

**Identifizierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse von  
Determinanten der Suszeptibilität und Resistenz im Pathosystem  
Gerste / Echter Gerstenmehltaupilz**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 21.11.2003

vorgelegt von  
Holger Schultheiß  
aus Friedberg (Hessen)

Gutachter: Prof. Dr. Hubert Felle  
Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel  
Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b>	<b>1</b>
1.1	<b><i>Wirt - Pathogen - Interaktionen</i></b>	<b>1</b>
1.2	<b><i>Resistenz</i></b>	<b>2</b>
1.2.1	Induzierte Resistenz	3
1.3	<b><i>Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr</i></b>	<b>4</b>
1.3.1	Präformierte Komponenten der Abwehr	4
1.3.2	Induzierte Komponenten der Abwehr	4
1.3.3	PR-Proteine	6
1.4	<b><i>Mechanismen der Suszeptibilität</i></b>	<b>6</b>
1.4.1	Kompatibilitätsfaktoren des Pathogens	6
1.4.2	Suszeptibilitätsfaktoren der Wirtspflanze	8
1.5	<b><i>Mechanismen der Pathogenerkennung</i></b>	<b>9</b>
1.6	<b><i>Pflanzliche Signaltransduktion nach Pathogenbefall</i></b>	<b>11</b>
1.6.1	Monomere G-Proteine	13
1.7	<b><i>Das Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltaupilz</i></b>	<b>15</b>
1.7.1	Abwehrreaktionen in der kompatiblen Interaktion	18
1.7.2	Rassen/Sorten-spezifische Resistenz von Gerste gegen <i>Bgh</i>	19
1.7.3	Die <i>mlo</i> vermittelte Resistenz von Gerste gegen <i>Bgh</i>	21
1.8	<b><i>Zielsetzung der Arbeit</i></b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b><i>PUBLIKATIONEN</i></b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b><i>DISKUSSION</i></b>	<b>25</b>
3.1	<b><i>Die transiente Transformation durch Partikelbombardement</i></b>	<b>25</b>
3.1.1	Optimierung der Transformationseffizienz	26
3.1.2	Der <i>knock-down</i> durch RNA Interferenz	28
3.2	<b><i>PR-1B als Resistenzfaktor im Gerste – Bgh Pathosystem</i></b>	<b>32</b>
3.3	<b><i>Kleine G-Proteine als Suszeptibilitätsfaktoren im Gerste – Bgh Pathosystem</i></b>	<b>35</b>
3.3.1	Die RAC/ROP Familie in Gerste	35
3.3.2	Molekulare Mechanismen der RAC/ROP Funktion	38
3.3.2.1	<i>Funktionen der Typ I RAC/ROP Proteine</i>	38
3.3.2.2	<i>Funktionen der Typ II RAC/ROP Proteine</i>	42
3.3.2.3	<i>Lokalisation und Funktion der RAC/ROP Proteine</i>	45
3.3.3	RAC/ROP Proteine als Suszeptibilitätsfaktoren	48
3.3.3.1	<i>Kooperation der RAC/ROPs mit anderen Suszeptibilitätsfaktoren</i>	49
3.3.3.2	<i>RAC/ROP Proteine als Angriffspunkte für Pathogenitätsfaktoren</i>	51
<b>4</b>	<b><i>ZUSAMMENFASSUNG</i></b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b><i>SUMMARY</i></b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b><i>LITERATURVERZEICHNIS</i></b>	<b>57</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Avr	Avirulenz
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>
bp	Basenpaare
CA	<i>constitutivly active</i> , konstitutiv aktiv
cDNA	<i>copy</i> DNA (mit mRNA als Vorlage synthetisierte DNA)
DAB	Diaminobenzidin
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
DN	dominant negativ
DNA	2-deoxyribonucleic acid (2- Desoxyribonukleinsäure)
DPI	Diphenyliodonium
DsRED	<i>Discosoma ssp. red</i> , rotes fluoreszierendes Protein
dsRNA	doppelsträngige RNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
hai	<i>hours after inoculation</i> , Stunden nach Inokulation
HR	Hypersensitive Reaktion
kDa	kilo Dalton
LRR	<i>leucine rich repeat</i> , Leucin reiche Region
<i>Mla</i>	<i>mildew locus A</i> , Resistenzgen
<i>Mlo</i>	<i>mildew locus O</i> , Suszeptibilitätsgen
mbar	milli Bar
mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten-RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
PCD	<i>programmed cell death</i> , programmierter Zelltod
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PM	Plasmamembran
PR	<i>pathogenesis related</i> , Pathogenese bedingte
RAC	<i>ras related C3 botulinumtoxin substrat</i> , Ras ähnliches Protein, das von C3 Toxin aus <i>Clostridium botulinum</i> inaktiviert wird.
RAR	<i>required for Mla specific resistance</i> , Protein, das für die <i>Mla</i> vermittelte Resistenz benötigt wird.
RAS	<i>rat sarcome onkogene product</i> , Protoonkogenprodukt der Ratte
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROI	<i>reactive oxygen intermediates</i> , Reaktive Sauerstoff Intermediate
ROP	<i>Rho of plants</i> , Proteine der Rho Familie in Pflanzen, Synonym zu RAC
ROR	<i>required for mlo specific resistance</i> , Protein, das für die <i>mlo</i> vermittelte Resistenz benötigt wird.
TIR	Toll / Interleukin Rezeptor

## 1 EINLEITUNG

Eines der größten Probleme der Gegenwart ist die Versorgung der schnell wachsenden Weltbevölkerung mit Nahrungsmitteln. Obwohl die moderne Landwirtschaft das Potential hat, alle Menschen ausreichend zu ernähren, wird dieses Ziel in großen Teilen der Welt verfehlt. Einen bedeutenden Anteil an der Diskrepanz zwischen theoretisch erreichbarem und tatsächlich erzieltm Ertrag haben pflanzliche Pathogene, die weltweit 17,5 Prozent des potentiellen Ertrags vernichten (Oerke, 1997). Auch mit intensiven chemischen Pflanzenschutzmaßnahmen ist ein Befall durch verschiedene Schaderreger oft nicht abzuwenden. So wird die volle Wirksamkeit eingesetzter Pflanzenschutzmittel oft durch ungenügende Applikationstechniken oder durch ungünstige äußere Bedingungen wie beispielsweise Regen verhindert. Zudem ist ein häufiger und starker Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln, wie er oft zur Verhinderung des Krankheitsausbruchs nötig wäre, sowohl aus ökonomischen als auch aus ökologischen Gründen nicht sinnvoll. Einige Pathogene entwickeln außerdem ständig neue Resistenzen gegen chemische Pflanzenschutzmittel. Die eleganteste Lösung zur Verhinderung des Pathogenbefalls von Nutzpflanzen, wäre der Anbau von Sorten, die resistent gegenüber den wichtigsten Pathogenen sind. Um dieses Ziel zu erreichen, ist eine genaue Kenntnis der jeweiligen Pathogenese und den zugehörigen Abwehrreaktionen der Pflanzen notwendig.

### *1.1 Wirt - Pathogen - Interaktionen*

Pflanzen sind in der Natur ständigen Angriffen von Viren, Bakterien, Pilzen und anderen Schaderregern ausgesetzt. Ist ein Pathogen in der Lage, einen Wirt zu befallen und sich auf bzw. in diesem Wirt zu vermehren, so spricht man von einer kompatiblen Interaktion, das heißt der Wirt ist anfällig bzw. suszeptibel gegenüber dem virulenten Pathogen. Kann die Pflanze den Krankheitserreger jedoch abwehren, handelt es sich um eine inkompatible Interaktion zwischen einem resistenten Wirt und einem avirulenten Pathogen (Schlösser, 1997). Eine Besonderheit ist die Toleranz gegenüber einem Pathogen. Hierbei lässt die Pflanze zwar eine Besiedlung zu, diese führt jedoch nicht zu einer wesentlichen Schädigung des Wirts (Agrios, 1997).

### 1.2 Resistenz

Als Resistenz bezeichnet man die Fähigkeit einer Pflanze, Befall und Besiedlung durch einen Schaderreger zu verhindern oder zu begrenzen. Die Mechanismen der Pflanze, den Pathogenbefall zu verhindern, sind vielfältig (siehe Kap. 1.4).

Die am weitesten verbreitete Art der Resistenz von Pflanzen gegenüber Mikroorganismen ist die sogenannte Nicht-Wirt-Resistenz. Diese Form der Resistenz zeichnet sich dadurch aus, dass sie dauerhaft und Rassen/Sorten-unspezifisch ist, das heißt, alle Angehörigen einer Pflanzenart sind gegen alle Pathotypen eines Erregers resistent. Es gibt zwei wesentliche Gründe, warum Pflanzen gegenüber den meisten potentiellen Pathogenen eine Nicht-Wirt-Resistenz zeigen. Einerseits stellt das Pathogen bestimmte physiologische Ansprüche an die Wirtspflanze. So muss der Wirt sowohl durch spezielle Signalmoleküle für das Pathogen erkennbar sein als auch bestimmte vom Pathogen benötigte Substrate liefern können. Außerdem müssen die oft hochwirksamen präformierten und induzierten Abwehrmechanismen der Pflanze durch den Schaderreger überwunden werden (Heath, 1987; Schlösser, 1997).

Durchbricht ein Pathogen durch evolutive Veränderungen die Nicht-Wirt-Resistenz, so kann es die Pflanze ungehindert besiedeln. Im Laufe der Evolution ist es der Pflanze jedoch möglich die Resistenz zurückzugewinnen, indem sie das Pathogen spezifisch erkennt und eine wirksame Abwehrreaktion ausgelöst wird. Die so entstandene Wirtsresistenz ist meistens qualitativ, das bedeutet, sie beruht auf der rassenspezifischen Erkennung eines Avirulenzgenprodukts des Pathogens durch das korrespondierende Resistenzgenprodukt der Pflanze (Gen-für-Gen Modell, Flor, 1971). Das Resistenzgenprodukt ist dabei Startpunkt einer Signalkaskade, die zu einer effektiven Abwehr des Pathogens führt. Die qualitative Wirtsresistenz ist allerdings monogenen Ursprungs, was zu einer nur geringen Dauerhaftigkeit in der agronomischen Anwendung führt (Schlösser, 1997).

Ist eine Resistenz gegenüber allen Erregerrassen gleichermaßen effektiv, so spricht man von rassenunspezifischer oder quantitativer Wirtsresistenz. Diese Form der Resistenz ist durch ihren polygenen Charakter zwar dauerhaft aber nur in wenigen Fällen vollständig (zum Beispiel die *mlo*-Resistenz der Gerste gegen Echten Gerstenmehltaupilz). Meist erhält die Pflanze durch quantitative Resistenzen nur eine unvollständige Basisresistenz (Schlösser, 1997).

### 1.2.1 Induzierte Resistenz

Die induzierte Resistenz umfasst alle Formen der Resistenz, die durch eine Stimulation der Pflanze vor einer Pathogenattacke ausgeprägt werden. Die Induktion der Resistenz kann dabei sowohl durch verschiedene biotische, als auch durch abiotische Stimuli erfolgen. Nach Perzeption des Stimulus wird eine Signalkaskade ausgelöst, die einerseits zur direkten Expression von Abwehrmechanismen führt, andererseits aber die Pflanze in einen *geprimten* Zustand versetzt, das heißt deren Neigung erhöht, auf eine spätere Pathogenattacke schneller und stärker zu reagieren (Conrath *et al.*, 2002).

Die biologisch induzierte Resistenz wurde erstmals durch Chester (1933) im System Tabak / Tabak Mosaik Virus (TMV) beschrieben. Nach einer lokalen Infektion von Tabak mit TMV wurde sowohl das befallene Blatt als auch die gesamte Pflanze resistenter gegen nachfolgende TMV-Infektionen. Dieses Phänomen wurde später als systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR) bezeichnet (Ross, 1961). Da die in den meisten dikotylen Pflanzenarten vorkommende SAR über mehrere Wochen bis Monate anhält und gegen ein breites Spektrum von Pathogenen wirkt, ist die biotechnologische Anwendung des SAR Mechanismus sehr interessant (Sticher *et al.*, 1997). Als Abgrenzung von der durch Pathogene induzierten SAR wird die durch wurzelbesiedelnde Rhizobakterien ausgelöste Resistenz als ISR (*induced systemic resistance*) bezeichnet (Pieterse *et al.*, 1998).

Zeitgleich mit dem Einsetzen der SAR kommt es in dikotylen Pflanzen zur Akkumulation von Salizylsäure (Sticher *et al.*, 1997) sowie zur verstärkten Expression von sogenannten *pathogenesis related* (PR) Genen (siehe Kap. 1.3.3, van Loon und van Strien, 1999). Die Anreicherung von Salizylsäure ist dabei entscheidend für den Aufbau der induzierten Resistenz. So sind transgene *NahG*-Pflanzen, in denen die Akkumulation von Salizylsäure durch Expression einer bakteriellen Salizylhydroxylase (*NahG*) verhindert wird, anfällig gegenüber einer sekundären Infektion.

Durch die exogene Zufuhr von Salizylsäure kann ebenfalls systemisch induzierte Resistenz erreicht werden, wobei der erhaltene Resistenzphänotyp nicht auf eine toxische Wirkung des Induktors Salizylsäure gegen das Pathogen zurückzuführen ist. In diesem Fall spricht man von chemisch induzierter Resistenz (CIR, Görlach *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997). Eine stärkere und langfristige Resistenz auslösung erreicht man bei Verwendung von Funktionsanaloga der Salizylsäure, wie DCINA (2,6 Dichlorisonicotinsäure) oder BTH (Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester).

### **1.3 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr**

#### **1.3.1 Präformierte Komponenten der Abwehr**

Unter präformierten Komponenten der Abwehr versteht man strukturelle (physikalische) und biochemische Abwehrmechanismen der Pflanze, welche bereits vor dem Kontakt mit dem Pathogen vorhanden sind und somit nicht induziert werden.

Zu den strukturellen präformierten Abwehrkomponenten gehören vor allem die mechanischen Barrieren wie Behaarung, epikutikuläre Wachsschichten und Kutikula. Diese Barrieren verhindern die unmittelbare Interaktion des Pathogens mit den Wirtszellen, wodurch eine Infektion erschwert wird (Schlösser, 1997).

Neben den strukturellen Komponenten gibt es eine Vielzahl von konstitutiven biochemischen Abwehrmechanismen. Zum Beispiel werden niedermolekulare antimikrobielle Substanzen, wie Senföle, Saponine und Alkaloide, in Vakuolen gespeichert oder in die Zellwand eingelagert (Stripe *et al.*, 1992; Agrios, 1997; Heath, 2000).

#### **1.3.2 Induzierte Komponenten der Abwehr**

Gelangt trotz der präformierten Abwehrkomponenten ein Erreger mit der Pflanzenzelle in Kontakt, so wird er in der Regel von der Pflanze erkannt, die daraufhin ein breites Spektrum an Abwehrmaßnahmen auslöst. Die Erkennung des Pathogens erfolgt hierbei über direkt oder indirekt vom Pathogen freigesetzte Moleküle, die als Elicitoren bezeichnet werden.

Unmittelbar nach der Perzeption eines Elicitors beginnt die Pflanzenzelle mit der massiven Produktion von Reaktiven Sauerstoff Intermediaten (ROI) wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ). Dieser Prozess wird als *oxidative burst* bezeichnet und beginnt wahrscheinlich mit der Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  durch eine plasmamembranständige NADPH-Oxidase (Lamb und Dixon, 1997).

ROIs sind wichtige Elemente der pflanzlichen Pathogenabwehr, da sie einerseits toxische Wirkungen auf eindringende Krankheitserreger haben (Mehdy, 1994) und andererseits zur Vernetzung von Zellwandbestandteilen benötigt werden (Brisson *et al.*, 1994). Noch nicht bewiesen ist die Annahme, dass es sich bei ROI um Signaltransduktionskomponenten handelt, die für die Regulation der verschiedenen Resistenzmechanismen verantwortlich sind (Scheel, 1998; Hückelhoven und Kogel, 2003).

Um die Wirtspflanze zu besiedeln, müssen die meisten Pathogene die pflanzliche Zellwand durchdringen. Dies verhindert die Pflanze durch Verstärkung der Zellwand direkt an der

Infektionsstelle durch Einlagerung, Polymerisation bzw. Vernetzung von Kallose, Lignin, Suberin und hydroxyprolinreichen Proteinen zu sogenannten Zellwandappositionen (Papillen, Thordal-Christensen *et al.*, 1999). Die Ausbildung der Papillen beginnt mit einer Zytoplasmaaggregation unter der Infektionsstelle. Zeitgleich kommt es zu einer Zentrierung des Aktinzytoskeletts auf den Angriffsort, wodurch wahrscheinlich die Voraussetzung für den gerichteten Transport von Zellwandmaterial und Abwehrproteinen geschaffen wird (Kobayashi *et al.*, 1997). Die lokal begrenzten Papillen verhindern im Idealfall die Penetration von Pilzen und Bakterien in die Zelle (Agrios, 1997). Die im Bereich der Penetrationsstelle ausgeschütteten antimikrobiellen Substanzen wie zum Beispiel Phytoalexine schwächen das Pathogen und unterstützen so die pflanzliche Abwehr (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Scheel, 1998).

Eine weitere Abwehrreaktion der Pflanze stellt das schnelle Absterben der angegriffenen Pflanzenzelle bzw. der unmittelbaren Umgebung der Infektionsstelle dar. Dabei produzieren die sterbenden Zellen große Mengen an Phytoalexinen, PR-Proteinen und Phenylpropanoiden (Koga *et al.*, 1990; Görg *et al.*, 1993; Hammond-Kosack und Jones, 1996). Dieser als Hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnete Prozess entzieht insbesondere biotrophen Pathogenen die Ernährungsgrundlage und bewahrt somit den Wirt vor der Besiedlung. Da sich die HR zytologisch von einer Nekrose unterscheidet und als aktiver Vorgang auf die Proteinbiosynthese angewiesen ist (He *et al.*, 1994; Schulze-Lefert und Vogel, 2000), scheint es sich bei der HR um einen dem programmierten Zelltod bei Tieren (Apoptose) analogen Vorgang zu handeln. Tatsächlich können verschiedene tierische Apoptoseinhibitoren auch die pflanzliche HR verhindern (Matsumura *et al.*, 2003). Allerdings unterscheiden sich die physiologischen Abläufe der HR im Detail von der Apoptose. Auch konnten verschiedene zur Regulation der Apoptose unerlässliche Faktoren (zum Beispiel BAX, BCL-2) in Pflanzen nicht gefunden werden. Aus diesem Grund wird die HR nicht als pflanzliche Apoptose sondern als programmierter Zelltod (*programmed cell death*, PCD) bezeichnet.

Um das angreifende Pathogen zu schwächen, werden sowohl in der angegriffenen Zelle als auch im umgebenden Gewebe antimikrobielle Substanzen produziert. So wird zum Beispiel nach Pathogenerkennung der Phenylpropanoidmetabolismus aktiviert (Dixon und Paiva, 1995; Eckey *et al.*, eingereicht), der zur Herstellung von antifungalen Substanzen (Alkaloide, Phytoalexine, Saponine, Terpene) und zellwandverstärkendem Lignin benötigt wird. Weiterhin produziert die befallene Zelle PR-Proteine, die entweder direkt antimikrobiell wirken oder für abwehrinduzierte Stoffwechselfvorgänge benötigt werden (van Loon und van Strien, 1999).

### 1.3.3 PR-Proteine

Die ersten fünf Klassen der PR-Proteine wurden unabhängig voneinander von Gianinazzi *et al.* (1970) und von van Loon und van Kammen (1970) entdeckt, da sie nach Infektion mit Tabak-Mosaik-Virus in Tabakblättern akkumulierten. Heute kennt man mindestens 17 verschiedene PR-Proteinfamilien (Muthukrishnan *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2002; Collinge *et al.*, 2002).

Vielen der PR-Proteine konnte relativ schnell eine biologische Funktion zugeordnet werden. So sind zum Beispiel Peroxidasen (PR-9) sowohl in die Regulation oxidativer Prozesse als auch in die Quervernetzung der Zellwandmoleküle involviert. Antifungale Aktivität konnte für PR-2 ( $\beta$ -1,3 Glukanase, Davidson *et al.*, 1987), PR-3 (Chitinase, Kragh *et al.*, 1990) und PR-13 (Thionin, Bohlmann und Apel, 1987) nachgewiesen werden. Die Funktion von PR-5, einem Thaumatin/Osmotin-ähnlichen Protein blieb lange Zeit ungeklärt, bis Abad *et al.* (1996) die Permeabilisierung von pilzlichen Membranen durch Osmotin zeigten.

Fraglich blieb jedoch die biologische Funktion von PR-1. Wie für alle PR-Proteine charakteristisch wird die PR-1 Expression in der Pflanze nach Pathogenbefall stark erhöht (van Loon und van Kammen, 1970). Allerdings zeigt sich auch eine verstärkte Expression nach zahlreichen Stress induzierenden Behandlungen, wie UV-Bestrahlung und Verwundung (Brederode *et al.*, 1991). In zweikeimblättrigen Pflanzen korreliert die PR-1 Expression außerdem mit der durch biologische und chemische Resistenzinduktoren induzierten Resistenz. Erste Hinweise auf die antimikrobielle Aktivität von PR-1 zeigten sich in PR-1 überexprimierenden Tabakpflanzen, die eine erhöhte Resistenz gegen Oomyceten aufwiesen (Alexander *et al.*, 1993). Weiterhin reduziert die Applikation von gereinigter PR-1-Proteinlösung die Wachstums- bzw. Keimungsrate von *Phytophthora infestans* und *Uromyces fabae* (Niderman *et al.*, 1995; Rauscher *et al.*, 1999).

## 1.4 Mechanismen der Suszeptibilität

### 1.4.1 Kompatibilitätsfaktoren des Pathogens

Lange Zeit wurde vermutet, dass zwischen Pflanzen und Mikroorganismen grundsätzlich eine kompatible Interaktion besteht, die durch Zugewinn bestimmter Abwehreigenschaften der Pflanze zur Inkompatibilität wird. Inzwischen ist bekannt, dass die Pflanze auch in Abwesenheit von rassenspezifischen Resistenzgenprodukten in der Lage ist, ein angreifendes Pathogen abzuwehren. Viele der vom Krankheitserreger abgegebenen Stoffe (zum Beispiel

Proteine, Peptide, Oligosaccharide) werden von der Pflanze perzipiert und lösen eine Abwehrreaktion aus (siehe Kap. 1.6). Daher geht man heute von einer Basisinkompatibilität aus, die das Pathogen erst durchbrechen muss, um die Wirtspflanze zu besiedeln (Heath, 1987). Vom Pathogen abgegebene Faktoren, die zur Schwächung oder Inhibierung der Abwehrreaktionen der Wirtspflanze führen, werden je nach Literaturstelle als Pathogenitäts- oder Kompatibilitätsfaktoren bezeichnet (Briggs und Johal, 1994). Je nach Wirkungsmechanismus können die Kompatibilitätsfaktoren in drei Gruppen eingeteilt werden: (a) Brechen bzw. Inhibierung der präformierten Abwehr, (b) Suppression der induzierten Abwehr und (c) aktives Abtöten der Zelle (Toyoda *et al.*, 2002).

Um eine kompatible Interaktion zu erreichen, muss ein Pathogen zunächst die physikalischen präformierten Abwehrkomponenten der Pflanze, wie die Kutikula und die Zellwand, durchbrechen. So ist zum Beispiel die Interaktion von *Fusarium solani* f.sp. *pisi* mit Erbse (*Pisum sativum* L.) vom Vorhandensein einer Kutinase abhängig, die das Pathogen zwingend benötigt, um die Kutinschicht der Wirtspflanze durchdringen zu können (Kolattukudy *et al.*, 1995). Der Besiedlungserfolg von Pathogenen wird auch von konstitutiv produzierten antimikrobiellen Substanzen, wie zum Beispiel Saponine (siehe Kap. 1.3.1), verringert. Die Detoxifizierung der Saponine ist zum Beispiel entscheidend für den Bruch der Basisresistenz von Hafer durch das Wurzelpathogen *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* (Bowyer *et al.*, 1995; Osbourn *et al.*, 1996). Auch das Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* verhält sich deutlich aggressiver, nachdem es mit dem Gen für die Saponin abbauende Tomatinase transformiert wurde (Melton *et al.*, 1998). Dieser Effekt scheint allerdings vorrangig auf der Suppression verschiedener pflanzlicher Abwehrkomponenten durch die Hydrolyseprodukte des Saponinabbaus zu beruhen (Bouarab *et al.*, 2002).

Kann ein Pathogen die präformierten Abwehrkomponenten durchdringen, so ist die Pflanze immer noch in der Lage, das Pathogen durch induzierte Abwehrreaktionen zu stoppen. Aus diesem Grund haben viele pflanzliche Krankheitserreger Suppressoren der aktiven Pathogenresistenz entwickelt. So werden PR-Proteine nur in Gerstenzellen produziert, die in der Lage waren, einen Mehлтаupilzbefall abzuwehren (Lyngkjaer und Gjetting, 2002). In penetrierten Zellen wird dies vom Pathogen unterdrückt. Die zur Suppression der pflanzlichen Abwehr verwendeten Mechanismen sind dabei äußerst vielseitig. So inhibiert zum Beispiel das Erbsenpathogen *Mycosphaerella pinodes* mittels zweier Proteine (Suppressin A und B) den Phosphoinositol-Metabolismus und eine ATPase seiner Wirtspflanze. Der Eingriff in den Energiehaushalt der Zelle und die Deregulation des Calciumhaushalts durch die Anreicherung von Inositol(1,4,5)triphosphaten, schwächen die Effektivität und Zielgenauigkeit der

pflanzlichen Abwehr (Kato *et al.*, 1993; Toyoda *et al.*, 1993). Der Erreger der Kraut- und Knollenfäule *Phytophthora infestans* hingegen unterbindet durch Abgabe von löslichen Glucanen den NADPH-Oxidase abhängigen *oxidative burst*, wodurch die HR in den befallenen Zellen verhindert wird (Doke, 1983). Auch das zunächst biotroph wachsende Bakterium *Pseudomonas syringae* inhibiert mittels des Typ III Effektor Proteins AvrPTO den PCD und schaltet somit einen Teil der pflanzlichen Pathogenabwehr aus (Abramovitch *et al.*, 2003). Auf die Verhinderung der HR sind insbesondere biotrophe Pathogene angewiesen, da sie sich ausschließlich aus lebendem Gewebe ernähren können. Die Inhibition des pflanzlichen Zelltods kann sogar makroskopisch als sogenannter *green island*-Effekt beobachtet werden. Dabei zeigen die Blattbereiche um die Infektionsstelle eines biotrophen Pathogens eine verzögerte Seneszenz im Vergleich zum umgebenden Blattgewebe (Scholes und Rolfe, 1996; Schulze-Lefert und Vogel, 2000).

Einen äußerst radikalen Weg, die pflanzliche Pathogenabwehr zu schwächen, verwenden einige nekrotrophe Pathogene der Gattungen *Cochliobolus* und *Alternaria*. Diese Pilze geben Wirt-selektive Toxine ab, die spezifisch Wirtspflanzenzellen abtöten, während Nichtwirtspflanzen keinen Schaden erleiden (Walton, 1996). Diese Toxine greifen meist direkt in die grundlegenden Stoffwechselprozesse der Pflanzenzelle ein. So blockiert zum Beispiel Victorin aus *C. victoriae* die Photorespiration (Navarre und Wolpert, 1995), während das HC-Toxin von *C. carbonum* die Histondeacetylierung hemmt und somit die Transkriptionsregulation der Wirtszelle stört (Brosch *et al.*, 1995).

### 1.4.2 Suszeptibilitätsfaktoren der Wirtspflanze

Neben den Kompatibilitätsfaktoren der Pathogene gibt es aber auch Wirtsproteine, die einen negativen Einfluss auf die eigenen Resistenzmechanismen haben. Diese als Suszeptibilitätsfaktoren bezeichneten Proteine regulieren zum Beispiel die Intensität der Abwehrreaktionen oder verhindern ein unkontrolliertes Ausbreiten der HR nach einem Pathogenbefall. Sind diese Gene jedoch mutiert, so erfolgt nach Angriff eines Krankheitserregers eine sehr viel heftigere Abwehrreaktion, wodurch die Pflanze oft deutlich resistenter wird. Allerdings zeigen diese Pflanzen in Abwesenheit des Pathogens oft pleiotrope Effekte wie zum Beispiel spontane Zelltodreaktionen, die zu einer verminderten Vitalität und Stresstoleranz führen (Toyoda *et al.*, 2002).

Bei dem Suszeptibilitätsfaktor EDR1 aus *Arabidopsis* handelt es sich um eine MAPKKK (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*), deren Expression nach Pathogenbefall

induziert wird. Die *edr1*-(*enhanced disease resistance*) Mutante wurde entdeckt, da sie über eine Resistenz gegen das normalerweise virulente Bakterium *Pseudomonas syringae* p.v. *tomato* DC3000 verfügt. Die *edr1*-Mutation vermittelt auch Resistenz gegen andere die Epidermis angreifende Pathogene wie zum Beispiel Mehltaupilze (Frye und Innes, 1998). Die pflanzlichen Resistenzantworten nach Pathogenbefall sind in der *edr1*-Mutante generell deutlich schneller und intensiver. Trotzdem werden die Pathogene erst durch eine spät einsetzende großflächige Mesophyll-HR gestoppt. In Abwesenheit des Pathogens zeigt die *edr1*-Mutante jedoch weder spontanen Zelltod noch konstitutive PR-Gen Expression (Frye und Innes, 1998). Der Wirkungsmechanismus der *edr1*-Mutation ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings ist bekannt, dass Salizylsäure vermittelte Signalkaskaden involviert sind, da *NahG*-Pflanzen keinen *edr1*-Effekt mehr zeigen (Frye *et al.*, 2001).

Beispiele für weitere Suszeptibilitätsfaktoren sind MLO (siehe Kap 1.7.3, Büschges *et al.*, 1997), der Bax-Inhibitor 1 (Hückelhoven *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2003), und die PMR- (*powdery mildew resistant*)-Proteine aus *Arabidopsis* (Vogel und Somerville, 2000). Das Protein PMR6 konnte als Pektinlyase identifiziert werden, allerdings ist deren Wirkungsweise als Suszeptibilitätsfaktor noch nicht geklärt (Vogel *et al.*, 2002). Überraschenderweise handelt es sich bei PMR4 um eine Kallozesynthase (Nishimura *et al.*, 2003). Nach herkömmlicher Theorie sollten Kallosesynthasen Resistenzfaktoren sein, da sie durch Produktion von Kallose die Zellwand verstärken und so das Eindringen von Pathogenen erschweren. Allerdings ist aber die durch *pmr4*-Mutation erhaltene Resistenz auf eine deutlich erhöhte HR-Rate zurückzuführen. Es scheint, als zöge die Kalloseablagerung in den Papillen weitere, die Abwehr supprimierende Effekte nach sich (Nishimura *et al.*, 2003).

### **1.5 Mechanismen der Pathogenerkennung**

Voraussetzung für die Induktion von Abwehrreaktionen ist die Erkennung von Pathogenen durch die attackierte Pflanze. Dabei werden sogenannte Elicitoren von pflanzlichen Rezeptoren gebunden, wodurch dann die Abwehr ausgelöst wird. Elicitoren sind meist Bestandteile des Pathogens, wie Glykoproteine, Peptide, Lipide und Oligosaccharide. Es gibt aber auch „endogene“ Elicitoren, die durch hydrolytische Enzyme des Pathogens aus der pflanzlichen Zellwand herausgelöst werden (Nürnberger und Brunner, 2002). Elicitoren sind oft für bestimmte Pflanzenarten spezifisch und lösen nur dort schon in geringsten Mengen eine Resistenzreaktion aus, während sie in anderen Pflanzenarten überhaupt nicht erkannt werden (Yamaguchi *et al.*, 2000). Dies gilt insbesondere für die rassenspezifische Erkennung

bestimmter Avirulenzgenprodukte durch sogenannte Resistenzgenprodukte (R-Genprodukte, Lehmann, 2002). Bei Avirulenzgenprodukten (AVR-Proteine) handelt es sich um Proteine des Pathogens, die normalerweise Virulenzfaktoren darstellen und daher vom Krankheitserreger für eine erfolgreiche Pathogenese benötigt werden. Werden diese jedoch von der Pflanze erkannt, wirken sie als spezifische Elicitoren und „verraten“ somit das Pathogen an das pflanzliche Pathogenabwehrsystem (Dangl und Jones, 2001).

Während aus vielen Pathogenen verschiedene Elicitoren aufgereinigt wurden, konnten bisher nur wenige pflanzliche Elicitorrezeptoren identifiziert werden. Der erste vollständig aufgereinigte und im Folgenden klonierte Rezeptor war ein Heptaglukan-bindendes Protein aus Soja. Allerdings verfügte das gefundene Protein über keinerlei konservierte Domänen, die auf eine Rezeptorfunktion hindeuteten (Umemoto *et al.*, 1997).

Ein sehr gut charakterisierter Elicitorrezeptor ist FLS2, eine Flagellin-bindende plasmamembranständige Rezeptorkinase mit extrazellulärer LRR-Domäne (*leucin rich repeat*), die wahrscheinlich für die spezifische Bindung des bakteriellen Flagellins verantwortlich ist (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Gomez-Gomez *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist außerdem die Tatsache, dass FLS2 auffallende Homologien zu Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) besitzt. TLRs sind Rezeptoren, die in tierischen Systemen für Pathogenerkennung und Auslösung von Immunantworten verantwortlich sind (O'Neill und Greene, 1998).

Neben den Elicitorrezeptoren lösen auch die bereits erwähnten rassenspezifischen R-Genprodukte nach Pathogenbefall eine Abwehrreaktion aus. Der Begriff R-Genprodukt ist eine Sammelbezeichnung für Proteine verschiedenster Familien, die nach Bindung eines Liganden jeweils Startpunkt einer oft in einer HR endenden Signalkaskade sind. Je nach Proteinfamilie variiert auch die Lokalisation der R-Genprodukte, die sowohl Transmembranproteine als auch zytosolisch und kernlokalisiert sein können. Die Mehrzahl der R-Genprodukte verfügt über eine LRR-Domäne, die für die Elicitor- bzw. Avirulenzgenprodukterkennung verantwortlich ist, während eine hochkonservierte Nukleotidbindedomäne (NBS) als molekularer Schalter für die nachgeschaltete Signaltransduktion dient (Jones, 1996; Baker *et al.*, 1997). Darüber hinausgehend weisen manche der R-Proteine weitere funktionelle Domänen auf. So werden teilweise *Leucinzipper*- oder Kinasedomänen für Protein/Protein Interaktionen und zur Signalweitergabe genutzt (Martin *et al.*, 1993; Bent, 1996), während andere R-Genprodukte, die aus tierischen Mechanismen der Pathogenerkennung bekannten TIR-Domänen (*Toll and Interleukin-1 receptor*) aufweisen (Lehmann, 2002).

Für einige der R-Genprodukte wurde die direkte Bindung an das entsprechende AVR-Protein gezeigt. So bindet zum Beispiel die zytosolische Proteinkinase PTO aus Tomate das Avirulenzgenprodukt AvrPTO (Martin *et al.*, 1993) und die membranständige RLK BR11 aus *Arabidopsis* erkennt extrazelluläre Brassinosteroide (He *et al.*, 2000). Doch nicht alle der R-Genprodukte haben die Aufgabe, ein Avirulenzgenprodukt oder einen Elicitor selbst direkt zu binden (Cohn *et al.*, 2001). Oft sind sie Teile eines größeren Signalperzeptionskomplexes, der über Korezeptoren das AVR-Protein bindet oder die vom AVR-Protein ausgelösten Störungen und Schäden erkennt (Van der Hoorn *et al.*, 2002). So wird beispielsweise das Arabidopsis Protein RIN4 von verschiedenen AVR-Proteinen modifiziert (AvrB, AvrRPM1) beziehungsweise degradiert (AvrRPT2). Die R-Genprodukte RPM1 und RPS2 erkennen diese Veränderungen des RIN4 Proteins und lösen daraufhin eine HR aus (Marathe und Dinesh-Kumar, 2003). Diese als Wächter-Hypothese (*Guard-Hypothese*) bezeichnete Strategie ermöglicht es der Pflanze, mit einem R-Genprodukt die Aktivität mehrerer AVR-Proteine zu überwachen.

### **1.6 Pflanzliche Signaltransduktion nach Pathogenbefall**

Die Signalperzeption nach einer Pathogenattacke ist Ausgangspunkt für verschiedene intrazelluläre und systemische Signaltransduktionsprozesse, die letztlich zur Aktivierung der induzierten Komponenten der Pathogenabwehr (siehe Kap. 1.3.2) beitragen.

Unmittelbar nach dem ersten Kontakt zwischen Pflanze und Pathogen wird die Permeabilität der pflanzlichen Plasmamembran verändert. Sowohl die unspezifische als auch die Resistenzgen vermittelte Signalperzeption führt zu einem Efflux von Kalium ( $K^+$ )- und Chloridionen ( $Cl^-$ ) sowie einem Influx von Calciumionen ( $Ca^{2+}$ ) und Protonen ( $H^+$ ) (Jabs *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Blatt *et al.*, 1999). Die transiente Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird vor allem durch Elicitor-responsive  $Ca^{2+}$ -Kanäle verursacht, die entweder spannungsabhängig oder durch Phosphorylierung aktiviert werden (Blume *et al.*, 2000; White, 2000).

Das am besten untersuchte Calcium-abhängige Regulatorprotein ist Calmodulin. Alle bekannten Calmodulin Isoformen besitzen vier hochaffine  $Ca^{2+}$ -Bindestellen und zeigen nach Calciumbindung eine Konformationsänderung, die zur Calcium-abhängigen Bindung der *downstream* Komponenten führt. Die von Calmodulin gebundenen Zielproteine sind äußerst vielfältig und auf alle Bereiche der zellulären Steuervorgänge verteilt. Oft handelt es sich jedoch um  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (*calcium dependent protein kinase*,

CDPK, Zhang und Lu, 2003). Speziell nach Pathogeninfektion wurde in Soja die verstärkte Expression zweier Calmodulin Isoformen gezeigt, die in die Regulation des programmierten Zelltods und der PR-Gen Expression eingebunden sind (Heo *et al.*, 1999). Ein weiteres im Sinne der Pathogenabwehr relevantes Calmodulin-reguliertes Protein ist MLO, ein Modulator von Resistenz- und Zelltodreaktionen in Gerste (Kim *et al.*, 2002b).

Die Schwankungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führen auch zu Änderungen in der Aktivität von CDPKs (Romeis *et al.*, 2000), die Proteine des Pathogenabwehrsystems wie die Phenylalanin-Ammonium-Lyase oder die  $\text{O}_2^-$ -generierende NADPH-Oxidase regulieren (Cheng *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2001). Die NADPH-Oxidase ist ein zentrales Element der pflanzlichen Pathogenabwehr und vermutlich durch viele weitere Faktoren regulierbar. Außer durch CDPKs ist eine Aktivierung der NADPH-Oxidase auch direkt durch Calcium über eine  $\text{Ca}^{2+}$  bindende *EF-hand* Domäne (Keller *et al.*, 1998; Sagi und Fluhr, 2001) sowie durch die Aktivität kleiner G-Proteine der RAC/ROP Familie möglich (siehe Kap. 1.6.1).

Eine sehr schnelle Reaktion der Pflanze nach Pathogenattacke ist die Produktion und Akkumulation von Stickstoffmonoxid (NO). Verantwortlich hierfür ist die pflanzliche Stickstoffmonoxidsynthase, die hohe Homologien zur Protein P Untereinheit des GDC-Multienzymkomplexes hat (Chandok *et al.*, 2003). Der GDC-Komplex baut in den Mitochondrien gemeinsam mit einer Serin-Hydroxymethyltransferase das während der Photorespiration anfallenden Glycin, zu Serin, Ammoniak und Kohlendioxid ab.

Stickstoffmonoxid konnte in vielen Signalkaskaden der Pathogenabwehr nachgewiesen werden (Neill *et al.*, 2003). So spielt NO wahrscheinlich im Zusammenspiel mit  $\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Rolle in der Auslösung des programmierten Zelltods. Auch führt die exogene Applikation von NO-Donoren zu einer erhöhten Salizylsäurekonzentration, der Induktion von PR-1 (Delledonne *et al.*, 1998) und einer Zunahme der Phytoalexinproduktion (Modolo *et al.*, 2002).

Über die NO nachgeschalteten Signalkomponenten ist nur wenig bekannt. Wie auch in Säugern scheint NO in Pflanzen über die *second messenger* Moleküle zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und zyklische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR) zu wirken (Durner *et al.*, 1998). Über selektiv von zyklischen Nukleotiden wie cGMP geöffnete Ionenkanäle, konnte eine Verbindung zur Auslösung der HR hergestellt werden, da die *Arabidopsis* Ionenkanalmutante *dnd1* zwar noch Pathogenabwehrreaktionen, aber keinen programmierten Zelltod zeigt (Clough *et al.*, 2000).

In die Signaltransduktion nach Pathogenbefall sind auch die sogenannten mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) involviert, die eine Verbindung von extrazellulären Stimuli zu

zellulären Antworten herstellen. MAPK-Kaskaden bestehen aus mindestens drei Komponenten, die ein Signal von einer MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) über eine MAPK Kinase (MAPKK) an eine MAPK weitergeben. Die Endglieder dieser Signalkaskade (die MAPK) haben ein breites Spektrum an Zielproteinen, unter anderem Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Zytoskelettproteine (Jonak *et al.*, 2002).

Mehrere MAPK konnten mit Signaltransduktionsvorgängen in der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht werden. So trägt die schon erwähnte *edr1*-Mutante (siehe Kap 1.4) einen Defekt in einer MAPKKK, der zur Resistenz von *Arabidopsis* gegen Mehltaupilze führt. Die MAPKKK EDR1 ist wahrscheinlich ein negativer Regulator der durch Salizylsäure vermittelten Resistenz (Frye *et al.*, 2001). Andere MAPK wurden als positive Regulatoren der pflanzlichen Abwehrreaktionen beschrieben wie zum Beispiel die aus Tabak isolierten Elicitor-responsiven MAPK SIPK und WIPK, die zur Auslösung der HR beitragen (Zhang und Klessig, 1998).

Eine komplett identifizierte dreistufige MAPK-Kaskade vermittelt die Resistenzreaktion von *Arabidopsis* nach Perzeption von Flagellin durch den Flagellinrezeptor. Durch diese MAPK-Signalkaskade werden letztlich zwei WRKY Transkriptionsfaktoren aktiviert (Asai *et al.*, 2002). Über die Bindung an sogenannte W-Boxen, die in den Promotoren vieler Abwehr-assoziiierter Gene liegen, sind die pflanzenspezifischen WRKY Transkriptionsfaktoren an der Transkriptionsregulation nach Pathogenbefall beteiligt (Eulgem *et al.*, 1999).

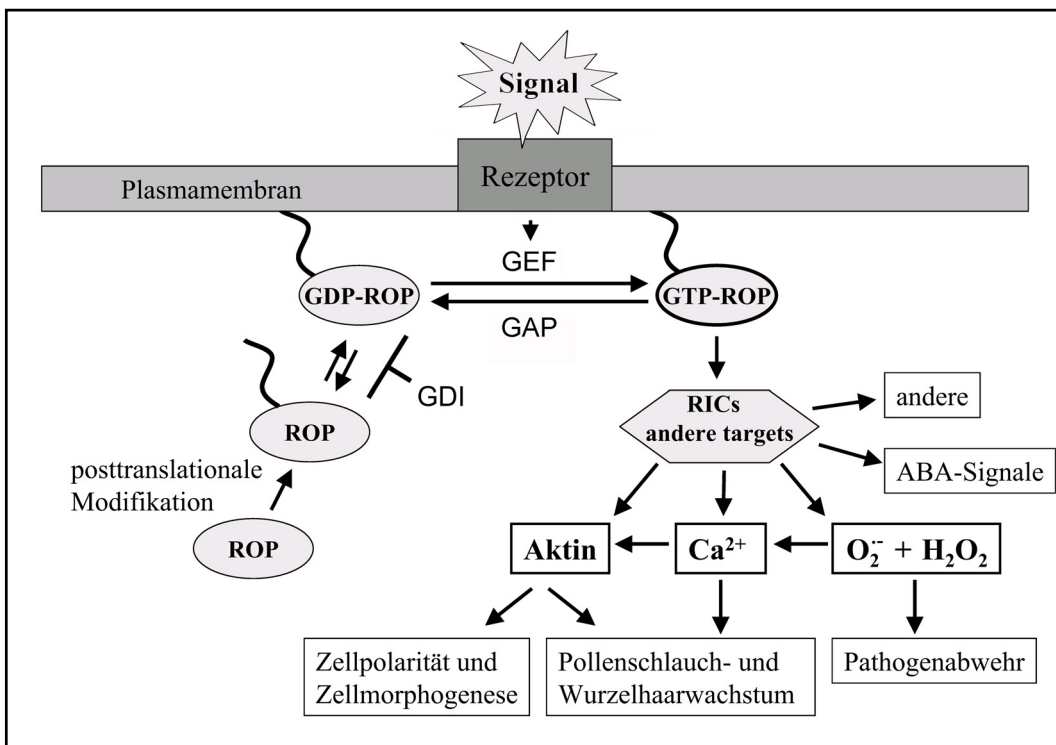
### 1.6.1 Monomere G-Proteine

Monomere G-Proteine sind Startpunkte von intrazellulären Signalkaskaden, die nach Perzeption eines Signals durch wahrscheinlich plasmamembranständige Rezeptoren ausgelöst werden. Die Superfamilie der kleinen, monomeren GTPasen besteht aus den fünf Proteinfamilien Ras, Rab, Arf, Ran und Rho. Während die Rho-Familie in tierischen Systemen die Proteine RAC, CDC42 und RHO beinhaltet (Hall, 1998), konnte in Pflanzen nur eine RAC-ähnliche Subfamilie gefunden werden (Valster *et al.*, 2000). Diese als RAC oder ROP (*Rho of plants*) bezeichneten Proteine verfügen über fünf distinkte Domänen, die verantwortlich sind für (a) die Bindung von GTP/GDP, (b) die Hydrolyse von GTP zu GDP, (c) die Bindung von regulatorischen Enzymen und (d) von *downstream* Effektoren sowie (e) die intrazelluläre Lokalisation (Paduch *et al.*, 2001).

Wie alle monomeren GTPasen sind RAC/ROP Proteine Signaltransduktionskomponenten, die in eine Vielzahl von zellulären Regulationsprozessen involviert sind. Als Antwort auf ein

extrazelluläres Signal wird mittels regulatorischer Enzyme (unter anderem *receptor like kinases*, RLKs) das RAC/ROP Protein mit GTP beladen. Die daraus resultierende Konformationsänderung führt zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade. Nach Hydrolyse des GTP zu GDP durch die im RAC/ROP Protein vorhandene GTPase Domäne werden die Veränderungen in der Konformation revertiert und das RAC/ROP Protein inaktiv (Paduch *et al.*, 2001). Der Aktivitätsstatus der RAC/ROPs kann durch Enzyme wie GAPs (*GTPase activating proteins*), GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) sehr exakt reguliert werden (Mackay und Hall, 1998).

Eine Voraussetzung für die Aktivierung der RAC/ROP Proteine ist deren Assoziation mit der Plasmamembran. Verantwortlich hierfür ist eine posttranslationale Modifikation von Cysteinresten, die innerhalb der C-terminalen hypervariablen Domäne (*hypervariable region*, HVR) liegen. Je nach Aufbau der HVR können die pflanzlichen RAC/ROPs in zwei Typen



**Abb. 1.1 Generalisiertes Schema der Aktivierung und funktionellen Diversität der RAC/ROP GTPasen**

Der erste Schritt zur Aktivierung der RAC/ROP (in der Abb. als ROP bezeichneten) Proteine ist die C-terminale Bindung eines Lipidrestes (posttranslationale Modifikation). Nach Translokation zur Plasmamembran wird das zunächst inaktive RAC/ROP Protein durch einen extrazellulären Stimulus aktiviert. Die Aktivierung der RAC/ROP Proteine erfolgt durch Bindung von GTP (Guanosintriphosphat). Der Aktivitätsstatus der RAC/ROPs wird durch Proteine wie GAPs (*GTPase activating proteins*), GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) sehr exakt reguliert. Das aktivierte GTP-RAC/ROP Protein induziert unter anderem über sogenannte RICs (*Rac interactive CRIB motif containing protein*) downstream Signalkaskaden, die ein breites Spektrum an physiologischen Prozessen regulieren (verändert nach Yang, 2002).

eingeteilt werden (Yang, 2002). Typ I RAC/ROPs verfügen über eine funktionelle CaaX-Box am C-Terminus, die mittels einer Farnesyl- oder einer Geranylgeranyltransferase isoprenyliert wird (Thompson und Okuyama, 2000). Bedingt durch ein zusätzliches Exon besitzen RAC/ROP Proteine vom Typ II mehrere Cysteine innerhalb der HVR, die allerdings keine funktionelle CaaX-Box bilden und wahrscheinlich palmitoyliert werden (Thompson und Okuyama, 2000).

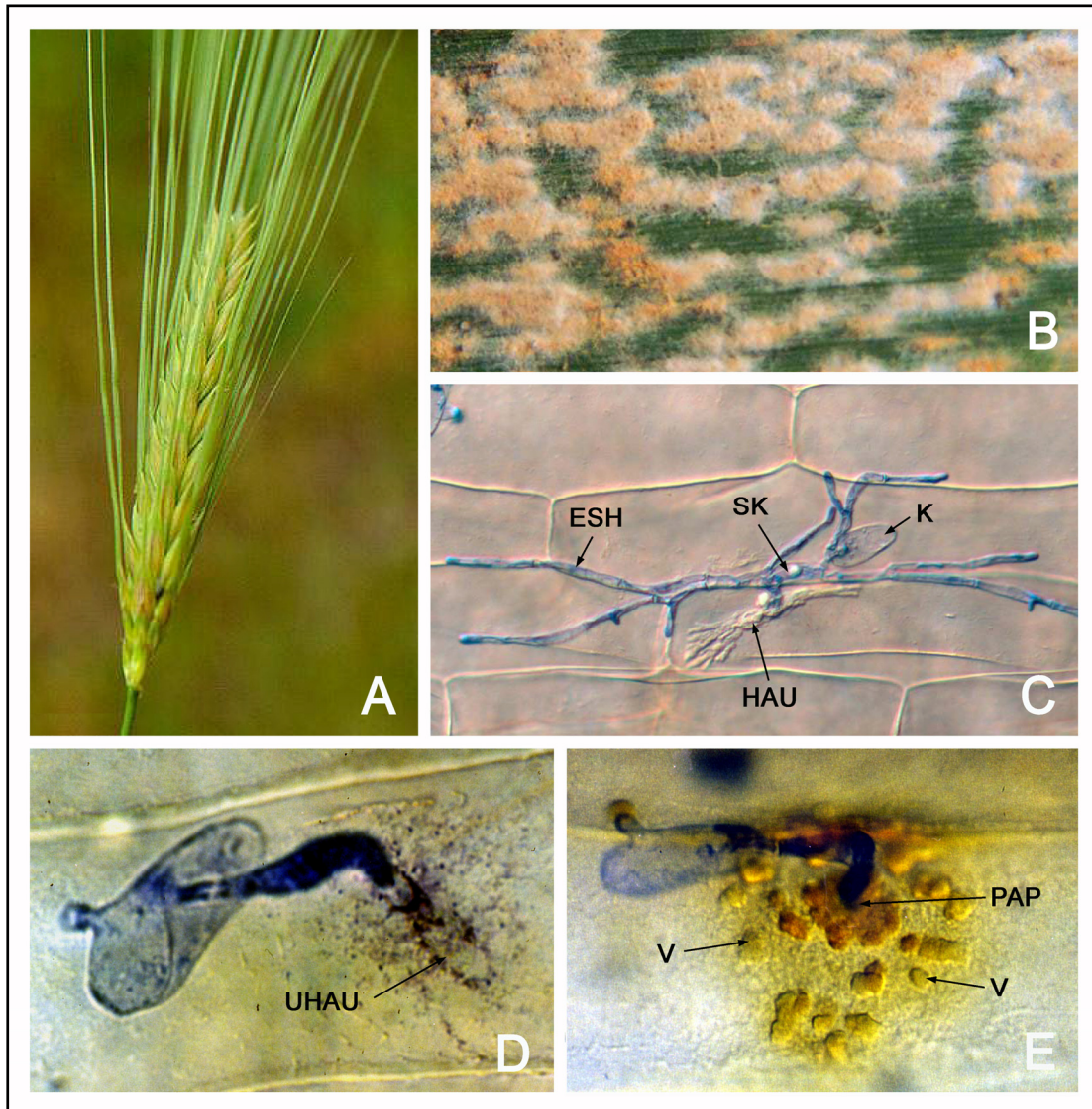
Die pflanzlichen RAC/ROP Proteine sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wobei eine ihrer Hauptaufgaben in der Regulation des Aktinzytoskeletts liegt (Valster *et al.*, 2000; Yang, 2002). So aktivieren RAC/ROP Proteine einerseits Enzyme, die das Aktinzytoskelett direkt verändern (Chen *et al.*, 2003), andererseits regulieren sie intrazelluläre Calciumgradienten (Li *et al.*, 1999). Sowohl das Aktinzytoskelett als auch die intrazellulären Calciumgradienten sind von entscheidender Bedeutung für alle polaren Wachstums- und Transportvorgänge. Neben dem polaren Wachstum von Pollenschläuchen benötigen auch Pathogenabwehrvorgänge eine Konzentration von Stoffwechselprodukten auf einen bestimmten Bereich der Zelle (Fu *et al.*, 2001; Schmelzer, 2002).

Weiterhin sind die RAC/ROP Proteine in die Regulation der ROI Produktion involviert. Obwohl in Pflanzen eine direkte Aktivierung der Superoxidradikalanionen generierenden NADPH-Oxidase noch nicht gezeigt wurde, führt die Überexpression von RAC/ROP Proteinen zur verstärkten Produktion von ROIs (Kawasaki *et al.*, 1999; Hassanain *et al.*, 2000). Die verstärkte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion durch Überexpression von konstitutiv aktivem OsRAC1 in Reispflanzen korreliert durch eine erhöhte HR-Rate auch mit höherer Resistenz gegen den hemibiotrophen Pilz *Magnaporthe grisea* (Ono *et al.*, 2001).

### **1.7 Das Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltaupilz**

Die Gerste (Abt. *Spermatophyta* / Unterabt. *Magnoliophyta* / Kl. *Liliopsida* / Ord. *Poales* / Fa. *Poaceae* / *Hordeum vulgare* L.) hat sich in Vorderasien aus den Wildarten *H. spontaneum* und *H. agriocrithon* und eventuell der Einkreuzung weiterer Arten gebildet. Gerste gehört zu den ältesten Kulturpflanzen und wird heute in allen gemäßigten Zonen bis in den hohen Norden angebaut. Sie stellt nur geringe Ansprüche an Boden und Temperatur und benötigt als Sommergerste nur 95 Tage zur Reife. In der Weltgetreideproduktion nimmt die Gerste nach Weizen, Reis und Mais mit einer Gesamternte von 160 Millionen Tonnen den vierten Rang ein. In den Industrienationen wird die proteinärmere Sommergerste hauptsächlich zur Bierherstellung und die proteinreichere Wintergerste als Viehfutter produziert. Außerdem

wird Gerste noch zur Erzeugung von Whisky und anderen Kornbranntweinen verwendet (Herder, 1994).



**Abb. 1.2 Das Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltaupilz**

(A) Die Ähre der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in unreifem Zustand.

(B) Symptome des Echten Gerstenmehltaus auf einem Gerstenblatt. Die Blattoberfläche ist von einem weißen pudrigen Belag aus Pilzmyzel und Konidien bedeckt.

(C) Mikroskopische Aufnahme der Epidermis eines vom Echten Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) befallenen Gerstenprimärblatts. Extrazelluläre Strukturen des Pilzes wurden mit essigsaurer Tinte angefärbt. Ausgehend von der ovalen Konidie (K) bildet *Bgh* einen sekundären Keimschlauch (SK) und dringt mittels eines Appressoriums in die Epidermiszelle ein. Nach Etablierung eines Haustoriums (HAU) mit fingerförmigen Fortsätzen beginnt *Bgh* mit der Ausbildung von verlängerten Sekundärhyphen (ESH) (Foto: R. Hückelhoven).

(D) *Bgh* penetriert erfolgreich eine Epidermiszelle und bildet ein unreifes Haustorium (UH). Die Interaktionsstelle wurde zur Lokalisierung von Superoxidradikalanionen mit NBT (Nitroblau-Tetrazolium) gefärbt. Man erkennt eine Akkumulation von  $O_2^-$  um die Penetrationsstelle und das unreife Haustorium von *Bgh* (Abbildung aus: Hückelhoven und Kogel, 1998).

(E) Eine Epidermiszelle wehrt durch Ausbildung einer effektiven Papille (PAP) den Penetrationsversuch von *Bgh* ab. Zur Lokalisation von Wasserstoffperoxid wurde die Interaktionsstelle mit DAB (Diaminobenzidin) gefärbt. Unterhalb des Appressoriums ist eine Akkumulation von  $H_2O_2$  zu erkennen. Ebenfalls sind DAB gefärbte Vesikel (V) zu beobachten, die wahrscheinlich zur Infektionsstelle transportiert werden (Abbildung aus: Hückelhoven *et al.*, 1999).

Die große agronomische Bedeutung und die Tatsache, dass sich das diploide Gerstengenom, trotz seiner 5,4 Milliarden Basen, im Vergleich zum hexaploiden Weizen leichter analysieren lässt, macht die Gerste zu einem geeigneten Modellorganismus der molekularen Pflanzenphysiologie (Graner und Altschmied, 2001).

Der Echte Gerstenmehltaupilz (R. *Fungi* / Abt. *Ascomycota* / Kl. *Leotiomycetes* / Ord. *Erysiphales* / Fa. *Erysiphaceae* / Ga. *Blumeria* / *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) ist ein obligat biotropher Ektoparasit der Gerste, der hauptsächlich in den gemäßigten Breiten vorkommt. Durch seine extreme Wirtsspezifität verursacht *Bgh* das Krankheitsbild des Echten Mehltaus nur auf verschiedenen Gerstensorten. Dabei bildet sich auf den Blättern, Halmen und Ähren ein weißes, flauschiges Pilzgeflecht. Im späteren Befallsstadium chlorotisieren und nekrotisieren die befallenen Blätter. Der Ertragsverlust, der sich meist durch eine deutliche Reduktion des Tausendkorngewichts zeigt, kann bei starken Epidemien bis zu 25 % betragen. Der Echte Gerstenmehltaupilz breitet sich im Frühjahr über asexuelle Konidien epidemieartig aus und bildet im Sommer bräunliche Kleistothecien, in denen Ascosporen heranreifen. Diese überbrücken die Vegetationsruhe und befallen im Herbst die Wintersaat. Über den Befall von Ausfallgetreide („Grüne Brücke“) kann *Bgh* aber auch in seiner asexuellen Form direkt das Wintergetreide besiedeln (Heitefuss *et al.*, 1984).

Der Befall der Gerste mit dem Echten Gerstenmehltaupilz kann durch Verwendung resistenter Sorten und rechtzeitiger Fungizidbehandlung bekämpft werden. Ein Problem ist dabei die sehr schnelle Resistenzbildung des Mehltaupilzes gegen Fungizide und dominant vererbte, monogene Resistenzen (Brown und Wolfe, 1991).

Der vegetative Entwicklungszyklus von *Bgh* beginnt mit dem Auftreffen der windverbreiteten Konidie auf das Gerstenblatt. Innerhalb von ein bis zwei Stunden beginnt die Konidie auszukeimen. Der gebildete primäre Keimschlauch (*primary germ tube*, PGT) greift die Pflanze nicht an, sondern dient nur als Wirtserkennungs- und Haftorgan und eventuell zur Wasseraufnahme (Kunoh *et al.*, 1979; Francis *et al.*, 1996). Die unter der Konidie liegende Gerstenepidermiszelle reagiert allerdings auf den vermeintlichen Angriff mit einer Zytoplasmaaggregation und nachfolgend mit der Bildung einer Papille unterhalb des PGT (Beckhove *et al.*, 1996; Heitefuss, 2001).

Nach weiteren zwei bis drei Stunden bildet die Konidie einen sekundären Keimschlauch, der sich an seinem Ende zu einem Appressorium entwickelt. Etwa zwölf Stunden nach dem ersten Kontakt des Pilzes mit der Pflanze beginnt *Bgh*, einen Penetrationskeil durch die pflanzliche Zellwand zu treiben. Parallel dazu schüttet der Pilz lytische Enzyme wie Kutinasen und Zellulasen aus, um die pflanzliche Zellwand zu schwächen und sie dann mittels

mechanischem Druck zu durchstoßen (Pryce-Jones *et al.*, 1999). Wird der Penetrationsversuch gestoppt, entwickelt *Bgh* durch Verzweigungen des sekundären Keimschlauchs ein zweites und teilweise sogar ein drittes Appressorium (Thordal-Christensen *et al.*, 1999).

Gelingt die Penetration der pflanzlichen Zellwand, so bildet *Bgh* innerhalb der nächsten vier Stunden ein Ernährungsorgan mit fingerförmigen Ausläufern, das Haustorium. Die Plasmamembran der Wirtszelle bleibt dabei intakt und wird nur eingestülpt und in ihrer Fläche vergrößert. Auf Grund von Änderungen in der Zusammensetzung und im Aufbau, wird der eingestülpte Teil als extrahaustoriale Membran bezeichnet (Cutler *et al.*, 2000; Perfect und Green, 2001; Mendgen und Hahn, 2002). Nach Etablierung des Haustoriums in der Wirtszelle, beginnt *Bgh* mit der Entwicklung von Sekundärhyphen, die sich in der Folge verzweigen und ihrerseits in die Wirtszellen eindringen und Sekundärhaustorien bilden.

In fast jedem Entwicklungsstadium kann *Bgh* von der Gerste durch die HR abgewehrt werden. Je nach Abwehrtyp und Entwicklungszustand des Pilzes reagiert entweder die angegriffene Zelle selbst mit einem programmierten Zelltod und entzieht dem Pilz damit die Ernährungsgrundlage, oder größere Bereiche des unterhalb der Epidermis liegenden Mesophylls sterben ab und stoppen somit den Assimilattransport in den befallenen Epidermisbereich (Boyd *et al.*, 1995; Hückelhoven *et al.*, 1999).

Sind alle Abwehrreaktionen der Pflanze erfolglos, so bildet *Bgh* nach vier bis acht Tagen extrazelluläre Sporenträger, die Sporenketten mit jeweils etwa acht Konidien hervorbringen. Immer die oberste Konidie des Sporenträgers reift, löst sich ab und wird durch den Wind verbreitet.

Die geschlechtliche Fortpflanzung des Echten Gerstenmehltaus erfolgt in alternden Myzelien gegen Ende der Vegetationsperiode der Gerste. Dabei bilden sich bräunliche dickwandige Kleistothecien, die jeweils 25 Asci zu je acht Ascosporen enthalten. Durch Quellung werden im späten Herbst bzw. im Frühjahr die Kleistothecien gesprengt und die Ascosporen aktiv ausgeschleudert (Agrios, 1997; Schlösser, 1997).

### **1.7.1 Abwehrreaktionen in der kompatiblen Interaktion**

Jede Gerstenpflanze verfügt über eine unterschiedlich stark ausgeprägte rassenunspezifische Basisresistenz gegen *Bgh*. So wehren auch anfällige Gerstenlinien, die keine Resistenzgene tragen, 30 % - 50 % der Penetrationsversuche von *Bgh* ab (Hückelhoven *et al.*, 1999). Grundsätzlich stehen der suszeptiblen Pflanze dabei alle Abwehrmechanismen zur

Verfügung, die auch von resistenten Gersten genutzt werden, allerdings findet die Auslösung der Abwehrmaßnahmen oft zu spät oder in zu geringem Maße statt. Durch Applikation Resistenz-fördernder Substanzen kann jedoch das auch in anfälligen Zellen vorhandene Abwehrpotenzial genutzt und das Pathogen erfolgreich abgewehrt werden (Beßer *et al.*, 2000; Wäspi *et al.*, 2001).

Auch in anfälligen Linien wird der Penetrationsversuch von *Bgh* durch Verstärkung der Zellwand und die Ausbildung von Papillen erschwert (Thordal-Christensen *et al.*, 1999). Parallel dazu kommt es an der Angriffsstelle zu einer Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das durch Quervernetzung von Zellwandbestandteilen die Papille stabilisiert und außerdem antifungale Eigenschaften hat (Hückelhoven und Kogel, 2003). Auch die Produktion der PR-Proteine kann in suszeptiblen Linie nachgewiesen werden, allerdings ist die Expression geringer als in resistenten Gerstenpflanzen (Peterhänsel *et al.*, 1997).

Teilweise folgt in den nicht penetrierten Zellen eine HR, die allerdings auf die attackierte Epidermiszelle beschränkt bleibt und sich nicht ausbreitet.

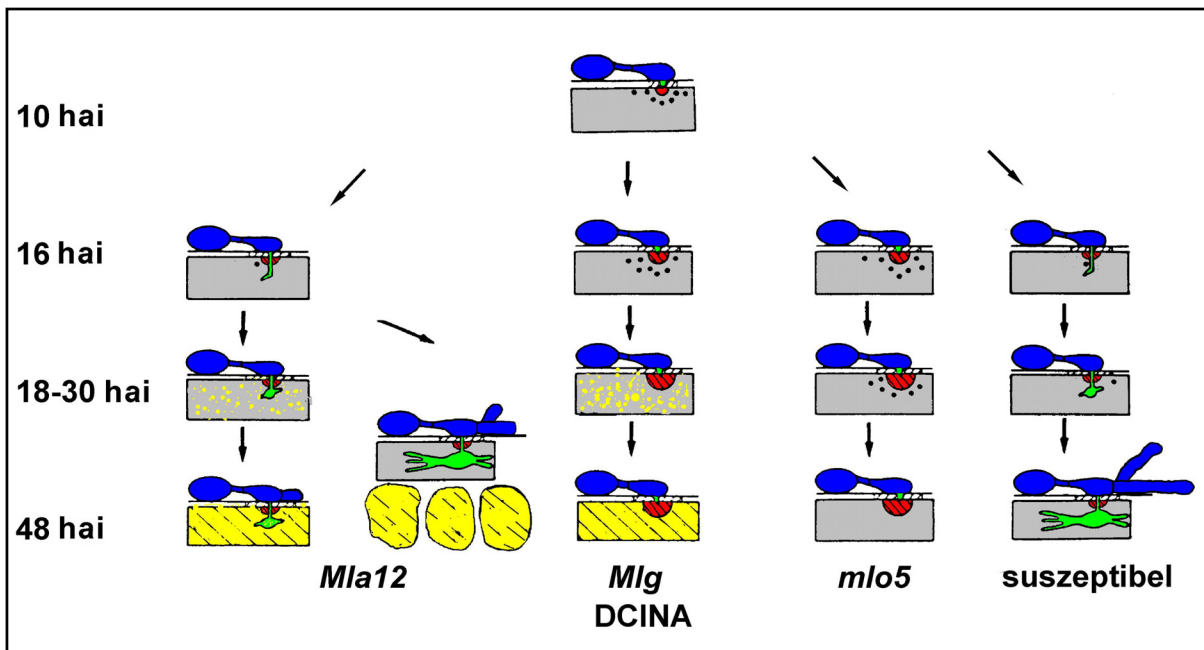
Kann *Bgh* erfolgreich die Epidermiszelle penetrieren, beginnt sofort die Suppression der zellulären Abwehrmaßnahmen und des PCD. So kann zum Beispiel in einer penetrierten Zelle keine Transkriptakkumulation von *PR*-Genen mehr nachgewiesen werden (Lyngkjaer und Gjetting, 2002) Auch findet sich an einer ineffektiven, das heißt durchbrochenen Papille kein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mehr, allerdings akkumuliert rund um das unreife Haustorium O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Hückelhoven *et al.*, 2000a). Die Rolle des Superoxids ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es könnte sich bei O<sub>2</sub><sup>-</sup> nur um das Edukt einer gehemmten SOD-Reaktion handeln oder aber um ein vom Pilz gefördertes Signal, das gemeinsam mit NO eine Zelltod-inhibierende Wirkung hat (Delledonne *et al.*, 2001) . Sobald das Haustorium in der Epidermiszelle einer anfälligen Gerste etabliert ist, verfügt die Pflanze über keine weiteren Abwehrmöglichkeiten und *Bgh* kann ungestört seinen Entwicklungszyklus beenden.

### **1.7.2 Rassen/Sorten-spezifische Resistenz von Gerste gegen *Bgh***

Das Gerste - Echter Gerstenmehltaupilz Pathosystem ist in Bezug auf die beschriebenen Resistenzgene eine der am besten untersuchten Wirt - Parasit Interaktionen. Insgesamt konnten über 85 Rassen/Sorten-spezifische Resistenzgene gefunden werden (Jorgensen, 1994; Thordal-Christensen *et al.*, 1999).

Der *Mla*-Locus (*mildew locus a*) umfasst mit einer Länge von 240 kbp auf dem kurzen Arm des Gerstenchromosoms 5 insgesamt 11 Resistenzgene vom NBS-LRR-Typ (Wei *et al.*,

1999). Die verschiedenen Resistenzgenprodukte vermitteln eine hohe Diversität an Resistenzphänotypen. So kommt es bei der *Mla1* vermittelten Resistenz 18 bis 24 hai (*hours after inoculation*) zu einer epidermalen HR, während *Mla7* zu einer späten (36 - 60 hai) Pathogenabwehr durch Epidermis- und Mesophyll HR führt (Boyd *et al.*, 1995). Das Resistenzgenprodukt MLA12 vermittelt Resistenz gegen *Bgh* der Rasse A6 (Wiberg, 1974) durch eine 36 hai einsetzende Epidermis- und Mesophyll-HR. Für die Ausprägung der *Mla12*



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Interaktionstypen von Gerste und *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* der Rasse A6**

Auf das Auskeimen einer Mehltaukonidie und der Bildung des appressorialen Keimschlauchs (blau) reagieren alle hier dargestellten Genotypen mit Zytoplasmaaggregation und Papillenbildung (10 hai). In suszeptible und *Mla12* tragende Linien kann *Bgh* eindringen und ein Haustorium ausbilden (grün). Ist das Resistenzgen *Mla12* vorhanden wird das Wachstum des Pilzes durch die Auslösung einer hypersensitiven Reaktion (HR, gelb) in der befallenen Epidermiszelle oder im Mesophyll gestoppt. In *Mlg* tragenden oder mit dem Resistenzinduktor DCINA behandelten Pflanzen wird *Bgh* durch Ausbildung einer effektiven Papille (rot) an der Penetration gehindert. Die angegriffene Zelle stirbt im Folgenden meist durch eine epidermale Einzelzell-HR ab. Werden Gerstenpflanzen, die eine *mlo*-Mutation homozygot tragen (*mlo5*), von *Bgh* befallen so wird die Infektion durch eine effektive Papille gestoppt, wobei die angegriffene Epidermiszelle überlebt. Letztlich gelingt es *Bgh* nur in suszeptiblen Gerstenlinien ein Haustorium zu etablieren und die penetrierte Zelle am Leben zu erhalten, was durch die Ausbildung verlängerter Sekundärhyphen (ESH) deutlich wird (Abbildung aus: Hückelhoven *et al.*, 1999)

vermittelten Resistenz ist ein funktionelles RAR1 Protein (*required for Mla specified resistance*) notwendig (Torp und Jorgensen, 1986; Freialdenhoven *et al.*, 1994). Bei RAR1 handelt es sich um ein  $Zn^{2+}$  bindendes CHOR-Domain-Protein, das spezifisch an SGT1, einem Regulator der Ubiquitinierung, bindet (Shirasu *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2002). Möglicherweise führt die von MLA12 ausgehende Resistenz über RAR1 zur Ubiquitinierung und damit zum Abbau von negativen Regulatoren der Pathogenabwehr durch das 26S

Proteasom. Die RAR1 abhängige Abwehr wird zwar auch von anderen Resistenzgenprodukten genutzt (MLP, MLH), ist allerdings kein genereller Mechanismus, da MLA1 und MLA7 unabhängig von RAR1 Resistenzen auslösen (Schulze-Lefert und Vogel, 2000; Zhou *et al.*, 2001).

Resistenz gegen *Bgh* der Rasse A6 vermittelt auch das bislang noch nicht isolierte Resistenzgen *Mlg*. Aber anders als die oben erwähnten dominanten *Mla*-Gene, wird *Mlg* semidominant vererbt und ist RAR1 unabhängig (Görg *et al.*, 1993; Peterhänsel *et al.*, 1997). Die *Mlg*-Resistenz zeichnet sich durch eine große Zahl effektiver Papillen und einer nachfolgenden frühen Einzelzell-HR aus. Damit entspricht sie zytologisch der chemisch induzierten Resistenz, die durch Resistenzinduktoren wie 2,6-Dichlorisonicotinsäure ausgelöst wird (Kogel *et al.*, 1994).

### 1.7.3 Die *mlo* vermittelte Resistenz von Gerste gegen *Bgh*

Eine äußerst stabile und gegen fast alle natürlichen Mehltaurassen wirksame Resistenz der Gerste wird durch Mutationen im *Mlo*-Locus erreicht. Gerstenpflanzen, die homozygot eine *mlo*-Mutation tragen, zeigen eine vollständige Penetrationsresistenz gegen *Bgh* (Stolzenburg *et al.*, 1984; Freialdenhoven *et al.*, 1996). Außerdem kommt es circa 60 h zu einer Zelltodreaktion im Mesophyllgewebe unterhalb der attackierten Epidermiszelle (Piffanelli *et al.*, 2002).

Auf molekularer Ebene erkennt man eine sehr schnelle und starke Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PR-Genen und Phytoalexinen (Peterhänsel *et al.*, 1997; von Röpenack *et al.*, 1998; Hückelhoven *et al.*, 1999). Insgesamt laufen in *mlo*-Pflanzen alle die vom anfälligen Wildtyp bekannten Abwehrreaktion ab, allerdings sind die Prozesse schneller und intensiver. Deshalb wird vermutet, dass es sich bei MLO um einen generellen Repressor der Abwehrreaktionen und des programmierten Zelltods handelt (Büschges *et al.*, 1997; von Röpenack *et al.*, 1998). Doch die Mutation des *Mlo*-Gens hat auch pleiotrope Effekte. So sind *mlo*-Pflanzen suszeptibler gegenüber hemibiotrophen Pathogenen wie *Bipolaris sorokiniana* und *Magnaporthe grisea* (Jarosch *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2001) und zeigen spontane Nekrosen und Chlorosen auf den Blättern (Wolter *et al.*, 1993; Peterhänsel *et al.*, 1997).

Das *Mlo*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4H und kodiert für ein circa 60 kDa großes Protein, das über 7 Transmembrandomänen verfügt. Das Protein MLO ist in der Plasmamembran lokalisiert und erinnert in seiner Struktur an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie von Säugern bekannt sind (Büschges *et al.*, 1997; Devoto *et al.*, 1999).

Inzwischen kann allerdings ausgeschlossen werden, dass heterotrimere G-Proteine an der Modulation der Abwehrreaktionen durch MLO beteiligt sind, da weder die Überexpression noch der *knock-down* der  $G\alpha$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine den Interaktionsphänotyp von *Bgh* und Gerste änderte (Kim *et al.*, 2002b). Allerdings konnte mit Calmodulin ein Bindungspartner von MLO identifiziert werden, der  $Ca^{2+}$  abhängig die Aktivität des MLO-Wildtypproteins steuert (Kim *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2002b).

Auch wurden zwei unabhängige Mutationen gefunden, die eine Ausprägung der *mlo*-Resistenz verhindern. Diese als *Ror1* und *Ror2* (*required for mlo specified resistance*) bezeichneten Loci wurden durch Mutagenese von *mlo*-Pflanzen gefunden, deren Suszeptibilität gegen *Bgh* zumindest teilweise wiederhergestellt wurde (Freialdenhoven *et al.*, 1996). Die Doppelmutanten *mlo/ror1* bzw. *mlo/ror2* zeigen eine im Vergleich zum resistenten *mlo*-Elter reduzierte Penetrationsresistenz, die sich auf eine langsamere und schwächere Abwehrreaktion zurückführen lässt, was an einer späteren und geringeren Akkumulation von  $H_2O_2$  und den PR-Genen erkennbar ist (Freialdenhoven *et al.*, 1996; Peterhänsel *et al.*, 1997; Hückelhoven *et al.*, 2000b).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Trotz vieler Jahre intensiver Forschung sind nur wenige grundlegende molekulare Mechanismen der Interaktion von monokotylen Pflanzen mit krankheitserregenden Pilzen aufgeklärt. Ein detaillierteres Wissen über den Ablauf der Pathogenese und den entsprechenden pflanzlichen Abwehrreaktionen im Modellsystem Gerste (*Hordeum vulgare* L.) / Echter Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) könnte zur gezielten Entwicklung krankheitsresistenterer Getreidesorten beitragen. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Determinanten der Suszeptibilität und Resistenz *in vivo* funktionell untersucht werden. Da die stabile Transformation von Getreide sehr zeit- und kostenintensiv ist, wurden Gerstenprimärblätter mittels Partikelbombardement transient transformiert. Zur Funktionsüberprüfung im Gerste/*Bgh* Pathosystem konnten die zu untersuchenden Kandidatengene sowohl überexprimiert als auch durch RNA Interferenz ausgeschaltet werden (Schweizer *et al.*, 1999b; Schweizer *et al.*, 2000).

Nach Etablierung und Verifizierung des transienten Transformationssystems, wurde *PR-1b* als erstes Kandidatengen ausgewählt, da seine Expression nach Befall durch verschiedene Pathogene induziert wird. Daher konnte man vermuten, dass PR-1B in das pflanzliche Pathogenabwehrsystem involviert ist.

Um Einblick in die pflanzliche Signaltransduktion nach Pathogenbefall zu erhalten, sollten zunächst verschiedene *Rac/Rop* GTPasen der Gerste isoliert werden. Da RAC/ROP Proteine in verschiedenen Systemen als Regulatoren des Zytoskeletts und der Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten dienen, handelt es sich um vielversprechende Kandidaten mit einer Funktion in der Signaltransduktion nach Pathogenbefall. Nach der funktionellen Analyse von sechs RAC/ROP Proteinen der Gerste mittels transients Transformation, wurden diese Kandidatengene weitergehend untersucht. Neben Expressionsstudien durch semiquantitative RT-PCR, konnte die intrazelluläre Lokalisation und deren Einfluss auf die Funktionalität der RAC/ROP Proteine bestimmt werden.

## 2 PUBLIKATIONEN

### Internationale wissenschaftliche Zeitschriften

**Schultheiss, H., Dechert, C., Kiraly, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K-H. und Hückelhoven, R.** (2003). Functional assessment of the pathogenesis related protein PR-1B in barley. **Plant Science** 165, 1275-1280.

**Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K-H. und Hückelhoven, R.** (2002). A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. **Plant Physiology** 128, 1447-1454.

**Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K-H. und Hückelhoven, R.** (2003). Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. **Plant Journal** 36, 589-601.

### Weitere Veröffentlichungen

**Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K-H. und Hückelhoven, R.** (2002). Knock-down of the small G-protein enhances penetration-resistance of barley against the powdery mildew fungus. **Plant Protection Science** 38 (*Special issue 2*), 477-479.

**Schultheiss, H., Hückelhoven, R. und Kogel, K-H.** (2001). *In-planta*-Funktionsanalyse von PR1 im Pathosystem Gerste – Echter Gertenmehltau mittels transientem *gene silencing*. **Phytomedizin** 2, 86-87.

**Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K-H. und Hückelhoven, R.** (2002). *Knock-out* des kleinen G-Proteins RACB erhöht die Penetrationsresistenz der Gerste gegen den Echten Gerstenmehltaupilz. **Phytomedizin** 3, 36-37.

**Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K-H. und Hückelhoven, R.** (2003). Kleine G-Proteine in Getreide – Neue Wirkstofftargets im Pflanzenschutz ? **Phytomedizin** 3, 22-23.

# Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley

Holger Schultheiss<sup>a</sup>, Cornelia Dechert<sup>a</sup>, Lorant Király<sup>b</sup>, József Fodor<sup>b</sup>, Kathrin Michel<sup>a</sup>, Karl-Heinz Kogel<sup>a</sup>, Ralph Hüchelhoven<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Interdisciplinary Research Centre for Environmental Sciences, Institute of Phytopathology and Applied Zoology, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

<sup>b</sup> Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 102, H-1525 Budapest, Hungary

Received 23 April 2003; received in revised form 15 July 2003; accepted 15 July 2003

## Abstract

The pathogenesis-related protein 1 (PR-1b) of barley (*Hordeum vulgare* L.) is a marker for the attack by the powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) and other pathogens. PR-1b consists of 164 amino acids and has a potential signal peptide for export into the cell wall. Here, we show that *PR-1b* is differentially expressed in near-isogenic barley lines exhibiting various forms of defence phenotypes including papilla formation and the hypersensitive cell death. To elucidate PR-1b function, we transiently silenced *PR-1* expression by double stranded RNA (dsRNA) interference in the moderately susceptible barley double mutant line A89 (genotype: *mlo5-ror1*), which shows a papillae-based defence phenotype. Upon bombardment of leaf segments with *PR-1b* dsRNA and a GFP marker gene construct, *Bgh* slightly more frequently penetrated the plant cell wall of transformed epidermal cells relative to cells bombarded with human control dsRNA. We conclude that PR-1b contributes to penetration resistance to the powdery mildew fungus in barley. We also observed that *PR-1b* expression correlates with the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in responses to *Bgh* and *Bipolaris sorokiniana* and was induced upon infiltration of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing mixture of glucose and glucose oxidase.

© 2003 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Gene silencing; MLO; Pathogen; Reactive oxygen intermediates; Resistance; Suppression

## 1. Introduction

The interaction between barley (*Hordeum vulgare* L.) and the powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) has been intensively studied in terms of plant defence reactions [1,2]. The plant response to pathogen attack includes alterations of the cell wall, production of phenolic metabolites and reactive oxygen intermediates, a hypersensitive cell death reaction (HR) as well as accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins. In barley, early penetration resistance and physical reinforcement of the cell wall by appositions (CWAs, syn. papillae) are typically observed in race-non-specific resistance responses such as those governed by the *mlo* alleles or quantitative background resistance. HR is the predominant plant response

in gene-for-gene resistance mediated by major resistance (*R*) genes such as *Mlg* and *Mla* [1]. Both race-non-specific formation of effective CWAs and *R* gene-mediated execution of HR correlate spatially and temporally with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation [3].

PR proteins were initially identified as pathogen inducible proteins in leaves of tobacco after tobacco mosaic virus infection. Despite years of intensive research the biological function of the pathogenesis-related protein PR-1 remained unclear. It was reported that purified PR-1 proteins exhibit antimicrobial activities against *Phytophthora infestans* and that tobacco overexpressing PR-1 shows enhanced resistance to oomycetes. This provided first evidence for a causal role of PR-1 in plant defence. Expression of the gene increased after pathogen attack as well as after a number of abiotic stresses, including UV irradiation and wounding (for reviews see [4,5]). In dicotyledonous but not in monocotyledonous plants, PR-1 expression correlates with the onset of resistance induced biologically or by chemical resistance inducers like 2,6-dichloroisonicotinic acid and benzothiadiazoles [4,6].

\* Corresponding author. Tel.: +49-641-9937494; fax: +49-641-9937499.

E-mail addresses: [holger.schultheiss@agr.uni-giessen.de](mailto:holger.schultheiss@agr.uni-giessen.de) (H. Schultheiss), [ralph.hueckelhoven@agr.uni-giessen.de](mailto:ralph.hueckelhoven@agr.uni-giessen.de) (R. Hüchelhoven).

In barley, Mouradov et al. [7], Bryngelsson et al. [8] and Stevens et al. [9] identified altogether four different *Bgh*-responsive basic forms of PR-1. Southern analyses indicated a total number of 8–10 PR-1 family members in the genome [8]. Evidence for an involvement of PR-1 in the defence of barley against the powdery mildew fungus came from the observation that *PR-1* accumulated in response to inoculation with *Bgh* in resistant barley lines much stronger than in susceptible lines [10–12].

In this study we underline the involvement of the basic PR-1b [8] protein in the defence mechanism of barley against the powdery mildew fungus. We demonstrate differential *PR-1b* transcript accumulation during execution of different resistance mechanisms and show a clear association of *PR-1b* expression and *Bgh*-resistance. By *PR-1b* double stranded RNA (dsRNA) interference, we uncover contribution of PR-1b to penetration resistance to *Bgh*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant materials, pathogens and inoculation

The barley (*Hordeum vulgare* L.) lines Ingrid, Palas and the backcross (BC) lines BCIngrid*mlo5*, BCPallas*Mla12* and BCPallas*Mlg* were obtained from Lisa Munk (Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark). Their generation was described previously [13]. The mutant A89 was provided by Paul Schulze-Lefert (Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany [14]). Plants were grown in a growth chamber at 18 °C with 60% relative humidity and a photoperiod of 16 h (60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photon flux density). The barley powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal, race A6 was inoculated onto barley primary leaves to give a density of 50 conidia  $\text{mm}^{-2}$ . *Bgh* was maintained on barley cultivar Siri under the conditions described above.

*Bipolaris sorokiniana* had been isolated from the boot leaf of the wheat cultivar Sonalika growing under natural conditions at Banaras, eastern India, during April 1999. Single spore isolation and maintenance of the isolate has been described by Kumar et al. [15]. For inoculation, primary leaf segments of 6 cm length harvested from 7-day-old plants were laid flat by fixing their ends on surface of a steel sheet. A suspension containing approximately 20,000 spores/ml water plus 0.02% Tween-20 was sprayed onto the segments. Inoculated segments were immediately placed onto a 2 mm thick layer of benzimidazole 0.5% water agar (0.6 ppm benzimidazole) in a plastic dish closed tightly with a lid. Segments were incubated for 72 h at 25 °C with a photoperiod of 16 h.

### 2.2. RNA extraction and Northern blotting

Total RNA was extracted from 5 to 10 primary leaf segments (5 cm long) using a RNA extraction buffer (AGS,

Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. For barley mRNA detection, 2–4  $\mu\text{g}$  of total RNA from each sample was separated in agarose gels and blotted by capillary transfer to positively charged Nylon membranes. Detection of RNAs was performed with anti-sense RNA probes (*HvPR-1b*, *HvOxOa* [2]) according to the DIG-System User's Guide (Roche, Mannheim, Germany). Prior to immunodetection of RNA–RNA hybrids, blots were washed stringently two times for 20 min in 0.1% (w/v) SDS,  $0.1 \times \text{SSC}$  at 68 °C. For probe generation, plasmids were amplified in *E. coli*, isolated and used for in vitro transcription using T7 RNA polymerases and digoxigenin or fluorescein labelled nucleotides (DIG-Luminescence Detection Kit, Roche, Mannheim, Germany).

### 2.3. Construction of pGY1-PR-1b and pGFP:PR-1b

For overexpression of the PR-1b protein the cDNA of *PR-1b* was cut out of the plasmid pHvPR-1b [8] with restriction enzymes *SmaI* and *EcoRV* and cloned into the *SmaI* site of pGY1 [16]. For expression of a GFP:PR-1b fusion protein the cDNA of the green fluorescent protein (GFP) was amplified from the plasmid pGFP under elimination of the GFP stop codon [16] by PCR (primers: 5'-GGATCCATGGT GAGCAAGGGCGAG-3' and 5'-GGATCCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'). PCR products were cloned directly into pGY1-PR-1b (cut with *SmaI*). The strategy was designed in a way, which allowed cloning of GFP upstream of the *PR-1b* 5' end. Orientation of the insert was checked by PCR.

### 2.4. Transient transformation, RNAi, and evaluation of fungal development

To determine the function of PR-1b, we used a transient transformation assay as described previously [17,18]. Plants were grown in a growth chamber at 24 °C (20 °C in the dark) with 60% relative humidity and a photoperiod of 16 h (240  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photon flux density). For dsRNA interference experiments, 312  $\mu\text{g}$  of 1.1  $\mu\text{m}$  tungsten particles (BioRad, Munich, Germany) were coated with dsRNA (2  $\mu\text{g}$ ) together with pGFP (1  $\mu\text{g}$ ; GFP under control of the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter [16]) as a transformation marker for each shot. As an unspecific RNA control, we used human thyroid receptor (hTR) dsRNA. Double stranded RNA was obtained by annealing of sense and antisense RNA synthesized in vitro [17]. For overexpression of PR-1b, 312  $\mu\text{g}$  of 1.1  $\mu\text{m}$  tungsten particles were coated with 0.5  $\mu\text{g}$  pGFP as a marker and 0.8  $\mu\text{g}$  pGY1-PR-1b or pGY1 (control), respectively.

Leaf segments were bombarded with coated particles 4 h before inoculation with *Bgh* race A6 (100 conidia  $\text{mm}^{-2}$ ). Interaction outcome was evaluated subsequently by fluorescence and light microscopy. For each individual experiment, at least 100 interaction sites were counted as described in

[18]. PE was calculated for each experiment as number of penetrated cells divided by total number of attacked cells.

### 2.5. In planta production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

To produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in planta we pressure-infiltrated barley first leaves with mixtures of glucose and glucose oxidase. Barley seedlings were infiltrated with 2 mM glucose (Gluc) in 10 mM K<sub>x</sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub> buffer pH 7.5 either alone or together with 25, 50, or 100 U/ml glucose oxidase (GOX EC 1.1.3.4 from *Aspergillus niger*, Sigma, Hannover, Germany). The starch/iodide assay was performed according to Wu et al. [19].

## 3. Results

### 3.1. Expression of PR-1b in response to biotrophic *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

To further elucidate a role of PR-1b in the barley defence against *Bgh*, we carried out gel blot analyses with total RNA from different susceptible and resistant near-isogenic barley lines after inoculation with 50 conidia of *BghA6* per mm<sup>2</sup>: (a) susceptible cultivars Ingrid and Pallas; (b) resistant backcross line BCIngrid*mlo5*; (c) moderately susceptible *ror*-mutant A89 (genotype *mlo5*, *ror1*); (d) resistant backcross lines BCPallas*Mlg* and BCPallas*Mla12*. The susceptible lines Pallas and Ingrid exhibited a late and transient *PR-1b* expression that decreased rapidly after successful haustoria formation (22–48 hai). The earliest detectable increase of *PR-1b* transcripts took place 3 hai in resistant BCIngrid*mlo5* (Fig. 1A). The mutant A89 showed an intermediate *PR-1b* transcript accumulation coinciding with an intermediate resistance phenotype between Ingrid and BCIngrid*mlo5*. In the *Mlg* and *Mla12* backcross lines strong *PR-1b* expression started between 8 and 22 hai and remained on a high level during expression of effective plant defence (Fig. 1B). The intensity of *PR-1b* signals correlated closely with the timing of different resistance responses in *mlo5*, *Mlg*, and *Mla12* genotypes.

### 3.2. PR-1b expression in response to the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*

It was previously shown that *Bgh*-resistant *mlo*-barley is highly susceptible to certain hemibiotrophic fungi such as *Magnaporthe grisea* and *B. sorokiniana* [15,20]. We inoculated *Mlo* and *mlo5* plants by spraying with 20,000 spores/ml of *B. sorokiniana* and recorded *PR-1b* expression during the first 3 days post-inoculation. The *mlo5* genotype showed more severe spot blotch symptoms than the wild type parent *Mlo* line (not shown). *B. sorokiniana*-induced *PR-1b* transcript accumulation started from 16 hai onward and was stronger and earlier in highly susceptible *mlo5*-barley relative to the *Mlo* parent (Fig. 2).

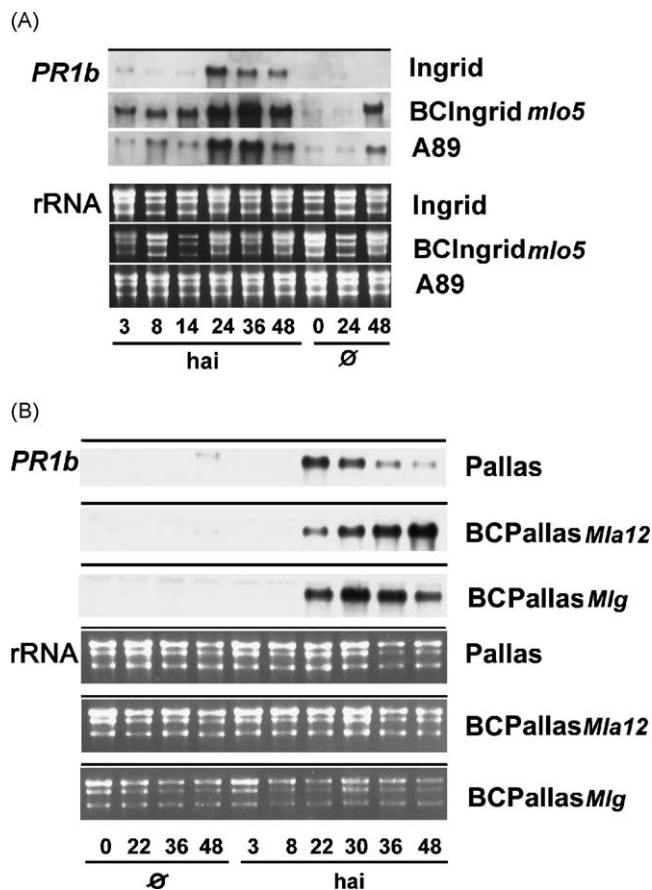


Fig. 1. Barley *PR-1b* expression in response to inoculation with *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. Northern blots of 2 µg total RNA were probed with antisense *PR-1b* RNA probes. Gene expression was analysed after mock (control, Ø) or conidial inoculation, respectively. Gel loading was documented after ethidium bromide staining of rRNAs. Total RNA was extracted at 0–48 h after inoculation (hai). (A) Transcript accumulation in near-isogenic susceptible cultivar Ingrid (genotype *Mlo*, *Ror1*), race-non-specific resistant BCIngrid*mlo5* (*mlo5*, *Ror1*) and moderately susceptible A89 (*mlo5*, *ror1*) after dense inoculation with *Bgh*. Resistant *mlo5*-barley builds effective cell wall appositions preventing penetration 14–24 h after inoculation. (B) Transcript accumulation in near-isogenic susceptible cultivar Pallas and race-specific resistant near-isogenic backcross lines BCPallas*Mla12* or BCPallas*Mlg* after dense inoculation with *Bgh* race A6 (*AvrMla12*, *AvrMlg*). Pallas is penetrated by *Bgh* 14–24 hai resulting in unrestricted fungal growth. BCPallas*Mla12* shows late post-penetration HR in epidermal cells and subjacent mesophyll cells 24–72 hai. BCPallas*Mlg* is resistant to fungal penetration and expresses early single-cell HR 18–30 hai.

### 3.3. PR-1b expression in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

We tested whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a trigger for *PR-1b* expression. Barley first leaves were infiltrated with mixtures of glucose and different concentrations of glucose oxidase (Gluc/GOX) that oxidizes glucose accompanied by the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the intercellular washing fluid was confirmed by the starch/iodide assay (not shown). Glucose alone or in mixture with low concentration of GOX (25 U ml<sup>-1</sup>) did not induce visible symptoms after infiltration into c.v. Pallas, whereas both 50 and 100 U GOX ml<sup>-1</sup>

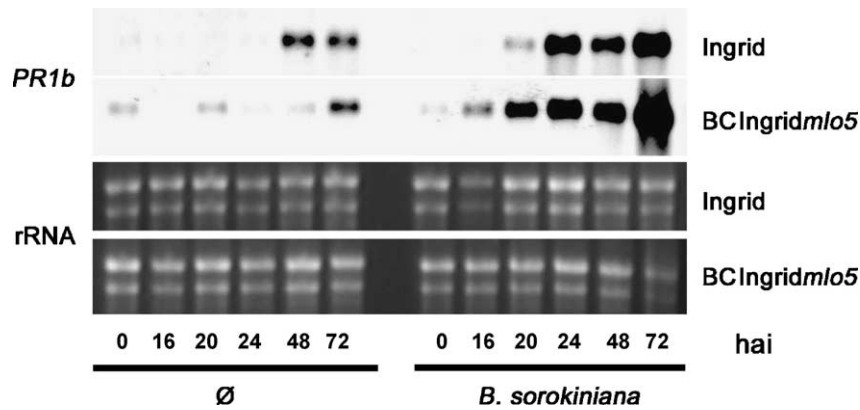


Fig. 2. Barley *PR-1b* expression in response to infection with *Bipolaris sorokiniana*. Northern blots of 3  $\mu$ g total RNA were probed with antisense *PR-1b* RNA probes to analyse gene expression during fungal penetration (biotrophic phase) and tissue colonisation (necrotrophic phase) by the hemibiotrophic fungus *B. sorokiniana*. *Mlo*-wild type barley c.v. Ingrid and *Mlo*-mutant backcrossline BCIngrid*mlo5* were tested after spraying water (control,  $\emptyset$ ) or conidial suspensions, respectively. Gel loading was documented after ethidium bromide staining of rRNAs. Total RNA was extracted at 0–72 h post-inoculation.

caused a mild leaf necrosis. We analysed *PR-1b* expression at 5 h and 24 h post-infiltration of Gluc/GOX and found increased gene expression at both time points even with 25 U GOX  $\text{ml}^{-1}$  while expression of *oxalate oxidase A* remained unchanged. Infiltration of Glucose solution did not induce detectable *PR-1b* expression (Fig. 3).

#### 3.4. Assessment of *PR-1b* function

To determine whether *PR-1b* is crucial for penetration resistance, we performed epidermal single-cell *PR-1b* gene silencing experiments by sequence-specific dsRNA interference (RNAi) in a transient transformation assay [17,18].

Leaf segments of the moderately susceptible barley mutant A89 in which *PR-1b* is expressed at a high level (see Fig. 1A) were bombarded with *PR-1b* dsRNA together with

a vector for expression of the green fluorescent protein (pGFP). Subsequently, the segments were inoculated with *Bgh*, and outcome of the interaction was evaluated 40 h later. After five independent experiments and evaluation of 772 interaction sites, we concluded that the transient knock down of *PR-1b* provoked a weak but significant increase in penetration efficiency (PE) of *Bgh* relative to controls that were bombarded with human control dsRNA (Fig. 4). Thereby, the relative PE on *PR-1b* dsRNA bombarded cells was enhanced from 20% in controls to approximately 25% (Fig. 4).

In order to demonstrate effectiveness and specificity of the RNA interference mechanism, we bombarded leaves with pGFP:*PR-1b* together with dsRNA of *PR-1b* or, alternatively, with a heterologous dsRNA of the human thyroid

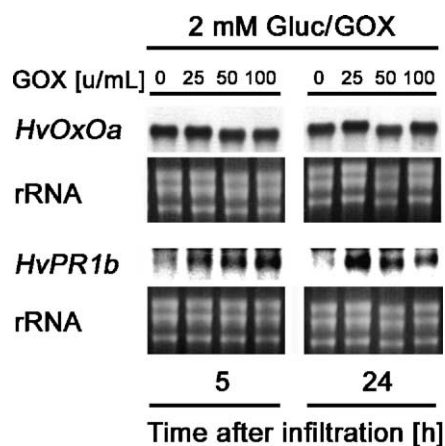


Fig. 3. Barley *PR-1b* expression in response to infiltration of mixtures of glucose and glucose oxidase provoking  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulation. Barley cultivar Pallas seedlings were pressure-infiltrated with 2 mM glucose (Gluc) either alone (0) or together with 25, 50, or 100 U  $\text{ml}^{-1}$  glucose oxidase (GOX). Barley oxalate oxidase A (*HvOxOa*) and *PR-1b* expression was analysed in Northern blots at 5 and 24 h after infiltration. Gel loading was documented after ethidium bromide staining of rRNAs.

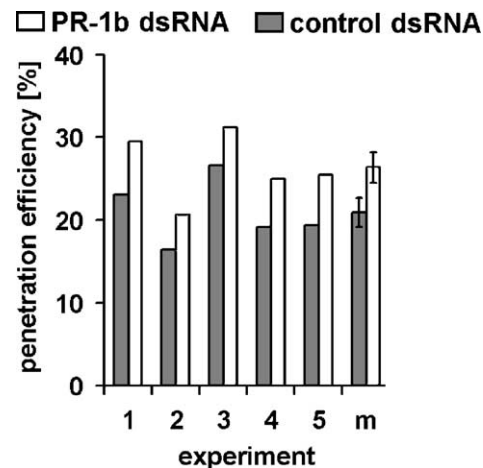


Fig. 4. Increase of penetration of barley mutant A89 (*mlo5*, *ror1*) by *Bgh* upon *PR-1b* dsRNA induced dsRNA interference. Penetration efficiencies were evaluated in five independent experiments with race *BghA6*. Penetration efficiency is enhanced by *PR-1b* dsRNA (white columns) relatively to controls (*TR* dsRNA; grey columns). Individual results (experiments 1–5) and means (*m*, columns with standard error bars) are displayed. Influence of *PR-1b* dsRNA on penetration efficiency in A89 is significantly different from the control at  $p < 0.001$  (Student's *t*-test).

hormone receptor (TR). Expression of the GFP:PR-1b fusion protein in the presence of TR dsRNA resulted in  $14.2 \pm 0.5$  GFP-fluorescent cells per segment (mean  $\pm$  S.E.). In contrast, transformation of cells with GFP:PR-1b in the presence of PR-1b dsRNA reduced the number of green fluorescent cells to  $3.9 \pm 0.4$  (mean  $\pm$  S.E.; 72% reduction) per segment indicating sequence-specific, induced degradation of GFP:PR-1b mRNA.

Overexpression of PR-1b in the susceptible line Ingrid that exhibits a relatively late and transient expression of PR-1b (see Fig. 1) led to a small decrease in fungal PE from  $51.9 \pm 4.8$  to  $47.7 \pm 2.7\%$  (mean  $\pm$  S.E.). However, this effect was not significant, although it was detectable in each of three independent experiments.

#### 4. Discussion

The analysis of PR-1 conducted in this study characterised PR-1 as a stress response protein involved in several plant defence mechanisms. We have demonstrated that expression of PR-1b is apparently not sufficient to restrict the growth of fungal pathogens but is one factor that limits penetration of barley by the powdery mildew fungus.

In vitro studies revealed that recombinant barley PR-1b is not sufficient for the inhibition of *Bgh* germ tube development [21], whereas PR-1 isolated from beans inhibits differentiation of rust fungi [22]. Silencing the expression of PR-1b in A89 enhanced fungal penetration success although overexpression in the susceptible cultivar Ingrid enhanced resistance only weakly. Since overexpression was not very effective, our results support the notion that PR-1b does not exert a direct antimicrobial effect on *Bgh*. We speculate that PR-1b contributes to build up a physical barrier against plant cell wall penetration by *Bgh* together with other apoplastic host proteins. The removal of PR-1b from the resistance machinery resulted in a partial breakdown of penetration resistance. For gene silencing analysis by RNAi it was critical to choose the *mlo5-ror1* double mutant line A89 that shows strong PR-1b expression though the interaction phenotype with powdery mildew is moderately susceptible [14].

Many studies have demonstrated the responsiveness of the barley PR-1b gene to attack from *Bgh* (Fig. 1) [8,23]. PR-1b expression in susceptible barley might be a result of non-specific single-cell background resistance, which is responsible for the fact that development of *Bgh* is arrested at up to 50% of interaction sites even in the absence of an R gene. After successful fungal establishment, PR-1b expression attenuated at 36–48 hpi possibly because the powdery mildew fungus actively suppresses defence reactions as a prerequisite to maintain biotrophy. Interestingly, transient defence gene expression in wheat upon inoculation with *B. graminis* reappeared after curative application of the resistance activating compound syringolin A, possibly counteracting defence suppression by the fungus [24]. In *mlo5*-barley, PR-1b expression in response to *Bgh*, *B.*

*sorokiniana* and *M. grisea* was very high (Figs. 1 and 2) [6,11]. *Bgh*-resistant *mlo5*-barley is highly susceptible to the hemibiotrophic *B. sorokiniana*. Apparently, development of this fungus is not affected by strong expression of PR-1b.

Physiological changes induced by *Bgh* in barley are associated with effects on the host redox status [3]. For instance, PR-1b expression correlates temporally with accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during both effective defence reactions (papillae, HR) against *Bgh* and tissue colonisation by *B. sorokiniana* [3,15], which indicates that PR-1b expression could be affected by the plant redox status. Accordingly, PR-1b expression was induced by Gluc/GOX producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in planta (Fig. 3). Though our results only hint to redox dependent PR-1b expression, this idea is further supported by the fact that the barley PR-1b promoter [23] contains several W-boxes that are supposed to be DNA sequences for binding of WRKY transcription factors that contain a potentially redox-sensitive zinc finger as DNA binding domain [25].

#### Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to K.-H.K. and R.H. (Ko 1208/8). J.F. was supported by the Deutscher Akademischer Austauschdienst, and by grants OTKA T-042801 and Bolyai János Scholarship. L.K. was supported by a Hungarian State Eötvös Fellowship and by a grant from the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA No. T 037341 I).

#### References

- [1] R. Panstruga, P. Schulze-Lefert, Live and let live: insights into powdery mildew disease and resistance, *Mol. Plant Pathol.* 3 (2002) 495–502.
- [2] D.B. Collinge, P.L. Gregersen, H. Thordal-Christensen, The nature and role of defense response genes in cereals, in: R.R. Bélanger, W.R. Bushnell, A.J. Dik, T.L.W. Carver (Eds.), *The Powdery Mildews*, APS Press, St. Paul, MN, 2002, pp. 146–160.
- [3] R. Hükelhoven, K.-H. Kogel, Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216 (2003) 891–902.
- [4] L.C. van Loon, E.A. Van Strien, The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55 (1999) 85–97.
- [5] S. Muthukrishnan, G.L. Liang, H.N. Trick, B.S. Gill, Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 64 (2001) 93–114.
- [6] B. Jarosch, M. Jansen, U. Schaffrath, Acquired resistance functions in *mlo*-barley, which is hypersusceptible to *Magnaporthe grisea*, *Mol. Plant Microb. Interact.* 16 (2003) 107–114.
- [7] A. Mouradov, L. Petrasovits, A. Davidson, K.J. Scott, A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley, *Plant Mol. Biol.* 23 (1993) 439–442.
- [8] T. Bryngelsson, J. Sommer-Knudsen, P.L. Gregersen, D.B. Collinge, B. Ek, H. Thordal-Christensen, Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR1-type pathogenesis-related proteins from barley, *Mol. Plant Microb. Interact.* 7 (1994) 267–275.

- [9] C. Stevens, E. Titarenko, J.A. Hargreaves, S.J. Gurr, Defence-related gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora (Septoria) nodorum* and barley (*Hordeum vulgare* L.) coleoptile cells, *Plant Mol. Biol.* 31 (1996) 741–749.
- [10] A. Freialdenhoven, B. Scherag, K. Hollricher, D.B. Collinge, H. Thordal-Christensen, P. Schulze-Lefert, *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley, *Plant Cell* 6 (1994) 983–994.
- [11] C. Peterhänzel, A. Freialdenhoven, J. Kurth, R. Kolsch, P. Schulze-Lefert, Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death, *Plant Cell* 9 (1997) 1397–1409.
- [12] R. Hükelhoven, J. Fodor, M. Trujillo, K.-H. Kogel, 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 (2000) 16–24.
- [13] P. Kølster, L. Munk, O. Stølen, J. Løhde, Near-isogenic barley lines with genes for resistance to powdery mildew, *Crop Sci.* 26 (1986) 903–907.
- [14] A. Freialdenhoven, C. Peterhänzel, J. Kurth, F. Kreuzaler, P. Schulze-Lefert, Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley, *Plant Cell* 8 (1996) 5–14.
- [15] J. Kumar, R. Hükelhoven, U. Beckhove, S. Nagarajan, K.-H. Kogel, A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins, *Phytopathology* 91 (2001) 127–133.
- [16] P. Schweizer, J. Pokorny, O. Abderhalden, R. Dudler, A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat, *Mol. Plant Microb. Interact.* 12 (1999) 647–654.
- [17] P. Schweizer, J. Pokorny, P. Schulze-Lefert, R. Dudler, Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals, *Plant J.* 24 (2000) 895–903.
- [18] H. Schultheiss, C. Dechert, K.-H. Kogel, R. Hükelhoven, A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley, *Plant Physiol.* 128 (2002) 1447–1454.
- [19] G. Wu, B.J. Short, E.B. Lawrence, E.B. Levine, K.C. Fitzsimmons, D.M. Shah, Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants, *Plant Cell* 7 (1995) 1357–1368.
- [20] B. Jarosch, K.-H. Kogel, U. Schaffrath, 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*, *Mol. Plant Microb. Interact.* 12 (1999) 508–514.
- [21] T.T. Poulsen, Transgenic barley with enhanced resistance to fungal pathogens, Ph.D. dissertation, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, 2001.
- [22] M. Rauscher, A.L. Adam, S. Wirtz, R. Guggenheim, K. Mendgen, H.B. Deising, PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean, *Plant J.* 19 (1999) 625–633.
- [23] A. Mouradov, E. Mouradova, K.J. Scott, Gene family encoding basic pathogenesis-related 1 proteins in barley, *Plant Mol. Biol.* 26 (1994) 503–507.
- [24] U. Wäspi, P. Schweizer, R. Dudler, Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew, *Plant Cell* 13 (2001) 153–161.
- [25] E. Vranová, D. Inze, F. van Breusegem, Signal transduction during oxidative stress, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1227–1236.

# A Small GTP-Binding Host Protein Is Required for Entry of Powdery Mildew Fungus into Epidermal Cells of Barley<sup>1</sup>

Holger Schultheiss, Cornelia Dechert, Karl-Heinz Kogel, and Ralph Hückelhoven\*

Institute of Phytopathology and Applied Zoology, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff Ring 26–32, D–35392 Giessen, Germany

Small GTP-binding proteins such as those from the RAC family are cytosolic signal transduction proteins that often are involved in processing of extracellular stimuli. Plant RAC proteins are implicated in regulation of plant cell architecture, secondary wall formation, meristem signaling, and defense against pathogens. We isolated a *RacB* homolog from barley (*Hordeum vulgare*) to study its role in resistance to the barley powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*). *RacB* was constitutively expressed in the barley epidermis and its expression level was not strongly influenced by inoculation with *B. graminis*. However, after biolistic bombardment of barley leaf segments with *RacB*-double-stranded RNA, sequence-specific RNA interference with *RacB* function inhibited fungal haustorium establishment in a cell-autonomous and genotype-specific manner. Mutants compromised in function of the *Mlo* wild-type gene and the *Ror1* gene (genotype *mlo5 ror1*) that are moderately susceptible to *B. graminis* showed no alteration in powdery mildew resistance upon *RacB*-specific RNA interference. Thus, the phenotype, induced by *RacB*-specific RNA interference, was apparently dependent on the same processes as *mlo5*-mediated broad resistance, which is suppressed by *ror1*. We conclude that an RAC small GTP-binding protein is required for successful fungal haustorium establishment and that this function may be linked to MLO-associated functions.

Complete resistance of barley (*Hordeum vulgare*) to the biotrophic, fungal pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) is mediated by major resistance genes such as the *Mla* genes or by loss of MLO function in *Mlo*-mutant genotypes such as *mlo5*-barley (Jørgensen, 1994; Schulze-Lefert and Vogel, 2000). The latter is expressed exclusively via penetration resistance, which is characterized by formation of cell wall appositions and accumulation of phytoalexins, pathogenesis-related gene transcripts, and hydrogen peroxide (Stolzenburg et al., 1984; Zeyen et al., 1993; Peterhänsel et al., 1997; von Röpenack et al., 1998; Hückelhoven et al., 1999, 2000b). All of these characteristics are also found in susceptible barley, albeit to a lower extent, meaning that the *mlo* alleles confer a primed responsiveness for these defense reactions or the functional MLO is a control element of these fundamental resistance mechanisms (Büschges et al., 1997; Peterhänsel et al., 1997).

It is intriguing that *Bgh*-resistant *mlo* genotypes show hypersusceptibility to *Magnaporthe grisea* and to toxic culture filtrates of *Cochliobolus sativus* (Jarosch et al., 1999; Kumar et al., 2001). Thus, *Mlo* exerts an ambivalent role in controlling resistance to the

biotroph *Bgh* and susceptibility to the hemibiotroph *M. grisea*. The MLO protein is a membrane-spanning protein reminiscent of a G-protein coupled receptor (Devoto et al., 1999). In animals, such proteins interact with heterotrimeric G-proteins and/or small GTP-binding proteins via different cytoplasmic domains (Naor et al., 2000). Small GTP-binding proteins such as those of the RAC family are cytosolic signal transduction proteins that often are involved in processing of extracellular stimuli. Plant RAC proteins are involved in regulation of plant cell architecture, secondary wall formation, meristem signaling, and defense against pathogens (Valster et al., 2000). Mammalian RAC1, in its GTP-binding form, is essential for stable assembly of an active NADPH oxidase complex in the plasma membrane of phagocytic and nonphagocytic cells. This complex is responsible for generation of superoxide radical anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) that is a signal molecule for cell proliferation in low concentrations, whereas it causes host cell death and pathogen killing in higher concentrations (Irani et al., 1997; Burstein et al., 1998; Irani and Goldschmidt-Clermont, 1998; Subauste et al., 2000).

Interaction of plant RAC homologs with the NADPH oxidase complex appears to regulate activity of NADPH oxidase that produces  $O_2^{\cdot-}$  in response to pathogen attack (Hassanain et al., 2000; Ono et al., 2001). Rice (*Oryza sativa*) *Rac1*, when overexpressed in rice in its constitutive active form, leads to hypersensitive reaction (HR) at sites of attack by *M. grisea* and, therefore, to pathogen resistance. Expression of

<sup>1</sup> This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant no. DFG Ko1208/8 to R.H. and K.-H.K.).

\* Corresponding author; e-mail Ralph.Hueckelhoven@agrar.uni-giessen.de; fax 49–641–9937499.

Article, publication date, and citation information can be found at [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.010805](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.010805).

dominant negative forms of *Rac1* consistently results in enhanced susceptibility to *M. grisea* (Kawasaki et al., 1999; Ono et al., 2001).

Reactive oxygen intermediates (ROI) play multiple roles in plant pathogen interactions.  $O_2^-$  or  $H_2O_2$  induce defense mechanisms including pathogenesis-related gene expression and the HR. On the other hand, ROI are also signals that restrict cell death and lead to production of antioxidants. Spatial and quantitative differences in the occurrence of ROI are crucial for their mode of action (Levine et al., 1994; Tenhaken et al., 1995; Jabs et al., 1996). In barley,  $O_2^-$  production takes place during attack by *Bgh* at sites of successful penetration of epidermal cells, but not at sites where fungal penetration is prevented (Hückelhoven and Kogel, 1998). In contrast,  $H_2O_2$  accumulates subcellularly in barley at sites where penetration by *Bgh* is successfully prevented as well as in entire cells that undergo HR. Together, accumulation patterns of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  differ temporally and spatially in barley during attack by *Bgh* (Thordal-Christensen et al., 1997; Hückelhoven and Kogel, 1998; Kogel and Hückelhoven, 1999; Hückelhoven et al., 1999, 2000a, 2000b).

We show here that a barley RAC homolog is required for parasitic entry of the biotrophic powdery mildew fungus into epidermal host cells and, therefore, that this protein has a negative function in disease resistance of barley to *Bgh*.

## RESULTS

### Isolation of a Barley RACB Open Reading Frame

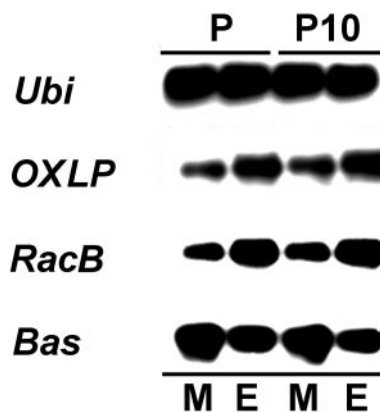
We recently isolated a partial coding sequence of a barley putative *Rac1* homolog (GenBank accession no. AJ290420; Hückelhoven et al., 2001). In this study, we isolated a complete open reading frame of the barley *Rac* homolog (see "Materials and Methods") that encodes a protein with more than 98% identity to RACB from rice and maize (*Zea mays*) and more than 55% identity to human RAC1 or RAC2. Therefore, the cDNA clone now is designated as barley *RacB* (GenBank accession no. AJ344223). The barley RACB homolog contains several conserved motifs that are essential for RAC function in animal systems. The CXXL motif is conserved at the C terminus. The Cys residue of this motif is the site of post-translational isoprenylation that directs active RAC proteins into the plasma membrane. The so-called effector loop of RAC protein can also be found in barley RACB (amino acids 28–48). This motif is responsible for interaction with target protein of RAC homologs such as NADPH oxidase. Barley RAC residues 127 to 140 resemble a specific effector loop that might be required for induction of  $O_2^-$  generation via RAC (Hassanain et al., 2000). Motifs typically responsible for GTP binding and GTP hydrolysis, respectively, are also present in barley RACB. Together, the isolated

barley cDNA encodes a protein that contains all typical motifs of small RAC GTP-binding proteins.

### *RacB* Is Expressed in Epidermal Tissue

In our previous study, we described constitutive expression of the barley *RacB* homolog (designated as *Rac1*) in barley primary leaves. *RacB* expression was unaffected by inoculation with the powdery mildew fungus (*Bgh*; Hückelhoven et al., 2001). In this study, we wanted to know whether *RacB* is expressed in the epidermis of barley that is the only tissue attacked by *Bgh*. We analyzed tissue-specific expression of *RacB* in peeled abaxial epidermal strips and the residual part of primary leaves. Susceptible barley cultivars Pallas and resistant P10 were inoculated densely on the abaxial sides with *Bgh* race A6 by 24 h before sampling. As a positive control for epidermis-specific gene expression, an oxalate-oxidase like-protein gene (*OXLP*) was selected (Wei et al., 1998). Ubiquitin 1 (*Ubi*) was used as a marker for tissue-unspecific expression, and chloroplast-directed *BAS* (thioredoxin-dependent peroxide reductase) was selected as a marker for mesophyll expression. As shown in Figure 1, expression of *RacB* was stronger in peeled epidermal strips than in the rest of the leaves. Tissue specificity of *RacB* expression was similar to that of *OXLP* and different from that of *Ubi* and *BAS*.

We compared early expression of *RacB* in a highly resistant barley *mlo* line BCIngrid-*mlo5*, the respective susceptible near-isogenic parent Ingrid, and a susceptible mutant A89 (*mlo5 ror1*) between 0 and 24 h after inoculation (HAI). In Ingrid, about 50% to 60% of fungal penetration attempts lead to haustoria

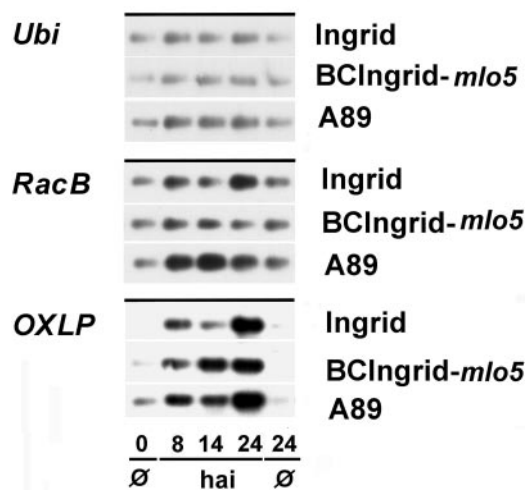


**Figure 1.** *RacB* is expressed in epidermal tissue. Reverse transcriptase (RT)-PCR with RNA from cv Pallas and cv BCPmla12 (P10) 24 HAI with *Bgh*A6. For extraction of total RNA, abaxial epidermal strips (E, inoculated site of the leaves) were separated from the mesophyll and adaxial epidermis (M). *Ubi* was selected as a marker for tissue-unspecific gene expression. *OXLP* was selected as a positive control for gene expression in the epidermal layer. *Bas* was selected as a positive control for gene expression in mesophyll cells. RT-PCR was carried out with 25 cycles under specific conditions. RT-PCR-products were denatured in gel, blotted, and detected by antisense RNA probes under stringent conditions.

formation between 12 and 24 HAI, whereas penetration rate in BCIngrid-*mlo5* was close to 0%. Cultivar A89, a *Mlo-Ror1* double-mutant line derived from BCIngrid-*mlo5*, is penetrated at 20% to 35% of the interaction sites by the *Bgh* isolate used (Hückelhoven et al., 2000b). *RacB* gene expression was slightly enhanced in response to *Bgh* inoculation as compared with *Ubi* expression that was taken as a constitutive marker. In the same RNA batch, the expression of *OXLP* as a positive control for *Bgh*-induced gene expression was enhanced from 8 HAI onward. At 14 HAI, when the first immature haustoria can be found in epidermal cells, *OXLP* expression was somewhat stronger in cv A89 and resistant BCIngrid-*mlo5* than in Ingrid (Fig. 2).

#### Sequence-Specific RNA Interference (RNAi) by *RacB*-double-stranded (ds) RNA Enhances Penetration Resistance

We addressed the question of whether *RACB* is involved in cellular accessibility or maintenance of basal resistance of barley to powdery mildew fungus. Host cell wall penetration and haustorium formation are the key steps in establishing host-pathogen compatibility. However, even susceptible barley cultivars such as Pallas or Ingrid prevent penetration at up to 50% of interaction sites, indicating a significant level of basal resistance. We used sequence-specific RNAi to induce gene silencing of *RacB*. RNAi produces phenotypes in plants that are very similar to those of



**Figure 2.** *RacB* expression in resistant and susceptible barley lines. RNA was isolated from cv Ingrid (*Mlo*, *Ror1*, susceptible), cv BCIngrid-*mlo5* (*mlo5*, *Ror1*, resistant), and cv A89 (*mlo5*, *ror1*, moderately susceptible) immediately before (0 Ø) inoculation at 8, 14, and 24 HAI with *Bgh* and 24 HAI from noninoculated control plants (24 Ø). *Ubi* was selected as a marker for constitutive gene expression. *OXLP* was selected as a positive control for *Bgh*-induced gene expression in the epidermal layer. RT-PCRs were carried out with 20 to 25 cycles under specific conditions. PCR products were denatured in gel, blotted, and detected by antisense RNA probes under stringent conditions.

**Table I.** Effect of *RacB*-dsRNA on transient expression of a *RACB*:GFP fusion protein

No. of Green Fluorescing Cells per Leaf <sup>a</sup>	
Control-dsRNA	11.3 ± 2.0
<i>RacB</i> -dsRNA	2.9 ± 1.8

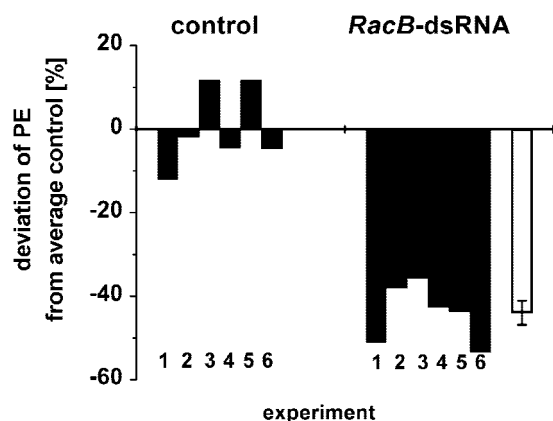
<sup>a</sup> Mean ± SE of four independent experiments.

knockout mutants (Waterhouse et al., 1998). It recently was shown that RNAi also functions transiently in barley if dsRNA is delivered into epidermal cells by biolistic bombardment (Schweizer et al., 2000). To test the efficiency of RNAi in induction of post-transcriptional gene silencing of *RACB*, we bombarded barley epidermal cells with *p*-green fluorescent protein (GFP):*RACB* that had been constructed for expression of a GFP:*RACB* fusion protein under control of the cauliflower mosaic virus 35 S promoter, together with *RacB*-dsRNA or heterologous control dsRNA (human thyroid hormone receptor dsRNA, *TR*), respectively. In four independent experiments, sequence-specific silencing of GFP:*RACB* led to a significant reduction of green fluorescing cells by 75% (Table I). This shows that dsRNA of *RacB* is suitable for inducing silencing of *RACB* in bombarded cells.

To elucidate the role of small GTP-binding proteins in basal resistance or cellular accessibility, we bombarded Pallas leaf segments with *RacB*-dsRNA together with a GFP expression vector (pGFP; Schweizer et al., 1999). Leaves were subsequently inoculated with *Bgh*, and the outcome of the interaction was evaluated 48 h later by *in vivo* light and fluorescence microscopy (Nielsen et al., 1999). Penetration into GFP-expressing cells was confirmed by detection of haustoria in living cells and by judgment of fungal development on these cells by fluorescence and light microscopy (see "Materials and Methods").

In each of six independent experiments, bombardment of cv Pallas with *RacB*-dsRNA led to a reduced number of cells that were successfully invaded by *Bgh* as compared with leaf segments bombarded with heterologous *TR*-dsRNA. The resistance-inducing effect of *RacB*-dsRNA resulted in an average reduction of penetration efficiency (PE) of *Bgh* by 44% (Fig. 3).

Broad prehaustorial resistance in barley against *Bgh* is controlled negatively by the wild-type MLO protein. Barley *mlo5* genotypes without a functional MLO protein are race nonspecifically resistant to penetration by *Bgh*A6, we speculated that *RacB* and *Mlo* might be functionally linked. To test this hypothesis, we selected a *mlo5* genotype (cv A89, *mlo5 ror1*, background Ingrid) that is moderately susceptible to *Bgh* due to the mutation in *Ror1* (Freialdenhoven et al., 1996). In this double-mutant genotype, we tested the impact of *RacB*-dsRNA in



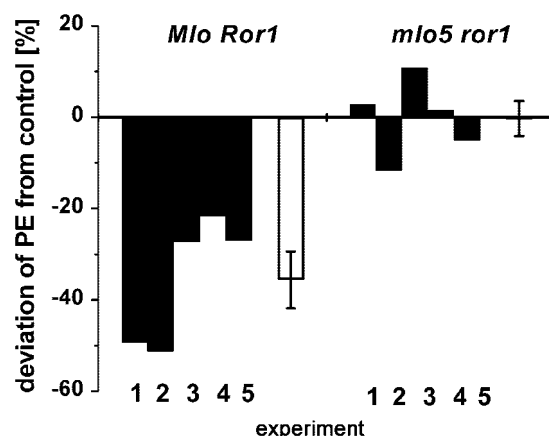
**Figure 3.** *RacB*-dsRNA interferes with the PE of *Bgh* in barley. Relative PE was evaluated in six independent experiments with *Bgh* on barley cv Pallas. PE of *Bgh* was reduced in cells that were bombarded with *RacB*-dsRNA compared with cells that were bombarded with control dsRNA (*TR*, human thyroid receptor-dsRNA). Negative and positive deviation of PE indicate reduced or enhanced PE, respectively, compared with average penetration frequency in six control experiments (adjusted to zero). Black columns, Relative PE at minimum 100 interaction sites in an independent experiment. White column, Average of the independent experiments with *RacB*-dsRNA. Error bar shows SE (relative PE of control and *RacB*-dsRNA are significantly different at  $P = 0.000001$  level, Student's *t* test).

comparison with wild-type *Mlo* genotypes. In five independent experiments, *RacB*-dsRNA did not prevent haustoria establishment in cv A89, whereas in the same experiments, PE was reduced by *RacB*-dsRNA in cv Pallas and cv Ingrid (*Mlo Ror1* genotypes; Fig. 4). Thus, resistance induced by *RacB*-dsRNA such as *mlo*-mediated resistance does not work in cv A89. It is remarkable that the *RacB*-dsRNA effect was stronger in cv Pallas than in cv Ingrid (Fig. 4, experiments 1 and 2 or 3–5, respectively). Absolute PEs are shown in Table II.

To rule out the possibility that *RacB*-dsRNA influences the transformation rate or the survival rate of attacked cells, we compared the number of GFP-expressing cells on control and *RacB*-dsRNA bombarded leaves (Table III). Microscopic evaluation showed that *RacB*-dsRNA did not influence the number of total or attacked GFP-expressing cells in any genotypes used. This demonstrates that RNAi by *RacB*-dsRNA strongly affects processes linked to successful establishment of the fungus but not cell death of host cells.

## DISCUSSION

We have shown that *RacB*-dsRNA specifically interferes in barley epidermal cells with haustorium establishment by the plant parasitic, biotrophic powdery mildew fungus. Delivery of *RacB*-dsRNA into epidermal cells induced resistance with a similar efficiency as *Mlo*-dsRNA (Schweizer et al., 2000). Therefore, our results tag an RAC small GTP-binding



**Figure 4.** The influence of *RacB*-dsRNA on the PE of *Bgh* is dependent on the barley genotype. Relative PE was evaluated in five independent experiments with *Bgh* on barley lines Pallas, Ingrid, or A89. The PE of *Bgh* is reduced in cv Pallas (*Mlo Ror1*, experiments 1 and 2) or cv Ingrid (*Mlo Ror1*, experiments 3–5) cells that were bombarded with *RacB*-dsRNA compared with cells bombarded with control dsRNA (not shown). Penetration of susceptible double-mutant A89 (*mlo5 ror1*, experiments 1–5) was not affected by *RacB*-dsRNA. Black columns, Relative PE in an independent experiment. White columns, Average of five independent experiments with *RacB*-dsRNA. Error bars show SEs (influence of *RacB*-dsRNA on PE in *Mlo Ror1* and *mlo5 ror1* genotypes, respectively, is significantly different at  $P < 0.002$ , Student's *t* test).

protein as a host element that is required for successful invasion by *Bgh*.

Several lines of evidence could exclude nonspecific effects of *RacB*-dsRNA. First, in all experiments, the effect of *RacB*-dsRNA was compared with that of nonspecific *TR*-dsRNA, which has no plant homologs. An effect of *TR*-dsRNA was excluded in several experiments (data not shown). Second, the effect of *RacB*-dsRNA was genotype specific (Fig. 4). Third, *RacB*-dsRNA did not influence the number of nonattacked or attacked GFP-expressing cells (Table III). Fourth, when we bombarded barley with pGFP:RACB for expression of a GFP:RACB fusion protein together with *RacB*-dsRNA, the number of cells showing GFP fluorescence was reduced by 75% compared with experiments with heterologous *TR*-dsRNA. This shows that *RacB*-dsRNA induced gene silencing of the *RacB:GFP*-transgene. Thus, the biological effects of *RacB*-dsRNA are most likely a result

**Table II.** Penetration frequencies of *Bgh* on barley leaves bombarded with dsRNA

Line	Penetration Frequency <sup>a</sup>	
	Control-dsRNA	<i>RacB</i> -dsRNA
	%	
Pallas ( <i>Mlo Ror1</i> )	57.0 ± 2.3	31.8 ± 1.6
Ingrid ( <i>Mlo Ror1</i> )	53.8 ± 6.5	39.0 ± 4.0
A89 ( <i>mlo5 ror1</i> )	27.4 ± 0.6	27.5 ± 1.6

<sup>a</sup> No. of penetrated cells divided by no. of attacked cells multiplied by 100 (mean ± SE).

**Table III.** Transformation rates on barley leaves bombarded with dsRNA

Line	No. of GFP-Expressing Cells per Shot <sup>a,b</sup>				n <sup>c</sup>
	Control-dsRNA		RacB-dsRNA		
	Total	Attacked	Total	Attacked	
Pallas ( <i>Mlo Ror1</i> )	34.3 ± 4.6	16.0 ± 2.2	33.9 ± 4.8	15.5 ± 1.4	6 (21)
Ingrid ( <i>Mlo Ror1</i> )	51.0 ± 8.9	27.6 ± 8.7	49.9 ± 5.6	31.5 ± 7.8	3 (11)
A89 ( <i>mlo5 ror1</i> )	34.4 ± 5.4	18.1 ± 4.0	34.1 ± 5.5	16.7 ± 3.8	5 (22)

<sup>a</sup> Four leaves were bombarded per shot. <sup>b</sup> Mean ± SE. <sup>c</sup> No. of independent experiments (shots in *n* experiments each for control and RacB-dsRNA).

of post-transcriptional gene silencing of endogenous *RacB*. In barley, high sequence identities of dsRNA and target genes are necessary for RNAi (Schweizer et al., 2000). However, because *RacB* is probably very similar to other barley *Rac* genes, we cannot exclude that we might have affected the expression of RAC proteins other than RACB by *RacB*-dsRNA.

The resistance inducing effect of *RacB*-dsRNA effect was somewhat stronger in cv Pallas than in cv Ingrid. Because RACB apparently plays a negative role in broad resistance to *Bgh*, different levels of broad resistance in cv Pallas and cv Ingrid might influence RACB activity. In the barley double-mutant A89 (*mlo5-ror1*), *RacB*-dsRNA did not interfere with resistance. Therefore, it appears that the function of a RAC protein is linked to elements of the MLO/ROR network. Because MLO and ROR1 are involved in broad resistance against *Bgh*, this finding suggests that *RacB*-dsRNA interferes with race-unspecific penetration resistance of barley against *Bgh*, and that the same processes underlying *mlo*-mediated resistance limit this effect. Because RACB and MLO are required for fungal entry in barley epidermal cells, we speculate that they might be linked functionally. It is interesting that functional RACB and functional MLO play negative roles in resistance to *Bgh*, whereas losses of RAC1 or MLO function lead to hypersusceptibility to the fungal parasite *M. grisea* (Jarosch et al., 1999; Ono et al., 2001). Thus, MLO and RAC G-proteins are signal transduction elements that play ambivalent roles in resistance to biotrophic *Bgh* and hemibiotrophic *M. grisea*.

The mechanism by which RAC interferes with penetration resistance needs to be elucidated. One possibility might be that RAC interacts with the cytoskeleton. In mammals, RAC activation is triggered by bacterial pathogens that invade nonphagocytic cells and in phagocytes during phagocytosis. Thereby, RAC is involved in actin reorganization processes during plasma membrane ruffling or bacterial engulfment (Knodler et al., 2001). Both processes appear to resemble the process of plasma membrane invagination during establishment of a fungal haustorium in a plant cell. If barley RAC is needed for plasma membrane invagination, loss of RAC function should lead to inhibition of haustorium formation, as shown here. We speculate that the *Bgh* triggers a RAC small GTP-binding protein and that this

process depends on MLO allowing plasma membrane invagination as a prerequisite for establishment of compatibility. Also, active RAC could be involved in cytoskeleton organization processes that antagonize formation of cell wall appositions. Cytoskeleton reorganization appears to be required for penetration resistance of barley coleoptiles to non-host pathogens such as *Erysiphe pisi* (Kobayashi et al., 1997).

RAC proteins are involved in activation of the O<sub>2</sub><sup>-</sup>-generating NADPH oxidase complex (Bokoch, 1995; Hassanain et al., 2000). In previous studies, we have shown that enhanced O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation in barley cells attacked by *Bgh* temporally and spatially coincided with successful penetration and haustorium formation, but not with processes resulting in penetration resistance. Resistant *mlo5* genotypes did not produce O<sub>2</sub><sup>-</sup> during the period of attempted penetration (Hückelhoven and Kogel, 1998; Kogel and Hückelhoven, 1999). Thus, it is tempting to speculate that barley RACB functions via activation of NADPH oxidase and that O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation influences penetration resistance to *Bgh* negatively. In contrast to O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulates at sites of formation of cell wall appositions in which *Bgh* sticks (Thordal-Christensen et al., 1997; Hückelhoven et al., 1999, 2000b). Thus, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is strictly associated with barley defense reactions. Together, the balance of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> might be crucial for accessibility of epidermal cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Materials, Pathogen, and Inoculation

The barley (*Hordeum vulgare*) lines Ingrid, Pallas, and the backcross line BCIngrid-*mlo5* were obtained from Lisa Munk (Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen). Their generation was described previously (Kølster et al., 1986). The mutant A89 was obtained from Paul Schulze-Lefert (Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Köln, Germany). Plants were grown in a growth chamber at 18°C with 60% relative humidity and a photoperiod of 16 h (60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> photon flux density). The barley powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal, race A6 (Wiberg, 1974) was inoculated onto barley primary leaves to give a density of 50 conidia mm<sup>-2</sup>. *Bgh* was maintained on barley cv Siri under the same conditions.

Isolation of epidermal tissue for expression analysis was performed by scribing adaxial sides of leaf tips with a scalpel without harming the abaxial epidermis. Leaf tips were folded back and taken as a handle to peel off epidermal strips that were cut off the leaf tips and frozen in liquid nitrogen immediately.

### Isolation of Barley *RacB*, Cloning, Sequencing, and Probe Generation

We isolated cDNA fragments by the use of one-step RT-PCR kits (Invitrogen, Carlsbad, CA or Qiagen, Hilden, Germany). A complex RNA pool out of barley seedlings was used as a template. RNA was isolated from cv Pallas at 3, 5, and 7 d after germination. In addition, RNA was isolated from cv Pallas and backcross lines bearing *mlo5*, *Mlg*, or *Mla12* at 1, 2, and 5 d after inoculation with *BghA6* at the 7th d after germination. All isolated RNAs were diluted to a concentration of 1  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  and they were pooled. Primers were designed using GenBank or expressed sequence tag database information for specific barley sequences or rice (*Oryza sativa*) sequences. To amplify a putative barley *RacB* cDNA, we designed primers from rice and barley sequences. Primers 5'-GGATC-CGATGAGCGCGTCCAGGTT-3' (from GenBank accession no. AF250327) and 5'-GTCGACCTTCGCCCTTGT-TCTTTGTC-3' (from GenBank accession no. BF260616) were suitable to generate a 642-bp RT-PCR product including 618-bp barley-specific sequence (GenBank accession no. AJ344223). We isolated cDNAs from gels and cloned them into pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim, Germany). cDNAs were sequenced from plasmids by use of the Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) and were analyzed for similarities in the GenBank database using the BLAST algorithm (Altschul et al., 1997). Because the 5' end of the isolated complete *RacB* open reading frame contained primer-derived sequences, we carried out RACE. First-strand cDNA synthesis and RACE were carried out as suggested by the manufacturer (GeneRacer; Invitrogen, Karlsruhe, Germany). First strand cDNA synthesis started from mRNA that was isolated from total RNA using the Dynabeads mRNA Purification kit (Dyna, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Hot-start touch-down RACE-PCR included the GeneRacer 5' primer and the *RacB*-specific primer 5'-GGA-TCCGATGAGCGCGTCCAGGTT-3'. Touch-down PCR was carried out with initial denaturation (5 min at 94°C), five cycles at a 70°C annealing temperature, five cycles at 68°C, and 28 cycles at 66°C. Each annealing was followed by a 1-min primer extension at 72°C and a 30-s denaturation at 94°C. The final extension time at 72°C was 10 min. The resulting RACE product of approximately 400 bp was reamplified with the gene-specific primer and the 5' GeneRacer nested primer, and was then isolated, cloned, and sequenced as already described.

For probe generation, plasmids were amplified in *Escherichia coli*, isolated, and used for in vitro transcription using T7 or SP6 RNA polymerases and digoxigenin- or fluorescein-labeled nucleotides (DIG-Luminescence Detec-

tion kit; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

### RNA Extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from eight to 10 primary leaf segments (5 cm long) or from 20 epidermal strips (mentioned before) using RNA extraction buffer (Applied Gene-technology Systems, Heidelberg) according to the manufacturer's instructions. RNA contents of the extracts were measured by UV photometry and were adjusted after checking in ethidium bromide-stained gels taking rRNA bands as a measure.

The OneStep RT-PCR kit (Qiagen) was used for semi-quantitative RT-PCR following the manufacturer's instructions. To estimate template amounts, the RT-PCR reaction was stopped during the exponential phase of amplification, maintaining initial differences in target transcript amounts. PCR products were separated in agarose gels, denatured, blotted on nylon membranes, and detected with specific nonradioactively labeled RNA probes according to the DIG System user's guide (Roche Molecular Biochemicals). Prior to immunodetection of DNA-RNA hybrids, blots were washed stringently two times for 20 min in 0.1% (w/v) SDS and 0.1× SSC (15 mM sodium chloride and 1.5 mM sodium citrate, pH 7.0) at 68°C.

The primers were: 5'-GTTCATCAAGTGCCTCACCGTG-3' (5' primer) and 5'-TTAGCTTCCTCAGTTCTTC-CCTG-3' (3' primer) for a 387-bp *RacB* cDNA fragment; 5'-CGCGCCGAGCCGAGTACGAC-3' (5' primer) and 5'-GTCACAAAAACA-CATGTAACC-3' (3' primer) for a 674-bp barley *BAS* cDNA fragment (GenBank accession no. Z34917); 5'-GGC-CGACATGCATTACCAG-3' (5' primer) and 5'-CATCT-GATATTGCTGGGTCTG-3' (3' primer) for a 506-bp *OxLP* cDNA fragment (GenBank accession no. X93171); and 5'-CCAAGATGCAGATCTTCGTGA-3' (5' primer) and 5'-TTCGCGATAGGTAAGAGCA-3' (3' primer) for a 513-bp *Ubi* cDNA fragment (GenBank accession no. M60175).

### Construction of pGFP:RACB

For expression of a GFP:RACB fusion protein, cDNAs of *GFP* (GFPemd-b in pGFP; Schweizer et al., 1999) and *RacB* were amplified from plasmids by PCR using primers with attached restriction sites. PCR products were cloned into pGEM-T, amplified in *E. coli*, digested using primer-specific restriction enzymes, isolated from gels, and cloned one after another in pGY1 (Schweizer et al., 1999). Primers were designed in a way that allowed cloning of *GFP* upstream of the *RacB* 5' end under elimination of the *GFP* stop codon. The primers used were 5'-GGATCCATGGTGAG-CAAGGGCGAG-3' and 5'-GGATCCTTGTACAGTCCGTCCAT-3' for *GFP* and the *RacB* primers already mentioned. Orientation of the inserts was checked by PCR.

### Transient Transformation, RNAi, and Evaluation of Fungal Development

A transient transformation protocol originally developed for wheat (*Triticum aestivum*) to assess gene function

in the interaction with powdery mildew was used to induce RNAi via biolistic delivery of dsRNA into epidermal cells of barley leaf segments as described by Schweizer et al. (1999) and Schweizer et al. (2000; compare also Nielsen et al., 1999). For the transient transformation assay, plants were grown in a growth chamber at 24°C (20°C in the dark) with 60% relative humidity and a photoperiod of 16 h (240  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photon flux density). In principle, 312  $\mu\text{g}$  of 1.1- $\mu\text{m}$  tungsten particles was coated with dsRNA (2  $\mu\text{g}$ ) together with pGFP (1  $\mu\text{g}$ ; GFP under control of cauliflower mosaic virus 35S promoter) as a transformation marker for each shot. ds*RacB* RNA was obtained by annealing of sense and antisense RNA synthesized in vitro (Schweizer et al., 2000). Leaf segments were bombarded with coated particles 4 h before inoculation with *Bgh*, race A6. Inoculation with 100 conidia  $\text{mm}^{-2}$  led to an attack rate of approximately 50% on transformed cells. Interaction outcome was judged subsequently by fluorescence and light microscopy. For each individual experiment, at least 100 interaction sites were evaluated. Transformed GFP-expressing cells were identified under blue light excitation. Three different categories of transformed cells were distinguished: (a) penetrated cells, which contained an easily visible haustorium; (b) cells that were attacked by a fungal appressorium but did not contain a haustorium; (c) and cells that did not contain a haustorium and were not attacked by *Bgh*. Cells that contained more than one haustorium were scored as one penetrated cell independent of the number of fungal penetration attempts. Cells with multiple attacks from *Bgh* without a haustorium were scored as one nonpenetrated cell. Stomata cells and stomata guard cells were excluded from the evaluation. Surface structures of *Bgh* were detected by light microscopy or by fluorescence staining of the fungus with 0.1% calcofluor (w/v in water) for 30 s.

Deviation of PE referring to average control PE was used as a measure for susceptibility of cells that were bombarded with *RacB*-dsRNA compared with those bombarded with control *TR*-dsRNA (human thyroid receptor-dsRNA; Fig. 3). In five independent experiments, *TR*-dsRNA did not change the PE of *Bgh* compared with water. Deviation of PE was calculated for each experiment as the number of penetrated cells divided by the total number of attacked cells (PE) minus average PE in the controls divided by average PE of the controls multiplied by 100.

Deviation of PE referring to individual control PE was used to compare the impact of RNAi in different genotypes (Fig. 4). Therefore, PE in each experiment with *RacB*-dsRNA was divided by PE of individual controls, normalized by subtraction of one and multiplication by 100.

Upon request, all novel materials described in this publication will be made available in a timely manner for noncommercial research purposes, subject to the requisite permission from any third-party owner of all or parts of the material. Obtaining any permission will be the responsibility of the requestor. No restrictions or conditions will be placed on the use of any novel materials described in this paper that would limit their use in noncommercial research purposes.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Patrick Schweizer (Institut für Pflanzen-genetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany) for being a great teacher in the transient transformation assay and for providing pGFP. We also thank Dr. Gregor Langen (Justus-Liebig-University, Giessen, Germany) for providing cDNA for RACE.

Received August 31, 2001; returned for revision November 19, 2001; accepted January 4, 2002.

## LITERATURE CITED

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402
- Bokoch GM (1995) Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol* **5**: 109–113
- Burstein ES, Hesterberg DJ, Gutkind JS, Brann MR, Currier EA, Messier TL (1998) The ras-related GTPase rac1 regulates a proliferative pathway selectively utilized by G-protein coupled receptors. *Oncogene* **17**: 1617–1623
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J et al. (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**: 695–705
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I, Wallin E, Panstruga R, von Heijne G, Schulze-Lefert P (1999) Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the *Mlo* family in plants. *J Biol Chem* **274**: 34993–35004
- Freialdenhoven A, Peterhänsel C, Kurth J, Kreuzaler F, Schulze-Lefert P (1996) Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* **8**: 5–14
- Hassanain HH, Sharma YK, Moldovan L, Khramtsov V, Berliner LJ, Duvick JP, Goldschmidt-Clermont PJ (2000) Plant rac proteins induce superoxide production in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **272**: 783–788
- Hückelhoven R, Dechert C, Trujillo M, Kogel K-H (2001) Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines inoculated with the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol* **47**: 739–748
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K-H (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol* **119**: 1251–1260
- Hückelhoven R, Fodor J, Trujillo M, Kogel K-H (2000a) 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
- Hückelhoven R, Kogel K-H (1998) Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and sus-

- ceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 292–300
- Hückelhoven R, Trujillo M, Kogel KH** (2000b) Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol* **1**: 287–292
- Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ** (1998) Ras, superoxide and signal transduction. *Biochem Pharmacol* **55**: 1339–1346
- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearch ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ** (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**: 1649–1652
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**: 1853–1856
- Jarosch B, Kogel K-H, Schaffrath U** (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*. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 508–514
- Jørgensen JH** (1994) Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 97–119
- Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K** (1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10922–10926
- Knodler LA, Celli J, Finlay BB** (2001) Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 578–588
- Kobayashi Y, Kobayashi I, Funaki Y, Fujimoto S, Takemoto T, Kunoh H** (1997) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J* **11**: 525–537
- Kogel K-H, Hückelhoven R** (1999) Superoxide generation in chemically activated resistance of barley in response to powdery mildew inoculation. *J Phytopathol* **147**: 1–4
- Kølster P, Munk L, Stølen O, Løhde J** (1986) Near-isogenic barley lines with genes for resistance to powdery mildew. *Crop Sci* **26**: 903–907
- Kumar J, Hückelhoven R, Beckhove U, Nagarajan S, Kogel K-H** (2001) A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* **91**: 127–133
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583–593
- Naor Z, Benard O, Seger R** (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* **11**: 91–99
- Nielsen K, Olsen O, Oliver R** (1999) A transient expression system to assay putative antifungal genes on powdery mildew infected barley leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* **54**: 1–12
- Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K** (2001) Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 759–764
- Peterhänsel C, Freialdenhoven A, Kurth J, Kolsch R, Schulze-Lefert P** (1997) Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell* **9**: 1397–1409
- Schulze-Lefert P, Vogel J** (2000) Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci* **5**: 343–348
- Schweizer P, Pokorny J, Abderhalden O, Dudler R** (1999) A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 647–654
- Schweizer P, Pokorny J, Schulze-Lefert P, Dudler R** (2000) Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J* **24**: 895–903
- Stolzenburg MC, Aist JR, Israel HW** (1984) The role of papillae in resistance to powdery mildew conditioned by the *ml-o* gene in barley: correlative evidence. *Physiol Plant Pathol* **25**: 337–346
- Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, Chamberlain CE, Chuang TH, Chu K, Bokoch GM, Hahn KM** (2000) Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *Biol Chem* **275**: 9725–9733
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4158–4163
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB** (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* **11**: 1187–1194
- Valster AH, Hepler PK, Chernoff J** (2000) Plant GTPases: the Rhos in bloom. *Trends Cell Biol* **10**: 141–146
- von Röpenack E, Parr A, Schulze-Lefert P** (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J Biol Chem* **273**: 9013–9022
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB** (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13959–13964
- Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H** (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defense response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol* **36**: 101–112
- Wiberg A** (1974) Genetical studies of spontaneous sources of resistance to powdery mildew in barley. *Hereditas* **77**: 89–148
- Zeyen RJ, Ahlstrand GG, Carver TLW** (1993) X-ray microanalysis of frozen-hydrated, freeze-dried, and critical point dried leaf specimens: determination of soluble and insoluble chemical elements at *Erysiphe graminis* epidermal cell papilla sites in barley isolines containing *Ml-o* and *ml-o* alleles. *Can J Bot* **71**: 284–296

# Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus

Holger Schultheiss, Cornelia Dechert, Karl-Heinz Kogel and Ralph Hückelhoven\*

Institute of Phytopathology and Applied Zoology, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

Received 20 June 2003; revised 15 August 2003; accepted 20 August 2003.

\*For correspondence (fax +49 641 9937499; e-mail Ralph.Hueckelhoven@agr.uni-giessen.de).

---

## Summary

Small monomeric G-proteins of the plant ras (rat sarcoma oncogene product) related C3 botulinum toxin substrate (RAC)/Rho of plants (ROP) family are molecular switches in signal transduction of many cellular processes. RAC/ROPs regulate hormone effects, subcellular gradients of  $Ca^{2+}$ , the organisation of the actin cytoskeleton and the production of reactive oxygen intermediates. Therefore, we followed a genetic bottom-up strategy to study the role of these proteins during the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the fungal biotrophic pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*). We identified six barley RAC/ROP proteins and studied their gene expression. Five out of six *Rac/Rop* genes were expressed constitutively in the leaf epidermis, which is the site of interaction with *Bgh*. None of the genes showed enhancement of mRNA abundance after inoculation with *Bgh*. After microprojectile mediated transformation of single barley epidermal cells with constitutively activated mutant RAC/ROP proteins, we found an RAC/ROP-specific enhancement of pathogen accessibility, tagging HvRACB, HvRAC3 and HvROP6 as host proteins potentially involved in the establishment of susceptibility to *Bgh*. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) of green fluorescent protein (GFP):HvRAC/ROP-transformed cells revealed varying strengths of plasma membrane association of barley RAC/ROPs. The C-terminal CAAX motif for presumable prenylation or the C-terminal hypervariable region (HVR), respectively, were required for membrane association of the RAC/ROPs. Proper intracellular localisation was essential for HvRACB and HvRAC3 function. Together, our data support the view that different paths of host signal transduction via RAC/ROP G-proteins are involved in processes supporting parasitic entry into epidermal host cells.

**Keywords:** MLO, penetration resistance, powdery mildew, small RAC/ROP G-protein, susceptibility.

---

## Introduction

In mammals, the Rho family of small monomeric GTPases contains RAC, cell division cycle protein 42 (CDC42) and ras homologue (RHO) proteins. In plants, however, only one subgroup, slightly more similar to the Rac than to the Rho family subgroup, exists and was designated Rac or Rho of plants (Rop; Hall, 1998; Valster *et al.*, 2000; Winge *et al.*, 1997; Zheng and Yang, 2000). All members of the Rho-family, including the plant-specific Rac/Rop subfamily share a similar five-loop domain architecture. These domains are responsible for binding of guanine nucleotides (GTP or GDP), hydrolysis of GTP to GDP (GTPase activity), binding of regulatory proteins, binding of downstream targets and subcellular localisation (Paduch *et al.*, 2001). The most variable part of the RAC/ROP proteins is the C-terminal hypervariable region (HVR), which regulates intracellular targeting and localisation. Small GTPases such

as the RAC/ROPs are signal transduction proteins acting as molecular switches in a multitude of cellular processes. In response to extracellular signals, regulatory proteins (in mammals: guanine nucleotide exchange factors) support binding of GTP by the RAC/ROP protein, activating the G-protein, which then binds and activates downstream effectors. By hydrolysing GTP to GDP and Pi conformational changes are reverted and the protein becomes inactive again. The activity status of plant RAC/ROP proteins is adjusted most likely by receptor-like kinases, GTPase activating proteins and guanine nucleotide dissociation inhibitors (Baxter-Burrell *et al.*, 2002; Vernoud *et al.*, 2003). RAC/ROPs associate with the plasma membrane (PM) mediated by either prenylation or palmitoylation of cysteine residues in the C-terminal HVR (Ivanchenko *et al.*, 2000; Lavy *et al.*, 2002).

RAC/ROPs are involved in actin cytoskeleton remodeling, secondary wall formation, establishing of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  gradients, regulation of polar cell growth, production of reactive oxygen intermediates (ROIs) and the modulation of hormone signalling and gene expression (Valster *et al.*, 2000; Yang, 2002). All of these processes are expected to be linked to signal transduction and physiological changes during plant–microbe interactions. Cell polarity is of special importance during early interaction of plant cells and fungal or oomycete pathogens (reviewed by Schmelzer, 2002). As many parasitic fungi invade cells by highly localised secretion of cell-wall-degrading enzymes along with osmotic pressure, forcing fungal infection structures into host cells, the attacked host needs to focus its defence to the site of attempted penetration. Thereby, the plant cytoskeleton is rearranged to direct actin filaments and microtubules to the site of attack. This leads further cytoplasmic aggregation and migration of the nucleus. These types of subcellular processes are assumed to be important for early defence and penetration resistance (Kobayashi *et al.*, 1997; Schmelzer, 2002). Inhibition of cytoskeleton rearrangement leads to facilitated parasitic access to plant cells. Despite this, invagination of the plant PM by biotrophic fungi and establishment of compatibility require membrane traffic and reorganisation of host cell architecture, processes that also dependent on rearrangement of the cytoskeleton. The function of RAC/ROPs has been linked to rearrangement of both the cytoskeleton and subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  gradients during polar pollen tube and root hair growth (e.g. Camacho and Malho, 2003; Gu *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2002; Molendijk *et al.*, 2001). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , like the cytoskeleton, plays roles in both cellular accessibility and defence to fungal pathogens (Blume *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Xu and Heath, 1998). In barley, the defence and cell death regulator membrane protein MLO interacts  $\text{Ca}^{2+}$ -dependently with calmodulin to completely fulfil its role in barley susceptibility to *Bgh* (Kim *et al.*, 2002).

Another role for RAC/ROP proteins is the regulation of ROI production. In mammals, RAC proteins are required for assembly of the NADPH oxidase complex that generates superoxide radical anions ( $\text{O}_2^-$ ) as signal or antimicrobial agent (Bokoch and Diebold, 2002). The role of RAC in NADPH oxidase assembly is the interaction with cytoplasmic subunits and/or direct interaction with the membrane protein GP91PHOX supporting electron flow (Bokoch and Diebold, 2002). Although the cytoplasmic subunits P47PHOX and P67PHOX do not exist in plants, constitutively activated (CA) maize RAC/ROP mutant proteins are able to induce ROI production in mammalian cell cultures (Hassanain *et al.*, 2000) and human CA RAC1 enhances ROI production in soybean cell suspensions in response to defence elicitors (Park *et al.*, 2000). Moreover, the involvement of RAC/ROP proteins in ROI production in plants is also given by the fact that overexpression of CA OsRAC1

leads to an enhanced hydrogen peroxide generation (Kawasaki *et al.*, 1999), hypersensitive cell death in response to virulent races of *Magnaporthe grisea* and enhanced resistance in rice (Ono *et al.*, 2001).

All these indications argue for an important participation of RAC/ROP proteins in regulation of plants defence against various pathogens. Indeed, importance of RAC/ROPs in defence mechanisms could be shown in at least three pathosystems. First, in the rice–rice blast fungus system (Ono *et al.*, 2001); second, in the rice–rice bacterial leaf blight system (Ono *et al.*, 2001); and third, in the interaction of barley with the barley powdery mildew fungus (Schultheiss *et al.*, 2002).

The barley powdery mildew fungus *Bgh* is an obligate biotrophic pathogen that attacks epidermal cells of barley (*Hordeum vulgare* L.). The crucial step of fungal invasion is the penetration of the cell wall followed by the establishment of a haustorium that does not destroy PM integrity. During penetration, superoxide radical anions ( $\text{O}_2^-$ ) are produced around the site of successful penetration and haustorium establishment (Hückelhoven and Kogel, 1998).

Resistance to the powdery mildew fungus is mediated by major genes such as the *powdery mildew resistance genes*  $a_x$ ,  $Mla_x$ , or by loss of *powdery mildew resistance gene o* (MLO)-function in *Mlo*-mutant genotypes (e.g. *mlo5*-barley, Jorgensen, 1994). The latter is expressed exclusively via penetration resistance, which is accompanied by accumulation of hydrogen peroxide but not by detectable  $\text{O}_2^-$  generation (Hückelhoven and Kogel, 2003; Schulze-Lefert and Vogel, 2000). The wild-type MLO protein is a seven-transmembrane-protein reminiscent of G-protein-coupled receptors in animals and fungi (Devoto *et al.*, 1999). It could be excluded that MLO signalling in susceptibility to *Bgh* depends on heterotrimeric G-proteins (Kim *et al.*, 2002). However, HVRACB, a small monomeric G-protein of the RAC/ROP family, may be linked to the MLO-signalling pathway because the transient knock down by *HvRacB*-dsRNA interference strongly enhanced penetration resistance to *Bgh* in susceptible barley but not in lines bearing the required for *mlo*-specified resistance (*ror1-2* mutant allele (Schultheiss *et al.*, 2002), which was discovered as a suppressor allele of *mlo*-mediated penetration resistance (Freialdenhoven *et al.*, 1996). This puts HVRACB as an upstream antagonist of the hypothetical ROR1 protein that was not yet identified. Interestingly, recent studies revealed that overexpression of barley BAX (BCL-2 associated X protein; BCL-2: B-cell lymphoma protein-2) Inhibitor 1, a putative cell death inhibitor without sequence similarity to MLO, is able to suppress *mlo* penetration resistance (Hückelhoven *et al.*, 2003). This underscores a possible link of penetration resistance, RAC/ROPs and cell death regulation.

In this study, we report about the identification of six barley RAC/ROP proteins and show RAC/ROP-specific support of barley susceptibility to the barley powdery mildew

fungus. To further examine the role of the RAC/ROP proteins in plant defence, we determined their subcellular localisation and show a link of RAC/ROP function and proper localisation at the PM.

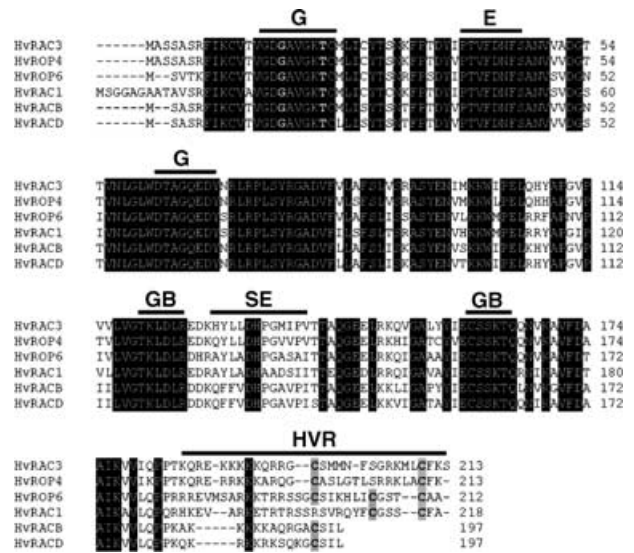
**Results**

*Isolation of barley Rac/Rop family cDNAs*

In a previous study, we showed that the knock down of the barley RAC/ROP family protein HvRACB by dsRNA interference led to enhanced resistance of barley to *Bgh*. To start a detailed examination of the RAC/ROP family proteins, we accomplished an expressed sequence tag (EST) database search starting with the sequence information of *HvRacB* (Hückelhoven *et al.*, 2001), and identified several ESTs that could be assembled to tentative mRNA sequences *in silico*. By using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE), we isolated the cDNAs of six different RAC/ROP homologous proteins (see Experimental procedures). Open-reading frames showed high aa sequence similarities between different barley RAC/ROPs of up to 90%. As a result of the lack of a common nomenclature for monocot RAC/ROPs, we named the six barley RAC/ROP proteins HvRAC1, HvRAC3, HvRACB, HvRACD, HvROP4 and HvROP6 according to the closest related homologue regardless of the species this protein originates from.

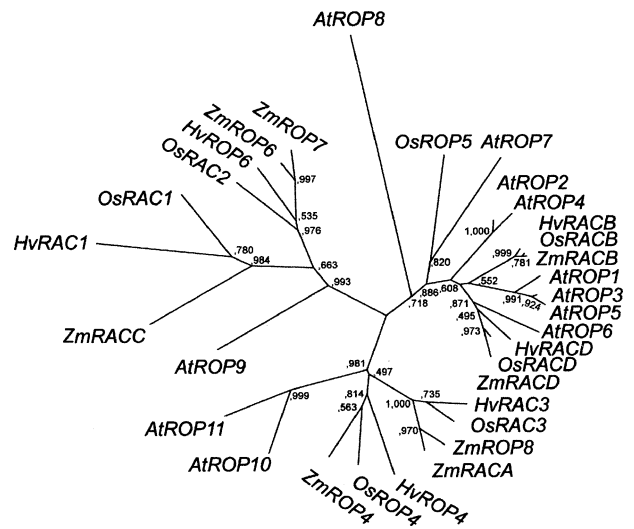
All barley-deduced RAC/ROPs amino acid sequences typically contain five domains for the presumed protein function (Figure 1). The GDP/GTP-binding domains and the GTPase domains are highly conserved among all six homologues. We could not observe any amino acid exchange within the core of these domains. Another completely conserved amino acid stretch belongs to the so-called effector-loop thought to be crucial for interactions with regulatory proteins (Valster *et al.*, 2000). Two domains do not show high similarities between all barley RAC/ROP family members. The first one is the special effector-loop (or insert-region) that is probably responsible for downstream signalling. The second one is the C-terminal HVR that contains signals targeting the RAC/ROP protein to specific membranes. HvRACB and HvRACD contain typical prenylation signals (CAAX-boxes, for cysteine–aliphatic a-aliphatic aa-X) at their C-terminus, whereas the HVRs of all other RAC/ROPs contain additional cysteine residues that might be palmitoylated (Ivanchenko *et al.*, 2000; Lavy *et al.*, 2002). The length of the C-terminal region also distinguishes the two type I RAC/ROPs, HvRACB and HvRACD, from the four type II RAC/ROPs, HvRAC1, HvRAC3, HvROP4 and HvROP6 (Figure 1).

An aa sequence comparison of the six barley RAC/ROPs with other cereal and *Arabidopsis* RAC/ROP proteins was used for a bootstrap analysis to construct an unrooted



**Figure 1.** Amino acid alignment of barley RAC/ROP proteins. Identical amino acids are boxed black, the potentially palmitoylated or prenylated C-terminal cysteines are shaded. Bars indicate conserved regions of RAC/ROP family proteins. The functional domains are: G, GTPase domain; E, effector loop; GB, GDP/GTP-binding domain; SE, special effector loop (insert region); and HVR, C-terminal hypervariable region. The glycine and threonine residues printed in bold (GTPase domain) were mutated to generate constitutively active or dominant negative mutants of the RAC/ROP proteins, respectively.

phylogenetic tree using the CLUSTALW program 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>, Figure 2). Although there is a relatively high similarity between the barley RAC/ROP proteins, the phylogenetic analysis divide them into

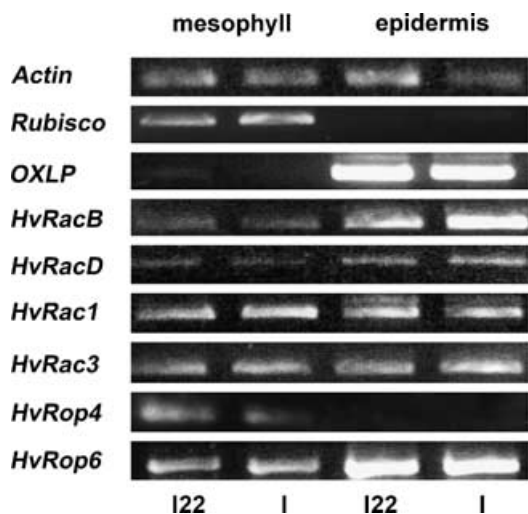


**Figure 2.** Unrooted phylogenetic tree of RAC/ROP proteins from barley, rice, maize and *Arabidopsis*. The tree was constructed after bootstrap analysis using CLUSTALW 1.83 (CLUSTALW: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). The sequence of the rice, maize and *Arabidopsis* RAC/ROP proteins were taken from GenBank. Abbreviations: At, *Arabidopsis thaliana*; Hv, *Hordeum vulgare*; Os, *Oryza sativa*; and Zm, *Zea mays*. AtROPs are named according to Yang (2002).

at least four subgroups, together with *Arabidopsis*, rice and maize RAC/ROPs. The type I RAC/ROPs, HvRACB and HvRACD of barley, rice and maize form a closely related subgroup together with six *Arabidopsis* ROPs. Figure 2 also demonstrates that the common ROP nomenclature suggested for *Arabidopsis* (Yang, 2002) is not applicable to cereal RAC/ROPs. Other cereal subgroups of RAC/ROPs contained: (i) RAC3, ROP8, RACA and ROP4; (ii) ROP6, ROP7 and RAC2; and (iii) RAC1 and RACC (Figure 2).

#### mRNA expression analysis of barley RAC/ROP proteins

We analysed the tissue-specific mRNA expression of barley RAC/ROP proteins during the interaction with *Bgh* by using RT-PCR. Total RNA was extracted from adaxial epidermal strips of first leaves from susceptible cv. Ingrid and the fully resistant backcross line Ingrid-*mlo5* by 24 h after inoculation (hai) with *Bgh*. All of the barley *Rac/Rops* were expressed in the mesophyll tissue (Figure 3). Five out of the six *Rac/Rops* were also expressed in the epidermal layer when compared to epidermis or mesophyll-expressed controls oxalate oxidase-like protein (*OxLp*) or ribulose biphosphate carboxylase (*Rubisco*), respectively. *HvRac1* and *HvRac3* showed no tissue-specific expression and were detectable in mesophyll and epidermis to equal amounts. *HvRop6*, *HvRacD* and *HvRacB* signals appeared to be stronger with RNA from the epidermal cell layers when com-



**Figure 3.** Expression profile of barley *Rac/Rops* during interaction with *B. graminis* f.sp. *hordei*.

Expression of the barley *Rac/Rop* genes in leaf epidermal and mesophyll tissue. Reverse transcriptase (RT)-PCR with RNA from cv. Ingrid (I) and Ingrid-*mlo5* (I22) at 24 hai with *BghA6*. For extraction of RNA, abaxial epidermal strips were separated from the mesophyll and adaxial epidermis (considered as mesophyll). *Actin* was selected as a marker for tissue unspecific gene expression. *Rubisco* was selected as positive control for gene expression in the mesophyll. *OxLp* (Wei *et al.*, 1998) was selected as positive control for gene expression in the epidermal cell layer. The expression of *HvRop4* was very weak so that we could detect a signal only after blotting of the RT-PCR product (inverted X-ray film shown).

pared to the remaining leaf. *HvRop4* transcripts were detected only in the mesophyll and only after blotting of the RT-PCR products (Figure 3).

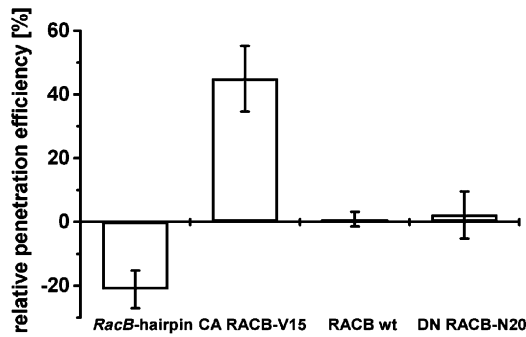
To assess the influence of a fungal attack on the *Rac/Rop* mRNA levels, we isolated RNA from barley first leaves at 8, 14 and 24 hai and carried out RT-PCRs. Transcript levels of all epidermis-expressed *Rac/Rops* were either not upregulated remarkably or were slightly downregulated during *Bgh* attack (data not shown).

#### Functional analysis of RAC/ROP proteins

To further examine the role of barley RAC/ROP proteins in the interaction with *Bgh*, we conducted transient knock down and overexpression assays. We bombarded susceptible barley with tungsten particles coated with a marker gene construct and an expression vector carrying the test gene under control of the cauliflower mosaic virus 35S (CaMV35S) promoter. After 24 h, we inoculated the leaves with *Bgh* and evaluated the outcome of the interaction 40 hai by bright field and fluorescence microscopy. Penetration efficiency in controls, transformed only with GFP and the empty vector, amounted to 33% on average of all experiments. Transformation with an *HvRacB*-hairpin construct CaMV35S::*HvRacB*(antisense)-Intron-*HvRacB*(sense), which leads to expression of a dsRNA-hairpin provoking sequence-specific gene silencing of *HvRacB*, reduced the penetration efficiency (PE) of *Bgh* into epidermal cells by 21% compared to the control (Figure 4). This result corroborates earlier knock down experiments in which dsRNA-*HvRacB* produced *in vitro*, instead of the dsRNA-hairpin vector, was directly delivered into the host cells (Schultheiss *et al.*, 2002). However, the effect of the dsRNA-hairpin construct after 24 h of RNAi was somewhat weaker than the effect obtained by direct delivery of dsRNA and 4 h of silencing before inoculation.

To confirm the role of RAC/ROP proteins in powdery mildew resistance, CA mutants were generated by site-directed mutagenesis of the GTPase domain. The exchange of the GTPase intrinsic aa glycine to valine leads to the loss of the GTPase function, which should result in a CA, GTP-bound RAC/ROP protein (e.g. Kawasaki *et al.*, 1999; see Figure 1, bold G in GTPase domain). Overexpression of the CA mutant of HvRACB (HvRACB-V15) consistently resulted in increased susceptibility of wild-type barley. In six independent experiments, we observed a significant average increase of fungal PE by 45% (Figure 4). In contrast, overexpression of wild-type HvRACB or a dominant negative HvRACB-N20 mutant did not yield significant effects on susceptibility (Figure 4).

As *HvRacB*-dsRNA interference was inefficient in barley genotypes bearing the *ror1-2* mutant allele (Schultheiss *et al.*, 2002), we tested the effect of CA HvRACB-V15 in moderately susceptible *mlo5 ror1-2* and completely resistant



**Figure 4.** Impact of HvRACB protein overexpression and RNA interference on PE of *Bgh*.

Columns indicate the influence of overexpressed *HvRacB* constructs on the relative PE of *Bgh* in barley epidermal cells (susceptible cv. Ingrid, genotype *Mlo Ror1*). Error bars show standard errors. Columns represent the average deviation of PE from controls. Results were confirmed in at least five independent experiments. Negative and positive values of relative PE indicate reduced and enhanced PE compared to the controls (set as 0). Controls were transformed with the marker gene and the empty overexpression vector. Transformation of barley cells with RNAi inducing *HvRacB*-hairpin construct (*HvRacB*(as)-intron-*HvRacB*(s)) significantly reduced the PE of *Bgh* into barley cells (Students' *t*-test,  $P = 0.028$ ), whereas overexpression of CA *HvRACB*-V15 enhanced the PE ( $P < 0.001$ ). Overexpression of wild-type (wt) *HvRACB* or the dominant negative *HvRACB*-N20 did not change the PE compared to the control ( $P = 0.607$  or  $P = 0.862$ , respectively). Absolute PE on controls was 33.2% in average.

*mlo5 Ror1* mutant genotypes. In both genotypes, overexpression of CA *HvRACB*-V15 did not enhance susceptibility, contrasting the clear effect in wild-type barley (Table 1).

The second barley type I RAC/ROP protein *HvRACD*, which is 90% identical to *HvRACB*, did not exhibit any significant effect on barley accessibility to *Bgh*, when overexpressed in its CA form (Figure 5). This underscores RAC/ROP-specificity of the CA *HvRACB* overexpression effect.

Overexpression experiments of type II RAC/ROP are summarised in Figure 5. The constitutive active forms of type II RAC/ROPs *HvRAC3*-V17, *HvROP4*-V17 and *HvROP6*-V15 enhanced significantly the accessibility of epidermal cells to *Bgh* in each at least five independent experiments. Overexpression of *HvRAC3*-V17 enhanced PE by 38%, overexpression of *HvROP4*-V17 that is closely related to *HvRAC3* (86% aa identity) enhanced PE by 40% and overexpression

**Table 1** The overexpression effect of CA *HvRACB*-V15 on PE of *B. graminis* f.sp. *hordei* is influenced by the host genotype

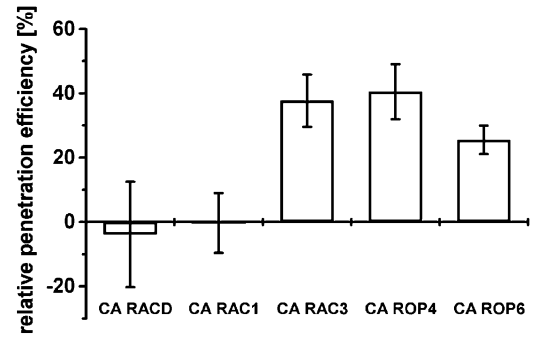
Genotype	<i>n</i> <sup>a</sup>	Interaction sites	Relative PE <sup>b</sup>	<i>P</i> -value <sup>c</sup>
<i>Mlo Ror1</i>	6	804	+45%	0.0007
<i>mlo5 Ror1</i>	2	194	±0% <sup>d</sup>	0.5
<i>mlo5 ror1-2</i>	4	444	-13%	0.3

<sup>a</sup>number of independent experiments.

<sup>b</sup>average PE [%] compared to controls expressing GFP and empty vector (set as 0%).

<sup>c</sup>*P*-value, *t*-test.

<sup>d</sup>PE was zero in this resistant genotype both in control and CA *HvRACB*-V15 overexpression.



**Figure 5.** Impact of overexpression of five different CA RAC/ROP proteins on PE of *Bgh*.

Columns indicate the influence of overexpressed RAC/ROP proteins on the relative PE of *Bgh* in barley epidermal cells (cv. Ingrid). Error bars show SEs. Columns represent the average deviation of PE from controls. Significant results were confirmed in at least five independent experiments. Overexpression of the constitutive active forms of *HvRAC3*, *HvROP4* and *HvROP6* led to an enhanced PE of *Bgh* into barley epidermal cells ( $P < 0.002$ ,  $P = 0.009$  or  $P = 0.011$ , respectively), whereas the overexpression of CA *HvRACD*-V15 and CA *HvRAC1*-V23 did not change the PE of *Bgh* compared to control ( $P = 0.560$  or  $P = 0.878$ , respectively). Absolute PE in controls was 31.2% on average.

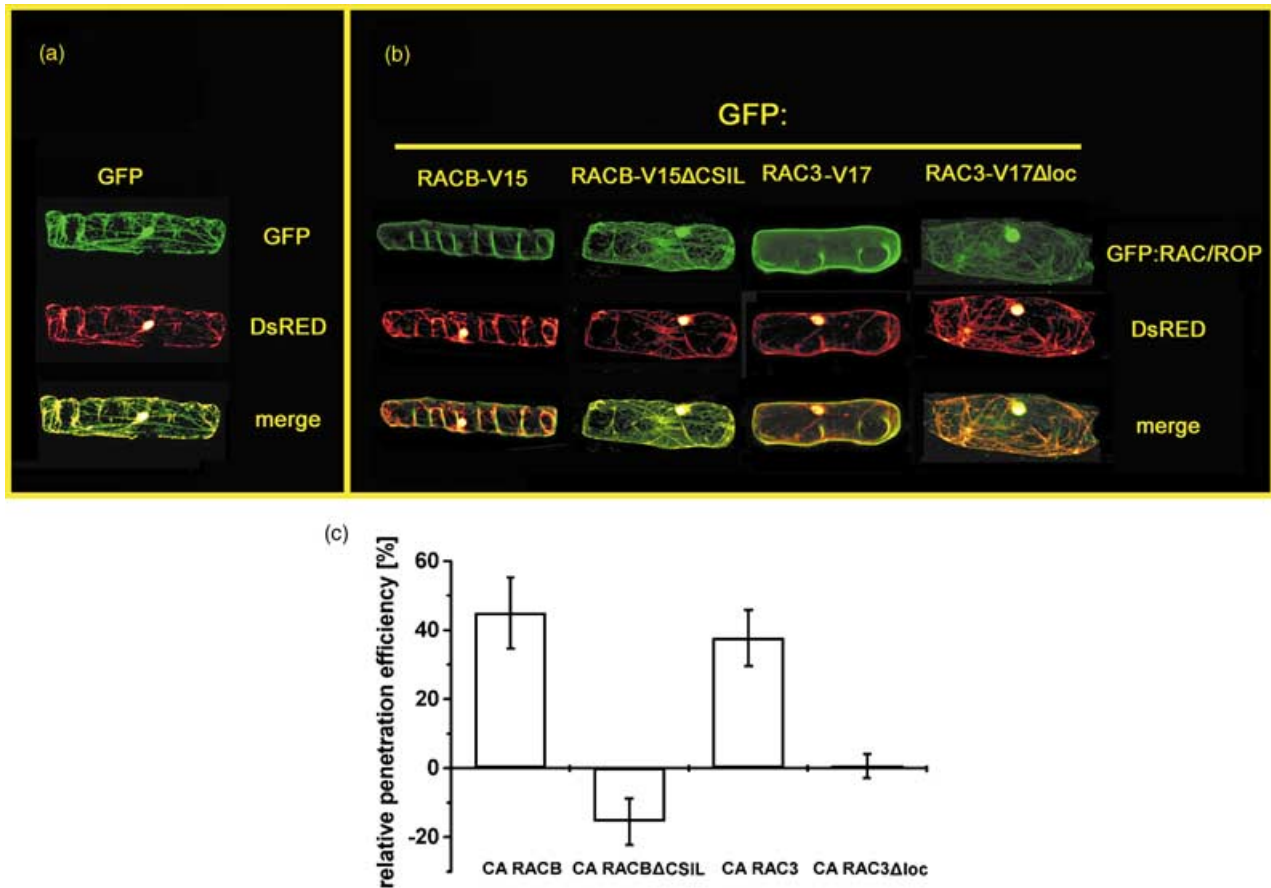
of *HvROP6*-V15 conferred a 26% higher PE of *Bgh*. In contrast, overexpression of the constitutively active *HvRAC1*-V23 had no influence on PE (Figure 5). None of the type II RAC/ROPs altered the number of living GFP-expressing cells (*Bgh*-attacked or non-attacked), which makes it unlikely that they are involved in *Bgh*-induced cell death reaction (data not shown).

#### Role of the C-terminal localisation motifs

To identify the subcellular site of CA RAC/ROP activity, we performed intracellular localisation of N-terminal GFP-fusion proteins of CA *HvRAC*/ROPs. The fusion proteins were expressed in epidermal cells after biolistic transformation of leaf segments. The co-transformation with the red fluorescent protein *DsRed* under control of *CaMV35S* served as control for a protein that freely moves in the cytoplasm and into the nucleus (*pe35AsclptRed*, *DsRed*-C1; Dietrich and Maiss, 2002). We observed the localisation of *DsRed* and GFP fusion proteins 48–96 h after transformation by confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Expression of the GFP protein alone resulted in evenly green fluorescence of the entire cytoplasm and nucleoplasm (Figure 6a). By comparing the GFP localisation with the distribution of *DsRed* in short epidermal cells, we found a nearly identical localisation of both fluorescent proteins. Similar localisation is visible in overlay pictures (Figure 6a merge) where pixels reflecting co-localised GFP and *DsRed* appear yellow.

Subcellular localisation of the type I RAC/ROP GFP:*HvRACB*-V15 is shown in Figure 6(b). Localisation of *HvRACB*-V15 was complex. We always observed GFP:*HvRACB*-V15 fluorescence at the PM. However, evaluation of the subcellular



**Figure 6.** The C-terminal localisation motifs of HvrACB and HvrAC3 are essential for both protein localisation and function in susceptibility.

(a) Barley epidermal cells of leaf segments were transiently transformed with GFP:RAC/ROP (green) and DsRed (red). DsRed was co-transformed as nuclear and cytoplasmic localised control. Overlays of the GFP and the DsRed channels led to yellow colour if GFP and DsRed were co-localised in one pixel. Pictures represent whole cell projection of 20–30 optical cuts of 3  $\mu\text{m}$  increments. Fluorescence patterns of GFP and DsRed after transformation of barley epidermal cells are similar. Both proteins are localised in the cytoplasm and the nucleus.

(b) Barley epidermal cells expressing DsRed and CA GFP:RAC/ROPs. Barley epidermal cells were transformed with GFP:RAC/ROP constructs (green) and DsRed (red). GFP:RACB-V15 and GFP:RAC3-V17 are located at the PM. The GFP-fusion mutants lacking the C-terminal localisation motifs, GFP:RACB-V15 $\Delta$ CSIL and GFP:RAC3-V17 $\Delta$ loc, were only visible in the cytoplasm and within the nucleus.

(c) Impact of overexpression of HvrACB-V15 $\Delta$ CSIL and HvrAC3-V17 $\Delta$ loc, lacking the C-terminal localisation motifs, on fungal PE. Each column represents the average of deviation of PE from control. Error bars show SEs. Overexpression of HvrACB-V15 and HvrAC3-V17 led to an enhancement of PE of *Bgh* by 45% ( $P < 0.001$ ) and 38% ( $P < 0.002$ ), respectively (see Figures 4 and 5). The overexpression of the respective mutants HvrACB-V15 $\Delta$ CSIL and HvrAC3-V17 $\Delta$ loc lacking the C-terminal localisation motifs did not change the PE compared to control ( $P = 0.093$  or  $P = 0.919$ , respectively).

localisation during the first 48 h after transformation also revealed an equally strong distribution of the GFP:HvrACB-V15 fusion protein throughout cytoplasm and nucleus (not shown). Surprisingly, evaluation at later time points after transformation, e.g. 72 h, revealed contrasting subcellular patterns of GFP:HvrACB-V15 distribution. In approximately 50% of the cells, cytoplasmic and nuclear green fluorescence completely disappeared, while the accumulation of the fusion protein at the PM was stable. The merge of confocal GFP- and DsRed-channel whole-cell projections of 20–30 optical cuts of 3  $\mu\text{m}$  increments delivered epidermal cells with a green periphery and a red inside suggesting PM localisation of GFP:HvrACB-V15 (Figure 6b). In the remaining cells, strong GFP:HvrACB-V15 derived fluorescence in nucleus

and cytoplasm decomposed, but was still detectable suggesting that the level of GFP:HvrACB-V15 expression might be responsible for specificity of the targeting process. Also, for strong GFP:HvrACB-V15 expressing cells, we could not rule out that HvrACB-V15 was partly attached to endomembranes, e.g. the endoplasmic reticulum and the tonoplast (not shown). However, when we introduced a stop codon in front of the terminal CAAX motif of RACB (aa sequence: CSIL; Figure 1), the mutant GFP:HvrACB-V15 $\Delta$ CSIL accumulated within the cytoplasm and the nucleus and its localisation could never be distinguished from that of DsRed (Figure 6b). As we never observed any GFP:HvrACB-V15 $\Delta$ CSIL-derived fluorescence at the PM, we concluded that the C-terminal CSIL prenylation motif is required for PM-localisation of

HvRACB-V15. Expression of an N-terminal GFP-fusion of the second type I RAC/ROP, RACD-V15, resulted in distribution of green fluorescence mainly at the PM and in the nucleus whereas the cytoplasm was hardly labelled (data not shown). Expression of DsRed together with GFP:HvRAC3-V17 led to the normal cytoplasmic and nuclear distribution of the red fluorescence. In contrast, the GFP-derived fluorescence was only visible in the cell periphery at the PM (Figure 6b). The nucleus, which shined bright in the red channel, was hardly or not detectable in the GFP channel. The same was true for all other CA type II GFP:RAC/ROPs. Only GFP:ROP4-V17 was found to some extent in the nucleus but not in the cytoplasm (not shown). Together, barley type II RAC/ROPs were more strictly associated with the PM than were type I RAC/ROPs. None of the type II RAC/ROPs described here possess a typical CAAX motif. Instead, the HVR of these proteins contains cysteine residues that might be palmitoylated. Mutants lacking the putative localisation domain were constructed and expressed in barley epidermal cells. We constructed a GFP:HvRAC3-V17 mutant, which possessed a stop codon in front of the cysteine residue in aa position 198 (GFP:HvRAC3-V17 $\Delta$ loc). This results in an open-reading frame lacking both cysteine residues possibly responsible for PM localisation of the full-length HvRAC3. Localisation of the truncated GFP:HvRAC3-V17 $\Delta$ loc within epidermal cells differed clearly from that of the full-length GFP:HvRAC3-V17 (Figure 6b). The green fluorescence was dispersed throughout the cell instead of being restricted to the cell periphery. Nevertheless, there was a difference between the distribution of the fusion and the DsRed because GFP:HvRAC3-V17 $\Delta$ loc was most strongly detected in the nucleus.

To study whether the membrane attachment is important for signalling in the barley–powdery mildew fungus interaction, we performed overexpression analysis using the truncated HvRACB-V15 $\Delta$ CSIL and HvRAC3-V17 $\Delta$ loc constructs. As already shown, overexpression of both full-length CA HvRACB and full-length CA HvRAC3 conferred enhanced susceptibility to barley epidermal cells (see Figures 4 and 5). In contrast, overexpression of the delocalised mutants HvRACB-V15 $\Delta$ CSIL and HvRAC3-V17 $\Delta$ loc did not significantly change the basal resistance status of barley (Figure 6c). We rather observed a tendency for a resistance-inducing effect of HvRACB-V15 $\Delta$ CSIL (Figure 6c), demonstrating that the C-terminal cysteine residues of HvRACB and HvRAC3 are required for both the specific localisation at the PM and the accurate function in barley powdery mildew fungus interaction.

## Discussion

Small GTPases of the RAC/ROP family play important roles in cell growth and cell morphogenesis, and are involved in host–pathogen interactions (Gu *et al.*, 2003; Mathur and

Hülkamp, 2002; Paduch *et al.*, 2001; Valster *et al.*, 2000; Yang, 2002; Zheng and Yang, 2000). We identified six, for the most part, formerly unknown barley RAC/ROP family proteins and examined their function and subcellular localisation in the barley–powdery mildew fungus interaction. Our data suggest that HvRACB, HvRAC3 and HvROP6 activate signalling cascades facilitating invasion of *Bgh* into barley epidermal cells and therefore are potential susceptibility factors. These proteins belong to different subgroups of the plant RAC/ROP family. This suggests that they function through different mechanisms.

All of the identified barley RAC/ROPs shared typical domains, such as GDP/GTP-binding and GTPase domains and the effector loop that is thought to be responsible for interaction with regulatory enzymes like GTPase-activating proteins (Moodie *et al.*, 1995). There are only two amino acid stretches lacking high similarities within the protein family. The first region is the special effector loop (or insert region) that is thought to be responsible for downstream signalling (Valster *et al.*, 2000). This insert region is likely not the only downstream signalling domain of barley RAC/ROPs because HvRACB and HvRACD, although functionally distinct, are identical within this domain. Moreover, *Arabidopsis* type I RAC/ROP proteins, which have different functions (Bischoff *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2003), are very similar in the insert region (Valster *et al.*, 2000; Winge *et al.*, 1997). The second domain of the RAC/ROP proteins without high similarities is the HVR at the C-terminus, thought to be required for subcellular targeting (Bischoff *et al.*, 2000; Lavy *et al.*, 2002). Within this domain, the basic character of the polybasic region is conserved but not the amino acids themselves. Also, the post-translationally lipid-linked cysteine residues are largely conserved, whereas the surrounding sequences are variable.

By comparing the barley RAC/ROP proteins with those from *Arabidopsis*, maize and rice, several distinct subgroups can be formed (Figure 2). The construction of a phylogenetic tree showed that the six barley homologues can be classified into the subgroups formed together with rice and maize proteins. As in rice and maize, not more than each 7 or 8 members of RAC/ROP proteins were identified so far, we speculate that the barley RAC/ROP family is not much larger than six members, although *Arabidopsis* contains 11 homologues (Vernoud *et al.*, 2003). Interestingly, *Arabidopsis* RAC/ROPs show partly higher similarities to cereal RAC/ROPs than they show to each other, likely indicating functional conservation in all higher plants.

The comparison of the barley RAC/ROPs with known proteins from other species and the construction of the phylogenetic tree generated first hints on barley RAC/ROP functions. Some members of the closely related type I subgroup (AtROP1–AtROP6, HvRACB, HvRACD) are known to be regulators of the actin cytoskeleton (Fu *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2003) that is rearranged during the attack of powdery

mildew fungi on barley (Kobayashi *et al.*, 1997; K. Opalsky and R. Hückelhoven unpublished results).

Transient knock down of HvRACB via dsRNA interference led to enhanced resistance against the powdery mildew fungus. This effect was only detectable in wild-type barley but not in mutant genotypes *mlo5 ror1* and *Mlo ror1* (Schultheiss *et al.*, 2002 and unpublished results; unpublished *Mlo ror1* genotype kindly provided by Nicholas Collins, Sainsbury Laboratory John Innes Centre, Norwich, UK). This suggests that HvRACB is a susceptibility factor involved in the ROR1-dependent defence regulation. In the present study, we confirmed the role of HvRACB as a potential susceptibility factor in the interaction of barley with *Bgh*. However, overexpression of HvRACB-V15 did not break the strong resistance of *mlo5/Ror1* or the moderate resistance of *mlo5/ror1* mutant genotypes (Table 1). Together, we speculate that HvRACB functions as an antagonist of functional ROR1.

To demonstrate that RACB can promote susceptibility, it was necessary to overexpress the CA mutant because wild-type HvRACB had no effect on the interaction outcome (Figure 4). This may not surprise as RAC/ROP proteins are signal transduction proteins that normally need to be activated by extracellular stimuli. Interestingly, overexpression of the presumably dominant negative mutant HvRACB-N20 did not induce resistance contrasting the results for *HvRacB*-dsRNA interference (Figure 4). This might be explained by the fact that low levels of active endogenous RACB are sufficient to function in susceptibility so that competition by the dominant negative mutant is not strong enough to eliminate RACB function. In contrast, knock down of RACB might be able to reduce the abundance of RACB proteins sufficiently to interfere with its function in susceptibility. Alternatively, HvRACB-N20 could interact with RACB up- and downstream interacting components as well as inhibitors such as plant RHO-guanine nucleotide dissociation inhibitors leading to abolishment of effects. To further examine HvRACB function, we analysed the intracellular localisation of the CA HvRACB. HvRACB possesses a polybasic domain followed by a typical C-terminal CAAX-box motif (CSIL). The final lysine residue is crucial for recognition by geranylgeranyltransferases instead of farnesyltransferases. Hence, the combination of these structures should result in geranylgeranylation (Caldelari *et al.*, 2001) and possible attachment to membranes (Thompson and Okuyama, 2000). Some type I RAC/ROP proteins were shown to be localised at the PM (Fu *et al.*, 2002; Nakanomyo *et al.*, 2002), whereas others are distributed all over the cell (Bischoff *et al.*, 2000). As expected for a CA RAC/ROP protein, we found GFP:HvRACB-V15 fluorescence not only at the PM but also a nuclear and cytoplasmic localisation of the fusion protein, albeit to a lesser extent (not shown). Bright fluorescing cells, which expressed high amounts of the fusion protein, showed a more intensive cytoplasmic

and nuclear distribution of the fusion protein. Cells containing only small amounts of the GFP:HvRACB-V15 fusion always concentrated the fluorescence at the PM, especially when incubated for 3 or 4 days after transient transformation. We speculate that the membrane transport mechanism of HvRACB is not effective enough to target large amounts of proteins to the PM. In contrast to GFP:HvRACB-V15, the GFP:HvRACB-V15 $\Delta$ CSIL fusion protein accumulated exclusively in the cytoplasm and in the nucleus (Figure 6b). In addition, overexpression of HvRACB-V15 $\Delta$ CSIL did not result in enhanced susceptibility of barley to *Bgh*. We conclude that both the PM localisation and HvRACB function in host cell accessibility depend on the C-terminal CAAX-box motif. The induction of plant susceptibility mediated by CA HvRACB is a specific feature of this particular type I RAC/ROP protein, which is clearly demonstrated by the fact that overexpression of CA HvRACD-V15 had no effect, although HvRACD shows 90% aa identity to HvRACB (Figure 1).

It is known that the HvRACB-homologous type I RAC/ROP proteins influence the assembly of the cytoskeleton by various mechanisms. First, human Rho-GTPases re-modulate the actin cytoskeleton by regulating the activity of serine/threonine kinases such as p65PAK or p160ROCK (Hall, 1998). These kinases regulate the activity of actin modifying enzymes such as actin depolymerisation factors (ADFs; Maekawa *et al.*, 1999). The same pathway may be conserved in plants, as NtRAC1, a HvRACB homologous type I RAC/ROP protein from *Nicotiana tabacum*, mediates pollen tube growth by regulating the activity status of ADF1 (Chen *et al.*, 2003). The actin cytoskeleton can also be modified by RAC/ROP proteins via the phosphoinositol pathway (Kost *et al.*, 1999). Another RAC/ROP-dependent mechanism during pollen tube and root hair growth is the formation of a tip-focused Ca<sup>2+</sup> accumulation that is needed for polar growth (Camacho and Malho, 2003; Fu *et al.*, 2001; Molendijk *et al.*, 2001). Calcium ions are also able to regulate the activity of the MLO protein via calmodulin (Kim *et al.*, 2002), which links back to susceptibility in the barley-*Bgh* interaction. It is likely that HvRACB is involved in at least some of these processes regulated by type I RAC/ROPs. The regulation of cell polarity might be of special interest, because invagination of the host PM during haustoria establishment within barley epidermal cells may represent a kind of 'inverted' tip growth induced by *Bgh* possibly via HvRACB. Alternatively, CA HvRACB such as other CA type I RAC/ROPs could induce isotropic cell growth, which antagonizes polar cytoskeleton focusing to site of attempted penetration crucial for penetration resistance (Kobayashi *et al.*, 1997).

With the exception of HvRAC1, all type II RAC/ROPs described here influence the barley-*Bgh* interaction. Overexpression of barley CA HvRAC3, HvROP4 and HvROP6 type II RAC/ROPs resulted in enhanced accessibility

(Figure 5). As HvROP4 mRNA was not detectable in the epidermis of barley leaves (Figure 3), the effect of CA HvROP4-V17 likely did not resemble an intrinsic signalling pathway. We speculate that the CA HvROP4 effect mimics the overexpression of the closely related HvRAC3 (Figure 5).

The molecular mechanism of enhanced cell accessibility and plant susceptibility by overexpression of HvRAC3 and HvROP6 is unclear. There is little known about function of type II RAC/ROPs in plants. The type II RAC/ROP OsRAC1 was shown to be involved in ROI production, cell death and disease resistance to *M. grisea* (Kawasaki *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2001). Kawasaki *et al.* (1999) provided evidence that OsRAC1 could be a regulator of an NADPH oxidase, as known for RAC2 and RAC1 from mammalian systems (Bokoch and Diebold, 2002). Like RAC/ROP proteins (Li *et al.*, 1999), the NADPH oxidase is involved in ROI production and tip-focused  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation during polar root hair growth (Foreman *et al.*, 2003). The establishment of *Bgh*-haustoria in barley epidermal cells requires polar plant membrane growth, and during this process, generation of superoxide at the side of penetration has been detected. Interestingly, such a superoxide burst was not detectable in resistant barley preventing haustorium establishment such as *mlo5*-genotypes. Thus, appearance of  $\text{O}_2^-$  that is possibly produced by NADPH oxidase is linked to accessibility to *Bgh* (Hückelhoven and Kogel, 1998). ROIs from NADPH oxidase activity are required for cell growth by regulating different processes, including calcium uptake, which might feed back NADPH oxidase activity that is  $\text{Ca}^{2+}$  stimulated (Keller *et al.*, 1998; Sagi and Fluhr, 2001). Although participation of the NADPH oxidase in barley-*Bgh* interaction seems possible, we do not exclude other explanations, e.g. involvement of phytohormones like ABA as described for AtROP10 (Zheng *et al.*, 2002).

Surprisingly, overexpression of HvRAC1-V23 did not influence the resistance status of barley to *Bgh* (Figure 4). This appears in clear contrast to the effect of CA OsRAC1 on rice blast resistance (Kawasaki *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2001). Possibly, HvRAC1 represents a part of a defence machinery that is only effective against hemibiotrophic fungi such as *M. grisea*, but is not involved in repelling the biotrophic *Bgh*. Moreover, our experiments with the CA RAC/ROPs were carried out using susceptible barley lines whereas Ono *et al.* (2001) linked OsRAC1 with *R*-gene-mediated resistance. Finally, the similarity of OsRAC1, ZmRACC and HvRAC1 is relatively low compared to the similarities with in other subgroups (Figure 2). This may indicate some differences in function of barley and rice RAC1.

The expression of fusion proteins composed of N-terminal GFP and the CA type II RAC/ROPs resulted in a clear PM-associated green fluorescence (Figure 6b). The transport of barley type II RAC/ROPs to the PM corresponds with data obtained from *Arabidopsis* and maize. As previously shown, the membrane-targeting signal in the C-terminal

hypervariable region of type II RAC/ROPs does not depend on a functional CAAX-box (Ivanchenko *et al.*, 2000; Lavy *et al.*, 2002). Especially the maize PM-located ZmROP6 exhibits very high similarities with HvROP6, even in the hypervariable region (22 of the last 31 aa are identical). Ivanchenko *et al.* (2000) showed that both cysteine residues (cys199 and cys206) upstream of the rudimentary CAAX-box are important for membrane association of ZmROP6, whereas the rudimentary CAAX-box (CAA) cysteine (cys210) could be mutated without changes in localisation. All barley type II RAC/ROPs possess only an incomplete or non-functional C-terminal CAAX-box, such as CAA (HvROP6) or CFKS (HvRAC3), but contain additional upstream cysteine residues, which could be palmitoylated. There is not much known about the function of type II RAC/ROPs, but it seems that a permanent PM association is required for their function. The strict and essential PM association can be seen as an additional hint that the downstream targets of the type II RAC/ROPs are also bound to the PM. This speculation is supported by the fact that CA HvRAC3 became non-functional when the C-terminal localisation domain was cut off (HvRAC3-V17 $\Delta$ loc, Figure 6c).

Finally, the question arises why host RAC/ROPs could act as susceptibility factors? It is not likely that the plant maintained *Rac/Rop* genes through evolution because of their function in helping fungal parasites to invade. The small G-proteins are involved in many signalling cascades, required for normal plant development. Some pathogens may trigger these pathways to cause a plant reaction allowing the pathogen to infect. Especially, the cytoskeleton is a primary target for animal pathogens trying to infect host cells (for review, see Boquet and Lemichez, 2003). The cytoskeleton can be either modified directly by toxins or cytoskeleton modulating proteins become deregulated. In the latter case, the targets of pathogen effectors are often small G-proteins of the Rho family (Boquet and Lemichez, 2003). Bacterial plant pathogens were shown to introduce effectors into the plant cell acting as pathogenicity factors (Abramovitch *et al.*, 2003). The *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB is a homologue of the *Yersinia* effector YopT that works as a protease cleaving small G-proteins (Shao *et al.*, 2002). It is imaginable that *Bgh* also effects the host RAC/ROP-signalling pathways to more easily infect the plant cell. For the future, it will be important to isolate the up- and downstream effectors of the different RAC/ROP proteins to uncover the signalling network, modulating cell accessibility to pathogen invasion.

## Experimental procedures

### *Plant materials, pathogen and inoculation*

The barley (*H. vulgare* L.) lines Ingrid and the backcross line BCIngrid-*mlo5* were obtained from Lisa Munk (Royal Veterinary

and Agricultural University, Copenhagen, Denmark). Their generation was described previously by Kølster *et al.* (1986). The mutant *mlo5 ror1-2* was obtained from Paul Schulze-Lefert (Max-Planck-Institute for plant breeding research, Cologne, Germany). Plants were grown in a growth chamber at 18°C with 60% relative humidity and a photoperiod of 16 h (240  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  photon flux density). The barley powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal, race A6 (Wiberg, 1974) was inoculated onto barley primary leaves to give a density of 150 conidia  $\text{mm}^{-2}$ . *Bgh* was maintained on barley cv. Siri under the same conditions.

#### Isolation of barley Rac/Rop family cDNAs, cloning and sequencing

We isolated cDNA fragments by the use of one-step RT-PCR kits (Qiagen, Hilden, Germany) and a complex RNA pool described previously by Schultheiss *et al.* (2002). Primers were designed using GenBank or EST database information for specific barley EST sequences. For primer sequence and accessions, see Table 2. Details of the isolation of *HvRacB* were described by Schultheiss *et al.* (2002). For first sequence information of *HvRac1*, we carried out RT-PCR with a primer derived from the conserved GTPase-region and a Primer derived from a barley EST (BM097964), which only contain 3' UTR sequence information. To access the complete 5'-region, we performed RACE (Schultheiss *et al.*, 2002).

cDNAs were isolated from gels and cloned into pGEM-T-Vector (Promega, Mannheim, Germany). cDNAs were sequenced from plasmids by use of the Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham, Freiburg, Germany) and analysed for similarities in the GenBank database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997).

For transient transformation assays complete open-reading frames of the *Rac/Rop* cDNAs were subcloned into pGY1 (Schweizer *et al.*, 1999) that contains a 540-bp fragment of the CaMV35S promoter and terminator separated by a multiple cloning site. The constructs were cloned using the restriction sites linked to primers mentioned in Table 2. All constructs were checked by sequencing (see above).

We constructed a dsRNA expression vector by use of pJP26 (provided by Robert Dudler, Institute of Plant Biology, University of Zurich, Switzerland) containing the CaMV35S promoter followed by an intron in the multiple cloning site suitable for cloning PCR products with adapted restriction sites to give an antisense-intron-sense construct.

To generate the constitutively active and dominant negative RAC/ROP mutants, we used the Transformer™ Mutagenesis Kit (Clontech, Heidelberg, Germany) following manufacturers instructions. For each RAC/ROP, the glycine corresponding to G12 of human Rac1 was substituted by a valine, leading to the destruction of the GTPase domain, which results in a CA small G-protein (primer: see Table 2). The dominant negative HvRACB-N20 was obtained in the same way by exchange of a threonine (T20) for an asparagine (primer: see Table 2; Kawasaki *et al.*, 1999).

#### Construction of GFP:HvRAC/ROP-fusions

For expression of GFP:HvRAC/ROP fusion proteins, cDNAs of GFP (GFPemd-b in pGFP; Schweizer *et al.*, 1999) were amplified from plasmids by PCR using primers with attached *Bam*HI restriction sites in all three frames under elimination of the GFP stop codon (GFP-5' primer: 5'-GGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'; GFP-3' primer (frame 1): 5'-GGATCCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'; GFP-3' primer (frame 2): 5'-GGATCCCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'; GFP-3' primer (frame 3): 5'-GGATCCCCTTGTACAGCTCGTCCAT-3').

**Table 2** Accession numbers and oligo-DNA primers used for RT-PCR, RACE and cDNA mutagenesis of barley *Rac/Rops*

<i>HvRac/Rop</i> (Accession number)	Primer	Sequence	EST Accession number <sup>a</sup>
<i>RacB</i> (AJ344223)	RacBs	5'-GGATCCGATGAGCGCGTCCAGGTT-3'	AJ290420, AF250327, BF260616
	RacBas	5'-GTCGACCTTCGCCCTTGTCTTTGTC-3'	
	RacB-RACE	5'-GGATCCGATGAGCGCGTCCAGGTT-3'	
	CA RacB	5'-ACCGTGGGGGACGTCGCCGTCGGCAAGAC-3'	
	DN RacB	5'-GCGCCGTCGGCAAGAAGTGCATGCTCATCT-3'	
	RacBΔCSIL	5'-GTCGACTCAAGCCCCCTCTGCGCTTTTTC-3'	
<i>RacD</i> (AJ439334)	RacDs	5'-GGATCCATGAGCGCATCTCGGTTT-3'	AV943381
	RacDas	5'-GTCGACGCGAGACACTGCAAAACAAA-3'	
	CA RacD	Identical to CA RacB	
<i>Rac1</i> (AJ518933)	Rac1s	5'-GGATCCGCTGGAGAGGAGAGGAGAGG-3'	BM097964
	Rac1as	5'-GTCGACCCCATTTGGAGAACAACCAC-3'	
	GTPase	5'-CAGGTTTCATCAAGTGCGT-3'	
	Rac1RACE	5'-GTCGGTGGGGAGCTTGTTCAGGTGTA-3'	
	CA Rac1	5'-GCCGTGGGGGACGTCGCCGTCGGCAAGAC-3'	
<i>Rac3</i> (AJ518932)	Rac3s	5'-GGATCCCGCGCGGCGAGCCATG-3'	BM816965
	Rac3as	5'-GTCGACGCAAGGAACCTTCTTTTCATC-3'	
	CA Rac3	Identical to CA RacB	
	Rac3Δloc	5-CGTCGGGGATGATCAATGATGAAC-3'	
<i>Rop4</i> (AJ439335)	Rop4s	5'-GGATCCTTCTCGTCCATTTAGCCGGC-3'	AV924458, AV836932
	Rop4as	5'-GTCGACTGATCACTTGAAGCATGCCAG-3'	
	CA Rop4	Identical to CA RacB	
<i>Rop6</i> (AJ439333)	Rop6s	5'-GGATCCGTGGAGCGCGGCGGAGA-3'	BI957947, BM099394
	Rop6as	5'-CTGCAGCCATGCTTCATCTCCATAGTCA-3'	
	CA Rop6	Identical to CA RacB	

<sup>a</sup>ESTs served to create tentative consensus sequences for primer design.

GFP-PCR products were cloned in frame into the appropriate pGY1-RAC/ROP-construct (linearised with *Bam*HI). Orientation of the inserts was checked by PCR and the fusion constructs were sequenced.

#### RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction

Isolation of epidermal tissue for expression analysis was performed as described previously by Schultheiss *et al.* (2002).

Total RNA was extracted from 8–10 primary leaf segments (5 cm long) or from 20 epidermal strips using RNA extraction buffer (PEQLAB, Erlangen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for semi-quantitative RT-PCR following manufacturers instructions. To estimate template amounts the RT-PCR was stopped during the exponential phase of amplification, maintaining initial differences in target transcript amounts. PCR products were separated in agarose gels.

**Primers.** For semiquantitative RT-PCR of *Rac/Rop* family member's mRNA, we used the primers mentioned (Table 2). For *OxLP* cDNA fragment (506 bp; GenBank Accession X93171): 5'-GGCCGACAT-GCATTACCAG-3' (5' primer) and 5'-CATCTGATATTGCTGGG-TCTG-3' (3' primer); *Rubisco* cDNA fragment (607 bp; GenBank Accession U43493): 5'-CCCTGTCTTACCTCCACCA-3' (5' primer) and 5'-GCGTGCAAAGATGTTTCTCAT-3' (3' primer); actin-like cDNA fragment (758 bp; GenBank Accession AJ234400): 5'-CT-GTAGGAAATGGCTGACGG-3' (5' primer) and 5'-TCGGATCACCT-GACCCAT-3' (3' primer).

#### Transient transformation and evaluation of fungal development

A transient transformation protocol, originally developed for wheat to assess gene function in the interaction with powdery mildew, was used to deliver overexpression constructs of the RAC/ROP proteins into epidermal cells of barley leaf segments as described by Schweizer *et al.* (1999) and Hückelhoven *et al.* (2003).

Barley leaf segments were bombarded with coated particles 24 h before inoculation with *Bgh*, race A6. Interaction outcome was judged 40 h after inoculation by fluorescence and light microscopy. For each individual experiment, at least 100 interaction sites were evaluated. Transformed GFP expressing cells were identified under blue light excitation. Penetration efficiency of *Bgh* was judged by the frequency by which *Bgh* was able to establish haustoria in transformed cells (Hückelhoven *et al.*, 2003). Surface structures of *Bgh* were detected by light microscopy or by fluorescence staining of the fungus with 0.3% calcofluor (w/v in 50 mM TRIS, pH 9) for 30 sec. Deviation of PE [%] was used as a measure for susceptibility of cells that expressed GFP and a test-gene (pGY1-RAC/ROP) compared to those transformed with GFP and empty vector (pGY1). PE [%] was calculated as number of penetrated cells divided by total number of attacked cells multiplied by 100. The deviation of PE was calculated as PE in cells expressing the testgene divided by PE of controls minus 1 and multiplied by 100.

#### Localisation of RAC/ROP proteins with CLSM

For localisation experiments, barley leaves were transformed with pGY1-GFP:HvRAC/ROP (1 µg) and pDsRed containing *DsRed* under control of CAMV35S (0.5 µg, pe35AsclptRed; Dietrich and Maiss, 2002) as described above.

The localisation of the GFP:HvRAC/ROP fusion protein was detected by CLSM (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Bensheim, Germany) 24–96 h after transformation. GFP:HvRAC/ROP was excited with a 488-nm laser line and detected at 505–530 nm. DsRed was excited by 543 nm laser line and detected at 580–650 nm.

All new materials will be delivered freely to the research community. Economically relevant use is restricted by patent WO03020939.

#### Acknowledgements

We are grateful to Edgar Maiss (University of Hannover, Germany) for providing the DsRed expression construct and to Robert Dudler (University of Zurich, Switzerland) for providing the hairpin vector pJP26. This work was supported by a DFG grant to R.H. and K.-H.K. (Ko1208/8).

#### References

- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. and Martin, G.B. (2003) *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J.* **22**, 60–69.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P.S. and Bailey-Serres, J. (2002) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science*, **14**, 2026–2028.
- Bischoff, F., Vahlkamp, L., Molendijk, A. and Palme, K. (2000) Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **42**, 515–530.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N. and Scheel, D. (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, **12**, 1425–1440.
- Bokoch, G.M. and Diebold, B.A. (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*, **100**, 2692–2696.
- Boquet, P. and Lemichez, E. (2003) Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol.* **13**, 238–246.
- Caldelari, D., Sternberg, H., Rodriguez-Concepcion, M., Gruissem, W. and Yalovsky, S. (2001) Efficient prenylation by a plant geranylgeranyltransferase-I requires a functional CaaL box motif and a proximal polybasic domain. *Plant Physiol.* **126**, 1416–1429.
- Camacho, L. and Malho, R. (2003) Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca<sup>2+</sup> and GTPases. *J. Exp. Bot.* **54**, 83–92.
- Chen, C.Y., Cheung, A.Y. and Wu, H.M. (2003) Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth. *Plant Cell*, **15**, 237–249.
- Cheung, A.Y., Chen, C., Tao, L., Andreyeva, T., Twell, D. and Wu, H.M. (2003) Regulation of pollen tube growth by Rac-like GTPases. *J. Exp. Bot.* **54**, 73–81.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G. and Schulze-Lefert, P. (1999) Topology, subcellular localisation, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 34993–35004.

- Dietrich, C. and Maiss, E.** (2002) Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *Biotechniques*, **32**, 286, 288–290, 292–293.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H. et al.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**, 442–446.
- Freialdenhoven, A., Peterhänsel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F. and Schulze-Lefert, P.** (1996) Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell*, **8**, 5–14.
- Fu, Y., Li, H. and Yang, Z.** (2002) The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. *Plant Cell*, **14**, 777–794.
- Fu, Y., Wu, G. and Yang, Z.** (2001) Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J. Cell Biol.* **152**, 1019–1032.
- Gu, Y., Vernoud, V., Fu, Y. and Yang, Z.** (2003) ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *J. Exp. Bot.* **54**, 93–101.
- Hall, A.** (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509–514.
- Hassanain, H.H., Sharma, Y.K., Moldovan, L., Khrantsov, V., Berliner, L.J., Duvick, J.P. and Goldschmidt-Clermont, P.J.** (2000) Plant rac proteins induce superoxide production in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 783–788.
- Hückelhoven, R. and Kogel, K.-H.** (1998) Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 292–300.
- Hückelhoven, R. and Kogel, K.-H.** (2003) Reactive oxygen intermediates in plant–microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta*, **216**, 891–902.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Trujillo, M. and Kogel, K.-H.** (2001) Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines inoculated with the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* **47**, 739–748.
- Hückelhoven, R., Dechert, C. and Kogel, K.-H.** (2003) Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5555–5560.
- Ivanchenko, M., Vejlupekova, Z., Quatrano, R.S. and Fowler, J.E.** (2000) Maize ROP7 GTPase contains a unique, CaaX box-independent plasma membrane targeting signal. *Plant J.* **24**, 79–90.
- Jones, M.A., Shen, J.-J., Fu, Y., Li, H., Yang, Z. and Grierson, C.S.** (2002) The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell*, **14**, 763–776.
- Jørgensen, J.H.** (1994) Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 97–119.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. and Shimamoto, K.** (1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10922–10926.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (1998) A plant homologue of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell*, **10**, 255–266.
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J. and Schulze-Lefert, P.** (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, **416**, 447–451.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T. and Kunoh, H.** (1997) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* **11**, 525–537.
- Kölster, P., Munk, L., Stølen, O. and Løhde, J.** (1986) Near-isogenic barley lines with genes for resistance to powdery mildew. *Crop Sci.* **26**, 903–907.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolias, K., Carpenter, C. and Chua, N.H.** (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J. Cell Biol.* **145**, 317–330.
- Lavy, M., Bracha-Drori, K., Sternberg, H. and Yalovsky, S.** (2002) A cell-specific, prenylation-independent mechanism regulates targeting of type II RACs. *Plant Cell*, **14**, 2431–2450.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X. and Yang, Z.** (1999) Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell*, **11**, 1731–1742.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S.** (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, **285**, 895–898.
- Mathur, J. and Hülskamp, M.** (2002) Signal transduction: rho-like proteins in plants. *Curr. Biol.* **12**, R526–R528.
- Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S.V., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S. and Palme, K.** (2001) *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J.* **20**, 2779–2788.
- Moodie, S.A., Paris, M., Villafranca, E., Kirshmeier, P., Willumsen, B.M. and Wolfman, A.** (1995) Different structural requirements within the switch II region of the Ras protein for interactions with specific downstream targets. *Oncogene*, **11**, 447–454.
- Nakanomyo, I., Kost, B., Chua, N.H. and Fukuda, H.** (2002) Preferential and asymmetrical accumulation of a Rac small GTPase mRNA in differentiating Xylem cells of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1484–1492.
- Ono, E., Wong, H.L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O. and Shimamoto, K.** (2001) Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 759–764.
- Paduch, M., Jelen, F. and Otlewski, J.** (2001) Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 829–850.
- Park, J., Choi, H.J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z. and Lee, Y.** (2000) Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol.* **124**, 725–732.
- Sagi, M. and Fluhr, R.** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91 (phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **126**, 1281–1290.
- Schmelzer, E.** (2002) Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Sci.* **7**, 411–415.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.-H. and Hückelhoven, R.** (2002) A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol.* **128**, 1447–1454.
- Schulze-Lefert, P. and Vogel, J.** (2000) Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci.* **5**, 343–348.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O. and Dudler, R.** (1999) A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 647–654.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W. and Dixon, J.E.** (2002) A Yersinia effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell*, **109**, 575–588.

- Thompson, G.A. and Okuyama, H.** (2000) Lipid-linked proteins of plants. *Prog. Lipid. Res.* **39**, 19–39.
- Valster, A.H., Hepler, P.K. and Chernoff, J.** (2000) Plant GTPases: the Rhos in bloom. *Trends Cell Biol.* **10**, 141–146.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z. and Nielsen, E.** (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **131**, 1191–1208.
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V. and Thordal-Christensen, H.** (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* **36**, 101–112.
- Wiberg, A.** (1974) Genetical studies of spontaneous sources of resistance to powdery mildew in barley. *Hereditas*, **77**, 89–148.
- Winge, P., Brembu, T. and Bones, A.M.** (1997) Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 483–495.
- Xu, H. and Heath, M.C.** (1998) Role of calcium in the signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust-fungus. *Plant Cell*, **10**, 585–597.
- Yang, Z.** (2002) Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, **14**, S375–S388.
- Zheng, Z.L. and Yang, Z.** (2000) The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**, 1–9.
- Zheng, Z.L., Nafisi, M., Tam, A., Li, H., Crowell, D.N., Chary, S.N., Schroeder, J.I., Shen, J. and Yang, Z.** (2002) Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 2787–2797.

Accession numbers: *HvRacB*: AJ344223; *HvRacD*: AJ439334; *HvRac1*: AJ518933; *HvRac3*: AJ518932; *HvRop4*: AJ439335; *HvRop6*: AJ439333.



### 3 DISKUSSION

#### 3.1 Die transiente Transformation durch Partikelbombardement

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion verschiedener, in die Gerste - Echter Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) Interaktion involvierter Proteine charakterisiert. Die funktionellen Analysen und die Studien zur intrazellulären Lokalisation wurden mit Hilfe der biolistischen transienten Transformation von Gerstenepidermiszellen durchgeführt (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003a; Schultheiss *et al.*, 2003b).

Grundsätzlich wird zur biolistischen transienten Transformation DNA auf Gold- oder Wolframpartikel präzipitiert. Diese werden mit Heliumdruck unter Vakuum auf Gerstenblattsegmente geschossen. Sie durchschlagen Kutikula und Zellwände und dringen in die Epidermiszellen ein. Trifft ein Partikel einen Zellkern, so löst sich die anhaftende DNA ab und das kodierte Protein wird transient exprimiert (Nelson und Bushnell, 1997). Abhängig vom experimentellen Ansatz werden die Gerstenblattsegmente 4 bis 96 Stunden nach Bombardement mit Konidien des Echten Gerstenmehltaupilzes inokuliert (Nielsen *et al.*, 1999). Nach weiteren 36 Stunden wird die Interaktion des Pilzes mit den transformierten Epidermiszellen mikroskopisch ausgewertet (Schweizer *et al.*, 1999b).

Der große Vorteil der Funktionsanalyse von Proteinen mittels transients Transformation liegt an der hohen Zahl an Kandidatengen, die in relativ kurzer Zeit getestet werden können. Obwohl die Technik der stabilen Transformation in den letzten Jahren auch bei monokotylen Pflanzen große Fortschritte gemacht hat, ist die Erzeugung von stabil transgenem Getreide immer noch schwierig sowie zeit- und arbeitsaufwändig. So benötigt die Erzeugung einer homozygoten stabil transgenen Linie inklusive aller Vorarbeiten mindestens ein Jahr, während der transiente Ansatz pro Gen nur sechs bis acht Wochen in Anspruch nimmt. Neben den geringen Material- und Arbeitskosten hat die transiente Transformation den Vorteil, dass auch Gene untersucht werden können, deren stabile Expression bzw. konstitutiver *knock-out* im Laufe der pflanzlichen Entwicklung letal wäre.

Die transiente Transformation einzelner Blattepidermiszellen schränkt die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode allerdings ein. So ist die Zahl der nutzbaren Pathosysteme sehr limitiert, denn zum einen sollte die Pathogenese auf Grund der geringen Dauerhaftigkeit der transienten Transformation in weniger als sieben Tagen abgeschlossen sein und zum anderen muss die Interaktion von Pflanze und Pathogen auf Einzelzellniveau

ablaufen, das heißt der Besiedlungserfolg des Pathogens von der Interaktion mit einer einzelnen Wirtszelle abhängen. Auch darf das verwendete Pathogen nur die transformierbare Epidermis angreifen und nicht, wie zum Beispiel für Rostpilze typisch, über die Stomata eindringen.

Eine weitere Einschränkung ergibt sich aus der Verwendung der ausdifferenzierten Blätter zur Transformation. So zeigen Kandidatengene, die in die pflanzliche Morphogenese und Entwicklung involviert sind, in ausdifferenzierten Geweben eventuell keine Effekte. Auch ist die Überprüfung von Proteinen, die von Zelle zu Zelle transportierbar sind, in der funktionellen Analyse mittels transienter Transformation problematisch, da die Überexpression bzw. der *knock-down* in einer einzelnen Zelle durch die Nachbarzellen kompensiert werden kann. Die Überexpression von apoplastischen Proteinen wie Chitinasen und Glukanasen scheint jedoch durch die regional erhöhte Konzentration einen Einfluss auf Pathogene zu haben (Schweizer *et al.*, 1999b).

Der invasive Transformationsvorgang durch Partikelbombardement kann seinerseits zur Erzeugung von Artefakten führen, da die ausgeprägten Wund- und Zelltodreaktionen die Pathogenabwehrvorgänge überlagern können. So sinkt die durchschnittliche Penetrationsrate des Mehltaupilzes auf beschossenen Blättern im Vergleich zu unverletzten Blättern deutlich ab (Nelson und Bushnell, 1997). Wird innerhalb der ersten 24 Stunden nach Transformation inokuliert, ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt (eigene Beobachtung, Schweizer *et al.*, 1999a; Schweizer *et al.*, 1999b). Werden die beschossenen Blätter jedoch vor der Inokulation länger inkubiert, so sinkt die Penetrationsrate von *Bgh* in suszeptible Gerstenlinien auf unter zehn Prozent (Nelson und Bushnell, 1997).

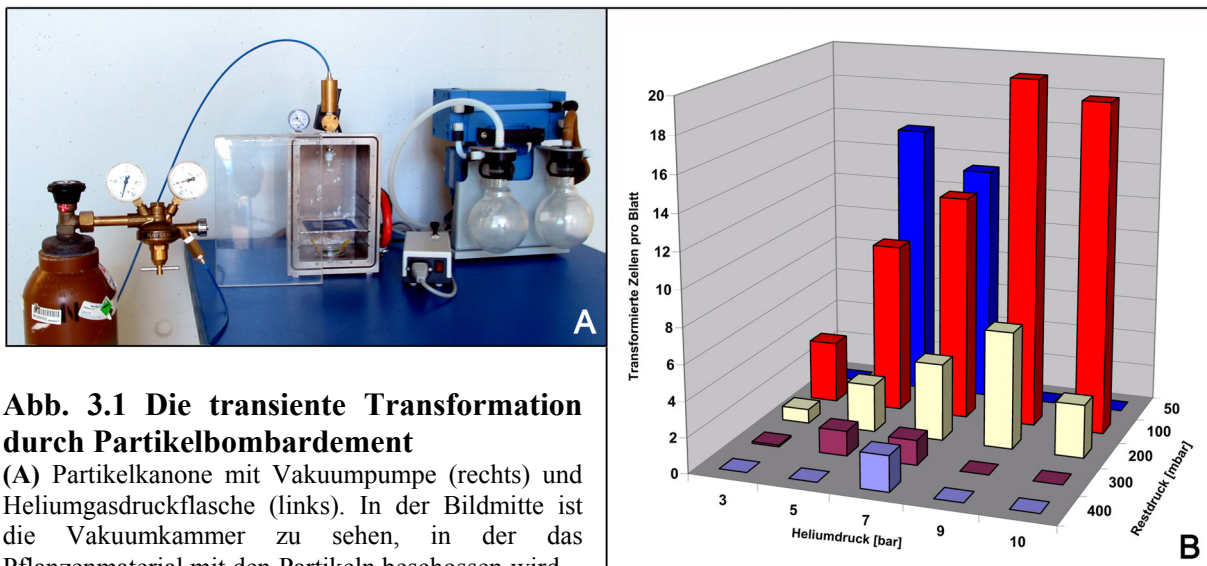
Durch die Beachtung der systembedingten Einschränkungen und der Durchführung umfangreicher Kontrollversuche hat sich die transiente Transformation im Rahmen dieser Arbeit allerdings als zuverlässiges und reproduzierbares Werkzeug zur Funktionsanalyse von Abwehr-assoziierten Proteinen erwiesen.

### 3.1.1 Optimierung der Transformationseffizienz

Die transiente Transformation durch Partikelbombardement ist eine Methode, deren einzelne Arbeitsschritte genau aufeinander abgestimmt sein müssen, um eine hohe Transformationsrate bei möglichst geringer Verletzung des Blattgewebes zu erreichen.

Der erste Schritt besteht in der Auswahl geeigneter Partikel, wobei Material und Größe die entscheidenden Parameter sind. Als Materialien stehen die Schwermetalle Gold und Wolfram

zur Verfügung. Wolframpartikel sind unregelmäßig geformt und weisen zahlreiche Ecken und Kanten auf. Außerdem oxidieren sie innerhalb der Zelle zu Schwermetallkationen, die auf viele enzymatische Reaktionen inhibierend wirken. Im Gegensatz dazu sind Goldpartikel glatt und fast perfekt kugelförmig, weshalb das Bombardement kleinere „Einschlaglöcher“ in der Zellwand verursacht, und somit weniger wundinduzierter Zelltod auftritt (Russell *et al.*, 1992). Da es sich bei Gold um ein inertes Edelmetall handelt, sind Goldpartikel nicht zytotoxisch (Nelson und Bushnell, 1997). Deshalb werden für die Generierung stabil transgener Pflanzen meist Goldpartikel verwendet. Für die transiente Transformation jedoch spielen die von Wolframpartikeln verursachten Verwundungen und der zytotoxische Effekt offenbar keine Rolle (eigene Beobachtung, Nelson und Bushnell, 1997; Schweizer *et al.*, 1999b). Deshalb gab bei der Wahl des Partikelmaterials für die vorliegende Arbeit der deutlich niedrigere Preis der Wolframpartikel den Ausschlag.



Die Wahl des Durchmessers der verwendeten Partikel richtet sich hauptsächlich nach der Größe der zu transformierenden Zellen (Sanford *et al.*, 1993). So können zum Beispiel die relativ großen Zwiebelepidermiszellen mit bis zu 4  $\mu\text{m}$  großen Goldpartikeln transformiert werden (Klein *et al.*, 1987), während für die Transformation der kleineren Getreideepidermiszellen die Verwendung kleinerer Partikel (1,0 - 1,5  $\mu\text{m}$ , bei einem Optimum von 1,2  $\mu\text{m}$ ) effizienter ist (Nelson und Bushnell, 1997; Schweizer *et al.*, 1999b). Aus diesem Grund müssen auch Partikelkonglomerate, die während der Präzipitation der

DNA auf die Wolframpartikel entstehen, mittels Ultraschallbehandlung zerkleinert werden, so dass eine homogene Partikelsuspension entsteht (eigene Beobachtung).

Um eine epidermale Zelle zu transformieren, müssen die Partikel in den Zellkern gelangen (eigene Beobachtung). Daher muss für eine hohe Transformationseffizienz die Geschwindigkeit der Partikel ausreichen, um Kutikula und Zellwand zu durchschlagen und in den Kern der Epidermiszelle einzudringen. Bei zu hoher Geschwindigkeit durchdringen die Partikel die Epidermis und werden erst im Mesophyll gestoppt. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Partikel wird einerseits durch den beschleunigenden Heliumdruck und andererseits durch die bremsende Luftschicht zwischen Partikelkanone und dem zu beschießendem Objekt bestimmt. Da der normale Luftdruck die sehr kleinen Partikel mit ihrem hohen Oberfläche/Volumen-Quotienten zu stark abbremsen würde, wird im Vakuum mit 50 - 500 mbar Restdruck gearbeitet (Nelson und Bushnell, 1997; Nielsen *et al.*, 1999; Schweizer *et al.*, 1999b). Die optimalen Druck- und Vakuumverhältnisse müssen für jedes Transformationssystem, jede Partikelgröße und jedes zu transformierende Objekt neu bestimmt werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die für die Transformation entscheidenden Parameter hinsichtlich ihrer Effizienz optimiert. Die maximale Anzahl transformierter Epidermiszellen konnte durch die Verwendung von 9 bar Heliumdruck und einem Vakuum von 100 mbar Restdruck erzielt werden (siehe Abb. 3.1). Ein nicht zu vernachlässigender Punkt ist die Verweildauer des Gerstenblattes im Vakuum. Diese sollte möglichst gering sein, da sonst der Vakuum-induzierte großflächige Zelltod eine hohe Transformationseffizienz verhindert (eigene Beobachtung, Mäenpää *et al.*, 1999).

Weitere zu optimierende Faktoren betreffen die zu transformierende Gerste. So erfolgte die Anzucht bei hoher Lichtintensität ( $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonenfluxdichte) und mäßiger Temperatur ( $> 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Maximale und stabile Transformationsraten wurden durch Verwendung von sechs bis sieben Tage alten Gerstenprimärblättern erhalten. Ältere Pflanzen zeigten zwar weniger Zelltod durch den Beschuss, aber auch weniger transformierte Zellen, während die Transformation jüngerer Blätter oder der physiologisch jüngeren Blattbasis stark schwankende Ergebnisse lieferte (eigene Beobachtungen).

### **3.1.2 Der *knock-down* durch RNA Interferenz**

Einige der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nutzten den zellulären Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) um die Expression bestimmter Testgene transient zu inhibieren. Das grundlegende Phänomen der RNAi ist schon lange unter dem Namen

PTGS (*posttranscriptional gene silencing*) bekannt, jedoch war seine Entstehung und Funktion lange Zeit unklar (van der Krol *et al.*, 1990). Heute weiss man, dass das RNAi System der Pflanze wahrscheinlich der Virenabwehr und der Inaktivierung von Retrotransposons dient.

Die RNAi wird von einem doppelsträngigen (ds) RNA Molekül ausgelöst. Die Pflanzenzelle erkennt die dsRNA als fremd und löst im Folgenden den sequenzspezifischen Abbau der homologen mRNA aus. Die Degradation der mRNA ist sehr schnell und nahezu vollständig, so dass eine Expression des kodierten Proteins verhindert wird (Fire *et al.*, 1998). Der Mechanismus der RNAi ist Gegenstand intensiver Forschung und noch nicht vollständig aufgeklärt. Es steht jedoch fest, dass der erste Schritt in der Auslösung der RNAi die Erkennung der dsRNA und deren Spaltung in 20 - 25 bp kurze dsRNA Fragmente ist. In Eukaryonten ist dafür eine DICER genannte der RNase III ähnliche Endonuklease verantwortlich (Bernstein *et al.*, 2001). Die durch DICER gebildeten *small interfering* (si) RNA genannten kurzen dsRNA Fragmente werden in einen Multiprotein Komplex (*RNA-inducing silencing complex*, RISC) eingelagert und unter ATP-Verbrauch in Einzelstränge getrennt. Durch den im Komplex verbleibenden *antisense* Strang der siRNA erfolgt sequenzspezifisch die Bindung der entsprechenden mRNA, die dann in der Mitte der homologen Sequenz endonukleolytisch gespalten wird (Metzlaff, 2002). Da die RNAi extrem effizient ist und geringste Mengen an auslösender dsRNA die Expression einer spezifischen mRNA über einen langen Zeitraum verhindern, wurde lange Zeit über einen sich selbst erhaltenden Mechanismus spekuliert (Fire *et al.*, 1998). Ein Hinweis ergab sich aus der Entdeckung einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRP), die aus einer RNAi-defizienten *Arabidopsis* Mutante isoliert wurde (Dalmay *et al.*, 2000). Heute geht man davon aus, dass die RNA-abhängige Polymerase mit mRNA als *template* und siRNA als Primer ständig neue dsRNA Moleküle synthetisiert, die wiederum zu siRNAs gespalten werden. So entsteht ein sich selbst verstärkender und selbsterhaltender Kreislauf, der zuverlässig und spezifisch die Translation der Ziel-mRNA verhindert (Nishikura, 2001). Doch die RNA Interferenz scheint auch die Transkription der inhibierten Gene zu stören, da auf bisher ungeklärtem Weg die Chromatinstruktur verändert und die DNA methyliert wird (Waterhouse *et al.*, 2001).

Bei der Verwendung eines so komplexen Systems wie der RNAi treten zwangsläufig Probleme auf, die zu artefaktbehafteten Ergebnissen führen. Aus diesem Grund muss jedes Experiment durch umfangreiche Kontrollen abgesichert werden. Speziell in tierischen Zellen wurden in frühen RNAi Experimenten oft der Theorie widersprechende Ergebnisse erzielt.

Erst nach der Durchführung vieler Kontrollexperimente konnten diese Resultate auf eine sequenzunspezifische Abwehrreaktion der verwendeten Säugerzellen zurückgeführt werden. So löst die Transfektion von dsRNA mit mehr als 30 bp Länge in Säugerzellen eine durch Interferon vermittelte unspezifische Abwehrreaktion aus, die durch Aktivierung von RNase I die gesamte mRNA abbaut und zusätzlich über die Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 $\alpha$  die Translation stoppt (Dykxhoorn *et al.*, 2003). In Pflanzen ist kein solcher unspezifischer Abwehrmechanismus gegen dsRNA bekannt. Dennoch wurde in allen RNAi Experimenten dieser Arbeit die dsRNA des humanen Thyroidhormonrezeptors (TR) als unspezifische Negativkontrolle verwendet. Die Transformation von Gerstenepidermiszellen mit TR-dsRNA und dem Markergen *Gfp*, das für das grün fluoreszierende Protein GFP kodiert, führte im Vergleich zu einer Transformation, in der nur der Marker GFP verwendet wurde, nie zu einer Veränderung der Penetrationsrate von *Bgh* (unveröffentlichte Daten).

Obwohl die RNAi ein wirksames Werkzeug ist, um Gene spezifisch zu inhibieren, kann es dennoch zu Beeinträchtigungen ihrer Effizienz kommen. Da das RNAi System ursprünglich als Virenabwehrmechanismus entwickelt wurde, sind vor allem einige RNA-Pflanzenviren in der Lage, das RNAi-System zu blockieren und so den Abbau ihrer Erbsubstanz zu verhindern (Metzlaff, 2002). Allerdings sind auch Unterschiede in der Effizienz des RNAi Systems abhängig vom verwendeten Pflanzengenotyp beobachtet worden (P. Schweizer, pers. Mitteilung). Diese unvorhersagbaren Einschränkungen machten es nötig, sowohl die Effizienz der RNAi als auch die Güte der verwendeten dsRNA im verwendeten Transformationssystem zu testen. Hierzu wurden jeweils Fusionskonstrukte aus GFP und Testgen gemeinsam mit der unspezifischen TR-dsRNA transformiert. Die Anzahl der so erhaltenen transformierten Zellen reduzierte sich drastisch, wenn statt TR-dsRNA die Testgen-spezifische dsRNA kotransformiert wurde. Die Reduktion der transformierten Zellen durch Kotransformation von Testgen-dsRNA lag bei ca. 70 - 80 % (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003a), was mit den vorhandenen Literaturdaten übereinstimmt (Schweizer *et al.*, 2000; Panstruga *et al.*, 2003). Da das RNAi System die Expression eines Proteins inhibieren konnte, das unter der Kontrolle des relativ starken Viruspromotors CaMV35S steht, kann man davon ausgehen, dass auch die Expression des endogenen Proteins durch die eingebrachte dsRNA vollständig verhindert wird.

Das RNAi System wurde im Rahmen dieser Arbeit für den *knock-down* von PR-1B und RACB eingesetzt. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Mitglieder größerer Proteinfamilien, die eine hohe Sequenzhomologie zeigen. So ist zum Beispiel PR-1B auf Aminosäureebene zu 91% identisch mit PR-1A, und RACB zeigt mindestens 70 % Identität

zu anderen Mitgliedern der Gersten RAC/ROP Familie. Es ist unklar, ob der RNAi Mechanismus zwischen den ähnlichen mRNAs der *Rac/Rops* unterscheiden kann. Eine theoretische Voraussage über die Spezifität der RNAi in einem bestimmten System ist kaum möglich, da das DICER Enzym aus einem Pool von dsRNA nicht alle möglichen siRNAs erzeugt, sondern gewisse Sequenzen präferiert (Dykxhoorn *et al.*, 2003). Einzelne Unterschiede in der Nukleotidsequenz der entstehenden siRNA im Vergleich zur Zielsequenz werden zudem toleriert, sofern der Fehler nicht im mittleren Bereich (10. - 12. Nukleotid) der siRNA liegt (Elbashir *et al.*, 2001).

Schweizer *et al.* (2000) konnten die Spezifität der RNAi dadurch belegen, dass die Expression der Dihydroflavonolreduktase in Mais trotz 81 %iger Identität nicht von der dsRNA des Gerstenhomologs unterdrückt werden konnte (Schweizer *et al.*, 2000). Da die Frage nach der Spezifität der RNAi aber nicht generell zu beantworten ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, welchen Einfluss die *RacB*-dsRNA auf die Expression der anderen RAC/ROP Proteine hat. Hierzu wurde eine transiente Transformation durchgeführt, mit DsRED als Transformationsmarker, dsRNA von *RacB* sowie den GFP-Fusionskonstrukten der verschiedenen *Rac/Rops*. Das experimentelle Design entsprach im Wesentlichen einem von Panstruga *et al.* (2003) veröffentlichten Testsystem. Erfolgte in diesem System ein effizienter Abbau der *GFP-Rac/Rop* mRNA durch *RacB* dsRNA, so wurden nur rot fluoreszierende Zellen, die keine GFP-Fluoreszenz zeigten, gefunden. War die RNAi durch zu große Sequenzunterschiede jedoch ineffektiv, so exprimierten die Zellen sowohl DsRED als auch GFP-RAC/ROP. Da alle *Rac/Rop* Gene über vollständig identische Bereiche verfügen, die länger als 21 Nukleotide sind, zeigten alle Konstrukte eine zumindest geringe Reduktion der GFP-RAC/ROP Expression durch *RacB*-dsRNA. Insgesamt konnte aber in mehr als 65% der mit RACD, RAC3 und ROP6 Fusionskonstrukten transformierten Zellen eine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (vorläufige Ergebnisse). Diese trotz der hohen Sequenzähnlichkeiten relativ niedrige RNAi Effektivität von *RacB*-dsRNA weist auf eine hohe Spezifität des RNAi Mechanismus hin. Eine deutliche Reduktion der GFP-Fluoreszenz ließ sich mit *RacB* dsRNA nur bei Kotransformation von GFP-ROP4 und der Positivkontrolle GFP-RACB erreichen (unveröffentlichte Daten). Dieses Ergebnis widerspricht zwar der relativ geringen Gesamthomologie von RACB und ROP4 (77 %), allerdings verfügt *Rop4* im Vergleich zu allen anderen *Rac/Rops* über den längsten ununterbrochenen (52 bp) mit *RacB* identischen Bereich. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente war der Abbau von endogener *Rop4*-mRNA durch *RacB*-dsRNA nicht relevant, da ROP4 natürlicherweise nicht in der Gerstenepidermis exprimiert wird. Die Transformation von

Gerstenepidermiszellen mit dsRNA von *RacB* führte somit nur zu einem effektiven Abbau von *RacB*-mRNA. Die Expression von anderen Mitgliedern der RAC/ROP Familie wurde durch *RacB*-dsRNA in einem nur sehr geringen Maß beeinträchtigt.

### **3.2 PR-1B als Resistenzfaktor im Gerste – *Bgh* Pathosystem**

Das *pathogenesis related protein* 1B (PR-1B) ist ein Stress- und Pathogen-responsives Element des pflanzlichen Abwehrsystems (Mouradov *et al.*, 1993; Bryngelsson *et al.*, 1994). In Gerste wurden insgesamt vier verschiedene basische PR-1 Proteine identifiziert (Mouradov *et al.*, 1993; Bryngelsson *et al.*, 1994; Stevens *et al.*, 1996), doch *Southern blot* Analysen lassen vermuten, dass die PR-1 Familie in Gerste aus mindestens acht bis zehn Mitgliedern besteht (Bryngelsson *et al.*, 1994). Funktionell wurde PR-1B noch nicht untersucht, doch es gab Hinweise auf antifungale Aktivität, da PR-1B homologe Proteine das Wachstum von Pilzen und Oomyceten hemmten (Niderman *et al.*, 1995; Rauscher *et al.*, 1999).

Die zeitliche Expression von *PR-1b* im Gerste - *Bgh* Pathosystem korreliert nahezu vollständig mit dem Auftreten von Abwehrreaktionen und dem Resistenzphänotyp der untersuchten Gerstenlinie. In suszeptiblen Gersten zeigt sich eine transiente *PR-1b* Expression erst 16 - 24 Stunden nach Inokulation (*hai*, *hours after infection*), während der Pilz die pflanzliche Zelle penetriert bzw. durch eine effektive Papille abgewehrt wird (Fig. 1 in Schultheiss *et al.*, 2003a). In resistenten Gerstenlinien ist die *PR-1b* Expression sehr viel stärker und zeigt zum Zeitpunkt der vorherrschenden Abwehrreaktion ein Maximum. In penetrationsresistenten *mlo*-Pflanzen beginnt die *PR-1b* Expression schon drei Stunden nach Inokulation, wenn die ersten Papillen unter den primären Keimschläuchen von *Bgh* gebildet werden (Fig. 1, Schultheiss *et al.*, 2003a). Bei *Mla*- und *Mlg*-tragenden Linien, deren Abwehrstrategien auf der Ausprägung einer Hypersensitiven Reaktion (HR) basieren, tritt eine spätere *PR-1b* Akkumulation auf, die zeitlich mit der Epidermis-HR (22-30 *hai*) in *Mlg*- und mit der späteren Mesophyll-HR in *Mla*-Linien (36-48 *hai*) übereinstimmt (Freialdenhoven *et al.*, 1994; Freialdenhoven *et al.*, 1996; Peterhänsel *et al.*, 1997; Hückelhoven *et al.*, 1999; Hückelhoven *et al.*, 2000b; Schultheiss *et al.*, 2003a). Die Korrelation der *PR-1b* Expression mit der Ausprägung der Resistenzreaktionen geht wahrscheinlich darauf zurück, dass die Transkripte der PR-Gene nur in Zellen akkumulieren, die *Bgh* erfolgreich abwehren konnten (Lyngkjaer und Gjetting, 2002). In penetrierten Zellen wird die *PR-1b* Expression dagegen unterdrückt. Die leichte und transiente Expression von *PR-1b* in suszeptiblen Linien ist daher wahrscheinlich auf die 30 % - 40 % der

Epidermiszellen zurückzuführen, die auf Grund der Basisresistenz den primären Penetrationsversuch von *Bgh* abwehren konnten (Hückelhoven *et al.*, 1999).

Zudem scheint die *PR-1b* Akkumulation mit der Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu korrelieren. Die Produktion von  $H_2O_2$  in der Abwehrreaktion von Gerste gegen *Bgh* ist wie auch die Expression von *PR-1b* stark mit dem Besiedlungserfolg von *Bgh* verbunden (Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Hückelhoven *et al.*, 1999; Hückelhoven *et al.*, 2000b). So akkumuliert  $H_2O_2$  sowohl in effektiven Papillen als auch in Zellen, die eine HR zeigen. Bei erfolgreicher Besiedlung der Epidermiszelle durch *Bgh* wird die  $H_2O_2$  Produktion jedoch unterdrückt (Hückelhoven *et al.*, 1999). Auch werden sowohl  $H_2O_2$  und als auch *PR-1b* nach UV-Bestrahlung und Verwundung verstärkt gebildet (Brederode *et al.*, 1991; Neill *et al.*, 2002b).

In anderen Pathosystemen ist ebenfalls eine ähnliche Regulation von Wasserstoffperoxid und *PR-1b* Expression zu beobachten. So akkumulieren in Gerstenblättern große Mengen  $H_2O_2$  während der Besiedlung des Mesophylls durch den hemibiotrophen Pilz *Bipolaris sorokiniana* (Kumar *et al.*, 2001). Obwohl die  $H_2O_2$  Akkumulation in dieser Interaktion eher mit Anfälligkeit als mit Resistenz korreliert, exprimiert die Gerste in dieser Phase ebenfalls *PR-1b* (Fig. 2 in Schultheiss *et al.*, 2003a).

Die Aktivierung von *PR-1b* durch exogen zugeführtes  $H_2O_2$  konnte bisher nicht gezeigt werden (Hückelhoven und Kogel, 2000; Desikan *et al.*, 2001). Wird Wasserstoffperoxid jedoch durch Injektion von Glukose und Glukoseoxidase über einen längeren Zeitraum im Blatt produziert (Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997), führt dies zu einer verstärkten *PR-1b* Expression (Fig. 3 in Schultheiss *et al.*, 2003a). Somit wird *PR-1b* Expression wahrscheinlich durch  $H_2O_2$  Akkumulation induziert.

In neueren Untersuchungen wird  $H_2O_2$  immer öfter als Signalmolekül identifiziert (siehe Übersichtsartikel: Neill *et al.*, 2002a). Obwohl noch keine  $H_2O_2$  Sensorproteine identifiziert werden konnten, führt die Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration in der Zelle zu weitreichenden Veränderungen auf Genexpressions- und Proteinaktivitätsebene. Beteiligt sind hierbei wahrscheinlich redoxensitive Calciumkanäle sowie oxidationsempfindliche Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (Neill *et al.*, 2002b). Wie für ein Redox-responsives Protein zu erwarten, enthält der *PR-1b* Promotor mehrere Bindestellen für WRKY Transkriptionsfaktoren, die eine wahrscheinlich redoxensitive Zinkfinger-DNA-Bindedomäne besitzen (Vranova *et al.*, 2002). Die Aktivierung von Resistenz-assoziierten Genen durch  $H_2O_2$  wird auch in Katalase-defizienten Tabakpflanzen deutlich. Da Katalase maßgeblich für den Abbau von  $H_2O_2$  verantwortlich ist, akkumuliert in Katalase-defizientem

Tabak nach längeren Starklichtphasen Wasserstoffperoxid. Parallel zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Anreicherung beginnen diese Pflanzen Abwehrgene zu exprimieren (Chamnongpol *et al.*, 1998).

Trotz der intensiven Untersuchungen der *PR-1b* Expressionsmuster ist, wie bereits erwähnt, die Funktion von PR-1B in der Wirt - Parasit Interaktion nur unzureichend untersucht. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit RNAi *knock-down* Experimente im Gerste - *Bgh* Pathosystem mittels transienter biolistischer Transformation durchgeführt. Da das Ausschalten eines nur schwach exprimierten Gens kaum signifikante Änderungen in der Gerste-Mehltau-Interaktion bewirken würde, konnten die PR-1B RNAi Experimente nicht in einer voll suszeptiblen Gersten-Wildtypelinie durchgeführt werden. Auch die Verwendung einer vollständig resistenten *mlo*-tragenden Linie wäre wahrscheinlich nicht praktikabel gewesen, da die starke *mlo*-Resistenz nicht durch das Fehlen eines einzelnen, eventuell antifungal wirkenden Proteins gebrochen werden dürfte. Deshalb wurde mit der *mlo5/ror1* Mutante A89 eine Gerstenlinie ausgewählt, die teilanfällig gegenüber *Bgh* ist (Penetrationsrate: ca. 20 %) und eine hohe *PR-1b* Expression nach Mehлтаupilzbefall zeigt (Fig. 1 in Schultheiss *et al.*, 2003a).

Der transiente *knock-down* der *PR-1b* Expression führte zu einer verstärkten Penetration von *Bgh* in die Gerstenlinie A89 (Fig. 4 in Schultheiss *et al.*, 2003a). Die Wiederholung des Experiments mit der Wildtypelinie Ingrid zeigte, wie erwartet, keine Veränderung der Penetrationsrate von *Bgh* (unveröffentlichte Daten). Die Wirkung von PR-1B lässt sich aber nicht allein durch eine antifungale Wirkung erklären, da seine Überexpression in einer suszeptiblen Linie zu keiner Beeinträchtigung des Pilzwachstums führte. Auch hat aufgereinigte PR-1B Proteinlösung keine antifungalen oder wachstumshemmenden Eigenschaften gegenüber *Bgh* (Poulsen, 2001). Hingegen konnte eine antifungale Wirkung von PR-1 gegen Oomyceten wie *Phytophthora infestans* (Alexander *et al.*, 1993; Niderman *et al.*, 1995) und Rostpilze (Rauscher *et al.*, 1999) gezeigt werden.

Diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse sind zum Beispiel durch die Bildung eines größeren Abwehrkomplexes von PR-1B zusammen mit anderen apoplastischen Proteinen erklärbar. Dieser Komplex wäre in der Gerste - *Bgh* Interaktion nur funktionell, wenn alle Bestandteile in streng regulierten und definierten Verhältnissen zusammenwirken. Eine Überexpression eines einzelnen Proteins hätte in diesem Fall keine Auswirkung. Werden jedoch alle Komponenten stärker exprimiert, wie es beispielsweise in einer *mlo* Mutante der Fall ist, so erhöht sich die rassenunspezifische Hintergrundresistenz (Schulze-Lefert und Vogel, 2000). Andererseits könnte die Entfernung eines einzelnen Faktors aus dem Komplex

zu einem partiellen Versagen der Abwehrmaschinerie führen, was sich in einer erhöhten Penetrationsrate widerspiegelt.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der *knock-down* von PR-1B auch die Expression anderer Proteine vom PR-1 Typ inhibiert. Der Mechanismus der RNAi ist gegen PR-1B hocheffizient (Schultheiss *et al.*, 2003a), seine Spezifität dürfte aber in Bezug auf PR-1A eingeschränkt sein, da zwischen *PR-1b* und *PR-1a* auf Nukleotidebene eine Identität von 85 % besteht (Bryngelsson *et al.*, 1994). In besonders konservierten Domänen existieren Bereiche von bis zu 42 bp Länge, die absolut identisch sind, wodurch eine *PR-1b* Selektivität des RNAi Systems unwahrscheinlich wird (siehe Kap. 3.1.2). Wenn jedoch der *knock-down* der gesamten PR-1 Familie zu einer Veränderung in der Gerste - *Bgh* Interaktion führt, wäre auch die Überexpression der gesamten Familie notwendig, um die Penetrationsrate von *Bgh* signifikant zu reduzieren.

Nach erfolgreicher Penetration durch *Bgh* beginnt eine Suppression von PR-1B und anderen zellulären Abwehrkomponenten. Diese Repression der Abwehr ist so vollständig, dass nach Penetration durch einen virulenten Mehltaupilz auch avirulente Pathotypen die betroffene Zelle befallen können (Lyngkjaer und Carver, 2000). Allerdings ist die Suppression, zumindest im Weizen - *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* System reversibel, da die kurative Applikation der Resistenz-induzierenden Substanz Syringolin A die verschiedenen Komponenten der Abwehr wieder aktiviert und zur Expression der Abwehr-assoziierten Gene führt (Wäspi *et al.*, 2001).

Da trotz langer Koevolution von *Bgh* und Gerste die Expression von *PR-1b* immer noch von *Bgh* reprimiert wird, ist anzunehmen, dass PR-1B in der Abwehrstrategie der Zelle eine essentielle Rolle spielt und den Besiedlungserfolg des Pilzes zumindest reduziert. Wäre PR-1B in der Gerste - *Bgh* Interaktion nicht funktionell, wäre es wahrscheinlich im Laufe der Evolution zum Verlust der aktiven Repression von PR-1B durch *Bgh* gekommen.

### **3.3 Kleine G-Proteine als Suszeptibilitätsfaktoren im Gerste – *Bgh* Pathosystem**

#### **3.3.1 Die RAC/ROP Familie in Gerste**

Kleine G-Proteine der RAC/ROP Familie sind ubiquitäre Regulatorproteine, die in zelluläre Wachstumsvorgänge, die Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten und in Wirt - Pathogen Interaktionen involviert sind (Valster *et al.*, 2000; Zheng und Yang, 2000; Yang, 2002; Agrawal *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnten cDNAs von

sechs Mitgliedern der RAC/ROP Proteinfamilie aus Gerste isoliert werden (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003b).

RAC-/ROP-Proteine der Gerste besitzen fünf verschiedene funktionelle Domänen, die zum Teil hohe Ähnlichkeiten aufweisen, wie zum Beispiel die GTP-Binde- und GTPase-Domäne. Ebenfalls hoch konserviert ist der sogenannte Effektorloop. Diese Domäne unterliegt beim Übergang des RAC/ROP Proteins vom GDP zum GTP gebundenen Zustand einer Konformationsänderung und dient wahrscheinlich als Interaktionsdomäne mit regulatorischen Proteinen wie etwa GTPase-aktivierende Proteine (Moodie *et al.*, 1995). Geringe Homologien zeigen die Gersten RAC/ROPs in zwei Regionen. Die sogenannte *Insert*-Region (spezieller Effektorloop) ist verantwortlich für die Vermittlung des Signals an *downstream* liegende Signalkaskadenelemente (Valster *et al.*, 2000). Allerdings muss es noch weitere Domänen geben, die für eine Signalweitergabe verantwortlich sind, da die funktionell verschiedenen Proteine RACB und RACD in dieser Domäne völlig identisch sind (Fig. 1 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Außerdem zeigen einige der RAC/ROPs aus *Arabidopsis* (AtROP2, AtROP3, AtROP4, AtROP5) keine Unterschiede in der *Insert*-Region, obwohl sie höchstwahrscheinlich in verschiedene Signalkaskaden involviert sind (Winge *et al.*, 1997; Valster *et al.*, 2000).

Die zweite Proteindomäne, die zwischen den verschiedenen Mitgliedern der RAC/ROP Familie nicht hochkonserviert ist, wird als C-terminale hypervariable Region (HVR) bezeichnet. Dieser Bereich enthält hauptsächlich basische Aminosäuren sowie ein bis drei posttranslational modifizierbare Cysteinreste. Die Cysteine sind die einzigen Aminosäuren innerhalb der HVR, die mehr oder weniger konserviert sind, die umgebende Sequenz hingegen ist hochvariabel, obwohl ihr polybasischer Charakter in allen RAC/ROPs erhalten ist.

Die HVR ist für die intrazelluläre Lokalisation verantwortlich, wobei die Membranassoziation der RAC/ROP Proteine durch die Bindung eines Lipidrestes an die in der HVR lokalisierten Cysteinreste und den Ladungszustand der basischen Aminosäuren bestimmt wird (Thompson und Okuyama, 2000). Je nach Länge und Aufbau der HVR werden die RAC/ROP Proteine in zwei Typen eingeteilt (Yang, 2002). Typ I RAC/ROPs wie RACB und RACD verfügen über eine funktionelle CaaX-Box am C-Terminus, die posttranslational isoprenyliert werden kann. Bedingt durch ein zusätzliches Exon besitzen RAC/ROP Proteine vom Typ II wie RAC1, RAC3, ROP4 und ROP6 zwei bis drei Cysteinreste innerhalb der HVR, die allerdings keine funktionelle CaaX-Box bilden und wahrscheinlich palmitoyliert werden (Thompson und Okuyama, 2000).

Durch den Sequenzvergleich der RAC/ROP Proteine aus Gerste, Reis (*Oryza sativa*), Mais (*Zea mays*) und *Arabidopsis thaliana* konnten die RAC/ROP Proteine in verschiedene Untergruppen eingeteilt und ein phylogenetischer Baum erstellt werden (Fig. 2 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Auffällig war, dass die intraspezifischen Unterschiede zwischen den RAC/ROPs verschiedener Untergruppen größer waren als die interspezifischen Unterschiede der RAC/ROP Proteine innerhalb einer Untergruppe. Dies weist auf eine artübergreifende Konservierung der Struktur und damit wahrscheinlich auch der Funktion hin. Da durch die sechs bekannten Gersten RAC/ROPs alle Untergruppen, die von Reis und Mais RAC/ROP Proteinen gebildet werden, abgedeckt sind, kann man spekulieren, dass die Gersten RAC/ROP Familie aus nicht viel mehr als den sechs gefundenen Mitgliedern besteht.

Der Vergleich der RAC/ROP Proteine von *Arabidopsis* und den monokotylen Spezies Gerste, Reis und Mais zeigt eine extreme Abundanz der Typ I RAC/ROPs in *Arabidopsis*. Acht von elf bekannten *Arabidopsis* RAC/ROP Proteinen gehören diesem Typus an, während in den drei monokotylen Spezies die Typ II RAC/ROP Proteine die deutliche Mehrheit bilden. Ein Grund hierfür könnte die redundante Funktion der *Arabidopsis* Typ I RAC/ROP Proteine sein. So konvertiert die Überexpression von konstitutiv aktivem AtROP1, AtROP2, AtROP3, AtROP4 und AtROP5 in Pollenschläuchen (Li *et al.*, 1998; Kost *et al.*, 1999; Cheung *et al.*, 2003) und AtROP2, AtROP4 und AtROP6 in Wurzelhaaren (Molendijk *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002) jeweils das polare in ein isotropes Wachstum. Obwohl die Phänotypen im Detail leicht variieren, sind die Hauptcharakteristika bei allen Typ I RAC/ROP Proteinen gleich. Im Genom der monokotylen Pflanzen sind nur zwei bis drei Typ I *Rac/Rops* vorhanden. Deren Funktion ist aber zumindest in Gerste nicht redundant, da die beiden Typ I RAC/ROP Proteine RACB und RACD intrazellulär unterschiedlich lokalisiert sind (siehe Abb. 3.3) und nach Überexpression das Gerste - *Bgh* Pathosystem verschieden modulieren. (Fig. 4-6 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Es scheint, dass im Laufe der Evolution in monokotylen Pflanzen eine Reduktion der Typ I RAC/ROPs von vielen redundanten Proteinen zu wenigen Typ I RAC/ROPs mit jeweils breiter Wirksamkeit stattfand, deren Funktionen jedoch nicht mehr überlappen. Alternativ ist es auch möglich, dass die hohe Zahl der *Arabidopsis* Typ I RAC/ROP Proteine auf eine oder mehrere Gen- oder partielle Genomduplikationen zurückgeführt werden kann (Raes *et al.*, 2003).

Obwohl *Arabidopsis* über elf verschiedene RAC/ROP Proteine verfügt, gibt es kein Homolog zur RAC1 Untergruppe der Monokotylen (RAC1, OsRAC1, ZmRACC, Fig. 2 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Dies verwundert um so mehr, als dass OsRAC1 eine Komponente des

pflanzlichen Abwehrsystems ist (Ono *et al.*, 2001). Eventuell handelt es sich bei der RAC1 vermittelten Abwehr um eine für monokotyle Pflanzen spezifische Verteidigungsstrategie.

### 3.3.2 Molekulare Mechanismen der RAC/ROP Funktion

Die kleinen G-Proteine der RAC/ROP Familie sind Regulatoren vieler zellulärer Signalkaskaden. Da ein breites Spektrum exogener Signale an der Oberfläche der Pflanze perzipiert, verarbeitet und weitergegeben wird, ist es nicht verwunderlich, dass fünf der sechs Gersten RAC/ROP Proteine in der Blattepidermis exprimiert sind. Die Ausnahme bildet ROP4, dessen Expression auch im Mesophyll kaum nachgewiesen werden kann (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003b).

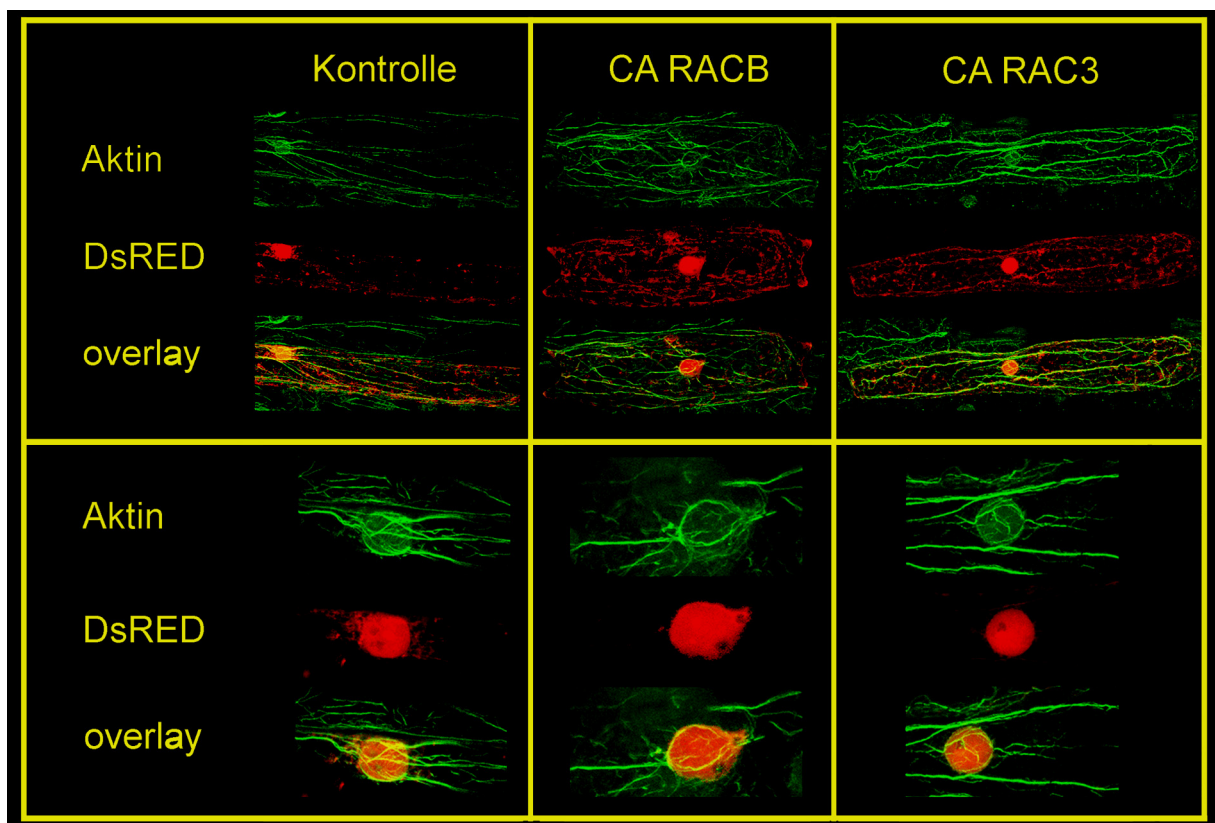
Durch die Bindung von GTP bzw. GDP sind RAC/ROP Proteine in ihrer Aktivität regulierbar (Yang, 2002). Aus diesem Grund kann ihre Aktivität auch bei konstanter Transkriptionsrate verändert werden. So wird keines der RAC/ROP Proteine in Gerste nach Inokulation mit *Bgh* verstärkt exprimiert. Die Transkriptakkumulation von *RacB*, *Rop6* und *Rac1* bleibt konstant, während die Expression von *Rac3* und *RacD* eher reduziert wird (unveröffentlichte Daten, Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003b).

#### 3.3.2.1 Funktionen der Typ I RAC/ROP Proteine

In Epidermiszellen der Gerste werden mit RACB und RACD zwei verschiedene Typ I RAC/ROP Proteine exprimiert. Der transiente *knock-down* von *RacB* durch RNAi führte in den Wildtyp Gerstenlinien Ingrid und Pallas zu einer Verringerung des Besiedlungserfolgs von *Bgh*, unabhängig davon, ob als Induktor der RNAi dsRNA verwendet oder ein endogen dsRNA bildendes *hairpin*-Konstrukt überexprimiert wurde (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003b). Umgekehrt erhöhte sich die Penetrationsrate von *Bgh* nach Überexpression von konstitutiv aktivem (CA) RACB, das durch gezielte Mutagenese der GTPase-Domäne erzeugt wurde (Schultheiss *et al.*, 2003b). Da die Überexpression des Wildtyp RAC/ROP Proteins keine Änderung in der Gerste - *Bgh* Interaktion ergab (Fig. 4 in Schultheiss *et al.*, 2003b) scheint die Verwendung von konstitutiv aktiven RAC/ROP Proteinen bei Überexpressionsexperimenten im Gerste - *Bgh* Pathosystem essentiell zu sein. Kleine G-Proteinen sind stringent regulierte molekulare Schalter. Eine Überexpression von Wildtyp RAC/ROP führt höchstwahrscheinlich zu einer Anreicherung der G-Proteine im inaktiven Zustand. Durch die Mutagenese, die zum Austausch einer einzelnen Aminosäure

führt, wird die endogene GTPase-Funktion des RAC/ROP Proteins gehemmt, wodurch das Protein nach einmaliger Aktivierung dauerhaft aktiv bleibt (Paduch *et al.*, 2001). Ob konstitutiv aktive RAC/ROP Mutanten für die Funktionsanalyse verwendet werden müssen, hängt vom experimentellen System ab. So können Veränderungen in der Morphogenese von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren auch durch die Überexpression der Wildtyp RAC/ROPs erreicht werden (Fu *et al.*, 2001; Cheung *et al.*, 2003), während Experimente, die ROI produzierende Prozesse benötigen, scheinbar auf die konstitutive Aktivierung der RAC/ROPs angewiesen sind (Kawasaki *et al.*, 1999; Hassanain *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2001).

Analog zu den konstitutiv aktiven RAC/ROP Proteinen ist auch die Erzeugung von dominant negativen (DN) RAC/ROPs möglich. Durch eine Mutation (N20) verfügen die DN RAC/ROP Proteine über eine hyperaktive GTPase Domäne, die gebundenes GTP direkt zu GDP



**Abb. 3.2 Visualisierung des Aktinzytoskeletts nach Überexpression von CA RACB und CA RAC3 mittels konfokaler Lasermikroskopie**

Die Gerstenepidermiszellen wurden transient mit RAC/ROP und DsRED (rot) transformiert. DsRED diente als Transformationsmarker und ist zytoplasmatisch und im Kern lokalisiert. Die Abbildungen zeigen Projektionen von 20 - 30 optischen Schnitten mit je 3 µm Abstand.

Obere Hälfte: Es sind keine deutlichen Unterschiede im Aufbau des Aktinzytoskeletts durch Überexpression von CA RACB und CA RAC3 im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. In allen drei Fällen erkennt man parallel verlaufende, schwach auf den Kern polarisierte Aktinfasern.

Untere Hälfte: Ausschnittvergrößerungen der oberen Abbildungen zur Untersuchung der Anbindung des Zellkerns an das Aktinzytoskelett. Nach Überexpression von CA RACB und CA RAC3 zeigte sich keine Änderung der Verbindung von Zellkern und Aktinzytoskelett.

hydrolysiert, wodurch das G-Protein sofort nach der Aktivierung wieder inaktiv wird. Die Überexpression der DN Mutanten sollte, wahrscheinlich durch kompetitive Inhibition von endogenem RAC/ROP, einen *knock-down* des G-Proteins simulieren. In dieser Arbeit führte eine Überexpression von DN RACB zu keinem Effekt in der Gerste - *Bgh* Interaktion, obwohl der RNAi vermittelte *knock-down* von *RacB* die Penetration von *Bgh* deutlich reduzierte (Fig. 4 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Man kann spekulieren, dass DN RAC/ROP das endogen produzierte Wildtyp RAC/ROP auch von inhibitorischen Regulatoren verdrängt und sich so der durch Bindung der aktivierenden Proteine erreichte DN RAC/ROP Effekt wieder aufhebt. Auch könnte es sein, dass in diesem speziellen System die Aktivität des endogen produzierten RACB ausreicht, um die notwendigen Signalkaskaden aufrechtzuerhalten. Zusätzlich könnte eine Schwächung der RACB *downstream* Signale mittels einer Rückkopplungsschleife sogar die Transkription des endogenen *RacB* aktivieren und somit den DN RACB vermittelten Effekt umgehen. Gezeigt wurde diese Rückkopplung in Mäusen, wo die Hemmung der *Rho*-GTPase durch Statin zu einer Akkumulation der *Rho*-mRNA führt (Laufs *et al.*, 2000).

Da die Überexpression von CA RACB die Anfälligkeit der Gerste gegen *Bgh* deutlich erhöht (relative Penetrationsrate, rel. PE: + 45 %, Schultheiss *et al.*, 2003b) und der transiente *knock-down* von *RacB* zu einer verstärkten Resistenz führt (rel. PE: - 44 %, Schultheiss *et al.*, 2002), kann RACB als Suszeptibilitätsfaktor in der Interaktion von *Bgh* und Gerste bezeichnet werden. Über den molekularen Mechanismus der RACB Funktion kann jedoch nur spekuliert werden.

Viele der zu RACB homologen *Arabidopsis* Typ I ROP Proteine konnten mit der Regulation des Zytoskeletts in Verbindung gebracht werden (Molendijk *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003). Das Aktinzytoskelett spielt eine zentrale Rolle in pflanzlichen Entwicklungs- und Wachstumsprozessen, wobei die longitudinalen Aktinfasern als Transportwege für Proteine und Vesikel dienen (Kropf *et al.*, 1998). Diese Funktion ist auch in der Pathogenabwehr wichtig, da der gerichtete Transport von Abwehrkomponenten zur Angriffsstelle hin gewährleistet sein muss (Schmelzer, 2002). Aus diesem Grund wird unmittelbar nach Erkennung des Pathogens das Zytoskelett umorganisiert, so dass die Aktinfasern auf den Pathogenangriffsort fokussiert werden (Kobayashi *et al.*, 1997).

Der Einfluss von RAC/ROP Proteinen auf die Zellpolarität und die Organisation des Zytoskeletts zeigt sich vor allem in nicht ausdifferenzierten, wachsenden Zellen. Die Überexpression von RAC/ROP Proteinen verändert hier das vorhandene polare Wachstum in ein ungerichtetes (isotropes) Wachstum (Li *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001; Molendijk *et al.*, 2001), wobei die molekularen Mechanismen allerdings noch nicht vollständig geklärt sind.

Der Einfluss der RAC/ROP Proteine auf das Zytoskelett verläuft wahrscheinlich über verschiedene Signalwege, die letztlich alle zu einer Modulation des Zytoskeletts führen.

Humane RAC Proteine aktivieren Serin/Threonin Kinasen wie p65PAK oder p160ROCK, die wiederum die Aktivität von Aktin-modifizierenden Enzymen wie zum Beispiel Aktin-Depolymerisations-Faktoren (ADFs) regulieren (Hall, 1998; Maekawa *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus scheint auch in Pflanzen konserviert zu sein, da das RACB homologe NtRAC1 (91 % identisch) aus Tabak über die Steuerung der Aktivität eines ADFs das Pollenschlauchwachstum reguliert (Chen *et al.*, 2003).

Außer durch Aktin-modifizierende Enzyme steuern RAC/ROP Proteine die Organisation des Aktinzytoskeletts durch die Aktivierung des Phosphoinositol -Metabolismus (Kost *et al.*, 1999) und durch Regulation des intrazellulären Calciumgradienten, der für alle Arten der Zellpolarität unverzichtbar ist (Li *et al.*, 1999; Molendijk *et al.*, 2001; Camacho und Malho, 2003). Der Einfluss von RAC/ROP Proteinen auf die Polarität und den Calciumhaushalt der Zelle ist für die Pathogenabwehr von entscheidender Bedeutung, da viele Abwehrmechanismen auf diese beiden Prozesse angewiesen sind (Kobayashi *et al.*, 1997; Schmelzer, 2002). So könnte der Suszeptibilitätsfaktor RACB antagonistisch zu der Konzentration der zellulären Abwehr auf die Angriffsstelle wirken, wodurch die Penetrationschancen von *Bgh* in die Wirtszelle steigen.

Allerdings bestimmen RAC/ROP Proteine nicht den Aufbau des Aktinzytoskeletts, sondern regulieren nur dessen Umbau. So verändert sich das Aktinzytoskelett von ausdifferenzierten Gerstenepidermiszellen nach Überexpression von CA RACB nicht (siehe Abb. 3.2), während CA RACB die Reorganisation des Zytoskeletts nach Inokulation mit *Bgh* behindert (pers. Mitteilung K. Opalski und R. Hückelhoven). Ein weiterer Aspekt in Bezug auf die Modulation der Interaktion von Gerste und *Bgh* durch kleine G-Proteine ist die Verbindung von Typ I RAC/ROPs mit dem Repressor der Pathogenabwehr MLO. Die durch RAC/ROP Proteine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert über die Bindung an Calmodulin auch MLO, wodurch die Abwehrreaktionen der Zelle gegen Pathogene reprimiert werden (Kim *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2002b).

Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung von MLO und RACB ergibt sich aus der Tatsache, dass in der teilanfälligen *mlo/ror1* Mutante A89, deren *mlo*-Resistenz durch eine weitere Mutation im *Ror1*-Locus geschwächt ist (Freialdenhoven *et al.*, 1996), weder die Überexpression noch der *knock-down* von RacB einen Effekt auf die Gerste - *Bgh* Interaktion zeigten (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003b). RACB ist jedoch kein direkter *downstream* Faktor von MLO, da die Überexpression von CA RACB nicht ausreicht, um die

*mlo*-Resistenz zu brechen (Tabelle 1 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Da die RNAi von *RacB* auch in einer *Mlo/ror1* tragenden Linie ohne Wirkung war (unveröffentlichte Daten), kann man über ein antagonistisches Verhalten von RACB zu ROR1 spekulieren. Genauere Aussagen lassen sich jedoch erst machen, wenn das ROR1 Protein identifiziert ist.

Das zweite Typ I RAC/ROP Protein der Gerste, RACD, zeigte in der Gerste - *Bgh* Interaktion keine Funktion (Fig. 5, Schultheiss *et al.*, 2003b). Die Penetrationsrate von *Bgh* blieb nach Überexpression von CA RACD unverändert. Die Funktion von RACD ist daher fraglich, doch aus der Literatur ist bekannt, dass die zu RACD homologen Typ I RAC/ROP Proteine NtRAC1 und AtROP6 in die Regulation von Phytohormon vermittelten Signalkaskaden involviert sind. NtRAC1 aktiviert die Auxinsynthese in Tabakpflanzen (Tao *et al.*, 2002), während der Auxinantagonist Abscisinsäure (ABA) in *Arabidopsis* durch Inaktivierung von AtRAC1 (entspricht AtROP6) das Schließen der Stomata reguliert (Lemichez *et al.*, 2001). Daher könnte die Funktion von RACD eventuell in der Regulation von Phytohormon-responsiven Signalkaskaden liegen.

Allerdings überlappen Teile der Signalkaskaden von Pathogenabwehr und Phytohormonen, da einige Phytohormone auch modulierend in Pathogenabwehrvorgänge eingreifen. So führt beispielsweise die Erholung der Gerste von Trockenstress, der mit einer Akkumulation von ABA verbunden ist, zu einem partiellen Bruch der *mlo* Resistenz (Newton und Young, 1996). Außerdem ist in Stomatazellen, deren gesamte Physiologie von Veränderungen der ABA-Konzentration abhängt, die *mlo*-vermittelte Resistenz ebenfalls nicht wirksam (Baker *et al.*, 2000).

### **3.3.2.2 Funktionen der Typ II RAC/ROP Proteine**

Die Gruppe der Typ II RAC/ROP Proteine in Gerste beinhaltet die eng verwandten Proteine RAC3 und ROP4 sowie ROP6 und RAC1. Die Überexpression der konstitutiv aktiven Typ II RAC/ROP Proteine führte mit Ausnahme von RAC1 zur einer erhöhten Suszeptibilität der Gerste gegen *Bgh*. So steigerte die Überexpression von CA RAC3 und CA ROP4 in der Wildtyp Gerstenlinie Ingrid die Penetrationsrate um 38 % bzw. 41 %, während durch CA ROP6 eine um 26 % erhöhte Penetrationsrate erreicht wurde (Fig. 4, Schultheiss *et al.*, 2003b). Die durch CA ROP4 ausgelöste Hypersuszeptibilität stellt allerdings eine artifizielle Situation dar, da ROP4 natürlicherweise nicht in der Epidermis der Gerste exprimiert wird (Fig. 3, Schultheiss *et al.*, 2003b). Eventuell aktiviert ROP4 in der Epidermis Signalkaskaden, die normalerweise durch das eng verwandte RAC3 Protein ausgelöst werden.

Die Funktion der Typ II RAC/ROP Proteine in anderen pflanzlichen Systemen beinhaltet meist die Regulation der Produktion von  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ . Zum Beispiel löst CA OsRAC1 in Reis eine erhöhte ROI Akkumulation aus (Kawasaki *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2001). Da ROIs eine wichtige Rolle sowohl in der Aktivierung als auch in der Inhibierung der HR spielen, könnte man erwarten, dass die Überexpression von CA Typ II RAC/ROPs die HR-Raten im Gerste - *Bgh* Pathosystem verändert. Dies konnte allerdings für die Gersten RAC/ROPs nicht bestätigt werden, denn die erhöhte Suszeptibilität der Gerstenepidermiszellen nach Überexpression der RAC/ROP Proteine beruht nur auf einer erhöhten Penetration und nicht auf einer veränderten HR-Rate (unveröffentlichte Daten und Table III in Schultheiss *et al.*, 2002). So führte die Überexpression von RAC3 (Typ II) und RACB (Typ I) zu ähnlichen Effekten, unabhängig davon ob als Transformationsmarker das nur in lebenden Zellen zu sehende GFP (Sheen *et al.*, 1995) oder der Marker GUS, der auch in Zellen nachgewiesen werden kann, die eine HR vollziehen (Pontier *et al.*, 1998), verwendet wurde (unveröffentlichte Daten). Außerdem wurden in keinem Experiment Unterschiede in der Anzahl der transformierten, lebenden, d.h. GFP exprimierenden, Zellen pro Blatt im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (unveröffentlichte Daten).

In Säugern sind RAC Proteine entscheidend am Aufbau und / oder der Regulation des Superoxidradikalanionen ( $O_2^-$ )-generierenden NADPH-Oxidasekomplexes beteiligt (siehe: Bokoch und Diebold, 2002). Da in Pflanzen ein Homolog der katalytische Untereinheit der NADPH-Oxidase, GP91PHOX, gefunden wurde, besteht die Möglichkeit, dass RAC/ROPs auch in Pflanzen die Aktivität des NADPH-Oxidasekomplexes regulieren (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998). Es gibt experimentelle Hinweise, dass eine NADPH-Oxidase in die durch RAC/ROP Proteine vermittelte Aktivierung der ROI Produktion involviert ist. So ist zum Beispiel humanes RAC1 ist in der Lage, die ROI Akkumulation in Sojazzellen zu steigern (Park *et al.*, 2000). Werden Säugerzellen mit den Typ II RAC/ROPs CA ZmRACA (homolog zu RAC3) und CA ZmRACC (homolog zu RAC1) aus Mais transformiert, so erhöht sich die  $O_2^-$ -Produktion deutlich, während die Überexpression von CA ZmRACB (Typ I, homolog zu RACB) einen nur geringen Effekt zeigt. Seltsamerweise führt auch CA ZmRACD zu einer verstärkten Superoxid-Akkumulation, obwohl es sich um ein zu RACD homologes Typ I RAC/ROP Protein handelt (Hassanain *et al.*, 2000). Insgesamt scheint aber die aus tierischen Systemen bekannte Regulation der ROI Produktion durch RAC/ROP Proteine in Pflanzen konserviert zu sein.

Die von der NADPH-Oxidase produzierten Superoxidradikalanionen besitzen in der pflanzlichen Abwehr multiple Funktionen. In niedrigen Konzentrationen und im

Zusammenspiel mit NO wirkt  $O_2^-$  als Signalmolekül zur Verhinderung des programmierten Zelltods (Delledonne *et al.*, 2001). Diese Korrelation zwischen der  $O_2^-$  Akkumulation und dem Überleben der Zelle zeigt sich auch im Gerste - *Bgh* Pathosystem. Gelingt es *Bgh*, eine Epidermiszelle zu penetrieren und am Leben zu erhalten, kommt es zu einer eventuell vom Pilz induzierten Anreicherung von  $O_2^-$  um die Penetrationsstelle (Hückelhoven und Kogel, 2003). In Zellen, die erkennbar eine HR vollziehen, wurde hingegen nie eine Superoxidakkumulation nachgewiesen. Oft zeigt sich aber in deren Nachbarzellen eine  $O_2^-$  Akkumulation, die eventuell zur Verhinderung einer Ausbreitung der Zelltodreaktion beiträgt (Hückelhoven und Kogel, 2003).

Andererseits ist  $O_2^-$  in höheren Konzentrationen toxisch und führt dann zur Auslösung von Zelltod. Dies wird besonders in der *Arabidopsis lsd1* Mutante deutlich, die auf Grund einer Mutation in einem Transkriptionsfaktor über eine nur sehr geringe  $O_2^-$  detoxifizierende SOD-Aktivität verfügt. Dies resultiert in einer Hypersensibilität gegenüber Superoxid, weshalb jede Anreicherung von  $O_2^-$  zu einer sich ausbreitenden Zelltodreaktion führt (Jabs *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1997; Kliebenstein *et al.*, 1999). Die exakte Regulation der lokalen Superoxidkonzentrationen ist daher für die korrekte Funktion aller  $O_2^-$  beinhaltenden Prozesse entscheidend.

Eine weitere erst kürzlich beschriebene Funktion des  $O_2^-$  ist der Aufbau von intrazellulären Calciumgradienten. Durch Akkumulation von Superoxidradikalanionen in der Wurzelhaarspitze wird eine lokale Hyperpolarisation der apikalen Region der Plasmamembran und die folgende Öffnung von Calcium-selektiven Ionenkanälen induziert (Foreman *et al.*, 2003). Der so entstehende intrazelluläre Calciumgradient ist Voraussetzung für das polare Wachstum der Wurzelhaare. Sollte die Superoxid-generierende NADPH-Oxidase durch Typ II RAC/ROPs reguliert werden, so ergäbe sich auch für RAC/ROP Proteine des Typs II wie schon für die des Typs I eine Verbindung zu Abwehr- und polaren Wachstumsprozessen der Pflanze.

Außerdem dient  $O_2^-$  als Substrat von Superoxiddismutasen (SOD), die die Produktion von  $H_2O_2$  katalysieren, so dass die Aktivierung der NADPH-Oxidase auch zur Erhöhung der  $H_2O_2$  Level führen kann. OsRAC1 überexprimierender Reis zeigt beispielsweise eine erhöhte  $H_2O_2$  Produktion, die sich mit DPI (Diphenyliodonium), einem Inhibitor der NADPH-Oxidase, reprimieren lässt (Kawasaki *et al.*, 1999). Die erhöhte  $H_2O_2$  Konzentration ist Voraussetzung für die erhöhte Resistenz von OsRAC1 überexprimierendem Reis gegen den hemibiotrophen Pilz *Magnaporthe grisea* (Ono *et al.*, 2001). Die Funktionen von  $H_2O_2$  in der Pathogenabwehr sind vielfältig: Neben einer antimikrobiellen Wirkung wird  $H_2O_2$  zur Quervernetzung der

Zellwände benötigt, wodurch die Penetration der Pathogene in die Zelle erschwert wird (Brisson *et al.*, 1994; Mehdy, 1994). Außerdem ist die Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unerlässlich für die Auslösung der HR, die einen entscheidenden Beitrag zur Resistenz gegen viele Pathogene liefert (Levine *et al.*, 1994; Ono *et al.*, 2001).

Ein direkter Nachweis des Zusammenhangs von RAC/ROP Aktivität und ROI Akkumulation ist in Gerste allerdings bisher nicht gelungen (unveröffentlichte Daten).

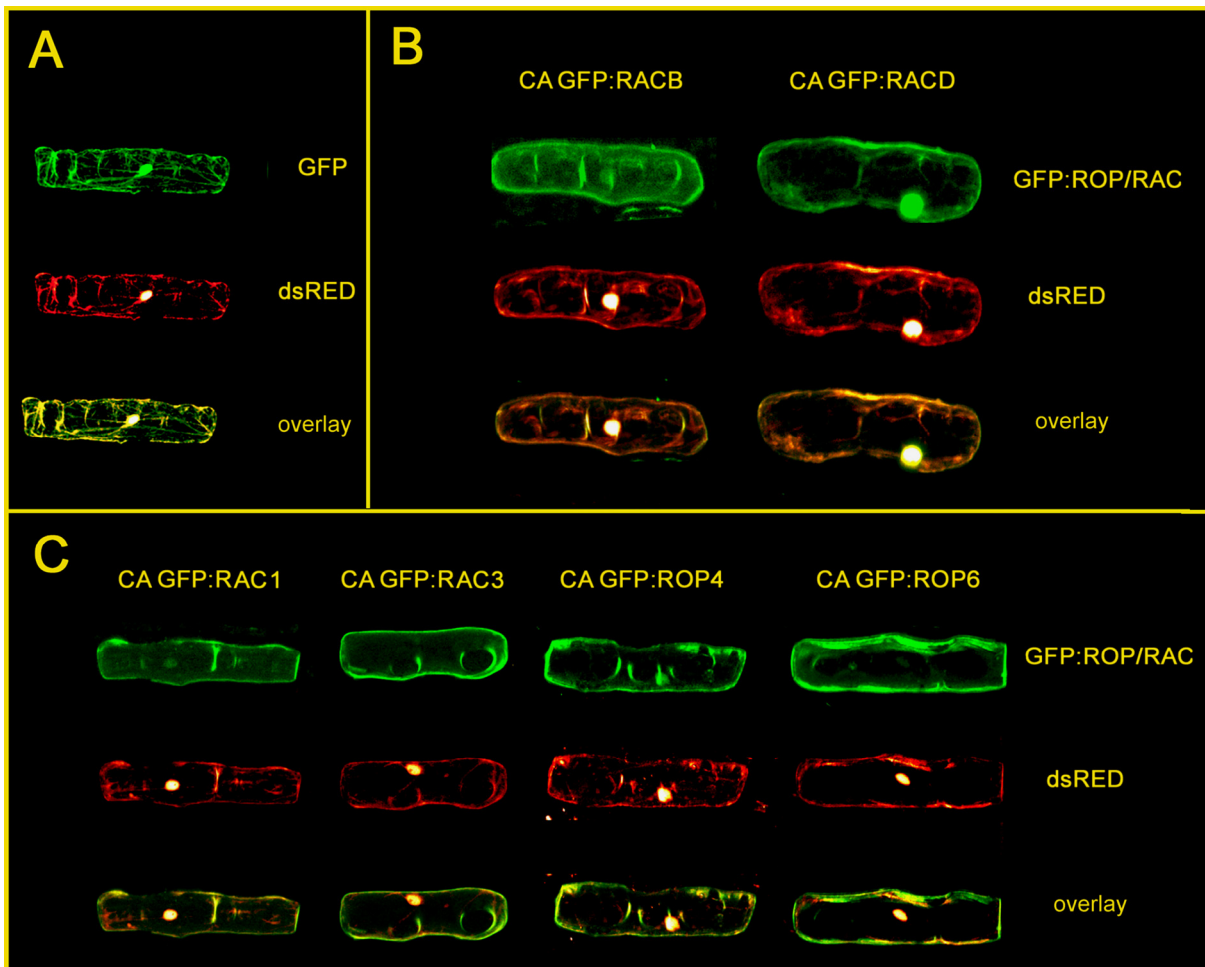
Die Überexpression von CA RAC1 führte zu keiner Veränderung der Penetrationsrate von *Bgh* in Gerste (Fig. 4 in Schultheiss *et al.*, 2003b), obwohl das RAC1 homologe OsRAC1 in Reis zu einer verstärkten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion und zu einer erhöhten Resistenz gegen den hemibiotrophen Pilz *Magnaporthe grisea* führt (Ono *et al.*, 2001). Allerdings wird OsRAC1 mit einer Resistenzgen vermittelten rassenspezifischen Abwehr in Verbindung gebracht (Ono *et al.*, 2001), während RAC1 auf seine Funktion in einer kompatiblen Interaktion mit *Bgh* getestet wurde. Auch unterscheiden sich die molekularen Mechanismen der Reis - *Magnaporthe* Interaktion völlig von denen im Gerste - *Bgh* Pathosystem. So ist in die Signaltransduktion nach *Magnaporthe* Inokulation ein heterotrimeres G-Protein involviert, das *downstream* OsRAC1 aktiviert (Suharsono *et al.*, 2002), während im Gerste - *Bgh* System eine Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen an der kompatiblen Interaktion ausgeschlossen werden kann (Kim *et al.*, 2002b). Da auch die Ähnlichkeit von RAC1 und OsRAC1 (85 %) im Vergleich zu anderen Reis und Gersten RAC/ROP Proteinen einer Untergruppe relativ gering ist, kann man spekulieren, dass RAC1 und OsRAC1 in Gerste und Reis keine identischen Funktionen erfüllen.

Alternativ könnte man für einige der Typ II RAC/ROPs, ähnlich wie für RACD, eine Funktion in Phytohormon gesteuerten Signalkaskaden postulieren, da für das Typ II RAC/ROP Protein AtROP10 eine inhibitorische Rolle in ABA vermittelten Signalkaskaden gezeigt werden konnte (Zheng *et al.*, 2002).

### **3.3.2.3 Lokalisation und Funktion der RAC/ROP Proteine**

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der RAC/ROP Proteine aus Gerste wurden GFP-RAC/ROP Fusionskonstrukte hergestellt. Die für die Lokalisation verantwortliche hypervariable Domäne (HVR), in der die posttranslational modifizierbaren Cysteinreste liegen, befindet sich am C-Terminus der RAC/ROPs. Um die Funktion der HVR nicht zu beeinträchtigen, wurde GFP immer an das N-terminale Ende der RAC/ROPs fusioniert.

Die Überexpression der GFP-RAC/ROP Fusionskonstrukte zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation ergab für alle Typ II RAC/ROPs der Gerste eine konstitutive Plasmamembranassoziation (siehe Abb. 3.3 und Fig. 6 in Schultheiss *et al.*, 2003b), obwohl keines der Typ II RAC/ROPs über eine funktionelle C-terminale Isoprenylierungsstelle (CaaX-Box) verfügt, die bei vielen G-Proteinen Voraussetzung zur Membranassoziation ist (Thompson und Okuyama, 2000). Wie jedoch mit RAC/ROP Proteinen aus *Arabidopsis* und



### Abb. 3.3 Intrazelluläre Lokalisation der konstitutiv aktiven RAC/ROP Proteine mittels konfokaler Lasermikroskopie

Die Gerstenepidermiszellen wurden transient mit GFP:RAC/ROP (grün) und DsRED (rot) transformiert. DsRED diente als zytoplasmatisch und Kern-lokalisierte Kontrolle. Die *overlays* des GFP und des DsRED Kanals zeigen bei Kolokalisation eines roten und grünen Pixels eine Gelbfärbung. Die Abbildung zeigt Projektionen von 20 - 30 optischen Schnitten mit je 3  $\mu\text{m}$  Abstand.

(A) GFP und DsRED zeigen eine ähnliche intrazelluläre Lokalisation. Beide Proteine sind sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert.

(B) Kotransformation von Gerstenepidermiszellen mit DsRED und den konstitutiv aktiven (CA) Typ I GFP:RAC/ROPs CA GFP:RACB und CA GFP:RACD. Das Fusionsprotein CA GFP:RACB ist größtenteils an die Plasmamembran assoziiert, während der Hauptteil von CA GFP:RACD sowohl im Zellkern als auch an der Plasmamembran lokalisiert ist.

(C) Kotransformation von Gerstenepidermiszellen mit DsRED und den CA Typ II GFP:RAC/ROPs. Alle CA Typ II RAC/ROPs zeigen eine deutliche Plasmamembranassoziation, wobei ROP4 auch zu einem kleinen Teil im Kern lokalisiert ist.

Mais gezeigt wurde, hängt die Membranlokalisation der Typ II RAC/ROPs von einer Palmitoylierung der Cysteine innerhalb der polybasischen Domäne ab (Ivanchenko *et al.*, 2000; Lavy *et al.*, 2002).

Da die permanente Lokalisation der Typ II RAC/ROPs an der Plasmamembran (PM) über Artengrenzen hinweg konserviert ist, muss sie essentiell sein. So verliert RAC3 seine Funktion in der Gerste - *Bgh* Interaktion, wenn die PM-Lokalisation durch Entfernung der für die Lokalisation verantwortlichen C-terminalen HVR verhindert wird (Fig. 6 in Schultheiss *et al.*, 2003b).

Auch Typ I RAC/ROP Proteine sind an der PM lokalisiert, wie durch Überexpression der entsprechenden N-terminalen GFP-Fusionskonstrukte gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3.3 und Fig. 6 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Allerdings war die Assoziation an die Membran im Vergleich zu den Typ II RAC/ROPs weniger ausschließlich. So konnte CA GFP-RACB außer an der PM auch zu geringen Teilen im Kern und im Zytoplasma gefunden werden, während CA GFP-RACD fast ausschließlich im Kern und an der PM akkumulierte. Für Typ I RAC/ROPs aus *Arabidopsis* konnte entweder eine konstitutive PM Assoziation (Fu *et al.*, 2002; Nakanomyo *et al.*, 2002) oder eine Lokalisation ausschließlich im Zytoplasma gezeigt werden (Bischoff *et al.*, 2000).

Für die Anlagerung der Gersten Typ I RAC/ROPs an die PM ist wie auch bei den humanen RAC Proteinen eine C-terminale CaaX-Box verantwortlich, die posttranslational isoprenyliert wird (Thompson und Okuyama, 2000). Wird ein verkürztes GFP-RACB Konstrukt, das über keine CaaX - Box mehr verfügt (CA GFP-RACB $\Delta$ CSIL), in Gerstenepidermiszellen überexprimiert, so befindet sich dieses Protein ausschließlich im Zytoplasma und im Zellkern. Auch zeigt das verkürzte und deshalb falsch lokalisierte CA RACB $\Delta$ CSIL Protein keine Funktion in der Modulation der Gerste - *Bgh* Interaktion (Fig. 6 in Schultheiss *et al.*, 2003b). Die Isoprenylierung der CaaX - Box ist also für die Lokalisation und Funktion von RACB essentiell.

Da alle RAC/ROPs auch als Wildtyp GFP-RAC/ROP Fusionsproteine konstitutiv an die Plasmamembran assoziiert sind (unveröffentlichte Daten), scheint der aus Tieren bekannte Kreislauf von inaktivem RAC im Zytoplasma und aktivem RAC an der PM (Hall, 1998) in Pflanzen nicht adäquat zu existieren. Die strikte und konstitutive Lokalisation der pflanzlichen RAC/ROP Proteine lässt die Spekulation zu, dass sowohl die *up-* als auch *downstream* Elemente der RAC/ROPs, wie eventuell Ionenkanäle, MLO und NADPH-Oxidase in oder an der Plasmamembran lokalisiert sind.

### 3.3.3 RAC/ROP Proteine als Suszeptibilitätsfaktoren

Zur Besiedlung der Gerste muss *Bgh* drei aufeinanderfolgende Ereignisse initiieren. Erstens muss die Zellwand der Wirtszelle durchbrochen und die Plasmamembran zur Etablierung des Haustoriums eingestülpt werden. Zweitens ist die Suppression der Abwehr des Wirts nötig, und drittens sollte die Wirtszelle solange am Leben bleiben und Nährstoffe liefern, bis der Lebenszyklus des Mehltaupilzes abgeschlossen ist (Schulze-Lefert und Vogel, 2000; Panstruga, 2003). Jede der drei Stufen erfordert vom Pilz ausgehende Signale, die „normale“ Stoffwechselfvorgänge der Wirtszelle zum Nutzen des Pilzes umprogrammieren.

Bestimmte Mutationen seitens der Pflanze können zum Ausfall einzelner vom Pathogen benötigter pflanzlicher Komponenten führen. Die so erworbene Resistenz gegen den Erreger beruht damit nicht auf einer konstitutiven Aktivierung der pflanzlichen Pathogenabwehr, wie es beispielsweise bei den *cpr*- und *lsd*-Mutanten aus *Arabidopsis* der Fall ist (Bowling *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1997), sondern auf dem Verlust bestimmter für die Pathogenese essentieller Faktoren, die auch als Suszeptibilitätsfaktoren bezeichnet werden. Da durch den Ausfall eines endogenen Proteins auch andere zelluläre Prozesse gestört werden, zeigen die resistenten Pflanzen oft pleiotrope Effekte. Einhergehend mit einer verringerten Vitalität ist oft das Wachstum reduziert oder die Morphogenese verändert, so dass sich diese resistenten Mutanten in der Natur nicht durchsetzen können (Vogel und Somerville, 2000; Toyoda *et al.*, 2002).

Die bisher bekannten pflanzlichen Suszeptibilitätsfaktoren wirken durch sehr unterschiedliche Mechanismen auf die Wirt - Pathogen Interaktion. So handelt es sich bei PMR6, einem Suszeptibilitätsfaktor im *Arabidopsis* - *Erysiphe cichoracearum* Pathosystem, um eine in der Plasmamembran lokalisierte Pektinlyase. Die Mutation des *Pmr6*-Gens führt, neben einer fast vollständigen Resistenz gegen *E. cichoracearum*, zu Kleinwuchs und zu Veränderungen im Zellwandaufbau (Vogel *et al.*, 2002). Warum *pmr6*-Mutanten resistent sind, ist nicht sicher geklärt. Es wird aber vermutet, dass der Ausfall der Pektinlyase zu einer Überladung der extrahaustorialen Matrix mit Pektin führt, wodurch die Ernährungssituation des Pilzes so verschlechtert wird, dass er vor Vollendung seines Lebenszyklus abstirbt (Vogel *et al.*, 2002). Andere Suszeptibilitätsfaktoren werden vom Pathogen benötigt, um Abwehrreaktionen in den attackierten Pflanzenzellen und im umgebenden Gewebe zu verhindern. So führt ein Defekt in der MAPKKK EDR1 aus *Arabidopsis* zu einer verstärkten und länger andauernden Abwehrreaktion gegen Mehltaupilze (Frye und Innes, 1998). Das Pathogen wird in einer *edr1*-Pflanze erst sehr spät durch eine großflächige Mesophyll-HR gestoppt. Wahrscheinlich

dient EDR1 normalerweise der Eindämmung von Zelltodreaktionen und wird von *E. cichoracearum* aktiv genutzt, um die zelluläre Abwehr zu inhibieren (Frye *et al.*, 2001).

Selbst wenn die Pathogenese-unabhängigen Mechanismen der RAC/ROP Funktion in der Pflanze geklärt wären, so bliebe die Frage wie einige der RAC/ROP Proteine als Suszeptibilitätsfaktoren im Gerste - *Bgh* Pathosystem fungieren.

Die beiden folgenden Kapitel geben einen Überblick über mögliche Interaktionen von RAC/ROP-Proteinen und Suszeptibilitäts- bzw. Pathogenitätsfaktoren.

### 3.3.3.1 Kooperation der RAC/ROPs mit anderen Suszeptibilitätsfaktoren

Der *knock-down* des kleinen G-Proteins RACB führte zu einer erhöhten Resistenz der Gerste gegen *Bgh*, während die Überexpression von RACB, RAC3, ROP4 und ROP6 die Anfälligkeit verstärkte (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003b). Da ROP4 natürlicherweise nicht in der Epidermis exprimiert wird, sind somit drei der sechs RAC/ROP Proteine Suszeptibilitätsfaktoren im Gerste - *Bgh* Pathosystem. Der Wirkmechanismus ist noch ungeklärt, aber scheinbar ergeben sich Verbindungen zu anderen beschriebenen Suszeptibilitätsfaktoren, wie zum Beispiel PMR4 und MLO.

Das *Arabidopsis Pmr4*-Gen kodiert für eine Kallozesynthese, die spezifisch durch biotischen und abiotischen Stress aktiviert wird. Die *pmr4*-Mutante zeigt keine Kalloseablagerungen in Papillen, ist aber resistent gegen Mehлтаupilze. Die Resistenz gegen *Erysiphe cichoracearum* beruht auf Zelltodreaktionen unterhalb der Infektionsstelle. Auch hier ist der Resistenz-auslösende Mechanismus noch nicht geklärt, es wird aber spekuliert, dass die fehlende Kalloseablagerung von der Zelle erkannt wird, und dies zur Verstärkung der nachfolgenden Abwehrmaßnahmen führt (Nishimura *et al.*, 2003). Aus Hefe ist bekannt, dass kleine G-Proteine der Rho Familie die der Kallozesynthese homologe  $\beta$ -(1-3)-Glukansynthase aktivieren (Qadota *et al.*, 1996). In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass ROP1 in einem Mitose-spezifischen Kallozesynthesekomplex gebunden ist (Verma und Hong, 2001). Sollte sich die regulatorische Funktion der RAC/ROP Proteine in der Kallozesynthese auch in Gerste bestätigen, würde der *knock-down* von RAC/ROP den Kallozesynthesekomplex hemmen. Analog zur *pmr4*-Mutante sollte die Verringerung der Kalloseablagerung in den Papillen zur Aktivierung der nachfolgenden Abwehrreaktionen und somit zu erhöhter Resistenz der Gerste gegen Mehltau führen (siehe Abb. 3.4 C).

Der Ausfall des Transmembranproteins MLO vermittelt vollständige Resistenz der Gerste gegen *Bgh* (Jorgensen, 1992; Büschges *et al.*, 1997). Wie die meisten Mutationen in

Suszeptibilitätsfaktoren führt auch die *mlo*-Mutation zu pleiotropen Effekten. So zeigen sich bei älteren Pflanzen Läsionen auf den Blättern, die spontanen Zelltodreaktionen zuzuschreiben sind (Jorgensen, 1992).

Das MLO Protein scheint allgemein ein negativer Regulator der Pathogenabwehr zu sein, da alle Abwehrmechanismen gegen *Bgh* im *mlo*-Mutanten zwar nicht konstitutiv exprimiert, aber bei Pathogenbefall deutlich schneller und stärker induziert werden (Freialdenhoven *et al.*, 1996; Peterhänsel *et al.*, 1997). Dies führt zu einer vollständigen Penetrationsresistenz, die mit einer starken Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PR-Proteinen einhergeht (Peterhänsel *et al.*, 1997; Hückelhoven *et al.*, 1999). Die Funktion des MLO Proteins liegt wahrscheinlich in einer Begrenzung der Abwehrreaktionen, die sowohl durch Anreicherung zytotoxischer Substanzen als auch durch eine zu starke Ausbreitung von Zelltodreaktionen die gesamte Pflanze gefährden würden (Piffanelli *et al.*, 2002; Toyoda *et al.*, 2002). Ein Hinweis auf die Abwehr-modulierende Funktion von MLO ergibt sich aus der Tatsache, dass die Überexpression von MLO in anfälligen Wildtyplinien zur Hypersuszeptibilität führt (Kim *et al.*, 2002b), das bedeutet die Suppression der Abwehr durch MLO unter der Kontrolle seines eigenen Promotors ist unvollständig. Somit hat die Gerstenpflanze die Möglichkeit, durch genaue Regulation der MLO Konzentration, eine Balance zwischen ausreichender Pathogenabwehr und Schutz der Wirtszellen zu halten.

Allerdings scheint diese Balance für einige Pathogene nicht optimal eingestellt zu sein. So ist eine komplette Repression von MLO optimal, um *Bgh* abzuwehren, während die Inhibition von MLO nach Befall mit *Magnaporthe grisea* und *Bipolaris sorokiniana* zu erhöhter Anfälligkeit führt (Jarosch *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2001).

Die Rolle der RAC/ROP Proteine in der Regulation der Abwehrreaktionen durch MLO ist noch nicht sicher nachgewiesen, aber durch die Ergebnisse dieser Arbeit naheliegend (siehe Abb. 3.4 B) Die Aktivierung von RAC/ROP Proteinen führt zur Öffnung von Calciumkanälen, wodurch die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt (Li *et al.*, 1999; Molendijk *et al.*, 2001). Die erhöhte Konzentration an Calciumionen bedingt, über die Bindung an Calmodulin, eine Aktivitätssteigerung von MLO, wodurch die Zelle suszeptibler gegen *Bgh* wird (Kim *et al.*, 2002b).

Die Resistenz vermittelnde *mlo*-Mutation ist abhängig vom Vorhandensein des *downstream* Effektors ROR1 (Freialdenhoven *et al.*, 1996). Auch der Resistenz-erhöhende Effekt des *knock-down* von RAC/ROP ist auf funktionelles ROR1 angewiesen (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2003b). Somit ist neben der indirekten Aktivierung von MLO durch RAC/ROP auch eine Konvergenz in den nachgeschalteten Signalkaskaden wahrscheinlich.

### 3.3.3.2 RAC/ROP Proteine als Angriffspunkte für Pathogenitätsfaktoren

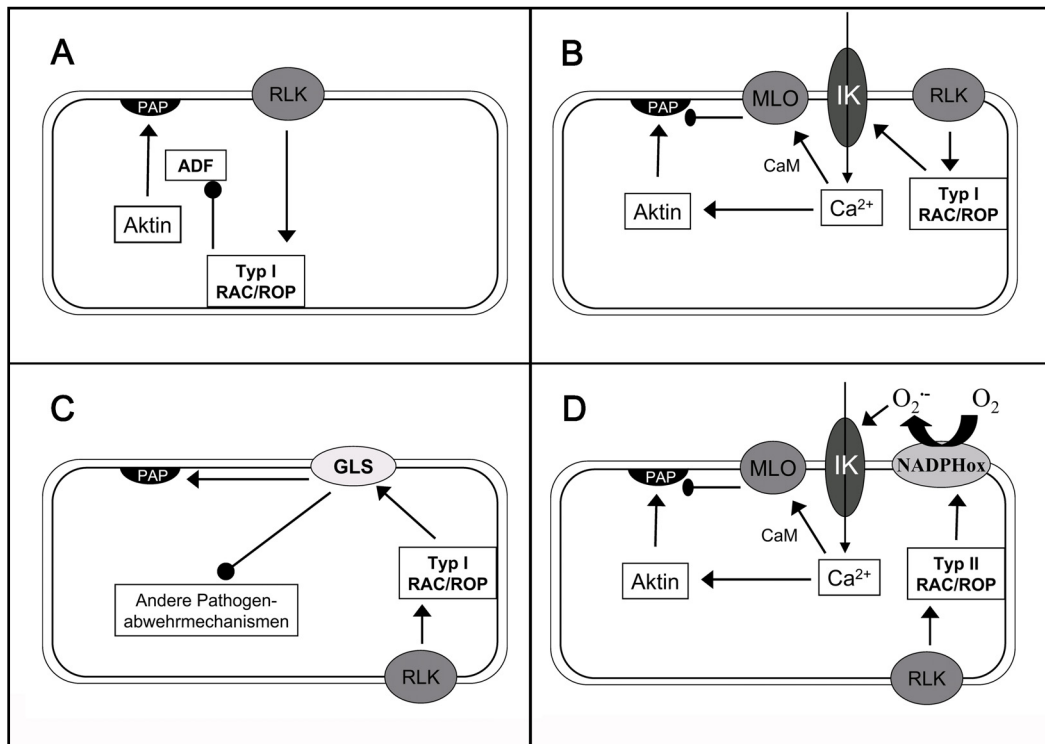
Der Angriff eines Pathogens auf eine Pflanze führt zu einer massiven Veränderung des Metabolismus und der intrazellulären Morphologie. Die Reorganisation des Zytoskeletts ist dabei Voraussetzung für die konzentrierte Akkumulation von Zytoplasma, Zellwandbestandteilen und antimikrobiellen Substanzen am Ort der Infektion (Schmelzer, 2002). So erhöhen viele tierische, aber auch einige pflanzliche Pathogene ihre Infektionschancen, indem sie die Ausrichtung des Zytoskeletts auf den Angriffsort verhindern oder verlangsamen (Belyi, 2002; Büttner und Bonas, 2003). Dies soll im Folgenden an den Infektionsstrategien einiger ausgewählter bakterieller Krankheitserreger erläutert werden.

Viele dieser Erreger verfügen über ein sogenanntes Typ III Sekretionssystem, das es dem Pathogen ermöglicht, Effektormoleküle direkt in die Wirtszelle einzuspritzen (Galan und Collmer, 1999). Ein großer Teil der Typ III Effektoren greift das Zytoskelett direkt oder indirekt an. So verhindert zum Beispiel das C2 Toxin von *Clostridium botulinum* die Aktinpolymerisation durch ADP-Ribosylierung der Aktinmonomere. Andere Typ III Effektorproteine modifizieren Zytoskelett-regulierende Proteine wie die kleinen G-Proteine der Rho Familie und erreichen so einen Umbau des Aktinzytoskeletts. Je nach Pathogen und Infektionsstrategie werden die kleine G-Proteine aktiviert bzw. inhibiert (Barbieri *et al.*, 2002). So hemmt das YopE Toxin aus *Yersinia* RHO Proteine, indem es die intrinsische GTPase der RHO Proteine aktiviert, während das gleichzeitig injizierte YopT die C-terminale hypervariable Domäne der RHO GTPasen proteolytisch abtrennt und das Protein somit irreversibel inaktiviert. Beide Prozesse führen zur Depolymerisation von Aktinfasern und reduzieren somit den gerichteten Transport der zellulären Abwehrkomponenten. Bei SopE aus *Salmonella typhimurium* handelt es sich um einen Faktor, der das an inaktives RAC gebundene GDP gegen GTP austauscht und das RAC Protein somit aktiviert (Steele-Mortimer *et al.*, 2000). Die Aktivierung von RAC führt zur Ausbildung von Membranfalten und Filopodien, die es dem Pathogen erleichtern, in die Zelle einzudringen.

In Pflanzen ist nur wenig über die Funktion Pathogenese-fördernder Effektormoleküle bekannt. Zwar wurden viele pilzliche AVR-Proteine isoliert, aber diese wurden bislang nur im Bezug auf die Auslösung der HR in der rassenspezifischen Resistenz untersucht. Heute geht man davon aus, dass AVR-Proteine in der kompatiblen Interaktion als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren fungieren (Büttner und Bonas, 2003).

Das AVR-Protein AvrPphB von *Pseudomonas syringae* führt in resistenten, das R-Gen *Rps5* tragenden *Arabidopsis* Pflanzen zur HR (Warren *et al.*, 1999). In Pflanzen, die nicht über

RPS5 verfügen, ist AvrPphB ein Pathogenitätsfaktor, der in Struktur und Funktion hohe Homologien zu dem *Yersinia* Typ III Effektor YopT zeigt (Shao *et al.*, 2002). Bei AvrPphB handelt es sich um eine Protease, die eine zytoplasmatische Kinase (PBS1) inaktiviert (Shao *et al.*, 2003). Die Funktion dieser Kinase in der pflanzlichen Signaltransduktion ist noch nicht bekannt, aber es ist zu vermuten, dass der Ausfall der PBS1 Signalkaskade die Pathogenese von *Pseudomonas* erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht.



**Abb. 3.4 Hypothetische Darstellung der Verbindung von RAC/ROP Proteinen mit Komponenten des zellulären Pathogenabwehrsystems**

Beschreibung siehe Text.

Abkürzungen: ADF: Aktindepolymerisationsfaktor, CaM: Calmodulin, GLS: Glukansynthase, IK: Calcium-Ionenkanal, NADPHox: NADPH-Oxidase, PAP: Papille, RLK: Rezeptor-like Kinase

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Pathogenese ist die Repression der pflanzlichen Abwehr. Der Typ III Effektor AvrPtoB aus *P. syringae* hemmt den pflanzlichen programmierten Zelltod, der zur Abwehr des Pathogens notwendig ist. Dabei ist die Hemmung des PCD durch AvrPtoB sehr effektiv und breit wirksam, da auch Zelltod inhibiert wird, der durch  $H_2O_2$  oder den tierischen proapoptotischen Faktor BAX ausgelöst wurde (Abramovitch *et al.*, 2003).

Obwohl ein Einfluss mikrobieller Pathogenitätsfaktoren auf das Zytoskelett oder die ROI-Produktion in Pflanzen bisher noch nicht gezeigt wurde, ist davon auszugehen, dass auch pflanzliche Pathogene die Erfolgsaussichten ihrer Pathogenese erhöhen, indem sie das Zytoskelett und oder die pflanzliche Abwehr stören.

Analog zu tierischen Pathosystemen wären die kleinen G-Proteine der RAC/ROP Familie ideale Ziele solcher Effektoren. So führt die Fehlregulation der RAC/ROPs zu Veränderungen im Aufbau des Zytoskeletts, der Aktivierung der NADPH-Oxidase (siehe Abb. 3.4 D), dem Zusammenbruch von intrazellulären Calciumgradienten und eventuell auch zu einer erhöhten Kallososeynthese (Li *et al.*, 1999; Verma und Hong, 2001; Foreman *et al.*, 2003). All diese Prozesse wirken sich wie auch die Überexpression verschiedener RAC/ROP Proteine wahrscheinlich negativ auf die Abwehrbereitschaft der Pflanze aus (Schultheiss *et al.*, 2003b). Die Störung des Aktinzytoskeletts führt zu einem langsameren und ineffizienteren Transport von Abwehrkomponenten sowie zu einer verringerten Konzentration der Abwehrmaßnahmen auf die Angriffsstelle (Schmelzer, 2002). Im Gerste - *Bgh* Pathosystem erfolgt direkt nach Erkennung des Pathogens eine massive Umlagerung des Zytoskeletts, die für eine effektive Abwehr essentiell ist. So korreliert die Verhinderung der Reorganisation des Zytoskeletts mit einer erhöhten Penetrationsrate von Mehltaupilzen in Gerste (Kobayashi *et al.*, 1997). Auch kommt es unmittelbar nach Penetration zu einer erneuten Umgestaltung des Zytoskeletts (persönliche Mitteilung K. Opalski und R. Hückelhoven). Diese wird wahrscheinlich durch ein Signal des penetrierenden Pilzes ausgelöst und ist Voraussetzung für die Einstülpung der Plasmamembran zur Etablierung eines Haustoriums. Der Einstülpungsprozess ist assoziiert mit einem polaren Membranwachstum an der Spitze des Haustoriums. Man kann spekulieren, dass die Aktivität der RAC/ROP Proteine für diese Art von „invertiertem“ polarem Wachstum notwendig ist (siehe Abb. 3.4 A).

Neben der Störung des Zytoskeletts würde die Aktivierung der RAC/ROP Proteine durch *Bgh* auch weitere die allgemeine Abwehr schwächende Folgen haben. So scheint die wahrscheinlich von RAC/ROP gesteuerte Ablagerung von Kallose in den Papillen, andere Abwehrreaktionen zu inhibieren (Nishimura *et al.*, 2003). Die gesteigerte Superoxidproduktion durch die RAC/ROP aktivierte NADPH-Oxidase führt im Zusammenspiel mit  $H_2O_2$  und Kupferionen zur Bildung von Hydroxylradikalen (Haber-Weiß-Reaktion), die eine Lockerung der Zellwand durch Degradation von Polysacchariden induzieren und somit die Penetration von *Bgh* erleichtern (Fry, 1998; Schopfer *et al.*, 2002). Außerdem hemmt die RAC/ROP abhängig erhöhte  $O_2^-$  Konzentration gemeinsam mit NO die Auslösung der HR (Delledonne *et al.*, 2001) und verändert über ROI-aktivierte Ionenkanäle den Calciumhaushalt der Zelle (Foreman *et al.*, 2003). Eine erhöhte Calciumkonzentration beeinflusst die Zellpolarität (Li *et al.*, 1999), wodurch die Fokussierung der Abwehrmaßnahmen eventuell verringert wird und aktiviert gleichzeitig das MLO Protein (siehe

Abb. 3.4 B und D), wodurch das gesamte pflanzliche Pathogenabwehrsystem weiter gehemmt wird (Kim *et al.*, 2002b).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch *Bgh* verschiedene Effektorproteine in die pflanzliche Wirtszelle einbringt, die aber bisher nur in ihrer Eigenschaft als Resistenz auslösende AVR-Proteine untersucht wurden. In Zukunft müssen die AVR-Proteine isoliert und Funktionen in der kompatiblen Interaktion überprüft werden. Bei der Identifikation der pflanzlichen Zielproteine der AVR-Proteine sollte den kleinen G-Proteinen der RAC/ROP Familie besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Im Falle einer durch *Bgh* induzierten RAC/ROP Aktivierung könnten viele der für die *Bgh*-Pathogenese typischen Veränderungen in der Akkumulation von ROIs und der Organisation des Zytoskeletts erklärt werden.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Der Echte Gerstenmehltaupilz, *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*), ist ein obligat biotropher Ektoparasit der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Die Penetration der Epidermiszellwand durch den Pilz ist Voraussetzung zur Einstülpung der Plasmamembran und der nachfolgenden Etablierung von Haustorien, die der Ernährung des Pathogens dienen. Zur Verhinderung der Penetration der Zellwand verfügt die Gerste unter anderem über ein apoplastisch wirkendes Abwehrsystem. Die Expression des apoplastischen *pathogenesis related* (PR) Protein 1B in Gerstenblättern nach *Bgh* Inokulation korrelierte zeitlich und räumlich mit den Resistenzreaktionen verschiedener anfälliger und resistenter Gerstenlinien. Zur funktionellen Analyse wurde die Expression von *PR-1b* durch RNA Interferenz mittels transgener biolistischer Transformation von *PR-1b*-dsRNA inhibiert. Da der transiente *knock-down* von *PR-1b* die Penetrationsresistenz der Gerste erniedrigte, handelt es sich bei PR-1B wahrscheinlich um ein Protein des extrazellulären Pathogenabwehrkomplexes.

Viele Erreger beeinflussen pflanzliche Signaltransduktionskaskaden, um bestimmte physiologische Eigenschaften der Wirtszelle wie zum Beispiel den Aufbau des Zytoskeletts und den Redoxzustand ihren Bedürfnissen anzupassen. An diesen Prozessen sind in tierischen wie auch in pflanzlichen Systemen kleine G-Proteine der RAC/ROP Familie beteiligt. In einem PCR-basierten Kandidatengenansatz wurden sechs unterschiedliche Gersten-cDNA-Sequenzen identifiziert, die für RAC/ROP Proteine der Gerste kodieren. Der transiente *knock-down* von RACB durch RNA Interferenz erhöhte die Penetrationsresistenz von Wildtyp Gerstenlinien gegenüber *Bgh*. In Gerstenlinien, die einen Defekt im *Ror1*- Gen aufweisen, zeigte der *knock-down* von RACB jedoch keinen Effekt. Dies bedeutet, dass die durch RNAi von *RacB* vermittelte Resistenz, ebenso wie die *mlo*-Resistenz von funktionellem ROR1 abhängig ist. Die Überexpression von konstitutiv aktiviertem RACB, RAC3, ROP4 und ROP6 führte zu einer erhöhten Anfälligkeit von Gerste gegen *Bgh*, während die Überexpression von konstitutiv aktivem RAC1 und RACD keinen Einfluss auf die Gerste - *Bgh* Interaktion zeigte. Somit sind einige der kleinen G-Proteine spezifische Suszeptibilitätsfaktoren in der Regulation der Penetrationsresistenz von Gerste gegen *Bgh*. Die intrazelluläre Lokalisation von GFP:RAC/ROP Fusionsproteinen zeigte eine konstitutive Assoziation aller RAC/ROP Proteine mit der Plasmamembran. Diese ist für die Funktion der RAC/ROP Proteine essentiell, da die Verhinderung der Plasmamembranassoziation durch Mutagenese der Lokalisationsdomäne mit einem Verlust der Suszeptibilität-erhöhenden Funktion in der Gerste - *Bgh* Interaktion einhergeht.

## 5 SUMMARY

The biotrophic barley powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) attacks epidermal cells of barley (*Hordeum vulgare* L.). The first step of pathogenesis is the penetration of the cell wall and the invagination of the plasma membrane followed by the establishment of a haustorium, which is required for nutrition of *Bgh*. Accordingly the first line of defence against *Bgh* is represented by an apoplastic defence system. The expression of the apoplastic pathogenesis related (PR) protein 1B correlates temporally and spatially with the onset of defence reactions in near-isogenic barley lines exhibiting various forms of defence phenotypes including papilla formation and the hypersensitive cell death. To elucidate PR-1B function, *PR-1b* expression was transiently silenced by double stranded RNA (dsRNA) interference using microprojectile mediated transformation of single barley epidermal cells and observed a decreased penetration resistance of barley to *Bgh*. This indicates that PR-1B is part of the apoplastic defence machinery.

The early interaction of barley and powdery mildew is accompanied by the remodelling of the cytoskeleton and the accumulation of reactive oxygen species (ROI). Small G-Proteins are known to be involved in the production of superoxide ( $O_2^-$ ) and the assembly of actin fibres. Using a candidate RT-PCR approach six cDNAs were identified coding for RAC/ROP proteins of barley. The transient knock-down of *RacB* led to a lower penetration efficiency up to 60 % in susceptible barley lines. Surprisingly the inhibition of *RacB* expression had no effect in mutant barley lines lacking the *Ror1* gene. That leads to the assumption that the *RacB* RNAi effect is dependent on a functional ROR1 that is also required for broad-spectrum *mlo*-mediated resistance to *Bgh*.

The overexpression of constitutively activated (CA) mutant RAC/ROP proteins led to a RAC/ROP-specific enhancement of accessibility to *Bgh*. The overexpression of CA RACB, CA RAC3, CA ROP4 and CA ROP6 enhanced the accessibility of barley to *Bgh*. Because CA RACD and CA RAC1 did not influence barley - *Bgh* interaction, it seems that some of the RAC/ROP proteins might be specific susceptibility factors, involved in processes supporting parasitic entry into epidermal host cells. Confocal laser scanning microscopy of GFP:HvRAC/ROP transformed cells revealed varying strengths of plasma membrane-association of barley RAC/ROPs. The C-terminal localisation domain was essential for membrane association and proper function of the RAC/ROPs in inducing accessibility of barley to *Bgh*.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abad, L. R., Paino D'Urzo, M., Liu, D., Narasimhan, M. L., Reuveni, M., Zhu, J. K., Niu, X., Singh, N. K., Hasegawa, P. M. und Bressan, R. A. (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 118, 11-23.
- Abramovitch, R. B., Kim, Y. J., Chen, S., Dickman, M. B. und Martin, G. B. (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *Embo J* 22, 60-69.
- Agrawal, G. K., Iwahashi, H. und Rakwal, R. (2003). Small GTPase 'Rop': molecular switch for plant defense responses. *FEBS Lett* 546, 173-180.
- Agrios, G. N. (1997). *Plant Pathology*, 4<sup>th</sup> edition edn (San Diego, USA, Academic Press).
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl Goy, P., Luntz, T., Ward, E. und Ryals, J. (1993). Increased tolerance to two Oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7327-7331.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. und Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-983.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. und Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295, 2073-2076.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. und Dinesh-Kumar, S. P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276, 726-733.
- Baker, S. J., Newton, A. C. und Gurr, S. J. (2000). Cellular characteristics of temporary partial breakdown of *mlo*-resistance in barley to powdery mildew. *Physiol Mol Plant Pathol* 56, 1-11.
- Barbieri, J. T., Riese, M. J. und Aktories, K. (2002). Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 315-344.
- Beckhove, U., Kogel, K.-H. und Schmelzer, E. (1996). Acquired resistance in barley: Early accumulation of the potentiometric dye DiOC<sub>6</sub> in cytoplasmic aggregates beneath the primary germ tube of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* of cells of barley coleoptiles induced by 2,6-Dichlorisonicotinic acid. In *Intercept of the 11th International Symposium of Modern Fungicides and Antifungal Compounds 1995*, H. Lyr, P. E. Russell, und H. D. Sisler, eds.
- Belyi, I. F. (2002). Actin machinery of phagocytic cells: universal target for bacterial attack. *Microsc Res Tech* 57, 432-440.
- Bent, A. F. (1996). Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* 8, 1757-1771.

- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. und Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G. und Kogel, K.-H. (2000). Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol Plant Pathol* 1, 277-286.
- Bischoff, F., Vahlkamp, L., Molendijk, A. und Palme, K. (2000). Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 42, 515-530.
- Blatt, M. R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K. und Jones, J. D. (1999). K<sup>+</sup> channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J* 19, 453-462.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N. und Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12, 1425-1440.
- Bohlmann, H. und Apel, K. (1987). Isolation and characterization of cDNAs coding for leaf-specific thionins closely related to the endosperm-specific hordothionin of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Gen Genet* 207, 446-454.
- Bokoch, G. M. und Diebold, B. A. (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 100, 2692-2696.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D. und Osbourn, A. (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418, 889-892.
- Bowling, S. A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A. S., Klessig, D. F. und Dong, X. (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1845-1857.
- Bowyer, P., Clarke, B. R., Lunness, P., Daniels, M. J. und Osbourn, A. E. (1995). Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267, 371-374.
- Boyd, L. A., Smith, P. H., Foster, E. M. und Brown, J. K. M. (1995). The effects of allelic variation at the *Mla* resistance locus in barley on the early development of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and host responses. *Plant J* 7, 959-968.
- Brederode, F. T., Linthorst, H. J. M. und Bol, J. F. (1991). Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol Biol* 17, 1117-1125.
- Briggs, S. P. und Johal, G. S. (1994). Genetic patterns of plant host-parasite interactions. *Trends Genet* 10, 12-16.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R. und Lamb, C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712.

- Brosch, G., Ransom, R., Lechner, T., Walton, J. D. und Loidl, P. (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* 7, 1941-1950.
- Brown, J. K. M. und Wolfe, M. S. (1991). Levels of resistance of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* to the systemic fungicide triadimenol. *Neth J Plant Pathol* 97, 251-263.
- Bryngelsson, T., Sommer-Knudsen, J., Gregersen, P. L., Collinge, D. B., Ek, B. und Thordal-Christensen, H. (1994). Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. *Mol Plant Microbe Interact* 7, 267-275.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., *et al.* (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88, 695-705.
- Büttner, D. und Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 6, 312-319.
- Camacho, L. und Malho, R. (2003). Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by  $Ca^{2+}$  and GTPases. *J Exp Bot* 54, 83-92.
- Chamnonpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr., Van Montagu, M., Inze, D. und Van Camp, W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by  $H_2O_2$  in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5818-5823.
- Chandok, M. R., Ytterberg, A. J., van Wijk, K. J. und Klessig, D. F. (2003). The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* 113, 469-482.
- Chen, C. Y., Cheung, A. Y. und Wu, H. M. (2003). Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth. *Plant Cell* 15, 237-249.
- Cheng, S. H., Sheen, J., Gerrish, C. und Bolwell, G. P. (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett* 503, 185-188.
- Chester, K. S. (1933). The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quart Rev Biol* 8, 275-324.
- Cheung, A. Y., Chen, C. Y., Tao, L. Z., Andreyeva, T., Twell, D. und Wu, H. M. (2003). Regulation of pollen tube growth by Rac-like GTPases. *J Exp Bot* 54, 73-81.
- Christensen, A. B., Cho, B. H., Naesby, M., Gregersen, P. L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D. B. und Thordal-Christensen, H. (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathol* 3, 135-144.
- Clough, S. J., Fessler, K. A., Yu, I. C., Lippok, B., Smith, R. K., Jr. und Bent, A. F. (2000). The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9323-9328.
- Cohn, J., Sessa, G. und Martin, G. B. (2001). Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* 13, 55-62.

- Collinge, D. B., Gregersen, P. L. und Thordal-Christensen, H. (2002). The nature and role of defence response genes in cereals. In *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*, R. R. Belanger, und W. R. Bushnell, eds. (St. Paul, Minnesota, USA, APS Press), pp. 146-160.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. und Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7, 210-216.
- Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffiths, J. S. und Somerville, C. R. (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3718-3723.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. und Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.
- Dangl, J. L. und Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Davidson, A. D., Manners, J. M., Simpson, R. S. und Scott, K. J. (1987). cDNA cloning of mRNAs induced in resistant barley during infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Plant Mol Biol* 8, 77-85.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. und Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. und Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13454-13459.
- Desikan, R., S, A. H.-M., Hancock, J. T. und Neill, S. J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127, 159-172.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G. und Schulze-Lefert, P. (1999). Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the *Mlo* family in plants. *J Biol Chem* 274, 34993-35004.
- Dietrich, R. A., Richberg, M. H., Schmidt, R., Dean, C. und Dangl, J. L. (1997). A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88, 685-694.
- Dixon, R. A. und Paiva, N. L. (1995). Stress-induced Phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Doke, N. (1983). Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol Plant Pathol* 23, 359-367.
- Durner, J., Wendehenne, D. und Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10328-10333.
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. und Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 457-467.

- Eckey, C., Korell, M., Leib, K., Biedenkopf, D., Jansen, C. und Kogel, K. H. (2003). Identification of powdery mildew induced barley genes by cDNA-AFLP: Functional assessment of an early expressed MAP-Kinase. *Plant Physiol In Press*.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. und Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-6888.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. und Somssich, I. E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo J* 18, 4689-4699.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene for gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9, 275-296.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., *et al.* (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442-446.
- Francis, S. A., Dewey, F. M. und Gurr, S. J. (1996). The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol Mol Plant Pathol* 49, 201-211.
- Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F. und Schulze-Lefert, P. (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., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, D. B., Thordal-Christensen, H. und Schulze-Lefert, P. (1994). *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 6, 983-994.
- Fry, S. C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J* 332, 507-515.
- Frye, C. A. und Innes, R. W. (1998). An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* 10, 947-956.
- Frye, C. A., Tang, D. und Innes, R. W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 373-378.
- Fu, Y., Li, H. und Yang, Z. (2002). The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis. *Plant Cell* 14, 777-794.
- Fu, Y., Wu, G. und Yang, Z. (2001). Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol* 152, 1019-1032.
- Galan, J. E. und Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322-1328.

- Gianinazzi, S., Martin, C. und Vallée, J. C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *CR Acad Sci Paris* 270, 2383- 2386.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z. und Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1155-1163.
- Gomez-Gomez, L. und Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5, 1003-1011.
- Görg, R., Hollricher, K. und Schulze-Lefert, P. (1993). Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant J* 3, 857-866.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643.
- Graner, A. und Altschmied, L. (2001). Gerste: ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. *GenomXPress* 1, pp. 5-12.
- Gu, Y., Vernoud, V., Fu, Y. und Yang, Z. (2003). ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *J Exp Bot* 54, 93-101.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hassanain, H. H., Sharma, Y. K., Moldovan, L., Khramtsov, V., Berliner, L. J., Duvick, J. P. und Goldschmidt-Clermont, P. J. (2000). Plant RAC proteins induce superoxide production in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 783-788.
- He, S. Y., Bauer, D. W., Collmer, A. und Beer, S. V. (1994). Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Mol Plant Microbe Interact* 7, 289-292.
- He, Z., Wang, Z. Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P. und Chory, J. (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* 288, 2360-2363.
- Heath, M. C. (1987). Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9, 389-397.
- Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3, 315-319.
- 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.
- Heitefuss, R., König, K., Obst, A. und Reschke, M. (1984). Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau, Vol 1 (Frankfurt (M), DLG-Verlag).

- Heo, W. D., Lee, S. H., Kim, M. C., Kim, J. C., Chung, W. S., Chun, H. J., Lee, K. J., Park, C. Y., Park, H. C., Choi, J. Y. und Cho, M. J. (1999). Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 766-771.
- Herder (1994). *Lexikon der Biologie* (Heidelberg, Berlin, Boston, Spektrum Akad. Verlag).
- Hückelhoven, R., Dechert, C. und Kogel, K. H. (2003). Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5555-5560.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. und Kogel, K. H. (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 Physiol* *119*, 1251-1260.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Trujillo, M. und Kogel, K. H. (2000a). 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.
- Hückelhoven, R. und Kogel, K. H. (2000). Association of hydrogen peroxide accumulation with expression of PR-1 during defense of barley against powdery mildew fungus. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* *35*, 231-238.
- Hückelhoven, R. und Kogel, K. H. (2003). Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* *216*, 891-902.
- Hückelhoven, R. und Kogel, K.-H. (1998). Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Mol Plant Microbe Interact* *11*, 292-300.
- Hückelhoven, R., Trujillo, M. und Kogel, K.-H. (2000b). Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol* *1*, 287-292.
- Ivanchenko, M., Vejlpkova, Z., Quatrano, R. S. und Fowler, J. E. (2000). Maize ROP7 GTPase contains a unique, CaaX box-independent plasma membrane targeting signal. *Plant J* *24*, 79-90.
- Jabs, T., Dietrich, R. A. und Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* *273*, 1853-1856.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4800-4805.
- Jarosch, B., Kogel, K.-H. und Schaffrath, U. (1999). The ambivalence of the barley *Mlo* locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhances susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant-Microbe Interact* *12*, 508-513.

- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L. und Hirt, H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5, 415-424.
- Jones, J. D. G. (1996). Plant disease resistance genes: structure, function and evolution. *Curr Opin Biotech* 7, 155-160.
- Jones, M. A., Shen, J. J., Fu, Y., Li, H., Yang, Z. und Grierson, C. S. (2002). The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* 14, 763-776.
- Jorgensen, J. H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63, 141-152.
- Jorgensen, J. H. (1994). Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Critical Reviews in Plant Science* 13, 97-119.
- Kato, T., Shiraishi, T., Toyoda, K., Saitoh, K., Satoh, Y., Tahara, M., Yamada, T. und Oku, H. (1993). Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by fungal suppressors from *Mycosphaerella pinodes* and their peptide moieties. *Plant Cell Physiol* 34, 439-445.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. und Shimamoto, K. (1999). The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10922-10926.
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A. und Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase *gp91phox* subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell* 10, 255-266.
- Kim, M. C., Lee, S. H., Kim, J. K., Chun, H. J., Choi, M. S., Chung, W. S., Moon, B. C., Kang, C. H., Park, C. Y., Ok, H. M., *et al.* (2002a). *Mlo*, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein: Isolation and characterization of a rice *Mlo* homologue. *J Biol Chem* 19, 19.
- Kim, M. C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H. C., Cho, M. J. und Schulze-Lefert, P. (2002b). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416, 447-451.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. und Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327, 70-73.
- Kliebenstein, D. J., Dietrich, R. A., Martin, A. C., Last, R. L. und Dangl, J. L. (1999). LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 1022-1026.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T. und Kunoh, H. (1997). Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J* 11, 525-537.
- Koga, H., Bushnell, W. R. und Zeyen, R. J. (1990). Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can J Bot* 68, 2344-2352.

- Kogel, K.-H., Beckhove, U., Dreschers, J., Münch, S. und Romme, Y. (1994). 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.
- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. S. und Flaishman, M. A. (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 4080-4087.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolia, K., Carpenter, C. und Chua, N. H. (1999). Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol* *145*, 317-330.
- Kragh, K. M., Jacobsen, M. S. und Mikkelsen, J. D. (1990). Induction, purification and characterization of barley leaf chitinase. *Plant Sci* *71*, 55-68.
- Kropf, D. L., Bisgrove, S. R. und Hable, W. E. (1998). Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 117-122.
- Kumar, J., Hüchelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S. und Kogel, K. H. (2001). A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* *91*, 127-133.
- Kunoh, H., Itoh, O., Kohno, M. und Ishizaki, H. (1979). Are primary germ tubes of conidia unique to *Erysiphe graminis*? *Annal Phytopathol Soc Japan* *45*, 675-682.
- Lamb, C. und Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* *48*, 251-275.
- Laufs, U., Endres, M., Custodis, F., Gertz, K., Nickenig, G., Liao, J. K. und Böhm, M. (2000). Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of *rho* GTPase gene transcription. *Circulation* *102*, 3104-3110.
- Lavy, M., Bracha-Drori, K., Sternberg, H. und Yalovsky, S. (2002). A cell-specific, prenylation-independent mechanism regulates targeting of type II RACs. *Plant Cell* *14*, 2431-2450.
- Lehmann, P. (2002). Structure and evolution of plant disease resistance genes. *J Appl Genet* *43*, 403-414.
- Lemichez, E., Wu, Y., Sanchez, J. P., Mettouchi, A., Mathur, J. und Chua, N. H. (2001). Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev* *15*, 1808-1816.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. und Lamb, C. (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, H., Lin, Y., Heath, R. M., Zhu, M. X. und Yang, Z. (1999). Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell* *11*, 1731-1742.

- Li, H., Wu, G., Ware, D., Davis, K. R. und Yang, Z. (1998). *Arabidopsis* Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiol* 118, 407-417.
- Lyngkjaer, M. F. und Carver, T. L. W. (2000). Conditioning of cellular defence responses to powdery mildew in cereal leaves by prior attack. *Mol Plant Pathol* 1, 41-49.
- Lyngkjaer, M. F. und Gjetting, T. (2002). Gene Transcript Profiling of Single Barley Epidermal Cells Attacked by Powdery Mildew. *Plant Protec Sci* 38, 242.
- Mackay, D. J. und Hall, A. (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem* 273, 20685-20688.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. und Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- Mäenpää, P., Gonzalez, E. B., Ahlandsberg, S. und Jansson, C. (1999). Transformation of nuclear and plastomic plant genomes by biolistic particle bombardment. *Mol Biotechnol* 13, 67-72.
- Marathe, R. und Dinesh-Kumar, S. P. (2003). Plant defense: one post, multiple guards?! *Mol Cell* 11, 284-286.
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D. und Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. und Terauchi, R. (2003). Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J* 33, 425-434.
- Mehdy, M. C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* 105, 467-472.
- Melton, R. E., Flegg, L. M., Brown, J. K., Oliver, R. P., Daniels, M. J. und Osbourn, A. E. (1998). Heterologous expression of *Septoria lycopersici* tomatinase in *Cladosporium fulvum*: effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 228-236.
- Mendgen, K. und Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* 7, 352-356.
- Metzlaff, M. (2002). RNA-mediated RNA degradation in transgene- and virus-induced gene silencing. *Biol Chem* 383, 1483-1489.
- Modolo, L. V., Cunha, F. Q., Braga, M. R. und Salgado, I. (2002). Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol* 130, 1288-1297.
- Molendijk, A. J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C. S., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S. und Palme, K. (2001). *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *Embo J* 20, 2779-2788.

- Moodie, S. A., Paris, M., Villafranca, E., Kirshmeier, P., Willumsen, B. M. und Wolfman, A. (1995). Different structural requirements within the switch II region of the Ras protein for interactions with specific downstream targets. *Oncogene* *11*, 447-454.
- Mouradov, A., Petrasovits, L., Davidson, A. D. und Scott, K. J. (1993). A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Mol Biol* *23*, 439-442.
- Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Trick, H. N. und Gill, B. S. (2001). Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, tissue and organ culture* *64*, 93-114.
- Nakanomyo, I., Kost, B., Chua, N. H. und Fukuda, H. (2002). Preferential and asymmetrical accumulation of a Rac small GTPase mRNA in differentiating xylem cells of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Physiol* *43*, 1484-1492.
- Navarre, D. A. und Wolpert, T. J. (1995). Inhibition of the glycine decarboxylase multienzyme complex by the host-selective toxin victorin. *Plant Cell* *7*, 463-471.
- Neill, S., Desikan, R. und Hancock, J. (2002a). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* *5*, 388-395.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. und Hancock, J. T. (2002b). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* *53*, 1237-1247.
- Neill, S. J., Desikan, R. und Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* *159*, 11-35.
- Nelson, A. J. und Bushnell, W. R. (1997). Transient expression of anthocyanin genes in barley epidermal cells: Potential for use in evaluation of disease response genes. *Transgen Res* *6*, 233-244.
- Newton, A. C. und Young, I. M. (1996). Temporary partial breakdown of *mlo*-resistance in spring barley by sudden relief of soil water-stress. *Plant Pathol* *45*, 973-977.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. und Möisinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal; isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* *108*, 17-27.
- Nielsen, K., Olsen, O. und Oliver, R. (1999). A transient expression system to assay putative antifungal genes on powdery mildew infected barley leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* *54*, 1-12.
- Nishikura, K. (2001). A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* *107*, 415-418.
- Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H. und Somerville, S. C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic Acid-dependent disease resistance. *Science* *301*, 969-972.
- Nürnbergger, T. und Brunner, F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* *5*, 318-324.

- Oerke, E.-C., Dehne, H.-W. (1997). Global crop production and the efficacy of crop protection - current situation and future trends. *Europ J Plant Pathol* 103, 203-215.
- O'Neill, L. A. und Greene, C. (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63, 650-657.
- Ono, E., Wong, H. L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O. und Shimamoto, K. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 759-764.
- Osborn, A. E., Bowyer, P. und Daniels, M. J. (1996). Saponin detoxification by plant pathogenic fungi. *Adv Exp Med Biol* 404, 547-555.
- Paduch, M., Jelen, F. und Otlewski, J. (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 48, 829-850.
- Panstruga, R. (2003). Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 6, 320-326.
- Panstruga, R., Kim, M. C., Cho, M. J. und Schulze-Lefert, P. (2003). Testing the efficiency of dsRNAi constructs *in vivo* : A transient expression assay based on two fluorescent proteins. *Molecular Biology Reports* 30, 135-140.
- Park, J., Choi, H. J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z. und Lee, Y. (2000). Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol* 124, 725-732.
- Perfect, S. E. und Green, J. R. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Mol Plant Pathol* 2, 101-108.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R. und Schulze-Lefert, P. (1997). Interaction analyses of genes required for resistance responses to oodwery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell* 9, 1397-1409.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. und van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N. C., Panstruga, R. und Schulze-Lefert, P. (2002). The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol* 129, 1076-1085.
- Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E. und Roby, D. (1998). Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 544-554.
- Poulsen, T. T. (2001) Transgenic barley with enhanced resistance to fungal pathogens., PhD Dissertation, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dänemark.
- Pryce-Jones, E., Carver, T. und Gurr, S. J. (1999). The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol Mol Plant Pathol* 55, 175-182.

- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. und Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* 272, 279-281.
- Raes, J., Vandepoele, K., Simillion, C., Saeys, Y. und Van de Peer, Y. (2003). Investigating ancient duplication events in the *Arabidopsis* genome. *J Struct Funct Genomics* 3, 117-129.
- Rauscher, M., Adam, A. L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K. und Deising, H. B. (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J* 19, 625-633.
- Romeis, T., Piedras, P. und Jones, J. D. (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12, 803-816.
- Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14.
- Russell, J. A., Roy, M. K. und Sanford, J. C. (1992). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol* 98, 1050-1056.
- Sagi, M. und Fluhr, R. (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 126, 1281-1290.
- Sanford, J. C., Smith, F. D. und Russell, J. A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* 217, 483-509.
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1, 305-310.
- Schlösser, E. (1997). *Allgemeine Phytopathologie* (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Schmelzer, E. (2002). Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Sci* 7, 411-415.
- Scholes, J. D. und Rolfe, S. A. (1996). Photosynthesis in localized regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*) : quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199, 573-582.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahy, G. und Wegner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214, 821-828.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kiraly, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K. H. und Hückelhoven, R. (2003a). Functional assessment of the pathogenesis related protein PR-1B in barley. *Plant Sci* 165, 1275-1280.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K. H. und Hückelhoven, R. (2002). A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol* 128, 1447-1454.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K. H. und Hückelhoven, R. (2003b). Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. *Plant J* 36, 589-601.

- Schulze-Lefert, P. und Vogel, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci* 5, 343-348.
- Schweizer, P., Christoffel, A. und Dudler, R. (1999a). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant J* 20, 541-552.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O. und Dudler, R. (1999b). A transient assay system for the functional assessment of defense related genes in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 647-654.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P. und Dudler, R. (2000). Technical advance. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J* 24, 895-903.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J. E. und Innes, R. W. (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301, 1230-1233.
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W. und Dixon, J. E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575-588.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. und Galbraith, D. W. (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* 8, 777-784.
- Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M. W., Zhou, F., Azevedo, C. und Schulze-Lefert, P. (1999). A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99, 355-366.
- Steele-Mortimer, O., Knodler, L. A. und Finlay, B. B. (2000). Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic* 1, 107-118.
- Stevens, C., Titarenko, E., Hargreaves, J. A. und Gurr, S. J. (1996). Defence-related gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum* and barley (*Hordeum vulgare* L.) coleoptile cells. *Plant Mol Biol* 31, 741-749.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. und Metraux, J. P. (1997). Systemic Acquired Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 35, 235-270.
- Stolzenburg, M. C., Aist, J. R. und Israel, H. W. (1984). The role of papillae in resistance to powdery mildew condition by the *ml-o* gene in barley. I. Correlative evidence. *Physiol Plant Pathol* 25, 337-346.
- Stripe, F., Barbieri, L., Battelli, M. G., Soria, M. und Lappi, D. A. (1992). Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10, 405-412.
- Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H. und Shimamoto, K. (2002). The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13307-13312.
- Tao, L. Z., Cheung, A. Y. und Wu, H. M. (2002). Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *Plant Cell* 14, 2745-2760.

- Thompson, G. A., Jr. und Okuyama, H. (2000). Lipid-linked proteins of plants. *Prog Lipid Res* 39, 19-39.
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P. L. und Collinge, D. B. (1999). The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In *Mechanisms of resistance to plant diseases.*, A. Slusarenko, R. Fraser, und K. van Loon, eds. (Kluwer Academic Publishers), pp. 77-100.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. und Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11, 1187-1194.
- Torp, J. und Jorgensen, J. H. (1986). Modification of barley powdery mildew resistance gene *Ml-a12* by induced mutation. *Can J Genet Cytol* 28, 725-731.
- Torres, M. A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91phox*). *Plant J* 14, 365-370.
- Toyoda, K., Collins, N. C., Takahashi, A. und Shirasu, K. (2002). Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Res* 11, 567-582.
- Toyoda, K., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. und Oku, H. (1993). Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol* 34, 729-735.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. und Ishida, I. (1997). The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1029-1034.
- Valster, A. H., Hepler, P. K. und Chernoff, J. (2000). Plant GTPases: the Rhos in bloom. *Trends Cell Biol* 10, 141-146.
- Van der Hoorn, R. A., De Wit, P. J. und Joosten, M. H. (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* 7, 67-71.
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. und Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.
- van Loon, L. C. und van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN." II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 199-211.
- van Loon, L. C. und van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55, 85-97.
- Verma, D. P. und Hong, Z. (2001). Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol* 47, 693-701.
- Vogel, J. und Somerville, S. (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1897-1902.

Vogel, J. P., Raab, T. K., Schiff, C. und Somerville, S. C. (2002). *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2095-2106.

von Röpenack, E., Parr, A. und Schulze-Lefert, P. (1998). Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J Biol Chem* 273, 9013-9022.

Vranova, E., Inze, D. und Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53, 1227-1236.

Walton, J. D. (1996). Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* 8, 1723-1733.

Warren, R. F., Merritt, P. M., Holub, E. und Innes, R. W. (1999). Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* 152, 401-412.

Wäspi, U., Schweizer, P. und Dudler, R. (2001). Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *Plant Cell* 13, 153-161.

Waterhouse, P. M., Wang, M. B. und Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.

Wei, F., Gobelmann-Werner, K., Morroll, S. M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Schulze-Lefert, P. und Wise, R. P. (1999). The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* 153, 1929-1948.

White, P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta* 1465, 171-189.

Wiberg, A. (1974). Genetical studies of spontaneous sources of resistance to powdery mildew in barley. *Hereditas* 77, 89-148.

Winge, P., Brembu, T. und Bones, A. M. (1997). Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 35, 483-495.

Wolter, M., Hollricher, K., Salamini, F. und Schulze-Lefert, P. (1993). The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Mol Gen Genet* 239, 122-128.

Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Leon, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Raskin, I. und Shah, D. M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants. *Plant Physiol* 115, 427-435.

Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C. und Shah, D. M. (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7, 1357-1368.

Xing, T., Wang, X. J., Malik, K. und Miki, B. L. (2001). Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 1261-1264.

- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T. und Shibuya, N. (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell* 12, 817-826.
- Yang, Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 14, S375-S388.
- Zhang, L. und Lu, Y. T. (2003). Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends Plant Sci* 8, 123-127.
- Zhang, S. und Klessig, D. F. (1998). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7433-7438.
- Zheng, Z. L., Nafisi, M., Tam, A., Li, H., Crowell, D. N., Chary, S. N., Schroeder, J. I., Shen, J. und Yang, Z. (2002). Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2787-2797.
- Zheng, Z. L. und Yang, Z. (2000). The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Mol Biol* 44, 1-9.
- Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Vale, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R. und Schulze-Lefert, P. (2001). Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. *Plant Cell* 13, 337-350.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. und Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2751-2755.

# DANKE

An dieser Stelle möchte ich bei allen lieben Menschen bedanken, ohne deren Hilfe die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich oder zumindest deutlich schwieriger gewesen wäre.

Folgenden Personen bin ich zu besonderem Dank verpflichtet :

- Herrn Prof. Kogel für die freundliche Aufnahme am Institut und die Überlassung eines sehr interessanten Themas.

- Herrn Prof. Felle für die Übernahme des Referats und seine stete Hilfsbereitschaft bei allen auftretenden Schwierigkeiten.

- dem „kleinen“ Chef Ralph Hückelhoven für die erstklassige Betreuung und seine immerwährende Bereitschaft, über meine teilweise abstrusen Theorien zu diskutieren.

- meinem „Uffräumschneeggsche“ Conny, die mir immer wieder kleine und größere Arbeiten abgenommen hat und vergeblich versuchte, aus mir einen ordnungsliebenden Menschen zu machen.

- meiner "Laborkröte" Ruth für die Einführung in die Feinheiten der RNA-Extraktion und ihre unermüdliche Begeisterung, mich über die brisanten Details des Institutslebens auf dem Laufenden zu halten.

- Carin für das unermüdliche Korrekturlesen, die vielen abendlichen Biere sowie für viele kleinere und größere Dinge, für die an dieser Stelle der Platz fehlt.

- Patrick und Marco für die „netten“ Gespräche über weibliches Verhalten (☺) und dafür, dass sie mir abends beim Squash die Möglichkeit gaben, die tagsüber aufgestauten Aggressionen abzubauen.

- den Mädels vom Nachbarlabor, Christina und Daggi, die mir unzählige Male helfen mussten, wenn der Sequenzer Probleme machte oder ich das richtige Cap im Freezer nicht finden konnte.

- außerdem meinen Kollegen Sibylle, Krystina, Gregor, Martina, Tobias, Bettina, Frank, Rebekka, Jörg, Uta, Christina N., Elke und Ex-Kollegin Kathrin M., sowie allen weiteren Mitarbeitern des IPAZ für die konstitutive Aufrechterhaltung der guten Stimmung am Institut.

... und zu guter Letzt meinen Eltern und meiner Freundin Chris für ihr Interesse und ihre Unterstützung während der langen Jahre des Studiums und der Promotion.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Angaben

Name	Holger Schultheiß
Geburtsdatum	23.05.1974
Geburtsort	Friedberg (Hessen)
Familienstand	ledig

## Schul Ausbildung

1980 - 1982	Grundschule Bruchenbrücken
1982 - 1984	Geschwister-Scholl-Schule in Assenheim
1984 - 1986	Förderstufe der Adolf-Reichwein-Schule in Friedberg
1986 - 1993	Augustiner Gymnasium Friedberg

## Bundeswehr

1993 - 1994	Grundwehrdienst in Ulmen (Eifel) und Schöneck-Kilianstädten.
-------------	--

## Studium

Oktober 1994	Beginn des Biologiestudiums an der JLU Gießen
Januar 2000 - März 2000	Diplomarbeit bei Prof. Renkawitz am Institut für Genetik der JLU Gießen
April 2000	Erhalt des akademischen Grades eines Diplombiologen
Juli 2000 - August 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen