

**Untersuchung der *Mlg*-vermittelten Resistenz durch Darstellung
differentieller Genaktivität im Pathosystem Gerste (*Hordeum
vulgare* L.) / Mehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*)**

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

Tag der Disputation: 13.12.2002

vorgelegt von
Diplom-Biologin Carin Jansen
aus Würselen

Gutachter: Prof. Dr. Hubert Felle
Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pflanze-Mikroorganismus-Interaktionen	1
1.2	Formen der Resistenz gegen phytopathogene Organismen	2
1.2.1	Nicht-Wirt-Resistenz	2
1.2.2	Wirt-Resistenz.....	2
1.2.2.1	Horizontale Resistenz.....	2
1.2.2.2	Vertikale Resistenz.....	2
1.2.3	Induzierte Resistenz (IR)	3
1.2.3.1	Biologisch induzierte Resistenz (bIR).....	3
1.2.3.2	Chemisch induzierte Resistenz (cIR)	4
1.3	Abwehrkomponenten	5
1.3.1	Präformierte Abwehrkomponenten.....	5
1.3.2	Induzierte Abwehrkomponenten.....	6
1.4	Signaltransduktionskaskaden der Pathogenabwehr	7
1.4.1	Resistenzgenprodukte	9
1.5	Das Pathosystem Gerste / Echter Gerstenmehltaupilz	11
1.5.1	Die Rassen-Sorten spezifische Resistenz der Gerste gegen <i>Bgh</i>	14
1.5.1.1	Die <i>Mla</i> -vermittelte Resistenz.....	14
1.5.1.2	Die <i>Mlg</i> -vermittelte Resistenz.....	15
1.5.2	Die Rassen unspezifische Resistenz der Gerste gegen <i>Bgh</i>	16
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Pflanzenmaterial	19
2.2	Pathogenmaterial	20
2.3	Behandlung des Pflanzenmaterials	21
2.3.1	Inokulation	21
2.3.2	Applikation eines chemischen Resistenzinduktors.....	21
2.3.3	Injektion von Glucoseoxidase.....	21
2.4	Mikroskopische Untersuchungen	22
2.5	RNA-Extraktion	22
2.5.1	Extraktion von Gesamt-RNA.....	22
2.5.2	Isolation von PolyA ⁺ -RNA	23
2.6	Durchführung der Suppressiven Subtraktionshybridisierungen (SSH)	23
2.6.1	Herstellung von cDNA-Banken.....	23

2.6.2	RsaI-Verdau der SMART-cDNAs.....	26
2.6.3	Aufreinigung der geschnittenen cDNAs.....	27
2.6.4	Adaptorligation und Ligationseffizienzanalyse.....	27
2.6.5	Durchführung der subtraktiven Hybridisierungen.....	27
2.6.6	Suppressions-PCR	28
2.6.7	Klonierung der PCR-Produkte.....	28
2.7	Identifizierung differentiell exprimierter Gene.....	30
2.7.1	Kolonie-PCR	30
2.7.2	Reverse Northern Dot Blots	31
2.8	Identifizierung von Resistenzgen-Analoga (RGA) in SMARTTM-cDNAs	32
2.8.1	Durchführung der RGA-PCRs.....	32
2.8.2	Klonierung der cDNA-Fragmente	33
2.9	Plasmidpräparation	33
2.9.1	Mini-Plasmidpräparation	33
2.9.2	Midi-Plasmidpräparation	34
2.10	Sequenzierung und GenBank Sequenzvergleiche.....	34
2.11	Überprüfung der differentiellen Expression auf Transkriptionsebene...36	
2.11.1	<i>Northern</i> -Analysen	36
2.11.1.1	Denaturierende Agarosegele	36
2.11.1.2	<i>Northern</i> Blotting	36
2.11.1.3	Sondenherstellung	36
2.11.1.4	<i>Northern</i> Hybridisierung und Detektion der Hybridisierungssignale	37
2.11.2	RT-PCR	38
2.11.3	„SMART TM -RT-PCR“	39
2.12	Verlängerung der ESTs.....	40
2.12.1	RACE-Experimente.....	40
2.12.2	Inverse PCR (iPCR).....	41
2.12.2.1	Herstellung von Restriktionsbanken.....	42
2.12.2.2	Durchführung der inversen PCRs.....	42
2.13	Genfunktionsanalyse mittels Transienter Transformation	44
2.13.1	Herstellung doppelsträngiger RNA	44
2.13.2	Beschichtung der <i>Microcarrier</i>	45
2.13.3	Beschießen der Gerstenblätter	46
2.13.4	Inokulation der Blattsegmente.....	46
2.13.5	Mikroskopische Auswertung der transienten Transformation	46

3	ERGEBNISSE.....	48
3.1	Zytologische Analyse der Interaktion zwischen Gerste und <i>BghA6</i>	48
3.2	Isolierung differentiell exprimierter Gerstengene mittels Suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH)	49
3.3	Überprüfung der Genexpression auf Transkriptionsebene	54
3.3.1	Genexpression nach Inokulation mit <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (<i>Bgh</i>) und <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>titici</i> (<i>Bgt</i>).....	54
3.3.2	Genexpression nach chemischer Induktion	57
3.4	Charakterisierung von <i>Pl074</i>	58
3.4.1	Expression von <i>Pl074</i> in <i>Mlg</i> - und <i>mlg</i> -tragenden Linien.....	58
3.4.2	Expression von <i>Pl074</i> in <i>Mla</i> - und <i>mlo</i> -tragenden Linien.....	60
3.4.3	Expression von <i>Pl074</i> nach Injektion von Glukose/Glukoseoxidase	61
3.4.4	Gewebespezifische Expression von <i>Pl074</i>	62
3.4.5	Expression von <i>Pl074</i> durch <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>titici</i>	62
3.5	Isolierung differentiell exprimierter Gerstengene mittels eines Kandidatengenansatzes.....	64
3.6	Überprüfung der Genexpression auf Transkriptionsebene	65
3.6.1	Genexpression durch <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (<i>Bgh</i>) und <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>titici</i> (<i>Bgt</i>).....	65
3.6.2	Genexpression nach chemischer Induktion	68
3.7	Charakterisierung von <i>Poly 85</i>.....	69
3.7.1	Expression von <i>Poly 85</i> in <i>Mlg</i> - und <i>mlg</i> -tragenden Linien.....	69
3.7.2	Expression von <i>Poly 85</i> nach Inokulation mit <i>Bgt</i>	70
3.7.3	Gewebespezifische Expression von <i>Poly 85</i> nach Inokulation mit <i>Bgh</i>	71
3.7.4	Expression von <i>Poly 85</i> in <i>Mla</i> -tragenden Linien	71
3.8	Verlängerung der Klone <i>Poly 4-1</i>, <i>Poly 85</i> und <i>Poly 103</i>	72
3.9	Transiente RNA Interferenz (RNAi) in Gerstenblättern zur Untersuchung des Einflusses ausgewählter Gene auf die Interaktion von Gerste mit Echtem Gerstenmehltaupilz	76
3.9.1	RNAi mit <i>Poly 4-1</i>	76
3.9.2	RNAi mit <i>Poly 85</i>	77
3.9.3	RNAi mit <i>Poly 103</i>	78

4	DISKUSSION.....	79
4.1	Die frühe Gerste - <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> Interaktion.....	79
4.2	Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH) als Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gerstengene.....	81
4.3	PCR als Methode zur Isolierung von Resistenzgenanaloga aus Gerste ..	85
4.4	Identifizierung Mehltaupilz-induzierter Gene der Gerste	87
4.4.1	WIR1- und WCI5-Homologe	88
4.4.2	Proteine mit Restistenzgen-Motiven	90
4.4.3	Phosphatasen	92
4.4.4	Chlorophyll a/b Bindeprotein	93
4.4.5	Aktin	94
4.4.6	ERD1-Homolog.....	95
4.4.7	Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL).....	96
4.4.8	Cu ²⁺ -bindendes Protein.....	97
4.5	Charakterisierung des PI074	99
4.6	Expression der Gene nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen <i>Bgt</i>	101
4.7	Expression der Gene nach chemischer Induktion mit BTH.....	103
4.8	Funktionsanalyse ausgewählter Gene mittels Transienter Transformation	105
4.9	Abschließende Betrachtungen	107
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6	SUMMARY	110
7	LITERATUR.....	111
8	ANHANG.....	129

Abkürzungen

A. bidest	<i>Aqua bidestilata</i> , hier: entionisiertes und von organischen Bestandteilen befreites Wasser, MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn)
A. bidest _{DEPC}	<i>Aqua bidestilata</i> , über Nacht mit Diethylpyrokarbonat behandelt und anschließend autoklaviert
A. dest	<i>Aqua destilata</i> , destilliertes Wasser
Avr	Avirulenz
BCI	<i>barley chemically induced</i> , in Gerste chemisch induzierte
Bgh	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> , Echter Gerstenmehltaupilz,
BghA6	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> , Rasse A6
Bgt	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> , Echter Weizenmehltaupilz,
bIR	<i>biologically induced resistance</i> , Biologisch Induzierte Resistenz
bp	<i>base pair</i> (Basenpaar)
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester, Bion [®]
cDNA	<i>copy</i> -DNA (aus mRNA synthetisierte DNA)
cIR	<i>chemically induced resistance</i> , chemisch Induzierte Resistenz
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
DNA	<i>2'-deoxyribonucleic acid</i> (2'-Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	2'-desoxy-Nukleosid-triphosphat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsRNA	doppelsträngige RNA
ERD	<i>early responsive to dehydration</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
f.sp.	<i>formae specialis</i>
Gbp	Gigabasenpaare (10 ⁹ bp)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
hpi	<i>hours post inoculation</i> , Stunden nach Inokulation
hpt	<i>hours post treatment</i> , Stunden nach Behandlung
HR	Hypersensitive Reaktion
I	Gerstenkultivar Ingrid
iPCR	inverse PCR
IR	<i>induced resistance</i> , Induzierte Resistenz
ISR	<i>induced systemic resistance</i> , Induzierte Systemische Resistenz
IWe	Gerstenkultivar Ingrid-Weihenstephan
LAR	<i>localized acquired resistance</i> , lokal erworbene Resistenz
LRR	<i>leucine rich repeat</i> , Leucin-reiche Region
LZ	Leucinzipper
Mi	Gerstenkultivar Manchuria _{isogen}
MiGf	Gerstenkultivar Manchuria _{isogen} -Goldfoil
mock	Schein-
MOPS	Morpholin-3-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
NBS	Nukleotidbindestelle
NTP	Nukleosidtriphosphat (ATP, TTP, CTP, GTP)
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
P	Gerstenkultivar Pallas
PAL	Phenylalanin Ammonium-Lyase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDe	Gerstenkultivar Pallas-Deba
PR	<i>pathogenesis related</i> , Pathogenese bedingte

RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
Rar	<i>required for Mla specified resistance</i> , Gen, das für <i>Mla</i> -vermittelte Resistenz benötigt wird
RCI	<i>rice chemically induced</i> , in Reis chemisch induzierte
RGA	Resistenzgenanaloga
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROI	<i>reactive oxygen intermediates</i> , Reaktive Sauerstoff Intermediate
Ror	<i>required for mlo-specified resistance</i> , Gen, das für die <i>mlo</i> -vermittelte Resistenz benötigt wird
RT-PCR	<i>reverse transcription-PCR</i>
S	Gerstenkultivar Siri
SA	Salicylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i> , systemisch erworbene Resistenz
SDe	Gerstenkultivar Siri-Deba
SMART	<i>Switching Mechanism At 5' end of the RNA Transcript</i>
SSH	Suppressive Subtraktionshybridisierung
TIR	Toll/Interleukin-Rezeptor
WCI	<i>wheat chemically induced</i> , in Weizen chemisch induzierte,
WIR	<i>wheat induced resistance</i> , hier: durch <i>Bgh</i> in Weizen induzierte
WP	<i>wettable powder</i> , Leerformulierung

1 Einleitung

Die Phytopathologie ist der Bestandteil der Phytomedizin, der sich mit der Diagnose, Erforschung, Verhütung und Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten befasst, die durch Viren, Bakterien und Pilze oder parasitische Blütenpflanzen hervorgerufen werden (Schlösser 1997). Das Auftreten von Krankheitssymptomen kann zur Verringerung von Ernteerträgen oder Minderung der Qualität des Ernteguts führen. Trotz intensiver Pflanzenschutzmaßnahmen sind die Ernteverluste bei Nahrungspflanzen in den letzten 20 Jahren mit 50 % des potentiellen Ertrags konstant hoch geblieben (Oerke und Dehne 1997), so dass ein unverminderter Bedarf an neuen Pflanzenschutzstrategien besteht. Voraussetzung zur Entwicklung solcher Konzepte ist die genaue Kenntnis der physiologisch-biochemischen Vorgänge von Wirt-Parasit-Interaktionen aber auch ihrer genetischen Determinanten, um sie zu Gunsten der Nutzpflanzen beeinflussen zu können.

1.1 Pflanze-Mikroorganismus-Interaktionen

Bei der Wechselbeziehung einer Pflanze mit einem Mikroorganismus (Virus, Bakterium, Pilz) unterscheidet man zwischen einer kompatiblen (verträglichen) und einer inkompatiblen (unverträglichen) Interaktion. Im Fall der Kompatibilität wird der Mikroorganismus als virulentes Pathogen bezeichnet, da er in der Lage ist, die Pflanze, den Wirt, erfolgreich zu besiedeln, sich auf oder in ihr zu vermehren und dabei eine Schädigung hervorzurufen. Einen Sonderfall der Kompatibilität stellt die Toleranz dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Pflanze trotz massiven Befalls durch ein Pathogen keine starken Krankheitssymptome und keine deutliche Reduktion im Ertrag zeigt (Agrios 1997; Schlösser 1997).

Der Regelfall zwischen Pflanzen und phytopathogenen Mikroorganismen ist allerdings die Inkompatibilität, auch Basisresistenz genannt. Hier führen passive aber auch unspezifische, induzierte Abwehrmechanismen der Pflanze dazu, dass ihre Besiedelung durch angreifende Mikroorganismen erfolgreich verhindert wird. Gelingt es dem Pathogen, durch evolutive Veränderungen, diese Abwehr zu überwinden, spricht man von Basiskompatibilität. Diese kann durch Rassen-Sorten-spezifische Mechanismen von Seiten der Pflanze wieder zur Inkompatibilität umgekehrt werden.

1.2 Formen der Resistenz gegen phytopathogene Organismen

1.2.1 Nicht-Wirt-Resistenz

Die meisten Mikroorganismen, mit denen eine Pflanze in Kontakt kommt, sind nicht in der Lage, diese zu besiedeln und sich auf ihr zu vermehren. Dieser Zustand der Pflanze wird als Nicht-Wirt-Resistenz bezeichnet, und ist eine meist durch viele genetische Faktoren (poly- oder multigen) determinierte Basisresistenz, die sich dadurch auszeichnet, dass alle Genotypen einer Pflanzenart gegenüber allen Genotypen eines potentiellen Pathogens dauerhaft resistent sind (Heath 1991). Der Grund hierfür kann zum einen auf Seiten des Pathogens liegen, wenn dessen Physiologie oder Umweltansprüche dem Befall der Pflanze entgegenstehen. Seitens der Pflanze können eine Reihe konstitutiver Abwehrmechanismen, wie mechanische Barrieren und biochemische Komponenten die Basisresistenz bedingen, oder unspezifische induzierte Komponenten zu dieser Form der Resistenz führen (Schlösser 1997, vgl. 1.4.)

1.2.2 Wirt-Resistenz

1.2.2.1 Horizontale Resistenz

Dieser auch als quantitative Resistenz bezeichnete Zustand der Pflanze steht ebenso wie die Nicht-Wirt-Resistenz unter komplexer genetischer Kontrolle. Er verleiht einem Genotypen einer Pflanzenart partielle Resistenz gegenüber einigen, wenn nicht sogar allen Rassen eines Pathogens und ist somit rassenunspezifisch (Schlösser 1997). Diese dauerhafte Resistenz ist allerdings meist unvollständig und umfasst z.B. die altersbedingte Resistenz, deren Wirkmechanismen noch unbekannt sind.

1.2.2.2 Vertikale Resistenz

Im Laufe der Evolution kann ein Pathogen die Nicht-Wirt-Resistenz einer Pflanze durchbrechen, so dass ein Zustand der Basiskompatibilität entsteht. Durch spezifische Mechanismen seitens der Pflanze kann daraus eine vertikale Resistenz entstehen, die dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Genotyp einer Pflanzersart gegenüber einer physiologischen Rasse des Pathogens resistent ist. Daher spricht man auch von Rassen-Sorten-spezifischer Resistenz, die mit dem Gen-für-Gen-Modell von Flor (Flor 1971) beschrieben werden kann. Demzufolge existieren auf Seiten der Pflanze Genprodukte sogenannter Resistenzgene, die als Rezeptoren fungieren und mit korrespondierenden Produkten von Avirulenzgenen (Elicitoren) des

Pathogens direkt oder indirekt interagieren (Heath 1991). Diese spezifische Erkennung führt zur Auslösung von Abwehrmechanismen und damit zur Resistenz der Pflanze gegenüber dieser Erregerrasse. Eine Mutation des Resistenz- oder Avirulenzgens kann dazu führen, dass das Pathogen nicht mehr durch die Pflanze erkannt wird, Abwehrmechanismen nicht angeschaltet werden, und das Pathogen virulent wird (de Wit 1992).

1.2.3 Induzierte Resistenz (IR)

Die wichtigsten Formen der induzierten Resistenz, die biologisch und die chemisch induzierte Resistenz, führen dazu, dass die Pflanze eine verstärkte Widerstandsfähigkeit gegenüber einem breiten Pathogenspektrum (Viren, Bakterien, Pilze) erwirbt (Kessmann *et al.* 1994, Sticher *et al.* 1997). Dies kann sowohl durch Auslösung und Verstärkung zellulärer Abwehrmechanismen geschehen, aber auch durch die erhöhte Bereitschaft der Pflanze, schneller und stärker auf eine Pathogenattacke zu reagieren. Diese erhöhte Abwehrbereitschaft wird Sensibilisierung oder auch *priming* genannt (Kohler *et al.* 2002, Conrath *et al.* 2002). Der durch IR erworbene quantitative Schutz gegen pathogene Organismen setzt in der Regel einige Tage nach der Induktion ein und kann mehrere Tage bis Monate andauern (Hammerschmidt 1993).

1.2.3.1 Biologisch induzierte Resistenz (bIR)

Die biologisch induzierte Resistenz kann entweder durch virulente oder avirulente Formen eines Pathogens oder durch nichtpathogene Rhizobakterien ausgelöst werden. Im ersten Fall führt die Attacke des Pathogens, wenn die Resistenz auf den infizierten Bereich der Pflanze begrenzt bleibt, zu einer LAR (*localized acquired resistance*, lokal erworbene Resistenz). Breitet sich die Resistenz jedoch innerhalb der Pflanze aus, spricht man von SAR (*systemic acquired resistance*, systemisch erworbene Resistenz) (van Loon *et al.* 1998).

LAR konnte bislang in Gerste (Ouchi *et al.* 1974), Reis (Horino 1976) und Weizen (Schweizer *et al.* 1989) gezeigt werden. In Weizen wurden vier sogenannte *WIR*-Gene (*wheat induced resistance*) isoliert, die nach Infektion mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) exprimiert wurden und mit dem Resistenz-Status gegenüber *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) korrelierten (Schweizer *et al.* 1989).

Die SAR wird häufig durch nekrotisierende Pathogene ausgelöst und kann in dikotylen Pflanzen nur unter Akkumulation von Salicylsäure ausgeprägt werden (van Loon *et al.* 1998). Durch Pfropfungsexperimente an Tabakpflanzen von Vernooij und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass Salicylsäure allerdings nicht das systemische Signal der SAR ist. Dabei

wurden Teile transgener Pflanzen verwendet, die das *nahG*-Gen exprimierten, das für eine Salicylsäure-Hydroxylase codiert, die SA zum Catechol metabolisiert. Wurzelstöcke, die mit dem *nahG*-Gen transformiert waren, konnten in aufgepfropften Teilen untransformierter Pflanzen SAR induzieren, während *nahG*-Pfropfstöcke unfähig waren, Resistenz aufzubauen, unabhängig vom verwendeten Wurzelstock (Vernooij *et al.* 1994). Welches Molekül die systemische Weiterleitung bewerkstelligt ist bis dato ungeklärt (Ryals *et al.* 1996). Bei der SAR wird eine Reihe von Proteinen gebildet, von denen einige zu den PR-Proteinen (s.1.3.2) gehören und direkte antimikrobielle Wirkung besitzen (Ward *et al.* 1991).

Die durch nichtpathogene Rhizobakterien (hauptsächlich Pseudomonaden) ausgelöste Resistenz wirkt systemisch und schützt in vielen Fällen auch gegen den Befall durch Blattpathogene. Daher wird sie als induzierte systemische Resistenz (ISR) bezeichnet. Bislang konnte das Phänomen der ISR nicht in monokotylen Pflanzen nachgewiesen werden (van Loon *et al.* 1998). Die Signalkaskaden der ISR und der SAR schienen zunächst nicht miteinander verknüpft zu sein, da SAR über einen Salicylsäure-abhängigen Weg läuft und ISR nur über Jasmonat und Ethylen reguliert zu sein schien (van Wees *et al.* 2000). Inzwischen ist aber bekannt, dass einige der wurzelbesiedelnden Pseudomonaden Salicylsäure (SA) ausscheiden und so eventuell Resistenz induzieren. Ausserdem konnte in SA-defizienten Bohnenpflanzen im Gegensatz zu Wildtyppflanzen keine Resistenz gegen *Botrytis cinerea* durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufen werden. Hinzu kommt, dass ein gemeinsames Element der beiden Signalwege in *Arabidopsis*, nämlich NPR1, identifiziert werden konnte (Cao *et al.* 1997), so dass der SAR- und der ISR-Signalweg vielleicht in einigen aber nicht allen Pflanzenspezies voneinander getrennt sind (M. Höfte, pers. Mitteilung).

1.2.3.2 Chemisch induzierte Resistenz (cIR)

Neben biotischen Induktoren können auch natürlich vorkommende und synthetische Substanzen eine partielle Resistenz in Pflanzen induzieren. Zu diesen gehören Salicylsäure, 2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester (BTH) (Kessmann *et al.* 1994; Kogel *et al.* 1994), wobei die beiden letztgenannten in di- und monokotylen Pflanzen als potenteste Resistenzinduktoren gelten (Kogel *et al.* 1994; Görlach *et al.* 1996; Sticher *et al.* 1997). Als Kriterien für cIR-Induktoren wurden folgende Punkte festgelegt: 1) cIR-Induktoren sollen Resistenz gegenüber demselben Pathogenspektrum vermitteln wie bIR. 2) Sie sollen die gleichen biochemischen Marker induzieren wie bIR. 3) Es soll keine direkte antimikrobielle Wirkung von cIR-Induktoren ausgehen (Kessmann *et al.* 1994). Diese Kriterien sind zumindest in dikotylen Pflanzen für DCINA und

BTH erfüllt (Friedrich *et al.* 1996, Lawton *et al.* 1996, Ward *et al.* 1991).

In Weizen, Gerste und Reis konnten nach chemischer Resistenzinduktion mit BTH bzw. DCINA Gene isoliert werden, die eine veränderte Expression gegenüber nicht-behandelten Pflanzen zeigten (Görlach *et al.* 1996, Schaffrath *et al.* 2000; Beßer *et al.* 2000). Diese mit *WCI-* (*w*heat *c*hemically *i*nduced), *BCI-* (*b*arley *c*hemically *i*nduced) und *RCI-* (*r*ice *c*hemically *i*nduced) bezeichneten Gene umfassen ein breites Spektrum und ihre Bedeutung für die cIR konnte bislang nicht umfassend geklärt werden. Für eines der *BCI*-Gene (*BCI-4*) konnte gezeigt werden, dass die transiente Überexpression in Blättern anfälliger Gerstenlinien zu einer deutlichen Reduktion der Penetrationseffizienz von *Bgh* führte (Beßer 2001). Vier der fünf *WCI*-Gene als auch die neun *BCI*-Gene zeigen keine veränderte Expression nach Pathogenattacke und können daher als Marker speziell für chemische Resistenzinduktion angesehen werden (Schaffrath *et al.* 1997; Beßer *et al.* 2000).

Zytologische Untersuchung der cIR in der Gerste/*Bgh*- und Gurke/*Colletotrichum lagenarium* (Auslöser der Anthracnose)-Interaktion haben gezeigt, dass in induzierten Pflanzen nicht die Keimung des Pathogens beeinflusst wurde, sondern die Anzahl effektiver Papillen erhöht und infolgedessen die Penetrationsrate erniedrigt war (Kessmann *et al.* 1994; Kogel *et al.* 1994; Jarosch *et al.* 1997).

1.3 Abwehrkomponenten

1.3.1 Präformierte Abwehrkomponenten

Präformierte Komponenten der Abwehr sind solche, die nicht induziert werden und bereits vor der Pathogenattacke in der Pflanze vorhanden sind. Diese können physikalischer Natur sein, wie epikutikuläre Wachsschicht, Kutikula und Zellwand von Epidermis und Rhizodermis oder im Fehlen struktureller Erkennungsfaktoren für das Pathogen bestehen (Agrios 1997; Schlösser 1997). Daneben gibt es eine Reihe für die Abwehr bedeutende biochemische Substanzen, zu denen Metabolite des Sekundärstoffwechsels z.B. Senföle, Saponine und Phenole gehören, aber auch komplexere Moleküle, wie Proteinaseinhibitoren, Glukanasen, Chitinasen, RIPs (ribosomeninaktivierende Proteine) und Defensine, die direkt antimikrobiell wirken (Stripe *et al.* 1992; Osbourn 1996; Agrios 1997; Schlösser 1997; Heath 2000).

1.3.2 Induzierte Abwehrkomponenten

Unter induzierten Abwehrmechanismen versteht man physikalische oder biochemische Komponenten, die in der Pflanze erst nach Kontakt mit einem Mikroorganismus aktiviert werden. Ausgelöst werden diese durch sogenannte Elicitoren. Dies sind entweder vom Erreger abgegebene Substanzen, wie Glykoproteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren, Proteine oder von der Pflanze stammende Zellwandbestandteile, die durch vom Pathogen gebildete Enzyme freigesetzt werden (Blumwald 1998, Somssich und Hahlbrock 1998). Die Erkennung eines Elicitors durch membrangebundene oder cytosolische Rezeptoren der Pflanze führt über verschiedene Signaltransduktionswege zu einer Vielzahl von Abwehrmechanismen (Scheel 1998).

Das vorrangige Ziel der Pflanzenzelle ist es, das Eindringen des Pathogens durch die Zellwand zu verhindern. Dies wird meist durch die Veränderung der Zellwand erreicht, wobei Callose, Lignin, Suberin und hydroxyprolinreiche Proteine abgelagert, polymerisiert oder miteinander vernetzt werden. Besonders die lokal begrenzte Bildung einer Zellwandapposition (Papille) stoppt oftmals den Penetrationsversuch pilzlicher Hyphen und somit die Attacke auf die Pflanzenzelle (Hammond-Kosack und Jones 1996; Agrios 1997). Andere im Bereich der Zellwand vorkommende Substanzen, wie Extensine und Reaktive Sauerstoffintermediate (ROI, *reactive oxygen intermediates*), z.B. H₂O₂, wirken direkt toxisch auf das Pathogen und schmälern so dessen Penetrationserfolg (Hammond-Kosack und Jones 1996; Scheel 1998).

Ein weiterer Abwehrmechanismus, der oftmals ausgelöst wird, wenn das Pathogen in die Zelle eingedrungen ist, ist die Hypersensitive Reaktion (HR), das schnelle Absterben einzelner Zellen oder ganzer Zellverbände (Gilchrist 1998; Graham und Graham 1999; Richael und Gilchrist 1999). Diese Abwehrreaktion unterbricht meist die Entwicklung biotropher Organismen, die für ihr Wachstum auf lebende Zellen angewiesen sind, kommt jedoch dagegen manchen nekrotrophen Pathogenen, die sich von totem Pflanzenmaterial ernähren, zugute. Diese werden aber möglicherweise durch antimikrobiell wirksame Stoffe, wie phenolische Verbindungen und Phytoalexine, die bei der Dekompartimentierung der Zelle aus der Vakuole freigesetzt werden, erfolgreich bekämpft (Hammond-Kosack und Jones 1996; Hammerschmidt und Dann 1999).

Der Befall durch Pilze, Bakterien und Viren oder die Applikation eines Elicitors führt zur Akkumulation bestimmter Transkripte, deren korrespondierende Proteine kurze Zeit später nachweisbar sind. Dabei handelt es sich um PR-Proteine (*pathogenesis related proteins*), die

heute in 17 Familien unterteilt und als PR-1 bis PR-17 bezeichnet werden (Collinge *et al.* 2001; Christensen *et al.* 2002). Die Funktion der zur PR-1 Familie gehörenden Proteine ist bis heute nicht geklärt (van Loon und van Strien 1999), jedoch zeigen neueste Untersuchungen, dass die Unterdrückung der PR-1b Translation in Gerstenepidermiszellen über RNA Interferenz (RNAi) zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Echtem Gerstenmehltaupilz führt (Schultheiss *et al.* 2001). Andere PR-Familien umfassen lytische Enzyme wie Glukanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3, -8 und -11) und Endoproteasen (PR-7), die antimikrobielle Wirkung besitzen. Daneben gibt es Chitin-bindende Proteine (PR-4), Thaumatin-ähnliche Enzyme (PR-5), Proteaseinhibitoren (PR-6), Lignin-bildende Peroxidasen (PR-9), RIPs (PR-10), Defensine (PR-12), Thionine (PR-13), LTPs (Lipid-Transfer-Proteine, PR-14), Oxalatoxidasen (PR-15), Oxalatoxidasen-ähnliche Proteine (PR-16) und Proteasen (PR-17), die zu den PR-Proteinen gezählt werden. In Gerste wurde bislang eine Reihe von PR-Proteinen gefunden, die zu den Familien PR-1 bis -6 und PR-13 bis PR-17 gehören (Muthukrishnan *et al.* 2001; Christensen *et al.* 2002).

Ebenfalls wichtig für die Abwehr phytopathogener Organismen könnte detoxifizierende Enzyme sein, die von der Pflanze gebildet werden und vom Pathogen freigesetzte Toxine abbauen (Agrios 1997).

1.4 Signaltransduktionskaskaden der Pathogenabwehr

Im folgenden Abschnitt wird ein Modell der Signaltransduktion in der Pathogenabwehr beschrieben, das sich aus einer Reihe von Originalarbeiten herleiten lässt. Startpunkt der Signaltransduktion in der Pathogenabwehr ist die rassenspezifische oder rassenunspezifische Erkennung eines Elicitors durch Rezeptoren der Pflanze. Diesem Prozess folgt ein Einstrom von Ca^{2+} - und H^{+} -Ionen aus dem Apoplasten ins Cytoplasma und in umgekehrter Richtung ein Ausstrom von K^{+} - und Cl^{-} -Ionen (Lamb 1997; Hutcheson 1998). Die transiente Akkumulation von Calciumionen im Cytosol führt zum *oxidative burst*, der Synthese reaktiver Sauerstoffintermediate, wie Hydrogenperoxid (H_2O_2), Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) durch membrangebundene NADPH-Oxidasen und apoplastische Peroxidasen (Lamb 1997; Blumwald 1998; Hutcheson 1998; Scheel 1998; Somssich und Hahlbrock 1998). Neben der direkt cytotoxischen Wirkung der ROI ist besonders H_2O_2 wichtig für die Vernetzung von Zellwandproteinen und die Bildung von Ligninvorstufen durch Peroxidasen (Hammond-Kosack und Jones 1996; Greenberg 1997). Außerdem ist es ein Signalmolekül, das die Phytoalexinproduktion und die Expression von Abwehrgenen

auslösen kann (Wu *et al.* 1995; Wu *et al.* 1997).

Des Weiteren sind an der Signaltransduktion G-Proteine, Proteinkinasen, Phospholipasen und Phosphatasen beteiligt (Blumwald 1998). Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen die Phytohormone Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen sowie deren Derivate und Systemin (Hammond-Kosack und Jones 1996; Scheel 1998). Abbildung 1.1 zeigt schematisch die wichtigsten Ereignisse der frühen Wirt-Pathogen-Interaktion.

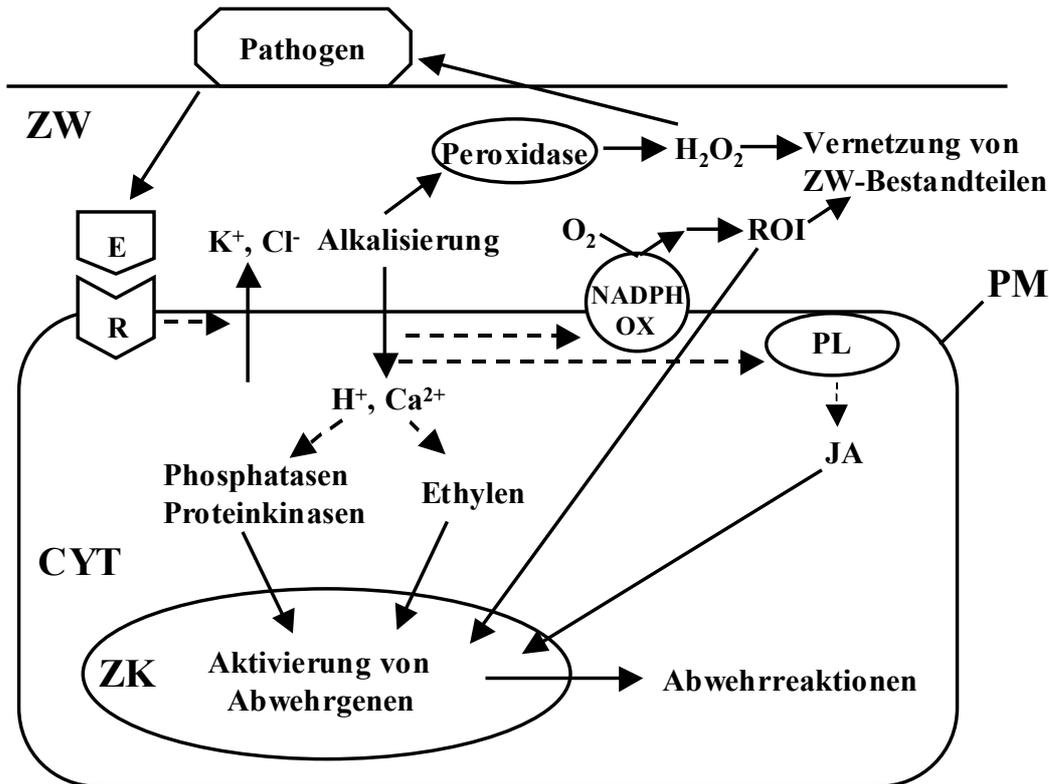


Abb. 1.1: Schematische Übersicht über frühe Ereignisse der Wirt-Pathogen Interaktion.

Nach der Erkennung des Elicitors (E) durch einen pflanzlichen Rezeptor (R) finden verschiedene Ionenströme über die Plasmamembran statt und es kommt zum sogenannten *oxidative burst*, der Bildung von ROI. Die über Phospholipasen gebildete Jasmonsäure und Ethylen lösen zusammen mit Phosphatasen und Proteinkinasen (MAP-Kinasen) die Transkription von Abwehrgenen aus, was schließlich zur Ausprägung verschiedener Abwehrreaktionen führt.

CYT: Cytoplasma, JA: Jasmonsäure, NADPH-OX: NADPH-Oxidase, PL: Phospholipase, PM: Plasmamembran, ROI: Reaktive Sauerstoffintermediate, ZK: Zellkern, ZW: Zellwand

Verändert nach: Hammond-Kosack und Jones 1996; Somssich und Hahlbrock 1998.

1.4.1 Resistenzgenprodukte

Resistenzgenprodukte sind pflanzliche Rezeptoren, die bei der Interaktion mit einem phytopathogenen Organismus direkt oder indirekt einen Elicitor, meist ein Avirulenzgenprodukt, erkennen und rassenspezifische Resistenzmechanismen auslösen oder Proteine, die direkt an der Signaltransduktion nach der Perzeption eines Pathogens beteiligt sind. Sie werden in fünf Gruppen eingeteilt.

Am häufigsten kommen sogenannte NBS-LRR-Proteine vor, die eine Nukleotidbindestelle (NBS) und eine Leucin-reiche Region (LRR) besitzen. Etwa 1 % des *Arabidopsis*genoms, d.h. ca. 200 Gene, codiert für solche Proteine (Ellis 2000). Die NBS-Region deutet darauf hin, dass die Bindung von ATP oder GTP für die Funktion des Resistenzgens notwendig ist, während die LRR-Domäne der Interaktion mit einem Liganden, möglicherweise einem Avirulenzgenprodukt, dient (Jones 1996; Baker *et al.* 1997). Einige NBS-LRR-Proteine enthalten zusätzlich eine TIR-Region, die Homologie zum Toll-Rezeptor von *Drosophila* bzw. zum Interleukin-Rezeptor des Menschen besitzt und wahrscheinlich an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist (Hutcheson 1998). Andere weisen einen Leucinzipper (LZ) auf, der eventuell wie die LRR-Region an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist (Bent 1996).

Zur zweiten Gruppe der Resistenzgenprodukte gehören cytoplasmatische Serin/Threonin-Kinasen. Diese phosphorylieren Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren, und sind so in die Signaltransduktion in der Pathogenabwehr involviert. Erst kürzlich wurde ein Resistenzgenprodukt (RPG1) der Gerste gegen Rostpilze identifiziert, das zwei hintereinander liegende Proteinkinasmotive aufweist und möglicherweise zu einer neuen Klasse der Resistenzgene gezählt werden kann (Brueggeman *et al.* 2002)

Rezeptorproteine mit einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären LRR-Region werden zur dritten Gruppe der Resistenzgenprodukte gezählt. Die LRR-Region dient auch hier wahrscheinlich der Bindung eines *Avr*-Genprodukts, allerdings fehlt diesen Proteinen eine Region, die zur Initiation eines Signals zur Auslösung von Abwehrmechanismen führt.

Anders ist dies bei den Vertretern der vierten Gruppe der Resistenzgenprodukte. Diese besitzen neben den Merkmalen der Proteine der vorangegangenen Gruppe eine cytoplasmatische Kinasedomäne und könnten daher direkt Interaktionspartner, wie Transkriptionsfaktoren, nach Bindung des korrespondierenden *Avr*-Genprodukts phosphorylieren.

Zur letzten der fünf Gruppen werden Proteine gezählt, die weder als Rezeptor noch als

Signalkaskadenelemente fungieren. Es handelt sich hierbei um Detoxifikationsenzyme, d.h. um solche, die vom Pathogen abgegebene Toxine metabolisieren und so zur Resistenz der Pflanze gegen diese Krankheitserreger beitragen (Jones 1996; Hammond-Kosack und Jones 1997; Baker *et al.* 2000).

Die Wirkungsdauer eines Resistenzgens bis zum Resistenzbruch schwankt in der Praxis zwischen 3 und 10 Jahren (Schlösser 1997). Meist reicht schon ein Einzelbasenaustausch im Avirulenzgen des Pathogens aus, um der spezifischen Erkennung des Avr-Proteins durch den Rezeptor zu entgehen.

Abbildung 1.2 zeigt schematisch die verschiedenen vorgestellten Resistenzgenprodukte mit ihren spezifischen Domänen.

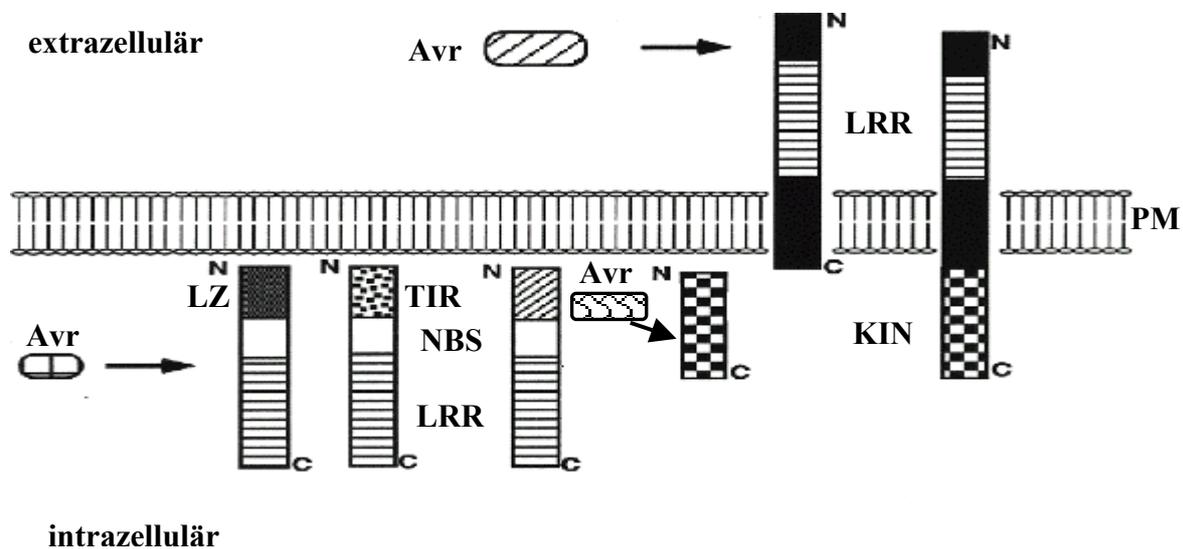


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Strukturen von Resistenzgenprodukten und möglichen Interaktionsstellen mit Avirulenzgenprodukten.

Die Avirulenzgenprodukte können extra- oder intrazellulär mit Leucinzipper- oder Leucin-reichen Regionen der Resistenzgenprodukte oder direkt mit Kinasen im Cytoplasma interagieren.

Avr: Avirulenzgenprodukt, C: Carboxylterminus, KIN: Kinase, LRR: Leucin-reiche Region, LZ: Leucinzipper, N: Aminoterminus, NBS: Nukleotidbindestelle, PM: Plasmamembran, TIR: Toll-/Interleukin-Region.

Verändert nach: Hammond-Kosack und Jones 1997.

1.5 Das Pathosystem Gerste / Echter Gerstenmehltaupilz

Die monokotyle Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und ist eine der ältesten Kulturpflanzen. Archäologische Funde weisen auf eine Kultivierung seit 7000 v. Chr. hin. Sie zeichnet sich durch eine kurze Reifezeit, ein hohes Ertragspotential und eine außerordentliche ökologische Anpassungsfähigkeit aus. Heute zählt die Gerste zu den wichtigsten landwirtschaftlich genutzten Fruchtarten und nimmt in der Weltgetreideproduktion nach Weizen, Reis und Mais den 4. Rang ein. In Deutschland stellt die Gerste mit einer Anbaufläche von 2,2 Mill. ha nach Weizen (2.5 Mill. ha) die wichtigste Kulturart dar. In ihrer Winterform wird Gerste vorwiegend als Futtergetreide angebaut, während Sommergerste in erster Linie als Rohstoff zur Brot- und Bierherstellung dient. Das Gerstengenom umfasst ca. 5,4 Gbp, die auf 7 Chromosomen ($2n = 14$) verteilt sind. Auf Grund ihrer großen landwirtschaftlichen Bedeutung und der Tatsache, dass sich das Genom der diploiden Gerste leichter analysieren lässt als z.B. das des tetraploiden Durum-Weizens oder des hexaploiden Saatweizens, stellt die Gerste im 1999 gestarteten BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) -Programm GABI (Genomanalyse im biologischen System Pflanze) neben *Arabidopsis* den zweiten pflanzlichen Modellorganismus dar (Graner und Altschmied 2001).

Der Echte Getreidemehltaupilz gehört zur Ordnung der *Erysiphales* innerhalb der *Ascomycotina*. Er ist weltweit verbreitet und befällt außer Weizen und Gerste auch Roggen, Hafer und zahlreiche Gräser. Er kommt in mehreren, spezialisierten Formen (*formae specialis*, f.sp.) vor, so dass ein Übergang von einer Getreideart auf die andere praktisch nicht möglich ist. Jedoch können die einzelnen Spezialformen ihren Wirtsbereich auf andere Gräsergattungen ausdehnen. Weiter gibt es für jede Spezialform eine Vielzahl von Rassen mit sortentypischen Virulenzunterschieden. In der Regel liegen die durch den Befall mit Mehltaupilz verursachten Ertragsausfälle bei Gerste und Weizen bei 5 bis 15 %, können in Einzelfällen aber bis 25 % betragen. Der Echte Gerstenmehltaupilz (*Blumeria* syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) ist ein biotropher Ektoparasit, der hauptsächlich in gemäßigten feucht/trocken wechselnden Klimazonen vorkommt (Hoffmann und Schmutterer 1999).

Die Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz Interaktion ist auf zytologischer Ebene eine der bestuntersuchten Wirt-Parasit-Beziehungen. Da das Wachstum des biotrophen Mehltaupilzes strikt auf die Blattoberfläche beschränkt ist und die Sporen mit hoher Synchronität keimen, kann die Entwicklung des Pilzes auf dem Gerstenblatt leicht verfolgt werden (Thordal-

Christensen *et al.* 1999). Die Ascosporen werden windverbreitet und bilden, wenn sie auf das Gerstenblatt auftreffen, innerhalb von 1-2 Stunden einen primären Keimschlauch (*primary germ tube*, PGT) aus. Die Funktion dieses Organs ist bislang nicht vollständig geklärt. Die Tatsache, dass ein PGT nur bei Mehltaupilzen vorkommt, die Gräser parasitieren, spricht jedoch dafür, dass er lediglich als Haftorgan und zur Wasseraufnahme dient und keine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese besitzt (Kunoh *et al.* 1979). 4-8 Stunden nach Inokulation bildet die Mehltaukonidie den appressorialen Keimschlauch (*appressorial germ tube*, AGT) aus, der sich am Ende zum Appressorium verdickt. Durch eine Pore in der unteren Zellwand des Appressoriums schiebt sich nach weiteren vier Stunden ein Penetrationskeil, der durch die Pflanzenzellwand getrieben wird, wobei nicht nur mechanische, sondern auch enzymatische Vorgänge eine Rolle spielen (Thordal-Christensen *et al.* 1999). Die Gestenpflanze reagiert in den meisten Fällen sowohl bei einer kompatiblen als auch einer inkompatiblen Interaktion auf beide Keimschläuche mit der Bildung einer Papille und der Expression von Abwehrgenen. Dabei zeigt die Transkriptakkumulation einen biphasischen Verlauf mit Expressionsmaxima bei 4-6 hpi (*hours post inoculation*) und 12-15 hpi (Davidson *et al.* 1988; Clark *et al.* 1995; Gregersen *et al.* 1997). Im Falle einer kompatiblen Interaktion ist der Pilz in der Lage, sowohl die pflanzliche Zellwand als auch die gebildete Papille zu durchdringen und ein Haustorium in der Epidermiszelle zu etablieren. Etwa 40 Stunden nach Inokulation ist das fingerförmige Ernährungsorgan, das von der Plasmamembran des Wirts umschlossen wird und daher als apoplastisch angesehen wird (Smith und Smith 1990), vollständig ausgebildet (Ellingboe 1972). Ab 30 hpi beginnt ausgehend vom Appressorium die Ausbildung verlängerter Sekundärhyphen (ESH, *elongated secondary hyphae*), von denen aus sekundäre Haustorien in die Epidermis abgesenkt werden. Nach 4-8 Tagen werden im Mycel dicht nebeneinander Sporenträger auf der Blattoberfläche gebildet, an denen Ketten aus ca. 8 miteinander verbundenen Konidien hängen. Makroskopisch sind zu diesem Zeitpunkt Pusteln einzelner Sporenkolonien zu sehen (Abb. 1.3 C). Die reifen Konidien werden durch den Wind verbreitet und können neue Infektionen auslösen.

Die sexuelle Vermehrung des Echten Gerstenmehltaupilzes erfolgt in alternden, haploiden Mycelien des heterothallischen (getrenntgeschlechtlichen) Organismus. Sie beginnt mit der Bildung von Ascogonien und Antheridien im Innern eines Fruchtkörpers, der aus knäuelartig zusammengewachsenen Hyphen besteht. Die reifen Kleistothezien, die als schwarze, kugelförmige Gebilde makroskopisch auf befallenem Blattmaterial zu erkennen sind (s. Abb. 1.3 C) und den Winter überdauern, enthalten bis zu 25 Asci mit 8 haploiden Ascosporen. Im

Frühjahr reißen die Kleistothezien auf und die Ascosporen werden aktiv herausgeschleudert (Agrios 1997; Schlösser 1997).

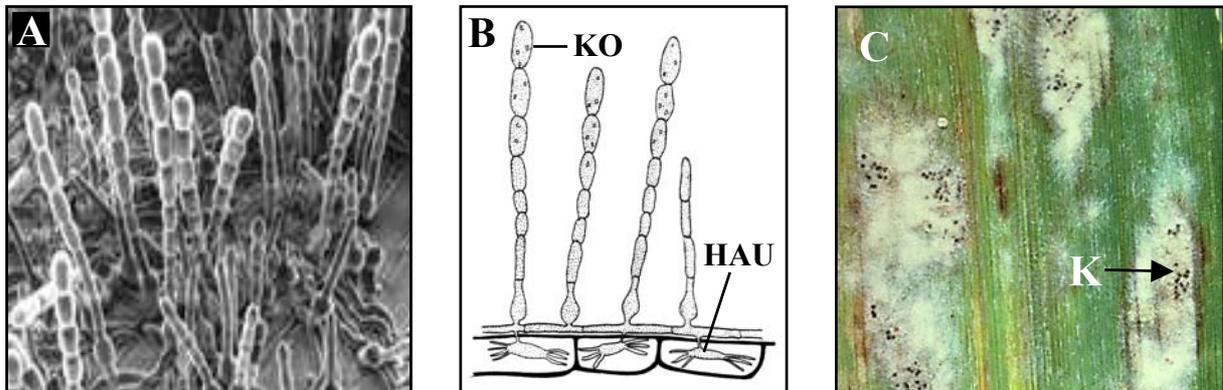


Abb. 1.3: *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

A: Konidienträger von *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme und B: in einer schematischen Darstellung. Erkennbar sind hier fingerförmige Haustorien (HAU) in penetrierten Epidermiszellen. KO: Konidie. C: Mehltaupusteln auf einer Gerstenpflanze zu einem späten Zeitpunkt der Infektion, zu dem bereits reife Kleistothezien (K) ausgebildet sind.

Bilder: A: Institute of Grassland and Environmental Research, http://www.bbsrc.ac.uk/news/features/00jul/00_07_sustain.html, B: entnommen aus: (Hoffmann und Schmutterer 1999), C: http://agrar.bayervital.de/index.cfm?SEITEN_ID=127.

1.5.1 Die Rassen-Sorten spezifische Resistenz der Gerste gegen *Bgh*

In verschiedenen Gerstensorten sind bislang über 85 dominant oder semidominant vererbte Resistenzgene beschrieben worden (Jørgensen 1994; Thordal-Christensen *et al.* 1999). Im folgenden sollen nur die für diese Arbeit relevanten Resistenzen, die durch *Mla* und *Mlg* vermittelt werden, näher charakterisiert werden.

1.5.1.1 Die *Mla*-vermittelte Resistenz

Der *Mla*-Locus liegt telomer innerhalb eines 240 kb großen Clusters auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 der Gerste. Dieser Cluster umfasst insgesamt 11 Gene, die NBS-LRR Resistenzgenhomologe codieren und in drei Genfamilien zusammengefasst werden (Wei *et al.* 1999). 32 *Mla*-Spezifitäten sind bislang bekannt, von denen zwei, nämlich *Mla1* und *Mla6*, isoliert und ihre Genprodukte näher charakterisiert werden konnten. In beiden Fällen handelt es sich um ein Protein mit einer N-terminalen *coiled-coil* Struktur, einer zentralen Nukleotid-Bindestelle (NBS) und einer C-terminalen Leucin-reichen Region (LRR) (Haltermann *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2001).

Die verschiedenen *Mla*-Spezifitäten bedingen eine hohe Diversität an Resistenzphänotypen. Während es beispielsweise bei der durch *Mla1* und *Mla6* vermittelten Resistenz zu einer raschen Hypersensitiven Reaktion der attackierten Epidermiszellen (24 hpi) kommt, reagieren Gerstenpflanzen, die das Resistenzgen *Mla3* oder *Mla7* tragen, erst zu einem Zeitpunkt, zu dem der Pilz bereits Sekundärhyphen ausgebildet hat (36 hpi), mit HR, die dann häufig auch Mesophyllzellen mit einbezieht. In *Mla6* resistenten Pflanzen scheint zudem die Bildung einer effektiven Papille unterhalb des appressorialen Keimschlauchs neben der Ausprägung einer HR in attackierten Epidermiszellen ein wichtiger Resistenzmechanismus zu sein (Boyd *et al.* 1995).

Das *Mla12*-Gen, das z. B. in der Linie Sultan-5 vorkommt, vermittelt Resistenz gegen *Bgh* der Rasse *A6*, der das korrespondierende Avirulenzgen *AvrMla12* besitzt. Für die Ausprägung dieser Resistenz sind neben dem Resistenzgen selbst mindestens noch zwei weitere Loci notwendig, die als *Rar1* und *Rar2* (*required for Mla specified resistance*) bezeichnet werden (Torp und Jørgensen 1986, Freialdenhoven *et al.* 1994). *Rar1* konnte über einen karten-gestützten Klonierungsansatz isoliert (Lahaye *et al.* 1998) und das dazugehörige Protein näher charakterisiert werden. Demnach handelt es sich bei RAR1 um ein 25 kDa großes cytoplasmatisches Protein mit zwei Zn²⁺-Bindedomänen (CHORD, *cysteine- and histidine-rich domains*) (Shirasu *et al.* 1999a). Erst kürzlich ist es Azevedo und Mitarbeitern gelungen, über

ein *yeast-two-hybrid* Screening einen RAR1 Interaktionspartner, SGT1, zu isolieren. Eine mögliche Rolle des SGT1 ist es, über einen SCF-Komplex negative Regulatoren der Pathogenresistenz dem Abbau durch das 26S Proteasom zuzuführen (Azevedo *et al.* 2002). Wie man inzwischen weiß, sind neben vielen der durch verschiedene *Mla*-Spezifitäten vermittelten Resistenzen auch die *Mlp*- bzw. *Mlh*-Resistenz *Rar1* abhängig. Die Allele *Mla1* und *Mla7* hingegen wirken über einen *Rar1* unabhängigen Abwehrweg (Schulze-Lefert und Vogel 2000; Zhou *et al.* 2001).

1.5.1.2 Die *Mlg*-vermittelte Resistenz

Das semidominant wirkende *Mlg*-Gen vermittelt ebenso wie das *Mla12*-Gen Resistenz gegen die Mehltaurasse *BghA6*. Es befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 4H der Gerste in Nähe des Centromers. Da in dieser Region das Verhältnis der physikalischen zur genetischen Distanz um ein 10-faches höher ist als der Durchschnitt des Gesamtgenoms, sind kartengestützte Klonierungsstrategien zur Isolierung dieses Gens bislang fehlgeschlagen (Kurth *et al.* 2001).

Die *Mlg*-vermittelte Resistenz ist durch die Bildung einer effektiven Papille unterhalb des appressorialen Keimschlauchs und nachfolgender Hypersensitiven Reaktion der attackierten Epidermiszelle (ab 18 hpi) charakterisiert. Damit entspricht sie zytologisch der durch DCINA (2,6-Dichlorisonikotinsäure) ausgelösten chemischen Resistenz nach Inokulation mit Mehltau, weshalb man auch von einer Phänokopie zwischen der *Mlg*-vermittelten und der DCINA-induzierten Resistenz spricht (Kogel *et al.* 1994).

Die Resistenzreaktionen in *Mlg*-tragenden Gerstenpflanzen sind Gendosis-abhängig. So zeigen heterozygote *Mlg/mlg*-Pflanzen eine drastisch reduzierte HR-Rate gegenüber homozygot resistenten (*Mlg/Mlg*) Pflanzen, wobei die Zahl an Haustorien in den Zellen unverändert bleibt. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Bildung einer effektiven Papille die Resistenz bedingt und die Hypersensitive Reaktion ein Sekundäreffekt der Pathogenattacke ist (Görg *et al.* 1993; Schiffer *et al.* 1997). Die *Mlg*-vermittelte Resistenz ist sowohl von den Genen *Ror1* und *Ror2*, die für die *mlo*-vermittelte Resistenz notwendig sind (s. 1.5.2), als auch von den oben erwähnten Komponenten der *Mla*-vermittelten Resistenz, *Rar1* und *Rar2*, unabhängig (Peterhänsel *et al.* 1997).

1.5.2 Die Rassen unspezifische Resistenz der Gerste gegen *Bgh*

Die Rassen unspezifische Resistenz der Gerste gegen *Bgh* wird durch die Mutation des *Mlo*-Gens bedingt. Diese ist in einigen Kultivaren, die in den 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts in Äthiopien gesammelt wurden, gefunden worden, kann aber auch durch chemische Mutagenese induziert werden (Jørgensen 1992). Inzwischen sind mehr als 150 verschiedene *mlo*-Mutanten beschrieben worden. Die Besonderheit dieser Resistenz ist, dass sie rezessiv und monogen vererbt wird und nicht dem Gen-für-Gen-Modell der Resistenz entspricht (Flor 1971), da sie Resistenz gegen alle natürlichen Isolate des Echten Gerstenmehltaupilzes bedingt (Jørgensen 1992; Büschges *et al.* 1997). Dies ist ein Grund dafür, dass das *mlo*-Gen in ca. 70 % der in der Bundesrepublik angebauten Sommergersten vorkommt. Gerstenpflanzen, die die *mlo*-Mutation tragen, zeigen bei sterilem Wachstum spontan gebildete Zellwandappositionen in Epidermiszellen und Chlorosen bzw. Nekrosen auf Primärblättern (Wolter *et al.* 1993; Peterhänsel *et al.* 1997). Außerdem besitzen diese Pflanzen eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber den hemibiotrophen Pathogenen *Magnaporthe grisea* und *Bipolaris sorokiniana* (Jarosch *et al.* 1999; Kumar *et al.* 2001). Die *mlo*-vermittelte Resistenz gegen Mehltau ist durch die Bildung einer effektiven Papille gekennzeichnet, ohne dass es zu einer Hypersensitiven Reaktion der attackierten Epidermiszelle kommt (Stolzenburg *et al.* 1984). Jedoch tritt 60 hpi ein massives Absterben an Mesophyllzellen ein, das in *Mlo*-Pflanzen nicht zu beobachten ist (Piffanelli *et al.* 2002).

Das *Mlo*-Gen, das ebenso wie *Mlg* auf dem langen Arm des Chromosoms 4H liegt, codiert für ein 60 kDa großes Protein, das über 7 Transmembranhelices in der Plasmamembran der Pflanzenzellen verankert ist (Büschges *et al.* 1997; Devoto *et al.* 1999). Erst kürzlich konnte von Kim und Mitarbeitern gezeigt werden, dass die Aktivität von MLO durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung von Calmodulin verstärkt wird (Kim *et al.* 2002a; Kim *et al.* 2002b). Außerdem scheint ein kleines GTP-bindendes Protein der RAC Familie in Gerste, RACB, eine Rolle in der MLO-vermittelten Kompatibilität mit Mehltau zu spielen (Schultheiss *et al.* 2002). Das *Mlo*-Genprodukt kann ganz allgemein als negativer Regulator von Abwehrreaktionen, wie z.B. Zelltod, angesehen werden.

Bislang wurden zwei für die *mlo*-vermittelte Resistenz notwendige Loci, die als *Ror1* und *Ror2* (*required for mlo-specified resistance*) bezeichnet werden, durch Mutagenese identifiziert (Freialdenhoven *et al.* 1996). Beide Komponenten werden für die Bildung spontaner Zellwandappositionen und die Ausprägung des spontanen Zelltods in

Primärblättern *mlo*-tragender Gersten benötigt (Freialdenhoven *et al.* 1996; Peterhänsel *et al.* 1997). Ihre Mutation führt zum partiellen Verlust der *mlo*-vermittelten, rassenunspezifisch wirkenden Resistenz.

Abbildung 1.4 zeigt als schematische Zeichnung die Abwehrmechanismen von verschiedenen Gerstengenotypen mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* der Rasse A6.

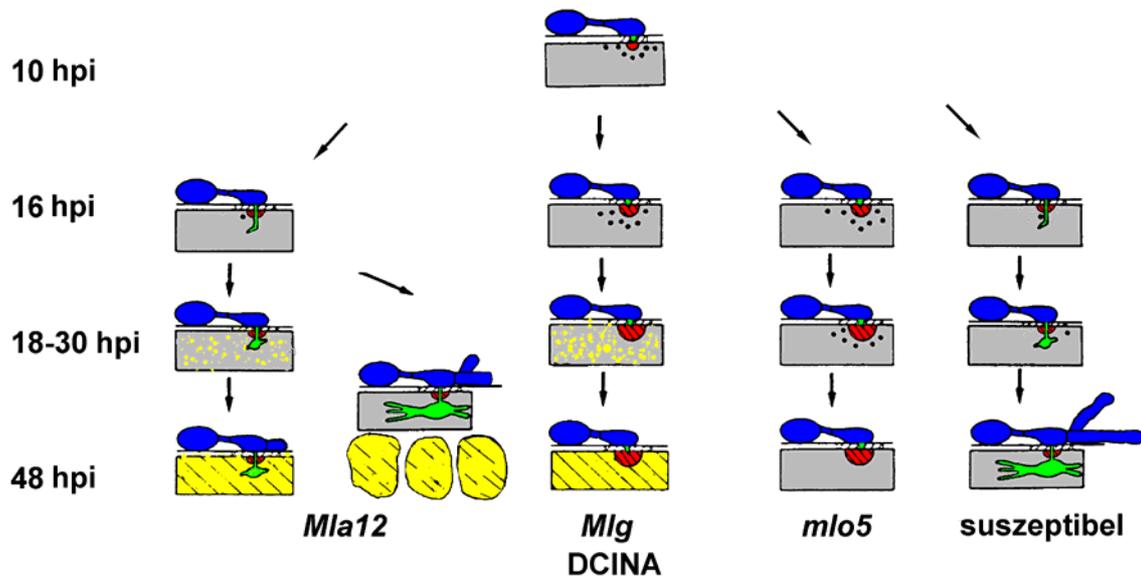


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Interaktionstypen zwischen Gerste und *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* der Rasse A6.

Auf das Auskeimen der Mehltaukonidie (blau) und der Bildung des appressorialen Keimschlauchs reagiert die Epidermiszelle mit Cytoplasmaaggregationen und einer Zellwandapposition. 16 hpi (*hours post inoculation*) kann man in Epidermiszellen *Mla12*-tragender und suszeptibler Linien ein Haustoriuminitial (grün) erkennen, da diese erfolgreich penetriert wurden, während der Penetrationsversuch des Pilzes in *mlo*- und *Mlg*-tragenden Gersten durch die Bildung einer effektiven Papille (rot) gestoppt werden konnte. Bei einer kompatiblen Interaktion wächst das Initial bis 48 hpi zu einem reifen Haustorium aus und das Wachstum von Sekundärhyphen beginnt. In *Mlg*- und *Mla12*-tragenden Linien kann man zu diesem Zeitpunkt das Sterben attackierter Epidermiszellen (HR, gelb) beobachten. In einigen Fällen kommt es bei der *Mla12*-vermittelten Resistenz zur HR von Mesophyllzellen unterhalb der lebenden penetrierten Epidermiszelle (Hückelhoven *et al.* 1999).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Bei zytologischen Untersuchungen erscheint die chemisch Induzierte Resistenz (cIR) der Gerste als Phänokopie der Rassen-spezifischen *Mlg*-vermittelten Resistenz (Hückelhoven *et al.* 1999; Kogel *et al.* 1994; Kogel und Hückelhoven 1999). Die Ausprägung gleicher Abwehrmechanismen bei cIR und *Mlg*-vermittelter Resistenz hat zu der Annahme geführt, dass beiden Formen der Resistenz gemeinsame Komponenten der Signaltransduktion zu Grunde liegen. Ausgehend von dieser Annahme sollten in der vorliegenden Arbeit mittels Suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH) Gene isoliert werden, die entweder zu einem frühen Zeitpunkt (3-13 hpi) der Gerste-Gerstenmehltaupilz-Interaktion oder konstitutiv insbesondere in *Mlg*-tragenden Linien exprimiert wurden. Die Produkte solcher Gene könnten z.B. Komponenten einer unmittelbar nach Erkennung des Pathogens wirkenden Signalkaskade oder konstitutiv vorhandene Elemente der *Mlg*-vermittelten Resistenz sein. Außerdem sollte SSH genutzt werden, um Gene zu isolieren, die unabhängig vom Resistenzstatus der Gerste durch Inokulation mit *Bgh* exprimiert werden.

Neben der SSH sollten über einen Resistenzgenanaloga-Kandidatengenansatz günstigstenfalls *Mlg* oder andere möglicherweise mit der *Mlg*-vermittelten Resistenz in Zusammenhang stehende Gene isoliert werden.

Alle Mehltaupilz-induzierbaren bzw. *Mlg*-spezifischen Gene sollten anschließend auf ihre Responsivität gegenüber dem chemischen Resistenzinduktor BTH getestet werden, um die postulierte Verknüpfung zwischen *Mlg*-vermittelter Resistenz und cIR zu bestätigen, bzw. um auf molekularer Ebene mögliche Schnittpunkte zwischen quantitativer Resistenz und cIR aufzuzeigen.

Außerdem sollte die Expression der *Bgh*-induzierten Gene nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) untersucht werden, um eine mögliche Beteiligung der Gene bei der Ausprägung der Basisresistenz aufzuzeigen.

Die Funktion im Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz-Pathosystem sollte abschließend für einige ausgewählte Kandidatengene mittels transienter Transformation von Gerstenblattsegmenten überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 12 verschiedene Gerstenlinien verwendet. Dabei handelte es sich um die Gerstensorten Ingrid (I), Pallas (P), Siri (S), Manchuria_{isogen} (Mi), Sultan-5 und die durch Einkreuzen von Resistenzgenen und anschließender Rückkreuzung oder durch chemische Mutagenese erzeugten nahezu isogenen Linien. Ingrid-Weihenstephan (Iwe, I21), Pallas-Deba (Pde, P21), Siri-Deba (Sde) und Manchuria_{isogen}-Goldfoil (MiGf) tragen homozygot das Resistenzgen *Mlg* des entsprechenden resistenten Elters (Weihenstephan, Deba bzw. Goldfoil). Aus der *Mla12* tragenden, doppelt haploiden Sorte Sultan-5 entstand durch Mutagenese mit Ethylmethylsulfonat (EMS) die suszeptible Mutante M100, deren Homozygotie durch Selbstung erreicht wurde. Diese Linie trägt eine nicht allelische Mutation in *Rar1* (*required for Mla12-specified resistance*), die rezessiv vererbt wird (Torp und Jørgensen 1986). Desweiteren wurden die Linie BCIngrid-*mlo5* (I22) und die aus dieser Linie hervorgegangene Mutante A89 verwendet, die einen Defekt in einem vom *mlo5*-Resistenzgen unabhängigen Locus, nämlich *Ror1* (*required for mlo-specified resistance*), besitzt (Freialdenhoven *et al.* 1996). Diese Mutation bedingt eine unvollständige Resistenz gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz in der Linie A89. Die Linien Manchuria_{isogen} und MiGf wurden freundlicherweise von Herrn Bockelman, National Small Grains Collection, Aberdeen, USA, zur Verfügung gestellt. Die Gerstensorte Ingrid und deren Rückkreuzungslinien stammen von James McKey, University of Uppsala, Schweden. Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark, stellte die Sorte Pallas und deren Rückkreuzungslinien zur Verfügung, während alle anderen Linien vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ), Köln, stammten. Tabelle 2.1 fasst die verschiedenen Gerstenlinien, deren genetische Konstitution und Interaktion mit Echem Gerstenmehltaupilz zusammen. Die relevanten Gene der Gerstenlinien bzw. der Mutanten sind in Klammern aufgeführt.

Für die Versuche wurde das Saatgut 24 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimt und je 5 Körner am Rand eines Vierkanttopfes (Volumen: 200 cm³) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimakammern bei 16-18 °C, 50-60 % rel. Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit einer Intensität von 50-60 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 6-8 Tage kultiviert.

Tab. 2.1: Interaktionstypen zwischen den verschiedenen untersuchten Gerstenlinien und der Gerstenmehltaurasse A6 (vgl. 2.2).

Gerstenlinie bzw. Mutante	Interaktion mit <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (A6)	Infektionstyp
Ingrid (<i>mlg, mla12, Mlo</i>)	kompatibel	voll anfällig
Pallas (<i>mlg, mla12, Mlo</i>)	kompatibel	voll anfällig
Siri (<i>mlg, mla12, Mlo</i>)	kompatibel	voll anfällig
Manchuria _{isogen} (<i>mlg, mla12, Mlo</i>)	kompatibel	voll anfällig
IWe (<i>Mlg, mla12, Mlo</i>)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-spezifisch)
PDe (<i>Mlg, mla12, Mlo</i>)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-spezifisch)
SDe (<i>Mlg, mla12, Mlo</i>)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-spezifisch)
MiGf (<i>Mlg, mla12, Mlo</i>)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-spezifisch)
Sultan-5 (<i>Mla12, Rar1, Rar2</i>)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-spezifisch)
M100 (<i>Mla12, rar1, Rar2</i>)	kompatibel	intermediär (Rassen-Sorten-spezifisch)
I22 (<i>mlo5, Ror1, Ror2</i>)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-unspezifisch)
A89 (<i>mlo5, ror1-2, Ror2</i>)	kompatibel	intermediär (Rassen-Sorten-unspezifisch)

2.2 Pathogenmaterial

Für alle Experimente mit Echtem Gerstenmehltaupilz wurden Konidiosporen von *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) der Rasse A6 verwendet. *Bgh*A6 besitzt u.a. die zu den Resistenzgenen *Mlg* und *Mla12* korrespondierenden Avirulenzgene und wurde von Jörn Pons-Kühnemann, Institut für Biometrie, JLU Gießen, zur Verfügung gestellt.

Für Inokulationsexperimente mit Echtem Weizenmehltaupilz, *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*), wurde ein von Ulrich Beckhove, IPAZ Gießen, 1995 in Aachen gewonnenes Feldisolat eingesetzt.

Die Nachzucht der obligat biotrophen Mehлтаupilze fand auf dem jeweils entsprechenden suszeptiblen Pflanzenmaterial statt. Die Vermehrung des Weizenmehltaupilzes wurde auf der Weizensorte Kanzler, die des Gerstenmehltaupilzes auf den Gerstensorten Siri oder Golden Promise durchgeführt. Die Nachzuchtplanzen konnten 7 Tage nach ihrer Aussaat inokuliert werden. Nach weiteren 7 Tagen hatte der Mehлтаupilz seinen vegetativen Lebenszyklus auf der Pflanze vollendet und Konidiosporen entwickelt, die für die Inokulationsexperimente

verwendet wurden.

2.3 Behandlung des Pflanzenmaterials

2.3.1 Inokulation

Um eine möglichst hohe Inokulationsdichte zu erreichen, wurde bei den meisten Experimenten sowohl die adaxiale als auch die abaxiale Seite der Gerstenprimärblätter inokuliert. Dazu wurden die Pflanzen zunächst randomisiert auf ein Tablett gelegt, so dass die adaxialen Seite der Primärblätter nach oben wies. Für die Inokulation wurde ein Inokulationsturm über das Tablett gestellt, in den Sporen stark Mehltaupilz-infizierter Pflanzen abgeschüttelt wurden. Eine gleichmäßige Inokulationsdichte von 130-150 Sporen pro mm² wurde durch rasche Verwirbelung der Luft gewährleistet. Nach ca. 15 Minuten wurden die Töpfe um 180 ° gedreht, so dass die Inokulation der abaxialen Seite der Primärblätter durchgeführt werden konnte. Nach weiteren 15 Minuten war die Inokulation abgeschlossen und die Pflanzen wurden bei den unter 2.1 beschriebenen Bedingungen in Klimakammern weiter kultiviert. Für eine Scheininokulation (mock) wurde wie beschreiben verfahren, allerdings wurde auf das Abschütteln von Sporenmaterial verzichtet.

2.3.2 Applikation eines chemischen Resistenzinduktors

Die Behandlung mit dem chemischen Resistenzinduktor Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-*S*-methylester (BTH, auch Azibenzolar-*S*-methyl, CGA245704, Bion[®], Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz) wurde von Dr. Katrin Beßer, IPAZ Gießen, durchgeführt. Dazu wurde BTH als Formulierung von 50 % aktiver Substanz mit WP (*wettable powder*) in Wasser mit einer Konzentration von 125 ppm auf 6 Tage alte Keimlinge der Linie Ingrid gesprüht, bis die Blätter gleichmäßig von feinen Tröpfchen bedeckt waren (Beßer 2001).

2.3.3 Injektion von Glucoseoxidase

Die Injektion der Glukoseoxidase in Gerstenblätter wurde von Dr. Josef Fodor am IPAZ, Gießen durchgeführt, der die RNA-Proben dieses Versuchs freundlicherweise für einige Untersuchungen zur Verfügung stellte. Um die Bildung von extrazellulärem Wasserstoffperoxid zu induzieren, wurde 9 Tage alten Primärblättern der Linie Pallas eine Kaliumphosphatlösung (10 mM KH₂PO₄, pH 7,5) injiziert, die 2 mM Glucose und verschiedene Konzentrationen (0, 25, 50, 100 *units/ml*) Glucoseoxidase enthielt. Kontrollpflanzen

wurde nur Wasser injiziert. Nach der Injektion wurden die Pflanzen in einem Klimaschrank kultiviert.

2.4 Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopischen Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob sich der Gerstenmehltaupilz erwartungsgemäß auf den Gerstenblättern entwickelte und ob schon zu frühen Zeitpunkten (5 und 13 hpi) Reaktionen der Zellen auf den Penetrationsversuch zu sehen waren. Die Entwicklung des Echten Gerstenmehltaupilzes, sowie Resistenzreaktionen der Pflanze auf Penetrationsversuche des Pilzes wurden mittels Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Zuvor wurde das Blattmaterial fixiert, entfärbt und anschließend der Pilz angefärbt. Die Fixierung des Blattmaterials erfolgte während einer 48-stündigen Inkubation in Entfärberlösung, wobei der Entfärber nach 24 Stunden erneuert wurde. Anschließend wurden die entfärbten Primärblätter in Mikroskopierlösung gelagert.

- Entfärberlösung: Trichloressigsäure 0,15 % (w/v) in Ethanol/Chloroform 4:1 (v/v)
- Mikroskopierlösung: Glycerol/A. dest 1:1 (v/v)

Ein etwa 5 cm langes Segment der entfärbten Blätter wurde zur Präparatherstellung mit Wasser gespült und dann für 30 Sekunden in Essigsäure Tinte gelegt. Anschließend wurden die Segmente erneut in Wasser geschwenkt, um überschüssige Tinte abzuwaschen. Dann wurden die Blätter mit der adaxialen Seite nach oben auf einen Objektträger gelegt und nach Zugabe von Mikroskopierlösung mit einem Deckglas luftblasenfrei abgeschlossen.

- Essigsäure Tinte: Blaue Tinte (Pelikan, 4001)/Essigsäure 25 % (v/v) 1:9 (v/v)

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem Zeiss Axioplan Mikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung.

2.5 RNA-Extraktion

2.5.1 Extraktion von Gesamt-RNA

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus Gerstenblättern wurden 5 Primärblätter in Falcon-Röhrchen in flüssigen Stickstoff geerntet. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Materials in flüssigem N₂. Das dabei entstandene Pulver wurde unverzüglich in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -70 °C bis zur Extraktion gelagert. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit RNA *clean* (AGS, Heidelberg).

Abweichend von diesem Protokoll wurde das getrocknete RNA-Pellet in A. bidest gelöst. Das anschließend noch vorhandene unlösliche Pellet, bei dem es sich wahrscheinlich um Polysaccharide handelte, wurde nach Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) von der RNA-Lösung getrennt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm (Photometer DU 7400, Beckman, München), wobei 2 µl der RNA-Lösung mit A. bidest 1:125 verdünnt wurde. Eine OD_{260nm} von 1 entsprach einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml.

2.5.2 Isolation von PolyA⁺-RNA

Für die Synthese von cDNA-Banken wurde mRNA aus einem Teil der Gesamt-RNA isoliert. Dazu wurden *Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅* (Dynal A.S, Oslo, Norwegen) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Bei *Dynabeads[®]* handelt es sich um magnetische polymere Partikel, deren Oligo-dT-Überhang mit dem PolyA⁺-Schwanz der mRNA in Wechselwirkung tritt und so die Separation der messenger-RNA von tRNA und rRNA ermöglicht. Nach einer Konditionierung der *Dynabeads[®]* in 100 µl *Binding-Puffer*, wurden 250 µl der Partikel mit 100 µg Gesamt-RNA in 1,5 ml Eppendorfgläsern vermischt. Danach wurden die Gefäße in einen Magnetständer gestellt und der Überstand entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasch-Puffer erfolgte die Elution der PolyA⁺-RNA in 10 µl Elutionslösung.

- *Binding-Puffer* (2x): 20mM TrisCl (pH 7,5), 1 mM LiCl, 2 mM EDTA
- *Wasch-Puffer*: 10 mM TrisCl (pH 7,5), 0,15 mM LiCl, 1 mM EDTA
- *Elutionslösung*: 10 mM TrisCl (pH 7,5)

2.6 Durchführung der Suppressiven Subtraktionshybridisierungen (SSH)

2.6.1 Herstellung von cDNA-Banken

Die für die Durchführung der Suppressiven Subtraktionshybridisierungen benötigten cDNA-Banken wurden mit Hilfe des *SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit* (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) hergestellt. Der Einsatz der *SMART[™]*-Technologie (*Switching Mechanism At 5' end of the RNA Transcript*) erlaubt es, aus geringen Mengen an Ausgangsmaterial (50 ng Gesamt- oder 25 ng mRNA) auf Grund eines PCR-Schrittes große Mengen an doppelsträngiger cDNA zu synthetisieren. Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthesen diente PolyA⁺-RNA, die wie in 2.5 beschrieben aus Gerstenprimärblättern isoliert worden

war. Die Blätter stammten von den Linien Ingrid (I, *mlg*) und Ingrid-Weihenstephan (IWe, *Mlg*) und waren 3, 4, 5 bzw. 11, 12, 13 Stunden nach Inokulation mit Echtem Gerstenmehltaupilz bzw. mock-Inokulation geerntet worden. Zunächst wurde die mRNA verschiedener Zeitpunkte der beiden Linien vereinigt, so dass die in Tabelle 2.2 aufgeführten mRNA-Pools entstanden. Die Synthese der cDNA erfolgte gemäß dem *SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual*. Pro Erststrangsynthese wurden 200 bis 400 ng PolyA⁺-RNA eingesetzt.

Tab. 2.2: Übersicht über Pflanzenmaterial, Behandlung und Probezeitpunkte zur Erstellung von mRNA-Pools, die als Ausgangsmaterial der SMART™-cDNA-Synthese dienten.

Nr.	Linie	Zeitpunkte	Behandlung
1	Ingrid	3 – 5 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert
2	Ingrid	3 – 5 hpi	mock- inokuliert
3	Ingrid	11 – 13 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert
4	Ingrid	11 – 13 hpi	mock- inokuliert
5	Ingrid-Weihenstephan	3 – 5 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert
6	Ingrid-Weihenstephan	3 – 5 hpi	mock- inokuliert
7	Ingrid-Weihenstephan	11 – 13 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert
8	Ingrid-Weihenstephan	11 – 13 hpi	mock- inokuliert

▪ Erststrangsynthese:

3 µl	mRNA-Lösung
1 µl	cDNA-Synthese(CDS)-Primer
<u>1 µl</u>	SMART II Oligonukleotid
5 µl	Endvolumen

▪ CDS-Primer: 5'-AAGCAGTGGTAAACAACGCAGAGTACT₃₀N₁N-3'
(N: A, C, G, T; N-1: A, C, G)

▪ SMART II Oligonukleotid: 5'-AAGCAGTGGTAAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'

Nach zweiminütiger Inkubation bei 70 °C in einem *thermocycler*, wurden die folgenden Komponenten hinzugegeben:

2 µl	5x Erststrangsynthese-Puffer
1 µl	Dithiothreitol (DTT, 20 mM)
1 µl	50x dNTP (10 mM)
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 <i>units</i> /µl)

Diese Mischung wurde anschließend für 1 Stunde bei 42 °C im *thermocycler* inkubiert.

Nach Beenden der Erststrangsynthese wurden die Ansätze mit je 450 µl TE-Puffer verdünnt und 7 min bei 72 °C in einem Heizblock erhitzt. Danach folgte eine LD-PCR (*long distance-PCR*), bei der doppelsträngige cDNA (ds-cDNA) entstand.

▪ **LD-PCR:**

3 µl	verdünntes cDNA-Erststrangsyntheseprodukt
39 µl	A. bdest
5 µl	10x Advantage 2 PCR Puffer
1 µl	50 x dNTP (10 mM)
1 µl	PCR-Primer (10 µM)
1 µl	50x Advantage 2 Polymerase Mix
50 µl	Endvolumen

Die Amplifikation der doppelsträngigen cDNA fand in einem *thermocycler* (Perkin Elmer 9600) statt:

	1 min	95 °C	Denaturierung
	5 sec	95 °C	Denaturierung
18x	5 sec	65 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	6 min	68 °C	Primerverlängerung (cDNA-Synthese)
	7 min	68 °C	Komplettierung der cDNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Bei der SMARTTM-Erststrangsynthese werden Adaptoren in den cDNA-Erststrang eingebaut, die eine spätere Amplifikation der cDNA mittels PCR ermöglichen (vgl. Abb. 2.1). Zunächst lagert sich der CDS-Primer, der einen PolyT-Bereich enthält, an den PolyA⁺-Schwanz der mRNA-Matrize an. Die M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*)-Reverse Transkriptase (Superscript II, GibcoTMBRL, Karlsruhe) synthetisiert dann den cDNA-Erststrang und hängt, sobald sie das 5'-Ende der Matrize erreicht hat, auf Grund ihrer terminalen Transferaseaktivität 3 bis 5 Deoxycytidine an das 3'-Ende der cDNA an. Dieser C-Überhang wird im folgenden für die Anlagerung des SMART II Oligonukleotids genutzt, das an seinem 3'-Ende drei Deoxyguanidine trägt. Schließlich kommt es zum sogenannten *template*

switching, d.h. die Reverse Transkriptase erkennt das SMART II Oligonukleotid als Matrize und fügt dieses Stück dem cDNA-Erststrang an. Letztlich entsteht so ein doppelsträngiger cDNA-Strang (ds-cDNA), der an beiden Enden eine Adaptorsequenz besitzt, die zur Amplifikation genutzt werden kann.

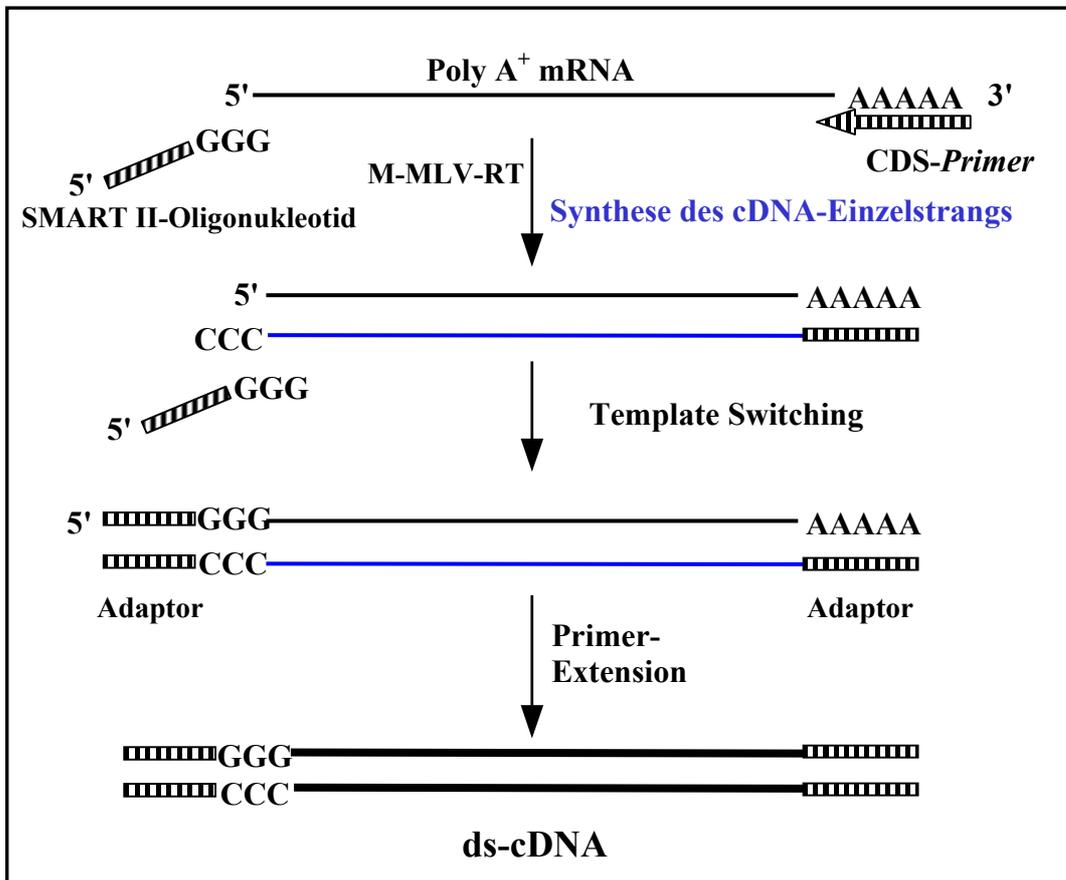


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der *SMART*TM-Technologie. (Erläuterung s. Text)

2.6.2 RsaI-Verdau der SMART-cDNAs

Auf die im *SMART*TM PCR cDNA Synthesis Kit User Manual empfohlene Aufreinigung der cDNA wurde verzichtet. Die Produkte aus vier cDNA-Synthesen wurden vereinigt, um eine ausreichende Menge an cDNA zu gewährleisten, und mit Komponenten aus dem *CLONTECH* PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) in einem Restriktionsverdau mit *RsaI* eingesetzt:

- **Restriktionsansatz:**

200 µl	ds-cDNA
22 µl	10x <i>RsaI</i> Restriktions-Puffer
1,5 µl	<i>Rsa I</i> (10 units/µl)

Der Verdau der cDNA fand während einer dreistündigen Inkubation in einem Wasserbad bei 37 °C statt.

2.6.3 Aufreinigung der geschnittenen cDNAs

Für diesen Schritt wurde nicht der vom Hersteller empfohlene *CLONTECH NucleoTrap[®] PCR Kit* verwendet, sondern der *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, allerdings wurde kein Elutionspuffer zur Elution der Nukleinsäuren benutzt, sondern A. bidest, das zuvor mit Natronlauge (0,1 N) auf pH 8-9 eingestellt worden war. Anschließend wurde das Eluat mit Hilfe von Microcon[®] YM-100 Zentrifugationssäulchen (Millipore, Eschborn) aufkonzentriert. Dazu wurde die aufgereinigte DNA-Lösung auf die Säule pipettiert, die in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß saß. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 500 g in einer Kühlzentrifuge, wurde das Microcon-Säulchen um 180 ° im Eppendorfgefäß gedreht. Die cDNA wurde schließlich durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 1000 g im Eppendorfgefäß aufgefangen. Dadurch wurde die für die anschließende Adaptorligation benötigte Konzentration an geschnittener und aufgereinigter cDNA von 300 µg/µl erreicht.

2.6.4 Adaptorligation und Ligationseffizienzanalyse

Die Adaptorligation wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze 15 Stunden bei 16 °C in einem *thermocycler* (Primus, MWG-Biotech AG, Ebersberg) inkubiert. Die anschließende Ligationseffizienzanalyse wurde nicht mit den im Kit enthaltenen G3PDH-Primern, die für die Anwendung des Kits in menschlichen Systemen gedacht sind, durchgeführt, sondern mit Primern für das GAPDH-Gen der Gerste, die von MWG-Biotech AG, Ebersberg, bezogen wurden.

- GAPDHs: 5'-TCAAGCAAGGACTGGAGA-3'
- GAPDHs: 5'-TGCTGTAACCCCACTCGT-3'

2.6.5 Durchführung der subtraktiven Hybridisierungen

Die subtraktiven Hybridisierungen sollen dazu dienen, cDNAs anzureichern, die in der cDNA-Population des sogenannten *Testers* häufiger vorkommen, als in der des sogenannten *Drivers*. Dazu wird der cDNA-Pool des *Testers* mit einem Überschuss an *Driver*-cDNA hybridisiert. Details zu dieser Methode finden sich in der Dissertation von Birgit Jarosch

(Jarosch, 2002), sowie im *CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual*. Insgesamt wurden vier subtraktive Hybridisierungen durchgeführt, wobei nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde. Die ersten Hybridisierungen dauerten jeweils 8 Stunden, die zweiten jeweils 16 Stunden und fanden alle in einem *thermocycler* (Primus, MWG-Biotech AG, Ebersberg) statt. Die einzelnen *Tester-Driver*-Kombinationen sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.3: *Tester-Driver*-Kombinationen der subtraktiven Hybridisierungen.

SSH	<i>Tester</i> -cDNA	<i>Driver</i> -cDNA
1	IWe, 3-5 hpi, inokuliert	Ingrid, 3-5 hpi, inokuliert
2	IWe, 11-13 hpi, inokuliert	Ingrid, 11-13 hpi, inokuliert
3	IWe, 11-13 hpi, mock-inokuliert	Ingrid, 11-13 hpi, mock-inokuliert
4	IWe, inokuliert (alle Zeitpunkte)	Ingrid, mock-inokuliert (alle Zeitpunkte)

Bei den Hybridisierungen 1 und 2 sollten Genfragmente angereichert werden, die in der *Mlg*-tragenden Linie IWe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation (3-5 hpi bzw. 11-13 hpi) im Vergleich zur *mlg*-tragenden Linie Ingrid verstärkt exprimiert werden. Bei der dritten Hybridisierung sollten Genfragmente isoliert werden, die konstitutiv in der resistenten Linie eine stärkere Expression zeigen, während in der letzten Hybridisierung alle Mehлтаupilz-induzierbaren Gene angereichert werden sollten.

2.6.6 Suppressions-PCR

Die Suppressions-PCR soll dazu dienen, die differentiell exprimierten cDNAs selektiv zu amplifizieren. Es wurde auch hier gemäß den Herstellerangaben verfahren, allerdings wurden beide PCR-Schritte mit mehr Zyklen durchgeführt, als im *CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual* angegeben waren. Bei den ersten Suppressions-PCRs wurden 28 Zyklen statt der empfohlenen 27 gewählt, und die *nested*-PCRs mit 17 statt der angegebenen 10-12 Zyklen durchgeführt, da zuvor keine Produkte sichtbar waren.

2.6.7 Klonierung der PCR-Produkte

Da bei der Suppressions-PCR *blunt-end* cDNAs, d.h. Fragmente ohne Nukleotidüberhang, entstanden waren, wurde für die Klonierung der *Zero Blunt® TOPO® PCR Kloning Kit for*

Sequencing (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. An den 3'-Enden des linearisierten *pCR[®]4Blunt-TOPO[®]*-Vektors befindet sich die aus dem *Vaccinia*-Virus stammende Topoisomerase I, die die Ligation von *blunt-end* PCR-Produkten bewerkstelligt. Ausserdem besitzt der Vektor zu beiden Seiten der Insertionsstelle einen Teil des *LacZα-ccdB*-Fusionsgens, das bewirkt, dass Zellen, die einen Vektor ohne *Insert* aufgenommen haben, absterben. Letztlich überleben nur die *E. coli*-Zellen, die den *pCR[®]4Blunt-TOPO[®]*-Vektor mit einkloniertem PCR-Produkt aufgenommen haben.

▪ **Klonierungsansatz:**

4 µl	frisches PCR-Produkt
1 µl	Salzlösung
1 µl	TOPO [®] -Vektor
<u>6 µl</u>	Endvolumen

Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur, erfolgte die Transformation der Vektoren in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen. Dazu wurden 2 µl des Klonierungsansatzes mit 50 µl *TOP 10 One Shot[®] Chemically Competent E. coli* (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) in einem Eppendorfgefäß gemischt und 25 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 30 Sekunden, wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit 250 µl SOC-Medium vermischt. Die Vermehrung der transformierten Zellen fand während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C in einem Horizontalschüttler statt, in dem die Eppendorfgefäße mit 200 rpm geschüttelt wurden.

Die Zellen wurden dann auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

- SOC-Medium:

2g	Bacto Trypton
0,55g	Bacto Yeast Extract
1 ml	1M NaCl Stock-Solution
1 ml	1M KCl Stock-Solution

- LB-Agar:

10 g	bacto-tryptone (Gibco [™] BRL, Karlsruhe)
5 g	bacto-yeast-extract (Gibco [™] BRL, Karlsruhe)
10 g	NaCl
15 g	Agar-Agar (Serva, Heidelberg)
ad 1 l mit A. dest., → pH 7 mit NaOH, autoklaviert	

- mit Ampicillin: 100 mg Ampicillin (sterilfiltriert) hinzugeben.

Von jeder der vier Hybridisierungen wurden 323-384 Bakterienkolonien mit integrierten cDNA-Fragmenten für weitere Untersuchungen isoliert, indem sie mit einem sterilen Zahnstocher auf LB-Agarplatten mit Ampicillin übertragen wurden.

2.7 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

2.7.1 Kolonie-PCR

Die einzelnen Klone der subtrahierten cDNA-Banken (2.6.7) wurden zunächst auf die Größe der inserierten cDNA-Fragmente in einer Kolonie-PCR hin überprüft. Diese wurde mit den Primern *nested 1* und *nested 2R* (s.u.) durchgeführt, die komplementär zu den Adaptorsequenzen sind, die an die RsaI-geschnittenen cDNA-Fragmente ligiert wurden (vgl. 2.6.4), und somit den inserierten Bereich direkt flankieren. Für die Amplifikation der inserierten cDNA-Fragmente wurden einige Zellen jeder Kolonie mit Hilfe eines Zahnstochers steril in 15 µl A. bidest überführt und mit den Komponenten eines Reaktionsansatzes vermischt.

- **Reaktionsansatz:**

2 µl	10x PCR-Puffer (Silverstar, Eurogentec, Heidelberg)
2 µl	dNTPs (2 mM)
2 µl	Primer 1/2R-Mix (10 mM)
0,12 u	Taq-Polymerase (Silverstar, Eurogentec, Heidelberg)
20 µl	Endvolumen

Die Amplifikation erfolgte in einem *thermocycler* (Perkin Elmer 9700).

	3 min	94 °C	Denaturierung
	15 sec	94 °C	Denaturierung
35x	30 sec	68 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	60 sec	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	7 min	72 °C	Komplettierung der cDNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

- *nested 1*-Primer: 5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGG-3'
- *nested 2R*-Primer: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

Anschließend wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl 5x DNA-Ladepuffer versetzt und im 1,5 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,16 µg/ml) in 1x TBE-Puffer

gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente ein 1 kb plus-Marker. Der Rest der Kolonie-PCR wurde 1:2 mit *A. bidest* verdünnt.

- 5x DNA-Ladepuffer: 50 % 10x Farbmarker, 50 % 10x TBE
- 10x Farbmarker: 0,25 % Bromphenolblau, 40 % Sucrose
- 10x TBE: 0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 25 mM EDTA, autoklaviert
- 1 kb⁺-Marker: 1 µg *1 Kb PLUS DNA LadderTM* (GibcoTMBRL, Karlsruhe)
in 1x TBE und 1x Farbmarker

2.7.2 Reverse Northern Dot Blots

Im Gegensatz zu *Northern* Analysen sind bei *Reversed Northern* Analysen mobiler und fixierter Hybridisierungspartner miteinander vertauscht und an Stelle von RNA wird cDNA eingesetzt. Für die *Dot Blots* wurde je 1 µl der verdünnten Produkte der Kolonie-PCR in zweifacher Wiederholung manuell auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gespottet. Als Kontrollen zum Vergleich der Signalstärken auf den mit *Tester*- und *Driver*-Sonde hybridisierten Blots wurden PCR-Produkte der GAPDH und eines Aktins auf die Membran aufgebracht. Durch Auflegen der Membran auf ein mit Denaturierungs-Puffer getränktes Filterpapier für 2x 5 min denaturiert, wobei die DNA-Seite nach oben wies. Nach einer anschließenden Neutralisation, für die die Membran 2x 5 min auf ein mit Neutralisations-Puffer getränktes Filterpapier gelegt wurde, wurde die DNA durch UV-*crosslinking* (125 mJ) kovalent an die Membran gebunden (*GS Gene LinkerTM UV chamber*, Bio-Rad, München). Von jeder Membran wurde ein Duplikat angefertigt. Vor der Hybridisierung wurden die Membranen 2x 5 min in 2x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen und 30 min bei 60 °C im Hybridisierungs-Ofen (Hybaid, Heidelberg) mit *Dig Easy Hyb* Puffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) prähybridisiert. Danach wurden die beiden Kopien der Membranen mit den korrespondierenden cDNA-Sonden von *Tester* und *Driver* (vgl. Tab. 2.3) bei 60 °C über Nacht hybridisiert. Bei den Sonden handelte es sich um PCR-Sonden, die durch Amplifikation der einzelsträngigen *SMARTTM*-cDNA (s. 2.6.1) gewonnen worden waren. Um die DIG-Markierung der Sonden zu erreichen, wurde bei der *SMARTTM*-Zweitstrangsynthese (s. 2.6.1) der dNTP-Mix durch einen *PCR DIG Probe Synthesis Mix* (*PCR DIG Probe Synthesis Kit*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ersetzt. Nachdem die Intensität der beiden Sonden angeglichen worden war, wurden diese bei -20 °C gelagert. Vor jeder Hybridisierung wurden die Sonden 5 min bei

90 °C denaturiert. Die Immunodetektion erfolgte nach Waschen der Membranen mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern über Chemilumineszenz entsprechend den Herstellerangaben für *Anti-Dig-AP*, *Fab fragments* und *CPD-StarTM* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Nach Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-OMATTM AR, Röntgen Bender, Baden-Baden) mit der eingeschweißten Membran wurde die Hybridisierung der Sonden mit den PCR-Produkten durch Schwärzung des Films nach dessen Entwicklung sichtbar.

- Denaturierungs-Puffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
- Neutralisierungs-Puffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris → pH 7,5 mit HCl, autoklaviert
- 20 x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Na-citrat, → pH 7 mit HCl, autoklaviert
- 10 % SDS: 10 % *sodiumdodecylsulfate* (w/v) in A. bidest, autoklaviert

2.8 Identifizierung von Resistenzgen-Analoga (RGA) in *SMARTTM*-cDNAs

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, mit Hilfe von verschiedenen Primerkombinationen, die von Sequenzen bestimmter Motive bereits bekannter Resistenzgene abgeleitet worden waren, das *Mlg*-Gen zu isolieren. Von den insgesamt 141 Primerkombinationen waren 69 von Nukleotidbindestellen (NBS), 59 von leucinreichen Regionen (LRR), 7 von Kinasemotiven, 4 von Toll-Interleukin-Motiven (TIR) und 2 von Leucin-Zipper-Motiven (LZ) abgeleitet worden (s. Tab. 8.3).

2.8.1 Durchführung der RGA-PCRs

Die Primerkombinationen wurden in PCRs eingesetzt, bei denen die *SMARTTM*-cDNAs (s. 2.6.1) als *template* dienten. Auf diese Weise sollten Gene mit Resistenzgenmotiv isoliert werden, die entweder in den *Mlg*-tragenden Gerstenlinien Ingrid-Weihenstephan (IWe) bzw. Manchuria-Goldfoil (MGf) im Vergleich zur nahezu isogenen, Mehлтаupilz-suszeptiblen Linie Ingrid (I) bzw. Manchuria_{isogen} (Mi) verstärkt exprimiert wurden, oder Gene, deren Expression nach *Bgh*-Inokulation erhöht war.

- **Reaktionsansatz**

2,5 µl	10x PCR-Puffer (SubTherm, Genecraft, Münster)
2,5 µl	dNTPs (2 mM)
0,75 µl	MgCl ₂ (3 mM)
4 µl	for. + rev. Primer-Mix (5 mM)
15,13 µl	A. bidest
0,12 µl	Taq-Polymerase (SubTherm, Genecraft, Münster)
25µl	Endvolumen

Die Amplifikation erfolgte in einem *thermocycler* (Perkin Elmer 9700):

	1 min	94 °C	Denaturierung
	15 sec	94 °C	Denaturierung
35x	30 sec	45-55 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	30 sec	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	7 min	72 °C	Komplettierung der ds-DNA
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Die PCR-Produkte wurden mit 3 µl 10x DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend gelelektrophoretisch im 1,5 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,16 µg/ml) in 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Polymorphe Banden wurden mittels Skalpell aus dem Gel geschnitten und die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) eluiert.

- 10x TBE: 0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 25 mM EDTA, autoklaviert

2.8.2 Klonierung der cDNA-Fragmente

Die eluierten cDNA-Fragmente wurden unter Verwendung des *pGEM[®]-T Vector Systems* (Promega, Mannheim) in *E. coli*-Zellen, Stamm DH5α (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) kloniert. Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.9 Plasmidpräparation

2.9.1 Mini-Plasmidpräparation

Zunächst wurden Übernachtskulturen der Klone hergestellt, indem mit einem sterilen Zahnstocher Zellen einer Einzelkolonie in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt wurden, und die Kultur über Nacht bei 37 °C horizontal geschüttelt wurde. Zur Plasmidpräparation wurden die Zellen anschließend pelletiert. Die Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA aus

Bakterienzellen wurde mit dem *Qiaprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Daneben wurden *glycerolstocks* von den Klonen angelegt, indem 150 µl Glycerin mit 850 µl Bakterienkultur auf einem Vortexer gut vermischt und bei -70 °C gelagert wurden.

2.9.2 Midi-Plasmidpräparation

Für die Isolierung größerer Mengen an Plasmid wurde eine 50 ml-Übernachtskultur angelegt, deren Zellen nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C in einem Horizontalschüttler für die Plasmidpräparation pelletiert wurden. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach Anleitung des *NucleoBond[®] PC 100 Kits* (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

2.10 Sequenzierung und *GenBank* Sequenzvergleiche

Die cDNA-Klone, die aus den RGA-Versuchen stammten, wurden, ebenso wie die, die im *Reversed Northern* differentielle Signale ergaben (s. 2.7.2), mit dem *Thermo Sequanase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) vom Plasmid nach der didesoxy-Kettenabbruckmethode (Sanger *et al.* 1977) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem *Li-Cor* 4000-Gerät (MWG-Biotech AG, Ebersberg) mit Fluoreszenz-(IRD800)-markierten M13*reverse*- oder M13*universal*-Primern (s.u.) im 6 %igen Polyacrylamidgel bei 40 °C, 37 mA, 1500 V und 40 W über Nacht (Trennstrecke 40 cm).

- Gel: 35 ml 6 % *Long Ranger Gel Solution* (Biozym, Hess. Oldendorf),
 7 M Harnstoff, 1 x TBE *long run* (MWG-Biotech AG, Ebersberg),
 sterilfiltriert
 350 µl DMSO (Dimethylsulfoxid)
 25 µl TMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
 250 µl 10 % APS in A. bidest (w/v)

- Sequenzierprimer:
 M13*forward* (-21): 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (5' IRD 800 Mod.)
 M13*universal* (-29): 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' (5' IRD 800 Mod.)

Für die Sequenzierreaktion wurden zu jeweils 1,5 µl A-, C-, G-, T-Lösung des Kits 4,5 µl des folgenden Mixes pipettiert und die Reaktion anschließend im *thermocycler* amplifiziert.

- *cycle sequencing*-Mix: 1-2 µg Plasmid
 ad 18 µl A. bidest
 2 µl Sequenzierprimer (10 µM)
 3 µl DMSO

	5 min	95 °C	Denaturierung
	15 sec	94 °C	Denaturierung
30 x	15 sec	61/64 °C (M13rev/M13univ)	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	15 sec	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Syn.)
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Nach Zugabe von 4 µl Stoppuffer (*Fluorescent loading dye with formamide*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zu jedem Reaktionsansatz, wurden 1,5 µl der Ansätze auf das Polyacrylamidgel geladen.

Die Sequenzen wurden in der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) *GenBank*-Datenbank mit Hilfe des BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Algorithmus auf Ähnlichkeiten mit anderen Sequenzen (Gene, ESTs und Proteine) untersucht (Altschul *et al.* 1997). Das Auffinden bestimmter Motive in den Sequenzen erfolgte durch Vergleiche mit bekannten Proteinmotivmustern in der *Prosite*-Datenbank (*ExPasy Molecular Biology Server*, *Swiss Institute of Bioinformatics* [SIB]) oder in der *Pfam HMM*-Datenbank (<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>, *University in St.Louis, Washington*). Motive innerhalb von Promotorregionen wurden durch Vergleiche in der *PlantCARE* Datenbank (<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/index.htm>) identifiziert. Alignments zum Vergleich von zwei oder mehreren Sequenzen miteinander wurden mit *ClustalW* (*European Molecular Biology Laboratory* [EMBL] *outstation* – *European Bioinformatics Institute* [EBI]) und dem Programm *GeneDoc* (*Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility*, Nicholas & Nicholas 1997) durchgeführt.

2.11 Überprüfung der differentiellen Expression auf Transkriptionsebene

2.11.1 Northern-Analysen

2.11.1.1 Denaturierende Agarosegele

Die Gesamt-RNA wurde in einem 1,5 %igen Agarosegel mit 5 % (v/v) Formaldehyd (37 %) in 1x MOPS gelelektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurde die RNA-Lösung mit dem gleichen Volumen an RNA-Ladepuffer versetzt und zum Auflösen von Sekundärstrukturen 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert.

- 10x MOPS: 200 mM Morpholin-3-propansulfonsäure
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
→ pH 7 mit NaOH, 1 % [v/v] DEPC, autoklaviert

- RNA-Ladepuffer: 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 in A. bidest_{DEPC})
ad 1,5 ml mit A. bidest_{DEPC}

2.11.1.2 Northern Blotting

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von 10-15 µg Gesamt-RNA wurden *Northern Blots* mittels Kapillarstromtransfer in 25 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6,5 bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Als Matrix diente eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), an die die RNA durch UV-Bestrahlung (125 mJ) kovalent gebunden wurde (s. 2.7.2).

2.11.1.3 Sondenherstellung

Alle *Northern* Analysen wurden mit ³²P-markierten PCR-Sonden durchgeführt. Als *template* für die Sondenherstellung diente entweder das Produkt aus der Kolonie-PCR (s. 2.7.1) oder das isolierte Plasmid mit integrierter cDNA (s. 2.9).

▪ **Reaktionsansatz:**

0,5 µl	Plasmid-DNA / PCR-Produkt
1,0 µl	10x PCR-Puffer (Silverstar, Eurogentec, Heidelberg)
1,0 µl	500 µM dATP-, dGTP-, dTTP-Mix
1,0 µl	for. + rev. Primer-Mix (10 µM)
0,3 µl	MgCl ₂ (50 mM)
2,7 µl	A. bidest
0,5 µl	Taq-Polymerase (Silverstar, Eurogentec, Heidelberg)
3,0 µl	α-dCTP ³² (10 µCi/µl)
<u>10,0 µl</u>	Endvolumen

Als Primer wurden entweder *nested 1-* und *nested 2R*-Primer (s. 2.7.1) oder die *U/R-Primer* M13fw [-40] und M13rev (s.u.) eingesetzt.

- M13fw [-40]: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
- M13rev: 5'-AACAGCTATGACCATGA-3'

Die Amplifikation fand in einem *thermocycler* statt (Primus, MWG-Biotech AG, Ebersberg).

	2 min	95 °C	Denaturierung
	15 sec	94 °C	Denaturierung
35 x	15 sec	56 o. 68 °C (<i>U/R</i> o. <i>nested</i>)	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	15 sec	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Syn.)
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Nach Beendigung der PCR wurden nicht-inkorporierte Nukleotide unter Einsatz einer Sephadex-Zentrifugationssäule (*MicroSpin G-25*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) vom PCR-Produkt nach Herstellerangaben abgetrennt. Die gereinigte Sonde wurde dann, bevor sie zur Hybridisierung eingesetzt wurde, 5 min bei 85 °C denaturiert.

2.11.1.4 *Northern* Hybridisierung und Detektion der Hybridisierungssignale

Vor der Hybridisierung wurden die Blotmembranen in 2x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur 3 x 10 min auf einem Schüttler gewaschen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60 °C im Hybridisierungsofen. Vor Zugabe der Sonde fand eine mindestens einstündige Prähybridisierung der Membran in 10 ml 1x Hybridisierungspuffer statt. Für die Hybridisierung wurde jeweils ein Volumen der denaturierten Sonde entsprechend ca.

300.000-400.000 cpm/ml eingesetzt. Nach einer etwa 16-stündigen Hybridisierung wurde die Membran zuerst 2x 5 min mit 2x SSC, 0,1 % SDS (60 °C) in der Röhre gewaschen. Dann erfolgte ein Waschen in 0,1x SSC, 0,1 % SDS im Wasserbad bei 60 °C, bis kein radioaktiver Hintergrund mehr mit dem Handmonitor zu detektieren war. Die Membran wurde dann in einen Plastikbeutel eingeschweißt und mit einem *Phosphorscreen* (*Kodak Imaging Screen-K*, Bio-Rad, München) exponiert. Das Auslesen der *Phosphorscreens* fand in einem *Phosphorimager* (*Molecular Imager[®] FX*, Bio-Rad, München) statt und wurde mit dem Programm *Quantity One-4.1.1* (Bio-Rad, München) in einer Auflösung von 100 oder 200 µm dokumentiert.

- 5x Hybridisierungspuffer: 1 % BSA (Rinderserumalbumin, w/v)
1 % Polyvinylpyrrolidon 10-40 kDa (w/v)
1 % Ficoll 1400000 (w/v)
250 mM TrisCl, pH 7,5
0,5 % Tetra-Na-diphosphat-Decahydrat (w/v)
5 % SDS (w/v)
sterilfiltriert (0,45 µm)

- 1x Hybridisierungspuffer: aus 5x Hybridisierungspuffer mit A. bidest verdünnt
0,4 M NaCl

2.11.2 RT-PCR

In den Fällen, in denen eine Genexpression für *Northern*-Analysen zu schwach war, wurde auf die sensitivere Methode der RT-PCR zurückgegriffen. Zu diesem Zweck wurde der *OneStep RT-PCR-Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach Reverser Transkription der RNA in cDNA, wurde anschließend mit Hilfe spezifischer Primer ein Fragment des zu untersuchenden Gens amplifiziert. Wenn mit Hilfe der RT-PCR eine differentielle Genexpression untersucht werden sollte, war es nötig, die Übereinstimmung der RNA-Konzentrationen in allen Proben durch RT-PCR mit *Ubiquitin1*-Primern (s. Tab. 8.4) zu überprüfen. Mit Hilfe dieser Primer wird ein etwa 500 bp großes Fragment des Transkripts des konstitutiven *Ubiquitin1*-Gens amplifiziert. Die Stärke der Banden sollte im Gel in allen Spuren gleich sein.

▪ **Reaktionsansatz:**

500 ng	RNA
5,0 µl	5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer
0,8 µl	dNTPs (10 mM)
0,4 µl	for. + rev. Primer-Mix (10 mM)
0,2 µl	RNase-Inhibitor (10 u/µl)
0,9 µl	Enzym-Mix
ad 25 µl	RNase freies Wasser

Die Reverse Transkription und anschließende Amplifikation fanden in einem *thermocycler* (Perkin Elmer 2400) statt:

	30 min	50 °C	Reverse Transkription
	15 min	95 °C	Inaktivierung der RT, Denaturierung
	30 sec	94 °C	Denaturierung
24-30 x	30 sec	56-65 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	30 sec	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	10 min	72 °C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Die RT-PCR-Produkte wurden schließlich im TBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt.

2.11.3 „*SMART*TM-RT-PCR“

Da die Zahl der Gene, deren Expression auf Transkriptionsebene im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, recht groß war, wurde nach einer preiswerten Alternative zur RT-PCR gesucht. So wurde die Methode der „*SMART*TM-RT-PCR“ entwickelt, bei der statt RNA doppelsträngige *SMART*TM-cDNA als *template* eingesetzt wurde. Vorteil dieser Methode war es, dass das *template* in nahezu beliebiger Menge amplifiziert werden konnte, wobei das Verhältnis der in der Ausgangs-RNA enthaltenen Transkripte unverändert blieb (Herrler 2000). Für die Herstellung der *SMART*TM-cDNA (s. 2.6.1) wurden Inokulationsversuche mit Echtem Gerstenmehltaupilz (*Bgh*) an den Gerstenkultivaren Ingrid und Ingrid-Weihenstephan (IWe) sowie mit Echtem Weizenmehltaupilz (*Bgt*) an Ingrid durchgeführt (s. 2.3.1), um unabhängige RNA zu gewinnen. Außerdem wurde *SMART*TM-cDNA aus PolyA⁺-RNA chemisch induzierter bzw. WP-behandelter Primärblätter cv. Manchuria hergestellt, um eine BTH-Induzierbarkeit der untersuchten Gene zeigen zu können. In Tabelle 2.4 sind die synthetisierten *SMART*TM-cDNAs zusammengestellt.

Tab. 2.4: Übersicht der für die SMARTTM-RT-PCR hergestellten SMARTTM-cDNA-Banken.

Linie	Zeitpunkt	Behandlung	Linie	Zeitpunkt	Behandlung
Ingrid	4 hpi	mock-inokuliert	Ingrid	4 hpi	<i>Bgt</i> -inokuliert
Ingrid	8 hpi	mock-inokuliert	Ingrid	8 hpi	<i>Bgt</i> -inokuliert
Ingrid	12 hpi	mock-inokuliert	Ingrid	12 hpi	<i>Bgt</i> -inokuliert
Ingrid	4 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert	Manchuria	7 hpt	WP-behandelt
Ingrid	8 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert	Manchuria	24 hpt	WP-behandelt
Ingrid	12 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert	Manchuria	7 hpt	BTH-behandelt
IWe	4 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert	Manchuria	24 hpt	BTH-behandelt
IWe	8 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert	hpi: <i>hours post inoculation</i> hpt: <i>hours post treatment</i>		
IWe	12 hpi	<i>Bgh</i> -inokuliert			

Die SMARTTM-cDNAs mock-inokulierter bzw. WP-behandelter Proben dienten als Kontrollen für die Induzierbarkeit der Gene durch Mehltäupilz oder BTH. Ebenso wie bei der RT-PCR wurde die Übereinstimmung der cDNA-Konzentrationen der einzelnen Banken durch PCR mit *Ubiquitin1*- oder *MAPK*-Primern (Acc.Nr.: AJ495775, s. Tab. 8.4) überprüft (s. 2.11.2). Für die Amplifikation wurde das Programm der RT-PCR verwendet, wobei der RT-Schritt entfiel und die erste Denaturierung auf 2 min verringert wurde.

2.12 Verlängerung der ESTs

2.12.1 RACE-Experimente

RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) ist dazu geeignet, ESTs in 5'- oder 3'-Richtung zu *full length* Transkripten zu verlängern. Die für diese Methode erforderliche cDNA-Bank wurde gemäß den Herstellerangaben zum *GeneRacerTM Kit* (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) aus 250 ng mRNA *Bgh*-inokulierter Primärblätter der Linie IWe (3 und 13 hpi) gewonnen. Unter Verwendung der *GeneRacerTM*-Primer, die an Adaptoren binden, die an die cDNA ligiert worden sind, und genspezifischer Primer sollten in einer PCR *full length* Kopien des untersuchten Gens amplifiziert werden. Sämtliche verwendeten Primer sind im Anhang (Tab. 8.5) aufgeführt.

2.12.2 Inverse PCR (iPCR)

Inverse PCR ist eine weitere PCR-basierende Methode, die ursprünglich zur Bestimmung von Insertionsstellen von Transposons eingesetzt wurde (Huang *et al.* 2000). Sie kann aber auch zur Isolierung von Promotoren bzw. zur Verlängerung von EST, die z.B. bei SSH oder einem Kandidatengenansatz entstehen, verwendet werden

Das Prinzip der iPCR ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Zunächst wird genomische DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Die dabei entstandenen Fragmente werden anschließend verdünnt und ligiert, so dass zyklische DNA-Moleküle entstehen. Diese dienen als *template* in einer PCR, bei der spezifische Primer für das jeweilige Gen (*gsp*) eingesetzt werden, die wie Primer für *RACE*-Experimente in 5'- und 3'-Richtung des Gens orientiert sind. Dies bedeutet, dass mit diesen Primern bei einer PCR mit linearisierter DNA keine Produkte amplifiziert werden. In der iPCR wird dann der Bereich zwischen den Primern amplifiziert, der je nach Lage der Restriktionsschnittstelle neue Sequenzinformation in 5'- und/oder 3'-Richtung beinhaltet.

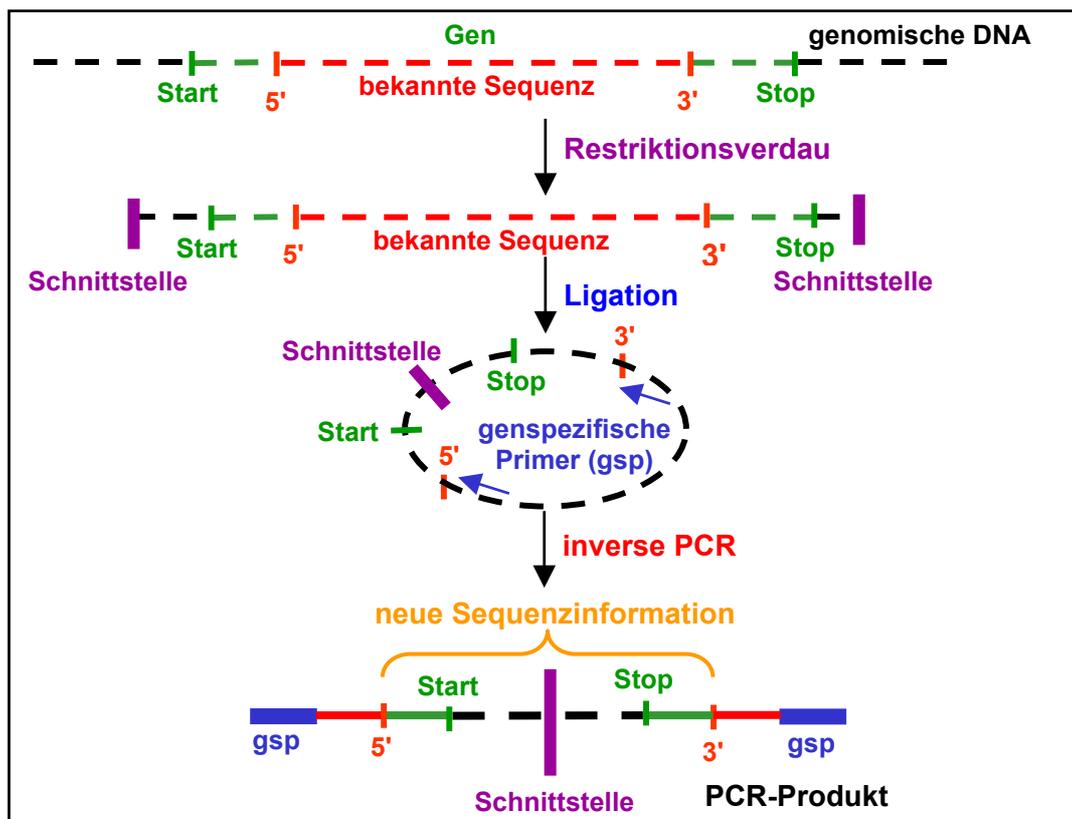


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Prinzips der iPCR. Erklärung siehe Text.

2.12.2.1 Herstellung von Restriktionsbanken

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten iPCR-Experimente wurden 16 verschiedene Restriktionsbanken, d.h. Pools zyklischer DNA-Moleküle, hergestellt. Dafür wurden die Restriktionsenzyme *Bam*HI¹, *Eco*72¹*i*, *Eco*91¹*i*, *Eco*RI², *Eco*RV¹, *Kpn*I¹, *Nco*I¹ und *Rsa*I² (¹: MBI Fermentas, St. Leon-Rot, ²: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Geschnitten wurden pro Enzym 2,5 µg und 750 ng genomischer DNA der Linie IWe während einer vierstündigen Inkubation der Ansätze bei 37 °C. Nach der Zugabe von 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol (100 %), wurden die DNA-Fragmente über Nacht bei –20 °C gefällt und während einer anschließenden Zentrifugation (45 min, 14.000 rpm, 4 °C) in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) pelletiert. Das Pellet wurde dann in 50 µl A. bidest gelöst. Danach erfolgte die Zugabe der folgenden Komponenten:

309 µl	A. bidest
40,0 µl	10x Ligase-Puffer
<u>1,0 µl</u>	T4-Ligase (10 u/µl, Promega, Mannheim)
400 µl	Endvolumen

Die Ligation erfolgte während der Inkubation der Ansätze bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurden die zyklischen DNA-Moleküle durch Zugabe von 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M) und 2 Volumen Ethanol (100 %) nach einer zweistündigen Inkubation bei –20 °C durch Zentrifugation (1 h, 14.000 rpm, 4 °C) gefällt. Das Pellet wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bis es klar war, und dann in 80 µl A. bidest gelöst.

2.12.2.2 Durchführung der inversen PCRs

Für die inversen PCRs wurde die zyklischen DNA als *template* verwendet.

- **iPCR-Reaktionsansatz:**

3 µl	<i>template</i> (zyklische DNA)
13,6 µl	A. bidest
2,5 µl	10x PCR-Puffer (SubTherm, Genecraft, Münster)
2,5 µl	dNTPs (2 mM)
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)
2,5 µl	gs-Primer-Mix (10 pM)
<u>0,15 µl</u>	Taq-Polymerase (10 u/µl, SubTherm, Genecraft, Münster)
25,0 µl	Endvolumen

Die Amplifikation fand in einem *thermocycler* (Perkin Elmer 2400) statt:

	3 min	94 °C	Denaturierung
	30 sec	94 °C	Denaturierung
35 x	30 sec	62-65 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	3 min	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	5 min	72 °C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Nach der Amplifikation wurde eine 1:50-Verdünnung der PCR-Produkte hergestellt, die als *template* für die folgende *nested*-PCR verwendet wurde.

▪ **nested-PCR-Reaktionsansatz:**

1,0 µl	verdünntes PCR-Produkt
15,6 µl	A. bidest
2,5 µl	10x PCR-Puffer (SubTherm, Genecraft, Münster)
2,5 µl	dNTPs (2 mM)
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)
2,5 µl	<i>nested-gs</i> -Primer-Mix (10 pM)
<u>0,15 µl</u>	Taq-Polymerase (10 u/µl, Subtherm, Genecraft, Münster)
25,0 µl	Endvolumen

Die Amplifikation erfolgte im *thermocycler* Perkin Elmer 2400:

	3 min	94 °C	Denaturierung
	30 sec	94 °C	Denaturierung
35 x	30 sec	62-65 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	3 min	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	5 min	72 °C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Die Produkte der *nested*-PCR wurden im TBE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert (s. 2.8.1) und schließlich sequenziert (s. 2.10).

2.13 Genfunktionsanalyse mittels Transienter Transformation

Zur Überprüfung der Funktion einiger ausgewählter Gene im Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz-Pathosystem wurde das von Schweizer et al. (1999a) entwickelte transiente Transformationssystem genutzt. Da von keinem der untersuchten Gene der komplette *open reading frame* (ORF) vorlag, wurden RNA Interferenz (RNAi) Experimente durchgeführt. Dabei wird doppelsträngige RNA des zu untersuchenden Gens synthetisiert und mittels *particle bombardments* in Epidermiszellen von Gerstenblättern eingebracht. Diese dsRNA bewirkt, über einen noch nicht völlig aufgeklärten Mechanismus, dass die mRNA des korrespondierenden Gens degradiert wird, und somit die Translation, d.h. die Bildung des Proteins unterbleibt. RNAi ist daher eine geeignete Methode, Gene gezielt auszuschalten und so ihre Funktion bei der Abwehr des Mehltaupilzes zu untersuchen.

2.13.1 Herstellung doppelsträngiger RNA

Zur Herstellung der dsRNA geht man vom linearisierten Plasmid aus, was bedeutet, dass die Vektoren (pGEM[®]-T und *pCR[®]4Blunt-TOPO[®]*), in die die zu untersuchenden Gene inkloniert waren, in zwei Ansätzen mit Hilfe zweier Restriktionsenzyme geschnitten werden mussten, und zwar hinter dem *Insert* vom jeweiligen RNA-Polymerase-Promoter aus gesehen. Für die Restriktion des pGEM[®]-T-Vektors wurden die Enzyme *Spe I* und *Sph I* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet, beim *pCR[®]4Blunt-TOPO[®]*-Vektor wurde statt mit *Sph I* mit *Not I* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) geschnitten.

- **Restriktionsansatz:**

10 µg	Plasmid
3 µl	10x Restriktionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
1,5 µl	Restriktionsenzym (10 u/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
<u>ad 30 µl</u>	A. bidest

Die Ansätze wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 170 µl H₂O_{DEPC} verdünnt. Die Zugabe von 200 µl Roti[®]-Phenol/Chloroform (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) führte zur Entfernung der Restriktionsenzyme aus der Lösung. Nach zehnminütiger Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C) wurden 200 µl Überstand abgenommen, mit 420 µl 100 %igem Ethanol versetzt und zum Fällern für 20 min auf Eis gestellt. Nach erneuter 30-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4 °C wurde das Ethanol abgenommen, das Pellet

getrocknet und schließlich in 10 μl A. bide_{st}DEPC gelöst. Durch *in vitro* Transkription bei 37 °C für 2 h und unter Verwendung der jeweiligen RNA-Polymerase (T7 im *Spe I*-Verdau, Sp6 im *Sph I*-Verdau und T3 im *Not I*-Verdau) erfolgte die Synthese der RNA-Einzelstränge (*sense* und *antisense*).

▪ **RT-Reaktionsansatz:**

2 μl	<i>template</i> (linearisiertes Plasmid)
4 μl	10x Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
1 μl	RNase-Inhibitor (10 u/ μl , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
5 μl	NTPs (10 mM, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
2 μl	T7 bzw. Sp6 RNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
ad 40 μl	A. bide _{st} DEPC

Die Bildung des RNA-Doppelstrangs erfolgte, indem die Ansätze zusammenpipettiert, 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und anschließend samt Block für 1 h bei –20 °C abgekühlt wurden. Die beiden Einzelstränge und der RNA-Doppelstrang wurden durch Auftrag von je 2 μl im TBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid überprüft.

Für eine Konzentrationsbestimmung wurden 4 μl der dsRNA mit 6 μl A. bide_{st}DEPC, 1 μl Natriumacetat (3 M) und 25 μl Ethanol (100 %) vermischt. Bei einer folgende Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurde die doppelsträngige RNA pelletiert und nach einem Waschschrift mit 70 %igem Ethanol in 400 μl A. bide_{st}DEPC unter Erwärmung gelöst. Schließlich wurde mit Hilfe des Photometers die Konzentration über den Extinktionswert bei 260 nm bestimmt.

2.13.2 Beschichtung der *Microcarrier*

Die Wolframpartikel M 17 (\varnothing : 1,1 μm , Bio-Rad, München) wurden vor der Beschichtung 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die Beschichtung erfolgte durch Mischung folgender Komponenten, wobei das Calciumnitrat (4 °C) langsam und tropfenweise unter Vortexen zugefügt wurde:

125 μl	Wolframpartikel (25 mg/ml)
10 μg	Reporter-DNA (GFP* in pGY-1)
20 μg	dsRNA (des Testgens oder hum. Thyroid-Rezeptors)
145 μl	Ca(NO ₃) ₂ (1M)

*: *green fluorescent protein*

Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis, wurde nach kurzer Zentrifugation so viel Überstand abgenommen, dass für 10 Schüsse 60 µl des Ansatzes übrig blieben. Als Kontrolle zum Testgen diente den RNA Interferenz Experimenten die dsRNA eines humanen Thyroid Hormonrezeptors (*Accession number* NM 000461), der keine Homologien zu Genen in Pflanzen aufweist.

2.13.3 Beschießen der Gerstenblätter

Pro Variante wurden 8 Petrischalen (Ø: 6,5 cm) mit 0,5 %igem Phytagar (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gefüllt. Auf den Agar wurden jeweils vier 5 cm lange Segmente von 6-8 Tage alten Primärblättern cv. Pallas mit der adaxialen Seite nach oben gelegt. Die Blätter wurden mit einer Plastischablone, die in der Mitte einen Ausschnitt von 2x 3 cm freiließe, fixiert und auf den Boden einer Vakuumkammer genau unter einem Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) platziert. Kurz vor dem Schießen wurden die beschichteten *Microcarrier* im Ultraschallbad behandelt, um mögliche Aggregate zu zerschlagen. Pro Schuss wurden 6 µl der beschichteten Partikel auf den *Macrocarrier* (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) aufgetragen, und dieser in die *particle inflow gun (PIG)* eingeschraubt. Mit einer Membranvakuumpumpe wurde der Druck in der Kammer um 0,9 bar reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche der Gerstenblätter geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Nach dem Beschuss wurden die Blätter für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.13.4 Inokulation der Blattsegmente

Vier Stunden nach dem Beschießen wurden die Blattsegmente mit Konidien des Echten Gerstenmehltaupilzes (*BghA6*) inokuliert. Dafür wurden die geöffneten Petrischalen unter einen Inokulationsturm gestellt und so lange Sporen stark infizierter Pflanzen abgeschüttelt, bis eine Dichte von 100-150 Sporen pro mm² erreicht war. Nach der Inokulation standen die Schalen mit geschlossenem Deckel für 48 Stunden bei 18-20 °C.

2.13.5 Mikroskopische Auswertung der transienten Transformation

Die Auswertung erfolgte zwei Tage nach der Inokulation der transformierten Blätter mit Hilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops (Axioplan, Zeiss, Jena). Zur Präparation wurden die Blattsegmente in Wasser geschwenkt, um sie von ungekeimten Sporen zu befreien. Die

gekeimten Mehлтаukonidien wurden durch anschließendes Eintauchen der Segmente in 0,3 %ige Calcofluorlösung (Polysciences Inc., Warrington, USA) für ca. 15 sec angefärbt. Danach wurden die Blattsegmente mit der adaxialen Seite nach oben auf einen Objektträger gelegt und nach Zugabe eines Tropfens 50 %igen Glycerols mit einem Deckglas luftdicht abgeschlossen. Zunächst wurden die Präparate unter Fluoreszenzanregung (Quecksilberhochdrucklampe, HBO 50 W, Osram) bei 100facher Vergrößerung und mit Hilfe eines GFP-Filters (Anregungsfilter 420 nm, Farbteiler 493 nm, Sperrfilter 505-530 nm) nach GFP-Zellen abgesucht. Einzelne GFP-Zellen wurden dann bei 400facher Vergrößerung unter Verwendung eines Calcofluorfilters (365 nm, 395 nm, 420 nm) und Durchlicht (Halogenlampe, 12 V, 100 W) auf die Interaktion mit gekeimten Mehлтаusporen untersucht. Bei den attackierten Zellen wurden erfolgreich penetrierte, d.h. solche mit mindestens einem etablierten Haustorium, von den Zellen unterschieden, bei denen der Penetrationsversuch abgewehrt worden war. Die Penetrationsrate wurde als Quotient der Summe der penetrierten Zellen und der Summe aller Interaktionsstellen berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Zytologische Analyse der Interaktion zwischen Gerste und *BghA6*

Da es Ziel dieser Arbeit war, Gerstengene zu isolieren, die zu frühen Zeitpunkten der Gerste/Gerstenmehltaupilz-Interaktion exprimiert werden, wurden von verschiedenen Gerstenlinien Primärblätter 3-5 hpi bzw. 11-13 hpi (*hours post inoculation*) geerntet. Die zytologischen Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob zu diesen Zeitpunkten bereits Reaktionen der Epidermiszellen auf die Pathogenattacke beobachtet werden konnten. So wurden Blätter der Linien Ingrid (I, *mlg/mlg*), Ingrid-Weihenstephan (IWe, *Mlg/Mlg*), Manchuria_{isogen} (Mi, *mlg/mlg*) und Manchuria_{isogen}-Goldfoil (MiGf, *Mlg/Mlg*) 5 hpi und 13 hpi mikroskopisch auf den Entwicklungsstatus des Pilzes und die Reaktion der attackierten Epidermiszellen hin untersucht. Abbildung 3.1 zeigt das Ergebnis dieser Analysen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei einer Inokulationsdichte von 130 Sporen/mm² etwa auf jeder zweiten Epidermiszelle eine Konidiospore lag.

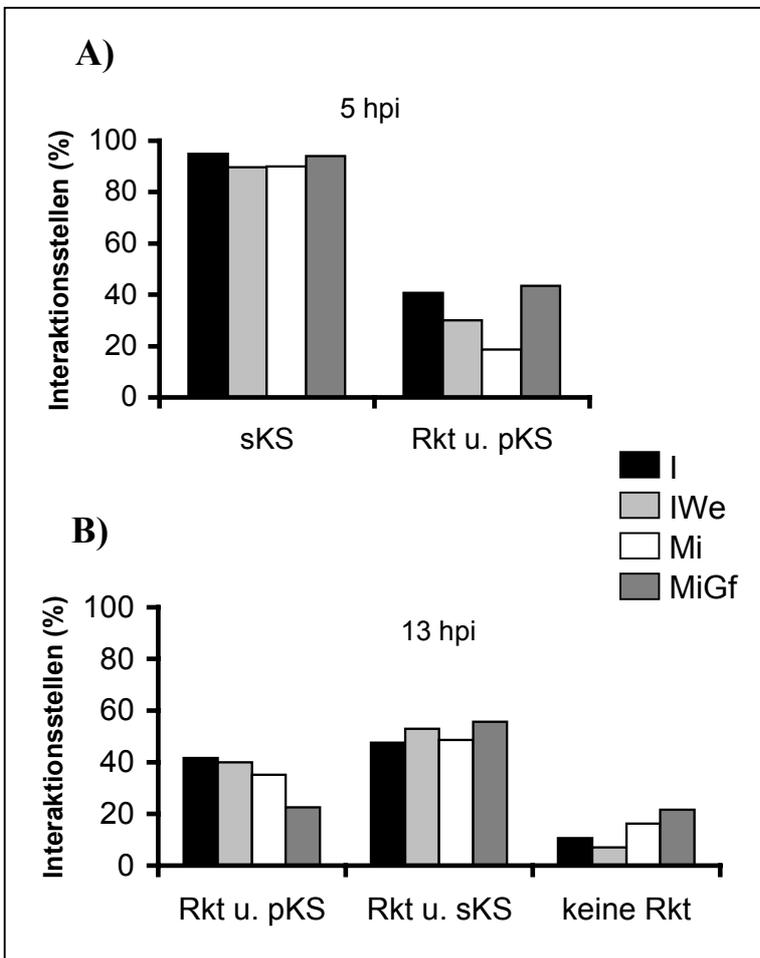


Abb. 3.1: Entwicklungsstatus des Mehлтаupilzes (5 hpi) und Reaktionen der Epidermiszellen auf die Attacke des Pathogens 5 hpi (A) und 13 hpi (B).

sKS: sekundärer Keimschlauch
 pKS: primärer Keimschlauch
 Rkt u.: Reaktion unter
 Gezählt wurden 5 hpi die Konidien, die einen sekundären Keimschlauch (sKS) gebildet hatten, sowie die Reaktionen der attackierten Zellen. Reaktion unter dem primären bzw. sekundären Keimschlauch bedeutet, dass die Zelle entweder ihren Zellkern unter den Keimschlauch verschoben hatte, oder eine Cytoplasmaaggregation unter dem Keimschlauch zu sehen war.
 schwarze Säulen: Ergebnisse der Linie Ingrid (I).
 hellgraue Säulen: Ergebnisse der Linie Ingrid-Weihenstephan (IWe).
 weiße Säulen: Ergebnisse der Linie Manchuria_{isogen} (Mi).
 dunkelgraue Säulen: Ergebnisse der Linie Manchuria_{isogen}-Goldfoil (MiGf).
 Pro Linie und Zeitpunkt wurden 200 Interaktionsstellen ausgewertet.

Fünf Stunden nach Inokulation hatten zwischen 90 % und 95 % der Sporen einen sekundären Keimschlauch ausgebildet. Zu diesem frühen Zeitpunkt zeigten zwischen 18,6 % (Mi) und 43,5 % (MiGf) der Epidermiszellen eine Reaktion auf den Pathogenbefall, was hier meist durch das Verschieben des Zellkerns unter den primären Keimschlauch deutlich wurde, während die Bildung einer Cytoplasmaaggregation äußerst selten war. 13 hpi reagierten zwischen 78,3 % und 93 % der Zellen auf die Attacke des Mehltaupilzes, wobei die Reaktionen unter dem appressorialen Keimschlauch häufiger waren, als die unter dem primären. Bei 47,6 % (I) bis 55,7 % (MiGf) der Interaktionen konnte eine Reaktion unter dem sekundären Keimschlauch beobachtet werden, während unter dem primären Keimschlauch nur in 22,6 % (MiGf) bis 41,7 % (I) der Fälle eine Reaktion sichtbar war. Auf Grund der Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen wurden die gewählten Zeitpunkte (3-5 hpi bzw. 11-13 hpi) für die Isolierung früh Mehltaupilz-induzierter Gene als geeignet erachtet.

3.2 Isolierung differentiell exprimierter Gerstengene mittels Suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH)

Zur Isolierung differentiell exprimierter Gerstengene wurden vier Suppressive Subtraktionshybridisierungen durchgeführt (vgl. 2.6.5). Beim ersten SSH-Experiment sollten Gene angereichert werden, die 3-5 Stunden nach Inokulation mit *BghA6* verstärkt in der *Mlg*-tragenden Linie Ingrid-Weihenstephan (IWe) im Vergleich zur suszeptiblen Linie Ingrid exprimiert waren. Dabei wurden 305 Klone isoliert, die in *Reversed Northern Dot Blots* auf differentielle Signale zwischen *Tester* (cDNA der Linie IWe) und *Driver* (cDNA der Linie Ingrid) hin untersucht wurden. Insgesamt zeigten 36 Klone ein stärkeres Signal auf den mit *Tester*-cDNA als Sonde hybridisierten Blots (s. Abb. 8.1). 27 dieser Klone wurden sequenziert und mit Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen aus der *NCBI GenBank* verglichen (s. Tab. 3.1). Sechs der Klone zeigten keine signifikante Homologie zu bereits bekannten Genen oder Proteinen. Die verbliebenen 21 Klone repräsentierten 8 verschiedene Gene (Sequenzen s. *GenBank* oder Tab. 8.1). Die Klone PI000, PI001, PI002, PI005, PI009, PI019, PI035 sowie die Klone PI006, PI011, PI022 bzw. PI010, PI027 und PI015, PI024, PI030, PI033 enthielten jeweils das gleiche Fragment. Ebenso die Klone PI013, PI014 und PI017, PI037.

Tab. 3.1: Sequenzvergleich der cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene, erstes SSH-Experiment.

Klon-Nr.	Accession-number	Größe (bp)	höchste Homologie blastn/ other ESTs ¹	höchste Homologie blastx ²
PI000 ^N , PI001, PI002 PI005, PI009, PI019, PI035	-/ AJ291335	764	Acc.Nr. AV935242 (0.0, 98 %)	<i>Trichoplusia ni</i> insect intestinal mucin Acc.Nr. AF000605 (2e ⁻⁰⁹ , 41 %)
PI003 ^N	AJ291343		keine signifikanten Homologien	
PI004	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI006 ^N , PI011 PI022	-/	767	Acc.Nr. BF265455 (0.0, 98 %)	<i>Solanum tuberosum</i> photosystem II type II chlorophyll a/b binding protein Acc.Nr. AF079590 (1e ⁻⁸¹ , 84 %)
PI007 ^N	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI008	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI010 ^N , PI027	AJ291338	576	Acc.Nr. BF066036 (0.0, 99 %)	<i>Triticum aestivum</i> WIR1A Protein Acc.Nr.Q01482 (1e ⁻⁸ , 50 %)
PI012	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI013 ^N , PI014	AJ291341	795	Acc.Nr. AV928118 (e ⁻¹¹³ , 83 %)	<i>Hordeum vulgare</i> putative acid phosphatase Acc.Nr. AJ250282 (2e ⁻³⁸ , 68 %)
PI015 ^N , PI024, PI030, PI033	-/	719	Acc.Nr. AV909444 (0.0, 98 %)	<i>Triticum aestivum</i> RuBisCO large subunit Acc.Nr. NC_002762 (e ⁻¹³⁰ , 100 %)
PI016 ^N	-/	569	Acc.Nr. BF253967 (0.0, 98 %)	keine signifikanten Homologien
PI017 ^N , PI037	-/	653	Acc.Nr. AJ433259 (0.0, 98 %)	<i>Hordeum vulgare</i> lipid transfer Protein 7a2b Acc.Nr. T05950 (2e ⁻⁴² , 94 %)
PI018 ^N	AJ291337	896	Acc.Nr. AV834130 (3e ⁻³⁵ , 93 %)	keine signifikanten Homologien
PI021 ^N	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI025 ^N	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI026	-/	361	keine signifikanten Homologien	
PI028 ^N	AJ291342	728	Acc.Nr. BM817394 (2e ⁻⁸⁴ , 94 %)	<i>Portesia coarctata</i> metallothionein Acc.Nr. AF257465 (2e ⁻¹³ , 76 %)
PI029 ^N	AJ291347	434	Acc.Nr. AV936648 (0.0, 99 %)	keine signifikanten Homologien
PI031	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI032 ^N	-/	n.d.	nicht sequenziert	

Fortsetzung Tab.3.1

PI034 ^N	-/	626	Acc.Nr. AV935834 (0.0, 98 %)	<i>Oryza sativa</i> Rieske Fe-S precursor protein Acc.Nr. AF093631 ($5e^{-77}$, 86 %)
PI036 ^N	AJ291348	567	keine signifikanten Homologien	

¹: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e , identische Nukleotide bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

²: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e , identische Aminosäuren bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

^N: differentielle Expression in Northern und/oder RT-PCR überprüft.

n.d.: nicht bestimmt

grau unterlegt: Gene, die als Mehltaupilz-induziert identifiziert werden konnten.

Beim zweiten SSH-Experiment sollten Gene angereichert werden, deren Expression 11-13 hpi in IWe im Vergleich zu Ingrid stärker war. Von den 336 isolierten Klonen zeigten 25 in *Reversed Northern Dot Blots* ein stärkeres Signal auf den mit *Tester*-cDNA als Sonde hybridisierten *Blots* (s. Abb. 8.2). 21 dieser potentiell differentiell exprimierten Gene wurden sequenziert (Sequenzen s. *GenBank* oder Tab. 8.1) und mit Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen aus der *NCBI GenBank* verglichen (s. Tab. 3.2). Zwei der Klone zeigten keine signifikante Homologie zu bekannten Proteinen oder Genen. Die Klone PI063, PI065, PI066, PI078, PI079, PI080, PI084, PI085, PI088, PI090, PI091 und PI093 enthielten jeweils das gleiche Fragment, ebenso die Klone PI073, PI082 bzw. PI074, PI081.

Tab. 3.2: Sequenzvergleich der cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene, zweites SSH-Experiment.

Klon-Nr.	Accession-number	Größe (bp)	Homologie blastn/other ESTs ¹	Homologie blastx ²
PI063, PI065, PI066, PI078, PI079, PI080, PI084, PI085, PI088, PI090, PI091, PI093	-/	706	Acc.Nr. AV928438 (0.0, 90 %)	<i>Oryza sativa</i> photosystem II 10K protein Acc.Nr. T04177 ($3e^{-27}$, 65 %)
PI064	-/	770	Acc.Nr. AV933045 (0.0, 94 %)	<i>Arabidopsis thaliana</i> NADH dehydrogenase Acc.Nr. NM_120938 ($1e^{-86}$, 67 %)
PI067 ^N	-/	n.d.	nicht sequenziert	

Fortsetzung Tabelle 3.2

PI068	-/	396	Acc.Nr. AJ433193 (e^{-128} , 98 %)	<i>Triticum aestivum</i> RuBisCO/ oxygen subunit Acc.Nr. AB042066 ($1e^{-34}$, 80 %)
PI069 ^N	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI070 ^N	-/	950	keine signifikanten Homologien	
PI072 ^N	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI073 ^N PI082	AJ278559	790	Acc.Nr. BE558680 (0.0, 87 %)	<i>Sorghum bicolor</i> leucine-rich repeat protein LRP Acc.Nr.T14818 ($4e^{-22}$, 40 %)
PI074 ^N , PI081	AJ278561	740	Acc.Nr. AV908944 (0.0, 91 %)	keine signifikanten Homologien
PI075 ^N	AJ278562	385	Acc.Nr. AJ435216 (0.0, 99 %)	keine signifikanten Homologien
PI077	-/	n.d.	nicht sequenziert	
PI089 ^N	AJ278556	810	Acc.Nr. HVY14201 (0.0, 97 %)	<i>Hordeum vulgare</i> hypothetical protein pBH6-12 Acc.Nr. T06204 ($1e^{-90}$, 87 %)

¹: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identische Nukleotide bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

²: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identische Aminosäuren bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

^N: differentielle Expression in Northern und/oder RT-PCR überprüft.

grau unterlegt: Gene, die als Mehltapilz-induziert identifiziert werden konnten.

n.d.: nicht bestimmt.

Konstitutiv zwischen IWe und Ingrid differentiell exprimierte Gene sollten im dritten SSH-Experiment isoliert werden. Hierzu wurden cDNAs nicht inokulierter Primärblätter in die Hybridisierungen eingesetzt. Insgesamt wurden 384 Klone isoliert, die in einer Kolonie-PCR (s. 2.7.1) auf die Größe des inserierten cDNA-Fragments hin überprüft wurden. Da nur etwa 10 verschiedene Insertgrößen gefunden wurden, wurde auf die Durchführung von *Reversed Northern Dot Blots* verzichtet und 12 der Klone sofort sequenziert. Die Klone PI108, PI115, PI120 sowie PI111, PI112, PI116 und PI117 enthielten jeweils das gleiche Fragment; ebenso die Klone PI113, PI118 und PI119 (Sequenzen s. *GenBank* oder Tab. 8.1).

Tab. 3.3: Sequenzvergleich der cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene, drittes SSH-Experiment.

Klon-Nr.	Accession-number	Größe (bp)	Homologie blastn/other ESTs ¹	Homologie blastx ²
PI108, PI115, PI120	AJ293751	385	gleiches Fragment wie PI075	
PI109 ^N	-/	378	Acc.Nr. AV937131 (e^{-155} , 98 %)	<i>Hordeum vulgare</i> Mg-chelatase subunit XANTHA-F Acc.Nr. AY039003 ($4e^{-32}$, 97 %)

Fortsetzung Tab.3.3

P1111 ^N , P1112, P1116, P1117	AJ293749	300	Acc.Nr. BG906524 (e ⁻¹¹⁹ , 96 %)	<i>Oryza sativa</i> putative tyrosine phosphatase Acc.Nr. AF272978 (1e ⁻³⁵ , 84 %)
P1113 ^N , P1118, P1119	AJ293750	604	Acc.Nr. AV933002 (0.0, 99 %)	<i>Nicotiana tabacum</i> phosphoprotein phosphatase 2A regulatory chain Acc.Nr. T03684 (1e ⁻⁹⁸ , 96 %)
P1114 ^N	AJ293752	517	Acc.Nr. BF201649 (e ⁻¹⁶⁸ , 96 %)	<i>Oryza sativa</i> unknown protein Acc.Nr. AP003199 (2e ⁻¹⁰ , 44 %)

¹: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identische Nukleotide bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

²: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identische Aminosäuren bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

^N: differentielle Expression in Northern und/oder RT-PCR überprüft.

grau unterlegt: Gene, die als Mehлтаupilz-induziert identifiziert werden konnten.

Das vierte SSH-Experiment sollte dazu dienen, Gene anzureichern, die nach Inokulation der Gerste mit Echtem Gerstenmehltaupilz differentiell exprimiert werden. Als *Tester* wurde cDNA von IWe verwendet, die aus Blättern hergestellt wurde, die mit Mehлтаupilz inokuliert und 3-5 hpi bzw. 11-13 hpi geerntet worden waren. Der *Driver* war in diesem Fall cDNA mock-inokulierter Blätter der Linie Ingrid. Von den 347 isolierten Klonen zeigten 12 in *Reversed Northern Dot Blots* differentielle Signale, wobei die Expression zweier Klone im *Tester* im Vergleich zum *Driver* geringer erschien (s. Abb. 8.3). Entgegen der bisherigen Praxis wurden die differentiellen Klone nicht sofort sequenziert, sondern erst in *Northern* Analysen auf ihre differentielle Expression hin überprüft. Nur einer der Klone (s. Tab. 3.4) zeigte eine verstärkte Expression nach Inokulation mit dem Echten Gerstenmehltaupilz und wurde sequenziert.

Tab. 3.4: Sequenzvergleich des differentiell exprimierten cDNA-Klons, viertes SSH-Experiment.

Klon-Nr.	Accession-number	Größe (bp)	Homologie blastn/other ESTs ¹	Homologie blastx ²
P1121 ^N	-/	723	Acc.Nr. BM371955 (0.0, 99 %)	<i>Triticum aestivum</i> WIR1B Protein Acc.Nr. Q01481 (2e ⁻⁰⁸ , 38 %)

¹: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identische Nukleotide bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

²: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identische Aminosäuren bezogen auf die verglichene Sequenz (in %).

^N: differentielle Expression in Northern und/oder RT-PCR überprüft.

grau unterlegt: Gen, das als Mehлтаupilz-induziert identifiziert werden konnte.

3.3 Überprüfung der Genexpression auf Transkriptionsebene

Die differentielle Expression der mittels SSH identifizierte Klone sollte in unabhängigen Experimenten überprüft werden. Deshalb wurden von den 30 in den Tabellen 3.1 bis 3.4 entsprechend gekennzeichneten Klonen ^{32}P -markierte PCR-Sonden (s. 2.11.1.3) hergestellt, die für *Northern Blot*-Analysen verwendet wurden. Diese wurden mit RNA-Proben aus einer Kinetik *BghA6*- bzw. mock-inokulierter Gerstenprimärblätter der Linienpaare Ingrid (*mlg*) und IWe (*Mlg*) oder *Manchuria*_{isogen} (*mlg*) und *MiGf* (*Mlg*) durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Expression zwischen suszeptiblen (*mlg*) und resistenten (*Mlg*) Linien aufzuzeigen.

3.3.1 Genexpression nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) und *Blumeria graminis* f.sp. *titici* (*Bgt*)

Da bei zwölf der 30 untersuchten Klone (P1003, P1016, P1027, P1028, P1029, P1036, P1073, P1075, P1109, P1111, P1113 und P1114) keine Signale auf den *Northern Blots* detektiert werden konnten, wurde die Expression dieser Klone mit „*SMART*TM-RT-PCR“ (s. 2.11.3) untersucht. Dazu wurden cDNAs aus PolyA⁺-Proben Mehлтаupilz- und mock-inokulierter Gerstenprimärblätter hergestellt, die dann als *template* in PCRs mit für das jeweilige Gen spezifischen Primern eingesetzt wurden. Die „*SMART*TM-RT-PCR“ für P1003, P1028 und P1109, P1114 zeigten eine konstitutive Expression der Gene (ohne Abbildung). In den PCRs mit Primern für P1027, P1029 und P1036 konnten keine Produkte amplifiziert werden. Für die Klone P1016, P1073, P1075, P1111 und P1113 konnte eine verstärkte Expression nach Inokulation mit *BghA6* und *Bgt* gezeigt werden (s. Abb. 3.2). Als Kontrolle wurde eine PCR mit Primern für das *Ubiquitin1*-Gen, das nicht oder nur schwach durch Inokulation mit *Bgh* induziert wurde (Schultheiss *et al.* 2002), durchgeführt. Bei gleichmäßiger Stärke der Ubiquitinsignale konnte davon ausgegangen werden, dass die Konzentrationen der als *template* eingesetzten cDNAs gleich war. Die Expression aller fünf untersuchten Gene wurde durch die Inokulation mit *Bgh* erhöht. P1111 (Tyrosinphosphatasegen) schien nur nach *Bgh*-Inokulation stärker induziert zu sein, während die übrigen vier Kandidatengene auch durch Inokulation mit *Bgt* induziert wurden. Die Expression von P1113 zeigte in der Linie Ingrid nach Inokulation mit *Bgh* und *Bgt* einen biphasischen Verlauf, während seine Expression in der *Mlg*-tragenden Linie IWe nach Inokulation mit *Bgh* unverändert blieb.

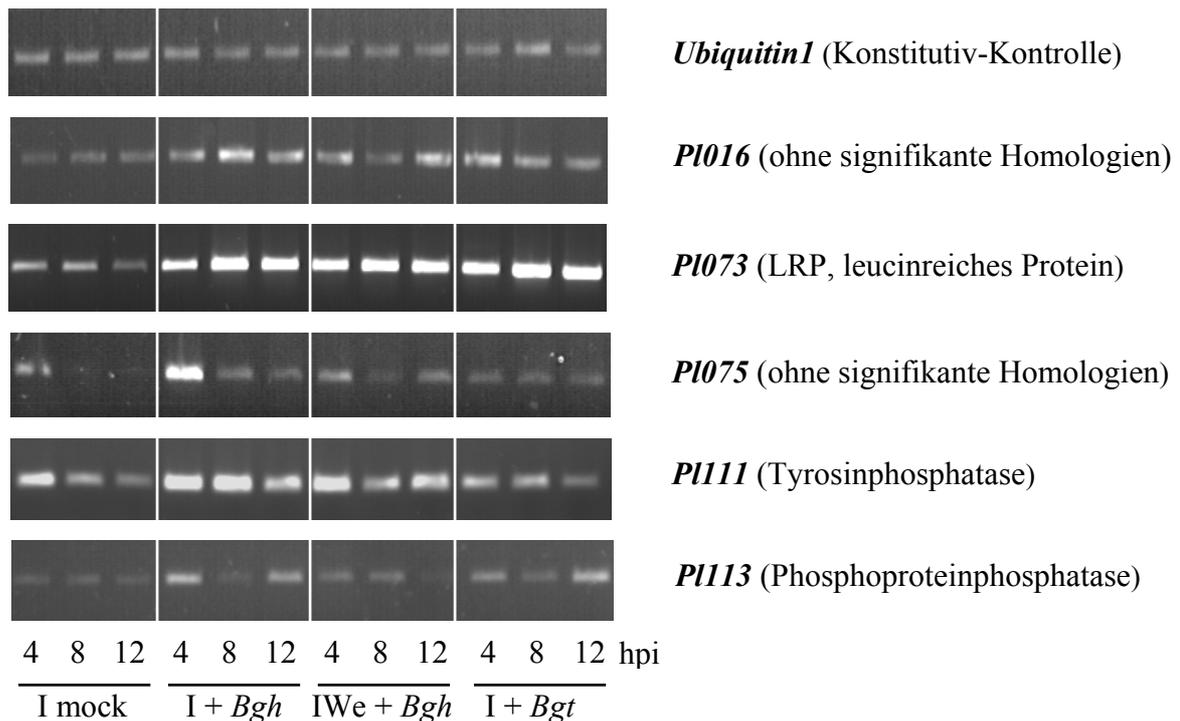


Abb. 3.2: Transkriptabundanz der Gene *Ubiquitin1*, *PI016*, *PI073*, *PI075*, *PI111* und *PI113* nach Inokulation mit *Bgh* und *Bgt*.

Sieben Tage alte Primärblätter der Linien Ingrid und IWe wurden beidseitig mit Sporen des Echten Gerstenmehltaupilzes oder des Echten Weizenmehltaupilzes (ca. 140 Sporen/mm²) bzw. mock-inokuliert. Nach 4, 8 und 12 Stunden wurden Blätter geerntet, aus denen Gesamt-RNA und schließlich mRNA gewonnen wurde. Diese wurde in *SMARTTM*-cDNAs übersetzt, die als *template* für PCRs mit genspezifischen Primern dienten. Als Kontrolle wurde eine PCR mit Primern eines *Ubiquitin1*-Gens durchgeführt, das eine konstitutive Expression zeigte.

Bei vierzehn der untersuchten Gene (*PI000*, *PI007*, *PI013*, *PI015*, *PI017*, *PI018*, *PI021*, *PI025*, *PI032*, *PI034*, *PI067*, *PI069*, *PI070* und *PI072*) konnte bei *Northern* Analysen keine Änderung der Expression nach Inokulation mit *Bgh* festgestellt werden. Auch war kein Unterschied in der Expression dieser Gene zwischen der resistenten Linie IWe und der *mlg*-tragenden Linie Ingrid zu beobachten.

Die Signale der Gene *PI010*, *PI089* und *PI121* waren auf den *Northern Blots* nur sehr schwach zu sehen, deuteten aber eine Induktion nach Inokulation mit *Bgh* an (ohne Abbildung). Diese konnte mit Hilfe der „*SMARTTM*-RT-PCR“ bestätigt werden (Abb. 3.3).

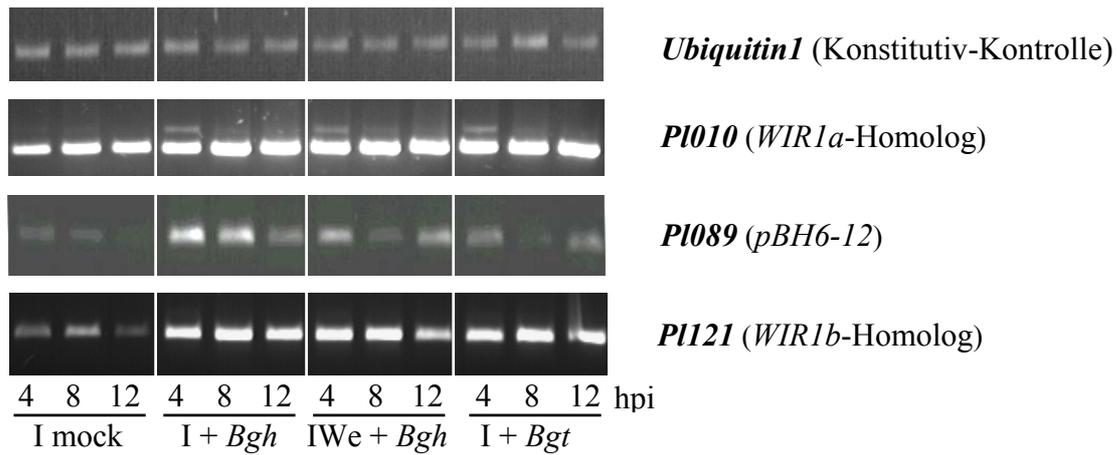


Abb. 3.3: Transkriptabundanz der Gene *Ubiquitin1*, *PI010*, *PI089* und *PI121* nach Inokulation mit *Bgh* und *Bgt*.

Sieben Tage alte Primärblätter der Linien Ingrid und IWe wurden beidseitig mit Sporen des Echten Gerstenmehltaupilzes oder des Echten Weizenmehltaupilzes (ca. 140 Sporen/mm²) bzw. mock-inokuliert. Nach 4, 8 und 12 Stunden wurden Blätter geerntet, aus denen Gesamt-RNA und schließlich mRNA gewonnen wurde. Diese wurde in *SMART*TM-cDNAs übersetzt, die als *template* für PCRs mit genspezifischen Primern dienten. Als Kontrolle wurde eine PCR mit Primern eines *Ubiquitin1*-Gens durchgeführt, das eine konstitutive Expression zeigte.

Northern Blots zeigten eine verstärkte Expression der Gene *PI006* und *PI074* nach Inokulation mit *Bgh* in den Linien Ingrid und IWe. Die Expression von *PI074* schien 24 hpi in IWe stärker zu sein als in der suszeptiblen Linie Ingrid (Abb. 3.4).

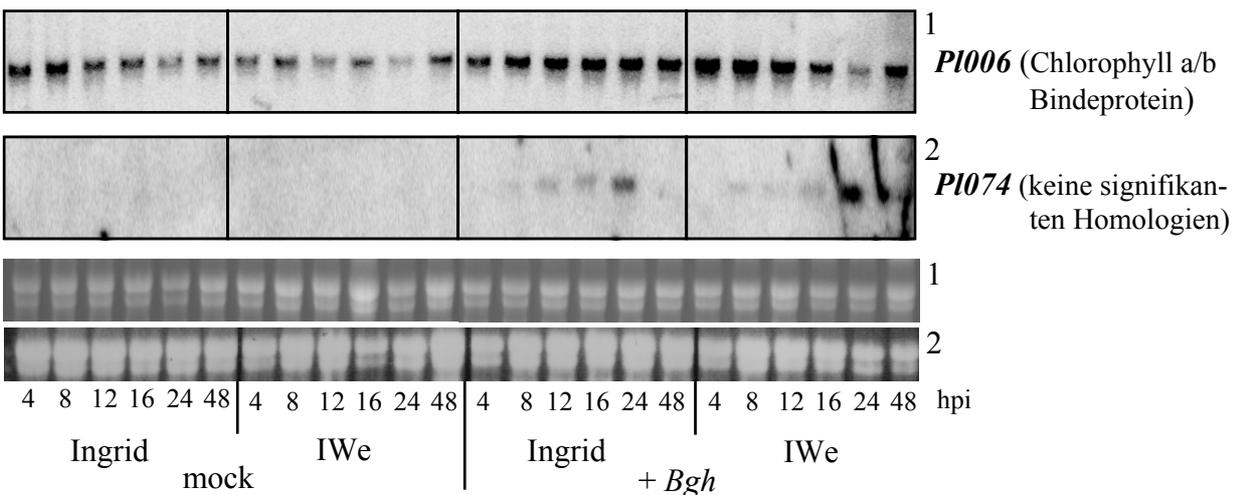


Abb. 3.4: Transkriptakkumulation der Gene *PI006* und *PI074* nach Inokulation mit *Bgh*.

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid und IWe wurden beidseitig mit ca. 140 *Bgh*-Sporen pro mm² inokuliert. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und

Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung von 10-15 µg RNA pro Spur und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit ³²P-PCR-Sonden von *PI006* und *PI074* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung der Gele wurde anhand der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz der ribosomalen Banden unter UV-Licht überprüft. Die Ziffern rechts neben den Autoradiogrammen (oben) und Gelen (unten) geben jeweils den zugehörigen *Blot* an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von 30 genauer untersuchten Klonen 17 eine konstitutive Expression in *Northern Blot* Analysen oder „*SMART*TM-RT-PCR“ zeigten, in drei Fällen konnten keine Signale detektiert werden, und bei zehn Klonen war die Expression nach Inokulation mit Gersten- und Weizenmehltaupilz erhöht. Außer für *PI111* (Tyrosinphosphatase) konnte kein Unterschied in der Expression bei der Gerste/*Bgh* Interaktion im Vergleich zu der der Gerste mit *Bgt* gefunden werden.

PI113 (Phosphoproteinphosphatase) war nur in Ingrid nach Inokulation mit *Bgh* und *Bgt* deutlich induziert, während in IWe die Expression durch die Inokulation unbeeinflusst blieb. Nur einer der Klone, nämlich *PI074*, dessen Sequenz keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen oder Proteinen aufwies, zeigte eine verstärkte Expression in der *Mlg*-tragenden Linie IWe im Vergleich zur suszeptiblen nahezu isogenen Linie Ingrid. Aus diesem Grund wurden weitere *Northern Blots* zur näheren Charakterisierung dieses Gens durchgeführt (s. 3.4).

3.3.2 Genexpression nach chemischer Induktion

Da auf Grund der Phänokopie zwischen chemischer Induktion und *Mlg*-vermittelter rassenspezifischer Resistenz (Kogel *et al.*, 1994) eine Vernetzung der Signalwege dieser beiden Resistenzmechanismen postuliert werden kann, wurde die Transkriptakkumulation der inokulationsinduzierten Gene nach chemischer Induktion mittels „*SMART*TM-RT-PCR“ untersucht (s. 2.11.3). Dazu wurden *SMART*TM-cDNAs aus PolyA⁺-Proben BTH (125 ppm, Sprühapplikation)- und WP-behandelter Gerstenprimärblätter hergestellt, die dann als *template* in PCRs mit für das jeweilige Gen spezifischen Primern dienten. Als Konstitutivkontrolle wurde eine PCR mit *MAPK*-Primern durchgeführt, da das *Ubiquitin1*-Gen durch BTH induziert wurde. Als Positivkontrolle wurde *BCI-4* getestet, das als Marker für chemische Induktion gilt (Beßer, *et al.*, 2000). Nur das WIR1B-Homolog *PI121* zeigte eine deutliche Induktion durch BTH 24 hpt (Abb. 3.5).

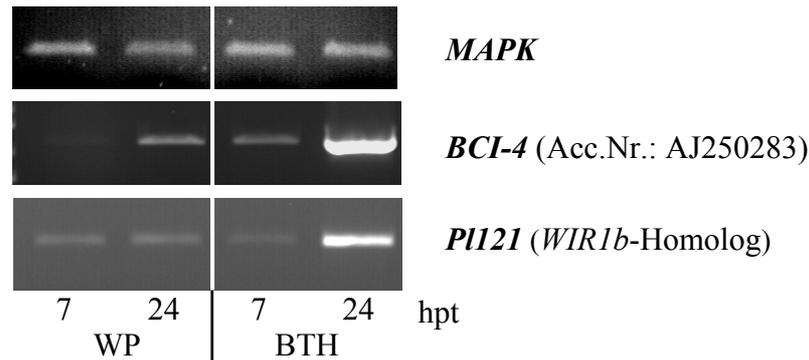


Abb. 3.5: Transkriptabundanz von *MAPK*, *BCI-4* und *PI121* nach Induktion mit BTH.

Sechs Tage alte Keimlinge cv. Manchuria wurden mit 125 mg/l BTH bzw. als Kontrolle mit der Leerformulierung (WP) besprüht. 7 und 24 Stunden nach der Behandlung (hpt) wurden Primärblätter dieser Pflanzen geerntet, aus denen Gesamt-RNA und anschließend mRNA isoliert wurde, die in *SMARTTM*-cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNAs von WP- bzw. BTH-behandelten Primärblättern cv. Manchuria wurden als *template* in die PCRs eingesetzt. Als Konstitutivkontrolle wurde eine PCR mit *MAPK*-Primern (Acc.Nr.: AJ495775) durchgeführt, da *Ubiquitin1* durch BTH induziert wurde. Als Positivkontrolle wurde *BCI-4* getestet, das als Marker für chemische Induktion gilt (Beßer *et al.*, 2000).

3.4 Charakterisierung von *PI074*

Da *PI074* das einzige mittels SSH isolierte Gen war, dessen Expression nach Inokulation mit *Bgh* zwischen IWe (*Mlg*) und Ingrid (*mlg*) differentiell war, wurde seine Transkriptakkumulation in verschiedenen Gerste-*Bgh*-Interaktionen, aber auch nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Bgt* untersucht. Dabei sollte unter anderem festgestellt werden, ob es sich bei *PI074*, das keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen oder Proteinen aufwies, um ein Gen der allgemeinen Abwehr handelte oder ob es speziell nach *Bgh*-Attacke verstärkt exprimiert war.

3.4.1 Expression von *PI074* in *Mlg*- und *mlg*-tragenden Linien

Um die differentielle Expression zwischen *Mlg*- und *mlg*-tragenden Linien zu bestätigen, wurde die Expression von *PI074* auch in den Linienpaaren Manchuria_{isogen}/ Manchuria_{isogen}-Goldfoil (Mi/MiGf), Pallas/Pallas-Deba (P/PDe) und Siri/Siri-Deba (S/SDe) nach Inokulation mit *BghA6* untersucht (Abb. 3.6).

3.4.2 Expression von *Pl074* in *Mla*- und *mlo*-tragenden Linien

Um weiteren Aufschluss über das Expressionsmuster des Gens *Pl074* zu erhalten, wurde die *Pl074*-Transkriptakkumulation in den Linien Sultan-5 (*Mla12*, *Rar1*, *Rar2*), I22 (*mlo5*, *Ror1*, *Ror2*) und deren entsprechenden Mutationslinien M100 (*Mla12*, *rar1-2*, *Rar2*) und A89 (*mlo5*, *ror1-2*, *Ror2*) untersucht (Abb. 3.7).

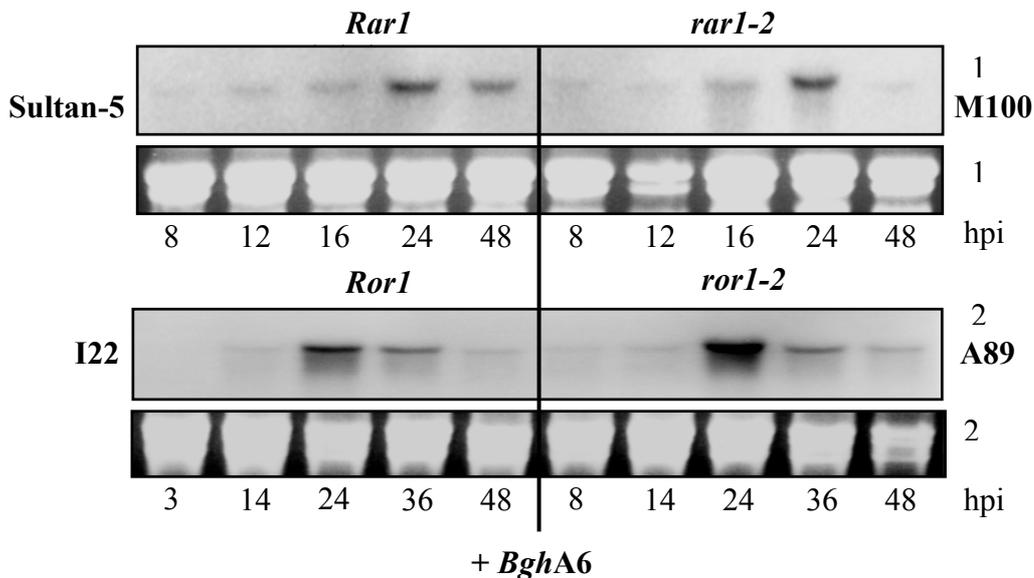


Abb. 3.7: Transkriptakkumulation des Gens *Pl074* in den Linien Sultan-5 (*Mla12*, *Rar1*, *Rar2*), M100 (*Mla12*, *rar1*, *Rar2*), I22 (*mlo5*, *Ror1*, *Ror2*) und A89 (*mlo5*, *Ror1-2*, *ror2*) nach Inokulation mit *BghA6*.

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Sultan-5 und M100 wurden beidseitig mit ca. 140 *Bgh*-Sporen pro mm², cv. I22 und A89 mit ca. 100 Sporen pro mm² nur auf der adaxialen Seite inokuliert. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung von 10-15 µg RNA pro Spur und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit der ³²P-PCR-Sonde von *Pl074* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung der Gele wurde anhand der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz der ribosomalen Banden unter UV-Licht überprüft. Die Ziffern rechts neben den Autoradiogrammen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an.

Die Expression von *Pl074* im Linienpaar Sultan-5/M100 war vergleichbar mit der im Linienpaar Ingrid/IWe. Auch hier war die Expression des Gens 48 hpi in der resistenten *Mla12*-tragenden Linie Sultan-5 im Vergleich zur anfälligen Mutationslinie M100 stärker. Beim Linienpaar I22/A89 zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Beladungsstärke der einzelnen RNA-Spuren in der anfälligen Mutationslinie A89 die

Transkriptakkumulation von *PI074* 24 bis 48 hpi etwas stärker war, als in der *mlo5*-resistenten Linie I22.

3.4.3 Expression von *PI074* nach Injektion von Glukose/Glukoseoxidase

Die Expressionsmuster des *PI074* in den verschiedenen Gerstenlinien deuteten auf eine Korrelation mit der Bildung von Wasserstoffperoxid nach *Bgh*-Attacke hin (Hückelhoven *et al.* 2000a; Hückelhoven *et al.* 2000b). Um den Einfluss von H₂O₂ auf die Expression von *PI074* zu untersuchen, wurde die Transkriptakkumulation dieses Gens nach Injektion von Glukose/Glukoseoxidase (Gluox) in Gerstenprimärblätter mittels RT-PCR untersucht (Abb. 3.8). Das gemeinsame Einspritzen von Glukose und Glukoseoxidase führt zu einer extrazellulären Bildung von H₂O₂, das als Signalmolekül die Expression bestimmter Gene induzieren kann (Wu *et al.* 1995; Wu *et al.* 1997).

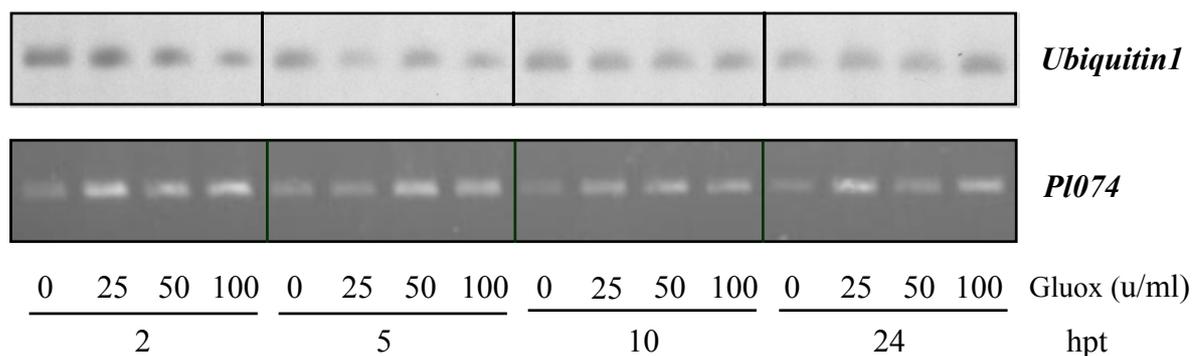


Abb. 3.8: Transkriptabundanz von *Ubiquitin* und *PI074* nach Injektion von Glukose/Glukoseoxidase.

Neun Tage alten Gerstenkeimlingen cv. Pallas wurde eine Kaliumhydrogenphosphatlösung (10 mM K₂HPO₄) injiziert, die 2 mM Glukose und verschiedene Konzentrationen (0, 25, 50, 100 *units/ml*) Glukoseoxidase enthielt. Kontrollpflanzen wurde nur Wasser injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) wurden Primärblätter geerntet, aus denen Gesamt-RNA extrahiert wurde, die als *template* für die RT-PCR diente. Es wurde auch eine RT-PCR mit Primern des *Ubiquitin1*-Gens durchgeführt, das nicht durch Wasserstoffperoxid induziert wird und als Konstitutivkontrolle diente.

Es zeigte sich, dass *PI074* zu allen Zeitpunkten und durch alle Konzentrationen an Glukose/Glukoseoxidase in den Gerstenblättern leicht induziert wurde.

3.4.4 Gewebespezifische Expression von *PI074*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion ausgewählter Gene über Transiente Transformation mittels RNA Interferenz (RNAi) untersucht werden. Da bei dieser Form der Genfunktionsanalyse nur die Expression von Genen, die in der Epidermis exprimiert werden, transient inhibiert wird, wurde mittels RT-PCR überprüft, ob das Gen *PI074* eine epidermale Expression nach Inokulation mit *BghA6* zeigte. Als Positivkontrolle wurde das in der Epidermis exprimierte *WIR1b*-Homolog gewählt (Abb.3.9).

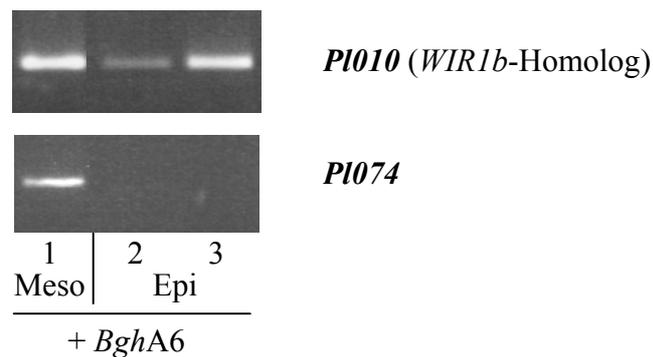


Abb. 3.9: Gewebespezifische Expression von *WIR1B*-Homolog und *PI074*.

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Pallas wurden auf der abaxialen Seite mit *BghA6* inokuliert und 8 bzw. 25 hpi Primärblätter geerntet. Nach Abziehen der unteren Epidermen wurde aus diesen und dem Rest der Blätter Gesamt-RNA isoliert. Diese diente als *template* in RT-PCRs, die mit genspezifischen Primern des *WIR1B*-Homologs und des *PI074* durchgeführt wurden. 1: Mesophyll, 25 hpi; 2: Epidermis, 25 hpi; 3: Epidermis, 8 hpi. Meso: Mesophyll, Epi: Epidermis.

PI074 war nach diesen Ergebnissen mesophyllspezifisch exprimiert und konnte daher nicht über RNAi auf seine Funktion hin untersucht werden. Da es auch nicht gelang, über RACE (s. 2.12.1) oder inverse PCR (iPCR, s. 2.12.2) den gesamten *open reading frame* (ORF) dieses Klons zu erhalten, konnte die Genfunktion von *PI074* im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

3.4.5 Expression von *PI074* durch *Blumeria graminis* f.sp. *titici*

Die Expression des *PI074* in Gerstenprimärblättern nach Inokulation mit *Bgt* wurde mittels RT-PCR untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Genaktivität durch die Attacke des Nicht-Wirt-Pathogens mit einem Maximum 24 hpi. Die Expression des *PI074*

war nach Inokulation mit *Bgt* zu diesem Zeitpunkt stärker als nach Inokulation mit *Bgh*, obwohl die Inokulation mit *Bgh* wesentlich dichter war, als die mit *Bgt* (s. Legende).

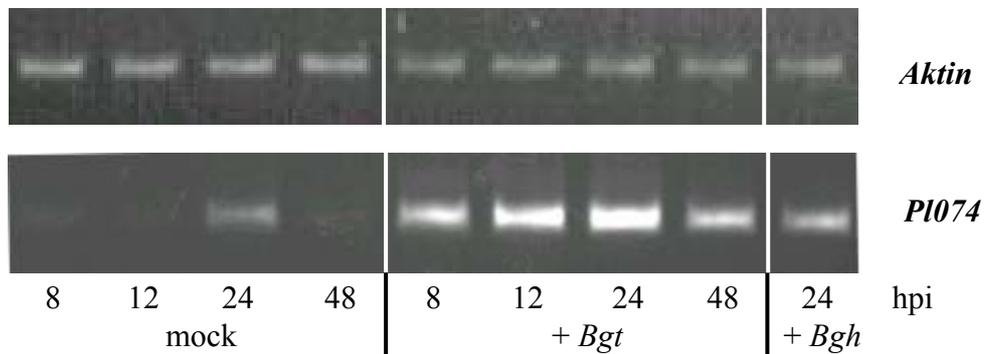


Abb. 3.10: Transkriptabundanz von *Aktin* und *PI074* nach Inokulation mit *Bgt* und *Bgh*.

Sieben Tage alte Primärblätter der Linie Ingrid wurden beidseitig mit Sporen des Echten Gerstenmehltaupilzes oder nur auf der adaxialen Seite mit Sporen des Echten Weizenmehltaupilzes (ca. 140 *Bgh*-Sporen/mm², 80 *Bgt*-Sporen/mm²) bzw. mock-inokuliert. Nach 8, 12, 24 und 48 Stunden wurden Blätter geerntet, aus denen Gesamt-RNA gewonnen wurde, die als *template* für die RT-PCR diente. Es wurde auch eine RT-PCR mit Primern eines Aktinens durchgeführt, das nicht durch *Bgt* oder *Bgh* induziert wurde und als Konstitutivkontrolle diente.

3.5 Isolierung differentiell exprimierter Gerstengene mittels eines Kandidatengenansatzes

Das Ziel des Kandidatengenansatzes, der in der AG Korell am IPAZ, Gießen, durchgeführt wurde, war das Auffinden von Polymorphismen zwischen *Mlg*- und *mlg*-tragenden Linien durch PCRs mit Primern, die von konservierten Motiven bekannter Resistenzgene abgeleitet worden waren (s. Tab. 8.3). Mit Hilfe dieser RGA-PCRs sollte das *Mlg*-Gen selbst sowie pathogeninduzierte Resistenzgene der Gerste isoliert werden. Daher wurde als *template SMARTTM*-cDNA der beiden *mlg*-tragenden Linien Ingrid und Manchuria_{isogen} sowie von deren nahezu isogenen *Mlg*-tragenden Linien IWe und MiGf nach Inokulation mit *BghA6* bzw. mock-Inokulation verwendet. Zwölf der 141 getesteten Primerkombinationen (s. Tab. 8.3) ergaben ein polymorphes Bandenmuster, bei denen die Stärke der in den inokulierten Proben amplifizierten Banden immer größer war als in den nicht inokulierten (M. Korell, pers. Mitteilung, ohne Abbildung). Die polymorphen Banden wurden nach Excision und Elution aus dem TBE-Gel kloniert und sequenziert (Sequenzen s. *GenBank* oder Tab. 8.2). Es konnte mit dieser Methode kein *Mlg*-spezifischer Polymorphismus auf cDNA-Ebene gefunden werden. Tabelle 3.5 zeigt die isolierten Klone und deren Homologien zu ESTs bzw. Proteinen der *GenBank*.

Tab. 3.5: Sequenzvergleich der cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene aus den RGA-Experimenten.

Klon	Accession-number	Größe (bp)	Homologie blastn/other ESTs ¹	Homologie blastx ²
Poly 4-1 ^N	AJ309557	746	Acc.Nr. AL503483 (1e ⁻¹⁹ , 81 %)	<i>Oryza sativa</i> receptor-like protein kinase Acc.Nr. AF172282 (1e ⁻²³ , 42 %)
Poly 4-2 ^N	-/	866	Acc.Nr. AJ435348 (0.0, 97 %)	<i>Zea mays</i> Actin 1 Acc.Nr. P02582 (e ⁻¹²¹ , 77 %)
Poly 22 ^N	AJ309558	863	Acc.Nr. BI948423 (0.0, 98 %)	<i>Arabidopsis thaliana</i> ERD1 protein precursor Acc.Nr. NM_124486 (2e ⁻⁸⁷ , 66 %)
Poly 23 ^N	-/	602	Acc.Nr. AL505349 (0.0, 99 %)	<i>Hordeum vulgare</i> phenylalanine ammonia-lyase Acc.Nr. T05970 (5e ⁻⁹⁷ , 90 %)
Poly 28 ^N	-/	882	Acc.Nr. BF617441 (0.0, 99 %)	<i>Triticum aestivum</i> benzothiadiazole-induced protein (WCI-5) Acc.Nr. T06278 (5e ⁻⁹⁶ , 85 %)
Poly 39 ^N	-/	206	Acc.Nr. AJ436743 (2e ⁻⁷⁹ , 94 %)	keine signifikanten Homologien
Poly 48 ^N	-/	313	keine signifikanten Homologien	

Fortsetzung der Tabelle 3.5

Poly 53 ^N	-/	290	Acc.Nr. BF261155 (e ⁻¹⁴¹ , 98 %)	<i>Oryza sativa</i> putative receptor protein kinase Acc.Nr. AP003106 (3e ⁻⁴³ , 94 %)
Poly 85 ^N	AJ309555	505	Acc.Nr. AV938964 (0.0, 98 %)	<i>Triticum aestivum</i> blue copper-binding protein homolog Acc.Nr. AF031195 (2e ⁻³⁹ , 72 %)
Poly 94 ^N	-/	977	Acc.Nr. BG605515 (0.0, 95 %)	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative protein Acc.Nr. NM_124695 (6e ⁻⁶⁴ , 72 %)
Poly 103 ^N	AJ309556	405	keine signifikanten Homologien	<i>Hordeum vulgare</i> NBS-LRR type resistance protein Acc.Nr. AF032686 (1e ⁻¹⁰ , 41 %)
Poly 129 ^N	-/	836	keine signifikanten Homologien	
Poly 134 ^N	-/	856	Acc.Nr. AV919616 (0.0, 97 %)	keine signifikanten Homologien

¹: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identische Nukleotide bezogen auf die verglichene Sequenz (Angabe in %).

²: Stand März 2002, Angabe des erwarteten Wertes e, identischer Aminosäuren bezogen auf die verglichene Sequenz (Angabe in %).

^N: differentielle Expression in Northern und/oder RT-PCR überprüft.

grau unterlegt: Gene, die als Mehltaupilz-induziert identifiziert werden konnten.

3.6 Überprüfung der Genexpression auf Transkriptionsebene

Alle in den Tabellen 3.5 aufgeführten Klone wurden in „SMARTTM-RT-PCR“ auf ihre Induktion durch Inokulation mit *BghA6* und *Bgt* hin überprüft. Dafür wurden genspezifische Primer (s. Tab. 8.4) von den einzelnen Sequenzen abgeleitet und in PCRs mit SMARTTM-cDNAs als *template* eingesetzt.

3.6.1 Genexpression durch *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) und *Blumeria graminis* f.sp. *titici* (*Bgt*)

Die Klone Poly 94 und Poly 134 zeigten eine konstitutive Expression nach Inokulation (ohne Abbildung), während für die übrigen 11 Klone eine Induktion nach Inokulation mit *BghA6* und *Bgt* bestätigt werden konnte, wobei kein Unterschied in der Stärke der Induktion zwischen der *mlg*- und der *Mlg*-tragenden Linie zu sehen war (Abb. 3.11).

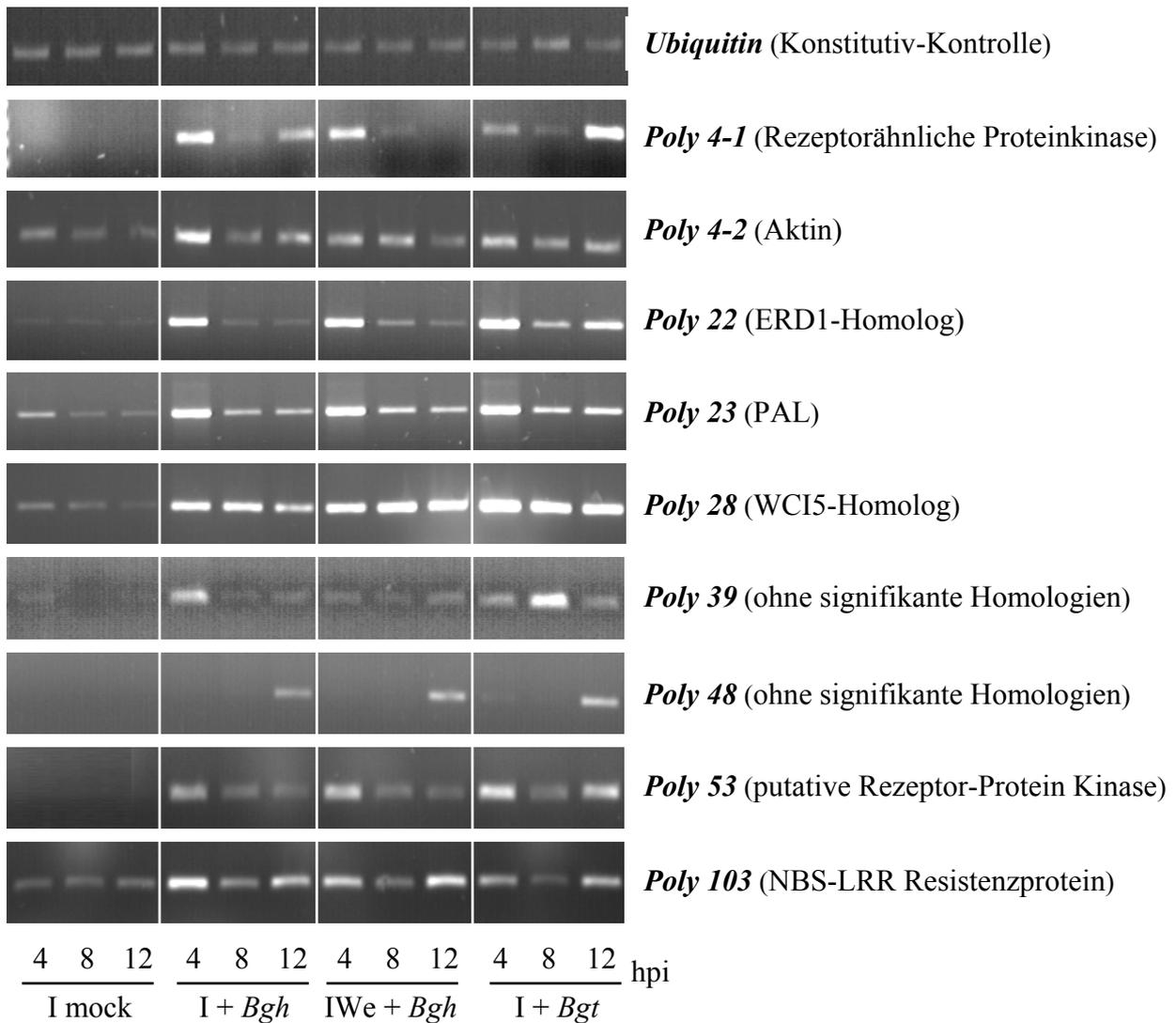


Abb. 3.11: Transkriptabundanz der Gene *Ubiquitin*, *Poly 4-1*, *Poly 4-2*, *Poly 22*, *Poly 23*, *Poly 28*, *Poly 39*, *Poly 48*, *Poly 53* und *Poly 103* nach Inokulation mit *Bgh* und *Bgt*.

Sieben Tage alte Primärblätter der Linien Ingrid und IWe wurden auf der adaxialen und abaxialen Seite mit Sporen des Echten Gerstenmehltaupilzes oder des Echten Weizenmehltaupilzes (ca. 140 Sporen/mm²) bzw. mock-inokuliert. Nach 4, 8 und 12 Stunden wurden Blätter geerntet, aus denen Gesamt-RNA und schließlich mRNA gewonnen wurde. Diese wurde in *SMART*TM-cDNAs übersetzt, die als *template* für PCRs mit genspezifischen Primern dienten. Als Kontrolle wurde eine PCR mit Primern des Ubiquitins durchgeführt, das eine konstitutive Expression nach Inokulation zeigte.

Die Gene *Poly 22* (ERD1-Homolog) und *Poly 23* (PAL) zeigten 4 Stunden nach Inokulation eine besonders starke Expression, während das Gen *Poly 48* nur 12 hpt exprimiert war. Das WCI-5-Homolog, *Poly 28*, war von allen untersuchten Genen am stärksten durch die Inokulation mit Mehltaupilz induziert.

Für das Gen *Poly 129* konnte bei der „*SMARTTM*-RT-PCR“ ein Produkt ausschließlich mit den *SMARTTM*-cDNAs inokulierter Proben amplifiziert werden (ohne Abbildung). Daher wurden die genspezifischen Primer von *Poly 129* genutzt, um festzustellen, ob dieses Gen pilzlichen Ursprungs war. Dazu wurde genomische DNA der Gestenlinien IWe, Manchuria_{isogen} (Mi), MiGf, des Echten Gerstenmehltaupilzes *Bgh*, sowie *SMARTTM*-cDNAs inokulierter Proben der Linien Ingrid (I) und IWe sowie eine *SMARTTM*-cDNA einer nicht inokulierten Probe in einer PCR als *template* verwendet. Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis dieser PCR.

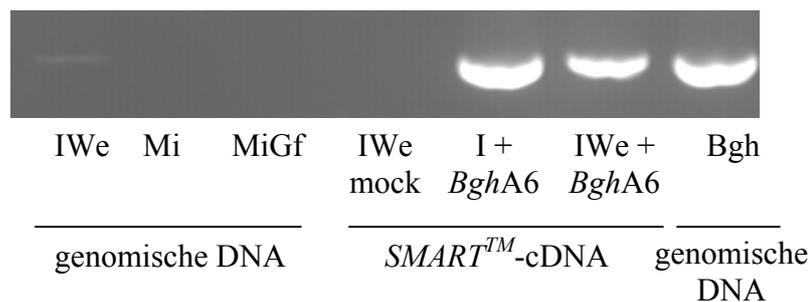


Abb. 3.12: PCR mit spezifischen Primern des Gens *Poly 129* auf genomischer Gersten- und *Bgh*-DNA sowie *SMARTTM*-cDNAs inokulierter Proben und einer mock-inokulierten Probe.

Diese PCR zeigte, dass das Gen *Poly 129* nicht aus Gerste, sondern aus dem Echten Gerstenmehltaupilz *Bgh* stammte.

Da mit den genspezifischen Primern von *Poly 85* kein Produkt amplifiziert werden konnte, wurde die Transkriptakkumulation dieses Gen mittels *Northern* Analysen überprüft (Abb. 3.13). Es zeigte sich, dass es ebenfalls nach Inokulation mit *BghA6* verstärkt exprimiert wurde, wobei die Expression in der *Mlg*-tragenden Linie MiGf 16 und 24 hpi stärker zu sein schien als in der suszeptiblen Linie Manchuria.

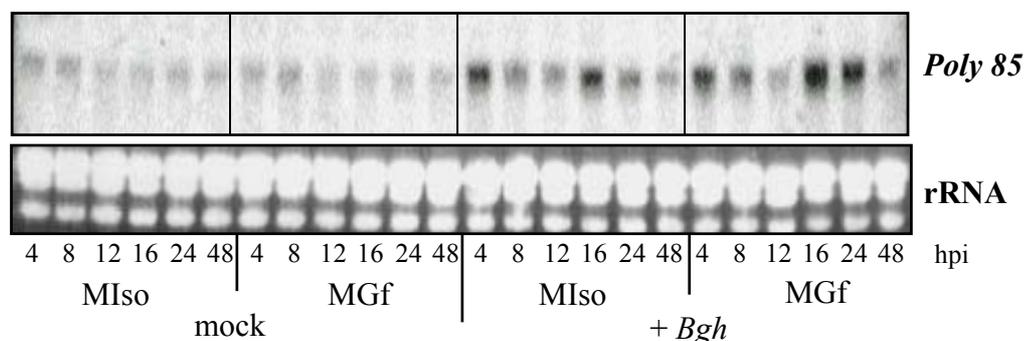


Abb. 3.13: Transkriptakkumulation von *Poly 85* nach Inokulation mit *Bgh*. Legende siehe nächste Seite.

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. *Manchuria_{isogen}* und MiGf wurden mit ca. 140 *Bgh*-Sporen pro mm² beidseitig inokuliert. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung von 10-15 µg RNA pro Spur und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit einer ³²P-PCR-Sonde von *Poly 85* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz der ribosomalen Banden unter UV-Licht überprüft.

3.6.2 Genexpression nach chemischer Induktion

Auch für die aus den RGA-Experimenten stammenden Gene wurde getestet, ob sie durch Applikation von BTH induziert wurden, indem ihre Transkriptakkumulation nach chemischer Induktion mittels „*SMARTTM*-RT-PCR“ untersucht wurde. Dazu wurden *SMARTTM*-cDNAs aus PolyA⁺-Proben BTH (125 ppm, Sprühapplikation)- und WP-behandelter Primärblätter cv. *Manchuria* hergestellt, die als *template* in PCRs mit für das jeweilige Gen spezifischen Primern dienten. Als Konstitutivkontrolle wurde eine PCR mit *MAPK*-Primern durchgeführt, da das *Ubiquitin1*-Gen durch BTH induziert wurde. Als Positivkontrolle wurde *BCI-4* getestet, das als Marker für chemische Induktion gilt. *Poly 22* (ERD1-Homolog) und *Poly 4-1* zeigten eine Transkriptakkumulation, die mit der des *BCI-4* vergleichbar war. Alle anderen Gene waren, wie *Poly 48*, nicht chemisch induzierbar (s. Abb. 3.14.).

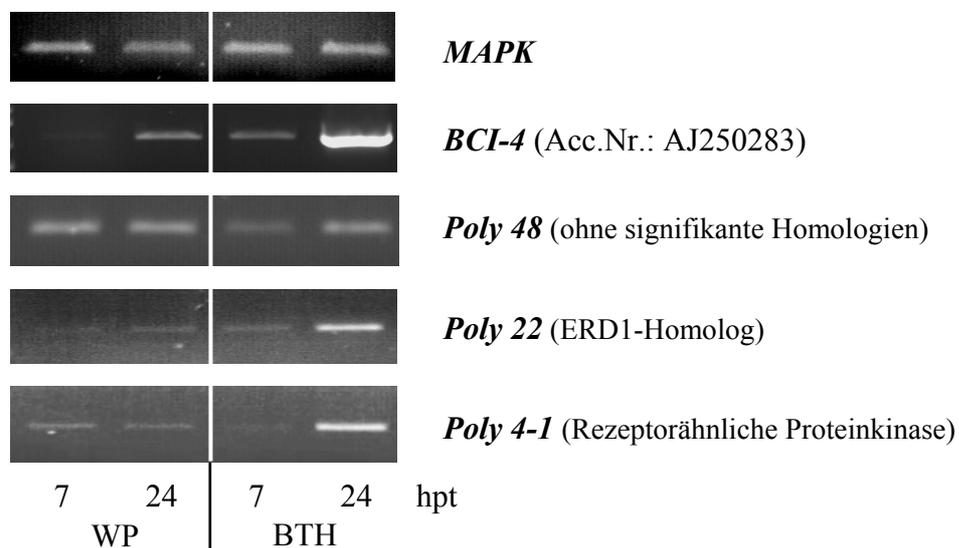


Abb. 3.14: Transkriptabundanz von *MAPK*, *BCI-4*, *Poly 48*, *Poly 22* und *Poly 4-1* nach Induktion mit BTH.

Sechs Tage alte Keimlinge cv. *Manchuria_{isogen}* wurden mit 125 mg/l BTH bzw. als Kontrolle mit der Leerformulierung (WP) besprüht. 7 und 24 Stunden nach der Behandlung wurden Primärblätter dieser Pflanzen geerntet, aus denen mRNA isoliert wurde, die in *SMARTTM*-cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNAs von WP- bzw. BTH-behandelten Primärblättern wurden als *template* in die PCRs eingesetzt. Als Konstitutivkontrolle wurde

eine PCR mit MAPK-Primern durchgeführt, da *Ubiquitin1* durch BTH induziert wurde. Als Positivkontrolle wurde BCI-4 getestet, das als Marker für chemische Induktion gilt.

3.7 Charakterisierung von *Poly 85*

Da die Expression des Gens *Poly 85* 16 und 24 hpi in der *Mlg*-tragenden Linie MiGf nach Inokulation mit *BghA6* stärker zu sein schien als in der nahezu isogenen Mehлтаupilz-suszeptiblen Linie *Manchuria_{isogen}* (vgl. Abb. 3.13), wurde eine nähere Charakterisierung dieses Gens vorgenommen. Zunächst wurde die Expression des *Poly 85* nach Inokulation mit *BghA6* in zwei weiteren nahezu isogenen Gerstenlinienpaaren (*mlg*- und *Mlg*-tragend) untersucht, sowie nach Inokulation mit *Bgt*. Ebenso wurde die gewebespezifische Expression nach Inokulation mit *BghA6* und die Expression in der *Mla12*-tragenden Linie Sultan-5 sowie der zugehörigen Mutante M100 mittels *Northern* Analyse überprüft.

3.7.1 Expression von *Poly 85* in *Mlg*- und *mlg*-tragenden Linien

Um die verstärkte Expression des *Poly 85* nach Inokulation mit Echtem Gerstenmehltaupilz in *Mlg*-tragenden Linien zu bestätigen, wurden *Northern* Analysen mit RNA-Proben der Linien Pallas/Pallas-Deba (P/PDe) und Siri/Siri-Deba (S/SDe) durchgeführt.

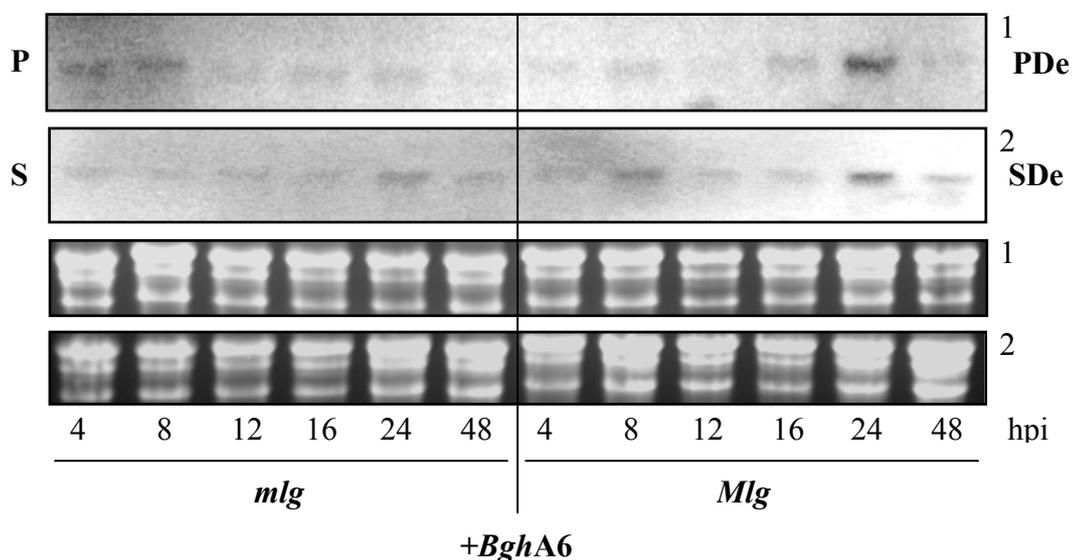


Abb. 3.15: Transkriptakkumulation des Gens *Poly 85* in *mlg*-tragenden (P und S) und in *Mlg*-tragenden Linien (PDe und SDe) nach Inokulation mit *BghA6*.

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Pallas, PDe, Siri und SDe wurden mit ca. 140 *Bgh*-Sporen pro mm² auf der ab- und der adaxialen Seite inokuliert. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung von 10-15 µg

RNA pro Spur und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit der ^{32}P -PCR-Sonde von *Poly 85* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung der Gele wurde anhand der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz der ribosomalen Banden unter UV-Licht überprüft. Die Ziffern rechts neben den Autoradiogrammen (oben) und Gelen (unten) geben jeweils den zugehörigen *Blot* an.

Es zeigte sich, dass *Poly 85* in den *Mlg*-tragenden Linien PDe und SDe nur 24 hpi etwas stärker induziert war als in den suszeptiblen Linien Pallas und Siri.

3.7.2 Expression von *Poly 85* nach Inokulation mit *Bgt*

Für die nähere Charakterisierung des *Poly 85* wurde dessen Expression im Nicht-Wirt-System Gerste-*Bgt* überprüft. Dazu wurde ein *Northern Blot* mit RNA-Proben *Bgt*- bzw. mock-inokulierter Gerstenprimärblätter der Linie *Manchuria*_{isogen} (Mi) hergestellt und mit einer ^{32}P -markierten Sonde des *Poly 85* hybridisiert. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *Poly 85* durch die Inokulation mit *Bgt* 7 und 24 hpi verstärkt wurde (s. Abb. 3.16).

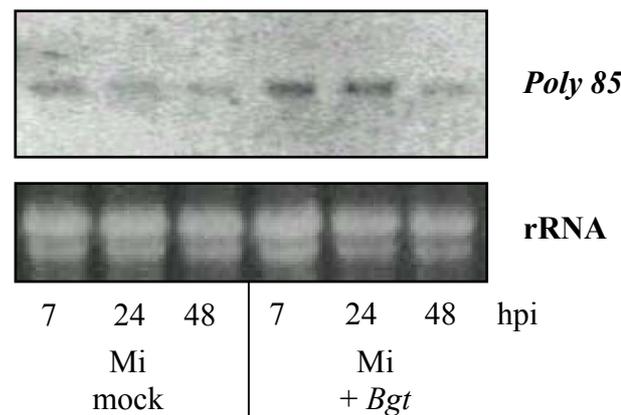


Abb. 3.16: Transkriptakkumulation von *Poly 85* nach Inokulation mit *Bgt*.

Sechs Tage alte Gerstenpflanzen cv. *Manchuria*_{isogen} (Mi) wurden mit 8 Konidien pro mm^2 des Echten Weizenmehltaupilzes bzw. mock inokuliert. Nach 7, 24 und 48 Stunden wurden Blätter geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung von 10-15 μg RNA pro Spur und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit ^{32}P -PCR-Sonden von *Poly 85* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz der ribosomalen Banden unter UV-Licht überprüft.

3.7.3 Gewebespezifische Expression von *Poly 85* nach Inokulation mit *Bgh*

Die Untersuchung der blattgewebespezifischen Expression von *Poly 85* zeigte, dass *Bgh* die *Poly 85*-Expression sowohl in der Epidermis als auch im Mesophyll deutlich induzieren konnte (Abb. 3.17).

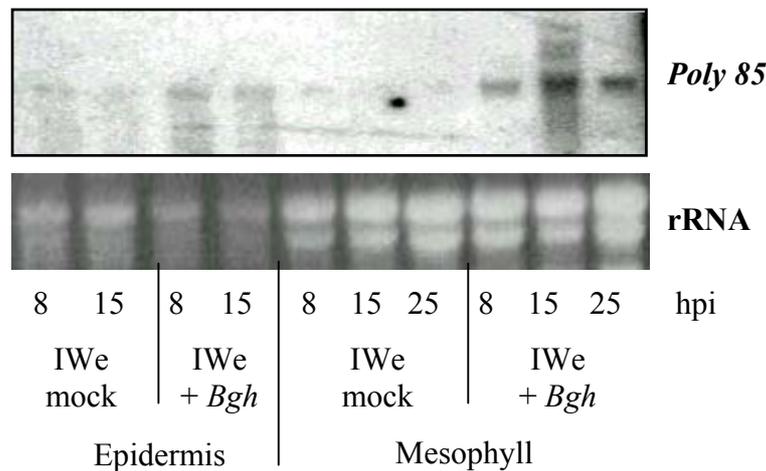


Abb. 3.17: Gewebespezifische Transkriptakkumulation von *Poly 85* nach Inokulation mit *Bgh*.

Acht Tage alte Gerstenpflanzen cv. IWe wurden auf der abaxialen Seite ihrer Primärblätter mit *BghA6* (80 Sporen/mm²) oder *mock*-inokuliert. Nach 8, 15 und 25 hpi wurde jeweils die abaxiale Epidermis vom restlichen Blatt getrennt und aus beiden Teilen Gesamt-RNA extrahiert.

Nach gelelektrophoretischer Trennung von 10-15 µg RNA pro Spur und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit ³²P-PCR-Sonden von *Poly 85* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz der ribosomalen Banden unter UV-Licht überprüft.

3.7.4 Expression von *Poly 85* in *Mla*-tragenden Linien

Um einen weiteren Hinweis auf die Funktion des putativ Kupfer-bindenden Proteins, POLY 85, zu erhalten, wurde dessen Expression in der *Mla12*-tragenden Linie Sultan-5 und in der *rar1-2*-Mutante M100 über *Northern* Analysen nach Inokulation mit *BghA6* überprüft (Abb. 3.18). Dabei zeigte sich, dass die Expression dieses Gens in der resistenten Linie Sultan-5 zu allen Zeitpunkten stärker war als in der anfälligen Mutationslinie M100. Dieser Unterschied war 48 hpi besonders deutlich, da zu diesem Zeitpunkt keine Expression des *Poly 85* in M100 zu sehen war, während sie in Sultan-5 unverändert hoch war.

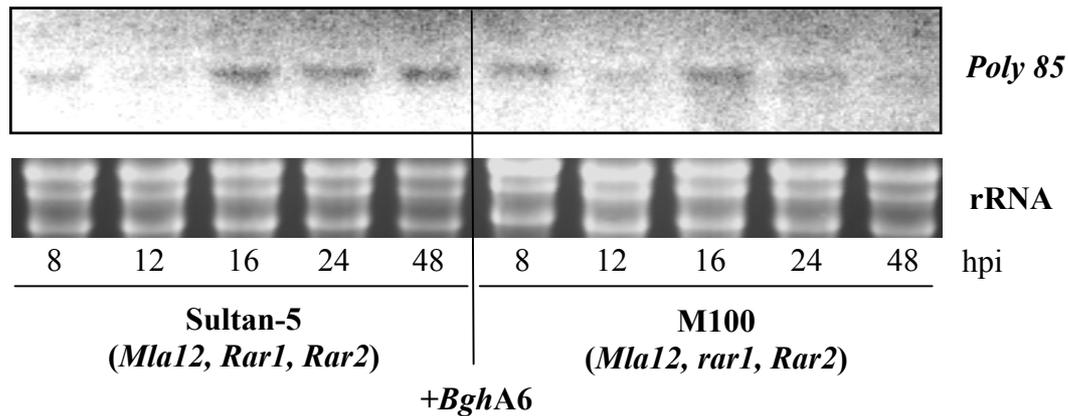


Abb. 3.18: Transkriptakkumulation des Gens *Poly 85* in den Linien Sultan-5 (*Mla12, Rar1, Rar2*), M100 (*Mla12, rar1-2, Rar2*) nach Inokulation mit *BghA6*.

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Sultan-5 und M100 wurden beidseitig mit ca. 140 Sporen des Echten Gerstenmehltaupilzes pro mm² inokuliert. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung von 10-15 µg RNA pro Spur und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit der ³²P-PCR-Sonde von *Poly 85* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz der ribosomalen Banden unter UV-Licht überprüft.

3.8 Verlängerung der Klone Poly 4-1, Poly 85 und Poly 103

Mit Hilfe der inversen PCR (iPCR, s. 2.12.2) wurde versucht, für ausgewählte Klone zusätzliche Sequenzinformation bzw. Teile des Promotors zu isolieren. Poly 4-1 (Rezeptorähnliche Proteinkinase) konnte in 5'-Richtung um 450 bp und in 3'-Richtung um 1272 bp verlängert werden (Nukleotidsequenz s. Abb. 8.4), wodurch der ORF dieses Gens komplettiert wurde. Innerhalb der Proteinsequenz konnten durch Vergleich mit der *Pfam HMM*-Datenbank ein zu S-Locus Glykoproteinen homologer Bereich, eine PAN-Domäne und ein Proteinkinasmotiv identifiziert werden. S-Locus Glykoproteine sind Teil des Selbst-Inkompatibilitätssystems bei vielen Pflanzenarten (Hinata *et al.* 1995) und PAN-Domänen an Protein-Protein-Interaktionen bzw. Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen beteiligt (Tordai *et al.* 1999). In Abbildung 3.20 ist das *alignment* der Proteinsequenz des Poly 4-1 mit drei Homologen Proteinen aus Reis (Acc.Nr.: CAD40612, CAD39336, CAD39337) dargestellt. Die verschiedenen Proteindomänen sind besonders hervorgehoben.

CAD40612	MRPQSYAFLGLVLLFSLPLAPCSAANLNNDTLLAGQALAVGDKLISNNGKFTLGGFFQP	60
CAD39336	MPSLY-IFLG--LLLFSLQ-APPCPAA---TDTLKAGQVLSAGDKLVS RNGKFALGFFNP	53
CAD39337	MLSVH-VFIG--LLLSLH-APPYSAA--VDDTLAAGQVLAVGEKLVSRNGKFALGFFQP	54
Poly 4-1	MLLLHILLLG--LLLSHTPCCCSWSTP--ASDTLNQGVRRRREACLDERQVRTR--LLP	54
CAD40612	DAGTSKS---SDTSTNSPGWYLGIWFNKIPVFTTV-WVANRERPITIPELNLTQLKFSSD	116
CAD39336	SANISKS---SDNISS--WYIGIWFNKIPVFTTV-WVANRERSIAEPDFKLTQLKISQD	107
CAD39337	SAIAISK---SSNYTNALGWYLAIFWNKIPVFTTV-WVANRERPITVPRLNSTWLKMSGD	110
Poly 4-1	ACNEHHQ-VPEHHQLQLVPWHMVQ-DPGFYCRVGC-WGSAHHRPQPQPNKAQDIKRWQS-	110
CAD40612	GNLVIFNHATESIIWSTRVIIDSHRTQETSSTNTSVVLLNTGNLVIEST-----TNNVLW	171
CAD39336	GNLAIVNHANESIIWSTRIVN-----RTEASMNSTVLLHDSGNLVIQST-----SNAVILW	157
CAD39337	GNLYILDHATNSIIWSTDHVVN---TTTETGMNSTATLLNSGNLVI RNP-----SGVVS	162
Poly 4-1	-----CHCTHDSVVVSTHIVNSRTQTRSINTTTGAAVLLNSGNLSLTVTESPSSDILLVW	165
CAD40612	ESFDSPTDVVLPGAKFGWKNITGLNRQCISKKSLIDPGLGSYSVELDTNGTKGVILMLRN	231
CAD39336	QSFDPYPTDVALPNAKIGWKNVTGLNRVGVSKSLIDMGTGSYSVQLYTNGTRRVTLLEHRN	217
CAD39337	QSFDNPTDVVLPGAKFGWKNATGLNRLGISKKSLIDPGLGSYSVELDTTGARGLILKHRN	222
Poly 4-1	QSFDPIDIVLPGAKFG-NKITGLNRKGVSKSLIDQGLGSYSVELDTSG--QVVLKRIN	222
CAD40612	PPKVYWG---LTSPTLIPELRSLAMDPRTRGLIIPTYVDNSQEEYYMYTLSNESPS-	286
CAD39336	PSIEYWYWP--DESGMKIPALKQLLYMNPQTRGLVTPAYVNSSEEEYYSYNSSDESS-	274
CAD39337	PSMEYWSS-----DRALIIPVLKSLFEMDPRTRGLITPAYVDNSEEYYIYTMSESS-	276
Poly 4-1	PSVYVWHWASSKTS SLKLIPILKSTIDLDPRTKGLMNPIYVDNDQEEYYMYTSPESSSS	282
CAD40612	SFLSLDMSGQIMLVNWEANQSQWIIYAQPADPCNPFATCGPFTICNGNSNPVCECMESF	346
CAD39336	TFLLLDINGQIKFNWVSQDKHSWQSLYTOPVDPCRSYDTGCGPFTICNGNSQPFCDMENF	334
CAD39337	VFVSLDVNGQIKMYVWSRANQSQSIIYAQPVDPCTPSATCGPFTICNGNSTQTCDCEMF	336
Poly 4-1	LFVSLDISGQVKNLVNWEANLSWQITCAEPADACTPAATCGPFTVCNGNAQPSDCMEGF	342
CAD40612	TRKSSQDWDLDGRTGGCSRNTPLDCTISGN---RTSSADM FHPHIAHVKLPYDSESIQDAT	403
CAD39336	TRKSPRDWDLDGRTGGCSRNSPLDCTRN-----TSSTDI FHPHIIHVTLPRNPQTIQEAT	388
CAD39337	SVKSLWDWELDDRGGCIRDTPHLHCVS DKN---MTSSTDM FQPIGLVTLPYDQIMQDAT	393
Poly 4-1	SRKSPQDWQFDDRTGGCIRNTPFNCSTRGNKNMTSSTDI FHPISQVALPYNPQSIDVAT	402
CAD40612	TQSKCAQACLSSCSCTAYSQNN-ICSVWHGDLFSVNQNDGIEHFDDVLYLRLAAKDLQ	462
CAD39336	TQSECAQACLSSCSCTAYSQNTSTCSIIWHDELFSVNQDDGIEIHSQDVLYLRLAAKDLQ	448
CAD39337	TQGECAQACLSDCSCTAYSQNS-RCSVWHGKLLNVNKNNDGIYINADNVLHLRLAATD	452
Poly 4-1	TQSKCEEACLSSCSCTAYSNNNS-RCYVWHGELLNVNLDGIDNNSKDALYLRLAATX--	459
CAD40612	SLSKNKRKPIVGVVTTISIIILVLLIMLVMVWRNRFKWCGVPLHRSQGGSG-IIAFR	521
CAD39336	SLRNNKRKPNVAVVIAASVIGFVLLMVG MFL-LIWRNRFWECGAPLHDGEDSSG-IKAFR	506
CAD39337	DLSKNKRKTNVELVVGASIVSFVLALIMILL-MIRGNKFKCCGAPFHDNEGRGG-IIAFR	510
Poly 4-1	KFXKXKXQTNIRFVAAXSIIIGFGLLVMLLA-LIWRNKFK----PLYNNQVSGGGIMAFR	514
CAD40612	YSDLDHATKNFSEKLGEGGFGSVFKGVL RDLTVVAVKRLD GARQGEKQFRAEVSSIGLIQ	581
CAD39336	YNDLVHATKNFSEKLGAGGFGSVFKGMLIDLTTIAVKRLDGDROGEKQFRAEVSSIGLIQ	566
CAD39337	YTDLAHATKNFSEKLGAGGFGSVFKGVL TNMATIAVKKLDGAHQGEKQFRAEVSSIGLIQ	570
Poly 4-1	YTDLVRATKNFSEKLGAGGFGSVYKGV LNSTSIAVKRLD GARQGEKQFRAEVSSIGLIQ	574
CAD40612	HINLVKLI GFCCQGDKRLLVYEHMLNGLSDTHLFQSN---ATILTWSTRYQIAIGVARGL	638
CAD39336	HINLVKLI GFCCGGRKRLLVYEHMLNGLSDAHLFQSN---AGTLNWSIRYHIALGVARGL	623
CAD39337	HINLVKLI GYCCGDKRLLVYEHMLNGLSDVHLFQSH---AAVLNWI TMHQIAIGVARGL	627
Poly 4-1	HINIVKLI GFCCGDRHLLVYEHMLNGLSDGR LFEKSNAAVAVLNWNTRYQIALGVARGL	634
CAD40612	SYLHQSCHECIIHCDIKPQNILLDESFTPKIADFGMAVFGVGRDFSRVLTTFRGTGVLAP	698
CAD3933	GYLHQSCHACIIHCDIKPQNILLDASFTPKIADFGMAAFVGRDFSRILTTFRGTGVLAP	683
CAD39337	SYLHESCRCIIHCDIKPENILLDISYFPKLADFGMATFVGRDFSRVLTTFRGTG----	683
Poly 4-1	SYLROSCHKCIIHCDIKPGTYSWTHLLFLKLOISG-ORLWGRDFSRVLDYIQRDCW----	689
CAD40612	EWISGVAITPKVDVYSYGMVLEIISGM RSLPNVHSNSHHAAYFPVQAI SKLHEGDVQS	758
CAD39336	EWISGVAITPKVDVYSFGMVLEIISGRRNSPNEYTS DNYHVSYPVQAINKLHEGDVRN	743
CAD39337	-----FGMVLEIISGRRNSPEVHTSGNYDATYFPVRAINKLHEGDMSS	727
Poly 4-1	-----	724
CAD40612	LVDPRLSGDFNLEEAERVCKVACWC IQDNEFDRPTMGEVVLVI EQLQEFDMPMPRLAA	818
CAD39336	LVDPQLCDDFSLEEAERVCKVACWC IQDDEHDRPTMSEVVRVI EGMQELMPPMPRLAA	803
CAD39337	LVDPRLHGDYNLDEVVRVCKVACWC IQDDEFDRPTMREVVVRVI EQLQELMPPMPRLAAT	787
Poly 4-1	-----	754
CAD40612	ITRSSNVAEM	828
CAD39336	LTKCSDVGS	813
CAD39337	LTNFSAVAS	797
Poly 4-1	-----	761

Abb. 3.19: alignment zwischen Poly 4-1 und drei Reis-Homologen. Legende s. nächste Seite.

Das *alignment* der Proteinsequenz des Poly 4-1 und der Sequenzen dreier Homologe aus Reis (Acc.Nr.: CAD40612, CAD39336, CAD39337) wurde mit *ClustalW* (*European Molecular Biology Laboratory [EMBL] outstation – European Bioinformatics Institute [EBI]*) generiert.

grau unterlegt: S-Locus-Glykoprotein-Bereich, schwarz unterlegt: PAN-Domäne, eingerahmt/grau unterlegt: Proteinkinasedomäne.

Ebenfalls durch iPCR konnte der Klon Poly 85 (Cu²⁺-Bindeprotein-Homolog) in 5'-Richtung um 114 bp und in 3'-Richtung um 522 bp verlängert werden, wodurch der ORF (*open reading frame*) dieses Gens komplettiert wurde. Ausserdem enthielten die 114 bp, die in 5'-Richtung als neue Sequenzinformation hinzugekommen waren, einige Grundelemente eukaryotischer Promotoren, wie CAAT-Box, GC-Region und TATA-Box (Abb. 3.20).

```

1  GGTACCGGTC GCTTGTTCAA ACGCACATGA CAATTCCACA GCAGATTTTC
51  AATATCCAAG TGCCATTTCC ACGAACCTAC CGCGCGCGCG CCAACC GGCC
101 TCCTGCGTAT ATAGAATTC GGTGTAGGGA AGACAACAGC AACCCGTCCC
151 CTCCTAAGCA CCAGCCTTCT ACCTCCTCTG CTCTGCGTTC CTCCTTCCGG
201 TCACAAGAGC AATCGATGGC TGCCATGAAG GCCGCCCTCC TTGCCGTGGC
251 CGCCATGGCC GCCTTACTAG GCGCCGCGTC AGCGGCAACC TACACCGTGG
301 GCGAGCCGGG CGGTTTCGTGG ACCTTGGACA CCGACTACAG CAAATGGGTG
351 TCCGACAAGA AGTTCAACGT GGGCGATGAG ATCGTCTTCA AGTACACGAC
401 CCCGACGCAC GACGTGGTTC AGGTCAGCAA GGCCGGCTAC GACTCCTGCA
451 GCACCGACGG CTCCATCAAA CCCTTAAACT CCGGCAACGA CGTCGTCCGC
501 CTAACCGCCG CCGGCACCCG CTACTTCATC TCGGGCATCC CTACCCACTG
551 CAACCCCGCC GCCGCCGCCA GCATGAAGGT CGTGATCGAG GTCGGGTCCG
601 GCTCCTCCTC GCCGTCTGCA CCCATGCCAG CTGCAGGTCC TGGCGCAAGC
651 AACTCTCCCC CGGCGCCGCC CTCTTCTGCC GCTACCTCTG TCGGGGCAAC
701 AGCAGGATTT GGCCTCGTTC CCCTACTGGC GGCCGGTCTC ATGGCTTGA
751 CGCCTATGTT GATCACCTGC TGGGCACACA TATGAGCCTA TTTATGGGCG
801 GTATTATCAC GGGTGAATAC CTGTTTTTCT TTTTAGAGTG AGAATGTGAT
851 AGTTACTTGT ACCTATCTCG TTTATATGTA ATCTGCAGGC CTTCATGTCT
901 TTGATATAAT GATCCTAGAG GATTATTTTA TAAGGGTGCG TCAGTGCATG
951 CGGAGCAGTA CCGATAGTCT TCTAACTAAA AAGAAAGTAT AGATAGTCCT
1001 GTTAGTTTTA TCCAACCATC AACCCAAAAT AATAGGTACA CATTCAAAG
1051 CGAAAACCTGA AGTGCCAATC TGTGCACGAG CACAAATGCT CTGGTTAACT
1101 CACATGTTTCG GGGAGCTCCA CCCGGTGTCA CCCTGGGCGT TTG

```

Abb. 3.20: Nukleotidsequenz des Klons Poly 85 nach Verlängerung durch iPCR.

eingerahmt/fett: CAAT-Box, schwarz unterlegt: GC-Region, unterstrichen/fett: TATA-Box, grau unterlegt: *open reading frame*

Innerhalb der Proteinsequenz des Poly 85 konnte durch Vergleich mit der *Pfam HMM*-Datenbank eine Kupfer-Bindedomäne identifiziert werden (Abb. 3.21).

```

1  MAAMKAALLAVAAMAALLGAASAATYTVGEPGGSWTLDTDYSKWVSDKKF
51  NVGDEIVFKYTTPTHDVVEVSKAGYDSCSTDGSIKPLNSGNDVVRLTAAG
101 TRYFICGIPTHCNPAAAAASMKVVIEVGS GSSSPSSPMPAAGPGASNSPPA
151 PPSSAATSVGATAGFGLVALLAAGLMAWTPMLITCWAHI-

```

Abb. 3.21: Proteinsequenz des Poly 85.

grau unterlegt: Kupfer-Bindedomäne.

Durch 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) wurde Poly 103 (NBS-LRR Resistenzprotein) in einer *hot start* PCR mit Hilfe des *GeneRacer™ Kits* in 5'-Richtung um 765 bp verlängert. Inverse PCR lieferte zusätzlich Sequenzinformation von 463 bp in 3'-Richtung (Nukleotidsequenz s. Abb. 8.4). Mit Hilfe der *Pfam HMM*-Datenbank konnte ein NB-ARC-Motiv in der Proteinsequenz des verlängerten Poly 103-Klons identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein Signalmotiv, das bei pflanzlichen Resistenzgenprodukten und tierischen Regulatoren des Zelltods gefunden wurde (van der Biezen und Jones 1998).

```

1      DTDMD-RSXXHLFHLRHSGLPVGLLRHHRSSSLRIAVTHSLTHSHLQHAS
51     RLLS-ANSRRSLAIEMSAPIISATMGAMNTLIGKLAALMGDEYKKLTSVR
101    KQASFLKDESAMKALLEKLELMDELDP LAKNWRDHVREMSYDMENCIDDF
151    MRDLGGADAKMIGFIKKTAKRLKTLRKRHRIADRMEELTVLALQANERRM
201    YKIDDCTDSTARVVPVDTRMLAIYKQAASLVGIDGPKNELVSWLTDQTQEN
251    LKVVAIVEFGVGKTTLAKQVYDMIKRQFRCKTFLSVSQRPDMSLLGRLQ
301    SKFKMKKEEXTHAHEVQDIVGRLREYLTHKRYLFC LN-HMCT-VVIDV-RS
351    VS-MDDRHT-F-HSHCLESRSTHA-RPPCCHGLRLALSTTKDGKERGFFF
401    QXKLIDVELEITRXYFLCTIMIVVGKN-SPTTVI-VQRE-KYKIH-IXXA
451    PLEXRMA-SSF EISNTTRPRRYANFRWGYXREKCGA-FALISLLSMLKLN
501    XRVTXXIMAIRY-RLIDG-D-LDPRKLVLV-VHXLVLYFIV-

```

Abb. 3.22: Proteinsequenz des Klons Poly 103 nach Verlängerung durch 5' -RACE und iPCR.

grau unterlegt: NB-ARC-Motiv.

3.9 Transiente RNA Interferenz (RNAi) in Gerstenblättern zur Untersuchung des Einflusses ausgewählter Gene auf die Interaktion von Gerste mit Echem Gerstenmehltaupilz

Der Einfluss einiger ausgewählter Gene auf die Interaktion von Gerste mit *Bgh* wurde mit Hilfe des von Schweizer *et al.* (1999a) auf der Grundlage erster transienter Expressionssysteme in Gerste (Nelson und Bushnell 1997; Shirasu *et al.* 1999b) entwickelten transienten Transformationssystems untersucht. Nachdem die epidermale Expression der Gene überprüft worden war (ohne Abbildung), wurden Primärblattsegmente cv. Pallas mit doppelsträngiger RNA der Gene *Poly 4-1*, *Poly 85* und *Poly 103* bzw. des menschlichen Tyroidrezeptors als Kontrolle und einem Reporter-genplasmid *pGFP* für die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mittels Partikelbeschuss cotransformiert. Vier Stunden nach Transformation wurden die Blattsegmente dicht mit *BghA6* inokuliert und anschließend 40 bis 48 h bei ca. 18 °C inkubiert. Die Interaktionen der transformierten Epidermiszellen wurde anschließend *in vivo* unter Fluoreszenzanregung mikroskopisch ausgewertet. Es wurde zwischen GFP-Zellen unterschieden, in denen der Echte Gerstenmehltaupilz erfolgreich eindringen und ein Haustorium etablieren konnte und solchen, die das Eindringen des Pilzes verhindern konnten. Nicht attackierte Zellen wurden nicht berücksichtigt.

3.9.1 RNAi mit *Poly 4-1*

In Abbildung 3.23 ist das Ergebnis der mikroskopischen Auswertung des Einflusses der RNAi von *Poly 4-1*-dsRNA (Rezeptorkinase) auf die Interaktion von Pallas mit dem Echten Gerstenmehltaupilz in vier unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Penetrationsrate errechnet sich als Verhältnis der transformierten Zellen mit Haustorium zur Anzahl aller attackierten GFP-Zellen.

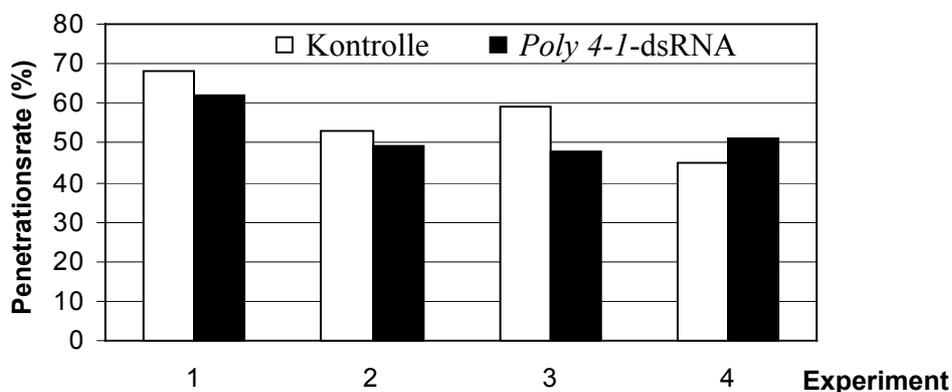


Abb. 3.23: Einfluss von *Poly 4-1*-dsRNA auf die Interaktion von Pallas mit *Bgh*. Legende s. nächste Seite.

Primärblattsegmente von Gerstenpflanzen cv. Pallas wurden mit dsRNA von *Poly 4-1* und *pGFP* cotransformiert. Die Auswertung der Interaktionsstellen von Pilz und transformierten Zellen erfolgte 40-48 h nach Inokulation der beschossenen Blattsegmente mit *BghA6*. Die Anzahl der Interaktionsstellen mit effektiver Papillenbildung und mit Ausbildung eines Haustoriums wurde im Vergleich zu Kontrolltransformationen (Beschuss mit dsRNA eines menschlichen Thyroidhormonrezeptors und *pGFP*) ausgewertet (mind. 50 Interaktionen pro Säule). Die Penetrationsrate gibt das Verhältnis von Zellen mit etablierten Haustorien zu allen attackierten Zellen in % an.

Die Penetrationsrate der Kontrolle lag bei den vier unabhängigen Versuchen zwischen 45 % und 68 %, die des Versuchsansatzes um 6 %, 4 % und 9 % darunter bzw. im letzten Versuch um 6 % darüber. Die mittlere Penetrationsrate wurde damit durchschnittlich um 7,5 % durch RNAi von *Poly 4-1*-dsRNA im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt.

3.9.2 RNAi mit *Poly 85*

Insgesamt wurde der Einfluss von *Poly 85* auf die Interaktion von Pallas mit *Bgh* in sechs unabhängigen Experimenten untersucht. Nur in zwei Fällen konnte eine ausreichende Zahl (> 50) an Interaktionen ausgezählt werden, so dass nur diese beiden Versuche gewertet werden konnten. Abbildung 3.24 zeigt das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung.

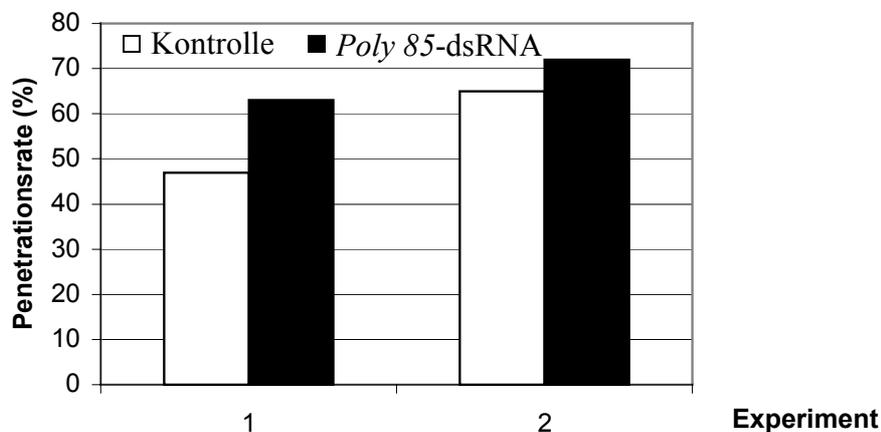


Abb. 3.24: Einfluss von *Poly 85*-dsRNA auf die Interaktion von Pallas mit *Bgh*. Legende siehe nächste Seite. Primärblattsegmente von Gerstenpflanzen cv. Pallas wurden mit dsRNA von *Poly 85* und *pGFP* cotransformiert. Die Auswertung der Interaktionsstellen von Pilz und transformierten Zellen erfolgte 40-48 h nach Inokulation der beschossenen Blattsegmente mit *BghA6*. Die Anzahl der Interaktionsstellen mit effektiver Papillenbildung und mit Ausbildung eines Haustoriums wurde im Vergleich zu Kontrolltransformationen (Beschuss mit dsRNA eines menschlichen Thyroidhormonrezeptors und *pGFP*) ausgewertet (mind. 50 Interaktionen pro Säule). Die Penetrationsrate gibt das Verhältnis von Zellen mit etablierten Haustorien zu allen attackierten Zellen in % an.

Die Penetrationsraten des *Bgh*, die der Kontrolle bei 47 % bzw. 65 % lagen, wurden durch den Beschuss mit dsRNA des *Poly 85* um 16 % bzw. 7 % gesteigert.

3.9.3 RNAi mit *Poly 103*

Der Einfluss von *Poly 103* auf die Interaktion von Pallas mit *Bgh* wurde in vier unabhängigen Experimenten untersucht. Die Penetrationsrate der Kontrolle schwankte zwischen 56 % und 70 %, die des Versuchsansatzes lag in zwei Fällen um 3 %, einmal um 2 % darunter und einmal 5 % darüber. In Abbildung 3.25 ist das Ergebnis der mikroskopischen Auswertung dargestellt.

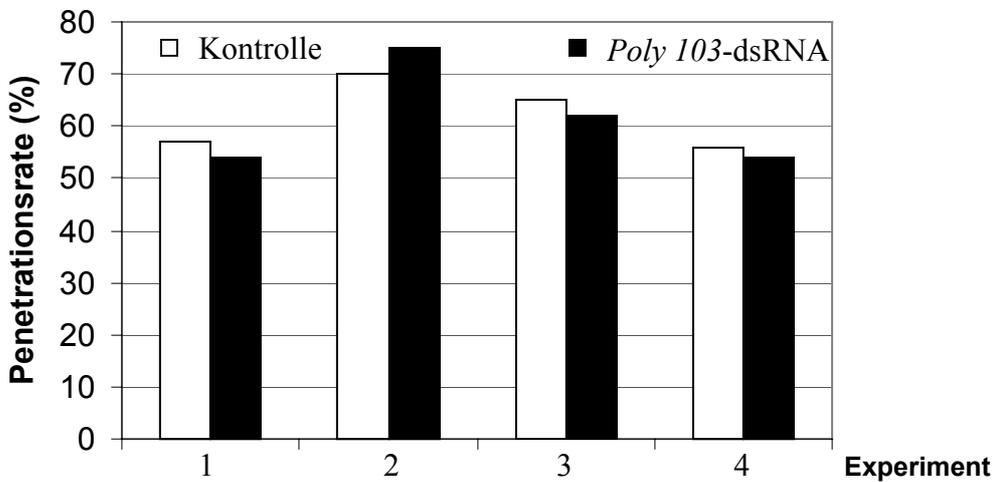


Abb. 3.25: Einfluss von *Poly 103*-dsRNA auf die Interaktion von Pallas mit *Bgh*.

Primärblattsegmente von Gerstenpflanzen cv. Pallas wurden mit dsRNA von *Poly 103* und *GFP* cotransformiert. Die Auswertung der Interaktionsstellen von Pilz und transformierten Zellen erfolgte 40-48 h nach Inokulation der beschossenen Blattsegmente mit *BghA6*. Die Anzahl der Interaktionsstellen mit effektiver Papillenbildung und mit Ausbildung eines Haustoriums wurde im Vergleich zu Kontrolltransformationen (Beschuss mit dsRNA eines menschlichen Thyroidhormonrezeptors und *pGFP*) ausgewertet (mind. 50 Interaktionen pro Säule). Die Penetrationsrate gibt das Verhältnis von Zellen mit etablierten Haustorien zu allen attackierten Zellen in % an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den drei in *RNAi* Experimenten untersuchten Genen nur die dsRNA von *Poly 85* einen deutlichen Einfluss auf die Penetrationsrate des Mehltreupilzes zeigte, da die mit dsRNA von *Poly 85* transformierten Gerstenepidermiszellen wesentlich häufiger von *Bgh* penetriert wurden als solche, die mit dsRNA eines menschlichen Thyroidhormonrezeptors transformiert worden waren.

4 Diskussion

4.1 Die frühe Gerste - *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* Interaktion

Für die erfolgreiche Abwehr des Gerstenmehltaupilzes scheint eine frühe Erkennung des Pathogens und folgende Aktivierung effektiver Abwehrmechanismen seitens der Wirtspflanze entscheidend zu sein. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit Gene isoliert werden, die in den ersten Stunden der Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz Interaktion exprimiert wurden und denen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Abwehr des Pilzes zukommt. Besonders interessant sollten dabei solche Gene sein, die in den *BghA6* resistenten *Mlg*-tragenden Gerstenkultivaren Ingrid-Weihenstephan (IWe) und Manchuria_{isogen}-Goldfoil (MiGf) nach Inokulation mit *Bgh* stärker exprimiert wurden als in den nahezu-isogenen, suszeptiblen (*mlg*) Linien Ingrid und Manchuria_{isogen}. Die Linie IWe wurde für diese Untersuchung ausgewählt, da IWe von allen zur Verfügung stehenden *Mlg*-tragenden Linien das kleinste introgressierte Fragment besaß (Görg *et al.* 1993) und MiGf, da diese Linie den größten Unterschied im genetischen Hintergrund zu Ingrid und IWe aufwies (M. Korell, pers. Mitteilung). Gregersen *et al.* (1997) fanden eine biphasische Transkriptakkumulation in Gerstenblättern nach *Bgh*-Inokulation mit Expressionsmaxima verschiedener Gene zwischen 4 und 6 Stunden nach Inokulation (hpi, *hours post inoculation*) bzw. 12 hpi und 18 hpi, was dem Anheften des primären und des appressorialen Keimschlauchs der Mehлтаukonidie auf dem Wirtblatt entspricht. Die zytologischen Analysen sollten Aufschluss darüber geben, ob sich der Mehлтаupilz unter den gewählten Bedingungen erwartungsgemäß entwickelte (Ellingboe 1972; Carver *et al.* 1995), wann erste Reaktionen in den Epidermiszellen auf die Pilzattacke erkennbar waren und ob linienspezifische Unterschiede bei diesen Reaktionen zu beobachten waren. Dazu wurden 5 hpi und 13 hpi Primärblätter der vier oben aufgeführten Gerstenkultivare geerntet, und die Interaktion dieser mit *Bgh* mikroskopisch analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass auf durchschnittlich jeder zweiten Epidermiszelle eine Konidie lag und diese größtenteils einen sekundären Keimschlauch ausgebildet hatten. 5 hpi waren bereits erste Reaktionen unter dem primären Keimschlauch (*primary germ tube*, PGT) Epidermiszellen der verschiedenen Linien zu sehen. Dabei handelte es sich meist um das Verschieben des Zellkerns unter die Stelle des Penetrationsversuchs durch den Pilz und seltener um die Bildung einer Cytoplasmaaggregation. Das Verschieben des Zellkerns in attackierten Pflanzenzellen wurde von Heath im Kuhbohne/Rost (*Vigna unguiculata* L./

Uromyces vignae, L.) Pathosystem bereits beschrieben (Heath 1997). Die Häufigkeit der Reaktion unter dem PGT war nicht vom Resistenzstatus der untersuchten Gerstenlinie abhängig, was mit Beobachtungen übereinstimmt, nach denen die Papillenbildung unabhängig vom Vorhandensein eines Resistenzgens in Epidermiszellen verschiedener Kultivare auftrat (Koga *et al.* 1990; Aist und Bushnell 1991; Kogel *et al.* 1994). Die Reaktion der Zelle unterhalb des primären Keimschlauchs zu diesem frühen Zeitpunkt der Gerste/*Bgh*-Interaktion lässt vermuten, dass es vorher zu einer Erkennung des Pathogens gekommen war. So ist es z.B. denkbar, dass Enzyme, wie Kutinasen, die Konidien 5 Minuten bzw. 10 bis 15 Minuten nach Auftreffen auf einen festen Untergrund exkretieren, von der Pflanze detektiert werden und bestimmte Abwehrreaktionen auslösen (Carver *et al.* 1995). Neben den zytologisch sichtbaren Ereignissen nach der Pathogenerkennung, kommt es auch zur verstärkten Expression verschiedener Gene, also der Aktivierung der Abwehr auf Transkriptionsebene (Davidson *et al.* 1988; Boyd *et al.* 1994; Gregersen *et al.* 1997). So kann man bereits 2 hpi in Gerstenprimärblättern eine Zunahme der Transkriptmenge der β -1,3-Glukanase und eine Stunde darauf von Chitinase und Peroxidase beobachten (Boyd *et al.* 1994; Heitefuss 2001).

Mit dem Auswachsen des appressorialen Keimschlauchs (*appressorial germ tube*, AGT) zwischen 3 hpi und 12 hpi verschob sich die Reaktion in der Epidermiszelle vom PGT zum sekundären Keimschlauch (sKS) in allen vier Gerstenlinien. Auch hier war 13 hpi kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Reaktionen zwischen resistenten und suszeptiblen Linien zu finden, was mit Beobachtungen von Koga *et al.* übereinstimmt (1990), die 12 hpi ebenfalls keinen Unterschied in der Bildung von Cytoplasmaaggregationen unter dem Appressorium zwischen *Mla1*- und *m1a1*-tragenden Gerstenlinien finden konnten. Es ist bekannt, dass ebenso wie die Bildung des PGT das Auswachsen des AGT zu einer verstärkten Expression bestimmter Gene in den Pflanzenzellen führt (Davidson *et al.* 1988; Boyd *et al.* 1994; Gregersen *et al.* 1997). Dabei handelt es sich zum einen um Gene, deren Expression bereits 2–5 hpi verstärkt wurde, wie die der Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) oder Peroxidasen, aber auch um solche, deren Expression zuvor nicht von der Pathogenattacke verändert worden war, wie z.B. das Gen des Thaumatin-ähnlichen Proteins (Boyd *et al.* 1994).

Nach den Ergebnissen der zytologischen Untersuchung der Interaktion zwischen den verschiedenen Gerstenlinien mit dem Echten Gerstenmehltaupilz konnte davon ausgegangen werden, dass die gewählten Zeitpunkte (3-5 hpi bzw. 11-13 hpi) für die Isolierung früh *Bgh*-induzierter Gerstengene geeignet waren.

4.2 Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH) als Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gerstengene

Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH) ist eine auf PCR basierende Methode, die häufig zur Isolierung differentiell exprimierter Gene, besonders solcher mit geringer Abundanz, eingesetzt wird (Diatchenko *et al.* 1996; Birch und Kamoun 2000). Speziell bei der Identifikation von Genen, die in Tumorgeweben im Vergleich zu gesundem Gewebe differentiell exprimiert werden, kommt SSH vielfach zum Einsatz (Yang *et al.* 1999; Carvalho *et al.* 2002), so dass die Methode speziell für die Applikation im tierischen System optimiert wurde (Dr. S. Schmitz, BD Biosciences Clontech, pers. Mitteilung). SSH findet aber auch bei der Analyse genomischer Unterschiede zwischen Bakterienstämmen und der Isolierung differentiell exprimierter Pflanzengene Verwendung (Janke *et al.* 2001). So wurde diese Methode unter anderem in Tomate, Kartoffel, *Arabidopsis*, Reis und Gerste angewendet, um differentiell exprimierte Gene nach Pathogenbefall, Seneszenzeintritt chemischer Induktion oder abiotischem Stress zu identifizieren (Birch *et al.* 1999; Beyer *et al.* 2001; Hinderhofer und Zentgraf 2001; Liu *et al.* 2001; Werner *et al.* 2001; Xiong *et al.* 2001; Jarosch 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier Suppressive Subtraktionshybridisierungen durchgeführt. In allen vier Hybridisierungen wurde *SMARTTM*-cDNA, die aus PolyA⁺-RNA hergestellt worden war, als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die *SMARTTM*-Technologie ermöglicht es, auch aus geringen Mengen an RNA, große Mengen cDNA herzustellen, da die Methode eine Amplifizierung der cDNA über PCR einschließt (Spirin *et al.* 1999). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bei einer geringen Anzahl an Zyklen in der PCR, das Verhältnis der einzelnen Transkripte zueinander verglichen mit der Ausgangs-RNA unverändert blieb (Herrler 2000; Vernon *et al.* 2000; Zhumbayeva *et al.* 2001). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit mit *Poly 4-2* (Aktin) bestätigt werden, dessen Expression nach Inokulation sowohl über *SMARTTM*-RT-PCR als auch über *Northern* überprüft wurde. In beiden Fällen konnte die schwache Induktion des Gens nach Pathogenbefall bestätigt werden (vgl. Abb. 3.11 und 8.7)

In den ersten beiden SSHs, in denen Gerstengene isoliert werden sollten, die nach Inokulation *Mlg*-spezifisch verstärkt exprimiert waren, zeigten insgesamt 59 Fragmente, die 35 unterschiedliche Gene repräsentierten, differentielle Signale auf den *Reversed Northern Dot Blots*. Mittels *Northern*-Analysen oder *SMARTTM*-RT-PCR wurde versucht, die differentielle Expression für 25 dieser Gene zu bestätigen. Nur eines der Gene, *Pl074* (ohne signifikante

Homologie), zeigte im *Northern* eine stärkere Expression in *Mlg*-tragenden Linien im Vergleich zu suszeptiblen Linien nach Inokulation (s. 3.4.1). Dieser Unterschied in der Expression trat allerdings erst ab 16 hpi auf, also zu einem Zeitpunkt, der bei der SSH nicht berücksichtigt wurde, da hier die Expression 11-13 hpi untersucht worden war. Somit war das Auffinden dieses differentiell exprimierten Gens bei den SSHs eher zufällig, so wie das der anderen 4 Mehltaupilz-induzierten Gene (*Pl006*, *Pl016*, *Pl073*, *Pl075*), bei denen kein linienspezifischer Unterschied in der Expression zu detektieren war. Bei der dritten SSH sollten konstitutiv differentiell exprimierte Gene der *Mlg*-tragenden Linie isoliert werden. Für keines der 5 Gene, die in den *Reversed Northern Dot-Blots* differentielle Signale zeigten und anschließend in *Northern*-Analysen oder *SMARTTM*-RT-PCR untersucht wurden, konnte allerdings eine stärkere Expression in der *Mlg*-tragenden Linie im Vergleich zur suszeptiblen bestätigt werden.

In der letzten SSH, die der Isolation pathogeninduzierter Gene dienen sollte, zeigten 12 Gene differentielle Signale in den *Reversed Northern Dot-Blots*, von denen nur eines, *Pl121* (WIR1B-Homolog), mittels *SMARTTM*-RT-PCR als pathogeninduziert bestätigt werden konnte.

Die Gründe für den auf den ersten Blick nur wenig erfolgreichen Verlauf der SSHs können sehr vielfältig sein, da viele Kriterien bei der Anreicherung differentiell exprimierter Gene über SSH eine Rolle spielen.

Als Erklärung dafür, dass bei den ersten 3 SSHs keine Gene isoliert wurden, die in der *Mlg*-tragenden Linie IWe im Vergleich zur suszeptiblen Linie Ingrid stärker exprimiert waren, kann angenommen werden, dass es solche Gene nicht gab. Es ist denkbar, dass weder konstitutiv noch zu einem frühen Zeitpunkt (3-13 hpi) der Gerste/*Bgh*-Interaktion die Expression eines Gens in den beiden Linien unterschiedlich stark war. Bei vergleichenden Genexpressionsstudien in den ersten 24 Stunden der Interaktion mit *Bgh* konnten zwischen *Mla1*- und *mLa1*-tragenden Gerstenlinien ebenfalls keine Unterschiede nachgewiesen werden (Davidson *et al.* 1988; Gregersen *et al.* 1997). Das gleiche fanden Clark und Mitarbeiter in *mlo*- und *Mlo*-Gerstenlinien in den ersten 15 Stunden der Interaktion mit dem Echten Gerstenmehltaupilz (Clark *et al.* 1993). Auch PR-Gene, wie die von Peroxidasen und Chitinasen, zeigten erst ab 30 hpi erste Unterschiede in ihrer Expression zwischen der resistenten und der anfälligen Linie (Boyd *et al.* 1994).

Ebenso wie in den SSHs konnte auch in einem parallel zu dieser Arbeit durchgeführten cDNA-AFLP kein Gen isoliert werden, das in den *Mlg*-tragenden Linien IWe und MiGf im Vergleich zu den suszeptiblen Linien Ingrid und Manchuria_{isogen} differentiell exprimierten

waren (Eckey in Vorbereitung). Da im cDNA-AFLP nahezu alle Gene auf ihre Expression hin untersucht worden sind, kann man sagen, dass es wahrscheinlich keine Gene gab, die konstitutiv oder zu frühen Zeitpunkten der Interaktion mit Gerstenmehltaupilz deutlich differentiell zwischen *Mlg*- und *mlg*-tragenden Linien exprimiert waren.

Das erklärt aber nicht das Ergebnis der vierten SSH, bei der *Bgh*-induzierte Gene angereichert werden sollten. In dem bereits erwähnten cDNA-AFLP waren ca. 4 % der dargestellten Genfragmente pathogenresponsiv, die meisten zeigten eine verstärkte Expression nach Inokulation mit Gerstenmehltaupilz (Eckey in Vorbereitung), so dass auch bei der SSH mehr als eines der 14 untersuchten Gene mehлтаupilz-induziert hätte sein sollen.

Doch bei den meisten der in den *Reversed Northern Dot Blots* differentiellen Klone handelte es sich um Falsch-Positive. Das Auftreten dieser Fragmente, die sich dadurch auszeichnen, dass sie in den *Reversed Northern Dot-Blots* differentielle Signale zeigen, ihre differentielle Expression allerdings nicht in *Northern* Analysen oder über RT-PCR bestätigt werden kann, ist ein häufiges Problem der SSH. Aus diesem Grund wurde bereits eine Methode, die sogenannte *mirror orientation selection* (MOS), die die Eliminierung Falsch-Positiver aus der SSH-Bank erlauben soll, entwickelt (Rebrikov *et al.* 2000).

Die Entstehung solcher Falsch-Positiven während der SSH kann verschiedene Ursachen haben. Diatchenko *et al.* vor einer Präamplifikation des Ausgangsmaterials, da sich dadurch der Anteil Falsch-Positiver in der resultierenden SSH-Bank erhöhen könnte, so dass die Amplifikation der cDNA in der *SMARTTM*-PCR möglicherweise das Auftreten falsch-positiver Signale verstärkt hat (Diatchenko *et al.* 1999). Der Anteil Falsch-Positiver nimmt auch zu je weniger differentielle mRNAs in der Hybridisierung vorhanden sind, d.h. je weniger homogen das Ausgangsmaterial ist (Diatchenko *et al.* 1999; Desai *et al.* 2000). Desai *et al.* (2000) konnten zeigen, dass bei einer SSH, die dem Auffinden differentiell exprimierter Gene in Prostatumoren dienen sollte, nur 3 % der Klone der SSH-Bank tatsächlich differentiell exprimiert waren, während es bei einem vergleichbaren Experiment mit Hirntumoren 70 % waren. Der Grund für diesen Unterschied lag nach Meinung der Autoren darin, dass Prostatumore nur zu etwa 30 % tumoröses Material enthalten, während Hirntumore oft zu 100 % aus Krebszellen bestehen. Ein inokuliertes Gerstenprimärblatt kann in gewisser Weise in Bezug auf seine Homogenität mit dem Gewebe eines Prostatumors verglichen werden. In einem Ansatz, in dem man cDNA von pathogeninfiziertem Material als *Tester* und cDNA von nicht-infiziertem als *Driver* verwendet, ist der Anteil differentieller mRNAs vergleichsweise niedrig, da nur etwa 16 % der Gene in den ersten 24 Stunden einer Pathogenattacke in ihrer Expression verändert werden (Scheideler *et al.* 2002). Besonders zu

frühen Zeitpunkten der Gerste/*Bgh*-Interaktion reagieren nicht alle Zellen des Gerstenblattes auf die Pathogenattacke, so dass die Expression pathogenresponsiver Gene speziell im Mesophyll noch nicht vollständig induziert ist, und Transkripte differentiell exprimierter Gene nur in einem Teil der Zellen zu finden sind.

Zudem wurden die Suppression-PCRs in der vorliegenden Arbeit mit einem bzw. 5 Zyklen mehr durchgeführt, als vom Hersteller empfohlen, was ebenfalls das Auftreten Falsch-Positiver begünstigt haben könnte (Diatchenko *et al.*, 1999). Die Erhöhung der Zyklenzahl schien notwendig, da bei geringerer Amplifikation keine Produkte nach gelelektrophoretischer Trennung sichtbar waren.

Die geringe Ausbeute an *Bgh*-induzierten Genen in der vierten SSH kann aber auch darin begründet sein, dass die Hybridisierung nicht erfolgreich verlaufen ist. Die Effektivität der Subtraktion hängt stark von der Effizienz ab, mit der die beiden Adaptoren zuvor an die *Tester*-cDNA-Fragmente ligiert wurden (Desai *et al.* 2000). Diese Ligationseffizienz war in der vierten SSH geringer als vom Hersteller gefordert und konnte auch durch experimentelle Variationen nicht gesteigert werden, so dass möglicherweise die Hybridisierung nicht erfolgreich verlaufen ist.

Über die Effizienz von SSH in anderen Arbeiten mit Pflanzenmaterial kann nur wenig gesagt werden, da oft keine Aussagen darüber getroffen wurden, wie viele der im ersten Screening differentiell erschienenen cDNAs in unabhängigen Analysen bestätigt werden konnten. Birch und Mitarbeiter konnten in einer SSH mit Kartoffelpflanzen zeigen, dass 10 % der Klone der SSH-Bank tatsächlich im Sinne der Fragestellung des Versuchs differentiell exprimiert waren (Birch *et al.* 1999). Xiong *et al.* (2001) konnten 4,4 % der Klone aus einer Reis-SSH-Bank als durch *M. grisea* induziert bestätigen. Bei Beyer *et al.* (2001) entsprachen nur 1,4 % der Klone der SSH-Bank der ursprünglichen Fragestellung. In der Dissertation von Birgit Jarosch, die SSH angewendet hatte, um DCINA-induzierte Gene der Gerste zu isolieren, waren 2,0 % der über SSH angereicherten cDNAs tatsächlich differentiell exprimiert (Jarosch 2002). Man muss feststellen, dass es nur wenigen Arbeitsgruppen gelungen ist, mittels SSH eine Anreicherung von differentiell exprimierten Genen zu erreichen.

4.3 PCR als Methode zur Isolierung von Resistenzgenanaloga aus Gerste

Die Isolierung von Resistenzgenanaloga (RGA) durch den Einsatz der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist bereits vielfach beschrieben worden. Neben der Isolation von Genen aus dikotylen Pflanzenspezies, wie *Arabidopsis*, Kartoffel, Salat, Soja, Sonnenblume, Tomate und Weinrebe (Kanazin *et al.* 1996; Leister *et al.* 1996; Yu *et al.* 1996; Aarts *et al.* 1998; Gentzbittel *et al.* 1998; Ohmori *et al.* 1998; Shen *et al.* 1998; Simons *et al.* 1998; Donald *et al.* 2002), kam diese Methode auch bei monokotylen Spezies, wie Gerste, Reis und Weizen zum Einsatz (Feuillet *et al.* 1997; Seah *et al.* 1998; Mago *et al.* 1999; Brueggeman *et al.* 2001).

Für die Isolation von RGA werden degenerierte Primer von konservierten Bereichen bereits isolierter und sequenzierter Resistenzgene, wie dem *L6*-Gen aus Flachs, dem *N*-Gen aus Tabak und dem *RPS2*-Gen aus *Arabidopsis*, abgeleitet und in PCRs eingesetzt (Leister *et al.* 1996; Shen *et al.* 1998). Meist dienen Motive der Nukleotidbindestelle (NBS), die in den meisten Resistenzgenen vorhanden ist, als Vorlage für die Erstellung degenerierter Primer (Bent 1996; Baker *et al.* 1997; Hammond-Kosack und Jones 1997; Ellis 2000). Neben der Phosphat-Bindeschleife (P-Loop), die die hoch konservierte Sequenz GGVGKTT aufweist (Saraste *et al.* 1990; Ohmori *et al.* 1998), wird auch eine zweite in der NBS vorkommende stark konservierte hydrophobe Domäne mit der Konsensusaminosäuresequenz GLPL als häufiges Motiv von Resistenzgenen angesehen und als Anheftungsstelle degenerierter Primer genutzt (Mago *et al.* 1999).

Einige Resistenzgenprodukte weisen eine ebenfalls konservierte Kinasedomäne auf, wie das XA21 aus Reis oder PTO aus Tomate (Hammond-Kosack und Jones 1997). Auch dieses Motiv kann bei der Erstellung degenerierter Primer als Vorlage dienen (Botella *et al.* 1997; Gentzbittel *et al.* 1998).

Andere Motive, wie Leucin-reiche Regionen (LRR), Leucinzipper (LZ) oder Toll-Interleukin-Domänen (TIR), werden seltener zur Erstellung degenerierter Primer herangezogen, da diese Regionen durch Protein-Protein-Interaktionen die Spezifität der Resistenzreaktion vermitteln und als hoch variabel gelten (Kobe und Deisenhofer 1994; Botella *et al.* 1997; Fluhr 2001; Mondragon-Palomino *et al.* 2002).

Als *template* können in der PCR genomische DNA, BAC-DNA (*bacterial artificial chromosomes*) oder cDNA eingesetzt werden. Bei komplexen Genomen, wie dem der Gerste empfiehlt sich der Einsatz von cDNA, um die Bildung unspezifischer Produkte zu

unterdrücken (Shen *et al.* 1998; Brueggeman *et al.* 2001).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das *Mlg*-Gen oder andere an der *Mlg*-vermittelten Resistenz beteiligten RGA mittels PCR aus Gerste zu isolieren. Insgesamt wurden 141 Primer-Kombinationen (*sense* und *antisense*, s. Tab. 8.3) in PCRs verwendet, die verschiedenen Literaturstellen entnommen worden waren (Kanazin *et al.* 1996; Leister *et al.* 1996; Yu *et al.* 1996; Botella *et al.* 1997; Aarts *et al.* 1998; Gentzbittel *et al.* 1998; Shen *et al.* 1998; Simons *et al.* 1998). 69 der Primer-Kombinationen waren von NBS, 59 von LRR, 7 von Kinasemotiven, 4 von TIR und 2 von LZ abgeleitet. Als *template* wurde cDNA aus mock- und *Bgh*-inokulierten Gerstenprimärblättern der Linien Ingrid und Manchuria_{isogen} (*mlg*) sowie IWe und MiGf (*Mlg*) verwendet. Die *annealing*-Temperatur bei den PCRs wurde 5 °C niedriger gewählt als vom Lieferanten der Primer angegeben, um die Anheftung der degenerierten Primer an die heterologe cDNA der Gerste zu gewährleisten. Es wurden keine *Mlg*-spezifischen Produkte amplifiziert, aber 13 Genfragmente, deren Expression nach *Bgh*-Inokulation in allen Linien erhöht war (M. Korell, pers. Mitteilung; s. Tab. 3.5). Diese Fragmente wurden aus dem Gel isoliert, kloniert und anschließend sequenziert. Sieben dieser Fragmente wurden mit Primern, die von *Arabidopsis*-LRR abgeleitet worden waren (Botella *et al.* 1997), amplifiziert, von denen zwei (Poly 39 und Poly 48) keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen zeigten. Neben diesen beiden wurden Genfragmente einer Rezeptorkinase (Poly 4-1), eines Aktins (Poly 4-2), einer PAL (Poly 23), eines ERD-1- (Poly 22) und eines WCI-5-Homologs (Poly 28) als pathogeninduziert bestätigt. Keines dieser Proteine wies eine LRR auf. Dies kann zum einen darin begründet liegen, dass LRR auf Grund ihrer postulierten Funktion der Ligandenbindung hoch spezifisch und daher sehr variabel sind (McDowell *et al.* 1998; Ellis *et al.* 1999; Luck *et al.* 2000; Moffett *et al.* 2002) und zum anderen darin, dass bei den PCRs eine so niedrige *annealing*-Temperatur gewählt wurde, dass die Primer unspezifisch an andere cDNAs binden konnten.

Eines der Genfragmente (Poly 53) wurde mit Primern amplifiziert, die von einer Kinasedomäne von *Arabidopsis* abgeleitet waren (Botella *et al.* 1997). In der Tat wies dieses Fragment Homologien zu verschiedenen Rezeptorkinasen auf und innerhalb des amplifizierten Bereichs konnte eine Proteinkinasedomäne identifiziert werden (s. Abb. 8.8). Die restlichen 5 Genfragmente (Poly 85, Poly 94, Poly 103, Poly 129 und Poly 134) stammten aus PCRs, in denen Primer eingesetzt wurden, die von NBS abgeleitet worden waren (Leister *et al.* 1996; Shen *et al.* 1998; Simons *et al.* 1998). Drei dieser Fragmente (Poly 94, Poly 129, Poly 134) zeigten keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen, wobei Poly 129 später als *Bgh*-cDNA identifiziert werden konnte (s. 3.6.1). Beim POLY 85 handelte es sich um ein

Protein mit Kupferbindedomäne, das keine NBS besitzt. Auch hier ist es wahrscheinlich, dass auf Grund der niedrigen *annealing*-Temperatur die Primer unspezifisch an die cDNA des Kupfer-bindenden Proteins gebunden haben und diese so amplifiziert wurde. Der POLY 103 wies als einziger die erwartete NBS auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit diesem Ansatz kein Gen gefunden werden konnte, das *Mlg*-Spezifität besaß. Die Aminosäuresequenzen von 2 der 13 *Bgh*-induzierten Gene wiesen das Motiv (Kinasedomäne und NBS) auf, von dem die degenerierten Primer ursprünglich abgeleitet worden waren. 5 Fragmente hatten keine Homologie zu Proteinen der NCBI-Datenbank und in sechs Fällen wurden Produkte amplifiziert, die keines der beschriebenen Resistenzgenmotive aufwiesen. Shen und Mitarbeiter, die RGA aus Salat mit Hilfe degenerierter Primer, die von NBS abgeleitet worden waren, zu isolieren versuchten, sequenzierten 65 verschiedenen PCR-Produkte, von denen knapp die Hälfte das erwartete Motiv aufwiesen. Diese relativ hohe Effizienz von ca. 50 % erklärten sie damit, dass die von ihnen verwendeten Primer sehr spezifisch und nur in geringem Maße degeneriert waren. Je stärker die Degeneration der Primer, wie sie durch den Einbau von Inosin erreicht wird, desto größer ist die Gefahr, unspezifische Produkte zu amplifizieren (Shen *et al.* 1998; Brueggeman *et al.* 2001). Einige der in dieser Arbeit verwendeten Primer besaßen einen hohen Degenerationsgrad (Kanazin *et al.* 1996; Leister *et al.* 1996), was der Grund dafür gewesen sein könnte, dass die amplifizierten Produkte nur zum Teil Resistenzgenmotive aufwiesen.

4.4 Identifizierung Mehltaupilz-induzierter Gene der Gerste

Die Überprüfung der über Suppressive Subtraktionshybridisierungen und RGA-Kandidatengenansatz isolierten, potentiell differentiell exprimierten Gerstengene führte zur Identifizierung von insgesamt 20 Genen, deren Expression durch die Inokulation mit *Bgh* erhöht wurde. Fünf der Genfragmente, P1016, P1074, P1075, Poly 39 und Poly 48, zeigten keine signifikanten Homologien bei Sequenzvergleichen in der Gendatenbank mit bereits bekannten Proteinen. Die restlichen 15 Genfragmente konnten auf Grund ihrer Homologien zu verschiedenen Gruppen zusammen gefasst werden. Neben vier WIR1 (*wheat induced resistance*)- bzw. WCI5- (*wheat chemically induced*) Homologen konnten vier Genfragmente mit Resistenzgen-Motiven, zwei Phosphatasen, ein Chlorophyll a/b-Bindeprotein, ein Aktin, ein ERD1 (*early responsive to dehydration*)-Homolog, eine PAL (Phenylalanin Ammonium-Lyase) und ein Kupfer-bindendes Protein als Mehltaupilz-induziert bestätigt werden. Bis auf *Poly 48*, das erst 12 hpi über RT-PCR nachzuweisen war (vgl. Abb. 3.11), waren alle Gene

bereits 4 Stunden nach Inokulation mit *Bgh* verstärkt exprimiert. *Pl113* (Phosphoproteinphosphatase) war nach Inokulation nur in Ingrid, nicht in IWe, induziert und zeigte eine biphasische Transkriptakkumulation (s. Abb. 3.2). Die Gene *Pl074* und *Poly 85* (Kupfer-Bindeprotein) waren 24 hpi und 48 hpi bzw. 16 hpi und 24 hpi in den *Mlg*-tragenden Linien IWe bzw. MiGf stärker exprimiert als in den nahezu isogenen suszeptiblen Linien (s. Abb. 3.4 und 3.13). In den folgenden Unterkapiteln werden die verschiedenen Gene vorgestellt und ihre mögliche Funktion bei der Abwehr des Mehлтаupilzes diskutiert.

4.4.1 WIR1- und WCI5-Homologe

Zwei der aus dem SSH-Ansatz stammenden, mehлтаupilzinduzierbaren Gene, *Pl010* und *Pl121*, zeigten Homologie zu *WIR1a* bzw. *WIR1b* aus Weizen. WIR ist die Abkürzung für „*wheat induced resistance*“ und charakterisiert Gene, die nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) verstärkt in Weizen exprimiert wurden (Schweizer *et al.* 1989; Rebmann *et al.* 1991; Rebmann *et al.* 1991a; Kmejl *et al.* 1995). Die Aminosäuresequenz von PL010 ist zu 48 % identisch mit der des WIR1A, während 64 % der Aminosäuren von PL121 identisch mit denen des WIR1B sind (s. Abb. 8.9). Bei den Proteinen der WIR1-Familie handelt es sich um relativ kleine (81 bis 88 aa), integrale Membranproteine der Klasse II mit einem kurzen cytoplasmatischen N-Terminus und einem prolin- und glycinreichen extracytoplasmatischen C-Terminus (von Heijne und Gavel 1988; Bull *et al.* 1992). *WIR1* akkumulierte in Weizen nach Inokulation mit *Bgh* und *Bgt* mit maximaler Expression bei 14 hpi, wobei die Stärke der Expression unabhängig von der f.sp. des Mehлтаupilzes war. Die *WIR1*-Gene waren weder wund- noch chemisch induziert (Bull *et al.* 1992; Schaffrath *et al.* 1997). Auf Grund ihres hohen Anteils an Glycin und Prolin im C-terminalen Bereich (ca. 45 %), wurde postuliert, dass WIR1-Proteine mit der Zellwand interagieren und so den Kontakt zwischen Zellwand und Plasmamembran, z.B. bei einer Pathogenattacke, verstärken (Mauch *et al.* 1991; Bull *et al.* 1992). Die Bedeutung der Plasmamembran-Zellwand-Adhäsion bei der Abwehr von pilzlichen Pathogenen wurde im Kuhbohne/Rost (*Vigna unguiculata* L./*Uromyces vignae*) System untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Rostpilz offenbar in der Lage war, die Adhäsion zwischen Zellwand und Plasmamembran zu reduzieren und so seine Penetration in die Zellen zu erleichtern (Mellersh und Heath 2001). In Bohne, Tomate und Soja wurden bei Trockenstress prolin- und glycinreiche Proteine verstärkt exprimiert, die wahrscheinlich eine Plasmolyse verhindern sollen (Creelman und Mullet 1991; Showalter *et al.* 1992; Gomez-Garcia *et al.* 2000). Den

stärksten Hinweis auf die Funktion der in Gerste gefundenen WIR1-Homologe lieferten Arbeiten von Mauch und Mitarbeitern zur Charakterisierung eines WIR1-Homologs aus Reis. Die Aminosäuresequenz dieses RIR1A ist zu 35 % identisch mit der des WIR1. Nach Inokulation von Reis mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* konnte über Immunodetektion die Akkumulation des RIR1A-Proteins in der Zellwand nachgewiesen werden (Mauch *et al.* 1991). Da WIR1A, WIR1B, RIR1A und die beiden gefundene Gerstenhomologe PL010 und PL121 das gleiche hydrophatische Profil aufweisen, ist anzunehmen, dass PL010 und PL121 ebenso wie ihre Homologe in Weizen bzw. Reis integrale Membranproteine sind und möglicherweise als Zellwand-Membran-Linker fungieren (B. Mörschbacher, pers. Mitteilung). Darüber hinaus besitzen PL010 und PL121 ein Signalpeptid, das auch in der RIR1A-Sequenz zu finden ist und auf eine Sekretion der Proteine schließen lässt (Mauch *et al.* 1991). Die funktionale Analyse des WIR1 durch Transiente Überexpression in Epidermiszellen von Weizenprimärblättern mittels Partikel-Bombardement ergab, dass WIR1 keinen Einfluss auf die Interaktion mit Echtem Weizenmehltaupilz (*Bgt*) hatte. Das bedeutet, dass die Überexpression dieses Gens die Penetrationseffizienz des Pilzes nicht signifikant verändern, seine Funktion in der Weizen-*Bgt*-Interaktion auf diesem Weg also nicht geklärt werden konnte (Schweizer *et al.* 1999a).

Ein weiteres pathogen-induziertes Gen des Weizens ist *WCI5*. WCI steht für „*w*heat *c*hemically *i*nduced“ und gibt einen Hinweis auf ein zusätzliches Charakteristikum dieses Gens, nämlich seine Induzierbarkeit durch den chemischen Resistenzinduktor BTH (Benzothiadiazol) in Weizen (Görlach *et al.* 1996). Das ca. 950 bp große *WCI5* ist der einzige Vertreter der fünf isolierten *WCI*-Gene, der auch nach Inokulation mit Echtem Weizenmehltaupilz eine deutlich verstärkte Expression zeigte (Görlach *et al.* 1996; Schaffrath *et al.* 1997). Die Lokalisation des WCI5-Proteins und seine genaue Funktion konnten bislang nicht geklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Homologe des WCI5 in Gerste isoliert, PL089 und POLY 28. Die Aminosäuresequenz des PL089 ist zu 87 % identisch mit der des PBH6-12, einem weiteren WCI5-Homologen aus Gerste, die des POLY 28 zu 85 % identisch mit der WCI5-Aminosäuresequenz. Erst kürzlich wurden WCI5, pBH6-12 und weitere Homologe aus *Arabidopsis*, Reis, Tabak und Weizen, deren Transkripte nach Pathogenattacke in Epidermis und Mesophyll akkumulierten, zur Familie der PR-17 zusammengefasst. Durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Proteinen wurden Homologien der PR-17-Proteine zu Zn²⁺-bindenden Proteinen und verschiedenen Proteasen gefunden, die auf die mögliche Funktion dieser Proteine schließen lassen. Da sie extrazellulär akkumulieren, könnten sie am Zellwandmetabolismus oder an Signaltransduktionsereignissen beteiligt sein.

Darüber hinaus ist auch eine direkte antibiotische Wirkung der *WCI5*-Homologe denkbar (Christensen *et al.* 2002). Eine transiente Überexpression des *WCI5* in Weizenepidermiszellen mittels Partikel-Bombardements konnte die Penetrationseffizienz von *Bgt* signifikant verringern, was bedeutet, dass diesem Gen eine relevante Funktion in der Weizen-*Bgt*-Interaktion zukommt, die auch für die übrigen Vertreter der PR-17-Familie und damit auch für PI010 und PI121 postuliert werden kann (Schweizer *et al.* 1999a).

4.4.2 Proteine mit Resistenzgen-Motiven

Die Aminosäuresequenzen von vier der pathogeninduzierten Gene wiesen Motive auf, die häufig in Resistenzgenprodukten gefunden werden. Das cDNA-Fragment PI073, das mittels Suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH) isoliert wurde, stellte den 786 bp langen 3'-Bereich eines Gens inklusive PolyA⁺-Schwanz dar. Die korrespondierende Aminosäuresequenz enthielt zwei Leucin-reiche Regionen (LRR) die sich über eine Länge von jeweils 25 Aminosäuren erstreckten. Das Fragment zeigte 40 % Identität auf Aminosäureebene zu einem Leucin-reichen Protein der Morenhirse (*Sorghum bicolor* L.). Dieses SLRR besitzt 6 imperfekte LRRs und akkumulierte in jungen Hirseblättern 6 Stunden nach Inokulation mit dem Maispathogen *Colletotrichum graminicola* (Hipskind *et al.* 1996). Außer der LRR-Region weist das SLRR ein Signalpeptid auf, das auf eine Exkretion in den extracytoplasmatischen Raum schließen lässt. Darüber hinaus besitzt es keinerlei besondere Motive, d.h. es beinhaltet weder eine Transmembranregion noch eine Kinasedomäne. Als Funktion der LRR wird die Bindung eines spezifischen Liganden als wahrscheinlichste Alternative diskutiert (Kobe und Deisenhofer 1994; Fluhr 2001). So ist es denkbar, dass das SLRR extrazellulär einen Liganden, z.B. einen Elicitor, bindet und dann ein Protein-Protein-Duplex mit einem Rezeptor oder einer Rezeptorkinase bildet, wie es auch für die Resistenzgenprodukte CF-2, -4 und -9 und PTO der Tomate postuliert wird bzw. gezeigt werden konnte (Hammond-Kosack und Jones 1997; Rathjen *et al.* 1999). Die verstärkte Expression des *SLRR*-Gens nach Pathogenbefall und die damit verbundene Akkumulation des Proteins im extrazellulären Raum könnte die Häufigkeit der Bindung des korrespondierenden Liganden erhöhen und damit zu einer Verstärkung nachfolgender Signaltransduktionsprozesse führen. Auch in Tabak konnte die verstärkte Expression eines Leucin-reichen Proteins (EILP) nach Elicitorbehandlung und in Tomate für LRP nach Viroidinfektion gezeigt werden (Tornero *et al.* 1996; Takemoto *et al.* 2000).

Da vom PI073 nur der N-terminale Bereich isoliert werden konnte, kann nicht ausgeschlossen

werden, dass sich im 5'-Bereich noch weitere Motive, wie eine NBS, eine Transmembranregion oder eine Kinasedomäne befinden. So lässt sich bisher nur sagen, dass das Vorhandensein der LRR auf eine Beteiligung des PL073 an einer Protein-Protein-Interaktion und an Signaltransduktionprozessen schließen lässt.

Poly 4-1 und Poly 53, zwei aus dem RGA-Kandidatengenansatzes stammende Genfragmente, wiesen beide eine Proteinkinasedomäne auf. Das 290 bp lange cDNA-Fragment Poly 53 kodierte u.a. für eine 44 Aminosäure umfassende Proteinkinasedomäne. In der Aminosäuresequenz des durch iPCR auf *full-length* verlängerten POLY 4-1 war eine 198 Aminosäuren lange Proteinkinasedomäne zu finden (s. Abb. 3.19). Kinasen kommt eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung z.B. nach Verwundung, osmotischem Stress oder Pathogeninfektion in Pflanzen zu (Ehness *et al.* 1997; Zhu 2002). Bereits wenige Minuten nach Elicitorbehandlung konnte in Tomatenzellkulturen eine Änderung des Proteinphosphorylierungsmusters gefunden werden, was auf die Aktivität von Proteinkinasen schließen ließ. Das Ausschalten von Proteinkinasen durch spezifische Inhibitoren führte hingegen zu einem Ausbleiben der Ethylenproduktion und verminderter PAL-Aktivität nach Elicitorbehandlung (Felix *et al.* 1991). In Tabak konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von PR-Genprodukten Proteinkinase-abhängig ist (Raz und Fluhr 1993; Despres *et al.* 1995; Suzuki und Shinshi 1995). Kinasedomänen sind ein wichtiges Merkmal von Resistenzgenprodukten (Hammond-Kosack und Jones 1997) und ermöglichen die direkte Weiterleitung von Signalen an nachfolgende Elemente der Signalkaskade.

Innerhalb der 814 Aminosäuren-langen Sequenz des POLY 4-1 konnten neben der Proteinkinasedomäne zwei weitere Motive über Homologievergleiche identifiziert werden. So enthält das Protein eine Signatur, die in S-Locus-Glykoproteinen zu finden ist, und eine PAN-Domäne (s. Abb. 3.19). Von S-Locus-Glykoproteinen ist bekannt, dass sie am Stigma sekretiert werden und an eine S-Rezeptor-Kinase (SRK) binden. Diese Bindung erhöht die Selbstinkompatibilität z.B. in Raps (Takayama *et al.* 2001; Hinata *et al.* 1995). Diese Signatur könnte demnach einen Hinweis auf die Interaktion zwischen dem Poly 4-1 und möglichen Bindungspartnern, wie Elicitoren, geben. Das gleiche gilt für die PAN-Domäne, die unterhalb der S-Locus-Glykoprotein-Signatur des POLY 4-1 liegt. Dieses Motiv ist durch das Vorhandensein von 3-4 Disulfidbrücken gekennzeichnet und wurde in verschiedenen Proteinen gefunden, die an Interaktionen mit anderen Proteinen oder Kohlenhydraten beteiligt sind (Tordai *et al.* 1999). Das hydropathische Profil des POLY 4-1, das computergestützt erstellt wurde (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>), zeigte, dass der isolierte ORF drei Transmembranregionen umfasst. Die S-Locus-Glykoprotein-Signatur und die PAN-

Domäne liegen extracytoplasmatisch, die Kinasedomäne intrazellulär. Dieses Profil stimmt mit dem des aus Reis isolierten XA21-Resistenzgenproduktes überein. Dieses besitzt eine extracytoplasmatische LRR, die über eine Transmembranregion mit einer intrazellulären Kinasedomäne verbunden ist (Liu *et al.* 2002).

Die Aminosäuresequenz, die durch das cDNA-Fragment Poly 103 kodiert wurde, wies eine NB-ARC-Domäne auf. Dieses Motiv wurde häufig in pflanzlichen Resistenzgenprodukten und tierischen Zelltodregulatoren gefunden und stellt einen nukleotidbindenden Adaptor dar, der eine Protein-Protein-Interaktionsstelle mit einer Effektdomäne verbindet (van der Biezen und Jones 1998). Da nur ein 544 Aminosäuren umfassender Bereich des POLY 103 gefunden wurde, konnte bisher nicht festgestellt werden, ob sich im C- oder N-terminalen Bereich des Proteins weitere Domänen, wie eine LRR oder eine Kinasedomäne befinden.

4.4.3 Phosphatasen

Zwei der über Suppressive Subtraktionshybridisierung isolierten, *Bgh*-induzierten Genfragmente, P1111 und P1113, zeigten bei Sequenzvergleichen in der Genbank Homologien zu verschiedenen Proteinphosphatasen. Diesen kommt als Antagonisten der Proteinkinasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivierung von Proteinen zu (Smith und Walker 1996; Denu und Dixon 1998). Im menschlichen Genom sind mehr als 500 Phosphatasen kodiert, was die große Bedeutung dieser Enzyme im tierischen System unterstreicht (Denu und Dixon 1998). Prinzipiell werden Proteinphosphatasen in zwei Gruppen unterteilt: Phosphoprotein-Phosphatasen (PPasen) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen). Die Vertreter der ersten Gruppe sind Serin/Threonin-Phosphatasen, d.h. sie dephosphorylieren Serin- oder Threoninreste der Zielproteine. Etwa 97 % der über Phosphorylierung regulierten Protein werden durch Kinasen an Serin/Threonin-Resten phosphoryliert. Die restlichen 3 % werden über Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Tyrosinresten durch Tyrosin-Kinasen bzw. PTPasen reguliert (Smith und Walker 1996).

Die Aminosäuresequenz des 300 bp langen P1111 war zu 84 % identisch mit der einer putativen Tyrosinphosphatase aus Reis. Erst das Auffinden von PTPasen gab einen Hinweis auf die Existenz von Tyrosin-Kinasen in Pflanzen. Über die Funktion von PTPasen ist bislang nur wenig bekannt. Sie sind unter anderem an der Stomatabewegung und der Aktivierung von Kalium-Kanälen in *Arabidopsis* beteiligt (Luan 2002; MacRobbie 2002). Außerdem konnte eine PTPase in *Arabidopsis* gefunden werden, deren Expression durch Salz- und Kältestress beeinflusst war (Xu *et al.* 1998). Eine wahrscheinliche Rolle der PTPasen in Pflanzen ist die

Deaktivierung von MAP (*mitogen-activated protein*) Kinasen. Diese werden im tierischen System über Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten durch dual-spezifische MAPK Kinasen aktiviert und u.a. durch PTPasen inaktiviert (Keyse 2000). Suzuki und Shinshi konnten in Tabakzellen die Aktivierung einer MAP Kinase durch Tyrosin-Phosphorylierung nachweisen (Suzuki und Shinshi 1995).

Die zum 604 bp langen Genfragment P113 korrespondierende Aminosäuresequenz zeigte eine 96 %ige Identität mit einer regulatorischen Untereinheit einer Phosphoprotein-Phosphatase 2A (PP 2A) aus Tabak. PP 2A sind Heterotrimeren, die aus einer katalytischen und 2 regulatorischen Untereinheiten bestehen. Sie weisen spezielle Motive, sogenannte HEAT-*repeats* auf, die auch in der Aminosäuresequenz des P113 gefunden werden konnten und möglicherweise als Protein-Protein-Interaktionsstelle fungieren (Groves *et al.* 1999). In Pflanzen konnte für PP 2A bislang die Beteiligung an der Regulation einer Sucrose-Phosphat-Synthase, einer Nitrat-Reduktase und einer Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nachgewiesen werden (Smith und Walker 1996). Darüber hinaus sind MAP Kinasen und MAPK Kinasen als Zielproteine dieses Phosphatasetyps wahrscheinlich (Keyse 2000; Sundaresan und Farndale 2002). P111 und P113 sind demnach möglicherweise als regulatorische Elemente an Signaltransduktionsprozessen nach Pathogeninfektion beteiligt, indem sie als Antagonisten von Proteinkinasen deren Zielproteine, wie z.B. MAP Kinasen oder Transkriptionsfaktoren, durch Dephosphorylierung inaktivieren.

4.4.4 Chlorophyll a/b Bindeprotein

Das Genfragment eines Chlorophyll a/b Bindeproteins (CAB, P1006) wurde mittels SSH isoliert und in *Northern* Analysen als Mehltaupilz-induziert bestätigt. CAB ist Teil des Photosystem II (PS II) der Photosynthese und bindet, wie sein Name bereits vermuten lässt, Chlorophyllmoleküle. Das PS II ist der Teil des Photosyntheseapparats, an dem die Oxidation von Wasser unter Bildung von Sauerstoff stattfindet (Buchanan *et al.* 2000). Die erhöhte Expression des *CAB*-Gens nach Inokulation mit Mehltaupilz könnte darauf hinweisen, dass die Photosyntheserate in attackierten Blättern erhöht ist. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse von C. Eckey bekräftigt, die nach Inokulation von Gerstenprimärblättern mit *Bgh* nicht nur die Induktion eines *CAB*-Gens fand, sondern auch eine erhöhte Expression eines Ferredoxin-Gens und eines Gens, das für ein *oxygen-evolving enhancer protein* codiert, bestätigte (Eckey in Vorbereitung). Beide Proteine sind ebenfalls Bestandteile des Photosyntheseapparats. Eine verstärkte Photosyntheserate nach Pathogenattacke kann

verschiedene Gründe haben. So könnte der biotrophe Mehltaupilz die Expression bestimmter Gene induzieren, um seinen eigenen Energiebedarf decken zu können. Da seine Existenz von der Aufnahme von Stoffen aus den lebenden Epidermiszellen über Haustorien abhängt, kommt ihm ein hoher Grundstoffwechsel seines Wirts und die erhöhte Bereitstellung von Energieäquivalenten in seiner Entwicklung zu Gute.

Zum anderen ist es denkbar, dass die Pflanze versucht, ihren durch die Induktion von Abwehrmechanismen gestiegenen Energiebedarf durch eine verstärkte Photosynthese zu decken. Dies kann durch das bei der Photosynthese direkt gebildete NADPH geschehen oder durch ATP, das an der ATP-Synthase beim Efflux von Protonen entsteht. Die Pflanze könnte aber noch auf andere Weise von der Erhöhung der Photosyntheserate profitieren. Die Photosynthese ist nämlich durch die Reaktion der Mehler-Peroxidase eine Quelle Reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) (Mullineaux *et al.* 2000). Am PS I entstehen durch die Übertragung von Elektronen aus Sauerstoff Superoxidanionradikale ($O_2^{\bullet-}$). Diese schützen wahrscheinlich die Zellen vor der Ausprägung von Hypersensitivem Zelltod, da sie vermehrt in Zellen zu finden waren, deren Nachbarzellen hypersensitiv reagiert hatten (Hückelhoven und Kogel 1998). Die Superoxidanionen können aber auch durch Kupfer/Zink-abhängige Superoxiddismutasen (Cu/Zn-SOD) zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) disproportioniert werden. Das Wasserstoffperoxid kann anschließend durch Ascorbatperoxidasen (APX) zu Wasser reduziert werden (Asada 1999; Mullineaux *et al.* 2000). Möglicherweise ist dieses H_2O_2 aber auch an der Auslösung der Mesophyll-HR beteiligt oder wird in Epidermiszellen transportiert, wo es HR auslösen kann (Hückelhoven *et al.* 2000a). Zudem gilt H_2O_2 als Botenstoff und kann die Expression verschiedener Gene induzieren (Wu *et al.* 1997). Außerdem wird es bei der Vernetzung von Zellwandbestandteilen genutzt und kann so die Penetrationsresistenz des Wirts verstärken (Brisson *et al.*, 1994).

So kann die verstärkte Photosyntheserate bei Mehltaupilz-Attacke indirekt zu einer Verstärkung der Pathogen-Abwehr beitragen.

4.4.5 Aktin

Das 866 bp lange Fragment Poly 4-2, dessen Expression nach Inokulation mit Mehltaupilz schwach induziert war, zeigte 77 % Homologie auf Aminosäureebene zum AKTIN1 aus Mais. Aktinfilamente sind Teil des Zytoskeletts, dem eine wichtige Funktion bei Zellteilung und Cytoplasmabewegung aber auch bei der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen oder Symbionten zukommt (Kobayashi 1992; Uetake und Peterson 1997; Jin *et al.* 1999; Dantan-

Gonzalez *et al.* 2001). So wurden in Wurzeln von Orchideen Aktin-Aggregationen rund um intrazelluläre Hyphen in mykorrhizierten Zellen gefunden (Uetake und Peterson 1997). Aber auch eindringende Hyphen pathogener Pilze werden von Aktin-Polymeren umschlossen, wie dies im Pathosystem Kuhbohne/Rostpilz (*Vigna unguiculata* L.-*Uromyces vignae*) und Zwiebel (*Allium cepa* L.)/*Botrytis allii* (Grant und Mansfield 1999) gezeigt werden konnte. Bei der erstgenannten Interaktion führte die Inhibition der Mikrofilamentpolymerisation durch CytochalasinE dazu, dass die Kerne der attackierten Bohnenzellen nicht mehr an die Stellen transportiert wurden, an denen der Pilz zu penetrieren versuchte (Skalamera und Heath 1998). Dies zeigte die Funktion des Zytoskeletts bei der Organellenbewegung nach Pathogenattacke. Jin und Mitarbeiter konnten in der kleinen Malve (*Malva pusilla*, Sm.) nach Inokulation mit *Colletotrichum gloeosporoides* f.sp. *malvae* die Induktion des *Aktin1*-Gens während der biotrophen Phase des Pilzes nachweisen (Jin *et al.* 1999). Dieses *Aktin1* zeigte eine starke Homologie zum *Aktin7*-Gen aus *Arabidopsis*, dessen Expression nach Verwundung erhöht war (McDowell *et al.* 1996). In Zellen von Gerstenkoleoptilen konnte die Penetration des Nicht-Wirt Pathogens *Blumeria pisi* deutlich durch die Inhibition der Aktin- und Tubulin-Polymerisation erhöht werden (Kobayashi *et al.* 1997). Diese Ergebnisse weisen alle darauf hin, dass das Zytoskelett eine wichtige Funktion bei der Interaktion von Pflanzen mit pilzlichen Pathogenen besitzt und seine dynamische Umstrukturierung eine Voraussetzung für die Resistenzprägung darstellt. Es gibt jedoch Hinweise für eine diametrale Funktion des Zytoskeletts bei der Pathogenabwehr. So konnte ein weiteres Aktinogen aus Gerste isoliert werden, dessen Expression nach Inokulation mit *Bgh* 8 hpi und 36 hpi deutlich reprimiert wurde (Hückelhoven *et al.* 2001b). Außerdem wurde ein kleines GTP-bindendes Protein, RACB, in Gerste gefunden, das einen negativen Einfluss auf die Penetrationsresistenz gegenüber *Bgh* vermittelt, indem es möglicherweise an einer Umstrukturierung des Zytosketetts beteiligt ist, die der Papillenbildung entgegen wirkt (Schultheiss *et al.* 2002).

4.4.6 ERD1-Homolog

Das im RGA-Kandidatengenansatz isolierte Genfragment Poly 22 zeigte auf Aminosäureebene eine 66 %ige Identität mit dem ERD1 aus *Arabidopsis*. Bei ERD1 handelt es sich um ein 946 aa umfassendes Protein, dessen Expression bei Trockenstress (ERD: *early responsive to dehydration*), nicht aber bei Hitze-, Kälte- und Schwermetallbehandlung anstieg. Außerdem konnte die Genaktivität des *ERD1* durch zahlreiche Phytohormone beeinflusst werden (Kiyosue *et al.* 1993). Inzwischen ist bekannt, dass die Expression des

ERD1 auch bei Ozonbehandlung, Salzstress und Seneszenz induziert wird (Nakashima *et al.* 1997; Miller *et al.* 1999). *ERD1* ist ein ClpC-ähnliches Protein, d.h. ein Homolog der regulatorischen Untereinheit einer chloroplastidären Protease (Weaver *et al.* 1999). Es ist nicht bekannt, ob *ERD1*, das heute zur Klasse der ClpD-Proteine gezählt wird, ebenfalls eine Untereinheit einer Protease darstellt oder selbständig im Stroma vorliegt und z.B. als Protease oder Chaperon fungiert (Adam 2000). Für chloroplastidäre Proteasen ist eine Funktion bei der Regulation der Genexpression denkbar, indem sie, wie ihre bakteriellen Homologe, regulatorische Proteine degradieren (Adam 2000). Das *ERD1*-Homolog Poly 22 weist in seiner Aminosäuresequenz eine ATP-Bindestelle, die auf eine Regulation durch ATP-Bindung hindeutet, und eine Chaperonin clpA/B-Signatur auf. Diese Motive sind bei zahlreichen Proteinen mit Homologie zu bakteriellen ClpA oder ClpB aus unterschiedlichen Spezies zu finden (Gottesman *et al.* 1990). All diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie ATP binden und die Zellen in extremen Stresssituationen schützen, indem sie die Akkumulation denaturierter Proteine kontrollieren. POLY 22 könnte demnach als Untereinheit einer in Chloroplasten lokalisierten Protease oder eigenständige Protease am Abbau abnormer Proteine beteiligt sein, oder alternativ als Chaperon die Faltung deformierter Proteine korrigieren. In beiden Fällen käme diesem Protein durch die Beseitigung oder Korrektur geschädigter Proteine, wie sie z.B. bei oxidativem Stress entstehen können, eine Schutzfunktion für die Zelle zu.

4.4.7 Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL)

Die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) ist eines der Schlüsselenzyme des pflanzlichen Sekundärmetabolismus und stellt den Verknüpfungspunkt zwischen diesem und dem Primärstoffwechsel dar (Bate *et al.* 1994; Dixon und Paiva 1995). Sie katalysiert den ersten Schritt des Phenylpropanoid-Stoffwechselweges, indem sie die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin zu trans-Zimtsäure bzw. Cumarsäure umsetzt (Rasmussen und Dixon 1999; Buchanan *et al.* 2000). Dies ist der Start des komplexen Phenylpropanoid-Stoffwechselweges, dessen Produkte sehr vielfältig sind und u.a. Flavonoide, Phytoalexine, UV-Protektoren, Lignin, Suberin und Salicylsäure umfassen (Kervinen *et al.* 1997). Während in einigen Pflanzenspezies nur ein *PAL*-Gen vorhanden ist, existieren in anderen mehrere Formen dieses Enzyms. So sind in Gerste bislang sieben verschiedene *PAL*s gefunden worden (Kervinen *et al.* 1997; Kervinen *et al.* 1998). Die in der vorliegenden Arbeit isolierte *PAL* konnte durch Homologievergleiche als *PAL7* identifiziert werden. Aus zahlreichen

Untersuchungen ist bekannt, dass die Expression der PAL-Gene durch verschiedene abiotische Stressfaktoren induziert wird. So konnte ein Anstieg der Genaktivität nach Behandlung mit Ozon in Soja (Booker und Miller 1998), chemischer Induktion mittels BTH in Weizen (Stadnik und Buchenauer 2000), Bestrahlung mit UV-Licht und Verwundung in Petersiliezellen (Logemann *et al.* 2000) und Kältebehandlung in *Arabidopsis* (Leyva *et al.* 1995) nachgewiesen werden. Die Induktion der PAL nach Pathogenattacke war ebenfalls Gegenstand vieler Untersuchungen und wurde auch im Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz intensiv untersucht. Eine Akkumulation des PAL-Transkripts war bereits 0,5 Stunden nach Inokulation mit Echtem Gerstenmehltaupilz und eine Zunahme ihrer Aktivität ab 2 hpi in Gerstenblättern detektierbar. Ein zweiter transienter Anstieg der PAL-Transkriptakkumulation und -Aktivität war 12-15 hpi zu finden (Shiraishi *et al.* 1989; Shiraishi *et al.* 1995). Damit entsprach die Induktion der PAL genau dem Auftreten des primären und appressorialen Keimschlauchs und zeigte einen Expressionsverlauf, wie er bereits für viele andere Gene, wie z.B. Chitinase, β -1-3-Glukanase oder PR4 in Gerste nach *Bgh*-Inokulation gefunden werden konnte (Gregersen *et al.* 1997). Die Aktivität der PAL unterschied sich in den ersten 24 Stunden der Interaktion mit *Bgh* nicht zwischen resistenten (*mlo*; *Mla2*) und suszeptiblen (*Mlo*; *m1a*) Gerstenkultivaren. Daraus ließ sich ableiten, dass die PAL nicht als ausreichend Resistenz-bedingendes Element der Pathogenabwehr angesehen werden kann, sondern vielmehr die im Phenylpropanoid-Stoffwechselweg gebildeten Produkte für die Resistenzausprägung maßgeblich sind (Clark *et al.* 1994; Shiraishi *et al.* 1995). Diese Aussage wurde durch Ergebnisse von Carver und Mitarbeitern bzw. Stadnik und Buchenauer untermauert, die zeigen konnten, dass die Inhibition der Synthese phenolischer Substanzen in Phenylpropanoid-Stoffwechselweg einen negativen Einfluss auf die Altersresistenz in Hafer und die chemisch induzierte Resistenz in Weizen hatte (Carver *et al.* 1996; Stadnik und Buchenauer 2000).

4.4.8 Cu²⁺-bindendes Protein

Das im RGA-Kandidatengenansatz isolierte 505 bp lange cDNA-Fragment eines Kupferbindenden Proteins, Poly 85, zeigte eine 72 %ige Identität auf Aminosäureebene mit einem *blue copper-binding protein* (BCB) aus Weizen. Über iPCR konnte der ORF dieses Gens, der für ein 189 Aminosäuren langes Protein kodierte, komplettiert werden. Die computergestützte Motivsuche innerhalb des POLY 85 ergab, dass das Protein eine zentrale 81 Aminosäuren umfassende Kupferbindedomäne aufweist. Ausserdem handelt es sich beim POLY 85 um ein

TypI-Membranprotein, dessen Kupferbindedomäne extracytoplasmatisch liegt (Emanuelsson *et al.* 2000). Ein Homolog des POLY 85 aus *Arabidopsis* zeigte verstärkte Expression bei Seneszenz (Himmelblau und Amasino 2000), nach Aluminiumgabe (Richards *et al.* 1998), Ozonbehandlung und Dunkelheit (van Gysel *et al.* 1993), bei Dehydratation, Salzstress und Kältebehandlung (Yang *et al.* 2002), also nach verschiedenen Behandlungen, die zu oxidativem Stress in der Pflanze führen können. Dieses BCB aus *Arabidopsis* kann daher als generelles Stressprotein betrachtet werden, dessen Expression mit dem Auftreten von oxidativem Stress korrelierte. Eine Funktion bei der Bekämpfung von oxidativem Stress kann auch für POLY 85 postuliert werden. Kupferionen fungieren nicht nur als Cofaktoren zahlreicher Enzyme, sondern sind auch exzellente Katalysatoren für Redoxreaktionen, da sie in drei verschiedenen Oxidationsstufen stabil sind (Malmstrom und Leckner 1998; Himmelblau und Amasino 2000). Sie kommen hauptsächlich im Apoplasten vor, in dem sich u.a. auch molekularer Sauerstoff, Ascorbat und Wasserstoffperoxid befinden (Fry 1998). In diesem Milieu können die von Eisen- oder Kupferionen katalysierte Fenton- und Haber-Weiß-Reaktion (s. Abb. 4.1) ablaufen (Schopfer *et al.* 2002; Schützendübel und Polle 2002). Eines der Endprodukte beider Reaktionen ist das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), dass als äußerst reaktiv und zytotoxisch gilt.

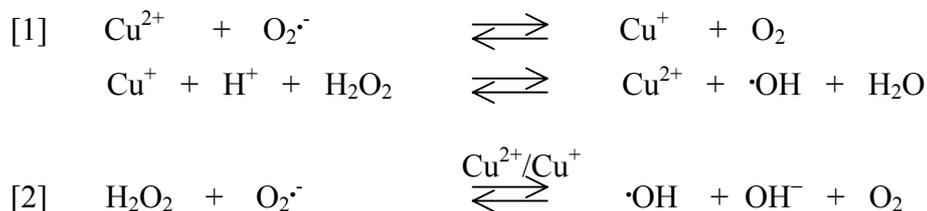


Abb. 4.1: Chemie der Fenton-Reaktion [1] und der Haber-Weiß-Reaktion [2].

In der Fenton-Reaktion werden in einem ersten Schritt Kupfer(II)-Ionen durch Superoxidanionradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) unter Bildung von elementarem Sauerstoff zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Diese einwertigen Kupferionen können anschließend mit Wasserstoffperoxid und einem Protonendonator unter der Bildung von Wasser und Hydroxylradikalen zu Kupfer(II)-Ionen rückoxidieren. In der Haber-Weiß-Reaktion werden aus Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen unter Katalyse von Kupferionen Hydroxylradikale, Hydroxylionen und elementarer Sauerstoff gebildet.

Die Bindung von Cu^{2+} -Ionen durch POLY 85 im Apoplasten könnte dazu führen, dass die Kupferionen-katalysierte Bildung von Hydroxylradikalen ausbleibt und damit der oxidative Stress für die Zellen verringert wird. Außerdem wird postuliert, dass Hydroxylradikale durch die Degradation von Polysacchariden in der Zellwand deren Lockerung bedingen. Dieser Effekt wäre besonders beim Penetrationsversuch eines Pathogens für die Pflanze äußerst

negativ, so dass die Vermeidung der Hydroxylradikal-Bildung auch ein Mittel wäre, die Integrität der Zellwand aufrecht zu erhalten, und so das Eindringen eines Pathogens zu verhindern (Fry 1998; Schopfer *et al.* 2002). Die Inhibition der Fenton-Reaktion durch die Bindung von Kupferionen an BCB hat außerdem zur Folge, dass Superoxidanionen nicht zu elementarem Sauerstoff oxidiert werden und auf andere Weise, z.B. durch Superoxid-dismutasen zu Wasserstoffperoxid, umgesetzt werden können. Dieses kann im Apoplasten direkt zur oxidativen Vernetzung von Zellwandbestandteilen verwendet werden (Brisson *et al.* 1994; Bolwell *et al.* 2002) oder zur Auslösung der HR führen (Greenberg 1997).

Damit käme POLY 85 durch die Bindung von Kupferionen eine wichtige Funktion in der Resistenzausprägung in Gerste nach *Bgh*-Inokulation zu. Dies könnte erklären, warum die transiente Inhibierung der POLY 85-Synthese über RNAi einen schwachen Effekt auf die Penetrationsrate des Gerstenmehltaupilzes hatte (vgl. 4.8). POLY 85 ist demnach wahrscheinlich aktiv am Schutz der Zelle vor oxidativen Schäden beteiligt, und seine Expression scheint mit dem Vorhandensein Reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) zu korrelieren. *Poly 85* zeigte nämlich eine stärkere Expression nach *Bgh*-Inokulation in Gerstelinien, die mit einer Hypersensitiven Reaktion und verstärkter ROI-Bildung auf die Pathogenattacke reagierten, z.B. Sultan-5 und PDe, als in suszeptiblen Linien (vgl. Abb. 3.13, 3.15 und 3.18) (Hückelhoven und Kogel 1998; Hückelhoven *et al.* 1999).

4.5 Charakterisierung des PI074

Beim PI074 handelt es sich um ein 633 bp langes Genfragment, das keinerlei signifikante Homologien zu bereits bekannten Proteinen der Gendatenbank aufwies. Da in ersten *Northern* Analysen eine differentielle Expression des *PI074* zwischen der suszeptiblen Linie Ingrid und der *Mlg*-tragenden Linie IWe nach Inokulation mit *Bgh* zu finden war (s. Abb. 3.4), wurde dieses Gen durch weitere *Northern* Analysen und RT-PCR näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass *PI074* ausschließlich im Mesophyll exprimiert und durch Wasserstoffperoxid schwach induziert wurde (s. Abb. 3.8 und 3.9). Wasserstoffperoxid ist nicht nur zur Lignifizierung notwendig und an der Vernetzung von Zellwandproteinen beteiligt, sondern kann auch die Expression bestimmter Gene induzieren und das Auftreten von HR forcieren (Tenhaken *et al.* 1995; Lamb 1997; Wu *et al.* 1997).

Diese H₂O₂-Respositivität kann eine Erklärung für die differentielle Expression des *PI074* zwischen den untersuchten Linienpaaren sein. Hückelhoven und Mitarbeiter haben in mikroskopischen Untersuchungen die H₂O₂-Generation in Epidermis und Mesophyll nach

Inokulation verschiedener Gerstenlinien mit *Bgh* oder *Bgt* eingehend studiert. Dabei konnten sie feststellen, dass in der *Mlg*-tragenden Linien PDe nach Inokulation mit *Bgh* 30 hpi bei 75 % der Interaktionen H₂O₂ in der gesamten Epidermiszelle gebildet wurde, was mit dem Auftreten von Hypersensitivem Zelltod korrelierte (Hückelhoven *et al.* 1999). Bei Inokulation der Linien Pallas und Ingrid (*mlg*) konnte diese Bildung von H₂O₂ nur bei 17 % bzw. 20 % der Interaktionen gefunden werden (Hückelhoven *et al.* 2000b). Dieser Unterschied in der Wasserstoffperoxid-Bildung zwischen *Mlg*- und *mlg*-tragenden Linien könnte die verschieden starke bzw. lange Expression des *Pl074* in den nahezu isogenen Linienpaaren erklären (s. Abb. 3.6).

Bei der Inokulation der Linie Ingrid mit *Bgt* konnte eine sehr starke Induktion der *Pl074*-Expression gefunden werden (s. Abb. 3.10), die ebenfalls mit dem Auftreten von H₂O₂ erklärt werden kann. Im Gegensatz zur Interaktion mit *Bgh* reagierten hier die Epidermiszellen mit massiver H₂O₂-Akkumulation auf die Attacke des Nicht-Wirt-Pathogens, die besonders unterhalb der Keimschläuche des *Bgt* nachzuweisen war (Hückelhoven *et al.* 2001a). Daher ist es nachvollziehbar, dass *Pl074* bei der Interaktion mit *Bgt* selbst bei geringerer Inokulationsdichte eine stärkere Expression zeigte als nach Inokulation mit dem Wirt-Pathogen.

Eine höhere H₂O₂-Akkumulation könnte auch die unterschiedlichen Expressionsniveaus des *Pl074* zwischen Sultan-5 und M100 bzw. I22 und A89 erklären. Bei Sultan-5 handelt es sich um eine Gerstenlinie, die das Resistenz-Gen *Mla12* trägt und deren Resistenz durch die Ausprägung von Hypersensitivem Zelltod nach Inokulation mit *BghA6* charakterisiert ist. M100 ist eine aus Sultan-5 hervorgegangene Mutationslinie, die eine Mutation des *Rar1*-Gens trägt und dadurch Mehltaupilz-suszeptibel ist. In der anfälligen M100 zeigten zwischen 24 hpi und 48 hpi nie mehr als 5 % der attackierten Epidermiszellen H₂O₂-Akkumulation in der gesamten Zelle, während es bei Sultan-5 über 30 % waren. In Sultan-5 konnte 48 hpi außerdem bei 40 % der Interaktionen das Vorhandensein von Wasserstoffperoxid in Mesophyllzellen unterhalb attackierter Epidermiszellen nachgewiesen werden (Hückelhoven *et al.* 2000a). Diese Wasserstoffperoxid-Bildung im Mesophyll könnte der Grund dafür sein, dass in Sultan-5 die Expression des *Pl074* 48 hpi deutlich höher war als in M100.

Bei der Interaktion der *mlo5*-tragenden Linie I22 und der *ror1-2*-Mutationslinie A89 mit *Bgh* war nur ein geringer Unterschied bezüglich der Bildung von H₂O₂ zwischen diesen beiden Linien zu sehen. In I22, die eine nahezu vollständige Papillenresistenz bei Attacke mit Gerstenmehltaupilz ausprägt, konnte nur in maximal 5 % (24 hpi) der Interaktionen H₂O₂ in der gesamten attackierten Epidermiszelle nachgewiesen werden. Bei A89, der partiell

anfälligen Mutationslinie, war dies in ca. 12 % (36 hpi) der Interaktionen der Fall (Hückelhoven *et al.* 2000b). Dieser geringe Unterschied spiegelte sich auch im Expressionsniveau des *Pl074* in diesen beiden Linien wider. Lediglich 48 hpi konnte eine schwach erhöhte Expression des *Pl074* in A89 im Vergleich zu I22 detektiert werden (s. Abb. 3.7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression des *Pl074* in erster Linie mit der Akkumulation von Wasserstoffperoxid in attackierten Zellen, der Phase III der Wasserstoffperoxid-Bildung, und meist mit dem Auftreten von Hypersensitivem Zelltod korrelierte (Hückelhoven *et al.* 1999; Hückelhoven *et al.* 2000a; Hückelhoven *et al.* 2000b).

Da *Pl074* keinerlei Homologien zu bekannten Proteinen aufwies, lässt sich über seine Funktion in der Gerste/Gerstenmehltaupilz-Interaktion nur wenig sagen. *Pl074* scheint aber nicht direkt an der Resistenzausprägung beteiligt zu sein, da seine Expression auch in anfälligen Linien deutlich durch Inokulation induziert war. Möglicherweise handelt es sich bei *Pl074*, ähnlich wie bei *POLY 85*, ebenfalls um einen Faktor, der die Zellen allgemein vor oxidativem Stress schützt und daher beim Auftreten von ROI, in diesem Fall speziell H_2O_2 , induziert wird.

4.6 Expression der Gene nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Bgt*

Die Expression der 20 bei den Suppressiven Subtraktionshybridisierungen bzw. dem RGA-Kandidatengenansatz als *Bgh*-induziert gefundenen Gene wurde vergleichend nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen Weizenmehltaupilz (*Bgt*) in der Linie Ingrid untersucht. Bis auf *Pl111* (Tyrosinphosphatase), dessen Genaktivität durch die Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen nicht verändert war (s. Abb. 3.2), wurde die Expression aller Gene durch Inokulation mit *Bgt* erhöht. Bei den meisten Genen war die Stärke der Induktion nach Inokulation mit beiden Pathogenen gleich hoch. Nur *Pl074* und *Poly 22* (ERD1-Homolog) zeigten eine höhere Expression nach Inokulation mit *Bgt* als nach Inokulation mit *Bgh* (s. Abb. 3.10 und 3.11). Für *Pl074* sind die Gründe für diesen Unterschied im vorangegangenen Kapitel bereits diskutiert worden.

Die Nicht-Wirt-Resistenz von Gerste gegenüber *Bgt* ist durch eine Vielzahl von Mechanismen gekennzeichnet, die auch nach Inokulation mit dem Wirt-Pathogen zu beobachten sind, wie Zellwandappositionen, Hypersensitive Reaktion, Akkumulation von autofluoreszierendem Material in der attackierten Zelle und PR-Genexpression (Gregersen *et al.* 1990; Peterhänsel *et al.* 1997; Hückelhoven *et al.* 2001a). Zytologisch zeigte sich in verschiedenen Linien,

darunter auch Ingrid, dass die Resistenz gegen *Bgt* in erster Linie durch die Bildung effektiver Papillen (ca. 85 %) charakterisiert war. Als zweiter Mechanismus konnte mit bei ca. 15 % der Interaktionen die Ausprägung einer HR beobachtet werden (Hückelhoven *et al.* 2001a). In anderen Nicht-Wirt-Systemen, wie der Schwarzer Nachtschatten (*Solanum nigrum*, L.)/*Phytophthora infestans*-Interaktion oder der Salat (*Lactuca sativa* L.)/*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*-Interaktion, war Hypersensitiver Zelltod als Hauptabwehrmechanismus zu beobachten (Bestwick *et al.* 1998; Vleeshouwers *et al.* 2000; Kamoun 2001). Die Nicht-Wirt-Resistenz gegen Pilze zeichnet sich aber primär durch Papillenbildung oder die Vernetzung von Zellwandbestandteilen vor Eindringen des Pathogens in die Zelle und weniger durch HR aus (Heath 2000; Rubiales und Carver 2000). Daher kommt es erwartungsgemäß bei der Gerste-*Bgt*-Interaktion zur Akkumulation von Wasserstoffperoxid, das für die Vernetzung von Zellwandbestandteilen benötigt wird, ähnlich wie in der *mlo*-vermittelten rassenunspezifischen Resistenz der Gerste gegen *Bgh* (Hückelhoven *et al.* 1999; Hückelhoven *et al.* 2000b). Es bestehen somit zytologisch viele Parallelen zwischen der Resistenzgen-vermittelten und der Nicht-Wirt-Resistenz in Gerste. Außerdem wird postuliert, dass die Nicht-Wirt-Resistenz einer Pflanzenspezies gegenüber einem nahen Verwandten eines Wirt-Pathogens, wie es bei der Resistenz der Gerste gegenüber *Bgt* der Fall ist, Resistenzgen-vermittelt ist (Tosa 1992; Heath 2001). Daher ist anzunehmen, dass auch auf molekularer Ebene bei der Nicht-Wirt-Resistenz der Gerste gegenüber *Bgt* zum Teil gleiche Prozesse wie bei der Wirt-Resistenz bzw. der allgemeinen Pathogenabwehr ablaufen. Einen ersten Hinweis auf die Verknüpfung zwischen der Nicht-Wirt- und der Wirt-Resistenz gaben Arbeiten von Peart und Mitarbeitern, die durch den transienten *knock-out* von *sgt1* in Tabak sowohl die Resistenz gegenüber dem Pathogen *Phytophthora infestans* als auch einigen Nicht-Pathogenen, wie *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, negativ beeinflussen konnten (Peart *et al.* 2002). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine enge Verknüpfung zwischen der Nicht-Wirt- und der Wirt-Resistenz in Gerste hin, da die Expression fast aller untersuchten Gene durch die Inokulation mit beiden Pathogenen gleichermaßen erhöht war. Die konstitutive Expression des Tyrosinphosphatasegens (*Pl111*, s. Abb. 3.2) bei Inokulation der Linie Ingrid mit *Bgt* könnte darauf hinweisen, dass es sich bei dieser Phosphatase um einen Suszeptibilitätsfaktor handelt, der nur von der passenden f.sp. des Mehltreiberpilzes induziert wird.

Über die Gründe der erhöhten Expression des ERD1-Homologs (POLY 22) nach Inokulation mit *Bgt* im Vergleich zur Expression nach Inokulation mit *Bgh*, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Wie bereits beschrieben (s. 4.4.6) handelt es sich beim POLY 22 um die

regulatorische Untereinheit einer chloroplastidären Protease, eine eigenständige Protease oder um ein im Stroma befindliches Chaperon. Damit könnte POLY 22 an der Beseitigung abnormer Proteine oder auch am Abbau regulatorischer Proteine, die einen Einfluss auf Genexpressionsvorgänge ausüben, beteiligt sein. Die massive Bildung von H₂O₂ und anderer radikaler Sauerstoffintermediate bei Attacke des Nicht-Wirt-Pathogens (Hückelhoven *et al.* 2001a) könnte zu der bereits erwähnten (s. 4.4.4) Bildung von Superoxidanionradikalen und anderer ROI im Chloroplasten und damit zur vermehrten Schädigung von Proteinen führen. Die Degradation dieser abnormen Proteine durch Proteasen wäre notwendig, um die Integrität der Zelle und damit ihr Überleben nicht zu gefährden. Dies könnte die verstärkte Expression des *Poly 22* nach *Bgt*-Attacke in Gerste erklären.

4.7 Expression der Gene nach chemischer Induktion mit BTH

Chemisch induzierte Resistenz (cIR) wurde in Getreide (Weizen, Gerste, Reis und Mais) gegen *Blumeria graminis* (Dehne *et al.* 1984; Kogel *et al.* 1994; Görlach *et al.* 1996), *Magnaporthe grisea* (Schweizer *et al.* 1997) und *Peronosclerospora sorghi* beschrieben (Morris *et al.* 1998). Dabei wurden verschiedene chemische Substanzen verwendet, von denen sich BTH (Benzothiadiazol) und DCINA (Dichlorisonikotinsäure), die als SA-Analoga angesehen werden, als die effektivsten Induktoren erwiesen haben. Zytologische Analysen der cIR in Gerste nach Inokulation mit *Bgh* ergaben, dass eine erhöhte Resistenz der Pflanzen durch die vermehrte Bildung effektiver Papillen, gefolgt von Hypersensitivem Zelltod (HR) der attackierten Zelle, erklärt werden konnte. Da bei der *Mlg*-vermittelten Resistenz der Gerste gegen *Bgh* die gleichen zytologischen Abwehrmechanismen beobachtet werden konnten, wird die cIR als Phänokopie der *Mlg*-vermittelten Resistenz bezeichnet (Kogel *et al.* 1994). Auch bei histochemischen Analysen zeigten sich beim Auftreten lokaler Wasserstoffperoxid- und Superoxidanionradikal-Akkumulationen Parallelen zwischen diesen beiden Resistenzformen (Hückelhoven *et al.* 1999; Kogel und Hückelhoven 1999). Daher war ein Ziel dieser Arbeit festzustellen, ob Übereinstimmungen zwischen cIR und der *Mlg*-vermittelten Resistenz auch auf molekularer Ebene zu finden sind.

In einer früheren Arbeit wurde die Expression von neun in Gerste als chemisch induziert gefundenen Gene (*BCII-9*), nach Inokulation mit *Bgh* untersucht (Beßer, 2001). Keines der *BCI*-Gene war pathogenresponsiv, was gegen einen gemeinsamen Signalweg in der cIR und der *Mlg*-vermittelten Resistenz oder allgemeiner Abwehr sprach (Beßer *et al.* 2000; Beßer 2001). Auch in Weizen und Reis konnte eine weitgehende Trennung zwischen bIR und cIR

bzw. cIR und allgemeiner Pathogenabwehr auf Transkriptionsebene gefunden werden (Görlach *et al.* 1996; Schaffrath *et al.* 1997; Schweizer *et al.* 1999b; Schaffrath *et al.* 2000). Dennoch ist es gelungen, einige Gene zu isolieren, deren Expression sowohl durch chemische Resistenzinduktoren als auch durch Inokulation mit Pathogenen erhöht wurde. So fand man in *Arabidopsis* NPR1 als elementare Komponente verschiedener Abwehrwege nach Behandlung mit INA, SA und *Peronospora parasitica* induziert (Ryals *et al.* 1997; Cao *et al.* 1998). Bei anderen Genen aus Tabak oder Weizen, die sowohl biologisch als auch chemisch induzierbar waren, handelte es sich meist um PR-Gene, also um Faktoren der unspezifischen Pathogenabwehr (Ward *et al.* 1991; Kessmann *et al.* 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Responsivität der 20 durch *Bgh* induzierten Gene gegenüber BTH untersucht. Dazu wurde BTH als Formulierung von 50 % aktiver Substanz mit WP in Wasser in einer Konzentration von 125 ppm auf 6 Tage alte Keimlinge der Linie Ingrid gesprüht. Die Induktion der 20 Gene wurde bei 12 und 24 hpt überprüft, wobei drei Kandidaten, *Pl121* (WIR1B-Homolog), *Poly 4-1* (Rezeptorkinase) und *Poly 22* (ERD1-Homolog), eine verstärkte Expression 24 hpt nach Induktion mit BTH zeigten (s. Abb. 3.5 und 3.14). Interessanterweise war ein zweites *WIR1*-Homolog, *Pl010* (*WIR1a*-Homolog), und die *WIR*-Gene aus Weizen nicht nach chemischer Induktion verstärkt exprimiert (Schaffrath *et al.*, 1997). Wie bereits erwähnt (s. 4.4.1) handelt es sich bei *WIR1* und vermutlich auch bei seinem Gerstenhomologen wahrscheinlich um ein membranständiges Protein, das im Falle eines Penetrationsversuchs durch ein Pathogen die Adhäsion zwischen Plasmamembran und Zellwand erhöht. Die Induktion des *WIR1b*-Homologs durch BTH könnte demnach dazu beitragen, dass die Zellen im Falle einer Pathogenattacke eine Penetrationsbarriere schneller und effektiver aufbauen können als vor der chemischen Aktivierung.

Die erhöhte Expression des Rezeptorkinasegens (*Poly 4-1*) durch BTH-Applikation führt wahrscheinlich in erster Linie dazu, dass die Zahl der POLY 4-1-Proteine in der Plasmamembran zunimmt und dadurch die Bindung eines Liganden, wie etwa eines Elicitors, schneller bzw. verstärkt ablaufen kann. Dadurch könnte es im Folgenden zur Beschleunigung und Verstärkung von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen und der Induktion bestimmter Abwehrgene kommen.

Über den Grund für die verstärkte Expression des ERD1-Homologs, POLY 22, nach chemischer Induktion kann auf Grund der fehlenden Funktionsdaten nur spekuliert werden. Möglicherweise führt die BTH-Behandlung in Gerste zur Induktion dieses allgemein Stress-responsiven Gens, um den Schutz der Pflanze vor oxidativen Stress zu verstärken.

4.8 Funktionsanalyse ausgewählter Gene mittels Transienter Transformation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von drei der als Pathogen-induzierten Gene, *Poly 4-1* (Rezeptorkinase), *Poly 103* (NBS-LRR) und *Poly 85* (Kupfer-Bindeprotein), in der Interaktion von Gerste mit Echem Gerstenmehltaupilz untersucht. Dabei wurde das transiente Transformationssystem von Schweizer *et al.* (1999) verwendet, das auf Grundlage erster transienter Expressionssysteme in Gerste (Nelson und Bushnell 1997; Nielsen *et al.* 1999; Shirasu *et al.* 1999b) entwickelt wurde (Schweizer *et al.* 1999a). Bei dieser Methode werden Gold- oder Wolfram-Partikel mit einem Plasmid, das ein Reportergen, z.B. das des GFP (*green fluorescent protein*) oder der GUS (β -Glucuronidase) enthält, und einem Plasmid mit dem ORF des Testgens bzw. doppelsträngiger RNA (dsRNA) des Testgens beschichtet. Danach erfolgt das Einschließen der Partikel mittels einer *particle inflow gun* (PIG) in die Epidermiszellen der Testpflanzen (Schweizer *et al.* 1999a; Schweizer *et al.* 2000). Der Effekt des Testgens kann dann z.B. bei einer Pathogenattacke entweder durch dessen Überexpression oder durch transienten *knock-out* auf Grund der dsRNA analysiert werden. Dabei können die transformierten Zellen leicht über die Expression des Reportergens identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, da zum Zeitpunkt der Durchführung der funktionellen Analysen keine *full-length* Klone der zu untersuchenden Gene vorlagen, *knock-out* Experimente mit dsRNA der entsprechenden Gene durchgeführt. dsRNA führt in tierischen, pilzlichen und pflanzlichen Zellen zu einem sequenzspezifischen PTGS (*post transcriptional gene silencing*) durch RNA Interferenz (RNAi), wobei es durch gezielte Degradation der mRNA, nicht zur Translation des zur dsRNA korrespondierenden Gens kommt (Fire *et al.* 1998; Chuang und Meyerowitz 2000). Dieser Mechanismus, der bereits bei der RmVR (*RNA mediated Virus Resistance*) und dem Ausschalten von Transposons in Pflanzen und Tieren beschrieben wurde, ist bis heute noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt (Matzke und Matzke 1998; Ketting *et al.* 1999; Balmori-Melian *et al.* 2002). Es wird postuliert, dass das Auftreten anormaler RNA (abRNA), die entweder von einem Virus stammt oder von der Pflanze selbst gebildet wird, zur Aktivierung einer RdRP (*RNA dependent RNA Polymerase*) führt (Matzke und Matzke 1998; Wassenegger und Pelissier 1998). Dieses Enzym synthetisiert den zur abRNA korrespondierenden *anti-sense* Strang, der dann mit der abRNA zum Doppelstrang hybridisiert. Diese dsRNA lagert sich mit Hilfe eines hypothetischen RNAi-Cofaktors an die korrespondierenden mRNAs des Virus oder der Pflanze an, die daraufhin von RNasen degradiert werden (Montgomery *et al.* 1998; Ding 2000). Bei PGTS

handelt es sich also um einen natürlichen Prozess, der möglicherweise auch zur Kontrolle der Translation pflanzeigener Gene zum Einsatz kommt (Matzke und Matzke 1998). Durch die hohe Sequenzspezifität der RNA Interferenz ist es möglich, die Translation eines Mitglieds einer Genfamilie gezielt zu inhibieren, und so die Funktion eines einzelnen Gens zu untersuchen (Chuang und Meyerowitz 2000; Schweizer *et al.* 2000).

Beim Beschuss von Gerstenblättern der Linie Pallas mit dsRNA des *Poly 4-1* (Rezeptorkinase) konnte keine signifikante Änderung der Penetrationsrate des Echten Gerstenmehltaupilzes festgestellt werden. Diese lag bei vier unabhängigen Experimenten um durchschnittlich 6,5 % unter der Penetrationsrate in den Kontrollblättern, die mit dsRNA eines menschlichen Thyroidhormon-Rezeptors und dem Reporter-genplasmid *pGFP* beschossen worden waren (vgl. 3.7.2).

Auch die transiente Transformation von Blättern der Linie Pallas mit dsRNA des *Poly 103* (NBS-LRR) hatte keine Auswirkung auf den Penetrationserfolg des Mehltaupilzes. Die Penetrationsrate wurde durch den Beschuss mit dsRNA von *Poly 103* durchschnittlich um 3 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt (vgl. 3.9.3).

Damit konnte für beide Gene keine Funktion in der Gerste/*Bgh*-Interaktion nachgewiesen werden. Ein Grund für die erfolglose Funktionsanalyse könnte sowohl beim *Poly 4-1* als auch beim *Poly 103* der sein, dass durch RNAi nur die Neusynthese der Proteine unterdrückt wurde. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei RNAi um einen Prozess, der zwischen Transkription und Translation stattfindet, bereits vorhandene Proteine bleiben unbeeinflusst. Da nach dem Beschuss der Blätter mit dsRNA der Gene lediglich 4 Stunden bis zur Inokulation mit *Bgh* gewartet wurde (s. 2.13.4), ist es denkbar, dass zum Zeitpunkt der Pathogenattacke noch ausreichend POLY 4-1- und POLY 103-Proteine in der Membran bzw. dem Cytoplasma vorhanden waren, um die Penetrationseffizienz des *Bgh* auf dem Niveau der Kontrolle zu halten. Es ist auch denkbar, dass beiden Genen bei der Abwehr des *Bgh* keine entscheidende Rolle zukommt und daher ihr transients *knock-out* ohne Folgen blieb. Diese Alternative erscheint aber gerade in Bezug auf *Poly 4-1* unwahrscheinlich, da seine Expression auch bei chemischer Induktion durch BTH induziert war, was auf eine bedeutende Funktion dieses Gens bei der Pathogenresistenz hindeutet.

Die dsRNA des *Poly 85* (Kupfer-Bindeprotein), dessen Funktion ebenfalls über RNA Interferenz untersucht wurde, zeigte einen schwachen Effekt auf die Penetrationsrate des *Bgh*, die in zwei unabhängigen Versuchen um relativ 22,5 % gesenkt werden konnte.

Wie in 4.4.8 bereits beschrieben, kann die Bindung von Kupferionen im Apoplasten durch *Poly 85* die Fenton-Reaktion, die zur Bildung von Hydroxylradikalen führt, verhindern. Die

transiente Inhibierung der Poly 85 Bildung würde diese Reaktion zulassen, so dass es durch $\cdot\text{OH}$ zu dem bereits erwähnten Abbau von Zellwand-Polysacchariden und in Folge dessen zur erleichterten Penetration der Zellwand durch *Bgh* bzw. zu oxidativem Stress kommen kann. Zum anderen können die freien Kupferionen selbst toxisch wirken, indem sie beispielsweise die Sekundärstruktur von Proteinen durch Oxidation zerstören (Himmelblau und Amasino 2000). All dies könnte erklären, warum der transiente *knock-out* des *Poly 85* den Penetrationserfolg des *Bgh* erhöhen konnte.

4.9 Abschließende Betrachtungen

Die 20 Gene, die im Rahmen dieser Arbeit als Mehлтаupilz-induziert identifiziert werden konnten, können ihrer Homologie nach in drei große Gruppen eingeteilt werden (s. Abb. 4.2). Neben *PI016*, *PI075*, *Poly 39* und *Poly 48*, die keine Homologie aufwiesen und deren Funktion über Expressionsanalysen nicht näher geklärt wurde, können Gene, die in Signaltransduktionsprozesse involviert sind, von solchen unterschieden werden, die eine regulatorische Funktion in verschiedenen Stresssituationen besitzen, oder Genen, die die allgemeine Abwehr der Pflanze verstärken.

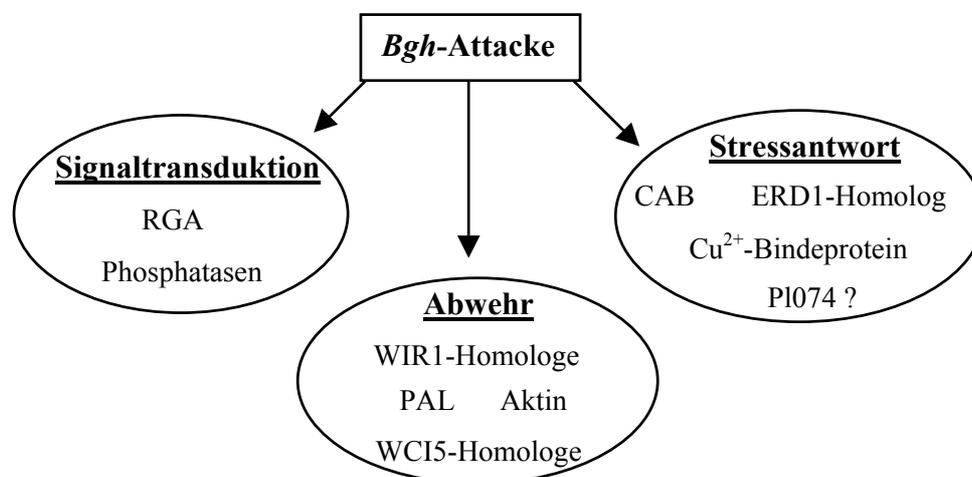


Abb. 4.2: Funktionelle Einteilung der Pathogen-induzierten Gene.

Nach Inokulation mit *Bgh* werden Gene verschiedener funktioneller Gruppen in Gerste verstärkt exprimiert. Dazu gehören Komponenten der Signaltransduktion, Gene mit regulatorischer Funktion bei verschiedenen Stresssituationen und Gene, die die allgemeine Abwehr verstärken.

CAB: Chlorophyll a/b-Bindeprotein; PAL: Phenylalanin Ammonium-Lyase; RGA: Resistenzgenanaloga.

Zu den Proteinen der Signaltransduktion können solche mit Resistenzgenmotiven, wie LRR oder Kinasedomäne (PL073, POLY 4-1, POLY 53, POLY 103), und Phosphatasen (PL111,

PL113) gezählt werden. Bei den RGA konnten verschiedene Domänen (LRR, PAN, NB-ARC) identifiziert werden, die auf eine Interaktion mit anderen Proteinen, z.B. Elicitoren, schließen lassen. Bei POLY 4-1 und POLY 53 wurden Kinasedomänen gefunden, die eine direkte Funktion bei der Signalweiterleitung besitzen können. Bei Signaltransduktionsprozessen spielen auch Phosphatasen eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, eine Tyrosinphosphatase der Gerste zu isolieren, die möglicherweise an der Deaktivierung von MAP Kinasen beteiligt ist.

Durch Inokulation mit *Bgh* wurden aber auch Gene mit regulatorischer Funktion verstärkt exprimiert. CAB (PL006) und wahrscheinlich auch das Cu^{2+} -Bindeprotein (POLY 85) sind an der Regulation von Redoxreaktionen und der Bildung von ROI beteiligt. Die Aktivität des Kupferbindeproteins könnte indirekt die Bildung von $\cdot\text{OH}$ verringern und so die Integrität der Zelle sichern. Eine Schutzfunktion vor oxidativem Stress kann auch für PL074 (ohne signifikante Homologien) postuliert werden, dessen Expression stark mit dem Auftreten von H_2O_2 bei der Gerste-Mehltaupilz-Interaktion korrelierte. Ebenso könnte das ERD1-Homolog durch seine Proteasefunktion die durch ROI geschädigte Proteine degradieren und so die Zellen vor Schäden schützen.

In der Gruppe der Abwehrgene tragen die *WIR1*-Homologe (*Pl010*, *Pl121*) und *Aktin* (*Poly 4-2*) vermutlich zur Erhöhung der Penetrationsresistenz bei. Dies könnte im Falle der *WIR1*-Homologe durch die Verstärkung der Zellwand-Plasmamembran-Adhäsion und bei *Aktin* durch die Stärkung des Zytoskeletts geschehen. Die erhöhte Aktivität der *PAL* (POLY 23) verstärkt den Phenylpropanoid-Stoffwechselweg und dadurch die Bildung von Phytoalexinen, Lignin und antimikrobieller Stoffen. Auch für die *WCI5*-Homologe (*Pl089*, *Poly 28*), die zur Gruppe der PR17-Gene gezählt werden können, kann eine abwehrverstärkende Wirkung postuliert werden.

5 Zusammenfassung

Zytologische und histochemische Arbeiten haben die Ausprägung gleicher Abwehrmechanismen bei der *Mlg*-vermittelten Resistenz und der chemisch induzierten Resistenz (cIR) in Gerste gegen den Echten Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) gezeigt. Das führte zu der Annahme, dass beide Resistenzformen auf einer gemeinsamen molekularen Grundlage beruhen. Daher wurde die Methode der Suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) angewendet, um Abwehrgene, die evtl. spezifisch in der *Mlg*-vermittelten Resistenz aktiviert werden, aufzufinden. In einem parallel zu den SSH durchgeführten RGA (Resistenzgenanaloga)-Kandidatengenansatz sollten daneben weitere an der *Mlg*-Resistenz beteiligten Gene isoliert werden. Insgesamt konnten 20 Gene identifiziert werden, die - bis auf eine Ausnahme - bereits 4 hpi (*hours post inoculation*) in kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen der Gerste mit *Bgh* induziert wurden. Keines dieser Gene wies dabei *Mlg*-Spezifität auf. Unter den *Bgh*-responsiven Genen befanden sich zahlreiche bislang nicht beschriebene, wie das einer Tyrosinphosphatase oder eines Kupfer-Bindeproteins. Außer dem einer Tyrosinphosphatase zeigten alle Gene auch eine Aktivierung durch das Nicht-Wirt-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*), wobei die Expression von zwei Genen, *Pl074* (ohne Homologien) und dem eines ERD1-Homologs (chloroplastidäre Protease), nach Inokulation mit *Bgt* sogar stärker war als nach Inokulation mit *Bgh*.

Bei der Untersuchung der Expressionsmuster nach chemischer Resistenzinduktion durch BTH (Benzothiadiazol) zeigte sich eine Zunahme der Transkriptmenge von 3 der 20 Gene, wodurch eine Verknüpfung zwischen quantitativer Resistenz und cIR gezeigt werden konnte. Dabei handelte es sich um ein WIR1-Homolog, eine Rezeptor-ähnliche Proteinkinase und ein ERD1-Homolog.

Die Expression von 2 Genen (*Pl074* und Cu²⁺-Bindeprotein) war insbesondere in resistenten Genotypen induziert, die mit der Bildung von Reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) auf die Inokulation mit *Bgh* reagieren. Das deutet eine Funktion der entsprechenden Proteine im Redoxstoffwechsel an.

Für das Cu²⁺-Bindeprotein konnte bei Funktionsanalysen mittels transienter RNA Interferenz (RNAi) eine Funktion in der Gerste/*Bgh*-Interaktion gezeigt werden, da die Penetrationseffizienz des Gerstenmehltaupilzes durch das *silencing* des Gens deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht war. Damit ist das Kupfer-Bindeprotein ein Kandidat, dessen Überexpression möglicherweise die Resistenz der Gerste gegen *Bgh* verstärken könnte.

6 Summary

Cytological and histochemical investigations revealed the formation of apparently identical defense mechanisms in *Mlg*-mediated resistance and chemically Induced Resistance in barley against the barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*). This led to the assumption that both resistance types share common molecular elements. For this reason, suppression subtractive hybridisation (SSH) was carried out to find defense related genes that are probably specifically activated in the *Mlg*-mediated resistance. In a RGA (resistance gene analogue) candidate gene approach further genes that are involved in the *Mlg*-resistance should have been isolated. Overall 20 *Bgh*-induced genes were identified - none showing a *Mlg*-specificity. Several of the *Bgh*-responsive genes have not been described yet, for instance one coding for a tyrosinephosphatase or one for a copper-binding protein. With one exception, all genes were already induced 4 hpi (hours post inoculation) in compatible and incompatible interactions between barley and *Bgh*. Besides a Tyrosinephosphatase, all genes showed an activation by the nonhost pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*). Thereby the expression of two genes, *PI074* (no homologies) and one for an ERD1-homologue (chloroplastic protease), was even stronger induced after inoculation with *Bgt* than after inoculation with *Bgh*.

The investigation of the expression patterns after chemical induction with BTH (benzothiadiazole) revealed transcript accumulation of three genes, a WIR1 homologue, a receptor like protein kinase and the ERD1 homologue.

The expression of two genes (*PI074* and Cu²⁺-binding protein) were specifically induced in resistant genotypes that respond with the formation of reactive oxygen intermediates (ROI) to the inoculation with *Bgh*. This indicates a function of the respective proteins in the redox system.

Functional analysis by RNA interference showed a role of the Cu²⁺-binding protein in the interaction of barley and powdery mildew, because the penetration efficiency of the fungus was clearly increased by silencing of the gene in comparison to the control. So the copper-binding protein is a candidate which when overexpressed might enhance the resistance of barley against *Bgh*.

7 Literatur

- Aarts, M.G.M., Lintel Hekkert, B.T., Holub, E.B., Beynon, J.L., Stiekema, W.J. und Pereira, A. (1998). Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 251-258.
- Adam, Z. (2000). Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression? *Biochimie* 82: 647-654.
- Agrios, G.N. (1997). *Plant Pathology*. 4th edition Academic Press, San Diego, USA.
- Aist, J.R. und Bushnell, W.R. (1991). Invasion of plant hosts by powdery mildew fungi and cellular mechanism of resistance. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. G. T. Cole and H. C. Hoch. New York, Plenum Press: 321-345.
- Altschul, F.S., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. und Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295: 2073-6.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. und Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-33.
- Baker, S.J., Newton, A.C. und Gurr, S.J. (2000). Cellular characteristics of temporary partial breakdown of *mlo*-resistance in barley to powdery mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 1-11.
- Balmori-Melian, E., MacDiarmid, R.M., Beck, D.L., Gardner, R.C. und Forster, R.L.S. (2002). Sequence-, tissue-, and delivery-specific targeting of RNA during post-transcriptional gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 753-763.
- Bate, N.J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P.W., Dixon, R.A., Lamb, C.J. und 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. USA* 91: 7608-7612.
- Bent, A.F. (1996). Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* 8: 1757-1771.
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G. und Kogel, K.H. (2000). Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol. Plant Pathol.* 1: 277-286.
- Beßer, K. (2001). Chemisch induzierte Resistenz im Pathosystem Gerste-Echter Gerstenmehltau: Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene der Gerste. Dissertation JLU Gießen.

- Bestwick, C.S., Brown, I.R. und Mansfield, J.W. (1998). Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 118: 1067-1078.
- Beyer, K., Binder, A., Boller, T. und Collinge, M. (2001). Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.* 2: 125-134.
- Birch, P.R.J., Avrova, A.O., Duncan, J.M., Lyon, G.D. und Toth, R.L. (1999). Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 356-361.
- Birch, P.R.J. und Kamoun, S. (2000). Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. *Trends Plant Sci.* 5: 77-82.
- Blumwald, E. (1998). Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 3: 342-346.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C. und Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53: 1367-1376.
- Booker, F.L. und Miller, J.E. (1998). Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves showing exposure to ozone. *J. Exp. Bot.* 49: 1191-1202.
- Botella, M.A., Coleman, M.J., Hughes, D.E., Nishimura, M.T., Jones, J.D.G. und Sommerville, S.C. (1997). Map positions of 47 *Arabidopsis* sequences with sequence similarity of disease resistance genes. *Plant J.* 12: 1197-1211.
- Boyd, L.A., Smith, P.H., Green, R.M. und Brown, J.K.M. (1994). 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., Foster, E.M. und Brown, J.K.M. (1995). The effects of allelic variation at the *Mla* resistance locus in barley on the early development of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and host responses. *Plant J.* 7: 959-968.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R. und Lamb, C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703-1712.
- Brueggeman, R., Druka, A., Kudrna, D. und Kleinhofs, A. (2001). Efficient cloning of resistance gene analogs from barley. *Barley genetics newsletter* (Online) 31.
- Brueggeman, R., Rostoks, N., Kudrna, D., Kilian, A., Han, F., Chen, J., Druka, A., Steffenson, B. und Kleinhofs, A. (2002). The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9328-33.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. und Jones, R.L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 3. Aufl., Rockville, USA.
- Bull, J., Mauch, F., Hertig, C., Rebmann, G. und Dudler, R. (1992). Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 516-519.

- Büschges, 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. und Schulze-Lefert, P. (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clakre, J.D., Volko, S. und 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. und 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: 6531-6536.
- Carvalho, B., Seruca, R., Buys, C.H.C.M. und Kok, K. (2002). Novel expressed sequences obtained by means of a suppression subtractive hybridisation analysis from the 6q21 region that is frequently deleted in gastric cancer. *European Journal of Cancer* 38: 1126-1132.
- Carver, T.L.W., Ingerson-Morris, S.M., Thomas, B.J. und Zeyen, R.J. (1995). Early interactions during powdery mildew infection. *Can. J. Bot.* 73: 632-639.
- Carver, T.L.W., Zhang, L., Zeyen, R.J. und Robbins, M.P. (1996). Phenolic biosynthesis inhibitors suppress adult plant resistance to *Erysiphe graminis* in oat at 20°C and 10°C. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 121-141.
- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B. und Thordal-Christensen, H. (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis related proteins. *Mol. Plant Pathol.* 3: 135-144.
- Chuang, C.F. und Meyerowitz, E.M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4985-90.
- Clark, T.A., Zeyen, R.J., Smith, A.G., Bushnell, W.R., Szabo, L.J. und 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. und 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. und 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.
- Collinge, D.B., Gregerson, P.L. und Thordal-Christensen, H. (2001). The nature and role of defence response genes in cereals. The powdery mildew: A comprehensive treatise. R. R. Belanger and W. R. Bushnell. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7: 210-216.

- Creelman, R.A. und Mullet, J.E. (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new beta-tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant. Mol. Biol.* 17: 591-608.
- Dantan-Gonzalez, E., Rosenstein, Y., Quinto, C. und Sanchez, F. (2001). Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1267-1273.
- Davidson, A.D., Manners, J.M., Simpson, R.S. und 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 Wit, P.J.G.M. (1992). Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10: 391-418.
- Dehne, H.-W., Stenzel, K. und Schönbeck, F. (1984). The efficiency of induced resistance under practical culture conditions III. Reproduction of powdery mildew on induced resistance plants. *J. Plant Dis Plant Prot.* 91: 258-265.
- Denu, J.M. und Dixon, J.E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 633-641.
- Desai, S., Hill, J., Trelogan, S., Diatchenko, L. und Siebert, P.D. (unveröffentlicht). Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization (SSH).
- Despres, C., Subramaniam, R., Matton, D.P. und Brisson, N. (1995). The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* 7: 589-598.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G. und Schulze-Lefert, P. (1999). Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the *Mlo* family in plants. *J. Biol. Chem.* 274: 34993-5004.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. und Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.-F.C. und Siebert, P.D. (1999). Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods in Enzymology* 303: 349-380.
- Ding, S.W. (2000). RNA silencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 152-156.
- Dixon, R.A. und Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Donald, T.M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A.F., Bouquet, A., Thomas, M.R. und Dry, I.B. (2002). Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 104: 610-618.

- Eckey, C. (in Vorbereitung). Isolierung und Charakterisierung pathogen induzierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für den *Mlg*-Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP. Dissertation JLU Gießen.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E. und Roitsch, T. (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825-1841.
- Ellingboe, A.H. (1972). Genetics and physiology of primary infection by *Erysiphe graminis*. *Phytopathology* 62: 401-406.
- Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Luck, J.E. und Dodds, P.N. (1999). Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell* 11: 495-506.
- Ellis, J. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 278-284.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M. und Boller, T. (1991). Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8831-4.
- Feuillet, C., Schachermayr, G. und Keller, B. (1997). Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat. *Plant J.: Cell Mol. Biol.* 11: 45-52.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Fluhr, R. (2001). Sentinels of disease. Plant resistance genes. *Plant Physiol.* 127: 1367-1374.
- Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. und Schulze-Lefert, P. (1994). *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 6: 983-994.
- Freialdenhoven, A., Peterhänsel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F. und Schulze-Lefert, P. (1996). Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 8: 5-14.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M.G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T. und Uknes, S. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.: Cell Mol. Biol.* 10: 61-70.
- Fry, S.C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.* 332: 507-515.

- Gentzbittel, K., Mouzeyar, S., Badaoui, S., Mestries, E., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D. und Nicolas, P. (1998). Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. Theor. Appl. Genet. 96: 519-525.
- Gilchrist, D.G. (1998). Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. Annu. Rev. Phytopathol. 36: 393-414.
- Gomez-Garcia, B.I., Campos, F., Hernandez, M. und Covarrubias, A.A. (2000). Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with plasma membrane protein. Plant J. 22: 277-288.
- Görg, R., Hollricher, K. und Schulze-Lefert, P. (1993). Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. Plant J. 3: 857-866.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8: 629-643.
- Gottesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M., Mattick, J.S., Dalrymple, B., Kuramitsu, H., Shiroza, T., Foster, T., Clark, W.P., Ross, B., Squires, C.L. und Maurizi, M.R. (1990). Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3513-3517.
- Graham, T.L. und Graham, M.Y. (1999). Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 13-20.
- Graner, A. und Altschmied, L. (2001). Gerste- ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. GenomXPress 1/01.
- Grant, M. und Mansfield, J. (1999). Early events in host-pathogen interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 312-319.
- Greenberg, J.T. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 525-545.
- Gregersen, P.L., Collinge, D.B. und Smedegaard-Petersen, V. (1990). Early induction of mRNAs accompanies the resistance reaction of barley to the wheat pathogen, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*. Plant Pathol. 36: 471-481.
- Gregersen, P.L., Thordal-Christensen, H., Förster, H. und 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.
- Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A. und Barford, D. (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. Cell 96: 99-110.
- Halterman, D., Zhou, F., Wei, F., Wise, R.P. und 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: 335-348.
- Hammerschmidt, R. (1993). The nature and generation of systemic signals induced by pathogens, arthropod herbivores, and wounds. Advance in Plant Pathology 10, 307-337.

- Hammerschmidt, R. und Dann, E.K. (1999). The role of phytoalexins in plant protection. *Novartis Found Symp.* 223: 175-87.
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-91.
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 575-607.
- Heath, M.C. (1991). The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* 81: 127-130.
- Heath, M.C. (1997). Signalling between pathogenic rust fungi and resistant and susceptible host plants. *Annal. Bot.* 80: 713-720.
- Heath, M.C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 315-319.
- Heath, M.C. (2001). Non-host resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58: 53-54.
- Heitefuss, R. (2001). Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften* 88: 273-83.
- Herrler, M. (2000). Use of SMART-generated cDNA for differential gene expression studies. *J. Mol. Med.* 78: B23.
- Himmelblau, E. und Amasino, R.M. (2000). Delivering copper within plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 205-210.
- Hinata, K., Watanabe, M., Yamakawa, S., Satta, Y. und Isogai, A. (1995). Evolutionary aspects of the S-related genes of the *Brassica* self-incompatibility system: synonymous and nonsynonymous base substitutions. *Genetics* 140: 1099-1104.
- Hinderhofer, K. und Zentgraf, U. (2001). Identification of a transcription factor specially expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213: 469-473.
- Hipskind, J.D., Nicholson, R.L. und Goldsbrough, P.B. (1996). Isolation of a cDNA encoding a novel leucine-rich repeat motif from *Sorghum bicolor* inoculated with fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 819-825.
- Hoffmann, G.M. und Schmutterer, H. (1999). Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Stuttgart.
- Horino, O. (1976). Induction of bacterial leaf blight resistance by incompatible strains of *Xanthomonas oryzae* in rice. In: *Biochem. Cytol. Plant Parasite Interact.* Toko eds. Kodanska
- Huang, G., Zhang, L. und Birch, R.G. (2000). Rapid amplification and cloning of Tn5 flanking fragment by inverse PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 149-153.
- Hückelhoven, R. und Kogel, K.-H. (1998). Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 292-300.

- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. und Kogel, K.H. (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1251-1260.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Trujillo, M. und Kogel, K.H. (2000a). Barley *Mla* and *Rar* mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. *Planta* 212: 16-24.
- Hückelhoven, R., Trujillo, M. und Kogel, K.-H. (2000b). Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol. Plant Pathol.* 1: 287-292.
- Hückelhoven, R., Dechert, C. und Kogel, K.-H. (2001a). Non-host resistance of barley is associated with hydrogen peroxide burst at sites of attempted penetration by wheat powdery mildew fungus. *Mol. Plant Pathol.* 2: 199-205.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Trujillo, M. und Kogel, K.H. (2001b). 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: 739-748.
- Hutcheson, S.W. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 59-90.
- Janke, B., Dobrindt, U., Hacker, J. und Blum-Oehler, G. (2001). A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E-coli* strain 536 and the *E-coli* K-12 strain MG1655. *FEMS Microbiol. Lett.* 199: 61-66.
- Jarosch, B., Beckhove, U., Schiffer, R., Heise, S., Kreuzaler, F. und Kogel, K.H. (1997). A common basis of genetically based and induced resistance in cereals. New approaches for the assessment of reliable assays for chemical inducers. Diagnosis and identification of plant pathogens. In: Proceedings of the 4th International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology: 229-235.
- Jarosch, B., Kogel, K.H. und Schaffrath, U. (1999). The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 508-514.
- Jarosch, B. (2002). Der Einfluß des *Mlo*-Locus auf genetisch vermittelte und chemisch induzierte Resistenz der Gerste [*Hordeum vulgare* L.] gegenüber pilzlichen Pathogenen. Dissertation JLU Gießen.
- Jin, S., Xu, R., Wei, Y. und Goodwin, P.H. (1999). Increased expression of a plant actin gene during a biotrophic interaction between round-leaved mallow, *Malva pusilla*, and *Colletotrichum gloeosporoides* f.sp. *malvae*. *Planta* 209: 487-494.
- Jones, J.D.G. (1996). Plant disease resistance genes: structure, function and evolution. *Curr. Opin. Biotech.* 7: 155-160.
- 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.
- Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 295-300.
- Kanazin, V., Marek, L.F. und Shoemaker, R.C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11746-11750.
- Kervinen, T., Peltonen, S., Utiainen, M., Kangasjärvi, J., Teeri, T.H. und 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. und Karjalainen, R. (1998). Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase genes in barley induced by fungal infection or elicitors. *New Phytol.* 139: 293-300.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Matzke, T. und Herzog, J. (1994). Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 439-459.
- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H.A., van Luenen, H.G.A.M. und Plasterk, R.H.A. (1999). *mut-7* of *C.elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome Helicase and RNaseD. *Cell* 99: 133-141.
- Keyse, S.M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 186-92.
- 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. und 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.* 19: 19.
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J. und Schulze-Lefert, P. (2002b). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447-51.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (1993). Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a CLP A,B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196: 1214-1220.
- Kmegl, A., Mauch, F., Winzeler, M., Winzeler, H. und Dudler, R. (1995). Quantitative field resistance of wheat to powdery mildew and defense reactions at the seedling stage: identification of a potential marker. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47: 185-199.
- Kobayashi, Y. (1992). Recognition of a pathogen and nonpathogen by barley coleoptile cells. II. Alteration of cytoplasmic strands in coleoptile cells caused by the pathogen, *Erysiphe graminis*, and the nonpathogen, *E. pisi*, prior to their penetration. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43: 243-254.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T. und Kunoh, H. (1997). Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* 11: 525-537.

- Kobe, B. und Deisenhofer, J. (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19: 415-421.
- Koga, H., Bushnell, W.R. und Zeyen, R.J. (1990). Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* 68: 2344-2352.
- Kogel, K.H., Beckhove, U., Dreschers, J., Münch, S. und Rommé, Y. (1994). Acquired resistance in barley. The resistance mechanisms induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* 109: 1269-1277.
- Kogel, K.-H. und Hückelhoven, R. (1999). Superoxide generation in chemically activated resistance of barley in response to inoculation with the powdery mildew fungus. *Phytopathologische Zeitschrift.* 147: 1-4.
- Kohler, A., Schwindling, S. und Conrath, U. (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128: 1046-56.
- Kumar, J., Hückelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S. und Kogel, K.H. (2001). A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* 91: 127-133.
- Kunoh, H., Itoh, O., Kohno, M. und Ishizaki, H. (1979). Are primary germ tubes of conidia unique to *Erysiphe graminis*? *Annal. Phytopathol. Soc. Japan* 45: 675-682.
- Kurth, J., Kolsch, R., Simons, V. und 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. Applied Genet.* 102: 53-60.
- Lahaye, T., Shirasu, K. und Schulze-Lefert, P. (1998). Chromosome landing at the barley *Rar1* locus. *Mol. Gen. Genet.* 260: 92-101.
- Lamb, C. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. und Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10: 71-82.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F. und Gebhardt, C. (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.* 14: 421-429.
- Leyva, A., Jarillo, J.A., Salinas, J. und Martinez-Zapater, J.M. (1995). Low temperature induced accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone-synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* 108: 39-46.
- Liu, J., Lui, J.D., Yuang, Z.Q., Qian, X.Y., Qian, M. und Yang, J.S. (2001). Isolation and identification of genes expressed differentially in rice inflorescence meristem with suppression subtractive hybridization. *Chin. Sci. Bull.* 46: 98-101.

- Liu, G.Z., Pi, L.Y., Walker, J.C., Ronald, P.C. und Song, W.Y. (2002). Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase XA21. *J. Biol. Chem.* 277: 20264-20269.
- Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I.E. und Hahlbrock, K. (2000). UV light selectively coinduces pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1903-1907.
- Luan, S. (2002). Tyrosine phosphorylation in plant cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11567-11569.
- Luck, J.E., Lawrence, G.J., Dodds, P.N., Shepherd, K.W. und 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: 1367-1377.
- MacRobbie, E.A. (2002). Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11963-11968.
- Mago, R., Nair, S. und Mohan, M. (1999). Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor. Appl. Genet.* 99: 50-57.
- Malmstrom, B.G. und Leckner, J. (1998). The chemical biology of copper. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 286-292.
- Matzke, M.A. und Matzke, A.J. (1998). Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 94-103.
- Mauch, F., Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J. und Dudler, R. (1991). A wheat glutathione-S-transferase gene with transposon-like sequences in the promoter region. *Plant Mol. Biol.* 16: 1089-1091.
- McDowell, J.M., An, Y., Huang, S., McKinney, E.C. und Meagher, R.B. (1996). The *Arabidopsis act7* actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiol.* 111: 699-711.
- McDowell, J.M., Dhandaydham, M., Long, T.A., Aarts, M.G., Goff, S., Holub, E.B. und Dangl, J.L. (1998). Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1861-1874.
- Mellersh, D.G. und Heath, M.C. (2001). Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *Plant Cell* 13: 413-424.
- Miller, J.D., Arteca, R.N. und Pell, E.J. (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120: 1015-1023.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J. und Baulcombe, D.C. (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *Embo J.* 21: 4511-4519.
- Mondragon-Palomino, M., Meyers, B.C., Michelmore, R.W. und Gaut, B.S. (2002). Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 12: 1305-1315.

- Montgomery, M.K., Xu, S. und Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15502-15507.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A. und Hulbert, S. (1998). Induced resistance responses in maize. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 643-658.
- Mullineaux, P., Ball, L., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. und Kaprinski, S. (2000). Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? Phil. Trans. R. Soc. Lond.B. 355: 1531-1540.
- Muthukrishnan, S., Liang, G.H., Trick, H.N. und Gill, B.S. (2001). Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. Plant Cell, tissue and organ culture 64: 93-114.
- Nakashima, K., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (1997). A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 12: 851-861.
- Nelson, A.J. und Bushnell, W.R. (1997). Transient expression of anthocyanin genes in barley epidermal cells: Potential for use in evaluation of disease response genes. Transgen. Res. 6: 233-244.
- Nielsen, K., Olsen, O. und Oliver, R. (1999). A transient expression system to assay putative antifungal genes on powdery mildew infected barley leaves. Physiol. Mol. Plant Pathol. 54: 1-12.
- Oerke, E.C. und Dehne, H.W. (1997). Global crop production and the efficacy of crop protection-current situation and future trends. Eur. J. Plant Pathol. 103: 203-215.
- Ohmori, T., Murata, M. und Motoyoshi, F. (1998). Characterization of disease resistance gene-like sequences in near-isogenic lines of tomato. Theor. Appl. Genet. 96: 331-338.
- Osborn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell 8: 1821-1831.
- Ouchi, S., Oku, H., Hibino, C. und Aldyama, I. (1974). Induction of accessibility and resistance in leaves of barley by some races of *Erysiphe graminis*. Phytopathologische Zeitschrift 79: 24-34.
- 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. und Baulcombe, D.C. (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10865-10869.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R. und Schulze-Lefert, P. (1997). Interaction of 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.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Cassais, C., Orme, J., Schaffrath, U., Collins, N., Panstruga, R. und Schulze-Lefert, P. (2002). The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. Plant Physiol. 129: 1-10.

- Rasmussen, S. und Dixon, R.A. (1999). Transgene mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 11: 1537-1551.
- Rathjen, J.P., Chang, J.H., Staskawicz, B.J. und Michelmore, R.W. (1999). Constitutively active *Pto* induces a *Prf*-dependent hypersensitive response in the absence of *avrPto*. *Embo J.* 18: 3232-3240.
- Raz, V. und Fluhr, R. (1993). Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* 5: 523-530.
- Rebmann, G., Hertig, C., Bull, J., Mauch, F. und Dudler, R. (1991a). Cloning and sequencing of cDNAs encoding a pathogen-induced putative peroxidase of wheat. *Plant Mol. Biol.* 16: 329-331.
- Rebmann, G., Mauch, F. und Dudler, R. (1991). Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein. *Plant Mol. Biol.* 17: 283-285.
- Rebrikov, D.V., Britanova, O.V., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A., Tarabykin, V.S. und Lukyanov, S.A. (2000). Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res.* 28: E90.
- Richael, C. und Gilchrist, D. (1999). The hypersensitive response: a case of hold or fold? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 5-12.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R. und Gardner, R.C. (1998). Aluminium induced oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 409-418.
- Rubiales, D. und Carver, T.L.W. (2000). Defence reactions of *Hordeum chilense* accessions to three *formae speciales* of cereal powdery mildew fungi. *Can. J. Bot.* 78: 1561-1570.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. und 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. und Uknes, S. (1997). The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell* 9: 425-439.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. und Wittinghofer, A. (1990). The P-loop -a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15: 430-434.
- Schaffrath, U., Freydl, E. und Dudler, R. (1997). Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 779-783.
- Schaffrath, U., Zabbai, F. und Dudler, R. (2000). Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur. J. Biochem.* 267: 5935-5942.

- 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., Slusarenko, A.J. und Hoheisel, J.D. (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis* using cDNA arrays. *J. Biol. Chem.* 277: 10555-10561.
- Schiffer, R., Görg, R., Jarosch, B., Beckhove, U., Bahrenberg, G., Kogel, K.H. und 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*. 2. Ausg. Thieme Verlag, Stuttgart
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahy, G. und Wegner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214: 821-828.
- Schultheiss, H., Hükelhoven, R. und Kogel, K.-H. (2001). In-planta-Funktionsanalyse von PR1 im Pathosystem Gerste-Echter Gerstenmehltau mittels transientem *gene silencing*. *Phytomedizin* 31: 86-87.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.H. und Hükelhoven, R. (2002). A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol.* 128: 1447-1454.
- Schulze-Lefert, P. und Vogel, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci.* 5: 343-8.
- Schützendübel, A. und Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53: 1351-1365.
- Schweizer, P., Hunziker, W. und Mosinger, E. (1989). cDNA cloning, in vitro transcription and partial sequence analysis of mRNAs from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*. *Plant Mol. Biol.* 12: 643-654.
- Schweizer, P., Buchala, A. und Metraux, J.P. (1997). Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiol.* 115: 61-70.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Aberhalen, O. und 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., Schlangenhauf, E., Schaffrath, U. und Dudler, R. (1999b). Different patterns of host genes are induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of resistance and the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 659-665.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P. und Dudler, R. (2000). Technical advance. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J.* 24: 895-903.
- Seah, S., Sivasithamparam, K., Karakousis, A. und Lagudah, E.S. (1998). Cloning and characterisation of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley. *Theor. Appl. Genet.* 97: 937-945.

- Shen, K.A., Meyers, B.C., Islam-Faridi, N.M., Chin, D.B., Stelly, D.M. und Michelmore, R.W. (1998). Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 815-823.
- Shiraishi, T., Ymaoka, N. und 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 on the barley leaf. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 75-83.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Nicholson, R.L. und Kunoh, H. (1995). Phenylalanine ammonia lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (race1) 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. und Schulze-Lefert, P. (1999a). 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.
- Shirasu, K., Nielsen, K., Piffanelli, P., Oliver, R. und Schulze-Lefert, P. (1999b). Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system. *Plant J.* 17: 293-299.
- Showalter, A.M., Butt, A.D. und Kim, S. (1992). Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Mol. Biol.* 19: 205-215.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. und Vos, P. (1998). Dissection of the *fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* 10: 1055-1068.
- Skalamera, D. und Heath, M.C. (1998). Changes in the cytoskeleton accompanying infection-induced nuclear movements and the hypersensitive response in plant cells invaded by rust fungi. *Plant J.* 16: 191-200.
- Smith, R.D. und Walker, J.C. (1996). Plant protein phosphatases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 101-125.
- Smith, S.E. und Smith, F.A. (1990). Structure and function of the interface in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114: 393-400.
- Somssich, I.E. und Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants: a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3: 86-90.
- Spirin, K.S., Ljubikov, A.V., Castellon, R., Wiedoeft, O., Marano, M., Sheppard, D., Kenney, M.C. und Brown, D.J. (1999). Analysis of gene expression in human bullous keratopathy corneas containing limiting amounts of RNA. *Inverst. Ophthamol. Vis. Sci.* 40: 3108-3115.
- Stadnik, M.J. und 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.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. und Metraux, J.-P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.

- Stolzenburg, M.C., Aist, J.R. und Israel, H.W. (1984). The role of papillae in resistance to powdery mildew condition by the *ml-o* gene in barley. I. Correlative evidence. *Physiol. Plant Pathol.* 25: 337-346.
- Stripe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. und Lappi, D.A. (1992). Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10: 405-412.
- Sundaresan, P. und Farndale, R. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS Lett.* 528: 139-144.
- Suzuki, K. und Shinshi, H. (1995). Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7: 639-647.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F.S., Watanabe, M., Iwano, M. und Isogai, A. (2001). Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 413: 534-538.
- Takemoto, D., Hayashi, M., Doke, N., Mishimura, M. und Kawakita, K. (2000). Isolation of the gene for EILP, an elicitor-inducible LRR receptor-like protein, from tobacco by differential display. *Plant Cell Physiol.* 41: 458-464.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A. und Lamb, C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4158-4163.
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P.L. und Collinge, D.B. (1999). The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In: *Mechanisms of Resistance*, Kluwer Verlag, Niederlande. 77-100.
- Tordai, H., Banyai, L. und Patthy, L. (1999). The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and heptacyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Lett.* 461: 63-67.
- Tornero, P., Mayda, E., Gomez, M.D., Canas, L., Conejero, V. und Vera, P. (1996). Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. *Plant J.* 10: 315-30.
- Torp, J. und Jørgensen, J.H. (1986). Modification of barley powdery mildew resistance gene *Ml-a12* by induced mutation. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 725-731.
- Tosa, Y. (1992). A model of the evolution of formae speciales and races. *Phytopathology* 82: 728-730.
- Uetake, Y. und Peterson, R.L. (1997). Changes in actin filament arrays in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*, induced by the symbiotic fungus *Ceratobasidium cornigerum*. *Can. J. Bot.* 75: 1661-1669.
- van der Biezen, E.A. und Jones, J.D. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr. Opin. Biol.* 8: 226-227.

- van Gysel, A., van Montagu, M. und Inze, D. (1993). A negatively light-regulated gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a protein showing high similarity to blue copper-binding proteins. *Gene* 136: 79-85.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. und Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Plant Pathol.* 36: 453-483.
- van Loon, L.C. und van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97.
- van Wees, S.C., de Swart, E.A., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. und Pieterse, C.M. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8711-8717
- Vernon, S.D., Unger, E.R., Rajevaan, M., Dimulescu, I.M., Nisenbaum, R. und Campbell, C.E. (2000). Reproducibility of alternative probe synthesis approaches for gene expression profiling with arrays. *J. Mol. Diagnost.* 2: 124-127.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. und Ryals, J. (1994). Salicylic acid is not the translocate signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6: 959-965.
- Vleeshouwers, V.G., van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S. und Colon, L.T. (2000). The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210: 853-864.
- von Heijne, G. und Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 174: 671-678.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P. und Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094.
- Wassenegger, M. und Pelissier, T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 37: 349-362.
- Weaver, L.M., Froehlich, J.E. und Amasino, R.M. (1999). Chloroplast-targeted ERD1 protein declines but its mRNA increases during senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 119: 1209-1216.
- Wei, F., Gobelman-Werner, K., Morroll, S.M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Schulze-Lefert, P. und Wise, R.P. (1999). The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* 153: 1929-1948.
- Werner, M., Uehlein, N., Proksch, P. und Kaldenhoff, R. (2001). Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Planta* 213: 550-555.
- Wolter, M., Hollricher, K., Salamini, F. und Schulze-Lefert, P. (1993). The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 239: 122-128.

- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Leon, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I. und Shah, D.M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.* 115: 427-435.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C. und Shah, D.M. (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂- generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-1368.
- Xiong, L., Lee, M.W., Qi, M. und Yang, Y. (2001). Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 685-692.
- Xu, Q., Fu, H.H., Gupta, R. und Luan, S. (1998). Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 849-857.
- Yang, G.P., Ross, D.T., Kuang, W.W., Brown, P.O. und Weigel, R.J. (1999). Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucl. Acids. Res.* 27: 1517-1523.
- Yang, K.Y., Im, Y.J., Chung, G.C. und Cho, B.H. (2002). Activity of the *Arabidopsis* blue copper-binding protein gene promoter in transgenic tobacco plants upon wounding. *Plant Cell Rep.* 20: 987-991.
- Yu, Y.G., Buss, G.R. und Saghai-Marroof, M.A. (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11751-11756.
- Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Vale, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R. und Schulze-Lefert, P. (2001). Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. *Plant Cell* 13: 337-50.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247-273.
- Zhumbayaeva, B., Diatchenko, L., Chenchik, A. und Siebert, P.D. (2001). Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques* 30: 158-163.

8 Anhang

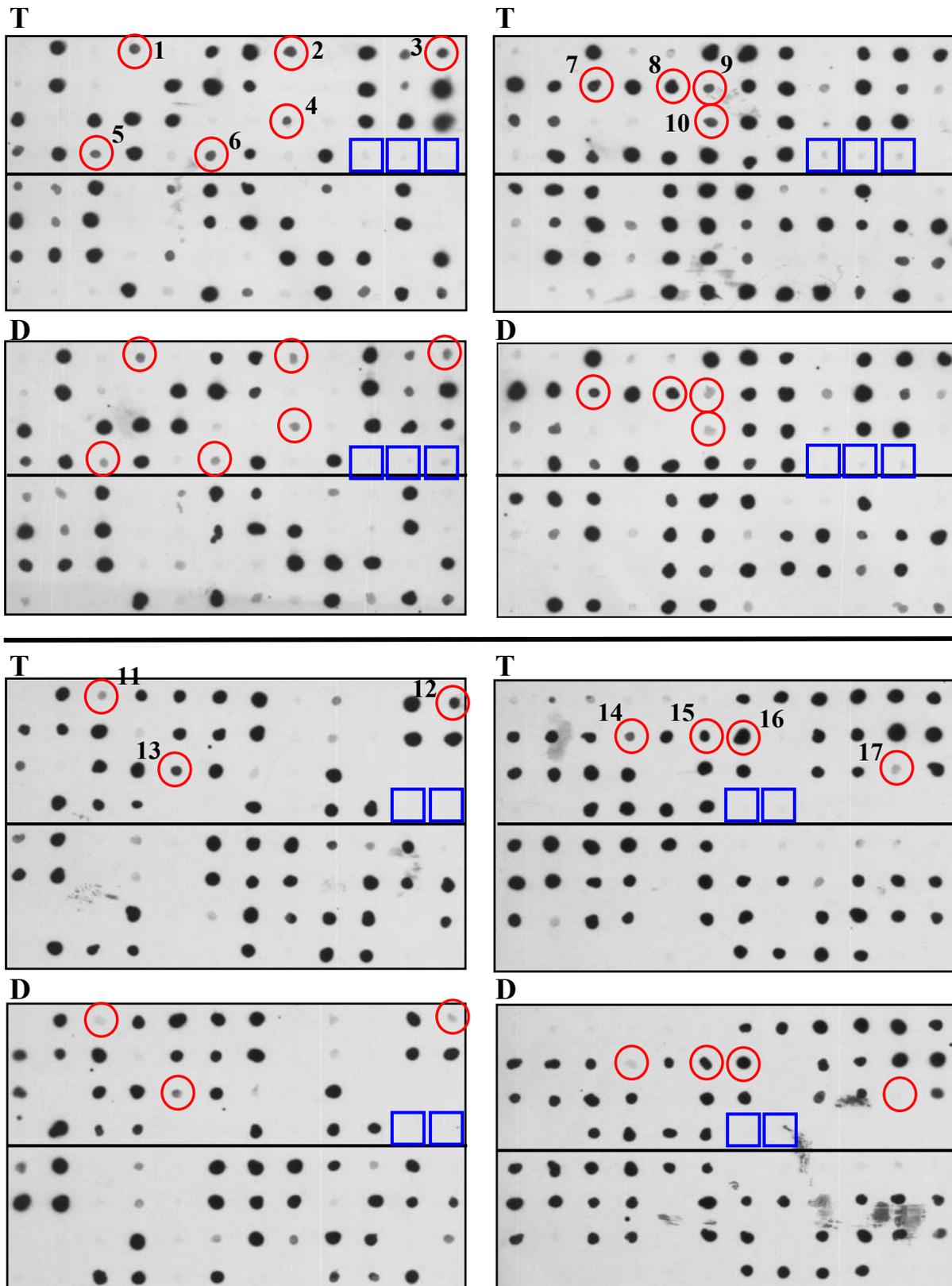


Abb.8.1: *Reversed Northern Dot Blots* der 305 Klone des ersten SSH-Experiments. Legende s. nächste Seite

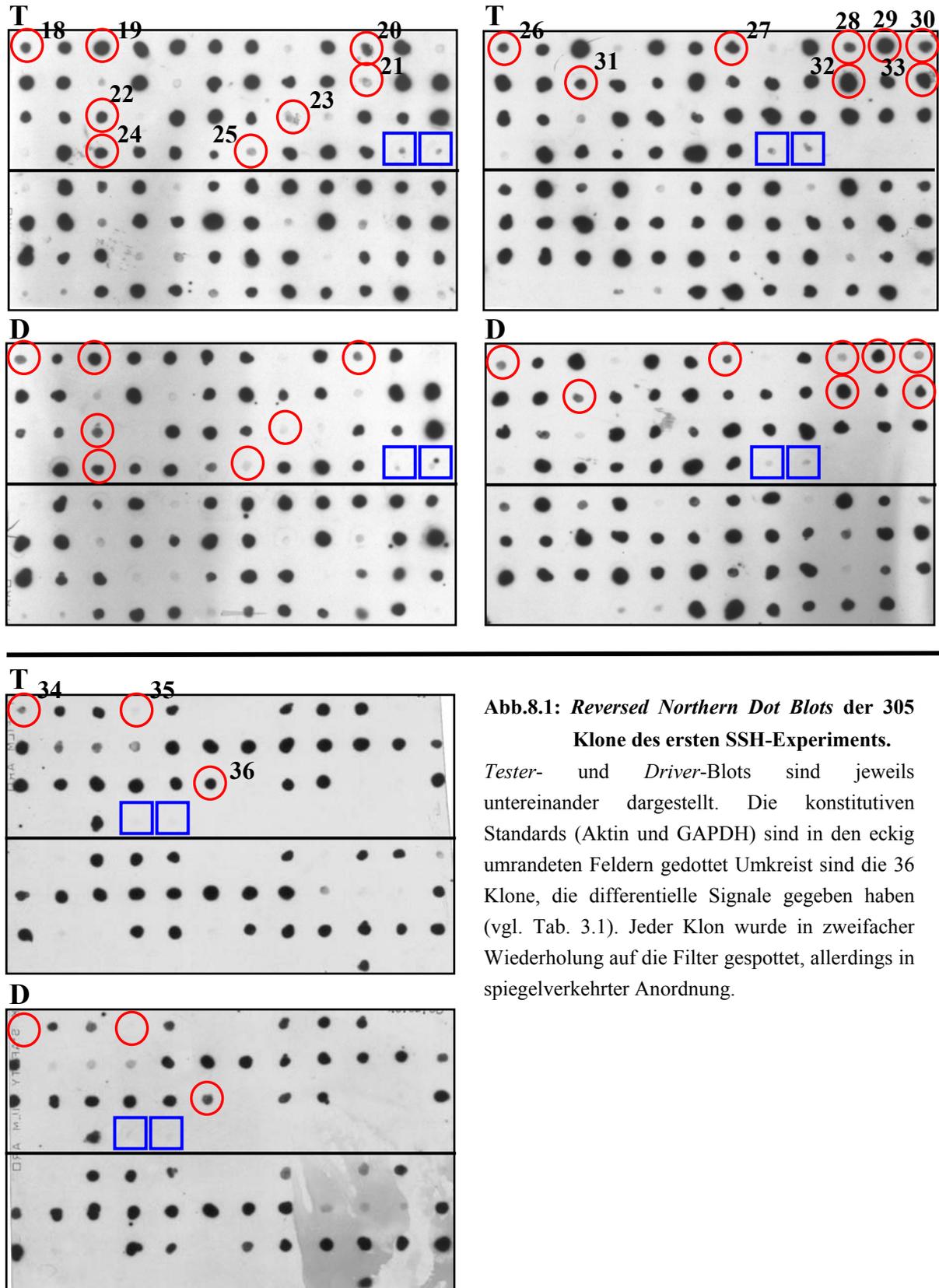


Abb.8.1: Reversed Northern Dot Blots der 305 Klone des ersten SSH-Experiments.

Tester- und *Driver*-Blots sind jeweils untereinander dargestellt. Die konstitutiven Standards (Aktin und GAPDH) sind in den eckig umrandeten Feldern gedotet. Umkreist sind die 36 Klone, die differentielle Signale gegeben haben (vgl. Tab. 3.1). Jeder Klon wurde in zweifacher Wiederholung auf die Filter gespottet, allerdings in spiegelverkehrter Anordnung.

1: PI000, 2: PI001, 3: PI002, 4: PI003, 5: PI004, 6: PI005, 7: PI006, 8: PI007, 9: PI008, 10: PI009, 11: PI010, 12: PI011, 13: PI012, 14: PI013, 15: PI014, 16: PI015, 17: PI016, 18: PI017, 19: PI018, 20: PI019, 21: PI021, 22: PI022, 23: PI024, 24: PI025, 25: PI026, 26: PI027, 27: PI028, 28: PI029, 29: PI030, 30: PI031, 31: PI032, 32: PI033, 33: PI034, 34: PI035, 35: PI036, 36: PI037

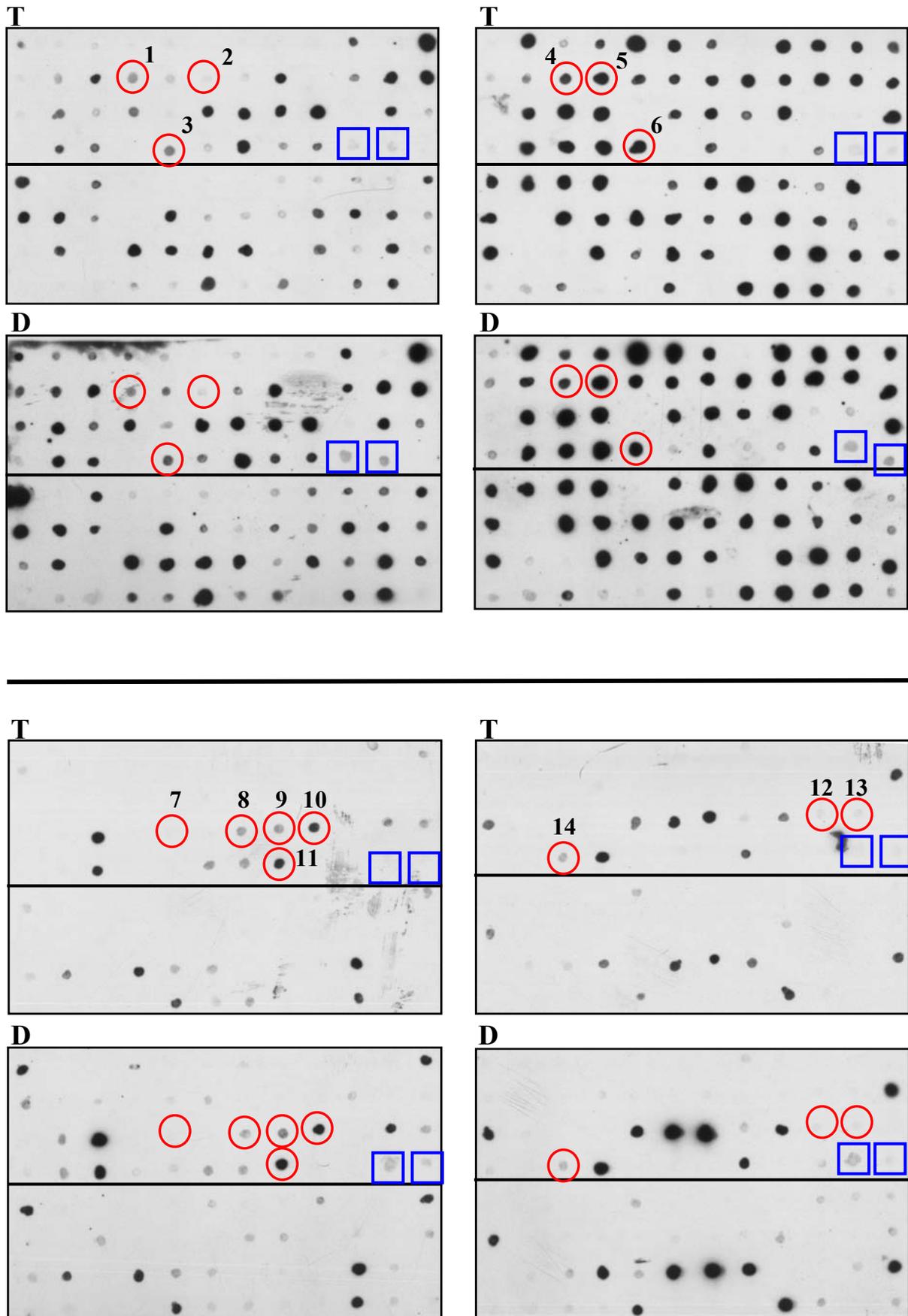


Abb.8.2: *Reversed Northern Dot Blots* der 336 Klone des zweiten SSH-Experiments. Legende s. nächste Seite.

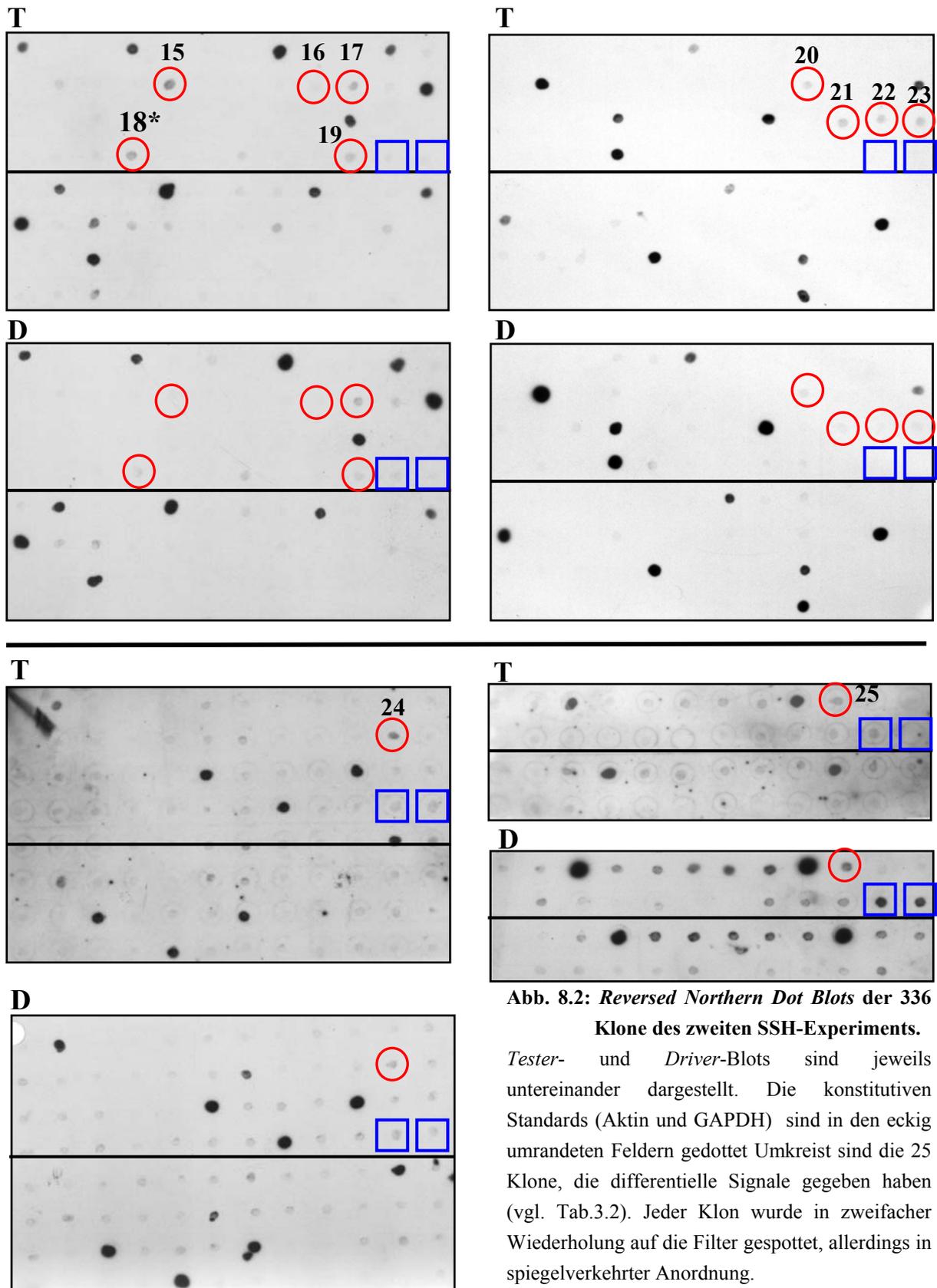


Abb. 8.2: Reversed Northern Dot Blots der 336 Klone des zweiten SSH-Experiments.

Tester- und *Driver*-Blots sind jeweils untereinander dargestellt. Die konstitutiven Standards (Aktin und GAPDH) sind in den eckig umrandeten Feldern gedotet Umkreist sind die 25 Klone, die differentielle Signale gegeben haben (vgl. Tab.3.2). Jeder Klon wurde in zweifacher Wiederholung auf die Filter gespottet, allerdings in spiegelverkehrter Anordnung.

1: PI063, 2: PI064, 3: PI065, 4: PI066, 5: PI067, 6: PI068, 7: PI082, 8: PI084, 9: PI085, 10: PI069, 11: PI070, 12: PI088, 13: PI089, 14: PI090, 15: PI091, 16: PI072, 17: PI073, **18*: PI074 (einziger Klon, dessen differentielle Expression bestätigt werden konnte)**, 19: PI075, 20: PI077, 21: PI078, 22: PI079, 23: PI093, 24: PI080, 25: PI081.

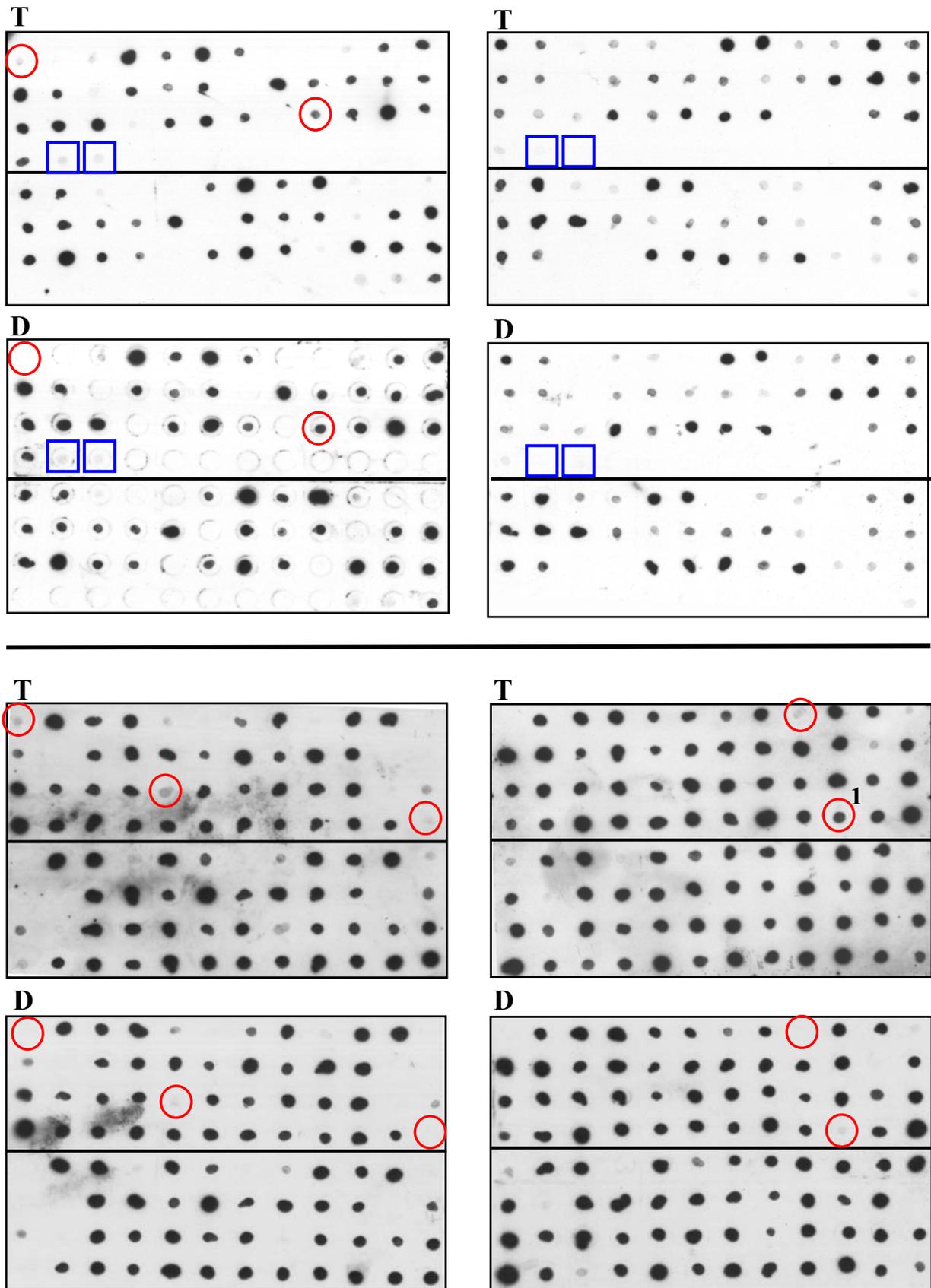


Abb. 8.3: *Reversed Northern Dot Blots* der 347 Klone des vierten SSH-Experiments. Legende s. nächste Seite.

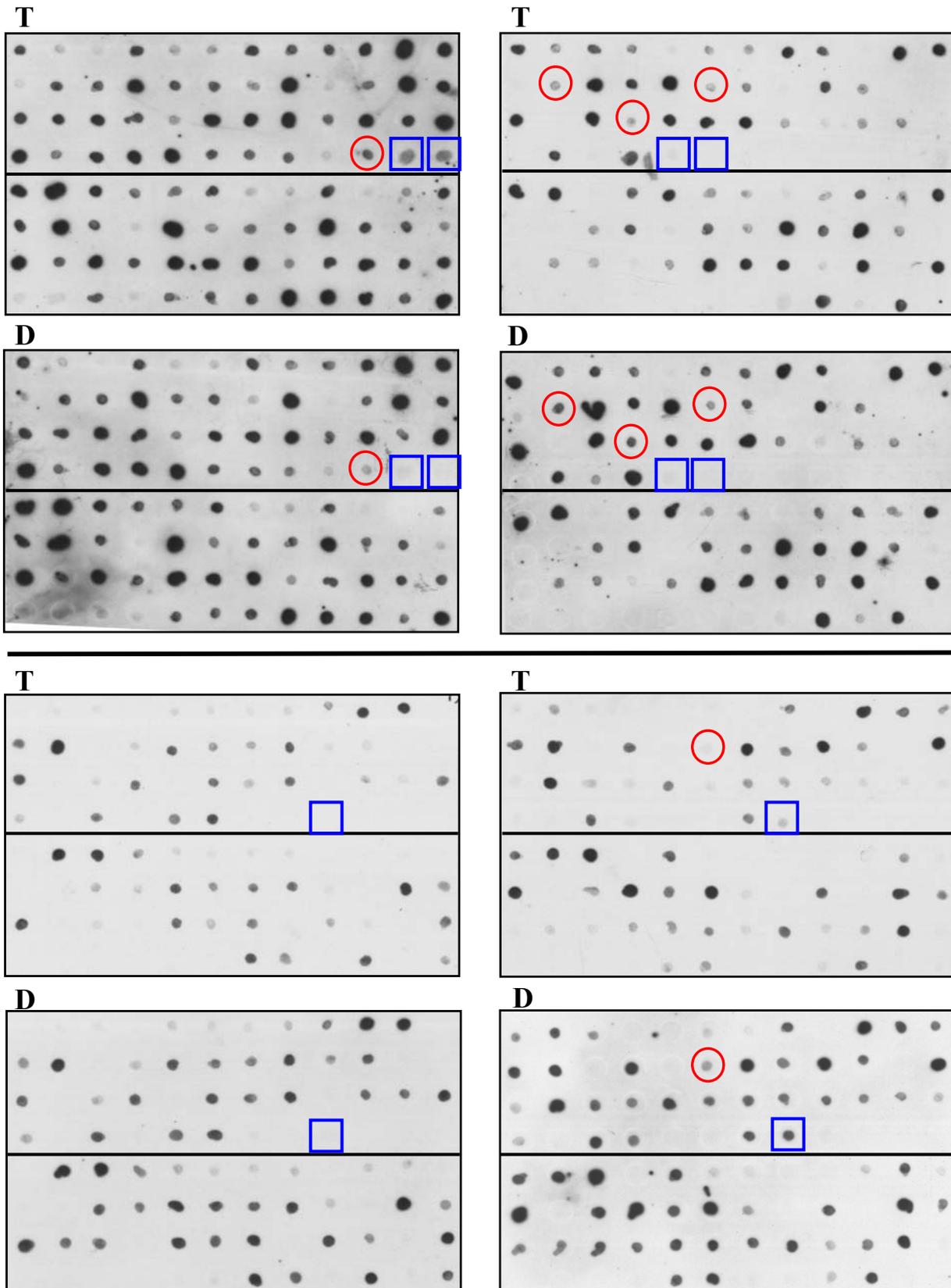


Abb. 8.3: Reversed Northern Dot Blots der 347 Klone des vierten SSH-Experiments.

Tester- und Driver-Blots sind jeweils untereinander dargestellt. Die konstitutiven Standards (Aktin und GAPDH) sind in den eckig umrandeten Feldern gedottet Umkreist sind die 12 Klone, die differentielle Signale gegeben haben (vgl. Tab.3.2). Jeder Klon wurde in zweifacher Wiederholung auf die Filter gespottet, allerdings in spiegelverkehrter Anordnung. 1: P1121

Tab. 8.1: Sequenzen der überprüften cDNA-Fragmente aus den SSH-Klonen (s.3.2)

Klon	Sequenz						
PI006	CCCAaACTcC	CcAAgAAcAG	GGAGCTGGAG	GtATCCACTC	gCGGTGGGcG	ATGCTCGGag	
	CCCTCGGGTG	CGTgTCCCCG	AgAtCcTGTC	CAAgAACGGC	ATAAGTTCGG	CGAGGCTgTT	
	GgTTcAAGGC	CGGCGCGcAA	TcTTCTCCGA	GGGCGGCCCTC	GACTACCTGG	GcAACCCCCA	
	ACCTGGTGCA	CGCGCAGAGC	ATCCTCGCCA	TCTGGGCATG	CCAGGTGGTG	CTCATGGGCT	
	TCATCGAGGG	CTACCGTGTT	GGTGGCGGAC	CCCTCGGTGA	GGGCCCTCGAC	ATCATCTACC	
	CGGGTGGTGC	CTTCGACCCA	CTTGGCCTCG	CCGACGACCC	TGACACAGCC	GCCGAGCTCA	
	AGGTCAAGGA	GCTCAAGAAC	GGCCGCCTCG	CCATGTTCTC	CATGTTCCGG	TTCTTTCGTGC	
	AGGCCATCGT	CACCGGAAAG	GGACCGGTTG	AGAACCTCTT	CGACCACATC	GCCGACCCAG	
	TGAACAACAA	CGCGTGGGCC	TTCGCCACCA	ACTTCGCCCC	CGGAAGTTAA	ATGTgTTTaG	
	CAGCCATCCG	TCTGTCCATC	GGACGAGATA	TGCATGTGTA	CTTGTACGTC	GtGGATCAAC	
	GtGTAGCTGC	ACGTACTTTG	TGTGTTTATT	TGTaTCATCA	TCATCGaGCG	AGCGAGATGC	
	CCTCTCCCTA	GCTGTGCGCA	ATGTAAATTA	ATTGAGCACa	AGGTGTGCAC	GAGCGAATGG	
	ATGGAAGGAT	TGtGTGTCAA	CAAAAAAAAA	AAAAAAAAaaa	AAAAAAA	(767 bp)	
	PI015	GGGATTATCC	GCAAAAaATT	ATGGTAGAGC	GTGTTATGAG	TGTCTACGTG	GTGGACTTGA
		TTTTACCAAA	GATGATGAAA	ACGTAAACTC	ACAACCATT	ATGCGCTGGA	GAGACCGTTT
		TGTCTTTTGT	GCCGAAGCTA	TTTATAAATC	ACAGGCCGAA	ACCGGTGAAA	TCAAGGGGCA
		TTACCTGAAT	GCGACTGCGG	GTACATGTGA	AGAAATGATT	AAgAGAGCTG	TATTTGCGAG
AGAATTAGGG		GTTCCATTG	TAATGCATGA	CTACTTAACC	GGGGGATTCA	CCGCAAATAC	
TACTTTGGCT		CACTATTGCC	GCGACAATGG	CTTACTTCTT	CACATTCACC	GTGCAATGCA	
TGCAGTTATT		GATAGACAGA	AAAATCATGG	TATGCATTT	CGTGTATTAG	CTAAAGCATT	
GCGTATGTCT		GGGGGAGATC	ATATCCACTC	CGGTACAGTA	GTAGGTAAGT	TAGAAGGGGA	
ACGCGAAATG		ACTTTAGGTT	TTGTTGATTT	ATTGCGCGAT	GATTTTTATTG	AAAAAGATCG	
TGCTCgCGGT		ATCTTTTTCA	CTCAGGACTG	GGTATCCATG	CCAGGTGTTA	TACCSGTAGC	
tTCAGGtGGT		ATTCATGTTT	GGCATATGCC	AGcYTYTgAC	CGAAATYTTT	GGGGGACGAT	
TCTGTATTAC		AATTTGGKGG	AGGaACTTTA	GGACAtCCTT	gGGGGGAaTG	CACCTggt	
						(719 bp)	
PI016		AGGACGCGGG	GTCTCGCCGG	GAGAGGATAG	GCACGGGACA	GGGCGGAGAG	AGGAAGCACA
		GCTGATCGCA	GCCGGAGAAC	CGCCCATCCG	CCATGAGCGA	CGGACAGGGC	AATGCTCCTC
		CTGGAGGCCA	CTTCATCGGC	CGTYCGGCAA	ACACCGACGA	GCCCAAGGAG	AAAGAACCGC
		CGCAGgCCTC	CCTGAGCCTG	CTCCGGCTGT	GAACAATCTT	CCTGGTgATT	ACTTCGTCCG
	CCGCCCGTtA	AACCACGAGC	AGAACACGAG	GCCGCCGCCG	CCTAAACCGA	GCTTCCTGGC	
	CAAAATCTGT	CCATGCCTCG	CCGGCGGTG	AGCTACCAGC	TAGACCAGCA	AGCCACCGCG	
	TGGTGAGCCG	TGCCCGTgAC	CGCGGGAGGa	TTTGAGGCGG	AATCGGGTCC	ATAAGTCTCA	
	ATTCTGTATT	GGAACCGTGC	GAGTHCTTTC	ATCTTTGGAA	GCTCTGCTCT	GTTTTTCTTT	
	cCTCCTCTAG	CATTTGATTc	CGACGTATTC	ACTCGTGTaA	TGCCGAMAAT	cGTAAAcTCG	
	GCGAAATTGC	CATCCGTCCCT	TGTGAAATG	(569 bp)			
	PI017	AGGGACTAGT	CCTGCAGGTT	TAAACGAATT	CGCCCTTTTCG	AGCGGCCGCC	CGGGCAGGTG
		GACTCCCAAG	CTCGCGCCGT	GCGTGGCGTA	CGTCACGGGG	AGGGCTTCTG	CGATCAGCAA
		GGAGTGCTGC	TCCGGCGTGC	AGGGGCTGAA	CGGCCTGGCC	CGCAGCAGCC	CGGACCGGCA
GACGGCGTGC		AGGTGCCTCA	AGAGCCTCGC	TACCAGCATC	AAGGCCATCA	AMATGGGMAA	
GGTCTCCGGC		GTGCCCGGCA	AGTGCGGCGT	CAGCGTGCCC	TTCCCCATCA	GCATGTCCAC	
CGACTGCAAC		AAGGTCCACT	AGCAGGGATC	AGATACTCCT	TCCTACGTGC	ATGCATGGAC	
GCGCTTGTGT		GGRGCTTAAT	ATCTACGTTG	ATGGAGTGCT	CATACGTACG	ATATTGAGCA	
ATAAAAAAWA		AAATAAAAAGA	GTATGCCTAT	GTCTGTACCT	TGCACACACA	CTGTGTGTGT	
GCGCATATAT		ATTTACGCGG	CATGCATGCA	CGCGTCCGTA	TGAGTGACTG	AACAGTCATC	
TCCTTGCTGT		ACTTTAGCCG	ATGTGTATGT	GTGATGTGTC	TGACCTACCT	GTTCAGGCAA	
TTAATGAATA		GKAATTATTT	TCTGAAAAAA	AAAAAAAAAAA	AAAAAAAAAAA	AAA	
						(653 bp)	

Klon	Sequenz						
PI026	AaAAAaAAAC	MAMAAtAAAA	GGAATaATCC	AGCCAGTttY	AAaGaAaTCG	CCCaTTCGaa	
	CGGCCGCCCG	GGCcAGTHAG	CGGGCcaGcW	TGGGCGGTca	TTMaCWGAWG	GCAaCTAaGC	
	RGcaTGGGGC	aTCGcMGCaC	TCCaTGTGGC	AGCMTcGTGG	CAaCGTCMAA	TTGGCGGGGc	
	ATcACACTgG	CcACMtgTTG	CTGCCAMTCA	AMCTTGCCCT	AaTtACTAaY	AWtWGCYAWG	
	TTTTaCYaTG	cAaTGCTGTG	AMaAaGTTAa	GTTAaTGTYA	aaaGTGTGGC	aTAAGGCTGC	
	CcAaTGTTGT	GCTAATAATA	aTCAATCGCG	TGGTTGCYac	NAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	
	A(361 bp)						
	PI034	CTTCGGCATG	CTCGTCCCCT	ACGGCTCYTT	CCTCGTCCC	GCCGACTCCG	GGAGCAACGC
		CGGAGGGGTC	GCCGCCAAGG	ACAAGCTCGG	CAACGACATC	CTCGTcGAGG	ATTGGCTCAA
AACGCACGGC		CCCAACGACC	GCACGCTCGC	CCAGGGGCTC	AGGGGTGATC	CTACCTACCT	
TGTGGTGGAG		TCCGACAARA	CCCTCGCCAC	CTACGGGATC	AACGCCGTCT	GCACGCATCT	
TGGCTGCGTC		GTGCCTTGGA	ACGCCGCCGA	GAACAAGTTC	CTCTGCCCTT	GCCATGGATC	
CCAGTACAAC		AACCAGGGCA	AGGTTGTCCG	TGGACCTGCA	CCTCTGTcAC	TGGCCCTCGT	
TACCGCTGAC		GTcGACGACG	GCAAGGTcGT	CTTCGTGCCA	TGGGTGGAGA	CCGACTTCAG	
GACCGGTGAG		AACCCGTGGT	GGAAATAAGC	GACACAAGCT	CCGGCAGCAA	AGCTCACTCG	
TGCgATATGT		TAAGCCTCCT	ACCAGTCCTA	AGAACGCTGC	TATAAGAGTA	CTCCTGCTAT	
AAATGCACCT		GTTTCTTGTA	TCCAGTTATA	TGTATACAGT	CTATGAAAGA	AGAGAAACCT	
TTGCAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA	(626 bp)				
PI063	GGTCCCACG	TTGKTTTTYTT	GCCGTGTcCT	TCCTTGGGCT	AAGMATAATY	TGAAYTACAC	
	CGCACAAGCA	CTCAtCWTAT	CGGCAScCTK	TATCGCTGGC	TTYTTcATCA	CCGcAGATAA	
	AACCATcCTA	CGAAACGCGG	GARACAGACA	TAGCTTGAGA	GAGAGcGCGA	GCGAGATACG	
	ATGGCAGcCT	CCATGATCAC	CTCGCCGATT	KTGGCGCCGA	CGAGcCTGCC	GTCCCTCTCC	
	CGCCGGGGCT	CCTCCTTCGC	CKTCTTYTGC	AGCGGTGGCA	AGAARATCAA	GGTCGACAAG	
	CCCCTCGGAC	CCGGGGGCGG	C TTGACCcGT	GACATCGACG	CCAGCGGCAG	GAAGGTcGGC	
	AAGARGGGTG	TCTACCAGTT	TGTTGACAAG	TACGGCGCCA	ACGTcGACGG	CTACAGCCCA	
	ATCTACACGC	CAGAGGAATG	GTCCGAATcT	GGTGACCcTA	CGCCGGTGGa	ACGACAGGGC	
	TTCTTATCTG	GGCCGTcACC	CTCGCCGGCC	TCCTCGGCGG	CGGCcCCCTC	CTCGTCTACA	
	ATACCAGCGC	TCTCGCCGGC	TAAGAAAGCA	TCTACCTGTA	ACACGGGCCG	AGTTTCTACT	
CTGTAACTA	CGTAGCTATA	ATGTGCATGT	ATGCCATCAA	CGGTGMAAAG	TAATTCATCC		
GAACAGATGG	TTTGTACGTT	AAAAAAAAAA	AARDAAAAAA	AAAAAA	(706 bp)		
PI064	GGACGTcCTT	CTTATCTTGT	TGTTAATGCT	GATGAGAGTG	AACCAMGGAA	CTTGTAAGAA	
	CAGGGAATCA	MTGCGTCATG	ACCCcACAA	GCTTCTGGAA	GGGTGCCTTA	TTGCTGGAGT	
	TGGAATGAGG	GCATCAGCTG	CTTACATCTA	CATCAGAGGT	GAATATGTGA	ATGAGCGTCT	
	GAWCCTTGAG	AWAGCTCGGC	GGGAAGCATA	TGCATCAGGA	C'TTCTTGgTA	AGATCGCTTG	
	CGGGTCAGGC	TATGATTTCK	ATGTGCATAT	WCATCTTGGT	GCTGGTGCCT	ACATTTGTKG	
	TGAAGAGACT	GCCCTACTGG	AGAGcCTTGA	WGGCAAGCAG	GGTAAACCAA	GGCTGATACC	
	ACCTTTCCCT	GCCAATGCTG	GGCTGTWTGG	CTGCCCCACA	ACTGTYACAW	ATGTTGATAC	
	TGTTGCTGTG	TCTCCAACAA	TTCTTWGGCG	TGGCCcAGAA	TGGTTTGCgA	GTTTTGGACG	
	CAAGAWTAAC	TCGGGAACAA	AGCTGTACTG	TATCTCAGGK	CAWGTGAACA	AACCTTGTWC	
	TGTTGAGGAG	GAAATKAGTW	TWCCTCTGAT	GGWWT'TTWTC	GAGAAGCACW	GCGGAGGTGT	
GAGAGGAGGA	TGGGAMAACC	WGCTTGCRGT	ATCCcWGGCG	GTTcGTCTGT	TCCTCTTTTG		
CCAAAGCACA	WATGTKWTGD	CGTGGTTGAT	GGACWATGAT	GCACTAWAGG	CYGTTCAGTC		
CGGWTTKGGa	CTGCAGMR'TT	ATGGTgATGG	MAAWTCMMAR	ATGT	(764 bp)		
PI068	CKatgTTGtG	YGMAaTYGTG	agCGGgTRRS	aatTtCRCgC	RGGaRgCRGc	TATgaCCATG	
	ATTaCGCCAR	GctcRGAGaT	TAACCCTCAC	TAAAggGACT	AGTCCTGcRG	GtTTAAACGA	
	ATTCGCCCTt	TCGAGCGGCC	GCCcGGGcAG	GTACCcAGGA	GATGCCTTGT	GCTCACGGAA	
	GATGAACCCA	ACCTTGCTGA	ACTCGagGCA	AgGCACCCAC	TTGGAGcGGA	TCaGGTAGTC	
	GACCTGCTTA	AGGaGGGCCT	CCGTGCTGAG	tGGtGGCAaG	TAAGAcRGGG	TcTcGAACCTT	
	CTTGATGCCc	TcGAtGGGCC	ACACStGcAt	GCACcTGAtC	C'TTCCACCGT	tSTGACGCTg	
	CcGagGCTAG	CGCCGTGgGA	GCGGCGGCTg	gACGgg	(396 bp)		

Klon	Sequenz						
PI070	TACMATATAT	ATATATATTA	TATATATATA	TATATATATA	TATATATATA	TATATATATA	
	TATGTRTATA	TATATAMACA	AAAATMAATG	TGTATATRAG	CAYATGTAAA	TATATATATM	
	TMTATGTATA	MATATGTGTR	TGTAWATGTA	AATATATAAA	TAWATGTRTA	YAWATATATA	
	TATAAGTSWA	TATATGTGTA	TGTATATATA	TATAAGTAWG	TATAWRATAA	WAWATGTSTG	
	TGDGTSTSAG	TGTGTGTATA	TATATGTGTG	TATGTATATG	TGTRTTTTTTT	TATATATGTA	
	CGTGKGBRTG	TAAGTAAGBS	GTATGTGTGG	TGTATATATG	TDATATGTAAA	TGTAAGTGKA	
	AGTGTGTGTG	TATVTGYGCA	GKGACAGAAA	AGRTGATAWG	TGTGTGTGTG	TGTGTAAGWG	
	GTGTKTGTA	ATGTGTGAAT	TATAARAWAA	ATATATRATA	AWGANHATMT	TTGTRTTTTGT	
	KTTTTTWTAA	AHTGKGGGGG	TGTTATGTGG	GGTGTTTTTAA	AYMTAWGTAW	ATTTBTGKGG	
	ATAYACAHWT	TTYTATRFTT	GTGTGGGCGG	GTGTVTAWGA	AAATTTGTGS	GGSTCTGTCT	
	ATGYAATGTG	TCTGHAMATG	TGTTTGTGGG	GGRAMTGTGT	AWMTCTTTGT	WTCTAAAAMT	
	AAAAACATST	GTGKGTATGG	ACAAAAMACTC	YCTTTC (696	bp)		
	PI109	GCKCTTTCGA	GCGGCCGCGC	GGGCAGGTGG	ACAACCTGGGS	TTACGAGGAA	GCAAATACCA
		CATTCATCGA	AGATGAAGAG	ATGAGGAAGA	GGCTGATGGA	CACATAATCCC	AATTCGTTCA
		GGAAGCTGCT	TCAAACCTTC	CTAGAAGCAA	ATGGCAGAGC	GCTACTGGGA	GACATCAGAG
		GATAACTTGG	AAAGGCTCAG	GGAGCTCTAC	TCGGAGGTTG	AAGACAAGAT	CGAAGGAATT
		GACCGGTGAA	CTCATTTTAC	TGATCAACAG	TTCCAGCACT	TGACAAGAAG	GATTCCTCTG
CCTCGTTGAG		TTGAAACTTG	TATATTTGTA	WTTAWAAWAA	GTGTAMATGC	AWAMARACYT	
TAAMAARAGG		GKGGTYSG (378	bp)				
PI121	CtAGtCCTGC	aaGGTTWAAA	CGAATTCSCC	CTTAGCGTGG	TCGCGGCCGg	GKWACATATA	
	TAGTTCTCAM	CCCCTCGCTC	AAACAATCAT	CAGCTAGCAG	CCTCGAGTCA	TCAGCATGGC	
	TTCTGCTGGC	CGTCGTCCCA	CGGTGCTCCT	GCAGATCGCT	CTCTTCGTCTG	TCGTCGCGGC	
	GGTCATCATC	AACAGCTCCG	TcTGCCTTGC	CgCCGGTGGC	CACGACGGCA	CCGGCACTGT	
	AGTAATAGGT	CCAGGCACTG	GTAGTGGTAG	CAACGACCCA	AACCACCCTG	TTTTCCCGTC	
	GCCGCTGGT	CAACACTACA	CCGGCGGTGG	GTGCCGCAGA	ATTTACGGAT	GTAGTAAAGG	
	ACCaCCGGCA	GGTGGCCAGC	CCTAATCAAC	ACAATGCAAG	GATGAAGGAC	GAAGAACCga	
	ACGGGCGGCC	TATAGATGCT	TACTCCCTCC	GTAAtCCAAAT	ATAAGTCTTT	TAAAATATTT	
	CATTAGATGT	CTACATACGA	AGCAAAATGA	ATGAATCTAT	ACTCTAAAGT	ATTTCTATAT	
	ACAtCCGTAT	GTAGTCTATT	AGTTAAACCT	CTAGAAAAGAC	TTATATTTAA	AAACGGAGGA	
	AGTaTaTTAT	ATGCATGCAT	GCATGCATGC	CTCTTTCTAT	GTAGCTCATG	TATCATCACA	
	AGTTACTCtA	CTGCCATGTA	TGACCTTAWA	CAGCAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAaAAaA	
	AAA (723	bp)					

Tab. 8.2: Konsensussequenzen der überprüften cDNA-Fragmente aus den RGA-Klonen (s.3.5)

Klon	Sequenz						
Poly 4-2	CMYTTTCWTTT	GGACGATS	KGDACCARAC	TMWTS	YTG	RATCCACATS	
	TGSTGGAAAG	TGCTAARAGA	GCCAAAAAWA	GAGCCACCAA	TCCAGACACT	GTACTTMCTT	
	TCAGGTKGTS	CAATAACTTT	AMCCNTCATA	CTGCTAGGRG	CAAGGGCCGT	RATCTCCTTG	
	CTCATACGAT	CAGCAATTCC	AGGAAACATG	GTAGACCCAC	CACTGAGAAC	AACATTACCG	
	TAMARAWCCT	DTCTGATATC	GACATCACAC	TTCATGATGG	AATTGTATGT	CGCTTCGTGT	
	GTACCAGGAA	CTDCCATACC	AACATGAGAT	GGTTGGAACA	GCACCTCAGG	ACACCTGAAC	
	CTTTCTGAAC	SAATKGTAAT	AACCTGACCA	TCAGGCATVT	CATAGCTCTT	CTCCACGGAG	
	GAGCTGCTCC	TAGCCGTTTC	CAGCTCCTGC	TVATAATCAA	GGGCAACATA	AGCGAGCCTC	
	TCCTTTATGT	CTCTGACAAT	TTCCCGTTCA	GCGGCTGTTG	TGAGGGAGTA	CCCTCTTTCT	
	GTCAGGATCA	TCATWAGATT	ATCCGTGAGG	TCACGGCCGG	CAAGGWCCAA	ACGCAGGATA	
	GCATGAGGAA	GGGTGTATCC	CTCGTAGATT	GGGACAGTGT	GGCTCACACC	ATCACCAGAG	
	TCAAGCAGAA	TACCAGTTGT	TCGACCCGCTG	GCACACAAGG	ACAGAACGGC	CTGGATTGCT	
	GATACATTGC	TGGGCAACTG	GAGGTWTC	ACATGATCTG	GGTCATTTTT	TCTCTGTTGG	
	CCTTGGGATT	GAGAGGGGCC	TCAGTCAGCA	ACACAGGATG	ATCCTCGGGT	GCGACACGGA	
	GCTCGTTGTA	GAATGTGGTG	ATGGGC	(866 bp)			
	Poly 23	GAGATGGCTC	TATGGATTGC	ATCCATGGTG	CTTTTCGAGG	CTAACGTCCT	TAGCCTCCTT
GCCGAGGTCC		TGTCGGCCGT	CTTCTGCGAG	GTGATGAATG	GCAAGCCGGA	GTACACCGAT	
CACCTTGACCC		ACAAGCTGAA	GCACCACCCT	GGACAGATCG	AGGCTGCCGC	CATCATGGAG	
CACATTCTTG		AAGGAAGCTC	CTACATGATG	CTAGCAAAGA	AGCTCGGTGA	GCTTGACCCA	
TTGATGAAGC		CAAAGCAAGA	TAGGTATGCA	CTCCGCACAT	CGCCTCAGTG	GCTTGGCCCT	
CAGATTGAGG		TCATCCGTGC	TGCCACCAAG	TCGATCGAGC	GGGAGATCAA	CTCTGTCAAT	
GACAACCCAC		TCATCGACGT	TTCTCGTGGC	AAGGCTATCC	ACGGTGCCAA	CTTCCAGGGC	
ACACCTATTG		GTGTGTCCAT	GGACAACACC	AGGCTTGCCA	TTGCTGCGAT	CGGTAAACTC	
ATGTTTGCCC		AGTTCTCAGA	GCTAGTGAAT	GACTTCTACA	ACAACGGTCT	GCCTTCCAAC	
CTCTCCGGCG		GGCGCAACCC	AAGTTTGGAC	TATGGCTTCA	AGTCTCCGGA	AATTGCCATA	
CC (602 bp)							
Poly 28		GCAAGCCTTC	AACACTTAGC	ACGATGAAGA	TTGCCATTGC	AGCAGCAGCA	GCCGCTCCCC
		TCCTCCTGCT	CCTGGCCCTG	GCCGGCACGG	CCGCGCCGTG	ACTTTCGACG	CGACGAACAC
		GGTTCCGGAC	TCGGCCGGCG	GCCAGAGATT	CAACCAGGAC	GTTGGCGTCG	ACTACGCCAA
		GCAGGTGCTC	TCCGATGCCT	CGTCCTTCAT	CTGGACCACC	TTCAACCAGC	CCAACCCGGG
		AGACCGTAGG	ACTACGACTC	GGTCACCCTC	GCTGTCTGTCG	ACAACATCGA	GCCTGTGGCC
	CAGACCGTCG	GCAACGCTAT	CCAACTCCGA	GCCCAATACG	TCGCCGGCTT	CGACGGCGAC	
	GTCAAGCAAG	AGGTGAAAGG	CGTACTGTAC	CACGAGGCGA	CGCACGTGTG	GCAGTGGATA	
	GACCACTACG	GCGAAAAACC	GGGGCTCTTC	GAGGGGATCG	CCGACTACGT	GCGGCTCAAG	
	GCCGACCTCG	CGCCGGGGCA	CTGGGTGAAG	GACGGGGGCG	GCGACCGGTG	GGATCAGGGG	
	TACGACGTGA	CGGCCAGGTT	CCTGGACTAC	TGCGACTCGC	TCAAGCCAGG	GTTCTGTGGC	
	GAGATGAACG	GCAAGCTCAA	GGACGGCTAC	AGCGACGACT	ACTTCGTGCA	GATCCTGGGG	
	AAGAGCGTGG	ACGAGCTGTG	GAGCGACTAC	AAGGCCAAGT	ACCCCCAGCC	CCAGAGCTGA	
	TGGTCGACGT	ACGATGCATG	CAGTTTATTG	TTGTATGTGT	ACCGGTATAC	ATCGACGTTT	
	GAAGTATGATCC	AGTATACTTG	TGTTAGAACA	CAGTTGCTGT	ATTGACTGGA	GCGGAATAAA	
	TTGACGTTGG	CACGGTGTGT	GTTGACGAAC	TGTGGATCCC	TT (882 bp)		
	Poly 39	GGATTCTGCC	GGGGACAATG	GAGAACATGT	ATCATCAAGT	CGATGAAACA	TACCAACCGT
TTGGATTGAC		AAGCGGCCCT	ACCTCGTTAG	CACTCATATG	TATTATCAGT	CAACGGAGGA	
AAGATAAGTT		CTCAGAAAAA	AAAAGGAATG	ATAAGATGTT	GCTAACTGGA	AGTTCGACTG	
AAAAGAGGTG		AAGTCCCAAG	ACTCGA	(206 bp)			

Klon	Sequenz						
Poly 53	ATTACATGGC	TCATGGTACC	CTGCGTGAGC	ACCTATACAA	GACCCATAAT	GCACCGCTTA	
	GCTGGAGGCA	GCGTTTTGGAG	ATCTGCATCG	GTGCTGCTCG	TGGGCTTCAC	TACCTTCATA	
	CCGKGCAAAG	CACACCATTA	TCCACCGTGA	TGTGAAGACG	ACAAACATCC	TCCTGGATGA	
	GAAATGGGTT	GCCAAGGTTT	CAGATTTTGG	TCTGTCCAAG	ACTGGGCCAT	CGATGGATCA	
	CACACATGTG	AGCACAGTTG	TCAAGGGCAG	TTTCGGGTTT	TCTTGACCCG	(290 bp)	
Poly 94	GAATTCGGTG	TAGGGAAAAC	CACTCCATAT	GCTTACCTGT	TACATACACA	TACTAGGTAT	
	GCATACATAA	CCATGAGGTC	GCTAGGTGCA	GTTGCTAAGA	TCTAACGCAT	CACTAGCTAG	
	CTAGTACAAG	TACACAAGTC	TACATACTAA	TCCTTACGAG	AGACATATAT	ATGGAAAAAA	
	AATGGAGAAT	CTACCGGTCT	GTAAAAGATG	GAAAATTCTT	GCTAGACTTT	GAAGCTTCTG	
	TCTTATTCAT	GCTGATTCAC	AAGTCCGCGC	CGGTGAGGAT	GCTATTGTTC	AAGCGGCGAT	
	GTAGGTGACT	GAAGTGTAG	CCGCTCCGAT	ACCTCAGCAA	GAGATGTGAG	GTTGCACTTG	
	ATCACGGCCT	CAACGAAGTA	GCAAGTCTCG	TCCTTTGTGT	TACCGTCAGC	ACATCAACCA	
	CGAAGGACTC	AATCACAAGT	GTCCCTGGCC	GCCCATCAAT	ACTCTGTGGG	TGGACTGTTA	
	TGATGGATGA	GTAGTTCCTT	AGCCGGTGAT	CGCCTCCAAC	AAACTTGACA	CTGAGGATAT	
	GCTCGTCTGC	ATCCAGCTGC	TCGAGCCCTT	CGGTGCTAGC	TGTCGCCGGC	AGGCCGGTCT	
	TGACGAACGG	CTCCCGCACG	CTGCCGATCT	CGAGGTCGCC	ACCGCGCAC	ACCAACGGGC	
	GGACGGGGGC	CTTGATGTGC	TTKACGAGCG	CGGAGGTGCA	CTGATTCTCG	CCGGGCGCGT	
	GGCCGTGCAG	CCGCCGCATG	TAGTCCGCCT	CTGTGCGAGC	CCCTCCTCCA	CCTGCGCCGC	
	TAGCCGGCTC	GTGGCTGAGC	CTCCAGACAC	GCGCGCCGCC	ACCTACGAGG	CCCACCATGC	
	CAGCAACTCG	GATACCCGCT	GCCACCGCCG	CCGCCGCCAC	TCCTACCGGT	GGTTGGCCTG	
	CCACTGGCGC	TGTCGAC	(977 bp)				
	Poly 129	TCCTCCTTTT	CTCACCTCAC	TTGCGGGAGA	ATTGTTTAAT	TGACGAGTAC	AAACTATTCG
		ACCTCTCGCT	CTTTGCGCGC	CGCGCGCTCG	CTCGCATCTA	TCTTCAAACA	TAACCTGCGC
		ATTCCATCGC	TATCMCCTCA	CTTCCAAGCA	TTTCCGCTAG	CCAAGTCTCC	GCAACACCAA
		CATGGGCGCC	AACCTTTTCGT	CACAAGAAGT	TGTCGATACA	TCGGCTGACG	TCATCATCCT
		AGGCGATCAC	CGCTCCGAGC	TATACMTCTT	ATTTTTTACA	GCTGGCTCTG	TCTACGCCAT
		TGGTATGATA	CTCGGCACTT	TACAATTAGT	GGATCACTGG	CGTGGTCCGG	TGGGGGATCG
		TTCTGTGCGT	CTATCCGGTG	TCTTAGCCGC	CATACTGCTG	TCAGTGGGTT	GGCCTCTAAT
TCTCTTCTAC		CTGTGGGTGC	TAGTCACATG	ATTGCTGGAT	CATTTTATGT	CATTTGCGAC	
CAACCCGGCC		AAAGGGCTTC	CACCGCCACA	TTTTCTTGCC	ACCCTTTGTC	GTCTATCGGC	
TTCTTTGCTT		GCTAGATTTG	GACTTTACCA	ACAGACTATC	GACTTTAACA	AGGATGGAAG	
CCTTGCTGCT		CATGATGTGG	CGAGATGTGG	GACACGGGAA	CTTGAACCAT	CCAATGAAGG	
CTTCTCGAGG		GATTATCGAG	CAGCAGGGCC	AGATATCAGC	AACGGAATTG	GAGGATATGA	
TAAGGTGTTT		TCTAGGAGTA	TGGCTGTAAT	GTTAGAGGTG	CTCAAGACCA	ACATTAGCAT	
AGGRTGTCTC		AGGTGTGGAT	TARACAGGGG	CMCTYCGGGG	ATACTGGCCA	MAAWA	
(835 bp)							
Poly 134		CCTGAGTTCC	CATCACTTGG	AAGAACACAA	ATAGTGAATA	TACCGCGGAC	TCGGCGTATT
		TGATATAGGA	TTACATCGTT	GGAAGCCTTT	TGCTCACAGA	CATCAAATAT	CTTTGGTGTT
	AGGTTGATTT	CTATATTGCC	AACAAAGCTT	TCCAGAAACA	TCTCCAAAC	TTCTGAAAAT	
	ATAATTTCGT	TACAGCTATG	TCATCATGGC	ATTCAGCTTC	TAGCGTCACA	ACCAGTAGTA	
	ACTGGAATAA	CAATATTTCT	CCCTTAGAGT	TAAACAGGAC	AACAAGCATA	CAAAATTTGC	
	CAAGACTCTC	CTTGATGCAT	GGAAACTGCG	GCCGCCTCCT	ACAGCACAGT	ATGTCTCAAC	
	GATGATGTGC	ACCTAAGCAC	TTTTCTTTGA	AGATTTCTTG	TGGATTTTCT	TCTGGGGCTT	
	CAACTTATTT	GATCCAGATG	ACGATGATTG	CTTGTCTTTC	CTCCTCTTGT	TGTCCTTCTT	
	CACCTTGATC	ATCGTGATTG	CCTTGCTGAC	ATCCAACGGT	TCCTCAAAGT	TCTTGGCCAG	
	TAGACAGTTC	AGGATTTTCT	CGTTTTGCTG	TTTCTCCAGG	TTGCCCATTC	CTTTCCCTTC	
	AACAACAGGG	AGGAACTTTC	TGTTTTTGCC	AGCCTTCTTA	AGAGGTTTCT	CGCCAGGCAC	
	TTTTTATCAA	ACTTTCCACC	ACTAGCCGTT	GCTGCAGAAG	CCATACCAGC	GACATTCTCG	
	AAGGTCTTCC	TTCTTAGCTT	TTCTTGCCAG	ATCAGCTTTA	GTTCCTGTGA	TGGGCMGGRM	
	GTGGCAGCGA	GCTGTATATG	ACTTGAGCTT	CATAATCCCG	CGGSCAWGGG	GGGCGGGRGC	
	ATGSGACGTC	GGGCCM	(856 bp)				

Tab. 8.3: Sequenz der Primer, die von konservierten Regionen bekannter Resistenzgenmotive abgeleitet und für den RGA-Kandidatengenansatz eingesetzt wurden.

PK Temp (°C)	Sense [5'--3']	Antisense [5'--3']	Motiv	Ref	PK Temp (°C)	Sense [5'--3']	Antisense [5'--3']	Motiv	Ref
1 45	TCGGAAGACTTA GGAAACTGA	AATGAGACGGGG ATAGGAC	LRR	1	26 53	AATAAAAACA AAATTGGCACT	GAATCACAAT GGCATCAC	LRR	1
2 47	CACAATGATGGG AAGTAAG	AAAAACAAAATA GGGAAAAAC	LRR	1	27 54	GGAAGAGAACCC TCAAGAAGA	CCGGTGTAAATCC CTCCTT	LRR	1
3 48	CATGGAGCCTTT CAGT	CCTGCAAGAGCT GTGAGT	LRR	1	28 54	GCAAGCCTTC AACACTTAGCA	AAGGGATCCA CAGTTCGTCA	LRR	1
4 48	GGATTGCTGATA CATTGC	GCCCATCACCAC ATTC	LRR	1	29 54	GAAGCCAATC ATTTTCA	AAACATATAC AGCATCTCCA	LRR	1
5 50	GCCATGACCAAG GAAAATAAG	AAGCATACATCA GAAGATTTGA	LRR	1	30 54	ATGATCACTC TTTTGCCTTTT	CCCCGGTGAG ATTGTT	LRR	1
6 50	TTGGGGAAGAGA AGT	CTTAGCCTTGCT TTGATA	TIR	1	31 54	AATATATTGG GGACTTGAAGA	ATACCCTTA GGATGAACAC	LRR	1
7 50	AAAAATCAAAAT GTCTTCTCA	TCCAGCTCTTTG TCGTCT	LRR	1	32 54	GGCCTTTGA GATCTAATAGT	TCTGTTAGCT GGTTTAGGTTG	LRR	1
8 50	GCCAATCCCTAG AGCACTCA	GTAATTCCGGTC CCTCCAAC	LRR	1	33 54	GCCCGGAACA AGTTTAGTGG	GCTCAGCAAA TCCTCACCTC	LRR	1
9 50	TGAGACTTAATA GTAGCCTGTT	CGAGCTCAAGTT GAGTAGCATA	LRR	1	34 54	CGGTTACTCC TTCTCCTTCTA	GATTCTTCCG TTGTTACAGC	LRR	1
10 50	ACATGGCGTCTC GAAACT	TGGAACCAGGTA CAAGGA	LRR	1	35 54	TTTCATCCCT CACTCTCC	AGTCTCCCTG ATGTCATT	LRR	1
11 50	GGCGTCATACCG AGTAAT	AGATTGTGGAAG CGAGTTAG	LRR	1	36 54	AGCTCGGAAA CATGACTA	GACATACGAG CTGCTGAA	TIR	1
12 50	CGATGGGTGTGG AGAGT	CCGGAGATGTCA AGATGT	LRR	1	37 54	GGGTTCTTGA GTTTCTG	ACTCTGGTAT CGGACCTG	LRR	1
13 50	TTAACGTAGCCG ATAACC	CAACGAAAACAA ACCAGT	LRR	1	38 55	CGTCTGTGTTG TTCTTGGA	GGCTTACGCA CCGATTTT	LRR	1
14 50	TTCGTCGATT TCGGAGTTAG	CTCGGAATTG ACCCACTG	LRR	1	39 55	TCTGCCGGGG ACAATGGAG	TCGAGTCTTG GGATTTAC	LRR	1
15 50	TCCTGCAACT TGATAATAACA	TGTCACATCC CTTAGAAAAAT	LRR	1	40 55	CATACTGCAAC TAAGTACGATG	AGTACTCCGG TCTGCCACCTA	TIR	1
16 51	TTTATCTGTC GGGCTGTTC	TACTTCAGAT GCTTACAACCA	LRR	1	41 55	GCAAGCCTTCA ACACTTAGCATG	CAAAGTTCCCG AAGGTTGTGAG	LRR	1
17 52	CTTCTCATCA CTATCATCACC	CGACGCCACT CCAAAGACACA	LRR	1	42 55	AAGCGTACTTC TCTGAAAGCAC	CATCACCGTCT GACTTCAAGAG	TIR	1
18 52	CCAACTCTAG AGAAACTCCTA	CATCTGGAAT CTCCTTTA	LRR	1	43 55	TTTTCATTTT CGTCATCT	CTCTCCGGTG ATTCTT	LRR	1
19 52	TTTCGCTGAAT CTTTCCAAT	TTTCCTTTTAA ATCGGATAA	LRR	1	44 55	TGTAATCTCC AATCCTCAGG	TCGAGATTTG TAGCATTTGAC	LRR	1
20 52	TCTTCATGGC AGGGAGTGG	CCCAGCAACA ATCTCTG	LRR	1	45 55	GGGCTGATAA ACCAACCAGGC	CTCTCCCTTT CATCTCGTTGC	TIR	1
21 52	GGAATCTCCGG TGTTATACCTC	TCCTACAAGGC CCTCTCTAAT	LRR	1	46 55	CAACTGATG CTCCAACAGAAC	ACCGGCGTACT TGTAGTACAAGT	LRR	1
22 52	ATGGACTGGC GTGATG	GAGAGACCCT GAGATTCTGTT	LRR	1	47 55	GGGAGATTCCC GCGGAAATCGGC	CCTTCATGTTA CCCATCCATTC	LRR	1
23 52	GAGATGGCTCT ATGGATTGCATC	GGTTAGGCAATT TCCGGAGACTTG	LRR	1	48 55	GCACCATAGC TGCATTCTTC	CTGTACATCG GAAACTCTGG	KIN	1
24 52	GCCAGAGTAC ACAGGACATGA	ACGACCAGTG AAGAGGTTGTT	LRR	1	49 55	CCAAAGCTTT CTGATTTTGG	CCAGTGGCAA CGTATTCAGG	KIN	1
25 52	AATGTTTCCG AGGATTGAA	GATATGTCCT GCAAGATGGT	LRR	1	50 55	TTGCACGACT ATGCAGATCC	AGTGAGTTGA CCGGTCATCG	KIN	1

Fortsetzung Tab. 8.3

PK Temp (°C)	Sense [5'--3']	Antisense [5'--3']	Motiv	Ref	PK Temp (°C)	Sense [5'--3']	Antisense [5'--3']	Motiv	Ref
51 55	ATGAAGCTCA AGTCATATAC	CCTGAGTTCC CATCACTTGG	KIN	1	76 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGGCC	NBS	2
52 55	GAATTGATT GGATACTGTG	AAATGTATTGG GATCGAGG	KIN	1	77 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGACC	NBS	2
53 55	ATTACATGGTC ATGGTAC	GGGTCAAGAAA CCCGAAAC	KIN	1	78 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGTCC	NBS	2
54 55	GACGCGTGCCA AACTC	GGGAAACATAC AATCTCACT	LRR	1	79 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGCCC	NBS	2
55 55	TTGGGGAGCGT AAGAAGA	AACAGGCAGTG CTGTA	LRR	1	80 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACGAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2
56 55	CAATTCTTTTC AGGCTCTGT	GCCTCGGGTAG GTTTC	LRR	1	81 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACGAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2
57 56	AGCGCATTTTG TCTCTTGTT	CCTGAGCATCG GAGGTT	LRR	1	82 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGGCC	NBS	2
58 56	GCGGAGAGCT TAAGCCAAC	GGATCTCGGT TTGATACTTGC	LRR	1	83 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGACC	NBS	2
59 56	ACGTGTTGTC CGCTGTCAGA	CGCCCCGGAG ATTTATGTC	LRR	1	84 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGTCC	NBS	2
60 57	GGATGAAGCAA TATTTTCGTCAC	GTCTCGTTAA TATCCGATGCG	LRR	1	85 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGCCC	NBS	2
61 57	CTCCCTCAA AACCTAAT	TTAGACGTGG CAAAGAAG	LRR	1	86 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACAAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2
62 60	TGAACTCTTC CTTTACTCTC	AAATCCCATC AAGGTGCTTG	LRR	1	87 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACAAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2
63 60	CGATGTTCAA AACACTTATG	GGATCCCGAC CACGGGTGCT	LRR	1	88 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGGCC	NBS	2
64 60	CGAACATTGA ATCTGGATGC	CGTTCAGAGA GACCAAGCCG	LRR	1	89 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGACC	NBS	2
65 60	TTGTTGCTCA AGTTTGAGAAC	CGGTTACAT GTATATTCAATG	LRR	1	90 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGTCC	NBS	2
66 60	GCCAACAAC TAG TTGATATTGAC	GGTTTGAGACA CCTGAAAGACC	LRR	1	91 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACGAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGCCC	NBS	2
67 60	GAACTCTGAAA CATGCCAAGGC	TGTTTGAGAAA ATTAACCTCGA	LRR	1	92 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACGAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2
68 68	TCGTCGTCTT CTTGCTTCTC	CGCAGCTCAC ACCATAACC	LRR	1	93 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACGAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2
69 70	GCTGGTGGACG TAATCGCTGACA	CTTCTCTCTCT TGCCCAAATCCC	NBS	1	94 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACCAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGGCC	NBS	2
70 50	GAATTCGGNGT NGNAAAACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGGCC	NBS	2	95 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACCAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGACC	NBS	2
71 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGACC	NBS	2	96 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACCAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGTCC	NBS	2
72 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGTCC	NBS	2	97 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACCAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGCCC	NBS	2
73 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACAAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGCCC	NBS	2	98 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACCAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2
74 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACAAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2	99 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACCAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2
75 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACAAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2	100 50	GAATTCGGNGTN GGNAAAACACTAC	GTCGACAGNGCN AGNNGNAGGCC	NBS	2

Fortsetzung Tab. 8.3

PK Temp (°C)	Sense [5'--3']	Antisense [5'--3']	Motiv	Ref	PK Temp (°C)	Sense [5'--3']	Antisense [5'--3']	Motiv	Ref
101 50	GAATTCGGNGTN GGNAAACTAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGACC	NBS	2	121 45	AGTTTATAATTY SATGCT	CTCTCGATTCAA AATATCAT	NBS	3
102 50	GAATTCGGNGTN GGNAAACTAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGTCC	NBS	2	122 45	TGTTACTGCTTT GTTTGGA	TACATCATGTGT TACCTCT	NBS	3
103 50	GAATTCGGNGTN GGNAAACTAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGCCC	NBS	2	123 45	TGCTAGAAAAGT CTATGAAG	TCAATCATTCT TTGCACAA	NBS	3
104 50	GAATTCGGNGTN GGNAAACTAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2	124 45	AGCCAAAGCCAT CTACAGT	AACTACATTCT TGCAAGT	NBS	3
105 50	GAATTCGGNGTN GGNAAACTAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2	125 45	AGCCAAAGCCAT CTACAGT	CCGAGCATAAG TTGCTG	NBS	3
106 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACCAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGGCC	NBS	2	126 45	AGCGAGAGTTGT ATTTAAG	AGCCACTTTTGA CAACTGC	NBS	3
107 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACCAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGACC	NBS	2	127 45	GGTGTTCATAA CATACTGCC	TCAACCTGCTCA GATGTAGTGG	LZ	4
108 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACCAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGTCC	NBS	2	128 45	TGGAGAGTTCCC TACACTGAG	TTCTCTTCAAGG TAGTTGGCAG	LZ	4
109 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACCAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGCCC	NBS	2	129 45	CCTCCTTTTCTC ACCTCACTTCGC	ATTTGTGGCCAG TATTTCCC	LRR	4
110 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACCAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2	130 45	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAGXGYXAGXGG XAGXCC	NBS	5
111 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACCAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2	131 45	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAGXGYXAGXGG XAAXCC	NBS	5
112 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACTAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGGCC	NBS	2	132 45	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAGXGYXAAXGG XAGXCC	NBS	5
113 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACTAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGACC	NBS	2	133 45	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAAXGYXAGXGG XAGXCC	NBS	5
114 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACTAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGTCC	NBS	2	134 45	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAAXGYXAGXGG XAGXCC	NBS	5
115 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACTAC	GTCGACAGNGCN AGNGGNAGCCC	NBS	2	135 40	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAAXGYXAGXGG XAAXCC	NBS	5
116 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACTAC	GTCGACAANGCC AANGGCAAACC	NBS	2	136 40	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAAXGYXAAXGG XAGXCC	NBS	5
117 50	GAATTCGGNGTN GGNAAGACTAC	GTCGACAANGCC AANGGCAATCC	NBS	2	137 40	GGXGGXRTXGGX AAXACXAC	XAAXGYXAAXGG XAAXCC	NBS	5
118 45	ARXGCTARXGGX ARXCC	GGXGGXGTXGGX AAXACXAC	NBS	3	138 50	GGAATGGGNGGN GTNGGNAARAC	YCTAGTTGTRAY DATDAYYYTRC	NBS	6
119 45	AGTTTATAATTY SATGCT	ACTACGATTCA GACGTCCT	NBS	3	139 35	GGAATGGGKGA GTYGGYAARAC	ATCATAACTTAT TTTKAG	NBS	7
120 45	AGTTTATAATTY SATGCT	CACACGGTTTAA AATCTCA	NBS	3	140 50	GGXGGXTTYGGX ATHGXTWYAAR	AAATXCKXGCC ATXCCRAARTC	KIN	7
121 45	AGTTTATAATTY SATGCT	CTCTCGATTCAA AATATCAT	NBS	3	141 50	GGXATGGGXGGX GTXGGXAARACN	CCWRAXGGXRAX CGXRAXTTYCAX	NBS	8

Referenzen: 1 = Botella et al. 1997, 2 = SHEN et al. 1998, 3 = KANAZIN et al. 1996, 4 = SIMONS et al. 1998, 5 = LEISTER et al. 1998, 6 = YU et al. 1996, 7 = GENTZBITTEL et al. 1998, 8 = AARTS et al. 1998, Abkürzungen: PK = Primerkombination, LRR = leucinreiche Wiederholungen [*Leucine-rich repeats*], NBS = Nukleotidbindestellen [*Nucleotide-binding site*], TM = transmembran, KIN = Kinase, P-Loop = Phosphatbindeschleife, X = Inosin.

grau unterlegt: Primerkombinationen, mit denen ein Polymorphismus auf SMARTTM-cDNA amplifiziert wurde.

Tab. 8.4: RT-Primer für die potentiell differentiell exprimierten SSH- und RGA-Klone, Ubiquitin und MAPK.

Klon	Kürzel	Sense [5'--3']	Kürzel	Antisense [5'--3']	Temp (°C)
PI003	PI040rs	CCC CCC TAC CAC AAS TCC	PI040ras	CTG CGW GGG GGT GTT GG	60
PI010	RTPi010s	CGC AAA CTC ACC GAA GGT AGT AAC A	RTPi010as	ACT GGT ACT GCG AAC AAG ACA GAG C	60
PI016	PI045rs	GAG AGG ATA GGC ACG GAA CAG	PI045ras	AGG ACG GAT GGC AAT TTC G	60
PI027	PI049rs	ACT CGG GGA CGC AGC GCA	PI049ras	GGG CGC TGA GGG CTG AGG	65
PI028	PI050rs	TGC CGT GCS AAA ACC TGA	PI050ras	CAC AGA AWC ACG AAA TGA AGT	50
PI029	PI051fs	TAA AAC ACA CAA TGG GCA AG	PI051fas	TTT GCA GTG GAC TCT CCT ATT G	55
PI036	PI056rs	GTG TGT GAG AGA GAG AGA TGT	PI056ras	CCA CTC CAC TCT WTC TGC	60
PI073	RTPi073s	CCT TTC ACT TTT TCC CTT TTT CTC TCC	RTPi073as	GGG AAC AAG CTG ACA GGA GGT ATA CC	60
PI074	PI074fs	CAT GGA AGC CGA AAT CAA TC	PI074fas	TAC ATA CCA CAG GCC ACA GC	58
PI075	PI075s	AGC CCA TTG AGT GCT CTA CC	PI075as	CGA GGT ACC TTT CGC ATG AT	60
PI089	RTPi089s	AAG GCA CCC AGA CGA GAT GAA G	RTPi089as	CTT CAC CCA GTT CGC CGC TAC	60
PI109	PI109for	CGA GGA AGC AAA TAC CAC ATT CA	PI109rev	AAC TCA ACG AGG CAG AAG AAT CC	62
PI111	RTPi111for	CTA AAT CCG GTC GGT GCG AAT	RTPi111rev	CGG CCG AGG TAC AAG GAT GGA A	65
PI113	RTPi119s	GAA GTT GTC CGA TGG TAG CAT CCT T	RTPi119as	CCG CTC TTG GAA AAT TGT TAG AAC C	60
PI114	RTPi114a	ATG GCG TAG TAA TTG GGG AAC TTG T	RTPi114as	CTC CCC TAA CTG AAG AGC TTT GCT T	60
PI121	RTPi121s	TTG GAT ACG GAG GGA GTA AGC ATC T	RTPi121as	CCT CGC TCA AAC AAT CAT CAG CTA	60
Poly 4-1	RTPoly4s	AGT GAG ACA AAC AGG GAA GAC GAT G	RTPoly4as	CGT CTC ACA AAT AGC AAA GCG ATG T	60
Poly 4-2	RTAktinfor	TGT ACT TCC TTT CAG GTG GTG CAA T	RTAktinrev	CTG AAC GGG AAA TTG TCA GAG ACA T	
Poly 22	RTPoly22s	GCT GAG TCA ACA ACT GAG GAG CCTA	RTPoly22as	CAA TGT ACC CTG GAG GAG AGC CTA T	60
Poly 23	RTPoly23s	AGT ACA AAG ATC ACT TGA CCC ACA A	RTPoly23as	CAC TAG CTC TGA GAA CTG GGC AAA C	60
Poly 28	RTPoly28s	CAA GAG GTG AAA GGC GTA CTG T	RTPoly28as	CCG GTA CAC ATA CAA CAA TAA ACT G	60
Poly 39	RTPoly39s	AAT CTG CCG GGG ACA ATG GAG AAC	RTPoly39as	ATC TCA CCT CTT TTC AGT CGA ACT TCC A	63
Poly 48	RTPoly48s	GCA GGC TAG CTG CAT TCC TCT GTC T	RTPoly48as	TTG TTT ATT CTC CTT GAA CAC TCG GCA A	60
Poly 53	RTPoly53s	GTA CCC TGC GTG AGC ACC TAT ACA A	RTPoly53as	GAA ACT GCC CTT GAC AAC TGT GCT	60
Poly 94	RTPoly94s	CTC CGA TAC CTC AGC AAG AGA TGT G	RTPoly94as	GTC CAC CTC GTT TGG TCG CTA GT	63
Poly 103	RTPoly103s	GTG GGG AAA ACT ACA CTT GCC AAA C	RTPoly103as	AAC GGG ATT CAA GAC AAT GAG AGT G	60
Poly 129	P129s	ATC TTC AAA CAT TTC CTG CGC ATT CC	P129as	CTA AAT CCA CAC CTG AGA CAT CCT AT	60
Poly 134	RTPoly134s	GAG GAG GAA GGA CAA GCA ATC ATC G	RTPoly134as	TTG CCA ACA AAG CTT TCC AGA AAC A	60
Ubiquitin	Ubi-1 s	CCA AGA TGC AGA TCT TCG TGA	Ubi-1 as	TTC GCG ATA GGT AAA AGA GCA	56
MAPK	MAPKfor	GAA CGA GGT TCT CCA CTG TAA A	MAPKrev	TGC TTG GCA GGA TCA ACA CCT	60

Tab. 8.5: RACE – und iPCR der Klone Poly 4-1, Poly 85 und Poly103.

Klon	Kürzel	Sense [5'--3']	Kürzel	Antisense [5'--3']	Temp (°C)
Poly 4-1	RACEP4_3'	TACTATTAACAATGT GAGTGGACCAAAC	RACEP4_5'	TCACTAGACATCTCT GGCCAGGTCAA	63
	RACEP4_3'n	AGATTGCCGTCCTT GAGAACTTAA	RACEP4_5'n	ACCATATGTGCTGAG CCTGAAGAT	63
	P4-Prom	GGGTATCGCTTGCAG GTGTGGAC	RKCarin3'neu	GCTTGTCTCAGTTCC TGC	65
	P4-Prom_nest	AAGCCCAAGAAGTAA TATGTAGAGGAG	RKCarin3'n	GGCATGGTGAATTGC TCAGTGTAAT	63
Poly 85	copper_3'	TTTGGGAATTTGAGG CCGTTGC	copper_5'	AACCGCCCGGCTCGC CC	63
	copper_3'n	AAGTAGACGCCGTAG GGATGG	copper_5'n	TAAGGCGGCCATGGC GG	65
Poly 103	P103 3'iPCR	CGACAGGCACACATA ATTTTGACTC	P103 5'iPCR	TGTCTTGACCTCGT GAGCGTGA	65
	P103 3'niPCR	AATCCCGTTCCACCC ATGCTT	P103 5'niPCR	GGCTTGACATATCAG GTCTTTGAGAAA	62
	NBS-Bam	CCAGGCCGAGAAGAT ATGCAACT	P103_Prom	CAGTGAGTGCGTGAC AGCGATTCG	63
	NBS-Bamnest	TTGGCATTGGGCCTC CTCC	P103_Promnest	CCGAGAAGTCCAAC AGGCA	62

1	<u>TTCGGCCACT</u>	<u>GCTGTCCTAA</u>	<u>TCCGAATTTG</u>	<u>ATCGCAGTGA</u>	<u>CAGTCAGCTG</u>	
51	<u>AACATATTAT</u>	<u>TGCTTCCTGT</u>	<u>TCCACTCTAT</u>	<u>ATATGCATCC</u>	<u>TCTTCCTCCT</u>	
101	<u>TCGAAAAACA</u>	<u>GAGCAGAGCA</u>	<u>CATTTCACACT</u>	<u>CTTCACCATG</u>	<u>CTTCTCCTCC</u>	
151	<u>ACATATTACT</u>	<u>TCTTGGGCTT</u>	<u>CTCCTCTCAC</u>	<u>ACACCCCATG</u>	<u>CTGTGCTCT</u>	
201	<u>TGGTCCACAC</u>	<u>CTGCAAGCGA</u>	<u>TACCCTCAAC</u>	<u>CAAGGCCAAG</u>	<u>TGCGCCGTCG</u>	
251	<u>GCGAGAAGCT</u>	<u>TGTCTCGACG</u>	<u>AACGGCAAGT</u>	<u>ACGCACTCGG</u>	<u>CTTCTTCCAG</u>	
301	<u>CCTGCAATGA</u>	<u>GCACCATCAG</u>	<u>TAAGTCCCAG</u>	<u>AACACCACCA</u>	<u>GCTCCAGCTG</u>	
351	<u>GTACCTTGGC</u>	<u>ATATGGTTCA</u>	<u>ATAAGATCCC</u>	<u>GGTTTTTACT</u>	<u>GTGCTGTGGG</u>	
401	<u>TTGCTAATGG</u>	<u>GGATCAGCCC</u>	<u>ATCACCCGCC</u>	<u>CCAACCTCAA</u>	<u>CCTAACAAAG</u>	
451	<u>CTCAAGATAT</u>	<u>CAAGCGATGG</u>	<u>CAATCTTGTC</u>	<u>ATTGTACACA</u>	<u>CGATTCCGTA</u>	
501	<u>GTTTGGTCCA</u>	<u>CTCACATTGT</u>	<u>CAATAGTAGG</u>	<u>ACACAAACCA</u>	<u>GGAGCATAAA</u>	
551	<u>CACCACTACT</u>	<u>GGTGCCGCTG</u>	<u>TTCTCTTGAA</u>	<u>CAGTGGAAAC</u>	<u>CTTTCCTTAA</u>	
601	<u>CAGTCACAGA</u>	<u>GAGCCCATCA</u>	<u>TCATCGGACC</u>	<u>TACTGGTGTG</u>	<u>GCAGAGCTTC</u>	
651	<u>GATCACCCAA</u>	<u>TAGATATTGT</u>	<u>GCTTCCTGGT</u>	<u>GCCAAGTTTG</u>	<u>GTTGAAACAA</u>	
701	<u>GATCACCGGT</u>	<u>TTGAACCGTA</u>	<u>AGGGCGTCTC</u>	<u>AAAGAAGAGC</u>	<u>CTCATTGATC</u>	
751	<u>AGGGTCTCGG</u>	<u>CTCATAACAG</u>	<u>GTTGAACTAG</u>	<u>ACACCAGCGG</u>	<u>GCAGGTGCTC</u>	
801	<u>CTCAAGCGCA</u>	<u>TAAACCCCTC</u>	<u>AGTCGTCTAT</u>	<u>TGGCATTGGG</u>	<u>CATCCTCCAA</u>	
851	<u>AACATCATCA</u>	<u>TTGAAGCTTA</u>	<u>TACCAATACT</u>	<u>CAAGTCCACT</u>	<u>ATAGATCTGG</u>	
901	<u>ATCCACGCAC</u>	<u>CAAAGGCCTG</u>	<u>ATGAACCCTA</u>	<u>TATATGTTGA</u>	<u>CAATGACCAA</u>	
951	<u>GAGGAGTACT</u>	<u>ACATGTACAC</u>	<u>TTCGCCGGAG</u>	<u>GAATCATCGT</u>	<u>CTTCCCTGTT</u>	
1001	<u>TGTCTCACTA</u>	<u>GACATCTCTG</u>	<u>GCCAGGTCAA</u>	<u>GCTGAATGTT</u>	<u>TGGTCAGAAG</u>	
1051	<u>CCAACCTGTC</u>	<u>ATGGCAAACC</u>	<u>ATATGTGCTG</u>	<u>AGCCTGCCGA</u>	<u>TGCCTGCACT</u>	
1101	<u>CCAGCTGCTA</u>	<u>CCTGCGGACC</u>	<u>ATTCACAGTC</u>	<u>TGCAACGGCA</u>	<u>ATGCACAGCC</u>	
1151	<u>ATCCTGTGAT</u>	<u>TGTATGGAGG</u>	<u>GC</u>	<u>TTTTTCTCG</u>	<u>GAAGTCACCA</u>	<u>CAGGATTGGC</u>
1201	<u>AGTTTGATGA</u>	<u>TCGAACAGGA</u>	<u>GGATGCATCA</u>	<u>GGAACACGCC</u>	<u>TTTTCAATTGC</u>	
1251	<u>AGCACTCGTG</u>	<u>GTAACAACA</u>	<u>AAACATGACA</u>	<u>AGTTCAACAG</u>	<u>ACATATTCCA</u>	
1301	<u>CCCATTCT</u>	<u>CAAGTTGCAT</u>	<u>TACCCTACAA</u>	<u>CCCACAAAGC</u>	<u>ATTGATTCTG</u>	
1351	<u>CTACCACTCA</u>	<u>GAGCAAATGC</u>	<u>GAAGAAGCTT</u>	<u>GTCTCAGTTC</u>	<u>CTGCTCCTGC</u>	
1401	<u>ACTGCTTATT</u>	<u>CCTATAACAA</u>	<u>TAGCAGATGC</u>	<u>TATGTCTGGC</u>	<u>ATGGTGAATT</u>	
1451	<u>GCTCAGTGTA</u>	<u>AATCTGAATG</u>	<u>ATGGAAATGA</u>	<u>TAATAATTCT</u>	<u>AAAGATGCTC</u>	
1501	<u>TTTACCTTCG</u>	<u>CCTTGCCGCG</u>	<u>ACTGCVAAGT</u>	<u>TTGARAAAVA</u>	<u>GAAGARACAG</u>	
1551	<u>ACAAACATTA</u>	<u>GATTTGTAGC</u>	<u>TGCTGCMAGT</u>	<u>ATTATTGGTT</u>	<u>TTGGGTTACT</u>	
1601	<u>GGTGTGATG</u>	<u>CTGTTGGCAC</u>	<u>TGATTTGGAG</u>	<u>GAACAAATTC</u>	<u>AAGCCATTAT</u>	
1651	<u>ACAACAATCA</u>	<u>AGTTAGTGGT</u>	<u>GGTGGGATTA</u>	<u>TGGCCTTTAG</u>	<u>ATACACTGAT</u>	
1701	<u>CTAGTTCGTG</u>	<u>CTACTAAVAA</u>	<u>CTTCTCAGAR</u>	<u>AAGCTCGGAG</u>	<u>GGGGTGGTTT</u>	
1751	<u>TGGTTCAGTA</u>	<u>TACAAAGGAG</u>	<u>TATTAACCG</u>	<u>CTCAACTAGT</u>	<u>ATAGCAGTGA</u>	
1801	<u>AAAGGCTTGA</u>	<u>TGGTGCCCCG</u>	<u>CAAGGTGAGA</u>	<u>AGCAATTCAG</u>	<u>GGCTGAGGTC</u>	
1851	<u>AGCTCAATTG</u>	<u>GA</u>	<u>CTGATCCA</u>	<u>ACATATTAAC</u>	<u>ATAGTAAAAAT</u>	<u>TGATCGGTTT</u>
1901	<u>CTGCTGCGAA</u>	<u>GGT</u>	<u>GATCACA</u>	<u>GGTTACTTGT</u>	<u>GTATGAACAC</u>	<u>ATGTTAAATG</u>
1951	<u>GTTCTCTTGA</u>	<u>TGGT</u>	<u>CGTCTA</u>	<u>TTTGAGAAGA</u>	<u>GCAATGCTGC</u>	<u>TGTTGCTGTC</u>
2001	<u>CTAAATTTGA</u>	<u>ACACCAGATA</u>	<u>TCAAATAGCC</u>	<u>TTAGGAGTTG</u>	<u>CCAAAGGATT</u>	
2051	<u>GTCTTACTTG</u>	<u>CGTCAGAGTT</u>	<u>GTACAAAATG</u>	<u>CATCATAACAT</u>	<u>TGTGACATTA</u>	
2101	<u>AGCCAGGAMC</u>	<u>ATACTCGTGG</u>	<u>RCGCMTCCTT</u>	<u>TGTTCCATAA</u>	<u>ATTGCAGATT</u>	
2151	<u>TCGGGTTAGC</u>	<u>AGCGTTTGTG</u>	<u>GGGAAGGGAT</u>	<u>TTTAGCCGAG</u>	<u>TTTCYACTA</u>	
2201	<u>CMTTCAGAGG</u>	<u>GACTGCTGGT</u>	<u>TATCYTGCC</u>	<u>CMGAGTGGCT</u>	<u>TAGTGGRGTT</u>	
2251	<u>GCAGTCACAC</u>	<u>CAAAATTKAC</u>	<u>SKTTWC</u>	<u>GGCT</u>	<u>TTGGTWTGGW</u>	<u>MTGCGGAAA</u>
2301	<u>CCTWTCMGGG</u>	<u>RGGGGRTTC</u>	<u>GGCCCYGSTG</u>	<u>TCCTATCCGR</u>	<u>ATTTGTYKCS</u>	
2351	<u>GTGRCACTCA</u>	<u>SCTGAMMWWT</u>	<u>TTTTCYTYCT</u>	<u>GTTCCCYCTW</u>	<u>WWWKSHCCC</u>	
2401	<u>CTYCCCCTTG</u>	<u>RAAAARRGSR</u>	<u>GGGCMTTYCC</u>	<u>CYCTTYCCTG</u>	<u>BTTT</u>	

Abb. 8.4: Nukleotidsequenz des verlängerten Klons Poly 4-1.

grau unterlegt: 5'-Sequenzinformation aus iPCR, nicht unterstrichen: ursprüngliche Sequenzinformation, schwarz unterlegt: 3'-Sequenzinformation aus iPCR.

```

1 GGACACTGAC ATGGACTGAA GGAGTARACR MCACCTATTC CACCTCCGGC ACTCCGGCTT
61 GCCTGTTGGA CTTCTCCGGC ACCACCGCAG CTCCTCCCTT CGAATCGCTG TCACGCACTC
121 ACTGACTCAC TCTCACTTGC AGCACGCGAG CAGGCTATTG AGTTGAGCTA ACAGCAGAAG
181 GAGCCTCGCC ATTGAGATGT CTGCACCAAT CATCAGCGCC ACCATGGGGG CGATGAACAC
241 CCTCATCGGC AAGCTCGCCG CACTGATGGG TGACGAGTAC AAGAAGCTCA CGTCCGTCAG
301 AAAGCAGGCC TCGTTCCTCA AGGATGAGCT TAGCGCCATG AAAGCTCTCC TTGAGAAGCT
361 TGAGCTCATG GATGAACTGG ATCCCTTGGC CAAGAACTGG AGGGATCATG TCAGGGAGAT
421 GTCCTACGAC ATGGAGAATT GCATCGATGA CTTTCATGCGA GACCTTGGAG GTGCCGATGC
481 AGATGGGCTT TATAAAGAAG ACGGCTAAAC GTCTCAAGAC GCTACGGAAG CGCCATATTG
541 CTGATCGGAT GGAAGAGCTC ACGGTCCTTG CTTTTCGCAAGC AAATGAACGA CGCATGAGGT
601 ACAAGATTGA CGATTGTACC GATTCTACCG CTCGTGTCGT TCCCGTCGAT ACTCGATGTT
661 CGATCTACAA GCAGGCAGCA AGTCTTGTAG GTATTGATGG CCCAAAGAAC GAGCTTGATA
721 TGGTTGACAG ATACTCAGGA AAACCTCAAG GTGGTGGCTA TTGTTGAATT CGGGGTGGGG
781 AAAACTACAC TTGCCAAACA AGTATATGAT ATGATTAATA GGCAATTTAG GTGTAACAACA
841 TTTTATCAG TTTCTCAAAG ACCTGATATG TCAAGCCTTC TTGGTCGTCT TCAATCGAAG
901 TTTAAGATGA AAGAGGAGTT RACTCACGCT CACGAGGTGC AAGACATTGT TGGCCGTCTT
961 AGAGAATATC TCACACATAA GAGGTACCTA TTTTGTCTAA ATTGACACAT GTGCACTTGA
1021 GTAGTTATAG ACGTTTAGAG GAGTGTCTCT TGAATGGACG ACAGGCACAC ATAATTTTGA
1081 CACTCTCATT GTCTTGAATC CCGTTCACC CATGCTTGAC GCCCTCCGTG TTGTCATGGG
1141 TCCCGCCTCG CACTGTCGAC AACCAAAGAT GGGAAAGAAA GAGGATTTTT TTTCCAAGAN
1201 AAATGATTG ATGTAGAATT AGAGATCACT AGARAGTACT TCCTCTGTAC CATAATGATT
1261 GTACTTGGGA AGAACTAGTC CCCAACTACA GTTATTTAGG TACAAAGGGA GTAAAAATAC
1321 AAAATCCATT GAATAADADA GGCGCCGCTA GAAGAHAGAA TGGCATGATC TTCATTTGAG
1381 ATAAGTAATA CTACCAGGCC GAGAAGATAT GCAAACCTTTA GATGGGGGTA TGADAGGGAG
1441 AAGTGTGGCG CTTAATTTGC TCTTATTTCT CTATTGAGTA TGTAAGTAA GTTGAATTAA
1501 AGAGTTACAA CDDRATTAT GGCCATCAGA TATTAGAGAT TGATCGATGG CTAAGATTAG
1561 TTGGATCCTA GAAAATTGGT ACTTGATGA GTACATARVT TGGTACTTTA TTTTATTGTA
1621 TAA

```

Abb. 8.5: Nukleotidsequenz des verlängerten Klon Poly 103.

grau unterlegt: Sequenzinformation aus 5'-RACE, nicht unterstrichen: ursprüngliche Sequenzinformation, schwarz unterlegt: Sequenzinformation aus iPCR.

```

Poly85      MAAMKAALLAVAAMAALLGAASAATYTVGEPGGSWTLTDYDYSKWVSDKKFNVGDEIVFKY 60
AAD10251    MAAMKITLLAVAAMAALLGTASAVTYNVGEQGGWTLNTDYSSWVSGKKFNVGDEIVFKY 59
          ***** :*****:***.**.*** ** *****:****.***.*****

Poly85      TTPTHDVVEVSKAGYDSCSTDGSIKPLNSGNDVVRLTAAGTRYFICGIPTHCNPAAAASM 120
AAD10251    SSSAAHDVVEVSKAGYDSCSIDGAINTEFKSGNDVIPLSATGTRYFICGITGHCSPTAAAASM 119
          :.:***** **::.:*****: *::*****. **.*:*****

Poly85      KVVIEVSGSSSPSPMPAAGPGASNSPPAPPSSAATSVGATAGFGLVALLAAGLMAWTP 180
AAD10251    KVMIDVASGSSSPSPMPAAGPGASNSPPAPPSSAATSVGATAGFGLVALLAAGLMA--- 176
          **:*.*.*****

Poly85      MLITCWAHI- 189
AAD10251    -----

```

Abb. 8.6: Alignment von POLY 85 und AAD10251 (Weizen-Homolog).

eingerahmt: Kupfer-Bindedomäne

CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name	Carin Jansen
Geburtsdatum	23.08.1974
Geburtsort	Würselen
Familienstand	ledig

Schulbildung

August 1980 – Juli 1984	Katholische Grundschule Teveren
August 1984 – Mai 1993	Bischöfliches Gymnasium St. Ursula in Geilenkirchen

Studium und Beruf

Oktober 1993	Beginn des Studiums der Biologie an der RWTH Aachen
Januar 1998 – Dezember 1998	Diplomarbeit bei Prof. Schuphan am Institut für Ökologie, Ökochemie und Ökotoxikologie der RWTH Aachen
Dezember 1998	Erhalt des akademischen Grades einer Diplombiologin
Mai 1999 – April 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen
seit Mai 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Arbeitsgruppenleiterin) am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen