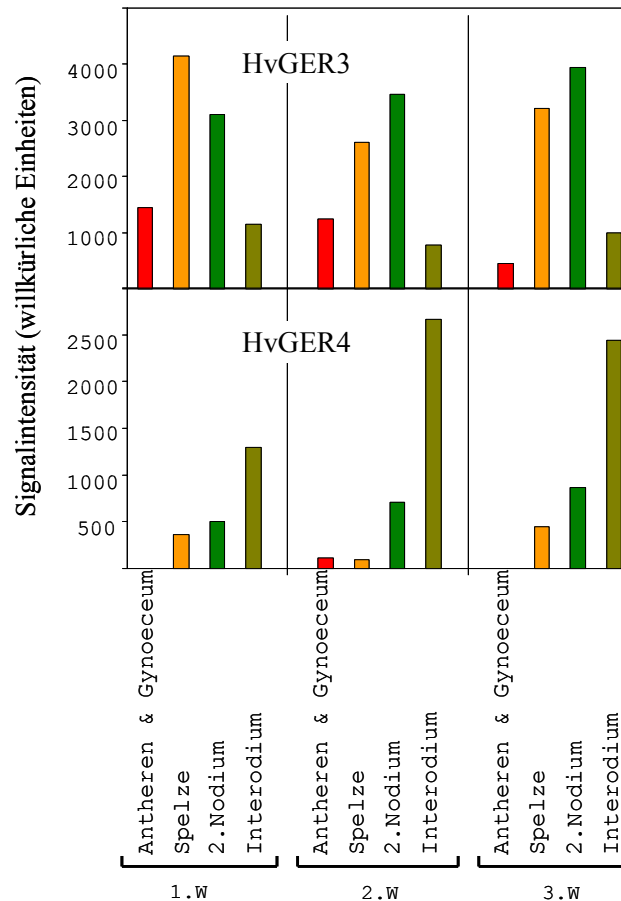
Um das Bild der entwicklungsabhängigen Expressionsstudien zu vervollständigen, wurde von ca. 10 Wochen alten Gerstenpflanzen nach geschobener Ähre Gewebeproben entnommen (Stadium: „Blüte“, Sorte Ingrid, Abb. 3.7 B). Die Pflanzen befanden sich im Stadium „gelbe bis weiße Antheren“, was ca. ein bis drei Wochen nach der Blüte entspricht.

Aus den Geweben der Antheren, des *Gynoeceum*, den Spelzen, dem 2. Nodium (unter der Ähre) und dem Internodium (zwischen dem 1. und 2. Nodium, unter der Ähre) wurde die totale RNA für eine quantitative Northernblotanalyse isoliert.

Das Ergebnis (Abb. 3.8) zeigt deutlich, dass Transkripte für *HvGER1*, *HvGER2*, *HvGER5* und *HvGER6* in diesen Geweben nicht nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise zeigte sich dagegen eine relativ starke Expression für *HvGER3* und eine weniger intensive Expression für *HvGER4*.



**Abb. 3.8:** Northernblotanalyse: Expressionsdetektion für HvGER1-6 in den Geweben blühender Gerstenpflanzen. Die RNA wurde wöchentlich in einer dreiwöchigen Periode (Zeitpunkt „gelb bis weisse Antheren“) 1W 2W, 3W, angefangen ca. eine Woche nach der Bestäubung, extrahiert. AG = Antheren und *Gynoeceum*, S = Spelze, 2N = 2. Nodium, I = Internodium. Hybridisierung mit der 26S ribosomalen Sonde wurde durchgeführt um Ladungsunterschiede zu korrigieren. 2µg totale RNA wurden je Spur aufgetragen.

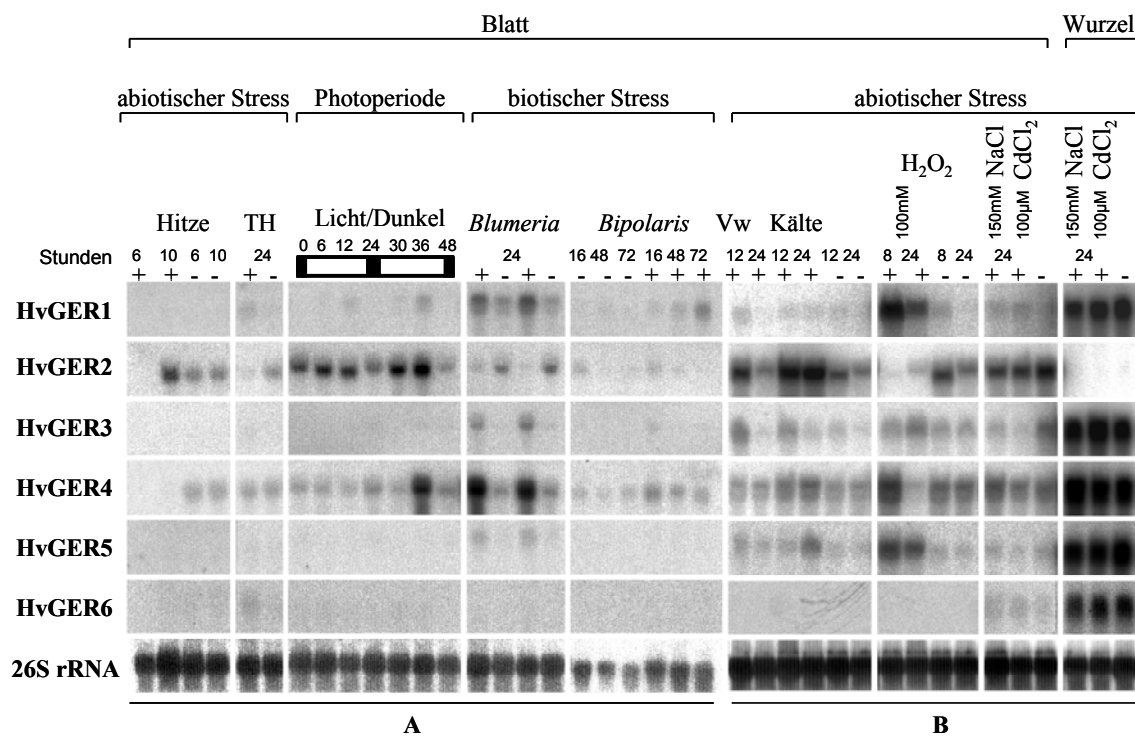


**Abb. 3.9:** Abgeglichenere Transkriptabundanz der HvGER Gene als Säulendiagramm dargestellt. Hier nur für HvGER3 und HvGER4 gezeigt. Die Transkriptabundanz dieser HvGER Gene wurde gegen die Transkriptabundanz der 26S ribosomalen DNA normalisiert. Die Y-Koordinate zeigt die Transkripthäufigkeit in willkürlichen Einheiten.

Besonders hohe Transkriptabundanzen für HvGER3 sind in der Spelze und im 2. Nodium detektierbar (s.h. auch Abb. 3.9 und Abb. 3.7 B). Bemerkenswert ist, dass das hohe Expressionsniveau in diesen Geweben über einem 3-wöchigen Zeitraum weitestgehend konstant bleibt. Hingegen ist das Transkript für *HvGER4* nur im Internodium detektierbar. Das Ergebnis zeigt außerdem, dass die Transkripte von *HvGER3* und *HvGER4* zwar in den vegetativen, aber nicht in den generativen Teilen der Blüte detektiert werden konnten.

### 3.2.3 Die Expression der HvGER-Subfamilien wird durch Umweltreize und durch Pathogenbefall reguliert.

Sieben Tage alte Gerstenpflanzen (Sorte Ingrid) wurden wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben stressbehandelt, die Gewebeproben gesammelt und anschließend die RNA isoliert. Die quantitativen Daten der Northernblotanalysen wurden durch zwei von einander unabhängige Hybridisierungen (A und B in Abb. 3.10 und Abb. 3.11) für jede Subfamilie erhalten. Dies erlaubt nur Vergleiche innerhalb eines Blocks (A oder B) und nur innerhalb einer Subfamilie. Die Abbildungen zeigen, dass die Expression der HvGER Gene von abiotischen und biotischen Stressfaktoren induziert wird. Gemeinsam für alle HvGER Gene ist, mit Ausnahme von *HvGER2*, eine starke konstitutive Expression in der Wurzel unabhängig von den applizierten Stressoren CdCl<sub>2</sub> und NaCl.



**Abb. 3.10:** Northernblotanalyse von gestresstem Pflanzenmaterial zur Detektion der Expression der HvGER Gene. 10µg RNA pro Slot wurden im Agarosegel separiert, auf eine Nylonmembran übertragen und die Transkriptabundanz der HvGER Gene mittels der HvGER1-HvGER6 Sonden detektiert. Zur Detektion von Ladungsunterschieden wurde anschließend mit der 26S ribosomalen Sonde hybridisiert. TH = Trockenheit, Vw = Verwundung, A und B = zwei von einander unabhängige Experimente.

Eine Induktion der HvGER Gene im Blatt durch CdCl<sub>2</sub> und NaCl konnte nicht detektiert werden. Von den Umweltfaktoren wie z.B. Hitze, Trockenheit, Verwundung und

Kälte scheinen reproduzierbar nur Verwundung und Kälte einen Teil der Gene (*HvGER2*, *HvGER3*, *HvGER5*) zu einem gewissen Grad zu induzieren.

Äußere Behandlung der Gerste mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zur starken Induktion von *HvGER1* und *HvGER5* und zur mäßigen Akkumulation des *HvGER3* und *HvGER4* Transkripts. Interessanterweise führt Pathogenbefall durch *B. graminis* fsp. *hordei* (Bgh) zur Induktion von *HvGER1*, 3, 4 und 5. Die Induktion dieser Gene durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> korreliert anscheinend mit der Induktion durch Bgh.

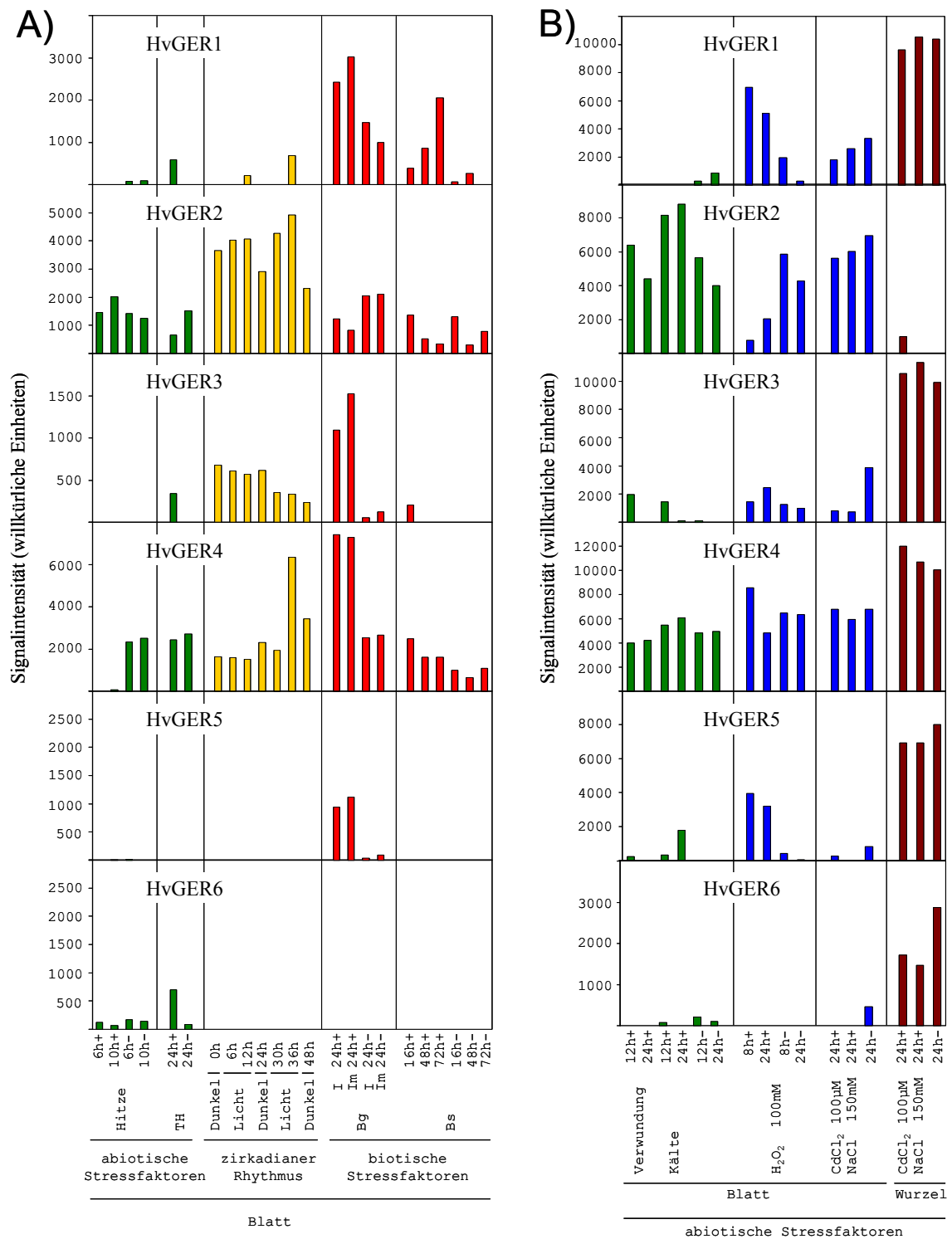
Neben dem obligat biotrophen Pilz *Blumeria graminis* wurde der Einfluss des hemibiotrophen Pilzes *Bipolaris sorokiniana* auf die Induzierbarkeit der Genexpression untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass nur *HvGER1* und *HvGER4*, aber nicht *HvGER3* und *HvGER5* induziert wurden.

Im Gegensatz dazu wird die Expression von *HvGER2* durch Behandlung der Gerste mit Hydrogenperoxid und Bgh reprimiert.

Als einziges der untersuchten Gene scheint *HvGER2* durch einen zirkadianen Rhythmus reguliert zu werden. Die Expression ist während der Lichtperiode intensiv und in der Dunkelperiode deutlich abgeschwächt. Durch die Licht/Dunkel Abhängigkeit in der Expression von *HvGER2* lässt sich keine eindeutige Aussage über eine auffällige Induktion durch die Stressoren Hitze, Verwundung und Kälte treffen. Möglicherweise ist *HvGER2* durch diese Stressfaktoren induziert.

Das für *HvGER4* detektierte Signal während der Lichtperiode darf als Ausreißer betrachtet werden, da bei Wiederholungen dieser Effekt nicht reproduziert werden konnte.

Zusammenfassend konnte für alle *HvGER* Gene außer *HvGER6* eine spezifische Induktion in Abhängigkeit verschiedener Stressfaktoren gezeigt werden.

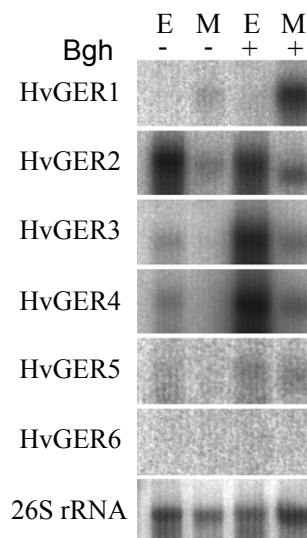


**Abb. 3.11:** Quantifizierung und Normalisierung der Transkripthäufigkeiten der HvGER Gene aus den Northernblotanalysen. Gezeigt ist auf der Y-Koordinate die Transkripthäufigkeit in willkürlichen Einheiten, normalisiert auf die Signale der 26S rRNA Sonde. Diese Analyse lässt Direktvergleiche innerhalb einer Subfamilie, aber nicht zwischen den Subfamilien zu. Applizierter Stress: **TH** = Trockenheit, **Bg** = *Blumeria graminis*, **Bs** = *Bipolaris sorokiniana*. Gerstensorten: **Im** = Ingrid *mlo5*, **I** = Ingrid

### 3.2.4 Nachweis der HvGER Transkripte in mehltauinokulierter Epidermis

Eine Induktion von *HvGER1*, *HvGER3*, *HvGER4* und *HvGER5* durch Bgh im Blatt ist im Abschnitt 3.2.3 (Abb. 3.10) gezeigt worden. Zur Untersuchung der räumlichen Expression der *HvGER* Gene im inokulierten und nicht inokulierten Blatt wurde die abaxiale Epidermis vom restlichen Blatt abgezogen. Anschließend wurde die RNA aus beiden Blattteilen für Northernblotanalysen extrahiert. Die Northernblotdaten zeigen (Abb. 3.12) den deutlichen Expressionsschwerpunkt der meisten *HvGER* Gene in der Epidermis mit Ausnahme von *HvGER1*, welches ausschließlich im inneren Blattgewebe (Mesophyll und Leitbündel) durch Bgh induziert wurde.

*HvGER2* wird konstitutiv in inokulierter und nicht-inokulierter Epidermis exprimiert und ist im restlichen Blatt kaum detektierbar. *HvGER3* und *HvGER4* werden durch Bgh exklusiv in der Epidermis induziert. *HvGER5* ist in der Epidermis konstitutiv exprimiert und im Mesophyll durch Bgh induziert. Dagegen weist *HvGER6*, wie die vorangegangenen Expressionsstudien gezeigt haben, außerhalb der Wurzel kaum Expression auf.



**Abb. 3.12:** Blattgewebsspezifische *HvGER* Genexpression reguliert durch den Gerstenmehltau *Blumeria graminis* fsp. *hordei*. **E** = Epidermis, **M** = „Mesophyll“ entspricht dem verbleibenden restlichen Teil des Blattes nach abgezogener abaxialer Epidermis, (-) = Kontrolle, nicht-inokuliertes Gewebe, (+) = Gewebe 24 h nach Inokulation mit Bgh. Jede Spur repräsentiert 2,5 µg totale RNA aus den Geweben Epidermis und „Mesophyll“. Hybridisiert wurde mit den *HvGER* cDNA-Sonden. Das untere Panel repräsentiert eine der Kontrollhybridisierungen mit der 26S rRNA-Sonde, zwecks Normalisierung der Signale.

### 3.2.5 Genexpression von vier HvGER4 Genen zur Untersuchung der differentiellen Regulation innerhalb einer Subfamilie

Vier Gene der Subfamilie HvGER4 wurden hinsichtlich ihrer Divergenz im Expressionsmuster untersucht. Im Mittelpunkt dieses Experiments stand die Frage, ob Gene, die zu einer Subfamilie gehören trotz ihrer sehr hohen Homologie im ORF differentiell reguliert werden, was Rückschlüsse über Promotorevolution zulassen würde. Am geeignetsten schien dafür die Subfamilie HvGER4, welche mit ca. 9 Genen, hervorgegangen durch multiple tandem Duplikationen, als *Cluster* auf Chromosom IV angeordnet ist (Druka et al., 2002).

Von den folgenden vier Genen, die zur Subfamilie HvGER4 gehören und für die EST Sequenzen vorlagen, wurden die Sonden für eine Northernblot Hybridisierung abgeleitet: *HvGER4a* (HO03H22), *HvGER4b* (HO11H17), *HvGER4c* (HO01J19) und *HvGER4d* (HO08H12). Wie in Abschnitt 3.1.4 erwähnt, weisen die Gene von HvGER4 eine sehr hohe Sequenzidentität (ca. 92% - 94%) zueinander auf, sodass auf voll-Länge cDNA Sonden verzichtet wurde, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Dagegen zeigt der 3' untranslatierte Bereich der cDNA eine deutlich geringere Sequenzhomologie (ca. 72% - 87%) zwischen den vier *HvGER4* Genen, und war für die Erzeugung genspezifischer Sonden geeignet. Aus dem 3' untranslatierten Bereich der cDNA wurde für jedes einzelne *HvGER4* Gen sequenzspezifische Primer abgeleitet. Nach PCR-Amplifikation wurden die 3'-spezifischen, ca. 100-150 bp große DNA-Fragmente radioaktiv mit <sup>32</sup>P-dCTP markiert und standen als genspezifische Sonden für Hybridisierungen zur Verfügung.

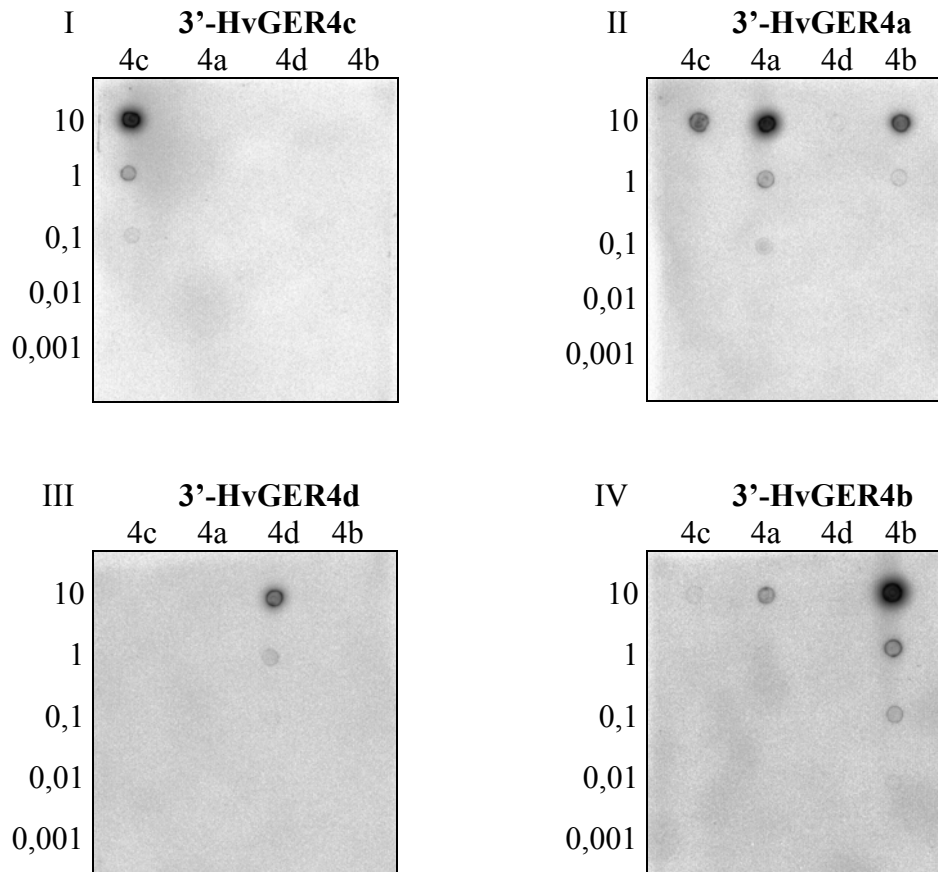
#### *Überprüfung auf Kreuzhybridisierung zwischen den vier HvGER4 Genen*

Um eine Aussage über eine differentielle Regulation zwischen den vier *HvGER4* Genen zu bekommen, wurden diese Gene zunächst auf Kreuzreaktionen überprüft. Es wurde die voll-Länge cDNA jedes *HvGER4* Gens in den Mengen 10µg, 1µg, 0,1µg, 0,01µg, 0,001µg auf eine Nylonmembran aufgetragen. Die von einander unabhängigen Hybridisierungen erfolgten anschließend mit den 3'-genspezifischen Sonden.

Aus der Dot Blot Analyse (Abb. 3.13) ist ersichtlich, dass nach Hybridisierung mit 3'-genspezifischen Sonden und nach Exposition eindeutig hohe Signalintensitäten zu den entsprechenden komplementären Genen zugeordnet werden kann. Die Hybridisierung mit der 3' Sonde 3'-HvGER4a (Abb. 3.13 II) führte nicht nur zu Signalen mit dem komplementären Gen, sondern auch mit *HvGER4c* und *HvGER4b*. Umgekehrt jedoch ist in



Abb. 3.13 I und Abb. 3.13 IV) kaum Kreuzreaktion mit *HvGER4a* ersichtlich. Für die meisten der *HvGER4* Gene konnte Kreuzhybridisierung ausgeschlossen und damit die spezifische Expression pro Gen in dieser Subfamilie analysiert werden.



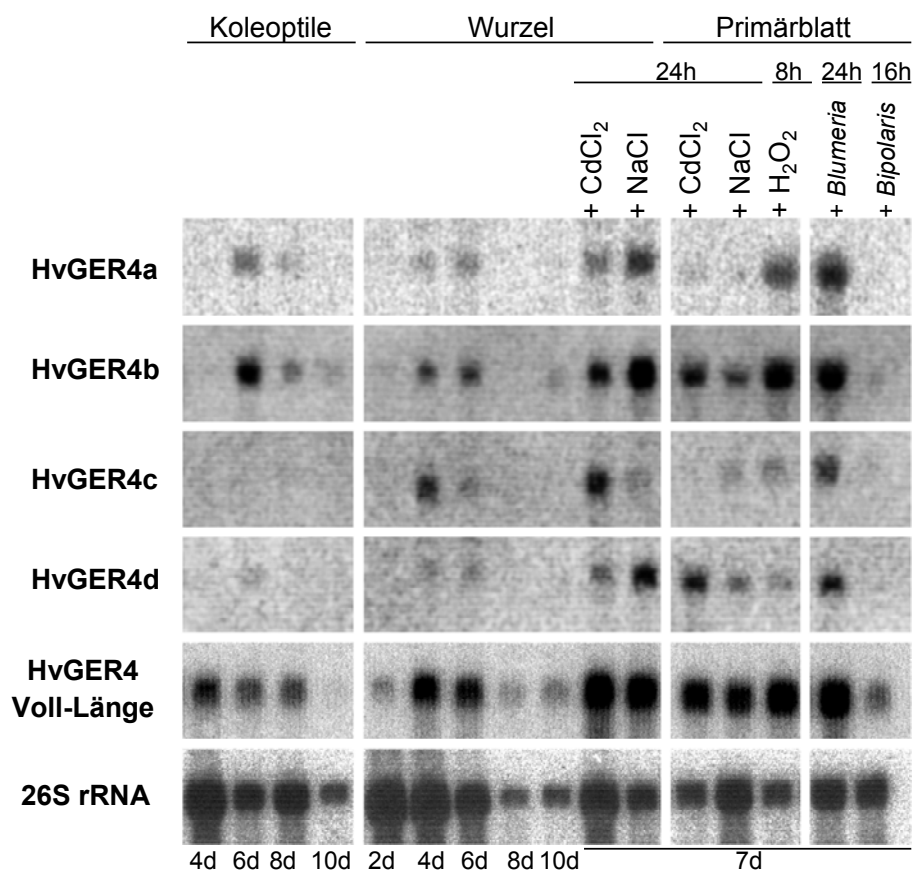
**Abb. 3.13:** Dot Blot Analyse zur Überprüfung von Kreuzhybridisierung zwischen Genen der Subfamilie *HvGER4*. **I, II, III, IV** zeigt die Hybridisierung mit den 3' genspezifischen Sonden (**3'-HvGER4x**), und **4c, 4a, 4d, 4b** entspricht der cDNA *HvGER4c* *HvGER4a* *HvGER4d* und *HvGER4b* aufgetragen in den Mengen von 10µg, 1µg, 0,1µg 0,01µg 0,001µg.

#### *Untersuchung zur differentiellen Expression von Genen der Subfamilie HvGER4*

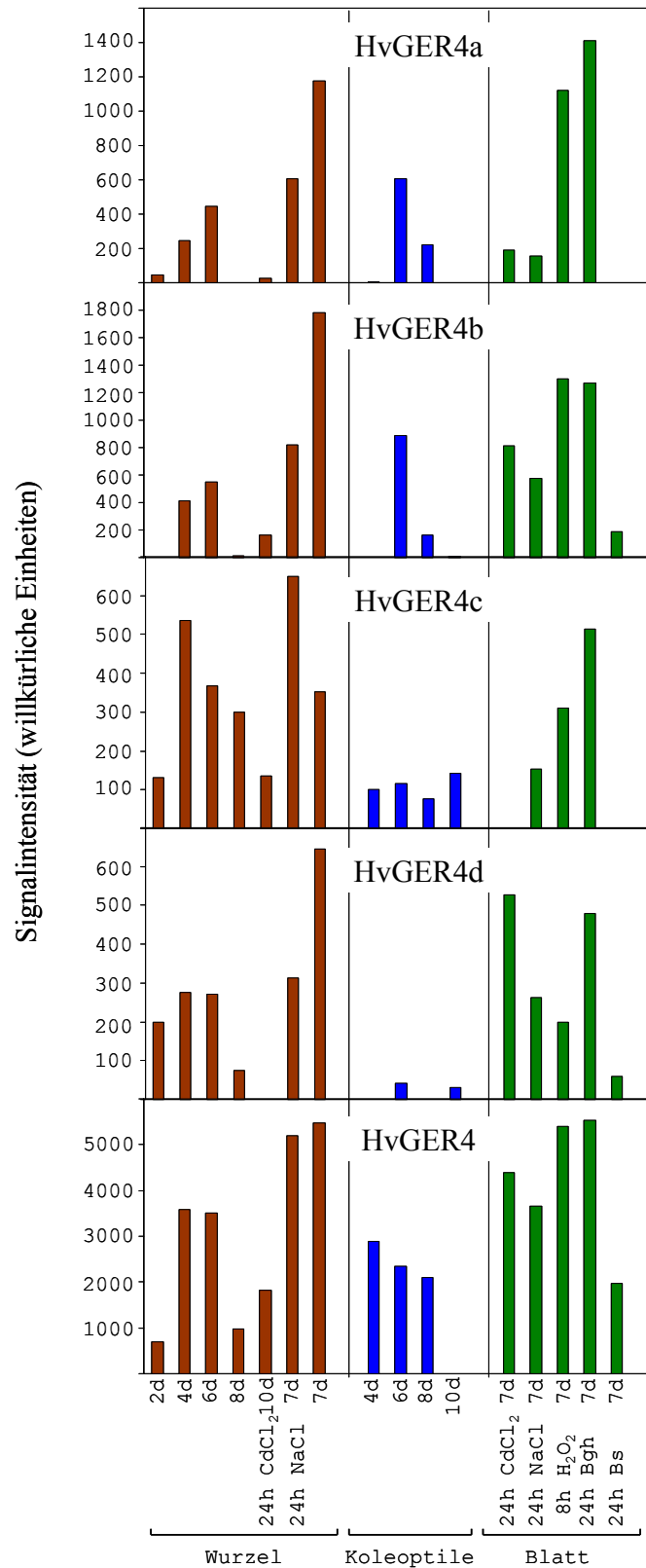
Vorangegangene Northernblotanalysen haben hier für *HvGER4* teilweise hohe Expressionsraten, in Abhängigkeit von dem Entwicklungszustand des Pflanzenorgans oder des verabreichten Stresses, gezeigt. Die entsprechenden RNA Proben, mit denen eine erhöhte Expression für *HvGER4* (unter Verwendung der voll-Länge cDNA Sonde) nachgewiesen wurde, wurden ausgewählt und für einen neuen Northernblot zusammengestellt. Dadurch sollte ermöglicht werden auffällige Unterschiede in der Expressionsintensität jedes einzelnen *HvGER4* Gens zu detektieren. Als Vergleich zu den 3'-genspezifischen Sonden wurde zusätzlich *HvGER4c* (HO01J19) als voll-Länge cDNA

Sonde für die Hybridisierungen verwendet. Wie schon beschrieben, wurden die Northernblots anschließend mit einer 26S ribosomalen Sonde hybridisiert, um die quantitativen Daten intern normalisieren zu können.

Das Ergebnis der Expressionsstudie (Abb. 3.14 und Abb. 3.15) zeigt differentielle Regulationstrends einzelner Gene einer Subfamilie. Dieses Experiment über divergente Expressionsmuster stellt eine Pilotstudie dar und bedarf weiterer Daten für eine abschließende Interpretation.



**Abb. 3.14:** Genexpression von vier *HvGER4* Genen zur Untersuchung der differentiellen Regulation. Pro Spur wurden 10µg RNA im Agarosegel aufgetrennt und auf die Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung mit den <sup>32</sup>P-dCTP markierten genspezifischen 3'Sonden erfolgte für jedes einzelne *HvGER4* Gen, gefolgt von Hybridisierungen mit einer 26S rRNA Sonde zwecks interner Normalisierung der Signale (unteres Panel als ein Beispiel). Alter des Pflanzengewebes: **h** = Stunde, **d** = Tag, **m** =Monat.



**Abb. 3.15:** Quantifizierung und Normalisierung der Transkripthäufigkeiten der vier Gene der HvGER4 Subfamilie. Gezeigt auf der Y-Koordinate ist die Transkripthäufigkeit in willkürlichen Einheiten, normalisiert auf die Signale der 26S rRNA Sonde. Diese Analyse lässt Direktvergleiche innerhalb einer Subfamilie, aber nicht zwischen den Subfamilien zu.

Ferner wurde eine Metaexpressionsanalyse der 4 paralogen *HvGER4* Gene unter Verwendung der seit kurzem zur Verfügung stehenden Expressionsdaten aus *BarleyBase* (<http://www.barleybase.org/>) durchgeführt (Abb. 3.16). Diese Expressionsdaten basieren auf verschiedene mRNA-Hybridisierungsexperimente bei welchen das *Barley1 GeneChip* von Affymetrix verwendet wurde.

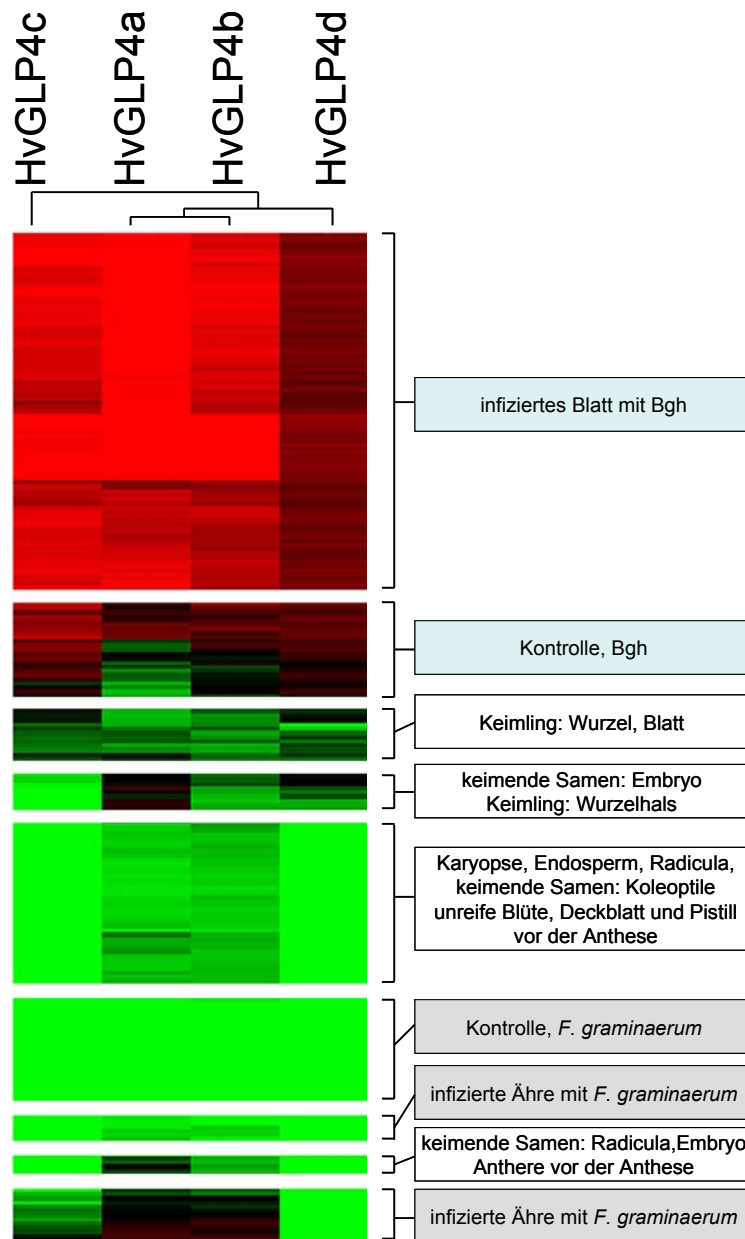
Die Gene des Gerstentranskriptoms werden auf diesem *GeneChip* durch ca. 10-20 verschiedene Oligonukleotidpaare repräsentiert, welche vorrangig aus dem 3'untranslatierten Bereich der *Consensus*-Sequenz abgeleitet wurden, um individuelle Transkripte innerhalb einer Genfamilie detektieren zu können.

Für die Metaexpressionsanalyse der paralogen *HvGER4* Gene interessierten aus *BarleyBase* besonders die Hybridisierungsexperimente BB3, BB4 und BB9. Die mRNA des Experiments BB3 wurde aus Geweben verschiedener Entwicklungsstadien der Gerstensorten Morex und Golden Promise isoliert. Die mRNA des Experiments BB4 wurde aus verschiedenen beinahe-isogenen Linien (Mla1, Mla6, Mla13), inokuliert mit jeweils zwei Isolaten von Bgh, extrahiert. Die mRNA des Experiments BB9 wurde aus *Fusarium graminearum* infizierten Ähren der Sorte Morex extrahiert. (Caldo et al., 2004; Boddu et al., 2006; Druka et al., 2006).

Die Hybridisierungsexperimente (BB3, BB4 und BB9) wurden jeweils aus 3 biologischen Replikaten erzeugt, sodass insgesamt 215 Hybridisierungen pro Gen für eine hierarchische *Cluster*-Analyse zur Verfügung standen. *BarleyBase* bietet öffentlich die normalisierten Expressionsdaten der Hybridisierungen als RMA-Werte (*Robust Multi-chip Average*) an (Details für Parameter s. <http://www.bioconductor.org/>). Die RMA-Werte wurden vor der *Cluster*-Analyse pro Gen median zentriert. Für die hierarchische *Cluster*-Analyse der vier Gene wurde das Programm „Cluster3“ von M. Eisen (<http://rana.Ibl.gov/EisenSoftware.htm>) verwendet. Die *Cluster*-Analyse erfolgte unter Berechnung der euklidischen Distanzen zwischen den Werten und unter Verwendung der „average linkage“ Einstellung des Programms.

In dem Dendrogramm werden nur die Regulationstrends der vier *HvGER4* Gene gezeigt (Abb. 3.16). Die Blöcke ähnlicher Regulation pro Gen werden durch mehrere biologische Replikate bestätigt (nicht gezeigt), was für die Reproduzierbarkeit der Expressionsanalyse spricht. In einer hierarchischen *Cluster*-Analyse liegen Gene mit ähnlichem Expressionsmuster im Dendrogramm verwandschaftlich näher, wie es z.B. für *HvGER4a* und *HvGER4b* gezeigt wird. Aus der Metaexpressionsanalyse ist erkennbar,

dass alle vier *HvGER4* Gene zwar grundlegend ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, aber tendenziell Abweichungen in der Feinregulation der Gene vorhanden sind.



**Abb. 3.16:** Metaexpressionsanalyse. Sondenbezeichnung der Hybridisierungsexperimente: *Contig 3151\_at* = *HvGER4a*, *Contig 3157\_at* = *HvGER4b*, *Contig 3155\_s\_at* = *HvGER4c* und *Contig 3156\_s\_at* = *HvGER4d*. (Siehe *BarleyBase* <http://www.barleybase.org/>, und Caldo et al., 2004; Boddu et al., 2006; Druka et al., 2006.)

- Bgh
- Entwicklung
- F. graminearum*

### 3.3 Untersuchung der Bedeutung von 6 HvGER Subfamilien in der Basalresistenz gegen *B. graminis* unter Verwendung des transienten Expressionssystems

Für die funktionelle Untersuchung der Subfamilien wurde je ein Gen als Vertreter verwendet, da die hohe Sequenzhomologie zwischen den Genen in einer Subfamilie auf funktionelle Redundanz schließen lässt.

Ein Vorteil des Gersten-Mehltau Systems gegenüber anderen Systemen ist, dass Interaktionen zwischen Pflanze-Pilz in der äußersten Zellschicht, der Epidermis, erfolgen. Dies ermöglicht die Entwicklung eines transienten Expressionssystems, welches auf biologischem Bombardement der Epidermis, gefolgt von der Inokulation mit Bgh, beruht (Schweizer et al., 1999b). Um eine Aussage zu bekommen, ob HvGER Gene die Basalresistenz in Gerste gegen *B.graminis* beeinflussen, wurden pro Genvertreter je Subfamilie Überexpressions – respektive RNAi *hairpin*-Konstrukte erzeugt. Diese Konstrukte wurden zusammen mit dem GUS-Reportergenkonstrukt in einzelne Epidermiszellen von Gerstenblättern transferiert und die Blätter anschließend mit Bgh inokuliert. Die erfolgreich transformierten Zellen wurden durch  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Färbung sichtbar gemacht und die Interaktionen zwischen den transformierten Zellen und dem Pilz ausgewertet. In Abhängigkeit des exprimierten Transgens kann der Pilz *B. graminis* die GUS-gefärbte Zelle penetrieren und ein Haustorium bilden oder die erfolgreiche Bildung des Haustoriums wird verhindert. Die Haustoriumhäufigkeit kann über einen Index bestimmt werden (Abschnitt 3.3.1) und zeigt an in wieweit transiente Genexpression die Basalresistenz beeinflusst (kein Effekt, erhöhte Resistenz oder erhöhte Anfälligkeit).

#### 3.3.1 Die absolute und die relative Haustoriumhäufigkeit als Maß zur Bestimmung von Resistenz und Anfälligkeit

Zur Bestimmung der absoluten oder der relativen Haustoriumhäufigkeit wurden alle erfolgreich transformierten Epidermiszellen und alle Haustorien des Pilzes, die sich innerhalb der transformierten Zellen etablieren konnten, gezählt. Für die Testgene und die Kontrollen wurde zunächst die absolute Haustoriumhäufigkeit aus dem Quotienten der Anzahl (N) aller Haustorien ( $N_{\text{Hau}}$ ) und der Anzahl aller transformierten Epidermiszellen ( $N_{\text{GUS}}$ ) berechnet (Formel A). Aus der absoluten Haustoriumhäufigkeit leitet sich die relative Haustoriumhäufigkeit wie folgt ab: Quotient aus dem Wert der absoluten

Haustoriumhäufigkeit des Testgens ( $AH_{Tg}$ ) und dem Wert der absoluten Haustoriumhäufigkeit der leeren Vektorkontrolle ( $AH_{Vek}$ ), (Formel B).

$$(A) \text{ absolute Haustoriumhäufigkeit (AH)} = N_{Hau}/N_{GUS}$$

$$(B) \text{ relative Haustoriumhäufigkeit (RH, \%)} = AH_{Tg}/AH_{Vek} * 100$$

Die leere Vektorkontrolle in (B) entspricht dabei einer relativen Haustoriumhäufigkeit von 100%.

### 3.3.2 Auswahl von geeigneten Sorten

Für ein GLP aus Weizen (*TaGLP4*) wurde in transienten Überexpressionsstudien eine signifikant erhöhte Penetrationsresistenz gegen *B. graminis* gezeigt (Schweizer et al., 1999a). Zu *TaGLP4* besitzt das orthologe GLP in der Gerste (*HvGER4d*) eine Sequenzidentität von über 90% und lässt funktionelle Homologie vermuten. Für *HvGER4d* wurde versucht den resistenzerhöhenden Effekt von *TaGLP4* bei transienter Überexpression zu reproduzieren. Um die Erfolgchancen zu erhöhen wurden verschiedene Gersten - und Weizensorten getestet.

Das Konstrukt von *HvGER4d*, welches in diesem Versuch getestet wurde, ist in Christensen et al., (2004) als pHvGLP4 beschrieben und besteht aus dem CaMV 35S Promotor, der voll-Länge-cDNA von *HvGER4d* und dem CaMV 35S Terminator im Expressionsvektor pGY1 (Schweizer et al., 1999b). In meinen Experimenten wird das Überexpressionskonstrukt als pHvGER4d bezeichnet.

Als Reportergenkonstrukt wurde pUbiGUS (Polyubiquitin 1 Promotor aus Mais gefolgt von der kodierenden Region des  $\beta$ -Glucuronidase Gens und des CaMV 35S Terminators, verwendet (Schweizer et al., 1999b).

Nach Fällung des Testgens - und des Reportergenkonstrukts auf Mikroprojekteile aus Gold wurden diese in die Epidemien von verschiedenen Getreidesorten kobombardiert. Vier Stunden nach Beschuss wurden die Weizensorten mit *B. graminis* f.sp. *tritici* (Bgt) und die Gerstensorten mit *B. graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) inokuliert. Erfolgreich transformierte Epidermiszellen wurden durch die  $\beta$ -Glucoronidase (GUS) - Färbung 40 h nach der Inokulation sichtbar gemacht und die Interaktionen ausgewertet.

Tab. 3.4 zeigt die Weizensorten: Fidel und Kanzler und die Gerstensorten: Pallas, Ingrid, Hanna und Golden Promise, die für die Experimente getestet wurden. Pro Getreidesorte wurden mehrere voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Als

negative Kontrolle wurde der leere Überexpressionsvektor pIPKTA9 und als positive Kontrolle das Überexpressionskonstrukt pWIR3 (*TaWIR3* Gen kodiert für eine putative Peroxidase aus Weizen) verwendet (Schweizer et al., 1999b).

Das Ergebnis zeigt, dass die transiente Überexpression von *HvGER4d* in der Epidermis, sowohl in der Gerste, als auch im Weizen zu einer Reduktion der relativen Haustoriumhäufigkeit und damit zu einer Erhöhung der Basalresistenz führte. So reduzierte pHvGER4d in der Weizensorte Fidel (s. Tab. 3.4) die relative Haustoriumhäufigkeit von ursprünglich 100% (entspricht dem leeren Vektor, pIPKTA9) auf einen Wert von  $65 \pm 10$  %. Dieser Wert liegt signifikant unter 100 %. Im Gegensatz dazu war das Konstrukt in der Weizensorte Kanzler ohne Effekt. Neben dem resistenzerhöhenden Effekt im Weizen führte Überexpression von *HvGER4d* in der Epidermis der Gerstensorte Pallas zu einer verringerten Haustoriumhäufigkeit. Es konnte eine signifikante Reduktion auf  $65 \pm 12$  % gegenüber der Negativkontrolle beobachtet werden. In den verbleibenden Gerstensorten Ingrid, Hanna und Golden Promise bewirkte pHvGER4d in den transformierten Epidermiszellen keine Verringerung der Haustorienbildung.

**Tab. 3.4:** Transiente Überexpression von *HvGER4d* in verschiedenen Weizen und Gerstensorten **AH:** Absolute Haustoriumhäufigkeit Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 – 6 von einander unabhängige Experimente, **RH:** Relative Haustoriumhäufigkeit bezogen auf die leere Vektorkontrolle (auf 100 % gesetzt), **Exp:** Anzahl der unabhängigen Experimente, **Int** (Interaktion): Totale Anzahl an beobachteten Interaktionen (Anzahl aller GUS gefärbten Zellen der leeren Vektorkontrolle (pIPKTA9) addiert mit der Anzahl aller GUS gefärbten Zellen des Testgens), **p-Wert:** Überprüfung auf signifikante Abweichung von 100 % mittels „one-sample t-Test“

Sorte	Testgene/Reportergen	AH (%)	RH (%)	Exp	Int.	p (t-Test)
Fidel	pIPKTA9 + pUbiGUS	43 $\pm$ 4	100	6		
	HvGER4d + pUbiGUS	27 $\pm$ 2	65 $\pm$ 10	6	2980	0,01
	pWIR3 + pUbiGUS	10 $\pm$ 1,7	25 $\pm$ 6	6	3326	0,0005
Kanzler	pIPKTA9 + pUbiGUS	14 $\pm$ 4	100	4		
	HvGER4d + pUbiGUS	19 $\pm$ 6	147 $\pm$ 56	4	1459	0,25
	pWIR3 + pUbiGUS	3 $\pm$ 0,7	24 $\pm$ 3	4	1407	0,0005
Pallas	pIPKTA9 + pUbiGUS	39 $\pm$ 4	100	4		
	HvGER4d + pUbiGUS	25 $\pm$ 6	65 $\pm$ 12	4	1903	0,05
	pWIR3 + pUbiGUS	16 $\pm$ 3	42 $\pm$ 10	4	1498	0,01



Ingrid	pIPKTA9 + pUbiGUS	31 ± 9	100	4		
	HvGER4d + pUbiGUS	23 ± 5	84 ± 12	4	2465	0,1
	pWIR3 + pUbiGUS	11 ± 0,9	44 ± 10	4	3358	0,0025
Hanna	pIPKTA9 + pUbiGUS	44 ± 4	100	4		
	HvGER4d + pUbiGUS	42 ± 6	94 ± 10	4	2339	0,5
	pWIR3 + pUbiGUS	21 ± 4	46 ± 7	4	3010	0,001
G. Promise	pIPKTA9 + pUbiGUS	27 ± 9	100	4		
	HvGER4d + pUbiGUS	33 ± 1	153 ± 35	4	1863	0,1
	pWIR3 + pUbiGUS	10 ± 3	43 ± 13	4	1739	0,01

Das Ergebnis legt nahe, dass die Wahl der geeigneten Gersten/Weizensorte von vorrangiger Bedeutung ist, wenn ein phänotypischer Effekt, hervorgegangen aus der Überexpression von HvGER Genen, beobachtet werden soll. Somit wurde es sinnvoll die Überexpression der verbleibenden HvGER Gene nur in den Sorten durchzuführen, wo das Testgen *HvGER4d* einen resistenten Phänotyp gezeigt hatte.

Im Gegensatz zu pHvGER4d, führt die Expression von pWIR3 in allen untersuchten Gersten- und Weizensorten zu einer starken Erniedrigung der relativen Haustoriumhäufigkeit. Dieser resistenzsteigernde Effekt war in allen Sorten signifikant und scheint unabhängig von der Wahl der Getreidesorte zu sein.

### 3.3.3 Transiente Überexpression von HvGER1 bis HvGER6 in der Gerste

In der Weizensorte Fidel und in der Gerstensorte Pallas wurde bei Überexpression von *HvGER4d* eine erhöhte Resistenz gegen *B. graminis* beobachtet. Für die weiterführenden Untersuchungen wurde daher die Überexpression der verbleibenden HvGER Gene in der Gerstensorte Pallas durchgeführt, um im System Gerste bleiben zu können.

Zunächst wurde jeweils ein Repräsentant aller HvGER Subfamilien in den Überexpressionsvektor pIPKTA9 zwischen dem CaMV35S Promotor und dem CaMV Terminator kloniert (s. Abschnitt 2.2.8). Diese Konstrukte werden als pHvGER1a, pHvGER2a, pHvGER3a, pHvGER4c, pHvGER5a und pHvGER6a bezeichnet.

Innerhalb der HvGER4 Subfamilie wurde neben dem Vertreter *HvGER4d* noch ein weiterer Vertreter, *HvGER4c*, verwendet um zu untersuchen, ob sich der resistenzsteigernde Effekt paraloger Gene einer Subfamilie übertragen lässt.

Aufgrund des bereits bekannten resistenzsteigernden Effekts von *HvGER4d* gegen Bgh in Pallas diene dieser Vertreter zusätzlich als Positivkontrolle. Mit Hilfe dieser

internen Kontrolle konnte für jedes einzelne Experiment geprüft werden, ob die Überexpression in Pallas generell funktionierte. Dabei wurden nur die Experimente verwendet, bei denen *HvGER4d* die relative Haustoriumhäufigkeit von 100 % (relativ zum leeren Vektor) auf mindestens 85% senken konnte. Dies erlaubte einen Direktvergleich aller getesteten HvGER Gene mit der Positivkontrolle.

Die Bedingungen für das Bombardement, Inokulation und GUS-Färbung wurden wie unter Abschnitt 3.3.2 beschrieben übernommen.

Interessant ist, dass Überexpression von 3 der 6 HvGER Subfamilien zu einer signifikanten Steigerung der Resistenz gegen Bgh führte (Tab. 3.5). So lagen die Werte der relativen Haustoriumhäufigkeit, verglichen mit der leeren Vektorkontrolle (auf 100 % gesetzt) für pHvGER2a bei  $58 \pm 10$  % und für pHvGER5a bei  $55 \pm 7$  %. Die Positivkontrolle (pHvGER4d) lag bei  $48 \pm 4$  %. Bemerkenswert ist, dass auch der zweite Vertreter der HvGER4 Subfamilie, das *HvGER4c* Gen (pHvGER4c), die Haustoriumhäufigkeit im Vergleich zur Kontrolle auf einen Wert von  $55 \pm 10$  % erniedrigte. Anhand dieses Beispiels konnte zumindest für 2 Gene, die zu einer gemeinsamen Subfamilie gehören, gezeigt werden, dass ihre Überexpression einen ähnlichen resistenzsteigernden Effekt hat.

Die Überexpression von *HvGER1a*, *HvGER3a* und *HvGER6a* führte zumindest in der Gerstensorte Pallas zu keinem resistenteren Phänotyp.

**Tab. 3.5** Transiente Überexpression von HvGER1-6 beeinflusst die Basalresistenz gegen Bgh. Absolute (AH) und relative (RH) Haustoriumhäufigkeit: Mittelwert  $\pm$  SEM von 5 (Serie A) von einander unabhängige Experimente (Exp). Int: beobachtete Interaktionen, entspricht der Anzahl aller GUS gefärbten Zellen der leeren Vektorkontrolle addiert mit der Anzahl aller GUS gefärbten Zellen des Testgens. p-Wert: Überprüfung auf signifikante Abweichung vom hypothetischen Wert 100 % mittels „one-sample t-Test“. n.s.=nicht signifikant.

Testgen/Reportergen	Serie	AH (%)	RH (%)	Exp	Int.	p (t-Test)
pIPKTA9 + pUbiGUS	A	$31 \pm 5$	100	5		
pHvGER4d + pUbiGUS	A	$14 \pm 2$	$48 \pm 4$	5	3048	0,0002
pHvGER1 + pUbiGUS	A	$23 \pm 5$	$79 \pm 13$	5	2822	n.s.
pHvGER2 + pUbiGUS	A	$17 \pm 2$	$58 \pm 10$	5	3140	0,01
pHvGER3 + pUbiGUS	A	$20 \pm 4$	$70 \pm 16$	5	2388	n.s.
pHvGER4c + pUbiGUS	A	$17 \pm 4$	$55 \pm 10$	5	3059	0,005

pHvGER5 + pUbiGUS	A	17 ± 4	55 ± 7	5	2645	0,002
pHvGER6 + pUbiGUS	A	20 ± 4	71 ± 13	5	2631	n.s.

Einige Gene mit resistenzsteigernder Wirkung wurden in einer weiteren Serie eingesetzt, zusammen mit den entsprechenden „*site-directed*“ Mutanten (s. 3.3.5.)

### 3.3.4 Untersuchung der Wirkung von RNA Interferenz (RNAi) der HvGER Gene auf die Resistenz epidermaler Zellen gegen *Blumeria graminis* fsp. *hordei*.

Northernblotanalysen (s. Abschnitt 3.2.4) haben gezeigt, dass die Gene der Subfamilien HvGER 3, 4 und 5 durch Bgh in der Epidermis induziert wurden und die Gene der Subfamilie HvGER2 konstitutiv in der Epidermis exprimiert waren. Durch „*gene-silencing*“ dieser Subfamilien sollte die Wirkung auf die Basalresistenz gegen Bgh untersucht werden. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen paralogen Genen einer Subfamilie, genügte es je ein Kandidatengen auszuwählen, um einen „*knock-down*“ einer Subfamilie zu gewährleisten. Für *HvGER1* und *HvGER6* wurde kein Transkript in der Epidermis nachgewiesen, daher wurde auf RNAi dieser Gene verzichtet.

Für die Erzeugung der RNAi Konstrukte (RNAi-HvGER2, RNAi-HvGER3, RNAi-HvGER4 und RNAi-HvGER5, s. Abschnitt 2.2.11) wurden ca. 500 bp lange DNA Stücke aus dem 5' un – und translatierten Genbereich der HvGER Gene mittels PCR amplifiziert. Diese wurden in den pIPKTA33 Vektor ligiert, gefolgt von Rekombinierung in den pIPKTA30N Vektor (Douchkov et al., 2005). Dabei zeigt sich die fertige Kasette wie folgt: CaMV 35S Promotor, HvGER Fragment in *sense* Richtung, *RGA2* Intron, HvGER Gen Fragment in *antisense* Richtung und der CaMV 35S Terminator (s. 2.2.11).

Die RNAi Experimente wurden in der Gerstensorte Golden Promise durchgeführt, da in einer Pilotstudie RNAi von *HvGER4* eine Hyperanfälligkeit dieser Sorte gegen Bgh verursachte (Christensen et al., 2004). Nach dem Bombardement wurden die Blätter erst nach zwei Tagen mit Bgh inokuliert, damit sich ein RNAi Effekt ausbilden konnte. Die GUS-Färbung der transformierten Epidermiszellen erfolgte auch hier 40 h nach dem Beschuß.

Tab. 3.6 zeigt den Effekt der pro Bombardement verwendeten RNAi Konstrukte auf die Basalresistenz. RNAi von *HvGER4* induzierte signifikant Hyperanfälligkeit. Dieser Effekt stimmt mit früheren Ergebnissen überein (Christensen et al., 2004). Die relative Haustoriumhäufigkeit für RNAi-HvGER4 lag bei 145 ± 11 %. Im Gegensatz dazu führte

RNAi von *HvGER3* und *HvGER5* zu gesteigerter Resistenz. Die relative Haustorimformation für RNAi-HvGER3 lag bei  $56 \pm 11$  % und für RNAi-HvGER5 bei  $70 \pm 7$  %. RNAi von *HvGER2* blieb hingegen wirkungslos auf die Basalresistenz.

„Pooling“ Experimente ergaben, dass bei Kombinationen mit einem weiteren oder mehreren RNAi-Konstrukten pro Bombardement die Effizienz von RNAi deutlich zurückgeht (Douchkov et al., 2005), daher wurden hier die Konstrukte nur einzeln getestet.

**Tab. 3.6** Wirkung des RNAi Effekts auf die Resistenz epidermaler Zellen gegen *Blumeria graminis* fsp. *hordei*. Die RNAi Konstrukte wurden in die Epidermis mittels Goldpartikel bombardiert. Nach 48 h erfolgte die Inokulation mit Bgh und nach weiteren 40h die GUS-Färbung der transformierten Epidermiszellen. **pIPKTA30N** = leerer Vektor, auf 100% gesetzt, **RNAi-HvGER4** (Christensen et al., 2004) und **pHvSNAP34** (Douchkov et al., 2005) = positive, interne Kontrollen, **AH** und **RH**: absolute und relative Haustoriumhäufigkeit, **Exp**: Anzahl unabhängiger Experimente. **Int**: gezählte Interaktionen, entspricht der Anzahl aller GUS-gefärbten Zellen des leeren Vektors (pIPKTA30N) und den GUS-gefärbten Zellen des Testgens. **p-Wert**: Überprüfung auf Signifikants mittels „one sample t-Test“.

Testgen/Reportergen Konstrukte	AH (%)	RH (%)	Exp.	Int.	p (t-Test)
pIPKTA30N + pUbiGUS	$16 \pm 5$	100	5		
HvSNAP 34 + pUbiGUS	$42 \pm 7$	$257 \pm 35$	3	1835	0,02
RNAi-HvGER2 + pUbiGUS	$13 \pm 3$	$107 \pm 33$	5	1832	n.s.
RNAi-HvGER3 + pUbiGUS	$9 \pm 4$	$56 \pm 11$	5	1913	0,02
RNAi-HvGER4 + pUbiGUS	$19 \pm 7$	$145 \pm 11$	4	1820	0,02
RNAi-HvGER5 + pUbiGUS	$12 \pm 2$	$70 \pm 7$	4	1884	0,03

Das Gen *HvSNAP34* kodiert für ein tSNARE Protein, welches für die papilläre Resistenz der Gerste benötigt wird (Collins et al., 2003). *HvSNAP34* stand als RNAi-Konstrukt (Douchkov et al., 2005) in diesen Versuchen als weitere interne Positivkontrolle zu Verfügung um zu prüfen, ob der RNAi Effekt im Blatt generell funktionierte. Wie das Ergebnis deutlich veranschaulicht, führt RNAi von *HvSNAP34* zu einer starken Hyperanfälligkeit.

### 3.3.5 „Site directed“ Mutagenese

Wie die Daten oben gezeigt haben führte Überexpression von Mitgliedern der HvGER Subfamilien 2, 4 und 5 zu einem resistenteren Phänotyp. In dem nachfolgenden Experiment sollte daher die interessante Frage geklärt werden, ob die vermuteten katalytischen Aktivitäten dieser drei HvGER Proteine zur Erhöhung der Basalresistenz gegen Mehltau benötigt werden (s. 3.3.5.1). Daher wurde für *HvGER2a*, *HvGER4d* und *HvGER5a* eine Mutation im vermuteten katalytischen Zentrum des kodierenden Proteins eingefügt. Die Mutagenese führte zum Austausch eines der drei konservierten Histidinreste (H) gegen ein Serinrest (S) (Beschreibung der Methode s. 2.2.13). Zur Erinnerung, die drei Histidinreste binden  $Mn^{2+}$ , welches für die enzymatische Aktivität benötigt wird (Woo et al., 2000) Durch den Austausch mit Serin wurde erwartet, dass die Bindung für  $Mn^{2+}$  nicht mehr erfolgen kann und die enzymatische Aktivität eliminiert wird, ohne die Polarität der Seitenketten signifikant zu verändern.

Zusätzlich wurden als Kontrollen *GF-2.8* und *HvGER1* verwendet. Auch für diese kodierten Proteine mit Oxalatoxidaseaktivität erfolgte der Austausch eines Histidinrests gegen ein Serinrest. Die mutierten Formen werden als HvGERxxxS bezeichnet, wobei (xxx) die Stelle nach dem Startcodon kennzeichnet, bei welcher der Aminosäureaustausch erfolgte.

#### 3.3.5.1 Funktionale Untersuchung zur Auswirkung von Mutationen im aktiven Zentrum der HvGER Proteine auf die Pathogenabwehr

Die nicht-mutagenisierten Gene *HvGER2a*, *HvGER4d* und *HvGER5a*, sowie die mutagenisierten Gene *HvGER2a(H103S)*, *HvGER4d(H110S)* und *HvGER5(H109S)* lagen im pIPKTA9 vor, und wurden für transiente Überexpressionsstudien in der Gerste verwendet. Die Konstrukte wurden zusammen mit dem Reporter gen pUbiGUS auf Mikroprojekteile gefällt und in die Blattepidermis der Gerstensorte Pallas bombardiert. Auch hier erfolgte 4h nach Bombardement die Inokulation mit *B. graminis* f.sp. *hordei* und 40h post Bombardement die GUS-Färbung und Zählung der Interaktionen unter dem Mikroskop.

Wie in Tab. 3.7 dargestellt, führt Überexpression der mutagenisierten HvGER Gene zum Verlust der Basalresistenz epidermaler Zellen gegen Bgh. Besonders verdeutlichen pHvGER4d(H110S) und pHvGER5a(H109S) die erhöhte Anfälligkeit gegen Bgh. Die Werte der relativen Haustoriumformation liegen signifikant über denen der Wildtypgene. Interessanterweise führte Überexpression von pHvGER5a(H109S) sogar zur

Hyperanfälligkeit im Vergleich zum leeren Vektor pIPKTA9. Für die Wildtypformen der HvGER Gene konnte der zuvor in Serie A (s. Abschnitt 3.3.3) beobachtete resistenzerhöhende Effekt bestätigt werden, außer für *HvGER2a*, was später diskutiert werden soll.

**Tab. 3.7** Transiente Überexpression der Wildtyp und mutierten Formen der HvGER Gene und ihre Wirkung auf die Basalreistenz. **AH** und **RH** = Mittelwerte  $\pm$  SEM der absoluten und relativen Haustoriumhäufigkeit berechnet aus 4 von einander unabhängigen Experimenten (**Exp**). **Int** = Anzahl der Interaktionen, **P** = ungepaarter t-Test (aus Vergleich Wildtyp *versus* mutierter Form); n.s. = nicht signifikant.

Transgen/Reportergen Konstrukt	Serie	AH (%)	RH (%)	Exp	Int.	P (t Test)
pIPKTA9 + pUbiGUS		33 $\pm$ 2	100	4		
pHvGER2a + pUbiGUS	B	32 $\pm$ 4	98 $\pm$ 6	4	2268	
pHvGER2aH103S + pUbiGUS		40 $\pm$ 8	122 $\pm$ 19	4	2100	n.s.
pHvGER4d + pUbiGUS	B	25 $\pm$ 2	76 $\pm$ 5	4	2721	
pHvGER4dH110S + pUbiGUS		35 $\pm$ 1	106 $\pm$ 13	4	2351	0,033
pHvGER5a + pUbiGUS	B	25 $\pm$ 4	76 $\pm$ 11	4	1979	
pHvGER5aH109S + pUbiGUS		41 $\pm$ 3	125 $\pm$ 2	4	2192	0,002

### 3.4 Expression der *HvGER* Gene in *Arabidopsis thaliana*

Die Gene der Wildtypformen *HvGER2a*, *HvGER4d* und *HvGER5a* sowie die der mutierten Formen, *HvGER2a(H103S)*, *HvGER4d(H110S)* und *HvGER5a(H109S)* wurden in *Arabidopsis thaliana* ektopisch exprimiert. Für das Weizengerminen *GF-2.8* konnte bereits eine erfolgreiche Expression in transgenen Dicotyledonen verzeichnet werden (Berna and Bernier, 1997; Donaldson et al., 2001, Livingstone et al., 2005), sodass *GF-2.8* und *GF-2.8 (H112S)* als positive Kontrollen verwendet werden konnten.

Durch Expression der ausgewählten *HvGER* Gene sollte geprüft werden, ob nach erfolgter Punktmutation eine intakte und stabile hexamere Proteinstruktur ausgebildet wird. Damit kann überprüft werden, ob die Punktmutation eine Akkumulation des stabilen Proteins im transienten Expressionssystem der Gerste beeinflusst. Zusätzlich sollte anhand der entsprechenden rekombinanten Proteine untersucht werden, welche der *HvGER* Vertreter Oxalatoxidase - oder Superoxiddismutaseaktivität besitzen.

Die oben genannten *HvGER* Vertreter (Wildtyp - und mutierte Form) lagen zunächst im Vektor pIPKTA9 vor. Nach Restriktion wurde die vollständige Überexpressionskassette ( $35S_{\text{Prom}}\text{-HvGER-}35S_{\text{Term}}$ ) in den binären Vektor pBINPLUS übertragen. Die Transformation des binären Vektors erfolgte anschließend in *Agrobacterium tumefaciens* (s. 2.2.14 und 2.2.15).

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch *Agrobacterium* -vermittelten Gentransfer. Die Samen von diesen transformierten Pflanzen wurde auf  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin enthaltendem Medium angezogen und die Pflanzen, welche die Selektion überlebten, wurden auf Erde übertragen. Die erste so erzeugte potentiell transgene Pflanzengeneration wird als  $T_0$ -Generation bezeichnet. Von den  $T_0$  transgenen Pflanzen wurde vorläufig noch keine  $T_1$ -Generation erzeugt. So liegen demzufolge noch keine Segregationsanalysen und noch keine homozygote Linien vor. Der vorläufige Verzicht auf homozygote Linien kann vor allem dadurch begründet werden, dass zunächst eine Untersuchung der rekombinanten *HvGER* Proteine im Vordergrund stand. Die  $T_0$ -Pflanzen genügten dem Anspruch ein Expressionssystem für das rekombinante Protein zu sein.

Insgesamt wurden 8 Transformationen in *Arabidopsis* durchgeführt, resultierend in kanamycinresistenten, transgenen  $T_0$ -Pflanzen, welche jeweils das *GF-2.8*, das *HvGER2a*, das *HvGER4d*, das *HvGER5a* Protein oder das *GF-2.8(H112S)*, das *HvGER2a(H103S)* -, das *HvGER4d(H110S)*, das *HvGER5a(H109S)* Protein exprimieren. Da die rekombinanten Proteine erwartungsgemäß in quantitativ unterschiedlichen Mengen in jeder transgenen Pflanze exprimiert werden, wurden von jeder Transformation jeweils 10  $T_0$ -Pflanzen

ausgesucht und das Blattmaterial für die Proteinextraktion gesammelt. Rekombinante und endogene Proteine wurden mit einer Methode extrahiert, die säurelösliche, apoplastische Proteine anreichert (s. 2.2.18). Dieses Extrakt wurde direkt für Westernblotanalysen verwendet.

### 3.4.1 Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine GF-2.8 und GF-2.8(H112)

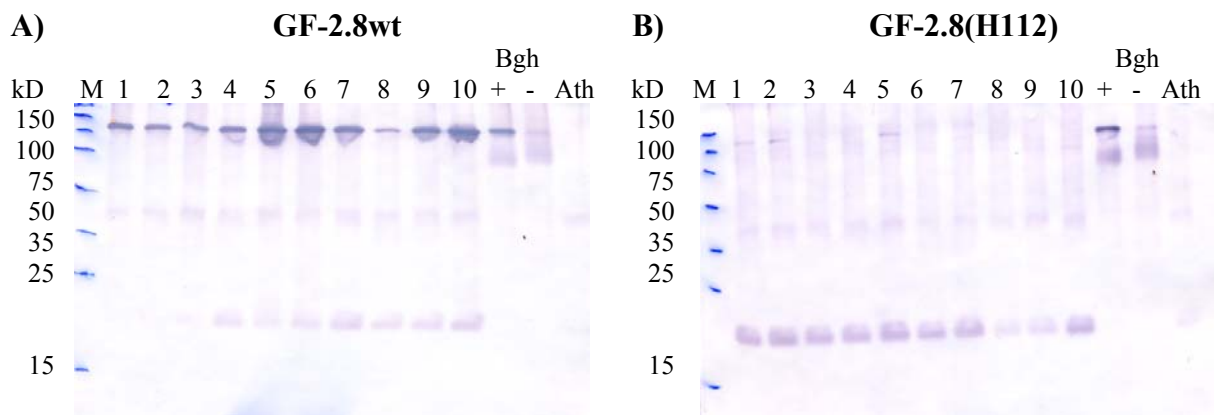
Die Oxalatoxidase aus Weizen (GF-2.8) ist die bisher am besten untersuchte GLP-Subfamilie. Die Expression des *GF-2.8* Gens in transgener *A. thaliana* und die Westernblotanalyse des rekombinanten Proteins diente in diesem Versuch als Standard für die Analysen der HvGER Proteine. Das Auftrennen der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte unter seminativen Bedingungen. Seminativ heißt, dass die Proteine vor dem Auftragen auf das Gel nicht durch Hitze denaturiert und nicht mit einem reduzierenden Agent wie z.B. Mercaptoethanol oder DTT versetzt wurden (Wei et al., 1998). Allein durch den SDS-Anteil im Polyacrylamidgel wurden teilweise denaturierende Bedingungen (seminativ) hergestellt.

Unter diesen Bedingungen migrieren GF-2.8, HvGER1 und HvGER4 als Homohexamere, was als ein diagnostisches Merkmal für GLP Proteine genutzt wird (Lane et al., 1992; Vallelan-Bindschedler et al., 1998a, Christensen et al., 2004). Nach dem Übertragen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte der Nachweis durch den primären polyklonalen anti-HvGER1 Antikörper aus Kaninchen. Da zwischen dem GLP1 Protein aus Weizen (GF-2.8) und dem aus Gerste (HvGER1) eine Sequenzidentität von über 95% besteht (Dumas et al., 1993), konnte das rekombinante GF-2.8 Protein durch den primären Antikörper anti-HvGER1 problemlos nachgewiesen werden.

Das Ergebnis der Westernblotanalyse wird in Abb. 3.17 A + B) gezeigt. Interessanterweise kann das Expressionssystem *Arabidopsis thaliana* die native Homohexamerstruktur von GF-2.8 ausbilden, wie hier mit Extrakten aus 10 verschiedenen T<sub>0</sub>-Pflanzen gezeigt ist (Abb. 3.17 A). Das Hexamer ist deutlich als Bande mit einer molekularen Masse von ca. 100 kD detektierbar. Neben dieser Bande ist auch die Bande der monomeren Struktur, allerdings mit einer deutlich schwächeren Signalintensität, beobachtbar. Die molekulare Masse liegt hier bei 22-23 kD. Eine intermediäre Form mit einer Größe von ca. 40 kD ist ebenfalls detektierbar. Jedoch dominiert eindeutig die Hexamerstruktur. Die unterschiedlich starken Signalintensitäten zwischen den Banden (der



Hexamerstruktur) sprechen dafür, dass die rekombinanten Proteine in den einzelnen T<sub>0</sub>-Pflanzen unterschiedlich stark akkumulieren.



**Abb. 3.17** Westernblotanalyse rekombinanter GF-2.8 Proteine in *Arabidopsis thaliana*. Detektion von GF-2.8 Protein (A) oder GF-2.8(H112) Protein (B), isoliert aus Blättern von primären transgenen Pflanzen der T<sub>0</sub>-Generation. Es wurden 5 µg Protein pro Spur aufgetragen und in einem 12 % - Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die rekombinanten Proteine wurden unter Verwendung des primären polyklonalen anti-HvGER1 Antikörper aus Kaninchen und des sekundären anti-Kaninchen IgG Antikörper aus Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, detektiert (Verdünnung beider Antikörper 1:2000). **M**: Molekularer Massenmarker für Proteine, **1 bis 10**: Entsprechen den Proteinextrakten aus Blättern von 10 Einzelpflanzen (T<sub>0</sub>1 bis T<sub>0</sub>10), **Bgt +**: Protein isoliert aus Weizenblätter inokuliert mit dem Weizenmehltau, **Bgt -**: Protein isoliert aus nicht-inokulierten Weizen, **Ath**: Protein isoliert aus *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp: Columbia) Wildtyppflanzen

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Daten der Westernblotanalyse der GF-2.8(H112S) Proteine (Abb. 3.17 B) deutlich von denen der GF-2.8 Proteine. Hier wurden die Monomere (22-23 kD) als Bande mit der stärksten Signalintensität detektiert. Die hexamere Struktur der GF-2.8(H112S) Proteine war hingegen kaum noch nachweisbar. Eine Ausnahme zeigt das rekombinante Protein, welches aus den T<sub>0</sub>1, T<sub>0</sub>2 und den T<sub>0</sub>5-Pflanzen isoliert wurde.

Zusammenfassend wurde anhand der Westernblotanalysen gezeigt, dass unter seminativen Bedingungen in der SDS-PAGE für die Wildtypform des GF-2.8 Proteins vorrangig eine hexamere Struktur, für die mutierte Form des gleichen Proteins aber vorrangig die monomere Struktur detektiert war.

Als Kontrollen wurden die Proteinextrakte aus Weizen inokuliert mit *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, und aus nicht-inokuliertem Weizen sowie aus *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen verwendet. Wie erwartet wies der Antikörper anti-HvGER1 die endogenen GF-2.8 Proteine in Weizen nach, dessen Akkumulation durch das Pathogen induziert

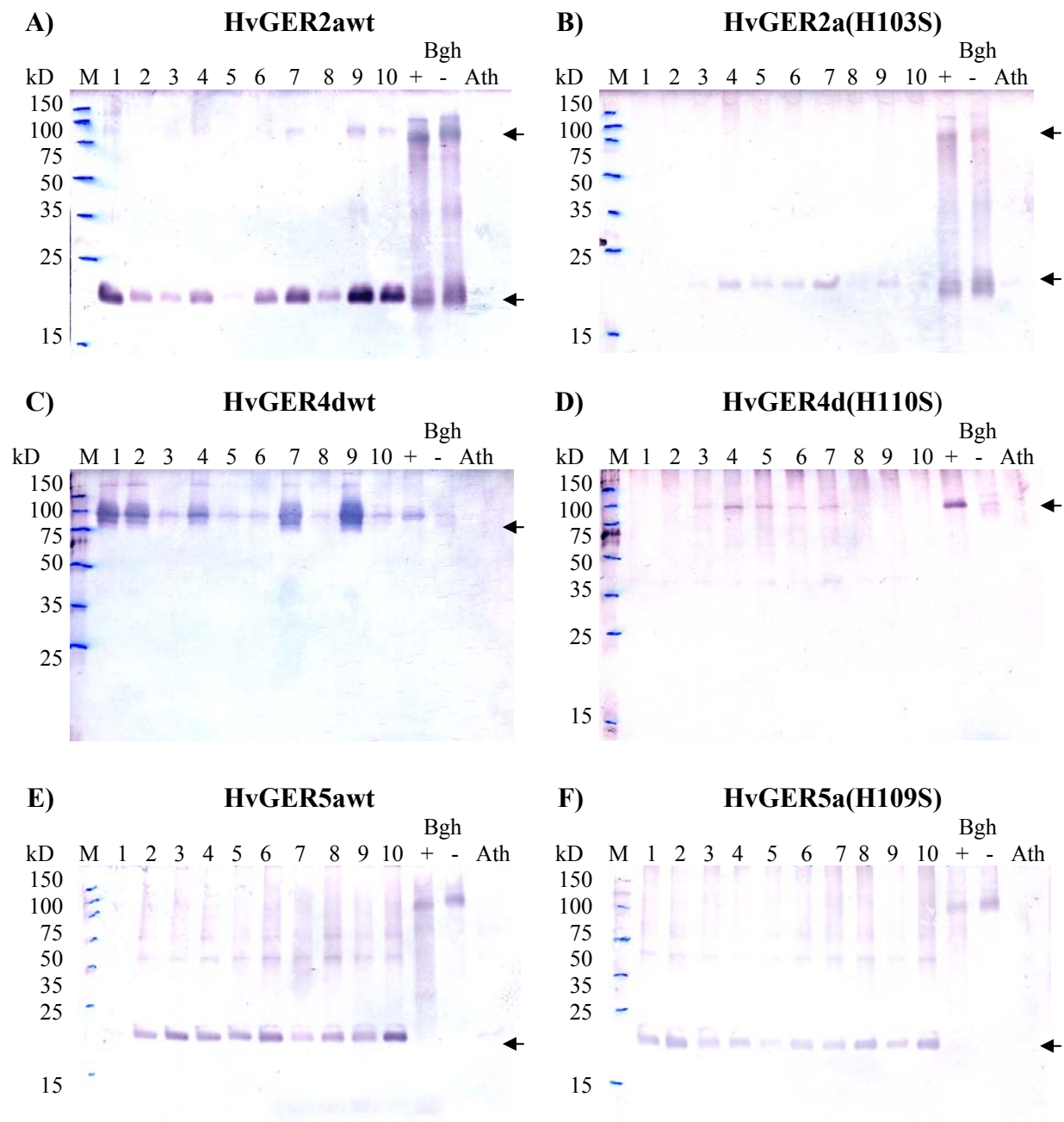
wurde. Kreuzreaktionen zwischen den endogenen GLP Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* und dem anti-HvGER1 Antikörper wurden nicht beobachtet (Spur „Ath“). Daher kann geschlossen werden, dass ein spezifischer Nachweis der rekombinanten Proteine GF-2.8 und GF-2.8(H112S) in *Arabidopsis* (der T<sub>0</sub>1 bis T<sub>0</sub>10-Pflanzen) erfolgt ist.

### **3.4.2 Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine HvGER2a und HvGER2a(H103S)**

Die rekombinanten Proteine HvGER2a und HvGER2a(H103S) wurden aus Blättern von jeweils 10 Einzelpflanzen der T<sub>0</sub>-Generation extrahiert. Unter seminativen Bedingungen wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion der rekombinanten Proteine HvGER2a und HvGER2a(H103S) erfolgte durch den primären polyklonalen anti-HvGER2 Antikörper aus Kaninchen und durch den sekundären anti-Kaninchen IgG Antikörper aus Ziege konjugiert mit alkalischer Phosphatase. In Abb. 3.18 werden die detektierten Signale für die Proteinextrakte HvGER2a (s. A) und HvGER2a(H103S) (s. B) gezeigt. Für das HvGER2a Protein wurden intensive Signalstärken beobachtet, besonders für die Banden, welche der monomeren Struktur des Proteins mit einer Größe von ca. 22-23 kD entsprechen. Nennenswert ist, dass eine hexamere Proteinstruktur (ca. 100 kD) ebenfalls nachgewiesen wurde. Sie war nur dann detektierbar, wenn für die entsprechende monomere Struktur ein sehr intensives Signal beobachtet wurde. Es handelte sich dabei um Pflanzen mit stärkerer Proteinakkumulation, was am Beispiel der Spuren 7, 9 und 10 gezeigt ist.

Im Gegensatz dazu wies der Westernblot der mutierten Form, HvGER2a(H103S), nur schwache Signale auf. Dies deutet darauf hin, dass die mutierte Form in den transgenen Pflanzen weniger stark akkumulierte, möglicherweise ist die mutierte Form instabil.

Als Kontrollen wurden Proteinextrakte aus Gerstenblättern inokuliert mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* respektive aus nicht- inokulierten Gerstenblättern, sowie aus *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen (Ökotyp Columbia) verwendet. Das Ergebnis zeigt, dass sowohl in inokulierten als auch in nicht-inokulierten Gerstenblättern das endogene HvGER2 Protein durch den Antikörper anti-HvGER2 detektiert wurde (Abb.3.19 A und B). Kreuzreaktionen zwischen den endogenen GLP Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* und dem anti-HvGER1 Antikörper wurden nicht beobachtet (Spur „Ath“).



**Abb. 3.18** Westernblotanalyse rekombinanter HvGER Proteine in *Arabidopsis thaliana*. Detektion der HvGER2a Proteine (A), der HvGER2a(H103S) Proteine (B), der HvGER4d Proteine (C), der HvGER4d(H110S) Proteine (D), der HvGER5a Proteine (E) und der HvGER5a(H109) Proteine (F). Die Proteine wurden aus Blättern von je 10 transgenen Pflanzen der T<sub>0</sub>-Generation extrahiert. Pro Slot wurden 5 µg Protein in einem 12 % SDS - Polyacrylamidgel unter seminativen Bedingungen aufgetrennt. Die Immunodetektion der Proteine erfolgte für (A+B) unter Verwendung des primären polyklonalen anti-HvGER2 Antikörper aus Kaninchen (Verdünnung 1:2000, Inkubationszeit 2h bei RT), für (C+D) unter Verwendung des primären polyklonalen anti-HvGER4 Antikörper aus Kaninchen (Verdünnung 1:1000, Inkubationszeit 16 h, 4°C) und für (E+F) unter Verwendung des primären anti-HvGER1 Antikörpers (Verdünnung 1:2000, Inkubationszeit 2h bei RT). **M**: Molekularer Massenmarker für Proteine, **1 bis 10**: Proteinextrakte aus Blättern von 10 Einzelpflanzen (entspricht T<sub>0</sub>1 bis T<sub>0</sub>10), **Bgh +**: Protein isoliert aus Gerstenblättern inokuliert mit dem Gerstenmehltau, **Bgh -**: Protein isoliert aus nicht-inokulierter Gerste, **Ath**: Protein isoliert aus *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen (Ökotyp: Columbia).

### **3.4.3 Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine HvGER4d und HvGER4d(H110S)**

SDS-PAGE und Westernblotanalyse wurden unter den Bedingungen wie oben bereits beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis der Westernblotanalyse der Proteine HvGER4d und HvGER4d(H110S) isoliert aus jeweils 10 transgenen Pflanzen ist in Abb. 3.18 C und D gezeigt.

Dabei waren deutliche Unterschiede in den Signalintensitäten ersichtlich, was für eine verschieden starke Akkumulation der rekombinanten HvGER4d Proteine zwischen den transgenen Einzelpflanzen spricht (Abb. 3.18 C). Interessanterweise sind hier nur die Banden detektierbar, welche der hexameren Struktur (bei einer Masse von ca. 100 kD) des Proteins entsprechen (Abb. 3.18 C und D). Abb. D zeigt nur sehr schwache Signalintensitäten verglichen zu (C). Es scheint die Tendenz zu bestehen, dass das mutierte HvGER4d(H110S) Protein in den transgenen Pflanzen weniger stark akkumulierte. Wie im Fall des HvGER2a(H103S) Proteins muß vermutet werden, dass die eingeführte Mutation das Protein destabilisierte.

Die unter Abschnitt 3.4.2 erwähnten Kontrollen wurden auch für dieses Experiment verwendet. Das Ergebnis zeigt, dass das endogene HvGER4 Protein in inokulierter Gerste nachgewiesen wird, nicht aber in nicht-inokulierten Gerstenblättern. Dies spricht dafür, dass nicht nur das HvGER4 Transkript, sondern auch das Protein nach Bgh-Befall akkumuliert. Kreuzreaktionen zwischen den endogenen GLPs aus *Arabidopsis thaliana* und dem anti-HvGER4 Antikörper wurden nicht beobachtet (Spur „Ath“), somit ist ein spezifischer Nachweis der rekombinanten Proteine HvGER4d und HvGER4d(H110S) in *Arabidopsis* (der T<sub>0</sub>1 bis T<sub>0</sub>10-Pflanzen) erfolgt.

### **3.4.4 Westernblotanalyse der rekombinanten Proteine HvGER5a und HvGER5a(H109S)**

Die Detektion der auf die Nitrozellulosemembran geblotteten Proteine HvGER5a und HvGER5a(H109S) erfolgte mit dem anti-HvGER1 Antikörper aus Kaninchen und dem sekundären anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege konjugiert mit alkalischer Phosphatase. Die Detektion der Signale beruht hierbei auf Kreuzreaktion zwischen Antigen und Antikörper. Nach der Farbreaktion durch das BCIP/NBT Gemisch wurden deutliche Signale für die Banden beobachtet, welche der monomeren Struktur der HvGER Proteine entsprechen. Dies ist aus Abb. 3.18 E und F sowohl für die Wildtypform, als auch für die

mutierte Form des HvGER5 Proteins ersichtlich. Auch hier sind die dimeren, nicht aber die hexameren Strukturen des rekombinanten Proteins detektierbar. Wie erwartet, wird auch das endogene HvGER1 aus inokulierter Gerste nachgewiesen. Das Signal aus nicht-inokulierter Gerste deutet darauf hin, dass HvGER1 in Gerste weniger stringent reguliert ist als GF-2.8 in Weizen (s.h. Abb. 3.18). Kreuzreaktionen zwischen den endogenen GLP Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* und dem anti-HvGER1 Antikörper wurden nicht beobachtet (Spur „Ath“).

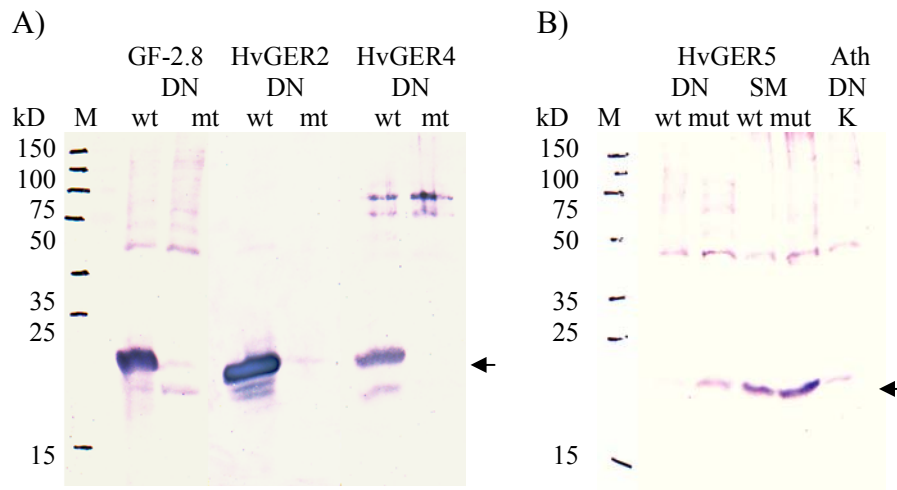
### **3.4.5 Nachweis der wildtyp- und der mutierten Formen der HvGER-Proteine unter denaturierenden Bedingungen**

In den oben erwähnten Westernblotanalysen wurde gezeigt, dass sich die hexamere als auch die monomere Struktur für die Wildtyp- und mutierte Form des rekombinanten Proteins je nach Zugehörigkeit zur entsprechenden HvGER Subfamilie ausbilden kann. Dies erschwert den Direktvergleich der gebildeten Proteinmengen in den transgenen Pflanzen. Hier soll untersucht werden, ob Unterschiede in der Menge des akkumulierten Proteins der Wildtypform respektive der mutierten Form vorhanden waren. Dazu wurde jeweils eine Probe pro Subfamilie aus wildtyp- und mutierter Form ausgewählt, welche in den Westernblotanalysen unter seminativen Bedingungen die größte Signalintensität gezeigt hatte. So wurde für GF-2.8 und GF-2.8(H112S) jeweils die Nr. 5 ausgesucht (Abb. 3.17), für HvGER2a die Nr. 9, für HvGER2a(H103S) die Nr. 7, für HvGER4d und HvGER4d(H110S) die Nr. 9 und 4, für HvGER5a und HvGER5a(H109S) die Nr. 10 und 2 (Abb. 3.18).

Die Westernblotanalyse wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. 5µg Protein wurden denaturiert, auf ein 12% iges SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Westernblotanalyse erfolgte unter Verwendung durch die unter Abschnitt 3.4.1 bis 3.4.4, Abb. 3.17 und Abb. 3.18 beschriebenen primären und sekundären Antikörper und unter den dort aufgeführten Bedingungen. Für die denaturierten Proteine wurde eine Bande in der Größenordnung von 22-23 kDa detektiert (durch Pfeil gekennzeichnet, Abb. 3.19 A und B). Dies liegt in Übereinstimmung mit vorangegangenen Ergebnissen (Christensen et al., 2004). Für die Wildtypform des GF-2.8, HvGER2a, HvGER4d Proteins wurde jeweils ein sehr deutliches Signal detektiert. Im Gegensatz dazu konnte die mutierte Form des Proteins kaum durch ein Signal detektiert werden. Die Ausnahme bildet HvGER5. Unter den denaturierenden

Bedingungen war zwar kaum ein Signal für die Wildtypform detektierbar, jedoch kann das rekombinante Protein der mutierten Form klar nachgewiesen werden.

Die schwächere Intensität der Signale für HvGER5a und HvGER5a(H109S) war wohl auf die nicht-optimale Erkennung von HvGER5a/(H109S) durch den anti-HvGER1 Antikörper zurückzuführen. Antikörper gegen HvGER2 und HvGER4 erkannten HvGER5a/(H109S) überhaupt nicht (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.19** Denaturierende Westernblotanalyse. 5µg Protein wurden denaturiert (mit 2µl Mercaptoethanol versetzt, für 10 min gekocht) und pro Slot aufgetragen. Die Erkennung der GF-2.8 Proteine erfolgte mit dem anti HvGER1 Antikörper, der HvGER2 Proteine mit dem anti HvGER2 Antikörper, der HvGER4 Proteine mit dem anti HvGER4 Antikörpers und der HvGER5 Proteine mit dem anti HvGER1 Antikörper und anschließend jeweils durch den sekundären Antikörper. Die Signale wurden unter Verwendung des BCIP/NBT Gemisches detektiert. GF-2.8, HvGER2, HvGER4 (A) HvGER5 (B) entsprechen den rekombinanten Proteinen, gekennzeichnet mit (wt) Wildtypform und (mt) mutierte Form. Ath als Kontrolle (K) entspricht dem Proteinextrakt aus *Arabidopsis thaliana*. M = Molekularer Marker, DN = denaturierende Bedingung, SM = seminataive Bedingung.

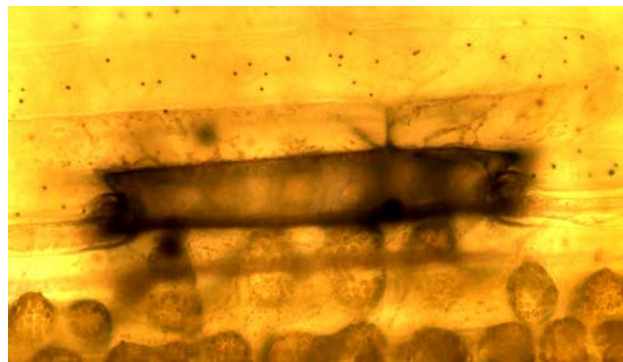
### 3.5 Nachweis enzymatischer Aktivität der HvGER Proteine

Alle Repräsentanten pro Unterfamilie, die als rekombinante Proteine vorlagen, wurden auf Vorhandensein von Oxalatoxidase - und Superoxiddismutase – Aktivität getestet.

#### 3.5.1 Test auf Oxalatoxidase Aktivität

Alle 6 HvGERs sowie die mutierte Variante HvGER1a(H112S), welche im Überexpressionsvektor pIPKTA9 vorlagen, wurden transient mittels biolistischem

Gentransfers in die Epidermis der Gerstensorte Ingrid exprimiert. (s. 2.2.12). Die Blätter wurden 24h nach Bombardement mit dem Oxalatoxidase-Puffer infiltriert (s. 2.2.20) und anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet. Pro Konstrukt wurden zwei von einander unabhängige Experimente durchgeführt. Bei der Untersuchung der 6 HvGERs konnte ausschließlich für das HvGER1 Protein Oxalatoxidase-Aktivität nachgewiesen werden. In Abb. 3.20 ist eine erfolgreich transformierte Epidermiszelle abgebildet. Die Aktivität des rekombinanten HvGER1 Proteins in der Epidermiszelle wird durch die Farbreaktion angezeigt. Eine Anhäufung der Farbe ist besonders an der Zellwand zu sehen, was für die Sekretion des HvGER1 Proteins in den extrazellulären Raum spricht. Dagegen konnte für die mutierte Variante HvGER1a(H112S) keine Oxalatoxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Für alle anderen mutierten HvGER Varianten wurde auf einen enzymatischen Nachweis verzichtet, da bereits für die nicht-mutierten Varianten keine enzymatische Aktivität detektiert werden konnte.



**Abb. 3.20** Nachweis von Oxalatoxidase-Aktivität für HvGER1 nach transienter Expression in Epidermiszellen. Mikroskopie im Durchlicht Hellfeld mit 200 facher Vergrößerung.

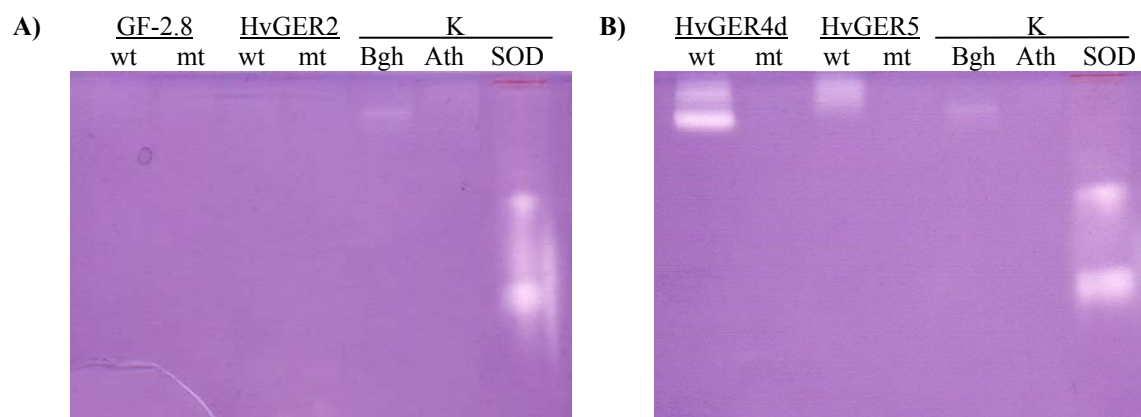
Zusätzlich zu der rekombinanten Enzymaktivität konnte eine Farbreaktion in den Leitbündeln der Blätter aufgrund der endogenen Oxalatoxidase (endogenes HvGER1) detektiert werden (wird hier nicht gezeigt) und diente somit als positive Kontrolle für die Funktion des Oxalatoxidasetests.

### 3.5.2 Test auf Superoxiddismutase-Aktivität

Das rekombinante Protein der unter Abschnitt 3.4.5 genannten und ausgewählten Proben sollte auf Superoxiddismutase (SOD) Aktivität untersucht werden. Dafür wurden 5µg Protein pro Slot auf einem 13% igen nicht denaturierenden Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in die SOD-Färbelösung überführt. Neben der bereits

bekannten SOD-Aktivität des HvGER4 Proteins (Chistensen et al., 2004) wurde hier neu für HvGER5 auch eine SOD-Aktivität im Gel detektiert (Abb. 3.21). Im Fall von GF-2.8, HvGER2 und HvGER4 lässt sich keine Aussage über die spezifische Aktivität der Mutanten herleiten, da die Proteine kaum gebildet wurden. Für HvGER5 lässt sich allerdings der Schluß ziehen, dass die Mutation (H109S) die enzymatische Aktivität des Proteins zerstörte ohne letzteres zu destabilisieren.

Für die positive Kontrolle (Bgh) und für die kommerzielle SOD wurden jeweils enzymatische Aktivitäten detektiert. Dagegen wird keine enzymatische Aktivität für die negative Kontrolle (Ath) detektiert.



**Abb. 3.21** Nachweis von Superoxiddismutaseaktivität im Gel (**A** + **B**) der HvGER Proteine. (**wt**) nicht – mutierte Variante und die dazu entsprechenden mutierten Varianten (**mt**): GF-2.8(H112S), HvGER2(H103S), HvGER4(H110S), HvGER5(H109S) der rekombinanten Proteine. **K** = Kontrollen: **Bgh** = Protein isoliert aus Gerste inokuliert mit Bgh, **Ath** = Protein isoliert aus nicht transformierter *A. haliana*, **SOD** = Superoxiddismutase aus Meerrettich (Sigma)



## 4. Diskussion

In meiner Arbeit wird erstmalig eine umfassende Übersicht zu den Germinen und GLPs aus *Hordeum vulgare* (HvGERs) präsentiert. Obwohl einige Daten über die HvGERs existieren, fehlen bis dato noch breitere Untersuchungen zu ihrer biologischen Funktion. Um das Bild dieser Multigenfamilie zu vervollständigen werden ausgehend von den Ergebnissen folgende Punkte diskutiert:

- Die Genevolution der HvGERs
- Die mögliche Rolle der HvGER Subfamilien in der Keimung und Keimlingsentwicklung, sowie in der abiotischen Stressantwort
- Die mögliche Rolle der HvGERs in der Stressantwort gegen Bgh
- Die enzymatische *versus* strukturelle Funktion der HvGER Proteine in der Resistenzantwort gegen Bgh

### 4.1 Diversität der GLP-Familien

Eine physikalische und genetische Kartierung von Germin-ähnlichen Genen der Gerste wurde erstmalig von Druka et al., 2002 durchgeführt und verschafft damit eine Übersicht über die Zahl der Subfamilien und deren Genmitglieder. Unter Verwendung der CR-EST Datenbank konnten in der vorliegenden Arbeit nicht nur 5 Subfamilien bestätigt werden (Druka et al., 2002), sondern es wurde auch eine 6. Subfamilie identifiziert und charakterisiert. Die neu entdeckte Subfamilie wird vorläufig durch ein Einzelgen in der Gerste vertreten. Für einige HvGER-Subfamilien konnte aufgrund des Zugriffs auf Sequenzen von EST-Datenbanken neue Mitglieder identifiziert werden.

In meiner Arbeit soll die Komplexität der GLP-Familien nicht nur in der Gerste, sondern auch in anderen Spezies, wie z.B. in Reis und *A. thaliana* untersucht werden (s. Abschnitt 3.1.5). In der Gerste wurde anhand von Sequenzvergleichen in der Datenbank TIGR für die HvGER Multigenfamilie 21 Gene vorhergesagt. Ähnlich komplex waren die identifizierten GLP Familien in Reis und *A. thaliana*. Während früher in *A. thaliana* 12 AtGLP Gene beschrieben wurden (Carter et al., 1998), konnten in meiner Untersuchung bereits 32 Gene anhand von Genmodellen aus der Datenbank TAIR vorhergesagt werden. Die Prognosen für *A. thaliana* scheinen am genauesten zu sein, da bereits im Jahr 2000 die erste Annotation von Genen für *A. thaliana* aufgrund des vollständig durchsequenzierten Genoms vorlag.

Für das Reisgenom konnten früher 6 verschiedene GLP Gene identifiziert werden (Membre and Bernier, 1998). Nach heutigem Stand wurden hier durch die Annotationen in der TIGR EST Datenbank bis zu 15 Gene vorhergesagt. Obwohl das Genom von Reis vollständig durchsequenziert ist, liegt die Annotation von Genen zur Zeit noch unvollständig vor, sodass ich nicht auf Genmodelle sondern auf EST-basierte *Tentative Consensi* (TC) im TIGR Genindex zurückgegriffen habe. Obwohl 15 TCs identifiziert wurden, kann nicht sicher zwischen Genen und Allelen unterschieden werden, da bei der Annotation die Genome zweier Subspezies (*Oryza sativa* ssp. *japonica* und ssp. *indica*) mit einbezogen wurden (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>).

Durch die Erstellung eines phylogenetischen Baumes habe ich die Zuordnung paraloger Gene zu Gruppen (Subfamilien) dargestellt (Abb. 3.3), was die Entstehung neuer Gene durch Duplikationsprozesse vermuten lässt. Die Identifizierung von putativen orthologen Subfamilien aus Gerste, Reis und *A. thaliana* wurde hier ebenfalls verdeutlicht. Genorthologie weist auf monophyletische Abstammung und funktionelle Konservierung der Gene zwischen den Spezies hin (Panopoulou et al., 2003).

#### **4.2 Die Bedeutung der Duplikation von HvGER Genen**

Duplikationen von Genen sind das Ergebnis von Duplikationen des gesamten Genoms (*large scale*), segmentaler Duplikation (Chromosomabschnitte) oder individueller Genduplikation (Davis and Petrov, 2005).

Für die HvGER Familie konnten zwei Subfamilien, HvGER4 und HvGER1, mit dem bisher größten Umfang an Genmitgliedern identifiziert werden. Die Gene innerhalb einer Subfamilie besitzen zueinander hohe Sequenzähnlichkeit, wie ich für HvGER4a, HvGER4b, HvGER4c und HvGER4d gezeigt habe (Abschnitt 3.1.4). Die vermuteten redundanten Funktionen der kodierten Proteine, wurden durch funktionelle Daten zumindest für HvGER4c und HvGER4d bestätigt (Abb. 3.5). Für die Gene der HvGER4 Subfamilie wurde gezeigt, dass sie als Gen-*Cluster* vorliegen und wahrscheinlich durch Tandemduplikationen aus einem Gen entstanden sind (Druka et al., 2002). Daraus ergibt sich die Frage: Welcher evolutionäre Vorteil wird durch die wiederholte Duplikation von Genen für eine Pflanze geschaffen?

Mehrere Duplikate eines Gens können die Fitness einer Pflanze erhöhen. Erfolgen deletierende Mutationen in einem Gen, so kann dieser Verlust durch die Funktion weiterer Genduplikate gepuffert werden, ohne dass das komplexe Netzwerk biologischer Funktionen in einer Pflanze beeinflusst wird (*genetic robustness*; Gu, 2003). Desweiteren

ermöglicht Genduplikation eine funktionelle Komplementation, sowie den Erwerb neuer Funktionen.

Wie unter anderem hier gezeigt wurde kodieren die Gene der Subfamilien HvGER1, HvGER4 und HvGER5 für Enzyme, welche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugen. Wie in meiner Arbeit noch ausführlicher diskutiert werden soll, führte die Überexpression zumindest von *HvGER4c*, *HvGER4d* und *HvGER5a* zu einer erhöhten Basalresistenz gegen Bgh. Durch Assoziation der HvGERs an die Zellwand und durch ihre Funktion als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildner können oxidative Quervernetzungen von Komponenten der Zellwand und der Papillen eingeleitet werden, was die Penetration des Pathogens erschweren kann. Eine Duplikation von Genen, welche für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugende Enzyme kodieren, kann daher die basale oder quantitative Resistenzantwort positiv beeinflussen. Kodieren mehrere duplizierte Gene für dasselbe Protein (z.B. Oxalatoxidase) besteht die Möglichkeit der mengenhaften Anreicherung, ohne dass ein extrem starker Promotor benötigt wird (*Gene Dosage*). Die Genduplikation würde so beitragen die Abwehrreaktion des Wirts zu verstärken.

Andererseits übernimmt Hydrogenperoxid eine Schlüsselfunktion in der Einleitung von Abwehrmechanismen. Eine Feinregulation dieses Signalmoleküls ist von großer Bedeutung, um Pflanzen vor oxidativem Stress und möglichen Zelltodreaktionen zu schützen. Durch die zeitlich und räumlich abgestimmte Expression mehrerer duplizierter Gene einer HvGER Subfamilie könnte die Bildung von Hydrogenperoxid feiner reguliert und den Entwicklungs - Gewebe- und Stress-bedingten Anforderungen besser angepasst werden.

Es besteht eine Tendenz, dass nach Genduplikation besonders häufig Gene mit abwehrverwandten Funktionen im Genom erhalten bleiben (Moore and Purugganan, 2005). So wurden in *A. thaliana* mehr als 150 und im Reis mehr als 300 R- (Resistenz) Gene identifiziert (kodierend für NB-LRR Proteine), welche oft durch Genduplikationsereignisse entstanden sind (Cannon et al., 2004). Durch Genduplikation und folgende positive Selektion für diverse Aminosäurereste in der LRR-Proteinerkennungsdomäne kann die Pflanze besonders schnell evolvierende neue Effektormoleküle bestimmter (wirtsspezifischer) Pathogene oder neue pathogene Rassen erkennen und die Abwehrantwort einleiten (Mondragon-Palomino et al., 2002). Dies definiert wahrscheinlich die spezifische Abwehrreaktion des Wirts gegen verschiedene pathogene Rassen (Rassenspezifische Resistenz). Somit können durch Genduplikation und positiver Selektion neue Funktionen zur Erkennung neuer Pathogener Rassen schneller evolviere.

#### 4.2.1 Subfunktionalität *versus* Neofunktionalität duplizierter Gene

Genduplikation, so wird weitestgehend angenommen, ist die Ursache für das Erscheinen neuer Gene (Ohno, 1970). Ohnos Hypothese besagt über das Schicksal duplizierter Gene, dass ein redundantes Duplikat entweder seine Funktionalität verliert (Pseudogen) oder eine neue Funktion übernimmt (Neofunktionalität). Sie besagt weiter, dass deletierende Mutationen häufiger vorkommen als Mutationen, die sich vorteilhaft auf die Genfunktion auswirken, und dass dadurch duplizierte Gene während der Evolution häufig wieder verloren gehen. Jedoch ist (1) die Zahl der duplizierten Gene, die während der Evolution entstanden sind, viel höher als durch diese Hypothese vorhergesagt wird, (2) bleiben diese Duplikate auch bewahrt und (3) haben die meisten der duplizierten Gene ihre Funktionalität behalten (Force et al., 1999). Hughes (1994) und Force (1999) erweiterten daher das klassische Modell indem sie eine Hypothese postulierten, die ein weiteres evolutioneres Schicksal für duplizierte Gene in Erwägung zieht (Duplikations-Degenerations-Komplementations-Modell; DDK). Degenerative Mutation in den regulatorischen Elementen duplizierter Gene kann die Chancen für eine Bewahrung der Duplikate erhöhen, indem z.B. beide an einer gemeinsamen Funktion beteiligt sind, welche das Vorfahrengen vor der Duplikation erfüllte (Subfunktionalität; Force et al., 1999).

Ich versuchte zu klären, ob funktionelle Konservierung zwischen den Genduplikaten einer HvGER-Subfamilie vorliegt, und ob Sub - oder/und Neofunktionalität aufgetreten sind. Nach dem Duplikationsereignis sind die meisten Duplikate noch redundant, jedoch erhöht sich mit dem Alter der duplizierten Gene deren Divergenz. Dies betrifft zum einen eine Divergenz in den regulatorischen Einheiten (d.h. Unterschiede in der Expression zwischen den Duplikaten) und zum anderen eine Divergenz in den kodierenden Sequenzbereichen (Li, et al., 2005).

Um Aufschlüsse über den Grad an funktioneller Konservierung der kodierenden Sequenzen zu erhalten wurden, pro HvGER Unterfamilie, die synonymen ( $K_s$ ) und nicht-synonymen Substitutionen ( $K_a$ ) zwischen den duplizierten Genen ermittelt (Tab. 3.3). Anhand der Ergebnisse wurde klar, dass die synonymen Substitutionen ( $K_s$ ) viel häufiger Vorkommen als die nicht-synonymen Substitutionen ( $K_a$ ). Dies spricht für konservierende Evolution der HvGER Proteine. Diese Beobachtung einer „*purifying selection*“ scheint die am häufigsten vorkommende Selektion duplizierter Gene zu sein (Nekrutenko et al., 2002). Da die Proteinsequenzen beibehalten werden lässt dies Rückschlüsse auf funktionelle Redundanz zu, wie innerhalb der HvGER4 Subfamilie hier gezeigt wurde.

Einzig im Fall von *HvGER1d* konnte eine positive Selektion im kodierenden Bereich zu den paralogen Genen *HvGER1a*, *HvGER1b*, *HvGER1c* beobachtet werden (Tab. 3.3). Diese Divergenz auf Proteinebene lässt partielle Neofunktionalität für *HvGER1d* vermuten.

Da innerhalb der meisten HvGER Subfamilien eine „*purifying selection*“ der Proteinsequenzen gefunden werden konnte wurde vermutet, dass eine Diversifizierung eher in den Promotorregionen erfolgte. Aufgrund dessen wurde unter Verwendung der *BarleyBase* Datenbank eine Transkriptanalyse für die HvGER4 Subfamilie durchgeführt (Abb. 3.16) welche zeigte, dass im Expressionsprofil der vier paralogen Gene trotz grundlegender Übereinstimmung bereits Abweichungen voneinander erkennbar waren. Expressionsdivergenz, so wurde vorgeschlagen, ist der erste Schritt zur Bewahrung von duplizierten Genen (Force, et al., 1999).

Interessanterweise wurde auf der Grundlage von Expressionsarray-Daten eine positive Korrelation zwischen der Expressionsdivergenz und der Divergenz von  $K_a$  von Genduplikaten aus Hefe gefunden, wenn  $K_a < 0,3$  ist (Gu et al., 2002). Für die meisten HvGER Subfamilien wurden  $K_a$ -Werte  $< 0,3$  gefunden, was auf Bewahrung dieser Genduplikate im Genom und auf funktionelle Bewahrung der kodierten Proteine hinweist.

Diese Expressionsdifferenzen lassen sich für einige HvGER Paraloge durch Sub- oder/und Neofunktionalität in der Promotorregion erklären. Für zwei paraloge Gene, *GerB* und *GerF* (*GerF* = *HvGER3a*) der HvGER3 Subfamilie wurde Subfunktionalität in den regulatorischen Elementen vorgeschlagen (Federico, et al., 2006). Für beide Gene wurden komplementäre gewebespezifische und entwicklungsspezifische Expressionmuster gezeigt.

Hingegen konnte hier für die paralogen *HvGER4* Gene ähnliche, aber kaum komplementäre Expressionsmuster detektiert werden (Abb. 3.16). Ich schlage daher vor, dass hier eher Neofunktionalität vorliegt. In der Neofunktionalisierung werden regulatorische Elemente in den Genduplikaten beibehalten, sowie neue erworben, während in Subfunktionalisierung die regulatorischen Elemente komplementär in den Duplikaten vorhanden sind (He and Zhang, 2004). Durch das Beibehalten des regulatorischen Grundmusters in den Duplikaten (gemeinsame Expressionsmuster) kann die Transkriptmenge für *HvGER4* in einem bestimmten Gewebe stärker angereichert und damit die Abwehrantwort gegen Bgh verstärkt werden: Alle vier *HvGER4* Gene waren Bgh-induziert (Abb. 3.16). Wahrscheinlich stellt Neofunktionalität, wie ich für die hier untersuchten 4 Gene vermute, eine evolutive Form für die genetische Robustheit dar. Hingegen scheint Subfunktionalität die genetische Robustheit nicht zu unterstützen. Eine deletierende Mutationen eines Genduplikates mit gewebespezifischer Expression könnte

die Fitness einer Pflanze supprimieren, wenn dieses Gen z.B. in der Entwicklung benötigt wird (*gene dosage effect*; Gu, 2003; Osborn et al., 2003).

Ferner kann durch den Erwerb neuer regulatorischer Funktionen, wie für einzelne *HvGER4* Gene vermutet wird, die zeitlich-räumliche Akkumulation der einzelnen Transkripte feiner abgestimmt werden (siehe oben), was einen Funktionsgewinn darstellt.

### **4.3 Expressionsstudien**

Mit Hilfe der Northernblotanalysen wurden nicht Einzelgene, sondern Unterfamilien mit allen dazu gehörenden Genmitgliedern untersucht. Die paralogen Gene einer Unterfamilie kreuzhybridisieren aufgrund hoher Sequenzähnlichkeiten. Eine genspezifische Analyse wurde nur durch Ableitung von Sonden aus dem 3'untranslatierten Bereich erreicht (Abb. 3.13). Aus diesem Grund genügte jeweils eine voll-Länge-Sonde pro Unterfamilie, um diese mit allen mRNA-Transkripten zu detektieren. Kreuzhybridisierungen zwischen den Unterfamilien wurde nicht gefunden (Abb.3.4) und es kann daher bei den einzelnen Northernblotanalysen von spezifischen Regulationsmustern pro Unterfamilie ausgegangen werden, die als solche diskutiert werden.

#### **4.3.1 HvGER Gene als Marker der frühen Keimlingsentwicklung**

In der Literatur existierten bis jetzt noch keine Publikationen über vollständige Untersuchungen, die einen Überblick über die Expression aller HvGER-Subfamilien während der Entwicklung von Gerstenkeimlingen vermitteln. Meine Untersuchungen zeigen, dass fast alle HvGER Unterfamilien in jungen Keimlingen exprimiert waren, einschließlich einer Expression im keimenden Samen.

Die erste Phase des Keimungsprozesses von trockenen (Weizen)-Embryonen ist durch eine rapide Wasseraufnahme (Quellung) gekennzeichnet. Die zweite Phase wird als der Beginn der Keimung gesehen, bei der die Reaktivierung des Metabolismus erfolgt und das Wachstum der Radikula des Embryos initiiert wird. In der dritten Phase erfolgt schließlich das enorme Wachstum der Radikula und der Koleoptile innerhalb des Samens, was hauptsächlich auf Zellelongation und weniger auf Mitose zurückzuführen ist. Mit dem Durchbrechen der Radikula durch die Samenschale ist die Keimung beendet und die Wachstumsphase des Keimlings beginnt, zunächst verbunden mit einem enormen Anstieg des Frischgewichts der Primärwurzel, hervorgerufen durch Zellelongation, wie auch durch Zellproliferation (Marcus, 1969; Lane, 1991b; Bewley and Black, 1997).

HvGER1, ein Oxalatoxidase, wurde als Marker für den Beginn der Keimung beschrieben (Lane et al., 1992). Eine Induktion von *HvGER1* 24 h nach dem Beginn des Quellens (was ca. der dritten Phase der Keimung entspricht) wurde auch hier gezeigt (Abb. 3.5, Abb. 3.6 und Abb. 3.7) und liegt in Übereinstimmung zu vorrangegangenen Berichten in welchen nicht nur das Transkript, sondern auch das Protein aufgrund seiner enzymatischen Aktivität in den Zellen der Coleorrhiza, des Epiblasten und des Scutellums im Embryo detektiert wurde (Caliskan et al., 1998). Für alle anderen HvGER Subfamilien habe ich kaum mRNA 24 h nach dem Beginn des Quellens detektiert, sodass HvGER1 wahrscheinlich den einzigen GLP-Marker dieser frühen Phase des keimenden Samens darstellt.

In der Wachstumsphase des Keimlings zeigen meine Ergebnisse nicht nur in der Wurzel, sondern auch in der Koleoptile erhöhte Transkriptakkumulation von *HvGER1*. Die erhöhte Akkumulation in diesen Geweben blieb auch in wachsenden Keimlingen bis zu 6 Tagen nach Beginn der Quellung konstant. Dies liegt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Caliskan et al., (1998). Bereits 48 h nach Beginn der Quellung wurde die enzymatische Aktivität von HvGER1 nicht nur in der Epidermis der Wurzel, sondern auch in der Epidermis und in den Leitbündelscheidezellen der Koleoptile nachgewiesen.

Meine Resultate zeigen, dass die Transkripte von *HvGER1* besonders in jungen Geweben mit intensivem Wachstum akkumulieren. Dies scheint zunächst im Widerspruch mit der Funktion der Oxalatoxidase als  $H_2O_2$ -erzeugendes Enzym zu stehen. HvGER1 befindet sich lokal an der EZM (Lane, 1994) und ist vermutlich aufgrund seiner enzymatischen Aktivität an oxidativen Quervernetzungsprozessen der Zellwand beteiligt, eine Funktion, die das Zellwachstum durch Zellwanderweiterung unterbinden würde.

Für HvGER1 wäre eine duale Funktion vorstellbar, in der es an der Initiation und der Termination der Zellwandstreckung beteiligt ist (Lane, 1994). Die Zellwand der Monocotyledonen wie z.B. der Gräser unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung von der Zellwand der Dicotyledonen (Carpita, 1996). Während der Zellwandstreckung werden für die Bildung der Primärwände in den Gräsern Zellulosemikrofibrillen und Hemizellulosen (vorallen die Glukuronarabinoxylane und die  $\beta$ -Glukane) benötigt. Eine enge Assoziation zwischen dem Weizengermin (homolog zum Gerstengermin HvGER1) und den Glukuronogalaktarabinoxylanen (GGAX) wurde von Jaikaran et al., (1990) gezeigt. Daher besteht die Annahme, dass das Germin als Chaperone und/oder für den Transport der GGAX an die Zellwand mit verantwortlich ist (Lane, 1994). GGAX stellt eine der Hauptquervernetzungssubstrate in der primären Zellwand vieler Monokotyledonen

dar (Carpita, 1996; Gibeaut et al., 2005). Es ist zu vermuten, dass HvGER1 durch Transport und Quervernetzung der GGAX in die primäre Zellwand die Streckung der Zellen beeinflusst. Eine Erklärung der hohen Expressionsintensitäten in Wurzel und Koleoptile von jungen Gerstenkeimlingen wäre so gegeben.

Andererseits ist neben Zellwandstreckung die Zellwandtermination ein besonders wichtiger Aspekt zur Vermeidung von unkontrolliertem Wachstum, oder zur Unterbindung von Wachstum in bestimmten Gewebestrukturen. So schlagen unter anderem Caliskan et al., (1998) vor, dass die Oxalatoxidase die Zellwandstreckung in wachsenden Geweben terminiert.

Die Koleoptile ist ein Gewebe mit enormem Streckungswachstum. Bekannt ist, dass Auxin das Elongationswachstum in den Koleoptilen z.B. von Hafer, Gerste und Mais stimuliert (Cleland, 1967; Sakurai and Masuda, 1978 Hoson and Nevins, 1989). Auxin induziert die Wasseraufnahme in der Koleoptile, was den Druck im Gewebe erhöht und eine Zellelongation unterstützt. Desweiteren induziert Auxin die Genexpression von z.B. Glykanasen, welche die Hydrolyse von Zellwandpolysacchariden katalysieren, was zur „Auflockerung“ der Zellwand führt. Diese Prozesse der Zellwandstreckung werden in der „acid-growth“ Theorie (Cleland, 1971) und der „enzym-linked cell wall loosening“ Theorie (Tanimoto and Masuda, 1968) beschrieben.

Für *HvGER1*, 2, 3 und 4 wurde erhöhte Transkriptakkumulation in der Koleoptile viertägiger Keimlinge detektiert (Abb. 3.6 und Abb. 3.7), allerdings stehen Promotor-Sequenzierungen zur Identifizierung möglicher auxinabhängiger regulatorischer Einheiten noch aus. Bisher wurde nur für das Weizengermin eine Erkennungsstelle für einen Auxin Transkriptionsfaktor in der Promotorregion identifiziert (Lane, 1991a; Berna and Bernier, 1997). Eine erhöhte Induzierbarkeit dieses Gens durch Auxin haben Caliskan et al., (2000) gezeigt. Dies und das Vorkommen einiger HvGER Proteine an der Zellwand und in Geweben mit enormen Streckungswachstum (Koleoptile) scheinen die Vermutung, dass HvGER1 an Zellwandelongations-Terminationsprozessen beteiligt sein könnte, zu bestätigen.

Ca. 48 Stunden nach Beginn der Quellung wurde insbesondere in der Epidermis von Wurzel und Koleoptile (wie oben erwähnt) erhöhte mRNA Abundanz für das Weizengermin nachgewiesen (Caliskan et al., 1998). Es ist hier erwähnenswert, dass die Epidermiszellen der Koleoptile, im Vergleich zu den Zellen des Mesophylls stark verdickte Zellwände besitzen (Carpita, et al., 2001). Obwohl die HvGER Gene in jungen Wurzeln und Koleoptile exprimiert waren (Abb. 3.6 und Abb. 3.7), wäre es hier interessant zu



prüfen, ob diese auch epidermisspezifisch vorkommen. Möglicherweise könnten damit Einblicke über die Beteiligung der HvGER Subfamilien in der Zellwandverstärkung vertieft werden. Vermutlich kann Zellwandverstärkung zu zwei Phänomene führen, zum einen zur Termination der Zellwandstreckung und zum anderen zu einer erhöhten Abwehr gegen zellwandpenetrierende Pathogene.

Dies führt zu einem weiteren möglichen Aspekt einer erhöhten Transkripthäufigkeit von HvGER Genen während und nach der Keimung, nämlich einer gesteigerten Abwehrbereitschaft des Keimlings gegen (bodenbürtige) Pathogene und Schädlinge. Zunächst umhüllen Spelzen den wachsenden Gerstenembryo und können daher auch als ein mechanischer Schutz gegen Pathogene verstanden werden. Diese werden jedoch während der Keimung durch die Radikula durchbrochen und der Gerstenkeimling ist direkt mit den bodenbürtigen Pathogenen konfrontiert.

Unmittelbar mit dem Erscheinen der Wurzel aus dem Samen (ca. 2 Tage nach Beginn der Quellung) habe ich in diesem Gewebe nicht nur für *HvGER1*, sondern auch für *HvGER5* und *HvGER6* erhöhte Transkriptmengen detektiert. Mit weiterem Wachstum der Wurzel wurden zusätzlich die Transkripte *HvGER3* und *HvGER4* detektiert (Abb. 3.6 und Abb. 3.7). Zumindest für *HvGER1*, *HvGER4* und *HvGER5* wäre als  $H_2O_2$ -Erzeuger eine antimikrobielle Wirkung vorstellbar.

Neben der Wurzel wird auch die Koleoptile direkt mit dem Bodenmilieu konfrontiert. Die Koleoptile umhüllt im Boden den Spross während und nach der Keimung. Sie bildet dadurch vermutlich einen Schutz des jungen Sprosses gegen bodenbürtige Pathogene bis dieser an die Oberfläche erscheint. Erst nach ca. 10 Tagen löste sich die Koleoptile vom Stengel von älterwerdenden Keimlingen ab. Eine Detektion der *HvGER3* und *HvGER4* Transkripte in der Koleoptile von 4 bis 8 Tage alte Keimlinge könnte daher durch eine Schutzfunktion in Bodennähe für das meristematische, undifferenzierte Sprossgewebe gegen bodenbürtige Pathogene erklärt werden.

Als Einziges akkumulierte das *HvGER2* Transkript in den Primärblättern von 4-6 Tage alten Keimlingen und war weder in den nicht-grünen Geweben des Keimlings noch in den älter werdenden Keimlingen nachweisbar. *HvGER2* kodiert für eine ADP-Glukose Pyrophosphatase/Phosphodiesterase, deren biologische Funktion noch nicht bekannt ist (Rodriguez-Lopez et al., 2001). Auf jeden Fall kann *HvGER2* als Marker für junge, elongierende Primärblätter gesehen werden.

Neben den Keimlingen wurden auch die adulten Gerstenpflanzen auf eine Akkumulation der HvGER Transkripte untersucht (Abb. 3.7, Abb. 3.8 und Abb. 3.9). In

adulten Gerstenpflanzen, 1-2 Wochen nach der Blüte, wurde zunächst die *HvGER3* und *HvGER4* mRNA im oberen Nodium und Internodium detektiert, konnte aber in späteren Experimenten nicht reproduziert werden. Eine Induktion beider Gene durch Stress (z.B. Insektenfraß) ist also nicht auszuschließen, da die Pflanzen im Gewächshaus ohne Fungizid- oder Insektizidbehandlung angezogen wurden.

Im Gegensatz dazu liegt die *HvGER3* Expression, in den vegetativen und generativen Teilen der Blüte in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Wu et al. (2000) und Federico et al, (2006). Die nekrotrophen Pilze *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* verursachen in der Landwirtschaft hohe Schäden an Weizen und in geringerem Umfang an Gerste. Sie befallen die Ähren zum Zeitpunkt der Blüte, und die Körner werden für eine weitere Verarbeitung zu Mehl und Malz unbrauchbar. Bekannt ist die antipathogene Wirkung, die einige HvGER Proteine besitzen (Christensen, et al., 2004). Eine Expression von *HvGER3* in den vegetativen und generativen Reproduktionsorganen könnte daher den Befall durch diese Pilze mindern (Federico et al., 2006).

Anhand meiner Expressionsdaten konnte gezeigt werden, dass die meisten HvGER Subfamilien vorrangig in jungen Keimlingen, in den nicht-photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert werden, mit der Ausnahme von *HvGER2*, das in jungen grünen Blättern exprimiert ist. Da einige HvGER Proteine  $H_2O_2$  erzeugen (Dumas et al., 1993; Zhang et al., 1995; Christensen et al., 2004 und diese Arbeit) wäre zum einen eine Funktion zum Schutz gegen Pathogenbefall durch bodenbürtige Organismen und zum anderen eine Funktion zur Unterbindung von unkontrolliertem Wachstum in jungen, elongierenden Geweben vorstellbar.

#### **4.3.2 Beteiligung der HvGER Subfamilien an der Stressantwort**

Die HvGER Gene sind nicht nur in jungen Gerstenkeimlingen exprimiert, sondern werden auch von verschiedenen Stressoren induziert. Dabei zeigte sich, dass diese Gene vor allem durch biotischen Stress und weniger durch abiotischen Stress induziert wurden. Eine Inokulation der Gerstenblätter mit Bgh führte zu einer deutlichen Anhäufung von *HvGER1*, *HvGER3*, *HvGER4* und *HvGER5* Transkripten (Abb. 3.10 und Abb. 3.11).

Bei getrennter Betrachtung der Epidermis und der inneren Gewebe der Blätter fiel mir auf, dass die Mehrzahl (4 von 6) der HvGER Unterfamilien in inokulierter Epidermis exprimiert waren (Abb. 3.12). Interessanterweise ist Bgh ein biotropher Pilz, der sich ausschließlich in diesen Epidermiszellen des Wirts zu etablieren versucht.

Die Epidermis ist das äußere Abschlussgewebe einer Pflanze und somit diversen Stressfaktoren unmittelbar ausgesetzt. Wachsschichten auf der Epidermiszellschicht oder verdickte Epidermiszellwände stellen bereits präformierte Abwehrkomponenten der Pflanze bei einem Pathogenbefall dar (Heath, 2000; Thordal-Christensen, 2003). In diesem Zusammenhang könnte auch die Funktion einiger HvGER Proteine in der Epidermis verstanden werden: Als Komponenten für den Schutz vor Invasions/Penetrationsversuche durch Bgh oder anderer direkt penetrierender Pathogene via Verstärkung der Epidermiszellwand. Für diese Funktion spricht, dass die Expression der HvGER Gene in der Epidermis erfolgt und dass aufgrund des vorhergesagten Signalpeptides dieser Gene die entsprechenden Proteine direkt am Ort des Geschehens, der Epidermiszellwand, akkumulieren. In der Tat wurde HvGER2, als auch die GLPs aus anderen Spezies an der Zellwand lokalisiert (Berna and Bernier, 1997; Vallelian-Bindschedler et al., 1998a; Membre et al., 2000).

Von den HvGER Genen, die in Bgh-inokulierter Epidermis induziert waren, zeigten zwei der entsprechenden Proteine, HvGER4a und HvGER5a, eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generierende SOD-Aktivität (vorliegende Arbeit und Christensen et al., 2004). Es ist bekannt, dass Hydrogenperoxid zur oxidativen Quervernetzung von Zellwandkomponenten beiträgt, was wiederum zur Verstärkung der Zellwände führt (Lamb and Dixon, 1997). Ein Abwehrmechanismus vor Bgh-Befall, bei welchem die Zellwand involviert ist, ist die Bildung von Papillen (Zellwandverdickungen) unterhalb eines Apressoriums.

Für das *HvGER4* Transkript wurde gezeigt, dass es ausschließlich in der Epidermis exprimiert wird und, dass seine Akkumulation räumlich und zeitlich mit der Entwicklung der Papillen korreliert (Wei et al., 1998). Nach transienter Expression von *GF-2.8* (Weizengermin, homolog zu HvGER1) in Epidermiszellen des Weizens wurde eine erhöhte enzymatische Aktivität des rekombinanten Proteins in und um die Papillen nachgewiesen (Schweizer et al., 1999a). Ferner wurde eine Quervernetzung des GF-2.8 Proteins in den Papillen gefunden (Schweizer et al., 1999a).

Dies könnte bedeuten, dass GLP Proteine nicht nur Quervernetzungsreaktionen katalysieren, sondern selbst Vernetzungssubstrate darstellen. Diese wichtigen Eigenschaften der HvGER Proteine können es ermöglichen, dass eine Penetration nicht erfolgt oder bereits innerhalb der Epidermiszellwand blockiert wird. Untersuchungen, bei welchen Überexpression der HvGER Gene in der Epidermis zur Erhöhung der Resistenz gegen Bgh führten, scheinen diese Annahme zu bestätigen (vorliegende Arbeit).

Anders als die Expression der meisten HvGER Gene in der Epidermis, induziert durch Bgh-Befall, akkumulierte das *HvGER1* Transkript vorrangig im Blattinneren (Abb. 3.12). Bereits Zhou et al., (1998) haben eine Oxalatoxidaseaktivität im Mesophyll von Bgh-inokulierten Gerstenblättern nachgewiesen. Eine mögliche Rolle für HvGER1 im Mesophyll könnte eine Beteiligung dieser Oxalatoxidase an der hypersensitiven Reaktion (HR) darstellen, um den Nährstoffnachschub für Bgh einzuschränken.

Im Vergleich zu Bgh schienen die HvGER Gene durch *Bipolaris sorokiniana* kaum induziert zu werden (Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Wie bei Kumar et al. (2002) beschrieben, scheint die Gerste allerdings bei frühen Interaktionsstadien dieselben Abwehrmechanismen gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene zu verwenden. Zu diesen Abwehrmechanismen gehören Papillenbildung, Hydrogenperoxidakkumulation, sowie die Expression einiger PR-Gene. Zu den PR Proteinen gehören auch die Oxalatoxidasen und die Superoxiddismutasen, welche wahrscheinlich aufgrund ihrer Hydrogenperoxid-erzeugenden Aktivität mit an frühen Abwehrreaktionen beteiligt sind.

Während dieser frühen Interaktion ist der hemibiotrophe Pilz *B. sorokiniana* zunächst durch seine biotrophe Lebensweise charakterisiert. Er penetriert direkt die Kutikula und die Epidermiszellwand der Gerste und entwickelt schließlich Hyphen innerhalb einer einzelnen lebenden Epidermiszelle. Anschließend beginnt die nekrotrophe Wachstumsphase des Pilzes. Die Hyphen dringen in die Mesophyllschicht vor, und pilzliche Toxine verursachen den Zelltod beider Gewebeschichten. (Kumar et al., 2002).

Ich habe gezeigt, dass die HvGER Gene durch biotrophe Pilze wie Bgh induziert wurden. Da *B. sorokiniana* zu Beginn einer Infektion die Epidermiszellen des Wirts nicht tötet, kann hier eine Parallele zu den „echten“ biotrophen Pilzen gesehen werden. Ich vermute daher, dass nur in dieser frühen Interaktionsphase, in welcher *B. sorokiniana* biotroph lebt, einige HvGER Gene induziert werden konnten. Dagegen könnte der Wechsel von biotropher- zu nekrotropher Lebensweise und ein vorrangiges Wachstum des Pilzes im Mesophyll eine massive Induktion der HvGERs verhindern.

Bemerkenswert ist, dass zumindest drei von sechs HvGER-Unterfamilienstellverteter (HvGER1a, HvGER4d, HvGER5a) die Produktion von Hydrogenperoxid katalysieren. Hydrogenperoxid ist als Signalmolekül an den Abwehrreaktionen wie Induktion der PR-Genexpression, der Synthese von Phytoalexinen und der hypersensitiven Reaktion beteiligt. Die Rolle von Hydrogenperoxid in der Signalübertragung, welche zur Einleitung des Zelltods führt, wurde weitestgehend akzeptiert (Levine et al., 1994).

Im Gersten-Bgh Pathosystem war eine erhöhte Resistenz einiger Gerstensorten mit verstärkter  $H_2O_2$ -Akkumulation verbunden (Hückelhoven et al., 1999). Diese erhöhte Akkumulation kann in Abhängigkeit vom Genotyp zum hypersensitiven Zelltod von Epidermis- und/oder Mesophyllzellen führen und somit das Wachstum dieses biotrophen Pilzes einschränken (Hückelhoven et al., 1999). Im Gegensatz dazu scheint bei anderen Pathosystemen (Gerste-*Bipolaris sorokiniana*, Reis-*Magnaporthe grisea*) eine Akkumulation von Hydrogenperoxid eine Pathogenese zu begünstigen, da nekrotrophe oder hemibiotrophe Pilze die Zellen ihres Wirts töten, um Nährstoffe aufzunehmen (Kumar et al., 2001). Dies könnte erklären, weshalb die Expression der meisten HvGER Gene vor allem durch den biotrophen Pilz Bgh und kaum durch den hemibiotrophen Pilz *B. sorokiniana* induziert wurde.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Hydrogenperoxid, werden in der Pflanze als Antwort auf Pathogenbefall innerhalb kürzester Zeit massiv erzeugt (*oxidative burst*; Wojtasek, 1997). Nicht nur Bgh-Befall, sondern auch eine äußerliche Behandlung mit Hydrogenperoxid induzierte die Expression diverser HvGER Gene (Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Dies bedeutet, dass einige HvGER Proteine nicht nur eine Quelle zur  $H_2O_2$ -Erzeugung darstellen, sondern auch, dass das Produkt ( $H_2O_2$ ) über einen positiven Rückkoppelungsmechanismus die Induktion der HvGER Gene und die Bildung von weiteren Produktmengen fördert.

Neben den biotischen Stressoren induzierten dagegen nur wenige abiotische Stressoren wie z.B. Verwundung und Kälte die Expression von *HvGER2*, *HvGER3* und *HvGER5* im Primärblatt siebentägiger Keimlinge zwar schwach, aber reproduzierbar.

Gräser werden durch Verschnitt oder grasende Tiere verwundet, was zur Zerstörung des Vaskularsystems, der Zellwand und der Zellmembran führt. Daher haben diese Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt, um einer Infektion durch eindringende Pflanzenpathogene oder einer Verwelkung durch Verlust von Wasser vorzubeugen. So können Zellen, welche um die Verwundung lokalisiert sind, mit einer extensiven Lignifizierung der Zellwand und mit der Quervernetzung von Zellwandpolymeren reagieren (Bradley et al., 1992). Wie bekannt, wird Hydrogenperoxid als Schlüsselkomponente für die Quervernetzung von Zellwandkomponenten nicht nur während des Angriffs durch Pathogene, sondern auch während der Wundheilung gesehen (Le Deunff et al., 2004).

Auch hier wurde in geschnittenen Gerstenblättern  $H_2O_2$ -Akkumulation mittels DAB-Färbung an den verwundeten Flächen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Obwohl die Quelle der Erzeugung von Hydrogenperoxid (Peroxidasen, Oxalatoxidasen, SODs) nicht untersucht wurde, haben Berna and Bernier (1999) in ihren Untersuchungen gezeigt, dass sich in mehrmals geschnittenen Blättern von Weizen oder transgenen Tabak, transformiert mit der Weizenoxalatoxidase, die Aktivität dieser Oxalatoxidase erhöhte. Daher erscheint eine Rolle von einigen  $H_2O_2$ -generierenden HvGER Subfamilien im Prozess der Wundheilung denkbar.

Die hier gezeigten Daten deuten insgesamt darauf hin, dass die HvGERs eine untergeordnete Rolle in der abiotischen Stressantwort der Gerste spielen.

Als einziges Gen zeigte HvGER2 eine zirkadiane Oszillation des Transkripts mit einem Maximum zum Ende der Lichtperiode (Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Diese Beobachtung bestätigt frühere Ergebnisse, die für *HvGER2* ein Expressionsmaximum nahe zum Ende des Tages zeigten (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a). Ähnlich zu *HvGER2* zeigten einige GLP Gene in anderen Spezies wie das *AtGER3* (in *A. thaliana*) und das *SaGLP* (in *Sinapis alba*) eine Oszillation in der Transkripthäufigkeit (Heintzen et al., 1994; Staiger et al., 1999). Es könnte über eine mögliche Beteiligung von *HvGER2a*, an photoperiodische Prozesse einer Pflanze, diskutiert werden.

#### **4.4 Die mögliche Rolle der HvGER Subfamilien während des Pathogenbefalls**

In einigen Veröffentlichungen (Schweizer et al., 1999a, Christensen et al., 2004) wurde bereits beschrieben, dass die HvGER Gene an Abwehrmechanismen beteiligt sind. Bgh ist nicht nur ein bedeutendes Pathogen der Gerste, sondern eignet sich durch seine epiphytische Lebensweise auf der Epidermis von Blättern als optimales Untersuchungsobjekt zur Analyse von Wirt-Parasit Beziehungen und zur Untersuchung der Resistenzwirkung einiger Gene. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit galt daher der Frage, ob die HvGER Gene bei transienter Überexpression in die Epidermis die Basalresistenz der Gerste gegen Bgh beeinflussen, vielleicht sogar idealerweise erhöhen können. Andererseits interessierte die Frage, inwieweit die HvGER Gene nach *silencing* (RNA *interference*, RNAi) die Basalresistenz modulieren. Motiviert wurden diese Fragen durch Northernblotanalysen, die gezeigt hatten, dass die meisten der HvGER Unterfamilien durch Bgh in der Epidermis induziert werden, also in dem Gewebe des Blattes, in welchem sich Bgh zu etablieren versucht (Abb. 3.12).

Ein Vorscreening einer kleinen Anzahl Gerstensorten hatte gezeigt (Tab. 3.4), dass transiente *HvGER4d* Überexpression genotypabhängig war. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass die Proteine der transient exprimierten HvGER Gene zwar akkumulieren, aber in Abhängigkeit vom Genotyp der Gerstensorte nicht maßgeblich an der Basalresistenz gegen Bgh beteiligt sind. Außerdem könnten die HvGER Proteine von weiteren Komponenten der Pflanze abhängig sein, die in manchen Gerstensorten leichter verfügbar sind. Zum Beispiel beeinflusst das Vorhandensein bestimmter Substrate die Funktion einiger HvGER Proteine entscheidend, so benötigen Superoxiddismutasen (HvGER4, HvGER5) Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Oxalatoxidasen (HvGER1) Oxalat als Substrate. Bestimmte Co-Faktoren dürfen ebenfalls nicht limitierend sein, da HvGER Proteine zur Katalyse enzymatischer Reaktionen  $Mn^{2+}$  Ionen im katalytisch aktiven Zentrum benötigen.

Da *HvGER4d* den Effekt einer Resistenzhöhung einzig in der Gerstensorte Pallas gezeigt hatte, wurden alle übrigen HvGER Gene in dieser Sorte überexprimiert. Dagegen schien *TaWIR3* (*TaWIR3* = *TaPERO*, für eine putative Peroxidase kodierend) nicht vom Wirtsgenotyp abhängig zu sein, da Überexpression nicht nur in allen Gerstensorten, sondern auch in allen Weizensorten die Resistenz signifikant erhöhte.

#### **4.4.1 Die HvGERs als resistenz- oder anfälligkeitsvermittelnde Faktoren gegen Bgh**

##### *HvGER1*

*HvGER1* (kodierend für das Gerstengermin) zeigte keinen Effekt bei Überexpression in der Gerste (Tab. 3.5). Diese Daten unterscheiden sich von denen, bei welchen erhöhte Resistenz in Weizen gegen *B. graminis* f.sp. *tritici* (Bgt) durch Überexpression des *GF-2.8* Gens (kodierend für das Weizengermin) gefunden wurde (Schweizer et al., 1999a). Das Weizengermin- und das Gerstengermin sind Orthologe und für beide Proteine konnte die enzymatische Aktivität einer Oxalatoxidase nachgewiesen werden (Zhang et al., 1995; Schweizer et al., 1999a; diese Arbeit). Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zwischen diesen Resultaten wäre eine geringere Verfügbarkeit oder das Fehlen von Oxalat (dem Substrat der Oxalatoxidasen) in der Gerstenepidermis im Gegensatz zum Weizen. Oxalat ist ein Pathogenitätsfaktor von *Sclerotinia* spp. (Godoy et al., 1990). Im Gegensatz zu *Sclerotinia* ist Bgh kein Oxalat-sekretierender Pilz. Transgene Expression der Gerstenoxalatoxidase in der Erdnuß führte zu erhöhter Resistenz nach Behandlung der

Pflanzen mit Oxalat oder nach Inokulation mit *Sclerotinia minor* (Livingstone et al., 2005). Dies spricht dafür, dass das Oxalat, welches durch den Wirt oder durch das Pathogen zu Verfügung gestellt wird nicht limitierend sein darf, um einen resistenzsteigernden Effekt für HvGER1 beobachten zu können.

### *HvGER2*

Auch die Überexpression von *HvGER2* (Tab. 3.5, Serie A) führte zunächst zu gesteigerter Resistenz. Allerdings konnte dieser Effekt in Serie B (Tab. 3.7) nicht mehr bestätigt werden. Ich bezweifle daher, dass dieses Gen zur Resistenzerhöhung beiträgt. Dieses Ergebnis liegt in Übereinstimmung zu einer früheren Untersuchung, bei welcher keine reproduzierbar erhöhte Penetrationsresistenz für *HvGER2* beobachtet wurde (Schweizer et al., 1999a). Andererseits wurde über eine vermutliche Quervernetzung des HvGER2 Proteins an der Zellwand bei Pathogenbefall berichtet, was theoretisch die Zellwände verstärken und die Resistenz gegen Bgh erhöhen könnte (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a). Vermutlich katalysiert es aber nicht seine eigene Quervernetzung, da weder Oxalatoxidase- noch Superoxiddismutaseaktivität nachgewiesen wurden (diese Arbeit). Wahrscheinlich dient es als Zellwandbestandteil für Quervernetzung anderer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generierender Systeme, welche z.B. auch durch Bgh-Befall oder weiterer Stressoren oder durch entwicklungsbedingte Faktoren induziert werden können. Die fehlende Resistenzerhöhung bei Überexpression deutet aber darauf hin, dass *HvGER2* in andere Prozesse als Pathogenabwehr involviert ist.

Zellteilung und besonders Zellwandstreckung spielen eine bedeutende Rolle in jungen, schnellwachsenden Geweben. Da *HvGER2* Expression in bis zu 6 Tage alten Primärblättern junger Keimlinge detektierbar ist (Abb. 3.7), könnte eine Funktion des HvGER2 Proteins darin gesehen werden, dass dieses via Quervernetzung die Zellstreckung in jungen expandierenden Keimlingsblättern terminiert.

### *HvGER3*

*HvGER3* beeinflusste durch Überexpression die Basalresistenz der Gerste gegen Bgh nicht. Allerdings führte *silencing* ähnlich wie bei *HvGER5* zu einer Erhöhung dieser Resistenz oder, in Abhängigkeit der Betrachtungsweise, zu verringerter Anfälligkeit (Tab. 3.6). Dies könnte bedeuten, dass HvGER3 einen „anfälligkeitsvermittelnden Faktor“ darstellt. Am einfachsten lässt sich diese anfälligkeitsvermittelnde Funktion mit Hilfe eines „Rezeptor-Modells“ für HvGER3 erklären (Abb.4.1), wo Effektormoleküle/PAMPs des



Pathogens entweder direkt oder indirekt mit dem HvGER3 Protein interagieren können. Geringe HvGER3 Proteinakkumulation in der Zellwand könnte bedeuten, dass aufgrund zu geringer Interaktion keine Anfälligkeit mehr vermittelt werden kann.

Eine anfälligkeitsvermittelnde Funktion von HvGER3 wäre ebenfalls vorstellbar, um z.B. die Pflanze vor unkontrollierten Abwehrreaktionen bei Bgh-Angriff zu schützen. Eine kontrollierte Abwehrreaktion bedeutet, dass sowohl resistenzvermittelnde/zelltodübertragende Faktoren als auch anfälligkeitsvermittelnde/zelltodverhindernde Faktoren in ihrer Regulation perfekt aufeinander abgestimmt sein müssen, damit die Fitness einer Pflanze nicht beeinträchtigt wird. „Anfälligkeitfaktoren“ wie *Mlo* (Wildtyp) sind an der Modulation der Pathogenabwehr und des Zelltodes beteiligt, indem sie diese supprimieren (Piffanelli et al., 2002). Dagegen vermitteln mutierte (*mlo*) Allele des *Mlo* Gens in der Gerste zwar Breitbandresistenz gegen alle Rassen von Bgh, jedoch verbunden mit größerer Neigung zum spontanen Zelltod.

Interessant wäre daher zu prüfen, ob die vermeintliche erhöhte Resistenz bei TIGS von *HvGER3* in Wirklichkeit erhöhter Zelltod infolge unkontrollierter Stressreaktion darstellt. Die Existenz von zelltodverhindernden „Anfälligkeitfaktoren“ wie *Mlo* zeigen, dass eine stringente Zelltodregulation, unter evolutionären Gesichtspunkt betrachtet, für Pflanzen von Vorteil sein kann, auch wenn dies mit erhöhter Bgh-Anfälligkeit einhergeht.

#### *HvGER4*

Die durch die Überexpression des *HvGER4d* Gens verursachte Erhöhung der Basalresistenz in der Sorte Pallas scheint sehr robust zu sein, da dieser Effekt durch mehrere unabhängige Serien bestätigt werden konnte (Tab. 3.4, Tab. 3.5 und Tab. 3.7). Äußerst interessant war, dass nicht nur *HvGER4d* sondern auch *HvGER4c* bei Überexpression die Basalresistenz gegen Bgh erhöhte (Tab. 3.5). Dies bestätigte die Vermutung, dass paraloge Gene einer HvGER-Subfamilie redundante Funktionen besitzen. Zwar wurde dies nur für zwei Gene der HvGER4 Subfamilie gezeigt, dennoch kann über eine ähnliche funktionelle Redundanz der verbleibenden Gene *HvGER4a* und *HvGER4b* nachgedacht werden. Begründet wird diese Vermutung durch die Ähnlichkeit der kodierten Proteine untereinander.

Während Überexpression von *HvGER4* die Basalresistenz gegen Bgh signifikant erhöhte, führte im Gegensatz dazu TIGS von *HvGER4* signifikant zu Hyperanfälligkeit (Tab. 3.6). Diese Ergebnisse liegen in Übereinstimmung mit vorangegangenen Experimenten aus Weizen und Gerste (Schweizer et al., 1999a, Christensen et al., 2004).

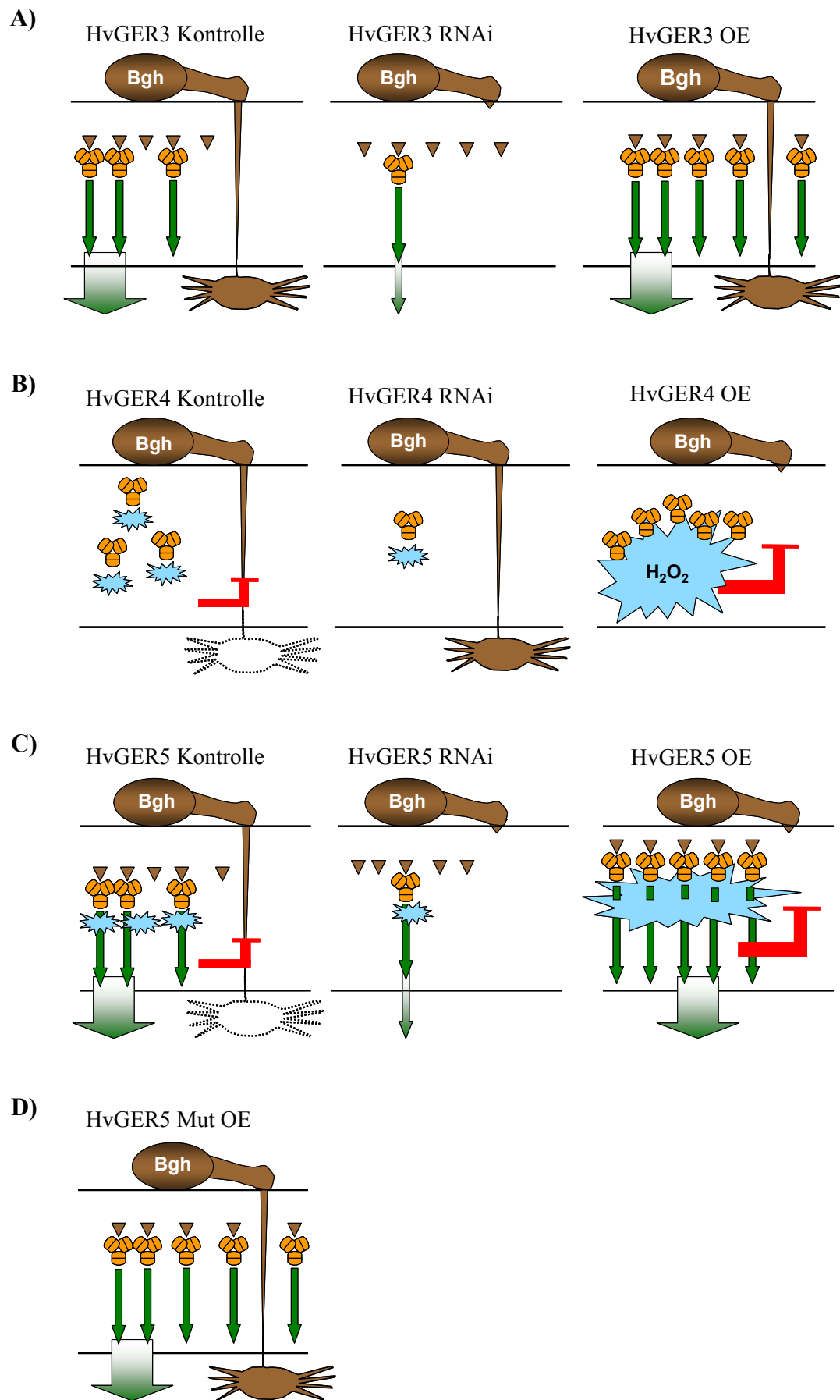
Es scheint also eine positive Korrelation zwischen der *HvGER4* Expressionsstärke und der Basalresistenz zu existieren (Abb.4.1).

### *HvGER5*

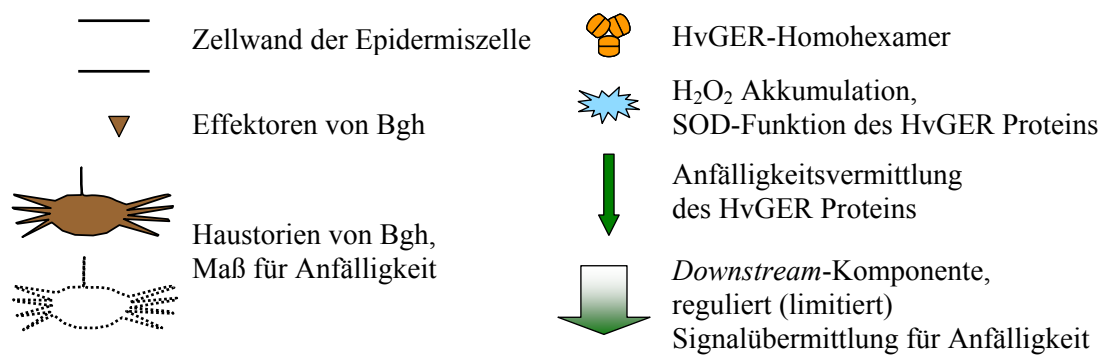
Nicht nur *HvGER4d* besitzt SOD-Aktivität, wie neulich Christensen et al., (2004) gezeigt haben, sondern auch, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, *HvGER5a*. Interessanterweise wurde durch Überexpression auch hier die Basalresistenz signifikant erhöht. *HvGER5* ist aufgrund des vorhergesagten N-terminalen Signalpeptides, wie die anderen *HvGER* Proteine, wahrscheinlich im Apoplasten lokalisiert. Da Hydrogenperoxid in und um den Papillen herum bei Bgh-Befall nachgewiesen wurde (Thordal-Christensen et al., 1997), wäre vorstellbar, dass *HvGER5a* aufgrund seiner enzymatischen Aktivität ebenfalls in diesen Bereichen akkumuliert und somit zur Resistenzerrhöhung beitragen kann.

Nicht nur bei Überexpression, sondern auch bei TIGS von *HvGER5* wurde erhöhte Resistenz beobachtet (Tab. 3.5 und Tab. 3.6). Eine Interpretation dieser Beobachtung ist schwierig. Aufgrund des ähnlichen Abwehreffekts, den erniedrigte und erhöhte *HvGER5* Expression verursacht haben, könnte über eine duale Funktion von *HvGER5* spekuliert werden. Zum einen über eine abwehrrelevante Funktion, welche Bedeutung bei hoher Genexpression hat, zum anderen eine anfälligkeitsvermittelnde Funktion, welche bei moderater Expression zum tragen kommt. Unglücklicherweise existieren noch keine aufschlussreichen Untersuchungen über Interaktionen von *HvGER*-Proteinen mit Proteinen oder Elizitoren welche vom Pathogen stammen. Ein GLP aus der Wurzel von *Pisum sativum* wurde als Rezeptor für Rhicadhesin, einem Oberflächenprotein von Bakterien der Gattung *Agrobacterium* und *Rhizobium* identifiziert (Swart et al., 1994). Besitzt *HvGER5* neben der Abwehrfunktion noch zusätzlich eine Rezeptorfunktion, könnte der Effekt der Resistenzerrhöhung bei erniedrigter und erhöhter Expression erklärt werden. So hätte der Rezeptor eine anfälligkeitsvermittelnde und die SOD- Aktivität eine resistenzvermittelnde Funktion (Abb.4.1).

*HvGER5* könnte ferner, ähnlich wie *Mlo* und dem Bax-Inhibitor der Gerste (Piffanelli et al., 2002; Eichmann et al., 2004), den Zelltod kontrollieren. Die vermeintliche erhöhte Resistenz oder verringerte basale Anfälligkeit (in Abhängigkeit der Betrachtung) bei TIGS könnte daher auch eine erhöhte Zelltodreaktion reflektieren, ähnlich wie *HvGER3*.



**Abb.4.1** (Legende und Abbildungsbeschreibung siehe folgende Seite).



Modell zur Beschreibung von anfälligkeits- und resistenzvermittelnder Wirkung der HvGER Proteine. **OE**=Überexpression, **RNAi**=RNA *interference*, **Mut**=Punktmutation

**A)** *HvGER3* als anfälligkeitsvermittelnder Faktor. Annahme, dass die anfälligkeitsvermittelnde Wirkung durch eine Rezeptorfunktion des HvGER3 Proteins übertragen wird. Die Anfälligkeitsvermittlung wird von weiteren *Downstream*-Komponenten reguliert. Eine Sättigung in der Signalübertragung für „Anfälligkeit“ ist bereits unter normaler Proteinakkumulation erreicht (*HvGER3* Kontrolle) und führt folglich nicht zu einer Änderung der basalen Anfälligkeit bei Überexpression (*HvGER3* OE). Bei RNAi wird *HvGER3* zum limitierenden Faktor für Anfälligkeitsvermittlung, was eine Resistenzhöhung zur Folge hat.

**B)** *HvGER4* als resistenzvermittelnder Faktor. Resistenz wird durch die SOD-Funktion des Proteins, als Hydrogenperoxid erzeuger, bewirkt. Durch die verringerte Proteinakkumulation (*HvGER4* RNAi) folgt eine verringerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Akkumulation (verringerte antimikrobielle Wirkung) was eine Resistenzerniedrigung zur Folge hat. Erhöhte Proteinakkumulation (*HvGER4* OE), führt durch die antimikrobielle Wirkung des Hydrogenperoxids zu Resistenzhöhung.

**C)** *HvGER5* als resistenz- und anfälligkeitsvermittelnder Faktor. Annahme, dass „Anfälligkeit“ durch eine Rezeptorfunktion des Proteins übertragen wird, welche von weiteren *Downstream*-Komponenten reguliert ist. Resistenzvermittlung wird durch die SOD-Funktion des Proteins bewirkt. Durch verringerte Proteinakkumulation (RNAi) wird *HvGER5* limitierend für die Signalübertragung in Richtung Anfälligkeit, was in einer Resistenzhöhung resultiert. Bei Überexpression überwiegt der SOD-abhängige, resistenz erhöhende Effekt des Proteins.

**D)** Überexpression des mutierten *HvGER5* Gens führt zur Hyperanfälligkeit. Dies deutet auf eine gestörte Balance zwischen Anfälligkeits- und resistenzvermittelnder Funktion des Proteins hin.

#### 4.5 SOD-Funktion versus Strukturfunktion

Als nächster Schritt sollte geklärt werden, ob die enzymatische Aktivität einiger HvGER Proteine (z.B. SOD) für die Pathogenabwehr benötigt wird oder ob die vermuteten Eigenschaften der HvGER Proteine als zellwandverstärkende crosslinking Substrate genügen, um einen resistenz erhöhenden Effekt herbeizuführen. Untersuchungen haben belegt, dass das Weizengermin GF-2.8 in und um die Papillen bei einer versuchten Penetration durch Bgt akkumuliert, und dass vermutlich das Protein selbst oxidativ in der Zellwand quervernetzt wird (Schweizer et al., 1999a).

Behandlung von Gerstenblättern mit Hitze, Hydrogenperoxid oder Bgh führte zur Unlösbarkeit des HvGER2 Proteins via Quervernetzung in der Zellwand (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a). Interessanterweise führte ein kurzer Hitzeschock zu erhöhter Resistenz der Gerste gegen Bgh, welche nicht auf Papillenbildung, sondern auf eine Modifikation der vorhandenen Zellwand zurückzuführen war. Es wurde spekuliert, dass *HvGER2* durch diese Form der Abwehr mit zur Resistenzerhöhung beiträgt (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a).

Für die hier gezeigte Untersuchung wurde daher in Erwägung gezogen, dass allein die Quervernetzung der HvGER Proteine in der Zellwand genügt, um eine Invasion durch Bgh zu mindern. Deshalb wurde für einige HvGERs eine Punktmutation im katalytisch aktiven Zentrum eingefügt, um die enzymatische Aktivität zu zerstören, ohne die Struktureigenschaften der Proteine massiv zu verändern.

Durch transiente Expression der mutierten HvGER Gene in der Epidermis sollte die Hypothese einer möglichen strukturellen Funktion bei der Pathogenabwehr überprüft werden. Um diese mutierten Proteine im transienten Assay einsetzen zu können, musste zuvor gezeigt werden, dass in transgenen Pflanzen die rekombinanten, mutierten HvGER Proteine normal akkumulieren. Da die Erzeugung transgener Gerstenpflanzen zuviel Zeit in Anspruch genommen hätte, wurden die rekombinanten HvGER Proteine in *Arabidopsis thaliana* exprimiert.

#### **4.5.1 Elektrophoretische Eigenschaften mutierter und wildtyp HvGER Proteine**

Die Ergebnisse der Westernblotanalyse zeigten für das rekombinante Weizengermin GF-2.8 und für das rekombinante HvGER4d Protein eine Migration als Homohexamerkomplex im seminativen SDS-Gel (Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Eine hohe Stabilität beider Proteine (Germin und HvGER4) gegen Detergentien und Proteasen ist mehrfach beschrieben worden (Grzelczack et al., 1984, Woo et al., 2000). Diese Stabilität des Homohexamerkomplexes von HvGER4d im eingesetzten seminativen SDS-Gel liegt in Übereinstimmung zu Christensen et al., (2004). Hingegen migrierten die rekombinanten Proteine HvGER2a und HvGER5a im seminativen SDS-Gel vorrangig als Monomerkomplex, im Gegensatz zum Migrationsverhalten von nativem HvGER2 als Homohexamer (Vallelian-Bindschedler et al., 1998a). Die Migration als Monomer weist vermutlich auf eine geringere Stabilität einiger rekombinanter HvGER Proteine hin, zumindest wenn diese in *A. thaliana* exprimiert werden.

Der Austausch eines der drei konservierten Histidinreste gegen ein Serinrest führte bei GF-2.8 zu einer Verlagerung des zuvor beobachteten Hexamerkomplexes hin zu den Monomeren (Abb. 3.17). Zusätzlich wurde bei GF-2.8(H112S), HvGER2a(H103S) und HvGER4d(H110S), nicht aber bei HvGER5a(H109S), eine verringerte Proteinakkumulation beobachtet (Abb. 3.19). Anhand dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass die Punktmutation in drei von vier Fällen eine Instabilität des Proteins, unter den Bedingungen der seminativen SDS-PAGE, verursachte. Allerdings ist nicht bekannt, inwieweit die verwendete Proteinextraktionsmethode (bei pH 2,8) die Stabilität des mutierten Proteins negativ beeinflusste. Da die mutierten Proteine GF-2.8, HvGER2a und HvGER4d in *A. thaliana* kaum akkumulierten, mußte angenommen werden, dass dies auch für die transiente Expression in der Gerste zutrifft.

Im Gegensatz dazu akkumulierte das HvGER5a(H109S) Protein ähnlich wie die Wildtypform des Proteins (Abb. 3.19), was darauf hindeutet, dass trotz der Punktmutation dieses Protein korrekt gefaltet und daher nicht durch das Qualitätskontrollsystem der Zelle abgebaut wurde. Die Gründe für die höhere Stabilität von HvGER5a(H109S) im Vergleich zu den anderen getesteten mutierten HvGERs sind nicht bekannt.

Im Gegensatz zum seminativen SDS-Gel migrierte HvGER5a im nativen Gel anhand der detektierten SOD-Aktivität als Homohexamer (Abb. 3.21). Dies spricht dafür, dass wahrscheinlich nicht alle HvGER Proteine resistent gegen SDS sind (Abb. 3.18). Eine SOD-Aktivität des HvGER5a Hexamerkomplexes war im mutierten HvGER5a(H109S) Protein nicht detektierbar (Abb. 3.21). Aufgrund vergleichbarer Proteinakkumulation der mutierten- und Wildtypform kann die Aussage getroffen werden, dass die Punktmutation die enzymatische SOD-Aktivität von HvGER5a(H109S) zerstörte, ohne die Proteinstabilität zu beeinflussen. Schlussfolgerungen zur Funktionsweise bei transienter Überexpression in der Gerste können demzufolge nur für HvGER5a gezogen werden.

#### **4.5.2 Enzymatische Funktionen der HvGER Proteine**

Eine SOD-Aktivität konnte für die Wildtypform der rekombinanten Proteine HvGER4d und HvGER5a detektiert werden (Abb. 3.21), was für HvGER4 mit vorherigen Daten übereinstimmt (Christensen et al., 2004). Keine SOD-Aktivität wurde für HvGER4d(H110S) detektiert, was vermutlich vorwiegend auf die geringe Proteinakkumulation infolge inkorrekt Faltung zurückzuführen war. Die Mutation (H109S) von HvGER5a zerstörte ebenfalls dessen SOD-Aktivität, ohne allerdings das Protein sichtbar zu destabilisieren.

Eine Oxalatoxidaseaktivität wurde ausschließlich für das Germin HvGER1 nachgewiesen (Abb. 3.20). Für alle übrigen HvGER Gene aus den verbleibenden fünf Subfamilien wurde gezeigt, dass sie nicht für Oxalatoxidasen kodieren. Als zusätzliches Ergebnis konnte hier für die rekombinanten Proteine GF-2.8 und HvGER2a keine SOD-Aktivität nachgewiesen werden, was im Gegensatz steht zu einigen Veröffentlichungen (Woo et al., 2000, Segarra et al., 2003). Ähnlich zu meiner Beobachtung haben Whittaker and Whittaker, (2002) ausschließlich eine Oxalatoxidase-, aber keine SOD-Aktivität für das rekombinante HvGER1 Protein, exprimiert in Hefe, nachgewiesen.

#### **4.5.3 Die SOD Funktion des HvGER5a Proteins wird in der Basalresistenz gegen Bgh benötigt**

Die Punktmutation von HvGER4d(H110S) führte bei transienter Überexpression in der Epidermis zu einer Zerstörung des resistenzerhöhenden Effekts gegen Bgh (Tab. 3.7). Jedoch können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob die fehlende Resistenz auf den Verlust der SOD-Aktivität oder auf eine verringerte Akkumulation von nicht korrekt gefaltetem Protein zurückzuführen war.

Im Fall von HvGER5a(H109S) bewirkte die Punktmutation bei transienter Überexpression in Gerste sogar eine erhöhte Anfälligkeit gegen Bgh im Vergleich zum leeren Expressionsvektor (Tab. 3.7). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass das stark angereicherte, mutierte Protein im Apoplast akkumulierte und von Bgh-Effektoren/PAMPs direkt oder indirekt als Interaktionspartner (Rezeptor) erkannt wurde, ohne den balancierenden, resistenzerhöhenden Effekt (Abb.4.1). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann zumindest für HvGER5 gefolgert werden, dass die SOD-Aktivität bei der Abwehr von Bgh benötigt wird. Sollte das HvGER5 Protein eine Quervernetzungseigenschaft besitzen, dann könnte diese Eigenschaft also von der eigenen SOD-Aktivität abhängig sein.

#### **4.6 Schlussfolgerungen**

Meine Untersuchungen haben gezeigt, dass die HvGER Proteine:

(1) Entwicklungsspezifische Faktoren darstellen, die besonders in jungen Keimlingen vorherrschen. Zur Untersuchung des Einflusses, den die HvGERs auf die Entwicklung von Pflanzen haben können, ist das Herstellen von transgener Gerste, welche HvGER Subfamilienvertreter als Überexpressions- und „*silencing*“ Versionen tragen, unabdingbar.

(2) Stressfaktoren darstellen, die vor allem bei Befall durch biotrophe Pathogene akkumulieren.

(3) Vorwiegend in der Spross表皮 akkumulieren, basierend auf mRNA Akkumulation

(4) Als Effektoren die Basalresistenz bedeutend modulieren können. Dabei können *HvGER4* und, bei starker Expression, *HvGER5* als Effektoren für Resistenzvermittlung/ Zelltodübertragung gesehen werden. Als Effektoren für Anfälligkeitsvermittlung/ Zelltodvermeidung kommen *HvGER3* und, bei moderater Expression, *HvGER5* in Betracht. Interessanterweise scheinen agonistische als auch antagonistische Effektoren der Basalresistenz innerhalb einer Multigenfamilie zu existieren. Auch hier ist das Herstellen von transgener Gerste mit „*silencing*“ Versionen der HvGER Gene unabdingbar.

(5) Ihre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- produzierende Aktivität für die Erhöhung der Basalresistenz benötigt wird, zumindest im Fall von *HvGER5*, welches SOD-Aktivität besitzt.

Vermutlich kann erst durch das komplexe Zusammenwirken aller HvGER Proteine eine fein abgestimmte Regulation in der Basalresistenz erreicht werden, welche die Forderung nach Abwehrreaktion und nach Fitness in einer Pflanze balancieren.



## 5. Zusammenfassung

Die Germin-ähnlichen Proteine gehören zusammen mit den Samenspeicherglobulinen zu einer Gruppe von Proteinen, die durch eine Ur-Cupin-Domäne charakterisiert und bereits in den *Archae* vertreten ist. Die Germin-ähnlichen Proteine werden durch Multigenfamilien kodiert, die weitverbreitet in verschiedenen Pflanzenspezies vorkommen. Für diese Proteine wurden unterschiedliche Funktionen in der Keimung von Pflanzen sowie in der Abwehr bei Pathogenbefall vorgeschlagen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Multigenfamilie der Germin-ähnlichen Proteine (HvGER) der Gerste (*Hordeum vulgare*) umfassend zu charakterisieren. Zum einen wurde die Rolle der HvGER Subfamilien in der Entwicklung der Gerste und zum anderen die mögliche Rolle in der Abwehr gegen den Gerstenmehltaupilz *Blumeria graminis* fsp. *hordei* untersucht.

Das Gerstengenom kodiert für mindestens sechs verschiedene HvGER Subfamilien, von denen jeweils ein Gen als Vertreter ausgewählt wurde. Mit Hilfe dieser Vertreter wurden die Genregulationstrends der HvGER Subfamilien in verschiedenen Geweben, entwicklungs- oder stressabhängig, untersucht. Ferner wurde die Funktion dieser Subfamilien in der Pathogenabwehr durch Genüberexpressions- als auch durch Gen-*silencing* Experimente mittels RNAi studiert. Diese Funktionsanalysen erfolgten anhand von transienter und stabiler Überexpression der HvGER Gene in Gerste und *Arabidopsis thaliana*.

Die Genregulationstrends wurden durch Northernblot-Hybridisierungen analysiert. Ein deutlicher Schwerpunkt der Expression der meisten Subfamilien wurde in jungen Keimlingen, vor allem in Wurzeln und Koleoptile, gefunden. HvGER2 wurde als Marker in jungen elongierenden Blättern identifiziert. Durch abiotische Stressoren, mit Ausnahme von Hydrogenperoxid, schien die Expression der HvGER Subfamilien kaum induziert zu werden. Hydrogenperoxid erwies sich als Induktor von HvGER1, 3, 4 und 5 und als Suppressor von HvGER2. Die Expression der HvGER Gene wurde stark durch *Blumeria graminis* fsp. *hordei* (Bgh) im Spross, aber kaum durch *Bipolaris sorokiniana* induziert. Ferner schienen die Transkripthäufigkeiten nach Hydrogenperoxidbehandlung und Bgh-Befall zu korrelieren. Die Transkripte von vier der fünf HvGER Subfamilien, die im Spross exprimiert waren, akkumulierten in der Epidermis (inokuliert oder nicht-inokuliert mit Bgh).

Einige HvGER Proteine sind mit der Zellwand assoziiert und besitzen eine bekannte enzymatische Aktivität, die  $H_2O_2$  erzeugt. Durch diese Eigenschaft können sie zu oxidativen Quervernetzungsreaktionen von Zellwandkomponenten und zur Zellwandverstärkung beitragen. Dies, und die Expression der HvGER Gene in den Epidermiszellen des Sprosses, die mit Bgh direkt interagieren, macht die HvGER Gene zu ausgezeichneten Kandidaten als Faktoren der Basalresistenz gegen Bgh.

Zur Untersuchung des Effekts, den die HvGER Subfamilien auf die Basalresistenz ausüben wurden Überexpressions- als auch RNAi-Konstrukte erzeugt. In beiden Konstrukten befinden sich die HvGER Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Die Konstrukte wurden mittels Partikelbombardement in die Blattepidermis transferiert und diese Epidermiszellen anschließend mit Bgh inokuliert. Die Interaktion des Pathogens mit transformierten Epidermiszellen wurde unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Transiente Überexpression von *HvGER4* oder *HvGER5* sowie transientes *silencing* durch RNAi von *HvGER3* oder *HvGER5* führten zur gesteigerten Basalresistenz der Gerste gegen Bgh. *Silencing* von HvGER4 induzierte Hyperanfälligkeit.

Für die Untersuchung, ob die enzymatische Funktion der HvGER Proteine bei der Pathogenabwehr benötigt wird, oder ob die HvGER Proteine Quervernetzungssubstrate darstellen, wurde eine Punktmutation in das katalytisch aktive Zentrum einiger HvGER Proteine eingeführt. Die Punktmutation erfolgte durch „*site directed mutagenesis*“ und führte zum Austausch eines der drei konservierten Histidinreste gegen ein Serinrest für HvGER1, 2, 4 und 5 und für die Weizenoxalatoxidase GF-2.8, als positive Kontrolle.

Die Wildtypformen und die mutierten Formen der HvGER Gene wurden in transgenen *A. thaliana* Pflanzen exprimiert, um die Akkumulation und Stabilität dieser Proteine zu prüfen. Die Westernblotanalysen zeigten, dass die Wildtypform und die mutierte Form HvGER5 im Vergleich zu den Kontrollen normal akkumulierten, währenddessen die punktmutierten Proteine GF-2.8, HvGER2 und HvGER4 destabilisiert wurden.

Als nächster Schritt wurden die einzelnen HvGER Subfamilien und ihre mutierten Versionen auf die bekannten enzymatischen Aktivitäten, Oxalatoxidase und Superoxiddismutase (SOD), untersucht um zu zeigen, ob die Punktmutation diese Aktivitäten zerstörte. Die Tests zeigten, dass *HvGER1* als einzige der sechs Subfamilien für eine Oxalatoxidase kodiert. Für HvGER4 wurde hier eine SOD-Aktivität bestätigt und für HvGER5 neu gefunden. Die Punktmutation in HvGER4 und HvGER5 führte zu einer Zerstörung der SOD-Aktivität.

Die transiente Überexpression der enzymatisch inaktiven Punktmutanten von *HvGER4* und *HvGER5* bewirkte keine erhöhte Resistenz gegen Bgh. Dies zeigt, zumindest im Fall von *HvGER5*, dessen Stabilität durch die Punktmutation nicht beeinträchtigt wurde, dass die SOD-Aktivität des Proteins bei der Bgh-Abwehr benötigt wird.

Die gezeigten Daten schlagen ein komplexes Zusammenspiel mehrerer HvGER Subfamilien vor, was zu einer fein abgestimmten Wirkung (1.) in der Entwicklung der Gerste und (2.) in der Basalresistenz gegen Bgh führt. Eine optimale Regulation dieser quantitativen Resistenzantwort dürfte für den Wirt als auch für das Pathogen wichtig sein für die Beständigkeit und Stabilisierung beider Populationen über einen evolutionären Zeitraum.

## 6. Summary

The Germin-like proteins belong, together with seed-storage globulins, to a group of proteins that is characterized by an ancestral cupin domain already present in *archaea*. Germin-like proteins are encoded by multigene families and are occurring in a wide range of several plant species. For these proteins different kinds of functions have been proposed. For some members a role in plant germination and in defence responses to pathogen attack was proposed.

The aim of this work was to present an extensive characterization of the germin-like multigene family (HvGER) in barley (*Hordeum vulgare*). On the one hand their role of HvGER subfamilies was studied in developing barley, on the other hand their possible involvement in defence responses against the barley powdery mildew *Blumeria graminis* fsp. *hordei* (Bgh) was investigated.

The genome of barley is coding for at least six different HvGER subfamilies, and from each subfamily one gene was selected as a representative. With the help of those representatives the trends in gene regulation were studied in barley of different developing stages and in differently stressed tissues. Furthermore, the function of the subfamilies in defence response was investigated by gene overexpression as well as gene silencing by RNA interference. These functional analyses were done by transient and stable expression of the HvGER genes in barley and *Arabidopsis thaliana*, respectively.

The analysis of gene regulation by Northern blot hybridizations revealed a peak of expression in young seedlings for most of the subfamilies, particularly in roots and coleoptile. As an exception, *HvGER2* was identified as marker in young elongating leaves. While abiotic stress factors induced the HvGER subfamilies only weakly, hydrogenperoxide has been found here to be an inducer of HvGER1, 2, 3, 4 and 5 and a suppressor of HvGER2. The expression of HvGER genes in the leaves was strongly induced by Bgh, but hardly by *Bipolaris sorokiniana*. Moreover, the degree of transcript accumulation of the HvGER subfamilies seemed to correlate between hydrogenperoxide application and Bgh attack. The transcripts of four of five HvGER subfamilies, which were induced in leaves, accumulated predominantly in the epidermis.

Some of the HvGER proteins are known to be associated with the cell wall and exhibit known enzymatic activity, which generates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Therefore, they may contribute to oxidative crosslinking reactions of cell wall components leading to cell wall

reinforcement. This, and the expression of HvGER genes in the epidermal cell layer, with which Bgh directly interacts, makes the HvGERs excellent candidates for investigating their role in basal resistance of barley against Bgh.

For this purpose, constructs for overexpression as well as silencing were created. In both constructs the HvGER genes were under the control of the CaMV 35S promoter. Constructs were transferred into the epidermis cell layer by particle bombardment, and epidermal cells were subsequently inoculated with Bgh. The interaction of the pathogen with transformed epidermis cells was evaluated by using a light microscope. Transient overexpression of *HvGER4* and *HvGER5* as well as transient silencing by RNAi of *HvGER3* and *HvGER5* led to enhanced basal resistance against Bgh. Silencing of *HvGER4* induced hypersusceptibility.

To address the question whether the enzymatic function of HvGER proteins is needed for a successful defence or whether HvGER proteins might be substrates for crosslinking reactions, a point-mutation was introduced into the catalytically active centre of some HvGER proteins by site directed mutagenesis. This led to the exchange of one of three conserved histidines to a serin, in HvGER1, HvGER2, HvGER4 and HvGER5 and for the wheat oxalate oxidase GF-2.8, as a positive control.

Both the wild type and the mutated forms of HvGER genes were expressed in transgenic *A. thaliana* plants in order to control the accumulation and the stability of the proteins. Western blot analyses have shown an accurate accumulation of the wild type and mutated form of HvGER5 protein. By contrast did the point mutations destabilize GF-2.8, HvGER2 and HvGER4 proteins.

The individual HvGER wildtype proteins and their mutated versions were tested for the known enzymatic activities, oxalate oxidase and superoxide dismutase (SOD), to determine if the point-mutations deleted the enzymatic activity. These enzymatic assays have shown that only *HvGER1* is coding for an oxalate oxidase. The SOD activity for HvGER4 was confirmed and for HvGER5 newly discovered. The point-mutation in HvGER4 and HvGER5 did destroy their SOD activity.

The transient overexpression of the enzymatically inactivated mutated versions of HvGER4 and HvGER5 did not enhance basal resistance against Bgh. At least in the case of HvGER5 the stability of which was not affected by the point mutation, it can be concluded that the SOD activity of the protein is required for the resistance-enhancing activity of the protein.

The data shown here suggest a complex interplay of several HvGER subfamilies, which leads to a finetuned effect (1) in the development of barley and (2) in the basal resistance against Bgh. From the evolutionary point of view an optimal regulation of the quantitative resistance response may be important for both host and pathogen in order to stabilize both populations over long periods of time.

## 7. Literaturverzeichnis

- 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**:403-410.
- An, G.** 1987. Binary Ti-Vectors for Plant Transformation and Promoter Analysis. *Methods in Enzymology* **153**:292-305.
- 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**: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**:2073-2076.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich.** 1971. Superoxide Dismutase - Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* **44**:276-&.
- Berna, A. and F. Bernier.** 1997. Regulated Expression of a Wheat Germin Gene in Tobacco: Oxalate Oxidase Activity and Apoplastic Localization of the Heterologous Protein. *Plant Molecular Biology* **33**:417-429.
- Berna, A. and F. Bernier.** 1999. Regulation by Biotic and Abiotic Stress of a Wheat Germin Gene Encoding Oxalate Oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Plant Molecular Biology* **39**:539-549.
- Bernier, F., G. Lemieux, and D. Pallotta.** 1987. Gene Families Encode the Major Encystment-Specific Proteins of Physarum-Polycephalum Plasmodia. *Gene* **59**:265-277.
- Bernier, F., D. Pallotta, and G. Lemieux.** 1986. Molecular-Cloning of Messenger-Rnas Expressed Specifically During Spherulation of Physarum-Polycephalum. *Biochimica Et Biophysica Acta* **867**:234-243.
- Bernier, F. and A. Berna.** 2001. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* **39**:545-554.
- Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**:293-300.
- Bewley, J. D.** 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**:1055-1066.
- Boddu, J., S. Cho, W. M. Kruger, and G. J. Muehlbauer.** 2006. Transcriptome Analysis of the Barley-*Fusarium graminearum* Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**:407-417.
- Bohlmann, H. and K. Apel.** 1991. Thionins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**:227-240.
- Boller, T.** 1995. Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**:189-214.
- Bradford, M. M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Bradley, D. J., P. Kjellbom, and C. J. Lamb.** 1992. Elicitor-Induced and Wound-Induced

- Oxidative Cross-Linking of a Proline-Rich Plant-Cell Wall Protein - a Novel, Rapid Defense Response. *Cell* **70**:21-30.
- Bringezu, K., O. Lichtenberger, I. Leopold, and D. Neumann.** 1999. Heavy Metal Tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* **154**:536-546.
- Caldo, R. A., D. Nettleton, and R. P. Wise.** 2004. Interaction-Dependent Gene Expression in Mla-Specified Response to Barley Powdery Mildew. *Plant Cell* **16**:2514-2528.
- Caliskan, M.** 2000. Germin-Like Oxalate Oxidase Activity Increase in Auxin-Treated Wheat Coleoptiles. *Turk J Bot* **24**:329-335.
- Caliskan, M. and A. C. Cuming.** 1998. Spatial Specificity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- generating Oxalate Oxidase Gene expression During Wheat Embryo Germination. *The Plant Journal* **15**:165-171.
- Cannon, S. B., A. Mitra, A. Baumgarten, N. D. Young, and G. May.** 2004. The Roles of Segmental and Tandem Gene Duplication in the Evolution of Large Gene Families in *Arabidopsis thaliana*. *BioMedCentral Plant Biology* **4**:1-21.
- Carpita, N. C.** 1996. Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**:445-476.
- Carpita, N. C., M. Defernez, K. Findlay, B. Wells, D. A. Shoue, G. Catchpole, R. H. Wilson, and M. C. Mccann.** 2001. Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. *Plant Physiology* **127**:551-565.
- Carter, C. and R. W. Thornburg.** 2000. Tobacco Nectarin I - Purification and Characterization as a Germin-like, Manganese Superoxide Dismutase Implicated in the Defense of Floral Reproductive Tissues. *Journal of Biological Chemistry* **275**:36726-36733.
- Carter, C., R. A. Graham, and R. W. Thornburg.** 1998. *Arabidopsis thaliana* Contains a Large Family of Germin-like Proteins: Characterization of cDNA and Genomic Sequences Encoding 12 Unique Family Members. *Plant Molecular Biology* **38**:929-943.
- Carter, C., R. A. Graham, and R. W. Thornburg.** 1999. Nectarin I is a Novel, Soluble Germin-like Protein Expressed in the Nectar of *Nicotiana* sp. *Plant Molecular Biology* **41**:207-216.
- Chang, J. H., A. K. Goel, S. R. Grant, and J. L. Dangl.** 2004. Wake of the Flood: Ascribing Functions to the Wave of Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria. *Current Opinion Microbial Biology* **7**:11-18.
- Chisholm, S. T., G. Coaker, B. Day, and B. J. Staskawicz.** 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* **124**:803-814.
- Christensen, A. B., H. Thordal-Christensen, G. Zimmermann, T. Gjetting, M. F. Lyngkjaer, R. Dudler, and P. Schweizer.** 2004. The Germinlike Protein GLP4 Exhibits Superoxide Dismutase Activity and Is an Important Component of Quantitative Resistance in Wheat and Barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**:109-117.
- Cleland, R.** 1967. Auxin and Mechanical Properties of Cell Wall. *Annals of the New York Academy of Sciences* **144**:3-&.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria - Genetic Transformation of *Escherichia-Coli* by R-Factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**:2110-&.
- Collinge, D. B., P. L. Gregersen, and Thordal-Christensen H.** 2002. The Nature and Role of



- Defence Response Genes in Cereals. Chapter 10 In : Belanger,R.R.; Bushnell,W.R. (Eds.) The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA146-160.
- Collins, N. C., H. Thordal-Christensen, V. Lipka, S. Bau, E. Kombrink, J. L. Qiu, R. Huckelhoven, M. Stein, A. Freialdenhoven, S. C. Somerville, and P. Schulze-Lefert.** 2003. SNARE-Protein-mediated Disease Resistance at the Plant Cell Wall. *Nature* **425**:973-977.
- Conrath, U., C. M. J. Pieterse, and B. Mauch-Mani.** 2002. Priming in Plant-Pathogen Interactions. *Trends in Plant Science* **7**:210-216.
- Dangl, J. L. and J. D. G. Jones.** 2001. Plant Pathogens and Integrated Defence Responses to Infection. *Nature* **411**:826-833.
- Davis, J. C. and D. A. Petrov.** 2005. Do Disparate Mechanisms of Duplication Add Similar Genes to the Genome? *Trends in Genetics* **21**:548-551.
- Deblaere, R., B. Bytebier, H. Degreve, F. Deboeck, J. Schell, M. Vanmontagu, and J. Leemans.** 1985. Efficient Octopine Ti Plasmid-Derived Vectors for Agrobacterium-mediated Gene-Transfer to Plants. *Nucleic Acids Research* **13**:4777-4788.
- Delledonne, M., Y. Xia, R. A. Dixon, and C. Lamb.** 1998. Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance . *Nature* **394**:585-588.
- Dodds, P. N., G. J. Lawrence, A. M. Catanzariti, T. Teh, C. I. A. Wang, M. A. Ayliffe, B. Kobe, and J. G. Ellis.** 2006. Direct Protein Interaction Underlies Gene-for-Gene Specificity and Coevolution of the Flax Resistance Genes and Flax Rust Avirulence Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:8888-8893.
- Donaldson, P. A., T. Anderson, B. G. Lane, A. L. Davidson, and D. H. Simmonds.** 2001. Soybean Plants Expressing an Active Oligomeric Oxalate Oxidase From the Wheat Gf-2.8 (Germin) Gene Are Resistant to the Oxalate-Secreting Pathogen *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**:297-307.
- Dong, W., D. Nowara, and P. Schweizer.** 2006. Protein Polyubiquitination Plays a Role in Basal Host Resistance of Barley. *The Plant Cell* **18**:3321-3331.
- Douchkov, D., D. Nowara, U. Zierold, and P. Schweizer.** 2005. A High-Throughput Gene-Silencing System for the Functional Assessment of Defense-Related Genes in Barley Epidermal Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**:755-761.
- Dratewkakos, E., S. Rahman, Z. F. Grzelczak, T. D. Kennedy, R. K. Murray, and B. G. Lane.** 1989. Polypeptide Structure of Germin as Deduced From cDNA Sequencing. *Journal of Biological Chemistry* **264**:4896-4900.
- Druka, A., G. Muehlbauer, I. Druka, R. Caldo, U. Baumann, N. Rostoks, A. Schreiber, R. Wiese, T. Close, and A. Kleinhofs.** 2006. An Atlas of Gene Expression from Seed to Seed Through Barley Development. *Functional & Integrative Genomics* **6**:202-211.
- Druka, A., D. Kudrna, C. G. Kannangara, D. von Wettstein, and A. Kleinhofs.** 2002. Physical and Genetic Mapping of Barley (*Hordeum vulgare*) Germin-like cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:850-855.
- Dumas, B., A. Sailland, J.-P. Cheviet, G. Freyssinet, and K. Pallett.** 1993. Identification of Barley Oxalate Oxidase As a Germin-like Protein. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life sciences* **316**:793-798.

- Dunwell, J. M., S. Khuri, and P. J. Gane.** 2000. Microbial Relatives of the Seed Storage Proteins of Higher Plants: Conservation of Structure and Diversification of Function During Evolution of the Cupin Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:153-179.
- Dunwell, J. M., A. Purvis, and S. Khuri.** 2004. Cupins: the Most Functionally Diverse Protein Superfamily? *Phytochemistry* **65**:7-17.
- Dunwell, J. M.** 1998. Cupins: A New Superfamily of Functionally Diverse Proteins that Include Germins and Plant Storage Proteins . *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **15**:
- Eichmann, R., H. Schultheiss, K. H. Kogel, and R. Huckelhoven.** 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**:484-490.
- Eulgem, T.** 2005. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in Plant Science* **10**:71-78.
- Federico, M. L., F. L. Iniguez-Luy, R. W. Skadsen, and H. F. Kaeppler.** 2006. Spatial and Temporal Divergence of Expression in Duplicated Barley Germin-like Protein-encoding Genes. *Genetics* **174**:179-190.
- Finnie, C., J. Borch, and D. B. Collinge.** 1999. 14-3-3 Proteins: Eukaryotic Regulatory Proteins With Many Functions. *Plant Molecular Biology* **40**:545-554.
- Flor, H. H.** 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**:275-296.
- Force, A., M. Lynch, F. B. Pickett, A. Amores, Y. L. Yan, and J. Postlethwait.** 1999. Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics* **151**:1531-1545.
- Francis, S., M. Dewery, and S. J. Gurr .** 1996. The Role of Cutinase in Germling Development in *Erysiphe graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**:201-211.
- Freialdenhoven, A., C. Peterhansel, J. Kurth, F. Kreuzaler, and P. Schulze-Lefert.** 1996. Identification of Genes Required for the Function of Non-Race-Specific Mlo Resistance to Powdery Mildew in Barley. *Plant Cell* **8**:5-14.
- Freialdenhoven, A., B. Scherag, K. Hollricher, D. B. Collinge, H. Thordalchristensen, and P. Schulze-Lefert.** 1994. Nar-1 and Nar-2, 2 Loci Required for Mla(12)-Specified Race-Specific Resistance to Powdery Mildew in Barley. *Plant Cell* **6**:983-994.
- Gane, P. J., J. M. Dunwell, and J. Warwicker.** 1998. Modeling Based on the Structure of Vicilins Predicts a Histidine Cluster in the Active Site of Oxalate Oxidase. *Journal of Molecular Evolution* **46**:488-493.
- Gelli, A. and E. Blumwald.** 1997. Hyperpolarization-Activated Ca<sup>2+</sup>-Permeable Channels in the Plasma Membrane of Tomato Cells. *Journal of Membrane Biology* **155**:35-45.
- Gelli, A., V. J. Higgins, and E. Blumwald.** 1997. Activation of Plant Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-Permeable Channels by Race-Specific Fungal Elicitors. *Plant Physiology* **113**:269-279.
- Gibeaut, D. M., M. Pauly, A. Bacic, and G. B. Fincher.** 2005. Changes in Cell Wall Polysaccharides in Developing Barley (*Hordeum Vulgare*) Coleoptiles. *Planta* **221**:729-738.
- Girardin, S. E., P. J. Snsionetti, and D. J. Philpott.** 2002. Intracellular vs Extracellular

- Recognition of Pathogenes - Common Concepts in Mammals and Flies. *Trends in Microbiology* **10**:193-199.
- Godoy, G., J. R. Steadman, M. B. Dickman, and R. Dam.** 1990. Use of Mutants to Demonstrate the Role of Oxalic-Acid in Pathogenicity of *Sclerotinia-Sclerotiorum* on *Phaseolus-Vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**:179-191.
- Gomez-Gomez, L. and T. Boller.** 2000. FLS2: an LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**:1003-1011.
- Green, J. R., T. L. W. Carver, and S. J. Gurr.** 2002. The Formation and Function of Infection and Feeding Structures. Chapter 4 In: Belanger, R.R.; Bushnell, W.R. (Eds.) *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA66-82.
- 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**:85-97.
- Grzelczak, Z. F. and B. G. Lane.** 1983. The Growth-Related 28-Kilodalton Protein in Germinating Wheat - Use of Peptide-Mapping to Identify Cryptic Forms in Cell-Free-Extracts and Protein-Synthesizing Systems. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **61**:1233-1243.
- Grzelczak, Z. F. and B. G. Lane.** 1984. Signal Resistance of a Soluble-Protein to Enzymic Proteolysis - an Unorthodox Approach to the Isolation and Purification of Germin, a Rare Growth-Related Protein. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **62**:1351-1353.
- Grzelczak, Z. F. and B. G. Lane.** 1985. Unorthodox Use of Proteolysis in the Isolation and Purification of Germin, a Rare Growth-Related Protein. *Federation Proceedings* **44**:1460.
- Grzelczak, Z. F., S. Rahman, T. D. Kennedy, and B. G. Lane.** 1985. Germin - Compartmentation of the Protein, Its Translatable Messenger-Rna, and Its Biosynthesis Among Roots, Stems, and Leaves of Wheat Seedlings. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **63**:1003-1013.
- Grzelczak, Z. F., M. H. Sattolo, L. K. Hanleybowdoin, T. D. Kennedy, and B. G. Lane.** 1982. Synthesis and Turnover of Proteins and Messenger-RNA in Germinating Wheat Embryos. *Canadian Journal of Biochemistry* **60**:389-397.
- Gu, X.** 2003. Evolution of Duplicate Genes Versus Genetic Robustness Against Null Mutations. *Trends in Genetics* **19**:354-356.
- Gu, Z. L., D. Nicolae, H. H. S. Lu, and W. H. Li.** 2002. Rapid Divergence in Expression Between Duplicate Genes Inferred From Microarray Data. *Trends in Genetics* **18**:609-613.
- Halterman, D. A., F. S. Wei, and R. P. Wise.** 2003. Powdery Mildew-Induced Mla mRNAs Are Alternatively Spliced and Contain Multiple Upstream Open Reading Frames. *Plant Physiology* **131**:558-567.
- 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**:215-226.
- Hanleybowdoin, L. and B. G. Lane.** 1983. A Novel Protein Programmed by the Messenger-RNA Conserved in Dry Wheat Embryos - the Principal Site of Cysteine Incorporation During Early

- Germination. *European Journal of Biochemistry* **135**:9-15.
- He, X. L. and J. Z. Zhang.** 2005. Rapid Subfunctionalization Accompanied by Prolonged and Substantial Neofunctionalization in Duplicate Gene Evolution. *Genetics* **169**:1157-1164.
- Heath, M. C.** 2000. Nonhost Resistance and Nonspecific Plant Defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**:315-319.
- Heintzen, C., R. Fischer, S. Melzer, S. Kappeler, K. Apel, and D. Staiger.** 1994. Circadian Oscillations of a Transcript Encoding a Germin-like Protein That Is Associated With Cell-Walls in Young Leaves of the Long-Day Plant *Sinapis-Alba* L. *Plant Physiology* **106**:905-915.
- Heitefuss, R.** 2001. Defence Reactions of Plants to Fungal Pathogens: Principles and Perspectives, Using Powdery Mildew on Cereals as an Example. *Naturwissenschaften* **88**:273-283.
- Hoson, T. and D. J. Nevins.** 1989a. Beta-D-Glucan Antibodies Inhibit Auxin-Induced Cell Elongation and Changes in the Cell-Wall of *Zea* Coleoptile Segments. *Plant Physiology* **90**:1353-1358.
- Hoson, T. and D. J. Nevins.** 1989b. Effect of Anti-Wall Protein Antibodies on Auxin-Induced Elongation, Cell-Wall Loosening, and Beta-D-Glucan Degradation in Maize Coleoptile Segments. *Physiologia Plantarum* **77**:208-215.
- Hu, X., D. L. Bidney, N. Yalpani, J. P. Duvick, O. Crasta, O. Folkerts, and G. Lu.** 2003. Overexpression of a Gene Encoding Hydrogen Peroxide-Generating Oxalate Oxidase Evokes Defense Responses in Sunflower. *Plant Physiology* **133**:170-181.
- Hughes, A. L.** 1994. The Evolution of Functionally Novel Proteins After Gene Duplication. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **256** :119-124.
- Hückelhoven, Ralph, Fodor, Jozsef, Preis, Christine, Kogel, and Karl-Heinz.** 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**:1251-1260.
- Hückelhoven, R., J. Fodor, M. Trujillo, and K.-H. Kogel.** 2000. Barley Mla and Rar Mutants Compromised in the Hypersensitive Cell Death Response Against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are Modified in Their Ability to Accumulate Reactive Oxygen Intermediates at Sites of Fungal Invasion. *Planta* **212**:16-24.
- Jahn, T., A. T. Fuglsang, A. Olsson, I. M. Bruntrup, D. B. Collinge, D. Volkmann, M. Sommarin, M. G. Palmgren, and C. Larsson.** 1997. The 14-3-3 Protein Interacts Directly With the C-Terminal Region of the Plant Plasma Membrane H<sup>+</sup>-Atpase. *Plant Cell* **9**:1805-1814.
- Jaikaran, A. S. I., T. D. Kennedy, E. Dratewkakos, and B. G. Lane.** 1990. Covalently Bonded and Adventitious Glycans in Germin. *Journal of Biological Chemistry* **265**:12503-12512.
- Jarosch, B., M. Jansen, and U. Schaffrath.** 2003. Acquired Resistance Functions in Mlo Barley, Which Is Hypersusceptible to Magnaporthe Grisea. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**:107-114.
- Jarosch, B., K. H. Kogel, and U. Schaffrath.** 1999. The Ambivalence of the Barley Mlo Locus: Mutations Conferring Resistance Against Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) Enhance Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**:508-514.

- Jin, P., M. D. Wood, Y. Wu, Z. Y. Xie, and F. Katagiri.** 2003. Cleavage of the *Pseudomonas syringae* Type III Effector AvrRpt2 Requires a Host Factor(s) Common Among Eukaryotes and Is Important for AvrRpt2 Localization in the Host Cell. *Plant Physiology* **133**:1072-1082.
- Jones, J. D. G. and J. L. Dangl.** 2006. The Plant Immune System. *Nature* **444**:323-329.
- Jorgensen, J. H.** 1992. Discovery, Characterization and Exploitation of Mlo Powdery Mildew Resistance in Barley. *Euphytica* **63**:141-152.
- Jorgensen, J. H.** 1988a. *Erysiphe graminis*, Powdery Mildew of Cereals and Grasses. *Advances in Plant Pathology* **6**:137-157.
- Jorgensen, J. H.** 1988b. Genetic Analysis of Barley Mutants with Modifications of Powdery Mildew Resistance Gene Ml-a12. *Genome* **30**:129-132.
- Jorgensen, J. H.** 1994. Genetics of Powdery Mildew Resistance in Barley. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**:97-119.
- Keen, N.** 1990. Gene-for-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. *Annual Review of Genetics* **24**:447-463.
- Keller, B., C. Feuillet, and M. Messmer.** 2000. Genetics of Disease Resistance. Kluwer Academic Publishers, Mechanisms of Resistance to Plant Diseases 101-160.
- Kim, H. J., T. C. Pesacreta, and B. A. Triplett.** 2004b. Cotton-fiber Germin-like Protein. II: Immunolocalization, Purification, and Functional Analysis. *Planta* **218**:525-535.
- Kim, H. J. and B. A. Triplett.** 2004a. Cotton Fiber Germin-like Protein. I. Molecular Cloning and Gene Expression. *Planta* **218**:516-524.
- 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.** 2002a. 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**: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.** 2002b. Calmodulin Interacts With Mlo Protein to Regulate Defence Against Mildew in Barley. *Nature* **416**:447-450.
- 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 Physiol* **106**: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** :319-332.
- Kohler, A., S. Schwindling, and U. Conrath.** 2002. Benzothiadiazole-Induced Priming for Potentiated Responses to Pathogen Infection, Wounding, and Infiltration of Water Into Leaves Requires the Npr1/Nim1 Gene in Arabidopsis. *Plant Physiology* **128**:1046-1056.
- Kumar, J., P. Schafer, R. Huckelhoven, G. Langen, H. Baltruschat, E. Stein, S. Nagarajan, and K. H. Kogel.** 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a Cereal Pathogen of Global Concern: Cytological and Molecular Approaches Towards Better Control. *Molecular Plant Pathology*

3:185-195.

- Kumar, J., R. Hückelhoven, U. Beckhove, S. Nagarajan, and K.-H. Kogel.** 2001. A Compromised MIO Pathway Affects the Response of Barley to the Necrotrophic Fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and Its Toxins. *Phytopathology* **91**:127-132.
- Kunoh, H., O. Itho, M. Kohno, and H. Ishizaki.** 1979. Are primary germe tubes of conidia unique to *Erysiphe graminis*? *Annual Phytopathology Soc. Jpn.* **45**:675-682.
- 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.
- Lane, B. G.** 1991b. Cellular Desiccation and Hydration - Developmentally Regulated Proteins, and the Maturation and Germination of Seed Embryos. *Faseb Journal* **5**:2893-2901.
- Lane, B. G.** 1994. Oxalate, Germin, and the Extracellular Matrix of Higher Plants. *The FASEB Journal* **8**:294-300.
- Lane, B. G.** 2002. Oxalate, Germins, and Higher-Plant Pathogens. *IUBMB Life* **53**:67-75.
- Lane, B. G.** 2000. Oxalate Oxidases and Differentiating Surface Structure in Wheat: Germins. *Biochemical Journal* **349**:309-321.
- Lane, B. G., F. Bernier, E. Dratewka-Kos, R. Shafai, T. D. Kennedy, C. Pyne, J. R. Munro, T. Vaughan, D. Walters, and F. Altomare.** 1991a. Homologies Between Members of the Germin Gene Family in Hexaploid Wheat and Similarities between These Wheat Germins and Certain Physarum Spherulins. *The Journal of Biological Chemistry* **266**:10461-10469.
- Lane, B. G., A. C. Cuming, J. Fregeau, N. C. Carpita, W. J. Hurkman, F. Bernier, E. Dratewka-Kos, and T. D. Kennedy.** 1992. Germin Isoforms are Discrete Temporal Markers of Wheat Development. Pseudogermin is a Uniquely Thermostable Water-Soluble Oligomeric Protein in Ungerminated Embryos and Like Germin in Germinated Embryos, it is Incorporated Into Cell Walls. *Eur. J. Biochem.* **209**:961-969.
- Lane, B. G., J. M. Dunwell, J. A. Ray, M. R. Schmitt, and A. C. Cuming.** 1993. Germin, a Protein Marker of Early Plant Development, Is an Oxalate Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:12239-12242.
- Le Deunff, E., C. Davoine, C. Le Dantec, J. P. Billard, and C. Huault.** 2004. Oxidative Burst and Expression of Germin/Oxo Genes During Wounding of Ryegrass Leaf Blades: Comparison With Senescence of Leaf Sheaths. *Plant Journal* **38**:421-431.
- Lecourieux, D., C. Mazars, N. Pauly, R. Ranjeva, and A. Pugin.** 2002. Analysis and Effects of Cytosolic Free Calcium Increases in Response to Elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *Plant Cell* **14**:2627-2641.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon, and C. Lamb.** 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> From the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. *Cell* **79**:583-593.
- Li, W. H., J. Yang, and X. Gu.** 2005. Expression Divergence Between Duplicate Genes. *Trends in Genetics* **21**:602-607.
- Liu, Y. L., M. Schiff, and S. P. Dinesh-Kumar.** 2004. Involvement of Mek1 MAPKK, Ntf6 MAPK, WRKY/Myb Transcription Factors, Coil and Ctrl in N-Mediated Resistance to Tobacco Mosaic Virus. *Plant Journal* **38**:800-809.

- Livingstone, D. M., J. L. Hampton, P. M. Phipps, and E. Grabau.** 2005. Enhancing Resistance to *Sclerotinia minor* in Peanut by Expressing a Barley Oxalate Oxidase Gene. *Plant Physiology* **137**:1354-1362.
- Low, P. S., Merida, and J. R.** 1996. The Oxidative Burst in Plant Defense: Function and Signal Transduction. *Physiologia Plantarum* **96**:533-542.
- Lu, G.** 2003. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* Resistance in Oilseed Crops. *African Journal of Biotechnology* **2**:509-516.
- Mackey, D., Y. Belkhadir, J. M. Alonso, J. R. Ecker, and J. L. Dangl.** 2003. *Arabidopsis* RIN4 is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell* **112**:379-389.
- Marcus, A.** 1969. Seed Germination and the Capacity for Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **23**:143-160.
- Mehdy, M. C.** 1994. Active Oxygen Species in Plant Defense Against Pathogens. *Plant Physiology* **105**:467-472.
- Membre, N. and F. Bernier.** 1998. The Rice Genome Expresses At Least Six Different Genes For Oxalate Oxidase/Germin-Like Proteins (Genbank AF032971, AF032972, AF032973, AF032974, AF032975, AF032976). *Plant Physiol.* **116**:1-3.
- Membre, N., F. S. D. Bernier, and A. Berna.** 2000. *Arabidopsis thaliana* Germin-like Proteins: Common and Specific Features Point to a Variety of Functions. *Planta* **211**:345-354.
- Menke, F. L. H., J. A. Van Pelt, C. M. J. Pieterse, and D. F. Klessig.** 2004. Silencing of the Mitogen-Activated Protein Kinase Mpk6 Compromises Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:897-907.
- Miller, R. T., A. G. Christoffels, C. Gopalakrishnan, J. Burke, A. A. Ptitsyn, T. R. Broveak, 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**:1143-1155.
- Mondragon-Palomino, M., B. C. Meyers, R. W. Michelmore, and B. S. Gaut.** 2002. Pattern of Positive Selection in the Complete NBS-LRR Gene Family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* **12**:1305-1315.
- Moore, R. C. and M. D. Purugganan.** 2005. The Evolutionary Dynamics of Plant Duplicate Genes. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:122-128.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology* **15**:473-497.
- Nei, M. and T. Gojobori.** 1986. Simple Methods for Estimating the Numbers of Synonymous and Nonsynonymous Nucleotide Substitutions. *Molecular Biology and Evolution* **3**:418-426.
- Nekrutenko, A., K. D. Makova, and W. H. Li.** 2002. The K-a/K-s Ratio Test for Assessing the Protein-Coding Potential of Genomic Regions: an Empirical and Simulation Study. *Genome Research* **12**:198-202.
- Nevins, D. J., K. Nishitani, N. Sakurai, and M. Inouhe.** 1993. Glucuronoxylanase Degradation of Complex Xylans. *Journal of Cellular Biochemistry* **11**.
- Nimchuk, Z., T. Eulgem, B. E. Holt, and J. L. Dangl.** 2003. Recognition and Response in the

- Plant Immune System. Annual Review of Genetics **37**:579-609.
- Nürnbergger, T. and V. Lipka.** 2005. Non-Host Resistance in Plants: New Insights into an Old Phenomenon. Molecular Plant Pathology **6**:335-345.
- Nürnbergger, T., F. Brunner, B. Kemmerling, and L. Piater.** 2004. Innate Immunity in Plants and Animals: Striking Similarities and Obvious Differences. Immunological Reviews **198**:249-266.
- Ohmiya, A., M. Kikuchi, S. Sakai, and T. Hayashi.** 1993. Purification and Properties of an Auxin-Binding Protein From the Shoot Apex of Peach-Tree. Plant and Cell Physiology **34**:177-183.
- Ohmiya, A., Y. Tanaka, K. Kadowaki, and T. Hayashi.** 1998. Cloning of Genes Encoding Auxin-Binding Proteins (Abp19/20) From Peach: Significant Peptide Sequence Similarity With Germin-Like Proteins . Plant and Cell Physiology **39**:492-499.
- Ohno, S.** 1970. Evolution by Gene Duplication. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Osborn, T. C., J. C. Pires, J. A. Birchler, Auger D.L., Z. J. Chen, H. S. Lee, L. Comai, Madlung A., R. W. Doerge, Colot V., and R. A. Martienssen.** 2003. Understanding Mechanisms of Novel Gene Expression in Polyploids. Trends in Genetics **19**:141-147.
- Panopoulou, G., S. Hennig, D. Groth, A. Krause, A. J. Poustka, R. Herwig, M. Vingron, and H. Lehrach.** 2003. New Evidence for Genome-Wide Duplications at the Origin of Vertebrates Using an Amphioxus Gene Set and Completed Animal Genomes. Genome Research **13**:1056-1066.
- Piffanelli, P., F. 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**:1076-1085.
- Ramputh, A. I., J. T. Arnason, L. Cass, and J. A. Simmonds.** 2002. Reduced Herbivory of the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) on Corn Transformed With Germin, a Wheat Oxalate Oxidase Gene. Plant Science **162**:431-440.
- Rodriguez-Lopez, M., E. Baroja-Fernandez, A. Zanduetta-Criado, B. Moreno-Bruna, F. J. Munoz, T. Akazawa, and J. Pozueta-Romero.** 2001. Two Isoforms of a Nucleotide-Sugar Pyrophosphatase/Phosphodiesterase from Barley Leaves (*Hordeum vulgare* L.) are Distinct Oligomers of HvGLP1, a Germin-like Protein. FEBS Letters **490**:44-48.
- Ryals, J. A., U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner, and M. D. Hunt.** 1996. Systemic Acquired Resistance. Plant Cell **8**:1809-1819.
- Sakurai, N. and Y. Masuda.** 1978a. Auxin-Induced Changes in Barley Coleoptile Cell-Wall Composition. Plant and Cell Physiology **19**:1217-1223.
- Sakurai, N. and Y. Masuda.** 1978b. Auxin-Induced Extension, Cell-Wall Loosening and Changes in Wall Polysaccharide Content of Barley Coleoptile Segments. Plant and Cell Physiology **19**:1225-1233.
- Sambrook, J. and D. W. Russel.** 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habor, New York **Band1-3**.
- Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe, and M. Smith.** 1977. Nucleotide-Sequence of Bacteriophage Phichi174 DNA. Nature **265**:687-695.



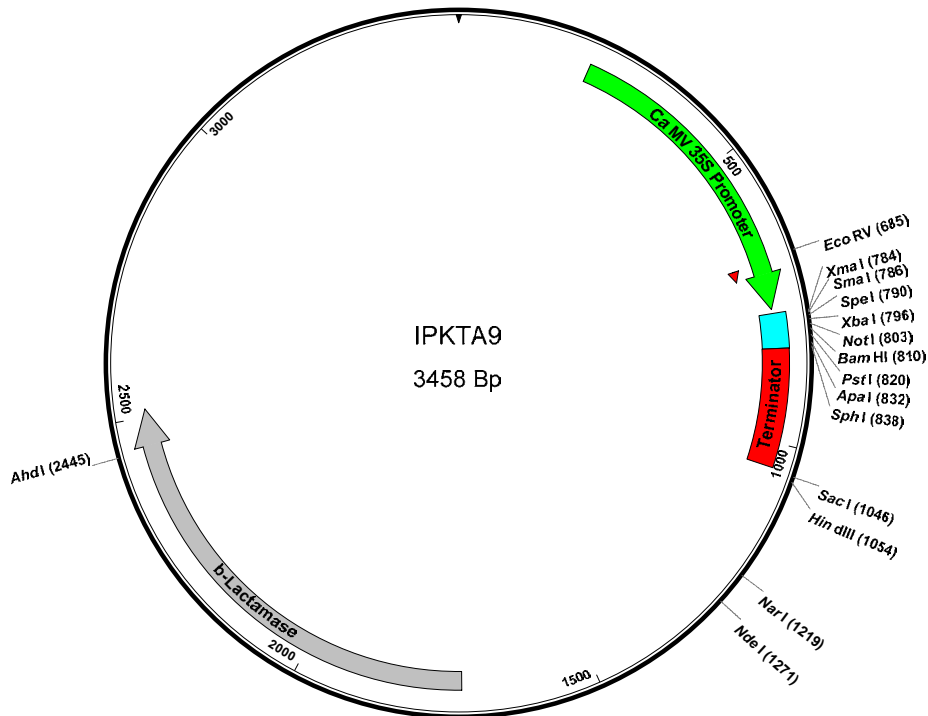
- Scheel, D.** 1998. Resistance Response Physiology and Signal Transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **1**:305-310.
- Schlösser, E.** 1997. *Allgemeine Phytopathology*. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart.
- Schweizer, P., A. Buchala, R. Dudler, and J. P. Mettraux.** 1998. Induced Systemic Resistance in Wounded Rice Plants. *Plant Journal* **14**:475-481.
- Schweizer, P., R. Gees, and E. Mosinger.** 1993. Effect of Jasmonic Acid on the Interaction of Barley (*Hordeum vulgare* L) With the Powdery Mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. *Plant Physiology* **102**:503-511.
- Schweizer, P., W. Hunziker, and E. Mosinger.** 1989. cDNA Cloning, In vitro Transcription and Partial Sequence-Analysis of Messenger-RNAs From Winter-Wheat (*Triticum aestivum* L) With Induced Resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Molecular Biology* **12**:643-654.
- Schweizer, P., A. Jeanguenat, D. Whitacre, J. P. Mettraux, 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**: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**:157-167.
- Schweizer, P., L. Vallelianbindschledler, 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**:51-66.
- Schweizer, P., A. Christoffel, and R. Dudler.** 1999a. Transient Expression of Members of the Germin-like Gene Family in Epidermal Cells of Wheat Confers Disease Resistance. *The Plant Journal* **20**:541-552.
- Schweizer, P., J. Pokorny, O. Abderhalden, and R. Dudler.** 1999b. A Transient Assay System for the Functional Assessment of Defense-Related Genes in Wheat. *MPMI* **12**:647-654.
- Segarra, C. I., C. A. Casalongue, M. L. Pinedo, V. P. Ronchi, and R. D. Conde.** 2003. A Germin-like Protein of Wheat Leaf Apoplast Inhibits Serine Protease. *Journal of Experimental Botany* **54**:1335-1341.
- Simmonds, J., L. Cass, E. Routly, K. Hubbard, P. Donaldson, B. Bancroft, A. Davidson, S. Hubbard, and D. Simmonds.** 2004. Oxalate Oxidase: A Novel Reporter Gene for Monocot and Dicot Transformations. *Molecular Breeding* **13**:79-91.
- Smith, S. E. and F. A. Smith.** 1990. Structure and Function of the Interfaces in Biotrophic Symbioses as They Relate to Nutrient Transport. *New Phytologist* **114**:1-38.
- Staiger, D., K. Apel, and G. Trepp.** 1999. The Atger3 Promoter Confers Circadian Clock-Regulated Transcription With Peak Expression at the Beginning of the Night. *Plant Molecular Biology* **40**:873-882.
- Swart, S., T. J. J. Logman, G. Smit, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne.** 1994. Purification and Partial Characterization of a Glycoprotein From Pea (*Pisum-Sativum*) With Receptor Activity for Rhicadhesin, an Attachment Protein of Rhizobiaceae. *Plant Molecular Biology* **24**:171-183.
- Swofford, D. L.** 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*And Other Methods),

- v.4b10. Sunderland, MA: Sinauer.
- Tanimoto, E. and Y. Masuda.** 1968. Effect of Auxin on Cell Wall Degrading Enzymes. *Physiologia Plantarum* **21**:820-&.
- Thordal-Christensen, H.** 2003. Fresh Insights into Processes of Nonhost Resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:351-357.
- Thordal-Christensen, H., P. L. Gregersen, and D. B. Collinge.** 2000. The Barley/*Blumeria* (Syn: *Erysiphe*) *graminis* Interaction. Kluwer Academic Publishers, Mechanisms of Resistance to Plant Diseases 77-100.
- Thordal-Christensen, H., Z. Zhang, Y. 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. *The Plant Journal* **11**:1187-1194.
- Vallelian-Bindschedler, L., J. P. Metraux, and P. Schweizer.** 1998c. Salicylic Acid Accumulation in Barley Is Pathogen Specific but Not Required for Defense-Gene Activation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**:702-705.
- Vallelian-Bindschedler, L., E. Mosinger, J. P. Metraux, and P. Schweizer.** 1998a. Structure, Expression and Localization of a Germin-Like Protein in Barley (*Hordeum vulgare* L.) That Is Insolubilized in Stressed Leaves. *Plant Molecular Biology* **37**:297-308.
- Vallelian-Bindschedler, L., P. Schweizer, E. Mosinger, and J. P. Metraux.** 1998b. 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**:185-199.
- Van Camp, W., H. Willekens, C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé, P. Reupold-Popp, H. J. Sandermann, and C. Langebartels.** 1994. Elevated Levels of Superoxide Dismutase Protect Transgenic Plants Against Ozone Damage. *Biotechniques* **12**:165-168.
- van Engelen, F. A., J. W. Molthoff, A. J. Conner, J.-P. Nap, A. Pereira, and W. J. Stiekema.** 1995. pBINPLUS: An Improved Plant Transformation Vector Based on pBIN19. **4**:288-290.
- Vanacker, H., T. L. W. Carver, and C. H. Foyer.** 2000. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation in Mesophyll Cells Leads to Induction of Glutathione During the Hyper-Sensitive Response in the Barley-Powdery Mildew Interaction. *Plant Physiology* **123**:1289-1300.
- Walther, U.** 2000. Analyses of Virulences and Selection of Resistant Material on the Host/Pathogen Combination Barley/*Puccinia hordei* and Wheat/*Puccinia recondita*. *Beitr. Züchtungsforschung* **6**:1-9.
- 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**: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**:101-112.
- Whittaker, M. M. and J. W. Whittaker.** 2002. Characterization of Recombinant Barley Oxalate Oxidase Expressed by *Pichia pastoris*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **7**:136-145.

- Wojtaszek, P.** 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**:681-692.
- Woo, E. J., J. M. Dunwell, P. W. Goodenough, A. C. Marvier, and R. W. Pickersgill.** 2000. Germin Is a Manganese Containing Homohexamer With Oxalate Oxidase and Superoxide Dismutase Activities. *Nature Structural Biology* **7**:1036-1040.
- Woo, E.-J., J. M. Dunwell, P. W. Goodenough, and R. W. Pickersgill.** 1998. Barley Oxalate Oxidase is a Hexameric Protein Related to Seed Storage Proteins: Evidence From X-ray Crystallography. *FEBS Letters* **437**:87-90.
- Xiao, S.** 2006. Current Perspective on Molecular Mechanisms of Plant Disease Resistance. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* **III**:317-333.
- Yamahara, T., T. Shiono, T. Suzuki, K. Tanaka, S. Takio, K. Sato, S. Yamazaki, and T. Satoh.** 1999. Isolation of a Germin-like Protein With Manganese Superoxide Dismutase Activity From Cells of a Moss, *Barbula unguiculata*. *Journal of Biological Chemistry* **274**:33274-33278.
- Zaleski, W. and A. Reinhard.** 1911. Über die fermentative Oxydation der Oxalsäure. *Pflanzenphysiol. Institut der Uni. Charkow.*
- Zeidler, D., U. Zahringer, Gerber. I., I. Dubery, T. Hartung, W. Bors , P. Hutzler, and J. Dunner.** 2004. Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides Activate Nitric Oxide Synthase (NOS) and Induce Defense Genes . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:15811-15816.
- Zeyen, R. J., T. L. W. Carver, and M. F. Lyngkjaer.** 2002. Epidermal Cell Papillae. Chapter 7 In : Belanger, R.R.; Bushnell, W.R. (Eds.) *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise.* The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA 107-125.
- Zhang, S. Q. and D. F. Klessig.** 2001. MAPK Cascades in Plant Defense Signaling. *Trends in Plant Science* **6**:520-527.
- Zhang, Y. J. and L. J. Wang.** 2005b. The WRKY Transcription Factor Superfamily: Its Origin in Eukaryotes and Expansion in Plants. *Bmc Evolutionary Biology* **5**.
- Zhang, Z., C. Henderson, E. Perfect, T. L. W. Carver, B. J. Thomas, P. Skamnioti, and S. J. Gurr.** 2005a. Of Genes and Genomes, Needles and Haystacks: *Blumeria graminis* and Functionality. *Molecular Plant Pathology* **6**:561-575.
- Zhang, Z., D. B. Collinge, and H. Thordal-Christensen.** 1995. Germin-like Oxalate Oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing Enzyme, Accumulates in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus. *The Plant Journal* **8**:139-145.
- Zhou, F. S., C. H. Andersen, K. Burhenne, P. H. Fischer, D. B. Collinge, and H. Thordal-Christensen.** 2000. Proton Extrusion Is an Essential Signalling Component in the HR of Epidermal Single Cells in the Barley-Powdery Mildew Interaction. *Plant Journal* **23**:245-254.
- Zhou, F., Z. Zhang, P. L. Gregersen, J. D. Mikkelsen, E. de Neergaard, D. B. Collinge, and H. Thordal-Christensen.** 1998. Molecular Characterization of the Oxalate Oxidase Involved in the Response of Barley to the Powdery Mildew Fungus. *Plant Physiology* **117**:33-41.
- Zimmermann, G., H. Baumlein, H. P. Mock, A. Himmelbach, and P. Schweizer.** 2006. The Multigene Family Encoding Germin-Like Proteins of Barley. Regulation and Function in Basal Host Resistance. *Plant Physiology* **142**:181-192.

## 8. Anhang

### 8.1 Klonierungskarte



Klonierungskarte des pIPKTA9-Vektors für transiente Überexpression (Dong et al., 2006; Zimmermann et al., 2006), pIPKTA9 basiert auf den pUC18-Vektor

### 8.2 Sequenzen

#### HvGER1a

5 AGCAACCACCCAGTAGTGCCTCAAAGGCTCCTGATCAACAAACTCTAGCTCATAGTGGTAGCTAAGCTTGCTACATAGCAAGCAATGGGTACTCTAAAAACCTAGGGGC 110  
 0  
 0 Met Gly Tyr Ser Lys Asn Leu Gly Ala  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9  
 5 TGGGCTGTTCACCATGCTGCTCCTTGCCTCCGGCCATCATGGCTACCGACCCTGACCCCTTACAGGACTTCTGGCTCGCGGACCTCGATGGCAAGGGCGGTCTCGGTGAACG 220  
 0  
 0 Gly Leu Phe Thr Met Leu Leu Leu Ala Pro Ala Ile Met Ala Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val Ser Val Asn  
 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45  
 5 GGCATACGTGTAAGCCCATGTCCGGAGGCGGGCGAGCACTTCCTCTTCCTGCTCCAAAGCTGACCAAGGCGGGCAACACGTCCACCCCGAACGGCTCGGCCGTGACGGAGCTC 330  
 0  
 0 Gly His Thr Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp Phe Leu Phe Ser Ser Lys Leu Thr Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro Asn Gly Ser Ala Val Thr Glu Leu  
 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82  
 5 GACGTGGCCGAGTGGCCCGGTACGAACACCGCTGGGGGTGCCATGAACCGTGTGGACTTCGCGCGGGCGGGCACCAACCGCGGCACATCCACCCCGGTGCAACCGGAGAT 440  
 0  
 0 Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Thr Asn Pro Pro His Ile His Pro Arg Ala Thr Glu Ile  
 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119  
 5 CGGCATGTGTGTAAGGAGCTCCTCGTGTGAATCCTCGGCAGCCTTGACTCCGGAAACAAGCTCTACTCCAGGGTGGTGGTGC CGGAGAGACTTTCGTATCCCGC 550  
 0  
 0 Gly Met Val Met Lys Gly Glu Leu Leu Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Val Ile Pro  
 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155  
 5 GCGGCTCATGACCTTCCAGTTCACAGTTCAGGTAAGACGGAAGCCTACATGGTGTGTCTTCAACAGCCAGAACCCCTGGCATCGTCTTCGTGGCCGTACACTCCTTCGGT 660  
 0  
 0 Arg Gly Leu Met His Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Tyr Met Val Val Ser Phe Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly  
 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192  
 5 TCCAAACCCGCCATCCCAACCCGGTCCACCAAGGCTCTTCGGGTGGAGCCGGGGTCTGGAACTTCTCAAGTCCAAGTTCGCCGGTGGTCTTAACCTCCATGAGC 770  
 0  
 0 Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val Glu Ala Gly Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Gly Gly Ser  
 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225  
 5 CCCAAATGATCAATATGAATATGTAATTCATATATATCCATGTATGCTGCGAATTTAATAGTACTCGACAGGAGACTATATTCAGCTTTCGGATAAGCTCGCATTTTCATA 880  
 0  
 0 GTAATAAGATTGAATAAGTTATCCTAGCGGTTCAGCCTTCAGAACAATGCGAGGAGTTAAAAATGATTGCTTCTTATTATTGTCATATTTGTTCTTTTGATTGAAGCGG 990  
 0  
 0

#### HvGER2a

5 CCACGCGTCCGACGCGAGTAGCAAGCCATGGCCAACGCAATGTTGCTCCCTGCTCCTCATCTCCTTCTCGTCTGCCCTTCTCCGCCATGGCCCTGACCCAGGACTTCT 110  
 0  
 0 Met Ala Asn Ala Met Leu Leu Pro Val Leu Ile Ser Phe Leu Val Leu Pro Phe Ser Ala Met Ala Leu Thr Gln Asp Phe  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27  
 5 GCGTCGCGACCTGTCTCGACGACACGCCGGCGGGTACCCTGCAAGACCGCGCTCGCGCGGGGACTTCTACTACCAGGCCTCGCCCGCGGGCAACACCAGC 220  
 0  
 0 Cys Val Ala Asp Leu Ser Cys Ser Asp Thr Pro Ala Gly Tyr Pro Cys Lys Thr Gly Val Gly Ala Gly Asp Phe Tyr Tyr His Gly Leu Ala Ala Ala Gly Asn Thr Ser  
 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64  
 5 AACCTCATCAAGGGCGCGGTAAACCCGGCCTTCGTCGGCCAGTTCGCCGGGTGAAAGGGCTCGGCATCTGCGCGAGGCTCGACATCGCCGTGGGGCGGCTCGTGCC 330  
 0  
 0 Asn Leu Ile Lys Ala Ala Val Thr Pro Ala Phe Val Gly Gln Phe Pro Gly Val Asn Gly Leu Gly Ile Ser Ala Ala Arg Leu Asp Ile Ala Val Gly Gly Val Val Pro  
 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101  
 5 GATGCACACCCACCCGGCCCTCTGAGCTCCTTCTGCTCACTGAGGCAACATCTTGGCGGGCTTCATCAGCTCCTCCTCAACACCGGTACACCAAGACGCTCTACA 440  
 0  
 0 Met His Thr His Pro Ala Ala Ser Glu Leu Leu Phe Val Thr Glu Gly Thr Ile Leu Ala Gly Phe Ile Ser Ser Ser Ser Asn Thr Val Tyr Thr Lys Thr Leu Tyr  
 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137  
 5 AGGGCGACATCATGGTGTTCACCCAGGGCTGCTCCACTACCAGTACAACGGTGGCAGCTCCTCCGCGTAGCGCTCGTTCGCTTCAGCGGGCCCAACCCAGGCTCCAG 550  
 0  
 0 Lys Gly Asp Ile Met Val Phe Pro Gln Gly Leu Leu His Tyr Gln Thr Asn Gly Gly Ser Ser Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Phe Ser Gly Pro Asn Pro Gly Leu Gln  
 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174  
 5 ATCACTGACTACGGCTCTTCGCCAACCAACTGCCATCCGGCTCGTTCAGAAAGGTCACCTTCCTTGGACGAGCGCAGGTGAAAGAGCTCAAGTCCGCTGCTCGGGCAG 660  
 0  
 0 Ile Thr Asp Tyr Ala Leu Phe Ala Asn Asn Leu Pro Ser Ala Val Val Glu Lys Val Thr Phe Leu Asp Asp Ala Gln Val Lys Lys Ser Val Leu Gly Gly Ser  
 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211  
 5 CGGCATTAATTAAGCAGTCTTCAGCAAAAGGTCGTCGTTGGTGTGACGGTCTCGGTTTATTTTGTATGATGATGTTTCGTCGCGGCTTGTGAGGTCAACTCCGAGTCTGTTCCAAGTT 770  
 0  
 0 Gly  
 212 213  
 5 GTGTTTAAATTTTCATATCAATTTTCATTTGATGATGTC 809  
 0  
 0

HvGER3a

5' GCCTGTGCAATCTACGGCTATTTAAGCACACCCATCCATGCTTCATTGCAAAAGCAACTCACAATGGCTTCTTCCACATTTGTTTTGGCTTTTCGCCCTCTGTGTGC 110  
 Met Ala Ser Ser Ser Thr Leu Phe Cys Leu Ser Ala Leu Leu Val  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

5' TGCCCTCATGGCAGGCCACTGCCCTACGATCCTAGCCCTCTTCAAGACTTCTGCATCGCCGACATGAAGGCGCTGGTATGCACTACGTATAGTGGCAGGTATAGATGTG 220  
 Leu Ala Ser Trp Gln Ala Thr Ala Tyr Asp Pro Ser Pro Leu Gln Asp Phe Cys Ile Ala Asp Met Lys Ala Pro  
 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

5' TGCCCTTAATTTCTAGTGGTGGTATAGTTPAATGTTGTGATAGCCTAGTATTTGATCACACACTGAAGTTTACTACATACTGATAACAGTTTTTCTTTTGGGGGTACATACT 330  
 5' GATCATAGTCTTAAAGTATATTACTGCGATGCTCAAGCCACCCACACATTCTTACTTGTCTTTATGTTTACTTTCTCTATGCAATGCGAGTGGCAATGATTTGCTTG 440  
 Val Arg Val Asn Gly Phe Ala Cys  
 41 42 43 44 45 46 47 48

5' CAAGGACCCAAATGGCCGCAACCCGGAGACTTCTTCAACGCGCCATGCTCGATCGCCTAGGGATACCAAGGCCAGCAAGGTCAAGTCCAAAGTCCACCAACATCAATG 550  
 Lys Asp Pro Met Ala Ala Thr Pro Gln Asp Phe Phe Asn Ala Ala Met Leu Asp Gln Pro Arg Asp Thr Lys Ala Ser Lys Val Arg Ser Asn Val Thr Asn Ile Asn  
 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84

5' TCATCAATTTTCTGGCCTCAACCCCTCGGCATCTCCCTGGCAGCATCGACTATGGGCCATTAGGTGTCAACACCGCCACATACACCCCGTGGCCCGGAGCTCCCTC 660  
 Val Ile Asn Phe Pro Gly Leu Asn Thr Leu Gly Ile Ser Leu Ala Arg Ile Asp Tyr Gly Pro Leu Gly Val Asn Thr Pro His Ile His Pro Arg Ala Thr Glu Leu Leu  
 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121

5' ACGGTCTTGAGGGGACCTTACCTTGGATTGTACATCCAACCCAAACAGGCTCTTCTCCAAGATAGTTAAGAAGGGTATGATATCGTATCCCAAAGCAATGAT 770  
 Thr Val Leu Glu Gly Thr Leu Tyr Leu Gly Phe Val Thr Ser Asn Pro Asn Arg Leu Phe Ser Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Val Phe Val Phe Pro Lys Ala Met Ile  
 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158

5' TCACCTCCAAATGAACCTGGCCGATGACAAGCCAGCAGCCGCTTGCCTCGCTCAGCAGCAAAACCCCTGGGGTATTTCTATCGCCAATGCGACTTTGGATCAAAAGC 880  
 His Phe Gln Met Asn Leu Ala His Asp Lys Pro Ala Ala Ala Leu Ser Ser Leu Ser Ser Gln Asn Pro Gly Val Ile Ser Ile Ala Asn Ala Val Phe Gly Ser Lys  
 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194

5' CACCAATTTAGATGATTTCTAGCCACGGCGTTTCAGTGGAGAAGGATCTGATTCATGGCTTCAATCTCAGTTCTGGGAGAATAACAACACTACTAGATACTCTCTTTC 990  
 Pro Pro Ile Ser Asp Asp Val Leu Ala Thr Ala Phe Gln Val Glu Lys Asp Leu Ile His Trp Leu Gln Ser Gln Phe Thr Glu Asn Asn Asn Tyr  
 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227

5' ATCTGGCCATATGGAAGTTTCATATGTAATGCTAG 1025

HvGER4a

5' GCACGAGGCACAAACAGGAACACAAAAGAAAAGAGGCAAAAGAAACTAAACACAAATGACAACCTCCTTCCATCCTTCTCCCTTGGCTGCCCTTCTTGGCTTGGTCTC 110  
 Met Thr Thr Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Ala Leu Val Ser  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

5' ATGGCAGGCCAATTCGGTCCGATCTGACCCACTCCAGGACTTTTGTGTCGCCGACATPGCATTCACCAGTGGGTGTCATGGGTTCGTTTGCAGAACCCGATGGAAGTTA 220  
 Trp Gln Ala Ile Ala Ser Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe Cys Val Ala Asp Met His Ser Pro Val Arg Val Asn Gly Phe Val Cys Lys Asn Pro Met Glu Val  
 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54

5' ATGCAAGATGACTTCTCAAGGCAACCCACTCGACAAGCCTAGGGTGCACCAACAGTTGGATCCAAGTCACTTTGATCAACGTCATGCAAGATTTGCTGGACTCAACACC 330  
 Asn Ala Asp Asp Phe Phe Lys Ala Ala Asn Leu Asp Lys Pro Arg Val Thr Asn Lys Val Gly Ser Asn Val Thr Leu Ile Asn Val Met Gln Ile Ala Gly Leu Asn Thr  
 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91

5' CTCGGAATCTCAATTCGGCGCATCGACTATGCTCCCTTGGGCCAAAACCCACCACATACGCACCCCTCGCGCCACTGAGATCCCTACGGTCTCGAGGGGACACTGTACGT 440  
 Leu Gly Ile Ser Ile Ala Arg Ile Asp Tyr Ala Pro Leu Gly Gln Asn Pro Pro His Thr His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Leu Thr Val Leu Glu Gly Thr Leu Tyr Val  
 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128

5' TGGCTTTTGCATCCACAGCCCGCCCGCCACAGAAACAAGTTCCCTTCCAAGGTGCTCAACAAAGGTGATGTGTTTGTCTTTCCCGTGGGGCTCATCCACTTCCART 550  
 Gly Phe Val Thr Ser Asn Gln Pro Ala Pro Asn Arg Asn Lys Phe Leu Ser Lys Val Leu Asn Lys Gly Asp Val Phe Val Phe Pro Val Gly Leu Ile His Phe Gln  
 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164

5' TCAACCCGAACCCCAACAGCCTGCCGTTGCAATTCGCCGCTCAGTAGCCAGAACCAGGGCTATCACAATGCCAATGCAAGTGTGGGTGAGCCCAACCAATATCG 660  
 Phe Asn Pro Asn Pro His Gln Pro Ala Val Ala Ile Ala Ala Leu Ser Ser Gln Asn Pro Gly Ala Ile Thr Ile Ala Asn Ala Val Phe Gly Ser Asp Pro Pro Ile Ser  
 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201

5' GATGATGTTCTTCCAAGGCATTTCCAGGTTGAAAAGAAATACAATAGACTATCTCCAGGCTCAGTTCTGGGAGAACAACCAATGATTGATTACACGGAAATAGAGTGC 770  
 Asp Asp Val Leu Ser Lys Ala Phe Gln Val Glu Lys Asn Thr Ile Asp Tyr Leu Gln Ala Gln Phe Trp Glu Asn Asn His Asn  
 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230

5' ATAAACCAAGGACTTGGTTGACTTTCTAGACATGCATCCATAAATAAATGGAGCATATATCATGTGCTTGTGTTTGAAGCCCTGAATGTATTTCAAGTCTC 880  
 5' ATGAATAATCAAGAAATATGT 900





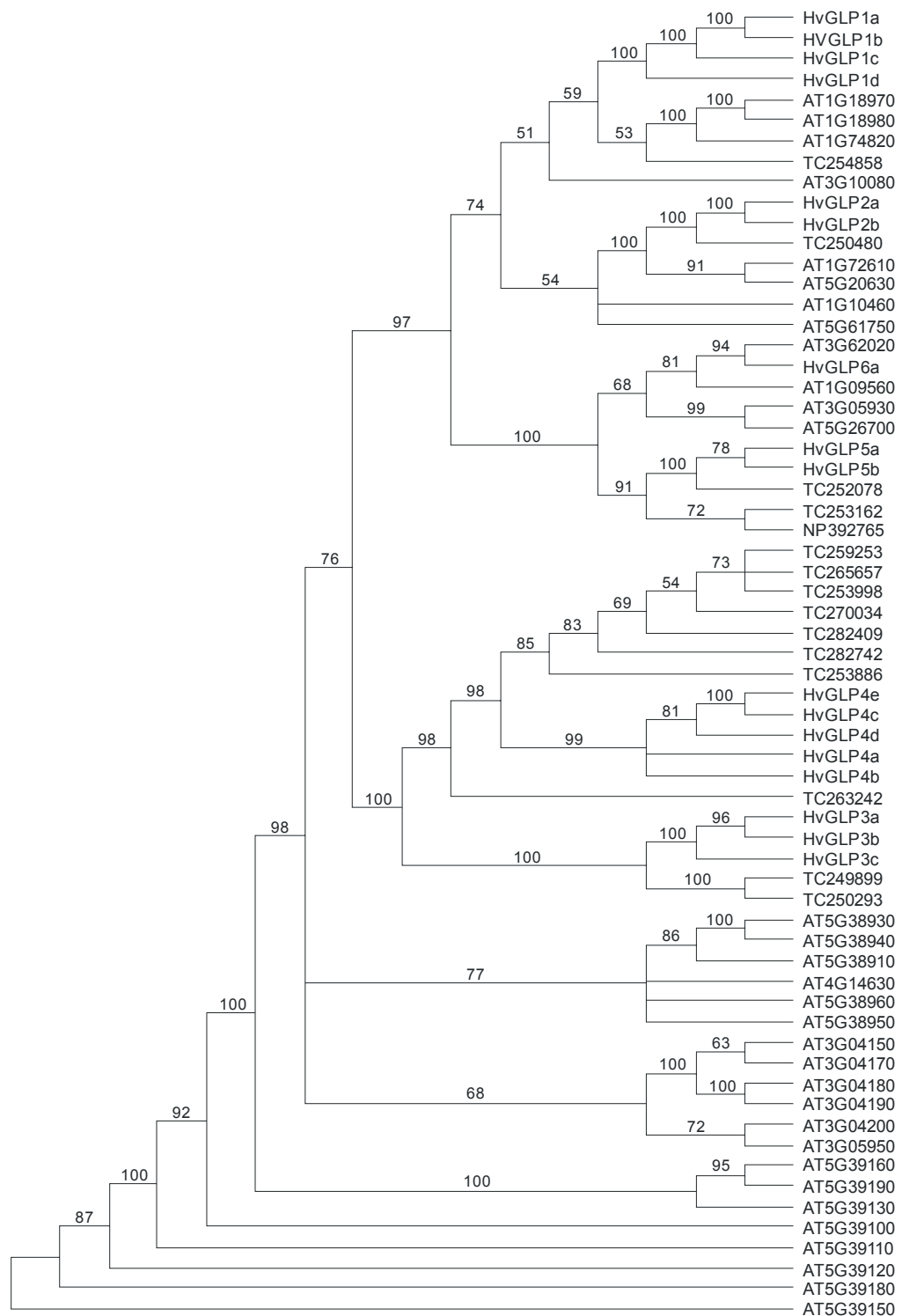








## 8.4 Phylogenetischer Baum



Phylogenetische Analyse der HvGER, der AtGLP und der OsGLP Proteinsequenzen. In die Berechnung sind nur Sequenzen mit vollständig kodiertem Bereich einbezogen. Nur die *Bootstrap*-Werte über 50% sind dargestellt. TC Nummern entsprechen den Reissequenzen und die AT Nummern den *A. thaliana* Genmodellen. NP Nummer (Reissequenz) entspricht der *Accession* in GenBank.

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abb. 1.1</b> Struktur der Germine und GLPs .....	<b>18</b>
<b>Abb. 3.1</b> Strukturelle Organisation der HvGER Proteine anhand des Sequenzalignment der Repräsentanten aus den HvGER Unterfamilien.....	<b>54</b>
<b>Abb. 3.2</b> Dendrogramm zeigt die Verwandtschaftsanalyse zwischen den HvGER Unterfamilien.....	<b>54</b>
<b>Abb. 3.3</b> Phylogenetische Analyse der HvGER, der AtGLP und der OsGLP Proteinsequenzen.....	<b>58</b>
<b>Abb. 3.4</b> Dot Blot Analyse der 6 HvGER cDNAs.....	<b>62</b>
<b>Abb. 3.5</b> Northernblotanalyse der Subfamilien HvGER1-6 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Gerste.....	<b>63</b>
<b>Abb. 3.6</b> Quantifizierung und Normalisierung der Transkripthäufigkeiten der HvGER Gene aus den Northernblotanalysen.....	<b>64</b>
<b>Abb. 3.7</b> Schematische Darstellung der entwicklungsabhängigen Expression der 6 HvGER-Subfamilien .....	<b>65</b>
<b>Abb. 3.8</b> Northernblotanalyse: Expressionsdetektion für HvGER1-6 in den Geweben blühender Gerstenpflanzen.....	<b>66</b>
<b>Abb. 3.9</b> Abgeglichene Transkriptabundanz der HvGER Gene als Säulendiagramm dargestellt .....	<b>67</b>
<b>Abb. 3.10</b> Northernblotanalyse von gestresstem Pflanzenmaterial zur Detektion der Expression der HvGER Gene.....	<b>68</b>
<b>Abb. 3.11</b> Quantifizierung und Normalisierung der Transkripthäufigkeiten der HvGER Gene aus den Northernblotanalysen.....	<b>70</b>
<b>Abb. 3.12</b> Blattgewebsspezifische HvGER Genexpression reguliert durch den Gerstenmehltau <i>Blumeria graminis</i> fsp. <i>hordei</i> .....	<b>71</b>
<b>Abb. 3.13</b> Dot Blot Analyse zur Überprüfung von Kreuzhybridisierung zwischen Genen der Subfamilie HvGER4. ....	<b>73</b>
<b>Abb. 3.14</b> Genexpression von vier <i>HvGER4</i> Genen zur Untersuchung der differentiellen Regulation. ....	<b>74</b>
<b>Abb. 3.15</b> Quantifizierung und Normalisierung der Transkripthäufigkeiten der vier Gene der HvGER4 Subfamilie.....	<b>75</b>
<b>Abb. 3.16</b> Metaexpressionsanalyse.....	<b>77</b>
<b>Abb. 3.17</b> Westernblotanalyse rekombinanter GF-2.8 Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i> . .	<b>89</b>
<b>Abb. 3.18</b> Westernblotanalyse rekombinanter HvGER Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i> . .	<b>91</b>
<b>Abb. 3.19</b> Denaturierende Westernblotanalyse. ....	<b>94</b>
<b>Abb. 3.20</b> Nachweis von Oxalatoxidase-Aktivität für HvGER1 nach transienter Expression in Epidermiszellen.....	<b>95</b>
<b>Abb. 3.21</b> Nachweis von Superoxiddismutaseaktivität im Gel.....	<b>96</b>

<b>Abb. 4.1</b> Modell zur Beschreibung von anfälligkeits- und resistenzvermittelnder Wirkung der HvGER Proteine .....	<b>115</b>
<b>Tab. 3.1</b> Identifizierung von HvGER Genen für jede Unterfamilie. ....	<b>51</b>
<b>Tab. 3.2</b> Identifizierung von vier <i>Contigs</i> (Genen) der HvGER4 Unterfamilie mittels <i>Cluster</i> -Analyse von 134'903 Gersten ESTs. ....	<b>56</b>
<b>Tab. 3.3</b> Die ORFs paraloger Gene einer HvGER Unterfamilie unterliegen fast ausschließlich einer „säubernder“ Selektion. ....	<b>60</b>
<b>Tab. 3.4</b> Transiente Überexpression von <i>HvGER4d</i> in verschiedenen Weizen und Gerstensorten. ....	<b>80</b>
<b>Tab. 3.5</b> Transiente Überexpression von HvGER1-6 beeinflusst die Basalresistenz gegen Bgh. ....	<b>82</b>
<b>Tab. 3.6</b> Wirkung des RNAi Effekts auf die Resistenz epidermaler Zellen gegen <i>Blumeria graminis</i> fsp. <i>hordei</i> . ....	<b>84</b>
<b>Tab. 3.7</b> Transiente Überexpression der Wildtyp und mutierten Formen der HvGER Gene und ihre Wirkung auf die Basalresistenz. ....	<b>86</b>

## 10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben angefertigt. Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern, speziell bei meiner eigenen Arbeitsgruppe „Transkriptomanalyse“ für das wissenschaftlich stimulierende Umfeld bedanken, welches die Entstehung meiner Arbeit günstig beeinflusst hat.

Besonders bedanke ich mich bei:

Herrn Prof. Ulrich Wobus, voriger Direktor des IPK, der mit freundlicher Übernahme der Betreuung die Erstellung meiner Promotionsarbeit ermöglichte.

Herrn Dr. habil. Patrick Schweizer, als begleitender Mentor und immer zur Verfügung stehender Ansprechpartner für seine wertvollen Anregungen und konstruktiven Diskussionen.

Den technischen Assistentinnen, Frau Gabriele Brantin und Frau Manuela Knauff, für ihre Hilfsbereitschaft und Umsichtigkeit. Besonders Frau Brantins unermüdlicher Einsatz an der Partikelkanone, in meiner letzten Arbeitsphase im Labor, möchte ich hervorheben.

Frau Liemann und Dr. habil. Bäumlein der Arbeitsgruppe „Molekulare Genetik“ für die Zusammenarbeit bei der Herstellung von transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

Frau Wolf, Frau Petra und Herrn Dr. Mock der Arbeitsgruppe „Angewandte Biochemie“ für die Verfügungstellung der Geräte und des „know-hows“ bei der Anfertigung von Polyacrylamidgelen und für die Tests auf Superoxiddismutase.

Alexandra für die Anmerkungen, Tips und dem Korrekturlesen der Arbeit, sowie für ihre aufmunternde Art.

Sergej für anregende Diskussionen und Kommentare zu den Texten, verbunden mit geduldiger Stärkung meines Durchstehvermögens.

Beate für ihre finanzielle Unterstützung und bei meinen Eltern für ihren Beistand in allen Lebenslagen.

## 11. Lebenslauf

### Persönliches

Name: Grit Astrid Zimmermann  
Adresse: Bestehornstraße 13  
06449 Aschersleben  
  
Geburtsdatum und -ort: 18.06.1974 in Aschersleben  
Familienstand: Ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung und Beruflicher Werdegang

1981-1990 Besuch der 4. Oberschule in Aschersleben  
  
1990-1993 Besuch des Gymnasiums „Stephaneum“ in Aschersleben  
  
1993-96 u. 1997-99 Biologie-Studium an der „Friedrich Schiller Universität“ in Jena, Spezialisierung in Ökologie, Botanik, Zoologie und Neurophysiologie  
  
1996-1997 Studium an der „University of Birmingham“ in Birmingham, UK  
Schwerpunkt in Neurophysiologie  
  
1999-2000 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben. Thema der Arbeit: „ATMYB23: ein pleiotroper Phänotyp durch Überexpression eines Transfaktor-Gens in *Arabidopsis thaliana*“. Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Genregulation“ von Dr. habil. Helmut Bäumlein betreut.  
  
2000-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am IPK Gatersleben in der Arbeitsgruppe „Lipidstoffwechsel“ unter der Leitung von Dr. habil.



Feußner. Forschungsaufgabe: Charakterisierung von pflanzlichen Lipoxygenasen

Feb. 2002 bis Jun. 2005      Doktorandin am IPK Gatersleben in der Arbeitsgruppe „Transkriptomanalyse“ unter der Betreuung von Dr. habil. Schweizer. Thema der Dissertation: Eine Multigenfamilie kodiert durch Germin-ähnliche Proteine in der Gerste: Regulation und Funktion in der Basalresistenz gegen den Mehлтаupilz *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

### Publikationen

Adler K, Kirik V, Zimmermann G, and Bäumlein H (2000). Morphological Characterisation of the *Arabidopsis*-Mutant MYB23 by Cryoscanning Electron Microscopy. EUREM **12**, 139-140.

Christensen AB, Thordal-Christensen H, Zimmermann G, Gjetting T, Lyngkjaer MF, Dudler R, and Schweizer P (2004). The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. Mol Plant Microbe Interact. **17**: 109-117.

Zimmermann G, Bäumlein H, Mock HP, Himmelbach A, and Schweizer P (2006). The multigene family encoding germin-like proteins of barley: Regulation and function in basal host resistance. Plant Physiology **142**:181-192.

## 12. Erklärung

### Erklärung

Gemäss §28 Abs. 2 Promotionsordnung 03.02.04

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die benutzten Werke wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Aschersleben, Juni 2007

Grit Zimmermann