

Mechanismen der Resistenzinduktion durch Protonenstress

Bedeutung des Xylems als Signalweg

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

Tag der Disputation:
13. Dezember 2006

Vorgelegt von

Diplom-Biologin Sandra Karl

aus Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Wagner

Prof. Dr. Sven Schubert

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner

Es ist schwer,
viele Wege des Lebens
zugleich zu gehen.

Pythagoras

1	EINLEITUNG	1
1.1	Resistenz	1
1.2	Protonenstress und Induzierte Resistenz	2
1.3	Resistenzmechanismen.....	4
1.4	Resistenzgene und deren Proteine.....	7
1.5	Signale und deren Transduktion	10
1.6	Das Xylem als Signalweg	12
1.7	Pathosystem Gerste – Echter Gerstenmehltau.....	13
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Pflanzenanzucht und Ernte.....	17
2.1.1	Pflanzenanzucht.....	17
2.1.2	Ernte.....	18
2.1.3	Biotest	18
2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	19
2.2.1	Probenaufarbeitung.....	19
2.2.1.1	Isolierung des Gesamtproteins	19
2.2.1.2	Isolierung der Proteine des Xylemsaftes.....	20
2.2.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	20
2.2.1.4	Aufreinigung des Proteinextraktes.....	21
2.2.2	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
2.2.3	Western-Blot	23
2.2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	24
2.2.4.1	1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung	25
2.2.4.2	Equilibrierung	25
2.2.4.3	2. Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.2.5	Silberfärbung.....	27

2.2.6	Coomassie-Färbung.....	27
2.2.7	Gelanalyse	27
2.2.8	Konservierung der Gele	28
2.2.9	Identifikation der Proteine mittels MALDI-TOF	29
2.2.10	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	29
2.2.10.1	Klonierungsstrategie.....	29
2.2.10.2	Überprüfung der Expression des rekombinanten Proteins	30
2.2.10.3	Extraktion des rekombinanten Proteins.....	31
2.2.10.4	Aufreinigung des rekombinanten Proteins	31
2.3	Molekularbiologische Methoden	32
2.3.1	RNA-Isolierung und -Aufkonzentrierung.....	32
2.3.2	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.3.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	33
2.3.3.1	Denaturierende DNA-Gelelektrophorese.....	33
2.3.3.2	Nicht-denaturierende DNA-Gelelektrophorese	33
2.3.3.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	34
2.3.4	Herstellung von cDNA (<i>complementary DNA</i>).....	34
2.3.5	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	35
2.3.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	36
2.3.7	Kolonie-PCR	36
2.3.8	Isolierung von Plasmid-DNA	37
2.3.9	Sequenzierung	37
2.3.10	Real-Time-PCR	38
2.4	Chemikalien	40
2.5	Software und Datenbanken	40
3	ERGEBNISSE.....	43
3.1	Pflanzenanzucht	43
3.2	Gewinnung von Xylemexsudat	44

3.3	Resistenzinduktion.....	46
3.4	Eindimensionale Gelelektrophorese	47
3.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	48
3.5.1	2D-Gele des Xylemexsudates unter Protonenstress.....	48
3.5.2	2D-Gele des Gesamtproteins des Blattes unter Protonenstress	51
3.5.3	2D-Gele des Xylemexsudates unter Salzstress	54
3.6	Identifikation von Proteinspots	57
3.7	Charakterisierung einzelner Kandidatengene und -proteine	66
3.7.1	Translational kontrolliertes Tumorprotein	66
3.7.2	Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase	70
3.7.3	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.....	73
3.7.4	Glucanase	76
3.7.5	PR-1	79
4	DISKUSSION.....	85
4.1	Resistenzinduktion durch Protonenstress.....	85
4.2	Proteinspotmuster des Xylemexsudates.....	87
4.3	Identifikation und Regulation von Proteinspots des Xylemexsudates ..	91
4.3.1	Proteine der pflanzlichen Abwehr.....	92
4.3.2	Proteine der Signaltransduktion	93
4.3.3	Proteine des Zellwandmetabolismus.....	94
4.3.4	Proteine des Zucker- und Stickstoffmetabolismus.....	95
4.4	Charakterisierung von durch Protonenstress differentiell regulierten Genen und Proteinen	97
4.4.1	Translational kontrolliertes Tumorprotein	97
4.4.2	CAD.....	99

4.4.3	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.....	101
4.4.4	PR1-1	103
4.4.5	Glucanase	105
4.5	Abschließende Betrachtung.....	107
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	SUMMARY.....	111
7	LITERATUR.....	113
8	ANHANG	128
8.1	Primersequenzen.....	128
8.2	Vektorkarten	130
8.3	2D-Gele des Xylemexsudates mit Kennzeichnung der entnommenen Spots.....	131

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. demin	demineralisiertes Wasser
Acc. Nr.	<i>accession number</i>
A. dest	destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
AP	<i>alkaline phosphatase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
A.th.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenzfaktor
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bIR	biotisch induzierte Resistenz
Bgh	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	<i>base pair</i> (Basenpaare)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
BTH	Benzol(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester, Bion®
BTP	1,3-[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan
C-	Carboxy-
ca.	circa
CAD	Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase
CDD	<i>conserved domain database</i>
cDNA	<i>copy-DNA</i> (komplementäre DNA, aus RNA synthetisiert)
CHAPS	Cholamido-propionsäure-sulfonat
cIR	chemisch induzierte Resistenz
cv.	<i>cultivar</i> (Sorte)
d	Tag
2D	zweidimensional
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCINA	(2,6-Dichlorisonikotinsäure)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>enzyme commission</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	EthylenGlycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N,N-Tetraessigsäure
ESH	<i>elongated secondary hyphae</i>
et al.	et altera (und andere)

EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
f.sp.	<i>forma specialis</i>
g	Gramm
g	Schleuderziffer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLP	<i>germin-like protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	Hypersensitive Reaktion
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
IR	Induzierte Resistenz
ISR	<i>induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
kVh	Kilovolt-Stunde
l	Liter
lacZ	Strukturgen der β -Galaktosidase
LAR	<i>localized acquired resistance</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
Lsg.	Lösung
LZ	<i>leucin zipper</i>
M	molar
m	milli
mA	Milliampere
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>
μ	Mikro (10^{-6})
max.	Maximal
min.	Minute
mind.	Mindestens
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	<i>molecular weight</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamadenindinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnologie Information
NBS	<i>nucleotid binding site</i>
NBT	Nitrotetrazolium blue
NTP	Nucleosidtriphosphat
N-	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
OH-PAS	[(2-hydroxyphenyl)amino]sulphinyl]acetic acid 1,1-

	dimethyl ester)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pDNA	Plasmid-DNA
pfam	<i>protein families</i>
pH	pH-Wert
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PR-Protein	<i>pathogenesis-related protein</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R-Gen	Resistenzgen
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROI	<i>reactive oxygen intermediate</i> (reaktives Sauerstoffintermediat)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
SA	Salicylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i> (SA-abhängige Systemische Induzierte Resistenz)
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCTP	<i>translationally controlled tumor protein</i>
TED	Tris-carboxymethyl ethylene diamin
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
TIR	Bereich mit Homologie zu Toll- und Interleukin-1 Rezeptoren
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumenteile
v/v	volume in volume
v/w	weight in volume
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Durch von Pilzen, Viren oder Bakterien hervorgerufene Pflanzenkrankheiten kommt es jährlich zu großen Ertragsausfällen. Besonders bei Monokulturen, wie sie für den Anbau von Getreide und anderen Nutzpflanzen üblich sind, führt der intensive Anbau zu einer verstärkten Anfälligkeit gegen biotischen und abiotischen Stress (Heitefuss, 2001). Das Auftreten der Krankheitssymptome führt zu einer verringerten Menge oder Qualität des Erntegutes oder zum Absterben der ganzen Pflanze, was im Hinblick auf die wachsende Weltbevölkerung und den Verlust kulturfähiger Flächen ein zunehmendes Problem darstellt. Größeren Ernteaufschlägen wird durch den Einsatz von Pflanzenschutzmaßnahmen vorgebeugt. Deren Effizienz liegt weltweit jedoch bei nur 40% und manche der eingesetzten Pestizide sind ökologisch und ökonomisch bedenklich (Oerke, 1992). Für die Entwicklung neuer und umweltfreundlicherer Pflanzenschutzkonzepte ist ein detailliertes Grundlagenwissen darüber erforderlich, mit welchen Resistenzmechanismen Pflanzen auf Pathogenbefall reagieren und sich selber erfolgreich verteidigen.

1.1 Resistenz

Unter Resistenz versteht man die Fähigkeit eines Organismus sich selbst gegen ein potentiell Pathogen zu verteidigen (Heitefuss, 2001). Inkompatibilität oder Nichtwirt-Resistenz bedeutet, dass die Pflanze nicht vom potentiellen Pathogen als Wirt besiedelt werden kann. Sie ist multigen bedingt, führt zu einer dauerhaften Resistenz und basiert auf konstitutiven strukturellen Barrieren und biochemische Komponenten (Schlösser, 1997). Dieser Resistenzmechanismus konnte in der Evolution von Pathogenen überwunden werden, was zu einer Basiskompatibilität geführt hat und damit zur Ausprägung von Krankheitssymptomen bei der Wirtspflanze (Dudler, 1997). Einigen Pflanzen gelang es jedoch die Resistenz wieder herzustellen, was als Wirtsresistenz bezeichnet wird. Diese ist monogen, rassenspezifisch und lässt sich mit dem Gen-für-Gen-Modell von Flor (1971) beschreiben: Die Pflanze besitzt ein Resistenzgen (R-Gen), dessen Genprodukt als Rezeptor mit dem Avirulenzfaktor (Avr) eines Pathogens interagiert und damit zur Aktivierung einer Abwehrantwort führt.

Neben den genetisch determinierten rassenspezifischen Resistenzen besitzen Pflanzen auch eine physiologisch induzierbare Krankheitsresistenz. Mit Induzierter Resistenz (IR)

bezeichnet man die Fähigkeit von Pflanzen nach einem vorherigen Stimulus die Abwehrbereitschaft zu aktivieren und so bei einer Infektion eine stärkere Resistenz zu zeigen (Dudler, 1997). Der Zustand der erhöhten Abwehrbereitschaft wird auch Sensitivierung oder Priming genannt. Es ist ein aktiver pflanzlicher Prozess und kann einen vollständigen Schutz über mehrere Wochen gegen ein breites Spektrum an Pathogenen bieten (Sticher et al., 1997).

Die IR unterteilt man nach Art der Induktoren und der Signalwege. Ross (1961) bezeichnet die Beschränkung der IR auf den Infektionsbereich als *localized acquired resistance* (LAR) und die Ausbreitung in der ganzen Pflanze als *systemic acquired resistance* (SAR). Die SAR wird in Dikotylen durch die Akkumulation von Salicylsäure (SA) und die Induktion von *pathogenesis-related* (PR)-Genen charakterisiert (van Loon et al., 1998), wobei SA zwar erforderlich ist, jedoch nicht das primär systemische Signal darstellt (Vernooij et al., 1994). Nichtpathogene Wurzelbakterien oder eine Verletzung der Pflanze induzieren eine *induced systemic resistance* (ISR). Sie ist unabhängig von SA und PR-Proteinen. Die Signalwege beruhen stattdessen auf der Anwesenheit von Jasmonsäure (JA) und Ethylen (Feys und Parker, 2000). Als *chemically induced resistance* (cIR) wird eine durch Chemikalien induzierte systemische Resistenz bezeichnet. Zu den effektivsten Resistenzinduktoren gehören die SA-Analoga DCINA (2,6-Dichlorisonicotinsäure) und BTH (Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester), die in monokotylen und dikotylen Pflanzen wirken (Kogel et al., 1994).

Ein Problem ist, dass fast alle Erkenntnisse zur Induzierten Resistenz bei dikotylen Pflanzen gewonnen wurden und damit nicht ohne weiteres auf die Interaktion von Pathogenen mit monokotylen Wirtspflanzen übertragbar sind. Während eine ISR nicht in Monokotylen bekannt ist (van Loon et al., 1998), konnte eine pathogen-induzierte SAR für Gerste beschrieben werden ohne jedoch deren systemische Resistenzinduktion zu zeigen (Pritsch et al., 2001).

1.2 Protonenstress und Induzierte Resistenz

Unter Stressfaktoren versteht man alle Umwelteinflüsse, die Wachstum, Entwicklung oder Resistenz der Pflanzen beeinflussen (Ayres, 1984). Eine Anpassung von Pflanzen an sich verändernde Stresssituationen erfolgt durch kurzzeitige physiologische Antworten und vor allem durch langsame, aber langfristige physiologische und morphologische

Veränderungen, die eine Minimierung des Stresses und eine Maximierung der Ressourcen der Pflanze zur Folge haben (Oerke und Schönbeck, 1986, Dickson und Isebrands, 1991). Abiotische Stressfaktoren verändern neben den physiologischen Leistungen auch die Resistenz gegenüber Schaderregern, wobei wenig zur Interaktion von IR und abiotischem Stress bekannt ist (Oerke et al., 1992).

Wenn Pathogenbefall und abiotischer Stress gleichzeitig auftreten, können Krankheitssymptome ab- oder zunehmen. Entweder addieren sich die negativen Effekte oder die Veränderungen der Pathogenresistenz durch den abiotischen Stress führen zu einer verbesserten Resistenz (Ayres, 1984). Moderater Wasser- und Trockenstress oder kurzer Stress verursacht nach Oerke et al. (1992) eine gesteigerte Anfälligkeit aufgrund einer Schwächung des Resistenzmechanismus, die unter anderem auf Veränderungen des Lipid- und Proteinstoffwechsels beruht. Hohe Stressintensitäten oder eine lange Stressdauer führen neben einer Abnahme der Biomassenproduktion dagegen zu einer Reduktion des Pathogenbefalls (Ayres, 1980, Oerke und Schönbeck, 1986). Yalpani et al. (1994) nennen das Phänomen, dass eine einem Stressfaktor ausgesetzte Pflanze gegenüber einem zweiten Stressor toleranter wird, auch „cross-tolerance“. Verantwortlich dafür könnte eine veränderte Synthesemenge von Sekundärmetaboliten sein, die vom Stressniveau abhängt (Dickson und Isebrands, 1991, Sakano et al., 2001).

Betrachtet man die Wurzel, so können in der Rhizosphäre durch z.B. Regen oder Trockenheit starke Veränderungen in sehr kurzer Zeit auftreten, die Salzkonzentration, pH-Werte oder osmotisches Potential stark schwanken lassen (Handelsmann und Stabb, 1996). Geringe pH-Werte im Wurzelmedium können direkt das Wurzelwachstum hemmen (Schubert et al., 1990) oder indirekte Einflüsse durch Veränderungen in der Verfügbarkeit von Mineralstoffen haben (Marschner, 1995). So kann es zu Aluminium- oder Mangan-Toxizität aufgrund einer erhöhten Löslichkeit kommen oder aber zu einer limitierten Verfügbarkeit von Molybdän, Phosphat, Calcium oder Magnesium (Yan et al., 1992, Koyama et al., 1995). Bei Nährlösungskulturen, deren pH-Werte von der Forschung oft vernachlässigt werden, kommt es abhängig von der verwendeten N-Quelle zu pH-Veränderungen in der Nährlösung (Schubert und Yan, 1997).

Wiese et al. (2004) konnten zum ersten Mal zeigen, dass bei Gerste durch Protonenstress eine Papillen-vermittelte Resistenz, ähnlich der cIR, gegen Gerstenmehltau induziert werden kann. Die Resistenzinduktion war konzentrationsabhängig und begann bereits bei

geringen Stressintensitäten. Es ist unbekannt, wie der nur an der Wurzel wirkende Protonenstress zum Spross weitergegeben wird (Shibuya und Minami, 2001, Wiese et al., 2004). Die Rolle von Protonen oder dem pH-Wert als *second messenger* ist in Pflanzen im Gegensatz zum Tierreich wenig etabliert, eine Induktion von pH-Veränderungen durch extrazelluläre Stimuli jedoch bekannt (Felle, 1989).

1.3 Resistenzmechanismen

Die natürliche Resistenz von Pflanzen basiert auf einem kombinierten Effekt aus konstitutiven und induzierbaren Mechanismen (Laxalt et al., 1996). Die konstitutive Resistenz besteht bereits vor einem Pathogenangriff und beinhaltet strukturelle und biochemische Attribute. Zu den strukturellen Barrieren gehören z.B. eine Wachsschicht, die Kutikula oder das Fehlen bestimmter struktureller Erkennungsfaktoren (Schlösser, 1997). Enzyminhibitoren, hydrolytische Proteine, Inhibitorsubstanzen oder Sekundärmetaboliten wie Phytotoxine stellen eine Reihe von biochemischen Abwehrkomponenten dar (Agrios, 1997).

Erst durch einen Kontakt von Pathogen und Pflanze und damit der Freisetzung von Elizitoren werden die induzierbaren Resistenzmechanismen aktiviert. Wurde der Begriff „Elizitor“ ursprünglich nur für Komponenten verwendet, die eine Phytoalexinakkumulation in der Pflanze auslösten, so findet er mittlerweile allgemeine Verwendung für alle Substanzen, die eine Abwehrantwort induzieren (Nürnberger, 1999). Es können neben vom Pathogen abgegebenen Substanzen wie Glycoproteinen, Kohlenhydraten oder Peptiden ebenfalls Abbauprodukte der Zellwand von Pathogen oder Wirt sein, die als potentielle Elizitoren agieren (Caldo et al., 2004). Diese werden von pflanzlichen Rezeptoren gebunden und lösen über Signaltransduktionskaskaden eine große Anzahl an Abwehrantworten aus, die sowohl schnelle metabolische Veränderungen wie Ionenflüsse oder Proteinmodifikationen beinhalten als auch langsame auf Transkriptionsveränderungen basierende. Die induzierbaren Abwehrmechanismen beinhalten unter anderem Veränderungen der Zellwand, wie die Bildung von Papillen, die Hypersensitive Reaktion (HR), reaktive Sauerstoffintermediate (ROS) oder die Synthese von PR-Proteinen (Kombrink und Somssich, 1997). Zum Teil ist eine klare Abgrenzung zwischen konstitutiven und induzierten Mechanismen nicht möglich, denn nach Heitefuss (2001) muss man die Resistenz als eine Multikomponentenantwort ansehen.

Die Zellwand stellt nicht nur eine passive strukturelle Barriere dar, sondern ist eine dynamische Struktur. Abiotischer Stress hat z.B. Auswirkungen auf ihre chemische und molekulare Zusammensetzung (Schulze-Lefert, 2004, Kwon et al., 2005), zum anderen dient die Zellwand als Reservoir für Signalmoleküle, antimikrobielle Proteine und andere Sekundärmetaboliten (Vorwerk et al., 2004). Dicke und Zusammensetzung der Zellwand sind wichtige Parameter für das Vorhandensein einer physikalischen Penetrationsbarriere gegen Pathogene und damit für eine erhöhte Resistenz (Hückelhoven et al., 2000). Abiotischer Stress kann Transport und Rate des Materialeinbaus in die Zellwand beeinflussen und damit die Bildung und Ablagerung von Kallose, hydroxyprolinreichen Glycoproteinen und besonders von Lignin (Brisson et al., 1994, Hammond-Kosack und Jones, 1996).

Während Lignin selber einen Bestandteil des konstitutiven Resistenzmechanismus darstellt, wird die Lignifizierung auch dem induzierten Mechanismus zugerechnet (Moerschbacher et al., 1990). Lignin ist ein komplexes phenolisches Monomer und führt zu hydrophoben Zellwandeigenschaften und einer mechanischen Zellwandverstärkung. Es ist sehr widerstandsfähig gegen einen mikrobiellen Abbau, stellt eine Diffusionsbarriere für die Nährstoffbewegung dar und inaktiviert pilzliche Enzyme (Vance et al., 1980). Struktur und Zusammensetzung des Lignins variieren je nach Spezies, wobei der relative Anteil der Cinnamylalkohole der wichtigste Faktor für Struktur und mechanische sowie chemische Eigenschaften ist. Ligninvorstufen können aus drei verschiedenen aromatischen Alkoholen bestehen und sind bei Monokotylen ohne Stressbedingungen in gleichen Teilen enthalten. Sie werden durch den Phenylpropanoidweg gebildet, der bei abiotischem Stress stimuliert wird und zur Neusynthese von Lignin und weiteren posttranslationalen Aktivierungsmechanismen führt (Matern et al., 1995). Ligninvorstufen selber können toxisch auf Pathogene wirken, Enzymaktivitäten modulieren oder Elizitoren beeinflussen. Die Lignifizierung kann nach Nicholson und Hammerschmidt (1992) in eine Primär- und eine Sekundärantwort unterteilt werden. Die Primärantwort erfolgt sehr schnell nach der Induktion der Resistenz, läuft ohne Beteiligung von Transkriptionsvorgängen ab und beinhaltet unter anderem die schnelle Akkumulation von toxischen Phenylpropanoiden. Die langsamere Sekundärantwort dagegen beinhaltet die aktive Lignifizierung, ein Prozess der einige Tage dauern kann (Matern et al., 1995). Für die Familie der Gramineen ist die aktive Lignifizierung ein sehr wichtiger Bestandteil der induzierten Resistenz, weil damit

der nur sehr geringe Anteil an Phytoalexinen an der pflanzlichen Abwehr ausgeglichen werden kann (Moerschbacher et al., 1990).

Sind die Verdickungen der Zellwand auf den Ort einer versuchten Penetration durch ein Pathogen begrenzt, spricht man von Zellwandappositionen oder Papillen. Sie befinden sich an der Innenseite der äußeren Epidermiszellen direkt unter den primären und appressorischen Keimschläuchen und vermitteln damit eine Penetrationsresistenz, weil sie das Pathogen am Eintritt in das Wirtsgewebe hindern (Thordal-Christensen et al., 1997). Papillen treten sowohl bei kompatiblen wie auch bei inkompatiblen Interaktionen auf und unterscheiden sich bei anfälligen und resistenten Pflanzen in der Bildungsgeschwindigkeit und der chemischen Zusammensetzung (Heitefuss, 2001). Die Bildung von Papillen beginnt mit der Reorganisation von Mikrofilamenten und Mikrotubuli und setzt sich in der Ablagerung von Kallose, Lignin und Silizium fort (Hammerschmidt, 1999). Es akkumulieren zudem antimikrobielle Substanzen wie Phytoalexine, Enzyme, Phenole und Wasserstoffperoxid in den Papillen (Brown et al., 1998).

Eine Akkumulation von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) ist meist eine der ersten Antworten einer Pflanze nach Pathogenbefall oder Umweltstress. Zu den wichtigsten ROS gehören Superoxidradikalanionen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH^\cdot) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die laufend bei Stoffwechselprozessen in der Pflanzenzelle oder extrazellulär z.B. nach Pathogenkontakt gebildet werden (Vranova et al., 2002). Neben einer direkten antimikrobiellen Wirkung sind ROS an den Strukturveränderungen der Zellwand und an der Signaltransduktion beteiligt und aktivieren die Genexpression u.a. des Phenylpropanoidweges. Bei Mammalia ist zudem bekannt, dass sie Transkriptionsfaktoren regulieren und die Stabilität von mRNAs kontrollieren (Hammond-Kosack und Jones, 1996). Wasserstoffperoxid ist essentiell für die apoplastische Abwehr von Gerste gegen echten Gerstenmehltau und bei resistenteren Pflanzen findet eine Akkumulation wesentlich früher und in höheren Konzentrationen statt (Hückelhoven und Kogel, 2003). An der Adaptation an Umweltbedingungen ist Wasserstoffperoxid nach Vanacker et al. (1998) durch die Veränderungen von Konzentration und Redoxstatus intrazellulärer Antioxidantien beteiligt. Die Abwehrantwort wird zudem von speziellen zellulären Schutzmechanismen wie dem Halliwell-Asada-Zyklus begleitet, um die Konsequenzen des Stresses zu minimieren.

Einen weiteren induzierten Resistenzmechanismus stellt die Hypersensitive Reaktion (HR) dar, das schnelle Absterben von Wirtszellen nach Pathogenkontakt. Greenburg und Yao (2004) gehen von der HR als einem genetisch programmierten und negativ kontrollierten Vorgang aus, denn die metabolische Aktivität der Wirtszelle und eine Proteinsynthese werden benötigt. Während biotrophen Pathogenen der Zugang zu Nährstoffen verwehrt wird, profitieren nekrotrophe Pathogene von der Nährstofffreisetzung während der Desintegration der Zelle, die aber auch mit einer Freisetzung von toxischen Substanzen verbunden sein kann (Greenburg, 1997). Der programmierte Zelltod bei Pflanzen weist eine große Ähnlichkeit zur Apoptose bei Tieren auf. Apoptose ist bei Mammalia als Mechanismus bekannt, durch den ungewollte, beschädigte oder pathogenbefallene Zellen getötet und phagozytiert werden. Man geht daher davon aus, dass der Zelltod bei Pflanzen und Tieren gemeinsame regulatorische Merkmale aufweist, wobei tierische Pathogene den Zelltod meist unterdrücken während pflanzliche ihn auslösen (Heitefuss, 2001).

1.4 Resistenzgene und deren Proteine

Resistenzgene (R-Gene) ermöglichen nach dem Gen-für-Gen Modell von Flor (1971) durch die Erkennung des korrespondierenden Avirulenzgens eines Pathogens dessen effektive Abwehr. Die Induktion der R-Gene findet außer durch eine Pathogeninfektion auch durch abiotischen Stress oder eine chemische Behandlung während eines Zeitraums von 12-48 Stunden statt (Pritsch et al., 2001, Collinge et al., 2002). Das erste klonierte pflanzliche R-Gen war *Pto*, eine Serine/Threonine-spezifische Kinase, die Tomaten eine Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* verlieh (Martin et al., 1993). Zur Auslösung einer Resistenzantwort benötigt *Pto* nach Salermon et al. (1996) das NBS-LRR-Protein *Prf* (*Pseudomonas resistance and fenthion sensitivity*).

Die pflanzlichen R-Gene beinhalten eine erkennende Domäne kombiniert mit einer an der Signalleitung beteiligten Hilfsdomäne und werden bisher aufgrund ihrer Motive in 5 Klassen unterteilt (Fluhr, 2001, Rathjen und Moffet, 2003). Die geringe Anzahl an stark konservierten Sequenzmotiven lässt auf einen hohen Grad der Konservierung der Signalwege schließen (Bent, 1996, Feys und Parker, 2000). NBS-LRR-Proteine stellen die dominierende Klasse der pflanzlichen R-Gene dar. Die NBS-Domäne (*nucleotide binding site*) besteht aus einem Bereich mit ATP- oder GTP-Bindungsaktivität, einem P-Loop und

drei Kinasendomänen. Sie besitzt eine Funktion in der Aktivierung von Kinasen und G-Proteinen, was durch Konformationsänderung mittels ATP/GTP-Hydrolyse erreicht zu werden scheint (Hammond-Kosack und Jones, 1997). Das LRR-Strukturmotiv (*leucine rich repeats*) besteht aus 14-28 leucinreichen Repitionseinheiten oder anderen hydrophoben Resten und erhält seine funktionelle Spezifität durch die außenstehenden Aminosäuren. Das Motiv besitzt eine charakteristische dreidimensionale Konformation und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen und Ligandenbindungen und ist damit an Signalkaskaden und der Enzyminhibition beteiligt. Es besitzt eventuell eine Rezeptor-ähnliche Funktion durch eine erkenntungsabhängige Proteinaktivierung (Dudler, 1997, Van der Biezen und Jones, 1998).

TIR-Domänen sind Bereiche von R-Genen mit Homologien zu Toll-Rezeptoren aus *Drosophila* und Interleukin-1 Rezeptoren von Säugetieren, die bei Tieren eine Rolle in der Signalleitung und der Immunantwort besitzen und damit eine Verknüpfung des tierischen und pflanzlichen angeborenen Abwehrsystems darstellen könnten (Hammond-Kosack und Jones, 1997). In Pflanzen ist ihre Funktion unbekannt, es wird vermutet, dass sie der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Stimulation von ROS dienen (Bent, 1996). In Getreiden sind TIR-Domänen unbekannt, sie werden funktionell durch CC-Motive (*coiled-coiled*) ersetzt. CC-Motive sind helikale meist N-terminale Strukturen mit einer Funktion bei der Dimerbildung, Proteininteraktion und Signalerkennung (Fluhr, 2001). Eine weiteres Motiv von R-Genen sind *leucin zipper* (LZ), die Dimerbildung und Interaktionen mit anderen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, forcieren (Bent, 1996). Es werden jedoch kontinuierlich weitere R-Gene entdeckt, die nicht in die bisherigen R-Gen Klassen eingeordnet werden können wie z.B. *Rpg1*, das in Gerste für eine Resistenz gegen *Puccinia graminis* verantwortlich ist und aus zwei hintereinanderliegenden Proteinkinasen besteht (Brueggeman et al., 2002).

Trotz des starken Forschungsinteresses im Bereich der R-Gene fehlt meist der Beweis für eine direkte Interaktion von R-Genprodukt und Avr-Protein, weshalb neben dem Rezeptor-Liganden-Modell (Dudler, 1997) weitere Modelle diskutiert werden. Beim Korezeptor-Modell wird davon ausgegangen, dass das Avr-Produkt an einen Korezeptor bindet, der dann mit dem R-Genprodukt interagiert (Bonas und Lahaye, 2002). Das Wächter-Modell geht davon aus, dass R-Genprodukte pflanzliche Zielproteine von Avr-Produkten überwachen (Van der Biezen und Jones, 1998).

Genprodukte, die nach biotischen oder abiotischen Stresssituationen akkumulieren, und eine Funktion in der pflanzlichen Abwehr besitzen, werden als *pathogenesis-related* (PR) Proteine oder auch als *defense-related* Proteine bezeichnet (Collinge et al., 2002). Die ersten PR-Proteine wurden in Tabakpflanzen entdeckt, die hypersensitiv gegenüber dem Tabakmosaikvirus reagierten (van Loon und van Kammen, 1970). Alle PR-Proteine besitzen gemeinsame Merkmale wie ein geringes Molekulargewicht, eine antimikrobielle Wirkung, Lokalisation in der Vakuole oder im extrazellulären Raum, extreme isoelektrische Punkte und eine große Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen (Joosten und de Wit, 1989, Kombrink und Somssich, 1997). Die Expressionsmuster von PR-Genen variieren stark zwischen verschiedenen Pflanzenspezies, die Transkriptakkumulation tritt bei resistenten Pflanzen aber früher und in größeren Mengen auf als bei anfälligen (Pritsch et al., 2001).

Obwohl viele Informationen über Induktion und physikalische Merkmale der PR-Proteine vorliegen, sind nur wenige Kenntnisse über ihre biologischen Funktionen vorhanden, was auch damit zusammenhängt, dass meist nur die cDNA oder genomische Sequenz bekannt sind (Joosten und de Wit, 1989). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten werden Rückschlüsse auf die Proteinfunktion gezogen, was die möglichen Funktionsbereiche Signalübertragung, Genregulation, Pathogenabwehr oder Anpassung an Stressbedingungen nahe legt (Dudler, 1997, van Loon und van Strien, 1999). Bei dikotylen Pflanzen ist die Induktion von PR-Proteinen eng mit der einer SAR korreliert, so dass einige PR-Proteine als SAR-Marker verwendet werden (Molina et al., 1999). In Monokotylen konnten Homologe zu den dikotylen PR-Genen identifiziert werden (Ryals et al., 1996). Homologe, konstitutiv exprimierte Proteine werden als PR-ähnliche Proteine (PRLs) bezeichnet. Seit 1994 existiert eine einheitliche auf der Aminosäuresequenz basierende Nomenklatur, die eine Klassifizierung in 14 Familien ermöglicht (van Loon und van Strien, 1999). Die Gruppe der PR-1 Proteine wurde als erste entdeckt und besitzen eine einzigartige dreidimensionale Struktur, doch über ihre biologische Funktion ist bis heute noch nichts bekannt (Davidson et al., 1987 bei Collinge, Fernandez et al., 1997). Die zweite Familie der PR-Proteine beinhaltet die Glucanasen und interagiert mit den Chitinasen der dritten Familie (Hammond-Kosack und Jones, 1997). Alle PR-Proteine wirken bei Konzentrationen unter 10 µg/ml und es ist vermutlich eine Kombination von verschiedenen PR-Proteinen notwendig, um eine effektive und fein abgestimmte Reaktion zu erzeugen (Sticher et al., 1997).

1.5 Signale und deren Transduktion

Die Pathogen- oder Stresserkennung durch die pflanzliche Zelle resultiert in der Initiierung einer Abwehrantwort, die zumeist mit Permeabilitätsveränderungen der Plasmamembran einhergeht und damit zu Aktivitätsänderungen von Ionenkanälen oder Protonenpumpen führt (Hoson, 2002). Es kommt zu einem Einstrom von Kalziumionen und Protonen in die Zelle, sowie zu einem Efflux von Chlorid- und Kaliumionen (Zimmermann et al., 1997). Der Anstieg der frei im Zytoplasma vorliegenden Ca^{2+} -Konzentration fungiert als *second messenger*, durch Bildung eines stimulusspezifischen, räumlich und zeitlich definierten Musters mit charakteristischer Größe, Frequenz und Dauer (Blume et al., 2000). Die Weiterleitung des Signals erfolgt über Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calmodulin, Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen, Phosphatasen oder Ionenkanäle (Blumwald et al., 1998). Auch Protonen können als *second messenger* fungieren und durch die Ansäuerung des Cytoplasmas zur Phosphorylierung von Proteinen, zur Gentranskription und Synthese von Sekundärmetaboliten führen (He et al., 1998, Lapous und Mathieu, 1998). Weitere Elemente der Signaltransduktion sind ROS, Stickstoffmonoxid (NO), G-Proteine, Kinasenkaskaden und Transkriptionsfaktoren, sowie die Phytohormone Salizylsäure, Jasmonat und Ethylen (Hammond-Kosack und Jones, 1997, Xiong und Yang, 2003).

Während viele Informationen über die speziellen Antworten einzelner Blätter bekannt sind, gibt es wenige Arbeiten über das ganze pflanzliche System und die Interaktion der Organe. Ein wichtiger Aspekt ist die Produktion von Signalen in der Wurzel als Antwort auf Stress und deren Transport mit dem Transpirationsstrom in den Spross, um dort die Regulation physiologischer Prozesse, wie z.B. die Resistenzinduktion, zu beeinflussen. Über die Natur des Signals und dessen Weg gab und gibt es kontroverse Diskussionen. Die Vermutung eines chemischen Signals, das im Phloem transportiert werden sollte, konnte durch die Blockade des Phloems widerlegt werden (Stratman und Ryan, 1997). Damit trat das Xylem an die Stelle des wahrscheinlichsten Signalweges für den Stresssignaltransport von der Wurzel in den Spross (Termmat et al., 1985, Davies und Zhang, 1991, Felle et al., 2005). Für das Signal bestehen verschiedene Möglichkeiten: die direkte Weitergabe des Stressfaktors, die Translokation einer vom Stress freigesetzten chemischen Komponente oder die Informationsweitergabe durch elektrische Spannung. Auch die mögliche Zeitspanne der Signalleitung variiert zwischen wenigen Minuten bis hin zu einigen Stunden (Felle et al., 2005, Munns et al., 2000). Während man lange Zeit für die

pflanzlichen Signalwege nur die fünf klassischen Pflanzenhormone Auxin, Cytokinin, Ethylen, Gibberellin und Abszinsäure in Betracht zog, hat man mittlerweile eine ganze Reihe neuer Kandidaten als mögliche Signalmoleküle entdeckt: Polypeptide, Oligosaccharide oder kleine undefinierte Moleküle (Ryan und Farmer, 1991). Signalpeptide besitzen meist eine Größe zwischen 2-9 kDa mit einem Vorläufer von 100-500 AS und wurden bisher in Pflanzen eher zufällig identifiziert, weil sie aufgrund der geringen Größe kaum in cDNA-Datenbanken enthalten sind (Lindsey et al., 2002). Im Gegensatz dazu sind Polypeptidhormone als häufigste Signalmoleküle in tierischen Systemen bekannt, wo sie als inaktive z.T. multiple Preproteine synthetisiert, von spezifischen Proteasen freigesetzt und post-translational modifiziert werden (Bisseling, 1999, Pearce et al., 2001). In Pflanzen wurden bisher die Signalpeptidklassen Systemin, Thionine, Defensine, Lipidtransferproteine, RALF, Hevein-ähnliche Proteine und Knottin-like Proteine identifiziert (Garcia-Olmedo et al., 1998). Die meisten der Signalpeptide besitzen eine N-terminale Signalsequenz für die Sekretion in den Apoplasten. Ihnen wird eine Funktion in konstitutiven und induzierbaren Resistenzmechanismen zugerechnet. Weitere Kandidaten für Signalmoleküle sind kleine, einzelsträngige und nicht codierende RNA-Moleküle wie *micro* RNAs (miRNAs) aus 20-24 Nukleotiden oder *short interfering* RNAs (siRNAs) aus 21-26 Nukleotiden. Sie sind weit verbreitet, besitzen eine regulatorische Rolle bei der Transkription, der Translation und dem Abbau von mRNA (Voinnet, 2002, Sunkar und Zhu, 2004). Ihr Langstreckentransport wurde nachgewiesen und eine Regulation durch abiotischen Stress ist bekannt (Yoo et al., 2004).

Die Intensität der pflanzlichen Abwehrantwort wird durch die Anzahl und Art der Komponenten, die an der Signalleitung beteiligt sind, moduliert. Chini et al. (2004) vermuten, dass biotische und abiotische Signalwege multiple Knotenpunkte besitzen und ihre Produkte signifikante funktionelle Überlappungen zeigen. Die Verknüpfung der unterschiedlichen Signaltransduktionswege in einem komplexen Netzwerk führt vermutlich zu einem großen regulatorischen Potential und berücksichtigt zudem, dass, im Gegensatz zu der auf nur einen Stimulus fokussierten Stressforschung, im Freiland Pflanzen simultan mehreren abiotischen und biotischen Umweltveränderungen ausgesetzt sind (Feys und Parker, 2000).

1.6 Das Xylem als Signalweg

Das Xylem ist ein Langstreckentransportsystem, das dem apoplastischen Kompartiment zuzurechnen ist und die Wurzel mit den oberirdischen Organen verbindet. Neben dem Transport von Wasser und Ionen beinhaltet der Xylemsaft auch Aminosäuren, Zucker und organische Säuren (Biles und Abeles, 1991, Buhtz et al., 2004), womit die Wurzel durch die Zusammensetzung des Xylemsaftes den physiologischen Zustand der oberirdischen Organe kontrolliert (Sato et al., 1992). Eine essentielle Voraussetzung für das Verständnis des Regulationsmechanismus von wurzelbürtigen Signalen auf die physiologischen Sprossprozesse erfordert Wissen über die Zusammensetzung und Veränderungen des Xylemsaftes (Liang und Zhang, 1997). Da die Xylemgefäße selbst tote Zellen sind und damit nicht zu einer eigenen Proteinsynthese in der Lage sind, geht man davon aus, dass die xylemspezifischen Proteine in der Wurzel produziert werden (Buhtz et al., 2004). Wurzelzellen zeigen eine spezifische Sekretion von Proteinen in den Xylemsaft, wobei die Sekretion unter anderem durch ein N-terminales Signalpeptid vermittelt werden kann (Masuda et al., 1999). Es gibt jedoch auch zahlreiche Proteine ohne diese sekretorische Zielsequenz, die extrazelluläre Funktionen besitzen, so dass man von weiteren bisher noch unbekanntem „*nonclassical*“ Exportmechanismen ausgehen muss (Cleves, 1997).

Selbst die im Xylem von gesunden und ungestressten Pflanzen enthaltenen Proteine sind bisher kaum untersucht und daher nur zu einem sehr geringen Prozentsatz identifiziert oder gar einer Funktion zugeordnet (Kehr et al., 2005). Da das Xylem als Bestandteil des Apoplasten sehr starken Kontakt mit biotischen oder abiotischen Umweltstimuli hat (Hoson, 1998) und zudem als Kontinuum sehr infektionsanfällig ist, muss man von einem speziellen Abwehrsystem ausgehen (Grunewald et al., 2003). Im Xylem verschiedener Pflanzen konnten bisher Proteine gezeigt werden, denen meist eine Funktion in der Zellwandmodulation, Stressweiterleitung oder Resistenzinduktion zugeordnet werden konnte. Im Xylemexsudat der Wassermelone konnten Biles et al. (1989) Katalasen, Peroxidasen und Reduktasen nachweisen. Sakuta et al. (1998) fanden glycinreiche Proteine im Xylemsaft der Gurke, die durch Stress oder Verwundung induziert werden konnten. Ebenfalls bei Gurke konnten Masuda et al. (1999) Lectin-ähnliche Xylemsaftproteine nachweisen, die nur in der Wurzel gebildet und im Xylem transportiert werden. Im Xylemsaft der Tomate konnten nach einer Pilzinfektion Proteine mehrerer PR-Familien gezeigt werden (Rep und Dekker, 2002). Weitere an der Pathogenabwehr beteiligte

Proteine konnten von Buhtz et al. (2004) in verschiedenen dikotylen Pflanzen nachgewiesen werden. Die einzigen Untersuchungen an monokotylen Pflanzen wurden von Young et al. (1995) an Reis durchgeführt. Die Veränderung nicht nur einzelner Xylemsaftproteine, sondern des gesamten Proteinmusters durch biotische und abiotische Stimuli konnte von Rep et al. (2003) und Kehr et al. (2005) gezeigt werden.

1.7 Pathosystem Gerste – Echter Gerstenmehltau

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist eine monokotyle Kulturpflanze und gehört zur Familie der Poaceae (Süßgräser). Die EU ist mit 57,4 Millionen Tonnen (Prognose 2006/07, Coceral) einer der größten Gerstenproduzenten und Deutschland mit 12,2 Millionen Tonnen im Jahr 2005 innerhalb der EU führend. Verwendung findet die Gerste als Nahrungsmittel (Brot, Graupen), in der Bierproduktion und als Futtergetreide (Geflügel- und Schweinemast). Das wichtigste Gerstenpathogen in der gemäßigten Zone ist der Echte Gerstenmehltau, der zu Ertragsverlusten aufgrund reduzierter Körneranzahl pro Ähre und veränderten Stärke- und Proteingehalten der Getreidekörner führt (Oerke und Schönbeck, 1990). Der Pathogen des Mehltaus heißt *Blumeria graminis* (veraltetes Synonym *Erysiphe graminis*) und tritt in mehreren Formen auf, die auf eine oder mehrere Arten spezialisiert sind, unter anderen *f. sp. hordei* (Bgh) bei Gerste (Heitefuss, 2001). *Blumeria graminis* gehört zur Abteilung der *Ascomycota*, Ordnung *Erysiphales*, Familie *Erysiphaceae* und ist weltweit verbreitet. Es ist ein obligat biotropher Ektoparasit, der sich von Epidermiszellen ernährt und ein weißliches Mycel auf der Blattoberfläche bildet. Sein Wachstum wird in Europa durch die lange Vegetationsperiode, die intensive Stickstoffdüngung und das relativ kühle und feuchte Klima begünstigt (Thordal-Christensen et al., 1999). Die Interaktion zwischen Gerste und Mehltau ist das Hauptmodell für Untersuchungen zur Pflanzenabwehr, weil die pilzliche Entwicklung sehr synchron abläuft, sich hohe Penetrationsraten ergeben und schon einiges an Wissen über den Infektionsprozess vorliegt (Collinge et al., 2002).

Die Verbreitung des Mehltaupilzes erfolgt mit dem Wind durch vegetative Konidien, die zwei Stunden nach dem Erreichen der Blattoberfläche einen kurzen primären Keimschlauch zur Wirtserkennung, Anheftung und Wasseraufnahme ausbilden (Craver und Ingersen, 1987). 4-8 Stunden nach der Inokulation wird der sekundäre Keimschlauch gebildet, dessen Ende zu einem Apressorium verdickt ist und einen Penetrationskeil zur

Überwindung der pflanzlichen Zellwand mittels mechanischem Druck und der Freisetzung von lytischen Enzymen enthält. Als Ernährungsorgan wird ein fingerförmiges Haustorium im Apoplasten ausgebildet, das zur Aufnahme von Wasser, Mineralstoffen und Metaboliten dient. Es wird von einer veränderten pflanzlichen Zellmembran umgeben, die extrahaustoriale Membran genannt wird (Thordal-Christensen et al., 1999). Durch die Bildung von sekundären Hyphen (*elongated secondary hyphae* - ESH) mit sekundären Haustorien findet die Ausbreitung des Pilzes auf dem Blatt statt. Es bildet sich das weiße Mycel. Aus Diesem werden unter optimalen Bedingungen nach 5-6 Tagen von senkrechten Sporenträgern reife Konidien abgeschnürt und zur weiteren Verbreitung des Mehltaupilzes auf neue Gerstenpflanzen übertragen. Die geschlechtliche Fortpflanzung findet am Ende der Vegetationsperiode durch die Bildung von Fruchtkörpern mit bis zu 25 Asci und je 8 haploiden Ascosporen statt. Zu deren Freisetzung kommt es jedoch erst im folgenden Frühjahr durch Aufquellen und Aufplatzen der Fruchtkörper (Schlösser, 1997).

Für Gerste sind einige Resistenzgene bekannt, deren Produkte vermutlich nach der Gen-für-Gen-Hypothese von Flor (1971) mit Avirulenzgenprodukten von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* interagieren und eine effektive Abwehr auslösen. Die Resistenz manifestiert sich entweder im Scheitern des Pilzes die epidermale Zellwand zu durchdringen (Piffanelli et al., 2002) oder in der Verhinderung der Ausbildung des Haustoriums (Kogel et al., 1994). Nach Felle et al. (2004) sind apoplastische pH-Veränderungen ein wichtiger Indikator für die Wirt-Pathogen-Interaktion, denn diese pH-Veränderungen korrelieren mit den verschiedenen Stadien der Pilzentwicklung und dem Auftreten unterschiedlicher Resistenzausprägungen. So tritt eine Papillenbildung zusammen mit einer transienten Blattansäuerung 8-12 Stunden nach Inokulation auf. Eine rassenspezifische Resistenz wird durch die Allele *Mla* und *Mlg* vermittelt. *Mla* wurde in die Kulturgerste aus dem wilden *Hordeum spontaneum* eingekreuzt (Schulze-Lefert und Vogel, 2000) und gehört nach Madson et al. (2003) zur Klasse der NBS-LRR-Gene. Es führt zu einer Resistenz, weil der Mehltaupilz nach der Haustorienbildung durch HR, also Zelltod und damit dem Entzug der biotrophen Nahrungsgrundlage, gestoppt wird. Aus der Signaltransduktion des *Mla*-Allels sind *Rar1* und *Rar2* (*required for Mla-specified resistance*) bekannt. Das semidominante *Mlg*-Allel vermittelt die Resistenz durch eine effektive Papillenbildung und damit der physikalischen Penetrationsverhinderung, gefolgt von der HR (Baker, 2000). Die *cIR* zeigt mit Papillenbildung und HR den identischen Abwehrmechanismus wie eine *Mlg*-vermittelte Resistenz (Kogel et al., 1994). Das rezessive *mlo*-Allel vermittelt dagegen eine

breite nicht rassenspezifische Abwehrantwort, die neben der Bildung effektiver Papillen auch die Akkumulation von Wasserstoffperoxid und die Induktion von PR-Genen beinhaltet (Peterhänsel et al., 1997).

Bei einer inkompatiblen Interaktion resistenter Gerstenlinien mit Gerstenmehltau ist SA weder für die Papillenbildung noch für HR, die Akkumulation von Wasserstoffperoxid oder die Expression von PR-Genen erforderlich (Hückelhoven et al., 1999). Die Induktoren der SAR wie SA, BTH oder DCINA wirken jedoch auch im Gerste-Mehltau-Pathosystem. Bei anfälligen Pflanzen, also der kompatiblen Interaktion, sind nach Schultheiss et al. (2000) ebenfalls Papillenbildung, Akkumulation von Wasserstoffperoxid, und PR-Gentranskripte zu finden, jedoch in weitaus geringeren Mengen und erst zu wesentlich späteren Zeitpunkten (Hückelhoven et al. 2000). Inwieweit hier die Resistenzinduktion durch abiotische und biotische Faktoren zu einer Veränderung der Resistenzreaktion beiträgt, ist noch vollständig unbekannt.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Neue Pflanzenschutzkonzepte sind notwendig, um den Pathogenbefall und die damit verbundenen Ernteausfälle angesichts der weltweit wachsenden Bevölkerungszahl zu reduzieren. Als Lösungsstrategie dieses Problems besteht zum einen die Möglichkeit, die pflanzeigenen Abwehrmechanismen mittels nicht toxischer Induktoren zu aktivieren, zum anderen die Züchtung krankheitsresistenter Arten durch die Kenntnis und Anwendung neu charakterisierter Resistenzgene. Dazu ist eine Aufklärung der physiologischen und molekularen Mechanismen der natürlichen pflanzlichen Abwehr von grundlegender Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Mechanismus der durch abiotischen Stress Induzierten Resistenz an der monokotylen Sommergerstensorte Ingrid, die keine bekannten Resistenzgene enthält, in Verbindung mit Befall durch den Echten Gerstenmehltau untersucht werden. Es sollen Gene und Proteine identifiziert werden, die durch Protonenstress differentiell exprimiert werden und damit vermutlich an der Signaltransduktion und / oder dem Abwehrmechanismus der Induzierten Resistenz beteiligt sind. Da das Xylem als wahrscheinlichster Signalweg für wurzelbürtige Signale an den Spross fungiert, wurden vergleichende Untersuchungen des Proteinmusters des

Xylemexsudates von Gerste unter Kontrollbedingungen und verschiedenen Stufen des Protonenstressses durchgeführt. Durch den Vergleich mit Proteinmustern von unter Salzstress gewonnenem Xylemexsudat können Aussagen hinsichtlich der unspezifischen Stressantwort getroffen und spezifisch regulierte Proteinspots ermittelt werden. Einige differentiell regulierten Proteine wurden ausgewählt und deren Genexpression in Wurzel- und Blattmaterial untersucht, um ein Gesamtbild der Regulation auf Transkriptions- und Translationsebene zu erhalten, ihre Lokalisation zu klären und mögliche Hinweise auf Aufbau und Funktion zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht und Ernte

2.1.1 Pflanzenanzucht

Zur Untersuchung der Resistenzmechanismen wurde die Sommergerste *Hordeum vulgare* L. cv. Ingrid verwendet, die gegenüber dem Echten Gerstenmehltau anfällig ist. Die Karyopsen der Sorte Ingrid wurden mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen, drei Stunden in einer 1 mM CaSO₄-Lösung unter Belüftung vorgequollen und auf mit 1 mM CaSO₄-Lösung getränkten Papiertüchern in einer lichtdichten Plastikwanne ausgelegt. Am fünften Tag wurden die Sprosse der Keimlinge mit Schaumstoff umwickelt und je 72 Pflanzen in eine 50 l Wanne auf Hydrokultur gesetzt. Zur Vermeidung von Toxizitätserscheinungen wurde die Nährlösung zunächst $\frac{1}{4}$ konzentriert. Am sechsten Anzuchttag wurde auf die halbe und am achten auf die volle Nährlösungskonzentration (vgl. Tab. 2.1) umgestellt. Der Wechsel der Nährlösung erfolgte zweimal wöchentlich. Die Pflanzenanzucht erfolgte in einer Klimakammer unter den folgenden Bedingungen: Tag 16 h bei 20 °C, Nacht 8 h bei 16 °C, 70% Luftfeuchte.

Tab. 2.1: Zusammensetzung der voll konzentrierten Nährlösung

Makronährstoffe:	1,0 mM Ca	CaCl ₂
	2,0 mM N	Ca(NO ₃) ₂
	2,0 mM K	K ₂ SO ₄
	0,6 mM Mg	MgSO ₄
	0,2 mM P	KH ₂ PO ₄
	2,0 mM Si	Silizium (Na ₂ SiO ₃)
Mikronährstoffe:	2,0 µM Mn	MnSO ₄
	1,0 µM B	H ₃ BO ₃
	0,5 µM Zn	ZnSO ₄
	0,3 µM Cu	CuSO ₄
	Fe(III)-EDTA (C ₁₀ H ₁₂ FeNaO ₈)	0,2 mM Fe
	1,0 µM Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄

Die Gerstenpflanzen wurden entweder einer Stressbehandlung mit Protonen oder mit NaCl unterzogen. Am zwölften Tag begann die Behandlung mit dem Protonenstress. Titriert wurde mit 0,1 M Schwefelsäure mit pH-Stat-Anlagen (Titro-line alpha von Schott) in 40 µmol H⁺-

Schritten je Tag, um den Wurzeln Zeit zur Anpassung zu geben. Es gab vier Anzuchtvarianten, wovon die Kontrolle den pH-Wert 6,0 hatte und die drei Behandlungen auf die pH-Werte 4,2, 3,9 und 3,6 eingestellt wurden. Da die Pflanzen mit Nitrat ernährt wurden, musste eine Erhöhung des eingestellten pH-Wertes in der Nährlösung mittels Titration mit 0,1 M Schwefelsäure durch die pH-Stat-Anlagen verhindert werden.

Bei den Versuchen mit Salzstress begann die Behandlung ebenfalls am zwölften Tag. Neben der Kontrolle gab es die beiden Behandlungen 15 mM und 20 mM NaCl. Die Natriumchloridkonzentration wurde täglich um 5 mM bis zur Endkonzentration gesteigert und bis zur Ernte am 27. Tag beibehalten.

2.1.2 Ernte

Bei beiden Anzuchtvarianten fand die Ernte am 27. Tag statt. Von 15 Pflanzen je Variante wurde das jüngste voll entwickelte Blatt abgeschnitten und 4 cm aus der Blattmitte für den Biotest verwendet. Der Rest des Blattmaterials wurde für RNA-Isolierung und 2D-Gele sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Ernte des Xylemsaftes wurde analog zu Sakuta et al. (1998) durchgeführt. Alle Gerstenpflanzen wurden ca. 2 cm über dem Wurzelende abgeschnitten. Die ersten 3 Tropfen des Xylemexsudates wurden als erste verunreinigte Xylemfraktion mit der Pipette abgenommen, auf Eis gesammelt und abschließend schockgefroren. Danach wurde die Schnittfläche mit Whatman-Papier vorsichtig abgetupft und im Verlauf der folgenden drei Stunden das Xylemexsudat als zweite reine Xylemfraktion gesammelt, wobei zwischen 1,5 ml und 3 ml Xylemsaft pro 72 Gerstenpflanzen einer Behandlung gewonnen werden konnten. Ebenfalls wurden pro Wanne 15 Gerstenwurzeln grob abgetupft und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gesamte Pflanzenmaterial wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der pH-Werte des Xylemexsudates der Kontrolle sowie der drei Protonenstressbehandlungen erfolgte in einem Eppendorfgefäß mit der pH-Mikroelektrode InLab 423 der Firma Mettler-Toledo in einem Volumen von 1,5 ml.

2.1.3 Biotest

Zur Bestimmung der Pathogenresistenz in den Blättern wurden die 4 cm langen Blattsegmente der jüngsten voll entwickelten Blätter mit der Blattoberseite nach oben auf eine Agarplatte (0,5% Agar mit 6 mg/l Benzimidazol) gelegt. Danach erfolgte die Inokulation mit Konidien des Echten Gerstenmehltaupilzes (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) der Rasse A6

(*BghA6*, zur Verfügung gestellt vom IPAZ, JLU Gießen), indem die Agarplatte unter einen Inokulationsturm gelegt wurde und das Sporenmateriale von ca. 2 Gefäßen mit Mehltau befallener Gerste darüber abgeschüttelt und durch Luftverwirbelung gleichmäßig verteilt wurde. Nach 4-5 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde die Anzahl der Mehltaukolonien bei den 15 Blattsegmenten jeder Behandlung mit einer Lupe ausgezählt. Die Auszählung erfolgte bei neun Ernteterminen.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Probenaufarbeitung

Für die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials für die 2D-Gelelektrophorese gibt es keine universelle Methode; für jedes Probenmaterial muss die optimale Aufarbeitung ausgetestet werden. Eine Isolation von Protein aus pflanzlichem Material wird durch die Zellwände, viele N-terminale Modifikationen und die schlechte Löslichkeit von Membranproteinen erschwert (Rabilloud, 1996; Tsugita und Kamo, 1999). Das Ziel der Probenaufarbeitung ist eine vollständige Lösung der Proteine durch Denaturierung, Reduktion und Auflösen von Aggregationen. Um eine Informationsreduktion durch Verlust oder Modifikation von Proteinen zu minimieren, sollte die Aufarbeitung in so wenig Schritten wie möglich durchgeführt werden (Görg et al., 1998).

2.2.1.1 Isolierung des Gesamtproteins

Die Methode der Proteinaufarbeitung von Görg et al. (1998) und Tsugita und Kamo (1999) wurde für die Isolierung von Gesamtprotein aus dem Blattmaterial von Gerste modifiziert. Es wurden 150 mg des unter flüssigem Stickstoff gemörserten Blattmaterials eingewogen und immer auf Eis gearbeitet, um einen möglichen Abbau der Proteine zu minimieren. Nach Zugabe von 1,6 ml eiskalter 10% TCA in Aceton mit 50 mM DTT wurde homogenisiert und im eisgekühlten Ultraschallbad das Zellmaterial lysiert. Über Nacht wurde bei -20 °C eine Fällung durchgeführt und anschließend 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Das proteinhaltige Pellet wurde zweimal in 1 ml eiskaltem Aceton homogenisiert, 10 min im Ultraschallbad behandelt und erneut zentrifugiert, um die TCA zu entfernen. Während ein Pellet für die Bestimmung des Proteingehaltes zurückgehalten wurde, wurden die anderen

Blattproben in 1 ml Lysepuffer II (s. Tab. 2.2) gelöst. Dieser enthält über Serdolit aufgereinigten Harnstoff und Thioharnstoff zur Denaturierung, CHAPS zum Lösen hydrophober Bindungen, DTT als Reduktionsmittel, Pefabloc als Proteaseinhibitor und einen an den pH-Bereich pH 3-10 angepassten IPG-Puffer. Tris-Base wurde verwendet, um die aus Harnstoff bei höheren Temperaturen oder pH-Werten entstehenden Cyanate abzufangen (Schrattenholz, 2001). Anschließend wurden die Proben bei 33 °C zwei Stunden geschüttelt, 15 min ins eiskalte Ultraschallbad gestellt und nach 40-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm der Überstand abgenommen.

Tab. 2.2: Zusammensetzung des Lysepuffers II

Harnstoff	8 M
Thioharnstoff	2 M
IPG-Puffer	0,5%
CHAPS	4%
DTT	30 mM
Tris-Base	20 mM
Pefabloc	5 mM
Bromphenolblau	

2.2.1.2 Isolierung der Proteine des Xylemsaftes

Vor der Fällung wurde die Proteinkonzentration des Xylemsaftes nach der Bradford-Methode bestimmt (s. 2.2.3) und maximal 300 µl Xylemsaft mit dem vierfachen Volumen Aceton in 2 ml Reaktionsgefäßen über Nacht bei –20 °C gefällt. Nach Pelletieren bei 4°C und 16000 rpm für 40 min in der Kühlzentrifuge wurde das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 20 min wurde das Pellet getrocknet und in 200 µl Lysepuffer II aufgenommen.

2.2.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Blatt- und Xylemproben erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant blue G250 bildet Komplexe mit den basischen oder aromatischen Resten der Proteine. Zur Bestimmung in den Blattproben wurde das Pellet in 100 µl PBS-Puffer (s. Tab. 2.4) gelöst und erneut abzentrifugiert. Beim Xylemsaft wurden 10 µl mit 10 µl PBS versetzt. Zur Abgleichung der Proteinkonzentration wurde mit BSA (*bovine serum albumin*, 0,5g/l) eine Kalibrierreihe (vgl. Tab 2.3) erstellt.

Tab. 2.3: Kalibrierreihe der Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinmenge (μg)	0	4	8	12	16	20	24
BSA (μl)	0	2	4	6	8	10	12
PBS (μl)	20	18	16	14	12	10	8

Allen Eppendorfgefäßen wurde 1 ml Bradfordlösung (vgl. Tab. 2.5) zugegeben, gemischt und 10 min inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm im Spektralphotometer (Cary 4 Bio Spectrophotometer) in Mikroküvetten gemessen. Anhand der Kalibriergeraden konnten die Proteinkonzentrationen des Blatt- und Xylemmaterials ermittelt werden.

Tab. 2.4: Zusammensetzung des zehnfachen PBS-Puffers

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ PO ₄	7,7 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
	auf pH 7,4 einstellen
Aqua dest	ad 1 l

Tab. 2.5: Zusammensetzung der Bradfordreagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,01%
Ethanol	4,7%
Phosphorsäure	8,5%
Filtration durch Blaubandfilter	

2.2.1.4 Aufreinigung des Proteinextraktes

Um im Blattmaterial für die Isoelektrische Fokussierung störende Salze zu entfernen, wurden Vivaspin Concentratoren™ von Vivascience verwendet. Es wurden Säulen mit der Siebgröße 5000 Da verwendet, um die Proteine im 10-15 kDa Bereich nicht zu beeinträchtigen. Das Probenmaterial wurde auf die Säule pipettiert und 3 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, während das Restvolumen im Lysepuffer aufgenommen werden konnte.

2.2.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Reinheit des Xylemsaftes zu überprüfen, wurde eine eindimensionale SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot durchgeführt. Mit Antikörpern gegen Rubisco als Marker für nicht-apoplastische Proteine wurde versucht, mögliche cytoplasmatische Verunreinigungen des Xylemsaftes nachzuweisen. Ein Marker für Phloemproteine ist nicht bekannt (Kehr et al., 2005).

In der SDS-PAGE werden die Proteine durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS lagert sich an die Peptidketten an, hebt nichtkovalente Bindungen auf und bildet negative geladene SDS-Proteinkomplexe mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit. Markerproteine ermöglichen eine Kalibrierung der Größe der Proteinbanden. Es wurden 15%ige Trenngelle (s. Tab. 2.6) verwendet, um Proteine in einem Bereich von 12- 60 kDa darstellen zu können. Die Übersichtung erfolgte mit einem 6%igen Sammelgel (vgl. Tab. 2.7).

Tab. 2.6: Zusammensetzung von 12,5% und 15% Trenngelen der SDS-Page

	12,5%	15%
H ₂ O	2 ml	1,5 ml
Trenngelpuffer	1,5 ml	1,5 ml
Polyacrylamid	2,5 ml	3 ml
APS (10%)	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Trenngelpuffer: 1,5 mol Tris, 0,4% SDS mit HCl auf pH 8,8 einstellen

Tab. 2.7: Zusammensetzung des 6%igen Sammelgels zur Übersichtung

	6%
H ₂ O	1,25 ml
Sammelgelpuffer	0,625 ml
Polyacrylamid	0,5 ml
APS	10 µl
TEMED	10 µl

Sammelgelpuffer: 0,5 ml Tris, 0,4% SDS mit HCl auf pH 6,8 einstellen

Es wurden 20 µg Protein eingesetzt und die Probenmenge 1:1 mit ATPase-Auftragspuffer (s. Tab. 2.8) vermischt, 30 min bei RT inkubiert und in die Geltaschen gefüllt. Als Marker fand der prestained Marker BenchMark™ von Invitrogen Verwendung. Das Gel lief bei 25 mA und 300 V ca. 1 Stunde und wurde anschließend über Nacht in Fixierlösung (vgl. Tab. 2.10) inkubiert.

Tab. 2.8: Zweifacher ATPasen-Auftragspuffer

Glycerol	20%
SDS	20%
DDT	0,4 M
Bromphenolblau	0,004%
Tris HCl pH 7,4	250 mM
PMSF	10 mM
Trasycol	1 : 100

Tab. 2.9: Zusammensetzung des 10fach Laufpuffers für die Gelelektrophoresen

	500 ml	1 l
0,25M TrisBase	15,1 g	30,3 g
1,92M Glycin	72,1 g	144,2 g
1% SDS	5,0 g	10,0 g

Tab. 2.10: Fixierlösung für 1D- und 2D-Gele

Ethanol	40%
Essigsäure	10%
H ₂ O demin	50%

2.2.3 Western-Blot

Beim Western-Blotting wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran transferiert, auf der die Banden der großen und kleinen Untereinheit der Rubisco mittels Antikörper nachgewiesen wurden.

Zum Proteintransfer wurde das Semidry-Verfahren angewendet. Nach 15 minütiger Inkubation in Blotpuffer (s. Tab. 2.11) wurde das Gel auf eine PVDF-Membran gelegt, oben und unten mit puffergetränkten Filterpapieren bedeckt und die Proteine bei 5 V in 90 min auf die Membran übertragen. Danach wurde die Membran zwei Stunden in 5% Milchpulver bewegt, um alle freien Bindungsstellen der Membran mit Protein abzusättigen. Über Nacht wurde dann mit der ersten Antikörperlösung (Anti-Rabbit gegen Rubisco 1: 10000 verdünnt) inkubiert, deren Antikörper spezifisch an die große und kleine Untereinheit der Rubisco binden. Nach drei Waschschritten in TBS-T-Puffer (vgl. Tab. 2.12) folgte eine zweistündige Inkubation mit dem 2. Antikörper (*alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG* von Sigma, 1: 30000 verdünnt), der an den ersten Antikörper bindet. Nach weiteren Waschschritten mit TBS-T, TBS und AP-Puffer konnte der Western-Blot entwickelt werden. An den zweiten Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gekoppelt, die das Substrat (BCIP/NBT vgl. Tab.

2.14) der Entwicklerlösung modifiziert, so dass es farbig an der Bindungsstelle des Rubisco-Antikörpers ausfällt. Die getrocknete Membran wurde eingescannt.

Tab. 2.11: Zusammensetzung des Towbin-Blotpuffers

Trisbase	0,025 M	1,52 g
Glycine	0,192 M	7,20 g
Methanol	20%	100 ml
mit HCl auf pH 8,3, dann auf 500ml mit H ₂ O demin		

Tab. 2.12: Zehnfacher trisgepufferter Salzpuffer (TBS)

Tris-HCl	1 mM	0,78 g
Mit NaOH auf pH 8,0		
NaCl	15 mM	4,38 g
In 500 ml H ₂ O demin		

TBS-T: 1% Tween 20 in 10xTBS-Puffer

Tab. 2.13: Alkalischer Phosphatpuffer (AP)

Tris-HCl	100 mM	7,8 g
Mit NaOH auf pH 9,5		
NaCl	100 mM	2,92 g
MgCl	5 mM	0,24 g
In 500 ml H ₂ O demin		

Tab. 2.14: Lösung zur Entwicklung des zweiten Antikörpers

BCIP	32 µl	100 mg BCIP in 1,9 ml Dimethylformamid
NBT	66 µl	100 mg NBT in 1,9 ml Dimethylformamid
In 10 ml AP-Puffer		

2.2.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die erste Dimension der zweidimensionalen (2D)-Gele wurden Strips der Firma Amersham mit immobilisierten Gradienten (IPG) von pH 3-10 und der Länge 11 cm verwendet. Diese werden durch Kopplung von Acylamidmonomeren und Immobilinen[®] erzeugt und ermöglichen eine gute Reproduzierbarkeit (Bijellqvist et al., 1982). Die Rehydratisierung und Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Strips wurde im IPGphor der Firma Amersham durchgeführt.

2.2.4.1 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Für die Gele des Xylemexsudates wurden 50 µg Protein und für die Blattgele 150 µg Protein in 210 µl Lysepuffer II verwendet, blasenfrei in Keramik-Küvetten pipettiert, ein IPG-Strip eingelegt und mit Paraffin-Öl überdeckt. Die Rehydratisierung im IPGphor lief bei 20°C über 12 Stunden bei 20 V was laut Görg et al. (1998) Proteinen mit höherem Molekulargewicht den Eintritt ins Gel erleichtert. Die IEF ist eine Elektrophorese mit IPG-Strip, der ein weitporiges Polyacrylamidgel mit immobilisierten pH-Gradienten enthält. Jedes Proteinmolekül bewegt sich zu seinem isoelektrischen Punkt, so dass eine Auftrennung erfolgt, die abhängig vom pH-Gradienten, der Pufferkapazität und der angelegten Spannung ist. Die Fokussierung beginnt mit einer geringen Spannung, die graduell erhöht wird, um Proteinaggregationen zu minimieren. Das gesamte IPGphor-Programm (s. Tab. 2.15) lief bei 40 kWh über 21 Stunden. Nach der Fokussierung können die Strips mit Ölfilm bei -80 °C gelagert werden.

Tab. 2.15 : Programm für das IPGphor mit eingebautem Netzgerät der Firma Amersham.

	Leistung	Spannung	Zeitstunden
Stufe 1 (Rehydratisierung)	5 W	20 V	12 h
Stufe 2	5 W	200 V	1 h
Stufe 3	5 W	500 V	1 h
Stufe 4	5 W	1000 V	1 h
Stufe 5	5 W	4000 V	2 h
Stufe 6	5 W	8000 V	4 h
gesamt			21 h

2.2.4.2 Equilibrierung

Das Equilibrieren der IPG-Strips erfolgte, damit die Proteine für die SDS-Gelelektrophorese denaturiert wurden und ein optimaler Proteintransfer von der ersten zur zweiten Dimension gewährleistet wurde. Die gefrorenen Strips wurden langsam aufgetaut, vorsichtig mit Aqua demin abgespült und 15 min liegend unter leichter Bewegung in je 5 ml Equilibrierungspuffer mit 50 mg DTT inkubiert. Der Equilibrierungspuffer (s. Tab. 2.16) enthält Tris-HCl (pH 8,8), Glycerol, 4% SDS und 6 M Harnstoff um elektroosmotische Effekte zu reduzieren und einen unvollständigen Proteintransfer zu vermeiden (Görg et al., 1987). Die Zugabe von Bromphenolblau ermöglichte es, den Elektrophoreselauf zu verfolgen. Die Strips wurden anschließend 15 min in je 5 ml Equilibrierungspuffer mit 100 mg Jodacetamid inkubiert.

Jodacetamid alkyliert die Cysteinreste zum Schutz gegen Reoxidation und reduziert während der Elektrophorese die Streifen- und Artefaktbildung. Nach der Equilibrierung wurden die Strips mehrmals mit Laufpuffer gespült, um Pufferreste zu entfernen.

Tab. 2.16: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers

Tris-HCl pH 8,8 1,5 M	50 mM	6,7 ml
Harnstoff	6 M	72,02 g
Glycerol 87% (v/v)	30% (v/v)	69 ml
SDS	4% (w/v)	4,0 g
Bromphenolblau		sehr wenig
auf 200 ml mit H ₂ O demin auffüllen		

Nach O'Farrell (1975), verändert.

2.2.4.3 2. Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der zweiten Dimension der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Aufgrund der Vertikalapparatur und der Verwendung von IPG-Streifen war kein Sammelgel notwendig, es wurde nur ein 15%-iges Trenngel (s. Tab. 2.17) gegossen, mit Wasser überschichtet und über Nacht bei RT auspolymerisiert.

Tab. 2.17: 15%-iges Acrylamid-Trenngel der zweiten Dimension

Acrylamid-Lösung	40,0 ml
Resolving Gel Buffer	20,0 ml
H ₂ O demin.	18,8 ml
10% SDS	800 µl
10% APS	400 µl
TEMED	26,4 µl
Gesamtvolumen 80 ml für 2 Gele	

Verändert nach Berkelmann (1998).

Die Geloberfläche wurde am folgenden Tag mehrmals mit Laufpuffer (s. Tab. 2.9) gespült. Für den Marker wurden 0,5 cm² große Markerplättchen zugeschnitten, 10 µl Fermentas PageRuler™ Protein Ladder aufgetragen und mit flüssiger Agarose versiegelt. Die Strips wurden mit Laufpuffer benetzt und auf die Geloberfläche aufgesetzt, so dass beide Gele durchgängig in Kontakt standen. Die vorbereiteten Markerplättchen wurden an der sauren Seite des Strips platziert und alles mit Agarose überschichtet, um ein Aufschwimmen zu verhindern. Der Lauf erfolgte in der Elektrophoresekammer (Höfer SE 600) bei 20 °C mit 15 mA pro Gel für 15 min und anschließend 40 mA pro Gel, bis die blaue Lauffront das Gelende

erreicht hatte. Die Gele wurden sofort aus der Apparatur entnommen und über Nacht in eine Fixierlösung (vgl. Tab. 2.10) gelegt, um eine Diffusion der Proteine zu vermeiden.

Tab. 2.18: Zusammensetzung des *Resolving gel buffers*

Tris base 1,5 M	181,5 g
H ₂ O demin	750 ml
HCl	Auf pH 8,8
Auf 1 l auffüllen	

2.2.5 Silberfärbung

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine können mit Hilfe von Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Die Silberfärbung ist mit bis zu 1 ng detektiertem Protein eine der empfindlichsten Detektionsmethoden und 10-100mal sensitiver als eine Färbung mit Coomassie Blue. Die Silber-Ionen bilden nichtstöchiometrische Komplexe mit den Proteinen, indem sie mit den sauren Gruppen und Sulfhydrylresten in Wechselwirkung treten. Durch die Zugabe von Formaldehyd werden die Silberionen reduziert und bilden rotbraune bis schwarze Spots. Die angewandte Silberfärbung beruht auf dem ProteoSilver[™] Plus Silver Kit von Sigma und wurde für 1D- wie auch 2D-Gele angewendet. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Scanner der Firma Umax (Powerlook 1120).

2.2.6 Coomassie-Färbung

Da für eine Analyse der Proteinspots mittels MALDI-TOF die Silberfärbung nicht geeignet ist, wurden die zum Ausstechen der Proteinspots vorgesehenen Gele mit der Methode Hot Coomassie R-350 (Amersham, Schweden) gefärbt. Die Färbelösung setzt sich aus 0,025% Coomassie R-350 in 10% Essigsäure zusammen und wird zum Sieden erhitzt. Pro Gel wurden 200 ml Coomassielösung verwendet und die Blattgele einmal 15 min, die Xylemgele zweimal 15 min gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes wurde durch 10% Essigsäure über einen Zeitraum von 48 h erzielt, wobei die Entfärbelösung mehrmals gewechselt wurde.

2.2.7 Gelanalyse

Durch die 2D-Gelelektrophorese werden mehrere hundert Proteinspots aufgetrennt, so dass eine Auswertung der qualitativen und quantitativen Unterschiede von Gelen nur per Computer

möglich ist. Die Schritte der computergestützten Gelanalyse beinhalteten: Digitalisierung der Gele mit dem Durchlichtscanner, Spoterkennung und Spotquantifizierung, Gelvergleiche und eine Datenanalyse. Der Vergleich der Gele erfolgte mit dem Programm Decodon Delta 2D-Version 3.3 der Firma Decodon. Da Proteinspots nicht immer zu 100% auf derselben Position erscheinen, mussten für ein Übereinanderlegen zweier Gele 15-20 identische Proteinspots auf beiden Gelen als Orientierungspunkte ausgewählt werden. Sie müssen gleichmäßig über das Gel verteilt und von guter Qualität sein. Anhand dieser Orientierungspunkte konnten Rotationen, Verzerrungen oder Verschiebungen für die Gele berechnet und damit beide Gele übereinander gelegt werden (Schrattenholz, 2001). Mit der *chained group warping strategy* wurden alle parallelen Gele einer Behandlung übereinander gelegt und daraus ein Fusionsgel erstellt. Die Fusionsgele aller Behandlungen ergeben übereinandergelegt wiederum das Mastergel. Alle Spots des Mastergels werden auf die anderen Fusionsgele zurückübertragen, so dass alle Gele die identische Anzahl an Proteinspots besitzen. Der Einsatz von Filtern ermöglicht es, Veränderungen der Spotintensitäten (hochreguliert, herunterreguliert, weggefallen, neu hinzugekommen) der verschiedenen Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle zu ermitteln.

2.2.8 Konservierung der Gele

Für eine kurzfristige Lagerung, zum Beispiel zum Entnehmen der Proteinspots für eine Analyse, wurden die Gele in 5%iger Glycerinlösung bei 4 °C aufbewahrt. Durch Trocknen der 2D-Gele besteht die Möglichkeit, die Proteine über einen längeren Zeitraum zu konservieren, auch wenn dadurch die Originalgröße des Gels nicht beibehalten werden kann. Die Gele wurden 15 min in einer 3% Glycerinlösung und die Zellophanfolien der Firma Roth 15 min in 5% Glycerinlösung inkubiert. Dann wurde eine Glasplatte mit 5% Glycerinlösung bedeckt, eine Folie luftblasenfrei aufgelegt und mit 3% Glycerinlösung überschichtet. Das Gel wurde auf die Folie gelegt, mit 3% Glycerinlösung überdeckt und die zweite Folie luftblasenfrei aufgelegt. Der obere Trockenrahmen wurde mit Klammern fixiert und das Gel über Nacht trocknen gelassen.

2.2.9 Identifikation der Proteine mittels MALDI-TOF

Die ausgestochenen Proteinspots wurden einzeln in Eppendorfgefäße überführt und entweder an das Institut für Medizinische Biochemie der Justus-Liebig-Universität Giessen oder an das Max-Planck-Institut für Pflanzenphysiologie in Golm geschickt. Dort erfolgte ein Trypsinverdau der Proteine und damit die Spaltung in spezifische Peptidfragmente. Bei der Analyse durch MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight*) wurden die gewonnenen Peptidfragmente mittels Laserbeschuss ionisiert, in einem elektrischen Feld beschleunigt und die Molekülmasse der gebildeten primären Ionen sowie deren Zerfallsprodukte bestimmt (Schrattenholz, 2001). Die resultierenden Peptid-Massenlisten wurden mit theoretischen Massen in der Proteindatenbank *Mascot Peptide Mass Fingerprint* (s. 2.5) verglichen und Bruchstücke der Aminosäuresequenz ermittelt. Die Identifikation der Bruchstücke erfolgte durch Vergleich der Sequenzähnlichkeiten mit Einträgen der Proteindatenbanken von NCBI, Barley-1 oder TIGR. Ein Problem liegt bei der Identifikation von Proteinspots mit geringen Intensitäten, denn die Detektionsgrenze der MALDI-Analyse liegt bei einer Probenkonzentration von mindestens 100pMol/µl in einem Mindestvolumen von 5 µl.

2.2.10 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Zur Gewinnung von reinem Protein für *Uptake*-Versuche zum Nachweis einer Signalfunktion sollte das rekombinante Protein eines durch Protonenstress induzierbaren Gens (*PRI-1*) in einem heterologen bakteriellen Expressionssystem synthetisiert werden. Die rekombinante Proteinexpression wurde mit dem Expressionsvektor pQE 30 (The Qiaexpressionist™, Qiagen) durchgeführt. Dieser enthält N-terminal sechs aufeinanderfolgende Histidin-Reste (6x His-tag) mit deren Hilfe das synthetisierte Protein aufgereinigt werden kann.

2.2.10.1 Klonierungsstrategie

Der kodierende Bereich von *PRI-1*, *TCTP* und *Glucanase* wurde ausgehend von cDNA mittels PCR (s. 2.3.5) inklusive Startcodon aber ohne Stoppcodon amplifiziert. Der Zwischenklonierungsvektor pGEM-T von Promega wurde verwendet, um nach Ligation das PCR-Produkt zu sequenzieren und damit die Korrektheit der Sequenz sicherzustellen. Aufgrund von Fehlern im Leseraster von *TCTP* und *Glucanase* wurde nur mit *PRI-1* weitergearbeitet. Anschließend wurden der Expressionsvektor pQE30 und der Klon mit

denselben Restriktionsenzymen Bam und Hind III verdaut, so dass das offene Leseraster des zu exprimierenden Gens im selben Leseraster wie der 6x His-tag in den Vektor ligiert wurde und ein funktionales Fusionsprotein entstand (vgl. 8.2). Für den Restriktionsverdau wurde ein 20 µl-Ansatz mit 10fach Tango Puffer, je 13 U der Enzyme Bam und Hind III (Fermentas) und 2 µg pQE-Vektor 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der komplette Verdau mit XB-Puffer versetzt und im Agarosegel aufgetrennt (s. 2.3.3.2). Die Banden des linearisierten pQE-Vektors und des PCR-Fragments wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Nucleo-Spin Extract II System (Macherey-Nagel) eluiert.

Über Nacht wurden 3 µl des PCR-Produktes mit 1 µl des pQE-Vektors bei 4°C ligiert (10 µl Ansatz: 5 µl Ligationsmix, 1 µl T₄-Ligase, Promega). Kompetente Zellen wurden nach Anleitung im „Qiaexpressionist“ aus dem *E. coli*-Stamm SG 13009 [pREP4] hergestellt, der besonders für gering exprimierte Proteine geeignet ist. Mit 5 µl des Ligationsansatzes wurden dann die kompetenten *E. coli*-SG13009-Zellen nach Herstellerprotokoll transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg ml⁻¹) und Kanamycin (12 µg ml⁻¹) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in einer Bakterien-PCR-Reaktion (s. 2.3.7) mit den für PR1-1 spezifischen Primern auf Vorhandensein des ORF getestet.

Primer für die Klonierung in pQE 30:

PR1-N	5`-TTTATCAAGGATCCGCATCTTCCAAGAGTAGTC
PR1-C	5`-TTATCAAAAAGCTTCTACTTGGCTTCGGCGTCAAGG
TCTP-N	5`-TTATCAAGGATCCCTCGTGTACCAGGACAAGC
TCTP-C	5`-TTATCAACTGCAGTCAGCAGTCCCTCCC
Glucanase-N	5`-TTATCAAGGATCCGTGAGGATCTACGACGCCG
Glucanase-C	5`-TTATCAACTGCAGTCAAGAGTTGTTTGGTGAG

2.2.10.2 Überprüfung der Expression des rekombinanten Proteins

Drei getestete Klone wurden in 5 ml LB Vorkultur mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 2,5 ml der Übernachtskultur wurden zur Vermehrung für 50 ml vorgewärmtes LB Medium verwendet und bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. 1,5 ml des Mediums wurden als nicht induzierte Kontrolle (t₀) abgenommen und die restliche Kultur zur Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid, 1 mM Endkonzentration) versetzt. IPTG inaktiviert das *lac*-Repressor-Protein, das an die Operatorsequenz des Plasmids

bindet und damit die Genexpression verhindert. Nach 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 h Schüttelinkubation wurden jeweils 1,5 ml Kultur abgenommen, pelletiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.10.3 Extraktion des rekombinanten Proteins

Die Proteinexpression wurde mittels einer schnellen Aufarbeitungsmethode überprüft. Dazu wurden die Bakterienpellets von 2.2.9.2 in 200 μl eiskaltem PBS resuspendiert und mit der 4-fachen Menge an Aceton über Nacht gefällt. Dann wurde bei 4°C und 16000 rpm 4 min abzentrifugiert und das Pellet in 20 μl PBS-T aufgenommen und direkt für eine SDS-PAGE mit 20 μl Auftragspuffer vermischt und aufgetrennt. Da keine Antikörper für PR1-1 vorhanden waren, konnte kein spezifischer Bandennachweis erbracht werden.

2.2.10.4 Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Zur Aufreinigung des Proteins wurden neue Kulturen angezogen. Von den 5 ml Vorkultur wurden 3 ml zum Animpfen von 100 ml Medium verwendet und ca. 80 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600} von 0,7 inkubiert. Anschließend wurde IPTG (Endkonzentration 1 mM) zur Induktion der Proteinsynthese zugegeben und weitere 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttler inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5500 g für 4 min wurde das Pellet über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Dann wurden pro g Pellet 2 ml LEW Buffer (Kit *Purification of polyhistidine-tagged proteins*, Macherey-Nagel) und 4 mg Lysozym (*lysozyme from chicken egg white*, Serva) zugegeben, 30 min auf Eis gerührt und mehrfach im Ultraschallbad behandelt. Nach 30 min Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 10000 g wurde das Pellet zur Kontrolle auf das Vorhandensein von Protein aufgehoben und der Überstand zur Aufreinigung auf eine Protino[®] Ni-TED 1000 packed Säule (Macherey-Nagel) gegeben. Die Aufreinigung erfolgt, indem die Histidin-Reste des rekombinanten Proteins an Nickelionen binden, die an einer TED (Tris-Carboxymethyl Ethylen Diamin)-Matrix chelatiert sind. Nach zwei Waschschrinen wurde das Protein eluiert. Alle Fraktionen wurden gesammelt und damit eine SDS-PAGE (s. 2.2.2) durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolierung und -Aufkonzentrierung

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Wurzel- und Blattproben wurden mit flüssigem Stickstoff pulvrig gemörsert und exakt 100 mg eingewogen. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das Kit *Invisorb[®] Spin Plant RNA Mini Kit* der Firma Invitek verwendet. Das Probenmaterial wurde 30 min bei RT mit DCT-Lysepuffer inkubiert, um die Zellen aufzuschließen und die DNA spezifisch an Nanopartikel zu binden. Die störende DNA wurde anschließend durch einen speziellen Filter entfernt, während das die RNA enthaltende Filtrat über eine Säule gegeben wurde. Nach mehreren Reinigungsschritten wurde die RNA auf Eis eluiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Da die Wurzelproben nur sehr geringe Mengen an RNA enthielten, mussten sie aufkonzentriert werden. Dazu wurde die isolierte RNA von vier Wurzelproben vereinigt und mit 1/10 Volumen 5 M LiCl und dem doppelten Volumen an kaltem Isopropanol über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 18000 rpm für 10 min wurde das RNA-Pellet mit kaltem 70% Ethanol gewaschen und in $20\text{ }\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ aufgenommen.

2.3.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung ihres Absorptionsmaximums bei 260 nm. Zur Messung wurde die RNA- bzw. DNA-Lösung 1:60 verdünnt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte entsprechend dem Lambert-Beerschen-Gesetz (Sambrook et al., 1989).

Die Messung erfolgte mit dem Spektralphotometer (Cary 4 Bio Varian, Programm Cary WinUV) gegen H_2O demin bei 260 nm für RNA bzw. DNA und bei 280 nm für Protein. Die *ratio*, das Verhältnis von A_{260}/A_{280} , ist ein Maß für die Verunreinigung mit Phenol- oder Proteinresten und sollte für reine DNA 1,8 und für reine RNA 2,0 betragen. Geringere Werte weisen auf Verunreinigungen hin (Nicholl 1995). Die Berechnung der Probenkonzentration ergibt sich aus folgender Formel:

$$c = A_{260} \times 40 \text{ (für RNA oder 50 für DNA)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Denaturierende DNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität und Quantität wurde die erhaltene RNA in einem 1%igen Agarosegel mit Formaldehyd aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS (vgl. Tab. 2.19). Zur Entfernung von RNAsen wurde ein Vorlauf des Gels von 15 min bei 50 V durchgeführt.

Tab. 2.19: Zusammensetzung des 20fach konzentrierten 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure-Puffers

MOPS	800 mM
Natriumacetat	200 mM
0,5M EDTA	20 mM
in 1 Liter H ₂ O lösen und autoklavieren	

2 µg RNA wurden 1:2 mit RNA-Auftragspuffer (s. Tab. 2.20) versetzt, für 15 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Banden unter UV-Licht mittels Ethidiumbromid-Floureszenz sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Tab. 2.20: Auftragspuffer für die RNA-Proben:

Formamid	720 µl
Formaldehyd	260 µl
Ethidiumbromid (10mg/ml)	50 µl
Bromphenolblau	80 µl
Glycerol	80 µl
20 x MOPS	80 µl

2.3.3.2 Nicht-denaturierende DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA (genomisch, Plasmide, PCR-Produkte) erfolgte für Fragmentlängen von 200-1500 bp im 1-1,5%igen nicht denaturierenden Agarosegel. Als Puffer diente 1x TBE, 5 µl Ethidiumbromid wurden zur Sichtbarmachung der Banden dem Gel zugesetzt. Von den DNA-Proben wurden 10-15 µl mit 3 µl des Auftragspuffers gemischt, über einen Zeitraum von 1-2 h bei 120 V aufgetrennt und anschließend fotografisch dokumentiert. Als DNA-Molekulargewichtsstandards dienten 7 µl der 100 bp oder 500 bp DNA Leiter der Firma Invitrogen.

Tab. 2.21: Zehnfacher Tris-Borat-EDTA-Laufpuffer

Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M.
EDTA	0,025 M auf pH 8,3

Tab. 2.22: Zusammensetzung des XB-Auftragspuffer für die DNA-Gelelektrophorese

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%
Glycerol in 1 x TBE-Puffer	25,0%

2.3.3.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zeigte eine DNA-Bande die erwartete Größe, wurde sie zur weiteren Analyse aus dem Gel mit möglichst wenig Agarose ausgeschnitten und eluiert. Zur Extraktion der DNA aus dem Gel fanden das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) oder das E.Z.N.A. Gel Extraktion Kit (PeqLab) Verwendung, welche die DNA über Säulen aufreinigen.

2.3.4 Herstellung von cDNA (*complementary* DNA)

Von einem mRNA-Strang ausgehend synthetisiert das aus AMV-Retroviren stammende Enzym Reverse Transkriptase den komplementären DNA-Strang, die *complementary* DNA (cDNA). Dabei diente das 3'-poly(A)-Ende der m-RNA als Bindestelle für einen Oligo(dT)-Primer. Dieser wiederum liefert eine 3'-OH-Gruppe für die Bindung der Reversen Transkriptase (Nicholl 1995). Die entstandene cDNA fand Verwendung für die Durchführung von PCRs, zur Klonierung und zur Erstellung von cDNA-Datenbanken.

Zur Synthese der cDNA wurden verschiedene Kits verwendet, die immer mit dem identischen Prinzip arbeiten: Schmelzen der RNA-Sekundärstrukturen, Primer-Annealing, cDNA-Synthese, Degradierung der RNA und Denaturierung der Reversen Transkriptase.

Es standen folgende Kits zur Verfügung: ImProm-II™ Reverse Transcription System von Promega, Reverse-iT™ RTase Blend Kit von ABgene oder iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma Biorad. Die jeweiligen Einsatzmengen finden sich in Tabelle 2.23.

Die Qualität der cDNA wurde in einer PCR (s. 2.3.5) mit Standard-Ubiquitinprimern getestet, dann Teile 1: 10 für die weitere Verwendung verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tab 2.23: Variable Bedingungen für die Kits zur cDNA-Synthese

	ImProm-II™ (Promega)	Reverse-iT™ (ABgene)	iScript™ (Biorad)
RNA	1 µg	1 µg	1 µg
10 mM each dNTPs	1 µl	1 µl	-
Reaktionsmix	4 µl	4 µl	4 µl
Transkriptase	1 µl	1 µl	1 µl
Inkubationszeit	42 °C 60 min	47 °C 50 min	42 °C 30 min
Reaktionsstopp	70 °C 15 min	75 °C 10 min	85 °C 5 min

2.3.5 PCR (*polymerase chain reaction*)

Für die spezifische Amplifikation von DNA wurden PCRs (*polymerase chain reactions*) mit dem Thermocycler T-Gradient von Biometra durchgeführt. Es wurden entweder 2 µl 1:10 verdünnte cDNA oder 100 ng Plasmid eingesetzt. Die Bedingungen für einen Reaktionsansatz und das Standardprogramm des Thermocyclers finden sich in Tabelle 2.24 und 2.25. Zur Kontrolle wurde das PCR-Reaktionsgemisch mit Auftragspuffer versetzt und auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen (s. 2.3.3.2).

Tab. 2.24: Bedingungen des Standard-PCR-Reaktionsansatzes

Taq-Polymerase (BioTherm™, Genecraft)	0,15 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
Primer (100 mM)	0,3 µl
DNTP-Mix (10 mM)	0,3 µl
H ₂ O demin	10,75 µl
Template cDNA (1:10 verdünnt)	1 µl

Tab. 2.25: Standardprogramm des Thermocyclers Biometra T-Gradient

Dauer	Temperatur	Zyklustyp	Zyklenzahl
3 min	94 °C	Initiale Denaturierung	1
30 sec	94 °C	Denaturierung	35
30 sec	Variabel, je nach Primer	Primer-Anlagerung	
30 sec	72 °C	Verlängerung	
5 min	72 °C	Finale Elongation	1
-	4 °C	Pause	

Die für die Klonierung der einzelnen Gene verwendeten Primer wurden auf der Grundlage der aus den 2D-Gelen durch MALDI-TOF gewonnenen Sequenzbruchstücke konfiguriert und orientieren sich wenn möglich an in der BLAST- oder TIGR-Datenbank vorhandenen homologen Genen von Gerste. Stand kein Gerstehomolog zur Verfügung, wurde das BLAST-Ergebnis mit der größten Übereinstimmung als Vorlage herangezogen. Die benötigten Primer wurden mit dem Programm Primer 3 erstellt und entweder bei Operon Biotechnologies (Köln) oder bei Roth (Karlsruhe) bestellt. Um zu überprüfen, ob die Primer auch das Zielgen amplifizieren, wurde das PCR-Produkt kloniert (s. 2.3.6) und sequenziert. Die Primersequenzen für GAPDH und α -Tubulin wurden von Burton et al. (2004) übernommen. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer befindet sich im Anhang unter 8.1.

2.3.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden nach Herstellerangaben in den *T/A cloning* Vektor pGEM[®]-T (Promega, USA) ligiert, der eine schnelle Selektion positiver Plasmid-tragender Bakterienkolonien durch Blau/Weiß-Selektion ermöglicht (Sambrook et al., 1989). Das Bakteriengenom kodiert für die N-terminale Untereinheit des Enzyms β -Galaktosidase, auf dem Plasmid befindet sich die C-terminale Untereinheit. Sind beide Teile intakt, wird die β -Galaktosidase produziert und kann die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff katalysieren. Kommt es durch den Einbau des DNA-Fragmentes zu einer Unterbrechung des *lacZ'*-Gens im Plasmid, ist die β -Galaktosidase nicht funktionsfähig und es entstehen weiße Kolonien. Die Vektoren wurden in kompetente *E. coli*-JM109-Zellen (Promega, USA) transformiert und weiße Kolonien mittels Kolonie-PCR auf die Integration der Fremd-DNA überprüft.

2.3.7 Kolonie-PCR

Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR und genspezifischen oder plasmidspezifischen Primern (M13fw, M13rev) auf die Integration der Fremd-DNA überprüft. Dazu wurden einzelne auf LB-Selektionsplatten (vgl. Tab. 2.26 und 2.27) wachsende Bakterienkolonien mit einem Zahnstocher aufgenommen und dem Mix einer Standard-PCR bei 45 °C zugesetzt. Nach Auftrennung des PCR-Produktes in einem 1,5%igen Agarosegel (s. 2.3.3.2), zeigte eine Bande von 236 bp den leeren pGEM[®]-T Vektor an, erfolgreich transformierte Kolonien wiesen eine um die Größe des eingebauten Fragmentes verschobene Bande auf.

Plasmidspezifische Primer

M 13fw 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT

M 13rev 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G

Tab. 2.26: Zusammensetzung des Luria-Bertani-Mediums für Agarplatten

Casein-Hydrolysat	5,0 g
NaCl	5,0 g
Hefe-Extrakt	2,5 g
Agar-Agar	9,0 g
in ½ l H ₂ O demin lösen, pH 7,3	

Tab. 2.27 Ansatz des Ampicillins für LB-Selektionsplatten

Ampicillin	100 mg in 1 ml H ₂ O steril filtrieren
Natronlauge	auf pH 8,0 einstellen
Für LB-Platten 1:1000 mit H ₂ O demin verdünnen	

2.3.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation wurde als Miniprep aus 3 ml Übernachtskultur (in LB-Medium Tab. 2.28) mit dem QIAprep Miniprep Kit der Firma Qiagen durchgeführt, das auf der Methode der alkalischen Lyse beruht.

Tab. 2.28: Zusammensetzung des Luria-Bertani-Mediums für Flüssigkulturen

Casein-Hydrolysat	10,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
auf 1 l mit H ₂ O demin auffüllen	
Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml), pH 7,3	

2.3.9 Sequenzierung

Eine Sequenzierung ist notwendig, um die Nukleotidsequenz des im Plasmid befindlichen DNA-Fragments zu bestimmen und Sequenzvergleiche mit Datenbanken vornehmen zu können. Die bei der Plasmidisolierung gewonnene DNA wurde photometrisch quantifiziert (s. 2.3.2). Für die Sequenzierung mussten die Proben auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt werden, wobei eine Abgabemenge von 250 ng und eine Ratio von 1,8 zu berücksichtigen war. Die Plasmid-DNA wurde im Institut für molekulare Mikrobiologie der JLU Gießen abgegeben und dort mit dem Apparat Genetic Analyse 310 von der Firma PE

Applied Biosystem sequenziert. Mit diesem Gerät ist es möglich, jede Base mit einem eigenen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und eine simultane Anregung und Detektion durchzuführen.

2.3.10 Real-Time-PCR

Bei der Real-Time-PCR wird die Produktakkumulation in Echtzeit betrachtet, wobei die Produktzunahme mittels des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green im Thermocycler Rotor-Gene 300 (Corbett Research) untersucht wurde. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet weitgehend sequenzspezifisch in der Furche der doppelsträngigen DNA und fluoresziert nach Anregung ca. 1000 mal stärker als der freie Farbstoff und wird bei 470 nm gemessen (Wilhelm, 2003). Die Bedingungen für einen Reaktionsansatz der Real-Time-PCR findet sich in Tab. 2.29. Nach Durchlaufen der Zyklen wurden die Proben durch Erhitzen über einen Temperaturgradienten von 72-95 °C geschmolzen und eine Schmelzkurve erstellt. Deren Peak zeigt, bei welcher Temperatur die cDNA einer Probe geschmolzen ist. Dies geschieht zur Überprüfung der Probenidentität untereinander und zur Abgrenzung gegenüber der Probenfreien Kontrolle, die einen wesentlich niedrigeren Schmelzpunkt besitzen sollte. Es fanden das Platinum™ SYBR Green qPCR SuperMix Kit von Invitrogen und der Absolute™ QPCR SYBR Green Mix von ABgene (Surrey, UK) Verwendung. Die verwendeten Standardprogramme der beiden Kits finden sich in den Tabellen 2.30 und 2.31. Zur Standardisierung wurden Ubiquitin und α -Tubulin als *Housekeeping*-Gene eingesetzt (Burton et al., 2004, Cooker und Davies, 2003), weil beide Proteine in der Pflanze konstitutiv exprimiert werden sollten.

Primer für die Real-Time-PCR:

HvUbi1fwd	5`- CCAAGATGCAGATCTTCGTGA
HvUbi1rev	5`- TTCGCGATAGGTAAAAAGA
α -Tubulin-N	5`-AGTGTCCCTGTCCACCCACTC
α -Tubulin-C	5`-AGCATGAAGTGGATCTCCGG
HvGAPDH-N	5`-GTGAGGCTGGTGCTGATTACG
HvGAPDH-C	5`-TGGTGCAGCTAGCATTGAGAC
GAPDH-C kurz	5`- TAGAACCGAGAAGGCTGCAT
GAPDH-N kurz	5`- TGTAACCCCACTCGTTGTCA

CAD X2D9-N	5` - GGACATCCACCAGGTCAAGA
CAD X2D9-C	5` - GACGTCGTTGTACGACCAGA
TCTP X2E3-N	5` - CAATGTCAACCACCTTCACG
TCTP X2E3-C	5` - GGGGGAGAAATCTCAAGAGG
PR1-N	5` - AAGAAGATGACGTGGGGTTG
PR1-C	5` - CCCAAGTGGATGTACGCTTT

Tab. 2.29: Ansatz für eine Real-Time-PCR-Reaktion

	Platinum (Invitrogen)	ABsolute (ABgene)
Mastermix	5 µl	5 µl
Primergemisch	0,4 µl	0,2 µl
cDNA (1:10 verdünnt)	2 µl	2 µl
H ₂ O demin	2,6 µl	2,8 µl

Tab. 2.30: Standardprogramm des Thermocyclers für Platinum (Invitrogen):

Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
10 min	95 °C Hold	1
15 sec	95 °C	45
20 sec	Variabel je nach Primer	
15 sec	72 °C	
23 min	72-95 °C Melt	1
1 min	25 °C Hold 2	1

Tab. 2.31: Standardprogramm des Thermocyclers für ABsolute (ABgene):

Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
2 min	50 °C Hold 1	1
15 min	95 °C Hold 2	1
15 sec	95 °C	45
1 min	Variabel nach Primer	
15 sec	72 °C	
23 min	72 – 95 °C Melt	1
1 min	25 °C Hold 3	1

Die Auswertung der Daten wurde mit dem Software-Programm Rotor-Gene (Version 6.0) durchgeführt. Es wurden jedem Real-Time Lauf drei Proben-freie Kontrollen beigefügt, um sicherzustellen, dass eine spezifische Reaktion abgelaufen war. Zudem wurde jede Probe dreimal eingesetzt und diejenigen nicht in die Auswertung miteinbezogen, deren Wert in der Schmelzkurve eine größere Abweichung als 0,3 °C aufwiesen. Mit der Real-Time-PCR wird der C_T-Wert jeder Probe bestimmt, der in der exponentiellen Phase proportional zum Logarithmus der Matrizenmenge im Reaktionsansatz ist (Wilhelm, 2003). Der C_T-Wert ist

der für alle Proben gleich gewählte Schwellenwert der Fluoreszenz. Durch den Einsatz von Standards (Verdünnungsreihen der Matrizen) wurde über eine Standardkurve und die C_T -Werte die Matrizen-Konzentration in jeder Probe von der Rotor-Gene Software bestimmt. Die Mittelwerte der Wiederholungen eines Laufes sowie der dreimaligen Wiederholungen wurden berechnet und durch die Mittelwerte der *Housekeeping*-Gene Ubiquitin und α -Tubulin geteilt. Die Kontrolle wurde abschließend gleich null gesetzt und die relativen Veränderungen der Behandlungen dazu in Prozentwerten ausgedrückt.

2.4 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Firmen Roth (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe), Serva (Serva *Electrophoresis* GmbH, Heidelberg), Merck (Merck KGaA, Frankfurt), Fluka (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen), Sigma (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) und Amersham (Amersham Biosciences plc., Freiburg) in p. A. Qualität bezogen. Die für molekularbiologische Methoden verwendeten Materialien wurden vom Hersteller auf RNase- und DNase-Verunreinigungen getestet. Für die Arbeiten mit Nukleinsäuren und Bakterienkulturen wurden alle verwendeten Materialien autoklaviert. Alle Lösungen und Verdünnungen wurden mit H_2O_{demin} hergestellt.

2.5 Software und Datenbanken

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden folgende Datenbanken, Internetdienste und frei im Internet verfügbare Programme verwendet:

- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) der Gen-Datenbank von **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*) zum Vergleich von Nukleotid- oder Proteinsequenzen
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
- **ClustalW** (*European Molecular Biology Laboratory [EMBL] outstation – European Bioinformatics Institute*) zum Vergleichen von mehrerer Sequenzen (Alignment)
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>
- **TreeView** zur Visualisierung von Stammbäumen
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- **CDD** (*conserved domain database*) von NCBI zum Auffinden konservativer Motive in Proteinsequenzen.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>

- Die Programme **PSORT** (Nakai und Kanehisa, 1991) sowie **TargetP** (Emanuelsson et al., 2000) dienen der Berechnung der möglichen subzellulären Lokalisation der Xylemproteine
<http://psort.nibb.ac.jp>
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>
- **MASCOT Peptide Mass Fingerprint** zur Datenbanksuche von Ergebnissen des Maldi-tof
http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PM
- **BRENDA**: Enzymdatenbank (Schomburg, 2001)
<http://www.brenda.uni-koeln.de/>
- **SignalP 3.0** zur Identifikation von Schnittstellen von Signalpeptiden (Bendtsen, 2004)
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- **NetPhos 2.0**: Vorhersage von Phosphorylierungsstellen bei Serinen, Threoninen und Tyrosin
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>
- **2zip** für die Identifizierung von *leucine zipper* Motiven (Kost Gramatikoff et al., 2004)
www.2zip.molgen.mpg.de
- **ExPasy Compute pI/Mw Tool**: Berechnung von isoelektrischem Punkt und molekularer Masse eines Proteins
http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html
- **ExPasy Translate Tool**: Übersetzen einer Nukleotidsequenz in die entsprechende Proteinsequenz.
<http://www.expasy.org/tools/dna.html>
- **pDRAW32** zur *in silico* Klonierung und zur Erstellung von Vektorkarten
<http://www.acaclone.com>
- **Primer3** (Rotzen S. und Skaletsky H. J., 2000) zum Entwerfen von Oligonukleotid-Primern
<http://www.acaclone.com>
- **NEBcutter 2.0** zur Suche von Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen in Nukleotidsequenzen (New England BioLabs)
<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
- Auf der Suche nach Gerstensequenzen wurden folgende Datenbanken durchsucht:

-
- o **Barley1**-Datenbank (Shen et al., 2005) <http://www.barleybase.org>
 - o **GABI** Primärdatenbank (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH). <http://gabi.rzpd.de/>
 - o **TIGR Barley Gene Index** (*TIGR Institute for Genomic Research*, Quackenbusch et al., 2000). <http://www.tigr.org>

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der durch Protonenstress ausgelöste Resistenzmechanismus der Gerstensorte (cv.) Ingrid gegenüber dem Echten Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* BghA6 untersucht und mit dem durch Salzstress ausgelösten verglichen. Die Gerste wurde in Hydrokultur unter verschiedenen pH-Intensitäten angezogen. An Wurzel- und Blattmaterial wurde die Resistenzinduktion durch Protonenstress untersucht und Expressionsanalysen durchgeführt. Das Xylemexsudat wurde für 2D-Gele verwendet und die Veränderungen des Proteinspotmusters durch Protonenstress analysiert und mit dem unter Salzstress verglichen. Anhand ausgewählter identifizierter Proteinspots wurden Elemente möglicher Resistenzmechanismen und Signalkaskaden ermittelt.

3.1 Pflanzenanzucht

Die Ernte der Gerstenpflanzen erfolgte sowohl für die Protonenstressanzuchten, wie auch bei den salzgestressten Pflanzen am 27. Tag. Spross und Blätter aller Anzuchtvarianten zeigten keine Stresssymptome. Es gab keine Mangelsymptome, die Gerstenpflanzen zeigten eine identische Wuchshöhe und wiesen die gleiche Grünfärbung auf. Auch die Wurzeln der unter Salzstress angezogenen Gerste zeigten bei 15 mM und 20 mM NaCl-Stress keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Aufgrund der starken Verwachsung der Wurzeln in den Anzuchtwannen war eine Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse von Wurzeln einzelner Pflanzen nicht möglich.

Im Gegensatz dazu kam es durch den Protonenstress trotz langsamen Absenkens des pH-Wertes der Nährlösung zu starken Veränderungen der Wurzel. Die Wurzeln der Kontrolle waren am längsten, die Wurzeln der behandelten Pflanzen zeigten eine kontinuierliche Längenabnahme mit steigender Stressintensität. Bei allen Protonenstressvarianten, jedoch am stärksten bei pH 3,6, starben die Wurzelspitzen ab und es wurden wenige neue Adventivwurzeln an der Sprossbasis ausgebildet. Die Seitenwurzeln der zweiten und dritten Ordnung waren sehr kurz, verkrümmt und am Ende zum Teil keulig verdickt.

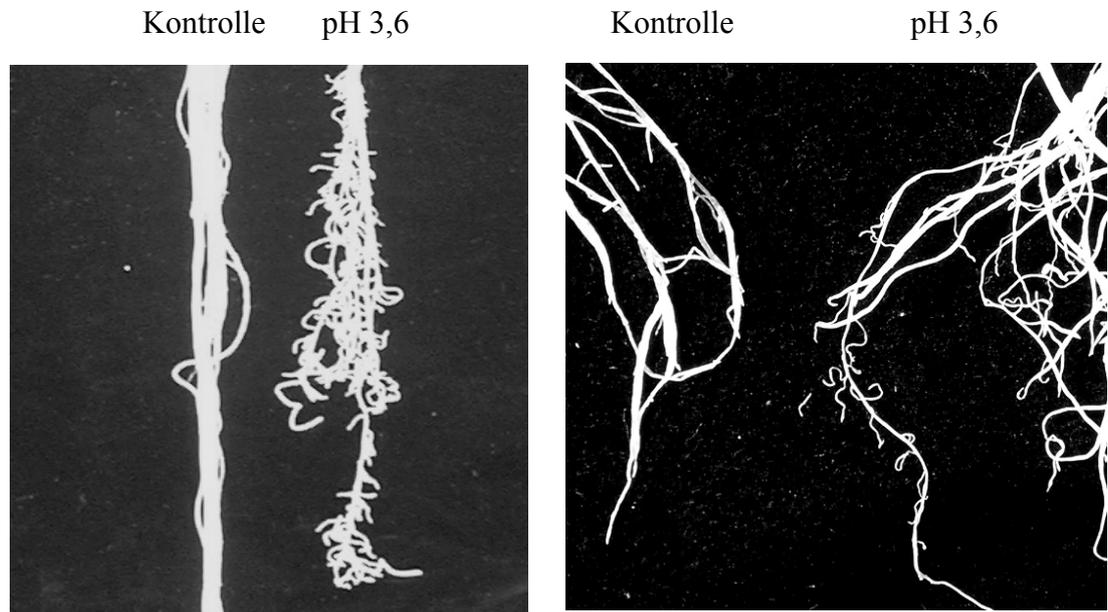


Abb 3.1: Vergleich von Wurzeln der Kontrolle mit Protonenstress pH 3,6 behandelten Wurzeln. Die Wurzeln der gestressten Pflanzen sind jeweils rechts abgebildet und sind sehr kurz und verkrümmt.

3.2 Gewinnung von Xylemexsudat

Das Xylemexsudat wurde zunächst nach der Methode von Satoh et al. (1992) gewonnen, wobei die ersten Tropfen nicht verworfen, sondern als erste Fraktion gesammelt wurden. Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot durchgeführt und mittels Antikörper gegen Rubisco auf deren Anwesenheit, also der möglichen Verunreinigung durch nicht-apoplastische Proteine, überprüft. Wie Abb. 3.2 zeigt, sind in der Gesamtproteinfraktion des Blattes beide Untereinheiten der Rubisco gut zu sehen. In der mit X1 gekennzeichneten ersten Xylemfraktion sieht man deutlich die bei 47 kDa gelegene Bande der großen Untereinheit der Rubisco, eine sehr schwache Bande in diesem Bereich ist auch noch bei der mit X2 gekennzeichneten zweiten Xylemfraktion sichtbar.

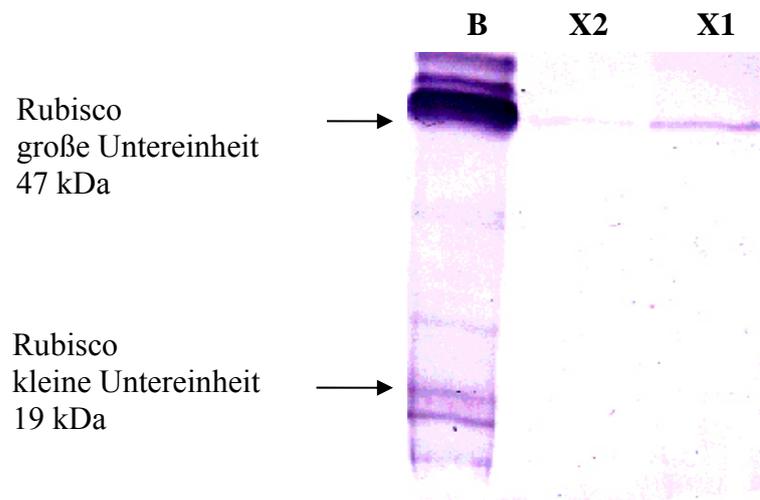


Abb 3.2: Western-Blot einer 1D-SDS-PAGE. 1D-SDS-PAGE mit 20 μg Protein je Spur, geblottet und Rubisco-Antikörpernachweis. B ist die isolierte Gesamteinfraktion des Blattes, X1 das erste unreine Xylemexsudat und X2 die reine Fraktion des Exsudates.

Zur Minimierung der Verunreinigungen wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt zwischen der ersten und zweiten Fraktion durch das Abtupfen mit Whatman-Papier eingeschoben. Die anschließend durchgeführten Antikörpertests auf Rubisco zeigten keinerlei Banden mehr. Das über drei Stunden gewonnene Xylemexsudat dieser reinen zweiten Fraktion hatte ein Volumen zwischen 1,5 und 3 ml je 72 Pflanzen und besaß eine Proteinkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Der pH-Wert des Xylemexsudates der verschiedenen Protonenstressvarianten wurde mit einer Mikroelektrode gemessen (vgl. 2.1.2). Abb. 3.3 zeigt die Mittelwerte von fünf Anzuchten. Während Kontrolle pH 6,0 und Behandlung pH 4,2 keine Veränderung aufwiesen, ergab sich verglichen mit pH 3,9 eine Reduktion um 0,1 pH-Einheiten. Beim stärksten Protonenstress von pH 3,6 wurde eine Reduktion um 0,2 pH-Einheiten gemessen.

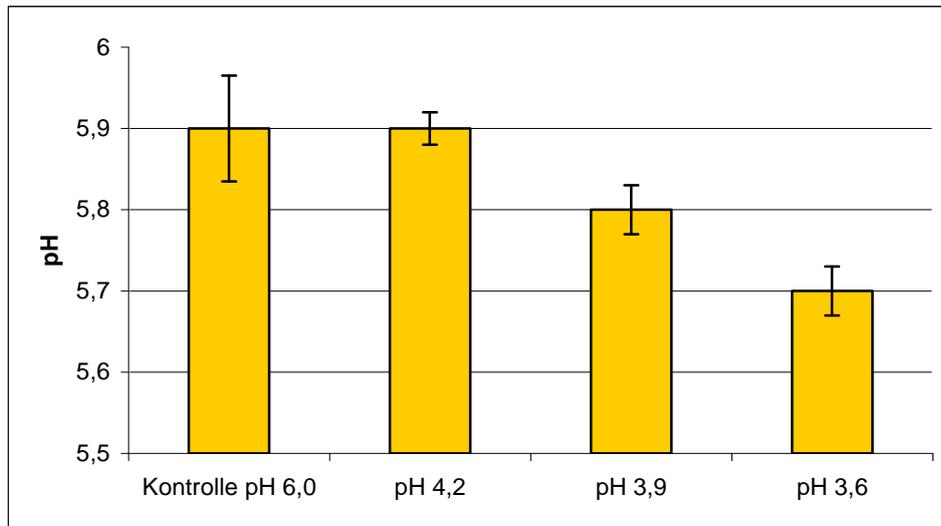


Abb 3.3: Graphische Darstellung der pH-Werte des Xylemsaftes aus 5 Anzuchten mit der Mikroelektrode gemessen. Mittelwerte +/- Standardfehler.

3.3 Resistenzinduktion

Die im Biotest ermittelten Anzahlen der Mehltaupusteln zeigten (Abb. 3.4) eine signifikante Abnahme der Pusteln pro Blatt mit zunehmender Stressintensität. Der Mittelwert von sechs Anzuchten lag bei 102 Pusteln pro Blatt in der Kontrolle, 80 Pusteln in der Behandlung pH 4,2, 43 bei pH 3,9 und 13 Mehltaupusteln je Blatt in der am stärksten gestressten Variante pH 3,6.

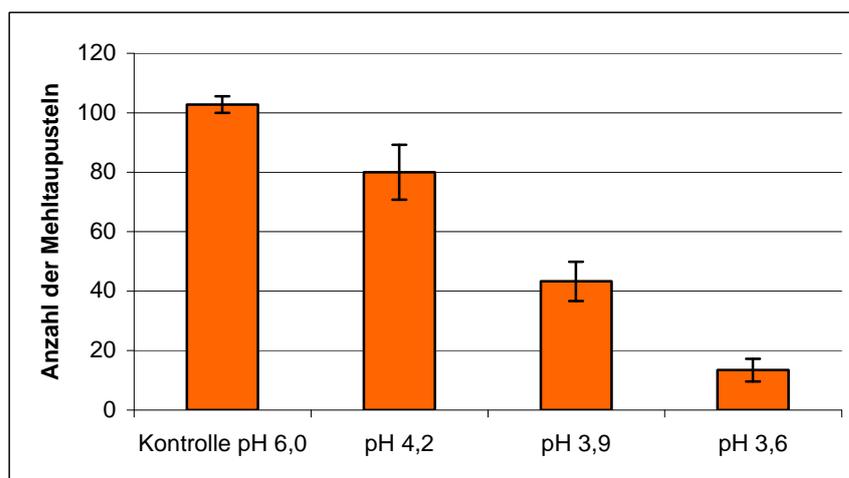


Abb. 3.4: Biotest der mit BghA6 inokulierten Gerstenblättern. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Mehltaupusteln mit zunehmender Stressintensität.

Dies ergab eine Reduktion der Anzahl der Mehltaupusteln von der Kontrolle zum stärksten Protonenstress von pH 3,6 um 85%.

3.4 Eindimensionale Gelelektrophorese

Ein eindimensionales 12,5%iges SDS-Gel wurde verwendet, um 20 μg der Proteine des Xylemexsudates der Kontrolle und der drei verschiedenen Protonenstressbehandlungen aufzutrennen. In Abb. 3.5 sind Banden im Bereich von 15-92 kDa zu erkennen. Die vier Proteinproben zeigten ein vergleichbares Proteinmuster, welches Unterschiede in der Intensität der Banden aufwies. Aufgrund der großen Proteinmenge kam es zu keiner vollständigen Auftrennung der einzelnen Banden, so dass eine Induktion oder Repression von Proteinbanden nur schlecht zu erkennen war. Um exaktere Aussagen zu den Veränderungen der Proteinmuster zu machen, musste eine Auftrennung mit höherer Auflösung durchgeführt werden. Dies war mit einer zweidimensionalen Gelelektrophorese möglich.

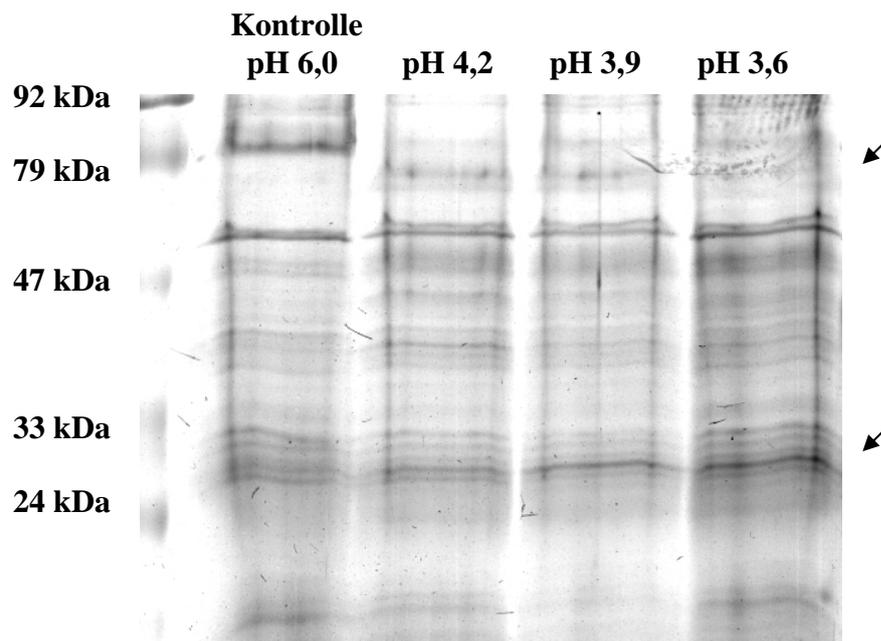


Abb. 3.5: 1D-Gel von Kontrolle und den drei Protonenstressbehandlungen mit 20 μg Proteinauftrag und anschließender Silberfärbung. Links sind die Bandengrößen des Markers aufgetragen. Die beiden Pfeile der rechten Seite zeigen Banden mit Intensitätsveränderung an.

3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der mehrere hundert Proteinspots auf einem Gel aufgetrennt und dargestellt werden können. Ziel einer subtraktiven Proteomanalyse ist der Vergleich zweier oder mehrerer Proteinmuster und die Untersuchung der sich ergebenden quantitativen und qualitativen Unterschiede. In dieser Arbeit wurde das Proteinspotmuster vom Gesamtprotein des jüngsten voll entwickelten Gerstenblattes und des Xylemexsudates untersucht. Als Kontrolle diente unter pH 6,0 angezogenes Pflanzenmaterial. Die Behandlungen waren Protonenstress der Stufen pH 4,2, pH 3,9 und pH 3,6, sowie Salzstress mit 15 mM und 20 mM NaCl. Der Vergleich der sich verändernden Proteinmuster hatte zum Ziel, stark induzierte oder reprimierte Proteine zu ermitteln und damit mögliche Mitglieder der durch Protonenstress bzw. Salzstress hervorgerufenen Resistenzreaktionen oder Signaltransduktionsketten zu identifizieren.

3.5.1 2D-Gele des Xylemexsudates unter Protonenstress

Die Proteine des Xylemexsudates wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben aufgereinigt und je 50 µg Protein in 200 µl Lysepuffer II aufgenommen. Nach der Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden die Gele mit Hot Coomassie gefärbt und eingescannt. Während jedes Elektrophoreselaufs wurden das Kontrollgel und die drei Behandlungen parallel durchgeführt.

Die Auflösung auf allen Gelen (Beispielhaft Abb 3.6 und 3.7) umfasste einen pI von pH 4,5–9, sowie eine molekulare Masse von 10-100 kDa. Die Proteinspots waren punktförmig und damit gut fokussiert. Sie lagen zum Teil als sogenannte Trainspots vor, die aus identischen Proteinen mit verschiedenen posttranslationalen Modifikationen bestanden. Die Auswertung der sieben parallel angefertigten Gelläufe erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben mit dem Programm Delta2D von Decodon.

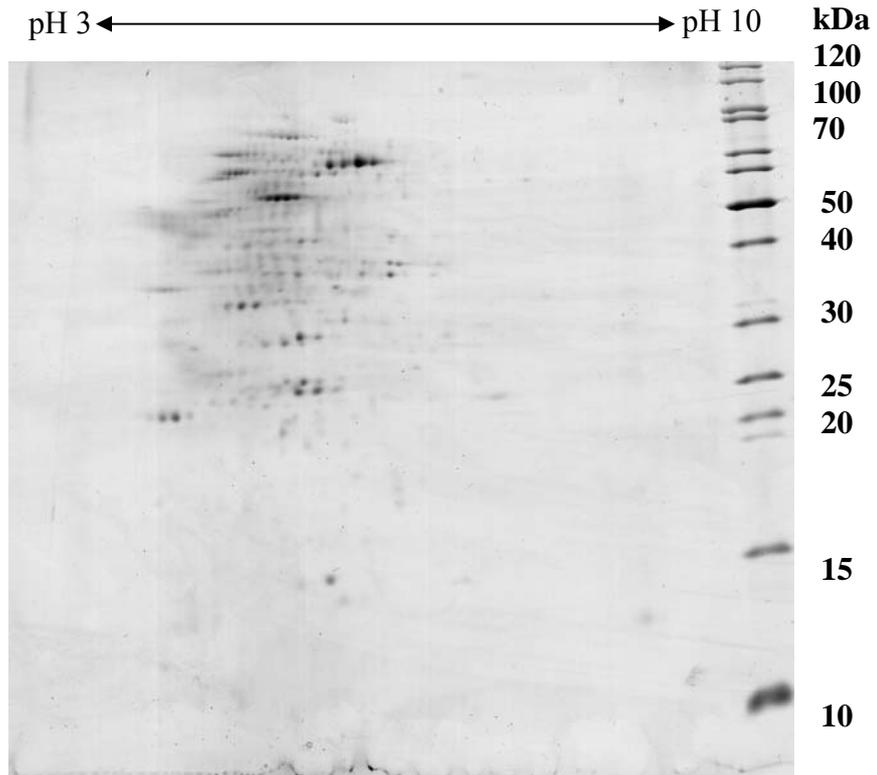


Abb. 3.6: 2D-Gele mit Xylemexsudat pH 6,0 der Kontrolle. Verwendet wurde ein IPG-Strip des pH-Bereiches 3-10 und der Proteinmarker Fermentas Page Ruler.

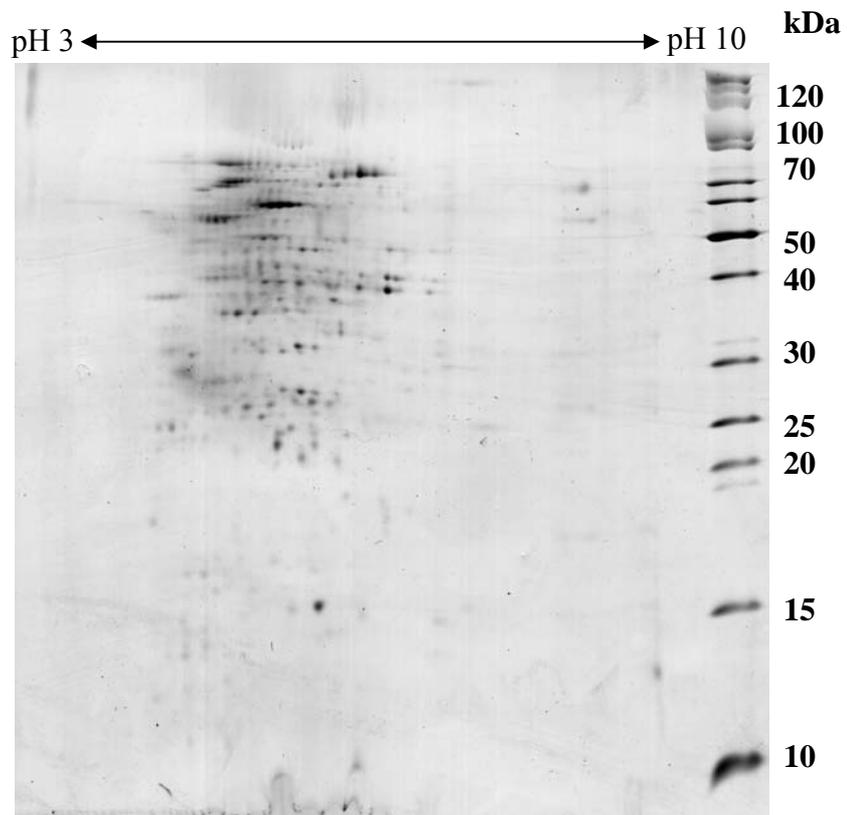


Abb. 3.7: 2D-Gel mit Xylemexsudat des Protonenstresses pH 3,6. Verwendet wurde ein IPG-Strip des pH-Bereiches 3-10 und der Proteinmarker Fermentas Page Ruler.

Durch das Auswertungsprogramm wiesen die Gele des Xylemexudates unter Protonenstress eine normierte Gesamtzahl von 457 Proteinspots auf. Durch den Einsatz von Filtern war es möglich die Proteine zu ermitteln, die sich durch den Protonenstress signifikant verändert hatten. Unverändert bedeutet, dass die Veränderung der Spotintensität zwischen Halbieren und Verdoppeln lag und damit als nicht signifikant bewertet wurde. Herunterregulierte Spots mussten mindestens eine Halbierung der Intensität aufweisen, hochregulierte Proteinspots eine Verdopplung. Die Anzahlen der Proteinspots sind in Tabelle 3.1 für alle drei Protonenstressbehandlungen im Vergleich zur Kontrolle aufgeführt.

Tab. 3.1: Intensitätsveränderungen der Proteinspots von sechs Gelserien des Xylemexsudates unter Protonenstress im Vergleich zur Kontrolle pH 6.0 ermittelt mit dem Programm Delta2D.

	pH 4,2	pH 3,9	pH 3,6
Gesamtanzahl	457	457	457
unverändert	162	135	277
herunterreguliert	107	96	99
hochreguliert	144	192	71
verschwunden	21	6	4
neu	23	28	6

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Anzahl der Proteinspots in Prozent umgerechnet und graphisch in Abb. 3.8 dargestellt.

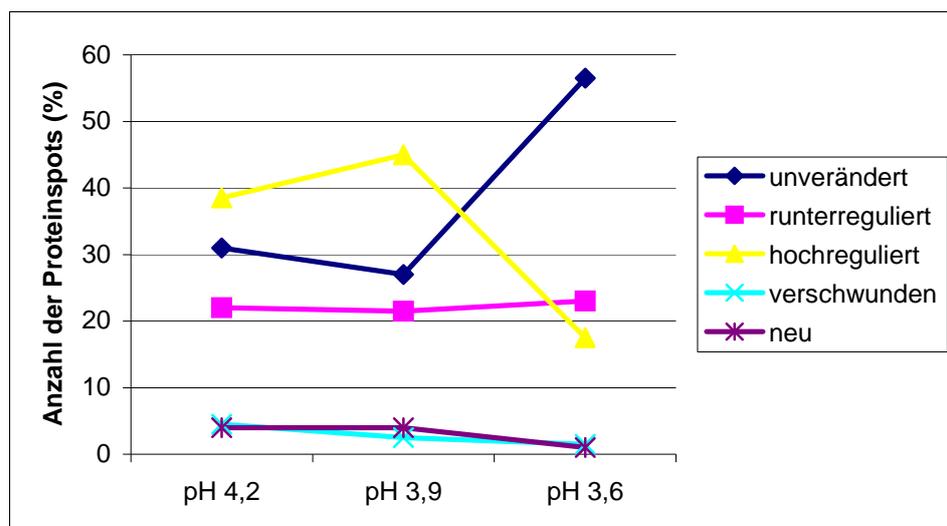


Abb. 3.8: Veränderungen des Proteinspotmusters der Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle in % der Gesamtproteinanzahl.

Man kann in Abb. 3.8 deutlich eine starke Veränderung der Spotintensitäten und damit des Proteinmusters aller Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle pH 6,0 erkennen. Zwischen den Behandlungen pH 4,2 und pH 3,9 zeigten sich hinsichtlich der Intensitätsveränderungen nur geringe Unterschiede. Bei der Protonenstressbehandlung pH 3,6 dagegen ergab sich eine Reduktion der hochregulierten Proteinspots und eine Zunahme der im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Spots.

3.5.2 2D-Gele des Gesamtproteins des Blattes unter Protonenstress

Die Isolation des Gesamtproteins der jüngsten voll entwickelten Blätter unter Protonenstress erfolgte wie unter 2.2.1.1. Auftragsmengen und die weitere Durchführung sind unter 1.5.1 beschrieben. Es wurden sechs Elektrophoreseläufe von zwei verschiedenen Pflanzenanzuchten durchgeführt. Der Bereich der Proteinspots (beispielhaft Abb. 3.9 und 3.10) umfasste einen pH von 3-9 und eine molekulare Masse von 12-100 kDa. Die starken Proteinspots im Bereich 50 kDa und 15 kDa waren auf die große und kleine Untereinheit der Rubisco zurückzuführen und führten aufgrund des großen Anteils an der Gesamtproteinfraktion zu einer Streifenbildung in vertikaler Richtung.

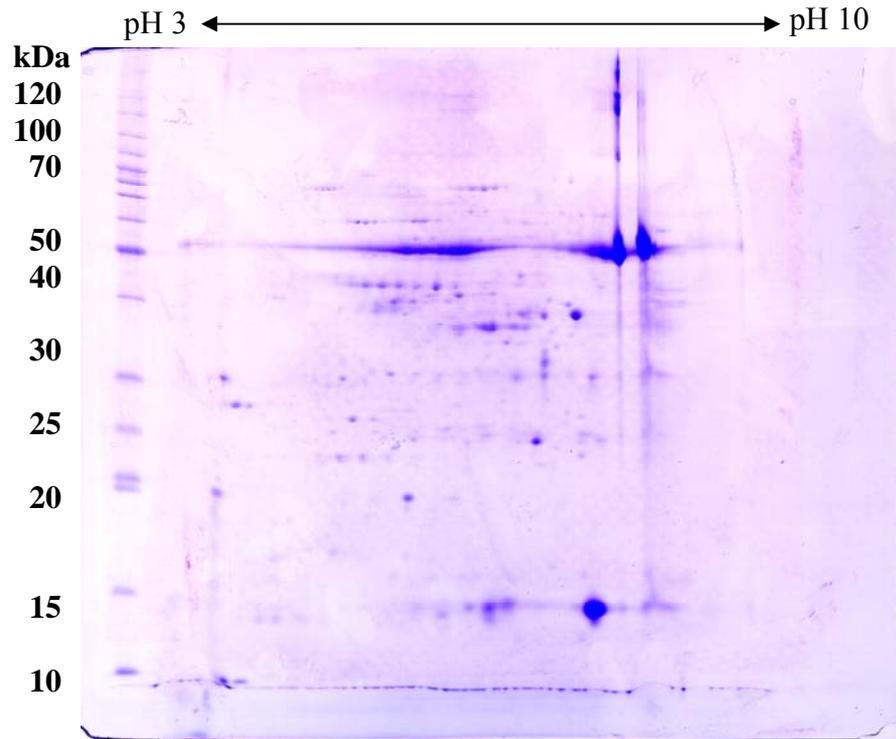


Abb. 3.9: 2D-Gel mit Gesamtprotein Blatt der Kontrolle. Verwendet wurde ein IPG-Strip des pH-Bereiches 3-10 und der Proteinmarker Fermentas Page Ruler.

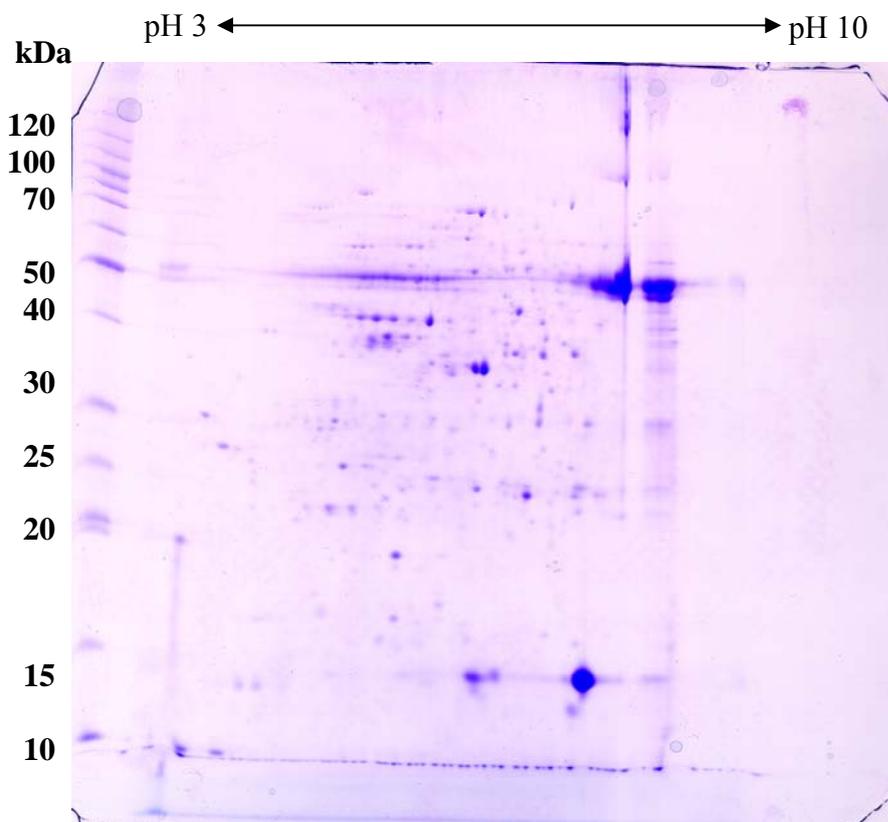


Abb. 3.10: 2D-Gel mit Gesamtprotein Blatt der Protonenstressbehandlung pH 3,6. Verwendet wurde ein IPG-Strip mit pH 3-10 und der Proteinmarker Fermentas Page Ruler.

Auf den Gelen mit dem Gesamtprotein des Blattes detektierte Delta2D eine Gesamtanzahl von 495 Proteinspots, welche für alle Behandlungen angenommen wurde. Die durch Filter ermittelten signifikanten Proteinveränderungen der Protonenstressbehandlungen im Vergleich zur Kontrolle wurden in Tabelle 3.2 dargestellt und in Abb. 3.11 als prozentuale Veränderungen der Gesamtanzahl aller Proteinspots ausgedrückt.

Tab. 3.2: Anzahlen der Proteinspots des Blattgesamtproteins mit den Intensitätsveränderungen unter Protonenstress im Vergleich zur Kontrolle pH 6.0.

	pH 4,2	pH 3,9	pH 3,6
Gesamtanzahl	495	495	495
unverändert	287	313	229
herunterreguliert	122	79	88
Hochreguliert	73	99	166
verschwunden	6	1	1
neu	7	3	11

Die Veränderung des Proteinspotmusters zeigte auch im Gesamtprotein des Blattes, dass sich große Unterschiede zwischen der Kontrolle und den drei Protonenstressbehandlungen ergaben. Vergleich man die Behandlungen pH 4,2 und pH 3,9, zeigten sich hinsichtlich der Intensitätsveränderungen wieder nur geringe Unterschiede.

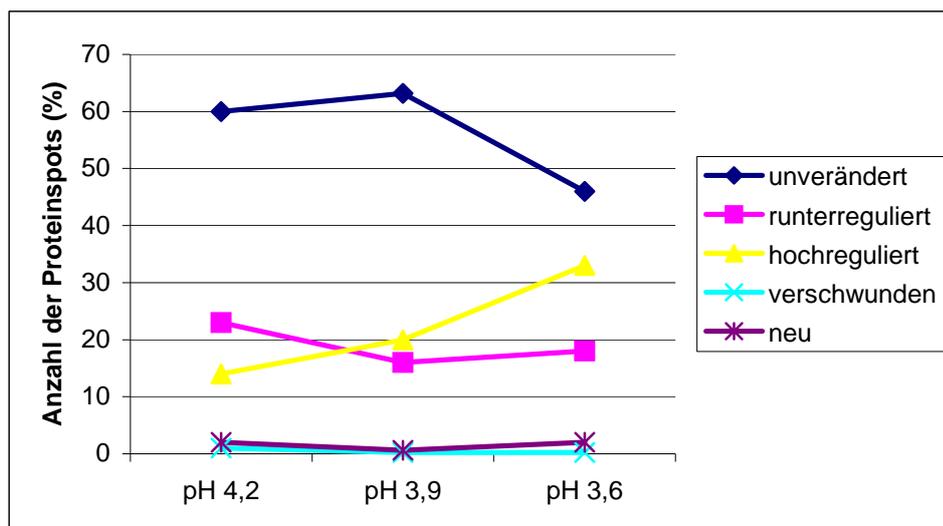


Abb. 3.11: Veränderungen des Proteinspotmusters des Gesamtproteins Blatt der Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle in % der Gesamtproteinanzahl.

Bei der Protonenstressbehandlung pH 3,6 ergab sich dagegen ein Anstieg der Anzahl von hochregulierten Proteinspots und eine Abnahme der im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Spots – also das genaue Gegenteil zu der Entwicklung des Proteinspotmusters der Wurzel.

3.5.3 2D-Gele des Xylemexsudates unter Salzstress

Die Isolation der Proteine des Xylemexsudates unter Salzstress erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Auftragsmengen und die weitere Durchführung sind identisch zu 1.5.1. Es wurden fünf Elektrophoreseläufe durchgeführt. Die Proteinspots (beispielhaft Abb. 3.12 und 3.13) umfassten einen Bereich von pI 4,5-8,5 und eine molekulare Masse von 12-80 kDa. Der dunkle Hintergrund war vermutlich auf das Salz im Probenmaterial zurückzuführen und beeinträchtigte die Auswertung mit dem Programm Delta2D, weil die Spoterkennung nicht so exakt war wie bei den Gelen des Protonenstress.

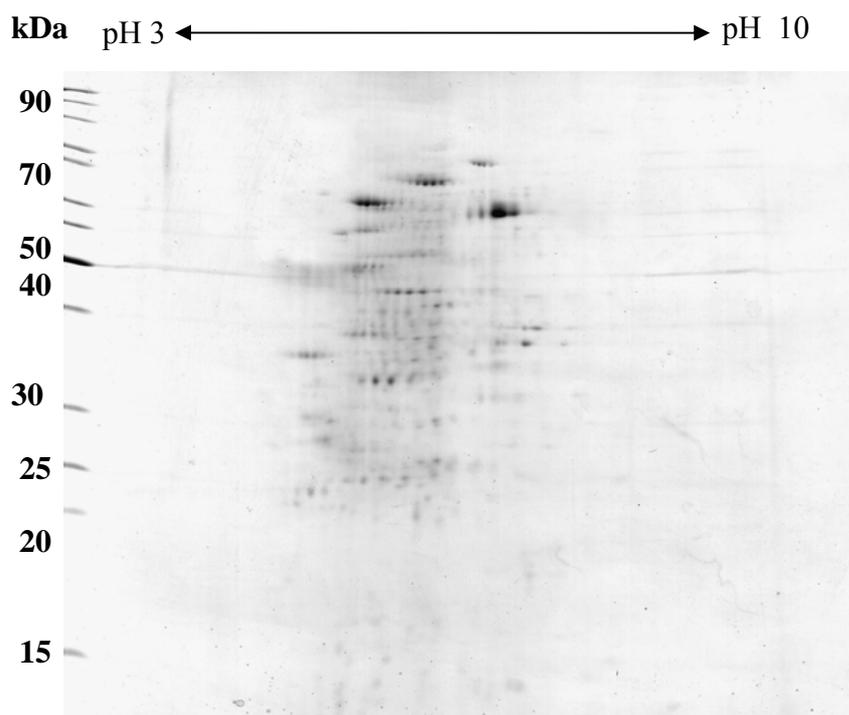


Abb. 3.12: 2D-Gele mit Xylemexsudat 15 mM NaCl-Stress. Verwendet wurde ein IPG-Strip pH 3-10 und der Proteinmarker Fermentas Page Ruler.

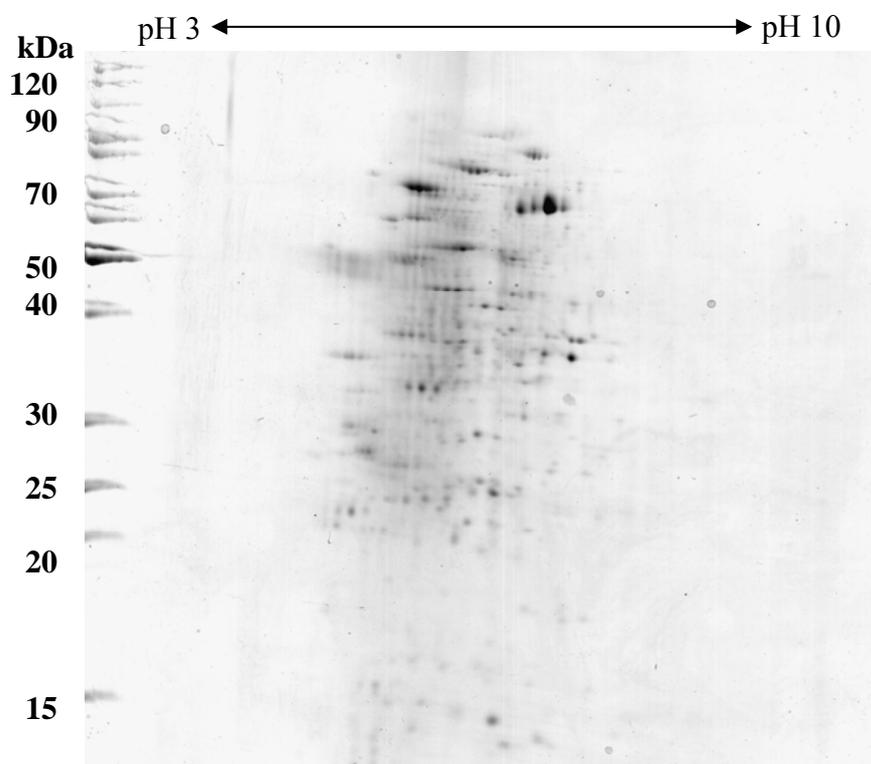


Abb. 3.13: 2D-Gele mit Xylemexsudat 20 mM NaCl-Stress. Verwendet wurde ein IPG-Strip pH 3-10 und der Proteinmarker Fermentas Page Ruler.

Das Proteinspotmuster des Xylemexudates zeigte eine normierte Gesamtanzahl von 452 Proteinspots (vgl. Tab. 3.3), was im vergleichbaren Bereich des Xylemexsudatmusters unter Protonenstress lag. Es existierten bereits bei den sehr geringen Stressintensitäten von 15 mM und 20 mM NaCl starke Unterschiede zu dem Spotmuster der Kontrolle. Vergleich man jedoch die Proteinspotmuster zwischen den beiden Salzstressbehandlungen, so ergaben sich kaum quantitative oder qualitative Veränderungen (s. Abb. 3.14). Eine Untersuchung von Xylemexsudat von Gerstenpflanzen der Sorte Ingrid unter 25 mM NaCl oder stärkerem Salzstress ist nicht möglich, weil zu geringe Mengen an Xylemexsudat für eine 2D-gelelektrophoretische Untersuchung vorliegen.

Tab. 3.3: Anzahlen der Proteinspots des Xylemexsudates unter Salzstress im Vergleich zur Kontrolle

	15 mM	20 mM
Gesamtanzahl	452	452
unverändert	122	99
herunterreguliert	104	104
hochreguliert	185	204
verschwunden	32	36
neu	9	9

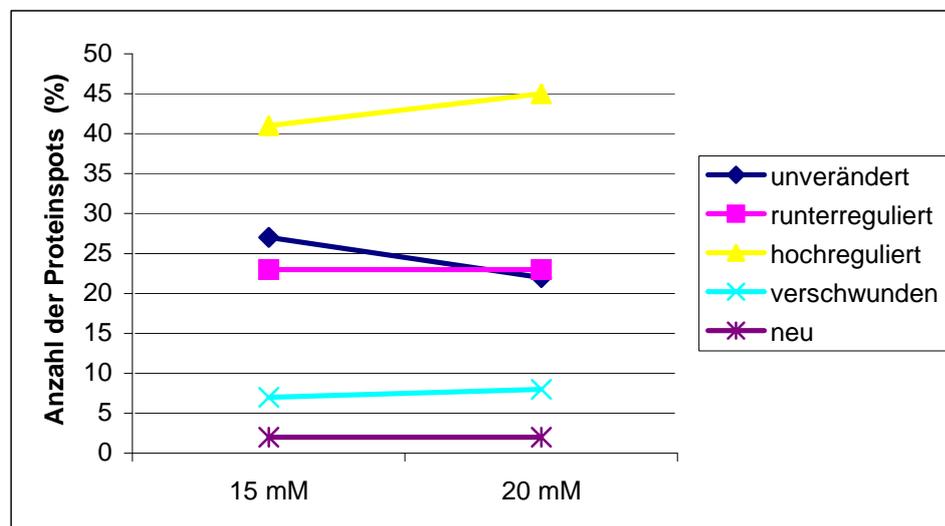


Abb. 3.14: Veränderungen des Proteinspotmusters des Xylemexsudates unter Salzstress. Vergleich der Behandlungen 15 mM und 20 mM NaCl mit der Kontrolle in % der Gesamtproteinanzahl.

3.6 Identifikation von Proteinspots

Die zur Identifikation mittels MALDI-TOF aus den Gelen des Xylemexudates ausgestochenen Spots wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: optisch durch den Protonenstress stark hoch- oder herunterreguliert, neu gebildete, Bestandteile von Trainspots oder Proteinspots im Bereich bekannter PR-Proteine zwischen 10 und 20 kDa. Gele auf denen alle ausgestochenen Proteinspots eingezeichnet sind, befinden sich im Anhang unter 8.3. Durch MALDI-TOF (vgl. 2.2.9) wurden Bruchstücke von Aminosäuresequenzen durch die Ähnlichkeit des Vorhersagemusters aus dem Trypsinverdau mit Massen aus der Proteindatenbanken Mascot Peptide Mass Fingerprint (s. 2.5) ermittelt. Die Identifikation der Bruchstücke erfolgte durch Vergleich der Sequenzähnlichkeiten mit Einträgen der Proteindatenbanken von NCBI, Barley-1 oder TIGR. Aufgrund der Dominanz von Reis als monokotyle Modellpflanze der *Proteomics* (Rose et al., 2004) fand sich oft *Oryza sativa* als BLAST-Ergebnis. In Tabelle 3.4 wurden neben der Spotnummer, dem Herkunftsgel, dem Proteinnamen mit zugehöriger Accession-Nummer auch der jeweilige Organismus und die mögliche Funktion für die identifizierten Proteine angegeben.

Tab. 3.4: Identifikation der Proteinspots mittels MALDI-TOF und anschließendem BLAST mit Mascot und den Proteindatenbanken von NCBI, Barley-1 und TIGR.

Spotnummer	Ähnlichkeit zu	Accession Nummer	Organismus	mögliche Funktion
1 - 5 X2I pH 3,6	S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase	BAE07182.1	<i>Beta vulgaris</i>	Stickstoffstoffwechsel / Purinbiosynthese
6 X2I pH 3,9	Steroidogener Faktor 1	AAK69416.1	<i>Calotes versicolor</i>	Signaltransduktion
7 - 8 X2I pH 3,9	P23 ähnliches Tumorprotein	ABB29923.1	<i>Solanum tuberosum</i>	Signaltransduktion
9 - 10 X2I pH 3,9	Putativer Beta-1,3-Glucanase Vorläufer	XP_478575.1	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr
11 X2I pH 3,9	Putatives Resistenzprotein	NP_921091.1	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr
12 X2I pH 3,9	Putative Beta-1,3-Glucanase	XP_478570.1	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr
16 - 17 X2I pH 3,9	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	CAC80376.1	<i>Capsicum annuum</i>	Zuckerstoffwechsel

20 X2I pH 3,9	Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase	BAA03099.1	<i>Aralia cordata</i>	Ligninbiosynthese
21 - 22 X2I K	Putatives 32.7 kDa Jasmonat-induziertes Protein	AAA87042.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Signaltransduktion
23 X2I pH K	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	XP_466582.1	<i>Oryza sativa</i>	Zuckerstoffwechsel
24 X2I pH 4,2	L-Aspartat Oxidase	ZP_00683146.1	<i>Xylella fastidiosa Ann-1</i>	Stickstoffstoffwechsel
25 X2I pH 4,2	Putative Nucleosid-Diphosphat- Kinase	NP_922751.1	<i>Oryza sativa</i>	Stickstoffstoffwechsel
26 X2I pH 4,2	Hypothetische Succinylglutamate-Desuccinylase	CAG20551.1	<i>Photobacterium profundum SS9</i>	Stickstoffstoffwechsel
27 – 30 X2I pH 4,2	Putative Polygalacturonase	XP_550458.1	<i>Oryza sativa</i>	Zellwandmetabolismus
31 X2I pH 3,9	Profilin-1	P52184	<i>Hordeum vulgare</i>	Zellwandmetabolismus
32 - 35 X2I pH 3,6	Putative Beta-1,3-Glucanase	XP_480946.1	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr
36 X2I pH 3,9	Cytosolische-3-Phosphoglycerat-Kinase	AAO32642.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Zuckerstoffwechsel
37 X2I K	Triosephosphat-Isomerase	P34937	<i>Hordeum vulgare</i>	Zucker - / Stickstoffstoffwechsel
38 X2I pH 3,9	Putativer Actin Depolymerisierungs-Faktor	AAT42170.1	<i>Sorghum bicolor</i>	Zellwandmetabolismus
40 X2I K	Germin-ähnliches Protein 1	gi 2815292	<i>Hordeum vulgare</i>	Zellwandmetabolismus
41 X2I pH 3,9	Putatives DNA-bearbeitendes Protein der Smf-Familie	BAC70342.1	<i>Streptomyces avermitilis</i>	andere
45 X2I pH 3,9	Putative Beta-1,3-Glucanase	XP_478568.1	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr
46 – 48 X2I pH 3,9	Adenosinkinase	CAB40376.1	<i>Zea mays</i>	Zucker - / Stickstoffstoffwechsel
50 X2I pH 3,9	Putatives 32.7 kDa Jasmonat-induziertes Protein	AAA87042.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Signaltransduktion
51 X1 A1	RAN	AAT40987.1	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Andere
52 X1 A2	Maturase K	AAM69173.1	<i>Osteospermum clandestinum</i>	Andere

54 - 55 X2D3 und D4	Resistenzprotein Yr10	AAG42168.1	<i>Triticum aestivum</i>	Pathogenabwehr
56 X2D5	Isocitrat- Dehydrogenase (NADP+)	CAA65503.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zucker - / Stickstoff- stoffwechsel
58 X2D7	Putative Rezeptor- Proteinkinase	AAG52302.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion
59 X2D8	Acyl-CoA- Reduktase	CAD30693.1	<i>Triticum aestivum</i>	Zellwandmetabolismus
60 X2D9	Cinnamyl-Alkohol- Dehydrogenase	BAA03099.1	<i>Aralia cordata</i>	Ligninbiosynthese
61 X2D10	Isocitrat- Dehydrogenase (NADP+)	CAA65504.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zucker - / Stickstoff- stoffwechsel
62 X2D11	Ähnlich zu NBS- LRR Resistenzgen	NP_910480.1	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr
64 X2E2	Resistenzprotein RPP13 (Variante)	AAS93947	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pathogenabwehr
65 X2E3	Menschliches Tumorprotein ähnliches Protein	AAF61933.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Signaltransduktion
66 X2E4	Putatives Resistenzprotein RPS2	BAD53266.1	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr
67 X2E5	Typ-1 Pathogenese- verknüpftes Protein	CAA88618.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Pathogenabwehr / Signaltransduktion

Ausgehend von ihrer Homologie auf Proteinebene wurden die identifizierten Proteinspots in hypothetische Funktionsbereiche eingeteilt (s. Abb. 3.15). 15 der 67 Proteine besaßen eine Funktion in der pflanzlichen Abwehr. 9 davon kodierten für PR-Proteine der Familien PR-1 (Spot 67) und PR-2 (Glucanasenspots 9, 10, 12, 32-35, 45), die restlichen 6 sind Resistenzproteine der NBS-LRR-Klasse (11, 54+55, 62, 64, 66). Der Signaltransduktion sind 12% der Proteine zuzurechnen (6-8, 21+22, 50, 58) und 15% erfüllten eine Funktion im Zellwandmetabolismus (20, 27-31, 38, 40 und 59). 27% der Spots ließen sich mit dem Zucker- (16+17, 23, 36+37, 56, 61) bzw. Stickstoffmetabolismus (1-5, 24-26, 46-48) in Zusammenhang bringen. Für 24% der Proteine war die Funktion unbekannt, weil entweder die Spotintensität nicht für eine MALDI-Analyse ausgereicht hat (Visualisierungsgrenze für Maldi ca 10 ng Protein, Rabilloud, 2002), oder keine Homologien in den Datenbanken gefunden werden konnten. Unter „andere Funktionen“ fielen die Spots 41, 51 und 52,

wobei zu beachten war, dass Ran und Maturase K aus den unreinen Gelen der ersten Xylemfraction ausgestochen wurden.

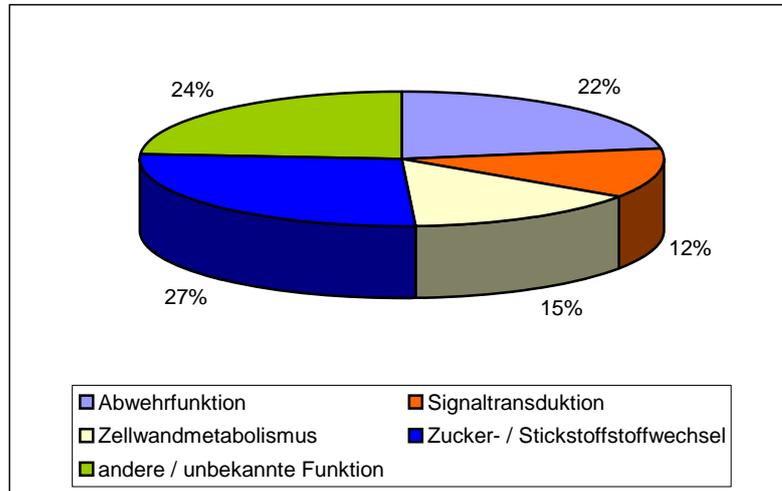


Abb. 3.15: Zuordnung aller 67 identifizierten Proteinspots aus den Gelen des Xylemexsudates unter Protonenstress in hypothetische Proteinkategorien.

Fokussierte man die Zuordnung auf die 30 hochregulierten Proteine (vgl. Abb. 3.16) wurde erkennbar, dass die Proteine mit einer Funktion in der Abwehr mit 36% den größten Anteil an den hochregulierten Proteinen ausmachten. Auch die Proteine der Signaltransduktion sowie des Zellwandmetabolismus waren bezogen auf ihre Gesamtmenge sehr stark bei den hochregulierten Proteinen vertreten.

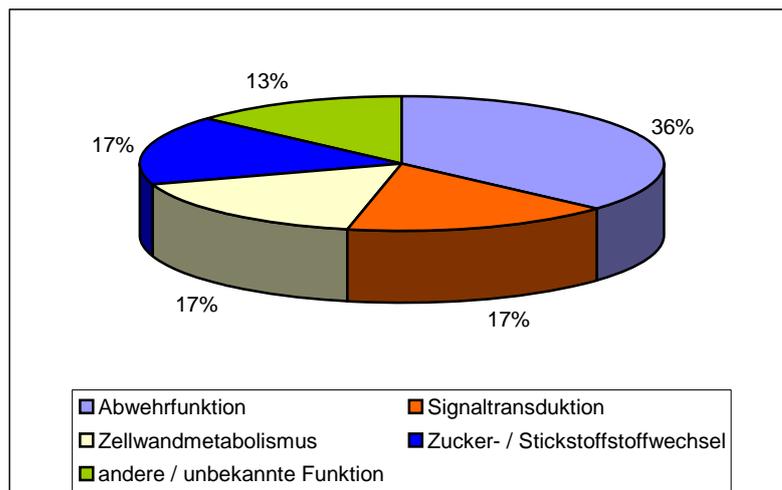


Abb. 3.16: Zuordnung der 30 durch Protonenstress hochregulierten Proteinspots aus den Gelen des Xylemexsudates in hypothetische Proteinkategorien

Bei der Zuordnung der 19 herunterregulierten Proteine, zeigte sich (s. Abb. 3.17), dass der Anteil der Proteine mit einer Funktion im Zucker- oder Stickstoffstoffwechsel mit 42% am

höchsten war. Die Proteine mit einer Funktion bei Abwehr oder Signaltransduktion waren dagegen mit 5% nur zu einem geringen Anteil herunterreguliert. Vergleich man dieses Ergebnis mit der Zuordnung der hochregulierten Proteine, ergab sich genau das umgekehrte Bild.

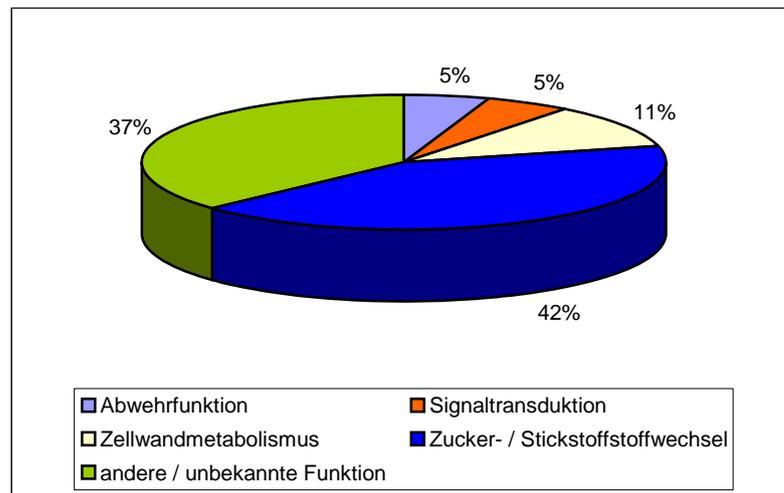


Abb. 3.17: Zuordnung der 19 durch Protonenstress herunterregulierten Proteinspots aus den Gelen des Xylemexsudates in hypothetische Proteinkategorien

Eine nähere Charakterisierung der mit MALDI identifizierten Proteinspots erfolgte durch die Ermittlung der theoretischen pI-Werte und Molekulargewichte mit dem Programm Compute pI/MW von ExPasy (s. 2.5). Die pI-Werte lagen fast alle, wie für apoplastische Proteine üblich, im sauren Bereich. Von den vier Ausnahmen (41, 63, 66+67) gehörten drei zu den Resistenzproteinen. Die im 2D-Gel ermittelten molekularen Massen stimmten meist mit den theoretisch ermittelten oder den Datenbankeinträgen überein. Abweichungen nach unten könnten durch Abspaltung von Signalpeptiden, proteolytischen Abbau während der Probenaufarbeitung (Chevallet et al., 1998) oder inkomplette Denaturierung durch SDS während der Equilibrierung aufgetreten sein. Eine Differenz von 2,5 kDa für Signalpeptide von pflanzlichen sekretierten Proteinen wurde von Takeuchi et al. (1990) beschrieben. Eine Änderung von pI oder MW nach oben konnte durch die Bildung von Oligomeren, post-translationale Modifikationen oder den Homologievergleich mit unterschiedlichen Isoformen auftreten (Dani et al., 2005). Proteine, die im 2D-Gel als aneinanderhängende Spotreihen (Trainspots) zu sehen waren, stellten zumeist identische Proteine mit verschiedenen posttranslationalen Modifikationen dar (Turck et al., 2004). Dies traf unter anderem für die Proteinspots 1-5 zu, deren Molekulargewicht 22 kDa betrug, deren pI aber zwischen 5,8 und 6,2 variierte. Signalsequenzen in Form eines N-terminalen

Signalpeptides dirigieren Ziel und Translokation von Proteinen und werden beim Transport durch eine Membran abgespalten (Nielson et al., 1997, Galili et al., 1998). Die Schnittstelle dieser Signalpeptide konnte mit Hilfe des Programmes Signal P vorhergesagt werden (Nielson und Krogh, 1998). Nur für drei der 15 Resistenzproteine wurde kein Signalpeptid für eine extrazelluläre Sekretion ermittelt. Es gibt jedoch eine Reihe von Proteinen mit extrazellulärer Funktion ohne sekretorische Zielsequenz (Rubartelli und Sitia, 1999), deren atypische ER-unabhängige Sekretion „*nonclassical export*“ genannt wird und dessen verschiedene Mechanismen bisher noch unbekannt sind (Cleves, 1997). Um trotz fehlender Signalpeptide eine Lokalisierung der Xylemproteine zu ermitteln, wurde mit den Programmen Psort und TargetP (s. 2.5) die mögliche zelluläre Lokalisation überprüft.

Tab. 3.5: Nähere Charakterisierung aller 67 identifizierten Xylemproteinspots. Die theoretischen Molekulargewichte und pI-Werte wurden mit dem Programm Compute pI/MW von ExPasy ermittelt. Die Signalpeptide für eine extrazelluläre Lokalisation wurden mit Signal P bestimmt, N steht für kein Signalpeptid, Y für das Vorhandensein. Die Regulation der Intensitätsveränderung von Proteinspots bei Protonen- und Salzstress ist wie folgt gekennzeichnet: - halbiert, -- mehr als halbiert, verschwunden = nur in der Kontrolle vorhanden, + verdoppelt, ++ mehr als verdoppelt, neu = nur in den Behandlungen, 0 = keine Veränderung, nd = nicht vorhanden, nv = nicht vergleichbar.

Spot-Nr.	Ähnlichkeit zu	MW (kDa)	Theor. MW	pI (Gel)	Theor. pI	Signalpeptid	Protonenstress	Salzstress
1	Homocystein-Hydrolase	52	53	5,8	5,8	N	-	-
2	Homocystein-Hydrolase	52	53	5,9	5,8	N	0	+
3	Homocystein-Hydrolase	52	53	6,0	5,8	N	0	0
4	Homocystein-Hydrolase	52	53	6,1	5,8	N	0	+
5	Homocystein-Hydrolase	52	53	6,2	5,8	N	++	-
6	Steroidogener Faktor 1	10,5	16,5	4,8	5,9	N	++	nd
7	P23 ähnliches Tumorprotein	13,5	17,2	5,2	4,4	N	0	nd
8	P23 ähnliches Tumorprotein	15,0	17,2	5,4	4,4	N	+	+
9	Glucanase-Precursor	22,0	53,7	4,7	5,6	Y	++	+
10	Glucanase-Precursor	22,0	53,7	4,8	5,6	Y	++	-

11	Putatives Resistenzprotein	22,0	110,0	4,9	8,5	Y	++	+
12	Beta-1,3-Glucanase	22,0	63,0	5,0	5,8	Y	++	+
13	unbekannt	25,0		6,0			++	+
14	unbekannt	25,0		6,2			0	+
15	unbekannt	26,0		6,1			0	-
16	GAPDH	38,0	34,0	6,8	5,6	N	-	nv
17	GAPDH	38,0	89,0	6,9	5,3	N	-	nv
18	unbekannt	40,0		6,9			0	nd
19	unbekannt	40,0		6,8			0	nd
20	CAD	43,0	39,0	6,1	5,3	N	++	+
21	Jasmonat-induziertes Protein	32,0	32,6	6,1	5,9	N	0	-
22	Jasmonat-induziertes Protein	32,0	32,6	6,1	5,9	N	-	-
23	GAPDH	38,0	36,5	7,0	7,7	N	-	0
24	Aspartat Oxidase	14,0	53,9	5,9	6,0	Y	++	nd
25	Nucleosid-Diphosphat- Kinase	14,0	16,7	6,1	6,8	N	0	0
26	Succinylglutamat-Desuccinylase	13,5	39,2	6,15	5,8	N	++	0
27	Putative Polygalacturonase	70,0	51,4	6,1	5,9	Y	++	+
28	Putative Polygalacturonase	70,0	51,4	6,4	5,9	Y	0	-
29	Putative Polygalacturonase	70,0	51,9	6,6	5,9	Y	0	+
30	Putative Polygalacturonase	70,0	51,9	6,7	5,9	Y	-	0
31	Profilin-1	12,0	14,3	5,0	5,0	N	0	+
32	Glucanase	35,0	60,8	5,5	5,1	Y	0	0
33	Glucanase	35,0	60,8	5,7	5,1	Y	0	-
34	Glucanase	35,0	60,8	5,8	5,1	Y	-	+
35	Glucanase	35,0	60,8	6,0	5,1	Y	++	+
36	Phosphoglycerat-Kinase	39,0	31,3	5,9	5,0	Y	++	+
37	Triosephosphat-Isomerase	26,0	26,7	5,7	5,4	N	0	0
38	Actin Depolymerisierungs-Factor	16,0	51,5	5,9	9,4	N	0	-
39	unbekannt	25,0		5,9		N	-	-
40	Germin-ähnliches Protein 1	23,5	21,8	5,8	5,6	Y	-	0
41	Protein der Smf-Familie	13,5	40,0	9,1	9,0	N	++	nd
42	unbekannt	22,0		6,3			verschw.	nd
43	unbekannt	20,0		6,5			-	nd

44	unbekannt	29,0		6,1			verschw.	-
45	Glucanase Vorläufer	16,5	30,4	5,6	5,4	Y	+	nd
46	Adenosinkinase	38,0	36,0	5,2	5,2	N	0	-
47	Adenosinkinase	38,0	36,0	5,3	5,2	N	--	-
48	Adenosinkinase	38,0	36,0	5,4	5,2	N	--	-
49	unbekannt	39,5		6,8			--	nv
50	Jasmonat-induziertes Protein	29,0	32,6	6,0	5,9	N	--	-
51	RAN	28,0	25,1	7,1	6,4	N	verschw.	nd
52	Maturase K	25,0		7,5		N	verschw.	nd
53	Glucose-Dehydrase	38,0	38,9	7,0	7,1	N	-	-
54	Resistenzprotein Yr10	38,0	93,2	6,5	7,2	N	+	-
55	Resistenzprotein Yr10	38,0	93,2	7,0	7,2	N	+	-
56	Isocitrat-Dehydrogenase	40,0	53,9	6,0	8,2	Y	+	-
57	unbekannt	60,0		6,4			++	+
58	Putative Rezeptorkinase	24,0	94,8	6,5	6,5	Y	neu	nd
59	Acyl-coA-Reduktase	10,0	57,5	7,5	8,7	N	++	Nd
60	CAD	43,0	39,0	6,1	5,3	N	++	-
61	Isocitrat-Dehydrogenase	42,0	52,5	6,1	7,1	Y	++	-
62	Ähnlich zu NBS-LRR Resistenzgen	15,0	108,0	6,9	8,2	Y	neu	nd
63	unbekannt	12,5		9,0			neu	nd
64	Resistenzprotein RPP13 (Variante)	25,0	97,2	4,6	8,0	N	++	nd
65	Menschliches Tumortprotein ähnliches Protein	17,0	17,2	4,5	4,4	N	+	0
66	Putatives Resistenzprotein RPS2	11,0	103,2	8,9	5,5	N	neu	nd
67	Typ-1 Pathogenese-verknüpftes Protein	10,0	18,8	8,7	8,5	Y	neu	nd

Die Intensitätsveränderung der Proteinspots wurde mit den Filtern des Programmes Delta2D von Decodon ermittelt. Die (0) steht für keine Veränderung zwischen Kontrolle und Behandlung. Für ein (+) musste eine Verdopplung der Spotintensität, bzw. für (-) eine Halbierung der Spotintensität stattgefunden haben. (++) kennzeichnet mehr als eine Verdopplung und *neu* zeigt, dass der Proteinspot erst in den 2D-Gelen der Stressbehandlung zu erkennen war. Zwei (- -) stehen für mehr als eine Halbierung und

(verschwunden) bedeutet, dass der Spot nur in der Kontrolle auftrat. Das Kürzel (nd) steht dafür, dass der Spot nicht im Gel zu finden war. Bei (nv) konnte kein Vergleich der Spots stattfinden, weil z.B. im Gel des unter Protonenstress gewonnenen Xylemexsudats ein Doppelspot auftrat, wo bei der Salzbehandlung nur ein Einzelspot existierte. In Abb. 3.18 wurde der Regulationsvergleich der Proteinspots unter Protonen- und Salzstress graphisch zusammengefasst.

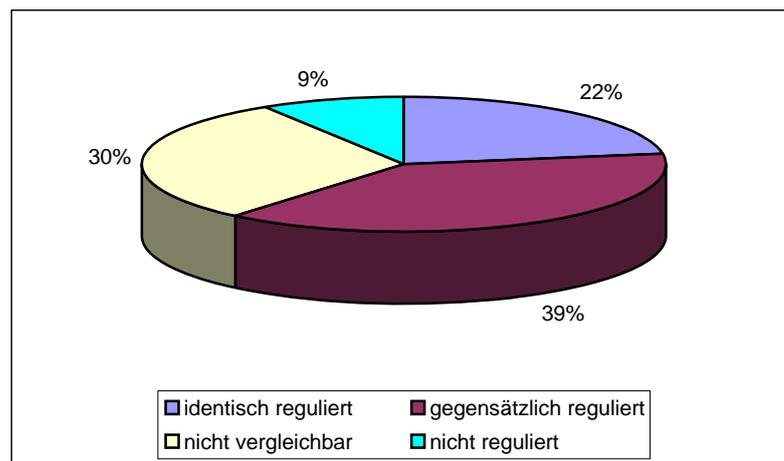


Abb. 3.18: Vergleich der Regulation von Proteinspots unter Protonen- und Salzstress mit dem Programm Delta2D von Decodon.

Es zeigte sich, dass eine Veränderung der abiotischen Umweltbedingungen pH-Wert und NaCl auf die Gerstensorte Ingrid als Stress wirkte und neben einem reduzierten Wurzelwachstum zu einer Veränderung des Metabolismus und damit zu quantitativen und qualitativen Veränderungen des Proteinspotmusters im Xylemexsudat führte. Wie Abb. 3.17 erkennen lässt, waren 30% der 67 identifizierten Proteinspots in ihrer Regulation nicht vergleichbar. 39% der Spots wurden unter Protonen- und Salzstress gegensätzlich reguliert, d.h., dass bei dem einen Stress eine Induktion des Proteins stattgefunden hat, während der andere Stress keine Regulation oder eine Reduktion der Spotintensität zur Folge hatte. Keine Veränderung durch Protonen- oder durch Salzstress fand bei 9% der Spots statt. Für 22% der Proteinspots war eine identische Regulation erkennbar, wobei hier nur eines der 15 Proteine mit postulierter Abwehrfunktion einzuordnen war. Ähnliche Spotmuster der 2D-Gele und identisch regulierte Proteine für Protonen- und Salzstress deuten darauf hin, dass einige Glieder der Signalketten überlappen könnten (Ueda et al., 2004).

3.7 Charakterisierung einzelner Kandidatengene und -proteine

3.7.1 Translational kontrolliertes Tumorprotein

Das *translationally controled tumor protein* (TCTP, homologe Bezeichnung P23) ist ein stark konserviertes und exprimiertes Gen in allen eukaryotischen Organismen (Arcuri et al., 2004). In dieser Arbeit konnte ein 489 bp langes, die vollständige Proteinsequenz von TCTP umfassendes Sequenzstück kloniert und sequenziert werden. Isoformen konnten im protonengestressten Blatt- und Wurzelmaterial im Vergleich zu den Kontrollen identifiziert werden. In Abb. 3.19 zeigt ein mit dem Programm Clustal W erstelltes Alignment, in dem die abweichenden Aminosäuren farblich gekennzeichnet wurden.

```

TCTPKontrolle      GIMLVYQDKLSGDELLSDFSFPYRELENGVLWEVDGHVWVQGAVDVDIGANPSAEGGGE  58
TCTPBpH3_6-2      GIMLVYQDKLSGDELLSDFSFPYRELENGVLWEVDGHVWVQGAVDVDIGANPSAEGGGE  58
TCTPWpH3_6        GIMLVYQDKLSGDELLSDFSFPYRELENGVLWEVDGHVWVQGAVDVDIGANPSAEGGGE  58
TCTPBpH3_6-1      GIMLVYQDKLSGDELLSDFSFPYRELENGVLWEVDGHVWVQGAVDVDIGANPSAEGGGE  58
*****

TCTPKontrolle      DEGVDDQAVKVVDIVDTLRLQEQPAPFDKKQFIAYIKRYIKNLTAKLEGEELDAFKKN  116
TCTPBpH3_6-2      DEGVDDQAVKVVDIVDTFRLQEQPAPFDKKQFIAYIKRYIKNLTAKLEGEELDAFKKN  116
TCTPWpH3_6        DEGVDDQAVKVVDIVDTFRLQEQPAPFDKKQFIAYIKRYIKNLTAKLEGEELDAFKKN  116
TCTPBpH3_6-1      DEGVDDQAVKVVDIVDTFRLQEQPAPFDKKQFIAYIKRCIKNLTAKLEGEELDAFKKN  116
*****:*****

TCTPKontrolle      VESATKYLLSKLKDLOFFVGGESMHDDGSVVFAYYREGAADPTFL  159
TCTPBpH3_6-2      VESATKYLLSKLKDLOFFVGGESMHDDGSVVFAYYRGGAADPTFL  159
TCTPWpH3_6        VESATKYLLSKLKDLOFFVGGESMHDDGSVVFAYYREGAADPTFL  159
TCTPBpH3_6-1      VESATKYLLSKLKDLOFFVGGESMHDDGSVVFAYYREGAADPTFL  159
*****

```

Abb. 3.19: Alignment der Aminosäuresequenzen der zwei Isoformen des behandelten Blattes gegen die Kontrolle und die protonengestresste Wurzelsequenz. Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal W 1.83 erstellt. Ein „*“ steht für eine konservierte Aminosäure, ein „:“ für Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften und ein „.“ für eine semikonservative Aminosäure. Die abweichenden Aminosäuren wurden farblich gekennzeichnet.

Ein Vergleich der Sequenzhomologie der Isoformen mit verschiedenen Organismen sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene ergab die größte Übereinstimmung mit 97% mit dem *human tumor protein-like protein* von *Hordeum vulgare* (AF230786.1), 94% zu TCTP aus *Triticum aestivum*, 84% zu *Oryza sativa*, 74% zu *Solanum tuberosum*, 70% zu *Arabidopsis thaliana* und 55% zu TCTP aus *Homo sapiens* und verschiedenen Hefen. In Abb. 3.20 ist ein phylogenetischer Stammbaum der TCTP-Proteine dargestellt. Es wurde deutlich, dass die gefundene Sequenz HvTCTPpH am stärksten mit Gerste und den anderen monokotylen TCTP-Proteinen clusterte. Etwas weiter entfernt fanden sich die dikotylen Sequenzen von *Solanum* und *Arabidopsis*. Die geringste aber dennoch über 50%

liegende Sequenzhomologie zeigte sich in der Entfernung zum Cluster der Sequenzen aus *Homo sapiens* und den Hefen. Die große Homologie aller Sequenzen war ein Indiz für die starke Konservierung des Proteins.

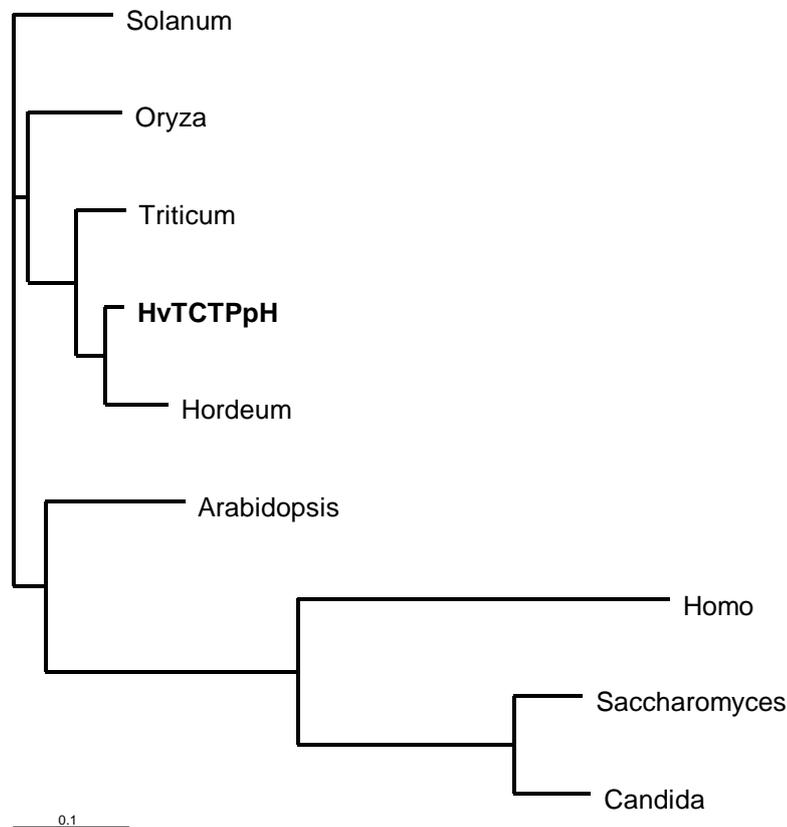


Abb. 3.20: Phylogenetischer Stammbaum der TCTP-Proteine. Das Phylogramm wurde mit dem Programm Clustal W erstellt und ein Divergenzmaßstab von 0,1% eingefügt.

TCTP zeigte keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinklassen und bildete damit eine eigene Proteinfamilie. Es zeigten sich jedoch strukturelle Ähnlichkeiten mit menschlichen Chaperonmolekülen (Bommer und Thiele, 2004). Die starke Sequenzhomologie auf Nukleinsäure- und Proteinebene der TCTP-Proteinklasse innerhalb aller eukaryotischen Organismen setzt sich auch in der Struktur fort. In Abb. 3.21 wurde ein Alignment von HvTCTPpH mit Sequenzen von mono- und dikotylen Pflanzen sowie einer Hefe dargestellt. Es wurden 10 Aminosäuren rot eingezeichnet, die in Sequenzen von über 30 Organismen komplett konserviert sind (Bommer und Thiele, 2004). Mit einem grünen Balken wurde zudem das Calciumbindungsmotiv (AS 81-112) eingezeichnet, welches keine Sequenzhomologie zu anderen Familien von Calciumbindenden Proteinen aufweist (Kim et al., 2000, Arcuri et al., 2005). Der blaue Balken

kennzeichnet die α -helikale Mikrotubulibindungsdomäne. Die für TCTP spezifischen Motive 1 (AS 45-62) und 2 (139-162) wurden durch gelbe Boxen markiert. Die ungekennzeichneten Aminosäurebereiche 92-124 und 126-172 weisen *coiled-coil* Strukturen auf und sind damit Bereiche einer möglichen Selbstinteraktion.

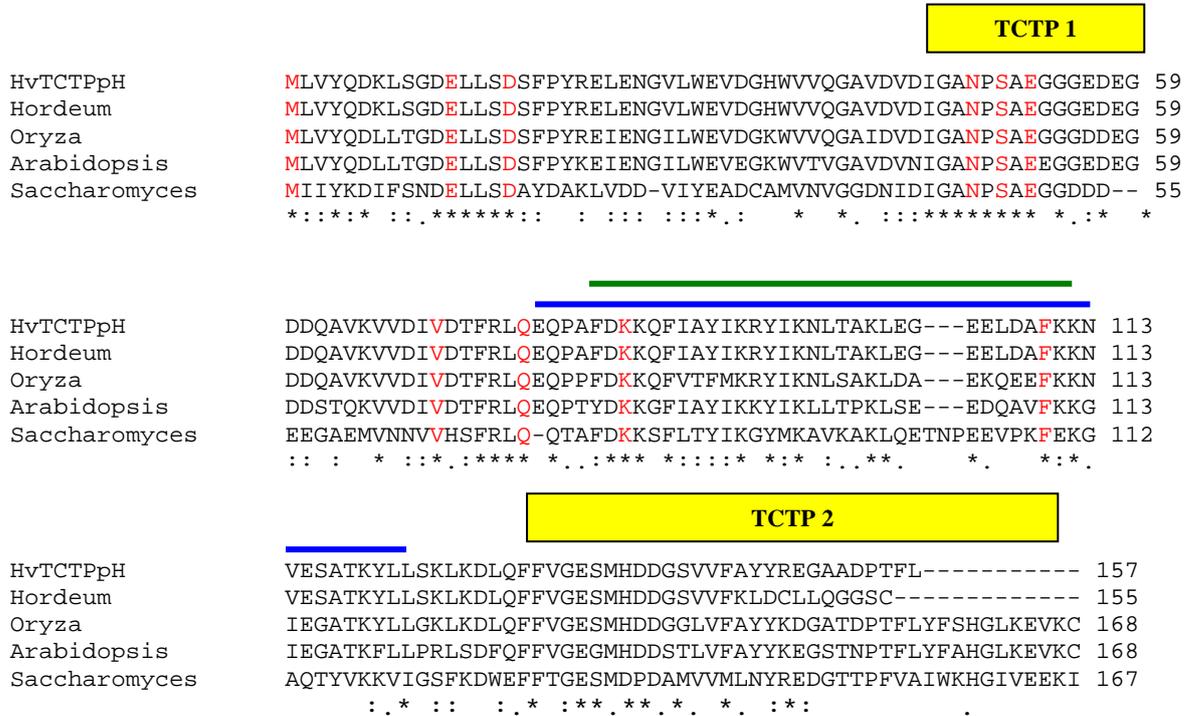


Abb. 3.21: Sequenzalignment und Struktur von TCTP. Verwendet wurden die Sequenzen von Gerste (AF230786), Reis (D12626), *Arabidopsis* (NM112537) und *Saccharomyces* (NP012867). Zur Optimierung der Homologie wurden Leerstellen „-“ eingefügt. Die zehn eingezeichneten roten Aminosäuren sind in allen Sequenzen konserviert. Der grüne Balken kennzeichnet das Calciumbindungs-motiv, der blaue die Domäne der Mikrotubulibindung. Die beiden TCTP-Motive sind durch die gelben Boxen gekennzeichnet.

Mittels Real-Time-PCR wurde die Veränderung der Regulation auf Transkriptionsebene durch Protonenstress untersucht. In Tab. 3.6 wurde die Veränderung der relativen Transkriptmenge von TCTP im Wurzel und Blatt unter Protonenstress dargestellt. Zur Normalisierung wurden die *Housekeeping*-Gene α -Tubulin und Ubiquitin verwendet. Die Kontrollen wurden gleich null gesetzt und die Veränderungen der Behandlungen in % zur Kontrolle ausgedrückt. In der Wurzel ergab sich erst bei pH 3,6 ein Anstieg der Transkriptmenge um 80% im Vergleich zur Kontrolle. Im Blatt zeigte sich eine Reduktion der Transkriptmenge, die bei pH 4,2 mit -20% begann und auf -80% bei pH 3,9 und 3,6 anstieg. Damit zeigte sich ein entgegengesetztes Expressionsmuster für TCTP unter Protonenstress in den beiden Kompartimenten Wurzel und Blatt.

Tab. 3.6: Relative TCTP-Transkriptmenge. Die Kontrollen wurden gleich null gesetzt und α -Tubulin und Ubiquitin zur Normalisierung verwendet.

	Kontrolle pH 6,0	pH 4,2	pH 3,9	pH 3,6
Wurzel	0	- 10%	0	+ 80%
Blatt	0	- 20%	- 80%	- 80%

Im Gel der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten drei Proteinspots für TCTP mittels MALDI-TOF identifiziert werden. Die Proteinspots Nr. 7 und 8 zeigten einen pI von 5,1 und eine molekulare Masse von 14 bzw. 14,5 kDa. Die größte Homologie ergab sich zur Sequenz P23 *tumor protein like* von *Solanum tuberosum* (ABB29923), die einen theoretischen pI von 4,5 und ein theoretisches Molekulargewicht von 18,8 kDa aufwies. Die beiden Spots waren sowohl unter Protonen- wie auch unter Salzstress um das doppelte ihrer Intensität hochreguliert. Der Spot Nr. 65 wurde ebenfalls als TCTP identifiziert, zeigte jedoch die größte Homologie zum *human tumor protein-like protein* von *Hordeum vulgare*. Die theoretisch ermittelten Werte pI 4,4 und MW 17,2 stimmten sehr gut mit dem im 2D-Gel ermittelten pI 4,5 und MW 17,0 überein. Dieser Proteinspot war nur bei Protonenstress hochreguliert, bei Salzstress ergab sich keine Veränderung der Spotintensität im Vergleich zur Kontrolle. Somit zeigten alle drei TCTP-Spots auf Proteinebene eine Hochregulation durch Protonen- und bis auf eine Ausnahme auch durch Salzstress.

Das Programm Signal P ergab keine Identifikation eines Signalpeptides, mit den Programmen Psort und TargetP konnte keine genauere Vorhersage der Lokalisation erfolgen. Phosphorylierungen oder Glykosylierungen von Proteinen sind ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Enzymaktivität und eventuelle Ursachen für die Abweichung der theoretischen zu den im 2D-Gel ermittelten pI- und MW-Werten. Die Programme NetPhos 2.0 und YinOYang 1.2 wurden zur Vorhersage möglicher Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen verwendet. Für die TCTP-Spots 7 und 8 ergaben sich drei mögliche Phosphorylierungs- und zwei mögliche Glykosylierungsstellen. Der Spot Nr. 65 zeigt fünf mögliche Phosphorylierungsstellen und eine Glykosylierungsstelle.

3.7.2 Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase

Von der Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD) konnte eine 240 Nukleinsäuren lange Teilsequenz aus dem codierenden Bereich kloniert und sequenziert werden. Für diesen Sequenzbereich konnte keine Isoformen auf cDNA-Ebene zwischen der Kontrolle und den Behandlungen von Wurzel oder Blatt identifiziert werden. Auf Proteinebene zeigte die Sequenz die größte Homologie zu *Festuca arundinaceae* (AAK97811, Rohrschwengel) mit einer Identität von 94% und nur eine Homologie von 13% zur bekannten CAD Sequenz von Gerste (X92754). Ein Alignment (Abb. 3.21) zeigte jedoch, dass die in der NCBI-Datenbank vorhandene Gerstensequenz nicht den ganzen ORF beinhaltet, sondern nur die zweite Hälfte des codierenden Bereiches, während der in dieser Arbeit klonierte Bereich HvCADpH aus der N-terminalen Proteinhälfte stammte. Es war daher möglich beide Teilsequenzen zusammensetzen.



Abb. 3.22: Sequenzalignment und Struktur von CAD. Verwendet wurden die Sequenzen von HvCADpH (blau), Gerste (X92754, schwarz) und *Festuca arundinaceae* (AAK97811). Zur Optimierung der Homologie wurden Leerstellen „-“ eingefügt. Die vier eingezeichneten roten AS-Reste sind verantwortlich für die Substratspezifität der Alkohole. Die grünen Balken kennzeichnen die Domänen der Zinkbindung. Mit gelben Boxen wurden die Bereiche der durch MALDI ermittelten Sequenzstücke markiert.

Die CAD (1.1.1.195) gehört zur Klasse der *Zn-containing* ADH-Enzyme und katalysiert die NADH-abhängige Reduktion von Cinnamyl-Aldehyden zu den korrespondierenden Alkoholen (Ligninvorstufen) (Brill et al., 1999). Wie in Abb. 3.22 ersichtlich, waren beide

Zn-katalytischen Regionen (Zn-1: AS 68-82 und Zn-2: AS 88-104) in dem klonierten Bereich von HvCADpH enthalten. Die rot markierten Reste I-96, Y-113, W-119 und F-299 sind verantwortlich für die Substratspezifität der aromatischen Alkohole. Die Bindungsregion des Cofaktors NADP (188-193) war in keiner der beiden Teilsequenzen aus Gerste enthalten (Selman-Housein et al., 1999). Durch die beiden gelben Boxen wurden die Sequenzausschnitte gekennzeichnet, die mittels MALDI-Analyse aus den 2D-Gelspots zur Identifikation der CAD geführt haben.

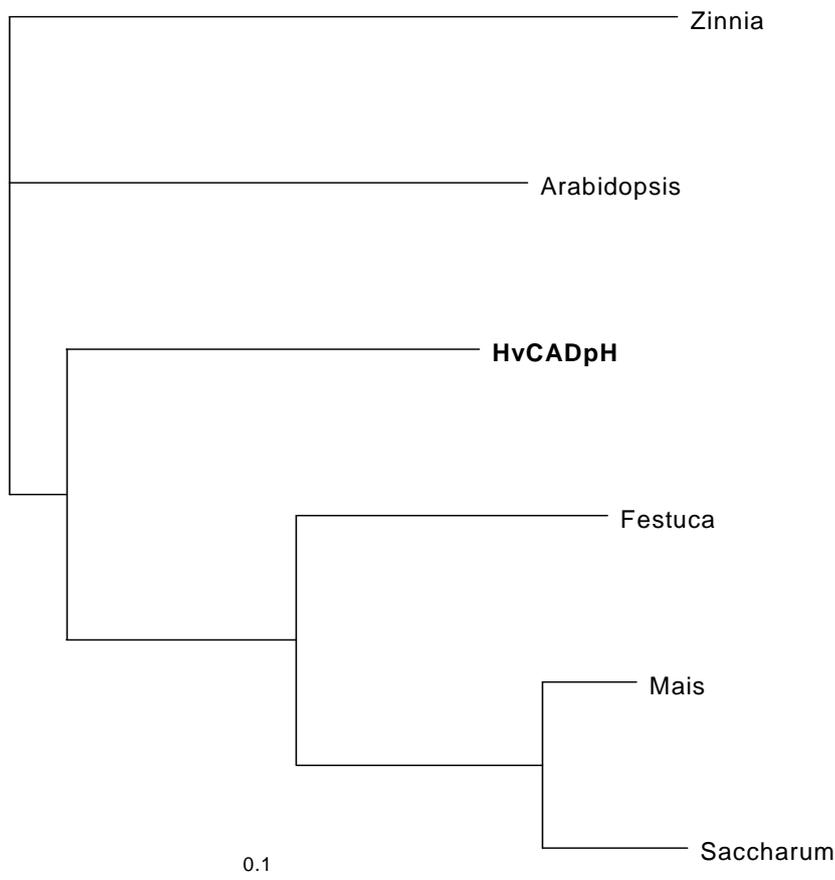


Abb. 3.23: Phylogenetischer Stammbaum der CAD-Proteine. Das Phylogramm wurde mit dem Programm Clustal W erstellt und ein Divergenzmaßstab von 0,1% eingefügt.

Ein Vergleich der Sequenzhomologie der zusammengesetzten Gerstensequenz auf Proteinebene ergab die größte Übereinstimmung mit 80% zu der *cinnamyl alcohol dehydrogenase 2b* von *Festuca*, 79% zu der von *Zea mays*, 78% zur CAD aus *Arabidopsis*

thaliana und *Saccharum officinarum* und 76% zu *Zinnia elegans*. In Abb. 3.23 wurde ein phylogenetischer Stammbaum der CAD-Proteine dargestellt. Es wurde deutlich, dass die zusammengesetzte Gerstensequenz aus HvCADpH und HvCAD stärker mit den anderen monokotylen CAD-Proteinen gruppiert war als mit den etwas weiter entfernten dikotylen Sequenzen von *Arabidopsis* und *Zinnia*. Die Clusterbildung würde sich noch verstärken, wenn eine Vollängensequenz aus Gerste vorliegen würde.

Die Veränderungen der Transkription von *HvCADpH* durch Protonenstress wurden mit der Real-Time-PCR untersucht. Es wurden α -Tubulin und Ubiquitin zur Normalisierung verwendet und die Veränderungen der Behandlung in % zur 0 gesetzten Kontrolle ausgedrückt. In Tab. 3.7 zeigte sich für die Wurzel ein Anstieg der Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle durch Protonenstress bei pH 4,2 um 105%, der sich bei den Behandlungen pH 3,9 und 3,6 auf 58% und 55% abschwächte. Im Blatt gab es ebenfalls einen Anstieg der Transkriptmenge von *HvCADpH*, jedoch erst bei pH 3,9 beginnend und bei pH 3,6 auf 190% ansteigend. In den beiden Organen Wurzel und Blatt zeigte sich damit durch Protonenstress eine Induktion der Transkriptmenge, die jedoch bei den verschiedenen Stressintensitäten variiert.

Tab. 3.7: Relative CAD-Transkription. Die Kontrollen wurden gleich null gesetzt und α -Tubulin und Ubiquitin zur Normalisierung verwendet.

	Kontrolle pH 6,0	pH 4,2	pH 3,9	pH 3,6
Wurzel	0	+ 105%	+ 58%	+ 55%
Blatt	0	0	+ 60%	+ 190%

Durch die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden zwei Proteinspots (Spt Nr. 20 + 60) auf Gelen von Proben verschiedener Proteinextraktionen von verschiedenen Anzuchten und verschiedenen Durchführungsorten der Identifikation durch MALDI (vgl. 2.2.9) als CAD identifiziert. Dies sprach für eine gute Reproduzierbarkeit der Proteinisolation sowie der Durchführung der 2D-Gele. Beide Proteinspots zeigten einen pI von 6,1 und ein Molekulargewicht von 43 kDa. Die größte Homologie zu HvCADpH zeigte *Aralia cordata cadacl mRNA for cinnamyl alcohol dehydrogenase* (D13991) mit den theoretisch ermittelten Werten pI 5,3 und MW 43 kDa. Die beiden Spots zeigten eine Verdopplung

ihrer Intensität bei Protonenstress (vgl. Abb. 3.24) und eine Halbierung der Spotintensität bei Salzstress.

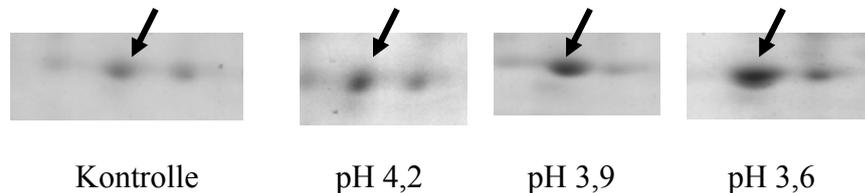


Abb. 3.24: Entwicklung der Intensität der Proteinspots von CAD in den 2D-Gelen des Xylemexsudates unter Protonenstress. Von Kontrolle über die Behandlungen pH 4,2, 3,9 und 3,6 ist eine Intensitätsverdopplung des mit einem Pfeil gekennzeichneten Spots von CAD zu erkennen.

Das Programm Signal P ergab keine Identifikation eines Signalpeptides für eine extrazelluläre Sekretion. Selman-Housein et al. (1999) gehen von verschiedenen Zielsequenzen im Protein aus. Sechs mögliche Phosphorylierungs- und zwei mögliche Glykosylierungsstellen (NetPhos 2.0, vgl 2.5) können eine Erklärung für die Abweichung des pI-Wertes um 0,8 pH-Einheiten sein.

3.7.3 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Sequenzinformationen zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden nur durch die mit MALDI-TOF gewonnenen Bruchstücke erzielt. Ein BLAST der gewonnenen Sequenzen in der CDD (s. 2.5) ergab, dass die Bruchstücke der C-terminalen 186 AS langen katalytischen Proteindomäne der GAPDHs zuzuordnen waren (Abb. 3.25) und damit eine eindeutige Identifikation (pfam 02800) ermöglicht wurde.

```
Query: 3 NIIPSTGAAK-----VPTVDVSVDLTVRL 28
Sbjct: 53 NIIPTSTGAAKAVGLVLPELKGKLTGMAFRVPTPNVSVVDLTVEL 97
```

Abb. 3.25: Alignment der HvGAPDHpH-Bruchstücke mit der Konsensussequenz der katalytischen Domäne von GAPDH. Die Konsensussequenz wurde unter Einbeziehung von zehn verschiedenen katalytischen Domänen von der CDD generiert. Rote Aminosäuren stehen für Identität, blaue für Ähnlichkeit.

Die GAPDH ist ein homotetrameres NAD-bindendes Enzym, dass bei höheren Pflanzen in zwei Isoformen im Chloroplasten (Gap A und B) und als einzelnes Enzym im Cytosol (Gap C) vorkommt (Brinkmann et al., 1989). Um zu klären, wo die in dieser Arbeit

charakterisierte HvGAPDHpH einzuordnen war, wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit mono- und dikotylen GAPDHs der verschiedenen Isoformen erstellt. Wie in Abb. 3.26 ersichtlich ist, clusterte HvGAPDHpH am stärksten mit den mono- und dikotylen Sequenzen der Gap C und zeigte auf Proteinebene eine Sequenzhomologie zwischen 83% und 91%. Zu den Sequenzen der Gap A und B ergaben sich nur Homologien von 45-47%, was die Zuordnung von HvGAPDHpH der Sequenzhomologie nach zu den im Cytosol vorkommenden Formen des Proteins ermöglichte.

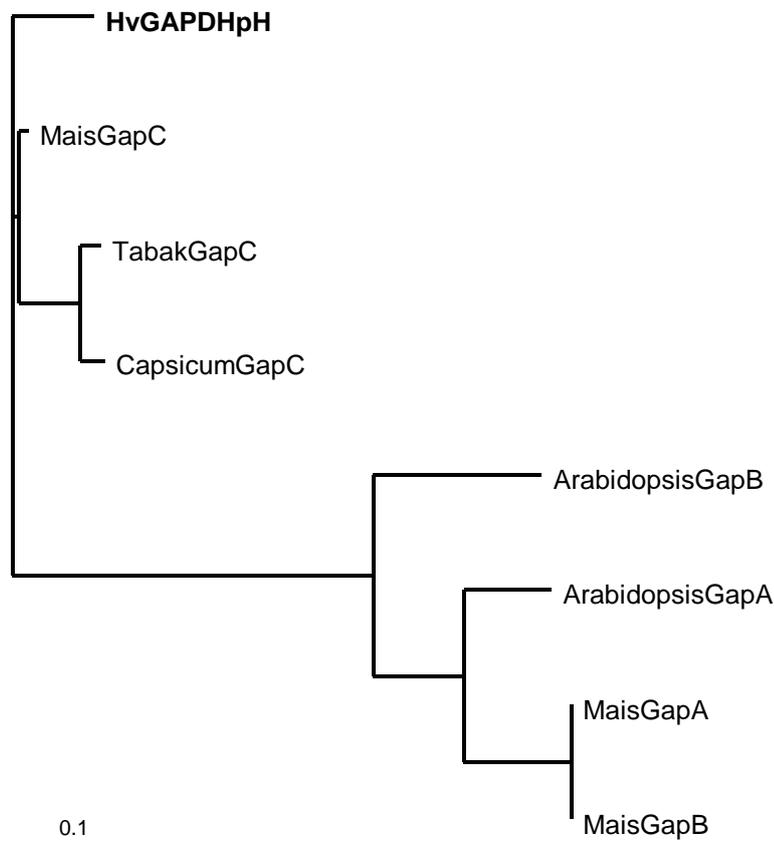


Abb. 3.26: Phylogenetischer Stammbaum der GAPDH-Proteine. Das Phylogramm wurde mit dem Programm Treeview erstellt und ein Divergenzmaßstab von 0,1% eingefügt. HvGAPDHpH clustert eindeutig mit den Gap C-Proteinen.

Durch Protonenstress verursachte Veränderungen der Transkriptmenge der *HvGAPDHpH* wurden mittels Real-Time-PCR untersucht. Als *Housekeeping*-Gene wurden α -Tubulin und Ubiquitin verwendet und die Veränderungen der Behandlung in% zur gleich null

gesetzten Kontrolle ausgedrückt. Wie man in Tab. 3.8 erkennen kann, kam es im Blatt zu keiner Veränderung der Transkriptmenge und in der Wurzel nur zu minimalen Veränderungen. Zusammengefasst konnte man sagen, dass es keine Veränderungen in der Transkriptmenge der *HvGAPDHpH* durch Protonenstress in Wurzel und Blatt gab und diese damit ein gutes *Housekeeping*-Gen für Transkriptuntersuchungen unter Protonenstress gewesen wäre. Unter Standardbedingungen wird die GapC oft zur Normalisierung verwendet (Coker und Davies, 2003 und Burton et al., 2004).

Tab. 3.8: Relative GAPDH-Transkriptmengen. Die Kontrollen wurden gleich null gesetzt und α -Tubulin und Ubiquitin zur Normalisierung verwendet.

	Kontrolle pH 6,0	pH 4,2	pH 3,9	pH 3,6
Wurzel	0	0	- 10%	+ 10%
Blatt	0	- 20%	- 30%	- 20%

Im Gegensatz zur fehlenden Regulation durch Protonenstress auf Transkriptionsebene ergaben sich mehrere Isoformen mit unterschiedlicher Stressregulation auf der Proteinebene. Im 2D-Gel wurde ein Trainspot bestehend aus 3 Proteinspots mit dem Molekulargewicht 38 kDa und den pI-Werten 6,8, 6,9 und 7,0 als GAPDH identifiziert. Die ersten beiden Proteinspots besitzen die Nummern 16 und 17 und zeigten die stärkste Homologie zur GAPDH aus *Capsicum annuum* (CAC80376) mit einem theoretischen MW von 34 kDa und einem pI von 5,6. Der dritte Proteinspot mit der Nummer 23 besaß dagegen die putative GAPDH von *Oryza sativa* (XP_466582) als größten Homologiepartner mit einem theoretischen pI von 7,7 und einem MW von 36,5 kDa. Alle drei Proteinspots wurden durch Protonenstress im 2D-Gel herunterreguliert, während sie bei Salzstress unverändert blieben oder gar nicht vorhanden waren. Das Programm Signal P ergab keine Identifikation eines Signalpeptides. Die Programme NetPhos 2.0 und YinOYang 1.2 ergaben eine große Anzahl möglicher Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen, was eine Erklärung für die Erhöhung der pI- bzw. MW-Werte und das Auftreten eines Trainspots sein könnte.

3.7.4 Glucanase

Die β -1,3-Glucanasen (3.2.1.39) gehören zur 2. Klasse der PR-Proteine und katalysieren die hydrolytische Spaltung von 1,3- β -D Glucosidverknüpfungen zu β -1,3-Glucan (Leubner-Metzger und Meins, 1999). In dieser Arbeit konnte ein 631 bp langer Bereich aus der codierenden Region einer β -1,3-Glucanase (HvGlucanasepH) kloniert und sequenziert werden, für den keine Isoformen in Kontrolle oder Behandlung von Wurzel oder Blatt identifiziert wurden. Die Überprüfung des Sequenzstückes in der CDD ergab eine Zuordnung zu pfam 00332 (s. Abb. 3.27), der Glycosyl- Hydrolasenfamilie 17.

Query: 4 NIKYIAAGNEVGDQGGDTGNILPAMQNLDAAALAAAGLGG-IKVSTSVSQGV-TAGYPPSQ 61
HvGlu: 85 KFRYIAVAGNEV-SPGTGQSFLVPAMRNIRNALTAAGLGNKIKVSTSVVFDILGNSFPSPN 143

Query: 62 GTF---SASYMGPIAQYLASTGAPLLANVYPYFSYVGNQAQIDISYALFTSPGTVVTDGD 118
HvGlu: 144 GSRVETRSFVDPIIVFLAGTNAPLLANVYPYFAYSNNPRDISLPYALFQPGSTVV-DGG 202

Query: 119 KEYQNLFDALVDTFYSALENAGAGSVGVVVSESGWPSAGGTAATTDNAQTYNQNLIKHVG 178
HvGlu: 203 LGYQNLFDAMLDAVYAALEKAGGPSVEVVSESGWPSDGGFAATIENARTYNQNLIDHVK 262

Query: 179 QGTPKR-SSAIEAYVFAMFNEDRKGPADTEKHF 210
HvGlu: 263 KGTPKRPGWAIETYVFAMFDENQKPGESVEKHF 295

Abb. 3.27: Alignment der HvGlucanasepH mit der Konsensussequenz der Glycosyl-Hydrolasenfamilie 17. Die Konsensussequenz wurde unter Einbeziehung von zehn verschiedenen katalytischen Domänen von der CDD generiert. Rote Aminosäuren stehen für Identität, blaue für Ähnlichkeit.

Ein Sequenzvergleich mit der Proteindatenbank von NCBI ergab die höchste Homologie mit 98% zur *beta-1,3-glucanase* von *Hordeum vulgare*, dann folgte mit 93% der *beta-1,3-glucanase precursor* (Glb3) von *Triticum aestivum*. Die Glucanasen werden in drei Klassen eingeteilt: I basisch vakuoläre Isoformen, II saure extrazelluläre und III neutrale und basische mit C-terminaler Verlängerung. Anhand der Extraktion aus Xylemexsudat konnte eine Einordnung der klonierten Glucanase in die 2. Klasse erfolgen, deren Kriterium unter anderem die Sekretion in den extrazellulären Raum ist (Leubner-Metzger und Meins, 1999). Diese unterteilt sich erneut in die Unterklassen a, b und c. Um zu klären, welcher Unterklasse die gefundenen Glucanasen angehörten, wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Dieser zeigte in Abb. 3.28 deutlich die Clusterbildung der HvGlucanasepH mit den beiden Sequenzen 2a aus Gerste und Weizen und ermöglichte eine Zuordnung zur Klasse II der Glucanasen, Unterklasse 2a. Nach Simmons (1994) werden die monokotylen β -Glucanasen in die drei Unterfamilien A-C eingeteilt, wobei die β -1,3-Glucanasen zur Subfamilie A gezählt werden. Ein

Stammbaumvergleich mit den Untergruppen GI bis GVI unter Einbeziehung der Sequenz PR2a von Gerste hat jedoch eine weitaus höhere Clusterbildung zu PR2a als zu der Subfamilie A gezeigt. Daher wurde die Zuordnung zu PR2a, auch im Hinblick auf die Sequenzhomologie mit Gerste PR2a in der Proteindatenbank, gewählt. Es konnten keine Veränderungen der Transkriptmenge durch Protonenstress mittels Real-Time-PCR untersucht werden, weil eine Synthese passender Primer nicht möglich war.

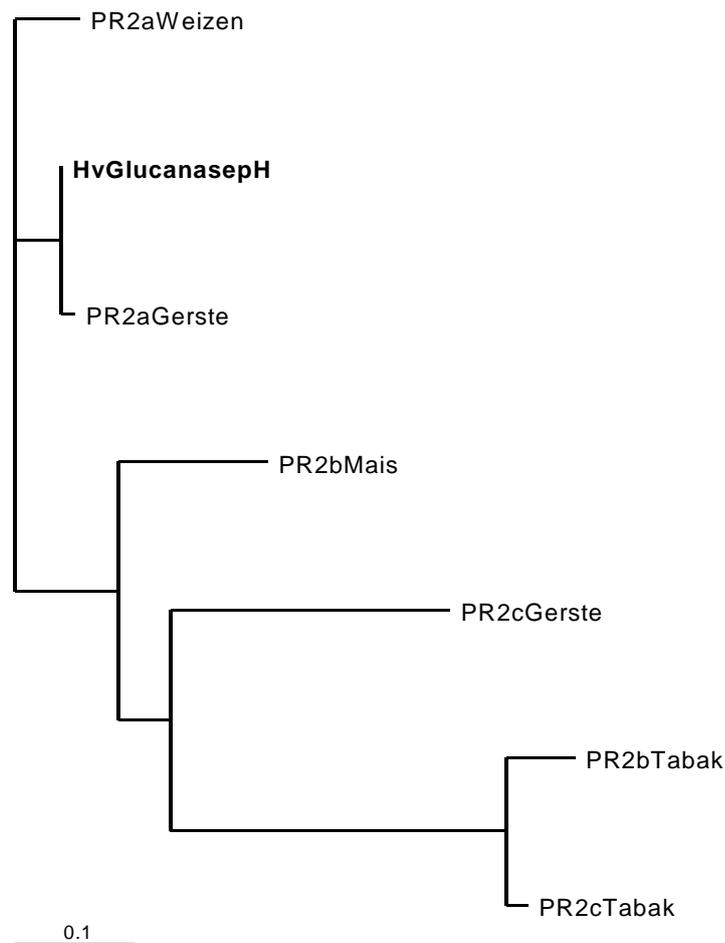


Abb. 3.28: Phylogenetischer Stammbaum der Glucanase-Proteine der Klasse II. Das Phylogramm wurde mit dem Programm Clustal W erstellt und ein Divergenzmaßstab von 0,1% eingefügt. Die Sequenz HvGlucanasepH clustert eindeutig mit den PR2a-Proteinen von Gerste (AAU11328) und Weizen (AAD28734). Die Acession-Nummern der anderen Vergleichssequenzen lauten Mais PR2b (AAB47177), Gerste PR2c (AJ271367), Tabak PR2b (P23547) und Tabak PR2c (P52397).

Dass die β -1,3-Glucanasen multiple strukturelle Isoformen mit verschiedenen Größen, pI-Werten und Regulationsmustern beinhalten, wurde auf der Ebene der 2D-Gele sichtbar. Es konnten zwei Trainspots mit drei bzw. vier Proteinen und ein Einzelspot als β -1,3-Glucanase identifiziert werden. Der erste Trainspot mit den Spotnummern 9, 10 und 12 hatte einen pI von 4,7-4,9 und ein Molekulargewicht von 22 kDa. Die größte Homologie auf Proteinebene ergab sich zu *Oryza sativa* und zwar zum *putativen beta-1,3-glucanase precursor* (XP_478575) bei Spot 9 und 10 und zur *putativen beta-1,3-glucanase* (XP_478570) bei Spot 12. Deren theoretische pI-Werte lagen bei 5,7 und die Molekulargewichte bei 54 kDa und alle Spots besaßen ein Signalpeptid von 26 AS. Es zeigte sich eine Hochregulation aller drei Spots sowohl durch Protonen- wie auch durch Salzstress, wobei die Induktion durch Protonenstress doppelt so stark war und bei Spot 12 bei pH 3,6 die Spotintensität wieder abfiel (s. Abb 3.29).

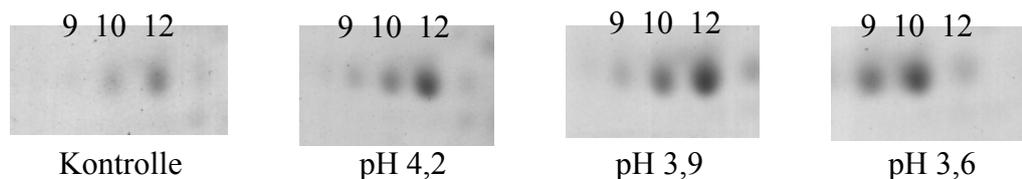


Abb. 3.29: Entwicklung der Intensitäten des Trainspots 9, 10 und 12 von Glucanase in den 2D-Gelelen des Xylemexsudates unter Protonenstress. Von Kontrolle über die Behandlungen pH 4,2, 3,9 und 3,6 war ein Anstieg der Spotintensität von 9 und 10 und eine Reduktion bei Spot 12 erkennbar.

Der zweite Trainspot beinhaltete die Spots Nummer 32-35 mit einem pI von 5,5-6,0 und der molekularen Masse 35 kDa. Sie besaßen alle die größte Homologie zum *putative beta-1,3-glucanase precursor* (XP_480946) von *Oryza sativa* mit einem theoretischen MW von 60 kDa, einem pI von 5,1 und einem Signalpeptid bestehend aus 26 AS. Die vier Proteinspots wurden durch Stress sehr unterschiedlich reguliert: Spot 32 wurde nicht reguliert, Spot 33 nur bei Salzstress herunterreguliert, Spot 34 bei Protonenstress herunter- und bei Salzstress hochreguliert und Spot 35 bei Protonenstress stark und bei Salzstress weniger stark hochreguliert. Der Einzelspot Nummer 45 mit einem pI von 5,6 und einem Molekulargewicht von 38 kDa zeigte die größte Homologie zur *putative beta-1,3-glucanase* von *Oryza sativa* mit den theoretischen Werten pI 5,3 und MW 30,4 kDa und einem 27 AS langem Signalpeptid. Alle Glucanasen besaßen mehrere mögliche Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen. Die aus Gerste bekannten β -1,3-Glucanasen Klasse II besitzen ebenfalls einen sauren pI, in den Gelspots ähnlicheres

121), Wasserstoffbrücken und hydrophoben Interaktionen stabilisiert wird. Diese Sandwichanordnung führt zur Bildung von zwei hydrophoben Kernen und einem Protein mit sehr hoher Stabilität (Fernandez et al., 1997). Aufgrund dieser einzigartigen Struktur wurden den PR1-Proteinen eine eigene Klasse zugeordnet, deren Funktion noch immer unbekannt ist (Van Loon und van Strien, 1999). Die PR-1 Proteine besitzen zudem alle eine N-terminale Signalsequenz aus 24 AS, die auf ihr extrazelluläres Vorkommen hinweist und eine kurze C-terminale Verlängerung.

Die Klasse der PR1-Proteine untergliedert sich in eine Vielzahl von Unterklassen. Um die unter Protonenstress gefundenen Sequenzen exakter zuordnen zu können, wurde ein BLAST gegen die NCBI-Proteindatenbank durchgeführt. Es zeigte sich eine 99% Homologie zum Protein *Bpr1-1 gene for type-1 pathogenesis-related protein* aus Gerste (Z48728), 94% zum *pathogenesis-related protein 1.2* aus Weizen (CAA07474) und nur 62% Sequenzhomologie zu den *pathogenesis related proteins PR-1a* (CAA52893) und *PR-1b* (CAA52894) aus Gerste. Noch deutlicher wurde die Zuordnung der Gerstenisoformen unter Protonenstress zu der Unterklasse der PR1-1 Proteine durch die Gruppenbildung im phylogenetischen Stammbaum der Abb. 3.31. Es ergab sich eine sehr enge Clusterbildung mit PR1-1 von Gerste, PR1.2 von Weizen war schon weiter entfernt, und alle PR1a oder PR1b Sequenzen bildeten jeweils mit deutlichem Abstand eigene Gruppierungen.

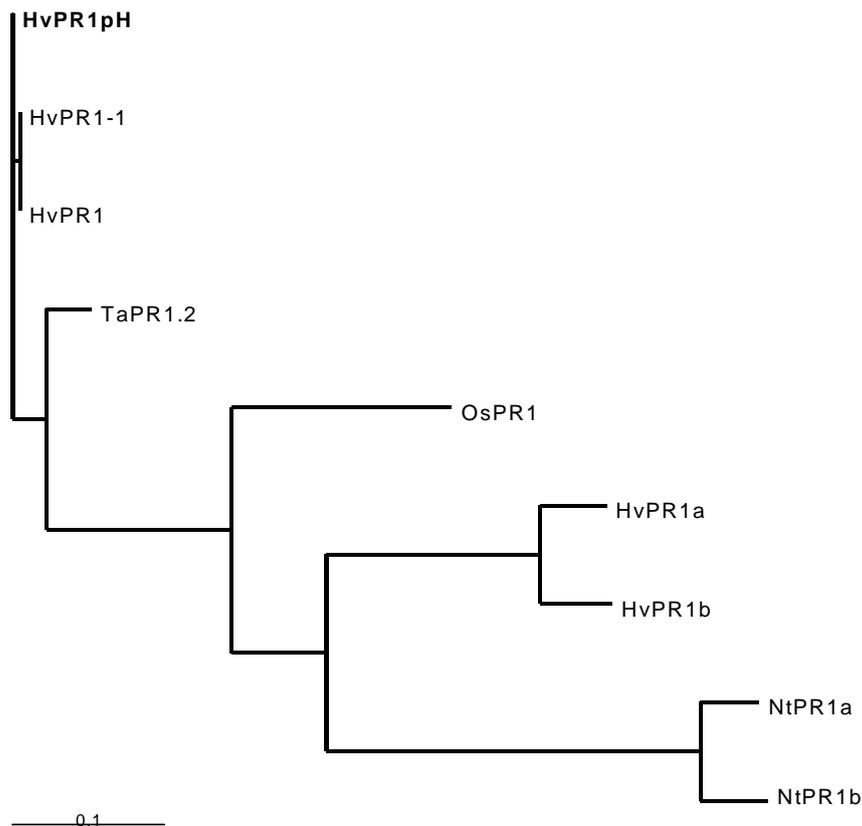


Abb. 3.31: Phylogenetischer Stammbaum der PR1-Proteine. Das Phylogramm wurde mit dem Programm Clustal W erstellt und ein Divergenzmaßstab von 0,1% eingefügt. Die Sequenz HvPR1pH ist eindeutig mit den PR1-1 Proteinen der Gerste gruppiert, was durch eine Markierung gekennzeichnet ist.

Ein Vergleich der HvPR1pH-Sequenzen mit der CDD ergab eine Übereinstimmung zum Eintrag cd00168, einer Familie von extrazellulären Domänen, in der die *Human glioma pathogenesis-related proteins* (GliPR) und die *plant pathogenesis-related proteins* zusammengefasst sind. Die Funktionen der Familien sind unbekannt, es wird jedoch eine funktionelle Verbindung zwischen dem menschlichen Immunsystem und der pflanzlichen Abwehr postuliert (Fluhr, 2001).

Eine Induktion der PR-Gene durch biotischen und abiotischen Stress zeigt sich auf Transkriptionsebene. Die mittels Real-Time-PCR ermittelten Veränderungen der Transkriptmenge von *HvPR1-1pH* der Wurzel zeigten in Tab. 3.9 deutlich, dass eine starke

Induktion von 220% durch Protonenstress ab pH 3,9 stattfand. Diese stieg auf 350% im Vergleich zur Kontrolle bei der Behandlung pH 3,6.

Tab. 3.9: Relative PR1-1-Transkription in der Wurzel. Die Kontrolle wurden gleich null gesetzt und α -Tubulin und Ubiquitin zur Normalisierung verwendet.

	Kontrolle pH 6,0	pH 4,2	pH 3,9	pH 3,6
Wurzel	0	- 10%	+ 220%	+ 350%

Diese starke Induktion auf der Transkriptionsebene war auf die Proteinebene übertragbar, denn der Proteinspot von PR1-1 wurde erst ab einem Protonenstress von pH 3,9 auf dem 2D-Gel sichtbar und seine Intensität verstärkte sich noch bei pH 3,6. Bei Salzstress dagegen war der Spot nicht vorhanden. Mit einem pI von 8,7 und einem Molekulargewicht von 10,5 kDa lag der Spot von PR1-1 nahe der Auflösungsgrenze von 2D-Gelen. Zum einen war die Spotintensität gerade an der Grenze für eine Detektion durch MALDI und zum anderen war der Bereich von 10 kDa auch jener der Laufbande, die daher Spots verdecken konnte. Die theoretischen Werte für HvBpr1-1 von Gerste lagen bei 8,5 für den pI und das Molekulargewicht betrug 18,8 kDa. Es konnte mit Signal P zudem das 24 AS lange Signalpeptid berechnet werden, was mit der klonierten Nukleinsäurestruktur übereinstimmt.

Das klonierte PR1-1 Protein zeigte verschiedene Aspekte, die auf eine mögliche Signalfunktion des Proteins unter Protonenstress im Xylem hinwiesen. Zum einen konnte es nur in der Wurzel und nicht im Blattmaterial gefunden werden. Zum zweiten fand eine sehr starke Induktion bei pH 3,9 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene statt. Und zum dritten besaß das Protein eine Signalsequenz und konnte im Xylem nachgewiesen werden, das den Transportweg für Wurzelsignale an den Spross darstellt. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde eine Heterologe Proteinexpression durchgeführt. Das rekombinante Protein des durch Protonenstress induzierten Gens PR1-1 sollte in dem heterologen bakteriellen Expressionssystem pQE 30 synthetisiert werden, um für Aufnahme-Experimente und damit einem möglichen Nachweis einer Signalfunktion zur Verfügung zu stehen.

Die Expression des rekombinanten Proteins PR1-1 in *E.coli* wurde überprüft, indem eine Kultur mit IPTG induziert wurde. Zu den Zeitpunkten t_0 , 0,5 h, 1 h und jede weitere Stunde bis insgesamt 5 h wurde Kultur abgenommen und das Protein extrahiert. In Abb. 3.32 ist die SDS-PAGE mit den aufgetrennten Proteinextrakten zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten dargestellt. Der Bereich zwischen 10 und 15 kDa, in dem die Bande von PR1-1 vermutet wurde, ist gekennzeichnet. Man erkennt, dass die Banden im Zeitverlauf in ihrer Intensität variieren. Aufgrund fehlender Antikörper für die Unterklasse PR1-1 konnte kein spezifischer Bandennachweis erbracht werden.

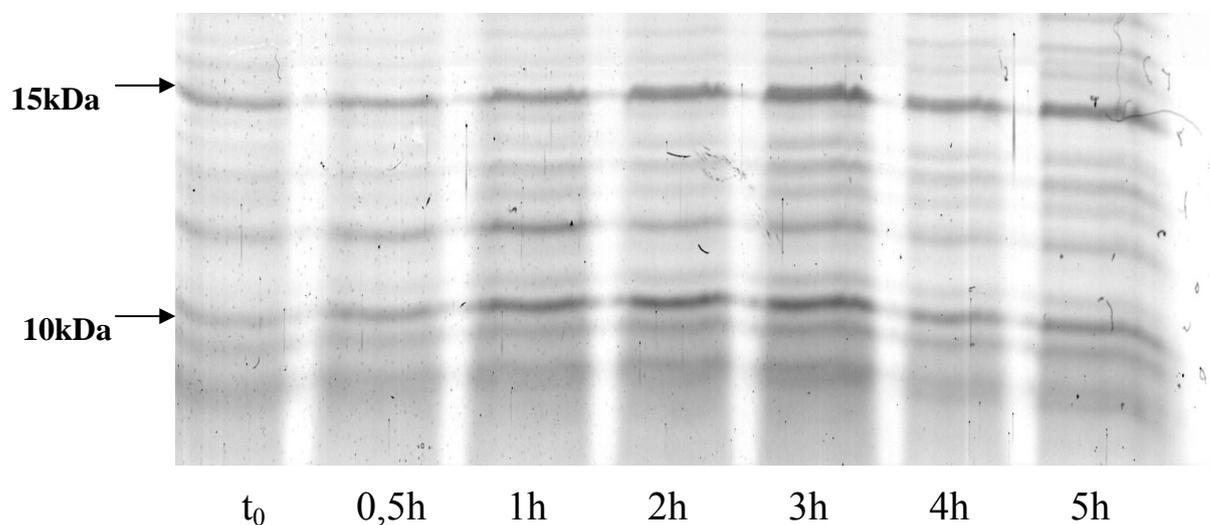


Abb. 3.32: 15%iges SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinextrakten der heterologen Proteinexpression. Gekennzeichnet sind die Entnahmezeitpunkte t_0 , 0,5 h, 1 h-5 h und der Bandenbereich zwischen 10 und 15 kDa. Das Gel wurde mit Coomassie angefärbt.

Um das Protein PR1-1 aufzureinigen und damit zu identifizieren, wurde eine Aufreinigung über eine Säule durchgeführt, die nur das His-tag des rekombinanten Proteins bindet (s.2.2.10.4). Mit dem Rohextrakt, dem Durchfluss, den einzelnen Waschschritten und schließlich dem Eluat welches PR1-1 enthalten sollte, wurde eine SDS-PAGE (Abb. 3.33) durchgeführt. Während in den Rohextrakten und Waschschrritten eine starke Bande im erwarteten Bereich zwischen 10 und 15 kDa vorlag, waren im Eluat keine Banden in diesem Molekularbereich sichtbar.

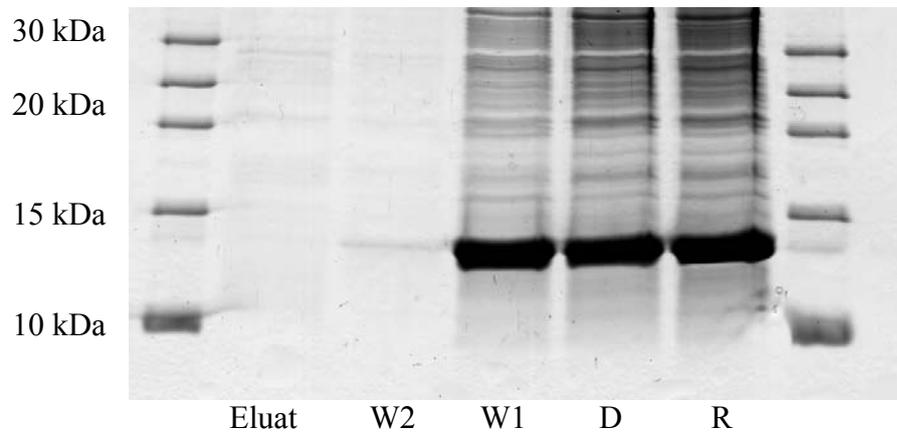


Abb. 3.33: 15%ige SDS-PAGE mit den Aufreinigungsschritten durch die His-Taq Säule, Silberfärbung. R steht für das Rohextrakt, D ist der Durchfluss ohne PR1-1, W1 und W2 sind der Durchfluss der beiden Waschschrte und Eluat sollte das rekombinante Protein PR1-1 enthalten.

Ein Grund dafür könnte sein, dass das Protein PR1-1 trotz starker Anreicherung noch in zu geringen Mengen zur Sichtbarmachung und damit auch für Aufnahme-Versuche vorhanden ist. Eine weitere Erklärung ist, dass das Protein von *E. coli* nicht exprimiert oder in Einschlußkörpern eingelagert wurde und damit bei der Proteinextraktion im nicht bearbeiteten Pellet statt im löslichen Überstand vorlag. Aufgrund des fehlenden Isolationsschrittes konnten keine Aufnahme-Versuche durchgeführt werden.

4 Diskussion

4.1 Resistenzinduktion durch Protonenstress

Pflanzen reagieren als standortgebundene Organismen auf Veränderungen abiotischer und biotischer Umweltbedingungen mit physiologischen und morphologischen Modifikationen, um den Stress zu minimieren. So können geringe pH-Werte im Wurzelmedium direkt das Pflanzenwachstum hemmen (Schubert et al., 1990), was sich in den starken Veränderungen der Wurzelmorphologie bei der Gerstensorte Ingrid unter den verschiedenen Protonenstressvarianten deutlich zeigt. Nach Yan et al. (1992) ist der kritische pH-Wert für die Hemmung des Wurzelwachstums und der Protonenfreisetzung, welche zur Ansäuerung des cytosolischen pH-Wertes führen kann, je nach Pflanzenart verschieden. Protonenstress von pH 4,5 führte bei Arabidopsiswurzeln bereits nach einer Stunde zu irreversiblen Schäden (Koyama et al., 2001), bei Luzerne und einem pH-Wert von 4,0 dauerte es vier Stunden (Yokota und Ojima, 1995). Es werden nur wachsende Wurzeln geschädigt, wobei die Plasmamembran betroffen ist (Yan et al., 1992, Koyama et al., 1995) und es nach Matsumoto et al. (1977) zudem zu Störungen der Kernaktivität in den Zellen kommt. Eine Reduktion der durch Protonenstress verursachten Schäden kann durch eine gleichzeitige Erhöhung der Calciumkonzentration im Wurzelmedium erfolgen (Koyama et al., 2001).

Bei Mais konnten Yan et al. (1998) zeigen, dass eine schrittweise Absenkung des pH-Wertes auf pH 3,5 zum Ausbleiben einer Wachstumsreduktion der Wurzel führte, wobei die adaptierten Maiswurzeln eine dreifach erhöhte Netto-Protonenabgabe, sowie eine erhöhte Aktivität der Plasmalemma H^+ -ATPase aufwiesen. Trotz identischer pH-Absenkungsbedingungen konnte bei der Gerstensorte Ingrid keine Adaptation festgestellt werden. Die Ansäuerung des Wurzelcytoplasmas, die sowohl durch abiotischen Stress induziert als auch durch Säurebehandlung direkt verursacht werden kann (Sakano et al., 2001), könnte ein Induktionssignal für die Abwehrreaktion der Pflanze sein (He et al., 1998). Es ist bekannt, dass eine cytoplasmatische Ansäuerung als intrazelluläres Signal nach 6-10 min zu einem Anstieg der mRNA-Menge und damit zu einer veränderten Genexpression führt, die Proteinsynthese und den Phosphorylierungsstatus von Proteinen beeinflusst und die Synthese von Sekundärmetaboliten auslösen kann (He et al., 1998b,

Isfort et al., 1993, Lapous und Mathieu, 1998). Inwieweit der Mechanismus der Induzierten Resistenz durch eine cytoplasmatische Ansäuerung ausgelöst werden kann, ist unklar (Yamaoka et al., 2000).

Viele stressinduzierte Modifikationen laufen auf molekularer Ebene ohne sichtbare Symptome ab (Oerke et al., 1992), was auch für den unter Protonenstress angezogenen Spross gilt. Es zeigten sich keine Veränderungen hinsichtlich Wuchshöhe oder Grünfärbung, dafür ergab sich im Biotest eine signifikante Abnahme der Mehлтаupusteln mit zunehmender Intensität des Protonenstress. Die Reduktion der Pustelzahl (vgl. Abb 3.4) zwischen Gerstenpflanzen der Kontrolle und der Behandlung pH 3,6 beträgt 85% und ist auf eine durch Protonenstress induzierte und durch die Bildung von Papillen vermittelte Induzierte Resistenz zurückzuführen, wie sie bereits von Wiese et al. (2004) beschrieben wurde. Eine ähnlich starke Resistenzinduktion konnte ebenfalls durch eine Ammoniumernährung der Gerstensorte Ingrid erzielt werden (Wiese et al., 2004).

Es stellt sich die Frage, wie der nur an der Wurzel wirkende Protonenstress zu einer Resistenzinduktion in den Blättern führen kann. Das Xylem gilt als wahrscheinlichster Signalweg für wurzelbürtige Signale (Felle et al., 2005), daher war die Gewinnung und Untersuchung des Xylemexsudates von Gerste unter Kontrollbedingungen und verschiedenen Protonenstressstufen eine grundlegende Fragestellung dieser Arbeit. Zur Gewinnung des Xylemexsudates wurde die Methode von Satoh et al. (1992) verwendet und optimiert, welche als Standardverfahren zur Exsudatgewinnung eingesetzt wird (Kato et al., 2001, Rep und Dekker, 2002, Buhtz et al., 2004). Auf eine Diskrepanz zwischen gewonnenem Xylemexsudat und der Xylemflüssigkeit intakter Pflanzen weisen Schurr und Schulze (1995) und Liang und Zhang (1997) aufgrund der veränderten Volumenflussrate und dem weggefallenen Austausch mit dem Phloem hin. Zudem ist die Zusammensetzung des Xylemsaftes abhängig von der Pflanzenart, dem Alter, der Tageszeit und dem Ernährungsstatus (Schurr und Schulze, 1995). Um diese Faktoren auszuschalten, wurden bei allen Anzuchten die Pflanzen 27 Tage unter identischen Bedingungen angezogen und die Ernte des Xylemexsudates im gleichen Zeitraum von 10-13 Uhr durchgeführt. Während van Die und Tammes (1975) noch von einer möglichen Verunreinigung durch beim Abschneiden in die Xylemgefäße gesaugten Phloemsaft ausgingen, verneinen Satoh et al. (1992) dies. Als Nachweis für eine mögliche Verunreinigung durch nicht-apoplastische Proteine wurde in dieser Arbeit ein Antikörper gegen Rubisco eingesetzt und

die Gewinnung des Xylemexsudates soweit optimiert, bis keine Verunreinigungen durch Rubisco mehr nachzuweisen waren. Alves et al. (2006) verwendeten Malatdehydrogenase als Marker.

Um zu klären, ob die pH-Änderung direkt als Signal des Protonenstress von der Wurzel an den Spross weitergegeben wird, wurden die pH-Werte des Xylemexsudates mittels Mikroelektrode untersucht (s. Abb. 3.3). Der pH-Wert der Kontrolle und der Behandlung pH 4,2 betrug pH 5,9 und reduzierte sich bei pH 3,9 um 0,1 pH-Einheit und bei dem stärksten Protonenstress von pH 3,6 auf einen pH-Wert von 5,7. Vergleichbare pH-Veränderungen mit Werten zwischen pH 5,5 und 5,7 finden sich im Wurzelexsudat von Maiswurzeln unter Trockenstress (Wegner und Zimmermann, 2004). Stärkere pH-Verschiebungen im Xylemsaft mit einem Anstieg von pH 6,3 auf pH 7,2 sind bei der Bohne unter Wasserstress oder bei Sonnenblumen unter Trockenstress bekannt (Gollan et al., 1992). Wilkinson (1999) sieht die pH-Änderung selber als das Signal von der Wurzel an den Spross. Felle et al. (2005) konnten jedoch zeigen, dass eine pH-Änderung an der Wurzel keinen Einfluß auf den apoplastischen pH des Blattes hatte, was mit der starken Pufferkapazität des Xylemsaftes und der Zellwände erklärt werden kann (Schurr und Schulze, 1996, De Boer und Volkov, 2003). Auch wenn die pH-Änderung selber nicht das Signal darstellt, kann sie Auswirkungen auf die Wurzel-Spross-Kommunikation haben (Wegner und Zimmermann, 2004). Durch die pH-Verschiebung kann es z.B. zu einer möglichen Veränderung von Enzymaktivitäten im Xylemsaft kommen. Bacon et al. (1998) gehen davon aus, dass die pH-Änderung über einen ABA-abhängigen Mechanismus in die Blätter weitergeleitet wird.

4.2 Proteinspotmuster des Xylemexsudates

Um weitere Informationen über die Zusammensetzung des Xylemexsudates und dessen Veränderungen unter Protonenstress zu bekommen, wurden die enthaltenen Proteine isoliert und zunächst einer eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Die Auftrennung der Proteinbanden in einem Bereich von 15-92 kDa stimmte mit dem von Grunewald et al. (2003) und Buhtz et al. (2005) angegebenen Bereich von 10-100 kDa überein. Die Gele zeigten Unterschiede in den Bandenintensitäten sowie neu auftretende

Banden, also klar erkennbare Veränderungen im Proteinmuster zwischen der Kontrolle und den Protonenstress-Behandlungen. Die Einzelbanden waren genau wie bei Rakwal et al. (1999) aufgrund der großen Menge und Dichte an Nebenbanden nur schwer zu unterscheiden. Um eine bessere Auflösung zu erzielen und mögliche Bandenüberlagerungen auszuschließen, musste ein anderes Auftrennungsverfahren angewandt werden. Krüger et al. (2002) schlagen eine mögliche Größenfraktionierung über Affinitätsäulen vor, Predel et al. (1999) führen eine Fraktionierung mittels HPLC durch. Um das gesamte Proteinmuster in einem Gel darzustellen, ist jedoch die zweidimensionale Gelelektrophorese mit einer Auflösung von bis zu mehreren tausend Proteinspots die beste Methode. Die zweidimensionale Gelelektrophorese des Xylemexsudates ermöglicht die Darstellung des Gesamtproteoms dieses Kompartimentes auf einem Gel, sowie die Untersuchung von Aspekten der Expression, Struktur und Interaktion der Xylemproteine (Rose et al., 2004). Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der durch den abiotischen Stress induzierten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den verschiedenen Protonenstress- und Salzstressbehandlungen. Dabei sollten induzierte oder reprimierte Proteine ermittelt werden, denn ihnen wird eine Beteiligung an der Signaltransduktion und / oder dem Resistenzmechanismus der durch den jeweiligen abiotischen Stress ausgelösten Induzierten Resistenz zugeschrieben.

Die Gele des unter Protonenstress gewonnenen Xylemexsudates wiesen 457 Proteinspots in einem Bereich von pH 4,5 bis 9 und einem Molekulargewicht von 10-100 kDa auf, was mit den Ergebnissen von Kehr et al. (2005) an *Brassica napus* übereinstimmt. Die Behandlungen pH 4,2 und pH 3,9 ergaben fast identische quantitative Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abb. 3.8). 35% der Proteinspots zeigten keine Veränderung im 2D-Gel und wurden damit durch den Protonenstress nicht in ihrer Intensität beeinflusst. Dagegen wurden 23% der Proteinspots herunterreguliert, also die Intensität dieser Proteine reprimiert, beziehungsweise 32% hochreguliert und damit durch den Protonenstress induziert. 5% der Spots waren in den Gelen der behandelten Proben weggefallen und d.h. ihre Proteinmenge wurde durch abiotischen Stress sehr stark reprimiert. Nach Ozturk et al. (2002) ist eine Herunterregulation nach abiotischem Stress für grundlegende biosynthetische Funktionen wie der Photosynthese, der Photorespiration und dem Aminosäure- oder Kohlenhydratmetabolismus zu erwarten. Die 5% der Proteinspots, die durch Protonenstress neu auftraten und damit sehr stark induziert worden waren, werden

der pflanzlichen Abwehr zugerechnet. Es ergibt sich damit eine quantitativ ähnliche, aber qualitativ veränderte Proteinsynthese bei verschiedenen Stressbehandlungen und die Zielsetzung, Proteine mit ansteigenden Mengen je Stresslevel zu identifizieren (Hurkman und Tanaka, 1988). Das 2D-Gel der Protonenstressbehandlung pH 3,6 zeigt auch quantitativ sehr große Veränderungen, denn es sind deutlich weniger Proteinspots hochreguliert und dagegen hat die Summe der im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Spots zugenommen. Eine weitere Absenkung des pH-Wertes ist aufgrund der bereits starken Wurzelschädigung bei pH 3,6 nicht sinnvoll. Oztur et al. (2002) verwenden statt der langsamen Absenkung des Stresses eine Schockbehandlung, um die Transkripte mit der stärksten Regulation zu ermitteln. In diesem Zusammenhang konnten Leone et al. (1994) jedoch zeigen, dass infolge von abruptem und allmählichem Stress verschiedene Proteine gebildet werden und damit keine Vergleichbarkeit der Spotmuster gegeben ist.

Parallel zu den protonengestressten Gerstenpflanzen wurden salzgestresste Pflanzen angezogen, um durch den Vergleich der 2D-Proteinspotmuster untereinander resistenzinduzierte Proteinspots oder Bestandteile einer unspezifischen Stressantwort identifizieren zu können. Für die Gele des unter Salzstress gewonnenen Xylemexsudates konnten 452 Proteinspots in einem Bereich von pH 4,5 bis 8,5 und den Molekulargewichten 12 - 80 kDa gezeigt werden. Zwischen den Behandlungen 15 mM NaCl und 20 mM NaCl gab es kaum qualitative oder quantitative Veränderungen des Spotmusters (vgl. Abb. 3.14). Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich jedoch auch bei diesen geringen Stressintensitäten bereits starke Veränderungen. Nur 25% der Proteinspots blieben im Vergleich von Kontrolle und den beiden Salzbehandlungen unverändert, während 23% der Spots herunterreguliert wurden und damit ihre Proteinmenge reduziert wurde. Im Gegensatz dazu zeigten 44% der Spots eine Induktion durch den Salzstress, 2% der Spots wurden neu durch Salzstress induziert. Oztur et al. (2002) konnten bei Salzstress in Gerste 38% der Transkripte als induziert nachweisen. 7% der Proteinspots waren durch die Salzbehandlung verschwunden. Um eine Entwicklung des Spotmusters zeigen zu können, müssten 2D-Gele des Xylemexsudates von Gerstenpflanzen angefertigt werden, die mit höheren Salzstressintensitäten behandelt wurden. Dies ist jedoch nicht möglich, weil bei der Gerstensorte Ingrid ab einer Behandlung von 25 mM NaCl nicht mehr genug Exsudat für eine 2D-Auftrennung gewonnen werden kann. Ein weiterer Ansatz wären stressabhängige Expressionsmuster in Zeitverläufen.

Die 2D-Gele der Gesamtproteinproben des Blattes unter Protonenstress besitzen den größten Bereich aufgetrennter Proteinspots mit der Spanne des Molekulargewichtes von 12-100 kDa und einem pH von 3 bis 9. Die Anzahl von 495 detektierten Proteinspots ist ähnlich der von Riccardi et al. (1998) für Maisblätter. Als wichtiger Marker in Gelen von Blattproteinen fungieren die große (50 kDa) und kleine (15 kDa) Untereinheit der Rubisco. Es konnte keine Regulation dieser beiden sehr distinkten Spots nachgewiesen werden, obwohl Oztur et al. (2002) für mit der Photosynthese verknüpfte Transkripte die stärkste Herunterregulation unter abiotischem Stress postulieren. Der mit 60% größte Anteil der Proteine des Blattes zeigt keine Veränderung durch den Protonenstress bei pH 4,2 und pH 3,9 während sich dieser Anteil der Proteine bei pH 3,6 auf 46% reduziert (s. Abb. 3.11). Die Zahl der reprimierten Proteine bewegt sich zwischen 16-23 %. Eine Entwicklung des Spotmusters unter Protonenstress im Blatt ist für die induzierten Proteine zu beobachten, denn deren Anzahl steigt von 14% bei pH 4,2 auf 20% bei pH 3,9 und schließlich 33% bei pH 3,6. Die Reduktion der Anzahl der unveränderten Proteinspots kombiniert mit der Zunahme der Anzahl an induzierten Spots zeigt ein gegensätzliches Bild zu dem 2D-Gelmuster des Xylemexsudates. Dani et al. (2005) weisen auf den Aspekt hin, dass Proteinmuster von Blattmaterial zwischen verschiedenen Spezies qualitativ nicht vergleichbar sind und damit die Aussagekraft relativiert werden muss. Man kann jedoch davon ausgehen, dass Proteinspots, die in mehreren unterschiedlichen Gelen einen identischen pI und das gleiche Molekulargewicht aufweisen, vermutlich dieselbe Identität besitzen (Costa et al., 1999).

Während für die 2D-Gele des Gesamtproteins des Blattes die starke Präsenz von Rubisco zur Überladung führte, bestand bei den Gelen des Xylemexsudates die Problematik in der Visualisierung der nur gering exprimierten Proteine, da das Detektionslimit der Coomassiefärbung bei 5-10 ng liegt. Auch hydrophobe oder basische Proteine mit einem großen Molekulargewicht erscheinen aufgrund von Problemen bei der IEF nur selten im 2D-Gel. Ein weiterer Aspekt war die Auswertung von Trainspots, also Proteinen, die im 2D-Gel als aneinandergereihte Proteine mit identischem Molekulargewicht aber leicht unterschiedlichen pI-Werten auftreten und ein identisches Protein mit verschiedenen post-translationalen Modifikationen darstellen (Turck et al., 2004). Nach Heazlewood und Millar (2003) muss eine definitive Identifikation dieser biologisch signifikanten Modifikationen mittels MALDI-TOF stattfinden, um Modifikationen als Ergebnis von

Carbamylation und / oder Alkylierungsreaktionen mit Harnstoff während der IEF auszuschließen. Isoformen von Proteinen resultieren aus post-translationalen Modifikationen und besitzen nach Alves et al. (2006) eine essentielle Rolle bei der Stressantwort.

4.3 Identifikation und Regulation von Proteinspots des Xylemexsudates

Stressbedingungen verändern quantitativ und qualitativ die Proteinzusammensetzung des Apoplasten (Dani et al., 2005), was sich in den Veränderungen des Proteinspotmusters im Xylemexsudat und im Gesamtprotein des Blattes durch Protonen- und Salzstress widerspiegelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 67 stark induzierte oder reprimierte Proteinspots ausgewählt, ihre Regulation mit Delta2D untersucht und zur Identifikation mittels MALDI-TOF gegeben (vgl. 2.2.9).

Untersucht man die Regulation der 67 identifizierten Proteinspots jeweils im Vergleich zur Kontrolle unter Protonenstress mit der unter Salzstress (s. Abb. 3.18), zeigen nur 9% der Spots keine Veränderung und damit keine Beeinflussung der Proteinmenge durch abiotischen Stress. Bei 30% der identifizierten Spots ist die Regulation nicht vergleichbar, weil die Proteinspots nur bei einer der beiden Stressbehandlungen auftraten und damit spezifisch für diese sind. Eine identische Veränderung bei beiden Stressvarianten konnte für 21% der Spots ermittelt werden, eine gegensätzliche Regulation für 40%. Verschiedene Proteinmuster deuten nach Alves et al. (2006) auf die Induktion verschiedener Regulationsmechanismen hin. Die zwischen Protonenstress und Salzstress sehr ähnlichen 2D-Spotmuster und die identische Regulation von 21% der Proteine lassen jedoch eine Überlappung einiger Glieder der Signalkette vermuten (Ueda et al., 2004). Es stellt sich damit die Frage, ob die übereinstimmend regulierten Proteine einer generellen Stressantwort auf abiotische Induktoren angehören oder der spezifischen Antwort auf Protonen- bzw. Salzstress und damit gemeinsame resistenzinduzierende Faktoren darstellen. Proteine, die nur durch Protonenstress induziert wurden, können vermutlich der spezifischen Resistenzinduktion zugeordnet werden. Insgesamt lässt die starke Antwortähnlichkeit zwischen Protonen- und Salzstress ein durch abiotischen Stress ausgelöstes Signalnetz, von dem je nach Stressor verschiedene Bestandteile benutzt werden, vermuten.

4.3.1 Proteine der pflanzlichen Abwehr

Die Identifikation der 67 ausgewählten Proteinspots des Xylemexsudates erfolgte über MALDI-TOF und einem anschließenden Datenbankvergleich und machte eine Einteilung in hypothetische Funktionseinheiten möglich (vgl. Abb. 3.15). Von den 67 identifizierten Proteinspots gehören 22% der pflanzlichen Abwehr an und können wiederum in Proteine der PR-Klasse und Proteine der NBS-LRR-Klasse unterteilt werden. Während Buhtz et al. (2004) allen Proteinen mit Abwehrfunktion im Xylemexsudat bei dikotylen Pflanzen eine apoplastische Signalsequenz zuordnen konnten, war dies in der vorliegenden und auf die monokotyle Gerste bezogenen Arbeit nicht möglich. Von der ersten Klasse der PR-Proteine konnte nur ein einzelner Spot gefunden werden, der nur bei den Gelen mit Protonenstress nicht aber bei Salzstress auftrat. Das identifizierte Protein wird unter 4.4.4 eingehend erläutert. Acht weitere Proteine sind der zweiten Klasse der PR-Proteine, den Glucanasen, zuzurechnen und liegen in Form verschiedener Trainspots vor. Auf sie wird unter 4.4.5 näher eingegangen. Alle PR-Proteine weisen die für den Apoplasten typische extrazelluläre Signalsequenz auf.

Die restlichen Resistenzproteine gehören zur NBS-LRR-Klasse und besitzen damit ein NBS-Motiv mit ATP-Bindungsbereich und Kinasendomänen, sowie ein LRR-Motiv für Protein-Protein-Interaktionen. Daneben zeigen alle eine NB-ARC-Domäne, ein aus Bakterien und Eukaryoten bekanntes Signalmotiv, das in Tieren an der Regulation des Zelltodes beteiligt ist und in Pflanzen eine Funktion in der Pathogenresistenz zugeordnet bekommen hat (CDD, pfam 00931). Das Putative Resistenzprotein (11) besitzt ein Signal für den Apoplasten und wird sowohl durch Protonen- als auch durch Salzstress hochreguliert. Es ist ebenfalls eine Regulation durch die abiotischen Faktoren Temperatur und Dunkelheit bekannt (Wang et al., 1999). Bei dem Resistenzprotein Yr10 (54 und 55) ist kein Signalpeptid bekannt. Eine Induktion tritt nur bei Protonenstress aber nicht unter Salzstress auf. Die gleiche Regulation besitzt der Proteinspot für das NBS-LRR-Typ Resistenzgen (62), das zudem eine 36 AS lange apoplastische Signalsequenz beinhaltet. Das 13 kDa kleine Resistenzprotein RPP 13 (64) besitzt keine bekannte Signalsequenz (Rose et al. 2004) und ist nach Bittner-Eddy und Beynon (2001) in *Arabidopsis thaliana* unabhängig vom SA-Signalweg. Auch in Gerste ist nach Hückelhoven et al. (1999) die

Induzierte Resistenz nicht mit SA verknüpft. Durch Protonenstress induziert aber bei Salzstress nicht vorhanden ist das Putative Resistenzprotein RPS2 (66). Es besitzt keine bekannte Signalsequenz, ist nach Day et al. (2005) in der Plasmamembran lokalisiert und besitzt eine Funktion bei der HR. Betrachtet man nur den hochregulierten Anteil der 67 identifizierten Xylemproteine (vgl. Abb. 3.16), so machen die Proteine mit einer Funktion in der Abwehr mit 36% den größten Anteil aus. Grunwald et al. (2003) bezeichnen das Auftreten der Resistenzproteine in nicht infizierten Pflanzen als permanente Verteidigungslinie gegen Pathogenangriffe im Apoplasten.

4.3.2 Proteine der Signaltransduktion

Zu den 12% der Signaltransduktion zugeordneten Proteinspots des Xylemexsudates gehört der Steroidogene Faktor 1 (6), der durch Protonenstress stark induziert wird und kein bekanntes apoplastisches Signalpeptid enthält. Der CDD zufolge (smart 00430) besitzt er eine Domäne für die Bindung eines Liganden, die ähnlich der von tierischen Hormonrezeptoren ist und könnte eine Funktion als Transkriptionsfaktor beinhalten. Das durch Protonenstress induzierte und als drei verschiedene Proteinspots auftretende P23 ähnliches Tumorprotein (7, 8, 65) wird unter 4.4.1 ausführlich diskutiert. Der Trainspot (21, 22, 50) konnte als Putatives 32.7 kDa Jasmonat-induziertes Protein identifiziert werden. Es enthält keine bekannte Signalsequenz und die Proteinmenge ist sowohl bei Protonenstress als auch bei Salzstress reprimiert. Die drei Proteinspots gehören zu einer Proteinfamilie mit Lectin-ähnlicher Domäne von denen eine Induktion durch Pathogeninfektion und Salzstress bekannt ist (CDD, pfam03018). Lectine sind kohlenhydratbindende Proteine mit Funktionen in der Zell-Zell- oder Wirt-Pathogen-Interaktion sowie der angeborenen Immunantwort (Kehr et al., 2005). Lee et al. (1996) konnten zeigen, dass die jasmonatabhängige Signalleitung in Gerste im Gegensatz zu Tomate und Kartoffel unabhängig von SA verläuft. Die Putative Rezeptor-Proteinkinase (58) besitzt ein 22 AS langes apoplastisches Signalpeptid, wird durch Protonenstress neu induziert und ist nach PSORT in der Plasmamembran lokalisiert. Nach der CDD gehört die katalytische Domäne zu denen der Tyrosinkinasen und vermittelt durch Phosphorylierung Antworten auf externe Stimuli.

4.3.3 Proteine des Zellwandmetabolismus

Dem Zellwandmetabolismus werden 15% der 67 aus dem Xylemexsudat identifizierten Proteine zugeordnet. Bereits Kwon et al. (2005) weisen darauf hin, dass von vielen der an der Zellwandregulation beteiligten Enzyme ein apoplastisches Vorkommen noch nicht bekannt aber sehr wahrscheinlich ist. Die Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (20) wird unter 4.4.2 behandelt. Der aus vier Proteinen bestehende Trainspot der Putativen Polygalacturonase (27-30) wird je nach Spot unterschiedlich bei Protonen- und Salzstress reguliert, alle vier Proteine besitzen jedoch ein 32 AS langes apoplastisches Signalpeptid. Mehrere Polygalacturonasen wurden ebenfalls von Kehr et al. (2005) im Xylemexsudat von *Brassica napus* als Trainspot, mit ähnlichem Molekulargewicht und pI-Werten wie für Gerste, nachgewiesen. Die Polygalacturonasen gehören zur Familie der Glycosylhydrolasen und besitzen eine Funktion im Zellwandmetabolismus (CDD, pfam 00295), die im Zusammenhang mit der Resistenzinduktion in der Beteiligung an der Freisetzung von Elizitoren aus dem Pathogen oder den pflanzlichen Zellwänden liegen könnte. In den Wurzeln von Reispflanzen konnte nach Pathogenkontakt eine Aktivitätssteigerung der Polygalacturonase gezeigt werden (Sekar et al., 2000).

Der bei Protonenstress nicht regulierte aber durch Salzstress induzierte Proteinspot von Profilin-1 (31) bindet Aktinmonomere, fördert deren Polymerisation bzw. Depolymerisation (Yarmola und Bubb, 2006) und könnte die Verknüpfung zwischen dem Cytoskelett und möglichen Signalkaskaden darstellen. Der Putative Actin-Depolymerisierungs-Faktor (ADF, 38) gehört ebenfalls zur Familie der Actin regulierenden Proteine und verändert dessen Turnover-Rate. Während keine Regulation für Protonenstress gezeigt werden konnte, findet durch Salzstress eine Herunterregulation statt. Nach Ali et al. (2006) ist ADF eines der induzierten Zielproteine bei Trockenstress in Reis. Zur Cupin-Superfamilie gehört das Germin-ähnliches Protein 1 (GLP, 40), das ein 22 AS langes Signalpeptid besitzt und als Speicherprotein bekannt ist. Kehr et al. (2005) konnten GLP im Xylemexsudat von *Brassica napus* nachweisen. Während das GLP 1 in der Gerstensorte Ingrid unter Protonenstress herunterreguliert ist, findet bei Tabak unter Salzstress eine Induktion um das Doppelte statt. Dani et al. (2005) konnten GLPs im Apoplasten als lose mit der Zellwandmatrix assoziierte Proteine nachweisen. Berna und

Bernier (1999) postulieren eine Funktion unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen durch die Stimulation von Abwehrmechanismen. Durch Überexpression und *gene-silencing* konnten Zimmermann et al. (2006) eine Rolle der GLP bei der Feinregulation der Resistenz gegen Gerstenmehltau zeigen. Eine starke Induktion durch Protonenstress zeigt Spot Nummer 59, die Acyl-coA-Reduktase (FAD), die eine Rolle bei der Lipid- und Wachssynthese besitzt. Wachse bilden eine hydrophobe Schutzschicht des Sprosses und sind damit Bestandteil der konstitutiven Anwehrbarriere (Costaglioli et al., 2005). Phospholipid-abstammende Moleküle gelten zudem neuerdings als second messenger in der pflanzlichen Abwehrsignalleitung und können in den Octadecanoid-Signalweg eingeschleust werden (Laxalt und Munnik, 2002).

4.3.4 Proteine des Zucker- und Stickstoffmetabolismus

Dem Zucker- und Stickstoffmetabolismus konnten 27% der Xylemproteine zugerechnet werden. Drei Proteinspots wurden als Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 16, 17, 23) identifiziert und liegen als Trainspot vor. Von allen drei Sequenzen ist kein Signalpeptid bekannt. Eine weitere Charakterisierung der GAPDH findet sich unter 4.4.3. Die Cytosolische 3-Phosphoglycerat-Kinase (36) besitzt ein 26 AS langes Signalpeptid und ist an der Glykolyse beteiligt. Die Intensität des Proteinspots wurde sowohl bei Protonen- als auch bei Salzstress hochreguliert. Ebenfalls eine Hochregulation konnten Parker et al. (2006) bei Reis innerhalb von 24 Stunden unter Salzstress zeigen. Keine Regulation unter Stress zeigte die Triosephosphat-Isomerase (37), die auch kein bekanntes Signalpeptid aufwies. Das glykolytische Enzym ist wichtig für eine effiziente Energieproduktion und ist als Dimer aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut, dessen addiertes Molekulargewicht mit dem im 2D-Gel ermittelten übereinstimmt. Durch Wasserstress konnte ein Expressionsanstieg der Isomerase bei Mais gezeigt werden (Riccardi et al., 1998). Die zwei Proteinspots der Isocitrat-Dehydrogenase (56, 61) wurden unter Protonenstress induziert und besaßen ein 18 AS langes apoplastisches Signalpeptid. Sie gilt als Schlüsselenzym, das den Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus miteinander verknüpft. Unter Salzstress konnte bei *Mesembryanthemum crystallinum* in der Wurzel ein Abfall der Aktivität und im Blatt ein Anstieg festgestellt werden. Das Enzym könnte an der Reduktion des Stresslevels der Pflanze durch die Versorgung des antioxidativen Systems beteiligt sein (Popova et al., 2002).

Dem Stickstoffmetabolismus ist die S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (1-5) zuzordnen, die als fünfteiliger Trainspot in den 2D-Gelen auftrat, kein bekanntes Signalpeptid enthielt und deren einzelne Isoformen durch Protonen- und Salzstress unterschiedlich reguliert wurden (vgl. Tab. 3.5). Das Enzym katalysiert die Hydrolyse zu Adenosin und Homocystein und moduliert die Aktivität verschiedener Methyltransferasen. In Reisblättern wurde das Enzym durch Kältestress hochreguliert (Cui et al., 2002). Keine Regulation durch einen der beiden Stressoren konnte der L-Aspartat-Oxidase (24) zugeordnet werden. Das Enzym besitzt ein 24 AS lange Signalpeptid, eine FAD-Bindungsdomäne und eine Funktion im Coenzymmetabolismus. Die Putative Nucleosid-Diphosphat-Kinase (25) ist ebenfalls unreguliert und besitzt kein bekanntes Signalpeptid. Sie katalysiert die nicht substratspezifische Umsetzung von Nucleosiddiphosphaten zu -triphosphaten und hat eventuell eine Rolle bei der Signaltransduktion inne (CDD, smart 00562). Den letzten Schritt im Argininkatabolismus synthetisiert die Hypothetische Succinylglutamat-Desuccinylase (26), die durch Protonenstress induziert wurde und ein 22 AS langes Signalpeptid aufweist. Drei Proteinspots als Trainspot konnten als Isoformen der Adenosinkinase (46-48) identifiziert werden. Obwohl kein Signalpeptid nachgewiesen wurde, soll die Kinase an der Regulation des extrazellulären Adenosinlevels beteiligt sein (CDD, pcd01168). Während für die Gerstensorte Ingrid eine Herunterregulation der Proteinmenge für alle drei Isoformen unter Protonen- und Salzstress gezeigt wurde, konnten Cooper et al. (2003) bei Reis unter Salzstress oder nach Pathogenkontakt eine Hochregulation zeigen.

Die unterschiedliche Reaktion der einzelnen identifizierten Proteinspots auf abiotischen Stress ist kennzeichnend für die kontroverse Diskussion in der Literatur. Oztur et al. (2002) z.B. fanden eine Herunterregulation des Aminosäure- und Kohlenhydratmetabolismus während abiotischen Stresses. Betrachtet man den herunterregulierten Anteil der 67 identifizierten Xylemproteine (vgl. Abb. 3.17), so sind mit 42% die Proteine mit einer Funktion im Zucker- und Stickstoffstoffwechsel am stärksten vertreten. Bei dem hochregulierten Proteinanteil dagegen sind nur 17% dieser hypothetischen Proteinkategorie zuzurechnen. Riccardi et al. (1998) gehen dagegen davon aus, dass eine koordinierte Induktion von Enzymen metabolischer und ATP-generierender Signalwege essentiell für die Aktivierung der energieproduzierenden Signalwege ist, um die Aufrechterhaltung der Homeostase in gestressten Zellen zu gewährleisten.

Die im Xylemsaft der Gerstensorte Ingrid unter Kontrolle und abiotischem Stress identifizierte Proteinspots gehören den unterschiedlichsten Proteingruppen an. Neben den verschiedenen, mit der pflanzlichen Abwehr verknüpften, Proteine gehören Komponenten der Signalleitung dazu, sowie Proteine, die an Zellwandmodifikationen beteiligt sind und Bestandteile von Kohlenhydrat- und Stickstoffstoffwechsel darstellen. Sie zeigen insgesamt, dass das Xylem die von Buhtz et al. (2004) postulierte wichtige Rolle bei der Stress- und Pathogenresistenz zu besitzen scheint. Weitere Untersuchungen in biochemischer und immuno-histologischer Hinsicht könnten zur Klärung möglicher physiologischer Funktionen der einzelnen Proteine im Xylemsaft beitragen (Kehr et al., 2005). Eine nähere Untersuchung von Proteinen war aufgrund des methodischen und zeitlichen Rahmens nur für einzelne der identifizierten Proteine möglich. Eine Auswahl der Proteine fand hinsichtlich des Bezuges zur Induzierten Resistenz und der technischen Durchführbarkeit statt.

4.4 Charakterisierung von durch Protonenstress differentiell regulierten Genen und Proteinen

4.4.1 Translational kontrolliertes Tumorprotein

Das translational kontrollierte Tumorprotein (TCTP) wurde ursprünglich in Tumorzellen von Mäusen als wachstumsverknüpftes Protein beschrieben, welches auf Translationsebene reguliert wird (Yenofsky et al., 1983). Das in menschlichem Gewebe gefundene Homolog erhielt die Bezeichnung p23 (Chitpatima et al., 1988) und wurde auch in normalen Gewebeproben nachgewiesen (Sanchez, 1997). Die Übereinstimmung der in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen der TCTP-Isoformen zu 97% mit der aus *Hordeum vulgare* schon bekannten und mit 55% zu *Homo sapiens*, ist ein Indiz für die starke Konservierung auf Nukleinsäure- und Proteinebene. Die weite Verbreitung des Proteins in allen eukaryotischen Organismen, die starke Konservierung und eine hohe Expression lassen auf essentielle Funktionen des Proteins schließen (Ermolayev et al., 2003). Über die physiologische Rolle von TCTP ist trotz aller Forschung bisher nur sehr wenig bekannt (Acruri et al., 2004). Da TCTP keine Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Proteinklassen aufweist, wurde es einer eigenen Proteinfamilie zugeordnet (Bommer und Thiele, 2004). Lediglich die Kerndomäne weist eine signifikante Ähnlichkeit zu zwei kleinen Chaperonen

auf (Thaw et al., 2001). Das Calciumbindungsmotiv der AS 81-112 weist keine Homologie zu bekannten Motiven auf, weshalb TCTP eine neue Klasse von Ca^{2+} -bindenden Proteinen darstellt (Kim et al., 2000). Die Region der Mikrotubulibindung hat nach Gachet et al. (1999) eventuell eine Mikrotubuli-stabilisierende Funktion bei der Zelldifferenzierung. Keine Funktion konnte bisher den beiden einzigartigen TCTP-Strukturmotiven zugeordnet werden. Die *coiled-coil* Strukturen der AS 92-124 könnten auf eine mögliche Selbstinteraktion von TCTP hinweisen und damit auf die Bildung von Dimeren oder Multimerformationen (Gnanosekar et al., 2002). Eine Untersuchung der Transkriptmengenveränderung durch Protonenstress zeigte eine Induktion in der Wurzel, die sich mit der von Ermolayev et al. (2003) beschriebenen erhöhten Genexpression in Sojabohnenwurzeln unter Aluminiumstress deckt. Im Blatt konnte in dieser Arbeit jedoch eine Reduktion der Transkriptmenge nachgewiesen werden, was ein gegensätzliches Expressionsmuster in beiden Organen verdeutlicht. Diese durch Protonenstress induzierten Regulationsveränderungen stehen im Gegensatz zu der von Coker und Davies (2003) beschriebenen Verwendung von TCTP als *Housekeeping*-Gen für Tomate.

Die Lokalisation von TCTP ergab den Nachweis für ein Vorkommen im Cytoplasma. Eine geringe Menge konnte im Zellkern gefunden werden (Li F. et al., 2001). Eine extrazelluläre Lokalisation und damit eine Sekretion von TCTP konnte bei Humanparasiten, Epithelzellen (Acruri et al., 2004) und in dieser Arbeit auch durch das Vorkommen im Xylemexsudat der Gerstensorte Ingrid gezeigt werden. Der Sekretionsmechanismus ist unbekannt, denn wie bei den in Gerste gefundenen Isoformen konnte für TCTP bisher keine Signalsequenz und kein Precursor nachgewiesen werden (Bommer und Thiele, 2004). Es wird ein Sekretionsmechanismus postuliert, der dem von Interleukin I oder Thioredoxin ähnelt (Gnanosekar et al., 2002). Auf den mit Xylemexsudat durchgeführten 2D-Gelen wurden drei Proteinspots für TCTP nachgewiesen und damit das Vorkommen von Isoformen auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene bestätigt. Es konnten mehrere theoretische Stellen für potentielle sekundäre Modifikationen der gefundenen TCTP-Sequenzen ermittelt werden, unter anderem fünf Phosphorylierungsstellen. Dies stimmt mit den Angaben von Ermolayev et al. (2003) für TCTP in der Wurzel von Sojabohnen unter Aluminiumstress überein. Die Molekulargewichte der identifizierten Proteine lagen mit 14,5 und 17 kDa niedriger als beim Menschen mit 22 - 23 kDa (Acruri et al., 2004), aber in einem identischen Bereich zu

Pharbitis mit 18,7 kDa (Pay et al., 1992). Die pI-Werte liegen mit 5,1 und 4,5 in dem für 2D-Proteinspots von TCTP identifiziertem Bereich von 4,2 - 5,0.

Die schnelle Anpassung der Proteinmengen von TCTP an die Veränderungen lassen vermuten, dass Synthese und Abbau stark reguliert werden. Eine Regulation von TCTP findet auf der Translationsebene und bei Pflanzen im Gegensatz zu Mensch und Maus auch auf der Transkriptionsebene statt (Sage-Ono et al., 1998). Sie wird durch eine große Bandbreite intra- und extrazellulärer Signale beeinflusst (Bommer und Thiele, 2004). Nach Xu et al. (1999) besitzt die Konzentration der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen einen regulatorischen Effekt auf die Gentranskription und die Proteinsynthese von TCTP. Weitere Regulationsmöglichkeiten sind eine Phosphorylierung durch Proteinkinasen (Yarm et al., 2002), die Selbstinteraktion von TCTP, sowie die Interaktion mit anderen Proteinen (Yoon et al., 2000).

Bei Protonen- und Salzstress fand für TCTP der Gerstensorte Ingrid eine Induktion statt. Beim Regenwurm unter Schwermetallstress zeigte sich eine starke Induktion (Stürzenbaum et al., 1998). Xu und Bellamy (1999) gehen davon aus, dass TCTP nicht Bestandteil einer allgemeinen Stressantwort, sondern speziell mit der sich verändernden Ca^{2+} -Homeostase verknüpft ist. Als Funktionen für TCTP wird eine Beteiligung am Zellwachstum und dem Schutz der Zellen vor Stressbedingungen vermutet (Acruiri et al., 2004, Bommer und Thiele, 2004). Im Menschen besitzt TCTP die nachgewiesene Funktion als *Histamin-releasing Factor* (MacDonald et al., 1995). Ein weiterer wichtiger Aspekt von TCTP liegt in der antiapoptotischen Funktion (Li et al., 2001, Bangrak et al., 2004), wobei nach Kim et al. (2000) Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Regulationsfunktion zukommt. In diesem Zusammenhang könnte TCTP beim Signalmechanismus der Induzierten Resistenz neben dem Schutz der Zellen vor Stress eine Funktion in der Unterdrückung der HR und dem damit verbundenen Tod von Zellen besitzen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Wiese et al. (2004) überein, die bei der Induzierten Resistenz der Gerstensorte Ingrid nur eine Bildung von Papillen nicht jedoch eine HR nachweisen konnten.

4.4.2 CAD

Die Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD, EC 1.1.1.195) gehört zur Familie der *medium-chain dehydrogenases/reductases* innerhalb der Alkoholdehydrogenasen. Sie

katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Cinnamylaldehyden zu Alkoholen und ist im Rahmen des Phenylpropanoid-Metabolismus an der Lignin- und Phytoalexinbiosynthese beteiligt (Caldo et al., 2004). Auf mRNA-Ebene konnten für das klonierte Sequenzstück der Gerstensorte Ingrid keine Isoformen in Kontrolle oder Behandlungen nachgewiesen werden. Dafür fand eine eindeutige Stammbaumzuordnung zu den monokotylen CAD statt, da monokotyle und dikotyle CAD-Sequenzen nur eine Übereinstimmung zwischen 72-77% zeigen (Selman-Housein et al., 1999). Zudem enthielt der klonierte Bereich die beiden typischen katalytischen Zn-Domänen (vgl. Abb. 3.22) und drei der vier für die Substratspezifität der CAD verantwortlichen Alkoholreste. Die Bindungsregion für den Cofaktor NADPH konnte nicht kloniert werden. Die Transkriptmenge von CAD zeigt eine Induktion durch Protonenstress, die in der Wurzel schon bei einer geringeren Stressintensität einsetzt, im Blatt, dem Kontaktorgan mit dem Pathogen, aber fast doppelt so stark ist. Eine Induktion der CAD bei Luzerne konnte durch Verwundung und pilzliche Elizitoren (Brill et al., 1999) oder Kältestress (Plazek und Zur, 2003) nachgewiesen werden. Tobias und Chow (2005) konnten einen engen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsmuster der CAD und dem Lignifikationsgrad des untersuchten Gewebes zeigen.

Auf den 2D-Gelen konnte nur ein Proteinspot als CAD identifiziert und damit genau wie auf der mRNA-Ebene keine Isoformen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten Satoh et al. (1997) für *Zinnia* vier Isoformen und Hawkins et al. (1994) in *Eucalyptus* zwei Isoformen im Xylemgewebe nachweisen. Der CAD-Proteinspot wies einen pI von 6,1 und ein Molekulargewicht von 43 kDa auf, was mit den Angaben für Zuckerrohr mit einem pI von 6,06 und einem Molekulargewicht von 39 kDa übereinstimmt (Selman-Housein et al., 1999). Hawkins und Boudet (1994) konnten an *Eukalyptus* jedoch zeigen, dass die CAD als Heterodimer mit 84 kDa vorliegt, welches aus zwei heterogenen Untereinheiten mit Molekulargewichten zwischen 39-44 kDa aufgebaut ist. Der identifizierte Spot stellt somit eine Untereinheit der CAD dar, das Heterodimer selber konnte in den 2D-Gelen nicht nachgewiesen werden. Eine Regulation der Aktivität der CAD auf Proteinebene findet durch die Interaktion der Untereinheiten statt, auf der Expressionsebene durch die pflanzliche Entwicklung und mögliche Umwelteinflüsse (Tobias und Chow, 2005). Genau wie auf der Ebene der mRNA konnte an den Proteinspots eine starke Induktion durch Protonenstress nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Salzstress eine

Halbierung der Spotintensität. Das Fehlen eines extrazellulären Signalpeptides erklären Selman-Housein et al. (1999) mit vermuteten Zielsequenzen im Protein selber.

Die CAD ist das Schlüsselenzym für die Produktion von Lignin-Vorstufen (Thordal-Christensen et al., 1999), Mitchell et al. (1994) bezeichnen die CAD als *highly specific marker for lignification*. Lignin zeigt in gesunden und geschädigten Zellen eine unterschiedliche monomere Zusammensetzung (Brill et al., 1999) und ist in Form von Oberflächen- und Abwehrligninen ein wichtiger Faktor für die konstitutiven und induzierten Resistenzmechanismen (Hawkins und Boudet, 1994). Es ist unklar, welche Reaktionen die Ligninmenge und deren Zusammensetzung kontrollieren, denn von den am Phenylpropanid-Metabolismus beteiligten Genen ist eine koordinierte Expression bekannt (Larsen, 2004). Eine Hemmung der CAD durch den Inhibitor OH-PAS ([[(2-hydroxyphenyl)amino)sulphinyl]acetic acid 1,1-dimethyl ester) als Substratanalog führte bei Gerste und Hafer zu einem Anstieg der Penetrationsrate auf das Doppelte und damit zu einer Reduktion der Resistenz. Carver et al. (1994 und 1996) erklärten dies damit, dass es zu einer Reduktion von phenolischen Komponenten kommt, die sich an der Kontaktstelle von Pflanze und Pathogen anlagern, und somit eine Penetration begünstigt wird. Eine Reduktion der Aktivität der CAD führt neben einer Modifikation der Ligninzusammensetzung (Halpin et al. 1998) auch zu einer Reduktion des Ligningehaltes (Sibout et al., 2003).

4.4.3 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12) ist an glycolytischen und gluconeogenetischen Signalwegen beteiligt und katalysiert die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat. Höhere Pflanzen besitzen drei verschiedene Arten der GAPDH, zwei Isoenzyme im Chloroplasten und ein cytosolisches Enzym (GapC), das als Homotetramer mit Signalpeptid auftritt (Brinkmann et al., 1989). Die Zuordnung der in der Gerstensorte Ingrid gefundenen Sequenz zu den cytosolischen GAPDHs ist aufgrund einer Clusterbildung im phylogenetischen Stammbaum (vgl. Abb. 3.26), sowie einer Sequenzidentität von 83-91% mit Gap C von Mais oder Tabak möglich. Die GAPDH zeigt eine starke Konservierung hinsichtlich Sequenz und Struktur und besitzt zwei funktionelle Domänen. Nur die 186 AS lange katalytische Domäne konnte in dieser Arbeit durch Vergleich der mit MALDI-TOF

gewonnenen Bruchstücke nachgewiesen werden, nicht jedoch die NAD-Bindungsdomäne. Während für Mais drei funktionelle Gene für Gap C bekannt sind (Martinez et al., 1989), konnte in *Arabidopsis* und Gerste nur ein Gen nachgewiesen werden (Shih et al., 1991, Chojecki, 1986). Viele glycolytische Enzyme zeigen eine Regulation der Transkriptmenge unter Umweltstressbedingungen (Laxalt et al., 1996). Eine gesteigerte Genexpression der GapC konnte durch Salzstress und Hitze bei Mais (Petersen et al. 2003), Trockenstress bei Reis (Arumugam et al., 2002) oder Pathogeninfektion bei Kartoffeln gezeigt werden (Laxalt et al., 1996). Für die Gerstensorte Ingrid konnte mit der Real-Time-PCR keine Veränderung der Transkriptmenge durch Protonenstress sowohl in der Wurzel als auch im Blattmaterial festgestellt werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Fujita et al. (2004) überein, die ein konstantes Expressionsmuster der GAPDH in pathogeninfizierter Gerste nachgewiesen haben. Die unveränderte Transkriptmenge in Gerste unter Protonenstress konnte auch für Salzstress gezeigt werden (Ueda et al., 2004). Dies ermöglicht es die GapC als *Housekeeping*-Gen für die Normalisierung der Ergebnisse der Real-Time-PCR zu verwenden, wie dies auch von Coker und Davies (2003) vorgeschlagen wurde. Burton et al. (2004) machen jedoch die Einschränkung GAPDH als Housekeeping-Gen nur für das Blatt zu verwenden und Yang et al. (1993) weisen auf die mögliche Fehlerquelle der Regulation durch den metabolischen Status hin.

Der fehlenden Regulation auf der Transkriptionsebene stehen stark durch Protonenstress regulierte Proteinspots in den 2D-Gelen gegenüber. Der aus drei Spots bestehende Trainspot weist mit einem Molekulargewicht von 38 kDa eine Übereinstimmung zu den in Tomate und Spinat gefundenen Sequenzen für die GapC-Untereinheiten mit 39 kDa auf (Herbik et al., 1996). Auch der pI mit 6.8 - 7.0 für die drei verschiedenen Proteinspots ist identisch zu dem für Reis ermittelten pI von 6,83 (Arumugam et al., 2002). Nach Singh und Green (1993) zeigt die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der GapC, dass das Enzym neben der mit der Glykolyse verknüpften noch weitere Funktionen besitzen muss. Die im Xylemexsudat der Gerstensorte Ingrid nachgewiesene GapC zeigte kein bekanntes Signalpeptid für eine Sekretion in den Apoplasten. Nach Kwon et al. (2005) sind jedoch einige glykolytische Enzyme als Zellwandkomponenten oder als in den Apoplasten sekretiert identifiziert worden, hierzu zählt auch die GAPDH. Eine mögliche Funktion der GAPDH im Apoplasten sehen Petersen et al. (2003) in einem Translokator, der die

glykolytischen Signalwege verknüpft und so das metabolische Netzwerk in die Lage versetzt, flexibel auf den Energieverbrauch von Zellen zu reagieren.

4.4.4 PR1-1

Von der Gruppe der *pathogenesis-related* (PR) Proteine konnten nur in protonengestresstem Wurzelmaterial, nicht jedoch in den Kontrollen oder dem behandelten Blattmaterial, verschiedene mRNA-Isoformen eines PR1-Proteins in Volllänge kloniert werden. Die Klasse der PR1-Proteine wurde von Davidson et al. (1987) identifiziert und die bisher bekannten Isoformen zeigen eine Sequenzidentität von 90-98% untereinander. Die stark konservierte dreidimensionale Struktur des sehr stabilen α - β - α -Sandwichs wird für alle PR1-Proteine angenommen (Fernandez et al., 1997) und ist auch bei allen in dieser Arbeit klonierten Isoformen (s. Abb. 3.30) vorhanden. Zudem besitzen alle Isoformen eine 24 AS lange N-terminale Signalsequenz, die auf einen Export in den extrazellulären Raum hinweist (Bryngelsson et al., 1994), und in Gerste von Muradov et al. (1993) beschrieben wurde. Die 9 AS lange C-terminale Verlängerung könnte nach Molina et al. (1999) eine Vakuolentransportsequenz darstellen. Die PR1-Proteine bilden damit eine spezielle Familie im Pflanzenreich und zeigen gemeinsame Struktur motive mit Proteinen aus Vertebraten, Invertebraten und dem Menschen. Dies lässt auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung und essentielle Funktionen der PR1-Proteinfamilie schließen (Van Loon und van Strien, 1999).

Am besten untersucht wurden die PR1-Proteine in den dikotylen Pflanzen *Arabidopsis* und Tabak, in denen ihr Auftreten mit der SAR verknüpft ist und sie daher als SAR-Marker verwendet werden (Hunt et al., 1996, Molina et al., 1999). Nach Pathogenbefall zeigte sich bei beiden Pflanzen eine starke Akkumulation von PR1 im Apoplasten, wobei die Isoformen PR1a, PR1b und PR1c auftraten (Uknes et al., 1992, Sticher et al., 1997). Auch im Xylemexsudat von Tomate konnten PR1a und PR1b von Rep und Dekker (2002) nachgewiesen werden. Eine Überexpression von PR1a in Tabak führte laut Feys und Parker (2000) zu einer Steigerung der Resistenz. In monokotylen Pflanzen können Homologe zu den dikotylen PR1-Proteinen identifiziert werden. Für Weizen sind die Isoformen PR1.1 und PR1.2 bekannt, die durch Mehltau nicht aber durch SA induziert wurden (Molina et al., 1999). Bei Gerste ist dagegen eine Induktion von Bpr1-1 durch Mehltau, SA und deren Analoga sowie durch Wasserstoffperoxid bekannt (Muradov et al.,

1993, Kogel et al., 1994, Hückelhoven und Kogel, 2003). Für Reis wurde eine Induktion der PR1-Proteine durch JA und osmotischen Stress gezeigt (Rakwal et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine starke Induktion von HvPR1.1 durch Protonenstress nachgewiesen werden. Die Veränderungen der Transkriptmenge ergaben eine Steigerung um 220% bei pH 3,9 und sogar um 350% bei pH 3,6.

Auf der Proteinebene sind anhand der Spotveränderungen in den 2D-Gelen des Xylemexsudates vergleichbare Ergebnisse aufgetreten. In den Gelen der Kontrolle konnte kein Proteinspot für HvPR1.1 nachgewiesen werden, was mit Stevens et al. (1996) übereinstimmt, der keine Transkripte für Bpr1-1 in ungestressten Pflanzen zeigen konnte. Grunwald et al. (2003) weisen darauf hin, dass PR-Proteine zwar konstitutiv im Apoplasten vorhanden sind, aufgrund der geringen Konzentrationen jedoch Probleme mit der Nachweisgrenze auftraten. Dies traf auch für die Spotintensität von HvPr1.1 in den 2D-Gelen zu. Der Proteinspot von HvPR1.1 trat erst in den Gelen ab einer Protonenstressbehandlung von pH 3,9 auf und seine Intensität steigerte sich noch bei den Gelen der Behandlung pH 3,6, was mit den Ergebnissen auf der Transkriptionsebene übereinstimmt und damit für eine Regulation von PR1 auf Transkriptionsebene spricht (Velasco et al., 1994). Der Proteinspot wies einen pI von 8,7 und ein Molekulargewicht von 10,5 kDa auf. Dies stimmte mit den Werten für andere bekannte PR1-Proteine in Weizen, Lupine oder Gerste überein (Molina et al., 1999, Alves et al., 2006, Bryngelsson et al., 1994). Unter mildem Salzstress konnte der Proteinspot für HvPr1.1 weder in der Kontrolle noch in den Behandlungen nachgewiesen werden.

Nach Grundwald et al. (2003) bilden PR-Proteine eine Verteidigungslinie gegen Pathogene und extrazelluläre Isoformen, wie HvPR1.1, wären damit speziell für die Abwehr im Apoplasten zuständig. Pflanzliche PR1-Proteine besitzen verwandte Proteine in Hefen, Insekten oder Vertebraten, die dort als Allergene wirken. Vergleicht man die Domänen mit vermuteter extrazellulärer Abwehrfunktion des PR-1b Proteins von Tomate mit HvPR1.1 und GliPR des Menschen, so ergibt sich eine mögliche Verknüpfung zwischen der pflanzlichen Abwehr und dem menschlichen Immunsystem (Van Loon und van Strien, 1999). Für das in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene und als Protein nachgewiesene HvPR1.1 wird eine Signalfunktion in der Kommunikation zwischen Wurzel und Blatt im Rahmen der Resistenzinduktion vermutet. Die Gründe, die für eine mögliche Signalfunktion sprechen, liegen darin, dass die mRNA nur in der Wurzel und nicht im Blattmaterial

nachgewiesen wurde. Das Protein besitzt eine extrazelluläre Signalsequenz und konnte als im Xylem transportiert gezeigt werden. Zudem zeigte sich eine starke Induktion nur durch starken Protonenstress von pH 3,9 und nicht durch milden Salzstress sowohl auf der Transkriptions- wie auch auf der Translationsebene. Eine Heterologe Proteinexpression wurde durchgeführt, die anschließende Proteinaufreinigung für die Durchführung von Aufnahme-Experimenten zur Klärung der Signalfunktion (Thordal-Christensen et al., 1997) war jedoch nicht erfolgreich. Somit ergeben sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit zwar Hinweise auf die Regulation von PR1.1 und sein extrazelluläre Vorkommen, eine genaue Funktion bei der Induzierten Resistenz kann dem Protein jedoch nicht zugeordnet werden.

4.4.5 Glucanase

Die in der Gerstensorte Ingrid gefundene Sequenz zeigte auf Nukleinsäureebene eine 98% Übereinstimmung mit der für *Hordeum vulgare* bekannten Sequenz der β -1,3-Glucanase und kann damit der zweiten Klasse der PR-Proteine zugeordnet werden. Es konnten keine Isoformen auf mRNA-Ebene in Wurzel- oder Blattmaterial von der Kontrolle oder den Behandlungen gefunden werden. Glucanasen (EC 3.2.1.39) katalysieren die hydrolytische Spaltung von Glucosidverknüpfungen zu Glucanen. Sie werden in drei Klassen eingeteilt, wobei Klasse I basisch vakuoläre, Klasse II saure extrazelluläre und Klasse III pathogeninduzierte Isoformen beinhaltet (Cheong et al., 2000). Aufgrund der Clusterbildung im phylogenetischen Stammbaum (vgl Abb. 3.28) konnte die in Gerste gefundene Glucanase der Klasse II zugeordnet und noch exakter als β -1,2-Glucanase 2a bezeichnet werden (Stevens et al., 1996). Für diese Familie ist bekannt, dass die Expression und Sekretion nach Stress oder Pathogenangriffen induziert ist (Simmons, 1994). Eine Induktion der Transkription ist zudem durch osmotischen Stress, Elizitorbehandlung oder Kälte bekannt (Leubner-Metzger und Meins, 1999, Hong und Hwang, 2002). Auch für Protonen- und Salzstress ist damit auf mRNA-Ebene mit einer Induktion der Transkriptmenge zu rechnen, was aufgrund unmöglich zu synthetisierender Primer mittels der Real-Time-PCR nicht gezeigt werden konnte.

Das Vorkommen der β -1,3-Glucanase im Xylemsaft der Gerstensorte Ingrid wird dadurch untermauert, dass Glucanasen im Xylemsaft von Tomate (Rep und Dekker, 2002) oder in der Apoplastenflüssigkeit von Weizen und Mais nachgewiesen werden konnten (Kombrink

et al., 1988, Anaud et al., 2004). Eine Sekretion der Glucanasen in den extrazellulären Raum und ihr Vorkommen auf der Oberfläche von Zellwänden oder in Papillen wird durch ein Signalpeptid bestätigt (Mauch et al., 1992, Simmons, 1994, Hu und Rijkenberg, 1998). Das hydrophobe und N-terminal gelegene Signalpeptid kann eine Länge von 24-32 AS aufweisen und besitzt einen hydrophoben Kern, der als Membrantranslokationssignal für den Eintritt ins sekretorische System fungiert (Malehorn et al., 1993). Für die in den 2D-Gelen identifizierten Glucanasen konnte ein theoretisches Signalpeptid von 26 AS ermittelt werden. Für Glucanasen in Gerste sind Signalpeptide mit 28 AS oder für die Glucanasenfamilie 2a mit 21 AS bekannt (Simmons, 1994, Troedsson et al., 2005).

Den fehlenden Isoformen auf der mRNA-Ebene stehen zwei Trainspots mit drei bzw. vier Proteinspots, die als β -1,3-Glucanasen identifiziert werden konnten, auf der Proteinebene gegenüber. Während der eine Trainspot mit einem Molekulargewicht von 22 kDa und einem pI von 4,7-4,9 nur mit den Angaben von Meins et al. (1992) übereinstimmt, gibt es für den zweiten Trainspot mit einem pI von 5,5-6,0 und einem Molekulargewicht von 35 kDa identische Angaben für Gerste (Malehorn et al., 1993), Weizen (Li W.L. et al., 2001) und Lupine (Alves et al., 2006). Differenzen der Molekulargewichte sowie Abweichungen der pI-Werte lassen sich mit multiplen Isoformen oder posttranslationalen Modifikationen der β -1,3-Glucanase erklären. Neben der zellulären Lokalisation ergeben sich auch Unterschiede zwischen den Isoformen im Hinblick auf das Regulationsmuster (Leubner-Metzger und Meins, 1999). Bei Protonen- und Salzstress zeigt sich, dass für den ersten Trainspot eine Hochregulation für alle drei Proteinspots in unterschiedlicher Intensität stattfindet, während beim zweiten Trainspot jeder Spot eine differenzierte Regulation unter der jeweiligen Behandlung zeigt.

In ungestressten und nicht pathogenbefallenen Pflanzen besitzen die Glucanasen eine Rolle als Entwicklungssignale, bei physiologischen Prozessen und bei der strukturellen Zellwandorganisation (Malehorn, 1993, Kwon et al., 2005). Als Bestandteil des Abwehrsystems von Pflanzen können sie den Abbau pilzlicher Zellwände katalysieren und damit deren Abbauprodukte als Elizitoren freisetzen, welche die Abwehrantwort der Pflanze aktivieren (Hu und Rijkenberg, 1998). Takeuchi et al. (1990) bezeichnen die β -1,3-Glucanasen daher als „*elicitor-releasing-factors*“. Eine Beteiligung der β -1,3-Glucanasen an weiterführenden Signalwegen ist nicht wahrscheinlich, weil andere Proteine sehr viel schneller auf abiotischen und biotischen Stress reagieren (Kombrink und Somssich, 1997).

Nach Inokulation von Tomatenpflanzen konnten Joosten und de Wit (1989) eine starke Akkumulation von PR-Proteinen im Apoplasten nachweisen, wobei die Glucanasen und Chitinasen die dominierenden Proteinklassen darstellten. Dies ist übereinstimmend mit dem Ergebnis der 2D-Gele des Xylemexsudates, auf denen die Proteinspots der Glucanasen in größerer Anzahl auftraten. Das apoplastische Vorkommen der PR-Proteine hat nach Joosten und de Wit (1989) eine Abwehrfunktion nicht nur gegen extrazelluläre, sondern auch gegen intrazelluläre Pathogene. Die Expressionsmenge der Glucanase ist positiv mit dem Level der Pathogenresistenz korreliert (Simmons, 1994). Sie ist früher und stärker in resistenten als in anfälligen Pflanzen induziert (Zhen und Li, 2004). Durch eine Überexpression der β -1,3-Glucanase konnte eine Steigerung der Resistenz für Tabak nachgewiesen werden (Lau et al., 2000).

4.5 Abschließende Betrachtung

Bisher gibt es nur wenige Informationen über die Interaktion von Wurzel und Spross im Rahmen einer Induzierten Resistenz, denn die Kompartimente wurden nur einzeln untersucht, nicht aber ihr Zusammenspiel. Eine Regulation der physiologischen Prozesse im Spross durch wurzelbürtige Signale ist bekannt (Oda et al., 2003) und konnte anhand der Auslösung einer Induzierten Resistenz im Spross durch nur an der Wurzel wirkende abiotische Faktoren, wie Protonen- oder Salzstress, bei der Gerstensorte Ingrid in dieser Arbeit gezeigt werden. Das Xylem gilt als vermutlicher Signalweg zwischen Wurzel und Spross, so dass die Untersuchung von Xylemexsudat ein wichtiger Aspekt für eine Klärung des Mechanismus der Induzierten Resistenz ist und der Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war.

Bei der Protonenstressbehandlung der Wurzel können Protonen direkt als Botenstoff fungieren oder als *second messenger* durch eine Ansäuerung des Cytoplasmas die Signaltransduktion in den Wurzelzellen vermitteln. Um mögliche im Xylem weitergeleitete Signale der Wurzel–Spross-Kommunikation bei der durch Protonenstress Induzierten Resistenz zu untersuchen, wurden vergleichende Proteomansätze des Xylemexsudates von Gerste in Form von 2D-Gelen angefertigt. Quantitative und qualitative Veränderungen des Proteoms konnten nachgewiesen und Proteine der unterschiedlichsten Funktionsbereiche als differentiell reguliert gezeigt werden. Es ist wichtig zu klären, welche Veränderungen des Proteinspotmusters einer generellen Antwort auf abiotischen Stress zuzurechnen sind,

welche speziell bei Protonenstress auftreten und welche die Resistenzinduktion beeinflussen. Nach Ermolayev et al. (2003) gehört die Mehrheit der unter Stressbedingungen hochregulierten Gene zur generellen Stressantwort. Eine Identifikation aller Proteinspots und der Abgleich mit den Proteinmustern anderer Stressarten könnte hier zur Klärung beitragen und damit die Anzahl der für eine spezifische Signaltransduktion in Frage kommenden Proteine reduzieren. Das starke Auftreten von Trainspots zeigt die wichtige Modulationsfunktion von Isoformen und posttranslationalen Modifikationen (Alves et al., 2006), deren weitere Analyse auf Transkriptionsebene unerlässlich ist. Zudem wäre eine Untersuchung von Peptiden und kleinen mRNAs notwendig, um ein vollständiges Bild möglicher Signalkandidaten des Xylemexsudates zu erhalten.

Insgesamt liegen auch von den differentiell regulierten Genen und Proteinen noch nicht alle Informationen vor, um ein komplettes Bild über deren mögliche Funktion bei der durch Protonenstress induzierten Resistenz zu zeichnen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Informationen zeigen jedoch, dass es sich vermutlich nicht nur um ein einzelnes Signal handelt, sondern dass verschiedene Signalebenen an der Kommunikation zwischen Wurzel und Spross während der Resistenzinduktion beteiligt sind. Eine Ebene stellen die Regulatoren von Stoffwechselprozessen dar, die eine Anpassung an den Stresszustand ermöglichen. Zu ihnen gehört unter anderem der mögliche Translokator Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Ein weiterer großer Bereich beinhaltet die Induktoren des Resistenzmechanismus wie für PR1-1 oder das translational kontrollierte Tumorprotein vermutet. Die dritte Signalebene umfasst im Rahmen der Resistenz induzierte Metaboliten, die für die Modifikation des Stoffwechsels und von Zellwänden benötigt werden oder als Barriere im Apoplasten fungieren wie die Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase oder Glucanasen.

Man muss davon ausgehen, dass durch verschiedene Stressarten, aber auch die unterschiedlichen Intensitäten einer Stressbehandlung, verschiedene Signalwege für die Auslösung der induzierten Resistenz verantwortlich sind, die jedoch multiple Knotenpunkte besitzen (Chini et al., 2004). In dieser Arbeit zeigen sich mögliche Knotenpunkte bei unterschiedlichen Stressintensitäten oder Stressarten als übereinstimmende Proteinspots, deren Regulation ebenfalls identisch ist. Besonders von den PR-Proteinen ist bekannt, dass ihre Aktivität stark koordiniert ist (Dudler, 1997, Sticher et al., 1997). Eine komplette Identifikation des Spotmusters der 2D-Gele würde hier mehr Informationen bringen und mit Sicherheit Proteine weiterer PR-Klassen

identifizieren. Gerade die Glucanasen treten meist in Koexpression mit Chitinasen auf (Mauch et al., 1992), die im Xylemexsudat der Gerstensorte Ingrid bisher nicht nachgewiesen werden konnten. Die Verknüpfung von verschiedenen Signalwegen in einem komplexen Netzwerk macht es der Pflanze möglich, effektiv und fein abgestimmt auf die verschiedenen biotischen und abiotischen Stressoren und deren jeweilige Intensität zu reagieren (Feys und Parker, 2000). Eine weitere Aufklärung der pflanzlichen Pathogenabwehr macht es zudem notwendig, sich mit dem tierischen Immunsystem und dessen Mechanismen auseinander zu setzen, denn dort liegen, wie dies für TCTP der Fall ist, viel umfassendere Informationen über Struktur, Vorkommen und mögliche Funktion von Proteinen vor. Hammond-Kosack und Jones (1997) vermuten sogar einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der pflanzlichen R-Gene mit verwandten Genen des tierischen Immunsystems.

Durch Protonenstress konnte eine Resistenzinduktion bei der Gerste erzielt und deren Mechanismus näher untersucht werden. Das weitere Ziel liegt darin, das Prinzip der Induzierten Resistenz für einen praktischen Pflanzenschutz weiterzuentwickeln, um eine Reduktion der klassischen Pestizide zu erreichen. Zum einen kann dies über eine Aktivierung der natürlichen Mechanismen der Pflanze durch billige und harmlose IR-Agentien erfolgen. Durch Protonenstress konnte diese Sensitivierung erreicht werden, es müsste jedoch durch weitere Anzuchtexperimente mit Zeitreihen abgeklärt werden, wie lange diese Induzierte Resistenz anhält und welche Stressintensität die optimale Balance zwischen Resistenzinduktion und Ertrag besitzt. Der zweite Weg liegt in der Identifikation von mit der Induzierten Resistenz verknüpften R-Genen und deren Manipulation oder die Klonierung von R-Genen verwandter Spezies zur Schaffung von ertragreichen Pflanzen mit einem hohen Resistenzlevel (Hammond-Kosack und Jones, 1997). Das Problem hier liegt darin, dass die Produkte der möglichen R-Gene mit den anderen Komponenten des Abwehrapparates kompatibel sein müssen, um zu funktionieren. Dies wiederum erfordert die Charakterisierung der beteiligten physiologischen und molekularbiologischen Regulationsmechanismen der Induzierten Resistenz, welche für die Signaltransduktion zwischen Wurzel und Spross unter Protonenstress für die Gerstensorte Ingrid im Rahmen dieser Arbeit begonnen wurde.

5 Zusammenfassung

In Gerste kann durch Protonenstress eine Papillen-vermittelte Resistenz gegenüber Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) induziert werden. In dieser Arbeit wurden Komponenten des Mechanismus der Induzierten Resistenz im Xylemexsudat, dem vermutlichen Signalweg zwischen Wurzel und Spross, untersucht.

Durch Zweidimensionale Gelelektrophorese des Xylemexsudates konnten 450 Proteinspots aufgetrennt werden. Davon wurden 67 differentiell regulierte Proteinspots mittels MALDI-TOF identifiziert und in die hypothetischen Funktionseinheiten Pathogenabwehr, Komponenten der Signaltransduktion, Zellwandmetabolismus und Zucker- bzw. Stickstoffmetabolismus eingeordnet.

Ein Vergleich mit dem Proteinmuster von Gerstenpflanzen, in denen durch Salzstress eine Pathogenresistenz induziert wurde, wurde durchgeführt, um Proteinspots der allgemeinen Stressantwort von denen spezifisch an der Induzierten Resistenz beteiligten unterscheiden zu können. Die sehr ähnlichen Proteinmuster der 2D-Gele und identisch regulierte Proteine lassen auf eine ähnliche Signaltransduktion mit gemeinsamen Knotenpunkten schließen, die entweder der allgemeinen Stressantwort zuzurechnen ist oder gemeinsame resistenzinduzierende Faktoren darstellen.

Von den im Xylemexsudat identifizierten Proteinspots wurden fünf Proteine näher charakterisiert. Das translationell kontrollierte Tumorseprotein (TCTP) zeigte eine Induktion durch Protonenstress und besitzt eine Funktion beim Schutz der Zellen vor Stress. Bei der Induzierten Resistenz der Gerste könnte dieses antiapoptotische Protein an der Unterdrückung der HR bei der Papillen-vermittelten Resistenz beteiligt sein. Die Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD) wurde ebenfalls durch Protonenstress in der Transkriptmenge und auf der Proteinebene stark induziert. Die Beteiligung der CAD an der Resistenz wird vermutlich durch eine Modulation des Ligningehaltes und dessen Zusammensetzung in den Zellwänden und den Papillen erreicht. Die eigentlich an der Glykolyse beteiligte Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zeigte unter Protonenstress zwar eine konstante Transkriptmenge dafür aber eine starke Regulation auf der Proteinebene. Seine mögliche extrazelluläre Funktion liegt in der Verknüpfung der glycolytischen Signalwege. Aus den Klassen der PR-Proteine konnte ein PR1-Protein und mehrere Proteine der 2. Klasse (Glucanasen) identifiziert werden. Die Glucanasen sind als Bestandteile der pflanzlichen

Pathogenabwehr und für die Freisetzung von Elizitoren aus der Zellwand bekannt. Das identifizierte PR1-1 Protein besitzt eine bisher noch unbekannt Funktion und zeigt eine koordinierte starke Induktion bei der Transkript- und Proteinmenge unter Protonenstress. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird PR1-1 als mögliches resistenzinduzierendes Signal bei der Wurzel-Spross-Kommunikation gesehen.

6 Summary

A papilla-mediated resistance of barley against barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) can be induced by proton stress. Here, elements of the mechanism of induced pathogen resistance were analyzed in xylem exudate, which is probably the signalling pathway between root and shoot.

450 protein spots were visualized by two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) of the xylem exudate. 67 of these differentially regulated proteins were identified by means of MALDI-TOF. They were classified into the hypothetical groups defence-related proteins, components of the signalling pathway, cell wall metabolism and sugar and nitrate metabolism.

A comparison of the protein patterns with those of barley plants with salt stress induced pathogen resistance was done in order to distinguish proteins of the common stress response from those for specific induced resistance. The protein patterns resolved by 2D-PAGEs show a strong similarity with identically regulated proteins. It was concluded that there are cross links in the signalling between proton and salt stress. Whether these cross links, however, are part of the common stress response or show common resistance-inducing factors is not known.

Proteins representing five protein classes were identified in the xylem exudate and characterized in more detail. The translationally controlled tumor protein (TCTP) is induced by proton stress and has a function in the protection of cells under stress conditions. During papilla-mediated defense of barley these antiapoptotic proteins could be involved in the repression of the HR. The cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) was also transcriptionally and translationally induced by proton stress. CAD is supposed to be involved in induced resistance by modulation of the amount and composition of lignin in cell walls and papillae.

Although glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), commonly known as an enzyme of glycolysis, shows a constant amount of GAPDH-transcripts, the amount of GAPDH-proteins is strongly regulated by proton stress. An assumed extracellular function of this protein is the connection of glycolytic signalling pathways.

Of the group of pathogenesis-related (PR) proteins one PR1-protein and multiple PR2-proteins (glucanases) were identified. Glucanases are believed to mediate a defense response because of their potential to degrade cell walls and release elicitors. The PR1-1 protein, a protein without known function shows a strong and coordinated induction of transcription and translation under proton stress. From the data of this work one can assume that PR1-1 is a resistance-inducing signal in root-to-shoot signalling. A coordinated and very strong induction of transcription and translation has been shown by the identified PR1-1 protein under proton stress. In this work, it appeared as a possible resistance-inducing signal for root-to-shoot signalling.

7 Literatur

Agrios GN (1997):

Plant Pathology. San Diego, USA, Academic Press

Ali GM, Komatsu S (2006):

Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress, *Proteome Res* 5, 396-403

Alves A, Francisco R, Martins I, Ricardo CP (2006):

Analysis of *Lupinus albus* leaf apoplastic proteins in response to boron deficiency, *Plant Soil* 279, 1-11

Anaud A, Lei Z, Sumner LW, Mysore KS, Arakane Y, Bockus WW, Muthukrishnan S (2004):

Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal, *Mol Plant-Microbe Interact* 17(12), 1306-1317

Arcuri F, Papa S, Carducci A, Romagnoli R, Liberatori S, Sanchez JC, Tosi P, del Vecchio MT (2004):

Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution and calcium binding activity, *Prostate* 60, 130-140

Arcuri F, Papa S, Meini A, Carducci A, Romagnoli R, Bianchi L, Sanchez JC, Palmi M, Cintonino M (2005):

The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells, *Biol Reprod* 73, 745-751

Arumugam M, Lihuang Z, Akiyama T (2002):

Molecular cloning, characterization, expression and chromosomal localisation of OsGAPDH a submergence responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.), *Theor Appl Genet* 105, 34-42

Ayres PG, Woolacott B (1980):

Effects of soil water level on the development of adult plant resistance to powdery mildew in barley, *Ann Appl Biol*, 94, 255-263

Ayres PG (1984):

The Interaction between the environmental stress injury and biotic disease physiology, *Annu Rev Phytopathol*, 22, 53-75

Bacon MA, Wilkinson S, Davies WJ (1998):

pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is Abscisic Acid dependent, *Plant Physiol* 118, 1507-1515

Baker SJ, Newton AC, Gurr SJ (2000):

Cellular characteristics of temporary partial breakdown of mlo-resistance in barley to powdery mildew, *Physiol Mol Plant Pathol*, 56, 1-11

Bangrak P, Graidist P, Chotigeat W, Phongdara A (2004):

Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from *Penaeus mondon shrimp*, *Biotechnology* 108(3), 219-226

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004):

Improved prediction of signal peptides: Signal P 3.0, *J Mol Biol*, 340(4), 783-95

Bent AF (1996):

- Plant disease resistance genes: function meets structure, *Plant Cell* 8, 1757-1771
- Berna A, Bernier F (1999):**
Regulation by biotic and abiotic stress of wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, *Plant Mol Biol* 39, 539-549
- Biles CL, Martyn RD, Wilson HD (1989):**
Isozymes and general proteins from various watermelon cultivars and tissue types, *Hort Sci* 24, 810-812
- Biles CL, Abeles FB (1991):**
Xylem sap proteins, *Plant Physiol* 96, 597-601
- Bisseling T (1999):**
The role of plant peptides in intracellular signalling, *Curr Opin Plant Biol* 2, 365-368
- Bittner-Eddy PD, Beynon JL (2001):**
The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene, RPP13-Nd, functions independently of NDR1 and EDS1 and does not require the accumulation of salicylic acid, *Mol Plant-Microbe Interact* 14, 416-421
- Blume B, Nürnberger T, Ness N, Scheel D (2000):**
Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley, *Plant Cell* 12, 1425-1440
- Bommer UA, Thiele BJ (2004):**
The translationally controlled tumor protein (TCTP), *Int J Biochem Cell Biol* 36, 379-385
- Bonas U, Lahaye T (2002):**
Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition, *Curr Opin Microbiol* 5, 44-50
- Bowles D (1998):**
Signal transduction in the wound response of tomato plants, *Philos Trans R Soc Lond* 353, 1405-1410
- Brill EM, Abrahams S, Hayes CM, Jenkins CL, Watson JM (1999):**
Molecular characterization and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.), *Plant Mol Biol* 41, 279-291
- Brinkmann H, Cerff R, Salomon M, Soll J (1989):**
Cloning and sequence of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits Gap A and Gap B of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach, *Plant Mol Biol* 13, 81-94
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C (1994):**
Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance, *Plant Cell* 6, 1703-1712
- Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwel GP (1998):**
Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells, *Plant J* 15(3), 333-343
- Brueggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinhofs A (2002):**
The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinase, *PNAS* 99, 9328-9333
- Bryngelsson T, Sommer-Knudsen J, Gregersen PL, Collinge DB, Ek B, Thordal-Christensen (1994):**

- Purification, characterization and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis related proteins from barley, *MPMI* 7(2), 267-275
- Burton RA, Shirley NJ, King BJ, Harvey AJ, Fincher GB (2004):**
The Cesa gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes, *Plant Physiol* 134, 224-236
- Buhtz A, Kolasa A, Arlt K, Walz C, Kehr J (2004):**
Xylem sap protein composition is conserved among different plant species, *Planta* 219, 610-618
- Caldo RA, Nettleton D, Wise RP (2004):**
Interaction-dependent gene expression in Mla-specified response to barley powdery mildew, *Plant Cell*, 16, 2514-2528
- Carver TL, Zeyen RJ, Bushnell WR, Robbins MP (1994):**
Inhibition of phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC), *Physiol Mol Plant Pathol* 44, 261-272
- Carver TL, Zhang L, Zeyen RJ, Robbins MP (1996) :**
Phenolic biosynthesis inhibitors suppress adult plant resistance to *Erysiphe graminis* in oat at 20 °C and 10 °C, *Physiol Mol Plant Pathol* 49, 121-141
- Cheong YH, Kim CY, Chun HJ, Moon BC, Park HC, Han C, Lee SY, Cho MJ (2000):**
Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection, *Plant Science* 154, 71-81
- Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Fuchs A, Kieffer S, Garin J, Rabilloud T (1998):**
New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis* 19, 1901-1909
- Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, Loake GJ (2004):**
Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene ADR1 requires salicylic acid, EDS1 and AB1, *Plant J* 38, 810-822
- Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G (1988):**
Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells, *Nucleic Acids Res* 16(5), 2350
- Chojecki J (1986):**
Identification and characterization of a cDNA clone for cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in barley, *Carlsberg Res Commun* 51, 203-210
- Cleves AE (1997):**
Protein transport: the nonclassical ins and outs, *Curr Biol* 7, R 318-320
- Coker JS, Davies E (2003):**
Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data, *Biotechnology* 35(4); 740-746
- Collinge DB, Gregersen PL, Thordal-Christensen H (2002):**
The nature and role of defence response genes in cereals. In: *The Powdery Mildew: a comprehensive treatise*, Belanger RR und Bushnell WR (eds), APS Press, Minnesota USA, Chapter 10, 146-160
- Cooper B, Clarke JD, Budworth P, Kreps J, Hutchison D, Park S, Guimil S, Dunn M, Luginbuhl P, Ellero C, Goff SA, Glazebrook J (2003):**
A network of rice genes associated with stress response and seed development, *PNAS* 100, 4945-4950
- Costa P, Pionneau C, Bauw G, Bahrmann N, Kremer A, Frigerio JM, Plomion C (1999):**
Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins, *Electrophoresis* 20, 1098-1108

- Costaglioli P, Joubes J, Garcia C, Stef M, Arveiler B, Lessire R, Gabay B (2005):**
Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis, *Biochim Biophys Acta* 1734, 247-258
- Craver TL, Ingersin SM (1987) :**
Responses of *Erysiphe graminis* germlings to contact with artificial and host surfaces, *Physiol Mol Plant Pathol* 30, 359-372
- Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J (2002):**
A proteomic analysis of cold stress response in rice, *Proteomics* 5, 3162-3172
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996):**
Death don't have o mercy: cell death programs in plant-microbe interactions, *Plant Cell*, 8, 1793-1807
- Dani V, Simon WJ, Duranti M, Croy RR (2005):**
Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress, *Proteomics* 5, 737-745
- Davies WJ, Zhang J (1991):**
Ropot signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil, *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 42, 55-76
- Day B, Dahlbeck D, Huang J, Chrisohm ST, Li D, Staskawicz BJ (2005):**
Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance, *Plant Cell* 17, 1292-1305
- De Boer AH, Volkov V (2003):**
Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem, *Plant Cell Environ* 26,87-101
- Dickson RE, Isebrands JG (1991):**
Leaves as regulators of stress response, In: Response of plants to multiple stresses, Mooney HA, Winner WE (eds), Academic Press, San Diego
- Dudler R. (1997):**
Krankheitsresistenz bei Pflanzen, *Bot Helv*, 107(2), 151-170
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000):**
Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005-1016
- Ermolayev V, Weschke W, Manteuffel R (2003):**
Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars, *J Exp Bot* 54, 2745-2756
- Felle HH (1989):**
pH as a second messenger in plants, In: Second messenger in plant growth and development, Alan R (ed), Lissabon, 145-166
- Felle H.H., Herrmann A, Hantsein S, Hüchelhoven R, Kogel KH (2004):**
Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked y the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. hordei, *MPMI*, 17(1), 118-123
- Felle HH, Hermann A, Hüchelhoven R, Kogel KH (2005):**
Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalization, a general stress response and defense factor in barley (*Hordeum vulgare*), *Protoplasma* 227, 17-24
- Fernandez C, Szyperski T, Bruyere T, Ramage P, Möisinger E, Wüthrich K (1997)**
NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a, *J Mol Biol* 266, 576-593
- Feys B und Parker J (2000):**
Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *TIG*, 16(10), 449-455
- Fluhr R (2001):**

- Sentinels of disease. Plant resistance genes, *Plant Physiol* 127, 1367-1374
- Fujita K, Matsuda Y, Wada M, Hirai Y, Moriura N, Nonomura T, Kakutani K, Toyoda H (2004):**
Powdery mildew pathogens can suppress the chitinase gene expression induced in detached inner epidermis of barley coleptile, *Plant Cell Rep* 23, 504-511
- Gachet Y, Tournier S, Lee M, Poulton T, Bommer UA (1999) :**
The growth-related translationally controlled P23 has properties of tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle, *J Cell Sci* 112, 1257-1271
- Galili G, Sengupta-Gopalan C, Ceriotti A (1998):**
The endoplasmic-reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies, *Plant Mol Biol* 38, 1-29
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P (1998):**
Plant defense peptides, *Biopolymers*, 47, 479-491
- Gollan T, Schurr U, Schultze ED (1992):**
Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus* L. *Plant Cell Environ* 15, 551-559
- Greenburg JT (1997):**
Programmed cell death in plant-pathogen interactions, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 525-545
- Greenburg JT und Yao N (2004):**
The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions, *Cell Microbiol*, 6(3), 201-211
- Grunwald I, Rupprecht I, Schuster G, Kloppstech K (2003):**
Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis-related proteins in non-infected barley plants, *Physiol Plant* 119, 192-202
- Halpin C, Holt K, Chojecki J, Oliver D, Chabbert B, Monties B, Edwards K, Barakarte A, Foxon GA (1998):**
Brown-midrib maize (bm1) – a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene, *Plant J* 14, 545-553
- Hammerschmidt R (1999):**
Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens ? *Physiol Mol Plant Pathol*, 55, 77-84
- Hammond-Kosack KE und Jones JD (1996):**
Resistance gene-dependent plant defense response, *Plant Cell*, 8, 1773-1791
- Hammond-Kosack KE und Jones JD (1997):**
Plant disease resistance genes, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 575-607
- Handelsmann J, Stabb EV (1996):**
Biocontrol of soilborne plant pathogens, *Plant Cell* 8, 1855-1869
- Hawkins SW, Boudet AM (1994):**
Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunii* Hook, *Plant Physiol* 104, 75-84
- He DY, Yazaki Y, Minami E (1998):**
Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor N-Acetylchitoheptose, *MPMI* 11(12), 1167-1174
- Heazlewood JL, Millar AH (2003):**
Integrated plant proteomics – putting the green genomes to work, *Funct Plant Biol* 30, 471-482
- Heitefuss R (2001):**

- Defense reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives using powdery mildew on cereals as an example, *Naturwissenschaften*, 88, 273-283
- Herbik A, Giritch A, Horstmann C, Becker R, Balzer HJ, Bäumlein H, Stephan UW (1996):**
Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant chloronerva, *Plant Physiol* 111, 533-540
- Hong JK, Hwang BK (2002):**
Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*), *Physiol Plant* 114, 549-558
- Hoson T (1998):**
Apoplast as the site of response to environmental signals, *J Plant Res* 111, 167-177
- Hoson T (2002):**
Physiological functions of plant cell coverings, *J Plant Res* 115, 277-282
- Hu G, Rijkenberg FH (1998):**
Subcellular localization of β -1,3-glucanase in *Puccinia recondita* f.sp. tritici – infectes wheat leaves, *Planta* 204, 324-334
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel KH (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, Trujillo M, Kogel KH (2000):**
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 (5), 287-292
- Hückelhoven R, Kogel KH (2003):**
Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216, 891-902
- Hunt MD, Neuenschwander UH, Delaney TP, Weymann KB, Friedrich LB, Lawton KA, Steiner HY, Ryals JA (1996):**
Recent advances in systemic acquired resistance research- a review, *Gene* 179, 89-95
- Hurkman WJ, Tanaka CK (1988):**
Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit and osmotic stress in barley roots: A comparison using two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis* 9, 781-787
- Hwang BK, Heitefuss R (1982):**
Induces resistance of spring barley to *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*, *Phytopathol Z* 103, 41-47
- Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB, Leboeuf RA (1993):**
Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene-expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation, *Eur J Biochem* 213, 349-357
- Joosten MH, De Wit PJ (1989):**
Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases, *Plant Physiol* 89, 945-951
- Kehr J, Buhtz A, Giavalisco P (2005):**
Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*, *BMC Plant Biol* 5, 11-24
- Kim M, Jung Y, Lee K, Kim C (2000):**

- Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein, *Arch Pharm Res* 23 (6), 633-636
- Kogel KH, Beckhove U, Dreschers J, Münch S, Romme Y (1994):**
Acquired resistance in barley, *Plant Physiol* 106, 1269-1277
- Kombrink E, Schröder M, Hahlbrock K (1988):**
Several pathogenesis-related proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases, *PNAS* 85, 782-786
- Kombrink E, Somssich IE (1997):**
Pathogenesis-related proteins and plant defense, In: Carroll GC, The Mycota V, Plant Relationships, Springer Verlag, 107-128
- Kato C, Ohshima N, Kamado H, Satoh S (2001):**
Enhancement of the inhibitory activity for greening in xylem sap of squash roots with waterlogging, *Plant Physiol Biochem* 39, 513-519
- Koyama H, Toda T, Yokota S, Dawair Z, Hara T (1995):**
Effects of aluminium and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain Landsberg in hydroponic culture, *Plant Cell Physiol* 36(1), 201-205
- Koyama H, Toda T, Hara T (2001):**
Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity, *J Exp Bot* 52(355), 361-368
- Krüger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R (2002):**
A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L., *J Biol Chem* 277 (28), 25062-25069
- Kwon HK, Yokoyama R, Nishitani K (2005):**
A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells, *Plant Cell Physiol* 46(6), 843-857
- Laxalt AM, Cassia RO, Sanllorenti PM, Madrid EA, Andreu AB, Daleo GR, Conde RD, Lamattina L (1996):**
Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatment in potato, *Plant Mol Biol* 30, 961-972
- Laxalt AM, Munnik T (2002):**
Phospholipid signalling in plant defense, *Current Opinion in Plant Biol* 5, 1-7
- Leone A, Costa A, Tucci M, Grillo S (1994):**
Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell suspension culture, *Plant Physiol* 106, 703-712
- Leubner-Metzger G, Meins F Jr (1999):**
Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2), In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds): Pathogenesis-related proteins in plants, CRC Press, Boca Raton Fla., 49-76
- Li F, Zhang D, Fujise K (2001):**
Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein, *J Biol Chem* 276 (50), 47542-47549
- Li WL, Faris JD, Muthukrishnan S, Liu DJ, Chen PD, Gill BS (2001):**
Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*, *Theor Appl Genet* 102, 353-362

- Liang J, Zhang J (1997):**
Collection of xylem sap at flow rate similar to in vivo transpiration flux, *Plant Cell Physiol* 38(12), 1375-1381
- MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM (1995):**
Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor, *Science* 296, 688-690
- Madson LH, Collins NC, Rakwalska M, Backes G, Sandal N, Pryor AJ, Langridge P, Schule-Lefert P, Stougaard J (2003):**
Barkley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping, *Mol Genet Genomics* 269, 150-161
- Malehorn DE, Scott KJ, Shah DM (1993):**
Structure and expression of a barley acidic β -glucanase gene, *Plant Mol Biol* 22, 347-360
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993):**
Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato, *Science* 262, 1432-1436
- Martinez P, Martin W, Cerff R (1989):**
Structure, evolution and anaerobic regulation of a nuclear gene encoding cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize, *J Mol Biol* 208, 551-565
- Masuda S, Sakuta C, Satoh S (1999):**
cDNA cloning of a novel Lectine-like xylem sap protein and its root-specific expression in cucumber, *Plant Cell Physiol* 40, 1177-1181
- Matsumoto H, Morimura S, Takahashi E (1977):**
Binding of aluminium to DNA in pea root nuclei, *Plant Cell Physiol* 18, 987-993
- Mauch F, Meehl JB, Staehelin A (1992):**
Ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves, *Planta* 186, 367-375
- Meins F, Neuhaus JM, Sperisen C, Ryals J (1992):**
The primary structure of plant pathogenesis-related glycohydrolases and their genes, In: Boller T (ed): *Genes involved in plant defense*, Springer, New York, 244-282
- Mitchell HJ, Hall JL, Barber M (1994):**
Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, *Plant Physiol* 104, 551-556
- Moerschbacher BM, Noll U, Gorrichon L, Reisener HJ (1990):**
Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust, *Plant Physiol* 93, 465-470
- Molina A, Görlach J, Volrath S, Ryals J (1999) :**
Wheat genes encoding two types oPR-1 proteins re pathogeninducible, bt norespond to activators of systemic acquired resistanc, *MPMI* 12(1), 53-58
- Munns R, Passioura JB, Guo J, Chazan O, Cramer GR (2000) :**
Water relations and leaf expansion: importance of time scale, *J Exp Bot* 51, 1495-1504
- Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992):**
Phenolic compounds and their role in disease resistance, *Annu Rev Phytopathol* 30, 369-389
- Nielson H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997):**
Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *PEDS* 10(1), 1-6
- Nielson H, Krogh A (1998):**

Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model, Proc Int Conf Intell, Syst Mol Biol 6, 122-130

Nürnberg T (1999):

Signal perception in plant pathogen defense, CMLS 55, 167-182

Oerke EC, Schönbeck F (1986):

Zum Einfluß abiotischer Stressbedingungen auf das Wachstum von Gerste und Bohne und deren Prädisposition gegenüber Schaderregern, JPDP 93 (6), 561-573

Oerke EC, Schönbeck F (1990):

Effect of nitrogen and powdery mildew on the yield formation of two winter barley cultivars, J Phytopathol 130, 89-104

Oerke EC, Krone C, Jacobi J, Schönbeck F (1992):

Zusammenhänge zwischen stressinduzierten Veränderungen der Pathogenese von Erysiphe graminis hordei und Membrankomponenten der Gerste, J Phytopathol 134, 157-169

Oztur ZN, Talame V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Tuberosa R,

Bohnert HJ (2002):

Monitoring large-scale changes in transcripts abundance in drought- and salt-stressed barley, Plant Mol Biol 48, 551-573

Parker R, Flowers TJ, Moore AL, Harpham NV (2006):

An accurate and reproducible method for proteom profiling of the effect of salt stress on rice, J Exp Bot 57, 119-1118

Pay A, Heberle-Bors E, Hirt H (1992):

An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein, Plant Mol Biol 19, 501-503

Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA (2001):

Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor, Nature 411, 817-820

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

Petersen J, Brinkmann H, Cerff R (2003):

Origin, evolution and metabolic role of a novel glycolytic GAPDH enzyme recruited by land plant plastids, J Mol Evol 57(1), 16-26

Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC, Panstruga R,

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

Plazek A, Zur I (2003):

Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability, Plant Science 164, 1019-1028

Popova OV, Ismailov SF, Popova TN, Dietz KJ, Goldack D (2002):

Salt-induces expression of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum*, Planta 215, 906-913

Pritsch C, Vance CP, Bushnell WR, Somers DA, Hihn TM, Muehlbauer GJ (2001):

Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection, Physiol Mol Plant Pathol 58, 1-12

Rabilloud T. (1996):

Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. Electrophoresis, 17, 813-829

Rabilloud T (2002):

Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old fashioned, but it still climbs up the mountains, *Proteomics* 2, 3-10

Rakwal R, Agrawai GK, Yonekura M (1999):

Separation of proteins from stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissue by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Induction of pathogenesis-related and cellular protective proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride, *Electrophoresis* 20, 3472-3478

Rathjen JP, Moffett P (2003):

Early signal transduction events in specific plant disease resistance, *Curr Opin Plant Biol* 6, 300-306

Rep M, Dekker HL (2002):

Mass spectrometric identification of isoforms of PR-Proteins in Xylem sap of Fungus infected Tomato, *Plant Physiol* 130, 904-917

Rep M, Dekker HL, Vossen JH, de Boer AD, Houterman PM, de Koster CG, Cornelissen BJ (2003):

A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins, *FEBS Letters* 534, 82-86

Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M (1998) :

Protein changes in response to progressive water deficit in maize, *Plant Physiol* 117, 1253-1263

Rose LE, Bittner-Eddy PD, Langley CH, Holub EB, Michelmore RW, Beynon JL (2004):

The maintenance of extreme amino acid diversity at the disease resistance gene RPP13 in *Arabidopsis thaliana*, *Genetics* 166, 1517-1527

Rose J, Bashir S, Giovannoni J, Jahn M, Saravanan R (2004):

Teckling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools, *Plant J* 39, 715-733

Rubartelli A, Sitia R (1999):

Interleukin I β and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion, *Biochem Soc Trans*, Band 19, 255-259

Ryals J, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996):

Systemic acquired resistance, *Plant Cell* 8, 1809-1819

Ryan CA, Farmer EE (1991):

Oligosaccharide signals in plants: a current assessment, *Annu Rev Plant Phys Mol Biol* 42, 651-674

Sage-Ono K, Ono M, Harada H, Kamada H (1998):

Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*, *Plant Cell Physiol* 39(3), 357-360

Sakuta C, Oda A, Yamakawa S, Satoh S (1998):

Root-specific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of antiserum against xylem sap proteins of cucumber, *Plant Cell Physiol* 39, 1330-1336

Sakuta C, Satoh S (2000):

Vascular tissue-specific gene expression of xylem sap glycine-rich proteins in root and their localization in the walls of metaxylem vessels in cucumber, *Plant Cell Physiol* 41, 627-638

Salmeron JM, Oldroyd GE, Rommens CM, Scofield SR, Kim HS, Lavelle DT, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (1996):

- Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster, *Cell* 86, 123-133
- Satoh S, Lizuka C, Kikuchi A, Nakamura N, Fujii T (1992):**
Proteins and carbohydrates in xylem sap from squash roots, *Plant Cell Physiol* 33, 841-847
- Satoh Y, Watanabe T, Komamine A, Hibino T, Shibata D, Sugiyama M, Fukuda H (1997) :**
Changes in the activity and mRNA of cinnamyl alcohol dehydrogenase during tracheary element differentiation in *Zinnia*, *Plant Physiol* 113, 425-430
- Schlösser E (1997):**
Allgemeine Phytopathologie, Stuttgart, Thieme Verlag
- Schrattenholz A (2001):**
Methoden der Proteomforschung – Molekulare Analyse der Proteinexpression, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2001
- Schubert S, Schubert E, Mengel K (1990):**
Effect of low pH of the root medium on proton release, growth, and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba* L.), *Plant Soil* 124, 239-244
- Schubert S, Yan F (1997):**
Nitrate and ammonium nutrition of plants: Effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H⁺-ATPase. *Z Pflanzenernähr Bodenkd* 160, 275-281
- Schultheiss H, Dechert C, Kogel KH, 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, Vogel J (2000):**
Closing the ranks to attack by powdery mildew, *Trends Plant Sci* 5(8), 343-348
- Schulze-Lefert P (2004):**
Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall, *Curr Opin Plant Biol* 7, 377-383
- Schurr U, Schulze ED (1995):**
The concentration of xylem sap constituents in root exudate and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.), *Plant Cell Environ* 18, 409-420
- Schurr U, Schulze ED (1996):**
Effects of drought on nutrient and ABA transport in *Ricinus communis*, *Plant Cell Environ* 19, 665-674
- Sanchez JC, Schaller D, Ravier F, Golaz O, Deshusses J, Hochstrasser D (1997):**
Translationally controlled tumor protein: A protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes, *Electrophoresis* 18, 150-155
- Sekar C, Prasad NN, Sundaram MD (2000):**
Enhancement of polygalacturonase activity during auxin induced para nodulation and endorhizosphere colonization of *Azospirillum* in rice roots, *Indian J Exp Bot* 38, 80-83
- Selman-Housein G, Lopez MA, Hernandez D, Civardi L, Miranda F, Rigau J, Puigdomenech P (1999):**
Molecular cloning of cDNAs coding for three sugarcane enzymes involved in lignification, *Plant Sci* 143, 163-171
- Shibuya N, Minami E (2001):**
Oligosaccharide signalling for defence response in plants, *Physiol Mol Plant Pathol* 59, 223-233
- Shih MC, Heinrich P, Goodman HM (1991):**

Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, Gene 104, 133-138

Sibout R, Endes A, Pollet B, Goujon T, Mila I, Granier F, Seguin A, Lapierre C, Jouanin L (2003) :

Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants, Plant Physiol 132, 848-860

Simmons CR (1994):

The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -D-glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases, Crit Rev Plant Sci 13, 325-387

Singh R, Green MR (1993):

Sequence specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Science 259, 365-368

Stevens C, Titarenko E, Hargreaves JA, Garr SJ (1996):

Defence-related gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum* and barley (*hordeum vulgare*) coleoptile cells, Plant Mol Biol 31, 741-749

Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP (1997):

Systemic acquired resistance, Annu Rev Phytopathol 35, 235-270

Stratman JW, Ryan CA (1997):

Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors, PNAS 94, 11085-11089

Stürzenbaum SR, Kille P, Morgan AJ (1998):

Identification of heavy metal induced changes in the expression pattern of the translationally controlled tumor protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*, Biochim Biophys Acta 1398, 294-304

Sunkar R, Zhu JK (2004):

Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*, Plant Cell 16, 2001-2019

Takeuchi Y, Yoshikawa M, Takabe G, Tanaka K, Shibata D, Horino O (1990):

Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, in soybean, Plant Physiol 93, 673-682

Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ (2001):

Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones, Nat Struct Mol Biol 8, 701-704

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997):

Subcellular localisation of H_2O_2 in plants: H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction, Plant J 11(6), 1187-94

Thordal-Christensen H, Gregersen PL, Collinge DB (1999):

The barley / *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) graminis interaction, In: Mechanisms of resistance to plant diseases, Slusarenko A, van Loon K (eds), Netherlands, Seite 77-100

Tobias CM, Chow EK (2005):

Structure of the cinnamyl-alcohol dehydrogenase gene family in rice and promoter activity of a member associated with lignification, Planta 220, 678-688

Troedsson U, Green B, Widell S, Collinge D, Bryngelsson T (2005):

Isolation and characterization of three β -1,3-glucanases from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) infected by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (unveröffentlicht)

Turck F, Zhou A, Somssich E (2004):

Stimulus-dependent protomorph-specific binding of transcription factor WRKY 1 to its native promoter and the defense-related gene PCPR1-1 in Parsley, *Plant Cell* 16, 2573-2585

Ueda A, Kathiresan A, Inada M, Narita Y, Nakamura T, Shi W, Takabe T, Bennet J (2004):

Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does, *J Exp Bot* 55, 2213-2218

Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J (1992):

Acquired resistance in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 4, 645-656

Vanacker H, Carver T, Foyer C (1998):

Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves, *Plant Physiol* 117, 1103-1114

Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT (1980):

Lignification as a mechanism of disease resistance, *Annu Rev Phytopathol* 18, 259-288

Van der Biezen EA, Jones JD (1998):

The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals, *Curr Biol* 8(7), R226-227

Van Loon LC, van Strien EA (1999):

The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiol Mol Plant Biol* 55, 85-97

Velasco R, Salamini F, Bartels D (1994):

Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, *Plant Mol Biol* 26, 541-546

Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994):

Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction, *Plant Cell* 6, 959-965

Voinnet O (2002):

RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression, *Curr Opin Plant Biol* 5, 444-451

Vorwerk S, Somerville S, Somerville C (2004):

The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance, *Trends Plant Sci* 9(4), 203-209

Vranova E, Inze D, Van Breusegem F (2002):

Signal transduction during oxidative stress, *J Exp Bot* 53, 1227-1236

Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999):

The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes, *Plant J* 19, 55-64

Wegner LH, Zimmermann H (2004):

Bicarbonate-induced alkalization of the xylem sap in intact maize seedlings as measured in situ with a novel xylem pH probe, *Plant Physiol* 136, 3469-3477

- Wiese J, Kranz T, Schubert S (2004):**
Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress, *Plant Biol* 6(5), 529-36
- Wilkinson S (1999) :**
pH as a stress signal, *Plant Growth Reg* 29, 87-99
- Xiong L, Yang Y (2003):**
Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase, *Plant Cell* 15, 745-759
- Xu A, Bellamy AR, Taylor Ja (1999):**
Expression of translationally controlled tumor protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level, *Biochem J* 342, 683-689
- Yan F, Schubert S, Mengel K (1992):**
Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.), *Plant Physiol* 99, 415-421
- Yan F, Feuerle R, Schäffer S, Fortmeier H, Schubert S (1998):**
Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH, *Plant Physiol* 117, 311-319
- Yang Y, Kwon HB, Peng HP, Shih MC (1993):**
Stress response and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*, *Plant Physiol* 101, 209-216
- Yamaoka N, Yoshida S, Motoyama E, Takeuchi Y, Takada Y, Fukunaga N (2000):**
Resistance induction in barley coleoptile cells by intracellular pH decline, *Plant Cell Physiol* 41(12), 1321-1326
- Yarm FR (2002):**
Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP, *Mol Cell Biol* 22, 6209-6221
- Yarmola EG, Bubb MR (2006):**
Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions, *Trends Biochem Sci* 31, 197-205
- Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G (1983):**
Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide, *Mol Cell Biol* 3(7), 1197-1203
- Yokota S, Ojima K (1995):**
Physiological response of root tip of alfalfa to low pH and aluminium stress in water culture, *Plant Soil* 171, 163-165
- Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ (2004):**
A systemic small RNA signaling system in plants, *Plant Cell* 16, 1979-2000
- Yoon T, Jung J, Kim M, Lee KM, Choi EC, Lee K (2000):**
Identification of the self-interaction of rat TCTP/IgE dependent histamin-releasing factor using yeast two-hybrid system, *Arch Biochem Biophys* 384, 379-382
- Young SA, Guo A, Guikoma JA, White FF, Leach JE (1995):**
Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interaction with *Xanthomonas oryzae pv oryzae*, *Plant Physiol* 107, 1333-1341
- Zhen XH, Li YZ (2004):**
Ultrastructural changes and location of β -1,3-glucanase in resistant and susceptible cotton callus cells in response to treatment with toxin of *Verticillium dahliae* and salicylic acid, *J Plant Physiol* 161, 1367-1377
- Zimmermann G, Baumlein H, Mock HP, Himmelbach A, Schweizer P (2006):**

The multigene family encoding Germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance, *Plant Physiol* 142, 181-192

Zimmermann S, Nürnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich R, Scheel D (1997):

Rezeptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense, *PNAS* 94, 2751-2755

8 Anhang

8.1 Primersequenzen

Tab. 8.1 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer (fett: eingefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen)

Gen	Primernamen	Sequenz 5`-	Fragment - grÖße	Annealing- temperatur
Kontrollprimer				
Ubiquitin	HvUbi1 fwd HvUbi1 rev	CCAAGATGCAGATCTTCGT GA TTCGCGATAGGTAAAAAGA	512 bp	55 °C
Ubiquitin	HvUbi60for HvUbi60rev	ACCCTCGCCGACTACAACA T CAGTAGTGGCGGTCGAAGT G	247 bp	63 °C
Insert	M 13 reverse M 13 forward	CAG GAA ACA GCT ATG AC GTA AAA CGA CGG CCA G		45 °C
α -Tubulin	α -Tubulin-N α -Tubulin-C	AGTGTCCCTGTCCACCCACTC AGCATGAAGTGGATCTCCG G	248 bp	60 °C
Primer für die PCR / Klonierung				
TCTP	TCTP-N lang TCTP-C lang	AGAGGAAAGTTGGATCAGC AG CGGCATCATGCTCGTGTA	489 bp	61 °C
GAPDH	GAPDH-N 500 GAPDH-C 500	TCAAATGCTAGCTGCACCA C TGTAACCCCACTCGTTGTCA	520 bp	60 °C
CAD	CAD-C lang CAD-N lang	CCTTTTCGACGCAGAACCT CACCAGACCAAGAACCACC	796 bp	60 °C
GAPDH	GAPDH-N lang GAPDH-C lang	GGCGTCAGTTCCTACTCCTT ATGCAGCCTTCTCGGTTCTA	789 bp	60 °C
PR1-1	PR1-N lang PR1-C lang	ACGGGCCCTTCTATATGCT CGCACACACATAAACACAC G	673 bp	60 °C
BD3	BD3-N BD3-C	TGTCACATTTCCGAGGTCA C GCAGCCCAATCAGTCATAA A	373 bp	60 °C
FAR	X2D8-N X2D8-C	TTTCACTCCCATCACGTTCA GGACGGGTTTCAATCTTTC A	202 bp	59 °C

NBS-LRR	X2D11-N X2D11-C	TCNAGNCCYCTYCTRGTGNC G CTNGCNGARTCNTAYTTYG AYG	570 bp	62 °C
Disease-resistance-like	X2E4-N	TTCCTNGAGCTNGAATCNC T	786 bp	60 °C
Primer für die Real-Time-PCR				
GAPDH	HvGAPDH-N HvGAPDH-C	GTGAGGCTGGTGCTGATTA CG TGGTGCAGCTAGCATTGGA GAC	198 bp	60 °C
GAPDH	GAPDH-C kurz GAPDH-N kurz	TAGAACCGAGAAGGCTGCA T TGTAACCCCACTCGTTGTCA	221 bp	60 °C
CAD	X2D9-N X2D9-C	GGACATCCACCAGGTCAAG A GACGTCGTTGTACGACCAG A	226 bp	63 °C
TCTP	X2E3-N X2E3-C	CAATGTCAACCACCTTCAC G GGGGGAGAAATCTCAAGAG G	238 bp	62 °C
PR1-1	PR1-N PR1-C	AAGAAGATGACGTGGGGTT G CCCAAGTGGATGTACGCTT T	246 bp	61 °C
Primer für die Heterologe Proteinexpression				
PR1-1	PR1-N PR1-C	TTTATCAAGGATCCGCATC TTCCAAGAGTAGTC TTATCAAAGCTTCTACTT GGCTTCGGCGTCAAGG	548 bp	68 °C
TCTP	TCTP-N TCTP-C	TTATCAAGGATCCCTCGTG TACCAGGACAAGC TTATCAACTGCAGTCAGC AGTCCCTCCC	491 bp	70 °C
Glucanase	Glucanase-N Glucanase-C	TTATCAAGGATCCGTGAG GATCTACGACGCCG TTATCAACTGCAGTCAAG AGTTGTTTGGTGAG	1538 bp	67 °C

8.2 Vektorkarten

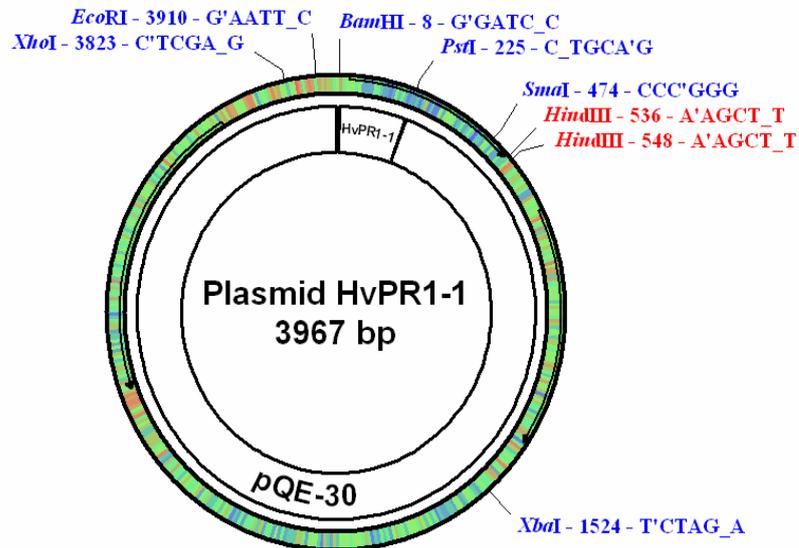


Abb. 8.1: Vektorkarte von HvPR1-1 in pQE-30

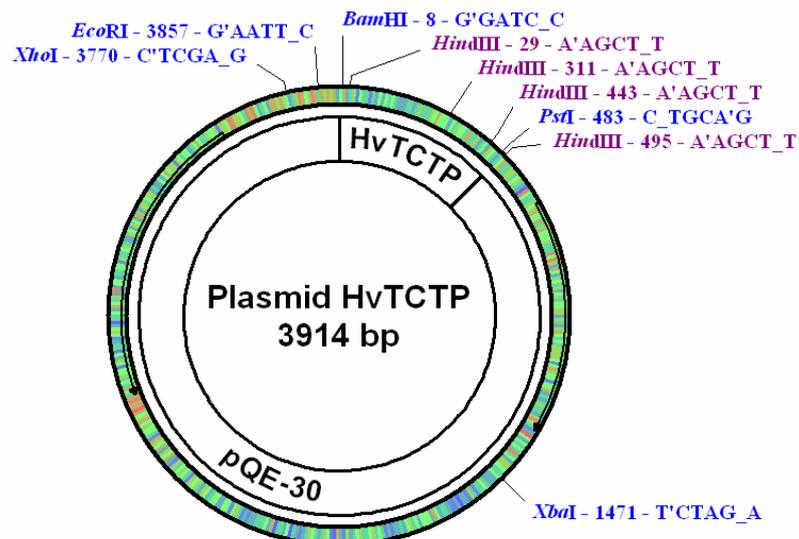


Abb. 8.2: Vektorkarte von HvTCTP in pQE-30

8.3 2D-Gele des Xylemexsudates mit Kennzeichnung der entnommenen Spots

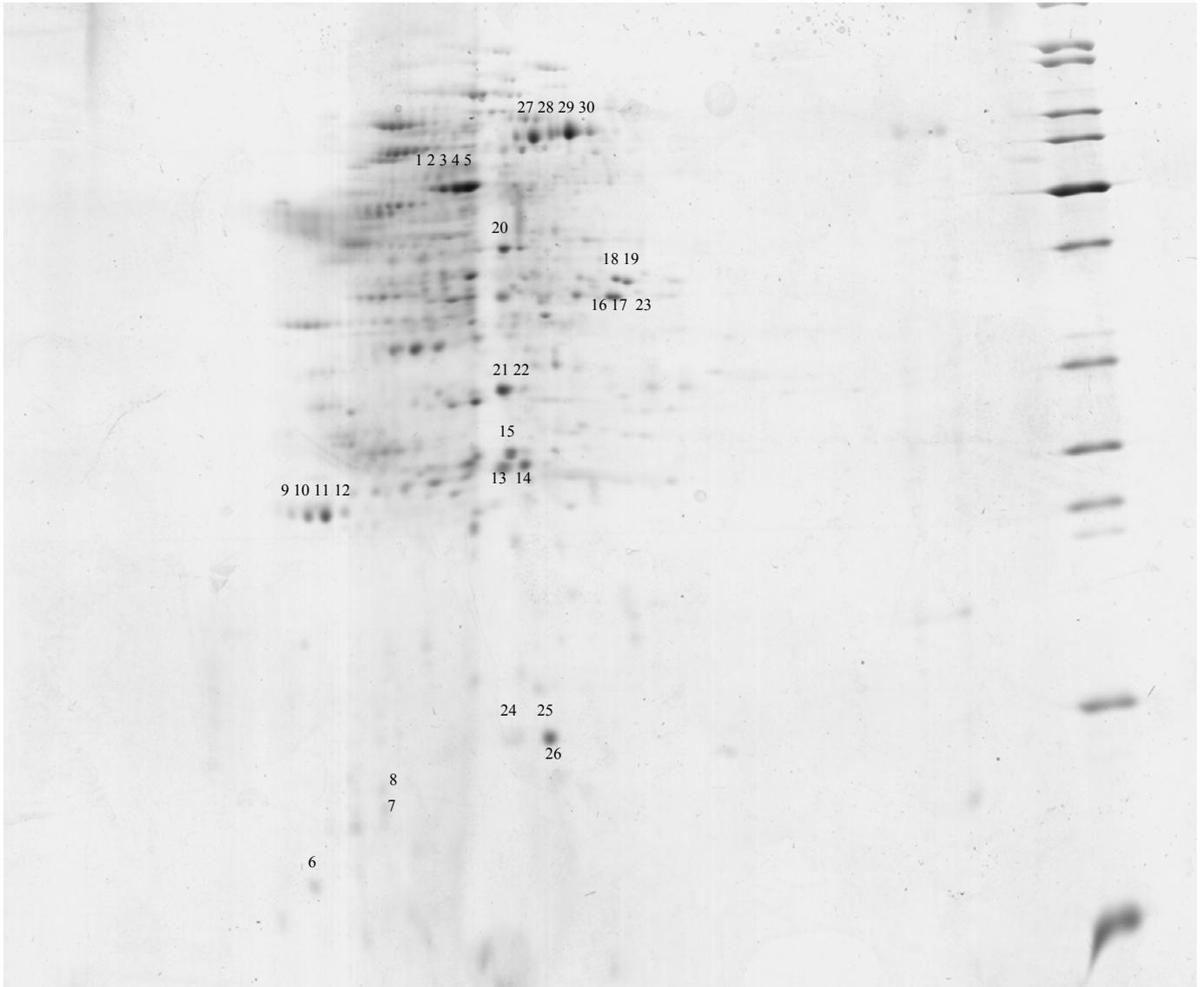


Abb. 8.3: 2D-Gel des Xylemexsudates pH 3,9 in denen die für MALDI-TOF entnommenen Proteinspots 1-30 gekennzeichnet wurden.

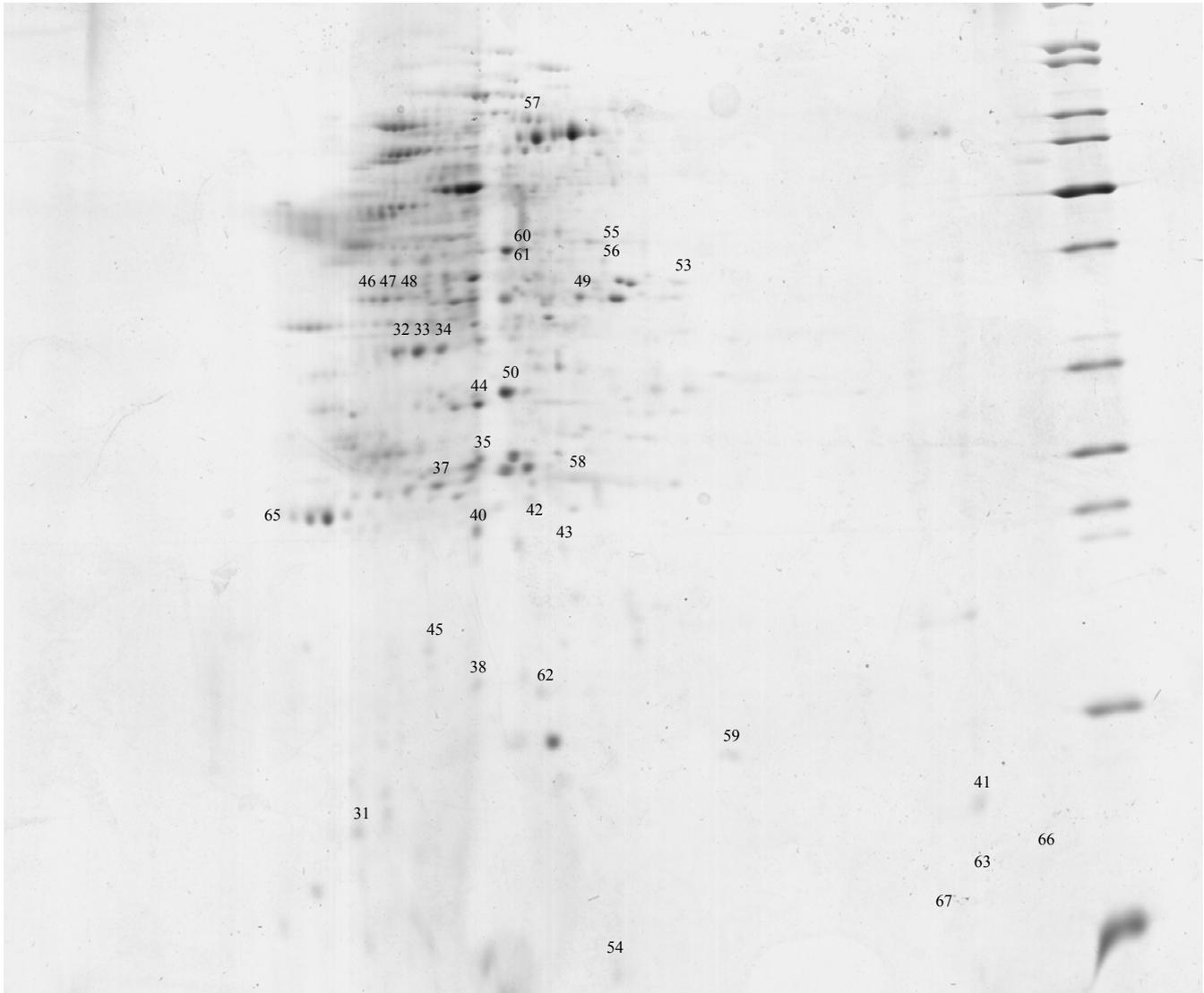


Abb. 8.4: 2D-Gel des Xylemexsudates pH 3,9 in denen die Orte für MALDI-TOF entnommenen Proteinspots 36-67 gekennzeichnet wurden.

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Sven Schubert für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Betreuung im Institut für Pflanzenernährung des Fachbereiches 09 danken.

Herrn Prof. Dr. Gottfried Wagner gilt mein Dank für die Betreuung im Fachbereich Biologie, für das Interesse am Fortgang der Arbeit und an seiner steten Diskussionsbereitschaft, die viele Anregungen ergeben hat.

Bei meinem Betreuer Dr. Achim Wiese möchte ich mich für die geleistete Vorarbeit, die tolle Betreuung mit stets offenem Ohr und Bergen von Tipps und Ideen danken. An Dr. Heike Wiese ebenfalls ein großes Dankeschön für berufliche und private Unterstützung in sämtlichen Lebenslagen.

Anne Weber und Tina Volk vielen Dank für die tatkräftige Hilfe im Chaos des Laboralltages und viele nette und aufbauende Gespräche.

Meinen Bürokollegen Caroline Krämer und Thorsten Kranz ein Dankeschön für die Erleichterung des Laboralltages, die gute Stimmung mit nicht selten schwarzem Humor und die vielen Diskussionen zu Methoden und Inhalten dieser Arbeit.

Für die Zusammenarbeit, Berge an Schokolade und Muffins sowie Motivationspostkarten ohne Ende seit Beginn des Studiums einen dicken Dank an Frau Dr. Katja Leib. Nicht zuletzt ihre Anregungen, die Hilfe und Korrekturen haben zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Der persönlichen und vor allem finanziellen Unterstützung meiner Eltern und meines Mannes Sascha habe ich es zu verdanken, dass mein Studium und die Doktorarbeit erst möglich war. Der restlichen Familie vielen Dank für die vielen Stunden des Babysittens, damit die Arbeit fertig werden konnte.

Alles Liebe und vielen Dank auch an meine beiden Kinder Lisa und Moritz, die für die Ablenkung vom Arbeitsalltag sorgten und ein Leuchten in mein Leben gebracht haben.

Lebenslauf

Name: Sandra Karl geb. Schließner
Geburtsdatum: 10. Mai 1977 in Gießen-Lahn
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

1983 – 1987 Wiesengrundschule in Leihgestern
1987 – 1989 Förderstufe der Ludwig-Uhland-Schule in Gießen
1989 – 1996 Liebigschule in Gießen, Abiturnote 1,8

Studium

10/ 1996 – 11/ 2003 Lehramt für Gymnasium (L3), Fächer Biologie und Geschichte an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Erstes Saatsexamen: 1,0 mit Auszeichnung

10/ 1997 – 07/ 2002 Zweitstudium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Diplomnote: 1,0 mit Auszeichnung

07/ 2002 – 09/ 2004 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pflanzenernährung

07/ 2003 – 12/ 2006 Promotion an den Instituten für Pflanzenphysiologie und Pflanzenernährung

09/ 2005 – 02/2006 Lehrbeauftragte an der FH Gießen-Friedberg im Fachbereich Biotechnologie

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den _____