

**Isolierung und Charakterisierung Pathogen-induzierter Gene
der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für
den *Mlg* Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP**

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

Tag der Disputation: 13. Dezember 2002

vorgelegt von
Diplom-Biologin Christina Eckey
aus Dortmund

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

1	EINLEITUNG	1
1.1	Wirt-Pathogen Interaktionen	1
1.2	Abwehrmechanismen der Pflanze	2
1.3	Induzierte Resistenz	4
1.4	Avirulenz- und Resistenzgene bei der Rassen-Sorten-spezifischen Resistenz	6
1.5	Signaltransduktion nach Pathogenbefall	10
1.6	Das Gerste-Mehltaupilz Pathosystem	12
1.7	Resistenzen im Pathosystem Gerste-Echter Mehltaupilz	14
1.7.1	Rezessive <i>mlo</i> -Allele vermitteln rassenunspezifische Resistenz	15
1.7.2	Rassenspezifische Resistenz vermittelt durch Allele des <i>Mla</i> -Locus	16
1.7.3	Das Resistenzgen <i>Mlg</i>	17
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Pflanzenmaterial	19
2.2	Pathogenmaterial	20
2.2.1	Der Echte Gerstenmehltaupilz	20
2.2.2	Der Echte Weizenmehltaupilz	20
2.3	Behandlung des Pflanzenmaterials	20
2.3.1	Inokulation mit <i>Blumeria graminis</i>	20
2.3.2	Applikation des chemischen Resistenzinduktors BTH	21
2.3.3	Verwundung	21
2.4	Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels cDNA-AFLP	21
2.4.1	RNA-Extraktion	22
2.4.2	poly-A ⁺ RNA-Isolierung	23
2.4.3	cDNA-Synthese für das cDNA-AFLP	23
2.4.4	Verdau der cDNA und Aufreinigung	24
2.4.5	Adaptorligation	25
2.4.6	Präamplifikation	25
2.4.7	Selektive Amplifikation	26
2.4.8	Auftrennung des cDNA-AFLP auf Polyacrylamidgelen	27
2.4.8.1	cDNA-AFLP mit Fluoreszenz-markierten Primern	27
2.4.8.2	cDNA-AFLP mit ³³ P-markierten Primern	28
2.4.9	Fragmentisolierung	29
2.5	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	30

2.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	30
2.6.1	Kolonie-PCR	30
2.7	Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.7.1	Miniprep	31
2.7.2	Midiprep	31
2.8	Sequenzierung und Sequenzvergleiche mit Datenbanken	31
2.9	Markerentwicklung	32
2.9.1	PCR-Marker	32
2.9.2	CAPS-Marker	33
2.10	Untersuchungen zur Genexpression	33
2.10.1	SMART™ RT-PCR	33
2.10.1.1	SMART™-cDNA Banken von Mehltreupilz-inokulierter Gerste	34
2.10.1.2	SMART™-cDNA Banken von BTH-behandelter Gerste	34
2.10.2	RT-PCR	35
2.10.3	Northern Analysen	35
2.10.3.1	Northern blotting	35
2.10.3.2	Sondenherstellung	36
2.10.3.3	Hybridisierung	37
2.11	Sequenzverlängerung von Genfragmenten	37
2.11.1	Verlängerung von cDNA mittels RACE	38
2.11.2	Inverse PCR (iPCR)	38
2.12	Genfunktionsanalyse durch transiente Transformation mit RNA Interferenz (RNAi) oder Überexpression	40
2.12.1	Klonierungsstrategie für eine Überexpression der MAP Kinase 13a-3	40
2.12.2	Erzeugung doppelsträngiger RNA (dsRNA)	41
2.12.3	Präparation und Beschichtung der <i>microcarrier</i>	42
2.12.4	Transiente Transformation mit der <i>particle inflow gun</i> (PIG)	43
2.12.5	Mikroskopische Auswertung der transienten Transformation	43
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Differentielle Banden im cDNA-AFLP	45
3.1.1	Linien-spezifische Marker	46
3.1.2	<i>Mlg</i> -spezifische Marker	48
3.1.3	Identifizierung <i>Bgh</i> -induzierter Gene	50
3.2	Bestätigung der differentiellen Genexpression isolierter cDNA-Fragmente nach Inokulation mit Mehltreupilz	57
3.2.1	Frühe Induktion einiger Gene nach Inokulation mit Gerstenmehltreupilz	60
3.3	BTH-induzierte Gene	61

3.4	Sequenzverlängerung der aus dem cDNA-AFLP stammenden Genfragmente	63
3.5	Charakterisierung eines putativen DNA-Bindeproteingens	66
3.5.1	Genexpression des putativen DNA-Bindeproteins nach Verwundung	66
3.5.2	RNAi mit dem putativen DNA-Bindeproteingen N9-10 in Gerstenblättern	67
3.6	Charakterisierung des MAP Kinase-Gens 13a-3	69
3.6.1	Genexpression des MAP Kinase-Gens nach Verwundung	70
3.6.2	Genexpression des MAP Kinase-Gens nach Inokulation mit <i>Bgt</i>	70
3.6.3	Funktionsanalyse der MAP Kinase 13a-3 durch RNAi in Gerstenblättern	71
3.6.4	Transiente Überexpression der MAP Kinase 13a-3 in Gerstenblättern	72
4	DISKUSSION	74
4.1	cDNA-AFLP als Methode zur Darstellung differentieller Genexpression	74
4.2	Das <i>Mlg</i>-spezifische cDNA-Fragment und Marker für den Resistenzgenlocus <i>Mlg</i>	76
4.3	Darstellung pilzlicher Gene mittels cDNA-AFLP nach Inokulation von Gerstenblättern mit <i>Bgh</i>	78
4.4	Im cDNA-AFLP identifizierte <i>Bgh</i>-induzierte Gene der Gerste	78
4.4.1	<i>Bgh</i> -induzierte Gene des Phenylpropanoidmetabolismus und verwandter Stoffwechselwege	80
4.4.1.1	Enzyme des Tryptophan-abhängigen Stoffwechsels	82
4.4.1.2	Phenylalaninammoniumlyase (PAL)	82
4.4.1.3	Enzyme <i>downstream</i> der PAL	84
4.4.2	<i>Bgh</i> -induzierte Gene der Redox-Regulation	85
4.4.2.1	ROI-produzierende Enzyme	86
4.4.2.2	Enzyme des antioxidativen Systems	87
4.4.3	<i>Bgh</i> -induzierte Gene von Signaltransduktionskomponenten	90
4.4.3.1	Proteinkinasen	91
4.4.3.2	Immunophilin (N5-4)	93
4.4.3.3	Phospholipase D (13b-10)	94
4.4.3.4	Transkriptionsfaktoren	95
4.5	Transkriptakkumulation nach Inokulation mit <i>Bgh</i> in <i>Mlg</i>- und <i>mlg</i>-tragenden Gerstenlinien	96
4.6	Transkriptakkumulation <i>Bgh</i>-induzierter Gene nach Inokulation des Nichtwirts Gerste mit Weizenmehltaupilz	97
4.7	Transkriptakkumulation <i>Bgh</i>-induzierter Gene in Gerste nach Behandlung mit dem chemischen Resistenzinduktor BTH	100
4.8	Charakterisierung des putativen DNA-Bindeproteingens N9-10	102
4.9	Isolierung und Charakterisierung der MAP Kinase 13a-3	105

4.10	Abschließende Betrachtung	111
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
	SUMMARY	117
6	LITERATURVERZEICHNIS	118
7	ANHANG	140

Abkürzungsverzeichnis

aa.....	<i>amino acids</i> (Aminosäuren)
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCI	<i>barley chemically induced</i>
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (Echter Gerstenmehltaupilz)
<i>Bgt</i>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> (Echter Weizenmehltaupilz)
bp	<i>base pair</i> (Basenpaar)
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester, Bion [®]
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>
cIR	chemisch Induzierte Resistenz
cv.	<i>cultivar</i> (Sorte)
dNTP.....	2'-desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
EST	<i>expressed sequence tag</i>
f.sp.	<i>forma specialis</i>
GFP.....	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
hpi	Stunden post Inokulation
hpt.....	<i>hours post treatment</i> (Stunden nach Behandlung)
HR.....	Hypersensitive Reaktion
IR	Induzierte Resistenz
LRR	<i>leucine reach repeat</i> (Leuzin-reiche Wiederholung)
MAPK.....	<i>mitogen activated protein kinase</i>
NBS	<i>nucleotide binding site</i> (Nukleotidbindestelle)
NIL	Nahezu-isogene Linie
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PR	<i>pathogenesis-related</i> (Pathogenese-bedingt)
RACE.....	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNAi.....	RNA Interferenz
ROI	<i>reactive oxygen intermediate(s)</i> (reaktive Sauerstoffintermediate)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
WP	<i>wettable powder</i> (Leerformulierung)

1 Einleitung

Unter naturnahen Bedingungen sind Pflanzenkrankheiten die Ausnahme. In Monokulturen, wie sie beim Anbau von Getreide und anderen Nutzpflanzen zu finden sind, versagen allerdings häufig die natürlichen Schutzmechanismen. Obwohl über 70000 unterschiedliche Pestizide auf dem Markt erhältlich sind (FAO 2001), liegt die jährliche Effizienz des weltweiten Pflanzenschutzes bei nur 40 % (Oerke 1997). Einige der eingesetzten Chemikalien sind hoch toxisch. Das macht deutlich, dass dringend neue Pflanzenschutzkonzepte entwickelt werden müssen. Eine Voraussetzung für innovative und erfolgreiche Strategien ist dabei ein detailliertes Wissen über die Interaktion der Pflanzen mit ihren Pathogenen.

1.1 Wirt-Pathogen Interaktionen

Die meisten Pflanzenarten sind gegenüber den meisten phytopathogenen Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze) resistent, das heißt die Pflanze ist kein Wirt für das potentielle Pathogen. Bei dieser Nichtwirt-Resistenz oder Basisinkompatibilität (Dudler 1997; Schlösser 1997) kann präformierte Resistenz, wie mechanische Barrieren oder chemische Komponenten, eine Rolle spielen. Außerdem erkennt die Nichtwirtspflanze in einigen Fällen durch vom Pathogen direkt oder indirekt freigesetzte Moleküle, sogenannte Elicitoren, die Pathogenattacke und löst eine Resistenzreaktion aus. In der Koevolution von Pflanze und Phytopathogen konnte diese Resistenz jedoch von einigen Erregern durchbrochen werden, was in einer Basiskompatibilität resultierte. Dabei gelingt es dem Pathogen, die Mechanismen der Nichtwirt-Resistenz zu umgehen oder zu unterdrücken, die Interaktion verläuft kompatibel mit Ausprägung der Krankheitssymptome. Angehörige einer einzelnen Pathogenspezies mit der gleichen Wirtspflanzenspezifität (Wirtsbereich) faßt man als eine *forma specialis* (f.sp.) zusammen (Prell 1996).

In einigen Fällen konnten Pflanzen im Laufe der Zeit die Resistenz wiederherstellen, das heißt, sie können ein angreifendes Pathogen erkennen und eine erfolgreiche Abwehrreaktion auslösen (Wirtsresistenz, auch kultivarspezifische Resistenz). Bei der Wirtsresistenz unterscheidet man nicht-rassenspezifische von rassenspezifischer Resistenz (Prell 1996). Erstere wird auch als horizontal oder quantitativ bezeichnet und vermittelt Resistenz gegen nahezu alle Rassen einer Pathogenspezies. Horizontal resistente Pflanzen zeigen häufig keine vollständige, aber sehr dauerhafte Resistenz (Schlösser 1997).

Die rassenspezifische Resistenz beruht auf engen Wechselwirkungen zwischen dem Genotyp des Wirtspflanzenkultivars mit bestimmten Rassen eines Phytopathogens. Die rassenspezifische Resistenz beruht auf engen Wechselwirkungen zwischen dem Genotyp des Wirtspflanzenkultivars mit bestimmten Rassen eines Phytopathogens. Die rassenspezifische Resistenz beruht auf engen Wechselwirkungen zwischen dem Genotyp des Wirtspflanzenkultivars mit bestimmten Rassen eines Phytopathogens.

spezifische Resistenz wird nach dem Gen-für-Gen Modell von Flor (1971) durch das Zusammentreffen eines Resistenzgens auf Seiten der Pflanze mit einem korrespondierenden Avirulenzgen des Pathogens bedingt. Dabei stellt das Resistenzgenprodukt einen Rezeptor dar, der direkt oder indirekt mit dem Avirulenzgenprodukt (spezifischer Elicitor) interagiert und dadurch eine Resistenzantwort auslöst. Die so vermittelte Resistenz ist in der Regel vollständig, wird aber unter Feldbedingungen nach drei bis zehn Jahren durch selektierte Pathogenrassen durchbrochen (Schlösser 1997).

1.2 Abwehrmechanismen der Pflanze

Versucht ein Pathogen eine Pflanze zu besiedeln, muss es eine Vielzahl von Abwehrbarrieren des möglichen Wirtes überwinden. Dazu gehören präformierte Komponenten der Verteidigung, die bereits vor dem Angriff des Pathogens in der Pflanze vorhanden sind, wie z.B. strukturelle Barrieren (Cuticula, Zellwand) und die Einlagerung von antimikrobiellen Stoffen (Osbourn 1996; Hutcheson 1998). Ist das Pathogen in der Lage, diese Verteidigungsstrategien zu überwinden bzw. zu tolerieren, kann es noch durch induzierte Abwehrmechanismen gestoppt werden.

Da das Eindringen in die Pflanzenzelle bzw. ihre Lyse häufig eine Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung eines Pathogens ist, gilt die Zellwandverstärkung als wichtige Resistenzreaktion (Agrios 1997). Sind die Zellwandappositionen lokal stark begrenzt, wie bei der Interaktion mit pilzlichen Pathogenen, spricht man von Papillen. Die Papillenbildung beginnt mit Cytoplasmaaggregation und einer damit verbundenen Reorganisation von Microfilamenten und Mikrotubuli (Kobayashi *et al.* 1997). Den Hauptbestandteil der Zellwandauflagerungen machen wahrscheinlich Lignin und Callose aus (Thordal-Christensen *et al.* 1999), es akkumulieren auch H_2O_2 , Peroxidasen und Phenole (von Röpenack *et al.* 1998; Hückelhoven *et al.* 1999). Extrazelluläre hydroxyprolinreiche Glycoproteine (HRGPs) verstärken die Zellwand durch H_2O_2 -vermittelte Vernetzung mit der Zellwandmatrix (Hammond-Kosack und Jones 1996).

Eine weit verbreitete Reaktion der Pflanze auf einen Pathogenangriff, vor allem in inkompatiblen Interaktionen, ist das schnelle Absterben attackierter Zellen an der Infektionsstelle, bekannt als Hypersensitive Reaktion (HR, Stakman 1915). Die Frage, ob es sich bei dem Zelltod in der HR um einen genetisch programmierten Zelltod (PCD, *programmed cell death*; Jones 2001a) oder um ein passives Absterben der Zelle (Nekrose) handelt, ist noch nicht endgültig geklärt (Dangl *et al.* 1996). Allerdings gehen immer mehr Wissenschaftler von einem aktiven PCD aus, da die Vorgänge einen funktionsfähigen Pflanzenmetabolismus

und neue Transkription sowie Translation benötigen (He *et al.* 1994; Schiffer *et al.* 1997; Richael und Gilchrist 1999; Heath 2000a; Schulze-Lefert und Vogel 2000). Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass Inhibitoren tierischer Caspasen (Apoptose auslösende Cysteineproteasen) den Zelltod in Pflanzen verhindern (Clarke *et al.* 2000; de Jong *et al.* 2002).

Neben der Aktivierung des Zelltods werden durch Pathogenkontakt eine Reihe von Abwehr assoziierten Genen angeschaltet. Sie codieren u.a. für PR-Proteine (*pathogenesis-related*) mit zum Teil antifungaler Wirkung (van Loon und van Strien 1999), Enzyme für die Synthese von Phytoalexinen (niedermolekulare antimikrobiell wirkende Substanzen; Hammond-Kosack und Jones 1996), des Phenylpropanoidstoffwechsels (Görlach *et al.* 1995) oder der Redox-Regulation (Vranova *et al.* 2002). Da viele der Abwehrreaktionen, einschließlich des Zelltods in der HR, gleichzeitig induziert werden, ist es schwierig zu bestimmen, welchen Anteil jede Komponente an der Ausprägung der Resistenz hat. Obwohl der Hypersensitive Zelltod die Entwicklung vor allem biotropher Organismen durch den Entzug von Nährstoffen stoppen und peritrophe Pathogene durch die Freisetzung toxischer Substanzen inhibieren kann (Agrios 1997; Schiffer *et al.* 1997), gibt es experimentelle Hinweise für die Entkopplung des Hypersensitiven Zelltods und der Resistenz (Yu *et al.* 1998; Richael und Gilchrist 1999; Heath 2000; Schulze-Lefert und Vogel 2000). Century *et al.* (1995) fanden eine *Arabidopsis* Mutante, *ndr1-1* (*non-race-specific disease resistance*), die anfällig gegenüber eigentlich avirulenten Pathogenisolaten geworden war, obwohl ein Hypersensitiver Zelltod induziert wurde. Dieser und ähnliche Versuche zeigen auch, dass in die Induktion von Abwehrgenen und des PCD während der HR wahrscheinlich unterschiedliche Signalwege involviert sind (Heath 2000).

Eine sehr frühe Reaktion der Pflanze auf Pathogene ist der *oxidative burst*, die transiente Akkumulation von Reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI, *reactive oxygen intermediates*; Levine *et al.* 1994; Jabs *et al.* 1997; Lamb und Dixon 1997). Zu den wichtigsten ROI zählen Hydroxylradikale ($\text{OH}^\bullet$), Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), von denen nur letzteres relativ stabil ist (Vranova *et al.* 2002). ROI entstehen fortwährend bei zellulären Prozessen in der Pflanzenzelle, z.B. bei der Photorespiration oder der β -Fettsäureoxidation. Sie können aber auch nach Pathogenkontakt extrazellulär mit Hilfe einer NADPHoxidase oder von Peroxidasen gebildet werden. Als weitere Quellen für ROI sind *germin-like* Oxidasen, Aminoxidasen und Reaktionen mit Cytochrom P450 im Gespräch (Bolwell und Wojtaszek 1997; Vranova *et al.* 2002). H_2O_2 und andere ROI haben mehrere Funktionen bei der Pathogenabwehr. Bei Kontakt wirken sie direkt toxisch auf Pathogene, sind

Voraussetzung für die Vernetzung von Zellwandbestandteilen und können als Signalmoleküle agieren (Bolwell und Wojtaszek 1997; Lamb und Dixon 1997; Ryals *et al.* 1997).

Inwieweit ROI bei der Induktion der HR eine Rolle spielen ist noch nicht geklärt (Heath 2000a). Es gibt aber Hinweise, dass ihre Akkumulation nicht ausreichend für die Auslösung der HR ist (Heath 1998; Hückelhoven und Kogel 1998; Dorey *et al.* 1999).

Trotz der zahlreichen Abwehrreaktionen der Pflanze kann es zum Befall (kompatible Interaktion) kommen, wenn das Pathogen die präformierten Abwehrmechanismen umgeht und eine zeitige Induktion der aktiven Abwehr vermeidet bzw. durch Toxine oder andere Stoffe verhindert.

1.3 Induzierte Resistenz

Unter Induzierter Resistenz (IR) versteht man die Fähigkeit von Pflanzen, nach einem vorangegangenen Stimulus (Pathogene, Chemikalien, Rhizobakterien) zelluläre Abwehrreaktionen anzuschalten und diese bei einem folgenden Pathogenangriff im Vergleich zu nicht stimulierten Pflanzen schneller und stärker zu induzieren. Bei dem Zustand der erhöhten Abwehrbereitschaft spricht man von Sensibilisierung oder *priming* (Conrath *et al.* 2002). Die IR kann über Wochen andauern und wirkt unspezifisch gegenüber einer Vielzahl an Pathogenen. Dies geschieht entweder lokal begrenzt (lokal induzierte Resistenz, IIR) oder in der gesamten Pflanze (systemisch induzierte Resistenz, sIR; Sticher *et al.* 1997). Eine bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschriebene sIR wird von Pathogen-induzierten Nekrosen ausgelöst und wurde als SAR (*systemic acquired resistance*) bezeichnet (Ryals *et al.* 1996; Sticher *et al.* 1997). Bei der Ausprägung der SAR in dikotylen Pflanzen akkumuliert Salicylsäure (SA) und die Transkription SAR-typischer PR-Gene wird angeschaltet. Um welche Gene es sich dabei handelt, ist von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich, in *Arabidopsis* z.B. korreliert die SAR mit der Expression von *PR-1*, *-2* und *-5* (Uknes *et al.* 1992). Die Notwendigkeit von Salicylsäure für SAR wurde mit Hilfe transgener Pflanzen, die das bakterielle *NahG* Gen exprimieren, gezeigt (Gaffney *et al.* 1993). *NahG* codiert für eine SA-Hydroxylase, die SA in das inaktive Catechol umwandelt. Diese Pflanzen können keine SA mehr akkumulieren, zeigen keine SAR-typische Genexpression und sind anfällig gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen. Pfropfungsexperimente haben gezeigt, dass SA zwar wichtig für die Signaltransduktion ist, aber nicht das in alle Pflanzenteile transportierte Signal darstellt (Vernooij *et al.* 1994). Das systemische Signal konnte bislang nicht identifiziert werden.

Systemische Resistenz kann auch durch bestimmte Chemikalien induziert werden (chemisch induzierte Resistenz, cIR; Ryals *et al.* 1996; Sticher *et al.* 1997). Zu den effektivsten Resistenzinduktoren gehören die Salicylsäure-Analoga 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester (BTH). Beide Substanzen wirken in monokotylen und dikotylen Pflanzen, wobei sie in Dikotylen vermutlich *downstream* oder anstelle von SA in die SAR Signalkette eingreifen und so eine der SAR ähnliche Resistenz hervorrufen (Delaney *et al.* 1995; Lawton *et al.* 1996). In Getreidepflanzen fehlen eindeutige Hinweise für das Vorkommen einer SA-abhängigen SAR, doch SA-Analoga können Resistenz gegen phytopathogene Pilze vermitteln (Kogel *et al.* 1994; Schweizer *et al.* 1997; Beßer *et al.* 2000). Beßer und Mitarbeiter (2000) identifizierten in Gerste mehrere Gene, *BCI-1* bis *BCI-9* (*barley chemically induced*), die nach Behandlung mit chemischen Resistenzinduktoren stärker exprimiert werden. Als eindeutiger Marker für cIR in Getreide gilt BCI-4, ein Protein mit Ca^{2+} -bindendem EF-Hand Motiv, dessen Transkription nur nach Behandlung mit chemischen Resistenzinduktoren induziert wird.

Eine weitere Form der Induzierten Resistenz wird durch nicht pathogene, Wurzel-besiedelnde Bakterien ausgelöst (ISR, *induced systemic resistance*; Pieterse *et al.* 1998; van Loon *et al.* 1998). Im Gegensatz zur SAR ist die ISR in den meisten Fällen unabhängig von Salicylsäure und SAR-typische PR-Gene werden nicht angeschaltet (Pieterse *et al.* 1996; Press *et al.* 1997; Pieterse *et al.* 1998). In die Signaltransduktion der ISR sind Jasmonat- und Ethylen-responsive Elemente involviert (Pieterse und van Loon 1999; Thomma *et al.* 2001). Allerdings scheint die Induzierte Resistenz durch den von Gerstenwurzeln isolierten Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 gegen Blattpathogene von Salicylsäure abhängig zu sein (M. Höfte, pers. Mitteilung).

Eine Gemeinsamkeit bei den verschiedenen Formen der IR (SAR, cIR, ISR) ist die Abhängigkeit von NPR1/NIM1 (*nonexpressor of PR genes 1/noninducible immunity 1*; Cao *et al.* 1994; Delaney *et al.* 1995). Eine Mutation in diesem Gen führt zum Verlust der Resistenz und Überexpression generiert nach Induktion Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen (Cao *et al.* 1998). NPR1/NIM1 enthält ankyrinreiche Motive und besitzt Homologie zu dem Transkriptionsfaktor-Inhibitor von Säugetieren I κ B (Cao *et al.* 1997; Ryals *et al.* 1997). Mehrere Studien konnten zeigen, dass NPR1/NIM1 durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TGA-Familie die Expression von Abwehrgenen reguliert (Zhang *et al.* 1999; Despres *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2000; Fan und Dong 2002).

1.4 Avirulenz- und Resistenzgene bei der Rassen-Sorten-spezifischen Resistenz

Resistenzgene (R-Gene) ermöglichen es Pflanzen, bestimmte Rassen eines Phytopathogens zu erkennen und eine effektive Abwehrreaktion anzuschalten. Voraussetzung ist dabei, dass das Pathogen, hierbei kann es sich um Viren, Bakterien, Pilze oder Nematoden handeln, ein korrespondierendes Avirulenz (*Avr*)-Gen trägt (Gen-für-Gen Modell; Flor 1971).

Aus Bakterien wurden seit 1984 mehr als 40 *Avr*-Gene isoliert (Hutcheson 1998; Bonas und Lahaye 2002), von denen die meisten keine bekannten Enzymaktivitäten besitzen, folglich scheint die Struktur für die Erkennung entscheidend zu sein. Alle untersuchten bakteriellen *Avr*-Genprodukte werden wahrscheinlich über das von *hrp*-Genen (*hypersensitive response and pathogenicity*) codierte Typ III-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle exportiert (Lahaye und Bonas 2001). Diese Translokation erfolgt ähnlich wie die der Pathogenitätsdeterminanten bei Säugetierpathogenen (Galan und Collmer 1999). Wären Avirulenzgene ausschließlich nachteilig für das Pathogen, wären sie wahrscheinlich durch negative Selektion aus Pathogenpopulationen eliminiert worden. Viele der *Avr*-Gene spielen jedoch eine Rolle bei der Pathogenität (Kjemtrup *et al.* 2000; White *et al.* 2000), eventuell durch eine Unterdrückung der Abwehrreaktionen der befallenen Pflanze.

Von Pilzen sind nicht viele *Avr*-Genprodukte bekannt. Eines der wenigen ist das von *Cladosporium fulvum* sezernierte *Avr9*, ein Cystein-reiches Propeptid, das von pilzlichen oder pflanzlichen Proteasen gespalten wird und als aktives Peptid (28 Aminosäuren) in Tomaten mit dem entsprechenden R-Genprodukt Cf-9 eine Resistenzantwort auslöst (Jones *et al.* 1994).

Das erste klonierte R-Gen war *Pto* (Martin *et al.* 1993). Diese Ser/Thr-spezifische Kinase vermittelt in Tomatenpflanzen eine gut untersuchte Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* mit dem Avirulenzgen *AvrPto*. Obwohl sie keine bekannte Spezifitätsdomäne zu haben scheint, bindet die *Pto*-Kinase *AvrPto* (Scofield *et al.* 1996; Tang *et al.* 1996). Um eine Resistenzantwort auszulösen, benötigt *Pto* das NBS-LRR-Protein (*nucleotide binding site - leucine rich repeat*) *Prf* (*Pseudomonas resistance and fenthion sensitivity*; Salmeron *et al.* 1996). Die Funktion dieses Proteins ist allerdings noch unbekannt, eventuell verankert *Prf* *Pto* mit der Plasmamembran. *In vitro* phosphoryliert *Pto* eine weitere Ser/Thr-spezifische Kinase, *Pti1* (*Pto interacting*; Zhou *et al.* 1995), und interagiert außerdem mit den drei Transkriptionsfaktoren *Pti4-6*, welche an die Promotoren von PR-Genen binden können (Zhou *et al.* 1997; Gu *et al.* 2002).

Nach *Pto* wurden noch viele andere R-Gene identifiziert, die man bisher in fünf Klassen (NBS-LRR-Proteine dabei mit zwei Untergruppen) eingeteilt hat (Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Die wichtigsten R-Gen Klassen. Als Beispiel für jede Klasse wird ein R-Gen und die Interaktion, in der es Resistenz vermittelt, genannt. In der rechten Spalte ist die vorhergesagte Anzahl an Homologen in *A.th.* angegeben (Arabidopsis Genome Initiative 2000).

R-Gen Klasse	Beispiel	Proteindomänen	<i>Arabidopsis</i> Homologe
LRR ¹ -RLK ²	<i>Xa21</i> (Reis/ <i>Xanthomonas oryzae</i>)	extrazelluläre LRRs, cytoplasmatische Ser/Thr-Kinase	~ 170
eLRR	<i>Cf-9</i> (Tomate/ <i>Cladosporium fulvum</i>)	Transmembranprotein mit extrazellulären LRRs	~ 30
Pto RLK	<i>Pto</i> (Tomate/ <i>Pseudomonas syringae</i>)	Ser/Thr-Kinase mit Myristilierungsstelle	~100
TIR ³ -NBS ⁴ -LRR	<i>N</i> (Tabak/TMV)	cytoplasmatisches NBS-LRR-Protein mit N-terminaler TIR-Domäne	~100
CC-NBS-LRR	<i>Mla1</i> (Gerste/ <i>Blumeria graminis</i>)	cytoplasmatisches NBS-LRR-Protein mit N-terminaler <i>coiled coil</i> (CC)-Struktur (Leuzin-Zipper)	~65
SA-CC	<i>RPW8</i> (<i>Arabidopsis</i> / <i>Erysiphe cichoracearum</i>)	put. <i>signal anchor</i> (SA) für Membranverankerung und put. CC-Domäne	~5

¹LRR: *leucine rich repeat*, ²RLK: *receptor-like kinase*, ³TIR: Toll-Interleukin 1R-Domäne, ⁴NBS: *nucleotide binding site*

Die meisten R-Gene besitzen ein LRR-Motiv (*leucine rich repeat*), das heißt einen Sequenzabschnitt, in dem in regelmäßigen Abständen Leuzin oder eine andere hydrophobe Aminosäure in unterschiedlich vielen Wiederholungen enthalten ist. Diese LRR-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen oder auch die Bindung von Peptiden (Bent 1996; Dangl und Jones 2001). Bei dem R-Gen *Xa21*, das in Reis Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* (*AvrXa21*) vermittelt, liegt die LRR-Domäne extrazellulär; sie ist über einen transmembranen Bereich mit einer cytoplasmatischen Ser/Thr-Kinase verbunden (Song *et al.* 1995; Wang *et al.* 1996a). Bei einer anderen Klasse von R-Genen, wie sie von *Cf-9* (Jones *et al.* 1994) repräsentiert wird, handelt es sich um Transmembranproteine mit extrazellulären LRRs. Wahrscheinlich mehr als 150 Sequenzen haben im *Arabidopsis*-Genom Homologie zur NBS-LRR Klasse der R-Gene (Arabidopsis Genome Initiative 2000). Die meisten bilden Multigenfamilien, es gibt aber auch 46 einzelne R-Genhomologe (Jones 2001b). Die NBS-Domäne (*nucleotide binding site*) dient der Bindung von GTP oder ATP und ist wesentlich für die Aktivität des Proteins (Bent 1996). Die NBS-LRR-Proteine lassen sich weiter unterteilen. Zum einen in eine Gruppe, die am N-Terminus einen Bereich mit Homologie zur cytoplasmatischen Domäne des Interleukin-1R Rezeptors aus Säugetieren bzw. dem Toll-Rezeptor aus *Drosophila* (TIR-

Domäne) besitzt, und zum anderen in eine Gruppe mit Leuzin Zipper (Konsensussequenz XXXYXXL, Y = hydrophob), der über die Formierung von *coiled coil*-Strukturen Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (CC-Domäne). Leuzin Zipper sind bekannt für ihre Rolle bei der Homo- oder Heterodimerisierung von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Auffällig ist, dass die TIR-NBS-LRR Klasse der R-Gene bisher nicht in Gräsern gefunden wurde (Michelmore 2000).

Eine erst vor kurzem in *Arabidopsis* entdeckte Klasse der R-Gene codiert für ein kleines Protein (RPW8) mit einem putativen Membran-Anker (*signal anchor*) und einer CC-Domäne (Xiao *et al.* 2001). Es wurden noch weitere R-Gene entdeckt, wie *Rpg1*, das in Gerste Resistenz gegen bestimmte Pathotypen von *Puccinia graminis* vermittelt, oder *Ve*, welches wirksam in der Tomate gegen *Verticillium dahliae*-Rassen ist. Beide lassen sich nicht in die bisherigen R-Gen Klassen einordnen. *Rpg1* codiert für ein Rezeptorkinase-ähnliches Protein mit zwei hintereinander liegenden Proteinkinasedomänen (Brueggeman *et al.* 2002) und *Ve* gehört wahrscheinlich zu einer neuen Gruppe von Zelloberflächen-Glycoproteinen mit für R-Gene bisher nicht beschriebenen Sequenzstrukturen (Kawchuk *et al.* 2001).

Durch den Austausch von Domänen (*domain swapping*) und sogenanntes *gene shuffling* kann herausgefunden werden, welcher Bereich der R-Gene für die spezifische Erkennung von Avr-Genprodukten eine Rolle spielt (Wulff *et al.* 2001). He und Mitarbeiter (2000) arbeiteten in ihrem System mit der LRR-RLK (*receptor like kinase*) BRI1, an die das Steroidhormon Brassinolid bindet, und der LRR-RLK Xa21, die in Reis nach Aktivierung durch Pathogene HR auslöst. Bildete man eine Chimäre aus der LRR-Domäne von BRI1 und der RLK-Domäne von Xa21, wurde nach Brassinolid-Zugabe eine HR ausgelöst. Dieser Versuch zeigt, dass die extrazelluläre LRR-Domäne notwendig für die Ligandenbindung ist und die intrazelluläre RLK-Domäne eine bestimmte Signaltransduktion in Gang setzen kann. Neben der LRR-Region können auch andere Bereiche, wie z. B. die TIR-Domäne, zur Spezifität beitragen (Luck *et al.* 2000).

Ein im Nucleus lokalisierter Rezeptor wird postuliert (Abb. 1.1), da es Avr-Produkte gibt, die eine Transkriptionsaktivierungs-Domäne (AD) enthalten und an doppelsträngige DNA binden können (White *et al.* 2000). Mutationen in der Aktivierungsdomäne eliminieren sowohl die Transkriptionsaktivität als auch die Avirulenz-Funktion. Andererseits bleibt die Avr-Funktion bestehen, wenn die AD mit einer AD aus dem Herpes-Virus ausgetauscht wird (Zhu *et al.* 1999). Ein weiterer Hinweis für R-Genprodukte im Zellkern sind TIR-NBS-LRR

Proteine mit einer zusätzlichen WRKY-Domäne, die vermutlich DNA-Bindung ermöglicht (Jones 2001b; Deslandes *et al.* 2002).

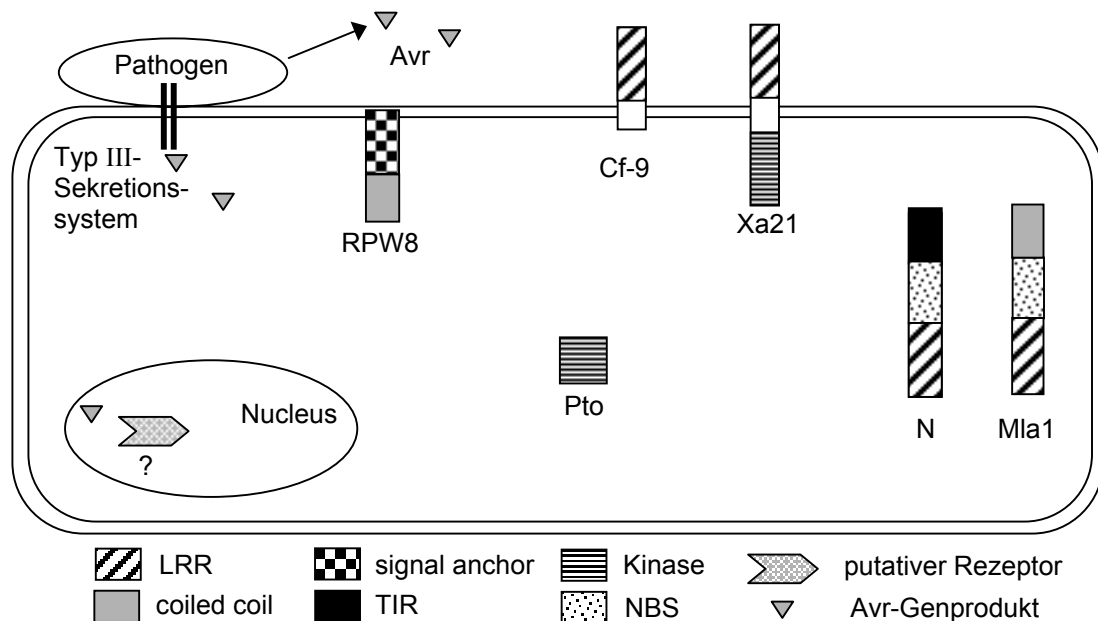


Abb. 1.1 R-Genprodukte und ihre vermutete Lokalisation in der Zelle. Die korrespondierenden Avr-Produkte werden entweder über das Typ III Sekretionssystem in die Zelle sezerniert (Bakterien) oder extrazellulär freigesetzt. Ein R-Genprodukt im Nucleus wird postuliert. Für eine Erklärung der Abkürzungen siehe Erläuterungen im Text.

Mit Ausnahme von Pto und dem NBS-LRR-Protein Pi-ta aus Reis, dass das entsprechende AvrPita-Protein von *Magnaporthe grisea* über die LRR-Domäne bindet (Jia *et al.* 2000), fehlen trotz zahlreicher Versuche häufig die Beweise für eine direkte Interaktion von Avr-Protein und R-Genprodukt (Luderer *et al.* 2001). Deshalb werden neben dem Rezeptor-Liganden Modell zwei weitere Modelle diskutiert (Bonas und Lahaye 2002). Beim leicht abgewandelten Corezeptor-Modell geht man davon aus, dass das Avr-Produkt spezifisch an eine Bindestelle eines Corezeptors bindet, welcher dann mit dem R-Genprodukt interagiert. Dieses Modell könnte die Interaktion von Avr9 mit Cf-9 erklären, denn es konnte zwar nachgewiesen werden, dass Avr9 spezifisch an die Membranen von Tomatenzellen bindet, die Bindung aber unabhängig von der Präsenz des Cf-9 Genprodukts ist (Koomans-Gersmann *et al.* 1996). Diese Beobachtung ließe sich so deuten, dass Avr9 mit einem ubiquitär vorkommenden Membranprotein einen Komplex bildet, der dann an Cf-9 bindet und so die Signalübertragung auslöst. Das sogenannte Wächter-Modell (*guard model*) beschreibt die Hypothese, dass R-Genprodukte pflanzliche Proteine "überwachen", die das Ziel von Avr-Genprodukten sind. Durch die Interaktion von Avr-Genprodukten mit diesen Pathogenitätszielen wird normalerweise die Entwicklung des Pathogens positiv beeinflusst.

Erkennt aber ein R-Genprodukt den Avr-Pathogenitätsziel-Komplex, löst es eine Resistenzantwort aus (Van der Biezen und Jones 1998; Dangl und Jones 2001). Dieses Modell könnte auch die mehrfache Erkennungskapazität einiger R-Gene erklären, da unterschiedliche Avr-Produkte das gleiche Zielprotein haben können. So vermittelt z.B. RPM1 aus *Arabidopsis* Resistenz gegenüber zwei unabhängigen Avr-Genprodukten aus *Pseudomonas syringae* (Grant *et al.* 1995).

1.5 Signaltransduktion nach Pathogenbefall

Die Erkennung eines Pathogens durch die Pflanzenzelle hängt von Elicitoren ab, die vom angreifenden Organismus generiert werden. Diese können entweder rassenunspezifisch sein, wie pilzliche oder pflanzliche Zellwandfragmente, die während des Infektionsprozesses frei werden, oder sie werden durch Avirulenzgene (Kap. 1.4) codiert. Eine der ersten Reaktionen nach Erkennung des Pathogens ist das Öffnen von Ionenkanälen, das zu einem Efflux von Kalium- und Chloridionen und einem Influx von Calciumionen (Ca^{2+}) führt (Jabs *et al.* 1997; Zimmermann *et al.* 1997; Scheel 1998). Ca^{2+} ist ein *second messenger*, dessen Konzentration im Cytosol durch viele Stimuli, einschließlich pilzliche Elicitoren, erhöht werden kann (Sanders *et al.* 2002). Eine reizabhängige Spezifität kann dabei durch räumlich und zeitlich definierte Ca^{2+} Signaturen (*signatures*) von charakteristischer Größe, Frequenz und Dauer erreicht werden (McAinsh und Hetherington 1998; Trewavas 1999). Blume *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Gabe eines Oligopeptidelicitors zu einer Petersilienzellkultur in einem raschen transienten Anstieg der cytoplasmatischen freien Ca^{2+} -Konzentration resultierte, gefolgt von einer längerfristigen, nur schwach erhöhten Ca^{2+} -Konzentration. Letztere wird für die Aktivierung Abwehr-assoziiierter Antworten benötigt. Die Signalweiterleitung erfolgt einerseits über Calmodulin und Calmodulin-ähnliche Proteine, die als Ca^{2+} -Rezeptor fungieren und durch Bindung an Interaktionspartner deren Aktivität regulieren. Calciumionen können aber auch an verschiedenste Proteine wie Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPKs; Harper *et al.* 1991), Phosphatasen, Ionenkanäle und Ca^{2+} -aktivierte Phospholipasen (Blumwald *et al.* 1998) direkt binden. Weitere wichtige Signalmoleküle sind Reaktive Sauerstoffintermediate wie H_2O_2 , die im *oxidative burst* entstehen (Kap. 1.2), und Stickstoffmonoxid (NO). Über 150 Gene werden durch H_2O_2 differentiell reguliert (Desikan *et al.* 2001b), darunter auch viele Abwehrgene (Levine *et al.* 1994). Die Bedeutung von NO in Pflanzen bei der Pathogenabwehr wurde zuerst von Delledonne *et al.* (1998) und Durner *et al.* (1998) beschrieben. Danach verstärkt NO die Induktion des Hypersensitiven Zelltods und ist in der Lage, Abwehrgene anzuschalten.

Wahrscheinlich agiert NO über cyclisches GMP (cGMP) als *second messenger*, in dem es eine Guanylatcyclase aktiviert (Durner *et al.* 1998; Clarke *et al.* 2000). Neben den bereits genannten Molekülen mehren sich die Hinweise für die Beteiligung von heterotrimeren und kleinen G-Proteinen (Aharon *et al.* 1998; Allen *et al.* 1999; Schultheiss *et al.* 2002), 14-3-3 Proteinen (Finnie *et al.* 1999) und Phospholipidderivaten wie IP₃ (Inosit-1,4,5-triphosphat) und Phosphatidsäure (Trewavas 2000; Munnik 2001) an der Signaltransduktion bei Pathogenbefall. Zu den Phytohormonen, die bei der pflanzlichen Pathogenabwehr eine Rolle spielen, gehören Salizylat (SA), Jasmonat (JA) und Ethylen (de Jong *et al.* 2002; Pieterse und van Loon 1999; Vijayan *et al.* 1998).

Die meisten Signalmoleküle sind in der Lage, verschiedene Proteinkinasen zu aktivieren. Gezeigt ist das unter anderem für Ca²⁺ (Harper *et al.* 1991), H₂O₂ (Kovtun *et al.* 2000; Desikan *et al.* 2001a) und NO (Kumar und Klessig 2000; Clarke *et al.* 2000). Es gibt hunderte von verschiedenen Proteinkinasen, die unterschiedliche Zielproteine phosphorylieren und so deren Aktivität beeinflussen. MAP (*mitogen activated protein*) Kinasen z.B. wirken in Kaskaden, die aus drei Kinase-Modulen bestehen (Abb. 1.3). Die strukturell heterogenste Gruppe bilden dabei die MAPKK Kinasen (K für Kinase), die durch verschiedene Reize aktiviert werden und dann MAPK Kinasen an bestimmten Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren. Das einzig bekannte Substrat für MAPK Kinasen sind MAP Kinasen, die in ihrem aktiven Zentrum an einem hoch konservierten TxY Motiv (T = Threonin, x = Aspartat oder Glutamat, Y = Tyrosin) phosphoryliert werden und, so aktiviert, Zielproteine wie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Um eine konstitutive Aktivierung der Proteinkinasen zu verhindern, werden sie durch Phosphatasen wieder dephosphoryliert (Luan 1998).

Nach Pathogenbefall bzw. Elicitorgabe werden mehrere MAP Kinasen in Pflanzenzellen aktiviert (Ligterink *et al.* 1997; Romeis *et al.* 1999; Cardinale *et al.* 2000; Desikan *et al.* 2001a). Neben einer Aktivierung auf posttranslationaler Ebene kann auch ihre Transkription induziert werden (Romeis *et al.* 1999).

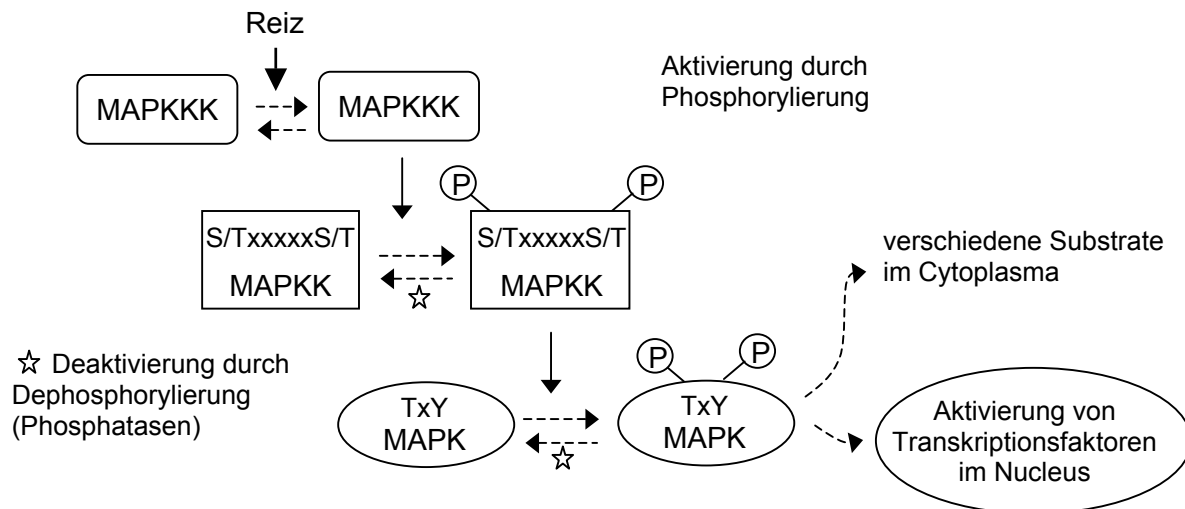


Abb. 1.3 Regulation von MAP Kinase Kaskaden. Eine inaktive MAP Kinase wird durch Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin in der Sequenz TxY (x = Aspartat oder Glutamat) durch eine MAPK Kinase aktiviert. Diese wird wiederum durch Phosphorylierung von Serin/Threonin in der Sequenz S/TxxxxxS/T durch eine MAPKK Kinase aktiviert. Auf der linken Seite sind die inaktiven, rechts die aktivierten Zustände dargestellt (nach Mizoguchi *et al.* 1997, Ichimura *et al.* 2002).

Alle Signalelemente fügen sich zu einem komplexen Netzwerk zusammen, das noch lange nicht vollständig entschlüsselt ist. Ein *cross talk* zwischen den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen resultiert vermutlich in einem großen regulatorischen Potential und hilft der Pflanze vielleicht, bestimmten Abwehrwegen den Vorzug vor anderen zu geben (Pieterse und van Loon 1999).

1.6 Das Gerste-Mehltaupilz Pathosystem

Die monokotyle Kulturpflanze Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und wird hauptsächlich als Nahrungsmittel (Brot, Graupen, Grütze), Futtergetreide (Geflügel- und Schweinemast) sowie zur Bierproduktion genutzt. Das Gerstengenom ist auf sieben Chromosomen verteilt und mit einem C-Wert von 5,4 Mbp wesentlich kleiner als das des Saatweizens, jedoch ungefähr doppelt so groß wie das menschliche Genom. 70-80 % der chromosomalen DNA wird von repetitiven Sequenzen gebildet (Graner und Altschmied 2001).

In Europa wird Sommer- und Wintergerste angebaut. Die lange Vegetationsperiode, hohe Stickstoff-Düngung und ein relativ kühles und feuchtes Klima sind ideale Bedingungen für eine der wichtigsten Gerstenkrankheiten, den Echten Mehltau (Thordal-Christensen *et al.* 1999). Der Erreger ist der Ascomycet *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (Bgh). Dieser obligat biotrophe Ektoparasit wächst auf der Blattoberfläche und ernährt sich über Haustorien, die er in die Epidermiszellen der Wirtspflanze einsenkt (Abb 1.4b).

Der vegetative Entwicklungszyklus beginnt mit der Keimung einer haploiden Mehltauspore (Konidie) nach ihrer Landung auf der Oberfläche von Gerstenblättern. Innerhalb von zwei Stunden entwickelt sich ein kurzer primärer Keimschlauch (PKS), der der Befestigung der Konidie auf der Blattoberfläche, der Wasseraufnahme und der Wirtserkennung dient (Carver *et al.* 1995; Pryce-Jones *et al.* 1999). Unterhalb des PKS sind bereits nach kürzester Zeit Cytoplasmaaggregationen in der Epidermiszelle zu beobachten, denen die Bildung von Papillen (Zellwandauflagerungen) folgt (Beckhove *et al.* 1996). Ein sekundärer oder appressorialer Keimschlauch (AKS) wächst nach der Etablierung des PKS aus und entwickelt an seiner Spitze ein Appressorium, von dem aus ein Penetrationskeil 12-15 Stunden nach Beginn der Keimung versucht, die pflanzliche Zellwand zu durchbrechen. Die Penetration erfolgt dabei anscheinend durch mechanische Kraft, im Appressorium entwickelt sich ein Turgordruck von 2-4 MPa, und durch die Aktivität von Cutinasen, Cellulasen und ähnlichen lytischen Enzymen, welche die Zellwand auflösen (Pryce-Jones *et al.* 1999). Wird der erste Penetrationsversuch von der Epidermiszelle durch effektive Papillenbildung abgewehrt, versucht der Pilz es oft ein zweites und sogar ein drittes Mal mit sinkenden Erfolgsaussichten (Thordal-Christensen *et al.* 1999). Ist die Penetration dagegen erfolgreich, bildet der biotrophe Pilz sein Ernährungsorgan, das Haustorium aus, über das er Nährstoffe aus der Pflanze aufnimmt. Das fingerförmige Haustorium entwickelt sich dabei aus einem Haustoriuminitial durch Einstülpung der pflanzlichen Plasmamembran und wird von einer extrahaustorialen Matrix umgeben.

Bei einer kompatiblen Interaktion entwickeln sich vom Appressorium aus sekundäre Hyphen (ESH, *elongated secondary hyphae*), die sich verzweigen und sekundäre Haustorien in weitere Epidermiszellen senken. Nach 5-6 Tagen wachsen aus dem Mycel senkrecht zur Oberfläche Sporenträger, von denen sich reife Konidien abschnüren und durch den Wind verbreitet werden. Der Befall der Pflanzen wird durch weiße mehligte Pusteln sichtbar (Abb. 1.4a). Bei der geschlechtlichen Fortpflanzung entstehen, meist gegen Ende einer Vegetationsperiode, Kleistothezien (Fruchtkörper) mit bis zu 25 Asci, die nach einer Meiose acht Ascosporen enthalten. Der Fruchtkörper dient als Überdauerungsorgan und quillt nach Wasseraufnahme, platzt auf und die Ascosporen werden frei (Agrios 1997; Schlösser 1997).

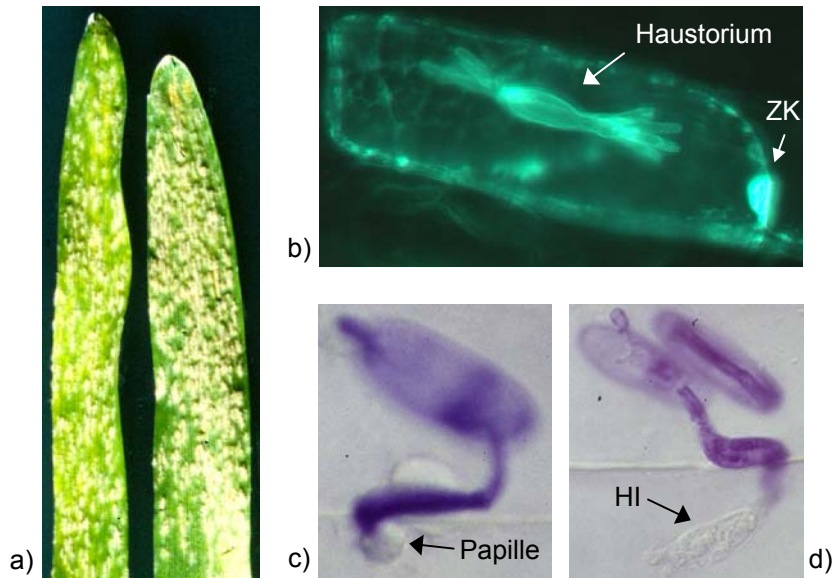


Abb. 1.4 Entwicklung des Echten Mehltaupilzes auf Gerste. Ist die Pflanze suszeptibel, werden nach ca. einer Woche die "Mehltaupusteln" auf dem Blatt sichtbar (a). Abb. b) zeigt das Ernährungsorgan (Haustorium) des Pilzes in einer Epidermiszelle, die mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) transient transformiert wurde, ZK: Zellkern. In den Abb. c) und d) wurde der Pilz mit essigsaurer Tinte angefärbt. In c) wurde das Wachstum durch Papillenbildung 13 hpi gestoppt (Gerstensorte mit R-Gen *Mlg*). In d) konnte der Pilz in die Epidermiszelle eindringen und 24 hpi ein unreifes Haustorium (HI: *haustorium initial*) ausbilden. (Fotos von C. Jansen und C. Eckey)

Die Gerste-Mehltaupilz Interaktion hat als experimentelles System einige Vorteile. Bei großer Inokulationsdichte wird eine hohe Angriffsrate erzielt, die Pilzsporen entwickeln sich synchron, der Infektionsprozeß ist bereits gut untersucht und von Gerste stehen viele nahezu isogene Linien (NILs), die verschiedene Resistenzgene im gleichen genetischen Hintergrund tragen, zur Verfügung (Collinge *et al.* 2002).

1.7 Resistenzen im Pathosystem Gerste-Echter Mehltaupilz

Mehr als 85 rassenspezifische Resistenzgene wurden in Gerste gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* identifiziert (Jørgensen 1994). Über die Funktion und Identität der meisten Resistenzgene ist nicht viel bekannt, eine Ausnahme macht hierbei der *Mla*-Resistenzgenlocus (Kap. 1.7.2). Auch mit Gerstenlinien, die das Resistenzgen *Mlg* tragen, sind einige Arbeiten gemacht worden, der *Mlg*-Locus konnte aber bislang nicht identifiziert werden (Kap. 1.7.3). Neben diesen Resistenzgenen, die die Avirulenzgenprodukte ganz bestimmter Rassen von *Bgh* erkennen (*Mla12* und *Mlg* z.B. die Rasse A6), ist noch eine ebenfalls monogenische, jedoch rassenspezifische Resistenz gegenüber *Bgh* bekannt (Kap. 1.7.1).

1.7.1 Rezessive *mlo*-Allele vermitteln rassenunspezifische Resistenz

1942 wurde erstmals eine ursprünglich anfällige Gerstenlinie beschrieben, die durch Mutagenese resistent gegenüber allen getesteten Gerstenmehltaupilzisolaten geworden war (Jørgensen 1992). Unabhängig davon fand eine deutsche Expedition 1937-38 in Äthiopien Gerstenlinien mit breiter Resistenz gegen sämtliche Rassen von *Bgh* (Schulze-Lefert und Vogel 2000). Es zeigte sich später, dass beide Resistenzen durch das gleiche rezessive Gen, *mlo*, kontrolliert werden. Bei der durch *mlo*-Allele vermittelten Pathogenabwehr handelt es sich um eine Penetrationsresistenz, begleitet von einer schnellen Bildung von Zellwandappositionen (Papillen) und einer Akkumulation von Phytoalexinen, PR-Transkripten und H_2O_2 (Peterhänsel 1997; von Röpenack *et al.* 1998; Hückelhoven *et al.* 1999). Diese Reaktionen laufen auch in *Mlo*-tragenden Pflanzen ab, sie sind jedoch in *mlo*-tragenden Gerstenlinien schneller induzierbar (Peterhänsel 1997; von Röpenack *et al.* 1998). Die Funktion von *mlo* hängt von zwei weiteren Proteinen ab, Ror1 und Ror2 (*required for mlo-specified resistance*). Mutationen in diesen Loci führen zu Penetrationsraten von 10-30 % (Freialdenhoven *et al.* 1996). 1997 gelang Büschges und Mitarbeiter (1997) über einen *chromosome landing*-Ansatz die Isolierung von *Mlo*. MLO stellt eine neue Proteinfamilie in Pflanzen dar, ist mit sieben transmembranen Helices in der Plasmamembran verankert und hat Ähnlichkeit mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus tierischen Systemen (Devoto *et al.* 1999). In Arbeiten von Kim *et al.* (2002a,b) ließ sich die Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen an der Funktion von MLO nicht bestätigen, statt dessen konnte gezeigt werden, dass MLO Ca^{2+} -abhängig mit Calmodulin interagiert und seine Funktion so abhängig von Ca^{2+} moduliert werden kann. Man geht davon aus, dass MLO ein negativer Regulator von Abwehrmechanismen gegen das biotrophe Pathogen *Bgh* ist (Schulze-Lefert und Vogel 2000; Kim *et al.* 2002a,b), weshalb ein Funktionsverlust (*mlo*) Resistenz vermittelt. Andererseits unterstützt *mlo* die Entwicklung nekrotropher und hemibiotropher Pathogene (Jarosch *et al.* 1999; Kumar *et al.* 2001). Dies geschieht vielleicht durch das Absterben von Mesophyllzellen unterhalb der attackierten Epidermiszellen (Wolter *et al.* 1993; Piffanelli *et al.* 2002) oder durch antagonistische Regulation der Resistenzwege.

Die rassenunspezifische Resistenz durch *mlo* gegenüber Mehltau ist seit vielen Jahren trotz intensiver Nutzung im Feld stabil (Jørgensen 1992; Heitefuss 2001).

1.7.2 Rassenspezifische Resistenz vermittelt durch Allele des *Mla*-Locus

Das *Mla*-Resistenzgencluster erstreckt sich über 240 kb und enthält drei Familien von NBS-LRR Resistenzgenhomologen (Wei *et al.* 1999), die dominant vererbt werden und Resistenz gegenüber bestimmten *Bgh* Rassen vermitteln. Dabei gelingt es dem Pilz, in die Epidermiszelle einzudringen, er wird dann aber durch die Ausprägung einer HR gestoppt (Görg *et al.* 1993, Peterhänsel *et al.* 1997, Schiffer *et al.* 1997). Die HR erfolgt entweder in der attackierten Epidermiszelle, oder in darunter liegenden Mesophyllzellen und wird durch die Akkumulation von H₂O₂ begleitet (Hückelhoven *et al.* 2000). Für den *Mla12*-vermittelten Resistenzweg wurden zwei notwendige Gene identifiziert, *Rar1* und *Rar2* (*required for Mla-specified resistance*; Freialdenhoven *et al.* 1994). *Rar1* codiert für ein cytoplasmatisches Protein mit zwei Zink-bindenden CHORD-Motiven (*cysteine- and histidine-rich domain*) und wird auch noch in der Signaltransduktion von anderen Resistenzgenen genutzt (Shirasu *et al.* 1999; Schulze-Lefert und Vogel 2000). In *Arabidopsis* und *Nicotiana benthamiana* konnten Homologe zu RAR1 identifiziert werden und es zeigte sich, dass seine Funktion zwischen den dikotylen Pflanzen und der monokotylen Gerste konserviert ist (Muskett *et al.* 2002; Tornero *et al.* 2002; Liu *et al.* 2002). RAR1 interagiert mit einem pflanzlichen SGT1-Homolog (Austin *et al.* 2002; Azevedo *et al.* 2002), welches in Tieren eine Komponente des SCF-Komplexes (*Skp1-Cullin-F-box*) darstellt. Dieser Komplex führt Proteine einem Ubiquitin-abhängigen Abbau im 26 S Proteosom zu. Eine mögliche Aufgabe des pflanzlichen SGT1 wäre es, Resistenz-regulierende Proteine für die Degradation über spezifische SCF-Komplexe kenntlich zu machen. Die Zielproteine könnten im Fall der *Mla*-vermittelten Resistenz negative Regulatoren des Zelltods sein (Azevedo *et al.* 2002). Als erste Resistenzgene des *Mla*-Clusters konnten *Mla1* (Zhou *et al.* 2001) und *Mla6* (Halterman *et al.* 2001) kloniert werden. Beide codieren für ein Resistenzprotein des CC-NBS-LRR-Typs (Kap. 1.4) und haben sehr ähnliche Sequenzen (91 % Identität auf Aminosäureebene; Halterman *et al.* 2001), erkennen aber verschiedene Avr-Genprodukte. Außerdem benötigt die Resistenzinduktion durch *Mla6 Rar1*, wohingegen die von *Mla1* ausgehende Signaltransduktion von *Rar1* unabhängig ist (Zhou *et al.* 2001). *Mla1* und *Mla6* benutzen somit unterschiedliche Signaltransduktionswege.

1.7.3 Das Resistenzgen *Mlg*

Das R-Gen *Mlg* vermittelt monoallelisch und semi-dominant Resistenz gegenüber bestimmten Rassen des Gerstenmehltaupilzes. Das Pathogen wird dabei durch effektive Papillenbildung gestoppt. Die sich häufig anschließende HR hat, anders als bei der *Mla12* vermittelten Abwehr, keinen Einfluß mehr auf die Resistenz (Görg *et al.* 1993; Schiffer *et al.* 1997). Nach Freialdenhoven *et al.* (1994) agiert *Mlg* unabhängig von dem für die Signaltransduktion vieler R-Gene notwendigen *Rar1*. Peterhänsel und Mitarbeiter (1997) konnten jedoch auf mikroskopischer Ebene eine *rar1-2* abhängige Unterdrückung der *Mlg*-Resistenz anhand einer leicht erhöhten Penetrationsrate feststellen. Die bei der rassenunspezifischen *mlo*-Resistenz wichtigen Komponenten Ror1 und Ror2 spielen keine Rolle bei der *Mlg*-vermittelten Resistenz (Peterhänsel *et al.* 1997).

Die in Gerste durch DCINA chemisch induzierte Resistenz (Kap. 1.3) gegenüber *Bgh* (Kogel *et al.* 1994; Beßer *et al.* 2000) zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit der *Mlg*-vermittelten Abwehr. Dabei wird das Wachstum des Pilzes durch Papillen gestoppt, gefolgt von einer HR in den attackierten Zellen. Kogel *et al.* (1994) sprechen von einer Phänokopie auf zytologischer Ebene.

Obwohl bekannt ist, dass *Mlg* auf dem Gerstenchromosom 4 in der Nähe des Centromers liegt (Görg *et al.* 1993; Kurth *et al.* 2001), konnte es bisher nicht isoliert werden. Die Rekombination ist in diesem Bereich stark unterdrückt, was sich im Verhältnis von physikalischer zu genetischer Distanz in der *Mlg*-Region widerspiegelt. Das Verhältnis ist ungefähr zehnmal größer als im Durchschnitt (1 cM entspricht im Mittel einer Länge von 3 Mb in Gerste; Künzel *et al.* 2000; Kurth *et al.* 2001). Zusammen mit der Größe des Gerstengenoms und der Häufigkeit repetitiver Sequenzen erschwert das die kartengestützte Klonierung von *Mlg*. Görg *et al.* (1993) und Kurth *et al.* (2001) konnten flankierende Marker für *Mlg* kartieren, die einen Bereich von 4,5 cM umspannen. Für einen erfolgversprechenden *chromosome landing* Ansatz in dieser Zielregion sollten jedoch Marker gefunden werden, die nicht weiter als 0,05 cM voneinander entfernt liegen (Kurth *et al.* 2001). Die kolineare Anordnung von Genen in Gräsern (Devos und Gale 1997) kann manchmal genutzt werden, um Marker im kleinsten untersuchten Genom von Getreiden mit wenig repetitiver DNA, dem Reisgenom, zu suchen und dann auf Gerste zu übertragen. Kurth und Mitarbeiter (2001) stellten jedoch fest, dass verschiedene Marker für *Mlg* auf fünf unterschiedlichen Reischromosomen kartieren, was einen Syntäniebruch zwischen Reis und Gerste in der *Mlg*-Region zeigt.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Bei der rassenspezifischen Resistenz fungieren R-Genprodukte als Rezeptoren für von dem angreifenden Pathogen freigesetzte Elicitoren und lösen eine Signaltransduktion aus, die letztlich zu Abwehrreaktionen der Pflanze führt. Die Identifizierung von Resistenzgenen und ihren Produkten kann wichtige Hinweise auf ihre Funktion, die von ihnen ausgelöste Signalkette und mögliche Interaktionspartner liefern. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit, das R-Gen *Mlg* zu identifizieren, welches in Gerste Resistenz gegenüber bestimmten Rassen von *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) vermittelt. Da klassische kartengestützte Klonierungsstrategien bislang erfolglos waren (Kurth *et al.* 2001), sollte die Isolierung über eine differentielle Darstellung der mRNA-Transkripte in *Mlg*- und *mlg*-Gerstenlinien mit Hilfe des cDNA-AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) erfolgen. Gleichzeitig konnten über diesen Ansatz neue Marker für den R-Genlocus *Mlg* entwickelt werden.

Eine weitere Intention war die Identifizierung *Bgh*-induzierter bzw. -reprimierter Gene der Gerste. Mit der Methode des cDNA-AFLP sollten parallel zu der Suche nach *Mlg*-spezifischen Genfragmenten Unterschiede in der Transkriptakkumulation zwischen nicht infizierten und mit *Bgh* inokulierten Pflanzen dargestellt werden. Dabei wurde durch früh gewählte Untersuchungszeitpunkte während der Interaktion ein Schwerpunkt auf die Isolierung von Komponenten der frühen Abwehr und Signaltransduktion gesetzt. Neben einer Charakterisierung dieser Gene auf Expressionsebene sollte einigen von ihnen im transienten Transformationsassay nach Schweizer *et al.* (1999a, 2000) durch *silencing* mittels RNA Interferenz (RNAi) oder Überexpression eine Funktion in der Gerste-*Bgh* Interaktion, das heißt bei der Ausbildung von Resistenz oder Suszeptibilität, zugeordnet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für diese Arbeit wurden verschiedene Paare von nahezu-isogenen Gerstenlinien (*Hordeum vulgare* L.) verwendet (Tab. 2.1). In anfällige Elternlinien war das Resistenzgen *Mlg*, welches Resistenz gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz der Rasse A6 vermittelt, eingekreuzt. Durch Wiederholung von Rückkreuzungen mit dem suszeptiblen rekurrenten Elter wurden Linien generiert, deren genetischer Hintergrund nahezu völlig mit dem des suszeptiblen rekurrenten Elter übereinstimmt. Lediglich das *Mlg* Gen mit den flankierenden Regionen des Donors, das introgressierte Fragment, weicht von diesem Genotyp ab. Die introgressierten Fragmente der unterschiedlichen Rückkreuzungslinien sind verschieden groß (Görg *et al.* 1993).

Tab. 2.1 Suszeptible und resistente (*Mlg*-tragende) Gerstenlinien.

Suszeptible rekurrente Elternlinie (<i>mlg/mlg</i>)	Resistente <i>Mlg</i> -Rückkreuzungslinie (<i>Mlg/Mlg</i>)	Resistente <i>Mlg</i> -Donorlinie (<i>Mlg/Mlg</i>)
I Ingrid	IGf ILi IMy IPb IR4 IWe	Gf Goldfoil Li Line 4831 My Maryland Pb Palmella Blue R4 Rinn 4 We Weihenstephan
P Pallas	PDe	De Deba
S Siri	SDe	De Deba
Mi Manchuria _{isogen}	MiGf	Gf Goldfoil

Die Gerstensorte Ingrid und ihre Rückkreuzungslinien wurden von James McKey, University of Uppsala, Schweden, zur Verfügung gestellt. Die Sorten (cv.) Pallas und Siri mit ihren entsprechenden Rückkreuzungen stammen von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark.

Manchuria_{isogen} und MiGf wurden von Herrn Bockelman, National Small Grains Collection, Aberdeen, USA, die Sorte Golden Promise von Paul Schulze-Lefert, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, bereit gestellt.

Der Winterweichweizen cv. Kanzler für die Vermehrung des Echten Weizenmehltaus wurde von der Saatgutanstalt Engelen-Büchling oHG, Büchlingen/Oberschneiding bezogen.

Für die Anzucht der Pflanzen wurde das Saatgut 24 h im Dunkeln vorgekeimt und anschließend in Vierkanttöpfe (8 x 8 cm) mit Einheitserde Typ ED 73 (Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa) ausgelegt. Für Inokulations-

experimente wurden fünf gleichmäßig gekeimte Samen an eine Seite des Topfes gelegt, ca. 1 cm mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Die Gerste wuchs in Klimakammern bei 16-18 °C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit ca. $60 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Nach sieben Tagen waren die Primärblätter in der Regel für Experimente groß genug.

Bei der Pflanzenanzucht für Versuche mit transienter Transformation wurde auf das Vorkeimen verzichtet, 30-50 Körner wurden direkt in den Vierkanttopf gegeben und ansonsten so verfahren wie beschrieben.

2.2 Pathogenmaterial

2.2.1 Der Echte Gerstenmehltaupilz

Für die Inokulation der Gerstenpflanzen wurde immer Inokulum vom Echten Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* Speer) der Rasse A6 (*BghA6*) verwendet.

BghA6 wurde von Jörn Pons-Kühnemann, Institut für Biometrie, JLU Gießen, zur Verfügung gestellt und trägt die Avirulenzgene *Mla12* und *Mlg*, die Interaktion mit *Mlg*-tragenden Gerstensorten verläuft somit inkompatibel. Die Nachzucht des Pathogens erfolgte in Klimakammern (16-18 °C, 60 % relativer Luftfeuchte, 16 h Lichtperiode mit ca. $60 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) auf sieben Tage alten suszeptiblen Gerstenpflanzen cv. Golden Promise. Nach einer Woche sporulierte der Pilz und das Inokulum konnte für Versuche genommen werden.

2.2.2 Der Echte Weizenmehltaupilz

Für Versuche mit dem Echten Weizenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, *Bgt*) wurde ein in Aachen von Ulrich Beckhove, IPAZ Gießen, isoliertes Freilandisolat genutzt. Vermehrt wurde *Bgt* auf der Weizensorte Kanzler unter den gleichen Bedingungen wie *Bgh*.

2.3 Behandlung des Pflanzenmaterials

2.3.1 Inokulation mit *Blumeria graminis*

Für die Darstellung differentieller Genaktivität nach Inokulation mit Mehltau war das Ziel eine möglichst dichte Inokulation der Gerstenblätter mit Konidiosporen. Dafür wurden die Töpfe randomisiert mit der adaxialen Seite der Blätter nach oben auf ein Tablett gelegt, Sporenmaterial von befallenen Pflanzen in einem Inokulationsturm darüber abgeschüttelt

und durch Luftverwirbelung möglichst gleichmäßig verteilt. Nach 15 min wurden die Töpfe umgedreht und die abaxiale Blattseite inokuliert. Mit den Kontrollpflanzen wurde genauso verfahren, nur dass auf das Abschütteln der Sporen verzichtet wurde (*mock*-Behandlung).

Je nach Fragestellung wurden Blätter zu bestimmten Zeitpunkten, z.B. vier und 12 Stunden nach Inokulation (h post Inokulation, hpi), geerntet, das heißt abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3.2 Applikation des chemischen Resistenzinduktors BTH

Das mit Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-*S*-methylester (BTH, auch Azibenzolar-*S*-methyl, CGA245704, Bion[®], Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz) behandelte Probenmaterial wurde von Katrin Beßer, IPAZ Gießen, zur Verfügung gestellt.

BTH wurde als Formulierung von 50 % aktiver Substanz mit *wettable powder* (WP) in Wasser in einer Konzentration von 125 mg L⁻¹ auf 5-8 Tage alte Gerstenkeimlinge der Sorte Manchuria gesprüht, bis die Blätter gleichmäßig von feinen Tröpfchen bedeckt waren.

2.3.3 Verwundung

Sieben Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) wurden durch vorsichtiges Einreiben mit dem Abrasiv Carborund (Korngröße 320 mesh, Schleifmittelwerke Butzbach) mechanisch verletzt. Blätter wurden kurz vor der Behandlung, sowie 10, 30, 60 min, 2, 4, 12 und 24 h nach Verwundung geerntet.

2.4 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels cDNA-AFLP

Mittels cDNA-AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) lässt sich differentielle Genaktivität darstellen. In der vorliegenden Arbeit ging es auf der einen Seite um die Identifizierung Pathogen-responsiver Gene, weshalb eine Hälfte der Gerstenpflanzen mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* inokuliert wurde. Die für die Darstellung gewählten Zeitpunkte 4 und 12 hpi entsprechen in etwa der Ausbildung des primären bzw. sekundären pilzlichen Keimschlauchs, die von der Pflanze durch zwei Transkriptakkumulationsphasen begleitet ist (Davidson *et al.* 1988, Clark *et al.* 1993, Gregersen *et al.* 1997).

Auf der anderen Seite wurden zwei Paare nahezu-isogener Linien (NILs), Ingrid (I, *mlg/mlg*) und Ingrid-Weihenstephan (IWe, *Mlg/Mlg*) sowie Manchuria_{isogen} (Mi, *mlg/mlg*) und Manchuria_{isogen}-Goldfoil (MiGf, *Mlg/Mlg*), gewählt, um das Resistenzgen *Mlg* oder zumindest Marker, die in der Nähe von *Mlg* liegen, zu identifizieren. I und IWe wurden

ausgesucht, da IWe das kleinste *Mlg*-tragende introgressierte Fragment der untersuchten Rückkreuzungslinien enthält (Görg *et al.* 1993). Mi und MiGf wiederum haben den größten genetischen Abstand im genetischen Hintergrund zu allen anderen NILs (M. Korell, unveröffentlicht). Genfragmente, die ausschließlich in den *Mlg*-tragenden Linien IWe und MiGf gefunden werden, liegen somit im Genom mit großer Wahrscheinlichkeit zumindest in der Nähe von *Mlg*.

Die Methode des cDNA-AFLP beginnt mit dem Verdau von cDNA mit einem oder zwei Restriktionsenzymen. An die Schnittstellen ligiert man Adaptoren, deren bekannte Sequenz Ausgangspunkt für die Amplifizierung der cDNA-Fragmente über PCR (*polymerase chain reaction*) ist. Für eine erste Vervielfältigung des gesamten Adaptor-ligierten cDNA-Pools werden Primer, die nur auf die Adaptor-Sequenz passen, benutzt. Bei einer zweiten, selektiven PCR werden Primer mit zwei selektiven Nucleotiden am 3'Ende eingesetzt, so dass nur noch ein Teil der gesamten cDNA amplifiziert wird. Einer der Primer ist Fluoreszenz- oder radioaktiv markiert, damit die cDNA-Fragmente auf einem Polyacrylamidgel sichtbar werden. Schließlich werden die Fragmente aus dem Gel isoliert, kloniert und sequenziert.

Dem cDNA-AFLP in dieser Arbeit liegt ein Protokoll von Remy Bruggmann, Institut für Pflanzenbiologie, Zürich, Schweiz, zugrunde, das sich von der Originalfassung von Bachem *et al.* (1996, im Internet unter <http://www.spg.wau.nl/pv/staff/AFLP.htm>) hauptsächlich durch die Wahl anderer Restriktionsenzyme unterscheidet.

2.4.1 RNA-Extraktion

Zur Extraktion von Gesamt-RNA wurden fünf Primärblätter in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert und anschließend die RNA aus ca. 300 mg Pflanzenmaterial auf Basis einer Guanidinthiocynat/Phenol-Extraktion mit *RNA clean* (AGS, Heidelberg) gemäß Herstellerangaben extrahiert. Das so gewonnene RNA-Pellet wurde in Milli-Q Wasser (Millipore, Eschborn) gelöst und 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg). Die in Lösung befindliche RNA wurde von dem nun entstandenen Pellet abgenommen und bei -70 °C aufbewahrt.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch (Photometer DU 7400, Beckman, München). Dafür wurde die RNA-Lösung 1:250 mit Milli-Q Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm ($OD_{260\text{ nm}} = 1$ bei 40 µg RNA mL⁻¹) gemessen. Die Qualität der RNA wurde im denaturierenden Agarosegel (Kap. 2.10.3.1) überprüft.

2.4.2 poly-A⁺ RNA-Isolierung

Die Isolierung von poly-A⁺ RNA erfolgte mittels Dynabeads[®] Oligo(dT)₂₅ (Dynal AS, Oslo, Norwegen). Das Prinzip der Isolierung beruht dabei auf Basenpaarungen zwischen der poly(A) Sequenz am 3' Ende der mRNA und einer poly(T) Sequenz, die kovalent an magnetische Partikel gebunden ist. Durch Waschschriffe werden rRNA und tRNA entfernt und schließlich die mRNA mit einem salzfreien Puffer, der die A:T Basenpaarung aufhebt, eluiert.

Für jeden Probenansatz wurden zweimal 100 µg Gesamt-RNA mit 250 µL Dynabeads[®] Oligo(dT)₂₅ behandelt. Das Vorgehen erfolgte ohne Abänderungen nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der poly-A⁺ RNA wurde photometrisch wie für RNA beschrieben bestimmt.

- ◆ Binde-Puffer 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 M LiCl
 2 mM EDTA
- ◆ Wasch-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 0,15 M LiCl
 1 mM EDTA
- ◆ Elutionslösung 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

2.4.3 cDNA-Synthese für das cDNA-AFLP

Für die Erststrangsynthese wurden jeweils 1,2 µg poly-A⁺ RNA eingesetzt. Ein Mix von 2 µL Oligo(dT)₁₈ (785 µg mL⁻¹) und 22 µL mRNA + Milli-Q Wasser wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dazu wurden folgende Komponenten pipettiert:

11 µL 5x First Strand Buffer (Gibco[™] BRL, Karlsruhe)
5 µL 0,1 M DTT
10 µL 2 mM dNTP-Mix

Das Gemisch wurde 2 min auf 42 °C erwärmt und dann 2 µL (400 U) SUPERScript[™]II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Gibco[™] BRL, Karlsruhe) dazu pipettiert. Nach 50 min bei 42 °C sollte die Erststrangsynthese abgeschlossen sein.

Für die Zweitstrangsynthese wurden folgende Reagenzien zu dem Erststrangprodukt gegeben:

14 μL	10x Reaktionspuffer
68 μL	Milli-Q Wasser
13 μL	dNTPs (2 mM)
3 μL	DNA Polymerase I (10 U μL^{-1} ; Promega, Madison, USA)
1,5 μL	RNase H (1 U μL^{-1} ; Promega, Madison, USA)

Der Mix wurde 2 h bei 16 °C im *Thermocycler* (Primus 25, MWG-Biotech AG, Ebersberg) inkubiert. Für die folgende Phenol/Chloroform-Extraktion wurden 250 μL Milli-Q Wasser und 400 μL Phenol/Chloroform zu dem Syntheseprodukt pipettiert, gevortext und 5 min zentrifugiert (4 °C, 14000 rpm). Die entstandene wässrige Phase wurde abgenommen, mit 40 μL 3 M NaAc versetzt und anschließend die cDNA mit 800 μL kaltem 96 % EtOH über Nacht bei -20 °C gefällt. Das durch Zentrifugation (20 min, 4 °C, 14000 rpm) entstandene Pellet wurde mit 100 μL 70 % EtOH gewaschen, erneut 15 min zentrifugiert, getrocknet und dann in 40 μL Milli-Q Wasser gelöst.

2.4.4 Verdau der cDNA und Aufreinigung

Die cDNA wurde zuerst 1 h mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* (Erkennungssequenz /GATC, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und dann 1 h mit *NcoI* (Erkennungssequenz C/CATGG, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geschnitten, da bei letzterem bei einem Verdau länger als 1 h *star*-Aktivität auftreten kann. Der verwendete OPA⁺ Puffer (*One-Phor-All Buffer Plus*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ist für beide Restriktionsenzyme geeignet.

Sau3AI-Verdau:

20 μL	cDNA
3 μL	OPA ⁺ Puffer
0,5 μL	MgCl ₂ (25 mM)
6 μL	Milli-Q Wasser
0,5 μL	<i>Sau3AI</i> (10 U μL^{-1})

1 h bei 37 °C

NcoI-Verdau:

30 μL	<i>Sau3AI</i> -Verdau
5 μL	OPA ⁺ Puffer
4,5 μL	Milli-Q Wasser
0,5 μL	<i>NcoI</i> (10 U μL^{-1})

1 h bei 37 °C

Die 40 μL verdauter cDNA wurden mit 40 μL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gevortext und 5 min (4 °C, 14000 rpm) zentrifugiert. Danach wurde die wässrige Phase mit der cDNA über eine Sephadexsäule aufgereinigt. Für diese Säule wurden Sephadex G-25 M Kügelchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), die in 10 mM TrisCl (pH 7,5-8) aufgenommenen waren, in eine gelbe Pipettenspitze gefüllt, die vorher mit Watte verstopft worden war, und über ein Loch im Deckel in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Die Sephadexsäule wurde 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert und das Eluat

verworfen. Anschließend wurde die Probe aufgetragen, 5 min bei RT stehengelassen und durch 1 min bei 2000 rpm eluiert.

2.4.5 Adaptorligation

Für die Herstellung von Adaptoren, die an die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme passen, wurden die Einzelstränge in Form von Primern (MWG-Biotech AG, Ebersberg) bestellt.

◆ AdNcoI s	5'- CCTGTAGACTGCGTACAC
AdNcoI as	5'- CATCTGACGCATGTGGTAC
AdSau3 s	5'- AGCGATGAGTCCTGAG
AdSau3 as	5'- TACTCAGGACTCCTAG

Die as genannten Primer mußten am 5'Ende phosphoryliert sein, damit der Überhang des s Primers durch die *Taq*-Polymerase in der ersten PCR aufgefüllt werden kann. Diese Modifikation wurde bei der Primersynthese angebracht. Die Primer, welche zusammen einen Adaptor bilden sollten, wurden zu gleichen Teilen (je 100 µM) zusammenpipettiert und auf 95 °C im Heizblock erhitzt. Der Heizblock wurde ausgeschaltet und die Primer konnten beim Abkühlen auf Raumtemperatur hybridisieren. Die so gewonnenen Adaptoren (50 µM) wurden auf 2 µM verdünnt.

Die Ligation der Adaptoren an die cDNA fand bei 16 °C für 3 h statt:

Adaptorligation:	40 µL	cDNA-Verdau
	6 µL	Ligationspuffer (Promega, Madison, USA)
	1,2 µL	ATP (10 mM)
	3 µL	<i>Sau3AI</i> Adaptor (2 µM)
	0,3 µL	<i>NcoI</i> Adaptor (2 µM)
	1 µL	Ligase (Promega, Madison, USA)
	8,5 µL	Milli-Q Wasser

Die 60 µL Ligationsansatz wurden mit Milli-Q Wasser auf 100 µL verdünnt.

2.4.6 Präamplifikation

Um den gesamten cDNA-*Pool* zu vervielfältigen, wurde eine PCR mit 20 Zyklen, 5 µL *template* und unspezifischen Primern (N+0, S+0) im *Thermocycler* (Perkin Elmer 2400) gefahren. Die Temperaturänderung während der PCR (*ramping*) darf dabei maximal 1 °C s⁻¹ betragen.

◆ N+0 Primer:	5'- AGACTGCGTACACCATGG
S+0 Primer:	5'- ATGAGTCCTGAGGATC

PCR-Ansatz:	5 µL	<i>template</i> aus dem verdünnten Ligationsansatz
	0,75 µL	N+0 Primer (10 µM)
	0,75 µL	S+0 Primer (10 µM)
	2,5 µL	10x Puffer
	0,5 µL	dNTPs (10 mM)
	0,25 µL	Taq-Polymerase (Qiagen, Heidelberg)
	15,3 µL	Milli-Q Wasser

Thermocycler-Bedingungen:	2 min	94 °C	
	30 s	94 °C	
	1 min	60 °C	20 Zyklen
	2 min	72 °C	
	2 min	72 °C	
	∞	4 °C	

Die Präamplifikation wurde überprüft, indem 3 µL PCR-Produkt auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen wurden. Damit die erwarteten Produkte in der Größenordnung bis 500 bp gut sichtbar waren, wurde ein Auftragspuffer mit Xylen Cyanol anstelle von Bromphenolblau benutzt. Die restlichen 22 µL der Präamplifikation wurden mit 378 µL 0,5x TE verdünnt und bei –20 °C eingefroren.

- ♦ TE: 10 mM Tris/Cl pH 7,5;
0,1 mM EDTA, autoklaviert

2.4.7 Selektive Amplifikation

Der Primer für die seltener vorkommende *NcoI*-Schnittstelle (*NcoI* hat als Erkennungssequenz sechs Basen, *Sau3AI* nur vier) wurde entweder Fluoreszenz- oder radioaktiv mit ³³P markiert. Die Fluoreszenz(IRD800)-markierten Primer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) wurden direkt in die PCR eingesetzt, für radioaktive cDNA-AFLPs wurden Primer mit [γ -³³P]dATP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) phosphoryliert:

2,5 µL	<i>NcoI</i> -Primer (100 µM)
2,5 µL	10x Reaktionspuffer
5 µL	[γ - ³³ P]dATP (3000 Ci mmol ⁻¹)
4 µL	verd. T4 Polynucleotidkinase (10 U, USB Corporation, USA)
11 µL	Milli-Q Wasser

Die T4 Polynucleotidkinase-Lösung wurde kurz vor Gebrauch 1:10 mit mitgeliefertem Verdünnungspuffer verdünnt, um nach Herstellerangaben optimale Aktivität zu bekommen. Die Reaktion fand bei 37 °C für 30 min im *Thermocycler* statt, gefolgt von einer fünfminütigen Inaktivierung bei 65 °C.

- ♦ Selektive Primer: *NcoI*+2nt 5'- AGACTGCGTACACCATGG+NN (N1-16)
Sau3AI+2nt 5'- ATGAGTCCTGAGGATC+NN (S1-16)

Tab. 2.2 Bezeichnung der selektiven Primer und ihre Endungen. Die Primer N1 bis N16 wurden entweder Fluoreszenz (IRD800)- oder radioaktiv (^{33}P) markiert.

Name	Nucleotide	Name	Nucleotide	Name	Nucleotide	Name	Nucleotide
N1/S1	+AA	N5/S5	+TA	N9/S9	+GA	N13/S13	+CA
N2/S2	+AT	N6/S6	+TT	N10/S10	+GT	N14/S14	+CT
N3/S3	+AG	N7/S7	+TG	N11/S11	+GG	N15/S15	+CG
N4/S4	+AC	N8/S8	+TC	N12/S12	+GC	N16/S16	+CC

Die *Touch-down*-PCR mit den selektiven Primern, jeweils ein markierter N-Primer mit einem S-Primer, fand nach folgendem Protokoll statt.

PCR-Ansatz: 3 μL *template* (aus Präamplifikation)
 0,6 μL N-Primer (10 μM)
 0,6 μL S-Primer (10 μM)
 2 μL 10x PCR-Puffer
 0,4 μL dNTPs (10 mM)
 0,2 μL Taq-Polymerase (Qiagen, Heidelberg)
 13,2 μL Milli-Q Wasser

Thermocycler-Bedingungen:

<u>2 min</u>	94 °C	
30 s	94 °C	
30 s	65 °C	9 Zyklen, -1 °C/Zyklus
<u>2 min</u>	72 °C	
30 s	94 °C	
30 s	57 °C	23 Zyklen
<u>2 min</u>	72 °C	
2 min	72 °C	
∞	4 °C	

Die PCR-Produkte der selektiven Amplifikation wurden anschließend auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.4.8 Auftrennung des cDNA-AFLP auf Polyacrylamidgelen

2.4.8.1 cDNA-AFLP mit Fluoreszenz-markierten Primern

Da zwei unterschiedliche Primer mit jeweils zwei selektiven Nucleotiden (A, C, G oder T) Verwendung fanden, ergaben sich daraus 256 mögliche Primerkombinationen. Um ein cDNA-Fragment des *Mlg* Resistenzgens zu finden, sollten alle Primerkombinationen ausprobiert werden. Dafür wurden Fluoreszenz(IRD800)-markierte Primer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) in der selektiven Amplifikation (Kap. 2.4.7) eingesetzt, die Produkte auf einem Polyacrylamidgel (8 %) mit Hilfe eines Li-Cor 4200-Geräts (MWG-Biotech AG, Ebersberg) aufgetrennt und ausgewertet. Dabei erfasst ein Laser die an ihm vorbeiziehenden Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte und speichert die Daten, welche auf einem Bildschirm als Banden sichtbar gemacht werden können.

- ◆ 25 cm Gel 25 mL 8 % Gellösung
 25 µL TEMED
 175 µL 10 % APS in Milli-Q Wasser (w/v)
 250 µL DMSO

- ◆ 8 % Gellösung 16 mL *Long Ranger[®] Gel Solution* (Biozym, Oldendorf)
 42 g Harnstoff
 10 mL 10x TBE
 ad. 100 mL A. bidest.

- ◆ 10x TBE-Puffer 900 mM Tris
 900 mM Borsäure
 25 mM EDTA
 in A. dest., mit HCl pH 8,0 einstellen

- ◆ Ladepuffer 98 % Formamid
 10 mM EDTA
 Spatelspitze Bromphenolblau
 Spatelspitze Xylen Cyanol (XCFE)

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass ein umfangreiches *screening* relativ schnell, ungefährlich und billiger als mit ^{33}P -markierten Primern durchgeführt werden kann. Allerdings ist es nicht möglich, die interessanten Banden des cDNA-AFLPs auszuschneiden, weshalb die Primerkombinationen für wichtig erscheinende Genfragmente mit radioaktiv markierten Primern wiederholt werden müssen.

2.4.8.2 cDNA-AFLP mit ^{33}P -markierten Primern

Für radioaktiv gefahrene Gele wurde die äußere Glasplatte der Apparatur (Sequi-gen II, Bio-Rad, München) silanisiert (SEA Spray, *BioLogicalTM Molecular Reagents*), um sie später leichter vom Gel lösen zu können. Vor dem eigentlichen Gießen des Gels wurde die Gelkammer (38 x 50 cm) unten mit Polyacrylamidgel verschlossen, indem sie für 2 min in einen Behälter mit „Verschlussgel“ (*sealing gel*) gestellt wurde und das Gel zwischen den Platten auspolymerisierte. Um für das cDNA-AFLP eine Lauftemperatur von 50 °C zu erreichen, war ein Vorlauf der Apparatur bei 110 W von ca. 45 min notwendig. Der *power supply* (Power Pac 3000, Bio-Rad, München) registrierte die Temperatur über einen Fühler (*temperature probe*) der an die äußere Glasplatte angebracht wurde. Um die gewünschten 50 °C schneller zu erreichen, wurde der Laufpuffer (1x TBE) im Wärmeschränk vorgewärmt.

- ♦ *sealing gel* 40 mL 8 % *Long Ranger*[®] Gellösung
 200 µL TEMED
 200 µL 25 % APS

- ♦ 38 x 50 cm Gel 80 mL 8 % *Long Ranger*[®] Gellösung
 80 µL TEMED
 500 µL DMSO
 80 µL 25 % APS

Die 25 µL Probe aus der selektiven PCR wurden mit 10 µL Ladepuffer (Kap. 2.4.8.1) versetzt und 6 µL auf das Gel aufgetragen. Ein Lauf dauerte ca. 2 h. Wenn die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war, wurde die Apparatur abgebaut und das Gel auf ein Whatman 3MM Papier übertragen. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe eines Geltrockners (*Model 583 Gel Dryer*, Bio-Rad, München) bei 80 °C unter Vakuum (Membran-Vakuumpumpe, Biometra, Göttingen) getrocknet.

Die ³³P-markierten Banden wurden durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak Biomax MR, Röntgen Bender, Baden-Baden), der mit Heftklammern an alle Ecken des Gels fixiert wurde, sichtbar gemacht. Die Expositionszeit betrug etwa 24 h bei Raumtemperatur.

2.4.9 Fragmentisolation

Der entwickelte Film wurde genau auf dem Gel ausgerichtet, fixiert und die zu isolierenden Banden mit einer Nadel an allen Ecken durchstoßen und so auf dem Gel markiert. Die Gelfragmente wurden mit einem Skalpell herausgeschnitten und für die Elution der cDNA-Fragmente in 100 µL Milli-Q Wasser gegeben. Einer 20 min Inkubation bei RT folgten 10 min bei 85 °C und 15 min Zentrifugation mit 13000 rpm. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Banden in einer PCR mit Adaptor-spezifischen Primern reamplifiziert und konnten dann aus dem Agarosegel eluiert, kloniert und sequenziert werden.

PCR-Ansatz:	5 µL	Eluat der ausgeschnittenen Bande
(Reamplifikation)	0,75 µL	N+0 Primer (10 µM)
	0,75 µL	S+0 Primer (10 µM)
	2,5 µL	10x PCR-Puffer
	0,5 µL	dNTPs (10 mM)
	1,5 µL	MgCl ₂ (25 mM)
	0,25 µL	Taq-Polymerase (Supratherm, Genecraft, Münster)
	13,8 µL	Milli-Q Wasser

<i>Thermocycler-Bedingungen:</i>	<u>2 min</u>	94 °C	20 Zyklen
	30 s	94 °C	
	1 min	60 °C	
	<u>2 min</u>	72 °C	
	2 min	72 °C	
	∞	4 °C	

2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

PCR-Produkte oder andere DNA-Fragmente wurden in 1,5 %igen Agarosegelen mit Ethidiumbromid ($0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$) in 1x TBE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Interessante Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des CONCERT™ *Rapid Gel Extraction System* (Gibco™ BRL, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellerprotokolls eluiert.

2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach Herstellerangaben in den pGEM®-T Vektor (Promega, Madison, USA) ligiert, der eine spätere Identifizierung der Plasmid-tragenden Kolonien durch Blau/Weiß-Selektion (α -Komplementierung defekter β -Galactosidase, Sambrook *et al.* 1989) ermöglicht. Außerdem wird die MCS (*multiple cloning site*) von T7 und SP6 RNA-Polymerase Promotoren flankiert, die für die Herstellung von RNA-Transkripten (Kap. 2.12) benötigt werden. Die Vektoren wurden in kompetente *Escherichia coli* DH5 α -Zellen (Clontech, Heidelberg) transformiert und einzelne Kolonien nach der Blau/Weiß-Selektion mittels Kolonie-PCR auf die Integration der Fremd-DNA hin überprüft.

2.6.1 Kolonie-PCR

Bakterienkolonien konnten mit Hilfe einer PCR mit genspezifischen oder U/R-Primern (M13fw[-40], M13rev) auf die integrierte Fremd-DNA hin überprüft werden. Dafür wurden sie mit einem Zahnstocher gepickt, in Milli-Q Wasser überführt und einer Standard-PCR unterzogen. *E. coli*-Zellen mit leerem pGEM®-T Vektor zeigen ein Produkt bei 236 bp, erfolgreich transformierte Kolonien eine Bande der Größe des inserierten Fragments + 236 bp.

- ♦ M13fw[-40] 5` - GTTTTCCCAGTCACGAC
- M13rev 5` - AACAGCTATGACCATGA

2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

2.7.1 Miniprep

Die Plasmidpräparation aus 4 mL Übernachtskultur (in LB-Medium mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin) wurde mit dem NucleoSpin® Multi 8 Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) durchgeführt, das auf der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.* 1989) beruht.

- ◆ LB-Medium 10 g Trypton (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
 5 g Hefe-Extrakt (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
 10 g NaCl
 mit A. dest. auf 1 L auffüllen, pH 7,0

2.7.2 Midiprep

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen wurden 40 mL Übernachtskultur angesetzt und die DNA ebenfalls durch alkalische Lyse nach Herstellerangaben mit dem NucleoBond® PC 100 Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) isoliert.

2.8 Sequenzierung und Sequenzvergleiche mit Datenbanken

Plasmide wurden mit dem LI-COR *dna Analyzer Gene Reader* 4200 (MWG-Biotech AG, Ebersberg) nach der dideoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) sequenziert. Dafür wurde das DYEnamic™ *Direct cycle sequencing kit* (Amersham Life Science, Cleveland, USA) nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion lief unter folgenden Bedingungen mit 5'-IRD800-markierten Primern ab:

Thermocycler-Bedingungen:	30 s	95 °C	30 Zyklen
	15 s	61 °C	
	1 min	70 °C	
	∞	4 °C	

- ◆ M13reverse[-21] 5'- CAGGAAACAGCTATGACC (5' IRD800 Modifikation)
- M13forward[-29] 5'- TGTAAAACGACGGCCAGT (5' IRD800 Modifikation)

Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem entsprechenden Programm ausgewertet.

- ◆ 50 cm Gel: 35 ml 6 % *Long Ranger*[®] *Gel Solution* (Biozym, Oldendorf)
- 35 µL TEMED
- 250 µL 10 % APS in Milli-Q Wasser (w/v)
- 350 µL DMSO

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Algorithmus gegen die NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, USA) *GenBank*-Datenbank auf Ähnlichkeit mit bereits bekannten Sequenzen anderer ESTs, Gene oder Proteine überprüft (Altschul *et al.* 1997). Für das Auffinden bestimmter Motive in den Proteinsequenzen wurden die *Prosites*-Datenbank (*ExPasy Molecular Biology Server*, *Swiss Institute of Bioinformatics*; Falquet *et al.* 2002) und Pfam 7.2 (Bateman *et al.* 2002) herangezogen. Transmembranregionen wurden von den Programmen HMMTOP (Tusnady und Simon 2001) und TMHMM (Krogh *et al.* 2001) vorhergesagt. *Alignments* zum Vergleich von zwei oder mehreren Sequenzen miteinander wurden mit *ClustalW* (*European Molecular Biology Laboratory [EMBL] outstation – European Bioinformatics Institute*) und dem Programm *GeneDoc* (*Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility*; Nicholas und Nicholas 1997) durchgeführt.

2.9 Markerentwicklung

Wurden im cDNA-AFLP polymorphe Banden zwischen *Mlg*- und *mlg*-tragenden Linien detektiert, konnten aus dem Sequenzunterschied, der den Polymorphismen zugrunde liegt, Marker für die entsprechende Linie generiert werden.

2.9.1 PCR-Marker

Resultiert der Bandenpolymorphismus aus einer Insertion bzw. Deletion eines größeren DNA-Fragments, können für diesen Sequenzabschnitt spezifische Primer entwickelt werden. Nach einer PCR erhält man dann nur in einer Linie ein Produkt, oder man bekommt in beiden Linien Banden, die aber verschieden groß sind.

In dieser Arbeit wurde ein PCR-Marker (Kap. 3.1.1) für die Linien I (*mlg*) und IWe (*Mlg*) mit folgenden Primern entwickelt:

- ◆ N16-10+11s 5'- CCATGGCCTGACCTCTCATAGCTCGCT
- N16-11as 5'- GGCGAGCGAGGAACCTTAACCCTAATCT
- N16-10as 5'- GGCGAGCGAGGAACCCTAACCCTTCTCT

Mit dem s und jeweils einem as Primer wurden 35 Zyklen einer Standard-PCR mit 68 °C *annealing*-Temperatur gefahren.

2.9.2 CAPS-Marker

Beruhet der Bandenpolymorphismus zwischen den Linien auf nur einem Basenaustausch, kann ein CAPS-Marker (*cleaved amplified polymorphic sequence*) generiert werden, wobei die Sequenzspezifität von Restriktionsenzymen genutzt wird. In einer PCR wird der den Polymorphismus tragende Sequenzabschnitt amplifiziert und anschließend mit einem Restriktionsenzym, das an der spezifischen Nukleotidabfolge schneidet, verdaut. Daraus resultiert für die verschiedenen Linien ein unterschiedliches Bandenmuster, da z.B. nur die Sequenz der *Mlg*-, nicht aber die der *mlg*-tragenden Linie geschnitten wird.

Für den CAPS-Marker 9-1 (Kap. 3.1.2) wurde die entscheidende Sequenz mit den Primern 321s und 321as mit 35 Zyklen und einer *annealing*-Temperatur von 60 °C via PCR amplifiziert und dann mit *Bc**II* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) bei 55 °C verdaut.

- ◆ 321s 5'- GATCATTCCCACATCATCAAATATCA
- 321as 5'- CATTTGCTCACCTGCCAACCT

2.10 Untersuchungen zur Genexpression

Für eine unabhängige Überprüfung der differentiell exprimierten Genfragmente aus dem cDNA-AFLP wurden neue Inokulationsversuche angesetzt, die RNA der Pflanzen extrahiert (Kap. 2.4.1) und die Expression der isolierten Gene untersucht.

2.10.1 SMART™ RT-PCR

Die SMART™-Technologie (Clontech, Palo Alto, USA) bietet die Möglichkeit, nahezu unbegrenzt *full-length* cDNA aus einer geringen Menge RNA zu synthetisieren (reverse Transkription). Diese cDNA wiederum kann als *template* in vielen PCRs eingesetzt werden. Möchte man viele verschiedenen Gene auf ihre Expression hin untersuchen, ist diese Form der RT-PCR kostengünstiger und einfacher als Untersuchungen über *Northern blots* oder herkömmlicher RT-PCR.

Bei der Erststrangsynthese lagert sich ein modifizierter oligo(dT) Primer, an den noch eine Adaptorsequenz angehängt wurde, an das poly-A⁺ Ende der mRNA. Eine spezielle Reverse Transkriptase synthetisiert den Erststrang und fügt auf Grund einer intrinsischen terminalen Transferaseaktivität am 5'-Ende noch Cytosin-Nukleotide an. An diesen Cytosin-Strang

hybridisiert ein SMARTTM Oligonucleotid, das die gleiche Adaptorsequenz wie der oligo(dT) Primer trägt. Für die Zweitstrangsynthese und weitere PCR-Zyklen zur Vervielfältigung der cDNA werden Adaptorspezifische Primer eingesetzt.

2.10.1.1 SMARTTM-cDNA Banken von Mehltaupilz-inokulierter Gerste

Gerstenpflanzen der Sorten Ingrid (*mlg*) und IWe (*Mlg*) wurden wie beschrieben (Kap. 2.3.1) mit *Bgh* oder dem Nichtwirt-Pathogen *Bgt* inokuliert, Blätter zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12 hpi geerntet und die poly-A⁺ RNA daraus isoliert (Kap. 2.4.1 und 2.4.2). Aus dem in Tab. 2.3 aufgelisteten Probenmaterial wurde mit dem SMARTTM *PCR cDNA Synthesis Kit* (Clontech, Palo Alto, USA), ausgehend von 200-400 µg poly-A⁺ RNA, nach Herstellerangaben cDNA synthetisiert.

Tab. 2.3 Versuchsanordnung für die Synthese der SMARTTM-cDNA Banken. hpi: h post Inokulation

nicht inok. Kontrolle			<i>Bgh</i> -inokuliert						<i>Bgt</i> -inokuliert		
Ingrid (<i>mlg</i>)			Ingrid (<i>mlg</i>)			IWe (<i>Mlg</i>)			Ingrid (<i>mlg</i>)		
4 hpi	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12

Nach einer Test-PCR mit 16, 18, 20 und 24 Zyklen wurden 18 Runden bei der Zweitstrangsynthese als optimale Zyklenzahl ermittelt. Anschließend konnte die cDNA als *template* für PCRs mit genspezifischen Primern eingesetzt werden. Als gleichmäßig konstitutiv expremiertes Kontrollgen wurde Ubiquitin gewählt. Mit Ubiquitin-spezifischen Primern (Ubi1fwd1, Ubi1rev2) wurden Kontroll-PCRs gefahren und die *template*-Menge der eingesetzten cDNA solange variiert, bis in allen Proben im Agarosegel eine gleich starke Bande zu sehen war.

- ♦ Ubi1fwd1 5'- CCAAGATGCAGATCTTCGTGA
- Ubi1rev2 5'- TTCGCGATAGGTAAAAGAGCA

2.10.1.2 SMARTTM-cDNA Banken von BTH-behandelter Gerste

Für SMARTTM cDNA-Synthese von chemisch induzierter Gerste (cv. Manchuria) wurde RNA aus dem Versuch 2.3.2 von Katrin Beßer verwendet. Poly-A⁺ RNA wurde isoliert (Kap. 2.4.2) und 200-400 µg poly-A⁺ RNA der Zeitpunkte 7 und 24 hpt (*hours post treatment*) für die cDNA-Synthese mit 16 Zyklen eingesetzt. Da Ubiquitin 7 h nach BTH-Behandlung induziert schien, wurde die Kontroll-PCR und somit die Einstellung der cDNA-Banken mit genspezifischen Primern für eine nicht chemisch induzierte MAP Kinase (*mitogen activated protein*) vorgenommen (Abb. 7.2).

- ♦ MAPKfor 5'- GAACGAGGTTCTCCACTGCAAA
 MAPKrev 5'- TGCTTGGCAGGATCAACACACT

2.10.2 RT-PCR

Fragestellungen zur Genexpression, die nicht durch die SMARTTM cDNA-Banken geklärt werden konnten, sollten mit Hilfe von *Northern blots* untersucht werden. Allerdings lieferten diese oftmals keine Signale, weshalb die sensitivere Methode der RT-PCR Anwendung fand. Ausgehend von ca. 500 ng RNA wurde mit Hilfe des *OneStep* RT-PCR *kit* (Qiagen, Hilden) cDNA hergestellt und mit genspezifischen Primern amplifiziert.

Reaktionsansatz:	500 ng	RNA
	5 µL	5x RT-Puffer
	1 µL	dNTPs (10 mM)
	0,6 µM	genspezifischer 5'-Primer
	0,6 µM	genspezifischer 3'-Primer
	10 u	RNase-Inhibitor (Promega, Madison USA)
	0,9 µL	Enzymmix (Qiagen, Hilden)
	ad 25 µL	Milli-Q Wasser

Thermocycler-Bedingungen:	30 min	50 °C	reverse Transkription
	15 min	95 °C	Inaktivierung der RT
	1 min	94 °C	
	30 s	X °C	18-35 Zyklen
	1 min	72 °C	
	10 min	72 °C	
	∞	4 °C	

Die Übereinstimmung der RNA-Konzentrationen in den unterschiedlichen Proben wurde über denaturierende Agarosegele und mittels Kontroll-Amplifizierung mit den Ubiquitin-Primern (Kap. 2.10.1.1) überprüft.

2.10.3 Northern Analysen

2.10.3.1 Northern blotting

10-20 µg Gesamt-RNA wurden in 1,5 %igen Agarosegelen mit 5 % [v/v] Formaldehyd (37 %) in 1x MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Lösung wurde dazu mit dem gleichen Volumen RNA-Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen der Proben 5 min bei 96 °C im Heizblock denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen.

- ♦ 10x MOPS 200 mM Morpholin-3-propansulfonsäure
 50 mM Natriumacetat
 10 mM EDTA
 mit NaOH auf pH 7, 1 % [v/v] DEPC, autoklaviert

- ♦ RNA-Auftragspuffer 260 µL Formaldehyd (37 %)
 720 µL Formamid
 80 µL Glycerin, autoklaviert
 80 µL gesättigtes Bromphenolblau
 160 µL 10x MOPS
 100 µL Ethidiumbromid (10 mg mL⁻¹)
 ad 1,5 mL mit Milli-Q Wasser

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA mittels Kapillarstromtransfer in 25 mM Na-Phosphat-Puffer pH 6,5 bei RT über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) überführt (*Northern blotting*). Die kovalente Bindung der RNA an die Membran erfolgte durch UV-Licht (125 mJ, *GS Gene Linker*TM *UV chamber*, Bio-Rad, München).

2.10.3.2 Sondenherstellung

Die *Northern*-Analysen wurden radioaktiv mit ³²P-markierten PCR-Sonden durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über MicroSpin G-25 Säulen (Amersham Life Science, Cleveland, USA) aufgereinigt, um nicht inkorporiertes α -dCTP³² zu entfernen. Dabei wurde die Säule vorbereitet, indem das Material durch leichtes Vortexen resuspendiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 735 g) wurde. Das PCR-Produkt wurde mit 35 µL Milli-Q Wasser versetzt, auf die Säule gegeben und 2 min bei 735 g zentrifugiert. Das Eluat mit der Sonde wurde bei 90 °C im Heizblock denaturiert, bevor es in den Hybridisierungspuffer gegeben wurde.

PCR-Ansatz:	0,5 µL	<i>template</i> (Plasmid-DNA, PCR-Produkt)
(Sonde)	1 µL	10x PCR-Puffer
	1 µL	500 µM dATP-, dGTP-, dTTP-Mix
	0,5 µL	3'-Primer (10 pmol)
	0,5 µL	5'-Primer (10 pmol)
	0,3 µL	MgCl ₂ (50 mM)
	2,7 µL	Milli-Q Wasser
	0,5 µL	Taq-Polymerase (Supratherm, Genecraft, Münster)
	3 µL	α -dCTP ³²

<i>Thermocycler</i> -Bedingungen:	<u>2 min</u>	94 °C	30 Zyklen
	30 s	95 °C	
	1 min	X °C	
	<u>1 min</u>	72 °C	
	∞	4 °C	

2.10.3.3 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurden die *Blot*-Membranen 2x 20 min bei RT in 2x SSC, 0,1 % SDS auf dem Schüttler gewaschen. Danach wurden sie mit 10 mL 1x Hybridisierungspuffer zur Prähybridisierung bei 60 °C (mind. 1 h) in den Hybridisierungsofen (Hybaid, Heidelberg) gegeben. Für die Hybridisierung über Nacht bei 60 °C wurde die denaturierte Sonde (Kap. 2.10.3.2) dazu pipettiert. Am nächsten Tag wurden die Filter 2x für 5 min mit 2x SSC, 0,1 % SDS in der Hybridisierungsröhre und 1x 5 min im Wasserbad bei 60 °C mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und gegen einen *Phosphorscreen* (*Kodak Imaging Screen-K*, Bio-Rad, München) exponiert. Die Signale wurden nach variabler Expositionszeit im *Phosphorimager* (*Molecular Imager*[®]FX, Bio-Rad, München) aufgezeichnet und mit dem Programm *Quantity One-4.1.1* (Bio-Rad, München) in einer Auflösung von 200 µm dokumentiert.

Sonden konnten durch Waschen in 1 % SDS (w/v), 50 % Formamid für 20-40 min bei 80 °C im Schüttelwasserbad von der Membran gelöst werden (*strippen*), um diese Filter dann für neue Hybridisierungen zu nutzen.

- ◆ 20x SSC-Puffer 3 M NaCl
 0,3 M Tri-Natriumacetat
 mit HCl auf pH 7, autoklaviert
- ◆ 10 % SDS 10 % *sodiumdodecylsulfate* (Natriumdodecylsulfat) in A. bidest.,
 autoklaviert
- ◆ 5x Hybridisierungspuffer 1 % BSA
 1 % Polyvinylpyrrolidon 10-40 kDa
 1 % Ficoll 1400000
 250 mM TrisCl pH 7,5
 0,5 % Na₄P₂O₇
 5 % SDS
- ◆ 1x Hybridisierungspuffer 5x Hybridisierungspuffer mit A. bidest._{DEPC} verdünnt
 + 0,4 M NaCl

2.11 Sequenzverlängerung von Genfragmenten

Die im cDNA-AFLP isolierten cDNA-Fragmente waren zum Teil sehr klein (< 100 bp), so dass erst mehr Sequenzinformation gewonnen werden musste, bevor sie in Genexpressionsstudien weiter charakterisiert werden konnten. Fanden sich in den EST-Datenbanken keine

homologen Sequenzen, wurden die cDNA-Fragmente in 5'- und 3'-Richtung mit den folgenden Methoden verlängert.

2.11.1 Verlängerung von cDNA mittels RACE

RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) ist eine Methode, mit der die 5'- und 3'-Enden von cDNA verlängert werden, um den gesamten ORF (*open reading frame*) zu erhalten.

250 ng mRNA aus inokulierten Gerstenblättern (cv. IWe) zu den Zeitpunkten 3 und 13 hpi dienten als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer cDNA-Bank mit dem *GeneRacerTM Kit* (Invitrogen Life Science GmbH, Karlsruhe). Mit *GeneRacerTM*- und genspezifischen Primern wurde eine erste sehr spezifische PCR gefahren, deren Produkte als *template* für eine weitere *nested*-PCR (die Primer liegen auf der Sequenz weiter innen) dienten. Die Durchführung dieser Versuche folgte dem Herstellerprotokoll. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, isoliert und sequenziert.

2.11.2 Inverse PCR (iPCR)

Die inverse PCR (iPCR) kann genutzt werden, um Promotorregionen eines Gens zu isolieren oder einfach nur, um mehr Sequenzinformation von einem Gen zu gewinnen, falls RACE nicht erfolgreich war. Dabei muss beachtet werden, dass mit genomischer DNA gearbeitet wird und somit auch Introns amplifiziert werden können.

Genomische DNA wird mit einem ausgesuchten Restriktionsenzym verdaut und die DNA-Fragmente zu einem Ring ligiert. Setzt man in einer PCR genspezifische Primer ein, die in entgegengesetzte Richtungen (einer in 5'- und der andere in 3'-Richtung) weisen, bekommt man nur ein Produkt, wenn sich die DNA zu einem Ring geschlossen hat. Wählt man den 3'-Primer so, dass er direkt vor einer bekannten Schnittstelle liegt, erhält man durch die iPCR hauptsächlich neue Sequenzinformation in 5'- und somit Promotor-Richtung.

Für die Herstellung der Restriktionsbanken wurde genomische Gersten-DNA (cv. IWe) nach Doyle & Doyle (Sambrook *et al.* 1989) extrahiert und in drei Konzentrationen (150 ng, 750 ng, 2,25 µg) eingesetzt. Verdaut wurde die DNA 4 h bei 37 °C mit den jeweiligen Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Bcl*II, *Eco*72i, *Eco*91i, *Eco*RV, *Eco*RI, *Kpn*I, *Mse*I, *Nco*I und *Rsa*I.

Verdau:	x μ L	Milli-Q Wasser
	10 μ L	Puffer
	3 μ L	Restriktionsenzym (30 u, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
	<u>x μL</u>	DNA
	100 μ L	

Der Verdauansatz wurde über Nacht mit 0,1 Vol. 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2 Vol. 100 %igem EtOH bei -20°C gefällt, 45 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und das trockene Pellet in 50 μ L Milli-Q Wasser resuspendiert.

Ligation:	50 μ L	Verdau
	309 μ L	Milli-Q Wasser
	40 μ L	10x Ligasepuffer
	<u>1 μL</u>	T4-Ligase (Promega, Madison, USA)
	400 μ L	

Die Ligation fand bei 4°C über Nacht statt. Der Ansatz wurde danach 1 h bei -20°C wie der Verdau gefällt, das Pellet mit 70 %igem kaltem EtOH gewaschen und anschließend in 80 μ L Milli-Q Wasser gelöst. Mit genspezifischen Primern, die in entgegengesetzte Richtungen weisen, können die zu einem Ring geschlossenen Genabschnitte in der inversen PCR amplifiziert werden.

iPCR-Ansatz:	3 μ L	<i>template</i> DNA
	13,6 μ L	Milli-Q Wasser
	2,5 μ L	10x PCR-Puffer
	2,5 μ L	dNTPs (2 mM)
	0,75 μ L	MgCl ₂ (50 mM)
	2,5 μ L	Primer (s und as 10 mM)
	<u>0,15 μL</u>	Taq-Polymerase (Subtherm, Genecraft, Münster)
	25 μ L	

Thermocycler-Bedingungen:	<u>3 min</u>	94 $^{\circ}\text{C}$	
	30 s	94 $^{\circ}\text{C}$	
	30 s	X $^{\circ}\text{C}$	35 Zyklen
	<u>3 min</u>	72 $^{\circ}\text{C}$	
	5 min	72 $^{\circ}\text{C}$	
	∞	4 $^{\circ}\text{C}$	

Das Produkt wurde 1:50 verdünnt. 1 μ L dieser Verdünnung diente in einer zweiten iPCR mit *nested*-Primern unter gleichen PCR-Bedingungen als *template*.

2.12 Genfunktionsanalyse durch transiente Transformation mit RNA Interferenz (RNAi) oder Überexpression

Die Bedeutung, die ein Gen bei der Pathogenabwehr hat, kann durch transiente Transformation, in der das zu untersuchende Gen entweder überexprimiert oder ausgeschaltet wird, untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgesuchte Gene durch das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in die Epidermiszellen von Gerste reprimiert (RNA Interferenz) oder durch Einbringen eines ORFs unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors überexprimiert und daraus resultierende Veränderungen in der Mehltaupilzabwehr beobachtet.

Bei der von P. Schweizer (Schweizer *et al.* 1999a, 2000) entwickelten Methode für das Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz werden Wolframpartikel mit dsRNA bzw. Test-DNA und einem Reportergenkonstrukt (GFP, grün fluoreszierendes Protein) beschichtet (Kap. 2.12.3) und mit einer *Particle Inflow Gun* auf Gerstenblätter geschossen (Kap. 2.12.4). Nach 4 h werden diese Blätter mit *Bgh* inokuliert und 40-48 h später die Interaktion mikroskopisch ausgewertet (Kap. 2.12.5). Als Kontrollansatz zu der dsRNA von zu untersuchenden Genen wurde dsRNA eines humanen Thyroid-Hormonrezeptors (*accession number* NM000461), der keine Homologie zu pflanzlichen Sequenzen aufweist, auf die Blattsegmente geschossen. Bei der Überexpression diente der leere Vektor als Kontrolle.

2.12.1 Klonierungsstrategie für eine Überexpression der MAP Kinase 13a-3

Der ORF der im cDNA-AFLP isolierten MAP Kinase 13a-3 wurde mit zwei Primern, die eine Schnittstelle für *Bam*HI bzw. *Pst*II enthalten amplifiziert und in pGEM-T kloniert. Um den MAP Kinase-ORF in die MCS des pGY1 Vektors zu klonieren, wurde der *full length* Klon mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*II aus pGEM-T in 10x Y⁺/TANGO Reaktionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) herausgeschnitten (2 h bei 37 °C) und dann in den linearisierten pGY1-Vektor (gleicher Restriktionsverdau) hinter den CaMV-35S-Promoter kloniert (Abb. 2.1).

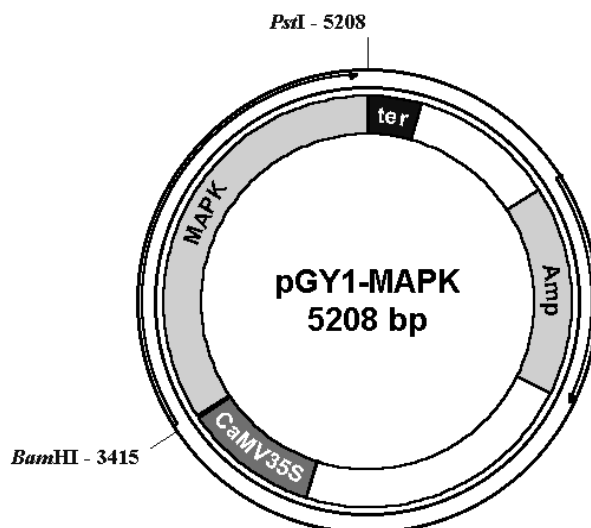


Abb. 2.1 Vektorkarte von pGY1 mit MAPK. Der ORF der MAP Kinase wurde in den pGY1-Vektor (mit pUC18-backbone) unter die Kontrolle des konstitutiven CaMV-35S-Promoters kloniert. Als bakterieller Selektionsmarker ist das β -Lactamasegen enthalten, das Ampicillinresistenz (Amp) vermittelt. ter: Transkriptionsterminator des bakteriellen Nopalsynthesegens.

Nach Transformation in DH5 α -Zellen (Kap. 2.6) wurden Plasmide von Einzelkolonien einer Restriktionsanalyse zur Überprüfung der Klonierung unterzogen. Ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *XhoI* resultiert bei pGY1-MAPK in zwei Banden (685 und 4523 bp), pGEM-T-MAPK dagegen wird gar nicht geschnitten. Um sicher zu sein, dass der MAP Kinase ORF in pGY1 keine Leserasterverschiebung oder ein vorzeitiges Stop-Codon enthält, wurde er vollständig sequenziert.

- ◆ BamMAPKfor 5'- GGATCCGGTAGGGAGGCGGCGCATG
- PstMAPKrev 5'- CTGCAGGCGGTGCCGACTTCCGTCA

2.12.2 Erzeugung doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Die Herstellung der dsRNA geht vom linearisierten Plasmid aus. Dafür wurde der Vektor pGEM[®]-T, in den das zu untersuchende Genfragment einkloniert war, in zwei Ansätzen mit Restriktionsenzymen geschnitten, und zwar hinter dem *insert* vom jeweiligen RNA-Polymerase-Promotor aus gesehen.

Plasmidverdau:	10 μ g	Plasmid
	3 μ L	10x Puffer
	<u>1,5 μL</u>	Restriktionsenzym (<i>SphI</i> , <i>SpeI</i> , Roche Diagn. GmbH, Mannheim)
	ad 30 μ L	Milli-Q Wasser

Die beiden Ansätze wurden 2 h bei 37 °C im Wärmeschrank verdaut, anschließend mit 170 µL Milli-Q Wasser und 200 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 8) versetzt und 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Die 200 µL Überstand wurden zu 420 µL 100 %igem EtOH gegeben und die geschnittenen Plasmide für 20 min auf Eis gefällt, gefolgt von einer 30 minütigen Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C). Das trockene Pellet wurde in 10 µL A. bide_{DEPC} gelöst. Durch *in vitro* Transkription erfolgte danach für 2 h bei 37 °C mit den entsprechenden RNA-Polymerasen (T7 im *SpeI*-Verdau, SP6 im *SphI*-Verdau) die Synthese der RNA-Einzelstränge (*sense* und *antisense*).

Transkription:	2 µg	<i>template</i> (linearisiertes Plasmid)
	4 µL	10x Puffer
	1 µL	RNase-Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
	5 µL	NTPs (10 mM)
	2 µL	T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase (Roche Diagn. GmbH)
	<u>26 µL</u>	A. bide _{DEPC}
	40 µL	

Die Bildung des Doppelstrangs erfolgte, indem beide Einzelstrang-Ansätze zusammenpipettiert, im Heizblock bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend samt Block für 30 min bei –20 °C gekühlt wurden. Durch Auftragen von jeweils 2 µL wurden beide Einzelstrang-Ansätze und die doppelsträngige RNA im TBE-Agarosegel überprüft.

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung der dsRNA wurden 4 µL des Ansatzes mit 6 µL A. bide_{DEPC}, 1 µL 3 M NaAc und 25 µL EtOH zusammengegeben, 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 400 µL A. bide_{DEPC} resuspendiert.

2.12.3 Präparation und Beschichtung der *microcarrier*

Für die transiente Transformation wurde die dsRNA bzw. Test-DNA zusammen mit dem Reportergenkonstrukt (GFP unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors in pGY-1) auf Wolframpartikel (*microcarrier*) präzipitiert. Dafür wurden 55 mg Wolframpartikel M17 (1,1 µm dm, Bio-Rad, München) vorbereitet, indem sie zweimal mit 1 mL Milli-Q Wasser und einmal mit 1 mL 100 %igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 2 mL 50 %igem Glycerin aufgenommen wurden. Danach wurden sie noch mit 1 µL mL⁻¹ DEPC für 3 h bei 37 °C behandelt und zuletzt 30 min auf 95 °C erhitzt.

Die *microcarrier* wurden vor Gebrauch gevortext und im Ultraschallbad 10 min suspendiert. Anschließend wurden sie zu der dsRNA bzw. Test-DNA und dem Reportergenkonstrukt pipettiert und diese durch die langsame, tropfenweise Zugabe von Ca(NO₃)₂ unter vortexen an die Partikel präzipitiert.

<i>microcarrier</i> -Beschichtung für RNAi: (Angaben pro Schuss)	12,5 µL	Wolframpartikel (25 mg mL ⁻¹)
	1 µg	GFP-Plasmid
	2 µg	dsRNA (Testgen/Kontrolle)
	14,5 µL	Ca(NO ₃) ₂ 10 mM, pH 10
<i>microcarrier</i> -Beschichtung für Über-: expression (Angaben pro Schuss)	12,5 µL	Wolframpartikel (25 mg mL ⁻¹)
	0,5 µg	GFP-Plasmid
	0,8 µg	Test-DNA/ leerer Vektor
	12,5 µL	Ca(NO ₃) ₂ 10 mM, pH 10

Da in der Regel acht Schalen pro Variante beschossen wurden, wurde die *microcarrier*-Beschichtung sicherheitshalber im 10fachen Ansatz pipettiert, 10 min auf Eis stehen gelassen, kurz zentrifugiert und soviel Überstand abgenommen, dass 60 µL übrig blieben (6 µL pro Schuss).

2.12.4 Transiente Transformation mit der *particle inflow gun* (PIG)

Von sieben Tage alten Gerstenblättern wurden ca. 4 cm lange Segmente abgeschnitten und jeweils vier mit der adaxialen Seite nach oben auf Petrischalen (dm: 6,5 cm) mit 0,5 % Phytagar (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gelegt. Die Blätter wurden mit einer Plastischablone, die in der Mitte eine Fläche von 5 cm² freilässt, in den Petrischalen unmittelbar vor dem Schießen fixiert und auf den Boden der Vakuumkammer gestellt.

Der an der Kammerdecke angebrachte *macrocarrier* (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, *Gelman Sciences*, Swinney, UK) wurde pro Schuss mit 6 µL beschichteten Wolframpartikeln (Kap. 2.12.3) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe wurde der Druck in der Kammer um 0,9 bar reduziert und die Partikel mit 9 bar Heliumgasdruck durch ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des *macrocarriers*) auf die Blätter geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet.

4 h nach dem Beschuss wurden die Blattsegmente mit Konidiosporen des Echten Gerstenmehltaupilzes der Rasse A6 im Inokulationsturm inokuliert, bis eine Dichte von ca. 100 Sporen pro mm² erreicht war.

2.12.5 Mikroskopische Auswertung der transienten Transformation

Zwei Tage nach Inokulation der transformierten Blätter erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops (Axioplan, Zeiss, Jena). Die Pilzstrukturen wurden mit einer 0,3 %igen Calcofluorlösung (Polysciences Inc., Warrington, USA) angefärbt und die Präparate unter Fluoreszenzanregung (Quecksilberhochdrucklampe, HBO 50 W, Osram) bei

100facher Vergrößerung mittels eines GFP-Filters (Anregungsfilter 420 nm, Farbteiler 493 nm, Sperrfilter 505-530 nm) nach GFP-Zellen abgesucht. Mit 400facher Vergrößerung wurden die GFP-Zellen unter Zuhilfenahme eines Dopifilters (365 nm / 395 nm / 420 nm) und Durchlicht (Halogenlampe, 12 V, 100 W) auf Interaktionen mit gekeimten Mehltau-pilzsporen untersucht. Bei den attackierten Zellen unterschied man erfolgreich penetrierte Zellen mit Haustorium von Zellen, die den Penetrationsversuch abgewehrt hatten. Die Penetrationsrate ergibt sich als Quotient der Summe der Zellen mit Haustorium und der Summe der attackierten Zellen insgesamt.

3 Ergebnisse

3.1 Differentielle Banden im cDNA-AFLP

Zur Darstellung differentieller Genexpression in Gerste nach Inokulation mit dem Echten Gerstenmehltaupilz (*BghA6*) in Abhängigkeit vom rassenspezifischen Resistenzgen *Mlg* wurden von den nahezu-isogenen Linienpaaren I/IWe und Mi/MiGf Primärblätter je zur Hälfte mit *BghA6* oder mock-inokuliert. Vier und zwölf Stunden nach Inokulation wurden Blätter geerntet, die RNA aus dem Blattmaterial isoliert und ein cDNA-AFLP durchgeführt. Die cDNA-Fragmente von *mlg*- und *Mlg*-Proben wurden auf Polyacrylamidgelen alternierend aufgetragen. Durch diesen Versuchsansatz ließen sich Linien- und *Mlg*-spezifische, Pathogen-induzierte, circadian regulierte und pilzliche Genfragmente darstellen (Abb. 3.1).

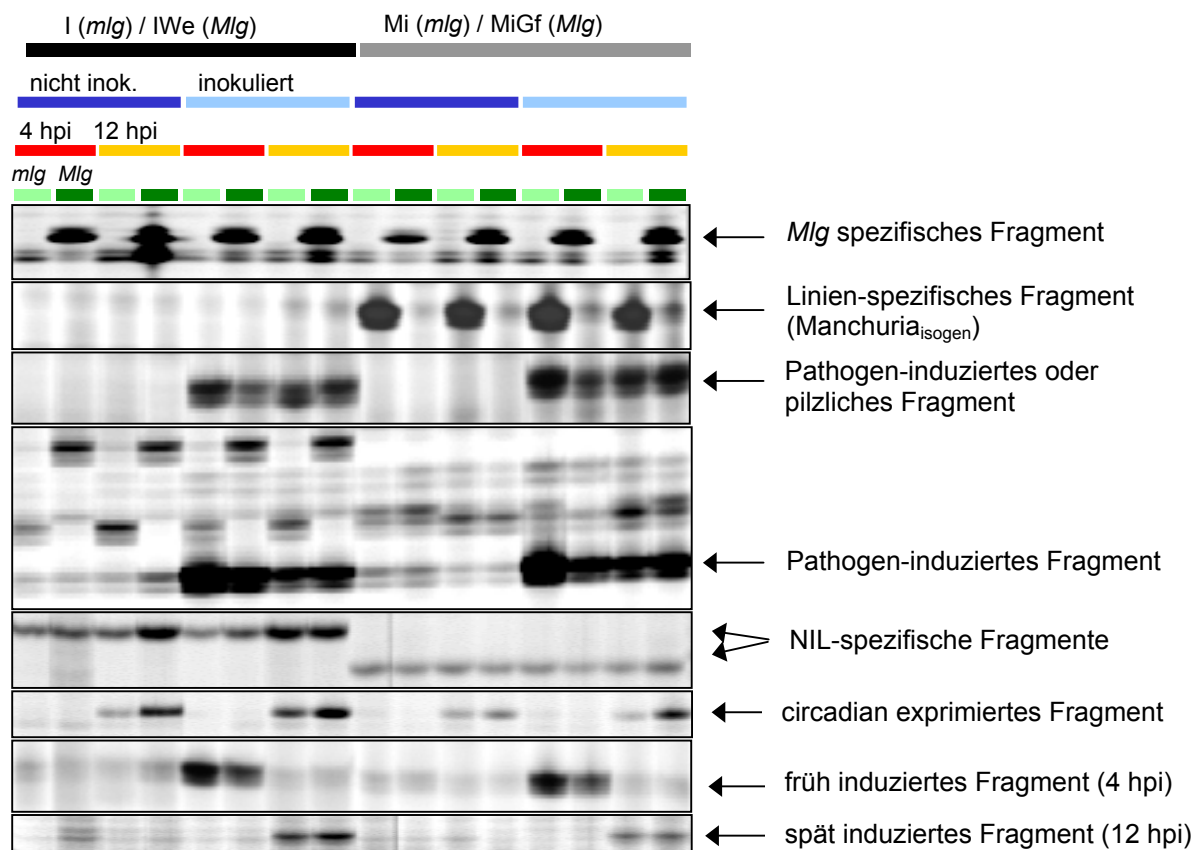


Abb. 3.1 Auftragsschema und beispielhafte Bandenmuster des cDNA-AFLP. *mlg*- und *Mlg*-Proben wurden alternierend aufgetragen. Die ersten vier Spuren eines Linienpaares waren nicht inokuliert, gefolgt von vier inokulierten Proben zu den Zeitpunkten 4 und 12 hpi. I: Ingrid (*mlg*-tragend), IWe: Ingrid-Weihenstephan (*Mlg*-tragend), Mi: Manchuria_{isogen} (*mlg*), MiGf: Manchuria_{isogen}-Goldfoil (*Mlg*), hpi: Stunden post Inokulation

3.1.1 Linienspezifische Marker

Linienspezifische Genfragmente wurden im cDNA-AFLP isoliert, um mit ihrer Hilfe Marker für den Resistenzgenlocus *Mlg* zu entwickeln. Solche Marker können genutzt werden, um den Genlocus über einen kartengestützten Klonierungsansatz zu kartieren und so das Resistenzgen zu identifizieren.

Im Screening mit fluoreszenzmarkierten Primern konnten 29 unterschiedliche linien-spezifische Banden dargestellt werden (Beispiele in Abb. 3.2), von denen 13 aus Gelen mit radioaktiv markierten Primern ausgeschnitten und sequenziert werden konnten (Tab 3.1).

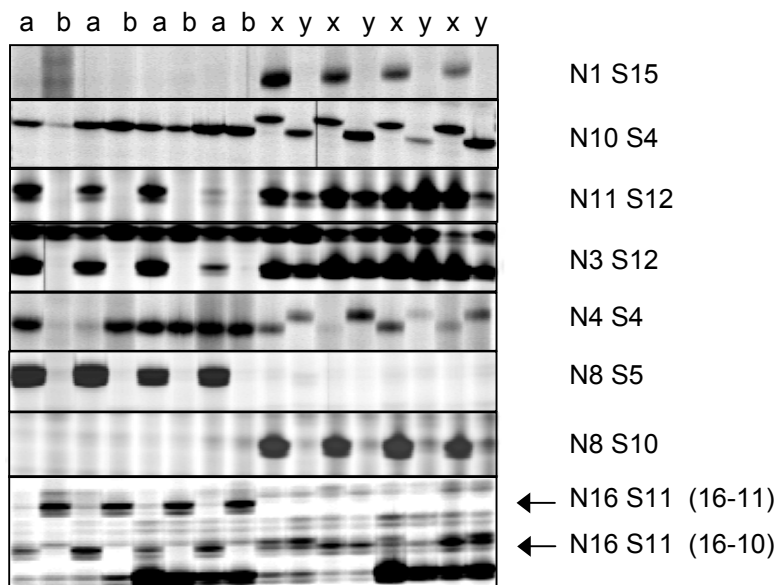


Abb. 3.2 Beispiele für linienspezifische Genfragmente im cDNA-AFLP. Rechts daneben ist die Primerkombination angegeben, mit der die Polymorphismen dargestellt wurden. Das Auftragsmuster entspricht dem in Abb. 3.1
a: Ingrid b: IWe (*Mlg*-tragend)
x: Manchuria_{isogen} y: MiGf (*Mlg*-tragend)

Der Bandenpolymorphismus 16-10/16-11 (Abb. 3.2) tritt nur in dem Linienpaar Ingrid (*mlg*)/ IWe (*Mlg*) auf und beruht auf einer 6 bp langen Insertion in der cDNA von IWe. Für diese Sequenz wurden spezifische Primer generiert, so dass in einer PCR mit den Primern 16-11as und 16-10+11s nur in IWe ein Produkt erzeugt wurde, wohingegen mit den Primern 16-10as und 16-10+11s in Ingrid und anderen Gerstenlinien eine Bande sichtbar war. Dieser Marker für IWe wurde in anderen NILs überprüft, doch blieb der Polymorphismus auf IWe beschränkt (Abb. 3.3).

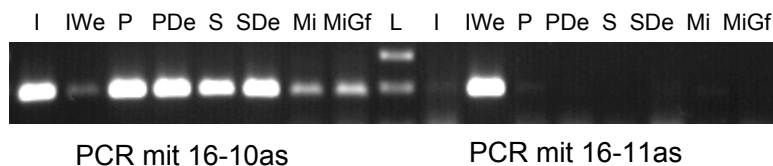


Abb. 3.3 Linienspezifität des PCR-Markers 16-10/11. In einer PCR mit den Primern 16-10+11s und 16-10as wird in allen Linien außer bei IWe ein deutliches Produkt amplifiziert, mit den Primern 16-10+11s und 16-11as erhält man nur in IWe eine Bande. I: *mlg*, IWe: *Mlg*, P: *mlg*, PDe: *Mlg*, S: *mlg*, SDe: *Mlg*, Mi: *mlg*, MiGf: *Mlg*, L: 1 kb plus Leiter

In einem parallel zu dieser Arbeit laufenden Projekt zur Isolierung von *Mlg*-Mutanten wurden resistente, *Mlg*-tragende Gerstenlinien (IWe, MiGf, PDe, SDe) mutagenisiert und die F₂-Generation auf einen Verlust ihrer Resistenz gegenüber *BghA6* hin untersucht (M. Korell, unveröffentlicht). Bei den als anfällig bonitierten Pflanzen konnte es sich um echte Mutanten oder aber Falschpositive (durch Saatgutvermischung) handeln. Mit dem PCR-Marker 16-10/11 ließen sich die mutagenisierten, das heißt anfällig gewordenen, IWe-Pflanzen von den Falschpositiven unterscheiden. Von 13 untersuchten Pflanzen (Abb. 3.4) konnten so die Proben 3 und 5 als Falschpositive aussortiert werden, bei allen anderen Pflanzen handelte es sich um Mutanten der ursprünglich resistenten *Mlg*-tragenden Sorte IWe.

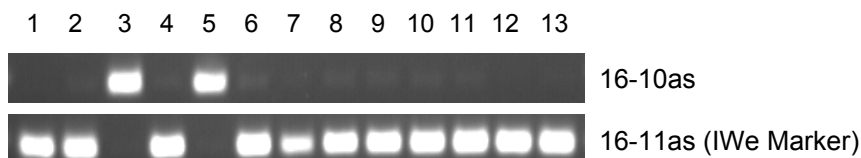


Abb. 3.4 Überprüfung möglicher IWe-Mutanten mit dem PCR-Marker 16-10/11. Pflanzen aus dem IWe-Mutanten Screening, die einen anfälligen Phänotyp zeigten, wurden mit dem PCR-Marker 16-10/11 getestet. Es zeigte sich, dass die Pflanzen 3 und 5 nicht der Linie IWe angehören, sie wurden als Falschpositive aussortiert.

1: IWe 163/2	4: IWe 318/17	7: IWe 512/2	10: IWe 512/6
2: IWe 163/17	5: IWe 441/7	8: IWe 512/3	11: IWe 512/7
3: IWe 313/11	6: IWe 512/1	9: IWe 512/4	12: IWe 613/15
			13: IWe 613/19

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem PCR-Marker 16-10/11 ein zuverlässiger Marker für das Resistenzgen *Mlg* in den nahezu-isogenen Linien Ingrid und Ingrid-Weihenstephan generiert wurde, der jedoch nicht in anderen Linien arbeitet. Andere linienspezifische Polymorphismen wurden bislang nicht weiter untersucht.

Tab. 3.1 Linienspezifische Genfragmente aus dem cDNA-AFLP. Banden, die im cDNA-AFLP nur bei einer Linie zu finden waren, wurden ausgeschnitten und sequenziert (Sequenzen im Anhang Tab. 7.1). Mit Hilfe dieser Sequenzinformation können Marker generiert werden, die bei der Kartierung des *Mlg*-Resistenzgenlocus eingesetzt werden können.

Primer	Code	Beschreibung	Größe (bp)	Homologie mit EST-Bank <i>e-value, identities (%)</i>
N13 S10	13b-3	in Attraktion zu <i>Mlg</i> , MiGf	505	BE404778 (<i>T. aestivum</i>) 0.0, 96%
N13 S16	13b-8	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Mi	136	AW983297 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁶¹ , 97%
N8 S13	8a-15	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Mi, 4 hpi	174	BF616574 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁹¹ , 99%
N12 S5	12-2	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Ingrid	147	-
N16 S5	16-4	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Ingrid	148	-
N16 11	16-10	in Attraktion zu <i>Mlg</i> , IWe	82	- (16-11)
N16 11	16-11	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Ingrid	88	- (16-10)
N5 S16	5-11	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Ingrid	136	AW983297 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻⁷⁰ , 99%
N7 S15	7-5	in Attraktion zu <i>Mlg</i> , MiGf	155	BE412901 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁷⁸ , 98%
N8 S5	8-7	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Ingrid	149	-
N8 S7	8-9	in Attraktion zu <i>Mlg</i> , IWe	150	-
N8 S10	8-11	in Repulsion zu <i>Mlg</i> , Mi	140	BE500550 (<i>T. aestivum</i>) 6e ⁻⁵⁵ , 94%
N8 S11	8-15	in Attraktion zu <i>Mlg</i> , IWe	88	-

3.1.2 *Mlg*-spezifische Marker

Im Screening mit 256 Primerkombinationen wurden vier *Mlg*-spezifische Genfragmente dargestellt. Sie waren alle sehr kurz und nach der Sequenzierung stellte sich heraus, dass es sich bei den vier Banden um das gleiche 37 bp lange cDNA-Stück handelt. Die mehrmalige Darstellung des gleichen Fragments mit den Primern S1 zusammen mit N5, N7, N9 und N11 beruht auf der ungenauen Anlagerung der N-Primer. Mit den Primern N9 und S1 zeigte sich die Bande am deutlichsten (Abb. 3.1), da die selektiven Nukleotide von N9 genau der Sequenz der cDNA entsprechen.

In der EST-Datenbank fand sich eine Sequenz aus Gerste (*acc. nr.* BE421001) mit 100 % Homologie zu dem *Mlg*-spezifischen Genfragment. Dieses EST beinhaltet einen ORF für eine Nukleosiddiphosphatkinase (NDPK), welcher über *mlg*- und *Mlg*-tragende Linien vergleichend sequenziert wurde. Der Unterschied zwischen den anfälligen und resistenten Linien beruht auf einem Basenaustausch in der *Sau3AI*-Schnittstelle. Die Thymin-Base wird in den anfälligen Linien durch einen Cytosinnukleotid ersetzt, weshalb die Schnittstelle wegfällt und somit keine Bande bei den *mlg*-tragenden Linien im cDNA-AFLP erscheint (Abb. 3.5).

[illegible]

Abb. 3.5 Das *Mlg*-spezifische Fragment aus dem cDNA-AFLP (fett) mit dem homologen EST *acc. nr.* BE421004 (*H. vulgare*, Barke). Unterstrichen sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Nco*I und *Sau*3A I. Mit den eingezeichneten Primern (>>> und <<<) wurde über *mlg*- und *Mlg*-tragende Linien vergleichend sequenziert. In den anfälligen Linien (*mlg*) ist die *Sau*3A I-Schnittstelle durch einen Basenaustausch (T→C) eliminiert worden. Das Start-Codon ATG und das Stop-Codon TGA für den ORF einer NDPK sind fett gedruckt.

Da der Basenaustausch an der dritten Stelle eines Triplets stattgefunden hat und sowohl GAC als auch GAT für Asparaginsäure (Asp) codieren, ändert sich die Aminosäuresequenz des Proteins nicht. Deswegen kann es sich bei der Nukleosiddiphosphatkinase-Sequenz nicht um das gesuchte Resistenzgen *Mlg* handeln. Das NDPK-Gen könnte jedoch in enger Nachbarschaft zum *Mlg*-Locus auf dem introgressierten Fragment liegen, da der Basenaustausch in beiden untersuchten NIL-Paaren (I/IWe und Mi/MiGf) mit sehr unterschiedlichem genetischen Hintergrund gefunden wurde. Die Sequenzinformation wurde deshalb genutzt, um einen CAPS-Marker (*c*leaved *a*mplified *p*olymorphic *s*equences) zu generieren, der mit Hilfe einer hochauflösenden Kartierungspopulation kartiert werden kann.

In einer PCR mit Primern, welche die Sequenz mit dem Basenaustausch umspannen, wird die DNA amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bcl*I (erkennt die Sequenz T/GATCA) verdaut. Der Marker CAPS9-1 unterscheidet deutlich *mlg*- von *Mlg*-tragenden Pflanzen in den NILs I/IWe, S/SDe, P/PDe und Mi/MiGf (Abb. 3.6).

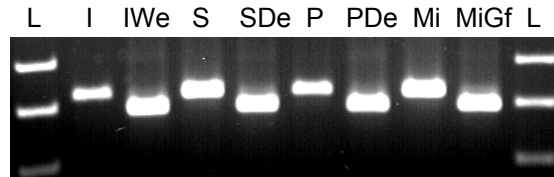
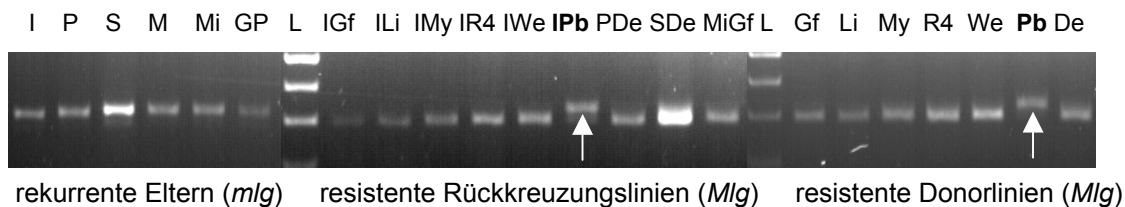


Abb. 3.6 Marker CAPS9-1 auf verschiedenen NILs (genomische DNA). Einer PCR mit den Primern 321s und 321as folgte ein Verdau mit *Bcl*I. obere Bande: 321 bp, untere Bande: 287 bp.

I: *mlg* IWe: *Mlg* P: *mlg* PDe: *Mlg*
S: *mlg* SDe: *Mlg* Mi: *mlg* MiGf: *Mlg*

Beim Einsatz des CAPS9-1 Markers auf anderen Linien zeigte er, mit bisher einer Ausnahme, zuverlässig den *Mlg*-Locus an. Bei der resistenten *Mlg*-Donorlinie Palmella Blue (Pb) und ihrer Rückkreuzungslinie IPb sagt CAPS9-1 allerdings nicht das Resistenzvermittelnde Allel *Mlg* vorher (Abb. 3.7).



rekurrente Eltern (*mlg*) resistente Rückkreuzungslinien (*Mlg*) resistente Donorlinien (*Mlg*)

Abb. 3.7 Der Marker CAPS9-1 auf rekurrenten Eltern, resistenten Donorlinien und ihren resistenten Rückkreuzungen (Mitte). Die höhere Bande (321 bp) zeigt das Anfälligkeitsallel *mlg* an, die tiefer liegende Bande (287 bp) das Resistenzallel *Mlg*. Eine Ausnahme macht der Marker bei der resistenten Donorlinie Pb und ihre Rückkreuzungslinie IPb. Für eine Beschreibung des Linienmaterials s. Kap. 2.1. L: 1 kb plus Leiter

Der Marker CAPS9-1 wird zur Zeit auf einer Population von J. Kurth (MPIZ Köln), die von P. Schulze-Lefert zur Verfügung gestellt wurde, und einer Kreuzung von Iwe (*Mlg*) x Ingrid (*mlg*) unter der Leitung von M. Korell kartiert.

3.1.3 Identifizierung *Bgh*-induzierter Gene

Im cDNA-AFLP mit fluoreszenzmarkierten Primern wurden 619 Genfragmente nach Inokulation mit *Bgh* differentiell exprimiert. Der größte Teil dieser cDNA zeigte sowohl vier als auch zwölf Stunden nach Inokulation eine erhöhte Expression, 17 Genfragmente (2,7 %) waren ausschließlich zum frühen, 13 (2,1 %) hauptsächlich zum späten Zeitpunkt hochreguliert. In diesem Screening wurden nur 5 cDNA-Fragmente (0,8 %) nach Inokulation sichtbar schwächer exprimiert. Die PCRs mit den Primerkombinationen, durch welche die meisten differentiellen Banden dargestellt werden konnten, wurden mit radioaktiv markierten Primern wiederholt, die Banden ausgeschnitten und sequenziert. Auf diese Weise wurden die Sequenzen von 120 Genfragmenten gewonnen, die alle nach Pathogenbefall

hochreguliert waren (Tab. 3.2). Bei dem cDNA-Fragment 13b-9 mit Homologie zu einer Subtilisin-ähnlichen Serinprotease handelt es sich wahrscheinlich um das einzige pilzliche Genfragment, das in dieser Arbeit sequenziert wurde. Der pilzliche Ursprung wurde in einer PCR mit Mehlaupilz-DNA, die freundlicherweise von C. Knecht, Institut für Biometrie, Gießen, zur Verfügung gestellt wurde, bestätigt (Abb. 7.1).

Tab. 3.2 Mehlaupilz-induzierte cDNA-Fragmente aus dem cDNA-AFLP. Sequenzen in Tab. 7.2

PK ¹	Code	Acc. Nr.	Länge (bp)	Homologie mit EST-Bank ² expected value, identities (%)	Homologie mit blastX ³ expected value, identities (%)
N13 S10	13b-1	-	131	BI779094 (<i>H. vulgare</i>) 8e ⁻⁶⁸ , 100%	-
	13b-2	AJ427591	151	BF291527 (<i>A. speltoides</i>) 4e ⁻⁴⁹ , 91%	unknown p., NM_106090 (<i>A.th.</i>) 1e ⁻¹³ , 64%
N13 S11	13b-4	-	57	BF266385 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻¹² , 100%	Hom. ⁴ : oxygen-evolving enhancer protein
	13b-5	-	134	BF064573 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁶⁷ , 99%	PAL, X16772 (<i>P. crispum</i>) 2e ⁻¹⁸ , 97%
N13 S16	13b-6	-	24	BI954761 (<i>H. vulgare</i>) 0.01, 95%	Hom.: put. chloroplast inner envelope protein
	13b-7	AJ428916	101	-	-
	13b-9 Pilz!	AJ312749	172	-	subtilisin-like serine protease, AF047689 (<i>P. anserina</i>), 6e ⁻¹⁸
	13b-10	AJ427593	216	BE587160 (<i>S. cereale</i>) 1e ⁻⁹⁴ , 95%	phospholipase D, AAG45487 (<i>L. esculentum</i>), 3e ⁻²⁶ , 71%
	13b-11	AJ427594	487	BF257931 (<i>H. vulgare</i>) 0.0, 100%	put. phytochelatin synthetase, AB016872 (<i>A.th.</i>) 1e ⁻⁵³ , 60%
N11 S9	11-1	-	63	BE558875 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻²⁵ , 98%	Hom.: pathogenesis-related protein 4
	11-2	-	80	BI954020 (<i>H. vulgare</i>) 7e ⁻³³ , 97%	amino acid permease, NM_105432 (<i>A.th.</i>) 6e-09, 73%
	11-3	AJ428917	85	BG739459 (<i>S. bicolor</i>) 2e ⁻³⁸ , 98%	hypoth. protein, F75297 (<i>D. radiodurans</i>) 8e ⁻⁰⁴ , 80%
	11-4	AJ428918	160	-	-
	11-5	-	263	AV947463 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁵² , 100%	-
			263	BE411182 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻⁸⁸ , 98%	
	11-6	-	268	BE519771 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁴² , 98%	mit. phosphate translocator, Y08499 (<i>B. pendula</i>) 6e ⁻³⁴ , 78%
N11 S13	11-7	-	50	BM500304 (<i>Z. mays</i>) 4e ⁻⁰⁹ , 91%	put. chorismate mutase, AC011438 (<i>A.th.</i>) 0.12, 93%
	11-8	-	103	BG418518 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁴⁸ , 98%	Hom.: ER66 (ethylene upregulated, <i>A.th.</i>)
	11-10	-	177	BF293408 (<i>T. turgidum</i>) 1e ⁻⁸⁵ , 97%	GTP-binding protein-like, (RHD3, <i>A.th.</i>) 6e ⁻²⁴ , 81%
	11-11	AJ427595	262	BE455253 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁴² , 97%	strictosidine synthase-like p., AL589883 (<i>A.th.</i>) 0.09, 42%
	11-12	-	195	BE601795 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁰⁵ , 99%	ribosomal protein, AF448416 (<i>Z. mays</i>) 4.6, 85%

PK ¹	Code	Acc. Nr.	Länge (bp)	Homologie mit EST-Bank ² <i>expected value, identities (%)</i>	Homologie mit blastX ³ <i>expected value, identities (%)</i>
N11 S14	11-13	-	58	BF261618 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻¹⁸ , 100%	4-alpha-glucanotransferase, T00748 (<i>A.th.</i>) 0.025, 78%
	11-14	-	125	BF256252 (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻⁶² , 99%	oxalate oxidase-like p., T05956 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻¹⁵ , 95%
	11-15	AJ428919	128	-	-
N8 S3	8a-1	AJ428922	32	BF485362 (<i>T. aestivum</i>) 2e ⁻⁰⁷ , 96%	Hom.: put. amine oxidase (<i>A.th.</i>)
	8a-2	-	44	BF065527 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻¹³ , 95%	tryptophan synthase beta chain, TRP1 MAIZE 8.5, 92%
	8a-3a	AJ428920	107	BG369913 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻⁴⁶ , 98%	PAL, AF237955 (<i>Rubus idaeus</i>) 1e ⁻⁰⁷ , 91%
	8a-3b	-	134	BE421279 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁶⁷ , 99%	put. ferredoxin, AC087851 (<i>O. sativa</i>) 6e ⁻¹⁶ , 84%
	8a-4a	AJ427596	489	BF619080 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁴⁹ , 98%	scarecrow-like protein, T45597 (<i>A.th.</i>) 0.26, 70%
	8a-4b	AJ427597	572		
	8a-5	AJ308568	36	BI952571 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻⁰⁶ , 91%	Hom.: heparanase (<i>A.th.</i>)
	8a-6	AJ428921	53	AU108195 (<i>O. sativa</i>) 1e ⁻¹³ , 95%	oligopeptide transporter, AC000375 (<i>A.th.</i>) 0.041, 76%
	8a-7	-	61	BE558296 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻²⁴ , 98%	receptor protein kinase, U20948 (<i>Ipomoea trifida</i>) 0.008, 100%
	8a-8	-	133	BE519960 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻⁵⁷ , 97%	blue copper-binding p., AF031195 (<i>T. aestivum</i>) 4e ⁻⁰⁶ , 85%
N8 S8	8a-9	AJ428922	137	BG60968 (<i>T. monococcum</i>) 3e ⁻⁵⁷ , 95%	put. amine oxidase, AC006224 (<i>A.th.</i>) 5e ⁻¹⁰ , 57%
	8a-10	-	150	AL500386 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁷² , 98%	Hom.: Cw-18 non-specific lipid transfer protein
	8a-11	-	359	BG343776 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁵¹ , 98%	glucose 6 P/Pi translocator, AF233658 (<i>A.th.</i>) 8e ⁻¹⁸ , 95%
	8a-12	-	466	BG299751 (<i>H. vulgare</i>) 0.0, 99%	NADP-dependent malic enzyme, P43279 (<i>O. sativa</i>) 7e ⁻⁷⁶ , 87%
	8a-13	-	104	AL450742 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻⁴⁹ , 99%	put. aspartate aminotransferase, AP003235 (<i>O. sativa</i>) 0.055, 61%
	8a-14	AJ427599	169	BE595498 (<i>S. bicolor</i>) 1e ⁻⁰⁷ , 87%	put. ser/thr-specific p. kinase, T01309 (<i>A.th.</i>) 6e ⁻²² , 87%
	8a-16	-	182	BG299437 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁹¹ , 98%	embryonic abundant protein-like, T50792 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻⁰⁸ , 46%
	8a-17	-	-	-	-
	8a-18	-	-	-	-
	8a-19	-	-	-	-
N5 S11	5-1	AJ428923	81	-	-
	5-2	-	134	BF064573 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁶⁷ , 99%	PAL, X16772 (<i>P. crispum</i>) 1e ⁻¹⁸ , 97%
N5 S6	5-3	-	56	BG350266 (<i>S. tuberosum</i>) 1e ⁻⁰⁴ , 85%	put. protein, T12956 (<i>A.th.</i>) 0.002, 100% (+ kinase signature)
	5-4	AJ428924	58	BG558800 (<i>S. bicolor</i>) 2e ⁻⁰⁷ , 96%	-
	5-5	AJ428925	63	BG262421 (<i>T. aestivum</i>) 1e ⁻¹⁴ , 94%	put. purple acid phosphatase, AC084319 (<i>A.th.</i>) 1e ⁻⁰⁴ , 80%
	5-6	-	120	BM325821 (<i>S. bicolor</i>) 5e ⁻²³ , 89%	NBS-LRR type resistance p., T04381 (<i>H. vulgare</i>) 7e ⁻¹⁶ , 100%
	5-7	AJ427600	136	AU077677 (<i>O. sativa</i>) 8e ⁻⁰⁹ , 81%	-
	5-8	-	-	-	-
	5-9	-	-	-	-
N13 S1	13a-1	-	37	BF259356 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻¹² , 100%	ATPase, Q08435 (<i>N. plumbaginifolia</i>) 1.7, 100%
	13a-2	-	55	BE437197 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻²⁰ , 98%	Hom.: put. signal peptidase (<i>A.th.</i>)

PK ¹	Code	Acc. Nr.	Länge (bp)	Homologie mit EST-Bank ² <i>expected value, identities (%)</i>	Homologie mit blastX ³ <i>expected value, identities (%)</i>
N13 S3	13a-3	AJ427601	34	AL504966 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁰⁸ , 100%	Hom.: MAP kinase (<i>O. sativa</i>)
	13a-4	-	41	BF266066 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻¹² , 97%	hypoth. protein, T05418 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻³⁰ , 57%
	13a-5	AJ312750	175	BF259330 (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻⁰⁴ , 87%	cytochrome P450, AB024038 (<i>A.th.</i>) 4e ⁻⁰⁸ , 50%
	13a-6	AJ427602	281	BF729477 (<i>Z. mays</i>) 2e ⁻⁴⁵ , 90%	put. amino acid acetyltransferase, AC004786 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻¹⁰ , 45%
N13 S6	13a-7	-	39	BG344702 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻⁰⁷ , 97%	Hom.: 4-coumarate-CoA ligase
	13a-8	-	55	BF264925 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻²¹ , 100%	-
	13a-9	AJ428903	58	BG558800 (<i>S. bicolor</i>) 1e ⁻⁰⁷ , 96%	-
	13a-10	-	61	AW982536 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻²⁶ , 100%	Hom.: put. UDP-glucose dehydrogenase
	13a-11	AJ428904	67	AL503462 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻¹⁷ , 100%	Hom.: calmodulin-binding heat- shock protein
	13a-12	-	71	BG343670 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻³⁰ , 98%	ATP-dependent RNA helicase, AB008265 (<i>A.th.</i>) 8.5, 59%
	13a-13	AJ427603	121	BM370422 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁸⁴ , 91%	tryptophan decarboxylase, U73657 (<i>C. acuminata</i>) 2e ⁻⁰⁹ , 65%
	13a-14	AJ427604	137	AU077677 (<i>O. sativa</i>) 1e ⁻⁰⁵ , 80%	-
	13a-15	-	217	BF263980 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹¹⁶ , 100%	unknown protein, AB005230 (<i>A.th.</i>) 4e ⁻³⁰ , 82%
	14-1	-	266	AV9137132 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁸⁴ , 91%	PAL, T06546 (<i>T. aestivum</i>) 4e ⁻³⁴ , 85%
N14 S9	14-2	-	41	AL502996 (<i>H. vulgare</i>) 6e ⁻¹⁵ , 100%	PAL, T05968 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻¹⁹ , 100%
	14-5	-	107	8-2, N12-4, N16-4, -	-
	14-6	AJ427605	114	8-3, N12-5, N16-5, -	-
	14-7	-	190	BE214036 (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻⁷² , 94%	PAL, A44133 (<i>L. esculentum</i>) 4e ⁻²¹ , 90%
	14-8	AJ428905	206	AV941494 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁰² , 98%	glutamine synthetase (GS2), P13564 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻³³ , 97%
	14-9	AJ428906	288	AV836011 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁵⁸ , 99%	Hom.: put. sugar transporter (<i>O. sativa</i>)
	14-10	-	47	AW982284 (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻¹⁶ , 97%	-
	14-11	-	50	BF266057 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻²⁰ , 100%	Hom.: ethylene-forming-enzyme- like dioxygenase
	14-12	-	77	BF259495 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻³³ , 98%	caffeoyl-CoA-O-methyltransferase, AB023482 (<i>O. sativa</i>) 1e ⁻⁰⁶ , 100%
	14-13	AJ427586	146	-	-
	14-14	AJ428907	161	BI959907 (<i>H. vulgare</i>) 6e ⁻⁶⁹ , 97%	-
	14-15	AJ308568	204	BE442888 (<i>T. aestivum</i>) 2e ⁻⁸² , 95%	heparanase, BAB09947 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻⁰⁸ , 53%
	14-16	AJ427587	588	BE492101 (<i>T. monococcum</i>) e ⁻¹⁷³ , 91%	PAL, T06546 (<i>T. aestivum</i>) 1e ⁻⁷⁸ , 82%
N8 S9	8-1	-	45	BF628596 (<i>H. vulgare</i>) 7e ⁻¹⁵ , 97%	-

PK ¹	Code	Acc. Nr.	Länge (bp)	Homologie mit EST-Bank ² <i>expected value, identities (%)</i>	Homologie mit blastX ³ <i>expected value, identities (%)</i>
	8-2	-	107	N12-4, N16-4, 14-5, -	-
	8-3	-	114	N12-5, 14-6, N16-5, -	-
	8-4	-	192	BE17043 (<i>T. aestivum</i>) 6e ⁻⁷⁸ , 94%	PAL, T05966 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻²⁷ , 98%
N8 S13	8-5	AJ427588	182	BG299437 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁹¹ , 98%	embryonic abundant protein-like, T50792 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻⁰⁸ , 46%
N8 S14	8-6	AJ428908	154	BF622336 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻³⁴ , 89%	-
	8-7	AJ428909	200	AV928786 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁰⁴ , 99%	naringenin-chalcone synthase, T04413 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻⁰⁹ , 70%
	8-8	-	290	BF261110 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁵⁵ , 98%	sucrose synthase, SUS1 HORVU (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁵⁰ , 100%
N11 S4	N11-3	-	110	BF065599 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻⁵³ , 99%	-
N11 S11	N11-9	AJ427589	212	BE519815 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻²⁰ , 83%	β-1,3-glucanase precursor, U72255 (<i>O. sativa</i>) 2e ⁻¹⁵ , 55%
	N11-10	AJ427590	343	-	-
N12 S5	N12-1	-	119	BE558443 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁵⁶ , 96%	peroxidase, AJ276227 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁷¹ , 81%
N12 S9	N12-4	-	107	N16-5, 14-5, 8-2, -	-
	N12-5	-	114	N16-6, 14-6, 8-3, -	-
	N12-6	-	227	BE558443 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹⁵⁶ , 96%	peroxidase, AJ276227 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁷¹ , 81%
N12 S11	N12-7	-	54	BF256520 (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻¹³ , 94%	Hom.: 3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyltransferase
	N12-8	AJ428910	80	BE516944 (<i>T. aestivum</i>) 2e ⁻¹⁵ , 93%	unknown protein, AC025808 (<i>A.th.</i>) 0.002, 68%
N16 S1	N16-1	-	39	BE559423 (<i>H. vulgare</i>) 0.026, 94%	Hom.: hexose transporter-like protein
N16 S5	N16-2	-	30	BF253515 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁰⁶ , 96%	Hom.: auxin-induced protein
N16 S9	N16-5	-	107	N12-4, 14-5, 8-2, -	-
	N16-6	-	114	N12-5, 14-6, 8-3, -	-
N16 S11	N16-8	-	52	-	-
	N16-12	AJ308568	193	BE442888 (<i>T. aestivum</i>) 8e ⁻⁵⁷ , 94%	heparanase, AB028613 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻⁰⁵ , 43%
N5 S4	N5-2	-	40	BF260881 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁰⁵ , 96%	-
	N5-4	AJ428911	226	BE196342 (<i>H. vulgare</i>) e ⁻¹²² , 99%	immunophilin, AB026647 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻⁰⁶ , 85%
N5 S6	N5-5	-	45	BG416212 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻¹⁷ , 100%	Hom.: put. acetyl-CoA carboxylase
	N5-7	-	67	BF627603 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻¹⁸ , 100%	Hom.: chl.a/b-binding protein
	N5-8	-	137	BE230944 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻⁷¹ , 100%	thioredoxin reductase, T00824 (<i>A.th.</i>) 5e ⁻¹² , 71%
N7 S15	N7-4	-	67	BI779141 (<i>H. vulgare</i>) 8e ⁻²³ , 100%	Hom.: ascorbate oxidase

PK ¹	Code	Acc. Nr.	Länge (bp)	Homologie mit EST-Bank ² <i>expected value, identities (%)</i>	Homologie mit blastX ³ <i>expected value, identities (%)</i>
	N7-5	-	155	BM816215 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁷⁹ , 99%	Hom.: ABA- and stress-inducible protein
N8 S1	N8-3	AJ428912	39	AV942695 (<i>H. vulgare</i>) 3e ⁻¹⁰ , 94%	Hom.: hexose transporter
	N8-4	AJ428913	87	-	-
	N8-5	AJ308568	99	BE442888 (<i>T. aestivum</i>) 6e ⁻⁰⁸ , 100%	heparanase, AB005249 (<i>A.th.</i>) 2e ⁻⁰⁶ , 80%
N8 S7	N8-8	-	73	BE415189 (<i>T. aestivum</i>) 5e ⁻²³ , 94%	PAL, T05970 (<i>H. vulgare</i>) 4e ⁻⁰⁶ , 95%
N8 S10	N8-10	-	91	BF260881 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻³⁷ , 97%	Hom.: Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein
N8 S11	N8-12	-	54	BF256520 (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻¹³ , 94%	Hom.: 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
	N8-13	-	78	BF266597 (<i>H. vulgare</i>) 9e ⁻²² , 100%	Hom.: oxygen-evolving enhancer protein
	N8-16	AJ308568	202	BE442888 (<i>T. aestivum</i>) 4e ⁻⁸⁸ , 96%	heparanase, AB005249 (<i>A.th.</i>) 1e ⁻¹² , 53%
N9 S4	N9-2	-	40	BF260881 (<i>H. vulgare</i>) 1e ⁻⁰⁷ , 100%	Hom.: Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein
	N9-3	AJ428915	74	C72419 (<i>O. sativa</i>) 2e ⁻²² , 93%	S-conjugate transporting ATPase AC009917 (<i>A.th.</i>) 0.005, 79%
N9 S8	N9-5	AJ428914	30	BE216545 (<i>H. vulgare</i>) 8e ⁻⁰⁹ , 100%	Hom.: put. disease resistance protein
	N9-6	-	105	BE519869 (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻⁵⁰ , 99%	Hom.: low temp. responsive protein
	N9-7	AJ430078	128	BE585739 (<i>T. aestivum</i>) 6e ⁻¹⁹ , 98%	Hom.: peroxidase
	N9-8	AJ430079	162	AW925326 (<i>H. vulgare</i>) 9e ⁻⁸² , 98%	Hom.: protein kinase
N9 S11	N9-10	AJ430080	128	BE437951 (<i>H. vulgare</i>) 2e ⁻⁶³ , 99%	Hom.: DNA-binding protein ABF2
	N9-11	-	134	HVPAL2MR (<i>H. vulgare</i>) 5e ⁻⁶⁷ , 97%	PAL, PAL1DAUCA (<i>D. carota</i>) 8e ⁻¹⁹ , 97%

¹: Primerkombination (PK) mit der der Polymorphismus generiert wurde

²: NCBI EST-Datenbankeinträge mit den höchsten Homologien (März 2002)

³: NCBI Protein-Datenbankeinträge mit den höchsten Homologien (März 2002)

⁴: Die Homologie mit blastX bezieht sich auf das zum differentiellen Fragment gefundene homologe EST (Hom.)

Die Größe der isolierten cDNA-Fragmente variierte zwischen 24 und 588 bp, wobei nur wenige länger als 200 bp waren (18 %), rund 41 % der dargestellten mehltaupilzinduzierten Banden waren kleiner als 100 bp. Für ca. 30 % der Fragmente fanden sich keine homologen Sequenzen (mit Homologie größer 90 %) in der Gersten-EST-Datenbank.

Manche cDNA-Elemente wurden mit mehreren Primerkombinationen amplifiziert, so z.B. ein 182 bp langer Abschnitt des *early abundant protein* (8a-16 und 8-5) oder ein Teil eines 3-Phosphoshikimatcarboxyvinyltransferase-Gens (N12-7 und N8-12).

Für einige Gene wurde mehr als ein cDNA-Fragment identifiziert. Homologie zu einer Peroxidase haben die Fragmente N12-1, N12-6 und N9-7. 8a-1 und 8a-9 kodieren für Teile einer Aminoxidase und für ein Heparanase-Gen wurden fünf unterschiedliche Banden ausgeschnitten (8a-5, 14-5, N16-12, N8-5, N8-16). Für das Schlüsselenzym des Phenylpropanoidstoffwechsels, die Phenylalaninammoniumlyase (PAL), wurden zehn cDNA-Fragmente isoliert. Bis auf das Fragment 8a-3a, das die höchste Homologie zu einer induzierbaren PAL aus Weizen hat, lassen sich alle cDNA-Stücke den von Kervinen *et al.* (1997, 1998) beschriebenen PAL-Genen der Gerste zuordnen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Zuordnung der identifizierten PAL-Fragmente zu den von Kervinen *et al.* (1997, 1998) beschriebenen PAL-Genen in Gerste.

cDNA-AFLP-Fragment	bp	accession nr. des Homologs	ähnlichstes Gen in der Datenbank
14-1	266	X99483	PAL 6 (280 bp bis NNN) 98 % Übereinstimmung
14-16	588	X99483	PAL 6 (280 bp bis NNN) 98 % Übereinstimmung
14-7 = 8-4	192	Z49145	PAL 2 (660 bis 852 bp) 100 % Übereinstimmung
14-2	41	Z49146	PAL 3 (1632 bis 1673) 100 % Übereinstimmung
5-2 = 13b-5 = 9-11	134	Z49145 Z49147	PAL 2 (532 bis 666 bp) und PAL 7 (1374 bis 1508) 100 % Übereinstimmung
8-8	73	Z49147	PAL 7 (229 bis 302 bp) 99 % Übereinstimmung
8a-3a	106	AY005474	induzierbare PAL (<i>T. aestivum</i>) 96 % Übereinstimmung

Ausgehend von ihrer Homologie auf Proteinebene, kann man die identifizierten Fragmente in hypothetische Funktionseinheiten einteilen (Abb. 3.9). Für 27 % der Sequenzen konnten keine Homologe gefunden werden oder die Funktion der Proteine ist unbekannt. Je 9 % der Genfragmente kodieren für ein in die Redox-Regulation (Peroxidasen, Aminoxidase, Thioredoxin Reduktase u.a.) oder die Signaltransduktion (z.B. Phospholipase D, GTP-Bindeprotein ähnlich, DNA-Bindeprotein) involviertes Protein. In der Gruppe der Signaltransduktionsproteine finden sich allein fünf unterschiedliche Proteinkinasen (8a-7, 8a-14, 5-3, 13a-3 und N9-8).

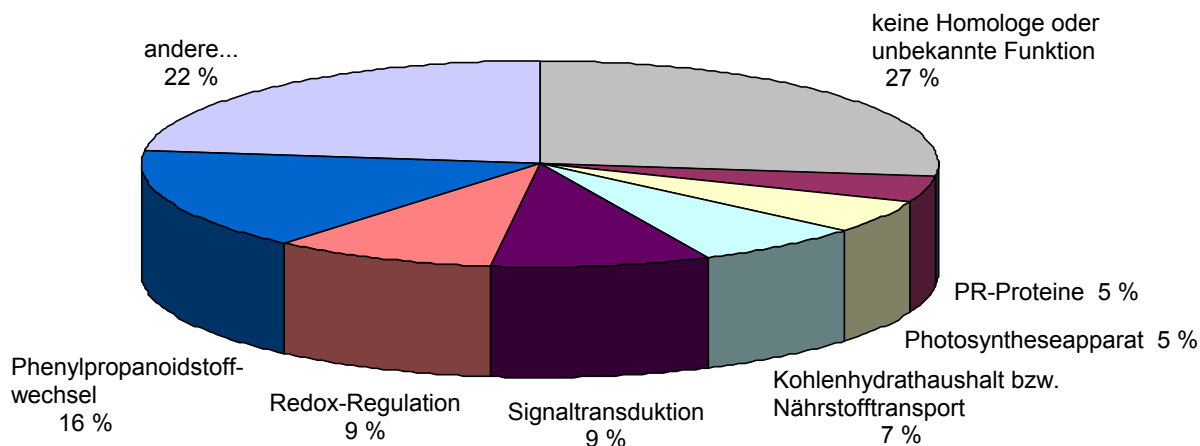


Abb. 3.9 Gruppierung Mehltaupilz-induzierter Genfragmente. Grundlage für die Einteilung ist ihre Homologie auf Proteinebene (blastX).

Die cDNA klassischer PR-Proteine wie β -1,3-Glucanase oder Chitinase wurde ähnlich häufig (5 %) identifiziert wie die von Genen des Photosyntheseapparats (z. B. Ferredoxin oder Chlorophyll-a/b-Bindeprotein). 7 % der cDNA-Fragmente lassen sich mit dem Zuckermetabolismus (z.B. Saccharose Synthase, UDP-Glucose Dehydrogenase, Malatenzym) bzw. mit dem Transport von Nährstoffen (Hexosetransporter, Oligopeptidtransporter, Aminosäurepermease) in Zusammenhang bringen. Ein großer Teil der identifizierten Gene (16 %) ist in den Shikimat- und Phenylpropanoidstoffwechsel involviert. Neben den bereits beschriebenen PAL-Genen (Tab. 3.3) finden sich Homologien für neun andere Enzyme (Chorismatmutase, Chalkonsynthase, Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase u.a.).

Die Ergebnisse des cDNA-AFLP zeigen, dass neben den typischen Stress-induzierbaren Genen (PR-Proteine, Phenylpropanoidstoffwechsel u. a.) die Transkripte zahlreicher weiterer Gene nach Kontakt mit dem Pathogen *Bgh* akkumulieren. Eine Funktion der Genprodukte in der Gerste-Mehltaupilz Interaktion ist oftmals nicht bekannt.

3.2 Bestätigung der differentiellen Genexpression isolierter cDNA-Fragmente nach Inokulation mit Mehltaupilz

Um die im cDNA-AFLP differentiellen Genfragmente unabhängig zu überprüfen, wurde ein neuer Inokulationsversuch durchgeführt und Gersten-RNA für Expressionsstudien isoliert. Da im *Northen blot* in der Regel keine Signale detektiert werden konnten, wurde die Transkription ausgesuchter Gene mittels SMARTTM-RT-PCR (Kap. 2.10.1) und *onestep* RT-PCR (Kap. 2.10.2) untersucht. SMARTTM-RT-PCR ist eine zuverlässige Methode (Vernon *et al.* 2000) und liefert die gleichen Ergebnisse wie eine *onestep* RT-PCR (Abb. 7.3). Um

Beladungsfehler auszuschließen, wurden die SMARTTM-RT-PCRs zwei- bis dreimal wiederholt.

Insgesamt wurden 30 Genfragmente überprüft. Für 9-3 (ABC-Transporter) und 13a-1 (ATPase) konnte die Induktion nach Inokulation nicht bestätigt werden, bei 11-10 (GTP-Bindeprotein ähnlich) war sie nur schwach (ohne Abb.). Alle anderen Gene waren deutlich nach Inokulation mit Gersten (*Bgh*)- und Weizenmehltaupilz (*Bgt*) stärker exprimiert (Abb. 3.10-3.12). Alle untersuchten Genfragmente waren bereits 4 hpi stärker exprimiert, die meisten zeigten zu diesem Zeitpunkt maximale Transkriptakkumulation, die dann mit zunehmender Zeit wieder schwächer wurde.

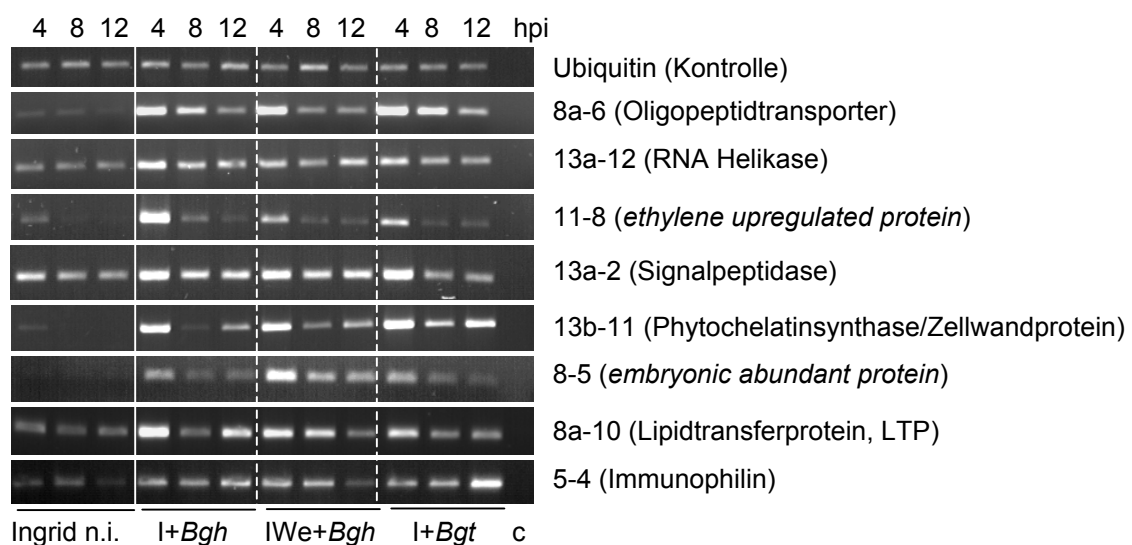


Abb. 3.10 Genexpression in den Linien Ingrid (*mlg*) und IWe (*Mlg*) nach Inokulation mit *Bgh* oder mit dem Nichtwirtspathogen *Bgt* (nur Ingrid) zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12 hpi. c: Kontrolle

Die Expression mancher Genfragmente, z.B. die von 5-3 (Proteinkinase, Abb. 3.12), ging nach 4 hpi wieder auf das Niveau der nicht inokulierten Proben zurück. Das Genfragment 13b-11 (Phytochelatinsynthase/Zellwandprotein) zeigte eine biphasische Transkriptakkumulation mit maximaler Induktion zu 4 und 12 hpi, unterbrochen von einer schwächeren Expression 8 hpi.

Ein reproduzierbarer Unterschied zwischen *mlg*- und *Mlg*-tragenden Linien ließ sich nicht darstellen. Einige der dem Phenylpropanoidstoffwechsel zugehörigen Gene (Abb. 3.11) wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum hochreguliert (8-12, 14-12), andere nur transient (8-8, 13a-7).

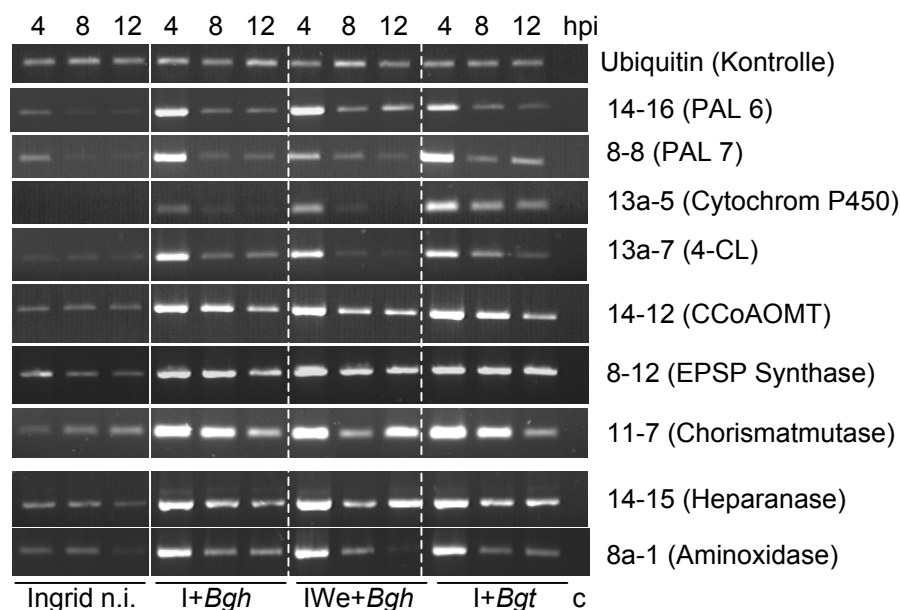


Abb. 3.11 Expression von Genen des Phenylpropanoidstoffwechsels und der Redox-Regulation (Heparanase, Aminoxidase) in den Linien Ingrid (*mlg*) und IWe (*Mlg*) nach Inokulation mit *Bgh* oder mit dem Nichtwirtspathogen *Bgt* (nur Ingrid) zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12 hpi.
PAL: Phenylalaninammoniumlyase, 4-CL: 4- Cumaryl-CoA-ligase, CCoAOMT: Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase, EPSP: 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat

Alle durch den Echten Gerstenmehltaupilz (*Bgh*) induzierten Gene wurden auch durch das Nichtwirt-Pathogen Echter Weizenmehltaupilz (*Bgt*) verstärkt exprimiert. Es fällt jedoch auf, dass die Genfragmente 13b-11 (Phytochelatinsynthase/Zellwandprotein, Abb. 3.10), 13a-5 (Cytochrom P450, Abb. 3.11), 14-11 (Ethylen-bildende Dioxygenase) und 9-5 (*disease resistance protein*, Abb. 3.12) stärker nach Inokulation mit *Bgt* als nach *Bgh* akkumulieren. Besonders deutlich wurde das bei 14-11 und 9-5. 9-5 wurde laut SMARTTM RT-PCR nur sehr schwach durch *Bgh* induziert und merklich stärker durch *Bgt*.

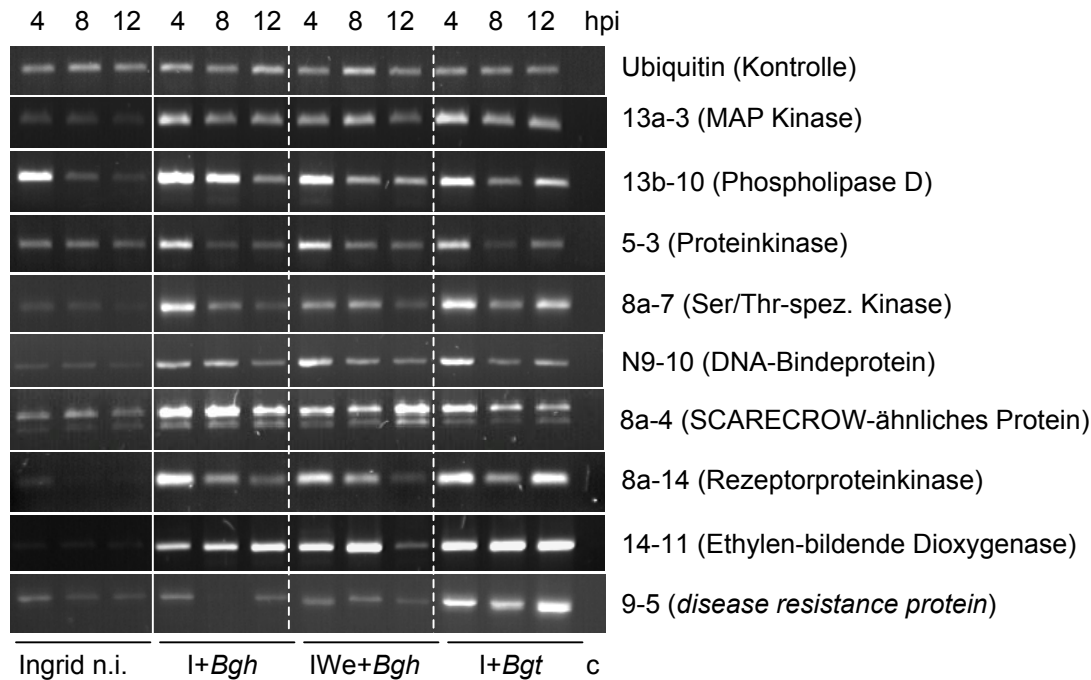


Abb. 3.12 Expression von Genen, die in Signaltransduktion involviert sein können, in den Linien Ingrid (*mlg*) und IWe (*Mlg*) nach Inokulation mit *Bgh* oder mit dem Nichtwirt-Pathogen *Bgt* (nur Ingrid) 4, 8 und 12 hpi.

3.2.1 Frühe Induktion einiger Gene nach Inokulation mit Gerstenmehltaupilz

Die für das cDNA-AFLP ausgewählten Zeitpunkte 4 und 12 hpi entsprechen ungefähr der Entwicklung des primären bzw. sekundären Keimschlauchs. Da alle induzierten Fragmente bereits 4 hpi akkumulierten, stellte sich die Frage, ab welchem Zeitpunkt nach Inokulation die Pflanzenzelle auf die Pilzattacke reagiert. Dafür wurden für einige ausgewählte Gene frühere Zeitpunkte ab 1 hpi bis 6 hpi untersucht (Abb. 3.13).

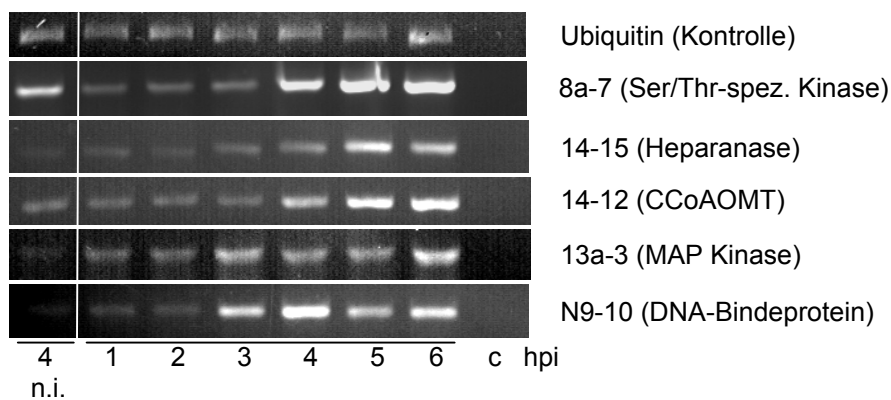


Abb. 3.13 Frühe *Bgh*-induzierte Genexpression in Ingrid-Weihenstephan (*Mlg*). *onestep*-RT-PCR, c: Kontrolle, n.i.: nicht inokuliert, CCoAOMT: Caffeoyl-Coenzym A-O-Methyltransferase.

Die Transkripte von 8a-7 (Ser/Thr-spez. Kinase) und 14-12 (CCoAOMT) wurden ab 4 hpi mit jeder Stunde stärker exprimiert, die Induktion von 14-15 (Heparanase) wurde erst 5 hpi richtig deutlich. Das Gen einer MAP Kinase (13a-3) schien bereits 1 h nach Inokulation leicht induziert zu sein, war aber auf jeden Fall ab 3 hpi hochreguliert. Das Gentranskript N9-10 mit Homologie zu einem DNA-Bindeprotein zeigte ebenfalls ab 1 hpi eine schwache Akkumulation und wurde insbesondere ab 3 hpi stärker abgelesen, die Transkription zeigt ein Maximum bei 4 hpi.

Diese frühe Transkriptakkumulation verschiedenster Gene macht deutlich, dass die Pflanze bereits auf Faktoren reagiert, die vor der Ausbildung des appressorialen Keimschlauchs freigesetzt werden.

3.3 BTH-induzierte Gene

Um gemeinsame Komponenten der chemisch induzierten Resistenz und der Pathogen-induzierten Abwehr zu finden, wurde die Expression Mehltaupilz-induzierter Gene nach Behandlung mit dem chemischen Resistenzinduktor BTH (Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-*S*-methylester) 7 und 24 hpt (*hours post treatment*) untersucht.

Der Marker für chemische Resistenzinduktion, BCI-4 (*barley chemically induced*, Beßer *et al.* 2000), diente als Positiv-Kontrolle und war 24 hpt deutlich induziert (Abb. 3.14).

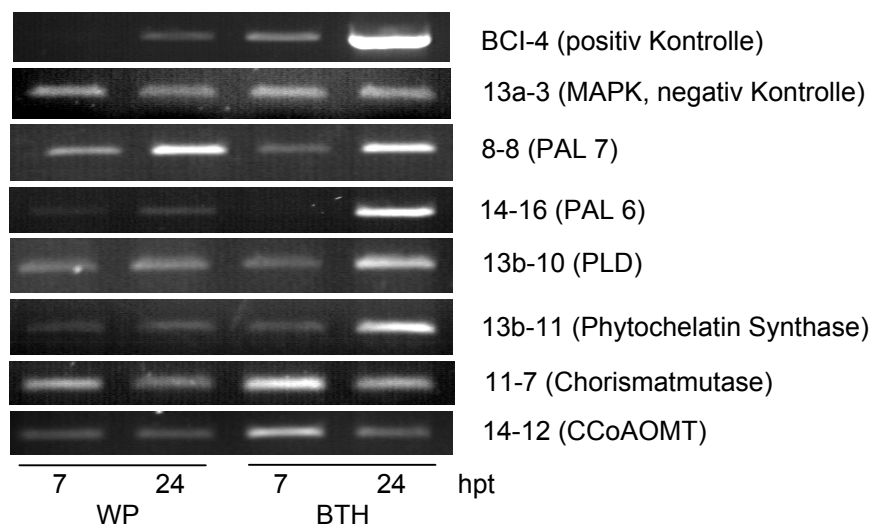


Abb. 3.14 Genexpression nach Behandlung mit dem chemischen Resistenzinduktor BTH. Gezeigt sind die Ergebnisse von SMARTTM-PCR nach unterschiedlicher Behandlung von Gerstenprimärblättern. BCI-4 diente als chemisch induzierte Positivkontrolle, 13a-3 als nicht induzierte Kontrolle. hpt: *hours post treatment*, WP: *wettable powder*, MAPK: MAP Kinase (*acc. nr.* AJ495775), PAL: Phenylalaninammoniumlyase, PLD: Phospholipase D, CCoAOMT: Caffeoyl-Coenzym A-O-Methyltransferase.

Die konstante Expression der MAP Kinase 13a-3 wurde durch *Northern*-Analyse bestätigt (Abb. 7.2 im Anhang) und eignete sich als nicht induzierte Kontrolle.

Die Genfragmente von 11-7 (Chorismatmutase) und 14-12 (CCoAOMT) wurden 7 h nach BTH-Behandlung stärker exprimiert, Transkripte von 14-16 (PAL 6), 13b-10 (Phospholipase D) und 13b-11 (Phytochelatinsynthase) akkumulierten 24 hpt.

Im Unterschied zu 14-16, einem Genfragment der PAL 6, war das Gen der PAL 7 (8-8) auch in der mit Leerformulierung behandelten Kontrolle 24 hpt hochreguliert, wurde also nicht chemisch induziert.

In Tab. 3.5 sind die Ergebnisse der unabhängigen Expressionsanalysen mittels SMARTTM-PCR für 30 Gene, bezeichnet nach ihrer höchsten Homologie auf Proteinebene, zusammengefasst. Die Bestätigung der Induktion bei 28 von 30 Genen zeigt, dass im cDNA-AFLP nur wenig Falschpositive isoliert wurden.

Tab. 3.5 Zusammenfassung des beobachteten Expressionsverhaltens von 30 untersuchten Genen nach Inokulation mit *Bgh*, *Bgt* und Sprühbehandlung mit dem chemischen Resistenzinduktor BTH.

Homolog	<i>Bgh</i>	<i>Bgt</i>	BTH	Homolog	<i>Bgh</i>	<i>Bgt</i>	BTH
MAP Kinase	+	+	-	Lipidtransferprotein	+	+	-
Phospholipase D	+	+	+	Immunophilin	+	+	-
Proteinkinase (5-3)	+	+	-	ATPase	-	-	-
Rezeptorproteinkinase	+	+	-	ABC-Transporter	-	-	-
DNA-Bindeprotein (N9-10)	+	+	-	Saccharose Synthase	+	+	-
Ser/Thr-spez. Kinase	+	+	n.d.	Oligopeptidtransporter	+	+	-
Ethylen-bildende Dioxygenase	+	++	-	<i>disease resistance protein</i> (9-5)	+	++	-
Cytochrom P450	+	++	-	PAL 6 (14-16)	+	+	+
<i>scarecrow-like protein</i>	+	+	-	PAL 7 (8-8)	+	+	-
GTP-Bindeprotein (11-10)	(+)	(+)	-	4-Cumaryl-CoA-ligase	+	+	n.d.
RNA-Helicase	+	+	-	CCoAOMT	+	+	+
<i>ethylene upregulated protein</i> (11-8)	+	+	-	<i>embryonic abundant protein</i>	+	+	-
Phytochelatinsynthase	+	++	+	EPSP Synthase	+	+	-
Aminoxidase	+	+	-	Chorismatmutase	+	+	+
Signalpeptidase	+	+	-	Heparanase	+	+	-

+ : erhöhte Expression
 ++ : stärker induziert als in anderen Behandlungen
 - : kein Einfluß auf die Expression
 () : schwacher Einfluß auf die Expression
 n.d. : nicht detektiert

3.4 Sequenzverlängerung der aus dem cDNA-AFLP stammenden Genfragmente

Ein Großteil der im cDNA-AFLP gewonnenen Fragmente war kleiner als 200 bp und musste, falls keine homologen Sequenzen in der Datenbank zu finden waren, für weitere Untersuchungen experimentell verlängert werden.

Ziel von RACE-Experimenten (*rapid amplification of cDNA ends*, Kap. 2.11.1) ist die Gewinnung der gesamten in der mRNA enthaltenen Sequenzinformation. Mit inverser PCR (iPCR, Kap. 2.11.2) können Genfragmente auf genomischer Ebene verlängert werden. Das hat einerseits den Vorteil, dass neben dem codierenden Bereich auch die Promotorregion des Gens isoliert werden kann, andererseits werden Introns im Gen mit amplifiziert. Letztere müssen durch weitere Arbeitsschritte genau lokalisiert werden, um einen durchgängigen ORF zu erhalten. Für 14 unterschiedliche Gene konnte mit diesen beiden Methoden mehr Sequenzinformation gewonnen werden (Tab. 3.6).

Für das Genfragment N5-4 konnte eine cDNA mit vollständigem ORF inclusive 5'- und 3'-nicht kodierender Bereiche gewonnen werden. Das Protein (Abb. 7.5) besteht aus 154 aa, hat hohe Homologie zu Immunophilin aus *A. th.* (*Arabidopsis thaliana*, 84% identische aa) und besitzt laut *PROSITE*-Vorhersage (Falquet *et al.* 2002) zwischen aa 50-138 eine FKBP-Typ Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase Domäne (*FK506-binding protein*).

N9-3 konnte in 5'-Richtung auf 488 bp verlängert werden, allerdings ließ sich seine Induktion durch Mehltäupilz nicht bestätigen, weshalb das Gen eines *multidrug-resistance* Proteins nicht weiter bearbeitet wurde.

Die Fragmente N9-5, N5-8, N8-12 (= N12-7) und 5-3 konnten mit RACE in 3'-Richtung verlängert werden. Der Gewinn an Sequenzinformation für N8-12 war nur gering (217 bp), weshalb sich die in Tab. 3.6 angegebene Ähnlichkeit mit einer EPSP Synthase (5-Enol-pyruvylshikimat-3-phosphat) auf ein größeres homologes EST bezieht. Dagegen konnte 5-3 auf 1100 bp verlängert werden, die ein Leseraster für eine Proteinkinase Domäne mit Serin/Threonin Kinase Signatur aufweisen (*PROSITE*). Die Sequenz besitzt jedoch keinen fehlerfrei durchgängigen ORF. Für N9-5 (648 bp) mit Homologie zu einem *Cf2/Cf5-disease resistance protein* ließ sich die Nukleotidabfolge weder mit RACE noch mit iPCR in 5'-Richtung verlängern.

Tab. 3.6 Durch experimentelle Verlängerung von Genfragmenten gewonnene Sequenzinformation.

Code	RACE	iPCR	Länge (bp)	Accession Nr. ¹	Homologie mit blastX <i>expected value, identities (%)</i>
N5-4	5' + 3'	n.d.	835	AJ495769	immunophilin, U52046 (<i>A. th.</i>), 6e ⁻⁵⁸ , 84%
N9-3	5'	n.d.	488	AJ428915	multidrug-resistance protein homolog, T01369 (<i>A. th.</i>), 1e ⁻⁷⁰ , 77%
N9-5	3'	-	648	AJ495770	Cf2/Cf5-disease resistance protein, AF166121 (<i>H. vulgare</i>), 1e ⁻²³ , 38 %
N5-8	3'	n.d.	642	AJ495771	put. thioredoxin reductase, AY062479 (<i>A. th.</i>), 4e ⁻⁵² , 73%
8a-5, 14-15, N16-12, N8-5, N8-16	5' + 3'	+	2216	AJ495772	contains similarity to heparanase gene, AB005249 (<i>A. th.</i>), 0.0, 53%
8a-6	3'	+	411 (2713)	AJ495773	put. peptide transporter, AC018727 (<i>O. sativa</i>), e ⁻¹⁰⁹ , 45%
13a-5	5' + 3'	n.d.	1790	AJ495774	cytochrome P450, AB036772 (<i>T. aestivum</i>), e ⁻¹⁰⁶ , 49%
13a-3	(5') + 3'	n.d.	2276	AJ495775	blast and wound induced MAP kinase, AF177392 (<i>O. sativa</i>), 0.0, 84%
13b-11	(5')	n.d.	1246	AJ495776	put. phytochelatin synthetase, AB016872 (<i>A. th.</i>), e-126, 57% put. cell wall protein, Y14423 (<i>A. th.</i>), e-125, 58%
N8-12, N12-7	3'	n.d.	217	AJ495777	- EST: AJ435453 → EPSP synthase (<i>Z. mays</i>)
8a-14	(5') + 3'	+	2221	AJ427599	receptor-type protein kinase LRK1, T50661 (<i>A. th.</i>), e ⁻¹⁷⁷ , 53%
N9-8	3'	n.d.	908	AJ495778	TCTR2 (<i>L. esculentum</i>), 2e ⁻⁴⁵ , 81% EDR1, AF305911 (<i>O. sativa</i>), 1e ⁻⁴⁴ , 82%
N9-10	3'	-	191	AJ430080	- EST: BM443318 → DNA-binding protein ABF2 (<i>Avena fatua</i>)
5-3	3'	n.d.	1100	AJ495779	protein kinase-like protein, NM_114559 (<i>A. th.</i>), e ⁻¹¹⁶ , 81% + 71%

Die verwendeten Primer sind im Anhang (Tab. 7.4 und 7.5) angegeben.

¹: Neueinträge in die *GenBank* Datenbank

n.d.: nicht durchgeführt

(): unvollständig (5'-Ende nicht erreicht)

-: erfolglos durchgeführte iPCR

Das 854 bp-Fragment eines putativen Heparanasegens konnte auf 2216 bp verlängert werden. Bei den Bereichen 808-909 bp und 1144-1238 bp (über iPCR gewonnen) handelt es sich vermutlich um Introns (Datenbankeintrag mit Intron-Information). Ohne diese Bereiche ist die Sequenz 2019 bp groß, ein Leserasterverschiebung wird eliminiert und die Homologie zu bekannten Heparanasegenen aus *Arabidopsis* steigt. Die 2019 bp enthalten einen ORF für ein Protein mit 537 aa (Abb. 7.6). Die Proteindomänensuche in der Pfam HMM-Datenbank (Bateman *et al.* 2002) liefert eine Homologie zur N-terminalen Domäne der Glycosyl-Hydrolase Familie 79 (3.9 e⁻¹⁶⁵). Diese Proteinregion gehört zur Familie der Endo-beta-N-Glucuronidasen, auch Heparanasen genannt. SignalP, ein Programm zur Identifizierung von Signalpeptiden (Nielsen 1997), findet eine mögliche Signalpeptid-Schnittstelle zwischen Aminosäure 19 und 20 (IMS-ED).

Das cDNA-Fragment 8a-6 konnte nach der 3'-Verlängerung mit RACE (402 bp) mittels iPCR auf 2713 bp ausgedehnt werden (Abb. 7.7). Die Homologie mit einem Peptidtransporter aus Reis beginnt ungefähr ab Base 800, die davor liegende Sequenz hat keine Ähnlichkeit mit bekannten Genabschnitten. Da es im codierenden Bereich zu Leserasterverschiebungen und Brüchen in der Homologie kommt, enthält die Sequenz wahrscheinlich Introns, die aber noch nicht lokalisiert worden sind. Eine Suche nach Proteindomänen in der Pfam HMM-Datenbank im +2 *frame* der Sequenz ergab eine Homologie ($1.9e^{-48}$) zu PTR2 (*peptide transporter*). Dabei handelt es sich um ein Protein, das zur POT-Familie (*proton-dependent oligopeptide transport*) gehört.

Für 13a-5 konnte über RACE die vollständige cDNA-Sequenz gewonnen werden. Sie enthält einen ORF (Abb. 7.8), der für 534 aa codiert und hohe Homologie zu Cytochrom P450-Proteinen aus verschiedenen Pflanzen hat.

Durch die Isolierung des cDNA-Fragments 13a-3 konnte das Gen einer MAP Kinase identifiziert werden, das in Abschnitt 3.6 näher beschrieben wird.

Mit Hilfe der Gersten-ESTs BF257931 und AV939845 und RACE in 5'-Richtung, wurde 13b-11 auf 1642 bp verlängert. Die cDNA-Sequenz ist damit noch nicht vollständig, hat aber im +1 Leseraster Homologie zu putativen Proteinen aus *A. th.* (Phytochelatinsynthase oder Zellwandprotein).

Das cDNA-AFLP Fragment 8a-14 konnte mittels RACE und iPCR auf 2221 bp verlängert werden. Da das 5'-Ende durch 5'-RACE isoliert wurde, kann es sich noch nicht um Promotorregion handeln, sondern muss dem nicht codierenden 5'-Bereich der mRNA zugeordnet werden. Die Sequenz von 8a-14 enthält einen ORF für ein Protein von 684 aa (Abb. 7.9) mit Homologie zu Rezeptorproteinkinasen. Im N-terminalen Bereich (29-201 aa) findet sich eine Lectin Beta Domäne (Pfam HMM-Datenbank) und zwischen 360 und 635 aa liegt die Proteinkinase-Domäne. Nach SignalP (Nielsen *et al.* 1997) ist ein Signalpeptid vorhanden (wahrscheinliche Spaltungsstelle zwischen Aminosäure 28 und 29, VAA-AD) und PSORT, ein Suchprogramm für die Lokalisation von Proteinen (Nakai und Horton 1999), sagt eine Transmembranregion (300-330 aa) vorher.

Bei N9-8 gelang die Verlängerung in 3'-Richtung. Die Sequenz enthält im +1 Leseraster eine Proteinkinase-Domäne und zeigt hohe Homologie zu MAP Kinase Kinase Kinasen wie TCTR2 aus Tomate und EDR1 (*enhanced disease resistance*) aus Reis.

Durch die 3'-Verlängerung von N9-10 konnte fast nur nicht-kodierende Sequenzinformation gewonnen werden. In 5'-Richtung waren weder RACE noch iPCR erfolgreich. Ein Gersten-

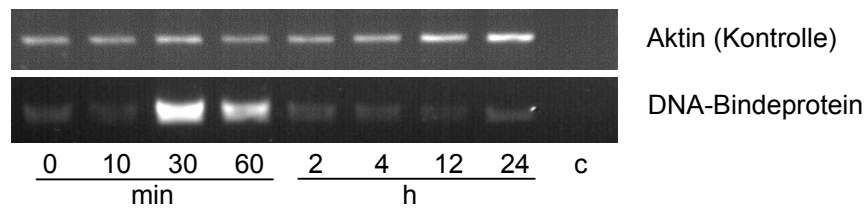


Abb. 3.16 Transkriptakkumulation des putativen DNA-Bindeproteingens N9-10 nach Verwundung. 7 Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) wurden mit Carborund verwundet und Blätter vor der Verwundung (0 min) bis 24 h nach Verwundung geerntet.

3.5.2 RNAi mit dem putativen DNA-Bindeproteingen N9-10 in Gerstenblättern

Im transienten Transformationssystem nach Schweizer *et al.* (2000) wurde die Epidermis von Gerstenblattsegmenten mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) des Testgens und einem GFP-Reporterplasmid ballistisch transformiert. Die dsRNA induziert über den RNA Interferenz (RNAi) Mechanismus einen sequenzspezifischen Abbau von Transkripten mit hoher Homologie zur dsRNA. Die Blattsegmente wurden vier Stunden nach Transformation mit Mehltaupilzsporen inokuliert und die Gerste-Mehltaupilz Interaktion 40-48 Stunden später ausgewertet. In parallelen Kontrollansätzen wurde dsRNA eines menschlichen Thyroid-Hormonrezeptorgens (TR-dsRNA), für das es keine bekannten homologen Sequenzen in Pflanzen gibt, in die Pflanzenzelle gebracht. Unterschiede in der Penetrationseffizienz von *Bgh* zwischen Testgen- und Kontrollansatz werden durch die unterdrückte Expression des Testgens erklärt.

Mithilfe einer RT-PCR (ohne Abbildung) konnte die Expression von N9-10 in der Epidermis als Voraussetzung für RNAi-Experimente gezeigt werden. Dies und die mRNA-Abundanz zu frühen Zeitpunkten der Gerste-*Bgh* Interaktion machten den transienten *knockout* in der Gerstenepidermis zum geeigneten Ansatz, die Funktion von N9-10 in dieser Wirt-Pathogen Interaktion zu überprüfen.

Es wurden sechs unabhängige Versuche des transienten *knockouts* von N9-10 durchgeführt. Die Penetrationsrate von *Bgh* in den Kontrollen variierte zwischen 35 und 72 %, im Mittel ($\pm$ SE) lag sie bei 57 ± 5 % (Abb. 3.17). Im Testansatz mit der dsRNA von N9-10 lag die Penetrationrate in allen Versuchen unter der der Kontrolle, der Mittelwert betrug 39 ± 6 %. Student's t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Penetrationsraten mit $p = 0,0026$.

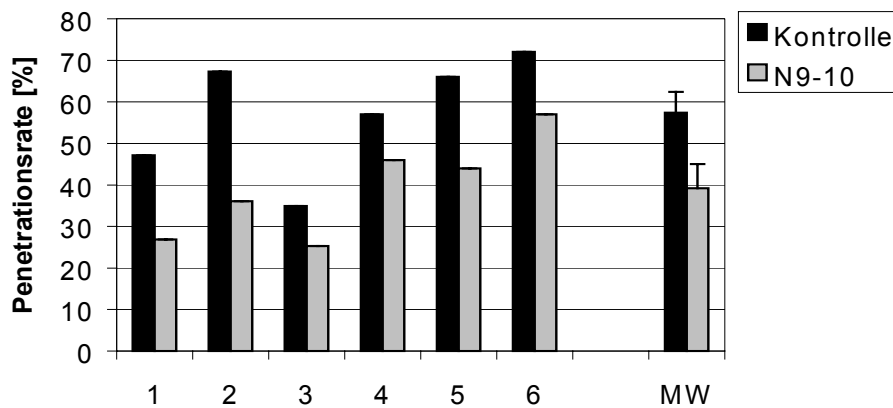


Abb. 3.17 Transienter *knockout* von N9-10 mittels RNAi. Blattsegmente des anfälligen Gerstenkultivars Pallas (*mlg*) wurden mit dsRNA von N9-10 oder einem Thyroidrezeptor als Kontrolle zusammen mit GFP transient transformiert und 4 h später mit *Bgh* A6 inokuliert. Der Mittelwert (MW ± Standardfehler) der Penetrationsrate (48 hpi) beträgt in der Kontrolle 57 ± 5 %, im Testansatz 39 ± 6 %.

Errechnet man die Abweichung der Penetrationseffizienz nach N9-10 RNAi von der Kontrolle, ergibt sich eine Reduktion der relativen Penetrationsrate um 32 ± 5 %. Die Gerstenblätter, in denen die Transkription von N9-10 unterdrückt wurde, waren also deutlich resistenter gegenüber Penetrationsversuchen des Echten Gerstenmehltaupilzes.

Die Anzahl GFP-exprimierender Zellen in der Gerstenblattepidermis 40-48 hpi differierte nach Beschuss mit unterschiedlicher dsRNA. Da nur lebende Zellen GFP exprimieren, können eventuell ungleiche GFP-Zellzahlen in den verschiedenen Ansätzen mit veränderten Zelltodraten in Zusammenhang gebracht werden. Im Mittel wurden in der Kontrolle insgesamt $40 \pm 6,7$ und im Ansatz mit N9-10-dsRNA $32 \pm 5,2$ GFP-Zellen gezählt. Dieser Unterschied war jedoch mit $p = 0,06$ im Student's t-Test nicht signifikant (Tab. 7.6).

3.6 Charakterisierung des MAP Kinase-Gens 13a-3

Im cDNA-AFLP wurde mit 13a-3 ein 34 bp langes Genfragment isoliert, das mit dem Gersten-EST AL504966 übereinstimmte. Dieses EST wurde über RACE und weitere ESTs aus der Datenbank verlängert, so dass letztlich die vollständige Sequenz einer putativen MAP Kinase amplifiziert und sequenziert werden konnte. Das abgeleitete Protein (Abb. 3.18) hat mindestens 506 aa, vermutlich aber sogar 578 aa. Damit beträgt das errechnete Molekulargewicht zwischen 58 und 65 kDa (*Protein Molecular Weight*, <http://bir.biology.washington.edu/SMS/index.html>).

13a-3	:	MGGGNGIVDGFRRLLFHRRTPSGSLGSSNQSSA-----GEDSSSELEAVEDLDLVGLRPIRV	:	56
BWMK1	:	-----	:	-
ATMPK9	:	-----	:	-
ATMPK8	:	MGGGNNLVDGVRRWLFQRPSSSSSSSSSSNNNNNHEQPIFNSSSFSSSSNPNHSANSSELIIIEEDLDFSGLTLINV	:	76
13a-3	:	PKRKMLPVEESHKKNIMEKEFFTEYGEASQYQIQEVVGKGSYGVVAAADTRTGERVAIKKINDVFEHVSDATRIL	:	132
BWMK1	:	-----MEFFTEYGEASQYQIQEVIGKGSYGVVAAVDTRTGERVAIKKINDVFEHVSDATRIL	:	58
ATMPK9	:	-----MDPHKKVALETEFFTEYGEASRYQIQEVIGKGSYGVVASAITHSCEKVAIKKSNVFEHVSDATRIL	:	68
ATMPK8	:	PKRN-HLPMDPHKK--GETEFFTEYGEANRYQIQEVVGKGSYGVVASAVDSHTGERVAIKKINDVFEHVSDATRIL	:	149
13a-3	:	REVKLLRLLRHPDVVEIKHIMLPPSRREFQDIYVVFELMESDLHQVIRANDDLTAEHYQFFLYQLLRALKYIHGAN	:	208
BWMK1	:	REIKLLRLLRHPDIVEIKHIMLPPSRREFQDIYVVFELMESDLHQVIRANDDLTAEHYQFFLYQLLRALKYIHAAN	:	134
ATMPK9	:	REIKLLRLLRHPDIVEIKHVMLPPSRREFQDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTAEHYQFFLYQLLRGLKFIHTAN	:	144
ATMPK8	:	REIKLLRLLRHPDVVEIKHIMLPPSRREFPHIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTAEHYQFFLYQLLRGLKVVHAAN	:	225
13a-3	:	VFHRDLKPKNILANADCKLKICDFGLARVSFNDAISAIFWTDYVATRWYRAPELCGSFFSKYTPAIEIWSIGCIFA	:	284
BWMK1	:	VFHRDLKPKNILANSACKLKICDFGLARVSFNDAISAIFWTDYVATRWYRAPELCGSFFSKYTPAIDIWSIGCIFA	:	210
ATMPK9	:	VFHRDLKPKNILANSACKLKICDFGLARVSFNDAISAIFWTDVANRWYRAPELCGSFFSKYTPAIDIWSIGCIFA	:	220
ATMPK8	:	VFHRDLKPKNILANADCKLKICDFGLARVSFNDAISAIFWTDYVATRWYRAPELCGSFFSKYTPAIDIWSVGCIFA	:	301
13a-3	:	ELLTGRPLFPGKNVVHQLDIITDILGTPSSETLSRIRNEKARRYLRMRKKHEVPLTCKFFNADPLAVRLLRLLA	:	360
BWMK1	:	ELLTGRPLFPGKNVVHQLDIITDILGTPSSETLSRIRNEKARRYLRMRKKHAVPFSQKFRNTDPLALRLLERLLA	:	286
ATMPK9	:	EMLTGKPLFPGKNVVHQLDIMTDILGTPPPEAIAIRIRNEKARRYLRGNMRKPEVPFTHKFFHVDPLALRLLHRLA	:	296
ATMPK8	:	EMLLGKPLFPGKNVVHQLDMLTDILGTPPPEISIRIRNEKARRYLRSMRKKQEPVPSHKFFKAEPLALRLLERLLA	:	377
13a-3	:	FDPKDRSAEEALADPYFASLANVEREPSRHPISKLEFEFERRKVTKDDVRELIYREILEYHPQMLEEYMKGGDQI	:	436
BWMK1	:	FDPKDRSAEEALADPYFASLANVEREPSRHPISKLEFEFERRKVTKDDVRELIYREILEYHPQMLEEYMKGGEQI	:	362
ATMPK9	:	FDPKDRSAEEALADPYFYGLANVDREPSTQPIPKLEFEFERRKLTKEVDVRELIYREILEYHPQMLEEYLRGGEQI	:	372
ATMPK8	:	FDPKDRASAEALADPYFSGLSNSEREPTQPIISKLEFDFERRKLVKDDVRELIYREILEYHPQMLEEYLRGGDQI	:	453
13a-3	:	SFLYPSGVDRFKRQFAHLEENYSK-----GERGSPLOKHASLPRQVGA-SNDSNNECHISDOEMSAPDAHGAVS	:	507
BWMK1	:	SFLYPSGVDRFKRQFAHLEENYSK-----GERGSPLOKHASLPRERVGVSKDGYNOQNTNDCERSADSVARTTVS	:	433
ATMPK9	:	SFMYPSGVDRFKRQFAHLEENYSK-----GEKGSPLORQHASLPRERVPAKKENGSHNHDIENRSIASIVTTLES	:	443
ATMPK8	:	SFMYPSGVDRFKRQFAHLEENQCKPVAAGGGRSTALRRHHASLPRERVPAENGETAEESDVERRAAAAIVASTLES	:	529
13a-3	:	FQKPDAPG---VGQNGLSPTSLSSRTYLSASISASKCVVNPKNQPEYDDAISFEETEGAVDGLSEKVS KMHA	:	578
BWMK1	:	PPMSQDAQQHGSAGONGVTSTDLSRSYLSASISASKCVAVKDNKEPE-DDYISFEEMEGSV DGLSEQVSRMHS	:	506
ATMPK9	:	PPTSQHEGS---DYRNGTSQOGYSARSLLSASISASKCIGMKPRNKSE-----YGESNNDTVDA LSQKVAALHT	:	510
ATMPK8	:	-----EEQTMEEVTVTVIS-----	:	543

Abb. 3.18 Alignment der Aminosäuresequenz von 13a-3 und verschiedener MAP Kinasen. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. BWMK1: *blast- and wound-induced MAP kinase* aus *Oryza sativa* (accession nr. AF177392), ATMPK9: MAP Kinase 9 aus *A.th.* (BAA92223), ATMPK8: MAP Kinase 8 aus *A.th.* (BAA92222).

Die MAP Kinase 13a-3 zeigt hohe Homologie zu einer MAP Kinase aus Reis (BWMK1, *accession nr.* AF177392), deren Transkription durch Inokulation mit *Magnaporthe grisea* und Verwundung induziert wird (He *et al.* 1999). Die Proteindomänenvorhersage mit *PROSITE* gibt neben einer MAP Kinase Signatur (173-276 aa) eine EF-Hand Calcium-Bindedomäne (484-496 aa) an.

3.6.1 Genexpression des MAP Kinase-Gens nach Verwundung

Um zu überprüfen, ob das Gen für die MAP Kinase auch nach abiotischem Stress wie Verwundung stärker transkribiert wird, wurden sieben Tage alte Gerstenkeimlinge (cv. Ingrid) mit dem Abrasiv Carborund verwundet. In einem Zeitraum von 10 min bis 24 h nach Verwundung wurden Blätter geerntet und die Expression der MAP Kinase mittels *Northern Blot*-Analyse untersucht (Abb. 3.19). Von dem MAP Kinase-Gen fanden sich 30 min bis 2 h nach Verwundung mehr Transkripte in den Blättern als vor der Behandlung (0 min). Dieser Anstieg ließ nach 4 h wieder nach und ging auf ein Expressionsniveau wie vor der Verwundung zurück (12 h).

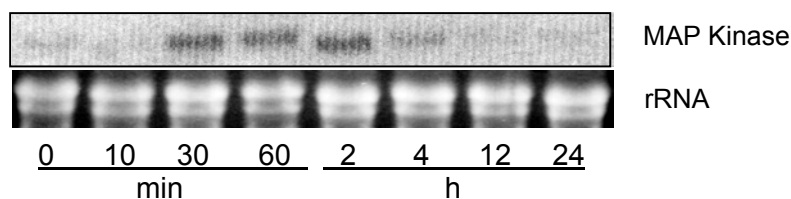


Abb. 3.19 Transkriptakkumulation des MAP Kinase-Gens nach Verwundung. 7 Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) wurden mit Carborund verwundet und Blätter vor der Verwundung (0 min) bis 24 h nach Verwundung geerntet. Für die *Northern*-Analyse wurden 20 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gleichmäßige Beladung des Gels anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft.

3.6.2 Genexpression des MAP Kinase-Gens nach Inokulation mit *Bgt*

SMARTTM RT-PCR (Abb. 3.12) hatte bereits gezeigt, dass die Expression des MAP Kinase-Gens durch die Inokulation mit dem Nichtwirt-Pathogen Weizenmehltaupilz (*Bgt*) induziert wird. Um zu sehen, ob diese Induktion länger als 12 hpi anhält, wurden sieben Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) dicht mit *Bgt* inokuliert, Blätter zu verschiedenen Zeitpunkten vier bis 48 hpi geerntet und Gesamt-RNA für eine *Northern Blot*-Analyse extrahiert. Diese zeigt deutlich eine stärkere Expression des MAP Kinase-Gens bereits vier Stunden nach Inokulation mit *Bgt* (Abb. 3.20).

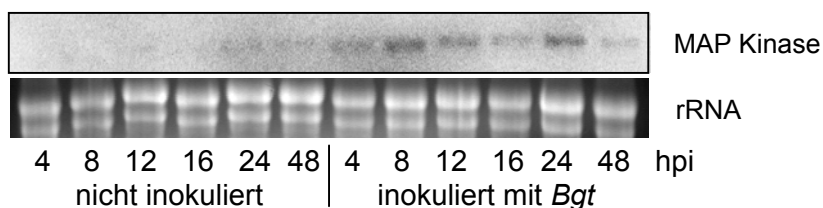


Abb. 3.20 Expression des MAP Kinase-Gens nach Inokulation mit *Bgt*. 7 Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) wurden mit *Bgt* inokuliert und Blätter 4 bis 48 hpi geerntet. Für die *Northern*-Analyse wurden 10 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gleichmäßige Beladung des Gels anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft.

Die Induktion zeigt zwei Maxima bei 8 und 24 hpi und hält, bedenkt man die schwächere Gelbeladung des inokulierten 48 Stunden-Wertes verglichen mit dem nicht inokulierten Wert, bis 48 hpi an.

3.6.3 Funktionsanalyse der MAP Kinase 13a-3 durch RNAi in Gerstenblättern

Um die Rolle, die die MAP Kinase in der Gerste-*Bgh*-Interaktion spielt, näher zu beleuchten, wurde die Expression des Gens durch RNAi im transienten Transformationsassay (Schweizer *et al.* 2000) unterdrückt. Nachdem durch RT-PCR gezeigt worden war, dass das MAP Kinase-Gen in der Epidermis exprimiert wird (ohne Abb.), wurde mit Hilfe der *particle inflow gun* MAPK-dsRNA oder TR-dsRNA zusammen mit pGFP auf Gerstenblattsegmente (cv. Pallas) geschossen. Diese wurden vier Stunden später mit *Bgh* inokuliert und nach weiteren 40 Stunden mikroskopisch auf den Penetrationserfolg von *Bgh* untersucht. Es wurden fünf unabhängige RNAi-Versuche durchgeführt (Abb. 3.21).

Durch Ausschalten des MAP Kinase-Gens wurden die Gerstenblätter in allen Versuchen anfälliger gegenüber *Bgh*, die Penetrationsrate stieg von 59 ± 5 % in der Kontrolle (TR-dsRNA) auf 69 ± 7 %. Dieser Effekt ist nicht sehr deutlich, aber nach t-Test signifikant mit $p = 0,025$. Relativ zur Kontrolle stieg die Penetrationseffizienz von *Bgh* um 19 ± 7 %.

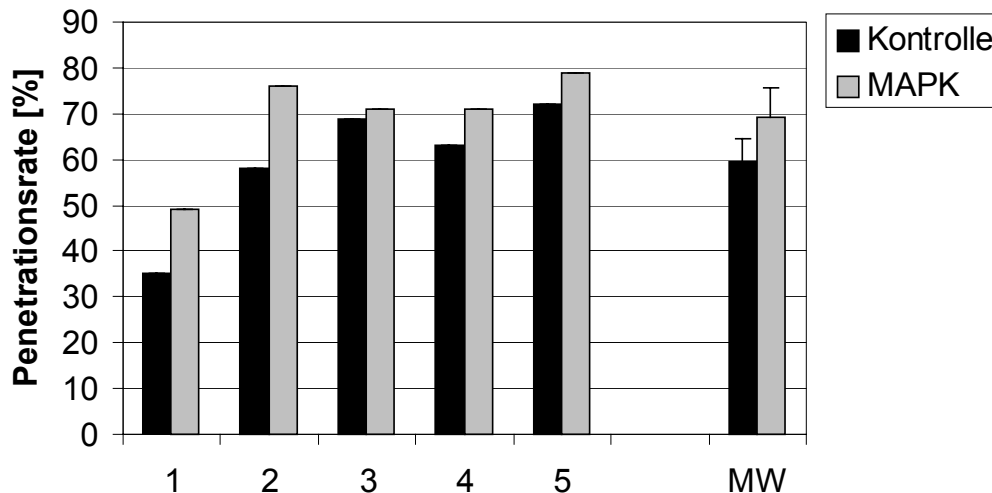


Abb. 3.21 Der transiente *knockout* der MAP Kinase hat einen Einfluss auf die Penetrationseffizienz von *Bgh*. Blattsegmente des anfälligen Gerstenkultivars Pallas wurden mit MAPK-dsRNA oder TR-dsRNA als Kontrolle zusammen mit GFP transient transformiert und 4 h später mit *BghA6* inokuliert. Der Mittelwert (MW $\pm$ Standardfehler) der Penetrationsrate (48 hpi) beträgt in der Kontrolle 59 ± 5 %, im Testansatz 69 ± 7 %.

Ebenfalls signifikant ($p = 0,049$) ist die unterschiedliche Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen bei der Transformation mit MAPK-dsRNA und TR-dsRNA (Tab. 7.7). In vier von fünf Versuchen wurden im Kontrollansatz ($31 \pm 1,5$ GFP-Zellen/Schuss) weniger GFP-exprimierende Zellen beobachtet als im Ansatz mit MAPK-dsRNA ($40 \pm 2,5$ GFP-Zellen/Schuss). Ähnlich wie in den RNAi-Versuchen mit dem DNA-Bindeproteingenfragment N9-10 könnten unterschiedliche Anzahlen an GFP-exprimierenden Zellen ein Hinweis auf veränderte Zelltodraten sein.

3.6.4 Transiente Überexpression der MAP Kinase 13a-3 in Gerstenblättern

Nachdem der *knockout* des MAP Kinasegens die Penetrationsrate von *Bgh* in transformierten Epidermiszellen erhöht hatte wurde überprüft, ob eine transiente Überexpression des Gens auch einen Effekt auf die Gerste-Mehltaupilz Interaktion hat. Dafür wurde der ORF der MAP Kinase in den Expressionsvektor pGY1 kloniert (Kap. 2.12.1) und dieser zusammen mit dem GFP-Reporterplasmid auf Wolframpartikel präzipitiert. Als Kontrolle diente der leere pGY1-Vektor. Die Partikel wurden auf 7-Tage alte Gerstenblattsegmente (cv. Ingrid) geschossen und diese 24 h später inokuliert. In einem ersten Versuch war bereits 4 h nach der Transformation inokuliert worden. Da in diesem Experiment die Überexpression keinen Effekt zeigte (ohne Abb.), wurde in den folgenden Experimenten 24 h bis zur Inokulation gewartet um dem System Zeit zu geben, das Protein in größeren Mengen zu exprimieren. Ungefähr 40 h nach Inokulation wurde die Interaktion mikroskopisch ausgewertet.

Es wurden drei Versuche durchgeführt die den Schluss zulassen, dass eine Überexpression der MAP Kinase 13a-3 keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Gerste-Mehltaupilz Interaktion hat (Abb. 3.22). Im ersten Versuch sank die Penetrationsrate nach Überexpression relativ im Vergleich zur Kontrolle um 19 % und in den folgenden zwei Versuchen stieg sie um 4 bzw. 19 %. Die Penetrationsrate betrug im Mittel ($\pm$ SE) in der Kontrolle 34 ± 4 % und bei der Überexpression 33 ± 4 %.

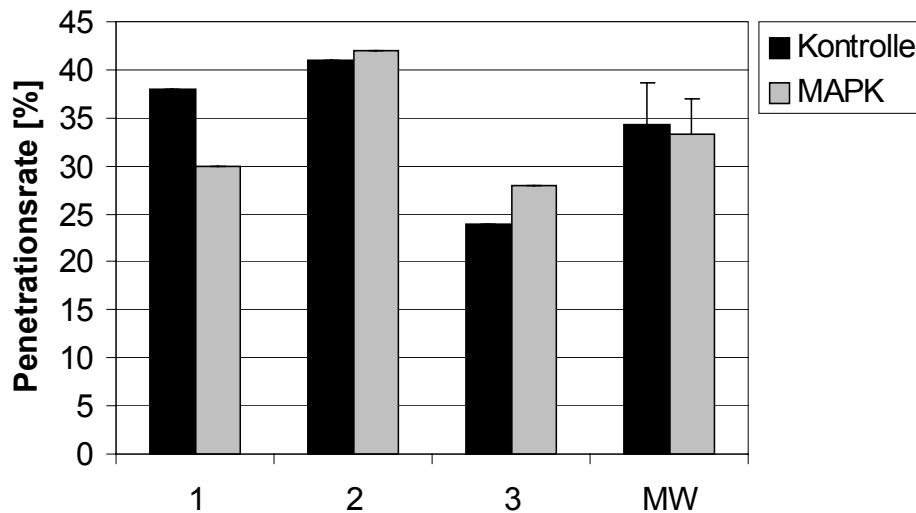


Abb. 3.22 Die transiente Überexpression der MAP Kinase hatte keinen Einfluss auf die Penetrationseffizienz von *Bgh*. Blattsegmente des anfälligen Gerstenkultivars Ingrid wurden mit pGY1-MAPK oder leerem Vektor als Kontrolle zusammen mit GFP transient transformiert und 24 h später mit *BghA6* inokuliert. Der Mittelwert (MW $\pm$ Standardfehler) der Penetrationsrate ($\sim$ 40 hpi) beträgt in der Kontrolle 34 ± 4 %, im Testansatz 33 ± 4 %.

4 Diskussion

4.1 cDNA-AFLP als Methode zur Darstellung differentieller Genexpression

In dieser Arbeit wurde die Methode des cDNA-AFLP angewandt, um differentielle Genexpression nach Inokulation mit Mehltaupilz in *Mlg*- und *mlg*-tragenden Gerstenlinien darzustellen. Bei dieser Methode wird im Wesentlichen ein Standard-AFLP-Protokoll (Vos *et al.* 1995) auf cDNA angewendet (Bachem *et al.* 1996). Durch die Ligation von Adaptoren an die cDNA-Restriktionsfragmente kann die folgende PCR mit spezifischen Primern unter stringenten Bedingungen ablaufen, resultierend in einer guten Reproduzierbarkeit und weniger Falschpositiven als beim mRNA *Differential Display* (Liang und Pardee 1992). Zu den Vorteilen des cDNA-AFLP gegenüber den auf Hybridisierung beruhenden *microarrays* gehört, dass relativ kleine Mengen an RNA als Startmaterial ausreichen, theoretisch alle Gene sämtlicher Organismen, einschließlich selten exprimierter Gene, dargestellt werden können und eine Unterscheidung zwischen stark homologen Genen aus Genfamilien möglich ist. Außerdem können mit dieser Methode unterschiedliche Aspekte der Genexpression gleichzeitig beobachtet werden (in dieser Arbeit z.B. die Abhängigkeit vom Resistenzgen *Mlg*, der Inokulation, der Zeit, der Gerstenlinie), wobei auch quantitative Unterschiede sichtbar werden. Zu den wesentlichen Nachteilen des cDNA-AFLP zählt, dass die Methode arbeitsaufwendig ist und in der Regel nur kurze (bis 500 bp) cDNA-Fragmente liefert.

In der vorliegenden Arbeit wurden in dem Screening mit Fluoreszenz-markierten Primern ca. 65 Banden pro Primerkombination (*Nco*I+NN mit *Sau*3AI+NN) aufgezeichnet. Da alle 256 möglichen Primerkombinationen genutzt wurden, ließen sich ungefähr 16500 Genfragmente zwischen 24 und 588 bp darstellen. Ähnliche Zahlen findet man auch in anderen Arbeiten mit cDNA-AFLP (Bachem *et al.* 1996; van der Biezen *et al.* 2000; Ditt *et al.* 2001). Geht man in Gerste von einer ähnlichen Transkriptomgröße wie in *Arabidopsis thaliana* aus, wurden über 60 % des Gersten-Transkriptoms untersucht.

Primerkombinationen, die im Screening mit Fluoreszenz-markierten Primern (Kap. 2.4.8) interessante differentielle Banden hervorbrachten, wurden mit radioaktiv-markierten Primern erneut in die PCR eingesetzt, um Genfragmente ausschneiden und sequenzieren zu können. Die Bandenmuster aus dem *screening* ließen sich mit den radioaktiven Gelen immer reproduzieren. Darüber hinaus wurden zusätzliche differentielle Banden detektiert. Ungefähr 85 Banden pro Primerkombination konnten mit den radioaktiven Gelen dargestellt werden,

was den Schluss zulässt, dass die Methode mit ^{33}P sensitiver arbeitet als mit dem Laser-scanner des Licor.

Bachem *et al.* (1998) testeten verschiedene Restriktionsenzym-Paarungen (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI* als 6 bp cutter mit *TaqI*, *MseI* als 4 bp cutter) im cDNA-AFLP und fanden, dass alle (auch mit unterschiedlichem *template*) ähnlich viele Genfragmente generierten (50-70 auswertbare Banden pro Primerkombination) und deshalb das gleiche Potential zur Darstellung differentieller Genexpression haben. Die für die Arbeit mit Gerste von Remy Bruggmann (Universität Zürich, Schweiz) empfohlenen Restriktionsenzyme *Sau3AI* und *NcoI* lieferten ein vergleichbares Ergebnis mit 65 bzw. 85 Banden.

Fast alle der aus dem Gel ausgeschnittenen Banden ließen sich reamplifizieren und klonieren. Problematisch bei der Sequenzgewinnung ist, dass jede Bande aus nur einem oder auch mehreren Genfragmenten bestehen kann. Welches Genfragment dabei das differentiell exprimierte ist, lässt sich z.B. durch *Northern* Analysen, RT-PCR oder PCR mit verlängerten selektiven Primern feststellen. In verschiedenen Arbeiten fanden alle genannten Methoden Anwendung, allerdings in der Regel mit nur wenigen Genen. So führten Ditt *et al.* (2001) eine Bestätigung nur für 7 von 50 sequenzierten Genfragmenten durch. In dieser Arbeit wurden für jede der über 150 ausgeschnittenen Banden mindestens drei Klone der Reamplifikation sequenziert und die Sequenz, die am Häufigsten vorkam, als differentiell angenommen. Anschließend wurde die Expression von 30 Genen mit unabhängig gewonnener RNA überprüft. Wie auch schon in Arbeiten von Seehaus und Tenhaken (1998) gaben die meisten getesteten differentiellen Klone in *Northern*-Analysen mit 10 µg Gesamt-RNA kein Signal. Aus diesem Grund wurden die Expressionsstudien mit SMARTTM RT-PCR durchgeführt. Mit der SMART-Methode können häufig und selten vorkommende Transkripte in repräsentativer Weise amplifiziert werden, das heißt die vervielfältigte cDNA sollte die Komplexität der anfänglichen mRNA-Population beibehalten (Endege *et al.* 1999; Zhumabayeva *et al.* 2001). SMARTTM RT-PCR ist sehr gut reproduzierbar und eventuell sensitiver als Standard-RT-PCR (Vernon *et al.* 2000; Puskas *et al.* 2002). Als konstitutiv exprimierte Kontrolle in den RT-PCRs wurde eine Ubiquitin-cDNA amplifiziert, die nach Erfahrung an unserem Institut nicht oder nur schwach durch Pathogene induziert wird (Schultheiss *et al.* 2002).

4.2 Das *Mlg*-spezifische cDNA-Fragment und Marker für den Resistenzgenlocus *Mlg*

Das in Gerste gegen bestimmte Rassen von *Bgh* Resistenz-vermittelnde R-Gen *Mlg* liegt auf dem Gerstenchromosom 4H in der Nähe des Centromers (Görg *et al.* 1993), konnte jedoch bisher nicht isoliert werden. Die Isolierung gestaltet sich schwierig, weil in der monokotylen Gerste einige hilfreiche Methoden wie das Transposon *tagging* nicht etabliert sind, das Gerstengenom groß, repetitive Sequenzen sehr häufig und die Rekombination im Zielbereich unterdrückt ist, was eine kartengestützte Klonierung von *Mlg* erschwert.

Um *Mlg* zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit die genannten Schwierigkeiten umgangen, indem ein Unterschied zwischen resistenten *Mlg*-Pflanzen und anfälligen *mlg*-Pflanzen auf Transkriptebene dargestellt werden sollte. Dafür wurde mit zwei nahezu isogenen Linienpaaren (NILs) gearbeitet. In der *Mlg*-tragenden Rückkreuzungslinie IWe ist das introgressierte Fragment von mehreren untersuchten NILs besonders klein (Görg *et al.* 1993), weshalb das NIL Ingrid (*mlg*) und IWe (*Mlg*) ausgewählt wurde. Manchuria_{isogen} (*mlg*) und MiGf (*Mlg*) haben zu den anderen NILs den unterschiedlichsten genetischen Hintergrund (M. Korell, unveröffentlicht), weshalb die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass gemeinsame *Mlg*-spezifische Polymorphismen der beiden NILs tatsächlich von dem *Mlg*-tragenden introgressierten Fragment stammen. In dem mit diesen beiden NILs durchgeführten cDNA-AFLP wurde ein 37 bp langes *Mlg*-spezifisches Fragment, das durch ungenaue Primeranlagerung viermal dargestellt wurde, identifiziert. Die 100 %ige Homologie mit einem EST (BE421004) aus der *GenBank*-Datenbank zeigte, dass es sich dabei um ein Genfragment einer Nukleosiddiphosphatkinase (NDPK) handelt. Die NDPK hat keine Ähnlichkeit mit bekannten R-Genen und besitzt auch keine R-Gen typischen Motive wie NBS oder LRR (Ellis *et al.* 2000). Ein vergleichendes Sequenzieren zwischen *Mlg*- und *mlg*-Pflanzen machte außerdem deutlich, dass der Polymorphismus durch einen einzigen Basenaustausch in der dritten Tripletstelle verursacht wurde. Aus dieser Mutation resultiert kein Aminosäureaustausch. Die entsprechenden Proteine dürften sich also nicht unterscheiden. Das R-Gen *Mlg* wurde somit nicht identifiziert, der Polymorphismus konnte jedoch in einen molekularen CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*) Marker für die Anwesenheit von *Mlg* in Gerstenkultivaren umgewandelt werden. Der Marker CAPS9-1 wurde auf verschiedenen Gerstenlinien getestet und zeigte immer, mit Ausnahme der *Mlg*-tragenden Linie Palmella Blue (Pb) und ihrer resistenten Rückkreuzungslinie IPb, zuverlässig den *Mlg*-Locus an (Abb. 3.7). Die RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) Marker bAL57 und MWG032 funktionieren ebenfalls nicht auf diesen

Linien (Görg *et al.* 1993). Görg und Mitarbeiter (1993) stellten die Hypothese auf, dass die *Mlg*-Donorlinie Pb ein anderes *Mlg* Ursprungsallel enthält. Dafür spräche auch der in AFLP-Analysen (M. Korell, unveröffentlicht) ermittelte große genetische Abstand zwischen Pb und anderen Gerstenlinien. Außerdem wurde bei starker Inokulationsdichte auf Blättern von Pb eine deutliche Nekrosen- und Myzelbildung beobachtet, die in anderen Linien nicht vorkommt (M. Korell, unveröffentlicht). Bereits Wiberg (1974, in Kurth *et al.* 2001) berichtete über einen unterschiedlichen Infektionsphänotyp bei Pb nach Inokulation mit *AvrMlg*-enthaltenden Pilzisolaten. Der Marker CAPS9-1 unterstützt die Hypothese, dass *Mlg* in Pb einen von anderen Gerstenlinien unterschiedlichen Ursprung hat.

Ein Grund, warum das R-Gen mittels cDNA-AFLP nicht gefunden wurde, liegt eventuell in der Umsatzrate von *Mlg*. Vielleicht sind nur sehr geringe Mengen eines relativ stabilen Proteins zur Resistenzvermittlung notwendig, was in einer für das cDNA-AFLP zu geringen Transkriptmenge resultieren könnte. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die mRNA bzw. cDNA von *Mlg* keine Schnittstellen für die beiden verwendeten Restriktionsenzyme *Nco*I und *Sau*3AI im darstellbaren Abstand aufweist.

Da *Mlg* also nicht über die differentielle Transkription isoliert werden konnte, sollte in einem anderen Projekt ein kartengestützter Klonierungsansatz verfolgt werden (M. Korell, unveröffentlicht). Ziel war es dabei, zwei flankierende Marker zu finden, die so nah beieinander liegen, dass sie auf einem genomischen Klon einer Bibliothek, z.B. einem YAC (*yeast artificial chromosome*), vorkommen. Durch diese als "*chromosome landing*" (Tanksley *et al.* 1995) bezeichnete Methode wurden bereits *Mlo*, *Rar1* und das *Mla*-Cluster in Gerste isoliert (Büschges *et al.* 1997; Simons *et al.* 1997; Lahaye *et al.* 1998; Shirasu *et al.* 1999; Wei *et al.* 1999). Um entsprechende Marker für den *Mlg*-Locus zu identifizieren, wurden 13 linienspezifische Fragmente aus dem cDNA-AFLP isoliert und sequenziert (Abb.3.2). Bis auf den so gewonnenen PCR-Marker 16-10/11, der für die Überprüfung möglicher *Mlg*-Mutanten der Linie IWe herangezogen wurde, wurden die linienspezifischen Polymorphismen bislang nicht weiter untersucht.

Der CAPS9-1 wurde auf 170 RILs (*recombinant inbred lines*), die von J. Kurth und P. Schulze-Lefert zur Verfügung gestellt wurden, sowie ca. 750 Pflanzen der F₂-Generation einer Kreuzung von IWe (*Mlg*) x I (*mlg*) kartiert. Er war in allen Fällen mit *Mlg* kosegregierend (T. Eschholz, pers. Mitteilung). CAPS9-1 scheint also sehr nahe am *Mlg*-Locus zu liegen und kann als diagnostischer Marker aufwendige Infektionstests mit phänotypischer Selektion im Rahmen von Züchtungsprogrammen, die die Einkreuzung von *Mlg* zum Ziel haben, überflüssig machen.

4.3 Darstellung pilzlicher Gene mittels cDNA-AFLP nach Inokulation von Gerstenblättern mit *Bgh*

Im cDNA-AFLP mit Fluoreszenz-markierten Primern wurden 50 Banden ausschließlich nach Inokulation mit *Bgh* detektiert. Bei diesen Banden kann es sich entweder um Fragmente pilzlicher Gene oder induzierter Gerstengene handeln. Van der Biezen und Mitarbeiter (2000) führten ein cDNA-AFLP mit infizierten *Arabidopsis* Blättern durch, um Gene des obligat biotrophen Oomyceten *Peronospora parasitica* zu identifizieren. 60 von 16000 Banden kamen nur in infizierten Blättern vor, davon wurden 23 sequenziert. Nur zehn dieser Genfragmente waren mit Sicherheit pilzlichen Ursprungs, von diesen codierten sieben für Proteine mit *housekeeping* Funktion. Die Autoren vermuten als Ursache für ihren Misserfolg, dass seltener vorkommende pilzliche Transkripte durch die große Menge an pflanzlicher mRNA verdrängt werden. Wahrscheinlich gilt das auch für diese Arbeit, die jedoch nicht die Isolierung von pilzlichen Genen zum Ziel hatte und in der nur eines der 50 möglicherweise pilzlichen cDNA-Fragmente sequenziert wurde. Das so identifizierte pilzliche Genfragment (13b-9, Tab. 3.2) hat Homologie zu einer Subtilisin-ähnlichen Serinprotease (Subtilase). Serinproteasen können in viele Reaktionen involviert sein, interessant ist u.a. ihre Rolle als Pathogenitätsfaktor bei nematophagen Pilzen. In *Arthrobotrys oligospora* werden Subtilasen erst bei der Besiedelung und dem Abtöten von Nematoden exprimiert und zusätzliche Subtilasegenkopien erhöhen die Infektionsgeschwindigkeit des Pilzes (Ahman *et al.* 2002). Bei der Malaria sind diese Enzyme an der Invasion der Plasmodium-Merozoiten in die Erythrocyten beteiligt (Whithers-Martinez *et al.* 2002). Möglicherweise fungieren Subtilasen auch bei der Besiedlung von Gerste als Pathogenitätsfaktor des Gerstenmehltaupilzes.

4.4 Im cDNA-AFLP identifizierte *Bgh*-induzierte Gene der Gerste

Erkennt die Pflanze ein angreifendes Pathogen, werden verschiedene Signalwege aktiviert, die letztlich zu einer veränderten Genexpression und so zur Initiation von Abwehrreaktionen führen (Scheel 1998).

619 der im cDNA-AFLP dargestellten Transkriptfragmente wurden nach *Bgh*-Inokulation differentiell reguliert, das sind etwa 4 % der insgesamt beobachteten Fragmente (ca. 16500). Diese Zahl stimmt nicht mit der absoluten Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene in Gerste nach *Bgh*-Inokulation überein, da große Gene mehrmals durch die eingesetzten Restriktionsenzyme geschnitten werden können und so mehrere Fragmente des gleichen

Gens dargestellt werden. Hinzu kommt Redundanz durch ungenaue Primeranlagerungen, durch die das gleiche Genfragment mehrmals im cDNA-AFLP sichtbar gemacht wird. Andererseits werden nicht alle Gene von den Restriktionsenzymen geschnitten, so dass die Anzahl regulierter Gene dadurch unterschätzt wird. Die 120 isolierten und sequenzierten Genfragmente stammen vermutlich von 105 verschiedenen Genen, das heißt ca. 13 % stammen vom gleichen Gentranskript. Bachem *et al.* (1998) ermittelten in ihrer Arbeit eine Redundanz von nur 2 %, doch Qin *et al.* (2000) gehen mit 10 % von einer ähnlich großen Rate mehrfach dargestellter Gene aus. Unter Berücksichtigung der Redundanz liegt der Anteil differentiell regulierter Gene in dieser Arbeit somit bei 3,5 %.

Der Prozentsatz differentiell regulierter Gene nach Pathogenbefall variiert in verschiedenen Arbeiten zwischen 1 und 16 % der untersuchten Transkripte. In einer Tabak-Zellkultur zeigte 1 % der ungefähr 30000 Genfragmente im cDNA-AFLP eine veränderte Expression in der Avr9- und Cf-9-vermittelten Abwehrreaktion 30 min nach Zugabe des Elicitors (Durrant *et al.* 2000). In Arbeiten mit *Microarrays* betrug der Anteil differentiell regulierter Gene nach Inokulation von *Arabidopsis* Blättern mit *Alternaria brassicicola* ca. 9 % (bei 2375 ausgewählten Genen; Schenk *et al.* 2000) und in der inkompatiblen *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* Interaktion waren es 16 % von 13000 ESTs (Scheideler *et al.* 2002). Nach einer Schätzung von Collinge *et al.* (2002) werden ca. 1000 Gene in Pflanzen nach Pathogenbefall differentiell exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich fünf Banden beobachtet, deren Intensität nach *Bgh*-Inokulation sichtbar schwächer wurde. Das ist auffallend wenig, in anderen Arbeiten war der Anteil herunterregulierter Gene höher, auch wenn immer deutlich mehr Gene induziert als supprimiert wurden (Durrant *et al.* 2000; Ditt *et al.* 2001; Scheideler *et al.* 2002). Eine mögliche Erklärung resultiert aus der auf zwei unabhängigen PCRs basierenden Methode des cDNA-AFLP. Wenn man davon ausgeht, dass die Supprimierung von Genen möglicherweise weniger deutlich ausfällt als die starke Anschaltung von Stress-induzierbaren Genen, könnten die vielen PCR-Zyklen schwache Unterschiede zwischen normaler und supprimierter Expression verwischen. Außerdem könnten die schwächer exprimierten von anderen cDNA-Fragmenten überlagert worden sein, da häufig mehrere Fragmente der gleichen Größe im Gel übereinander laufen.

Mehrere Arbeitsgruppen beobachteten eine biphasische Transkriptakkumulation in Gerste nach Inokulation mit dem Gerstenmehltaupilz mit besonders starker Expression zwischen 4-6 und 12-18 h nach Inokulation (Walther-Larsen *et al.* 1993; Clark *et al.* 1995; Gregersen *et al.* 1997). Diese Zeitpunkte entsprechen der Anheftung des primären bzw. sekundären

Keimschlauchs. Mikroskopische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit C. Jansen bestätigten diesen zeitlichen Ablauf der pilzlichen Entwicklung unter unseren Versuchsbedingungen (Jansen in Vorbereitung), weshalb 4 und 12 hpi (h post Inokulation) Blattmaterial für die Untersuchung der Expression geerntet wurde. Dadurch sollten möglichst viele durch den Pilz induzierte Transkripte identifiziert werden. Die nach der Isolierung durchgeführte unabhängige Bestätigung der Induktion über SMARTTM RT-PCR zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12 hpi zeigte, dass alle Gene besonders 4 hpi deutlich induziert waren. Ein erneuter Anstieg der Transkriptakkumulation 12 hpi war dagegen nur in einigen Fällen zu beobachten. Für die Darstellung der zweiten Akkumulationsphase hätte vielleicht ein etwas späterer Zeitpunkt gewählt werden müssen, da das Penetrationsereignis ab etwa 15 hpi zu erwarten ist (Carver *et al.* 1995).

Auch wenn die primäre Ebene der Genexpressionskontrolle die Transkription ist, muss bedacht werden, dass Proteinakkumulation und Proteinaktivität nicht nur durch die mRNA-Menge bestimmt wird, sondern dass häufig post-translationale Modifikationen eine wesentliche Rolle spielen (Gygi *et al.* 1999). Die in dieser Arbeit untersuchte mRNA-Akkumulation in Gerstenblättern nach Inokulation mit Mehltäupilz kann also nur als Hinweis auf eine mögliche Funktion des entsprechenden Proteins in der Wirt-Pathogen Interaktion gewertet werden. In den folgenden Abschnitten wird die Beteiligung einiger der 120 *Bgh*-induzierten Gene an den Reaktionen in der Pflanze diskutiert. Ausgangspunkt ist dabei die Homologie der isolierten Sequenzen mit bereits bekannten Proteinen in der *GenBank*-Datenbank. Natürlich können im Rahmen dieser Arbeit nicht alle isolierten Gene diskutiert werden, verzichtet wurde z.B. auf eine Besprechung der bekannten PR-Gene (van Loon und van Strien 1999; Christensen *et al.* 2002). Statt dessen werden vor allem Gene aus den anteilig größten funktionalen Gruppen Phenylpropanoidstoffwechsel, Redox-Regulation und Signaltransduktion diskutiert (Abb. 3.9).

4.4.1 *Bgh*-induzierte Gene des Phenylpropanoidmetabolismus und verwandter Stoffwechselwege

Fast alle pflanzlichen Phenole stammen aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel, der vom Shikimatweg zur Synthese aromatischer Aminosäuren ausgeht. Zu den mannigfaltigen Produkten gehören Lignine, Flavonoide, Alkaloide, Phytoalexine, Salicylsäure, Stilbene, Glucosinolate u.a.. Enzyme des Phenylpropanoidstoffwechsel werden durch viele verschiedene Reize induziert, dazu gehören UV-Licht, Verwundung, Pathogene, niedrige Temperaturen und Nährstoffmangel (Dixon und Paiva 1995). 16 % der Genfragmente, die

durch *Bgh* induziert waren und isoliert werden konnten, kodieren für Gene des Phenylpropanoidmetabolismus oder verwandte Stoffwechselwege. Abb. 4.1 zeigt die in dieser Arbeit auf Transkriptebene induzierten Enzyme. Für sechs der gezeigten Enzyme (EPSP Synthase, Chorismatmutase, zwei Isoformen der PAL, 4CL und CCoAOMT) wurde die Expression nach *Bgh*-Befall unabhängig bestätigt (Abb. 3.11).

Die Transkripte der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat Synthase (EPSPS, auch 3-Phosphoshikimat-1-carboxyvinyl-transferase genannt) wurden deutlich durch *Bgh* induziert, im Unterschied zu vielen anderen untersuchten Genen hielt die Transkriptakkumulation auch noch zwölf Stunden nach Inokulation an. Görlach und Mitarbeiter (1995) untersuchten die Expression unterschiedlicher Enzyme des Shikimatwegs in Tomaten-Zellkulturen nach Zugabe eines pilzlichen Elicitors. Auch in diesem System wurde die EPSP Synthase, wie alle anderen untersuchten Enzyme, induziert und zwar vier bis fünf Stunden nach Elicitorgabe.

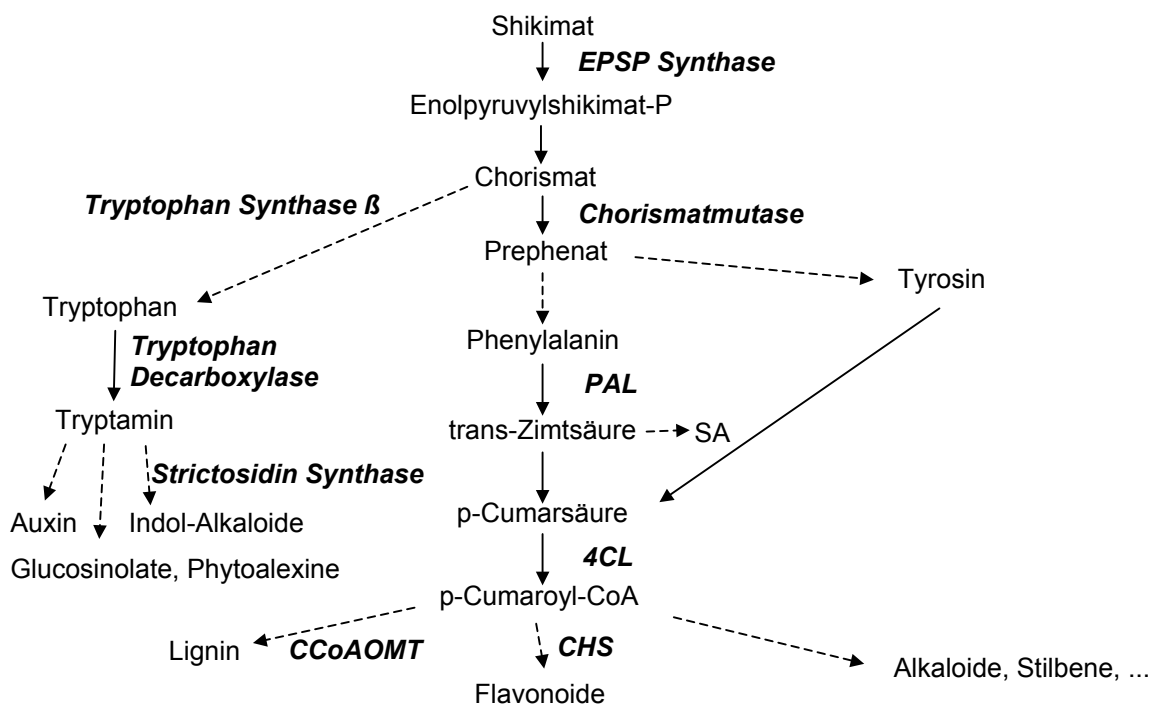


Abb. 4.1 Übersicht über einen Teil des Shikimat-, Tryptophan- und Phenylpropanoidstoffwechsels. Fett eingezeichnet sind die im cDNA-AFLP identifizierte Enzyme. Gestrichelte Pfeile: Zwischenschritte weggelassen, durchgängige Pfeile: direkte Reaktion. EPSP: 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat, PAL: Phenylalaninammoniumlyase, 4CL: 4-Cumaryl-CoA-ligase, CHS: Chalkonsynthase, CCoAOMT: Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase, SA: Salicylsäure.

Für fast alle Enzyme des Phenylpropanoidmetabolismus und verwandter Stoffwechselwege gibt es verschiedene Isoformen. Von der Chorismatmutase (CM) konnten in *Arabidopsis* drei Isoenzyme identifiziert werden (Mobley *et al.* 1999). Eberhard *et al.* (1996) verglichen

die Expression einer cytosolischen Isoform mit der plastidären Chorismatmutase und fanden, dass nur letztere durch Pathogene induziert wurde. Auch bei dem im cDNA-AFLP isolierten Gen handelt es sich der Homologie nach um eine plastidäre Form, dessen Expression sehr deutlich vier Stunden nach Inokulation hoch reguliert wurde (Abb. 3.11).

4.4.1.1 Enzyme des Tryptophan-abhängigen Stoffwechsels

Der Stoffwechselweg über die Aminosäure Tryptophan führt zur Synthese vieler Sekundärmetabolite wie Auxin, Indol-Glucosinolate, Alkaloide und Phytoalexine. Die Enzyme dieses Biosynthesewegs, z.B. die in dieser Arbeit identifizierte Tryptophan Synthase β , werden nach Infiltration von *Arabidopsis* Blättern mit *Pseudomonas syringae* auf mRNA und Protein Ebene hochreguliert (Zhao und Last 1996). Die Synthese von Tryptophan findet im Chloroplasten statt (Radwanski und Last 1995). Die ebenfalls *Bgh*-induzierte Tryptophan Decarboxylase (TDC) ist dagegen ein cytosolisches Enzym (Di Fiore *et al.* 2002) und katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu Tryptamin. TDC wird u.a. durch pilzliche Elicitoren, Auxin und Jasmonat induziert (Facchini *et al.* 2000). In einem nächsten Schritt kann die Strictosidin-Synthase (STR) Tryptamin und Secologanin aus dem Mevalonatweg zu Strictosidin, der universellen Ausgangssubstanz der Terpenoid-Indol-Alkaloide (TIA), kondensieren. Bringt man das STR-Gen aus *Catharanthus roseus* in Tabak ein, wird die Transkription durch pilzliche Elicitoren induziert, entsprechend wurden Elicitor-responsive und auch Jasmonat induzierbare Promotorelemente gefunden (Menke *et al.* 1999; Pasquali *et al.* 1999).

Hagemeier *et al.* (2001) untersuchten die Veränderungen an Sekundärmetaboliten in *Arabidopsis* Blättern nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* und kamen zu dem Schluss, dass fast alle Sekundärprodukte die akkumulierten, strukturell mit Tryptophan verwandt sind. Indol-Komponenten wurden somit in *Arabidopsis* häufiger als Phenylpropanoid-Derivate produziert. In dieser Arbeit wurden drei Enzyme des Tryptophanstoffwechsels isoliert. Das lässt die Vermutung zu, dass Indol-Verbindungen auch in Gerste eine wichtige Rolle spielen. Das Vorkommen eines Genfragments mit Homologie zur Strictosidin Synthase gibt einen Hinweis auf die Existenz von Terpenoid-Indol-Alkaloiden, über die in Gerste wenig bekannt ist.

4.4.1.2 Phenylalaninammoniumlyase (PAL)

Die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) ist das Schlüsselenzym des Phenylpropanoid-stoffwechsels. Die Anzahl an PAL-Genen in Genom variiert je nach Pflanzenart, drei oder

vier sind am häufigsten, in der Kartoffel gibt es jedoch eine Genfamilie mit 40-50 Mitgliedern (Kindl 1994). Die verschiedenen Isoformen werden in der Regel durch unterschiedliche Reize wie Ozon (Booker und Miller 1998), UV-Licht (Logemann *et al.* 2000), Licht/Dunkel Wechsel (Sarma *et al.* 1998), Verwundung (Logemann *et al.* 1995a) und Pathogene (Görlach *et al.* 1995; Mauch-Mani und Slusarenko 1996) induziert. Auch in der Interaktion von Gerste mit Mehltaupilz ist eine mRNA-Akkumulation zusammen mit einem Anstieg der PAL-Aktivität bekannt (Shiraishi *et al.* 1989; Clark *et al.* 1994; Shiraishi *et al.* 1995). Kervinen und Mitarbeiter (1997) identifizierten in Gerste fünf unterschiedliche Mitglieder der PAL-Genfamilie: *hpal2*, 3, 4, 6 und 7. *hpal2* und 7 sind mit 99,7 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene am nächsten verwandt und wurden auch in dieser Arbeit häufig zusammen isoliert. Neben diesen beiden Isoformen wurden noch Genfragmente von *hpal6*, *hpal3* und eine nicht von Kervinen *et al.* (1997, 1998) beschriebene PAL mit größter Ähnlichkeit zu einem PAL-Gen aus Weizen durch *Bgh* induziert (Tab. 3.4). Für *hpal4* wird nach Inokulation mit dem Pilz *Bipolaris sorokiniana* ein ähnlicher Expressionsverlauf beschrieben wie für *hpal2* und 6, diese Isoform wurde jedoch im cDNA-AFLP nicht detektiert, vermutlich aufgrund einer vergleichsweise schwachen Expression (Kervinen *et al.* 1998). Die Induktion der beiden überprüften Gene *hpal6* und *hpal7* nach Inokulation mit *Bgh* verläuft parallel mit einer starken Transkriptakkumulation zum frühen Zeitpunkt 4 hpi (Abb. 3.11). Geht man aufgrund der großen Ähnlichkeit von *hpal2* und 7 von einer gemeinsamen Regulation aus, stimmt das mit den Ergebnissen von Kervinen und Mitarbeitern (1998) überein, die einen fast identischen Expressionsverlauf für *hpal2* und 6 zeigten. In einer Arbeit mit vier unterschiedlichen PAL-Isoformen in Petersilie war die Transkriptakkumulation von drei PAL-Genen nach UV-Licht, pilzlichem Elicitor und Verwundung ebenfalls zeitlich nicht zu unterscheiden (Logemann *et al.* 1995b). Die Transkription vieler Mitglieder der PAL-Genfamilie scheint sehr ähnlich reguliert zu sein. Allerdings wird *hpal6*, nicht aber *hpal7*, durch den chemischen Resistenzinduktor Bion induziert (Abb. 3.14). Das könnte auf die bereits von Kervinen *et al.* (1998) diskutierte Involvierung der unterschiedlichen PAL-Isoformen in verschiedene Zweige des Phenylpropanoidstoffwechsels hinweisen. Möglicherweise spielt PAL6 eher eine Rolle bei der Lignifizierung, wohingegen PAL7 z.B. den Zweig in Richtung Flavonoidsynthese aktivieren könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen PAL-Genfragmente nicht näher untersucht, man kann jedoch festhalten, dass nach Pathogenbefall in Gerste mindestens fünf PAL-Isoformen auf Transkriptebene induziert werden. Die Bedeutung der PAL in der

Pflanze-Pathogen Interaktion lässt sich mittels transgener Pflanzen aufgrund der vielen Isoformen und der komplexen Regulierung des Enzyms nur schwer ermitteln. In transgenem Tabak führte das Einbringen eines PAL-Gens aus Bohne zu einer *sense* Suppression der PAL, resultierend in niedrigeren Konzentrationen an Chlorogensäure, dem häufigsten löslichen Phenylpropanoidprodukt in Blättern. In solchen transgenen Pflanzen kam es zu einer schnelleren und intensiveren Ausbildung von Läsionen nach Infektion mit dem virulenten Pilz *Cercospora nicotianae* als in Wildtyp-Tabak (Maher *et al.* 1994). Bate *et al.* (1994) untersuchten die Ligninbildung in den gleichen transgenen Pflanzen und kamen zu dem Schluss, dass sehr starke Inhibierung der PAL zu einer Reduktion der Ligninablagerung führen kann, die beeinträchtigte PAL aber nur einen kleinen Anteil an der Kontrolle des Metabolitenflusses zu Lignin hat. In Versuchen mit PAL Inhibitoren beobachteten Carver (1991) und Mitarbeiter eine Abnahme der Autofluoreszenz in von Mehltaupilz attackierten Haferzellen zusammen mit einer Erhöhung der Suszeptibilität. In der dikotylen Pflanze *Arabidopsis thaliana* scheint die Produktion von Salicylsäure eine wichtige Funktion der PAL bei der Resistenz gegenüber *Peronospora parasitica* zu sein. Inhibition der PAL führte zur Abnahme der Pathogen-induzierten Lignifizierung und machte die Pflanzen vollständig suszeptibel. Zugabe von Salicylsäure stellte die Resistenz und auch die Lignifizierung wieder her (Mauch-Mani und Slusarenko 1996). Da in Gerste nach Inokulation mit *Bgh* keine Akkumulation von SA festgestellt werden konnte (Vallelian-Bindschedler *et al.* 1998; Hückelhoven *et al.* 1999), ist es zweifelhaft, ob die Ergebnisse von Mauch-Mani und Mitarbeitern (1996) auf das Pathosystem Gerste-Mehltaupilz übertragen werden können.

4.4.1.3 Enzyme downstream der PAL

Im cDNA-AFLP wurden drei weitere Enzyme isoliert, die im Phenylpropanoidstoffwechsel *downstream* der PAL-Genfamilie agieren. Die 4-Cumaryl-CoA-ligase (4CL) ist das letzte Enzym des generellen Phenylpropanoidwegs, der bei p-Coumaryl-CoA endet. Auch von diesem Enzym gibt es in der Regel mehrere Isoformen (Allina *et al.* 1998; Hu *et al.* 1998), deren Transkription durch verschiedene Umweltreize induziert wird (Logemann *et al.* 1995a; Booker und Miller 1998).

Chalkonsynthasen (CHS) katalysieren den ersten Schritt in der Synthese von Flavonoiden. Das *Bgh* induzierte Genfragment hat mit 70 % Identität auf Aminosäureebene die größte Ähnlichkeit mit Naringenin-Chalkonsynthasen. Naringenin gehört zu den Flavanonen, einer der sechs Unterklassen der über 5000 Flavonoide (Ross und Kasum 2002). CHS werden u.a. durch UV-Licht, Verwundung, und Pathogene induziert (Christensen *et al.* 1998; Richard *et*

al. 2000; Logemann *et al.* 2000; Loyall *et al.* 2000). Im Unterschied zu anderen Arbeiten war die im cDNA-AFLP isolierte CHS bereits 4 h nach Inokulation mit *Bgh* stärker exprimiert. Gregersen *et al.* (1997) fanden im gleichen Pathosystem eine weitere Form der CHS erst 72 hpi induziert. Nachfolgende Arbeiten zeigten eine Induktion der gleichen CHS 24-36 hpi (Christensen *et al.* 1998).

Die Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase (CCoAOMT) wird direkt mit der Lignifizierung in Zusammenhang gebracht (Ye 1997). In transgenem Tabak führt die Reduktion der CCoAOMT-Aktivität zu einem starken Abfall des Ligningehalts (Zhong *et al.* 1998). Chen und Mitarbeiter (2000) beobachteten in der Pappel eine Induktion von zwei Isoenzymen nach Verwundung, Pilzinfektion und mechanischem Stress gefolgt von einer Neuablagerung von Lignin. Eine stärkere Aktivität der CCoAOMT nach Zugabe eines pilzlichen Elicitors konnte auch in Zellkulturen von *Vitis vinifera* festgestellt werden (Busam *et al.* 1997a).

Da die Gene des Phenylpropanoidmetabolismus durch sehr viele biotische und abiotische Stressoren induziert werden, stellt sich die Frage, wie groß ihre Bedeutung in der Gerste-Mehltaupilz Interaktion ist. Eine erste Antwort darauf geben die bereits erwähnten Experimente von Carver *et al.* (1991) mit PAL-Inhibitoren, durch deren Einsatz Hafer anfälliger gegen Penetration durch Mehлтаupilz wurde. Zellwandverstärkung durch Ligninablagerung und Einbau phenolischer Substanzen ist eine wichtige Resistenzreaktion in Gerste, für die der Phenylpropanoidmetabolismus das Ausgangsmaterial synthetisiert (von Röpenack *et al.* 1998). Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass Alkaloide oder Phytoalexine gebildet werden, die toxisch auf den angreifenden Pilz wirken. Eine bisher wenig beachtete Funktion können Phenylpropanoid-Metabolite, vor allem die weitverbreitete Chlorogensäure, als Antioxidantien haben (Grace und Logan 2000). Die Autoren vermuten, dass unter Stressbedingungen die Biosynthese von Phenylpropanoiden einen alternativen Weg für die Dissipation photochemischer Energie darstellt und so gleichzeitig die antioxidative Kapazität der Zelle erhöht wird.

4.4.2 *Bgh*-induzierte Gene der Redox-Regulation

Nach Kontakt mit einem Pathogen reagieren viele Pflanzen mit einem *oxidative burst*, in dem transient Reaktive Sauerstoffintermediate (ROI, *reactive oxygen intermediates*) wie H₂O₂ oder Superoxidanionen akkumulieren. Die Funktionen von ROI sind mannigfaltig, sie können direkt antimikrobiell wirken, Zellwandbestandteile vernetzen, den Zellschutz aktivieren (Levine *et al.* 1994) und als Signalmoleküle agieren (Bolwell und Wojtaszek

1997; Lamb und Dixon 1997). Akkumuliert eine sehr große Menge an ROI, die nicht mehr von den antioxidativen Systemen der Zelle aufgefangen wird, werden zelluläre Komponenten zerstört, was zu Zelltod führen kann. In Gerste akkumulieren ROI bereits kurze Zeit nach Inokulation mit *Bgh* (Thordal-Christensen *et al.* 1997; Hückelhoven und Kogel 1998).

4.4.2.1 ROI-produzierende Enzyme

Die in dieser Arbeit durch *Bgh* induzierten Transkripte einer Aminoxidase (8a-1 und 8a-9), einer Cytochrom P450-Monooxygenase (13a-5) und eines Oxalat-Oxidase-ähnlichen Proteins (11-14) kodieren für Enzyme, die in die Produktion von H_2O_2 involviert sein könnten. Aminoxidasen, die vornehmlich im Apoplasten lokalisiert sind (Laurenzi *et al.* 2001), katalysieren die Oxidation vieler biogener Amine unter Freisetzung von H_2O_2 (Bolwell und Wojtaszek 1997). Neben kupferhaltigen Aminoxidasen (CuAO) gibt es flavintragende Enzyme, zu denen die Polyaminoxidasen (PAO) zählen. Mit letzteren hat die in dieser Arbeit identifizierte Aminoxidase die größte Ähnlichkeit. PAOs oxidieren speziell Polyamine wie Spermin und Spermidin, die in allen Pflanzenzellen vorkommen (Walters 2000). Polyamine können in ihrer freien Form oder als Konjugate mit verschiedenen phenolischen Säuren aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel (HCAs, *hydroxycinnamic acids amides*) vorkommen. Die Konzentration an Polyaminen und ihren Konjugaten in Gerstenblättern steigt nach Infektion mit *Bgh* (Walters *et al.* 1985; von Röpenack *et al.* 1998) und Behandlung mit Methyljasmonat (Walters *et al.* 2002). Allan und Fluhr (1997) zeigten, dass Amine und Polyamine die Bildung von ROI im Apoplasten von Tabakepidermiszellen induzieren. Da ein Anstieg an Aminoxidaseaktivität, z.B. nach Verwundung oder Methyljasmonat-Behandlung, häufig von einer gesteigerten Peroxidaseaktivität begleitet wird (Angelini *et al.* 1990; Walters *et al.* 2002), gehen viele Wissenschaftler davon aus, dass das von den Aminoxidasen produzierte H_2O_2 direkt von apoplastidären Peroxidasen für die Vernetzung von Zellwandbestandteilen genutzt werden könnte (Bolwell und Wojtaszek 1997). Einen ähnlichen Mechanismus vermuten Wiesniewski *et al.* (2000) bei der Insolubilisierung von pflanzlichen Matrix-Glycoproteinen (MGP) während der Besiedelung von Erbsenwurzeln mit *Rhizobium leguminosarum*. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren konnten sie demonstrieren, dass die Vernetzung von MGP an der Wurzeloberfläche von einer Peroxidaseaktivität abhängt und dass vermutlich eine Diaminoxidase das H_2O_2 für diese Reaktion liefert.

Die Cytochrom P450 Monooxygenasen bilden die größte Klasse pflanzlicher Enzyme (Werck-Reichhart *et al.* 2000). Sie sind an der Degradierung eines großen Teils von Xenobiotika (u.a. Herbizide) beteiligt und in verschiedene sekundäre Stoffwechselwege, vor allem den Phenylpropanoidmetabolismus, involviert. Als Quelle für ROI sind sie in Pflanzen bisher wenig diskutiert worden, obwohl es während der katalysierten Reaktionen, z.B. durch Elektronenübertragung (*leakage*) auf Sauerstoff, zur Bildung von O_2^- kommen kann (Vranova *et al.* 2002). In Mikrosomen des Menschen ist die Produktion von ROI durch Cytochrom P450s bekannt (Puntarulo und Cederbaum 1998).

Als weiteres Enzym, das möglicherweise in die Bildung von ROI involviert ist, wird das Oxalatoxidase-ähnliche Protein (OXLP, *oxalate oxidase-like protein*) diskutiert. Seine Transkripte akkumulieren epidermisspezifisch als Antwort auf Angriffe des Mehltäupilzes ab 3 hpi mit einem Maximum 24 hpi (Wei *et al.* 1998). Auch in dieser Arbeit war eine stärkere Expression im cDNA-AFLP 4 und 12 hpi zu beobachten, sie wurde jedoch nicht weiter untersucht. Wei *et al.* (1998) stellten die Hypothese auf, dass OXLP in den Papillen H_2O_2 von einem bislang unbekannten Substrat bildet, welches dann entweder direkt das Wachstum des Pilzes inhibiert, durch Vernetzungsreaktionen die Zellwand verstärkt oder als Signalmolekül dient. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Arbeit von Hückelhoven *et al.* (2001a), die zeigt, dass die OXLP-Expression in Gerstenlinien, die effektive Zellwandappositionen gegen *Bgh* ausbilden, stärker induziert wird als z.B. in suszeptiblen Pflanzen. Einen Hinweis für die Bedeutung der OXLP in der Wirt-Pathogen Interaktion gibt die transiente Überexpression des Weizen-Homologs *TaGLP2a* in Weizenblättern, die in einer erhöhten Penetrationsresistenz gegenüber *Bgt* resultierte. Allerdings konnte für *TaGLP2a* nicht die vermutete Oxalat Oxidase Aktivität, das heißt keine H_2O_2 -Bildung, gezeigt werden (Schweizer *et al.* 1999b). Die Autoren vermuten für *TaGLP2a* eine Rolle als Strukturprotein bei der Zellwandverstärkung.

4.4.2.2 Enzyme des antioxidativen Systems

Neben den ROI produzierenden Enzymen werden durch eine Pilzattacke, eventuell über die im *oxidative burst* gebildeten ROI, Enzyme des antioxidativen Systems angeschaltet (Levine *et al.* 1994). Die in dieser Arbeit identifizierten Transkripte von zwei unterschiedlichen Peroxidasen (N12-1, N12-6 und N9-7), einer Thioredoxin Reduktase (N5-8) und eines Heparanase-homologs (N8-5, N8-16, N16-12, 14-15, 8a-5) könnten für Antioxidantien kodieren.

Nach Inokulation mit *Bgh* akkumulieren verschiedene Isoenzyme der Peroxidase in Gerstenblättern (Kogel *et al.* 1994; Boyd *et al.* 1994b; Gregersen *et al.* 1997; Kristensen *et*

al. 1999). Diese Akkumulation konzentriert sich für mindestens eine Peroxidase auf die Papille (Scott-Craig *et al.* 1995). Die wichtigsten Aufgaben dieser Enzyme scheinen die Polymerisationsreaktionen bei der Lignifizierung, Suberinisierung und dem Quervernetzen von Zellwandproteinen und phenolischen Substanzen unter H_2O_2 -Verbrauch zu sein. Es gibt aber auch Hinweise auf eine pH-Wert abhängige Produktion von H_2O_2 (Bolwell und Wojtaszek 1997).

Bei den cDNA-Fragmenten N12-1 und N12-6 handelt es sich um Teile des Peroxidasegens *Prx8* aus Gerste. *Prx8* wird nach Inokulation mit *Bgh* hauptsächlich im Mesophyll induziert und akkumuliert 9 hpi auch auf Proteinebene (Gregersen *et al.* 1997; Kristensen *et al.* 1999). Das Weizengen *WIR3* codiert für eine putative Peroxidase, dem Ortholog zu *Prx8*. Wird *WIR3* in Weizenblättern transient überexprimiert, kommt es bei einer nachfolgenden *Bgt* Infektion zu einer sehr starken Reduktion der Penetrationseffizienz (70 %; Schweizer *et al.* 1999a). Die Autoren vermuten, dass der Effekt aus einer Zellwandverstärkung resultiert. Das Fragment N9-7 gehört zu einem anderen Gen der zehn bis zwölf Isoenzyme der Peroxidasen in Gerste (Kogel *et al.* 1994; Kristensen *et al.* 1999). Neben den Polymerisierungsreaktionen in der Zellwand können Peroxidasen auch noch bei anderen Biosynthesen von Bedeutung sein. Sie sollen z.B. die letzte Stufe der Hordatinsynthese katalysieren (Stoessl 1967, in Kristensen *et al.* 1999). Hordatine sind Dimere von Hydroxyzimtsäureamiden, die antifungale Wirkung haben und nach Inokulation mit *Bgh* langsam aber deutlich in Gerste akkumulieren (Smith und Best 1978, in Kristensen *et al.* 1999). Ein weiteres Substrat für Peroxidasen sind möglicherweise Flavone (s. unten).

Das Thioredoxinsystem ist in allen Organismen von Archaeobakterien bis zum Menschen verbreitet. Thioredoxin ist zusammen mit Glutathion verantwortlich für ein niedriges Redox-Potential und einen hohen Anteil freier SH-Gruppen von Proteinen in der Zelle (Arner und Holmgren 2000). Thioredoxin wird von Thioredoxin-Reduktasen reduziert, von denen es in Pflanzen drei Unterklassen gibt. Zwei (m und f) befinden sich in Chloroplasten und sind abhängig von Ferredoxin, wohingegen die intrazelluläre Form (h) die Elektronen von NADPH überträgt (Juttner *et al.* 2000). Da von dem in dieser Arbeit identifizierten Fragment N5-8 nicht genug Sequenzinformation bekannt ist, lässt sich nicht feststellen, welche der drei Formen durch *Bgh* induziert wurde. Thioredoxin reguliert den Funktionsstatus verschiedener Proteine über die Thiol-Gruppe und moduliert Signaltransduktionskaskaden über die Kontrolle des Redoxstatus. Eine Reihe von wichtigen Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B, wird so gesteuert (Schenk *et al.* 1994). Auch in Pflanzen hat man bereits Transkriptionsfaktoren identifiziert, die über ihren Redoxstatus reguliert sind. Tron und

Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass zwei Mitglieder der pflanzlichen DNA-Bindeproteine mit Homöodomäne durch Thioredoxin in Anwesenheit der Thioredoxin-Reduktase aktiviert werden. In tierischen Systemen gibt es Hinweise auf die Beteiligung dieses Enzyms und Thioredoxin an der Steuerung der Apoptose. So ist Thioredoxin ein Inhibitor der ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase*), einer Kinase die das Apoptoseprogramm aktiviert (Saitoh *et al.* 1998). Lindner *et al.* (2000) identifizierten mit *GRIM-12* (*genes associated with retinoid-interferon-induced mortality*) ein Gen der menschlichen Thioredoxin-Reduktase, die eine wichtige Rolle in Apoptose spielen soll. Suppression von GRIM-12 führte zu Resistenz gegenüber Interferon/Tamoxifen-induzierten Zelltod und unterstützte das Zellwachstum, wohingegen eine Überexpression dieser Thioredoxin-Reduktase die Interferon/Tamoxifen-induzierte Apoptose steigerte.

Ein bereits früh durch *Bgh* induziertes Gen, von dem mit N8-5, N8-16, N16-12, 14-15 und 8a-5 fünf Fragmente im cDNA-AFLP isoliert wurden, hat größte Ähnlichkeit zu einem Heparanasegen aus *Arabidopsis thaliana* (58 % identische Aminosäuren, 76 % positiv). Heparanasen (β -Glucuronidasen) schneiden Heparansulfate (HS) in charakteristische Fragmente. Proteine, an die eine oder mehrere HS-Ketten kovalent gebunden sind, werden HSPGs (HS Proteoglykane) genannt (Bame 2001). Sie haben wichtige Funktionen als Strukturproteine und Zelloberflächenrezeptoren, die u. a. Wachstumsfaktoren binden. Die menschliche Heparanase ist ein gut untersuchtes Enzym, da ihre Aktivität eng mit dem Metastasierungspotential von Tumorzellen zusammenhängt (Miao *et al.* 1999; Vlodavsky *et al.* 1999). Die einzigen Arbeiten zu pflanzlichen β -Glucuronidasen/Heparanasen stammen von einer japanischen Arbeitsgruppe und weisen auf eine andere Enzymfunktion hin. *Scutellaria baicalensis* enthält eine große Anzahl an Flavonen, darunter Baicalein. Das wichtigste Flavonoid dieser Pflanze ist Baicalein 7-O- β -D-Glucuronid (BAG). In Zellsuspensionskulturen soll H_2O_2 effektiv metabolisiert werden, indem BAG durch eine β -Glucuronidase zu Baicalein hydrolysiert wird, welches dann wiederum als Substrat für Peroxidasen dient, die unter H_2O_2 Verbrauch Dehydrobaicalein produzieren (Morimoto *et al.* 1998). Die Auslösung eines *oxidative burst* in *S. baicalensis* Zellen durch Elicitoren resultiert in Anwesenheit eines β -Glucuronidase Inhibitors in größeren Schäden in den Zellen als ohne Inhibitor. Ein ähnliches Bild zeigt sich nach direkter Zugabe von H_2O_2 in die Zellkultur. Die Autoren schließen daraus, dass die β -Glucuronidase Teil eines schnellen H_2O_2 -Entgiftungsmechanismus ist. Die in dieser Arbeit identifizierte Heparanase besitzt wie das Enzym aus *S. baicalensis* ein Signalpeptid, welches eine Lokalisation im Apoplasten vermuten lässt, und ist mit vermutlich 518 Aminosäuren ähnlich groß wie die verwandte

Form (502 Aminosäuren; Sasaki *et al.* 2000). Eine Funktion als (indirekt) antioxidatives Enzym wäre für die Heparanase in Gerste, wie für *S. baicalensis* beschrieben, nach Pathogenattacke durchaus denkbar. Gleichzeitig wären sie durch die Freisetzung phenolischer Substanzen an der Zellwandverstärkung beteiligt.

Durch einen starken *oxidative burst* wird auf der einen Seite der angreifende Mehltaupilz direkt mit ROI konfrontiert. Auf der anderen Seite kann in der Pflanzenzelle Zelltod induziert werden, wodurch dem biotrophen Pathogen die Nahrungsgrundlage entzogen wird. Außerdem akkumuliert H₂O₂ in effektiven Papillen von Epidermiszellen der Gerste nach Inokulation mit *Bgh* (Thordal-Christensen *et al.* 1997; Hückelhoven *et al.* 1999). So gesehen handelt es sich bei der ROI-Produktion um eine wichtige Abwehrreaktion, und eine Induktion des antioxidativen Systems scheint in den betroffenen Zellen nicht wünschenswert. Das führte einige Wissenschaftler zu der Überlegung, dass in kompatiblen Interaktionen das antioxidative System hochreguliert und so das Wachstum des Pilzes unterstützt wird, wohingegen in inkompatiblen Interaktionen die ROI-Produktion die Oberhand behält und es zur HR kommt (Hückelhoven *et al.* 1999, 2000; Collinge *et al.* 2002). Gestützt wird diese Hypothese durch Arbeiten die zeigen, dass antioxidative Enzymaktivitäten nach Inokulation mit *Bgh* in kompatiblen Interaktionen stärker ansteigen als in inkompatiblen (El-Zahaby *et al.* 1995; Vanacker *et al.* 1998). In dieser Arbeit konnten auf Transkriptionsebene allerdings keine Unterschiede in der Induktion der antioxidativen oder ROI-produzierenden Enzyme zwischen *Mlg*- und *mlg*-tragenden Pflanzen beobachtet werden.

4.4.3 *Bgh*-induzierte Gene von Signaltransduktionskomponenten

Voraussetzung für eine erfolgreiche Abwehrreaktion der Pflanze ist eine schnelle Perzeption und Signaltransduktion der vom Pathogen ausgelösten Reize. Die dafür notwendigen Rezeptoren und Signalwege müssen teilweise schon vor dem Angriff vorhanden sein, häufig werden wichtige Komponenten jedoch zusätzlich induziert, was zu einer Verstärkung der Signale führen kann. So wird z.B. das Resistenzgen *Xa1*, das in Reis Resistenz gegen bestimmte Rassen von *Xanthomonas oryzae* vermittelt, durch Inokulation mit diesen Bakterien induziert (Yoshimura *et al.* 1998). Einige der im cDNA-AFLP isolierten Gene, die in einer Signalweiterleitung involviert sein könnten, sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.4.3.1 Proteinkinasen

Versuche mit Proteinkinase-Inhibitoren implizierten schon früh, dass diese Enzyme an Abwehrantworten wie *oxidative burst*, Aktivierung von Abwehrgenen und HR beteiligt sind. Der Einsatz von Proteinphosphatase-Inhibitoren, die eine Deaktivierung von Proteinkinasen und somit auch ihrer Substrate verhindern, führte dagegen zur Imitation Elicitor-induzierter Reaktionen (Felix *et al.* 1994; Rajasekhar *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Proteinkinasen isoliert, deren Transkripte nach Inokulation mit *Bgh* akkumulierten.

Das Genfragment N9-8 hat hohe Homologie zu den MAP Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK) CTR1 (*constitutive triple response*; Kieber *et al.* 1993) und EDR1 (*enhanced disease resistance*; Frye *et al.* 2001), die zur Raf-Familie der Proteinkinasen gehören (Jouannic *et al.* 1999). Beide wurden als rezessive Mutanten in *Arabidopsis* entdeckt. *ctr1*-Mutanten zeigen auch in Abwesenheit von Ethylen einen konstitutiven Phänotyp der Ethylenantwort (Kieber *et al.* 1993). Vermutlich bindet CTR1 an den Ethylenrezeptor ETR1 und verbindet so diesen Zwei-Komponenten-Rezeptor mit einer MAP Kinase Kaskade (Clark *et al.* 1998). *edr1* wurde in einem *screening* nach Pathogen-resistenten *Arabidopsis* Mutanten gefunden. Die Pflanzen zeigten konstitutiv erhöhte Resistenz gegenüber dem ursprünglich virulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und dem Pilz *Erysiphe cichoracearum* ohne stärkere Expression von PR-Genen (Frye und Innes 1998). Durch das Einkreuzen von *edr1* in verschiedene *Arabidopsis* Mutanten konnten Frye *et al.* (2001) demonstrieren, dass die *edr1*-vermittelte Resistenz von Salicylsäure (SA), jedoch nicht von Ethylen, abhängt. Die Autoren postulieren, dass EDR1 am Anfang einer MAPK Kaskade steht, die SA-induzierte Abwehrantworten negativ reguliert. Dabei könnte EDR1, analog zu CTR1, mit einem Rezeptor interagieren. Vergleichbar mit der *Bgh*-Induktion von N9-8 wird auch die Transkription der MAPKKK CTR1 (durch Ethylengabe; Müller *et al.* 2002) und EDR1 (durch Infektion mit *E. cichoracearum*; Frye *et al.* 2001) nach entsprechenden Reizen angeschaltet. Die mRNA einer anderen MAPKKK (AtMEKK1) akkumuliert nach unterschiedlichen Stressauslösern wie Kälte und Salzbehandlung (Mizoguchi *et al.* 1996). Die Ähnlichkeit von N9-8 mit den MAPKKK TCTR2 (dem Tomaten-Homolog zu CTR1) und EDR1 aus Reis ist ungefähr gleich (Tab. 3.6) und größer als mit dem bereits in Gerste isolierten EDR1-Homolog. Deshalb lässt sich nicht sagen, welche Funktion dem von N9-8 kodierten Protein in der Gerste-*Bgh* Interaktion zukommt. Möglicherweise ist diese MAPKKK Ausgangspunkt für eine von Ethylen und SA unabhängige Signalkette.

Mit der MAP Kinase 13a-3 ist ein weiteres Mitglied einer MAP Kinase Kaskade in dieser Arbeit isoliert worden. Ihre Charakterisierung wird in Kap. 1.9 diskutiert.

In Pflanzen wurde bereits eine große Anzahl Rezeptor-ähnlicher Proteinkinasen (RLKs, *receptor-like kinases*) beschrieben, die nach ihren Sequenzmotiven in der extrazellulären Domäne in mehrere Klassen eingeteilt werden können (Hardie 1999). Dazu gehören RLKs mit LRR-Motiv, S-Domäne (involviert in Selbst-Inkompatibilität) oder mit Motivwiederholungen des epidermalen Wachstumsfaktors. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte RLK (8a-14) hat große Ähnlichkeit mit lecRK1 aus *Arabidopsis*, dem ersten beschriebenen Mitglied der RLK-Klasse mit extrazellulärer Lectindomäne (Herve *et al.* 1996). Lectine sind Kohlenhydrat-bindende Proteine, deren Funktion möglicherweise in der Weiterleitung von Oligosaccharid-Signalen liegt. Das von 8a-14 kodierte Protein hat vermutlich 684 Aminosäuren und ist damit ähnlich groß wie andere RLKs mit Lectin-Domäne (Herve *et al.* 1996; Nishiguchi *et al.* 2002). Ein Signalpeptid und die putative Transmembranregion (im Bereich um Aminosäure 300) sind ebenfalls charakteristisch. Herve und Mitarbeiter (1999) fanden in *Arabidopsis* mindestens fünf Genfamilien von lecRK Rezeptoren und bestätigten experimentell, dass es sich dabei um Transmembranproteine handelt. Sie vermuteten, dass nicht alle lecRKs Kohlenhydrate binden, sondern dass einige auch andere hydrophobe Liganden wie Pflanzenhormone binden könnten. Ohtake *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Transkription zahlreicher RLKs durch SA-Behandlung induziert wird und postulieren eine Involvierung dieser Kinasen in SA-abhängige Abwehrantworten der Pflanzen gegen Pathogene. Leider wurden RLKs mit Lectindomäne in ihren Versuchen nicht berücksichtigt. Eine Beteiligung der deutlich *Bgh*-induzierten lecRK 8a-14 an der Gerste-Mehltaupilz Interaktion ist gut vorstellbar, sie könnte vom Pilz freigesetzte Elicitoren (z.B. Oligosaccharide der pflanzlichen Zellwand) binden und auf diesem Weg zur Erkennung des Pathogens beitragen. So gesehen ist es nicht überraschend, dass 8a-14, wie auch eine lecRK aus *Pinus nigra* (Nishiguchi *et al.* 2002), bereits 30 min nach Verwundung induziert wird (ohne Abbildung). Bei einer Verwundung wird ebenfalls die Zellwand beschädigt und es werden eventuell ähnliche Kohlenhydrate wie bei einem pilzlichem Angriff freigesetzt.

Das Genfragment 8a-7 hat wie 8a-14 Homologie zu RLKs, für eine genaue Zuordnung ist jedoch nicht genug Sequenzinformation vorhanden. Wie bei allen bisher identifizierten pflanzlichen RLKs handelt es sich um eine Ser/Thr-spezifische Kinase (Hardie 1999). Auffällig ist das nahezu identische Expressionsmuster der beiden Kinasen (Abb. 3.12), welches auf ähnliche Funktionen hindeuten könnte. Dagegen gibt es bei der Proteinkinase-

sequenz 5-3 keine Hinweise auf eine Ähnlichkeit mit Rezeptorkinasen. Diese Ser/Thr-spezifische Kinase wird ausschließlich 4 hpi, zum frühesten der untersuchten Zeitpunkte, stärker exprimiert. Über die Substrate der verschiedenen Proteinkinasen lässt sich zur Zeit keine Aussage machen.

4.4.3.2 Immunophilin (N5-4)

Durch die Isolierung von N5-4 konnte letztlich der gesamte ORF für ein FKBP (FK506-binding protein), auch Immunophilin genannt, gewonnen werden. FKBP's gehören zur Familie der Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPiasen), die in viele zelluläre Prozesse wie Transkription, Proteintransport und Signaltransduktion involviert sind. Die meisten Funktionen sind allerdings noch unbekannt. FK506 gehört mit Cyclosporin A und Rapamycin zu den immunsuppressiven Drogen, die in Säugetieren T-Zellen hemmen, wenn sie im Komplex mit Immunophilinen vorliegen. Die Abstoßung von Organen bei Transplantationen kann dadurch verhindert werden. Aufgrund ihrer Kapazität, FK506 zu binden, wurden die ersten pflanzlichen FKBP's isoliert (Luan *et al.* 1994). Unterschieden werden kleine (niedermolekulare) von großen (hochmolekulare) FKBP's. Die kleinen sollen Signaltransduktionswege modulieren, wohingegen die großen mit vielen verschiedenen Proteinen wie dem Hitzeschockprotein hsp90, Steroidrezeptoren oder Dynein interagieren (Harrar *et al.* 2001).

N5-4 hat mit AtFKBP15-1 aus *Arabidopsis* 84 % identische Aminosäuren und gehört damit zu den kleinen FKBP's mit einem Molekulargewicht von voraussichtlich 15 kDa. Wie VfFKBP15 aus *Vicia faba* und AtFKBP15-1 besitzt N5-4 ein Signalpeptid für die Translokation ins ER, ein ER-Rückhaltesignal wie bei den beiden Homologen (Luan *et al.* 1996) konnte jedoch nicht identifiziert werden. Im *Arabidopsis*-Genom sind mindestens elf niedermolekulare FKBP's gefunden worden, die alle unterschiedliche Funktionen haben könnten (Harrar *et al.* 2001). Weiterführende Arbeiten zur Funktion der Immunophiline in Pflanzen fehlen jedoch zur Zeit noch, weshalb die Bedeutung der Induktion von N5-4 durch den Mehltaupilz vorläufig im Dunkeln bleibt. Einen Hinweis für die Beteiligung von FKBP's in Signaltransduktion kommt aus tierischen Systemen. Dort ist ein FKBP12 bekannt, dass an Rezeptoren bindet und so ihre Aktivität, eventuell über die Verankerung eines Inhibitors, herunterreguliert (Wang *et al.* 1996b).

4.4.3.3 Phospholipase D (13b-10)

Mit 13b-10 wurde ein *Bgh*-induziertes Genfragment einer Phospholipase D (PLD) isoliert. PLD produziert den *second messenger* Phosphatidsäure (PA) im Unterschied zur Phospholipase C direkt durch Hydrolyse von Strukturphospholipiden wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Mindestens fünf Untertypen der PLD sind in Pflanzen bekannt (Wang *et al.* 2000b; Katagiri *et al.* 2001), die vermutlich viele Rollen unter verschiedensten Bedingungen spielen. PLD α ist die häufigste und am besten untersuchte Form. Aufgrund fehlender Sequenzinformation lässt sich die in dieser Arbeit isolierte PLD leider nicht einer bestimmten Form zuordnen. Neben der Synthese des *second messengers* PA kann die PLD-Aktivität Veränderungen der physikalischen Eigenschaften von Membranen oder sogar einen Membranabbau hervorrufen. Den ersten direkten Hinweis für eine Partizipation der PLD in Signalwegen von Pflanzen kam von Munnik *et al.* (1995). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass PLD durch G-Proteinaktivatoren wie Mastoporan stimuliert wird. Nachfolgende Arbeiten demonstrierten eine Regulierung der PLD-Aktivität durch die Phytohormone Ethylen und Abscisinsäure (Fan *et al.* 1997), Calcium-Ionen (Zheng *et al.* 2000), Polyphosphoinositide (Qin *et al.* 1997), G-Proteine (Ritchie und Gilroy 2000) und pH-Veränderungen (Pappan und Wang 1999). In Bohnenblättern führte Verwundung zu einer schnellen Aktivierung der PLD-vermittelten Hydrolyse, welches an einer schnellen Akkumulation von PA und Cholin (der zusätzlich freiwerdenden Kopfgruppe der Phospholipide) messbar war. Interessanterweise resultierte die frühe Aktivierung nicht aus einem Transkriptanstieg der PLD, sondern aus einer Translokation des Enzyms zur Membran, eventuell ermöglicht durch einen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration (Ryu und Wang 1996). Eine Arbeit mit *Arabidopsis* zeigte, dass die mRNA verschiedener PLD-Formen durch Verwundung unterschiedlich stark induziert wird und dass PLD α auf Transkriptebene am wenigsten sensitiv reagiert, dafür aber durch Transport zur Membran aktiviert wird (Wang *et al.* 2000a). Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit einem *antisense* PLD α -Gen akkumulierten nach Verwundung weniger PA, aber auch weniger Jasmonat (JA) und ein JA-reguliertes Gen war schwächer induziert als in Wildtyp-Pflanzen. Wang *et al.* (2000a) deuten die Ergebnisse in die Richtung, dass Aktivierung der PLD die Wund-stimulierte Bildung von JA induziert. Lee und Mitarbeiter (2001) identifizierten eine Wund-induzierte MAP Kinase in Bohnenblättern, die speziell durch PA aktiviert wird. Diese Aktivierung ist jedoch nicht direkt, sondern abhängig von Phosphorylierungen *upstream* der MAP Kinase. Eine mögliche Eingreifstelle für PA wäre die *upstream* liegende MAPKKK. Im tierischen System ist die Insulin-induzierte Stimulierung einer MAP Kinase-Kaskade

abhängig von der RAF-1 (MAPKKK)-Translokation an die Plasmamembran, die durch direkte Interaktion mit PA vermittelt wird (Rizzo *et al.* 1999, 2000).

PLD-Transkripte akkumulieren ein bis vier Tage nach Infektion mit dem bakteriellen Pathogen *Xanthomonas oryzae* in Reis (Young *et al.* 1996). Im Unterschied zur suszeptiblen Interaktion, in welcher das PLD-Protein gleichmäßig entlang der Plasmamembran verteilt war, akkumulierte die PLD in resistenten Interaktionen zwischen 6 und 24 Stunden nach Infektion in der Plasmamembran bevorzugt in direkter Nachbarschaft zu den Bakterien. Die Autoren vermuten, dass die konzentrierte PLD-Aktivität zu einer Zerstörung der Membran und so letztendlich zu Zelltod und Resistenz führt. Ein weiterer wichtiger Hinweis für die mögliche Funktion der PLD in der pflanzlichen Abwehr gegen Pathogene stammt erneut aus tierischen Systemen. Dort haben Versuche belegt, dass PA den ROI-produzierenden NADPHoxidase-Komplex in Neutrophilen aktiviert (Waite *et al.* 1997; McPhail *et al.* 1999). Die Arbeit von Sang *et al.* (2001) lässt die Annahme zu, dass gleiches auch für den pflanzlichen Organismus gilt. Einbringung des PLD α -Gens in *antisense*-Richtung in *Arabidopsis* resultierte in erniedrigten PA-Konzentrationen und einer verringerten Superoxidproduktion. Die Zugabe von PA verstärkte dagegen die Anreicherung dieses ROI in den Blättern. Sang und Mitarbeiter (2001) gehen davon aus, dass die NADPHoxidase eines der Ziele des Lipidbotenstoffes PA ist.

4.4.3.4 Transkriptionsfaktoren

Neben den bereits beschriebenen Komponenten von Signalwegen, von denen einige sehr weit oben in der Kette anzusiedeln sind (Rezeptor-ähnliche Kinase, MAPKKK), wurden mindestens zwei putative Transkriptionsfaktoren, die auf der letzten Stufe der Signalweiterleitung stehen, identifiziert. In den letzten Jahren wurden einige Familien von Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise in pflanzliche Pathogenabwehr-Antworten involviert sind, beschrieben. Dazugehören W-Box bindende WRKY Proteine (Eulgem *et al.* 1999; Chen und Chen 2000; Yu *et al.* 2001), Myb-ähnliche Proteine (Sugimoto *et al.* 2000), EREB Proteine (*ethylene-response element-binding*; Park *et al.* 2001), bZIP Proteine (Despres *et al.* 2000; Lee *et al.* 2002) und NAC Proteine (Xie *et al.* 1999; Ren *et al.* 2000). Die Aktivierung der meisten Transkriptionsfaktoren ist jedoch in der Regel nicht auf Pathogene beschränkt. Ein putatives DNA-Bindeprotein (N9-10) mit Homologie zu WRKY Transkriptionsfaktoren wird in Kap. 1.8 ausführlicher diskutiert.

Das Genfragment 8a-4 hat Ähnlichkeit mit dem 3'-Ende von *SCARECROW* (*SCR*), einem Gen der GRAS Familie. Die Bezeichnung GRAS wurde aus den ersten drei von 19

identifizierten Mitgliedern dieser Familie in *Arabidopsis* abgeleitet (*GAI*, *RGA*, *SCR*; Pysh *et al.* 1999). *SCR* wurde in einem Screening nach Mutationen, die die Wurzelentwicklung beeinflussen, isoliert. Mutationen in *SCR* zerstören die radiale Musterbildung in der Wurzel (Benfey *et al.* 1993). Das vorausgesagte Protein enthält einige Domänen, die die Annahme zulassen, dass es sich bei *SCR* um einen Transkriptionsfaktor handelt (Di Laurenzio *et al.* 1996). Zwei Mitglieder der GRAS Familie konnten der Gibberellinsäure-induzierten Signaltransduktion zugeordnet werden (Silverstone *et al.* 1998), weitere Funktionen der putativen GRAS Transkriptionsfaktoren, insbesondere in Wirt-Pathogen Interaktionen, sind jedoch nicht bekannt. In Gerste scheint es mindestens zwei mögliche *SCR*-ähnliche Gene zu geben. Mit spezifischen Primern für die im cDNA-AFLP isolierte Sequenz wurden mit RT-PCR zwei Produkte amplifiziert (Abb. 3.12). Die größere Sequenz (8a-4a) enthielt eine 83 bp lange Insertion, durch die in der Proteindomänensuche mit *PROSITE* eine Zink-Finger Signatur identifiziert wurde, die in der kleineren Sequenz (8a-4b) fehlt. Beide Gene werden bereits 4 hpi durch *Bgh* induziert, die obere Bande anscheinend stärker. Zukünftige Arbeiten sollen klären, ob eines der beiden Gene eine Bedeutung bei der Pathogenabwehr hat und ob die mRNA der unterschiedlichen Formen nach verschiedenen Reizen immer synchron akkumuliert.

4.5 Transkriptakkumulation nach Inokulation mit *Bgh* in *Mlg*- und *mlg*-tragenden Gerstenlinien

Das Resistenzgen *Mlg* vermittelt monoallelisch und semi-dominant Resistenz gegenüber der Rasse A6 des Gerstenmehltaupilzes. Das Pathogen wird dabei durch effektive Papillenbildung gestoppt. Dieser Reaktion folgt meistens noch eine HR der attackierten Zellen (Görg *et al.* 1993; Schiffer *et al.* 1997). Die Ausbildung von Resistenz in der inkompatiblen Interaktion von Gerste (*Mlg*) mit *BghA6* könnte dabei durch eine schnellere oder auch stärkere Induktion Abwehr-relevanter Gene determiniert werden. Um solche differentiell regulierten Gene zu identifizieren, wurde die RNA aus Primärblättern von Ingrid (*mlg*) und IWe (*Mlg*) 4, 8 und 12 Stunden nach Inokulation mit *BghA6* isoliert und anschließend die Expression von 30 im cDNA-AFLP isolierten Genen untersucht. Keines dieser Gene zeigte einen deutlichen oder reproduzierbaren Unterschied in der Transkriptakkumulation zwischen den *Mlg*- und *mlg*-tragenden Gerstenkultivaren. Bereits im cDNA-AFLP Screening war keine differentielle Genexpression zwischen inkompatibler und kompatibler Interaktion zu 4 und 12 hpi festgestellt worden, was teilweise durch eine zu hohe Anzahl an PCR-Zyklen oder zu große Inokulationsdichte erklärt werden könnte. In einer cDNA-AFLP

Untersuchung von *rhml*-resistenten Mais und Wildtyp-Pflanzen nach *Bipolaris maydis* Infektion konnten Simmons *et al.* (2001) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen *rhml*- und Wildtyp-Transkriptmenge ausmachen. Auch Clark und Mitarbeiter (1995) fanden bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt 15 hpi keinen Unterschied im Expressionsverhalten sechs verschiedener Gene zwischen Gerstenkultivaren, die das rassenunspezifisch Resistenz-vermittelnde Gen *mlo* (Kap. 1.7.1) oder das Wildtypallel *Mlo* trugen. Die meisten Untersuchungen zur Transkriptakkumulation in inkompatiblen und kompatiblen Gerste-Mehltaupilz Interaktionen wurden in Abhängigkeit von *Mla* (Kap. 1.7.2) durchgeführt. In der *Mla*-vermittelten Resistenz wurde bis 24 hpi keine differentielle Genexpression beobachtet (Walther-Larsen *et al.* 1993; Boyd *et al.* 1994a,b; Gregersen *et al.* 1997), doch zu späteren Zeitpunkten akkumulierten manche Transkripte schneller in inkompatiblen Interaktionen (Gregersen *et al.* 1997; Christensen *et al.* 1998). So wurde z.B. die stärkere Induktion einer Chitinase und Peroxidase in *Mla6*-tragender Gerste nach Inokulation erst 30-36 hpi in der inkompatiblen Interaktion ersichtlich und hielt dann für ca. 20 h an (Boyd *et al.* 1994a,b). Dieser spät auftretende Unterschied in der Transkriptakkumulation lässt die Überlegung zu, dass mit 4, 8 und 12 hpi die Zeitpunkte für die Untersuchung einer möglichen differentiellen Genexpression in *Mlg*- und *mlg*-tragenden Pflanzen zu früh gewählt waren. Dafür spricht auch, dass von C. Jansen (in Vorbereitung) ein Gen gefunden wurde, dass erst ab 16 hpi stärker in *Mlg*-tragenden Pflanzen akkumuliert. Andererseits stellt sich die Frage, inwieweit Gene, die erst nach 24 hpi oder später in der inkompatiblen Interaktion akkumulieren, überhaupt noch einen Einfluss auf die Pathogen-Abwehr haben können, da der Pilz in der *Mlg*-vermittelten Resistenz bereits früh durch Papillen gestoppt wird.

4.6 Transkriptakkumulation *Bgh*-induzierter Gene nach Inokulation des Nichtwirts Gerste mit Weizenmehltaupilz

Nichtwirtresistenz wird von allen Pflanzen gegenüber der Mehrzahl potentieller Pathogene ausgebildet. Präformierte Abwehrkomponenten spielen dabei vermutlich eine große Rolle, es werden aber auch Resistenzreaktionen durch unspezifische Elicitoren induziert (Heath 1981; Heath 2000b). Ein Pathogen kann erst dann erfolgreich eine Pflanze besiedeln, wenn es in der Lage ist, diese Abwehrreaktionen zu tolerieren oder zu unterdrücken. Bei der Nichtwirtresistenz handelt es sich um eine sehr dauerhafte Form der Resistenz, deshalb ist das Interesse an der Aufschlüsselung der zugrunde liegenden Mechanismen groß, jedoch blieben die molekularen Grundlagen bislang in weiten Teilen unbekannt. Die Ausprägung

der Nichtwirtresistenz ist häufig durch die Aktivierung der gleichen Abwehrreaktionen wie bei der R-Gen vermittelten rassenspezifischen Resistenz charakterisiert, dazu gehören in der Gerste-Mehltaupilz Interaktion sowie in anderen Pathosystemen Zellwandappositionen und die HR (Heath 2000b; Vleeshouwers *et al.* 2000; Kamoun 2001; Hückelhoven *et al.* 2001b). Ein weiterer Hinweis für gemeinsame Mechanismen der Nichtwirt- und Wirtresistenz ist die Isolierung der *Arabidopsis* Mutante *nho1*, deren Resistenz sowohl gegenüber eigentlich avirulenten *Pseudomonas*-Bakterien als auch nicht pathogenen Pseudomonaden gebrochen ist (Lu *et al.* 2001). Neueste Untersuchungen zeigen außerdem, dass Komponenten der rassenspezifischen Resistenz wie SGT1 (Peart *et al.* 2002) und der rassenspezifischen Resistenz wie ROR1 (Peterhänsel *et al.* 1997; Hückelhoven *et al.* unveröffentlicht) in einigen Nichtwirt-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen. Viele Arbeiten lassen vermuten, dass die Nichtwirtresistenz auf einer kumulativen Wirkung vieler Gen-für-Gen Erkennungsreaktionen, ähnlich denen der Wirtresistenz, beruht (Tosa 1992; Kamoun *et al.* 1998; Vleeshouwers *et al.* 2000; Kamoun 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression *Bgh*-induzierter Gene in Gerste nach Inokulation mit dem Nichtwirt-Pathogen Weizenmehltaupilz (*Bgt*) untersucht. Die Transkriptakkumulation von 30 Genen wurde zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12 h nach Inokulation mittels SMARTTM RT-PCR untersucht. Parallel dazu wurde die Induktion der Gene nach Inokulation mit *Bgh* in einer kompatiblen (*mlg*) und in einer durch das R-Gen *Mlg* inkompatibeln Interaktion dargestellt. Es zeigte sich, dass alle durch *Bgh* induzierten Gene auch nach Angriff von *Bgt* in Gerstenblättern akkumulierten. Einige der Gene wurden jedoch auffällig stärker durch *Bgt* als durch *Bgh* induziert, besonders deutlich wurde das bei Genen mit Homologie zu einem *Cf2/Cf5 disease resistance protein* (N9-5), einem Cytochrom P450 (13a-5), einem putativen Zellwandprotein (13b-11) und einer möglichen Ethylen-bildenden Dioxygenase (14-11). Diese differentielle Transkriptakkumulation zwischen Wirt- und Nichtwirt-Interaktion wurde in unabhängigen Versuchen bestätigt (R. Eichmann, unveröffentlicht). Funktionsanalysen verschiedener synthetischer Promotorelemente in Pflanzen ergaben, dass in der Nichtwirt-Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *Bgh* nicht so viele der untersuchten Promotorelemente die Genexpression anschalten wie in Wirt-Interaktionen (Rushton *et al.* 2002). Es viel auf, dass alle in der Nichtwirt-Interaktion aktiven synthetischen Promotoren das Element Box S enthielten, was suggeriert, dass Box S eine Rolle in der Nichtwirt-Signaltransduktion spielen könnte (Rushton *et al.* 2002). Möglicherweise enthalten die durch *Bgt* stärker induzierten Gene ein oder mehrere Box S-Elemente in ihren Promotorbereichen.

Von dem Genfragment N9-5 mit Homologie zu einem *Cf2/Cf5 disease resistance protein* konnte nicht die vollständige kodierende Sequenz ermittelt werden. Am C-Terminus sagt die Proteindomänensuche mit Pfam (Bateman *et al.* 2002) zwei Leuzinreiche Regionen (LRRs) vorher. Die *Cf*-Gene sind R-Gene, die in Tomate Resistenz gegen *Cladosporium fulvum* vermitteln und in komplexen Clustern vorkommen. Die Proteine sind in der Plasmamembran verankert und extrazelluläre LRRs bestimmen durch ihre Sequenzvariabilität und Anzahl die spezifische Erkennung von Liganden (Dixon *et al.* 1998; Thomas *et al.* 1998; Wulff *et al.* 2001). Vielleicht handelt es sich bei N9-5 um eines der R-Gene, die die postulierten Gen-für-Gen Interaktionen bei der Nichtwirtresistenz vermitteln (Kamoun 2001). Möglicherweise bindet das Protein aber auch unspezifische Elicitoren wie Oligosaccharide oder Peptide, die von vielen Pathogenen freigesetzt werden.

Von einer Cytochrom P450 Monooxygenase (13a-5) konnte die gesamte mRNA-Sequenz gewonnen werden. Diese Enzyme haben viele Aufgaben, so dass ihre genaue Funktion in der Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen ungeklärt ist. In einer Zellkultur von *Glycine max* wurden nach Zugabe eines pilzlichen Elicitors allein acht verschiedene P450s induziert (Schopfer und Ebel 1998). Viele der P450s sind in die Biosynthese von sekundären Pflanzenstoffen wie Phytoalexinen und Substanzen des Phenylpropanoidstoffwechsels involviert (Frey *et al.* 1997; Nielsen und Moller 2000; Whitbred und Schuler 2000). Eine andere bekannte Funktion ist der oxidative Abbau toxischer Substanzen, die eventuell auch von Pathogenen stammen können. Bei den von P450s katalysierten Reaktionen können außerdem, wie bereits erwähnt, ROI freigesetzt werden (Puntarulo und Cederbaum 1998; Vranova *et al.* 2002).

Mit 13b-11 wurde ein Gen nach Inokulation mit *Bgt* stärker induziert, dass einerseits Homologie zu einem putativen Zellwandprotein besitzt, andererseits Ähnlichkeit mit Phytochelatinsynthasen hat. Phytochelatinsynthasen bilden Phytochelatine, deren Aufgabe hauptsächlich in der Detoxifizierung von Schwermetallen durch Chelatierung gesehen wird (Cobbett 2000). Eine Transkriptakkumulation der Phytochelatinsynthase nach Schwermetallstress wurde nicht beobachtet (Cobbett 2000) und eine Involvierung dieses Enzyms in Wirt-Pathogen Interaktionen ist bislang nicht bekannt.

Die Annahme, dass es sich bei 13b-11 um ein in der Zellwand lokalisiertes Protein handelt, würde hingegen die Bedeutung der Zellwand bei der Abwehr von Nichtwirt-Pathogenen hervorheben, die sich auch in cytologischen Arbeiten zeigte (Heath 2000; Hückelhoven *et al.* 2001b).

Ethylenproduktion ist eine frühe Antwort von Pflanzen auf die Perzeption eines Pathogens und scheint verschiedene Abwehrreaktionen zu induzieren (Fluhr 1998). Die stärkere Expression einer Ethylen-bildenden Dioxygenase (14-11) in einer Nichtwirt-Interaktion könnte auf eine besondere Bedeutung von Ethylen in dieser Resistenzform hindeuten. Unterstützt wird diese Überlegung durch Arbeiten von Knoester *et al.* (1998) die zeigen, dass Ethylen insensitive transgene Tabakpflanzen anfällig gegenüber normalerweise auf Tabak nicht pathogenen Pilzen wurden, während die Resistenz gegen das Tabak-Mosaik-Virus erhalten blieb.

Festzuhalten bleibt, dass in der Nichtwirtresistenz einige Gene stärker induziert wurden als in kompatiblen Interaktionen und *Mlg*-vermittelter rassenspezifischer Resistenz. Möglicherweise handelt es sich dabei um Gene, deren Expression in einer Wirt-Pathogen Interaktion vom Pathogen unterdrückt wird. Ob diesen Genen tatsächlich eine besondere Bedeutung in der Nichtwirtresistenz zukommt, müssen zukünftige Arbeiten klären.

4.7 Transkriptakkumulation *Bgh*-induzierter Gene in Gerste nach Behandlung mit dem chemischen Resistenzinduktor BTH

Chemisch induzierte Resistenz (cIR) durch biologische Extrakte und synthetische Komponenten ist in Getreide gegen verschiedene Pathogene, einschließlich dem Echten Mehltaupilz wirksam (Kogel *et al.* 1994; Schweizer *et al.* 1997; Morris *et al.* 1998; Beßer *et al.* 2000). Die Salicylsäure (SA)-Analoga BTH und DCINA wirken dabei effektiver als SA (Görlach *et al.* 1996). Da BTH in den normalen Applikationsmengen im Gegensatz zu DCINA keine phytotoxische Wirkung zeigte (Beßer *et al.* 2000), wurden BTH-induzierte Pflanzen für die Suche nach gemeinsamen Komponenten der cIR und Pathogen-induzierter Abwehr herangezogen. Bei denen der cIR zugrunde liegenden Mechanismen gegen Mehltaupilze handelt es sich um die Ausbildung effektiver Papillen gefolgt von einem Hypersensitiven Zelltod der angegriffenen Epidermiszellen (Kogel *et al.* 1994; Görlach *et al.* 1996; Stadnik und Buchenauer 1999). Cytologische und biochemische Arbeiten zeigten eine auffallende Ähnlichkeit zwischen dieser chemisch induzierten und *Mlg* Resistenzgen-vermittelter Abwehr (Kogel *et al.* 1994; Hückelhoven *et al.* 1999; Kogel und Hückelhoven 1999). Diese Ähnlichkeit lässt vermuten, dass bei BTH- und Pathogen-induzierter Resistenz zumindest teilweise gleiche Gene angeschaltet werden. Diese Annahme wurde durch Arbeiten von Maleck *et al.* (2000) in einem anderen Pathosystem bestätigt. In einem *microarray* zur Untersuchung des Transkriptoms von *Arabidopsis* stellten sie fest, dass das Expressionsmuster nach Inokulation mit dem Pathogen *Peronospora parasitica* dem

Expressionsmuster der frühen Antwort auf BTH-Induktion ähnelt. Görlach *et al.* (1996) identifizierten fünf BTH-induzierte *WCI*-Transkripte (*wheat chemically induced*) in Weizen, die auch, allerdings nur schwach und erst nach neun Tagen, nach Inokulation mit Weizenmehltaupilz akkumulierten. Diese späte Reaktion lässt die Induktion durch Pathogene fragwürdig erscheinen. So wurden die *WCI*-Gene auch nicht durch das Nichtwirt-Pathogen Gerstenmehltaupilz induziert (Schaffrath 1997). Die Autoren vermuten deshalb die Existenz von mindestens zwei unterschiedlichen Resistenzinduktionswegen. Unterstützung findet diese Hypothese durch die Arbeit von Beßer *et al.* (2000). Von neun chemisch induzierten Genen der Gerste (*BCIs*, *barley chemically induced*) wurde keines durch Gerstenmehltaupilz angeschaltet. In der vorliegenden Arbeit akkumulierten fünf von 30 untersuchten Pathogen-induzierten Genen auch nach Behandlung mit BTH (Abb. 3.14). Keines der Transkripte akkumulierte jedoch so stark wie der Marker für cIR, *BCI-4*. Interessanterweise kodieren drei dieser Gene für Enzyme des Phenylpropanoidstoffwechsels. Die PAL6 wurde 24 h, eine Chorismatmutase und eine CCoAOMT bereits 7 h nach Behandlung induziert. In Weizen wurde ein Anstieg der PAL-Aktivität nach Induktion chemischer Resistenz mit BTH und eine höhere Konzentration an autofluoreszierendem Material beobachtet, außerdem stieg der Gehalt an Zellwand-gebundenen phenolischen Säuren (Stadnik und Buchenauer 1999, 2000). Der Einsatz eines PAL-Inhibitors führte zu einer Abnahme der Fluoreszenz in BTH-behandelten Blättern und einem Anstieg der Penetrationseffizienz des Weizenmehltaupilzes. Anscheinend spielen phenolischen Substanzen aus dem Phenylpropanoidmetabolismus eine wichtige Rolle bei der BTH-induzierten Penetrationsresistenz gegen Echte Mehltaupilze. In Zellkulturen von *Vitis vinifera* wurde ebenfalls die Expression von Genen des Phenylpropanoidstoffwechsels (CCoAOMT und Stilbensynthase) durch chemische Aktivatoren wie DCINA, in diesem System allerdings nicht durch BTH, induziert (Busam *et al.* 1997a).

Die beiden anderen Gene, 13b-11 (Phytochelatinsynthase oder Zellwandprotein) und 13b-10 (Phospholipase D), werden 24 h nach Behandlung leicht angeschaltet. Über 13b-11 lässt sich aufgrund der unvollständigen Identifizierung nichts mit Gewissheit sagen. Die Phospholipase D kann durch die Bildung von Lipidbotenstoffen in viele Reaktionen eingreifen (Kap. 1.4.3.3). Interessant ist die postulierte Involvierung der PLD in die Jasmonatsynthese (Wang *et al.* 2000a), wobei nicht bekannt ist, ob die PLD lediglich freie Fettsäuren für die Jasmonatbiosynthese zur Verfügung stellt oder vielleicht den Jasmonatweg über *second messenger* induziert. Die PLD könnte so ein Verknüpfungspunkt der cIR mit der Signalkette des Phytohormons Jasmonat darstellen. Die meisten *BCIs*

werden neben chemischen Aktivatoren auch durch Jasmonat angeschaltet (Beßer *et al.* 2000). Gegen eine Beteiligung von Jasmonat an der cIR im Gerste-Mehltaupilz Pathosystem sprechen jedoch Untersuchungen von Kogel *et al.* (1995). Sie fanden keine erhöhten Jasmonatkonzentrationen nach DCINA-Behandlung und Resistenz in Gerste gegen *Bgh* war nicht mit einer Akkumulation von endogenem Jasmonat verknüpft.

4.8 Charakterisierung des putativen DNA-Bindeproteingens N9-10

Bereits 3 h nach Inokulation mit *Bgh* akkumulierte in Gerstenblättern das Genfragment N9-10 (Abb. 3.13), dessen Sequenz über 3'-RACE und ein homologes EST verlängert werden konnte. Die abgeleitete Aminosäuresequenz hat große Ähnlichkeit zum C-Terminus von Proteinen der Familie der WRKY Transkriptionsfaktoren (Abb. 3.15). WRKY Proteine sind auf das Pflanzenreich beschränkt, bilden dort aber eine große Familie von geschätzten 100 Mitgliedern in *Arabidopsis* (Eulgem *et al.* 2000). Gemeinsames Merkmal dieser Transkriptionsfaktoren ist das Vorkommen der Sequenz WRKYGQK am N-Terminus und das Zinkfingermotiv Cys₂-His₂ (Gruppe I). Proteine mit zwei Kopien der WRKY-Domäne werden in Gruppe II eingeteilt und solche mit einem veränderten Zinkfingermotiv (Cys₂-HisCys) gehören zur Gruppe III (Eulgem *et al.* 2000). Vor kurzem wurden zwei neue WRKY Proteine isoliert, die beide eine putative Leuzin Zipper Domäne ausserhalb der DNA-Binderegion aufweisen (Cormack *et al.* 2002). WRKY Proteine binden an Promotorelemente mit der Sequenz (T)TGAC(C/T), sogenannte W Boxen (Eulgem *et al.* 1999). Das TGAC Kernmotiv wurde ursprünglich als Elicitor-responsives Element im *PR1-I* Gen von Petersilie identifiziert (Meier *et al.* 1991). Spätere Arbeiten fanden W Box Elemente in verschiedenen Pathogen-responsiven Genen (Rushton *et al.* 1996; Yang *et al.* 1999; Yu *et al.* 2001) und in einem *microarray* von Maleck *et al.* (2000) wurde ein PR-1 Regulon identifiziert, bei dem die Promotoren eine signifikant höhere Anzahl an W Box Elementen enthielten als Promotoren anderer Gene. Es finden sich auch auffällig viele Bindestellen für WRKY Proteine in Genen, deren Transkripte während der Seneszenz akkumulierten (Chen *et al.* 2002).

Transkripte des putativen WRKY Gens N9-10 akkumulierten sehr schnell nach Inokulation mit *Bgh* und dem Nichtwirt-Pathogen *Bgt* mit einem Maximum 4 hpi (Abb 3.13). Solch eine schnelle Induktion nach Pathogenbefall ist für viele WRKY Transkriptionsfaktoren gezeigt, u.a. für WRKY1 und WRKY3 aus Petersilie (Rushton *et al.* 1996), tWRKY1 aus Tabak (Yang *et al.* 1999) und verschiedene AtWRKYs aus *Arabidopsis* (Durrant *et al.* 2000). Mechanischer Stress, wie er durch Kontakt mit pilzlichen Hyphen verursacht wird, war in

einer Petersilienzellkultur bereits ausreichend, um WRKY1 zu induzieren (Gus-Mayer *et al.* 1998). N9-10 wurde auch durch Verwundung mit dem Abrasiv Carborund sehr deutlich und transient zwischen 30 min und 1 h induziert (Abb. 3.16). Ein WRKY Protein, das ebenfalls durch Verwundung induziert wird, ist WIZZ (*wound-induced leucine-zipper and zinc-finger protein*; Hara *et al.* 2000). Wizz-Transkripte akkumulierten in Tabakblättern sehr schnell nach Verwundung mit einem Maximum nach 30 min. Cheong und Mitarbeiter (2002) untersuchten in einem *microarray* mit über 8000 *Arabidopsis* Genen die Transkriptakkumulation nach Verwundung und fanden sieben induzierte WRKY Gene. Eine ähnliche Regulation von Genen nach Pathogenbefall oder Verwundung wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen beobachtet (Durrant *et al.* 2000; Cheong *et al.* 2002). Sogar das R-Gen *Xa1* aus Reis soll außer durch Pathogene auch durch Verwundung induziert sein (Yoshimura *et al.* 1998). Da Verwundung neben der Zerstörung pflanzlichen Gewebes auch verschiedenen Pathogenen einen Weg in die Pflanze eröffnet, wird vermutet, dass Pflanzen Mechanismen entwickelt haben, die die Pathogen- mit der Verwundungsantwort koppeln. So zeigten Promotorstudien von Rushton *et al.* (2002), dass die Expression sämtlicher untersuchter Promotorelemente mit Ausnahme der Box D, neben Pathogenen auch durch lokale Verwundung induziert wird.

Auf Grund ihrer schnellen Induktion nach Pathogenattacke oder Verwundung und dem bereits erwähnten häufigen Vorkommen ihrer Promotorbindestelle (W Box) in Abwehr-relevanten Genen gehen einige Wissenschaftler davon aus, dass viele WRKY Proteine als Transkriptionsaktivatoren die Expression eines großen Teils Abwehr-relevanter Gene regulieren. Diese Überlegung wird u.a. dadurch unterstützt, dass NPR1, ein positiver Regulator induzierbarer Resistenz in Pflanzen, in seinem Promotor W Box Elemente enthält. Arbeiten von Yu *et al.* (2001) geben außerdem Hinweise darauf, dass WRKY Proteine *upstream* von NPR1 seine Expression während der Aktivierung der Resistenz positiv regulieren. Eine moderate Überexpression von *AtWRKY18* in transgenen *Arabidopsis* Pflanzen aktiviert die PR-Genexpression und erhöht die Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* in ausgewachsenen Pflanzen, die Akkumulation großer Mengen an überexprimiertem *AtWRKY18* führte jedoch zu einem abnormalen Kümmerwuchs (Chen und Chen 2002).

Im transienten Transformationsassay nach Schweizer *et al.* (2000) wurde die Expression des putativen WRKY Proteins N9-10 mittels RNAi unterdrückt (Abb. 3.17). Diese Methode führt zu einem hoch sequenzspezifischen Abbau von mRNA, der durch homologe dsRNA induziert wird. 81 %ige Ähnlichkeit der dsRNA mit einem Gen reicht dabei nicht aus, dieses

auszuschalten (Schweizer *et al.* 2000). Um zusätzlich sicher zu gehen, dass nur das Gen N9-10 aus der wahrscheinlich auch in Gerste großen WRKY Genfamilie ausgeschaltet wird, wurde die dsRNA an der Sequenz des 3'-Endes des kodierenden und des nicht kodierenden Bereichs synthetisiert. 4 h nach Transformation von Gerstenblattsegmenten der suszeptiblen Linie Pallas mit dem GFP-Reporterplasmid und der dsRNA von N9-10 wurden die Blätter mit *Bgh* inokuliert und nach 40-48 h die Interaktion mikroskopisch ausgewertet. In einem Kontrollansatz wurde mit dsRNA des humanen Thyroidrezeptorgens gearbeitet, die aufgrund der Sequenzspezifität keinen Effekt auf die Interaktion haben sollte, da es keine homologen Gene in Gerste gibt. Es wurden sechs unabhängige Experimente zum transienten *knockout* von N9-10 durchgeführt. Die Penetrationsrate (PR) von *Bgh* in den Kontrollen lag im Mittel bei 57 %. Im Testansatz mit dsRNA von N9-10 lag die PR in allen Versuchen unter der der Kontrolle, der Mittelwert betrug hier 39 %. Die Gerstenblätter wurden signifikant ($p = 0,003$) resistenter gegenüber Penetrationsversuchen von *Bgh*, die relative Penetrationseffizienz reduzierte sich um 32 %. Da die Coexpressionsrate des Reporterplasmids GFP und der dsRNA etwa 75 % beträgt (Schultheiss *et al.* 2002), wird der dargestellte Effekt, die Erhöhung der Resistenz durch *knockout* des putativen WRKY Proteins N9-10, unterschätzt und dürfte eigentlich noch größer veranschlagt werden. Ausgehend von der Hypothese, dass die meisten WRKY Transkriptionsfaktoren die Expression wichtiger PR-Gene positiv regulieren (s.o.), hätte man eine gegenteilige Wirkung erwarten können. Trotz der steigenden Anzahl isolierter WRKYs konnte jedoch eine Funktion als Transkriptionsaktivatoren bislang nur für ZAP1 aus *Arabidopsis* (de Pater *et al.* 1996) und WRKY1 aus Petersilie (Eulgem *et al.* 1999) gezeigt werden und es ist wahrscheinlich, dass einige WRKY Proteine auch als negative Regulatoren funktionieren. So handelt es sich z.B. bei der WRKY-Bindestelle im PR-1 Promotor von *Arabidopsis* um ein negatives regulatorisches Element für die Induktion der chemischen Resistenz durch INA (Lebel *et al.* 1998). Dieses Ergebnis lässt Maleck *et al.* (2000) die Hypothese aufstellen, dass Gene des PR-1 Regulons normalerweise durch WRKY Proteine reprimiert werden und die Aufhebung dieser Repression ein allgemein gültiger Schritt bei der Induktion der pflanzlichen Abwehr ist. Mehrere WRKY Gene enthalten in ihren eigenen Promotorbereichen W Box Elemente (Eulgem *et al.* 1999; Chen und Chen 2002) und Promotorstudien in *Arabidopsis* haben gezeigt, dass zumindest in *AtWRKY18* diese W Box Elemente als negative Regulatoren wirken (Chen und Chen 2002). Durch Bindung von aktiven WRKY Transkriptionsfaktoren an diese Elemente, eventuell durch *AtWRKY18* selbst (Auto-regulation), kann eine zu starke Akkumulierung der Transkriptionsfaktoren mit

möglicherweise negativen Folgen wie bei AtWRKY18 verhindert werden (Chen und Chen 2002). Da ein *knockout* von N9-10 Gerstenblätter resistenter gegenüber Mehltaupilzangriffen machte, ist es gut möglich, dass es sich bei dem entsprechenden Protein um einen WRKY Transkriptionsfaktor handelt, der normalerweise die Transkription Abwehrrelevanter Gene inhibiert. Durch *silencing* von N9-10 könnten diese Gene schneller bzw. stärker abgelesen werden, was in einer verbesserten Abwehrreaktion resultiert.

Im durchgeführten transienten Transformationsassay wurde GFP als Markerplasmid verwendet. Dadurch wurden nur GFP-exprimierende, das heißt lebende Zellen, unter UV-Licht als transformiert kenntlich gemacht. Bei den RNAi Versuchen fiel auf, dass mit dsRNA von N9-10 transformierte Blätter weniger GFP Zellen aufwiesen als Kontrollblätter (Tab. 7.6). Besonders deutlich war dieser Unterschied bei Interaktionen, in denen der Pilz die Epidermiszelle penetriert hatte und bei Zellen ohne pilzlichen Interaktionspartner. Nach dieser Beobachtung könnte spekuliert werden, dass *knockout* von N9-10 Zelltod fördert und deswegen weniger GFP-Zellen sichtbar waren. N9-10 wäre somit unter normalen Bedingungen ein negativer Regulator von Zelltod. Mit MLO ist bereits ein negativer Regulator von Zelltod bekannt, der im funktionslosen mutierten Zustand (*mlo*) oder durch *silencing* Resistenz vermittelt (Büschges *et al.* 1997; Schweizer *et al.* 2000).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit N9-10 ein putatives WRKY Gen identifiziert wurde, dessen Transkripte nach Inokulation mit *Bgh* und dem Nichtwirt-pathogen *Bgt* bereits 3 hpi und nach Verwundung zwischen 30 min und 1 h in Gerste akkumulierten. Eine Induktion durch den chemischen Resistenzinduktor BTH konnte nicht festgestellt werden. Ein *knockout* dieses Gens machte Gerstenblätter im transienten Transformationsassay resistenter gegenüber *Bgh* Attacken. Man könnte N9-10 deswegen als Suszeptibilitätsfaktor bezeichnen, der möglicherweise als Transkriptionsinhibitor Abwehrrelevanter Gene agiert. Darüber hinaus ist man versucht zu spekulieren, dass N9-10 *downstream* von MLO wirken könnte.

4.9 Isolierung und Charakterisierung der MAP Kinase 13a-3

Mit 13a-3 wurde ein 34 bp langes Genfragment aus dem cDNA-AFLP isoliert, für das durch RACE-Experimente und homologe ESTs aus der *GenBank*-Datenbank die vollständige Sequenz (*accession nr.* AJ495776) gewonnen werden konnte. Der ORF kodiert mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine MAP Kinase, die große Ähnlichkeit mit BMWK1 aus Reis und den beiden MAP Kinasen AtMPK8 und AtMPK9 aus *Arabidopsis* hat (*alignment* in Abb. 3.19). Die genannten MAP Kinasen unterscheiden sich von den meisten anderen

pflanzlichen MAP Kinasen, auch PERKs (*plant extracellular signal-regulated protein kinase*) genannt, durch ein TDY-Motiv anstelle des häufigeren TEY-Motivs in der Aktivierungsschleife (Mizoguchi *et al.* 1997; Wrzaczek und Hirt 2001; Ichimura *et al.* 2002) und einer längeren C-terminalen Region. Diese MAP Kinasen werden in die nach Sequenzähnlichkeit definierte Gruppe D eingeordnet (Ichimura *et al.* 2002) und grenzen sich deutlich von den anderen drei Gruppen der pflanzlichen MAP Kinasen ab (Abb. 4.2).

Da die Aminosäuresequenz von 13a-3 am Anfang mehrere Methionin (M) Bausteine aufweist kann nicht genau gesagt werden, ob das Protein mit dem ersten M ähnlich ATMPK8 beginnt und somit ca. 65 kDa (nach dem Programm *Protein Molecular Weight*, <http://bir.biology.washington.edu/SMS/index.html>) groß wäre oder ob es mit dem dritten M startet und so ein mit BMWK1 vergleichbares Molekulargewicht von 58 kDa aufweist.

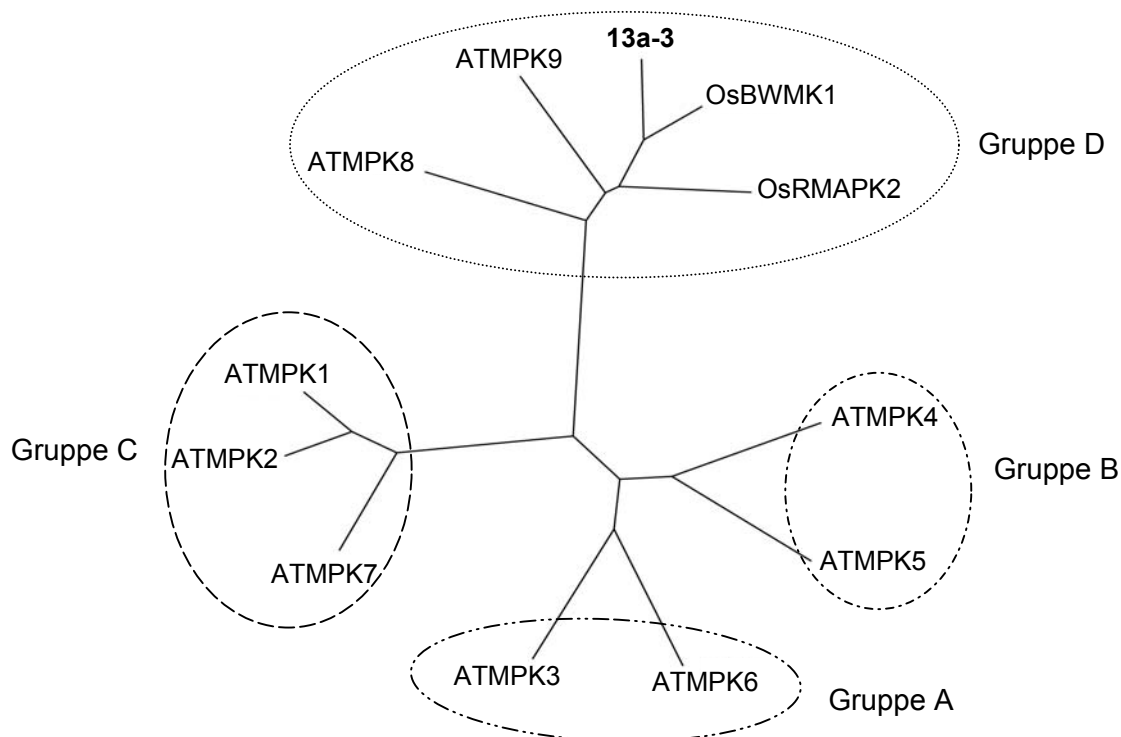


Abb. 4.2 Phylogenetischer Verwandtschaftsbaum verschiedener MAP Kinasen. 13a-3 gehört zur Gruppe D mit TDY-Motiv in der Aktivierungsschleife. Der Verwandtschaftsbaum wurde mit den Programmen *clustalW* und *TreeView 1.6.6* erstellt. Gruppenbezeichnung nach Ichimura *et al.* (2002). ATMPK1-9: MAP Kinasen 1 bis 9 aus *Arabidopsis thaliana*. BMWK1: *blast- and wound-induced MAP kinase 1* aus Reis. OsRMAPK2: MAP Kinase aus Reis.

Die Aktivität pflanzlicher MAP Kinasen kann durch verschiedene Reize induziert werden, dazu gehören Seneszenz (Berberich *et al.* 1999), Kälte (Jonak *et al.* 1996; Ichimura *et al.* 2000; Huang *et al.* 2002), der chemische Resistenzinduktor BTH (Song 2002), Salicylsäure

(Zhang und Klessig 1997), Verwundung (Seo *et al.* 1995, 1999; Song 2002), Calcium-Ionen (Suzuki *et al.* 1999; Takezawa 1999; Link *et al.* 2002), Ozon (Samuel *et al.* 2000; Samuel und Ellis 2002), H₂O₂ (Kovtun *et al.* 2000; Desikan *et al.* 1999b), Trockenheit (Jonak *et al.* 1996), osmotischer und Salz-Stress (Mizoguchi *et al.* 1996; Mikołajczyk *et al.* 2000), Berührung (Mizoguchi *et al.* 1996; Ichimura *et al.* 2000) sowie Pathogene und ihre Elicitoren (Ligterink *et al.* 1997; Lebrun-Garcia *et al.* 1998; Desikan *et al.* 1999a; Asai *et al.* 2002). Zu den am besten untersuchten stressinduzierten MAP Kinasen gehören die SIPK (*salicylic acid-induced protein kinase*; Zhang und Klessig 1997) aus Tabak mit ihren Orthologen AtMPK6 in *Arabidopsis* und SIMK (*salt stress-induced MAP kinase*; Munnik *et al.* 1999) in Luzerne sowie WIPK (*wound-induced protein kinase*; Seo *et al.* 1995) aus Tabak mit den entsprechenden Orthologen AtMPK3 in *Arabidopsis* und SAMK (*stress-activated MAP kinase*; Cardinale *et al.* 2000) in Luzerne. Eine Besonderheit der WIPK-Gruppe ist die Induzierbarkeit ihrer Transkripte, z.B. wurde eine Akkumulation der WIPK mRNA in Tabakblättern bereits 1 min nach Verwundung beobachtet (Seo *et al.* 1995). MAP Kinasen der SIPK-Gruppe werden dagegen nur posttranslational reguliert (Zhang *et al.* 1998; Ichimura *et al.* 2002). Über MAP Kinasen der Gruppe D gibt es nur wenige Veröffentlichungen. Bekannt ist, dass *BWMK1* Transkripte in Reis nach Infektion mit *Magnaporthe grisea* und Verwundung akkumulieren (He *et al.* 1999) und *TDY1* in Luzerne durch Verwundung induziert wird (Schoenbeck *et al.* 1999). Die in dieser Arbeit isolierte MAP Kinase wurde ebenfalls auf Transkriptionsebene reguliert. Ihre mRNA akkumulierte nach Inokulation mit *Bgh* im Vergleich zu mock-inokulierten Blättern bereits ab 1 h, deutlich ab 3 h bis mindestens 48 hpi (Abb. 3.12, 3.13 und 7.4). Die MAP Kinase 13a-3 wurde außerdem nach Inokulation mit dem Nichtwirtpathogen *Bgt* zwischen 4 und 48 hpi (Abb. 3.21) und nach Verwundung mit dem Abrasiv Carborund transient von 30 min bis maximal 4 h (Abb. 3.20) induziert. Die Genexpression dieser MAP Kinase reagierte jedoch nicht auf Zugabe des chemischen Resistenzinduktors BTH (Abb. 7.2) und nicht auf Kälte (1-24 h bei 5° C und 16 h Lichtperiode, ohne Abb.).

Eine erste Antwort auf die Frage, welche Bedeutung die Induktion der MAP Kinase in der Gerste-Mehltaupilz Interaktion haben könnte, sollte ein transienter *knockout* dieses Gens über den sequenzspezifischen RNAi-Mechanismus liefern. In fünf Experimenten stieg jeweils die Penetrationsrate des Pilzes, wenn die Expression der MAP Kinase unterdrückt war. Dieser Unterschied zwischen Testgenansatz und Kontrolle war im t-Test signifikant mit $p = 0,03$. Relativ zur Kontrolle stieg die Penetrationseffizienz von *Bgh* im Mittel ($\pm$ SE) um 19 ± 7 %. Diese Erhöhung der Anfälligkeit von Gerstenblättern gegenüber *Bgh* durch

knockout der MAP Kinase 13a-3 ist einer der ersten experimentellen Beweise dafür, dass MAP Kinasen in der Resistenz gegen Pathogene benötigt werden. Eine mögliche Erklärung für die größere Penetrationseffizienz des Pilzes liegt in der vermutlich normalerweise stattfindenden Aktivierung der MAP Kinase innerhalb einer MAP Kinase Kaskade, die durch Elicitoren angeschaltet wurde. Die aktivierte MAP Kinase könnte Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, welche wiederum die Transkription Abwehr-relevanter Gene induzieren und so Resistenzreaktionen ausprägen. Ist die MAP Kinase durch RNAi ausgeschaltet, werden diese Abwehrgene nicht oder langsamer induziert und die Gerstenblätter werden suszeptibler. Unterstützung findet diese Überlegung durch die Lokalisation von MAP Kinasen. Entweder befinden sie sich ständig im Nukleus, wie Fus3p in Hefe, oder sie werden nach Induktion schnell aus dem Cytoplasma in den Zellkern transportiert, wie es bei Hog1p in Hefe und ERMK in Petersilie der Fall ist (Ligterink *et al.* 1997; van Drogen *et al.* 2001). Die in dieser Arbeit isolierte MAP Kinase ist nach PSORT-Vorhersage (Nakai und Horton 1999) mit 98 %iger Wahrscheinlichkeit im Nukleus lokalisiert. Die Prognose wurde jedoch noch nicht experimentell überprüft. Weitere Hinweise für die Involvierung von MAP Kinase in die Induktion von Abwehrgenen wurden durch konstitutiv aktive MAP Kinasen und MAPK Kinasen, den direkten Aktivatoren von MAP Kinasen, sowie den Einsatz von Inhibitoren dieser Enzyme gewonnen. Die in Tabakblätter transient transformierte SIPK unter der Kontrolle eines steroidinduzierbaren Promotors akkumulierte nach Steroidzugabe, wurde durch MAPK Kinasen aktiviert und induzierte Hypersensitiven Zelltod (Zhang und Liu 2001). Die Expression der konstitutiv aktiven MAPK Kinase NtMEK2^{DD} aktiviert in Tabak die beiden MAP Kinasen SIPK und WIPK und führt zu Hypersensitivem Zelltod und zur Induktion Abwehr-relevanter Gene wie die der PAL (Yang *et al.* 2001; Zhang und Liu 2001). Auch in transgenen *Arabidopsis* Pflanzen induzieren die konstitutiv aktiven MAPK Kinasen AtMEK4^{DD}, AtMEK5^{DD} und NtMEK2^{DD} HR-ähnlichen Zelltod (Ren *et al.* 2002). Ein Inhibitor von MAPK Kinasen dagegen verhinderte in einer *Arabidopsis* Zellkultur den durch den Elicitor Harpin induzierten Zelltod und die Expression von Abwehrgenen (Desikan *et al.* 1999a). Die in den genannten Versuchen gezeigte Rolle der MAP Kinase Aktivität bei der Auslösung von Zelltod könnte vielleicht auch den in den RNAi-Experimenten beobachteten Unterschied an GFP-Zellzahlen zwischen Kontrolle und Testgen erklären. Wenn die MAP Kinase Expression durch dsRNA unterdrückt wurde, konnten in der Gerstenepidermis mehr GFP-Zellen pro Blatt bzw. Schuss gezählt werden als in der Kontrolle (Tab. 7.7). Ausgehend von der Annahme, dass nur lebende Zellen GFP exprimieren, könnte der Schluss gezogen werden, dass bei einem *knockout* der MAP Kinase

mehr Zellen physiologisch aktiv bleiben als in der Kontrolle. Dagegen war die MAP Kinase im Kontrollansatz wahrscheinlich durch die Inokulation mit *Bgh* und die Beschuss-bedingte Verwundung aktiviert worden, was zu einer Induktion von Zelltod geführt haben könnte.

Da sich die Penetrationsrate von *Bgh* im Ansatz der Überexpression der MAP Kinase 13a-3 nicht wesentlich von der Kontrolle unterschied (Abb. 3.22), und sich auch die GFP-Zellzahl nicht veränderte, scheint die MAP Kinase-Überexpression nicht auszureichen, um Resistenz gegenüber *Bgh* oder Zelltod zu induzieren. MAP Kinasen sind nur im phosphorylierten Zustand aktiv. Das bedeutet, dass die Akkumulation dieser Enzyme durch Überexpression nur dann einen Einfluss auf die Vorgänge in der Zelle haben kann, wenn die MAP Kinaseproteine durch entsprechende MAPK Kinasen aktiviert werden. Vermutlich blieb eine Aktivierung der überschüssigen MAP Kinaseproteine in den Epidermiszellen aus und die Akkumulation deshalb ohne Konsequenzen. Zhang und Liu (2001) beobachteten die Akkumulation von WIPK in transient transformierten Tabakblättern, die jedoch ebenfalls nicht in einer Erhöhung der WIPK-Aktivität mündete. Außerdem wurde die Genexpression von 13a-3 durch Verwundung und Inokulation mit *Bgh* wahrscheinlich auch in der Kontrolle induziert, was die Darstellung eines Unterschieds zwischen Überexpression und Kontrolle erschwert. Eine konstitutiv aktive, das heißt mutagenisierte Form der MAP Kinase sollte in Zukunft zu einer Überexpression mit Einfluss auf die Wirt-Pathogen Interaktion führen.

Die ineffektive Überexpression macht deutlich, dass von einer Transkriptakkumulation nicht zwangsläufig auf eine Anreicherung des Proteins oder gar eine Erhöhung der Aktivität geschlossen werden kann (Gygi *et al.* 1999). So konnte für die WIPK in Tabak trotz der Transkriptakkumulation keine Anreicherung des Proteins festgestellt werden (Zhang *et al.* 1998; Romeis *et al.* 1999). Andererseits zeigen viele Arbeiten, dass eine Induktion der Genexpression von MAP Kinasen von einer Aktivierung des entsprechenden Enzyms begleitet wurde (Seo *et al.* 1995; Bögre *et al.* 1997; Berberich *et al.* 1999; Takezawa 1999).

Die Genexpression der MAP Kinase 13a-3 wird durch Kontakt mit Pathogenen, Nichtwirtpathogenen, Verwundung und vermutlich weitere Reize induziert. Die stress-induzierbaren MAP Kinasen der WIPK- und SIPK-Gruppe werden ebenfalls durch viele verschiedene Stimuli aktiviert. Es stellt sich die Frage, wie die Signaltransduktion über MAP Kinasen Spezifität erlangt. Das Vorkommen von 60 putativen MAPKK Kinasen, 10 MAPK Kinasen und 20 MAP Kinasen im *Arabidopsis* Genom (Ichimura *et al.* 2002) lässt den Schluss zu, dass einzelne MAPK Kinasen von vielen MAPKK Kinasen aktiviert werden können und ihrerseits mehrere MAP Kinasen phosphorylieren. Das MAPK Kinasen mehrere MAP Kinasen nach Stimulierung durch einen pilzlichen Elicitor aktivieren, konnte bereits in

Luzerne gezeigt werden (Cardinale *et al.* 2002). Ein wichtiger Aspekt für die Spezifitätsvermittlung ist deshalb die Bildung von Multiproteinkomplexen. Gerüstproteine (*scaffold proteins*) bringen verschiedene Kinase-Module für eine selektive Aktivierung und subzelluläre Lokalisierung der Signaltransduktionskomplexe zusammen (Garrington und Johnson 1999). Außerdem können in unterschiedlichen Geweben verschiedene Transkriptionsfaktoren exprimiert sein, so dass eine MAP Kinase Kaskade gewebespezifische Substrate vorfindet (Madhani und Fink 1998). Die MAP Kinase 13a-3 besitzt in ihrer C-terminalen Region nach PROSITE, einem Programm zur Vorhersage von Proteindomänen (Falquet *et al.* 2002), eine EF-Hand Calcium-Bindedomäne. Die meisten Ca^{2+} -bindenden Proteine besitzen ein Paar dieser Domäne (Ikura 1996), doch konnte auch schon für einzelne EF-Hand Domänen eine Ca^{2+} -Bindung gezeigt werden (Lu *et al.* 1994; Frandsen *et al.* 1996). Möglicherweise wird die MAP Kinase 13a-3 zusätzlich über die Bindung des *second messengers* Ca^{2+} reguliert. Ca^{2+} -Einstrom in das Cytoplasma von Pflanzenzellen nach Kontakt mit einem Pathogen konnte häufig beobachtet werden (Jabs *et al.* 1997; Xu und Heath 1998; Blume *et al.* 2000; Grant *et al.* 2000). Bislang galt dieser Einstrom eher als Auslöser von Abwehrreaktionen. So verhindert die Zugabe von Calciumchelatoren und Inhibitoren von Calciumkanälen die Ausbildung des *oxidative burst*, von dem man annimmt, dass er Abwehrreaktionen anschaltet (Blume *et al.* 2000; Grant *et al.* 2000). Im Fall von MLO sieht es jedoch so aus, als ob Ca^{2+} die Suppression von Abwehrreaktionen verstärkt (Kim *et al.* 2002a,b). Die Autoren konnten zeigen, dass MLO *in vitro* Ca^{2+} -abhängig Calmodulin bindet. Verlust dieser Calmodulin-Bindung halbierte die Fähigkeit von MLO, Abwehrreaktionen gegenüber *Bgh* in Gerstenblättern negativ zu regulieren. Welche Konsequenz die mögliche Bindung von Ca^{2+} für die Funktion der MAP Kinase 13a-3 hat bleibt fraglich.

Ein sehr wichtiger Punkt für eine distinkte Signalweiterleitung scheint die Stärke und vor allem Dauer der Aktivierung zu sein. Verwundung und abiotischer Stress führten zu einer transienten Aktivierung von MAP Kinasen in Tabak (Seo *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1998; Romeis *et al.* 1999), Tomate (Stratman und Ryan 1997) und Luzerne (Jonak *et al.* 1996; Bögre *et al.* 1997). Pathogene und ihre Elicitoren aktivieren die MAP Kinasen dagegen lang anhaltend (Zhang *et al.* 1998; Romeis *et al.* 1999; Ren *et al.* 2002). Mehrere Arbeiten lassen vermuten, dass eine andauernde MAP Kinase Aktivierung mitverantwortlich für die Auslösung des Hypersensitiven Zelltods ist (Zhang *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 1999; Ren *et al.* 2002). Die genannten Aktivierungskinetiken spiegeln sich in der Expression der MAP Kinase 13a-3 wieder. Wie auch die BWMK1 aus Reis wird sie nach Verwundung nur

transient induziert (He *et al.* 1999). Nach Inokulation mit *Bgh* oder *Bgt* ist die Transkriptakkumulation jedoch lang anhaltend.

Festzuhalten bleibt, dass mit 13a-3 die vollständige Sequenz einer MAP Kinase der Gruppe D (Ichimura *et al.* 2002) isoliert wurde, deren Transkripte nach Pathogenangriff und Verwundung lang anhaltend bzw. transient akkumulierten. Eine Überexpression dieser MAP Kinase im transienten Transformationsassay blieb ohne Effekt. Dagegen führte ein *knockout* des Gens in Gerste zu einer Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber *Bgh*. Möglicherweise induziert die MAP Kinase Abwehrreaktionen über die Aktivierung entsprechender Transkriptionsfaktoren.

4.10 Abschließende Betrachtung

In dieser Arbeit wurde mittels cDNA-AFLP ein für die *Mlg*-tragenden Gerstenlinien IWe und MiGf spezifisches cDNA-Fragment isoliert. Über dieses Fragment konnte zwar nicht das R-Gen *Mlg* identifiziert, aber ein mit *Mlg* kosegregrierender (T. Eschholz, pers. Mitteilung) CAPS-Marker (CAPS9-1) generiert werden. CAPS9-1 ist zur Zeit der vermutlich beste Marker für den *Mlg* Locus, da es sich bei dem zweiten bekannten kosegregrierenden Marker MWG032 (Kurth *et al.* 2001) um einen RFLP-Marker handelt. RFLP-Marker sind im Labor arbeitsintensiver und teurer als CAPS-Marker.

Das cDNA-AFLP stellte sich auch bei der Isolierung *Bgh*-induzierter Genfragmente als aufwendige aber zuverlässige Methode heraus. Lediglich bei zwei von 30 unabhängig überprüften Genen ließ sich die Induktion durch *Bgh* nicht bestätigen. Für rund ein Viertel der 120 sequenzierten Fragmente konnte keine homologe Sequenz bzw. lediglich Proteine mit unbekannter Funktion in den Datenbanken ermittelt werden. Auch wenn es sich dabei zum Teil um kurze Sequenzen aus 3' nicht-translatierten Bereichen handelte, zeigt dieser hohe Prozentsatz, dass noch viele Pathogen-induzierte Gene in Pflanzen nicht beschrieben sind. Selbst für die seit langem als stress-induziert bekannten Gene wie die des Phenylpropanoidstoffwechsels ist oftmals keine genaue Funktion bei der Abwehr phytopathogener Pilze bekannt (Collinge *et al.* 2002).

Die in dieser Arbeit beobachtete sehr ähnliche Induktion Abwehr-relevanter Gene in kompatibler und inkompatibler Interaktion sowie in der Nichtwirtresistenz führt zu der Annahme, dass der Unterschied im Ausgang der Gerste-Mehltaupilz Interaktion von wenigen wichtigen Genen gesteuert wird. Eine andere Interpretation könnte beinhalten, dass zwar die gleichen Gene angeschaltet werden, die Dauer und Intensivität der Induktion jedoch variieren, so wie beispielsweise einige Gene in der Nichtwirtresistenz stärker

induziert waren. In Tabak wurden von 18 untersuchten Genen, deren Transkripte in der R-Gen vermittelten Resistenz akkumulierten, alle ebenfalls durch mechanischen Stress induziert. Durrant und Mitarbeiter (2000) gehen davon aus, dass der finale Effekt durch Unterschiede in Dauer und Stärke der Aktivierung der gleichen Signalkomponenten und Geninduktion resultiert.

Nach den vorliegenden Ergebnissen und unter Einbeziehung der Literatur wurde ein einfaches hypothetisches Modell für die möglichen Funktionsweisen der MAP Kinase 13a-3 und des WRKY Proteins N9-10 aufgestellt (Abb. 4.3). Da der *knockout* von N9-10 zu erhöhter Resistenz in den Gerstenblättern gegenüber *Bgh* führte, könnte es sich bei dem Protein um einen negativen Regulator der Transkription handeln, der an W Box Elemente in den Promotorbereichen verschiedener Abwehr-relevanter Gene bindet wie z.B. der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) oder Zelltod-auslösender Gene. Das gehäufte Auftreten von W Box Elementen in Promotoren von PR-Genen ist bekannt (Maleck *et al.* 2000) und eine negative cis-regulatorische Aktivität von WRKY Proteinen konnte ebenfalls bereits gezeigt werden (Lebel *et al.* 1998; Chen und Chen 2002). Neben den W Boxen befinden sich noch weitere regulatorische Elemente (schraffierte Flächen) in den Promotorbereichen, an die z.B. Transkriptionsaktivatoren (TF1 und TF2) binden könnten. Ohne entsprechende Reize (Abb. 4.3a), die die MAP Kinase 13a-3 aktivieren, befindet sich diese entweder im Zellkern oder im Cytoplasma, von wo sie nach Aktivierung in den Zellkern transportiert wird. Das WRKY Protein N9-10 ist an die W Boxen gebunden und inhibiert die Transkription von Abwehrgenen. Die Transkriptionsaktivatoren liegen frei im Zellkern vor, eventuell wie TF1 von Inhibitor-Proteinen im inaktiven Zustand festgehalten.

Wird die MAP Kinase durch Verwundung transient aktiviert (Abb. 4.3b), kann sie nicht alle Substrate phosphorylieren bzw. werden sowohl die MAP Kinase als auch ihre Substrate durch Phosphatasen schnell wieder dephosphoryliert. Nur die phosphorylierten WRKY-Proteine verlassen ihre Position und heben so die Transkriptionsinhibierung auf. Die anderen Transkriptionsfaktoren werden entweder selbst durch Anhängung der Phosphatgruppe aktiviert (TF2) oder durch Phosphorylierung des Inhibitor-Proteins (I) frei gesetzt (TF1) und binden an die entsprechenden Promotorelemente. So kann TF1 die Transkription des PAL-Gens aktivieren, wohingegen die Bindung von TF2 ohne Konsequenzen für die Induktion der Zelltod-auslösenden Gene bleibt, da ein WRKY-Protein noch immer an den Promotor gebunden ist. Das Modell postuliert damit eine geringere Schwelle für die Induzierbarkeit stress-responsiver Gene verglichen mit der Zelltod-auslösender Gene.

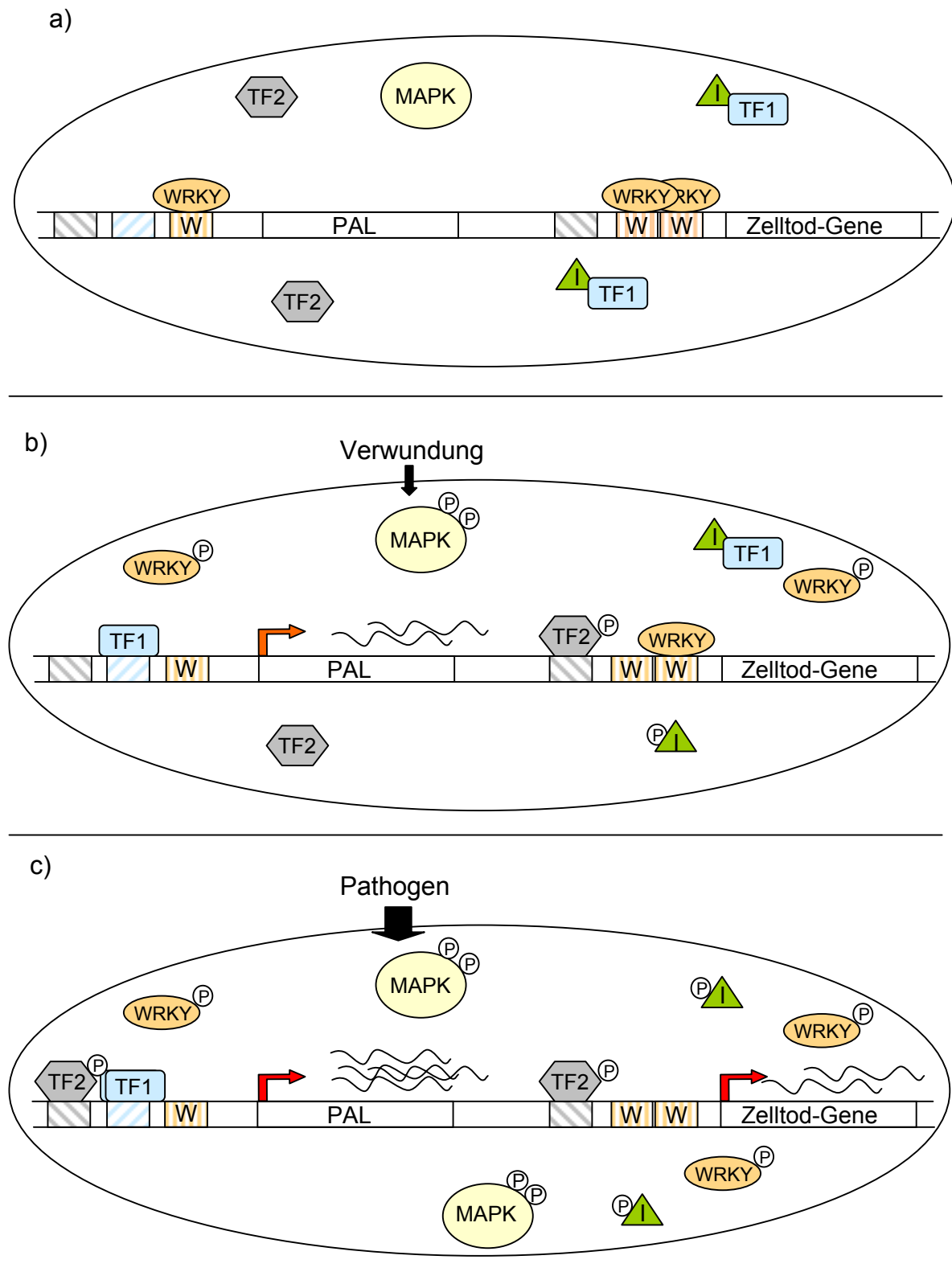


Abb.3.4 Modell zur möglichen Funktion der MAP Kinase 13a-3 und des WRKY-Proteins N9-10.

a) Grundzustand. WRKY-Protein bindet an W Boxen und inhibiert die Transkription Abwehr-relevanter Gene. Transkriptionsaktivatoren inaktiv.

b) Transiente Aktivierung der MAP Kinase nach Verwundung.

c) Andauernde Aktivierung der MAP Kinase bei Pathogenbefall.

Nähere Erläuterungen im Text. I: Inhibitorprotein, P: phosphorylierter Zustand, PAL: Phenylalanin-ammoniumlyase TF: Transkriptionsfaktor, W: W Box. Erläuterungen siehe Text.

Bei einer lang andauernden Akkumulation und Aktivierung der MAP Kinase (Abb. 4.3c), wie sie nach Kontakt mit *Bgh* beobachtet wurde, werden alle Transkriptionsfaktoren dauerhaft aktiviert. Die Inhibition durch die WRKY-Proteine wird aufgehoben und die Transkriptionsaktivatoren binden an die Promotoren der Abwehr-relevanten und Zelltod-auslösenden Gene. Die Schwelle zur Auslösung des programmierten Zelltods wurde in diesem Fall überschritten.

Die erhöhte Suszeptibilität beim *knockout* der MAP Kinase 13a-3 ließe sich nach diesem Modell durch die fehlende Aktivierung der Transkriptionsfaktoren erklären, wodurch bestimmte Abwehrgene nicht induziert werden und negative Regulatoren wie WRKY N9-10 an die Promotoren gebunden bleiben. Die durch den MAP Kinase-Wegfall fehlende bzw. schwächere Transkription einiger Zelltod-induzierender Gene könnte die gesteigerte GFP-Zellzahl im RNAi Ansatz erklären. Ein *knockout* des WRKY Proteins N9-10 erleichtert möglicherweise die Transkription Abwehr-relevanter Gene und macht so die Gerstenblätter resistenter gegenüber Mehltaupilz. Auch Zelltod-induzierende Gene könnten schneller oder stärker aktiviert werden, was eventuell die geringere Anzahl an GFP-Zellen im RNAi Ansatz verständlich macht.

Die im Modell enthaltende Schwellenwertidee bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen, insbesondere bei der Auslösung des programmierten Zelltods, könnte auch den beobachteten Gen-Dosis-Effekt des R-Gens *Mlg* erklären. Homozygote *Mlg/Mlg* Gerstenlinien sind nahezu vollständig resistent gegenüber *Bgh*-Rassen, die das *AvrMlg*-Gen tragen. Der Ausbildung effektiver Papillen in diesen Pflanzen folgt in ca. 80 % der Fälle ein Hypersensitiver Zelltod (Hückelhoven *et al.* 1999). Auf heterozygoten *Mlg/mlg* Gerstenlinien wird der Pilz immer noch in rund 80 % der Fälle durch effektive Papillen gestoppt, ein proportionaler Anstieg der HR wurde jedoch nicht beobachtet (18 % HR; Görg *et al.* 1993). Möglicherweise wird die Schwelle für eine Induktion des Hypersensitiven Zelltod erst durch die von zwei *Mlg*-Allelen vermittelte Aktivierung überschritten. Görg und Mitarbeiter (1993) sprechen von einem "overshoot" in *Mlg/Mlg* Gerstenlinien.

Ein zukünftiges Ziel im Pflanzenschutz ist die Erstellung stabil transgener Getreidepflanzen, die durch Überexpression oder Repression bestimmter Gene resistenter gegenüber Krankheitserregern sind. In einem ersten Schritt können solche Abwehr-relevanten Gene im transienten Transformationsassay getestet werden und sollten dabei einen deutlichen Effekt auf die Resistenz haben. Mit N9-10, einem putativen WRKY Gen, ist ein möglicher Kandidat für die stabile Transformation identifiziert worden, da Repression von N9-10 Gerstenblätter um ca. 32 % resistenter gegenüber Mehltaupilz machte. Weitere im cDNA-

AFLP identifizierte Gene sollen im transienten Transformationsassay geprüft werden, um eine Einschätzung ihres möglichen Beitrags zur Mehlttauresistenz zu gewinnen.

5 Zusammenfassung

In Gerste vermittelt das Resistenzgen *Mlg* Resistenz gegenüber bestimmten Rassen des Echten Gerstenmehltaupilzes (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*). In dieser Arbeit konnte über die Darstellung differentieller Genexpression in *Mlg*- und *mlg*-Gerstenlinien mittels cDNA-AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) ein neuer Marker für den *Mlg* Resistenzgenlocus generiert werden. Der Marker CAPS9-1 (*cleaved amplified polymorphic sequence*) zeigte in allen getesteten Gerstenlinien außer Palmella Blue zuverlässig den *Mlg*-Locus an. Das Resistenzgen konnte jedoch nicht isoliert werden. Eine *Mlg*-spezifische Transkriptakkumulation Abwehr-relevanter Gene nach Inokulation mit *Bgh* wurde im cDNA-AFLP und in anschließenden Genexpressionsanalysen nicht festgestellt.

Ungefähr 3,5 % der 16500 im cDNA-AFLP dargestellten Genfragmente waren vier und zwölf Stunden nach Inokulation mit *Bgh* in Gerstenblättern differentiell reguliert. 120 dieser früh induzierten cDNA-Fragmente wurden isoliert und sequenziert. Neben einem pilzlichen Gen konnten Gerstengene identifiziert werden, die zu einem großen Teil für Proteine aus den Bereichen Phenylpropanoidstoffwechsel, Redox-Regulation und Signaltransduktion kodieren. Für rund ein Viertel der cDNA-Fragmente fanden sich entweder keine homologen Sequenzen in den Datenbanken oder sie kodieren für Proteine mit unbekannter Funktion. Von 28 überprüften *Bgh*-induzierten Genen akkumulierten fünf auch nach Behandlung mit dem chemischen Resistenzinduktor BTH (Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-*S*-methylester). Drei dieser chemisch induzierten Gene lassen sich dem Phenylpropanoid-metabolismus zuordnen. Bei einem Vergleich der Genexpression nach Inokulation mit *Bgh* und dem Nichtwirt-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* zeigte sich, dass einige Gene durch das Nichtwirt-Pathogen sogar stärker induziert waren.

Einer MAP Kinase und einem WRKY Transkriptionsfaktor konnten durch Funktionsanalysen im transienten Transformationsassay eine Bedeutung in der Gerste-*Bgh* Interaktion zugeordnet werden. *Silencing* der MAP Kinase mittels RNA Interferenz führte zu einer erhöhten Suszeptibilität von Gerstenblättern gegenüber *Bgh*. Die funktionale MAP Kinase scheint in Gerste damit eine Bedeutung für die Ausbildung von Resistenzreaktionen zu haben. Ein *knockout* des WRKY Transkriptionsfaktors resultierte dagegen in einer um ca. 30 % erhöhten Resistenz von Gerstenblättern gegenüber *Bgh*. Somit könnte es sich bei diesem Protein um einen Suszeptibilitätsfaktor handeln, der Abwehrreaktionen negativ reguliert.

Summary

The resistance gene *Mlg* mediates race-specific resistance in barley to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*). In this study a new marker for the *Mlg* locus was generated via analysis of differential gene expression in *Mlg*- and *mlg*-carrying barley lines by cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism). The marker CAPS9-1 (cleaved amplified polymorphic sequence) tags the *Mlg* locus in all tested barley lines, except Palmella Blue. A *Mlg*-specific transcript accumulation of defence-related genes after inoculation was not detected, neither in the cDNA-AFLP nor in following gene expression studies.

About 3.5 % of the 16500 screened cDNA fragments were differentially regulated four and twelve hours after inoculation with *Bgh*. 120 of the early induced fragments were isolated and sequenced. Besides one fungal gene many barley genes were identified that code for proteins from the phenylpropanoid pathway, redox regulation and signal transduction. For approximately one quarter of the cDNA fragments no homologous sequences with known function could be found in the databases. The expression of 28 *Bgh*-induced genes was analysed after treatment with the chemical resistance inducer BTH (Benzo(1,2,3)-thiadiazol-carbothionsäure-*S*-methylester). Five of the corresponding transcripts accumulated after BTH treatment. Three out of them belong to the phenylpropanoid metabolism. A comparison of gene expression after inoculation with *Bgh* and the non-host pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* revealed that some of the investigated genes were even stronger activated upon inoculation with the non-host pathogen.

A MAP kinase and a WRKY transcription factor were shown to play a role in the barley-powdery mildew interaction by means of functional analysis in a transient transformation assay. Silencing of the MAP kinase by RNA interference led to enhanced accessibility of barley epidermal cells towards *Bgh*. The functional MAP kinase seems to have significance for the activation of defence reactions. The knockout of the WRKY transcription factor on the contrary resulted in a 30 % increase of penetration resistance to *Bgh*. Thus the protein may be a susceptibility factor that negatively regulates defence reactions.

6 Literaturverzeichnis

- Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. San Diego, USA, Academic Press.
- Aharon, G.S., Gelli, A., Snedden, W.A., Blumwald, E. (1998). Activation of a plant plasma membrane Ca^{2+} channel by TGalpha1, a heterotrimeric G protein alpha-subunit homologue. FEBS Lett 424: 17-21.
- Ahman, J., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P.J., van den Hondel, C.A., Tunlid, A. (2002). Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. Appl Environ Microbiol 68: 3408-15.
- Allan, A.C., Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. Plant Cell 9: 1559-1572.
- Allen, L.J., MacGregor, K.B., Koop, R.S., Bruce, D.H., Karner, J., Bown, A.W. (1999). The relationship between photosynthesis and a mastoparan-induced hypersensitive response in isolated mesophyll cells. Plant Physiol 119: 1233-42.
- Allina, S.M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D.A., Ellis, B.E., Douglas, C.J. (1998). 4-Coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. Plant Physiol 116: 743-54.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-402.
- Angelini, R., Manes, F., Federico, R. (1990). Spatial and functional correlation between diamine oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. Planta 182: 89-96.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 796-815.
- Arner, E.S., Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem 267: 6102-9.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. Nature 415: 977-983.
- Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D., Parker, J.E. (2002). Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. Science 295: 2077-80.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. Science 295: 2073-6.
- Bachem, C.W., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant J 9: 745-53.
- Bachem, C.W.B., Oomen, R.J.F.J., Visser, R.G.F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. Plant Mol Biol Rep 16: 157-173.
- Bame, K.J. (2001). Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. Glycobiology 11: 91R-98R.
- Bate, N.J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P.W., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Elkind, Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 7608-12.

- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M., Sonnhammer, E.L. (2002). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 30: 276-80.
- Beckhove, U., Kogel, K.-H., Schmelzer, E. (1996). Acquired resistance in barley: early accumulation of the potentiometric dye DIOC6 in cytoplasmic aggregations beneath the primary germ tube of *Erysiphe graminis* fsp. *hordei* of cells of barley coleoptiles induced by 2,6-dichlorisonicotinic acid. Intercept of the 11th International Symposium of Modern Fungicides and Antifungal Compounds 1995. H. Lyr, Russell, P.E., Sisler, H.D.: 475-481.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., Aeschbacher, R.A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119: 57-70.
- Bent, A.F. (1996). Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* 8: 1757-1771.
- Berberich, T., Sano, H., Kusano, T. (1999). Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. *Mol Gen Genet* 262: 534-42.
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G., Kogel, K.-H. (2000). Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol Plant Pathol* 1: 277-286.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12: 1425-40.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Lam, B.C.-H. (1998). Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 3: 342-346.
- Bögre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N.S., Hirt, H. (1997). Wounding Induces the Rapid and Transient Activation of a Specific MAP Kinase Pathway. *Plant Cell* 9: 75-83.
- Bolwell, G.P., Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 347-366.
- Bonas, U., Lahaye, T. (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol* 5: 44-50.
- Booker, F.L., Miller, J.E. (1998). Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone. *J Exp Bot* 49: 1191-1202.
- Boyd, L.A., Smith, P.H., Green, R.M., Brown, J.K. (1994a). The relationship between the expression of defense-related genes and mildew development in barley. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 401-410.
- Boyd, L.A., Smith, P.H., Brown, J.K.M. (1994b). Molecular and cellular expression of quantitative resistance in barley to powdery mildew. *Physiol Mol Plant Pathol* 45: 47-58.
- Brueggeman, R., Rostoks, N., Kudrna, D., Kilian, A., Han, F., Chen, J., Druka, A., Steffenson, B., Kleinohs, A. (2002). The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9328-33.
- Busam, G., Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Kassemeyer, H.H., Matern, U. (1997a). Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O- methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol* 115: 1039-48.
- Busam, G., Kassemeyer, H.H., Matern, U. (1997b). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol* 115: 1029-38.
- Büsches, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705.

- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, S., Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6: 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57-63.
- Cao, H., Li, X., Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6531-6.
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* 275: 36734-40.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F., Hirt, H. (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 14: 703-711.
- Carver, T.L.W., Robbins, M.P., Zeyen, R.J. (1991). Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host cell responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. *Physiol Mol Plant Pathol* 39: 269-287.
- Carver, T.L.W., Ingerson-Morris, S.M., Thomas, B.J., Zeyen, R.J. (1995). Early interactions during powdery mildew infection. *Can J Bot* 73: 632-639.
- Century, K.S., Holub, E.B., Staskawicz, B.J. (1995). NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6597-601.
- Chen, C., Chen, Z. (2000). Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol Biol* 42: 387-96.
- Chen, C., Chen, Z. (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol* 129: 706-716.
- Chen, C., Meyermans, H., Burggraefe, B., De Rycke, R.M., Inoue, K., De Vleeschauwer, V., Steenackers, M., Van Montagu, M.C., Engler, G.J., Boerjan, W.A. (2000). Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-coenzyme A-3-O- methyltransferase in poplar. *Plant Physiol* 123: 853-67.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., Zhu, T. (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-74.
- Cheong, Y.H., Chang, H.-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S. (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 661-677.
- Christensen, A.B., Gregersen, P.L., Olsen, C.E., Collinge, D.B. (1998a). A flavonoid 7-O-methyltransferase is expressed in barley leaves in response to pathogen attack. *Plant Mol Biol* 36: 219-27.
- Christensen, A.B., Gregersen, P.L., Schroder, J., Collinge, D.B. (1998b). A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol Biol* 37: 849-57.
- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathol* 3: 135-144.

- Clark, T.A., Zeyen, R.J., Smith, A.G., Bushnell, W.R., Szabo, L.J., Vance, C.P. (1993). Host response gene transcript accumulation in relation to visible cytological events during *Erysiphe graminis* attack in isogenic barley lines differing at the *Ml-a* locus. *Physiol Mol Plant Pathol* 43: 283-298.
- Clark, T.A., Zeyen, R.J., Smith, A.G., Carver, T.L.W., Vance, C.P. (1994). Phenylalanine ammonia lyase mRNA accumulation, enzyme activity and cytoplasmic responses in barley isolines, differing at *Ml-a* and *Ml-o* loci, attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol Mol Plant Pathol* 44: 171-185.
- Clark, T.A., Zeyen, R.J., Carver, T.L.W., Smith, A.G., Bushnell, W.R. (1995). Epidermal cell cytoplasmic events and response gene transcript accumulation during *Erysiphe graminis* attack in isogenic barley lines differing at the *Ml-o* locus. *Physiol Mol Plant Pathol* 46: 1-16.
- Clark, K.L., Larsen, P.B., Wang, X., Chang, C. (1998). Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5401-6.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 24: 667-77.
- Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* 3: 211-216.
- Collinge, D.B., Gregersen, P.L., Thordal-Christensen, H. (2002). The nature and role of defence response genes in cereals. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. R. R. Belanger, W. R. Bushnell. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. Chapter 10: 146-160.
- Conrath, U., Pieterse, C.M., Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7: 210-6.
- Cormack, R.S., Eulgem, T., Rushton, P.J., Kochner, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (2002). Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim Biophys Acta* 1576: 92-100.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.
- Dangl, J.L., Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33.
- Davidson, A.D., Manners, J.M., Simpson, R.S., Scott, K.J. (1988). Altered host gene expression in near-isogenic barley conditioned by different genes for resistance during infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol Mol Plant Pathol* 32: 127-139.
- de Jong, J., Yakimova, E.T., Kapchina, V.M., Woltering, E.J. (2002). A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214: 537-45.
- de Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J., Kijne, J. (1996). Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 24: 4624-31.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., Ryals, J.A. (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6602-6.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-8.
- Desikan, R., Clarke, A., Atherfold, P., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1999a). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta* 210: 97-103.
- Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1999b). H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* 50: 1863-1866.

- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K., Neill, S.J. (2001a). Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol* 126: 1579-87.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2001b). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127: 159-72.
- Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., Fobert, P.R. (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12: 279-90.
- Devos, K.M., Gale, M.D. (1997). Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol Biol* 35: 3-15.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G., Schulze-Lefert, P. (1999). Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J Biol Chem* 274: 34993-5004.
- Di Fiore, S., Li, Q., Leech, M.J., Schuster, F., Emans, N., Fischer, R., Schillberg, S. (2002). Targeting tryptophan decarboxylase to selected subcellular compartments of tobacco plants affects enzyme stability and in vivo function and leads to a lesion-mimic phenotype. *Plant Physiol* 129: 1160-1169.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., Benfey, P.N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-33.
- Ditt, R.F., Nester, E.W., Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10954-9.
- Dixon, M.S., Hatzixanthis, K., Jones, D.A., Harrison, K., Jones, J.D. (1998). The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10: 1915-25.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B., Kauffmann, S. (1999). Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol* 121: 163-72.
- Dudler, R. (1997). Krankheitsresistenz bei Pflanzen. *Botanica Helvetica* 107: 151-170.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10328-33.
- Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D. (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-77.
- Eberhard, J., Ehrler, T.T., Eppele, P., Felix, G., Raesecke, H.R., Amrhein, N., Schmid, J. (1996). Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. *Plant J* 10: 815-21.
- Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 3: 278-84.
- El-Zahaby, H.M., Gullner, G., Kiraly, Z. (1995). Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Biochem Cell Biol* 85: 1225-1230.
- Endege, W.O., Steinmann, K.E., Boardman, L.A., Thibodeau, S.N., Schlegel, R. (1999). Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 26: 542-8.

- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5: 199-206.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo J* 18: 4689-99.
- Facchini, P.J., Huber-Allanach, K.L., Tari, L.W. (2000). Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry* 54: 121-38.
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K., Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* 30: 235-8.
- Fan, L., Zheng, S., Wang, X. (1997). Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 9: 2183-96.
- Fan, W., Dong, X. (2002). In Vivo Interaction between NPR1 and Transcription Factor TGA2 Leads to Salicylic Acid-Mediated Gene Activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1377-1389.
- FAO (2001). Progress made towards reducing risks of pesticides and chemicals in developing countries. Press release 01/67.
- Felix, G., Regenass, M., Spanu, P., Boller, T. (1994). The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with [32 P]phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 952-6.
- Finnie, C., Borch, J., Collinge, D.B. (1999). 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol Biol* 40: 545-54.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene for gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9: 275-296.
- Fluhr, R. (1998). Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci* 3: 141-146.
- Frandsen, G., Müller-Uri, F., Nielsen, M., Mundy, J., Skriver, K. (1996). Novel plant Ca^{2+} -binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J Biol Chem* 271: 343-8.
- Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H., Schulze-Lefert, P. (1994). *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 6: 983-994.
- Freialdenhoven, A., Peterhänsel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., Schulze-Lefert, P. (1996). Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 8: 5-14.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S., Winklmeier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., Gierl, A. (1997). Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696-9.
- Frye, C.A., Innes, R.W. (1998). An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* 10: 947-56.
- Frye, C.A., Tang, D., Innes, R.W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 373-8.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Galan, J.E., Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-8.
- Garrington, T.P., Johnson, G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 211-8.

- Görg, R., Hollricher, K., Schulze-Lefert, P. (1993). Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant J* 3: 857-866.
- Görlach, J., Raesecke, H.R., Rentsch, D., Regenass, M., Roy, P., Zala, M., Keel, C., Boller, T., Amrhein, N., Schmid, J. (1995). Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3166-70.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-43.
- Grace, S.C., Logan, B.A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1499-510.
- Graner, A., Altschmied, L. (2001). Gerste-ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. *GenomXPress* 01: 5-12.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., Dangl, J.L. (1995). Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269: 843-6.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., Mansfield, J. (2000). The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* 23: 441-50.
- Gregersen, P.L., Thordal-Christensen, H., Förster, H., Collinge, D.B. (1997). Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 85-97.
- Gu, Y.Q., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y.T., Yang, C., He, X., Han, Y., Martin, G.B. (2002). Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 817-31.
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K., Schmelzer, E. (1998). Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8398-8403.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-30.
- Hagemeier, J., Schneider, B., Oldham, N.J., Hahlbrock, K. (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 753-8.
- Halterman, D., Zhou, F., Wei, F., Wise, R.P., Schulze-Lefert, P. (2001). The MLA6 coiled-coil, NBS-LRR protein confers AvrMla6-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in barley and wheat. *Plant J* 25: 335-48.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-91.
- Hara, K., Yagi, M., Kusano, T., Sano, H. (2000). Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol Gen Genet* 263: 30-7.
- Hardie, D.G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: Classification and functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 97-131.
- Harper, J.F., Sussman, M.R., Schaller, G.E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H., Harmon, A.C. (1991). A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* 252: 951-4.
- Harrar, Y., Bellini, C., Faure, J.D. (2001). FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends Plant Sci* 6: 426-31.

- He, C., Fong, S.H., Yang, D., Wang, G.L. (1999). BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 1064-73.
- He, S.Y., Bauer, D.W., Collmer, A., Beer, S.V. (1994). Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 289-292.
- He, Z., Wang, Z.Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J. (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* 288: 2360-3.
- Heath, M.C. (1981). A generalized concept of host-parasite specificity. *Am Phytopathol Soc* 71: 1121-1123.
- Heath, M.C. (1998). Involvement of reactive oxygen species in the response of resistant (hypersensitive) or susceptible cowpeas to the cowpea rust fungus. *New Phytol* 138: 251-263.
- Heath, M.C. (2000a). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44: 321-34.
- Heath, M.C. (2000b). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3: 315-9.
- Heitefuss, R. (2001). Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften* 88: 273-283.
- Herve, C., Dabos, P., Galaud, J.P., Rouge, P., Lescure, B. (1996). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. *J Mol Biol* 258: 778-88.
- Herve, C., Serres, J., Dabos, P., Canut, H., Barre, A., Rouge, P., Lescure, B. (1999). Characterization of the *Arabidopsis* lecRK-a genes: members of a superfamily encoding putative receptors with an extracellular domain homologous to legume lectins. *Plant Mol Biol* 39: 671-82.
- Hu, W.J., Kawaoka, A., Tsai, C.J., Lung, J., Osakabe, K., Ebinuma, H., Chiang, V.L. (1998). Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5407-12.
- Huang, H.-J., Fu, S.-F., Tai, Y.-H., Chou, W.-C., Huang, D.-D. (2002). Expression of *Oryza sativa* MAP kinase gene is developmentally regulated and stress-responsive. *Physiol Plant* 114: 572-580.
- Hückelhoven, R., Kogel, K.-H. (1998). Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 292-300.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K.H. (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol* 119: 1251-60.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Trujillo, M., Kogel, K.H. (2000). Barley *Mla* and *Rar* mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. *Planta* 212: 16-24.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Trujillo, M., Kogel, K.H. (2001a). Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol* 47: 739-48.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Kogel, K.-H. (2001b). Non-host resistance of barley is associated with a hydrogen peroxide burst at sites of attempted penetration by wheat powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol* 2: 199-205.
- Hutcheson, S.W. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annu Rev Phytopathol* 36: 59-87.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J* 24: 655-665.

- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohasi, Y., Walker, J.C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301-308.
- Ikura, M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 21: 14-7.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4800-5.
- Jansen, C. (in Vorbereitung). Untersuchung der *Mlg*-vermittelten Resistenz durch Darstellung differentieller Genaktivität im Pathosystem Gerste (*Hordeum vulgare* L.)/Melhtaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*). Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Jarosch, B., Kogel, K.-H., Schaffrath, U. (1999). The ambivalence of the barley *Mlo* locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) enhances susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 508-513.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J* 19: 4004-14.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Hirt, H. (1996). Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11274-11279.
- Jones, A.M. (2001a). Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 125: 94-7.
- Jones, J.D. (2001b). Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr Opin Plant Biol* 4: 281-7.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., Jones, J.D. (1994). Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266: 789-93.
- Jørgensen, J.H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63: 141-152.
- Jørgensen, J.H. (1994). Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Crit Rev Plant Sci* 13: 97-119.
- Jouannic, S., Hamal, A., Leprince, A.S., Tregear, J.W., Kreis, M., Henry, Y. (1999). Plant MAP kinase kinase kinases structure, classification and evolution. *Gene* 233: 1-11.
- Jüttner, J., Olde, D., Langridge, P., Baumann, U. (2000). Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. *Eur J Biochem* 267: 7109-17.
- Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V.G., de Groot, K.E., Govers, F. (1998). Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* 10: 1413-26.
- Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr Opin Plant Biol* 4: 295-300.
- Katagiri, T., Takahashi, S., Shinozaki, K. (2001). Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLDdelta, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *Plant J* 26: 595-605.
- Kawchuk, L.M., Hachey, J., Lynch, D.R., Kulcsar, F., van Rooijen, G., Waterer, D.R., Robertson, A., Kokko, E., Byers, R., Howard, R.J., Fischer, R., Prufer, D. (2001). Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6511-5.

- Kervinen, T., Peltonen, S., Utrianen, M., Kangasjärvi, J., Teeri, T.H., Karjalainen, R. (1997). Cloning and characterization of cDNA clones encoding phenylalanine ammonia-lyase in barley. *Plant Sci* 123: 143-150.
- Kervinen, T., Peltonen, S., Teeri, T.H., Karjalainen, R. (1998). Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase genes in barley induced by fungal infection or elicitors. *New Phytol* 139: 293-300.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., Ecker, J.R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-41.
- Kim, M.C., Lee, S.H., Kim, J.K., Chun, H.J., Choi, M.S., Chung, W.S., Moon, B.C., Kang, C.H., Park, C.Y., Ok, H.M., Kang, Y.H., Koo, S.C., Koo, Y.D., Jung, J.C., Kim, S.T., Schulze-Lefert, P., Lee, S.Y., Cho, M.J. (2002a). Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein: Isolation and characterization of a rice Mlo homologue. *J Biol Chem* 277: 19.
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J., Schulze-Lefert, P. (2002b). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447-51.
- Kindl, H. (1994). *Biochemie der Pflanzen*, Springer Verlag.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., Dangel, J.L. (2000). Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr Opin Microbiol* 3: 73-8.
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F., Linthorst, H.J.M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1933-7.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T., Kunoh, H. (1997). Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J* 11: 525-537.
- Kogel, K.-H., Beckhove, U., Dreschers, J., Münch, S., Romme, Y. (1994). The resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol* 106: 1269-1277.
- Kogel, K.-H., Ortel, B., Jarosch, B., Atzorn, R., Schiffer, R., Wasternack, C. (1995). Resistance in barley against the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *Eur J Plant Pathol* 101: 319-332.
- Kogel, K.-H., Hückelhoven, R. (1999). Superoxide generation in chemically activated resistance of barley in response to inoculation with the powdery mildew fungus. *J Phytopathology* 147: 1-4.
- Koomans-Gersmann, M., Honee, G., Bonnema, G., de Wit, P.J.G.M. (1996). A high-affinity binding site for the Avr9 peptide elicitor of *Cladosporium fulvum* is present on plasma membranes of tomato and other solanaceous plants. *Plant Cell* 8: 929-938.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2940-5.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K. (1999). Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiol* 120: 501-12.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-80.
- Kumar, D., Klessig, D.F. (2000). Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 347-51.

- Kumar, J., Hückelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S., Kogel, K.-H. (2001). A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxin. *Phytopathology* 91: 127-133.
- Künzel, G., Korzun, L., Meister, A. (2000). Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154: 397-412.
- Kurth, J., Kolsch, R., Simons, V., Schulze-Lefert, P. (2001). A high-resolution genetic map and a diagnostic RFLP marker for the *Mlg* resistance locus to powdery mildew in barley. *Theor Appl Genet* 102: 53-60.
- Lahaye, T., Bonas, U. (2001). Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci* 6: 479-85.
- Lahaye, T., Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (1998). Chromosome landing at the barley *Rar1* locus. *Mol Gen Genet* 260: 92-101.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251-275.
- Laurenzi, M., Tipping, A.J., Marcus, S.E., Knox, J.P., Federico, R., Angelini, R., McPherson, M.J. (2001). Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta* 214: 37-45.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* 10: 71-82.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., Ward, E. (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 16: 223-33.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., Pugin, A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* 15: 773-81.
- Lee, S., Hirt, H., Lee, Y. (2001). Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J* 26: 479-86.
- Lee, S.J., Lee, M.Y., Yi, S.Y., Oh, S.K., Choi, S.H., Her, N.H., Choi, D., Min, B.W., Yang, S.G., Harn, C.H. (2002). PPI1: a novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor from pepper. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 540-8.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-93.
- Liang, P., Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-71.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276: 2054-7.
- Lindner, D.J., Hofmann, E.R., Karra, S., Kalvakolanu, D.V. (2000). The interferon-beta and tamoxifen combination induces apoptosis using thioredoxin reductase. *Biochim Biophys Acta* 1496: 196-206.
- Link, V.L., Hofmann, M.G., Sinha, A.K., Ehness, R., Strnad, M., Roitsch, T. (2002). Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli. *Plant Phys* 128: 271-281.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* 30: 415-29.
- Logemann, E., Parniske, M., Hahlbrock, K. (1995a). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5905-9.

- Logemann, E., Wu, S.C., Schroder, J., Schmelzer, E., Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (1995b). Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle- related genes. *Plant J* 8: 865-76.
- Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (2000). UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1903-7.
- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M., Frohnmeier, H. (2000). Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell* 12: 1939-50.
- Lu, G., Sehnke, P.C., Ferl, R.J. (1994). Phosphorylation and Calcium Binding Properties of an *Arabidopsis* GF14 Brain Protein Homolog. *Plant Cell* 6: 501-510.
- Lu, M., Tang, X., Zhou, J.M. (2001). *Arabidopsis* NHO1 Is Required for General Resistance against *Pseudomonas* Bacteria. *Plant Cell* 13: 437-47.
- Luan, S., Albers, M.W., Schreiber, S.L. (1994). Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 984-8.
- Luan, S., Kudla, J., Gruissem, W., Schreiber, S.L. (1996). Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6964-9.
- Luan, S. (1998). Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends Plant Sci* 3: 271-275.
- Luck, J.E., Lawrence, G.J., Dodds, P.N., Shepherd, K.W., Ellis, J.G. (2000). Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *Plant Cell* 12: 1367-77.
- Luderer, R., Rivas, S., Nurnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H.W., Van der Hoorn, R.A., Romeis, T., Wehrfritz, J.M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., De Lorenzo, G., Jones, J.D., De Wit, P.J., Joosten, M.H. (2001). No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 867-76.
- Madhani, H.D., Fink, G.R. (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Gen* 14: 151-155.
- Maher, E.A., Bate, N.J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7802-6.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., Dietrich, R.A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* 26: 403-10.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262: 1432-6.
- Mauch-Mani, B., Slusarenko, A.J. (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-212.
- McAinsh, M.R., Hetherington, A.M. (1998). Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends Plant Sci* 3: 32-36.
- McPhail, L.C., Waite, K.A., Regier, D.S., Nixon, J.B., Qualliotine-Mann, D., Zhang, W.X., Wallin, R., Sergeant, S. (1999). A novel protein kinase target for the lipid second messenger phosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta* 1439: 277-90.

- Meier, I., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1991). Elicitor-inducible and constitutive in vivo DNA footprints indicate novel cis-acting elements in the promoter of a parsley gene encoding pathogenesis-related protein 1. *Plant Cell* 3: 309-15.
- Menke, F.L., Champion, A., Kijne, J.W., Memelink, J. (1999). A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *Embo J* 18: 4455-63.
- Miao, H.Q., Elkin, M., Aingorn, E., Ishai-Michaeli, R., Stein, C.A., Vlodavsky, I. (1999). Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 83: 424-31.
- Michelmore, R. (2000). Genomic approaches to plant disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* 3: 125-31.
- Mikolajczyk, M., Awotunde, O.S., Muszynska, G., Klessig, D.F., Dobrowolska, G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12: 165-78.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., Shinozaki, K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 765-9.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Shinozaki, K. (1997). Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol* 15: 15-9.
- Mobley, E.M., Kunkel, B.N., Keith, B. (1999). Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 240: 115-23.
- Morimoto, S., Tateishi, N., Matsuda, T., Tanaka, H., Taura, F., Furuya, N., Matsuyama, N., Shoyama, Y. (1998). Novel hydrogen peroxide metabolism in suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J Biol Chem* 273: 12606-11.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., Uknes, S. (1998). Induced resistance responses in maize. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 643-58.
- Müller, R., Owen, C.A., Xue, Z.T., Welander, M., Stummann, B.M. (2002). Characterization of two CTR-like protein kinases in *Rosa hybrida* and their expression during flower senescence and in response to ethylene. *J Exp Bot* 53: 1223-5.
- Munnik, T. (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* 6: 227-233.
- Munnik, T., Arisz, S.A., de Vrije, T., Musgrave, A. (1995). G protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. *Plant Cell* 7: 2197-2210.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I.I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J* 20: 381-8.
- Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J.D., Parker, J.E. (2002). *Arabidopsis* RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* 14: 979-92.
- Nakai, K., Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34-6.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-6.

- Nielsen, J.S., Moller, B.L. (2000). Cloning and expression of cytochrome P450 enzymes catalyzing the conversion of tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima*. *Plant Physiol* 122: 1311-21.
- Nishiguchi, M., Yoshida, K., Sumizono, T., Tazaki, K. (2002). A receptor-like protein kinase with a lectin-like domain from lombardy poplar: gene expression in response to wounding and characterization of phosphorylation activity. *Mol Genet Genomics* 267: 506-14.
- Oerke, E.-C., Dehne, H.-W. (1997). Global crop production and the efficacy of crop protection - current situation and future trends. *Europ J Plant Pathol* 103: 203-215.
- Ohtake, Y., Takahashi, T., Komeda, Y. (2000). Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 1038-44.
- Osborn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Pappan, K., Wang, X. (1999). Plant phospholipase D alpha is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca^{2+} concentrations. *Arch Biochem Biophys* 368: 347-53.
- Park, J.M., Park, C.J., Lee, S.B., Ham, B.K., Shin, R., Paek, K.H. (2001). Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13: 1035-46.
- Pasquali, G., Erven, A.S., Ouwerkerk, P.B., Menke, F.L., Memelink, J. (1999). The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol Biol* 39: 1299-310.
- Peart, J.R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D.C., Schauser, L., Jaggard, D.A., Xiao, S., Coleman, M.J., Dow, M., Jones, J.D., Shirasu, K., Baulcombe, D.C. (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10865-9.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R. and 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.
- Pieterse, C., van Wees, S., Hoffland, E., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 4: 52-58.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Schaffrath, U., Collins, N., Panstruga, R., Schulze-Lefert, P. (2002). The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Phys* 129: 1-10.
- Prell, H.H. (1996). Interaktionen von Pflanzen, phytopathogenen Pilzen. Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Press, C.M., Wilson, M., Tuzun, S., Kloepper, J.W. (1997). Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 761-768.
- Pryce-Jones, E., Carver, T., Gurr, S.J. (1999). The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol Mol Plant Pathol* 55: 175-182.
- Puntarulo, S., Cederbaum, A.I. (1998). Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 24: 1324-30.

- Puskas, L.G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Van Hummelen, P. (2002). RNA amplification results in reproducible microarray data with slight ratio bias. *Biotechniques* 32: 1330-4.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P.N. (1999). The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18: 111-9.
- Qin, W., Pappan, K., Wang, X. (1997). Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLDgamma and regulation of plant PLDgamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium. *J Biol Chem* 272: 28267-73.
- Qin, L., Overmars, H., Helder, J., Popeijus, H., van der Voort, J.R., Groenink, W., van Koert, P., Schots, A., Bakker, J., Smant, G. (2000). An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 830-6.
- Radwanski, E.R., Last, R.L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7: 921-934.
- Rajasekhar, V.K., Lamb, C., Dixon, R.A. (1999). Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Plant Physiol* 120: 1137-46.
- Ren, D., Yang, H., Zhang, S. (2002). Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 559-65.
- Ren, T., Qu, F., Morris, T.J. (2000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12: 1917-26.
- Richael, C., Gilchrist, D. (1999). The hypersensitive response: A case of hold or fold? *Physiol Mol Plant Pathol* 55: 5-12.
- Richard, S., Lapointe, G., Rutledge, R.G., Seguin, A. (2000). Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant Cell Physiol* 41: 982-7.
- Ritchie, S., Gilroy, S. (2000). Absciscic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane. *Plant Physiol* 124: 693-702.
- Rizzo, M.A., Shome, K., Vasudevan, C., Stolz, D.B., Sung, T.C., Frohman, M.A., Watkins, S.C., Romero, G. (1999). Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274: 1131-9.
- Rizzo, M.A., Shome, K., Watkins, S.C., Romero, G. (2000). The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 275: 23911-8.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11: 273-87.
- Ross, J.A., Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22: 19-34.
- Rushton, P.J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, I.E. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14: 749-62.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR*I genes. *Embo J* 15: 5690-700.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.

- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., Uknes, S. (1997). The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell* 9: 425-39.
- Ryu, S.B., Wang, X. (1996). Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochim Biophys Acta* 1303: 243-50.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17: 2596-606.
- Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E., Rommens, C.M., Scofield, S.R., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B.J. (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: 123-33.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuel, M.A., Ellis, B.E. (2002). Double jeopardy: Both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14: 2059-2069.
- Samuel, M.A., Miles, G.P., Ellis, B.E. (2000). Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J* 22: 367-376.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14: S401-417.
- Sang, Y., Cui, D., Wang, X. (2001). Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 1449-58.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463.
- Sarma, A.D., Sreelakshmi, Y., Sharma, R. (1998). Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry* 49: 2233-43.
- Sasaki, K., Taura, F., Shoyama, Y., Morimoto, S. (2000). Molecular characterization of a novel beta-glucuronidase from *Scutellaria baicalensis* georgi. *J Biol Chem* 275: 27466-72.
- Schaffrath, U., Freydl, E., and Dudler, R. (1997). Evidence for different signaling pathways activated by inducers of Acquired Resistance in wheat. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 779-783.
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1: 305-310.
- Scheideler, M., Schlaich, N.L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N.C., Vingron, M., Slusarenko, A.J., Hoheisel, J.D. (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *J Biol Chem* 277: 10555-61.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W., Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1672-6.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., Manners, J.M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11655-60.
- Schiffer, R., Görg, R., Jarosch, B., Beckhove, U., Bahrenberg, G., Kogel, K.-H., Schulze-Lefert, P. (1997). Tissue dependence and differential Cordycepin sensitivity of race-specific resistance responses in the barley-powdery mildew interaction. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 830-839.
- Schlösser, E. (1997). *Allgemeine Phytopathologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

- Schoenbeck, M.A., Samac, D.A., Fedorova, M., Gregerson, R.G., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1999). The alfalfa (*Medicago sativa*) TDY1 gene encodes a mitogen-activated protein kinase homolog. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 882-893.
- Schopfer, C.R., Ebel, J. (1998). Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. *Mol Gen Genet* 258: 315-22.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.H., 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: 1447-54.
- Schulze-Lefert, P., Vogel, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci* 5: 343-8.
- Schweizer, P., Buchala, A., Metraux, J.P. (1997). Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichlorisonicotinic acid. *Plant Physiol* 115: 61-70.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., Dudler, R. (1999a). A transient assay system for the functional assessment of defense related genes in wheat. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 647-654.
- Schweizer, P., Christoffel, A., Dudler, R. (1999b). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant J* 20: 541-52.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P., Dudler, R. (2000). Technical advance. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J* 24: 895-903.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Micheltore, R.W., Staskawicz, B.J. (1996). Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 274: 2063-5.
- Scott-Craig, J.S., Kerby, K.B., Stein, B.D., Somerville, S.C. (1995). Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Physiol Mol Plant Pathol* 47: 407-418.
- Seehaus, K., Tenhaken, R. (1998). Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Plant Mol Biol* 38: 1225-34.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., Ohashi, Y. (1995). Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270: 1988-92.
- Seo, S., Sano, H., Ohashi, Y. (1999). Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11: 289-298.
- Shiraishi, T., Yamakoa, N., Kunoh, H. (1989). Association between increased phenylalanine ammonia-lyase activity and cinnamic acid synthesis and the induction of temporary inaccessibility caused by *Erysiphe graminis* primary germ tube penetration of the barley leaf. *Physiol Mol Plant Pathol* 34: 75-83.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Nicholson, R.L., Kunoh, H. (1995). Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (race 1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. *Physiol Mol Plant Pathol* 46: 153-162.
- Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M.W., Zhou, F., Azevedo, C., Schulze-Lefert, P. (1999). A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99: 355-66.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., Sun, T. (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10: 155-69.
- Simmons, C.R., Grant, S., Altier, D.J., Dowd, P.F., Crasta, O., Folkerts, O., Yalpani, N. (2001). Maize rhm1 resistance to *Bipolaris maydis* is associated with few differences in pathogenesis-related proteins and global mRNA profiles. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 947-954.

- Simons, G., van der Lee, T., Diergaarde, P., van Daelen, R., Groenendijk, J., Frijters, A., Buschges, R., Hollricher, K., Topsch, S., Schulze-Lefert, P., Salamini, F., Zabeau, M., Vos, P. (1997). AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* 44: 61-70.
- Smith, T.A., Best, G. (1978). Distribution of the hordatines in barley. *Phytochemistry* 17: 1093-1098.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., et al. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270: 1804-6.
- Song, F., Goodman, R.M. (2002). *OsBIMK1*, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance responses. *Planta* 215: 997-1005.
- Stadnik, M.J., Buchenauer, H. (1999). Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazole-induced and quantitative resistance of wheat. *J Phytopathol* 147: 615-622.
- Stadnik, M.J., Buchenauer, H. (2000). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 57: 25-34.
- Stakman, E.C. (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res* 4: 193-200.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Metraux, J.P. (1997). Systemic Acquired Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 35: 235-270.
- Stoessl, A. (1967). The antifungal factors in barley. IV. Isolation, structure, and synthesis of the hordatines. *Can J Chem* 45: 1745-1760.
- Stratman, J.W., Ryan, C.A. (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11085-11089.
- Sugimoto, K., Takeda, S., Hirochika, H. (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell* 12: 2511-2528.
- Suzuki, K., Yano, A., Shinshi, H. (1999). Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Phys* 119: 1465-1472.
- Takezawa, D. (1999). Elicitor- and A23187-induced expression of *WCK-1*, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. *Plant Mol Biol* 40: 921-933.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., Martin, G.B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 274: 2060-3.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Martin, G.B. (1995). Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet* 11: 63-8.
- Thomas, C.M., Dixon, M.S., Parniske, M., Golstein, C., Jones, J.D. (1998). Genetic and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1413-24.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* 13: 63-8.
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P.L., Collinge, D.B. (1999). The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. Mechanisms of resistance to plant diseases. A. Slusarenko, Fraser, R., van Loon, K., Kluwer Academic Publishers: 77-100.

- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11: 1187-1194.
- Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., Dangl, J.L. (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to Disease Resistance in *Arabidopsis*, and Their Relative Contributions Are Dependent on the R Gene Assayed. *Plant Cell* 14: 1005-1015.
- Tosa, Y. (1992). A model for the evolution of formae speciales and races. *Phytopathol* 82: 728-730.
- Trewavas, A. (1999). Le calcium, C'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiol* 120: 1-6.
- Trewavas, A. (2000). Signal Perception and Transduction. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B. Buchanan, Gruissem, W., Jones, R. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists: 930-987.
- Tron, A.E., Bertoncini, C.W., Chan, R.L., Gonzalez, D.H. (2002). Redox regulation of plant homeodomain transcription factors. *J Biol Chem* 277: 34800-34807.
- Tusnady, G.E., Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17: 849-50.
- 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: 645-56.
- Vallelian-Bindschedler, L., Metraux, J.P., Schweizer, P. (1998). Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defence-gene activation. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 702-705.
- van der Biezen, E.A., Jones, J.D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 23: 454-6.
- van der Biezen, E.A., Juwana, H., Parker, J.E., Jones, J.D. (2000). cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 895-8.
- van Drogen, F., Stucke, V.M., Jorritsma, G., Peter, M. (2001). MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nature Cell Biology* 3: 1051-1059.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36: 453-483.
- van Loon, L.C., van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55: 85-97.
- Vanacker, H., Carver, T.L., Foyer, C.H. (1998). Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol* 117: 1103-14.
- Vernon, S.D., Unger, E.R., Rajeevan, M., Dimulescu, I.M., Nisenbaum, R., Campbell, C.E. (2000). Reproducibility of alternative probe synthesis approaches for gene expression profiling with arrays. *J Mol Diagn* 2: 124-7.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reit, 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.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7209-14.
- Vleeshouwers, V.G., van Dooyeweert, W., Govers, F., Kamoun, S., Colon, L.T. (2000). The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210: 853-64.

- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L., Pecker, I. (1999). Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 5: 793-802.
- von Röpenack, E., Parr, A., Schulze-Lefert, P. (1998). Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J Biol Chem* 273: 9013-22.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-14.
- Vranova, E., Inze, D., Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53: 1227-36.
- Waite, K.A., Wallin, R., Qualliotine-Mann, D., McPhail, L.C. (1997). Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. *J Biol Chem* 272: 15569-78.
- Walters, D.R., Wilson, P.W.F., Shuttleton, M.A. (1985). Relative changes in levels of polyamines and activities of biosynthetic enzymes in barley infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* DC. Ex Merat f.sp. *hordei* Marchal. *New Phytol* 101: 695-705.
- Walters, D.R. (2000). Polyamines in plant-microbe interactions. *Physiol Mol Plant Pathol* 57: 137-146.
- Walters, D., Cowley, T., Mitchell, A. (2002). Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *J Exp Bot* 53: 747-56.
- Walther-Larsen, H., Brandt, J., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. (1993). A pathogen-induced gene of barley encodes a HSP90 homologue showing striking similarity to vertebrate forms resident in the endoplasmic reticulum. *Plant Mol Biol* 21: 1097-108.
- Wang, G.L., Song, W.Y., Ruan, D.L., Sideris, S., Ronald, P.C. (1996a). The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Mol Plant-Microbe Interact* 9: 850-5.
- Wang, T., Li, B.Y., Danielson, P.D., Shah, P.C., Rockwell, S., Lechleider, R.J., Martin, J., Manganaro, T., Donahoe, P.K. (1996b). The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86: 435-44.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F., Wang, X. (2000a). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2237-46.
- Wang, X., Wang, C., Sang, Y., Zheng, L., Qin, C. (2000b). Lipids and signalling: Phospholipase-mediated pathways. *Biochem Soc Transact* 28: 813-816.
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V., Thordal-Christensen, H. (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol* 36: 101-12.
- Wei, F., Gobelmann-Werner, K., Morroll, S.M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Schulze-Lefert, P., Wise, R.P. (1999). The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* 153: 1929-48.
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., Didierjean, L. (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci* 5: 116-123.
- Whitbred, J.M., Schuler, M.A. (2000). Molecular characterization of *CYP73A9* and *CYP82A1* P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiol* 124: 47-58.

- White, F.F., Yang, B., Johnson, L.B. (2000). Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr Opin Plant Biol* 3: 291-8.
- Whithers-Martinez, C., Saldanha, J.W., Ely, B., Hackett, F., O'Connor, T., Blackman, M.J. (2002). Expression of recombinant *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1 in insect cells: characterization, comparison with the parasite protease, and homology modelling. *J Biol Chem* in press.
- Wiesniewski, J.-P., Rathbun, E.A., Knox, J.P., Brewin, N.J. (2000). Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 413-420.
- Wolter, M., Hollricher, K., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1993). The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Mol Gen Genet* 239: 122-8.
- Wrzaczek, M., Hirt, H. (2001). Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biol Cell* 93: 81-7.
- Wulff, B.B., Thomas, C.M., Smoker, M., Grant, M., Jones, J.D. (2001). Domain swapping and gene shuffling identify sequences required for induction of an Avr-dependent hypersensitive response by the tomato Cf-4 and Cf-9 proteins. *Plant Cell* 13: 255-72.
- Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., Turner, J.G. (2001). Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* 291: 118-20.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., Garcia, J.A., Gutierrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol Biol* 39: 647-56.
- Xu, H., Heath, M.C. (1998). Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* 10: 585-98.
- Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., Chen, Z. (1999). A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J* 18: 141-149.
- Yang, K.Y., Liu, Y., Zhang, S. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 741-6.
- Ye, Z.H. (1997). Association of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants. *Plant Physiol* 115: 1341-50.
- Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z.X., Kono, I., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N., Sasaki, T. (1998). Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1663-8.
- Young, S.A., Wang, X., Leach, J.E. (1996). Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Cell* 8: 1079-1090.
- Yu, I.C., Parker, J., Bent, A.F. (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7819-24.
- Yu, D., Chen, C., Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* 13: 1527-40.
- Zhang, S., Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809-824.
- Zhang, S., Du, H., Klessig, D.F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10: 435-50.

- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-I* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6523-8.
- Zhang, S., Liu, Y. (2001). Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* 13: 1877-89.
- Zhao, J., Last, R.L. (1996). Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 2235-2244.
- Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M., Wang, X. (2000). Distinct Ca^{2+} binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase α and β . *J Biol Chem* 275: 19700-6.
- Zhong, R., Iii, W.H., Negrel, J., Ye, Z.H. (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell* 10: 2033-46.
- Zhou, J., Loh, Y.T., Bressan, R.A., Martin, G.B. (1995). The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 83: 925-35.
- Zhou, J., Tang, X., Martin, G.B. (1997). The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *Embo J* 16: 3207-18.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., Klessig, D.F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-I* gene required for induction by salicylic acid. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 191-202.
- Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Vale, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R., Schulze-Lefert, P. (2001). Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. *Plant Cell* 13: 337-50.
- Zhu, W., Yang, B., Wills, N., Johnson, L.B., White, F.F. (1999). The C terminus of *AvrXa10* can be replaced by the transcriptional activation domain of VP16 from the herpes simplex virus. *Plant Cell* 11: 1665-74.
- Zhumabayeva, B., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D. (2001). Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques* 30: 158-63.
- Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. and Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2751-2755.

7 Anhang

Tab. 7.1 Nukleotidsequenzen von linienspezifischen Genfragmenten (Marker) aus dem cDNA-AFLP (Tab. 3.1), die nicht in die *GenBank* Datenbank gestellt wurden.

13b-3	CC					
Klon	ATGGCAGAGG	GGGAGGAATC	TTTCCTACGT	TTGTTGCACA	CGCCTGAgAT	GTCCAAACCA
	TCCCCAGAAC	CATGCTTTGA	TGCATGTGTT	GACAGGTTAA	GGCCAGAACC	ATTGAGCACC
	TTCTTGTGAT	GGCCATGTGA	GGTGCTCTTT	GCTGGAGCAG	CAGTTSCAGG	CCTCTCAAGC
	TCAAATTCCG	TGGTCGGCAG	ATTCTCCCAT	GATTCAAAAT	CATCTGCCTC	AGTAGGAACC
	GAGAAATTGG	CATCCCTCCC	AGTGAGCTCA	AACCACCTCT	TCATATCGGC	CTCAGGAACA
	CCCACTAAGT	TCGGTGTCCG	CACGATCTCA	ATACCATGAA	GGCACTGCGG	GTTTGACAAA
	CCCCGGTAGT	GCTTACGCTG	CATCCGGTGT	GAGCGCACAA	ACCCTTTGTC	TGCGCTGAAA
	GGAAACTGTG	GCTCCCCAAG	GCGCGAGTGA	CCATTCATGA	AGCTCCTCAG	CTGCATCTTC
	CCCAGGGCAT	TCTCCGGACG	ATC			
N13b-8	CC					
Klon 109	ATGGCATCAT	AAACTCATTT	TATGCACATA	GATAGTTGCG	GCGATTTCGAC	TCAAGTAACA
	CAGAATGATT	gGTAGAGCTA	CTGAaAATAC	AGAACCAAAC	GCACATCCTA	CTACATCAGT
	AGGCGGGTGG	GATC				
8a-15	C	CATGGTCAAC	TCCACCCTCA	AGCTCAGGAA	CTTCTACTCC	GACTTCGACG
Klon 264	GCGTCGTCGC	CAACGTCTAC	AAGGAGAGCG	GTGGCCTCTA	CGACGAGGAG	TTCGTGCAGA
	AGAGAATGGA	CCGCGCCGAC	GAGGTGGAAG	AGCTGGGCGG	CAAGTTCGCC	GCGAAGTTGG
	AtC					
N9-1						
Klon 12	CCATGGGAGG	CAGCTCCTGG	CACCATCCGC	GGTGATC		
N12-2	GATCTACTAT	GAAGTTAGCG	CAACCCCCTC	CTCCGGCCGC	GTGGCGGTGA	GCGCAAgcCT
Klon 219	CATGCTTCTT	CGGTGAGAAG	GCAGCGGGTG	CCCTTTCCCT	CCTTGCTTTC	TCTTCTTGTC
	CTCCTCCCCT	CCTCCACCGA	GGCCCATGG			
N16-4	GATCTACAC	GTA CTGTGTA	CGTACAAGGG	AGAACATGTT	ACACTTCGAG	CTACTAACAC
Klon 151	ACGGCAACTG	CCAGAAAAAA	GGAGAAGAAA	CACACACATG	GCATGTATAT	TTCCCGGTGG
	CTATGGCGGC	GCCGTTTGGT	TGGCCATGG			
N16-10						
Klon 9	CCATGGCC	TGACCTCTCA	TAGCTCGCTC	CAATCGACGA	CGTGCCAAAT	TCAGAGAAGG
	TTAGGGTTCC	TCGCTCGCCG	ATC			
N16-11						
Klon 10	GATCGGG	CGAGCGAGGA	ACCTTAACCC	TAATCTTCTC	TGAATTTGGC	ACGTCGTCGA
	TTGGAGCGAG	CTATGAGAGG	TCAGGCCATG	G		
N5-11	GATCCACCC	GCCTACTGAT	GAAGTAGGAT	GTGCGTTTGG	TTCTGTATTT	TCAGTAGCTC
Klon 117	TACCGTTCAT	TCTGTGTTAC	TTGAGTCGAA	TCGCCGCAAC	TATCTATGTG	CATAARATGA
	GTTTATGATA	CCATGG				
N7-5	GATCCGCT	CGTACTCGCC	CTCGTTGCCG	GTGCCGGTCA	CCACCGTCTC	GGTCGAGTAC
Klon 241	CCGTACACGT	CGGCGCCGCC	GTCAGCGGCG	GGCTGGAAGT	CCTCGCCCTC	CTTCTTGTGG
	TGGAACAGGT	GGTGGTGGTG	CTTCTCCTCC	ACCATGG		
N8-7	CC					
	ATGGTCAACC	AAACGGCGCC	GCCAAAtAGCC	ACCGGGAAAT	ATACATGCCA	TGTGTGTGTT
	TCTTCTCCTT	TTTTCTGGCA	GTTGCCGTGT	GTTAGTAGCT	CGAAGTGTA	CATGTtCTCC
	CTTGACGTA	CACAGTACGT	G TAGATC			
N8-9	CCATGG					
Klon 137	GTCAACCAAA	CGGCGCCGCC	ATAGCCGCCG	GGAAATATAC	ATGCCATGTG	TGTGTTTCTT
	CTCCTTTTTT	TTCTGGCAGT	TGCCGTGTGT	TAGTAGCTCG	AAGTGTAACA	TGTTCTCCCT
	TGTACGTACA	CAGTACGTGC	AGATC			
N8-11	GATCGT					
Klon 190	GCGGACACCG	AACTTAGTGG	GTGTTCCCTGA	GGCCGATATG	AAGAGGTGGT	TTGAGCTCAC
	TGGGAGGGAT	GCCAATTTCT	CGGTTCCAC	TGAGGCAGAT	GATTTTGAAT	CATGGAGGAA
	TCTGCCGACC	ATGG				
N8-15						
Klon 167	CCATGGTCT	GACCTCTCAT	AGCTCGCTCC	AATCGACGAC	ATGCCAAATT	CAGAGAAGAT
	TAGGGTTAAG	GTTCTCTGCT	CGCCCGATC			

Tab. 7.2 Mehltaupilz-induzierte Genfragmente aus dem cDNA-AFLP, die nicht in die Datenbank gegeben wurden (Tab. 3.2).

13b-1 Klon 90	CCA TGGCAACATA CGGCGCTGGG CAACGATC	TATCAGTCAC TGCCTTGTCC	CTCCTCGACG ACAGAGGCCA	GCGGTGCCAC CCTCGGTCTG	GTTCACTCGT CACGGCTCGC	TTCCCGTTGC CTGAgAACCT
13b-4 Klon 480	CCATGGCATT	GCaTTCACAT	CGAtCCTTCA	GTGTCGCATA	AATATACATG	ACCGATC
13b-5 Klon 99	CCATGGC AGAGGTTGGA ACATGAGTTT	AATCTCAGCA AGGCAGACCG ACCGATC	CCCTTGAAaGC TTGTTGTAGA	CATAGTCCAA AGTCATTAC	ACTTGGGTTG TAGCTCTGAG	CGCCCGCCGG AACTGGGCAA
13b-6 Klon 102	GATCCCGAAA	AGATGTTGCC	ATGG			
11-1 Klon 295	CCATGG GTCGATC	GGGCCAACGC	GCACAGCAGG	ACAGCCGCCA	GTACCGCACG	TCCGGCCATC
11-2 Klon 329	CCATGG GTGATCGGGA	GGGTGACATT GCCAGTCATC	GTGGAAGGCC GATC	GAGTACCACC	ACTTGGCGTT	CCTCGACGAC
11-5a Klon 304	CCATGG CACGGGCCGC CACTCGTCAC CCTTGCCCGG AATAATAATB	GGCAAAACAA ACTACTATTC CACAGACGCG TCCCCAGACA ATAATAATAA	TTACTACTAT CACGACGCTT CCCCGATTCT CGTtATGATA TATAATGATA	CAGGTTACAG GCCGTCATCT TTTGCCACCG GTAAACCCGA ATCGAtC	GTTCACAACA TCTTCTTCTT GATCAGACCG CTGAACAAAT	ACAACAGCAG CTTCCTTCTT GGAACCTTAG
11-5b Klon 336	CCATGG ATATTGGAAT GCAGTAGGTG AATGCTGTTG GTTATAGACT	GGCAAGGCGC TCATGGACTG CTAGCGAGGT GAAACTGCAT ATATACCCTT	ATTTGCTGGT GGGTGACTAT TGATAAAGAA AATTGATGTA cTCGAtC	ATTCCACTTC GGGGCGATGG GATGACATGT AAGATTCTAT	AGCTTGCTGG GCGCCTTCAT TTGTGCTCAT GTCTTAATAT	AACCAGAAAA CAATATTGGA TGCTCCCCAG ATTTTCTCTA
11-6 Klon 340	CC GAGGTAGATG CTTCTTGAAC CGTCGGCGCC CGACGAGGAG	ATGGGGCAGA AGGGTCTTGT ACCTCATACA CAGCCCCGGA ATGCTCTTGT	GCGCGACGTC ACTtGGCGGC GGCCGTACTT AGAAGCCGCG ACTTGCCCGG	GCGCAGCACC GTACTCCGGG AAACGCGCCC GACGCCCTGC GTCGATC	TCGGCGGTGG CCGGCCATGT TGCGCGCTGT TCCTTCAGCA	CCGAGCCGGC CGGTGTACTC ACCCCAGGAA CGATGCTGAA
11-7 Klon 309	CCATGGGG	TAGCTGCCGA	GCACCCTGAG	GAACGACGTG	AACTCCTGGA	TC
11-8 Klon 314	CCATGGGG AAGAATTGCC	AGCAATGCAT TCACCATCGG	CAGAGATATC CAGGTCAAGG	TGGTCTACCT TCTTCAGGCT	GGTATTGGAG GGATC	ATGTTACCGG
11-10 Klon 465	CCA TGGCTTGAGT GGACAGGGGA GATC	TGGGGGAGGC GACGGTATAC GATTAAAGTT	AGCCAGTTGT TCGGTTTCAG CTCTCCTCTG	TGTTCTCTCT CTTTAaATTG GaACCCTTTC	GTTTGCKTCC CCTCCaAAGA CCATGAAGTG	TGAGCAGCTA GACTTGCACT GAGGCAAGTG
11-12 Klon 472	C TtATTYTCAA ATGGAtTCAG CATGtTATcT	CATGGGGAAA GTGTGGAGGA GCCGGGATAG CGAACGTGTG	AAGGTCAGGA TYTCACTCGT CGAGTTGAAC GATC	TcTTCATGTA CCCTTAGGTT TGCTCTTYCC	CCCAGCAGC ttCATtTCGA GTGTGAAGAA	ATCTAAAAGG GTCTTGTAAG CTTTAGTTtT
11-13 Klon 353	CCATGGGGGG	GTGCTGGTGT	TGCCGTACCA	ATGTTYTCAA	TCAGGTCAAA	TGAGGATC
11-14 Klon 324	CCATGGGGGA TGGGGGCGGG GGATC	GACAAACACA CAGGTTGGAC	TCACCTTTGT GTGACAAATC	TGAGCACCTT CGACATACAG	GGAGAGGAAC TGTCCTCTCG	TTGTTTCTGT AGTACCGTGA
8a-2 Klon 221	CCAT	GGTCAGCAGC	CTCCACTCCA	ATCAGTCTTA	CATCCTGATC	
8a-3b Klon 230	AGACT CAAATAAGAC TTGTTATGTG	GCGTACACCA AGCCTGAAGC TTGGTTACCC	TGGTCGCTGT CCTTGGAATA CTCCTCTGAT	ACAAGCTGTG TCGGCTGACT CCTCAGGACT	CTGTTAGGAT TAAGAGAGCA	AAAATCGGGC GGGCTATGCG
8a-7 Klon 242	CCA TCGAGATC	TGGTCTCTTC	TCTGTCAAAT	CGGATGTATT	CAGCTTTGGC	GTTCTAGTTC
8a-8 Klon 246	C AGCCGGGCGG TCAACGTGGG	CATGGTCGCC TTCGTGGACC CGATGAGATC	TTACTAGGCG TTGGACACCG	CCGCGTCAGC ACTACAGCAA	GGCAACCTAC ATGGGTGTCC	ACCGTGGGCG GACAAGAAGT
8a-10 Klon 251	CCATGGTCC ATCAAACACT ACGTCTCTCC	AACGTACAGC GATACAAAAC CCTCTCTCTC	AAACTCCCGT CGATACAACA TCATGGAGAT	ATGTGTCTCC GTGAGCGGCC C	TCAAAGGGAG ATGTAGAGCT	TGAACAAACA GGCTCAGCGT

8a-11 Klon 254	CCATGG AAAAGAAAAAG AGATATATAT AGACATCGTT ATGGCGATGG GACGCGACGA CAGCGGCGAG	TCACGGAACA AAAAAAGAAAG ATGCTCAACA TCGATGATTT CCGCCCCGAG TGACCGAGAT ATC	ACAAACGAAG AACAAAGATT ACATATAATG CCATTACTGC CGCGTTGACG ACGCTTCATG	AATTCAGAGA CTAATATATA TCCGAACGCC TTTGCCTGGG GGCTGCACCG GTGTTGCCCA	TATCCGCGGC TTACAAGGGG GGGCCGACTC AGTAGATGAA GCGTGCGGAA CGCTGAATGT	TAAACCTAGA TTTCTTAATT TCGTCCGGAAG GGTTCCGAGG GATGATGATG
8a-12 Klon 456	CCA TAACAAGGGG CCCCCCGGCC GTACACCGTG GCTCTTCTAC CGTCGTCGGC CATCAGCCTC CATCCAGGTC	TGGTCCTTCT CTGGCCTTCT ATCGTCTCCC CCCCTCCAGC AAGCTCCTCA GAGGCCTGCC AAGGACAAGG ATCGTCGTCA	CCGTCGCAAG CCGAGGCGGA AGGAGCACCA GCTACATCGC TCGACAACGT AGAAGTACGG GCAAGGTGCT CCGACGGCGA	CGGGCACTCG GCGCGACGCG AGAGAAGAAG CATGATGGAC CGAGGAGCTG CAGCATCTAC TGAGGTGCTC GCGCATTTTG	CTGCTGAGGG cACTACCTCC ATCATGCACA CTCCAGGAGA CTCCCCGTCG CGCCGCCCGC AAGAAGTGGC GGCCTCGGAG	ACCCCCGGCA GGGGCCTCCT ACCTCCGCCA GGAACGAGAG TGTACACGCC AGGgGCTCTA CTGAGAGGAG ATC
8a-13 Klon 417	CCA CCTGCCTTCT	TGGTCGAAAC GCGATATACT	TGCTTCACCG ACTGGCACCA	CCGGCATAAC GATGTGTACT	CTAGGTTCAA GGCTTTGGAT	GGCTGCAAGC C
8a-16 Klon 268	CCATGGTC CTGCAGCTTC GCCGGGCTTC GATC	AGCCTCGTCC TCCCCGAACG TTGAGAACGC	TCGGGTCCAT GGTGGATGTC GGTTCACCAC	GTACGGCCGC GTAGTTGTAC GGCGTAGAAG	ATGGCCGGGT CCCCACACGG AGCGGGACGT	ACAGCGTCCC CGAGCACGCC CGAACCAGTG
5-2 Klon 367	AGACT GTTGCGCCCG TGAGAACTGG	GCGTACACCA CCGGAGAGGT GCAAAACATGA	TGGTAATCTC TGGAAGGCAG GTTTACCGAT	AGCACCCCTTG ACCGTTGTTG C	AAGCCATAGT TAGAAGTCAT	CCAAACTTGG TCACTAGCTC
5-3 Klon 371	CCATGGT	AAACAGTACC	AAAGGTCCCA	GAACCTAGTT	CACGCAATTC	TTCAAGATC
5-6 Klon 378	CCATGGT CTCTGAATTG ATC	AAGTTGAGCC GATACTTCAA	TTTCGGAGAT TAAAGATAAC	AGTCTGTTGT AACCTGATAA	ATCTCCATTG TCATGGGCCT	TGTTCAAGCGC TCTTCTCAAG
13a-1 Klon 132	CCATGGC	AATTCATTGG	TCTGTTGCCC	CTGTTTGATC		
13a-2 Klon 272	CCATGGCA	GCGCATGGAA	ATTTTGTTAT	GTTTGGCAAA	AGGAGAGTCT	GTTGATC
13a-4 Klon 142	CCATGGCAG	CCCGAGTGGC	TCTCACCATC	TTCCTGCTGA	TC	
13a-7 Klon 165	CCATGGCAA	GGAGCTGCAG	GACGCCTTCA	TGCCAAGATC		
13a-8 Klon 168	CCATGGCAA	CGCACAGGCG	CTAAGATAAT	TCCGATGAGT	TATCCCTATG	AAGATC
13a-10 Klon 282	CCAT GAAGATC	GGCATCTGCA	TCATGACTGA	GTGGGATGAG	TTCAAGACTC	TTGACTACAA
13a-12 Klon 179	CCATGGCA TTCACGCAAG	CCAGCTGACT ATC	TGGACATAGC	TTCTAGCGCT	GGATTCACAA	CCTGTCCAGC
13a-15 Klon 478	CCATGGCA CATTGAGGaG TGCTCTGTAT AACGCCATTT	GATGAaTTGG GTTATCGGTG TTAGCTGCAT TGGGGTTTCC	TGTACTCTGT AACCAGTTTA CCAGTCCACA TTCCTAATCC	AGACTTGTGG TATTGTTGGa CCTTGTaAAG TGCAAGATC	CGCGACCAGG aACTCTCTTG GGGGTCACAT	TCCAGCATT GAGGTTTTGT CGCTTAATGC
14-1 Klon 38	CCA CCATGTCCAG CGGAAGACTG TTGTGCCAAG TGTGTCACAA	TGGCTTCATA AGTGCGGASA CCGAGGCCAT CCATCGACCT GAGTGGCCAG	CTGCTCGGCG ACACAATCAA CGACATTCTG ACGCCACCTC GAAGACCCTG	CTCCAATTCT GATGTTAAC AAGCTCATGT GAGGAGAATG ATC	TGGGCAACCC CCCTCGGATT CCTCTACATT TCAAGAACGC	AGTGACCYYA AATCTCGGCC TTTGGTTGCG CGTCAAGAAT
14-2 Klon 41	CCATG	GCTGAGCAGC	TACACAATTA	ACAACACACG	TCGATC	
14-5 Klon 51	CCAT GCTAGTCCTC	GGCTGACGAA CAGCTCGTCG	CCAAGTACTC GCCTTCTTGG	ATCAGCCATC GCACGCCGAA	ACTAATAAAC CCTCTTCTCG	GAATTAAC ATC
14-1 Klon 38	CCA CCATGTCCAG CGGAAGACTG TTGTGCCAAG TGTGTCACAA	TGGCTTCATA AGTGCGGASA CCGAGGCCAT CCATCGACCT GAGTGGCCAG	CTGCTCGGCG ACACAATCAA CGACATTCTG ACGCCACCTC GAAGACCCTG	CTCCAATTCT GATGTTAAC AAGCTCATGT GAGGAGAATG ATC	TGGGCAACCC CCCTCGGATT CCTCTACATT TCAAGAACGC	AGTGACCYYA AATCTCGGCC TTTGGTTGCG CGTCAAGAAT
14-2 Klon 41	CCATG	GCTGAGCAGC	TACACAATTA	ACAACACACG	TCGATC	

14-5 Klon 51	CCAT GCTAGTCCTC	GGCTGACGAA CAGCTCGTCG	CCAAGTACTC GCCTTCTTGG	ATCAGCCATC GCACGCCGAA	ACTAATAAAC CCTCTTCTCG	GAATTAAC TA ATC
14-7 Klon 72	CCATGGC CCAGAGCGCG ACCGCCGAGG CAGGCTATCG	TCGTACTGCT GAgAACACAA CCATTGACAT ATC	CCGAAC TTCA CCAAGATGTC ATTGAAGCTC	ATTCTTGGGC AACTCTCTTG ATGTCCTCGA	AACCCGGTTA GTCTCATCTC CATTCTTGGT	CCAACCATGT CTCCAGGAAG CGCGTTGTGC
14-10 Klon 112	CC	ATGGCTACAG	TAAGAAATGG	TGATCGTGTG	CTGGGTGCCC	CGATC
14-11 Klon 116	CCATGG	CTTCTTATGA	CCAACAATTC	AAGGTTCTCG	AGGTACCTCC	GATC
14-12 Klon 128	CCATG GTAGCCCGTG	GCTAAGATGG TAGACGCCGA	TGCCGTCGTC TC	GGGGATGGCG	AGCGCGGTGG	CGAGCAGGGA
8-1 Klon 00	CCATGGTCTG	CCGCTAGCTC	TTGGCCTCCT	CCTAGTTTGC	TCGATC	
8-2 Klon 03	G GCTAGTTAAT	ATCGAGAAGA TCGTTTATTA	GGTTCGGCGT GTGATGGCTG	GCCCAAGAAG ATGAGTACTT	GCCGACGAGC GGTTCGTCGC	TGGAGGACTA CCATGG
8-3 Klon 08	G GCTAGTTAAT TGG	ATCGAGAAGA TCGTTTATTA	GGTTCGGCGT GTGATGGCTG	GCCCAAGAAG ATGAGTACTT	GCCGACGAGC GGTTCGTTGC	TGGAGGACTA TGGTCGACCA
8-4 Klon 09	GAT ATGTCAATGG TTGTGTTGCT GAGCAGTACG	CGATAGCCTG CCTCGGCGGT CCGCGCTCTG AGACCATGG	GCACAACGCG CTTCCTGGAG GACATGGTTG	ACCAAGAATG GAGATGAGAC GTAACCGGGT	TCGAGGACAT CAAGAGAGTT TGCCCAAGAA	GAGCTTCAAT GACATCTTGG TTGAAGTTCTG
8-8 Klon 21	CCATGGTCAC TACATCTCAA ATTGGCTTGT AGGAGCTCCT AAGTAGACAG	CAGCAACAAT CCAAGCCAGT TCCTGTCTT CAATTTTCTG TCATGTCTGC	CACAAGGTTT CATGTTCTTC CAACACAAAT GTGGAAGGCG TCCAGGAGAG	GCCAAGTCCT ACGCGGTCAA TTGTGTTTCA GTGAGCCTCT ACAATGTTGA	TCAGATGTGC GACGAGCCAT CGTTCTCAAC TGTCAGTCTC ACTTAGGATC	GTTCTTTCCG TGAAAAGATG ATCGCTGTAC GGTATATGGG
11-3 Klon 361	CCATGG ACCAGGGAGG	GGCTGTTCCC AAGACAAGAG	GCAGAGCGCC CCAGCTCACC	GGCCTGCACG ATCTTCTATG	ACGCCGCCGC GTGGGAAGGT	CCCCGATGCT GATC
N12-1 Klon 215	GATCTAAGGC AAATATCTAG	AAGAACTAAA CTTTTGATGG	CTAGCCTTGC CAATTAAGCA	TAAGCAAGGT TGTAACCGTT	TAGGCGTTTG GTCAAAACCT	GTAAAGATAA TGCCCATGG
N12-6 Klon 19	GATCGACG TGAATGAATA AAGAACTAAA CTTTTGATGG	GACGAGCTAC AGGCCCCAGC CTAGCCTTGC CAATTAAGCA	TACCTACTAG TGAACCTGTG TAAGCAAGGT TGTaACCGTT	TCGGCAGCGC GCCAATATAG TAGGCGTTTG GTCAAGACCT	TCGCAAGCAC GGTATGTTTG GTAAAGATAA TGCCCATGG	GACAAGTACG GATCTAAGGC AAATATCTAG
N12-7 Klon 20	CCATGGGCAG	GGGCTACAGA	AGTACAAGCG	CAATTCGCCG	TAGATTCTCC	GATC
N16-1 Klon 0	CCATAGGCCG	AGGTTGTCCG	ACTTGTCCGT	CACCTTGATC		
N16-2 Klon 1	CCATGGCCTG	TCGCGTGTTT	TTCATaGATC			
N16-8 Klon 7	CCATGGCCGC	GTAGTCCACG	TAAAAGGCCT	CGTTCGGCTG	CCTCGCCCCG	TC
N5-2 Klon 178	CCATGGTAAT	GGCAACCCTC	AGGCAAATAC	GCGCGTGATC		
N5-5 Klon 272	CCATGGTATA	TGAACGAGTC	GATGATGCCA	GCGACAGTGA	AGATC	
N5-7 Klon 182	CC CGGCCGTTGA	ATGGTATTGC AGATC	ATTCACATCG	ATCATGCCCA	CCACCCCAT	CATCGCCGTC
N5-8 Klon 263	GATCTTCTTA AAAGATGTTG CGCAAGTTAT	TTGAATTCCA AGATGGGCTT ACCATGG	CCAGCCTGTT TGACATTACT	CGCGAAGAGA CACACAAAGC	AAAAGAAGGA ACAAGGGACA	GATTGAAGGC GTATGCACTC
N7-4 Klon 238	CCATGGTGT ACCGGATC	GCCCATGCCG	GCgAGGGCCG	ACCGTATGCT	GCTCCTCCTC	AACACCCAGA
N7-5 Klon 241	GATCCGCT CCGTACACGT TGGAACAGGT	CGTACTCGCC CGGCGCCGCC GGTGGTGGTG	CTCGTTGCCG GTCAGCGGCG CTTCTCCTCC	GTGCCGGTCA GGCTGGAAGT ACCATGG	CCACCGTCTC CCTCGCCCTC	GGTCGAGTAC CTTCTTGTGG
N8-8 Klon 197	CCATGGTCAC TCCCGGACAG	CACCGGCTTA ATC	CGGTACTCCT	CCACCATcCG	CTTCACGGCA	TCCAAATGGC
N8-10 Klon 198	GA TGACAAGGGG	TCGTGCGTAC GGAACATACA	GTGCAGGCGC TATATGGCGG	AcTTAGCTCC CGACCATGG	ACCTTTGCAT	CCGGGAGGAG

N8-12 Klon 357	CCATGGTCAG GGGCTACAGA AGTACAAGCG CAATTCGCCG TAGATTCTCC GATC
N8-13 Klon 293	CCA TGGTCCTCAT CAAGATGCGT GAGATCGGTC TCTACACGGT GCTTCCCTGA GGAGATTCCA TTAATTCGC CGATC
N9-2 Klon 226	CCATGGGAAT GGCAACCCTC AAGCAAATAC GCGCGTGATC
N9-6 Klon 103	G ATCTCGTCTG TCTAGTCGTC CCTCCTTGCT TGTGTGGGTT CTTTAAATTC TTCTCCGTGC ATGCCGATGA AGTGATGATG CAAATTCCTC TGTGGTTCCC ATGG
N9-9 Klon 29	GATCGGTCGA CGATGAACAG CGATAAGATT CCATCCATGG
N9-11 Klon 201	CC ATGGGAATCT CAGCACCCCTT GAAGCCATAG TCCAAACTTG GGTTCGCGCC GCCGGAGAGG TTGGAAGGCA GACCGTTGTT GTAGAAGTCA TTACTAGCT CTGAGAACTG GGCAAACATG AGTTTACCGA TC

Tab. 7.3 Primer für (SMART™-) RT-PCR. *Annealing*-Temperatur nach Herstellerangaben (MWG Biotech).

RT-Primer	Sequenz (5'-3')	<i>annealing</i> -Temperatur (°C)
5-3rev	TGCTGCCATTTAACAGCTCAGG	60.3
5-3for	GTTCTGGGACCTTTGGTACTGTTTA	61.3
11-8for	CACTAGGTGCTGTGCGGAATGC	64.0
11-8rev	CGTCCCTTTTGCCAGGAAGTTG	62.1
11-10for	TTGATCCGCATGAAGGACAGGT	60.3
11-10rev	TTGATCCGCATGAAGGACAGGT	60.3
13b-11for	CAAGCCCAAGTGCTGTGTCACC	64.0
13b-11rev	CGACCCACTCATGTTGGTTTGC	62.1
chorisfor (11-7)	CCGAGATCCAGGAGTTCACGTC	64.0
chorisrev	TGGCTCAAATGGCACGATTTTACA	59.3
9-10for	GACGAGGGACCCCAGCTTCAA	63.7
9-10rev	CATGGGAATTATGGAACGGAACATTTG	61.9
n9-5for	GAGTGTGTCAGGAGCCTGCATCA	64.2
RT9-5rev	TCAACAAAGAGAGACGTGGCAACCA	63.0
8-5for	TCCACTGGTTCGACGTCCCCTCT	67.8
eaprev	CCATGGCCAGCCTCGTCCT	63.1
8a-6for	CTTGTTGAGGTCGTGCGGAGATC	62.1
8a-6rev	GCAGATGCCGCAGTACTTCTT	59.8
PALfor (14-16)	ACTGCTCGGAGCTCCAATTCTT	60.3
PALrev	TAGAGCTCCTGCTCGAATGTGG	62.1
8-8 = P23s (PAL 7)	AGTACACCGATCACTTGACCCACA	62.7
P23as	CACTAGCTCTGAGAACTGGGCAAAC	64.6
SuSyfor (8-8)	CCTAAGTTCAACATCGTCTCTCCTG	63.0
SuSyrev	TCCTCTTGAACCTCAGCCTGCTC	62.1
13a-2for	TCTTGGGAGATCTGTGCTTCG	59.8
13a-2rev	ACAAAATTTCCATGCGCTGTC	55.9
phosDfor (13b-10)	ACGCGTCCGAAAGAAGTAGGTT	60.3
phosDrev	TATGTTCCCGAGATGTCGAAC	60.3
ATPfor (13a-1)	CTGTGCAACTGCAAGGAGGA	59.4
ATPprev	GGGTCAATTGACCCATCTCCA	59.8
helicasefor (13a-12)	ATCTTGCGTGAAGCTGGACA	57.3
helicaserev	TGCTTAGTTCACTGTTTCGATTGG	59.3
13a-5for	GCAGAGCTCGTCCGCAAC	60.5
13a-5rev	CAGCCTCAGCGTTTCCTTGA	59.4
4-CLfor (13a-7)	GCCTTCATGGCCAAGATCC	58.8
4-CLrev	TCCTTGAGCCTGTCAACAATGA	58.4
8a-14for	CTTGTCAGGCTACCGTTTG	59.4
8a-14rev	ATCCAAGCAAGGGGTGAAG	56.7
8a-7for	GGCTCATGGGATGTTGCTCT	59.4
8a-7rev	TCAACGATTTCGGTCCCCTCT	57.3

LTPfor (8a-10)	GGCTGCTGTAGCGGAGTCAA	61.4
LTPrev	CAACAGTGAGCGGCCATGTA	59.4
8a-4for	AGGTGCCAAAACGAGGTTCA	57.3
8a-4rev	GTGGGTCTTGCAAGGATGGA	59.4
8a-1for	CTTTGGTGCCCCATTGACAT	57.3
8a-1rev	GACCTTGAGCGAGAGCCTGA	61.4
8-12for	CACGAGTGACTCTTGCGGTTGTTG	64.4
8-12rev	CATCAAGGCCAACGCACTACAAAAC	63.0
5-4for	CGCACCCCTCTCGCAAGTTC	63.5
5-4rev	CTGCGCCGAGCTGCCTACAGA	65.7
MAPKfor (13a-3)	GAACGAGGTTCTCCACTGCAAA	60.3
MAPKrev	TGCTTGGCAGGATCAACACCT	60.3
CCoAOMTfor (14-12)	ACCACCCATGGAACCTGATGAC	62.1
CCoAOMTrev	GAAGTCGCGGTAGTAGCGGATG	64.0
13b-9for (Pilz!)	ATGGCATGAACAATCGAGTCTTT	57.1
13b-9rev	GATCCCAGACTCCTATGATTGATA	59.3
9-3for (neu)	TGCTGGAAGATGGAGGAACA	57.9
n9-3rev	GGCTGCTCGAAGACTTGACGTGAT	64.4
Heps (14-15 u.a.)	GGGAAGCTGGCGGACGTATAA	61.8
Hepas	CCATCTTGAGCCGTCAGGTGATA	62.4
14-11for	GCACGAGCTAACAGCAAGCAA	59.8
14-11rev	TAGAGATTGAGCCCGGTCGTTC	62.1

Tab. 7.4 Primer für RACE Experimente.

RACE-Primer	Sequenz (5'-3')	<i>annealing</i> -Temperatur (°C)
5-4for (Immunophilin)	GGCGGAGCAACTCTCATATTCGA	63.0
n5-4for	CGCAGCAAGTTCGCCCAGTTA	61.8
5-4rev	CTGCGCCGAGCTGCCTACAGA	65.7
n5-4rev	CGACATCCTCGTCTGATTTGCTAGA	63.0
9-3for	CACGTCAAGTCTTCGGCAGCCAA	64.4
n9-3for	ACTACATGCTCCGGTCTATATTAAG	59.7
9-3rev	GTAGTCATGCAACTTCTTGCTGCTCGA	66.6
n9-3rev	GGCTGCTCGAAGACTTGACGTGAT	64.4
9-5for	GATCTCCCAAGCACATCCACTTC	62.7
n9-5for	GAGTGTGTCAGGAGCCTGCATCA	64.2
9-5rev	CTTGGCCATGGGAAGTGGATGTT	62.4
n9-5rev	GGAAGTGGATGTTGCTTGGGAGAT	62.7
5-8for	CACCAGCCTGTTTCGCGAAGAGA	64.0
n5-8for	TGAGATGGGCTTTGACATTACTACA	61.6
5-8rev	GTGTATACTGTCCCTTGCTTTGTGT	63.4
n5-8rev	AACAGGCTGGTGGAATTCA	54.5
Hepfor = Heps	GGGAAGCTGGCGGACGTATAA	61.8
nHepfor	GGCCAGTCAGCAAAGTATGATACCAA	63.2
Heprev = Hepas	CCATCTTGAGCCGTCAGGTGATA	62.4
nHeprev	CCTTGCGCTATGCCGACGTTGA	64.0
8a-65' (auch 1. iPCR)	GCGACGTGCACATGCTCTTCA	61.8
8a-6n5'	GAAGAACTCTAGCTGCGCGATGTA	62.7
8a-63'	ACCATCGCGCTGGGGAGCTACATGA	67.9
8a-6n3'	CATCTACGCCATCGTGGAGGCCTT	66.1
13a-5for	GCAGAGCTCGTCCGCAAC	60.5
nP450for	CGGATGGTCATCAGGAAACGCTGA	64.6
13a-5rev	CAGCCTCAGCGTTTCCTTGA	59.4
nP450rev	GGTTGCGGACGAGCTCTGCCAT	65.8
MAPKfor (13a-3)	GAACGAGGTTCTCCACTGCAAA	60.3
nMAPKfor	CATCGCTTGCTGCACGCAGGAA	64.0
MAPKrev	TGCTTGGCAGGATCAACACCT	60.3
nMAPKrev	AACCCCACTTGATAGAGGAAGCTAA	63.2

8-12for	CTACGGCGAATTGCGCTTGTA	59.8
n8-12for	GCGCTTGACTTCTGTAGCCTCTGT	64.6
8-12rev	CCATGGACAGGGGCTACAGAAGT	64.2
n8-12rev	GCGCAATTCGCCGTAGATTCTC	62.1
RK5' (8a-14)	GGGTGGTGCTGAGCAACGGCTTG	67.8
RK5'n	GCTGGGTCTCGCCATCCAAGTG	66.0
RK3'	GGCGTTGACCGTCGGCACCATC	65.8
RK3'n	GGCGGAAGATGGTACTCACGATG	64.2
5-3for	TAAACAGTACCAAAGGTCCCAGAA	59.3
n5-3for	ACCTAGTTCACGCAATCTTCAAG	59.3
5-3rev	CTTGAAGAATTGCGTGAAGTAGGT	59.3
n5-3rev	GTTCTGGGACCTTTGGTACTGTTTA	61.3
9-8for (=9-8s)	GGATGCGTATGGACAAGGTTCTGCAC	66.5
n9-8for	CGAGAGCGTAGTGTGTTAGTTCCAA	63.0
9-8rev	CTCTCGTCAGCACCACTTCGT	64.0
n9-8rev	CCATACGCATCCATACTCCAGAGA	62.7
9-10for	TCGGAGTTACCGCTCGTGACATAG	64.6
n9-10for (=9-10s)	CGGCGGCGAGGGAGGTTGTAACAT	67.8
9-10rev	CATGGGAATTATGGAACGGAACATTTG	61.9
n9-10rev	CGTCGTGTTGCGGGTCTATGTAC	64.2

Tab. 7.5 Primer für iPCR.

Primer		Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur (°C)
8a-6 1. iPCR	8a-65'	GCGACGTGCACATGCTCTTCA	61.8
	8a-65'n	GAAGAACTCTAGCTGCGCGATGTA	62.7
	8a-63'	ACCATCGCGCTGGGGAGCTACATGA	67.9
	8a-63'n	CATCTACGCCATCGTGGAGGCCCTT	66.1
2. iPCR	8a-65'	GCGACGTGCACATGCTCTTCA	61.8
	OPT5'n	CCGCCGGCCAGGAAGAAGTA	63.5
	8a-63'	s. 1 iPCR	
	8a-63'n	s. 1 iPCR	
3. iPCR	3.OPT5'	CGAAGGCGAGCGCGATGCAG	65.5
	3.OPT5'n	CGAAGCCCAGGCCCCAGCTGATA	67.8
	OPT3'	GCCTGCTGCCCGTCTGGATCCTA	78.0
	OPT3'n	GCCTTCTCGCAGATGAAACACCACG	76.0 (Euro-gentec)
(4. iPCR)	klon5685'	AGGAGGAGGATGGTGGCAGGGAGCTAA	69.5
	klon568n5'	TCGGGCAGGAGCGGCGGTGCT	71.4
	OPTeco72	GCCTGCTGCCCGTCTGGATCACTA	78.0
	OPTeco72n	GCCTTCTCGCAGATGAACACCACG	76.0 (Euro-gentec)
Heparanase 1. iPCR	Hep5'	CGACCCACGAGCCGACCATG	67.6
	Hep5'n	GTCGTTGTATCGTGAGCTGGAGA	62.4
	Hep3' (= Heps)	GGGAAGCTGGCGGACGTTAA	61.8
	Hep3'n	CAATACTTTCCTGGATAGCTTCTGG	61.3
2. iPCR	iHep5'	CCAATGGTTTGCTAGGGTTTTCATA	59.7
	iHep5'n	CTTGCAACCGATTCCACTTCCACTCAA	64.8
	Hep3'	s. 1 iPCR	
	Hep3'n	s. 1 iPCR	
8a-14 1. iPCR	8a-145'	CTGCACGAGGTTACGGTGTTTGATG	64.4
	8a-145'n	CCAATACTTACAATCTCCGCGACGA	63.0
	8a-143'	TGGCTATTGTCGGCGAAAAGATGA	61.0
	8a-143'n	GATGAGCTCATTTTGGTGTACGATTA	60.1
2. iPCR	RK5'	GGGTGGTGCTGAGCAACGGCTTG	67.8
	RK5'n	GCTGGGTCTCGCCATCCAAGTG	66.0
	RK3'	GGCGTTGACCGTCGGCACCATC	65.8
	RK3'n	GGCGGAAGATGGTACTCACGATG	64.2

(3. iPCR)	Reck2 (5')	AGTTAGGTGCTTACCGCTACTACGTG	64.8
	Reck1 (5'n)	TTTGGAGCGCGTCTGCGTAAGAGGATG	68.0
	Reck3 (3')	CCTCGACGGCGCGGCCACCATC	71.4
	Reck4 (3'n)	CCACCAGAAGGGCCACGCGTTCCA	69.6
9-5 1. iPCR	9-55'	ACAGCTGCAACGCCTCCAACCTCGA	66.1
	9-55'n	CTACTCTACCGGGCAGACAACGAT	64.6
	9-53'	GCGGGCTTGTCGTCGTCTAGTCA	66.0
	9-53'n	GAGAAGAAACCGATGAAATGTTGTGG	61.6
9-10 1. iPCR	9-105'	AATTGATGTCCCTGGTCGGCGAGA	64.4
	9-105'n	GGTGACCAGCGCCGCTTGAA	65.7
	9-103' (=9-10for)	TCGGAGTTACCGCTCGTGTACATAG	64.4
	9-103'n (=n9-10for)	CGGCGGCGAGGGAGGTTGTAACAT	67.8

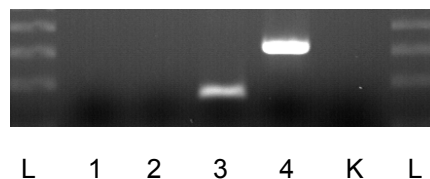


Abb. 7.1 PCR mit 13b-9 spezifischen Primern.

1 = genomische Gersten-DNA (cv. Ingrid), 2 = cDNA aus Gerste (cv. Ingrid),
3 = cDNA aus *Bgh*-inokulierter Gerste (cv. Ingrid), 4 = genomische DNA von *Bgh*,
K = Kontrolle (PCR ohne *template*), L = 1 kb plus Leiter

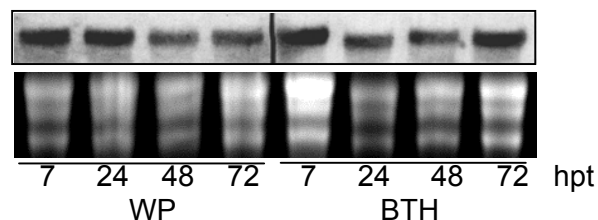


Abb. 7.2 Überprüfung der Transkriptakkumulation der MAP Kinase 13a-3 nach Behandlung von Gerste mit dem chemischen Resistenzinduktor BTH. Für die *Northern*-Analyse wurden 15 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gleichmäßige Beladung des Gels anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft (untere Abbildung).

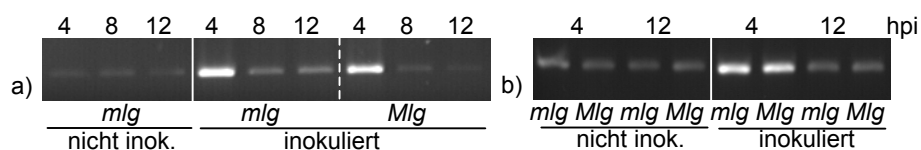


Abb. 7.3 SMARTTM RT-PCR (a) und *onestep* RT-PCR (b) im Vergleich für die 4-Cumaryl-CoA-Ligase (4-CL). Beide Darstellungsformen zeigten das gleiche Expressionsmuster. Die Transkripte der 4-CL akkumulieren 4 hpi sowohl in Ingrid (*mlg*) als auch in IWe (*Mlg*).

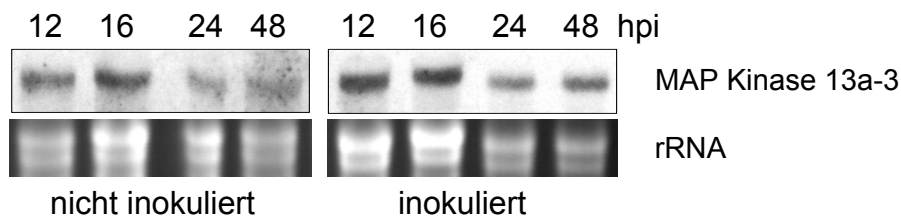


Abb. 7.4 Transkriptakkumulation der MAP Kinase 13a-3 nach Inokulation von 7 Tage alten Gerstenpflanzen (cv. MiGf) mit *Bgh* zu späteren Zeitpunkten (12-48 hpi). Die mit RT-PCR gezeigte Induktion (Abb. 3.12) hält bis mindestens 48 hpt an. Für die *Northern*-Analysen wurden 15 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gleichmäßige Beladung des Gels anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. hpi: h post Inokulation.

KTAAAL - THPSRKFGKNPPFSPEQTPAASMAKPGLLLCLLVAAALLLVASAKKSGDVSA
 LQIGVKYPESCSISAHKGDVRKVHYRGTLDGTVFDSSYERGDPIEFELGTGQVIKQWD
 QGILGMCIGEKRLKIPSKLGYGDQGSPTIPGGATLIFDTELAVNGEPSSKSDVDVAD
 SDL - AARRSKFAQLPNRIGLCIGELTLVGQTQ - DMNILLPWSNKGWLSKSNRSSDFSYP
 M - FSGIILISTMLHLLIVRGMVIKTSVHVDLDLKKKKKK

Abb. 7.5 Translation der Nukleotidsequenz von 5-4 mit Homologie zu Immunophilinen. Das putative Start-Codon ist fett eingezeichnet.

ENLSLCIGGEAPLYSWQPLANGAGAGEDLRAKDAIFSFDPLGPILVAETCYFFEHSFS - D
 SPRSPLGWL - SPGGESMRLWSLLLLLVCLPTLIMSEDYSDVTIVIRGSKTIAATSDEFIC
 ATVDWWPEKCNVDQCPWGKASILNMDLTNPLLAKAIQAFSPLRIRVGSLQDQVYETP
 NLGSPCRPFTKASSGLFGFSKGCITMERWDAMNDLFLNTGAVITFGLNALRGRKQIRKGV
 WGGAWNPSNAQEFMEYTVSMNYPIDSWEFNLSGSGIGASVGAEQYQKDLVELQKIVDQ
 LYENPSKPLVLAPGGFYDKQCFQALLDVSGPNVVRGMTHHIYNLGAENDPRVANRILDPQ
 YLSRVSDTFRDLQLTIQRHGPWSAPWGEAGGAYNSGSRTVSNTFLDSFWYLDQLGQSAK
 YDTKVYCRQTLIGGNYGLLDTDTYVPNPDIYSALLWHRLMGNGVLSIDFGSTSYLRAYAH
 CGKRKGIIALLINLSQNMGSMVTVRNDLVGIAQQGGDHKDSSFVHGLKRTVSWVGSKA
 SDGLEKREEYHLTAQDGNPLARTMLLNGVPLELTEDGDIPPMYPVQVSASSPIYVAPLSI
 AFVAFPDFEADAC - Q - STVVFR - DTMRDFQLQQYSPSPLYTDTDENDVLMCSAPIGPSYIE
 LLDVQHFHKKKKK

Abb. 7.6 Translation der Heparanasesequenz ohne Introns. Das putative Start-Codon ist fett eingezeichnet.

```

1  GAAAAACACAG CAGCAGCAGC CAAAGCCTGA GGCGAGCTAA GAAAGAGTTC
51 ACAGAGTTGA CGGAGGACAC AGCTGAACTA GCTAAGATTA TCTCAAACCTT
101 CGTTCGCATT ACTTCATCTT CCTCTAGACA CAGAGCTCGC CGGCGACATG
151 GASGCCATGG AGAGAGGCGA GCACGCGCCG CTCCTGCCCC AGGTAACGAT
201 TAGCTCCCTG CCACCATCCT CCTCCTCCTC CGCTGCCCCC TGTGTGTTCT
251 GGAAGGAGGA TCAGTACGAT GAAAACTGAA ATGCAAAATC CAGAAGACAA
301 GAAGAACATT GGGTAACTCC ATTAAATAGA CCGAGTCAAA CTTACAACAA
351 CACACGATTA ATTCATACGT GCGTGTGTAC GCCAGCATTA AAGGGTTTTTA
401 ACACGTGGTT AATACGTGCG TATCCAGGCC CCTTCCTTTC CTAATCACAC
451 AAGCACGTCC ACATCACAGT CTTGCTGCAG CATGCATCAT TTCCAGAACT
501 CGTCAATTCC TGCAACCTAT CTCTGTAAAA AACAAAAAAT GCGTGACATG
551 TACAGATTCT GTTCTGGCTG CTAACAATTC CTGTAATCTA TCTCTGTTGC
601 AGAGTCACGG CCCAGAGAGT CAAGAGGACG ATAGCCTGCA GCTGCAAGTG
651 CCGCTCCTGA AGCACAAGAA GCGCGGCGGC GCGCGCAGCA AGGCACCCGC
701 AGTAATTCTT TGTAAGCAAA ACCTCCATCT TTTGTGGAAA TTGTTTCTTC
751 AGTTAACAAA AATGTGGTTT AACTGAACTC TTTGCAATTG TCTGGTGCAG
801 TGTTCTGAATG CCTGGAGAGC ACGGCGTTCA ATGGCATCCC CACCAACCTG
851 GTGGTGTGTC TGGAGACTGT CCTCCACGGC AGCAACCTCG CCAGCGCCTC
901 CAACGTCGCC ACCTGGTTCG GCACCAGCTA CCTCACCCCA CTCTTCGGTG
951 CCATCATCGC CGACACCTTC TGGGGCAACT ACAACACCAT CCTTGTCTCC
1001 CTCGCCGTCT ACCTCCTCGG CATGATGCTC GTCACCTTCT CTGCGTTCCG
1051 GCCGACGACC ACGGCGGCGC TGTGCGCGGC GGGCGCGTCG TGCGTGGAA
1101 CCACCGGCAC GTGGGCGCTG AGCTCACAGA CCGTGGCTTT CATGGGGCTG
1151 TACCTCGTGG CGATCGGGTG CGGCGGGGTG CGCTCGTCTC TACTGCCATT
1201 CGGTGC GGAG CAGTACGACG ACGACAGCGT GGCTGACCGG GAGGGCAAGG
1251 CCTCCTTCTT CAGCTGGTTC TACCTCTGCG TGAGCTTCGG CCCCATCATC
1301 TCAGGCGTGT TCCTCGTCTG GATCCAGCAG AATATCAGCT GGGGCTGGG
1351 CTTCGGCATA GCCACCGCCT GCATCGCGCT CGCCTTCGCC GCCTTCGTGC
1401 TCGCCACGCC CGTGTACAAG CGCCGGATGC CCACCGGCAC GCCGCTCAAG
1451 AGCCTCTGCC AGGTCGTGCG CGCCGCGTGC AAGAAGATCA GCATCAAGGT
1501 GCGCGCCGAA GCGGACACCC TCTACGAGGT CAGCGACAAG ATCGACTCAC
1551 CCCAACCCTA GATCGCGCAC ACCAGCGGCT TCAAGTTTCT CGACAAGGCG
1601 GCGCTCGTCA CGCAGTCGGA CATGGAGGAG AGGCCGGAGG AAGCGACCTC
1651 GTGGAAGTTG TGCACCGTGA CTCAGGTGGA GGAGCTCAAG ATCCTGCTCC
1701 GCCTGCTGCC CGTCTGGATC ACTAGCGTCG TCGTGTCTTC GGCCTTCTCG
1751 CAGATGAACA CCACGTTCGT GCAGCAGGGC AGCGCCATGG GACATGACCA
1801 TCCTGTGCGT GCCGGTGCCC GCTGCGTCGC TGGCCTCCTT CGAGGTGATC
1851 TGCCTCATGA CATGGGTGCT CCTGTACAAC AAGGTGATCG TGTGCGCATT
1901 GAGGAGCTTC TCCTCCAGCG GTGACGGCGA GCCGTCGCCG CTGCAGCGGA
1951 TGGGGTGCCG GCGGCTCCTT CATGGCGCTC ACCATGGCGG TGGCGGCGCT
2001 CGTGGAAATC TCCTCCAGCG GTGACGGCGA GCCGTCGCCG TGCAGCGGAT
2051 GGGTGCCGGG CGGCTCCTCA TGGCGCTCAC CATGGCGGTG GCGGCGCTCG
2101 TGGAAATGAA GCGGCTGGAC AGTGCGGCGC GTGGGGAGGA GATCAGCATC
2151 TCGTGGCAGA TGCCGAGTA CTTCTTCCTG GCCGGCGGGG AGGTCTTCTG
2201 CTACATCGCG CACTAGAGTT CTTCTTCGAC GAGGCGCCGG ACACCATGAA
2251 GAGCATGTGC ACGTCGCTCG CTCTGCTCAC CATCGCGCTG GGGAGCTACA
2301 TGAGCTCCTT CATCTACGCC ATCGTGGAGG CCTTCACGGC GACGGGAGAC
2351 AGCCCCGGGT GGATCTCCGA CGACCTCAAC AAGGGCCACC TGGACTACTT
2401 CTTCTGGGCC ATGGCTGCAA TGTGCACGCT CAACTTCGTC GTGTACAGCG
2451 GCATCGTCAA GAACCTACAGG CTCAAGACCG TCATCTCGTG ATCGCTCGCG
2501 CAAGGATTCA GGATTCCATT ACATTACATT ACGTAGATTA GCTAGATTGC
2551 ACAATCGCCA ATTGGTGATG GGTGAACAGT AACTAGATAG TAGCCAGGTA
2601 CGTACGTATA TACACAAGAA ATAATAGGAA GAAAAATGTAA GGTACATACC
2651 TTTTTTTTTG TGATGGGACT ACAAATTAAA TGGATGGCAG AATCAATTTT
2701 TGGAAAAAAA AA

```

Abb. 7.7 Sequenz von 8a-6 (Oligopeptidtransporter) nach iPCR. Die Ausgangssequenz (fett) wurde durch RACE (kursiv) und iPCR verlängert. Ein durchgängiger ORF ist nicht vorhanden, mögliche Introns nicht lokalisiert.

KTAVEHVVGETT-FGPLPPVAMDMDQLCLMAVATILLTLILRQVLGGKGTGAKLPPGPWN
 LPVIGSLHHLVATKPPPHRALLSLSRRYGPVMLRLGEVNPVIVSTPEAAVLVLKTNDLT
 FATRTSGPTLDVVGSASEGIIIFAPYGEHWRQMRKVCVVELLSAMQVRRIQSIMQAEIAHL
 LESVAAASSASPFRSAVVDVGKGLARLTNNVIARAVFGGKSRQQEAYLRELGVMAILGGG
 FSLVDLFPSSRLVRWLSSSGRAMRRLHSRMQRILGDIIQDRKETRAPNGASDAATARDNE
 DLLDVLLRLGKQDALSFXLTSEIISAVIFDIFSAATDTTAATLEWAMAELVXNPQAMARA
 KLEVRQMLRHRRSSTITADLAGLHYLRMVIKETLRLHPSAPLIHRASQENCRVMGYDIP
 KGTAVMINAFVGRDPAHWGADAAEFRPERFQGTSEYSSQGPHEFVFPFAGRRQCPGA
 LFATTMLELVLANLLYHFDWAIPGGESPEAMDGEVFGIIVHTRSSLHLQASEACHLQDQ
 TTGVVS-KLITDNISGRSHMLKHPTSFIG-ASKL--YTK-CLFLQYLWGIKKKKKKR

Abb. 7.8 Aminosäuresequenz der Cytochrom P450 Monooxygenase (13a-5). Putative Start-Codons sind fett eingezeichnet.

KTSRRRILLQLKVPRHFITSVFNPRMAMMHMFLLILFLSAGVTLPPLPVAAADADGEQ
 FVYTGTGNSNLVDGAATITATGLVELTNATTHQKGHAFHPAPLRLRGSPDGTGTVRSFS
 VAFVCGIASSYTDSTHGLALVIAPGVRSLSAGLTDQYFGVTNAQNDGSAANHFAVELD
 TVQNIERDINNHHVGVNDINGLTSVVSHEAGYYDHRNGGGSQNVSLISRAAMQFWVDYDR
 VTTQIDVTMAPLWMARPSKPLSTTQNLSTVLAVEPSYIGFSSSTGPVNTRHYVLGWSLG
 IDGPAPAIDAAKLPKLPQLGPKPRSRVLEITLPIASAVVVLAVGIALVLLVRRRLRYTEV
 RGDWEMEFGPHRFAYKDLFQATKGFKDKHLLGAGGFSMVYKGVLPASGVEIAVKKVSHGS
KQGVKEFVAEIVSIGRIKHNRLVQLLGYCRRKDELILVYDYPNGSLDKYLYGHGDGDI
TLDWAQRLHVIKGVACGLHYLHERWEKVVIHRDVKTSNVLLDKGMNGRLGDFGLAKLYEH
GTNPQTTRVVGTTGYLAPELVRTGKATPLTDAFAFGTFMLEVACGRRPIKQDEQGNQILL
ADWLDHLHRESLIEAADPRLQHEYNSNEVCLILKIGLLCSHPSPSARPMQVQLQYLDG
ELPLPEMTRTTLSFNLLALKERKELQSMSSPFSSTALTVGTISDLSGGR-YSRCLILILY
 HVFSRILNTLKF-YYDA-I

Abb. 7.9 Aminosäuresequenz der Rezeptorkinase 8a-14. Putative Start-Codons sind fett eingezeichnet. Unterstrichen: Proteinkinase-Domäne

Tab. 7.6 Anzahl GFP-exprimierender Zellen pro Schuss mit der *Particle Inflow Gun* in RNAi Versuchen mit N9-10 dsRNA. TR: Thyroidrezeptor.

GFP-exprimierende Zellen/Schuss								
Versuch	TR dsRNA (Kontrolle)				N9-10 ds RNA			
	penetriert	abgewehrt	ohne Pilz	Gesamt	penetriert	abgewehrt	ohne Pilz	Gesamt
1	8	12	16	36	3	10	10	23
2	11	6	26	43	3	6	17	26
3	4	7	43	54	3	9	36	48
4	13	10	42	65	6	7	36	49
5	6	3	8	17	4	5	6	15
6	5	2	18	25	5	4	20	29
MW	7,8	6,7	25,5	40	4	6,8	20,8	31,7
SE	1,3	1,5	5,4	6,7	0,5	0,9	4,8	5,2
t-test (Vergleich Kontrolle/N9-10 dsRNA)				p =	0,036	0,862	0,035	0,060

Tab. 7.7 Anzahl GFP-exprimierender Zellen pro Schuss mit der *particle inflow gun* in RNAi Versuchen mit dsRNA der MAP Kinase 13a-3. TR: Thyroidrezeptor.

GFP-exprimierende Zellen/Schuss								
Versuch	TR dsRNA (Kontrolle)				MAPK ds RNA			
	penetriert	abgwehrt	ohne Pilz	Gesamt	penetriert	abgwehrt	ohne Pilz	Gesamt
1	5	10	13	28	9	9	15	33
2	6	4	26	36	8	2	32	42
3	11	5	11	27	19	8	18	45
4	6	3	24	33	6	3	25	34
5	10	4	17	31	16	4	26	46
MW	7,6	5,2	18,2	31	11,6	5,2	23,2	40
SE	1,1	1,1	2,6	1,5	2,2	1,3	2,7	2,5
t-test (Vergleich Kontrolle/MAPK dsRNA)				p =	0,047	1	0,030	0,049

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Christina Eckey
Geburtsdatum	04.07.1973
Geburtsort	Dortmund
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1980 - 1984	Grundschule in Lünen
1984 - 1993	Gymnasium Altlünen in Lünen

Studium und Beruf

Oktober 1993	Beginn des Biologiestudiums an der JLU Gießen
Oktober 1996 - April 1997	Auslandssemester an der <i>University of Edinburgh</i> , Schottland
1997 - 1998	Tätigkeit als studentische Hilfskraft
April 1998 - Mai 1999	Diplomarbeit bei Prof. Dr. van Bel am Institut für Botanik der JLU Gießen
Mai 1999 – Mai 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen
ab Mai 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen (Arbeitsgruppenleiterin)