

**Untersuchungen zum Resistenzmechanismus
der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegenüber dem
Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)**

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

Tag der Disputation:

16.12.2005

Vorgelegt von

Diplom-Biologin Katja Leib

aus Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Edwin Pahlich

Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer

1 Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Eckey, C., Korell, M., Leib, K., Biedenkopf, D., Jansen, C., Langen, G., Kogel, K.-H. (2004) Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: Functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* 55: 1-15

Leib, K., Hensel, G., Ciolkowski, I. Biedenkopf, D., Langen, G., Kumlehn, J., Kogel, K.-H. (in preparation) Ectopic expression of transcription factors *HvWRKY1* and 2 in barley enhances susceptibility to powdery mildew.

INHALTSVERZEICHNIS

I

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Gerste-Mehltau Pathosystem.....	1
1.2	Abwehrmechanismen von Pflanzen gegenüber Mikroorganismen	4
1.3	Die Rassenunspezifische Resistenz der Gerste gegen Bgh: mlo	9
1.4	Signaltransduktion nach Pathogenbefall	10
1.5	Pflanzliche Transkriptionsfaktoren	13
1.6	WRKY-Transkriptionsfaktoren.....	17
1.7	Ziele der Arbeit.....	22
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Chemikalien	24
2.2	Software und Datenbanken.....	24
2.3	Pflanzenmaterial	26
2.4	Pathogene.....	27
2.4.1	Echter Gerstenmehltaupilz.....	27
2.4.2	Echter Weizenmehltaupilz	28
2.4.3	<i>Piriformospora indica</i>	28
2.5	Behandlung des Pflanzenmaterials.....	29
2.5.1	Inokulation mit <i>Blumeria graminis</i>	29
2.5.2	Inokulation mit <i>Piriformospora indica</i>	29
2.5.3	Verwundung.....	29
2.5.4	Pflanzenorgane.....	30
2.5.5	Epidermismaterial	30
2.6	Isolierung von Gesamt-RNA	30
2.7	Isolierung von genomischer DNA.....	31
2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	32
2.8.1	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	32
2.8.2	Nicht-denaturierende DNA-Gelelektrophorese	32
2.8.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	33
2.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	33
2.10	Überprüfung der Transformation	34
2.10.1	Kolonie-PCR.....	34
2.10.2	Restriktions-Endonukleaseverdau	35
2.10.3	Sequenzierung.....	35
2.11	Isolierung von Plasmid-DNA	36
2.11.1	Mini-Präparation.....	36
2.11.2	Midi-Präparation.....	36
2.11.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.12	Untersuchung der Genexpression auf Transkriptionsebene	36
2.12.1	Herstellung von cDNA (<i>complimentary DNA</i>).....	36
2.12.2	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	36
2.12.3	<i>One-Step</i> RT-PCR	37
2.13	Untersuchung der Genexpression auf Translationsebene	38
2.13.1	Antikörper	38
2.13.2	Proteinisolierung	39
2.13.3	Western Blot	39
2.13.4	ELISA (<i>enzyme linked immunoabsorbent assay</i>).....	42
2.14	Klonierungsstrategien	44
2.15	Genfunktionsanalysen durch transiente Transformation: RNA-Interferenz (RNAi) und Überexpression	46
2.15.1	Herstellung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)	47
2.15.2	Präparation und Beschichtung der <i>microcarrier</i>	48

INHALTSVERZEICHNIS

II

2.15.3	Transiente Transformation mittels <i>particle inflow gun</i>	49
2.15.4	Mikroskopische Auswertung	49
2.16	Subzelluläre Lokalisation eines Fusionsproteins.....	50
2.17	Transgene Pflanzen	51
2.17.1	Southern Blot	52
2.18	MAPKKK-Inhibitor	55
2.19	EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	56
2.19.1	Klonierung in den Expressionsvektor pQE30.....	56
2.19.2	Überprüfung der Expression des rekombinanten Proteins.....	57
2.19.3	Extraktion des rekombinanten Proteins	57
2.19.4	Auftrennung der Proteine	58
2.19.5	Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide.....	59
2.19.6	Herstellung der Sonde, Bindereaktion und Gellauf	59
2.20	Promotorsequenzen.....	61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	In silico Analyse der Sequenzen von WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerste	62
3.2	Charakterisierung der Promotorregion von HvWRKY1, Poly85 und der putativen Phytochelatinsynthase.....	70
3.3	Heterologe Expression von HvWRKY1 in E. coli und electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	75
3.4	Untersuchung der Expression Bgh-responsiver Gene mittels RT-PCR nach Inokulation mit verschiedenen Pathogenen und Verwundung	77
3.5	Untersuchung der Bindungsspezifität der Antikörper gegen HvWRKY1 und gegen die WRKY-Domäne mittels Western Blot und ELISA	86
3.6	Transiente Überexpression und RNAi mit Bgh induzierten Genen	94
3.6.1	Überexpression und RNAi von WRKY-Transkriptionsfaktoren	95
3.6.2	Überexpression und RNAi von weiteren <i>Bgh-responsiven Genen</i>	107
3.7	Charakterisierung von transgenen HvWRKY1 RNAi Gerstenpflanzen... ..	113
3.8	Subzelluläre Lokalisation von HvWRKY1 und 2.....	120
3.9	Wird HvWRKY1 über einen MAPK-Signalweg reguliert?	123
4	DISKUSSION	127
4.1	WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerste	127
4.2	Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren.....	129
4.2.1	Regulation auf Transkriptionsebene	130
4.2.2	Regulation auf Translationsebene	143
4.2.3	Regulation durch MAP-Kinasen	147
4.3	Funktionsanalyse von WRKY-Faktoren mittels particle bombardment... ..	151
4.3.1	Vor und Nachteile der Methode der transienten Transformation.....	151
4.3.2	Überexpression und RNA-Interferenz von Kandidatengenen	152
4.3.3	RNAi und Überexpression von WRKY-Transkriptionsfaktoren.....	153
4.3.4	Der Effekt von <i>mlo</i> auf WRKY-Faktoren	155
4.3.5	<i>Knock-down</i> und Überexpression weiterer <i>Bgh-responsiver Gene</i>	157
4.3.6	<i>Knock-down</i> von <i>HvWRKY1</i> : Transgene Gerstenpflanzen	160
4.4	Lokalisation von WRKY-Transkriptionsfaktoren im Nukleus	163
4.5	Ausblick.....	165
5	ZUSAMMENFASSUNG	168
SUMMARY		169
6	LITERATURVERZEICHNIS	170
7	ANHANG	185
7.1	Primersequenzen	185

INHALTSVERZEICHNIS

III

7.2	Vektorkarten.....	188
7.3	Übersicht über transgene HvWRKY1-RNAi-Gerstenpflanzen.....	190

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Acc. Nr.	<i>accession</i> Nummer
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
Amp	Ampicillin
as	<i>antisense</i> (Primer)
A. th.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCI	<i>barley chemically induced</i>
Bgh	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
Bgt	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> (Echter Weizenmehltau)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>base pair</i>
ca.	circa
cDNA	<i>complementary-DNA</i>
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester, Bion [®]
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
cIR	chemisch induzierte Resistenz
cv.	<i>cultivar</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d. h.	das heißt
DNA	<i>2'-desoxy-ribonucleic acid</i>
dNTP	2'-desoxy-Nukleosidtriphosphat
dpi	Tage post Inokulation
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

V

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>et. al.</i>	<i>et altera</i>
etc.	et cetera
f. sp.	<i>forma specialis</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GOI	<i>gene of interest</i>
GP	Golden Promise
hpi	<i>hours post inoculation</i>
hpt	<i>hours post treatment</i>
HR	Hypersensitive Reaktion
Hrsg.	Herausgeber
i. d. R.	in der Regel
IR	Induzierte Resistenz
JA	Jasmonat
JLU	Justus-Liebig-Universität
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
LB-Medium	Luria-Bretani-Medium
LB	<i>large bleeding</i>
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeJa	Methyljasmonat
min	Minuten
mind.	mindestens
MOPS	4-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBS	<i>nucleotide binding site</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VI

OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
ORI	<i>origin of replication</i>
PAT	Phosphinothricin Acetyltransferase
PBS/T	<i>phosphate buffered saline/tween</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDNA	Plasmid-DNA
PR	<i>pathogenesis-related</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
ROI	<i>reactive oxygen intermediate</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	<i>sense</i> (Primer)
sek	Sekunden
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SE	<i>standard error</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
u	<i>unit</i>
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
wpi	Wochen post Inokulation
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

2 EINLEITUNG

Eine deutliche Ertragssteigerung im Pflanzenanbau gewinnt im Angesicht der wachsenden Weltbevölkerung und der gleichzeitig steigenden Ansprüche an die Nahrungsmittelqualität stark an Bedeutung. Das Wachstum der für den Ackerbau erschlossenen Flächen wird in Zukunft in einigen Gebieten der Erde u. a. durch Erosion, Versalzung und Verunreinigung mit Chemikalien zum Stillstand kommen oder abnehmen (FAO *Word agriculture towards 2015/2030, an FAO perspective*, Kap. 4). Die deshalb nötige Intensivierung der Landwirtschaft durch Anpflanzen von Monokulturen ertragsreicher Kultivare führt jedoch gleichzeitig zu einer verstärkten Ausbreitung von Pathogenen und damit wiederum zu Ertragsverlusten (FAO *Word agriculture towards 2015/2030, an FAO perspective*, Kap. 11.2). Für die Jahre 1991-1993 wurde ermittelt, dass es mit Hilfe von Schutzmaßnahmen gelang, weltweit die potentiellen Ertragsverluste der Gerstenproduktion von um 16,2 % zu reduzieren (Oerke und Dehne, 1997). Diese Maßnahmen werden aber auf lange Sicht kaum ausreichen, um mit dem Bevölkerungswachstum Schritt zu halten. In Westeuropa beträgt trotz Einsatz moderner Pflanzenschutzmittel der geschätzte Anteil von Pathogenen an den potentiellen Gesamtverlusten 17,5 %. Daher ist es nötig, neue Pflanzenschutzkonzepte zu entwickeln, um den ökologisch und auch ökonomisch oft umstrittenen Einsatz von Pestiziden zu reduzieren (FAO *Word agriculture towards 2015/2030, an FAO perspective*, Kap. 11. 2, 12.1). Ein wichtiger Aspekt dabei ist, detailliertes Grundlagenwissen über die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen zu gewinnen, um auf lange Sicht widerstandsfähige und trotzdem ertragreiche Kultivare zu erzeugen.

2.1 Gerste-Mehltau Pathosystem

Gerste (*Hordeum vulgare* L., Abb. 1.1 A) gehört innerhalb der monokotylen Pflanzen zur Familie der *Poaceae* (Süßgräser). Sie ist eine der wichtigsten Kulturpflanzen, weltweit steht ihr Anbau nach Weizen, Reis und Mais an vierter Stelle. In Deutschland wurden 2002 13,4 Mio. Tonnen Gerste produziert, innerhalb der EU 47,3 Mio. Damit ist die EU der größte Gerstenproduzent (Coceral, Staatliches Bundesamt, 2003). Weltweit wurden 1997 bis 1999 139,9 Mio. Tonnen Gerste auf einer Fläche von 58, 6 Mio. ha produziert (FAO *Word agriculture towards 2015/2030, an FAO perspective*, Anhang, Tab. A 4.4) In Europa wird sowohl

Sommer- als auch Wintergerste angebaut. Neben der Nutzung als Nahrungsmittel (Brot, Graupen) spielt sie eine wichtige Rolle als Futtermittel und in der Bierproduktion. Das Genom der Gerste ist diploid mit $2n = 14$ Chromosomen und ca. 5400 Mb groß (Graner und Altschmied, 2001).

Eines der wichtigsten Gerstenpathogene ist der Echte Gerstenmehltau *Blumeria* (synonym: *Erysiphe*) *graminis* f. sp. *hordei* (Bgh, Thordal-Christensen *et al.*, 1999). Dieser Pilz gehört zur Abteilung der *Ascomycota*, Klasse *Plectomycetes*, Ordnung *Erysiphales*, Familie *Erysiphaceae*. *Blumeria graminis* ist weltweit verbreitet und befällt neben Gerste auch andere Gräser. Es gibt mehrere Spezialformen (*formae specialis*, f. sp.), die jeweils auf eine oder mehrere Arten spezialisiert sind, so z. B. f. sp. *hordei* auf Gerste und f. sp. *tritici* auf Weizen. Ferner gibt es verschiedene Rassen, die sich hinsichtlich ihrer Virulenz unterscheiden. *Blumeria graminis* ist ein obligat biotropher Ektoparasit, der sich über spezielle Ernährungsorgane, so genannte Haustorien (Abb. 1.1. B), ernährt. Besonders bei relativ feuchtem und mäßig kühlem Klima, sowie hoher Stickstoffdüngung, vermehrt sich der Pilz auf der Blattoberfläche und bildet ein weißliches Myzel (Abb. 1.1 B). Die Besonderheit von *Blumeria graminis* liegt darin, dass die Konidien des Pilzes auch unter trockenen Bedingungen keimen können, während andere Pilze dazu eine Luftfeuchtigkeit von nahezu 100 % benötigen (Thordal-Christensen *et al.*, 1999). Der Befall führt zu einem verminderten Ertrag aufgrund reduzierter Kornzahl pro Ähre.

Die Verbreitung des Pilzes erfolgt auf vegetativem Weg mittels haploider Konidien, die innerhalb von zwei Stunden nach Erreichen einer Gerstenblattoberfläche mit einem primären Keimschlauch auskeimen. Dieser dient der Wirtserkennung, der Anhaftung auf dem Blatt und der Wasseraufnahme (Craver und Ingerson, 1987, Pryce-Jones *et al.*, 1999). Ein sekundärer Keimschlauch wird innerhalb von vier bis acht Stunden nach Inokulation ausgebildet, der sich an seinem Ende zu einem Appressorium verdickt. Die Ausbildung dieser Struktur ist unabhängig davon, ob es sich um eine kompatible oder inkompatible Interaktion handelt. Durch Erzeugung mechanischen Druckes und das Ausschütten lytischer Enzyme (Zellulasen, Kutinasen) ist es dem Pilz möglich, die pflanzliche Zellwand mit Hilfe eines Penetrationskeils am Ende des Appressoriums zu durchdringen. Wird diese Penetration durch die Pflanze verhindert, geht dies meist mit der Bildung einer Zellwand-Apposition, einer so genannten Papille (Abb. 1.1 F), einher. Der Pilz kann dann noch maximal zwei weitere apressoriale Loben bilden, die aber in der Regel

nicht in die Zelle eindringen können (Craver, 1986, Kunoh *et al.*, 1988). Nach erfolgreicher Penetration der Zellwand kommt es zur Ausbildung eines fingerförmigen Haustoriums (Abb. 1.1 E), dem Ernährungsorgan des Pilzes. Dieses dringt nicht ins pflanzliche Zytoplasma ein, sondern befindet sich im Apoplasten. Es ist umgeben von der veränderten pflanzlichen Zellmembran, der sogenannten extrahaustorialen Membran. Konnte das Haustorium erfolgreich etabliert werden, beginnt die Ausbildung von sekundären Hyphen (*elongated secondary hyphae*, ESH, Abb. 1.1 D). Diese bilden sekundäre Appressorien und ermöglichen so die Etablierung weiterer Haustorien und die Ausbreitung des Pilzes auf dem Blatt. Unter optimalen Bedingungen ist der Entwicklungszyklus nach fünf bis sechs Tagen mit der Bildung von senkrecht stehenden Sporenträgern abgeschlossen. An deren Oberfläche schnüren sich reife Konidien ab, die mit dem Wind verbreitet werden, um neue Pflanzen zu infizieren.

Gegen Ende der Wachstumsperiode erfolgt die geschlechtliche Fortpflanzung des heterothallischen Pilzes. Es bilden sich bräunliche Kleistothezien (Fruchtkörper, Abb. 1.1 B) mit bis zu 25 Asci (Abb.1.1 C), die nach einer Meiose jeweils acht haploide Ascosporen enthalten. Die Fruchtkörper dienen als Überdauerungsorgane. Die Freisetzung der Ascosporen erfolgt im nächsten Frühjahr durch Quellen und anschließendes Aufplatzen der Kleistothezien (Agrios, 1997, Schlösser, 1997).

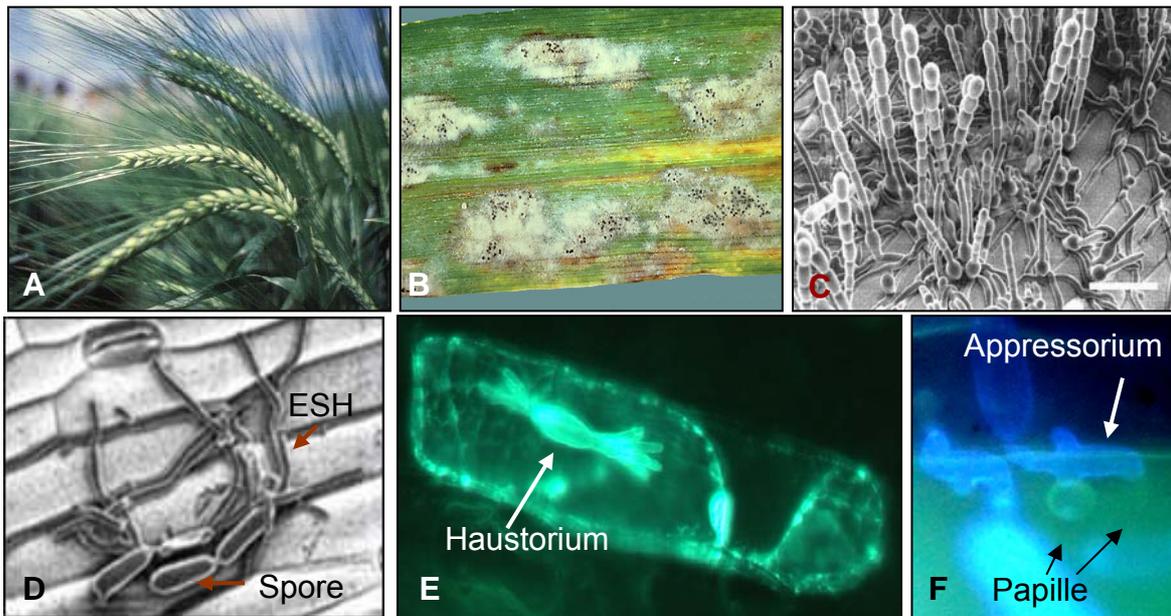


Abb. 1.1 Das Pathosystem Geste – Echter Gerstenmehltaupilz **A**: Die Ähren der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in unreifem Zustand (Quelle: <http://res2.agr.gc.ca/brandon/images/Photos/barley.jpg>) **B**: Aufnahme eines von *Blumeria graminis* befallenen Gerstenblattes. Auf dem hell gefärbten Myzel sind einige Kleistothezien als schwarze Punkte erkennbar (Quelle: <http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/cultivarmixtures/Images/barleypowdery.jpg>) **C**: Elektronenmikroskopische Aufnahme einiger Asci des Echten Gerstenmehltaupilzes mit jeweils acht Ascosporen (Quelle: http://www.biology.ox.ac.uk/index_files/Mildew%20Spores.jpg) **D**: Elektronenmikroskopische Aufnahme von gekeimten, zum Teil noch zusammenhängenden Ascosporen mit sekundären Hyphen (*elongated secondary hyphae*, ESH, Quelle: http://www.scri.sari.ac.uk/SCRI/Web/MultimediaFiles/POWDERY_MILDEW.JPG) **E**: UV-lichtmikroskopische Aufnahme einer mit GFP transformierten Epidermiszelle eines Primärblattes. *Bgh* hat die Zelle erfolgreich penetriert und ein fingerförmiges Haustorium etabliert (Quelle: Eckey, IPAZ Gießen) **F**: UV-lichtmikroskopische Aufnahme eines gestoppten Penetrationsversuches von *Bgh* auf einer mit GFP transformierten Epidermiszelle. Pilzliche Strukturen wurden mit Calcofluor angefärbt. Das Appressorium hat neben dem ersten Penetrationsversuch noch zwei weitere durchgeführt, die alle durch eine Papille erfolgreich gestoppt wurden. Die Papillen sind an ihrer im UV-Licht bräunlichen Färbung erkennbar (Quelle: Eckey, IPAZ Gießen).

2.2 Abwehrmechanismen von Pflanzen gegenüber

Mikroorganismen

Basisinkompatibilität und Basiskompatibilität

Nicht immer gelingt einem potentiell pathogenen Mikroorganismus die Besiedlung der jeweiligen Pflanze. Diese Inkompatibilität führt dazu, dass sich der Mikroorganismus nicht auf der Pflanze vermehren kann. Das ist im Gegensatz zur kompatiblen Interaktion die weitaus häufigere Form der Interaktion. Sie wird auch

als Basisresistenz bezeichnet und kann verschiedene konstitutive Ursachen haben, beispielsweise mechanische Barrieren (Kutikula, Zellwand), das Fehlen von Strukturen für die Erkennung durch den Pilz oder antimikrobiell wirkende biochemische Stoffe. Auch unterschiedliche Umweltansprüche von Mikroorganismen und Pflanze können eine Besiedlung verhindern (Agris, 1997, Schlösser, 1997). Man spricht hierbei von einer Nicht-Wirts-Resistenz, die rassen-sortenunspezifisch und dauerhaft ist. Oft erkennt die Pflanze das Pathogen direkt an Hand bestimmter Strukturen oder Stoffe, so genannter Elizitoren, und reagiert mit einer Resistenzantwort. Gelingt es dem Pilz, diese konstitutiven oder induzierbaren basalen Schutzmechanismen zu umgehen, so spricht man von einer Basiskompatibilität. Die Pflanze ist prinzipiell anfällig gegenüber dem Pathogen. Im Laufe der Evolution war es vielen Pflanzen möglich, ihre Resistenz gegenüber dem Pathogen wiederherzustellen. Man spricht in diesem Fall von einer Wirtsresistenz oder kultivarspezifischen Resistenz. Meist ist diese Resistenz rassen-sortenspezifisch, auch qualitative oder vertikale Resistenz genannt. Diese Form der Resistenz lässt sich mit dem Gen-für-Gen-Modell von Flor (1971) erklären: Der Pflanze gelingt es auf Grund des Genproduktes eines Resistenzgens (*R*-Gens) das Pathogen anhand eines Avirulenzgenproduktes (*Avr*-Gen, z. B. ein Elizitor) zu erkennen und Abwehrmechanismen zu aktivieren (siehe unten). Da diese Form der Resistenz in der Regel monogenen Ursprungs (ein *R*-Genprodukt erkennt ein *Avr*-Genprodukt) ist, kann sie unter hohem Selektionsdruck innerhalb weniger Jahre von dem Pathogen überwunden werden. Dauerhafter hingegen ist die quantitative oder horizontale Resistenz, die multigenen Ursprungs ist und gegen einige, oft auch alle Rassen eines Pathogens wirkt. Allerdings ist sie nur in seltenen Fällen vollständig (Schlösser, 1997).

Resistenzgene

Pflanzenspezifische *R*(Resistenz)-Genprodukte erkennen spezifische pilzliche Elizitoren, die von Avirulenz-Genen (*Avr*) des Pathogens kodiert werden oder an deren Bildung *Avr*-Gene beteiligt sind. Durch diese Erkennungsreaktion wird eine Resistenzantwort der Pflanze ausgelöst. Das Modell wurde 1955 erstmalig von Flor postuliert. Die meisten *R*-Gene erkennen dabei nur ein oder wenige *Avr*-Gene. Da *Avr*-Gene trotz ihrer potentiellen Erkennung durch pflanzliche *R*-Genprodukte nicht durch Selektion eliminiert wurden, geht man davon aus, dass sie als

Suszeptibilitätsfaktoren für das Pathogen wichtige Proteine kodieren (Kjemtrup *et al.*, 2000). In einigen Fällen konnte nachgewiesen werden, dass Avr-Produkte die Resistenzantwort der suszeptiblen Wirtspflanze unterdrücken (Ritter und Dangl, 1996, Tsiamis *et al.*, 2000). Die große Bedeutung der R-Gene zeigt sich in ihrer großen Anzahl, in *Arabidopsis* sind ca. 125 R-Gene bekannt, in Reis sogar ca. 600 (Nimchuk *et al.*, 2003), wobei die genaue Funktion der meisten von ihnen unbekannt ist (Goff *et al.*, 2002).

Strukturell sind R-Proteine inhomogen. Allerdings enthalten die meisten eine so genannte NBS-LRR-Domäne (*nucleotide binding site - leucine rich repeat*). Mutationen der NBS-Domäne führen zum Verlust der Resistenzfunktion und zeigen demnach die funktionelle Bedeutung dieser Domäne (Tao *et al.*, 2000). Diese Proteine vom NBS-LRR Typ unterscheiden sich wiederum hinsichtlich ihrer N-terminalen Domäne: Einige besitzen eine CC-Domäne (*coiled-coiled*), andere eine TIR-Domäne, die eine Homologie zu Bereichen von TOLL-Rezeptoren aus *Drosophila* und zu IL-1 Rezeptoren aus Säugetieren aufweist. Diese Domänen dienen vermutlich der Protein-Protein Wechselwirkung. Aus anderen Proteinen ist bekannt, dass LRR-Domänen ebenso der Protein-Protein Interaktion (Kobe und Kajava, 2001) dienen. Im Kontext der R-Proteine vermitteln sie die Erkennungsspezifität (Ellis *et al.*, 2000). So konnte *in vitro* und in einem *yeast-two-hybrid* Versuch gezeigt werden, dass Avr-Pi-ta aus *Magnaporthe grisea* direkt an die LRR-Domäne von Pi-ta, einem putativen cytoplasmatischen Rezeptor, bindet (Jia *et al.*, 2000). Dies entspricht dem klassischen Rezeptor-Liganden-Modell, wonach R-Proteine als Rezeptoren für Avr-Proteine funktionieren und beide Moleküle direkt interagieren. Da sich aber nur selten eine direkte Interaktion von Avr- und R-Protein nachweisen ließ, geht ein anderes Modell davon aus, dass die Bindung über einen Ko-Rezeptor vermittelt wird, der das Avr-Genprodukt bindet und dann an das R-Protein andockt. Ein drittes Modell, die so genannte „Wächter-“ („*Guard*-“) Hypothese besagt, dass R-Proteine nicht direkt Avr-Produkte des Pathogens erkennen, sondern deren Wirkungen als Suszeptibilitätsfaktoren. Diese Hypothese wird z. B. dadurch gestützt, dass in den wenigen Fällen, in denen eine biochemische Funktion der Avr-Proteine nachgewiesen werden konnte, die durch R-Proteine ausgelöste Reaktion von der biochemischen Aktivität des Avr-Produktes abhängig war (Swiderski und Innes, 2001, Shao *et al.*, 2002).

Induzierte Resistenz (IR)

Mit induzierter Resistenz bezeichnet man das Phänomen, dass Pflanzen nach Befall mit einem virulenten oder avirulenten Pathogen gegenüber einer weiteren Infektion erhöhte Resistenz aufweisen (biologisch induzierte Resistenz, bIR). Diesen Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft, der bis zu mehreren Monaten anhalten kann, bezeichnet man auch als *priming* (Conrath *et al.* 2002). Bleibt diese induzierte Resistenz nicht auf den Bereich der Erstinfektion (LAR, *localized acquired resistance*) beschränkt, so spricht man von einer *systemic acquired resistance* (SAR, Ross, 1961, van Loon *et al.*, 1998). Erstmals beschrieben wurde dieser Mechanismus von Chester (1933) im System Tabak-Tabakmosaikvirus (TMV). Biologisch induzierte Resistenz kann auch durch nichtpathogene Rhizobakterien ausgelöst werden. In Abgrenzung zur SAR bezeichnet man diesen Mechanismus als *induced systemic resistance* (ISR, Pieterse *et al.*, 1998, van Loon *et al.* 1998).

Die SAR geht in mehreren untersuchten dikotylen Pflanzen mit einer Akkumulation von Salizylsäure (SA) und der Expression von PR-Genen einher (*pathogenesis related*, van Loon und van Strien, 1999, siehe unten). Diese Salizylsäureakkumulation ist entscheidend für die Resistenzausprägung, da in transgenen *NahG* Pflanzen, in denen eine Salizylsäure-Hydroxylase Salizylsäure abbaut, kein *priming* Effekt und keine SAR beobachtet werden kann (Gaffney *et al.*, 1993). Im Unterschied dazu ist die ISR in der Regel von Salizylsäure unabhängig, sie benötigt Komponenten der Jasmonat- und Ethylen-Signalwege (Pozo *et al.*, 2005). Es kommt zu keiner Induktion von PR-Genen (Pieterse *et al.*, 1996, Press *et al.*, 1997, Pieterse *et al.*, 1998).

Neben diesen Formen der biologisch induzierten Resistenz gibt es auch die chemisch induzierte Resistenz (cIR, Ryals, *et al.*, 1996, Sticher *et al.*, 1997, Beßer *et al.*, 2000). Hierbei wird die Resistenz durch exogene Zugabe von Salizylsäure oder durch ihre funktionellen Analoga 2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA) und Benzol-(1, 2, 3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester (BTH) induziert. Dieser Mechanismus ist sowohl in dikotylen als auch in monokotylen Pflanzen wirksam. In Gerste werden einige so genannte BCI-Gene (*barley chemically induced*) nach Behandlung mit den genannten Resistenzinduktoren exprimiert und dienen als Marker für die cIR (Beßer *et al.*, 2000). Alle diese Formen der induzierten Resistenz (bIR, cIR, SAR, ISR) sind abhängig von der Expression von NPR1/NIM1 (*nonexpressor of pathogenesis related genes 1/noninducible immunity 1*), das somit

eine Schlüsselrolle bei der Resistenzausbildung inne hat (Cao, *et al.*, 1994, Delaney *et al.*, 1995, Shah *et al.*, 1997). Es handelt sich bei NPR1 um ein Protein mit Homologie zu tierischen I κ B Proteinen (Ryals *et al.*, 1997). NPR1 wirkt als Transkriptionskoaktivator von an der Resistenzausbildung beteiligten Genen.

Komponenten der pflanzlichen Abwehr

Neben den oben erwähnten präformierten Komponenten der pflanzlichen Abwehr, die nicht erst durch den Kontakt mit dem Pathogen induziert werden, gibt es eine Reihe induzierbarer Mechanismen, die nebeneinander ablaufen können. Die Auslöser für diese Mechanismen sind pilzliche Elizitoren wie Chitin, Proteine oder auch Bestandteile der pflanzlichen Zellwand, die durch den Pilz aufgelöst wird (Blumwald, 1998, Somssich und Hahlbrock, 1998). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPS = *pathogen associated molecular patterns*, Zipfel *et al.*, 2004), die von der Pflanze erkannt werden.

Nach der Erkennung des Pilzes über spezifische Rezeptoren ist eine der ersten sichtbaren Reaktionen der Pflanzenzelle die Verstärkung der Zellwand unterhalb des pilzlichen Appressoriums, um ein Eindringen zu verhindern. Dabei werden lokal vermehrt die Zellwandbestandteile Kallose, Lignin, Suberin und polyhydroxyreiche Proteine eingelagert und bilden Zellwandappositionen, sogenannte Papillen (Thordal-Christensen *et al.*, 1999). Dabei kann eine erhöhte Zellplasmaaggregation unterhalb der Penetrationsstelle und eine Ausrichtung des Aktinzytoskelettes dorthin beobachtet werden (Kobayashi *et al.*, 1997). Auch der Zellkern wird in diesen Bereich verlagert (Opalski *et al.*, 2005). Es tritt eine Anreicherung von antimikrobiellen Stoffen wie Phytoalexinen und Phenolen auf (Hammond-Kosack und Jones, 1996, Scheel, 1998). Die Polymerisation der Zellwandbestandteile (*cross-linking*) geschieht durch eine Freisetzung von *reactive oxygen intermediates* (ROI, Brisson *et al.*, 1994) wie H₂O₂ und Superoxidradikalanionen. Sie üben gleichzeitig eine toxische Wirkung auf das Pathogen aus (Mehdy, 1994). Dieses auch *oxidative burst* genannte Phänomen wird durch eine NADPH-Oxidase in der Plasmamembran ausgelöst (Lamb und Dixon, 1997). Es wird diskutiert, ob ihm zusätzlich eine Rolle in der Signaltransduktion zukommt (Scheel, 1998, Hückelhoven und Kogel, 2003a).

Besonders bei einem Angriff von biotrophen Pilzen, die zur Ernährung auf lebende Pflanzenzellen angewiesen sind, ist die hypersensitive Reaktion (HR) eine erfolgreiche Strategie. Dabei sterben einzelne Zellen oder ganze Zellgruppen schnell, meist innerhalb von 24 h, ab (Buchanan *et al.*, 2000). Es handelt sich hierbei um einen aktiven Vorgang, der im Unterschied zur Nekrose von der Proteinbiosynthese abhängig ist (Yang *et al.*, 1993, He *et al.*, 1994, Schulze-Lefert und Vogel, 2000). Es kommt bei der HR zu Veränderungen des Zellstoffwechsels, inklusive einer Akkumulation von PR-Proteinen und von antimikrobiellen Stoffen, und zur Produktion von ROIs (Hammond-Kosack und Jones, 1996). Da es sich bei der HR um einen gesteuerten Vorgang handelt, wird dieses Phänomen auch als programmierter Zelltod (*programmed cell death*, PCD) bezeichnet.

Die Erkennung eines Pathogens führt zur Induktion einiger Gene, deren Produkte unter anderem zur strukturell und funktionell diversen Gruppe der PR-Proteine (*pathogenesis related proteins*, Gianinazzi *et al.*, 1970, van Loon und van Kammen, 1970) gehören. Bisher wurden 17 verschiedene PR-Proteinfamilien charakterisiert (PR-1 bis PR-17, Muthukrishnan *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2002; Collinge *et al.*, 2002). Dazu zählen z.B. lytische Enzyme wie Glukanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3, 8, 11) aber auch Proteinaseinhibitoren (PR-6) und Defensine (PR-12).

2.3 Die Rassenunspezifische Resistenz der Gerste gegen Bgh:

mlo

In den 30er Jahren wurde in Äthiopien eine Gerstenlinie entdeckt, die eine breite Resistenz gegenüber sämtlichen Rassen des Echten Gerstenmehltaupilzes besaß (Schulze-Lefert und Vogel, 2000). Diese rassenunspezifische Resistenz der Gerste wird durch eine Mutation im *Mlo*-Gen vermittelt. Dieses kodiert für ein ca. 60 kDa großes Protein in der Plasmamembran der Zellen, das über sieben Transmembrandomänen verfügt. Während sein C-terminales Ende im Cytoplasma liegt, befindet sich das N-terminale außerhalb der Zelle (Büschges *et al.*, 1997, Devoto *et al.*, 1999). Die Modulierung von Resistenzmechanismen durch *Mlo* wird Ca^{2+} -abhängig durch Calmodulin gesteuert (Kim *et al.*, 2002). Heterotrimere G-Proteine spielen dabei entgegen früheren Annahmen keine Rolle.

Die pflanzenspezifische Mlo-Proteinfamilie umfasst 15 Mitglieder in *Arabidopsis* und 13 in Reis. Im Unterschied zu den meisten Resistenz-vermittelnden Genen wird die Resistenz rezessiv vererbt (*mlo*) und entspricht nicht dem Gen-für-Gen-Modell von Flor (1971). Obwohl diese Resistenz einen monogenen Ursprung hat, ist sie 70 Jahre nach ihrer Entdeckung trotz ihres Einsatzes in der Züchtung noch dauerhaft (Stolzenburg *et al.*, 1984, Freialdenhoven *et al.*, 1996).

Die *mlo*-vermittelte Resistenz beruht vor allem auf einer Penetrationsresistenz. 60 Stunden nach Inokulation erfolgt ein massives Absterben von Mesophyllzellen (Piffanelli *et al.*, 2002). In der attackierten Epidermiszelle selbst kommt es allerdings nicht zu einer hypersensitiven Reaktion (Stolzenburg *et al.*, 1984). In den angegriffenen Zellen von *mlo-5*-tragenden Pflanzen akkumuliert H₂O₂ stärker als in *Mlo*-tragenden (Hückelhoven *et al.*, 1999, 2000, Piffanelli *et al.*, 2002). H₂O₂ spielt beim *cross-linking* der Zellwand während der Papillenbildung eine Rolle.

Diese Abwehrmechanismen sind dieselben wie in Wildtyppflanzen, allerdings laufen sie in *mlo*-tragenden Pflanzen viel schneller ab. Es wird daher postuliert, dass *Mlo* ein Suppressor allgemeiner Abwehrmechanismen wie z. B. des Zelltodes ist (Büchges *et al.*, 1997, von Röpenack *et al.*, 1998). Pflanzen, die *mlo* tragen, zeigen pleiotrophe Effekte wie spontane Papillenbildung und Chlorosen, sowie Nekrosen auf den Primärblättern (Wolter *et al.*, 1993, Peterhänsel *et al.*, 1997). Die Pflanzen sind gegenüber einigen anderen hemibiotrophen Pathogenen, wie *Magnaporthe grisea* und *Bipolaris sorokiniana*, suszeptibler als *Mlo*-Pflanzen (Jarosch *et al.*, 1999, Kumar *et al.*, 2001). Freialdenhoven *et al.* (1996) identifizierten zwei für die *mlo*-Resistenz nötige Loci, *Ror1* und *Ror2* (*required for mlo-specified resistance*). Mutationen in *Ror1* oder *Ror2* führen zu einem partiellen Verlust der *mlo*-vermittelten Resistenz. *Ror2* kodiert für ein Syntaxin der SNARE Familie und ist wahrscheinlich an der Vesikelfusion während der Exozytose beteiligt (Collins *et al.*, 2003). In *ror2*-tragenden Pflanzen ist die Akkumulation von H₂O₂ gestört (Hückelhoven *et al.*, 2000; Piffanelli *et al.*, 2002).

2.4 Signaltransduktion nach Pathogenbefall

Die Signalkette zur Aktivierung von Abwehrreaktionen beginnt mit der Erkennung eines Pathogens durch Bindung eines Elizitors an spezifische Rezeptoren. Dies führt zu einer transienten Veränderung der Permeabilität der Plasmamembran, Kalziumionen (Ca²⁺) und Protonen (H⁺) strömen in die Zelle, Chlorid- (Cl⁻) und

Kaliumionen (K^+) in den Apoplasten (Jabs *et al.* 1997; Zimmermann *et al.* 1997; Scheel 1998). Ca^{2+} -Ionen wirken dabei als *second messenger*. Sie werden an Calmodulin gebunden. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Calmodulins und ermöglicht die Bindung und Aktivierung weiterer Proteine. Dazu zählen beispielsweise Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (*calcium/calmodulin dependent protein kinases*, CDPKs). Auch Mlo (Kap. 1.5) wird über Ca^{2+} /Calmodulin reguliert (Kim *et al.*, 2002). Auf diesem Wege führt die Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen zu einer Aktivierung von membrangebundenen NADPH-Oxidasen und apoplastischen Peroxidasen und damit zum so genannten *oxidative burst*, d. h. der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxylradikalen ($\cdot OH$, Lamb and Dixon, 1997, Blumwald 1998, Somssich und Hahlbrock, 1998). Diese *reactive oxygen species* (ROI) wirken bei direktem Kontakt toxisch auf Pathogene, sie dienen aber auch der Vernetzung der Zellwand während der Papillenbildung und können selbst als Signalmoleküle dienen (Wu *et al.*, 1995, 1997, Hammond-Kosak und Jones, 1996, Jabs *et al.*, 1996, 1997, Greenberg, 1997). Daneben gibt es noch weitere Signalmoleküle, die an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind. Eines davon ist Stickstoffmonoxid (NO, Delledonne *et al.*, 1998, Durner *et al.*, 1998). NO scheint die Induktion der hypersensitiven Reaktion (HR) zu verstärken und die Expression verschiedener Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels, wie der Phenylalaninammoniumlyase (*pal*) und Chalconsynthase (*chs*) (Delledonne *et al.*, 1998) und PR-1 (Klessig *et al.*, 2000) zu induzieren. NO entfaltet seine Wirkung über den *second messenger* cyclisches GMP (cGMP, Durner *et al.*, 1998). Weitere Signalmoleküle der Interaktion Pflanze – Pathogen sind kleine monomere G-Proteine (Aharon *et al.*, 1998, Schultheiss *et al.*, 2002, Opalski *et al.*, 2005), 14-3-3 Proteine (Finnie *et al.*, 1999) und Phospholipiderivate wie Inosit-1,4,5,-triphosphat (IP_3 , Trewavas 2000). Neben diesen kleinen Signalmolekülen spielen auch die Phytohormone Salizylsäure (SA), Methyljasmonat (MeJa) und Ethylen eine wichtige Rolle (Dong, 1998, Reymond und Farmer, 1998, Pieterse und van Loon, 1999, Pozo *et al.*, 2005).

Als weiterer Schritt in der Signalübertragung werden verschiedene Proteinkinase aktiviert, besonders so genannte *mitogen activated proteine kinases* (MAPKs). Diese bilden Kaskaden aus drei nachgeschalteten Kinasen, was eine Verstärkung des Signals ermöglicht. Eine MAPK Kinase Kinase aktiviert eine MAPK Kinase und

diese wiederum eine MAPK. Letztere verfügen über ein großes Spektrum an Zielgenen wie z. B. Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Zytoskelettproteine (Jonak *et al.*, 2002). Aus Tabak ist bekannt, dass die MAPKs SIPK (*salicylic acid induced protein kinase*) und WIPK (*wound induced protein kinase*) nach Pathogenbefall induziert werden und einen der HR-ähnlichen Zelltodmechanismus auslösen können. Außerdem führen sie zur Synthese von Jasmonat und verhindern die Expression von Auxin-responsiven Genen (Zhang und Klessig, 2001). Asai *et al.* (2001) konnten eine MAPK-Kaskade in *Arabidopsis* identifizieren (MEKK1, MKK4/MKK5, MPK3/MPK6), welche die Aktivierung eines Rezeptors durch den Elizitor Flagellin mit der Aktivierung von zwei WRKY-Transkriptionsfaktoren (WRKY22 und WRKY29) verknüpft. Generell führt die Signaltransduktion nach der Erkennung eines Pathogens über Verstärkungsmechanismen zur Aktivierung oder auch Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Veränderung der Genexpression nach Pathogenbefall schnell und effizient kontrollieren.

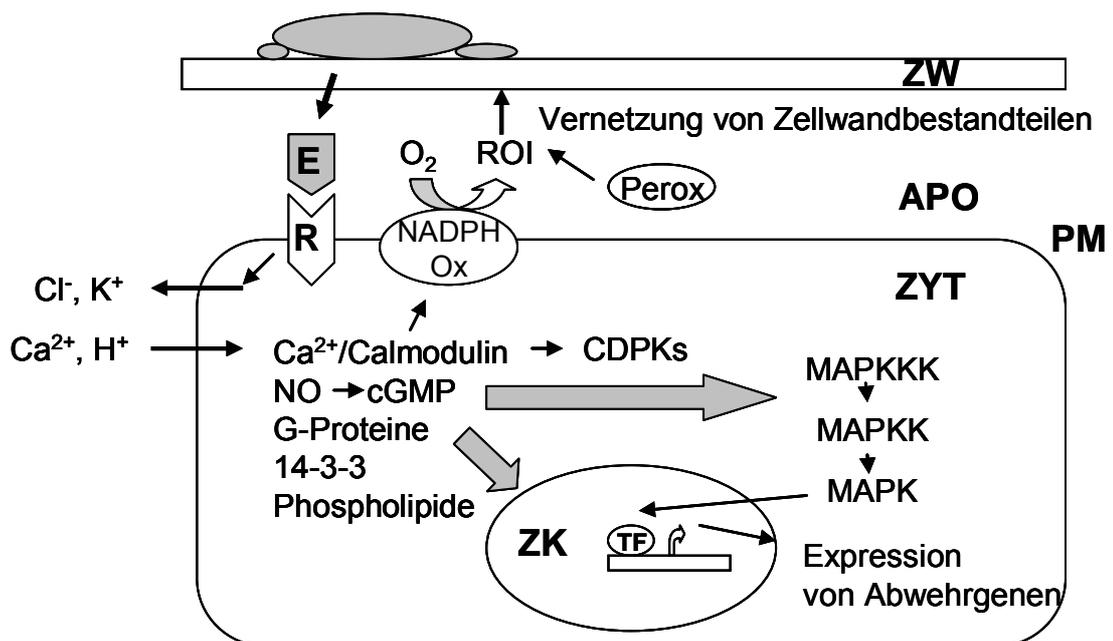


Abb. 1.2 Signaltransduktion nach Pathogenbefall. Nach Erkennung von Elizitoren (E) des Pathogens durch einen Rezeptor (R) verändern sich die Ionenströme durch die Plasmamembran (PM). Als Folge davon werden verschiedene Signalmoleküle aktiviert und es kommt zum *oxidative burst*, der Bildung von ROI und einer Vernetzung von Zellwandbestandteilen. Die Aktivierung nachgeordneter Signalkaskaden wie MAPKs führt zu einer Veränderung der Expression von Abwehrgenen. ZW = Zellwand, APO = Apoplast, PM = Plasmamembran, ZYT = Zytosol, ZK = Zellkern, E = Elizitor, R = Rezeptor, NADPH Ox = NADPH-Oxidase, Perox = Peroxidase, TF = Transkriptionsfaktor. Verändert nach Hammond-Kosack und Jones, 1996, Somssich und Hahlbrock, 1998

2.5 Pflanzliche Transkriptionsfaktoren

Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren wird dadurch deutlich, dass etwa 5,9 % des Genoms von *Arabidopsis* für Transkriptionsfaktoren kodieren. Das entspricht mehr als 1700 Genen, verglichen mit 500 Transkriptionsfaktoren im Genom von *C. elegans* (2,7 %) und 694 oder 5 % der Gene in *Drosophila* (Riechmann und Ratcliffe, 2000). Im Reisgenom wurden 1336 Transkriptionsfaktoren identifiziert (Kikuchi *et al.*, 2003).

Viele Transkriptionsfaktoren sind pflanzenspezifisch, d. h. sie wurden bisher nur in Pflanzen nachgewiesen (Tab. 1.1). Dazu zählen AP2/EREB (APETALA2 /*ethylene-responsive-element binding protein*), NAC, WRKY, ARF-Aux/IAA (*AUXIN RESPONSE FACTOR- Auxin/indole acetic acid*) und Dof (*DNA-binding with one finger*).

Tab. 1.1 Pflanzenspezifische Familien von Transkriptionsfaktoren und die Anzahl ihrer Mitglieder in *Arabidopsis thaliana* (verändert nach Riechmann *et al.*, 2000). Die Familien wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten klassifiziert. Die Tabelle ist nicht-redundant, Proteine mit mehreren Motiven wurden nur einmal aufgenommen. „Andere“ enthält einige kleine Familien und Einzelgene.

Genfamilie	Anzahl in <i>Arabidopsis</i>
AP2/EREBP	144
NAC	109
WRKY	74
GARP	56
Dof	37
CO-like	33
YABBY	6
GRAS	32
Trihelix	28
TCP	25
ARF	23
C ₃ H-Typ 2	16
SBP	16
Nin-like	15
ABI3/VP1	14
Alfin-like	7
EIL	6
LFY	1
Andere	20

Die meisten Transkriptionsfaktorfamilien sind jedoch in Pflanzen, Tieren und Pilzen konserviert. Ihre Evolution fand also vor der Trennung dieser Reiche vor etwa 1,5 Milliarden Jahren statt (Riechmann *et al.*, 2000). Für die Evolution der Transkriptionsfaktoren waren besonders Genduplikationen und *domain shuffling*, d. h. die neue Kombination von Domänen, sowie *exon capture* d. h. Rekombination von Teilen verschiedener Gene, wichtig. So folgt in ca. 50 % der Transkriptionsfaktoren der Homeobox-Familie in *Arabidopsis* eine *leucine zipper* Domäne auf eine Homeobox-Domäne, ein Arrangement, das in Hefe und Tieren nicht auftritt (Riechmann *et al.*, 2000). Aber auch Nukleotidsubstitutionen,

Insertionen und Deletionen führten zu der großen Diversität von Transkriptionsfaktoren (Liu *et al.*, 1999).

Die größte Familie von Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* bilden MYB-Transkriptionsfaktoren mit etwa 180 Mitgliedern. In Reis besitzt diese Familie 158 Mitglieder. Sie sind nicht pflanzenspezifisch und spielen eine Rolle im Sekundärmetabolismus, der zellulären Morphogenese, beim Wachstum, biotischen und abiotischen Stressreaktionen, circadianen Rhythmen und der Ausbildung der Dorsoventralität, d. h. der Differenzierung von Organen in Ober- und Unterseite (z. B. Blätter, Blüten). Weitere häufige Familien sind AP2/EREBP mit 150 Mitgliedern in *Arabidopsis*, NAC, bHLH/MYC (*basic helix-loop-helix*), bZIP (*basic leucine zipper*), HB (*homeobox*), Zinkfinger Proteine vom C₂H₂-Typ, MADS, WRKY, ARF-Aux/IAA und Dof (Riechmann und Ratcliffe, 2000). Generell herrscht unter Transkriptionsfaktoren einer Familie eine große funktionale Redundanz (Kempin *et al.*, 1995, Liljegren *et al.*, 2000). Sequenzanalyse von *Arabidopsis* MADS-Box Genen lassen auf eine partiell redundante Funktion für ca. 40 % der Proteine schließen (Riechmann und Ratcliffe, 2000). Andererseits können Transkriptionsfaktoren einer Familie auch völlig verschiedene Funktionen aufweisen, ebenso wie Transkriptionsfaktoren verschiedener Familien ähnliche biologische Funktionen erfüllen können (Riechmann *et al.*, 2000). So wurde für die Familien der NAC (Ren *et al.*, 2000), bZip (Lee *et al.*, 2002) und WRKY-Transkriptionsfaktoren (Eulgem *et al.*, 2000, Ülker und Somssich, 2004) eine Rolle in der Pathogenabwehr nachgewiesen. Diese funktionelle Komplexität von Transkriptionsfaktoren spiegelt sich in Überlappungen von Expressionsprofilen nach verschiedenen Stimuli wieder, die zu einer koordinierten Regulation ganzer Gengruppen führen. Beispielsweise gibt es eine große Übereinstimmung zwischen den Expressionsprofilen einer inkompatiblen Interaktion von Pflanzen und Pilz mit dem nach Verwundung (Durrant *et al.*, 2000). Dabei spielt die zeitliche und räumliche Koordination der Genexpression eine große Rolle (Singh *et al.*, 2002).

Ihre Wirkung entfalten Transkriptionsfaktoren durch die Bindung an *cis*-Elemente (Tjian, 1995), d. h. kurze, konservierte Nukleotidsequenzen in den Promotoren ihrer Zielgene. Dabei konnten verschiedene *cis*-Elemente einem definierten Reiz zugeordnet werden. Beispielsweise vermittelt das sogenannte TCA-Motiv mit der Kernsequenz AGAA (Pastuglia *et al.*, 1997) die Salizylsäure-Responsivität von Genen. Die Wirkungsweise und Stärke der *cis*-Elemente ist abhängig von ihrer

Anordnung, Kombination und den sie umgebenden Nukleotiden (Rushton *et al.*, 2002).

Ein typischer Transkriptionsfaktor besteht aus einer DNA-Binderegion, sofern der Transkriptionsfaktor als Oligomer wirkt, aus einem für diese Oligomerisation zuständigen Bereich, einer Transkriptionsregulations-Domäne und einem Signal für den Transport in den Zellkern (*nuclear localisation signal*, NLS, Liu *et al.*, 1999). Die Klassifikation der Transkriptionsfaktoren erfolgt dabei anhand von strukturellen Eigenschaften wie Zinkfingern, die detailliertere Untergliederung anhand der Anzahl und des Abstandes dieser Motive (Liu *et al.*, 1999). Gewöhnlich haben pflanzliche Transkriptionsfaktoren nur einen Typ von DNA-Bindedomänen, die allerdings sowohl in einer als auch in mehreren Kopien pro Molekül vorhanden sein können. Man geht davon aus, dass mehrere Kopien eine kooperative DNA-Bindung ermöglichen. Die Oligomerisations-Domäne dient der Bildung von Homo- oder Heterodimeren, was die DNA-Bindung hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität beeinflusst, aber auch die Kernlokalisierung modifizieren kann (Katagiri *et al.*, 1992, Guiltinan und Miller, 1994, Kinkema *et al.*, 2000). Kernlokalisationssequenzen (*nuclear localisation signal*, NLS) beinhalten die mehrfach aufeinander folgenden basische Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K). Es können eine oder mehrere NLS pro Transkriptionsfaktor vorhanden sein (Boulikas, 1994, Dehesh, *et al.*, 1995, Lyck, *et al.*, 1997), deren Funktionalität variiert (Varagona und Raikhel, 1994). Die unterschiedliche Wirkung des Faktors als Repressor oder Aktivator der Transkription wird durch die Transkriptionsregulations-Domäne bestimmt (Yangisawa und Sheen, 1998). Repression der Transkription kann durch kompetitive Bindung von *cis*-Elementen stattfinden, aber auch durch eine Maskierung von Regulationsdomänen auf Grund von Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren oder durch Interaktion mit Repressionsdomänen (Chern, 1996). Die Funktion als Aktivierungsdomäne hängt hingegen von einzelnen interagierenden Aminosäuren ab (Sainz *et al.*, 1997).

Da Transkriptionsfaktoren in der Regel mehrere Gene und damit oft ganze Organisations- und Reaktionsprogramme steuern, ist ihre Regulation von großer Wichtigkeit. Die Regulation von Transkriptionsfaktoren selbst findet auf mehreren Ebenen statt (Calkhoven und Ab, 1996): auf der Ebene der Transkription, der RNA-Prozessierung (alternatives *splicing*), der RNA-Degradation, die besonders wichtig ist für eine transiente Transkriptakkumulation, und auf der Ebene der Translation. Im

Hinblick auf die Transkription spielen Autoregulationsmechanismen eine große Rolle. Positive Rückkopplungswege ermöglichen die Ausbildung einer Art Gedächtnis, um einen bestimmten Differenzierungszustand zu erhalten (Calkhoven und Ab, 1996). Auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung sind von großer Bedeutung, da sie die Lokalisation und Aktivität eines Faktors beeinflussen können. Die Regulation durch Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde schon erwähnt. Dabei kann es sich bei den Interaktionspartnern sowohl um andere Transkriptionsfaktoren handeln, als auch um Nicht-DNA-Bindende Faktoren. Sie dienen als Koaktivatoren oder -repressoren, oder vermitteln die Bindung zwischen Transkriptionsfaktor und der basalen Transkriptionsmaschinerie.

Als Beispiel soll NPR1 (*non-expressor of pathogenesis related genes 1*) dienen (Pieterse und Van Loon, 2004). Es ist bekannt, dass NPR1 in nicht-induzierten Zellen als inaktive Form vorliegt, in der Disulfidbrücken mehrere Monomere zu einem Komplex verbinden. Nach einer Pathogeninfektion führt die Akkumulation von Salizylsäure zu einer Änderung des Redoxzustandes der jeweiligen Zelle, wahrscheinlich durch Anhäufung von Antioxidanzien. In diesem reduzierenden Umfeld werden die intermolekularen Disulfidbrücken von NPR1 reduziert und es geht in den monomeren, aktiven Zustand über. Monomeres NPR1 wird in den Zellkern transportiert und interagiert dort mit verschiedenen TGA-Transkriptionsfaktoren, einer Unterklasse der bZIP-Faktoren, deren DNA-Bindeaktivität an die entsprechenden Salizylsäure-responsiven *cis*-Elemente durch NPR1 gesteigert wird. Dies führt zur Expression von PR-Proteinen. Eine weitere, zytosolische Funktion von NPR1 ist die gleichzeitige Inhibierung des Jasmonat-Signalwegs.

2.6 WRKY-Transkriptionsfaktoren

WRKY-Transkriptionsfaktoren bilden eine pflanzenspezifische Multigenfamilie. In *Arabidopsis thaliana* sind bisher 74 Mitglieder bekannt (Ulker und Somssich, 2004), in Reis wurden 81 Mitglieder charakterisiert (Xie et al., 2005). Der erste identifizierte WRKY-Transkriptionsfaktor war SPF1 (*sweet potato factor 1*) aus der Süßkartoffel (Ishiguro und Nakamura, 1994). Weitere Proteine wurde in verschiedenen Pflanzen gefunden, wie den Nutzpflanzen Gerste, Hafer, Kartoffel, Maniok, der Zuckerrübe, Baumwolle, Tabak, Kaffee, Kakao, Zitrone, Petersilie, Kamille und im Bittersüßen

Nachtschatten, in Ginster und in *Nicotiana longiflora* (Rushton *et al.*, 1995, de Pater *et al.*, 1996, Rushton *et al.*, 1996, Dellagi *et al.*, 2000, Hara *et al.*, 2000, Beyer *et al.*, 2001, Lambais, 2001, Ashida *et al.*, 2002, Huang und Duman, 2002, Pnueli *et al.*, 2002, Izaguirre *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2003, Borrone *et al.*, 2004, Fernandez *et al.*, 2004, Lagacé und Matton, 2004, Xu *et al.*, 2004, Kemp *et al.*, 2005). Auch in niederen Pflanzen wie dem Farn *Ceratopteris richardii*, dem Moos *Physcomitrella patens* und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, sowie in dem nicht Photosynthese-betreibenden Schleimpilzen *Dictyostelium discoideum* und dem Einzeller *Giardia lamblia*, konnten WRKY-Transkriptionsfaktoren gefunden werden (Ülker und Somssich, 2004).

Charakteristisch für diese Genfamilie ist eine etwa 60 Aminosäuren umfassende konservierte Domäne, die nach ihren streng konservierten Aminosäuren WRKY-Domäne (Eulgem *et al.*, 2000) genannt wird und der Familie den Namen gegeben hat. Yamasaki *et al.* (2005) gelang vor kurzem die Aufklärung der Kristallstruktur der C-terminalen WRKY-Domäne des Gruppe I Faktors AtWRKY4. Demnach besteht sie aus vier β -Faltblättern mit einer zinkbindenden Tasche. Das N-terminale Faltblatt mit den Aminosäuren WRKYGQK soll tief in den großen Graben der DNA-Doppelhelix eintauchen und die sequenzspezifische Bindung an die DNA vermitteln. Auch die N-terminale WRKY-Domäne ist in der Lage, DNA zu binden, allerdings weniger stark als die C-terminale Domäne. Sie verstärkt die durch die N-terminale Domäne vermittelte Bindung und ermöglicht eventuell Protein-Protein Interaktionen. Die DNA-Bindung kann durch Metall-Chelatoren wie EDTA und *o*-phenathrolin gehemmt (Rushton *et al.*, 1995, de Pater *et al.*, 1996, Hara *et al.* 2000, Maeo *et al.*, 2001) und durch Zugabe von Zinkionen wieder hergestellt werden (Maeo *et al.*, 2001).

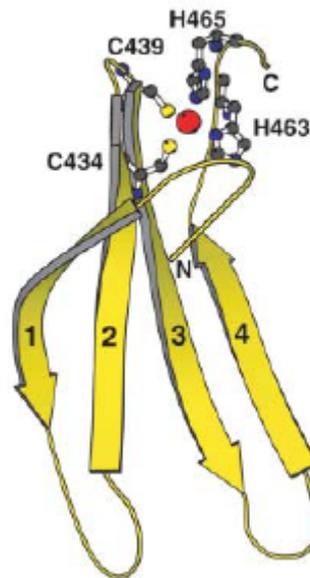


Abb. 1.3 Kristallstruktur der C-terminalen WRKY-Domäne von AtWRKY4 (aus: Yamasaki *et al.*, 2005). Die vier β -Faltblätter wurden ausgehend vom N-Terminus nummeriert. Die vier das Zink-Ion (rot) bindenden Aminosäuren sind hervorgehoben und nummeriert. Die Abbildung zeigt den Bereich zwischen Leu407 und Ala469 ohne den wenig konservierten N-terminalen Abschnitt.

Innerhalb dieser WRKY-Domäne liegt auch ein neuartiges, pflanzenspezifisches Zinkfingermotiv der Struktur $C-X_{4-5}-C-X_{22-23}-H-X_1-H$ oder $C-X_7-C-X_{23}-H-X_1-C$ (de Pater *et al.*, 1996).

Anhand dieser beiden Domänen haben Eulgem *et al.* (2000) eine Unterteilung der Familie in drei Untergruppen vorgenommen. Gruppe I bilden WRKY Faktoren, die zwei WRKY-Domänen besitzen. Gruppe III zeichnet sich durch das C_2 -HC-Zinkfingermotiv aus. Alle weiteren WRKY-Faktoren (C_2 -H₂ Zinkfinger und eine WRKY-Domäne) gehören zur größten Gruppe II, die ihrerseits wieder anhand anderer Motive unterteilt ist. Diese Gruppierung, die mit Übereinstimmungen der Struktur einhergeht, korreliert z. T. auch mit dem Expressionsmuster, so dass einzelnen Untergruppen bestimmte Funktionen zugeordnet wurden (Dong, *et al.*, 2003, Kalde *et al.*, 2003).

Allen WRKY-Transkriptionsfaktoren ist gemein, dass sie an W-Boxen binden. Eine W-Box ist ein *cis*-Element in Promotoren der Sequenz (T)TGAC(C/T) (Rushton *et al.*, 1996). Für diese Bindung sind sowohl die WRKY-Sequenz als auch das Zinkfingermotiv essentiell (Ishiguro und Nakamura, 1994, de Pater *et al.* 1996, Maeo *et al.*, 2001). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Anordnung der W-Boxen: Sowohl die Anzahl der W-Boxen, als auch ihr Abstand und die flankierenden Basen

der unveränderlichen TGAC-Kernsequenz sind entscheidend (Yang *et al.*, 1999, Marè *et al.*, 2004). Euglem *et al.* (1999) fand heraus, dass in dem Promotor von PR-10 aus Petersilie eine palindromische Anordnung der W-Boxen für die Genexpression von Bedeutung ist. Eine Besonderheit weist SUSIBA2, ein WRKY-Transkriptionsfaktor aus Gerste, auf. Sun *et al.* (2003) konnten zeigen, dass dieser nicht nur an W-Boxen, sondern auch an SURE-Elemente (*sugar responsive element*) bindet.

W-Boxen treten in *Arabidopsis* gehäuft in Promotoren des PR-1-Regulon auf, was auf eine Rolle im Mechanismus der SAR (*systemic acquired resistance*, Maleck *et al.*, 2000) hinweist, ebenso wie die Tatsache, dass der Promotor von NPR1 (*nonexpressor of PR-1*) drei funktionelle W-Boxen enthält (Yu *et al.*, 2001). Eine Häufung von W-Boxen tritt auch in den Promotoren von *receptor-like protein kinases* auf (RLKs, Zipfel *et al.*, 2004, Du und Chen, 2000). WRKY-Faktoren selbst besitzen oft W-Boxen in ihren Promotoren (Asai *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2002, Dong *et al.*, 2003), was selbstregulatorische Mechanismen ermöglicht (Euglem *et al.*, 1999, Robatzek und Somssich, 2002, Ülker und Somssich, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass 49 von 72 untersuchten WRKY Genen in *Arabidopsis* während der durch *Pseudomonas syringae* oder Salizylsäure ausgelösten Resistenzausbildung induziert werden (Dong *et al.*, 2003). WRKY-Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle in der Regulation der Genexpression nach Befall mit Viren (Yang *et al.*, 1999), Bakterien (Dellagi *et al.*, 2000, Chen und Chen, 2002, Dong *et al.*, 2003, Wen *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2004), Pilzen (Rushton *et al.*, 1996, Dellagi *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2000, Kirsch *et al.*, 2000, Wen *et al.*, 2003, Wan *et al.*, 2004) und Herbivoren (Hui *et al.*, 2003, Izaguirre *et al.*, 2003).

Eckey *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die Expression des in dieser Arbeit näher untersuchten *HvWRKY1* nach Inokulation mit *BghA6* induziert wird und ein *knock-down* des Gens mittels RNAi die Resistenz gegenüber dem Pilz erhöht.

Außer diesen Funktionen in der Pathogenabwehr sind WRKY-Transkriptionsfaktoren von Bedeutung für die Anpassung an abiotische Faktoren wie Verwundung (Hara *et al.*, 2000, Cheong, *et al.*, 2002), niedrige Temperaturen und Trockenstress (Fowler und Thomashow, 2002, Huang und Duman, 2002, Rizhsky *et al.*, 2002, Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003, Marè *et al.*, 2004). Sie regulieren die pflanzliche Entwicklung (Alexandrova und Conger, 2002, Johnson *et al.*, 2002, Lagacé und Matton, 2004, Pnueli *et al.*, 2002), hierbei besonders

Seneszenzprozesse (Hinterhofer und Zentgraf, 2001, Robatzek und Somssich, 2001, 2002, Chen *et al.*, 2002, Guo *et al.*, 2004). Die Expression der WRKY-Faktoren wird auch durch Pflanzenhormone wie Salizylsäure (Yang *et al.*, 1999, Dong *et al.*, 2003), Jasmonat (Li *et al.*, 2004) und Giberellin (Zhang *et al.* 2004) beeinflusst. Aber auch H₂O₂, NO und Ozon führen zu einer Induktion von WRKY-Faktoren (Mahalingam *et al.*, 2003, Vandenabeele *et al.*, 2003, Lin und Wu, 2004, Parani *et al.*, 2004, Rizhsky *et al.*, 2004). Charakteristisch für WRKY-Transkriptionsfaktoren ist dabei, dass sie sehr schnell auf den Reiz reagieren und deshalb zur so genannten „*immediate early response*“ gehören (Rushton *et al.*, 1996, Cheong *et al.*, 2002, Cormack *et al.*, 2002). Generell können WRKY-Faktoren als positive und negative Regulatoren dienen (Miao *et al.*, 2004). Li *et al.* (2004) konnten zeigen, dass AtWRKY70 salizylsäure-induzierte Gene aktiviert und jasmonat-induzierte reprimiert. AtWRKY6 wirkt als negativer Regulator in Bezug auf seinen eigenen Promotor, stimuliert aber die Aktivität des Promotors von PR-1 und SIRK (Robatzek und Somssich, 2002).

Asai *et al.* (2002) konnten erstmalig eine vollständige pflanzliche Signalkaskade in *Arabidopsis* aufschlüsseln, die zur Resistenz gegenüber pilzlichen und bakteriellen Pathogenen führt. Diese beginnt mit dem Rezeptor FLS2, der den bakteriellen Flagellin-Elizitor flg22 erkennt und endet mit WRKY22 und WRKY29. Die Verbindung dieser Elemente geschieht über eine MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Kaskade (MEKK1, MKK4/MKK5, MPK3/MPK6, einen Überblick über MAPK-Kaskaden geben Zhang and Klessig, 2001). Wie genau WRKY und MAPKs verbunden sind, ist nicht bekannt. Asai *et al.* (2002) vermuten eine Verbindung durch Phosphorylierung eines WRKY-Inhibitors. Im Unterschied dazu konnten Kim und Zhang (2004) in Tabak keine direkte Phosphorylierung mittels Phosphatasebehandlung und *gel-shift* Experimenten nachweisen. Sie fanden aber eine Verbindung zwischen MEK2 aus Tabak und verschiedenen WRKY-Faktoren, die durch SIPK und WIPK, zwei auf Stress reagierende MAPKs, vermittelt wurde. Menke *et al.* (2005) konnten vor kurzem nachweisen, dass eine direkte Phosphorylierung von WKRY1 aus Tabak durch SIPK stattfindet.

Ülker und Somssich (2004) schlagen ein Modell vor, in dem WRKY-Faktoren durch direkte Phosphorylierung ihre Affinität zu bestimmten W-Boxen ändern. Sie konnten zeigen, dass in Petersilie die W-Boxen zweier Promotoren immer mit verschiedenen WRKY-Faktoren besetzt sind (Turck *et al.* 2004), die im Falle einer Phosphorylierung

die jeweilige W-Box verlassen und somit Platz für andere WRKY-Faktoren machen, die dann die Genexpression aktivieren. Auch eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von AtWRKY7 an Calmodulin wurde nachgewiesen (Park *et al.*, 2005).

Ein interessanter Sonderfall ist RRS1-R (*resistance to ralstonia solanacearum* 1-rezessives Allel) aus *Arabidopsis*. Das Gen *RRS1-R* vermittelt Resistenz gegenüber *Ralstonia solanacearum* (Lahaye, 2002, Deslandes *et al.*, 2002, Deslandes *et al.*, 2003). Das kodierte Protein besitzt sowohl typische Motive von Resistenzgenen (TIR-NBS-LRR: *Toll/interleukin-1-receptor-nucleotide binding site-leucine-rich-repeat*, Kap. 1.2) als auch eine WRKY-Domäne. Inwieweit RRS1-R als Transkriptionsfaktor wirkt, ist noch unbekannt.

2.7 Ziele der Arbeit

Während viele Effektorgene der Pathogenabwehr mittlerweile gut untersucht sind, ist wenig über die Signalkaskaden bekannt, die diese Gene steuern. Von besonderem Interesse sind dabei Transkriptionsfaktoren, da diese auf einen Stimulus (z. B. ein eindringendes Pathogen) hin mehrere Gene, und damit unter Umständen ganze Reaktionsprogramme, regulieren. Über WRKY-Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie eine Rolle in der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen spielen (Eulgem *et al.*, 2000). Diese Genfamilie ist in dikotyledonen Pflanzen wie *Arabidopsis* gut untersucht, auch in einigen Monokotylen wie Reis. Allerdings sind bisher nur zwei Gene aus Gerste charakterisiert worden.

Es ist bekannt, dass *HvWRKY1* nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* induziert wird und dass der *knock-down* des Gens durch RNAi zu einer verstärkten Resistenz gegenüber diesem Pathogen führt (Eckey *et al.*, 2004). Ziel dieser Arbeit war es nun, die Bedeutung von *HvWRKY1* durch transiente Überexpression und *knock-down* mittels *particle bombardment* genauer zu analysieren. Diese Ergebnisse sollten in stabil transgenen *HvWRKY1*-RNAi-Pflanzen überprüft werden. Außerdem sollten weitere Mitglieder der WRKY-Multigenfamilie in Gerste in Datenbanken identifiziert, kloniert und molekular charakterisiert werden. Zur Untersuchung der Induzierbarkeit dieser Gene durch biotische Faktoren, insbesondere durch *Bgh*, aber auch durch abiotischen Reize wie Verwundung, sollten RT-PCRs durchgeführt werden. Außerdem sollten einige der Gene, mittels transienter Transformation und RNAi bzw. Überexpression im System Gerste –

Mehltau getestet werden. Dies stellt eine schnelle und preisgünstige Methode zur Untersuchung der Funktion eines Gens dar. Neben den WRKY-Faktoren wurden in die Untersuchungen auch weitere *Bgh*-responsive Gene einbezogen. Um zu untersuchen, ob eine Verbindung zwischen WRKY-Faktoren und dem *mlo*-Signalweg besteht, sollten sowohl die Expressionsstudien als auch die transiente Transformation zusätzlich in Kultivaren, die eine Mutation im Signalweg des Resistenzgens *mlo* tragen, durchgeführt werden. Da nur wenig über die Signalketten bekannt ist, die zu einer Aktivierung der WRKY-Transkriptionsfaktoren führen, sollte auch der Promotor von *HvWRKY1* isoliert und hinsichtlich möglicher *cis*-Elemente charakterisiert werden, insbesondere im Hinblick auf pathogenresponsive Elemente wie W-Boxen, die die eine Autoregulation des Gens ermöglichen könnten. Diese W-Boxen sollten dann im EMSA (*electromobility shift assay*) mit dem *HvWRKY1* Protein auf ihre Funktionalität überprüft werden, was gleichzeitig Auskunft über die Bindungspräferenzen von *HvWRKY1* Protein geben könnte. Dazu sollte rekombinantes *HvWRKY1* Protein hergestellt werden. Da es Hinweise gibt, dass WRKY-Faktoren über eine MAPK-Kaskade reguliert werden (Ülker und Somssich, 2004, Menke *et al.*, 2005), sollte überprüft werden, ob die Behandlung von Gerstenblättern mit einem MAPKKK-Inhibitor (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*) einen Einfluss auf die Expression von *HvWRKY1* hat. Ferner sollte die Lokalisation von *HvWRKY1* und weiteren WRKY-Faktoren auf zellulärer Ebene geklärt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Firmen Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Serva (Serva *Electrophoresis* GmbH, Heidelberg), Merck (Merck KGaA, Frankfurt), Fluka (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen), Sigma (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) und Boehringer (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim) in p. A. Qualität verwendet. Synthetische Oligonukleotide wurden bei MWG (MWG-Biotech AG, Ebersberg), bei Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) oder bei Sigma Genosys (The Woodlands, USA) bestellt. Die für molekularbiologische Methoden verwendeten Materialien wurden vom Hersteller auf RNase- und DNase-Verunreinigungen getestet. Für die Arbeiten mit Nukleinsäuren und Bakterienkulturen wurden alle verwendeten Materialien autoklaviert. Alle Lösungen und Verdünnungen wurden mit *MilliQ*-Wasser hergestellt.

3.2 Software und Datenbanken

Zur Erstellung dieser Arbeit (z. B. zur Analyse der Nukleotid- und Proteinsequenzen) wurden folgende Datenbanken, Internetdienste und frei im Internet verfügbare Programme verwendet:

- ◆ BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) gegen die NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) GeneBank-Datenbanken (Altschul et al., 1997) diente dem Vergleich von Protein- oder Nukleotidsequenzen mit homologen Genen, Proteinen oder ESTs (*expressed sequence tags*).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

- ◆ *ClustalW* (*European Molecular Biology Laboratory [EMBL] outstation – European Bioinformatics Institute*, Pearson, 1990) und das Programm GeneDoc (*Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility*; Nicholas und Nicholas 1997) wurden für *alignments* von mehreren Sequenzen genutzt.

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>

- ◆ Das Programm TreeView (Page, 1996) wurde zur Visualisierung von Stammbäumen angewendet.
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- ◆ Die *Prosite*-Datenbank (Falquet *et al.* 2002, *Expasy Molecular Biology Server, Swiss Institute of Bioinformatics*) wurde zum Auffinden konservierter Motive in den Proteinsequenzen verwendet.
<http://www.expasy.org/prosite>
<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>
- ◆ Die Programme PSORT (Nakai and Kanehisa, 1991) sowie WoLF Psort (Horton *et al.*, unveröffentlicht) diente der Vorhersage der möglichen subzellulären Lokalisation der WRKY-Proteine.
<http://psort.nibb.ac.jp>
<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp>
- ◆ Die Berechnung von Sumoylierungsmotiven erfolgte mit SUMO plot™ (Bornberg-Bauer *et al.*, 1998).
www.abgent.com/doc/sumoplot
- ◆ Für die Identifizierung von *leucine zipper* Motiven wurde das Programm 2zip angewandt (Kost Gramatikoff *et al.*, 2004).
www.2zip.molgen.mpg.de
- ◆ Zur Vorhersage von isoelektrischem Punkt und molekularer Masse eines Proteins wurde das *Expasy Compute pI/Mw Tool* eingesetzt.
http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html
- ◆ Zum Übersetzen einer Nukleotidsequenz in die entsprechende Proteinsequenz wurde das *Expasy Translate Tool* benutzt.
<http://www.expasy.org/tools/dna.html>
- ◆ Das Programm pDRAW32 diente zur *in silico* Klonierung und zur Erstellung von Vektorkarten.
<http://www.acaclone.com>
- ◆ Mit Hilfe von Primer3 (Rotzen, S., Skaletsky, H. J. 2000) wurden Oligonukleotid-Primer entworfen.
<http://www.acaclone.com>
- ◆ Das Programm Webcutter 2.0 ermöglicht es Nukleotidsequenzen nach Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen abzusuchen.
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>

- ◆ Auf der Suche nach Gersten WRKY-Faktoren wurden folgende Datenbanken nach ESTs und *contigs* durchsucht:
 - *Barley1*-Datenbank (Shen *et al.* 2005) <http://www.barleybase.org>
 - GABI Primärdatenbank (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH).
<http://gabi.rzpd.de/>
 - *TIGR Barley Gene Index* (*TIGR Institute for Genomic Research*, Quackenbusch *et al.* 2000).
<http://www.tigr.org>
- ◆ Zur *in silico* Bestimmung von putativen regulatorischen Elementen in Promotoren dienen PLACE (*National Institute of Agrobiological Sciences*, Ibaraki, Japan, Higo *et al.* 1999) und PlantCARE (Rombauts *et al.* 1999).
<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>
<http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE>
- ◆ Das Programm FGENESH (Softberry Inc., Mount Kisco, NY, USA) zur Lokalisierung von Genen in eukaryotischen Genomen diente zur Bestimmung des putativen Transkriptionsstarts von Genen.
www.softberry.com/berry.phtml
- ◆ Für die Suche nach Publikationen wurden die Online-Datenbanken des *ISI Web of Knowledge*SM (*The Thomson Corporation*) und NCBI PubMed (*National Center for Biotechnology Information*) benutzt.
<http://isi15.isiknowledge.com/portal.cgi> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>

3.3 Pflanzenmaterial

Für diese Arbeit wurden die Gerstenkultivare (*Hordeum vulgare* L.) Ingrid, Pallas und Golden Promise verwendet. Zusätzlich wurde die nahezu isogene Rückkreuzungslinie BCIngrid *mlo-5* (I22) eingesetzt, in die das Resistenzgen gegen den Echten Mehltau (*Blumeria graminis*), *mlo-5*, eingekreuzt wurde (Kølster *et al.* 1986). Auch die Mutante A89 des Kultivars BCIngrid *mlo-5* (Freialdenhoven *et al.*, 1996) mit einer Mutation im (von *mlo-5* unabhängigen) Locus Ror1 (*required for mlo specified resistance*) diente als Material für Versuche. Das Genprodukt von Ror1 ist für die *mlo*-vermittelte Resistenz nötig, die Resistenz des cv. A89 gegenüber dem Echten Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bgh*) also unvollständig.

Kultivar 105-6 (Collins *et al.* 2003) stellt eine Kreuzung von A89 und der Sultan5 Mutante M100 (*Mla12*, *rar* 1-2) dar, und trägt die Mutation *ror1-2*, allerdings im Hintergrund von *Mlo*. Kultivar 105-6 ist daher hypersuszeptibel gegenüber *Bgh*.

Die Gerste cv. Ingrid und deren Rückkreuzungslinien stammen von James McKey, University of Uppsala, Schweden. Gerste cv. Pallas wurde von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University Kopenhagen, Dänemark, zur Verfügung gestellt. Paul Schulze-Lefert, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, hat cv. Golden Promise und die Mutanten A89 sowie 105-6 bereitgestellt.

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

Zur Anzucht wurde das Saatgut über Nacht im Dunkeln vorgekeimt und anschließend in Vierkanttöpfe (8x8 cm) mit Einheitserde Typ ED73 (Einheitserde- und Humuswerke Gebrüder Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa) ausgelegt. Für Inokulationsexperimente zur RNA-Isolierung wurden fünf Keimlinge in einer Reihe an einer Topfseite gepflanzt. Anschließend wuchsen die Pflanzen in Klimakammern oder Klimaschränken (VB1514, Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen und Percival Scientific Incorporated, Perry, USA) bei 20 - 22 °C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit ca. 60 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Die Pflanzenanzucht für die Versuche zur transienten Transformation erfolgte ohne Vorkeimen. 30 - 50 Körner wurden direkt in einen Vierkanttopf gegeben, mit Erde bedeckt und wie beschrieben zur Keimung gebracht.

3.4 Pathogene

3.4.1 Echter Gerstenmehltaupilz

Die Inokulation der Gerstenpflanzen erfolgte mit Konidien des Echten Gerstenmehltaupilzes (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) der Rasse A6 (*BghA6*). *BghA6* besitzt unter anderem die Avirulenzgene *Mlg* und *Mla12*. Der Pilz wurde von Pons-Kühnemann, Institut für Pflanzenbau II, JLU Gießen zur Verfügung gestellt. Die Nachzucht des Pathogens erfolgte in einer Klimakammer (16 - 18 °C, 60 % relative Luftfeuchte, 16 h Lichtperiode mit ca. 60 $\mu\text{Es}^{-1} \text{m}^{-2}$) auf etwa einer Woche alten suszeptiblen Gerstenpflanzen der Kultivare Golden Promise und Ingrid. Eine

Übersicht über die Interaktionen der Kultivare mit dem Gerstenmehltaupilz (*BghA6*) gibt folgende Tabelle:

Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Gerstenkultivare und deren Interaktion mit dem Echten Gerstenmehltaupilz (*BghA6*).

Kultivar	Interaktionstyp mit <i>BghA6</i>	Infektionstyp mit <i>BghA6</i>
Pallas (WT) <i>Mlo, Ror1</i>	kompatibel	suszeptibel
Ingrid (WT) <i>Mlo, Ror1</i>	kompatibel	suszeptibel
Golden Promise (WT) <i>Mlo, Ror1</i>	kompatibel	suszeptibel
BCIngrid <i>mlo-5</i> (I22) <i>mlo-5, Ror1</i>	inkompatibel	resistent Rassen-Sorten-unspezifisch
A89 <i>mlo-5, ror1-2</i>	kompatibel	intermediär Rassen-Sorten-unspezifisch
105-6 <i>Mlo, ror1</i>	kompatibel	hypersuszeptibel

3.4.2 Echter Weizenmehltaupilz

Für die Inokulation mit dem Echten Weizenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*) wurde ein von Beckhove, IPAZ Gießen, in Aachen isoliertes Freilandisolat benutzt. Die Vermehrung von *Bgt* fand auf Weizen cv. Kanzler unter gleichen Bedingungen wie in Kap. 3.4.1 für *BghA6* beschrieben statt.

3.4.3 *Piriformospora indica*

Der Wurzelendophyt *Piriformospora indica* gehört innerhalb der Basidiomyceten zur Rhizoctonia-Gruppe. Er wurde 1997 in der indischen Wüste Thar isoliert (Varma *et al.*, 1999). Der Pilz wurde von Franken, Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

3.5 Behandlung des Pflanzenmaterials

3.5.1 Inokulation mit *Blumeria graminis*

Zur Untersuchung differentieller Genaktivität nach Inokulation mit Echtem Mehltaupilz wurden Töpfe mit etwa sieben Tage alten Gerstenpflanzen mit der adaxialen Seite der Blätter nach oben auf den Boden unter einen Inokulationsturm gelegt, das Sporenmaterial von ca. sechs Töpfen darüber abgeschüttelt und durch Luftverwirbelung gleichmäßig verteilt, so dass die Sporendichte 130 - 150 Sporen pro mm² betrug. Nach 10 min wurden die Töpfe gedreht so dass die abaxiale Seite der Blätter inokuliert werden konnte. Die Kontrollpflanzen wurden ohne Inokulation ebenso auf dem Boden verteilt und gedreht (*mock*-Behandlung). Dann wurden die Pflanzen zurück in den Klimaschrank gebracht und zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Inokulation (*hpi*, *hours post inoculation*) das Primärblatt geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert.

3.5.2 Inokulation mit *Piriformospora indica*

Die RNA von mit *Piriformospora indica* behandelten Pflanzen wurde von Achatz und Desmukh (IPAZ, Gießen) zur Verfügung gestellt (Waller *et al.*, 2005). Drei Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 4 g Pilzmycel inokuliert und die Pflanzen cv. Ingrid drei Wochen nach Inokulation geerntet. Es wurde das Material des jüngsten und zweitjüngsten Blattes, d. h. des zweiten und dritten, vereinigt und daraus RNA isoliert. Als weiter Ansatz wurden ebenfalls drei Wochen alte Kontroll- und mit *P. indica* besiedelte Pflanzen mit *BghA6* inokuliert (ca. 90 Sporen pro mm²) und zwölf Stunden danach die Blätter geerntet. Wurzelmaterial wurde drei Wochen nach Inokulation gründlich abgewaschen, überschüssiges Wasser entfernt und eingefroren. Als Kontrolle dienten jeweils nicht mit *P. indica* inokulierte Pflanzen. Die Besiedlung mit dem Pilz wurde an ausgewählten Pflanzen mikroskopisch überprüft.

3.5.3 Verwundung

Sieben Tage alte Gerstenpflanzen cv. Ingrid wurden durch vorsichtiges Reiben mit dem Abrasiv Carborund (Korngröße 320 mesh, Schleifmittelwerke Butzbach) mechanisch leicht verletzt, zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der Behandlung geerntet und bei -70 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die

Kontrollpflanzen wurden nicht verwundet und unter gleichen Bedingungen wie die verwundeten Pflanzen bis zur Ernte kultiviert.

3.5.4 Pflanzenorgane

Um die Expression der zu testenden Gene in verschiedenen pflanzlichen Organen von Gerste cv. Ingrid zu untersuchen, wurden Wurzeln von drei Wochen alten Pflanzen, die in Seramis® (Masterfood GmbH, Mogendorf) angezogen wurden, geerntet. Embryogewebe wurde aus Samen, die einen Tag im Dunklen vorgekeimt waren, isoliert. Primärblätter wurden von einer Woche alten Pflanzen, drittes und viertes Blatt von etwa 3 Wochen alten Pflanzen geerntet. Das Fahnenblatt wurde zeitgleich mit der jungen, blühenden Ähre abgeschnitten. Alle Gewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.5.5 Epidermismaterial

Epidermismaterial von etwa einer Woche alten Gerstenpflanzen cv. Ingrid wurde geerntet, indem die adaxiale Blattseite mit dem Skalpell eingeschnitten, die abaxiale Epidermis vorsichtig abgezogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde.

3.6 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte nach der Guanidinthiocyanat/Phenol Methode. Es wurden ca. 300 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert und in 1 ml RNA-Extraktionspuffer aufgenommen. Es folgten zwei Reinigungsschritte mittels Chloroform. Die RNA wurde mit 5 M LiCl gefällt (30 min oder über Nacht bei 4 °C inkubiert), 30 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70 % Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gewaschen und anschließend in 50 µl *MilliQ-Wasser*_{DEPC} gelöst. Ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min bei 4 °C und 14 000 rpm, Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) diente zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile. Die gelöste RNA wurde bei -70 °C aufbewahrt.

Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte photometrisch (Photometer DU 7400, Beckman, München). Die Extinktion der 1: 250 verdünnten RNA-Lösung wurde bei 260 nm ($OD_{260nm} = 1$ bei $40 \mu\text{g RNA ml}^{-1}$) gemessen. Im denaturierenden Agarosegel wurde die Qualität der RNA überprüft (Kap. 3.8.1). Alle für die Arbeit mit

RNA benötigten Lösungen wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) behandelt.

RNA-Extraktionspuffer

0,8	M Guanidinthiocyanat (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)
0,4	M Ammoniumthiocyanat (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)
0,1	M NaAcetat-Lösung (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)
5	% Glycerol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
38	% Phenol in gesättigtem Puffer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
	<i>MilliQ-Wasser</i> _{DEPC}

MilliQ-Wasser_{DEPC}

0,1	% [w/v] DEPC (Diethylpyrocarbonat, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) 2 h rühren, über Nacht bei 37 °C inkubieren, autoklavieren
-----	--

3.7 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung der DNA erfolgte leicht verändert nach der Methode von Doyle und Doyle (1990). Etwa 300 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial wurde in 700 µl Extraktionspuffer aufgenommen und 30 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gereinigt. Die Fällung erfolgte mit 80 % Volumenanteilen Isopropanol sowie jeweils 10 % Volumenanteilen 10 M NH₄OAc (Merck KGaA, Frankfurt) und 3 M NaAcetat (pH 5,5, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol/10mM NH₄OAc gewaschen und in 50 µl *MilliQ-Wasser* gelöst. Anschließend erfolgte ein Verdau der eventuell vorhandenen RNA mittels RNase A (Endkonzentration 10 µg/ml, *Ribonuclease A from bovine pancreas*, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen).

DNA-Extraktionspuffer

100	mM Tris/HCl (pH 8,0, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
20	mM EDTA (pH 8,0 Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
1,4	M NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
2	% CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
1	% N ₂ S ₂ O ₅ (Merck (Merck KGaA, Frankfurt)
0,2	% β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)

3.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte weitgehend nach Sambrook *et al.* (1989).

3.8.1 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde die RNA im 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Puffer diente 1x MOPS. Es wurden 4 % Formaldehyd (37 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zugegeben.

2 µg RNA wurden 1: 1 mit ethidiumbromidhaltigem RNA-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert (Heizblock Dri Block DB-2A, Techne, Dextford-Cambridge, England) und auf Eis abgekühlt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Banden mittels einer UV-Lampe (Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau) sichtbar gemacht und die Ergebnisse mit dem digit STORE System (Intas, Göttingen) protokolliert.

10x MOPS pH 7,0

0,2	mM MOPS (4-Morpholino-Propansulfonsäure, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
0,05	M NaAcetat (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)
0,01	M EDTA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)

RNA-Ladepuffer

720	µl Formamid
260	µl Formaldehyd (37 % Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
160	µl 10x MOPS pH 7
100	µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
100	µl MilliQ-Wasser _{DEPC}
80	µl Glycerol (autoklaviert, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
80	µl Bromphenolblau-Lösung (gesättigt, Merck KGaA, Frankfurt)

3.8.2 Nicht-denaturierende DNA-Gelelektrophorese

Die nicht-denaturierende Auftrennung von DNA (genomische DNA, Plasmide, PCR-Produkte) erfolgte im 1,5 - 2 %igen Agarosegel. Als Puffer diente 1x TBE. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden dem noch flüssigen Gel 25 ng/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) zugefügt. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 10x DNA-Ladepuffer versehen und über einen Zeitraum von mindestens 45 min bei 80 - 120 V aufgetrennt. Als DNA-Molekulargewichtsstandard dienten 7 µl der 1 Kb PLUS DNA Ladder™ (Gibco™ BRL, Karlsruhe).

10x TBE pH 8,3

0,9	M Tris (USB, Cleaveland, USA)
0,9	M Borsäure (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
0,025	M EDTA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)

10x DNA-Ladepuffer

50	% Glycerol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
0,1	M EDTA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
1	% SDS (Natrium-Lauryl-Sulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) Bromphenolblau-Lösung (gesättigt, Merck KGaA, Frankfurt)

1 Kb PLUS

100	µl 1 Kb PLUS DNA Ladder™ (Gibco™BRL, Karlsruhe)
100	µl 10x TBE
100	µl 10x DNA-Ladepuffer
700	µl MilliQ-Wasser Bromphenolblau-Lösung (gesättigt, Merck KGaA, Frankfurt)

3.8.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Banden von DNA-Fragmenten wurden nach erfolgter Elektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben eluiert.

3.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in den *T/A cloning* Vektor pGEM[®]-T (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben ligiert. Dieser Vektor ermöglicht eine schnelle Selektion der positiven Bakterienkolonien mithilfe der Blau/Weiß-Selektion (α -Komplementierung defekter β -Galactosidase, Sambrook *et al.*, 1989). Die MCS (*multiple cloning site*) dieses Vektors wird von Promotoren für die T7 und Sp6 RNA-Polymerase flankiert, die die Herstellung von RNA-Transkripten ermöglichen (Kap. 3.14). Die Vektoren wurden in chemokompetente *Escherichia coli* DH5 α -Zellen (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) transformiert und einzelne Kolonien mithilfe der Blau/Weiß-Selektion isoliert. Die Integration der Fremd-DNA wurde durch Kolonie-PCR (Kap. 3.10.1) bzw. Restriktionsverdau (Kap. 3.10.2) überprüft.

E. coli DH5 α Genotyp

F, *endA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1* (Hanahan, 1983)

Zur Überexpression von Test-Genen mittels transienter Transformation wird ein Vektor mit einem starken Promotor vor der *multiple cloning site* benötigt. In diesem Falle wurde der Vektor pGY-1 (Schweizer *et al.* 1999) mit dem CaMV-35S-Promotor verwendet. Zur Klonierung wurde die *full length* Sequenz des Gens in den pGY-1 Vektor mittels genspezifischer Primer mit angehängten Schnittstellen für jeweils

verschiedene Restriktionsenzyme in einer PCR-Reaktion vervielfältigt, im Agarosegel aufgetrennt (Kap. 3.8.2) und das PCR-Produkt aus dem Gel eluiert (Kap. 3.10.2). Das Produkt sowie der Vektor wurden mit den entsprechenden Enzymen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut (3 h bei 37 °C oder nach Anleitung des Enzyms, Kap. 3.10.2). Der Verdauansatz wurde zur Aufreinigung auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend die entsprechende Bande eluiert. Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte bei 37 °C für 30 min mit anschließender Inaktivierung bei 70 °C für 10 min.

Dephosphorylierung des Vektors:

50	µl Eluat
1,5	µl CIAP (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> , Gibco™BRL, Karlsruhe, 10 u/µl)
5	µl 10x Puffer

Anschließend erfolgten die Ligation von Testgen und pGY-1, sowie die Transformation von *E. coli* DH5α Zellen. Der Transformationsansatz wurde auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausgestrichen. Zur Kontrolle der Transformation wurde ein Ligationsansatz mit 14 µl *MilliQ*-Wasser anstelle des PCR-Produktes mit anschließender Transformation durchgeführt. In diesem Fall sollten kaum Kolonien auf den LB-Platten wachsen. Die Integration der Fremd-DNA wurde durch Kolonie-PCR bzw. Restriktionsverdau überprüft.

Ligation:

3	µl dephosphorylierter Vektor (pGY-1)
14	µl geschnittenes PCR-Produkt
2	µl 10x Puffer
1	µl Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, 10u/µl)

LB-Platten

10	g Trypton (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
5	g Hefe-Extrakt (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
10	g NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
10	g Agar-Agar (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
	mit <i>A. dest.</i> auf 1 l auffüllen, pH 7,0
	100 µg mL ⁻¹ Ampicillin hinzugeben,

3.10 Überprüfung der Transformation

3.10.1 Kolonie-PCR

Einzelne Bakterienkolonien können schnell und einfach mittels Kolonie-PCR mit genspezifischen oder U/R-Primern (M13fw[-40], M13rev) auf die integrierte Fremd-DNA hin überprüft werden. Dazu wurde eine einzelne auf LB-Selektionsplatten wachsende Bakterienkolonie mit einem Zahnstocher aufgenommen und in *MilliQ*-

Wasser überführt. Mit einer Standard-PCR (Kap. 3.12.2) konnte die Länge des inserierten Fragmentes ermittelt werden. Unter Verwendung von U/R-Primern betrug die Länge des erhaltenen Produktes bei einem pGM[®]-T-Vektor ohne inserierte DNA 236 bp.

U/R-Primer

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

3.10.2 Restriktions-Endonukleaseverdau

Der Verdau von Plasmiden aus Mini- oder Midipräparationen oder von PCR-Produkten erfolgte mit den entsprechenden Puffern gemäß den Angaben des Enzymherstellers (MBI Fermentas, St. Lenon-Rot) in einem Volumen von 20 - 30 µl, in der Regel für 2 h bei 37 °C.

3.10.3 Sequenzierung

Plasmide wurden mit dem Li-COR *DNA Analyzer Gene Reader 4200* (MWG-Biotech AG, Ebersberg) nach der dideoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1997) sequenziert. Dazu wurde das DYEnamic[™] *direct cycle sequencing kit* (Amersham Life Science, Cleveland, USA) den Herstellerangaben folgend, eingesetzt. Die Sequenzierreaktion lief unter folgenden Bedingungen mit 5'-IRD800 markierten Primern ab:

Thermocycler-Bedingungen

30	sec	95	°C	} 30 Zyklen
15	sec	61	°C	
1	min	70	°C	
∞		4	°C	

Primer

M13reverse[-21] 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
M13forward[-29] 5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'

Die Reaktionsprodukte wurden in einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem Programm FirstBase ausgewertet.

Polyacrylamidgel

35	ml	6 % Long Ranger® Gel Solution (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf)
35	µl	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
250	µl	10 % APS (Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
350	µl	DMSO (Dimethylsulfoxid, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)

3.11 Isolierung von Plasmid-DNA

3.11.1 Mini-Präparation

Die Plasmidpräparation aus 2 ml Bakterienkultur (über Nacht angezogen in LB-Medium mit $100\mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin) wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid *Kit* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren), das auf der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.* 1989) beruht, nach Herstellerangaben durchgeführt.

LB-Medium pH7,0

10	g Trypton (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
5	g Hefe-Extrakt (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
10	g NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
	ad 1 l mit A. dest.

3.11.2 Midi-Präparation

Für die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 50 ml Bakterienkultur nach Herstellerangaben mittels NucleoBond® PC 100 *Kit* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aufgearbeitet. Dabei wurde eine Beckman J2-21M/E Zentrifuge (Rotor JA-20) benutzt (45 min, 15 000 rpm).

3.11.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsmessung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch (Photometer DU 7400, Beckman, München). Die Extinktion der 1: 100 verdünnten Lösung wurde bei 260 nm ($\text{OD}_{260\text{nm}} = 1$ bei $50\mu\text{g DNA mL}^{-1}$) gemessen.

3.12 Untersuchung der Genexpression auf Transkriptionsebene

3.12.1 Herstellung von cDNA (*complimentary DNA*)

Zur Erzeugung von cDNA aus Gesamt-RNA wurde die RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas, St. Lenon-Rot) den Herstellerangaben gemäß verwendet. Als Primer dienten Oligo(dT)₁₈ Primer. Je Reaktion wurden 2 μg Gesamt RNA als *template* eingesetzt.

3.12.2 PCR (*polymerase chain reaction*)

Zur spezifischen Amplifikation von DNA (in Form von Plasmiden, cDNA oder genomischer DNA) wurden PCRs (*polymerase chain reactions*) durchgeführt. Dazu

wurden entweder ca. 100 ng Plasmid, 50 - 100 ng genomische DNA oder 1 µl cDNA (Kap. 3.12.1) als *template* eingesetzt. Für jede PCR wurde eine Kontrolle durchgeführt, in der das *template* durch *MilliQ*-Wasser ersetzt wurde. Die Amplifizierung erfolgte im GeneAmp® PCR-System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Grundsätzlich wurde ein „*hot start*“ Effekt erzielt, indem die Proben nach Programmstart erst bei Erreichen der Denaturierungstemperatur von 95 °C vom Eis in das Gerät überführt wurden. Dadurch konnten unspezifische Bindungen der Primer minimiert werden. Nach Beenden der PCR wurden die PCR-Reaktionsgemische mit 2 µl 10x DNA-Ladepuffer versetzt und davon 20 µl auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen (Kap. 3.8.2).

Standard-PCR-Reaktionsansatz:

0,2	µl	Taq-Polymerase (5 u/µl, <i>SupraTherm™ DNA-Polymerase, GeneCraft GmbH, Lüdinghausen</i>)
2	µl	10x PCR-Puffer
1	µl	je Primer (100 mM, MWG-Biotech AG, Ebersberg)
2	µl	dNTPs-Mix (20 mM, MBI Fermentas, St. Lenon-Rot)
0,7	µl	MgCl ₂ (50 mM, <i>GeneCraft GmbH, Lüdinghausen</i>)
		<i>template</i>

ad 20 µl *MilliQ*-Wasser

Thermocycler-Bedingungen

5	min	95	°C	
30	sec	95	°C	} 20-35 Zyklen
30	sec	60	°C	
1	min	72	°C	
5	min	72	°C	
∞		4	°C	

Um innerhalb einer Versuchsreihe möglichst gleiche Ausgangsmengen cDNA für die semiquantitativen RT-PCRs zu erzielen, wurde die für Standard-PCR eingesetzte *template* Menge mit Primern für das *housekeeping* Gen Ubiquitin (T_m= 60 °C, Acc. Nr. M60175) normiert.

Ubiquitin-Primer

HvUbi60degfor	5'-ACCCTCGCCGACTACAACAT-3'
HvUbi60degrev	5'-CAGTAGTGGCGGTCTGAAGTG-3'

3.12.3 One-Step RT-PCR

In einer *One-Step* RT-PCR finden cDNA-Synthese und genspezifische Amplifikation direkt hintereinander in demselben Reaktionsansatz statt. Für semiquantitative *One-Step* RT-PCRs zum Nachweis der Expression des *HvWRYK1* Gens in den transgenen Gerstenpflanzen (Kap. 3.17) wurde das QIAGEN *One-Step* RT-PCR Kit

(Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Reaktionsvolumen und die eingesetzten Enzymmengen wurde dabei halbiert. Auch hier erfolgte die Ermittlung der eingesetzten Menge an Gesamt-RNA durch eine *One-Step* PCR mit dem *housekeeping* Gen Ubiquitin (Kap.3.12.2).

3.13 Untersuchung der Genexpression auf Translationsebene

Um die Expression des *HvWRKY1* Gens auf Translationsebene zu untersuchen, wurden polyklonale Antikörper gegen ein *HvWRKY1*-spezifisches Peptid hergestellt (anti-*HvWRKY1*). Ebenso wurde ein Antikörper gegen die *WRKY*-Domäne erzeugt (anti-*WRKYall*), um einen Großteil der *WRKY*-Transkriptionsfaktoren in Gerste zu erkennen.

3.13.1 Antikörper

Erster Antikörper: *WRKY* Antikörper

Die Antikörper wurden von der Firma Eurogentec EGT Group (Seraing, Belgien) hergestellt. Dazu wurden verschiedene mögliche Sequenzbereiche für die Peptidproduktion vorgeschlagen und von der Firma die Geeignetsten ausgewählt. Eurogentec führte die Synthese des Peptides durch, das dann als Antigen zur Antikörpergewinnung in Kaninchen eingesetzt wurde. Je Peptid wurden zwei Kaninchen immunisiert (Immunisierungsprogramm ZDE04132: anti-*HvWRKY1*, vier *boosts* und ZDE04133 anti-*WRKYall*, vier *boosts*). 1 ml der letzten Blutung (für *WRKYall* von einem Kaninchen, für *HvWRKY1* von beiden Kaninchen vereinigt) wurde von Eurogentec über eine AF-Amino TOYOPEARL 650 M Säule (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) aufgereinigt.

Sequenzen für die Antikörperproduktion (die aa Angaben beziehen sich auf die Sequenz von *HvWRKY1*, Acc. Nr. AJ430080)

anti- <i>HvWRKY1</i> :	aa 121-135	NH ₂ -+C- VSPSRKRKSEESLGT-CONH ₂ (N-terminale Kopplung an das hinzugefügte Cystein)
anti- <i>WRKYall</i>	aa 198-213	NH ₂ -YQWRKYGQKVTKDNPC- CONH ₂ (C-terminale Kopplung an das Cystein)

Tab. 2.2 Übersicht über das Standard-Immunisierungsprotokoll der Firma Eurogentec für Kaninchen (Quelle: Eurogentec EGT Group, Seraing, Belgien)

Standard Immunisierungsprotokoll (für Kaninchen)							
Tag	0	14	28	38	56	66	87
Injektion	1.	2.	3.		4.		
Blutung	Präimmun			2 ml		2+20 ml	60 ml

Erster Antikörper: anti-Aktin Antikörper

Monoklonale Maus anti-Aktin Antikörper (Klon C4, ICN Biomedicals Inc., Eschwege)

Zweiter Antikörper

- ◆ *Anti-Rabbit* IgG, gekoppelt an alkalische Phosphatase, produziert in Ziege (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
- ◆ ImmunoPure® *antibody*, Antigen IgG, gekoppelt an *horseradish* Peroxidase, produziert in Maus, (Pierce, Bonn)
- ◆ *Anti-mouse* IgG-POD (Peroxidase, *anti-rabbit* IgG-POD, BM Chemilumineszenz Western Blotting Kit (Boehringer, Ingelheim)

3.13.2 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung aus Blattmaterial und die Anreicherung von Zellkernen erfolgte verändert nach Turck *et al.* (2004) aus eine Woche alten Gerstenpflanzen cv. Ingrid. Als Proteinaseinhibitoren wurde abweichend von diesem Protokoll (Turck *et al.*, 2004) eine *complete* Proteinase Inhibitor Cocktail Tablette (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eingesetzt. Ferner wurde durch Nylonnetze der Maschengröße 95 µm und 54 µm (Franz Eckert GmbH, Waldkirch) gefiltert.

3.13.3 Western Blot

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung eines Western Blots wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel gegossen. Dazu wurde das Mini-PROTEAN II System von Bio-Rad (München) verwendet. Je Probe wurden 20 µg Protein aufgetragen. Als Probenpuffer diente der 4x NuPage LDS® Probenpuffer (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Zusammen mit dem Puffer wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert (Heizblock Dri Block DB-2A, Techne, Dextford-Cambridge, England) und vor dem Auftragen auf Eis abgekühlt. Als Größenmarker wurden 7 µl des *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) benutzt. Der Gellauf wurde bei 100 V für 1,5 h durchgeführt.

15 %iges Polyacrylamid-Gel: Trenngel

- | | | |
|------|----|---|
| 2,5 | ml | 4x Trenngelpuffer |
| 3,56 | ml | A. <i>dest.</i> |
| 3,75 | ml | Acrylamid-Lösung (40 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) |
| 50 | µl | APS (10 %, Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) |
| 5 | µl | TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) |

4x Trenngelpuffer pH 8,8

- 1,5 M Tris/HCl (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
- 0,4 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Sammelgel

- 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer
- 6,6 ml A. dest.
- 0,8 ml Acylamid-Lösung (40 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- 100 µl APS (10 %, Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
- 10 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

4x Sammelgelpuffer pH 6,8

- 0,5 M Tris/HCl
- 0,4 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Blotting

Das anschließende *blotting* erfolgte mit dem Mini Trans Blot System (Bio-Rad, München) bei 100 V für 1,5 h unter Eiskühlung. Als Puffer diente Towbin-Puffer, in dem die Membran (PROTRAN BA85 Cellulosenitrat (E), Schleicher & Schuell, Dassel) und Gel-*blotting*-Papiere (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) vor Benutzung äquilibriert wurden.

Towbin-Puffer

- 25 mM Tris/HCl (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
- 192 mM Glycin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- 20 % Methanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- A. dest.

Ponceau-Färbung

Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Membran und zum eventuell notwendigen Teilen der Membran, um verschiedene Antikörper einsetzen zu können, wurde die Membran nach dem *blotting* mit Ponceau-Rot Lösung (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim) nach Herstellerangaben gefärbt und das Ergebnis nach zweimaligem Waschen mit A. dest. eingescannt.

Proteinnachweis

Der eigentliche Proteinnachweis wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Dazu wurde der Blot auf einem Schüttler (GFL-3015 Schüttelapparat mit Kreisbewegungen, GFL- Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) bei RT leicht geschüttelt um eine gleichmäßige Benetzung mit der jeweiligen Lösung zu erreichen. Als Substrat für die alkalische Phosphatase dienten NBT und BCIP, für die *horseradish peroxidase* (Chemilumineszenz) das SuperSignal® West PiCo Chemiluminescent Substrate (Pierce, Bonn), das gemäß den Herstellerangaben

verwendet wurde. Das Substrat der alkalischen Phosphatase wurde ca. 15 - 30 min auf dem Blot belassen und dann mit *A. dest.* abgewaschen, der Blot getrocknet und eingescannt. Für die Chemilumineszenz-Versuche wurde der Blot zusammen mit dem Substrat benetzt und zwischen Folien auf einen Kodak® XP, AR Film (XAR-5, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) in eine X-Ray-Kassette (IEC 60406, Rego X-Ray GmbH, Augsburg) gelegt. Nach 1 h wurde der Film mit Hilfe des Protec Optimax Type TR (Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld) entwickelt.

Tab. 2.2 Übersicht über die Behandlung des Western Blots. Es sind die Arbeitsschritte mit den dazugehörigen Lösungen, ihrer Verdünnung und der Einwirkzeit aufgeführt. Der Blot wurde in der jeweiligen Lösung leicht geschüttelt. Das Substrat richtet sich nach dem verwendeten Antikörper (siehe oben).

Arbeitsschritt	Lösung	Verdünnung	Zeit
Waschen	PBS/T		3 x 5 min
Blocken	1 % BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)		2 h
Waschen	PBS/T		3 x 5 min
Erster Antikörper	10 ml aufgereinigter Antikörper <u>oder</u> Präimmunsrum <u>oder</u> Maus anti-Aktin Antikörper je + 0,3 % BSA	1:100 in PBS/T 1:2 000 in PBS/T	über Nacht, 4 °C
Waschen	PBS/T		3 x 5 min
Zweiter Antikörper	Anti-Rabbit IgG (Alkalische Phosphatase gekoppelt) <u>oder</u> ImmunoPure® Antibody, Antigen IgG (<i>horseradish</i> Peroxidase-gekoppelt) <u>oder</u> <i>Anti-mouse</i> IgG-POD/ <i>anti-rabbit</i> IgG-POD (<i>horseradish</i> Peroxidase gekoppelt) je + 0,3 % BSA	1:2 000 in PBS/T 1:10 000 in PBS/T	2 h
Waschen	PBS/T		3 x 5 min
Substrat	BCIP und NBT in Substratpuffer <u>oder</u> SuperSignal® Substrat		

10x PBS

80 g NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
 2 g KCl (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)
 7,7 g Na₂HPO₄ x 2H₂O (Merck KGaA, Frankfurt)
 2 g KH₂PO₄ (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
 0,02 % NaAzid (Merck KGaA, Frankfurt)
 ad 1 l mit A. dest.

1x PBS/T

1x PBS
 0,05 % Tween20 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Substratpuffer (für alkalische Phosphahtase) pH 9,5

100 mM Tris/HCl (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
 100 mM NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
 5 mM NaCl₂ (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)

BCIP-Stocklösung

50 mg BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat-p-tuloidin Salz; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
 in 2 ml 50 % DMF(Dimethylformamid, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)

NBT-Stocklösung

100 mg NBT (p-Nitrotetrazoliumblauschlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
 in 2 ml 70 % DMF (Dimethylformamid, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)

Substratlösung (für alkalische Phosphahtase)

10 ml Substratpuffer
 66 µl NBT Stocklösung
 68 µl BCIP Stocklösung

3.13.4 ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*)

Der ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) wurde leicht verändert nach einem Protokoll der Firma Eurogentec (Eurogentec EGT Group, Seraing, Belgien) durchgeführt. Dazu wurden 20 µg Proteinextrakt in 100 µl PBS gelöst, oder 100 µl der entsprechenden Verdünnung des Peptides mit PBS in eine MikroWell Platte F-Form (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf) pipettiert.

Tab. 2.3 Übersicht über die Vorgehensweise für den ELISA. Es sind die Arbeitsschritte mit den dazugehörigen Lösungen, ihrem Volumen ihrer Verdünnung und der Einwirkzeit aufgeführt. Die MikroWell Platte wurde nach jedem Schritt mehrmals kräftig auf saugfähigem Papier ausgeklopft.

Arbeitsschritt	Lösung	Volumen	Verdünnung	Zeit
Bindung des Proteins	Proteinextrakt in PBS	100 µl		über Nacht, 4 °C
Waschen	PBS/T	150 µl		3 x 5 min
Blocken	1 % BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)	100 µl		2 h
Waschen	PBS/T	150 µl		3 x 5 min
Erster Antikörper	aufgereinigter Antikörper oder Präimmenserum	100 µl	1:100 in PBS/T	2 h
Waschen	PBS/T	150 µl		3 x 5 min
Zweiter Antikörper	Anti-Rabbit IgG (Alkalische Phosphatase gekoppelt)	100 µl	1:1 000 in PBS/T	2 h
Waschen	PBS/T	150 µl		3 x 5 min
Substrat	p-Nitrophenylphosphat (Loewe Biochemie, Otterfing/München, 1 mg/ml) in Diethanolaminpuffer	100 µl		ca. 45 min
Stoppen	3 M NaOH (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)	50 µl		

Die Proben wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und die Absorption mit dem Easy Reader 400 ATX (SLT-Labinstruments, Crailsheim) bei 405 nm gemessen (Referenzwellenlänge 620 nm).

Diethanolaminpuffer pH 9,8, 0,05 M

101 mg MgCl₂ (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)

97 ml Diethanolamin (Merck KGaA, Frankfurt)

ad 1 l mit A. dest.

0,02 % NaN₃ (Merck KGaA, Frankfurt)

3.14 Klonierungsstrategien

Die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Gene und Genfragmente nebst den benutzten Primern für RT-PCRs wurden bei Eckey (2002) und Eckey *et al.* (2004) beschrieben:

Isomerase (Acc. Nr. AJ495769)

receptor-like protein kinase (RLK; Acc. Nr. AJ427599)

scarecrow-like protein (Acc. Nr. BF619080)

HvWRKY1 (Acc. Nr. AJ430080)

ABA- und Stress-induzierbares Protein

Chorismatmutase

putative Phytochelatinsynthase (Acc. Nr. AJ427594)

mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK, Acc. Nr. AJ495778)

Die Fragmente von *Poly85* (*blue copper binding protein*, Acc. Nr. AJ309555) und *PI073* (*Poly73*, LRP, Acc. Nr. AJ278559) wurden von Jansen kloniert (Jansen, 2002).

Die *full length* Sequenz von *HvWRKY2* (Acc. Nr. AJ853838) wurde *in silico* aus drei überlappenden ESTs der GenBank EST-Datenbank (Kap. 3.2) zusammengesetzt.

Acc. Nr. der ESTs

BQ765471

BQ763525

BQ766055

HvWRKY2 full length Primer (mit angehängten Restriktionsstellen, fett)

WRKY3Spe5' 5'-**ACTAGT**CGAGGAAGACATGGAGGAGCA-3'

WRKY3HindIII 5'-**AAGCTT**GCTGGGAGATTTCCGATCA-3'

Die Sequenz von *HvWRKY3* (Acc. Nr. AJ853839) wurde aus drei überlappenden ESTs der GenBank EST-Datenbank (Kap. 3.2) generiert:

Acc. Nr. der ESTs

CB877228

CD054286

CK565910

Primer für *HvWRKY3*

RTW6for 5'-CGCAGTCTCAGCCTCTCAGGTTC-3'

RTW6rev 5'-TCCGCCATTGATACCCGTCTTTC-3'.

Zur Verlängerung des Fragmentes in Richtung des 3'-Endes wurde eine *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) durchgeführt. Dazu dienten 250 ng mRNA aus nicht inokulierten bzw. mit *BghA6* inokulierten Gerstenblättern (cv. Ingrid, vereinigt 3 bis 13 hpi) als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer cDNA-Bank mit dem *GeneRacer™ Kit* (Invitrogen Life Science GmbH, Karlsruhe). Mit *GeneRacer™*- und genspezifischen Primern wurde eine erste, sehr spezifische, PCR-Reaktion durchgeführt, deren Produkte als *template* für eine folgende *nested-PCR* benutzt wurden. Die Primer dafür lagen innerhalb des mit der ersten PCR gewonnenen Fragmentes. Die Durchführung der Reaktionen folgte dem Herstellerprotokoll. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, eluiert und sequenziert.

Primer für das 3'-RACE von *HvWRKY3*

3'RACEW6II	5'-GGCAAGAAAAGGAGCAGGGAGAGCATGGA-3'
nest3'RACEW6II	5'-GATTCCGGCGATGGCAACAGCGACAA-3'
3'RACEW6	5'-TTGTCGCTGTTGCCATCGCCGGAATC-3'
n3'RACEW6	5'-TCCATGCTCTCCCTGCTCCTTTTCTTGCC-3'

Die Sequenzen von *HvWRKY4*, (Acc. Nr. AJ853840), *HvWRKY5* (Acc. Nr. AJ853841) und *HvWRKY6* (Acc. Nr. AJ853842) stammen aus der GABI Primärdatenbank.

Primer für *HvWRKY4*

W15fwd	5'-GCGGGCGATGACGGCG-3'
W15rev	5'-GAAAAGCATCGAATGAAGATCAGCCG-3'

Primer für *HvWRKY5*

W16fwd	5'-CGGCACGAGGTGTGGACTTG-3'
W16rev	5'-CCTGGACATATTATCAATTATCAGTTATGACGC-3'

Primer für *HvWRKY6*

W17fwd	5'-GGCTGCAAAGATGAGCGATGG-3'
W17rev	5'-CTAACCCAACAACAGCTCACGTAACC-3'

Zur Klonierung der ORFs für die transienten Überexpressionsexperimente dieser Arbeit wurden folgende Primer mit angehängten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen benutzt:

HvWRKY1 full length Primer

9-10Xbafor	5'- TCTAGAG AGGGACCAATGGATCCA-3'
9-10Sph	5'- GCATGCT TGTGGGATTAATTGATG-3'

HvWRKY2 full length Primer

WRKY3Spe5'	5'- ACTAGTC GAGGAAGACATGGAGGAGCA-3'
WRKY3HindIII	5'- AAGCTT GCTGGGAGATTTCCGATCA-3'

Isomerase full length Primer

SAL5-4	5'- ACGTCGACT CATTGCGTCTGCCCTA-3'
Bam5-4	5'- ACGGATCCT GCCGCATCCATGGCGAA-3'

Für die RNAi-Experimente wurden folgende Genbereiche und Primer verwendet:

Tab. 2.4 Übersicht über die für transiente RNA-Interferenz Experimente benutzten Genfragmente und die zu ihrer Erzeugung verwendeten Primer (Primersequenzen siehe 8.1).

Genbezeichnung	Transformiertes Fragment [Position Nukleotide]	Primernamen
<i>Isomerase</i>	24-547	5-4for+ 5-4rev
<i>RLK</i>	1259-1390	8a-14for + 8a-14rev
<i>MAPKKK</i>	495-571	9-8for + 9-8rev
<i>Scarecrow like protein</i>	54-524	8a-4for + 8a-4rev
<i>ABA-und Stress- induzierbares Protein</i>	1-155	N7-5for + N7-5rev
<i>HvWRKY2</i>	11-967	WRKY3Spe5' + WRKY3Sph
<i>HvWRKY2 "kurz"</i>	11-400	WRKY3Spe5 + RTWRKY3
<i>HvWRKY3</i>	71-415	RTW6for+ RTW6rev

3.15 Genfunktionsanalysen durch transiente Transformation: RNA Interferenz (RNAi) und Überexpression

Eine relativ schnelle Möglichkeit die Bedeutung eines Gens in Bezug auf die Pathogenabwehr von Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltau zu untersuchen, besteht darin, das zu untersuchende Gen mittels transienter Transformation in Epidermiszellen überzuexprimieren oder zu reprimieren (*knock-down*). Genfunktionsanalysen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten durch Beschuss von Gerstenblättern mit Wolframpartikeln, die mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) beschichtet waren. So konnte ein sequenzspezifischer *knock-down* des entsprechenden Gens über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) erzielt werden. Die Expression des jeweiligen Gens in der Epidermis wurde vorab mittels RT-PCR überprüft (Kap. 3.12.2). Zusätzlich wurden einige Gene unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV-35S-Promotors überexprimiert. Die durch Überexpression bzw. *knock-down* ausgelösten Veränderungen in der Pathogenabwehr der Epidermiszellen konnten mikroskopisch verfolgt werden (Kap. 3.15.4).

Die Methode zur Bestimmung der Bedeutung eines Gens bei der Pathogen-Abwehr durch transiente Überexpression oder *knock-down* durch RNAi wurde von P. Schweizer (1999, 2000) für das System Gerste/Echter Mehltau entwickelt. Als Marker für transformierte Zellen diente GFP (*green fluorescent protein*, Schweizer *et al.* 1999). Das Plasmid pGFP zur konstitutiven Überexpression von GFP wurde zusammen mit dsRNA (Kap. 3.15.1) bzw. der Test-DNA mittels einer *particle inflow gun* in die Epidermiszellen geschossen (Kap.3.15.3). Nach 4 h bzw. 24 h wurden die Blätter mit *BghA6* inokuliert und die Interaktion zwischen Pilz und Epidermiszelle weitere 40-48 h später mikroskopisch ausgewertet. Als Kontrollansatz in den Versuchen zur RNA-Interferenz diente dsRNA eines humanen Thyroid-Hormonrezeptors (*Acc. Nr.* NM000461). Dieses Gen weist keine Homologie zu pflanzlichen Sequenzen auf. Für die Überexpression wurden Kontrollblätter mit dem leeren Vektor (pGY-1, Schweizer *et al.*, 1999) beschossen.

3.15.1 Herstellung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Für die Herstellung der dsRNA wurde ein linearisiertes Plasmid, in diesem Falle der pGEM®-T-Vektor (Promega, Madison, USA, Kap. 3.9), mit das einklonierte DNA-Fragment (*insert*) flankierenden Promotoren für T7- und Sp6-RNA-Polymerasen benötigt. Um den Vektor zu linearisieren, wurden zwei Restriktionsverdauungen mit Restriktionsenzymen, die vor und hinter dem *insert*, aber nicht in selbigem schneiden, und mit für das jeweilige Enzym passenden Puffern durchgeführt.

Restriktionsansatz

10	µg Plasmid
3	µl 10x Puffer
1,5	µl Restriktionsenzym (10 u/µl)

Ad 30 µl MilliQ-Wasser
2 h, 37 °C

Anschließend wurde der Ansatz mit 170 µl MilliQ-Wasser und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25: 24: 1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) versetzt, kurz gevortext und 10 min bei 4 °C und 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 420 µl Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gegeben und die geschnittenen Plasmide für mindestens 30 min auf Eis gefällt. Dann wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C und 14 000 rpm zentrifugiert und das nach Verwerfen des Überstandes getrocknete Pellet in 10 µl MilliQ-Wasser_{DEPC} gelöst. Durch Inkubation mit den RNA-Polymerasen T7 bzw. Sp6 für 2 h bei 37 °C

erfolgte die Synthese der RNA-Einzelstränge in *sense* bzw. *antisense* Orientierung (*in vitro* Transkription).

In vitro Transkription

2	µg linearisiertes Plasmid (<i>template</i>)
4	µl 10x Puffer
1	µl RNase-Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 40 u/µl)
5	µl NTPs (10 mM, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
3	µl T7- bzw. Sp6- RNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 20 u/µl)
26	µl A. <i>bidst.</i> _{DEPC}

Beide Ansätze wurden zur Bildung doppelsträngiger RNA vereinigt, 5 min im Heizblock denaturiert und anschließend langsam für mindestens 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Durch Auftragen von jeweils 2 µl jedes Einzelstranges und der dsRNA im TBE-Agarosegel wurde die Qualität der dsRNA überprüft. Für die photometrische Konzentrationsmessung wurden zu 4 µl der dsRNA 6 µl *MilliQ*-Wasser_{DEPC}, 1 µl 3 M NaAcetat (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) und 25 µl Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) pipettiert, 10 min bei 14 000 rpm gefällt und das Pellet in 400 µl *MilliQ*-Wasser_{DEPC} gelöst.

3.15.2 Präparation und Beschichtung der *microcarrier*

Für die transiente Transformation wurden Wolframpartikel (M17, 1,1 µm Durchmesser, Bio-Rad, München) mit der dsRNA bzw. der Test-DNA und dem Reporter-genkonstrukt pGFP (GFP unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors in pGY-1) beschichtet. Die Präparation der Wolframpartikel (*microcarrier*) erfolgte, indem 55 mg Partikel zweimal mit 1 ml *MilliQ*-Wasser und einmal mit 1 ml Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gewaschen wurden. Anschließend wurden die Partikel getrocknet, in 2 ml 50 %igem Glycerin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) aufgenommen, mit 1 µl/ml DEPC (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) behandelt (3 h, 37 °C) und anschließend für 30 min auf 95 °C erhitzt.

Vor Gebrauch wurden die *microcarrier* gevortext und im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 106, Bandelin, Mörfelden-Walldorf) für mindestens 10 min suspendiert. Zuerst wurden die Partikel zusammen mit der dsRNA bzw. der Test-DNA und dem Reporter-genkonstrukt in ein Reaktionsgefäß pipettiert und dann die Nukleinsäure durch langsame, tropfenweise Zugabe von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ unter vortexen auf die Wolframpartikel präzipitiert.

microcarrier-Beschichtung für RNAi (Angaben pro Schuss):

12,5	µl Wolframpartikel (25 mg/ml)
1	µg GFP-Plasmid
2	µg dsRNA (Testgen/Kontrolle)
14,5	µl Ca(NO ₃) ₂ , 10 mM, pH 10 (Merck KGaA, Frankfurt)

microcarrier-Beschichtung für Überexpression (Angaben pro Schuss)

12,5	µl Wolframpartikel (25 mg/ml)
0,5	µg GFP-Plasmid
0,8	µg Test-DNA/leerer pGY-1 Vektor
12,5	µl Ca(NO ₃) ₂ , 10 mM, pH 10

In der Regel wurden acht Schüsse pro Testgen durchgeführt und die *microcarrier* dazu im 10fachen Ansatz pipettiert. Die Ansätze standen 10 min auf Eis, die Wolframpartikel wurden kurz zentrifugiert und so viel vom Überstand abgenommen, dass 60 µl der Lösung übrig blieben. Pro Transformation wurden 6 µl benötigt.

3.15.3 Transiente Transformation mittels *particle inflow gun*

Zur Transformation wurden die Primärblätter von etwa sieben Tage alten Gerstenpflanzen benutzt. Etwa 4 cm lange Blattspitzen wurden mit der adaxialen Seite nach oben auf Petrischalen (Durchmesser: 6,5 cm) mit 0,5 % Phytagar (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gelegt. Die Blätter wurden unmittelbar vor der Transformation mit einer Plastikschaablone, die in der Mitte eine Fläche von etwa 5 cm² freiließ in der Petrischale fixiert und auf den Boden der Vakuumkammer gestellt. Der an der Kammerdecke angebrachte *macrocarrier* (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, *Gelman Sciences*, Swinney, UK) wurde mit 6 µl beschichteten Wolframpartikeln (Kap. 3.15.2) beladen. Der Druck in der Kammer wurde mit einer Membranvakuumpumpe um 0,9 bar reduziert und die Partikel mit 9 bar Heliumgasdruck durch ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des *macrocarriers*) in die Blätter eingebracht. Sofort danach wurde die Kammer belüftet.

4 h oder 24 h nach Beschuss erfolgte die Inokulation der Blattsegmente mit Konidiosporen des Echten Gerstenmehltaus der Rasse A6 im Inokulationsturm. Die Sporendichte betrug etwa 100 Sporen pro mm².

3.15.4 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Versuche erfolgte zwei Tage nach Inokulation mit Hilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops (Axioplan, Zeiss, Jena). Die Pilzstrukturen wurden mit einer 0,3 %igen Calcofluorlösung (Polysciences Inc., Warrington, USA) angefärbt und die Präparate unter Fluoreszenzanregung

(Quecksilberhochdrucklampe, HBO 50 W, Osram, München) bei 100facher Vergrößerung mit einem GFP-Filter (Anregungsfilter 420 nm, Farbteiler 493 nm, Sperrfilter 505-530 nm) nach GFP-Zellen abgesucht. Mit 400facher Vergrößerung wurden die GFP-Zellen unter Zuhilfenahme eines Filters (365 nm/ 395 nm/ 420 nm) und Durchlichts (Halogenlampe, 12 V, 100 W) auf Interaktionen mit gekeimten Mehлтаupilzsporen untersucht. Dabei wurden mindestens 50 Interaktionen je Ansatz mikroskopiert, wobei Spaltöffnungen nicht berücksichtigt wurden. Bei den attackierten Zellen wurde zwischen erfolgreich penetrierten Zellen (Haustorium) und solchen, die den Penetrationsversuch abgewehrt und eine Papille gebildet hatten, unterschieden. Die Penetrationsrate ergibt sich als Quotient der Summe der penetrierten Zellen mit Haustorium und der Summe der attackierten Zellen insgesamt.

3.16 Subzelluläre Lokalisation eines Fusionsproteins

Klonierungsstrategie

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von HvWRKY1 und 2 erfolgte mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen. Dazu wurden *HvWRKY1* und *HvWRKY2* mittels PCR, ausgehend von einem den *full length* Klon beinhaltenden Plasmid, amplifiziert. Dafür wurden dieselben Primer wie bereits für die Überexpressionsexperimente (Kap. 3.14) verwendet. Die *full length* PCR-Produkte von *HvWRKY1* und 2 wurden in den pGM[®]-T Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert, die Sequenz und Orientierung überprüft und das jeweilige Gen in den Expressionsvektor pGY-1-GFP (Schweizer *et al.* 1999) umkloniert. Dazu wurde mit XbaI und SphI (*HvWRKY1*) bzw. Sall und HindIII (*HvWRKY2*) geschnitten.

HvWRKY1 full length primer

9-10XbaI	5'- TCTAGAGAGGGACCAATGGATCCA -3'
9-10Sph	5'- GCATGCTGTGGGGATTAATTGATG -3'

HvWRKY2 full length primer

WRKY3Spe5'	5'- ACTAGTCGAGGAAGACATGGAGGAGCA -3'
WRKY3HindIII	5'- AAGCTTGCTGGGAGATTTCCGATCA -3'

Transformation und Mikroskopie

Etwa sieben Tage alte Gerstenblattsegmente wurden durch *particle bombardment* (Kap. 3.14) transient transformiert. Dazu wurden pro Schuss 1 µg des pGFP:HvWRKY Konstruktes zusammen mit 1 µg DsRed (pe35AsclOptRed:

DsRedC1 unter der Kontrolle des CaMV-35S Promotors (erhalten von Maiss, Universität Hannover) in Gerstenepidermiszellen eingebracht. DsRed diente dabei als Kontrolle für die Lokalisation im Zytosol und im Zellkern (Dietrich und Maiss, 2002). Ein Teil der Proben wurde 24 h nach Transformation mit *BghA6* inokuliert. Drei Tage nach der Transformation wurden die Fusionsproteine mit Hilfe eines konfokalen Laser-*Scanning* Mikroskops (Leica TCS SP2; Leica Microsystems AG, Bensheim) visualisiert. Die GFP-Anregung lag bei der Wellenlänge 488 nm, die Detektion fand bei 505 bis 530 nm statt. DsRed wurde mit 543 nm angeregt, die Detektion bei 580 bis 650 nm durchgeführt. Die biologische Funktionsfähigkeit der Fusionsproteine wurde durch transiente Überexpressionsexperimente (Kap. 3.14) bestätigt.

3.17 Transgene Pflanzen

Stabil transgene Pflanzen wurden von Hensel und Kumlehn (IPK Gatersleben) erstellt. Dazu wurde die Methode der *Agrobacterium* vermittelten Transformation gewählt. Das der Transformation dienende Konstrukt wurde von Eckey (IPAZ, Gießen) erstellt: Zwei PCR-Produkte von *HvWRKY1* (1041 - 1389 nt) wurden gerichtet über die Schnittstellen *SpeI* und *PstI* bzw. *XbaI* und *BamHI* zur Überprüfung der Sequenz erst in pGEM[®]-T (Promega, Madison, USA) und dann nacheinander in den RNAi Vektor pJP26 (Dudler, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich) kloniert, so dass sie durch das RGA2-Intron getrennt waren. Am IPK Gatersleben wurde dieses Konstrukt dann unter der Kontrolle des Mais Ubiquitin-Promotors in den Binärvektor pLH6000 umkloniert (Kap. 8.2).

Die T₁-Generation der Pflanzen wurde auf das Vorhandensein des Transgens und des CaMV-35S-Promotors, der die Expression der Antibiotikaresistenz kontrollierte, getestet. Als Kontrollen dienten gleich alte Golden Promise Wildtyp Pflanzen. Es wurden zehn Körner je Kultivar angezogen. Diese wurden vorher 1 min mit 70 %igem Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und 1,5 h mit 6 %iger NaOCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) oberflächensterilisiert und anschließend gründlich mit *A. dest.* gewaschen.

Das nach ca. sieben Tagen gewachsene Primärblatt wurde auf Phytagar gelegt und nach 1,5 h mit *BghA6* inokuliert. 48 h nach Inokulation wurden die Blätter für zwei Tage in Entfärberlösung gegeben, die nach einem Tag erneuert wurde, und dann bis zur Mikroskopie in 50 % Glycerol aufbewahrt. Zur Mikroskopie wurden die

extrazellulären Strukturen des Pilzes mit essigsaurer Tinte angefärbt und je Blatt 200 Interaktionen ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, verschiedene Bereiche des Blattsegments zu berücksichtigen. Es wurde unterschieden zwischen ausgebildetem Haustorium und gestoppter Penetration mit Papillenbildung.

Das Sekundärblatt wurde geerntet, mit *BghA6* inokuliert und 4 hpi in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus dem Material wurde Gesamt-RNA isoliert (Kap. 3.6) und damit eine *One-Step* RT-PCR durchgeführt (Kap. 3.12.3).

Primer für die Klonierung in pJP26

Pst9-10RNAi 5'-**CTGCAG**CTCGAGCTCTCGCCGACCA-3'

Spe9-10RNAi 5'-**TGATCAG**GAAATTATGGAACGGAAC-3'

Xba9-10RNAi 5'-**TCTAGAG**GAAATTATGGAACGGAAC-3'

Bam9-10RNAi 5'-**GGATCC**TCGAGCTCTCGCCGACCA-3'

Entfärberlösung

1,5 g Trichloressigsäure (Merck KGaA, Frankfurt)

750 ml Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

250 ml Chloroform (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Essigsaurer Tinte

10 % (v/v) Blaue Tinte (Pelikan 4001, Pelikan Holding AG, Baar, Schweiz)

90 % (v/v) Essigsäure 25 % (Merck KGaA, Frankfurt)

3.17.1 Southern Blot

DNA Isolierung

Das Protokoll für den Southern Blot wurde von Kannangara (Washington State University, Pullman, USA) zur Verfügung gestellt.

Blätter von etwa drei Wochen alten Pflanzen wurden zusammen mit etwas Seesand (Riedel-De-Haën AG, Seelze) unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 1,5 g Material wurden mit 7 ml auf 65 °C vorgewärmtem Puffer S gemischt und 0,7 ml 20 % SDS (Natrium-Lauryl-Sulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) hinzugefügt. Die Proben wurden für 2 h bei 65 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Chloroform: Isoamylalkohol (24: 1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) auf 14 ml aufgefüllt, gemischt und 20 min bei 1 000 rpm zentrifugiert (Rotina 48R, Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen). Zu dem Überstand wurden 60 % (v/v) Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zum Fällen der DNA hinzugefügt und erneut für 4 min bei 1 000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde bei 45 °C in 4 ml 1x TE gelöst. Ein RNase-Verdau mit RNase A (Endkonzentration 10 µg/ml, *ribonuclease A from bovine pancreas*, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) wurde bei 37 °C für 2 h oder über Nacht bei 4 °C

durchgeführt. Zur Fällung des Enzyms wurden 8 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) hinzugefügt, 15 min bei 1 000 rpm zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Dazu wurden 10 % (v/v) 3 M NaAcetat (pH 5,2, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) und das doppelte Volumen eiskalter Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zugegeben und zur erneuten Fällung der DNA bei 1 000 rpm für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in ca. 200 µl 1x TE-Puffer bei 45 °C gelöst.

Puffer S

110	mM Tris (pH 8,0, USB, Cleaveland, USA)
55	mM EDTA (pH 8,0, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
1,54	mM NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
1,1	% CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

1x TE

10	mM Tris/HCl (pH 8,0, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
1	mM EDTA (pH 8,0, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)

Southern blotting

10 µg der DNA wurden mit 30 u eines der folgenden Enzyme über Nacht bei 37 °C in dem entsprechenden Puffer verdaut: KpnI, PvuII, BamHI, HindIII. Die Vollständigkeit des Verdauens wurde auf einem 0,8 %igem TBE-Agarosegel getestet (Kap. 3.8.2). Dann wurde der komplette Verdau auf ein 0,8 %iges TAE-Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetragen und über Nacht bei 4 °C und 25 V über eine Laufstrecke von etwa 10 cm aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente dabei der mit HindIII linearisierter Vektor *HvWRKY1* in pGY-1 und der mit XbaI linearisierte Binärvektor pLH6000-9-10RNAi. Beide Vektoren enthalten auch den CaMV-35S-Promotor. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) gefärbt und photographiert. Anschließend fand die Depurinierung der DNA für 15 min in 0,25 N HCl statt. Das Gel wurde in der Lösung T für 15 min denaturiert. Das *blotting* fand über Nacht bei Raumtemperatur mit Lösung T als Transferpuffer statt. Dazu wurde ein langes Stück Gel-*blotting*-Papier (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) über eine Plasticscheibe gelegt, so dass es in Kontakt mit dem Transferpuffer stand und als Flüssigkeitsbrücke diente. Darauf wurden mehrere Gel-*blotting*-Papiere gestapelt. Es folgte das Gel und darauf die Membran (Hybond N+, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Mittels Plastikfolie wurde ein Flüssigkeitstransport an der Membran vorbei verhindert. Auf die Membran wurden erst Gel-*blotting*-Papiere und dann Kleenex®-Tücher (Hakle-

Kimberly Deutschland GmbH, Mainz) gestapelt. Die Membran wurde anschließend 2 h lang bei 37 °C getrocknet und dadurch fixiert.

50x TAE

- | | |
|----|--|
| 40 | mM Tris-Acetat (242 g Tris-Base USB, Cleveland, USA + 57,1g Eisessig, Merck KGaA, Frankfurt) |
| 1 | mM EDTA (pH 8,0, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) |

Lösung T

- | | |
|-----|---|
| 0,4 | M NaOH (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) |
| 0,6 | M NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) |

Sondenherstellung

Zur Herstellung der Sonden wurde eine PCR mit Primern für den CaMV-35S-Promotor oder für *HvWRKY1* durchgeführt. Als *template* diente ein das entsprechende Gen enthaltende Plasmid. Die radioaktive Markierung wurde mit den *Ready To Go*TM DNA Labelling Beads (-dCTP, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 50 ng DNA und 50 µCi [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) eingesetzt. Abweichend vom Herstellerprotokoll betrug die Inkubationszeit 1 h.

Primer für die Sondenherstellung

- | | |
|-----------|-----------------------------------|
| 35S_for | 5'-ATGGTGGAGCACGACACTCT-3' |
| 35S_rev | 5'-GGTCTTGCGAAGGATAGTGG |
| RT9-10for | 5'-GACGAGGGACCCCAGCTTCAA-3' |
| RT9-10rev | 5'-CATGGAAATTATGGAACGGAACATTTG-3' |

Hybridisierung

Vor der Prähybridisierung wurde die Membran in 2x SSC äquilibriert. Dann wurde sie blasenfrei in die Hybridisierungsröhre überführt. Der Prähybridisierungspuffer wurde 7 min lang gekocht, dann auf die Membran gegeben und ca. 1 h lang auf der Membran unter langsamen Drehen (Hybridisierungsöfen Hybaid GmbH, Heidelberg) belassen. Anschließend wurde der Puffer durch den Hybridisierungspuffer ersetzt. Diesem wurde 1 ml frisch gekochte *Salmon Sperm*-DNA zugefügt und wiederum für 7 min gekocht. Die radioaktiv markierte Probe wurde hinzugegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert.

Prähybridisierungspuffer

- | | |
|----|------------------|
| 18 | ml MilliQ-Wasser |
| 6 | ml 5x HSB |
| 3 | ml Denhardts III |

auf 65 °C erhitzen, dann 3 ml frisch gekochte *Salmon-Sperm*-DNA (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) zufügen

5x HSB

30,3 g PIPES (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in 300 ml *MilliQ*-Wasser pH 6,8
600 ml 5 M NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0 Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
ad 1 l *MilliQ*-Wasser, autoklavieren

Denhardts III

4 g BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
20 g SDS (Natrium-Lauryl-Sulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
4 g Ficoll-400 (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)
4 g PVP-360 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
10 g Na₄P₂O₇ x 10 H₂O (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen)
ad 200 ml *MilliQ*-Wasser

20x SSC pH 7,0

3 M NaCl
0,3 M tri-Natrium-Citrat x 2 H₂O (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Waschen des Southern Blots und Entwicklung

Der Hybridisierungspuffer wurde entfernt und der Blot 1 min lang mit 100 ml Lösung A gewaschen. Anschließend wurde 30 min lang mit 300 ml Lösung A bei 65 °C inkubiert und dieser Schritt wiederholt. Eine weitere Wiederholung dieses Schrittes fand mit Lösung B statt. Die Auswertung der Ergebnisse fand mit Hilfe des PhosphorImagers Imager FX von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) statt. Dazu wurde der Blot auf einem Kodak (BaFBr:Eu) *screen* (Kodak GmbH, Stuttgart) für zwei bis drei Tage exponiert.

Lösung A

2x SSC
1 % SDS (Natrium-Lauryl-Sulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Lösung B

2x SSC
0,5 % SDS (Natrium-Lauryl-Sulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

3.18 MAPKKK-Inhibitor

Um zu untersuchen, ob *HvWRKY1* über einen MAPK-Signalweg (*mitogen activated protein kinase*) reguliert wird, wurde ein Inhibitor für MAPKKKs (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*), der MEK Inhibitor U0126 (Promega Madison, USA, Duncia *et al.* 1998, Asai *et al.*, 2002), verwendet. Es wurden Primärblätter von sieben Tage alten Gerstenpflanzen cv. Ingrid abgeschnitten und mit der Schnittstelle für zwei Stunden in eine 10 µM Lösung von U0126 in 0,2 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) gestellt (*uptake*-Experiment). In einem weiteren Experiment wurden die Blätter 12 h auf der Lösung inkubiert (*floating*-Experiment). Kontrollblätter wurde jeweils mit einer 0,2 %igen DMSO

Lösung ohne Inhibitor behandelt. Nach der Behandlung wurden die Blätter auf Petrischalen mit 0,5 % Phytagar (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gelegt und mit *BghA6* inokuliert. Einige Blätter wurden nach verschiedenen Zeitpunkten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur RNA-Extraktion gelagert (Kap. 3.6). Im *uptake*-Experiment wurde die Expression von *HvWRKY1* mittels *One-Step* RT-PCR untersucht (Kap. 3.12.3). 48 h nach Inokulation wurde an anderen Blättern der Penetrationserfolg der Mehltaupilzes mikroskopisch ausgewertet. Im *uptake*-Experiment wurde die Penetrationsrate des Pilzes auf jeweils sieben Blättern der Kontrolle und zehn behandelten Blättern ermittelt, im *floating*-Experiment auf acht Blättern der Kontrolle und sieben Behandelten. In der Zone nahe der Schnittstelle, im mittleren Blattbereich und an der Spitze wurden jeweils 100 Interaktionen betrachtet.

3.19 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Bei der Methode des EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) handelt es sich um einen sensitiven Test zur Identifizierung von DNA-Protein-Wechselwirkungen *in vitro*. Diese Methode basiert darauf, dass die elektrophoretische Mobilität eines DNA-Protein-Komplexes geringer ist, als die der freien DNA. Sie diente in dieser Arbeit dazu, die selektive Bindung von *HvWRKY1* und *HvWRKY2* an W-Boxen aus dem Promotor von *HvWRKY1* nachzuweisen. Um eine ausreichende Menge an WRKY-Protein zur Verfügung zu haben, wurden *HvWRKY1* und 2 in *E. coli* überexprimiert.

3.19.1 Klonierung in den Expressionsvektor pQE30

Der Expressionsvektor pQE30 (The *Qiaexpressionist*[™], Qiagen GmbH, Hilden) wurde bereits erfolgreich für die heterologe Expression von *WRKY*-Genen eingesetzt (Miao *et al.*, 2004). Er zeichnet sich durch ein N-terminales 6xHis-Epitop aus. Die kodierenden Bereiche von *HvWRKY1* und *HvWRKY2* wurden ausgehend von cDNA mittels PCR (Kap. 3.12.2) inklusive des endogenen Startkodons, aber ohne Stopkodon, amplifiziert, um das Anhängen des His-tags zu ermöglichen. Um eine gerichtete Ligation zu erreichen, wurden Primer mit Schnittstellen für zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet. Es wurde ein Zwischenklonierungsvektor (pGEM[®]-T Vektor, Promega, Madison, USA) benutzt und dieser nach Ligation mit dem PCR-Produkt in beide Richtungen sequenziert,

um sicherzugehen, dass die Sequenz korrekt war. Danach wurde *HvWRKY1* nach der entsprechenden Restriktionsendonuklease-Behandlung in die Sall/SphI Schnittstellen des pQE30 Vektors, *HvWRKY2* in die Sall/HindIII Schnittstellen einkloniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass durch die Klonierung das Leseraster (*frame*) nicht verändert wurde: Der Übergang von pQE30 zum einklonierten Fragment wurde sequenziert.

Primer für die Klonierung in pQE30

WRKY1Sal3' 5'-**GTCGAC**GATTAATTGATGTCCCTGGTC-3'
WRKY1Sph5' 5'-**GCATGC**ATCGATCCATGGATAGGCAG-3'

WRKY3Sal5' 5'-**GTCGAC**ACATCGAGGAGCAGTGG-3'
WRKY3Hind3' 5'-**AAGCTT**GCTGGGAGATTTCCGATCA-3'

SeqpQE 5'-CGGATAACAATTTACACAG-3'

3.19.2 Überprüfung der Expression des rekombinanten Proteins

Nach Transformation des rekombinanten Expressionsplasmids in den *E. coli*-Expressionsstamm M15 [pREP4] (Qiagen GmbH, Hilden) wurden separate Kolonien in eine 1 ml LB Vorkultur mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1 ml der Übernachtskultur wurden in 12 ml vorgewärmtes LB Medium mit Ampicillin und Kanamycin gegeben und bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht war. 1 ml des Mediums wurde als Kontrolle (Zeitpunkt T₀) entnommen. Durch Zugabe von IPTG in der Endkonzentration von 1 mM wurde die Expression des heterologen Proteins induziert. Als Positivkontrolle diente pQE40 mit dem DHFR Protein (26 kDa). In Abständen von jeweils 1 h wurden 2 ml des Mediums abgenommen, zentrifugiert (14 000 rpm, 5 min) und das Pellet bei -20 °C gelagert.

E. coli M15 [pREP4] Genotyp

Nal^S, Str^S, Rif^S, *thi*⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺ Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

3.19.3 Extraktion des rekombinanten Proteins

Die Bakterienpellets wurden jeweils in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 100 µg/ml Lysozym (*lysozyme from hen egg white*, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) und jeweils 1 u DNase I (Qiagen GmbH, Hilden) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und direkt anschließendes Auftauen wurden die Zellwände geöffnet. Erneut wurde 30

min bei 37 °C inkubiert und 5 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden bei –20 °C getrennt aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration wurde in Anlehnung an die Bradford-Methode (Bradford, 1976) gemessen. Dazu wurde Roti®-Blue (*Coomassie Brilliant Blue G250*, Bio-Rad, München) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Messung der OD₅₉₅ erfolgte mit dem Photometer DU 7400 (Beckman, München). Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve (BSA) ermittelt.

TE-Puffer pH 8,0

10	mM Tris/HCl (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
1	mM EDTA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)

3.19.4 Auftrennung der Proteine

Zur Überprüfung des rekombinanten Proteins wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Kap. 3.13.3) durchgeführt. Es wurden 20 µg Protein und 7 µl Größenmarker (*BenchMark™ Prestained Protein Ladder*, Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) aufgetragen. Zur Kontrolle, ob sich das Protein auch im Pellet befand, wurde das Zellpellet in 20 µl TE-Puffer aufgenommen, denaturiert und davon 9 µl auf das Gel aufgetragen.

Nach dem Gellauf wurde das Gel mit dem InVision His-tag In-gel Stain (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe) behandelt. Dieser Farbstoff ermöglicht eine schnelle Färbung von His-tags durch UV-Licht. Die Färbung des Gels erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Anschließend wurde das Gel mit Roti®-Blue (*Coomassie Brilliant Blue G250*, Bio-Rad, München) ohne vorherige Fixierung gefärbt. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel über Nacht in Färbelösung unter leichtem Schwenken gefärbt und anschließend in Entfärberlösung leicht geschüttelt, bis der Hintergrund klar war. Das Gel wurde dann eine halbe Stunde in Trocknerlösung gegeben und anschließend zwischen Zellophanfolie (Max Bringmann KG, Wendelstein) in einem Rahmen eingespannt und getrocknet.

Färbelösung

50	% (v/v) Methanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
10	% (v/v) Essigsäure (Merck KGaA, Frankfurt)
0,5	% (w/v) Roti®-Blue (<i>Coomassie Brilliant Blue G250</i> , Bio-Rad, München)

Entfärberlösung

30	% (v/v) Methanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
10	% (v/v) Essigsäure (Merck KGaA, Frankfurt)

Trocknerlösung

3	% (v/v) Glycerol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
27	% (v/v) Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

3.19.5 Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide

Die für die EMSA-Versuche verwendeten Oligonukleotide (MWG-Biotech AG, Ebersberg) enthielten W-Box Motive, deren Sequenz denjenigen aus dem Promotor von *HvWRKY1* (Kap. 3.20), inklusive der die W-Box umgebenden Nukleotide, entsprechen. „W-box1“ entspricht der ersten W-Box *upstream* des ATG (-635 nt), „W-box2“ der vierten W-Box *upstream* (-1322 nt). Um die Oligonukleotide in den *gel-shift*-Experimenten verwenden zu können, mussten zunächst jeweils Sinn- und Gegensinn-Fragment miteinander hybridisiert werden. Dazu wurden von den Oligonukleotiden gleiche Mengen (je 2 µg der Stocklösung mit 100 pmol/µl) zu 6,5 µl *MilliQ*-Wasser gegeben, bei 70 °C für 5 min denaturiert und dann langsam abgekühlt (*annealing*).

Sequenzen der Oligonukleotide

Wbox1f	5'-GGGCATGTGTGGTGCACCTTCCTTGACCCGATCATCAGCAC-3'
Wbox1r	5'-GGGGTGCTGATGATCGGGTCAAGGAAGTGCACCACACAT-3'
Wbox2f	5'-GGGAACGTCGACGTCGGTCAAGAAAAGGGGCACC-3'
Wbx2r	5'-GGGGGTGCCCCCTTTTCTTGACCGACGTCGACGTT-3'

3.19.6 Herstellung der Sonde, Bindereaktion und Gellauf

Im Anschluss an das *annealing* erfolgte die radioaktive Endmarkierung mit dem Klenowfragment der DNA Polymerase I, welches die überhängende 5'-Enden der hybridisierten Oligonukleotide auffüllt (5' → 3' DNA- Polymeraseaktivität). Zu den hybridisierten Oligonukleotiden wurden 2,5 µl dNTPs (ohne dCTP, MBI Fermentas, St. Lenon-Rot) und 2 µl Klenow-Puffer gegeben. Es wurden 3 µl α^[32P]-dCTP (30 µCi, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) und 2 µl Klenow Enzym (MBI Fermentas, St. Lenon-Rot, 5 u/µl) hinzugefügt und 30 min bei 37 °C im Heizblock (Dri Block DB-2A, Techne, Dextford-Cambridge, England) inkubiert. Die Sonde wurde gemäß den Herstellerangaben über Sephadex 50 (*Quick Spin Columns G-50 for Radiolabeled DNA Purification*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgereinigt. Zur Messung der Einbaurrate wurde 1 µl des Eluats in einem Szintillationszähler (LS 6500 *Multi Purpose Scintillation Counter*, Beckman Coulter, Fullerton, USA) gemessen.

Der Reaktionsansatz zur Bindung der Proteine an die DNA setzte sich zusammen aus 2 µl poly (dIdC) (1 µg/µl, *Poly(2'-deoxyinosinic-2'-deoxycytidylic acid) sodium salt*, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München) zur Absättigung der unspezifischen DNA-Protein Wechselwirkung, 30 µg Proteinextrakt aus *E. coli* und 30 000 bis 50 000 cpm der radioaktiv markierten Sonde. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Bindung von DNA und Protein zu ermöglichen.

Um die Spezifität der DNA-Protein-Bindung festzustellen, wurde ein so genannter Kompetitionstest durchgeführt. Es wurde ein Überschuss von unmarkierter DNA zur Bindereaktion gegeben, der die Bindung der radioaktiv markierten DNA an das heterolog exprimierte Protein verhindern sollte. Dazu wurden je 2 µl der Oligonukleotide wie oben beschrieben hybridisiert, ohne radioaktive Markierung in die Bindereaktion gegeben und der Ansatz 10 min inkubiert. Erst anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Sonde und eine weitere Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur.

Dann wurden 3 µl Probenauftragspuffer (Roti®-Load 2 Proteinauftragspuffer, nicht reduzierend, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zu den Proben hinzugefügt und diese auf ein natives 6 %iges Polyacrylamidgel in 0,5 % TBE aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,5 % TBE. Der Gellauf fand bei 4 °C und 50 V für ca 1,5 h statt.

6 % natives Polyacrylamidgel

1	ml	10x TBE
16	ml	MilliQ-Wasser
3	ml	Acylamidlösung (40 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
50	µl	APS (30 %, Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)
23,2	µl	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

10x TBE pH 8,3

0,9	M	Tris (USB, Cleaveland, USA)
0,9	M	Borsäure (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
0,025	M	EDTA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München)

Das Gel wurde dann auf Gel-*blotting*-Papier (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) transferiert und unter Vakuum bei 80 °C im Geltrockner (Gel Dryer Model 583, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA, Vakuumpumpe Biometra GmbH, Göttingen) für 2 h getrocknet. Die Auswertung der Ergebnisse fand mit Hilfe des PhosphorImagers Imager FX von Bio-Rad (Bio-Rad *Labratories*, Hercules, USA) statt. Dazu wurde der Blot auf einen Kodak (BaFBr:Eu) *screen* (Kodak GmbH, Stuttgart) für ein bis zwei Tage exponiert.

3.20 Promotorsequenzen

Zur Gewinnung von Sequenzinformationen für den Promotorbereich der Gene *HvWRKY1*, *Poly85* und einer putativen *Phytochelatinsynthase* (Kap. 3.14) wurden *upstream*-Bereiche entsprechender BAC (*bacterial artificial chromosomes*) Klone sequenziert (GENterprise GmbH, Mainz). Die BAC-Library entstammt der Hv_Mba Library (Clemson University, Yu et al, 2000) und wurde von Altschmied (IPK Gatersleben) nach den entsprechenden Klonen durchsucht. Die Isolation der BAC-DNA erfolgte mit dem NucleoBond® BAC Maxi Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA). Durch *primer walking* wurden die jeweiligen 5'-upstream-Sequenzen direkt vom BAC sequenziert. Die *in silico* Analyse der gewonnenen putativen Promotorbereiche erfolgte mit den Programmen PlantCARE und PLACE (Kap. 3.2).

Primer für das BAC-screening:

RACEP855'	5'-GGTAGGGATGCCGCAGATGAA-3'
Poly85as	5'-GTAGGGATGCCGCAGATGAAGTAG-3'
RT 13b11f	5'-CAAGCCCAAGTGCTGTGTCCACC-3'
RT 13b11r	5'-CGACCCACTCATGTTGGTTTGC-3'
RT9-10for	5'-GACGAGGGACCCCAGCTTCAA-3'
RT9-10rev	5'-CATGGAAATTATGGAACGGAACATTTG-3'

Thermocycler-Bedingungen für das BAC-screening

5	min	94	°C	
30	sek	94	°C	} 10 Zyklen
30	sek	65	°C -0,5 °C/Zyklus	
1	min	72	°C	
30	sek	94	°C	} 30 Zyklen
30	sek	60	°C	
1	min	72	°C	
3	min	72	°C,	
∞		20	°C	

Sequenzierte BACs

<i>HvWRKY1</i>	BAC 311 E 20
<i>Poly85</i>	BAC 673 I 15
<i>putative Phytochelatinsynthase</i>	BAC 359 N 03

4 ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Resistenzmechanismus von Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz *BghA6* untersucht. Es wurden Gene, die in den Arbeiten von Eckey (2002) im Rahmen eines cDNA-AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) screening und von Jansen (2002) als *Bgh*-induziert beschrieben wurden, näher charakterisiert. Einen Schwerpunkt stellten dabei WRKY-Transkriptionsfaktoren dar. Deren Expressionsprofil wurde ermittelt und ihre Funktion in der Interaktion mit *BghA6* mittels transienter Überexpression und *knock-down* Experimenten untersucht. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden stabile *HvWRKY1 knock-down* Pflanzen hergestellt und charakterisiert. Außerdem wurde der Promotorbereich von *HvWRKY1* und zwei weiteren *Bgh*-responsiven Genen sequenziert.

4.1 In silico Analyse der Sequenzen von WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerste

Der vollständige *open reading frame* (ORF) von *HvWRKY1* (Acc. Nr. AJ536667) wurde von Eckey (2002) mittels RACE und inverser PCR (iPCR) gewonnen. Um die Nukleotidsequenz weiterer WRKY-Transkriptionsfaktoren aus Gerste zu erhalten, wurde die EST-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) nach ESTs, die die Sequenz WRKYGQ enthielten, untersucht. Aus mehreren überlappenden ESTs konnte die Sequenz von *HvWRKY2* (Acc. Nr. AJ853838) abgeleitet und mit spezifischen Primern kloniert werden. Die Länge der Sequenz betrug 987 bp. Der ORF kodiert für ein Protein mit 319 Aminosäuren, einer molekularen Masse von 34,3 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 9,2 (berechnet mit dem *ExPasy Compute pI/Mw Tool*). In 5'-Richtung vor dem wahrscheinlichen Startkodon befinden sich drei *in-frame* Stopkondons, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die cDNA den kompletten ORF enthält. Auf der Proteinebene zeigt *HvWRKY2* eine hohe Sequenzähnlichkeit zu WRKY28 aus Reis (58 % identische Aminosäuren, Acc. Nr. AY541586) und 51 % zu *HvWRKY1*. Auf Nukleotidebene besteht eine Ähnlichkeit von 88% zwischen *HvWRKY1* und 2. *HvWRKY2* enthält, ebenso wie *HvWRKY1*, nur eine WRKY-Domäne. Die Struktur des Zinkfingermotives folgt bei beiden WRKY-Transkriptionsfaktoren dem C₂-H₂

Muster. Deshalb können sie nach Eulgem *et al.* (2000) in Gruppe II der WRKY-Familie eingeordnet werden. Als weitere Motive besitzen beide Sequenzen eine Folge konservierter Aminosäuren (Leucin und Valin), die in funktionellen *leucine zippers* (Cormack *et al.*, 2002) anderer WRKY-Faktoren ebenfalls enthalten sind. Sie dienen der Dimerisierung von Proteinen und beeinflussen in WRKY-Faktoren die Affinität zu W-Boxen. Allerdings konnte 2zip, ein Programm zur *in silico* Identifizierung von *leucine zippers*, nur einen in HvWRKY2 berechnen, obwohl auch HvWRKY1 eine Abfolge von sechs Valin und Leuzin aufweist. Mit Hilfe des Programmes WoLF PSORT konnten mehrere *nuclear localisation signals* (NLS) in den Sequenzen von HvWRKY1 und 2 berechnet werden. Während HvWRKY2 nur ein putatives NLS enthält (108-PARKRAR-114) enthält HvWRKY1 vier (125-RKRK-128 bzw. 123-PSRKRKS-129, 166-PCKRIRE-172 und 227-PVKKKVQ-233). Die Funktionalität dieser Sequenzen bleibt zu überprüfen. Eine Lokalisation im Zellkern wurde von dem Programm PSORT nur für HvWRKY1 vorhergesagt (Kap. 4.8). Xie *et al.* (2005) beschreiben für Reis-WKRY-Faktoren ein Repressormotiv (Tiwari *et al.*, 2004) mit der Sequenz LXLXLX, dessen Funktionalität in Aux/IAA Proteinen von *Arabidopsis* gezeigt wurde (Tiwari *et al.*, 2004). Ob dieses Motiv in WRKY-Transkriptionsfaktoren funktional ist, ist unbekannt. Es ist in beiden hier analysierten Gerste-WRKY-Faktoren konserviert.

Innerhalb einiger WRKY-Transkriptionsfaktoren der Gruppe II ist die Position eines Introns zwischen den Kodons für die Aminosäuren K und V konserviert (Xie *et al.*, 2005, Abb. 3.1). Dazu gehört auch OsWRKY71, der mit 65 % identischen Aminosäuren eine große Ähnlichkeit zu *HvWRKY1* aufweist. Maré *et al.* (2004) berichten, dass dieses in Reis und *Arabidopsis* konservierte Intron in Gerste fehlt, ebenso wie ein zweites Intron am Beginn der WRKY-Domäne (Abb. 3.1). Allerdings konnten sie ein Intron an Beginn des *leucine zippers* in Gerste nachweisen, dass auch in Reis und *Arabidopsis* konserviert ist.

Xie *et al.* (2005) konnten zeigen, dass 35 WRKY-Faktoren aus Reis ein oder mehrere Sumoylierungsmotive enthalten. Das Motiv hierfür ist ψ KXD/E (mit ψ meist als aliphatische, manchmal auch basische oder aromatische Aminosäure). Das Programm SUMO plot™ ermöglicht die Berechnung möglicher Sumoylierungsmotive. Demnach enthält HvWRKY1 zwei Sumoylierungsstellen mit hoher Wahrscheinlich (55-LKKD-58 und 195-VKDG-198), HvWRKY2 nur eines (183-VKDG-186). Folgende Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz von *HvWRKY1*

und 2 inklusive der beschriebenen Motive. Die beiden Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms ClustalW *aligned*.

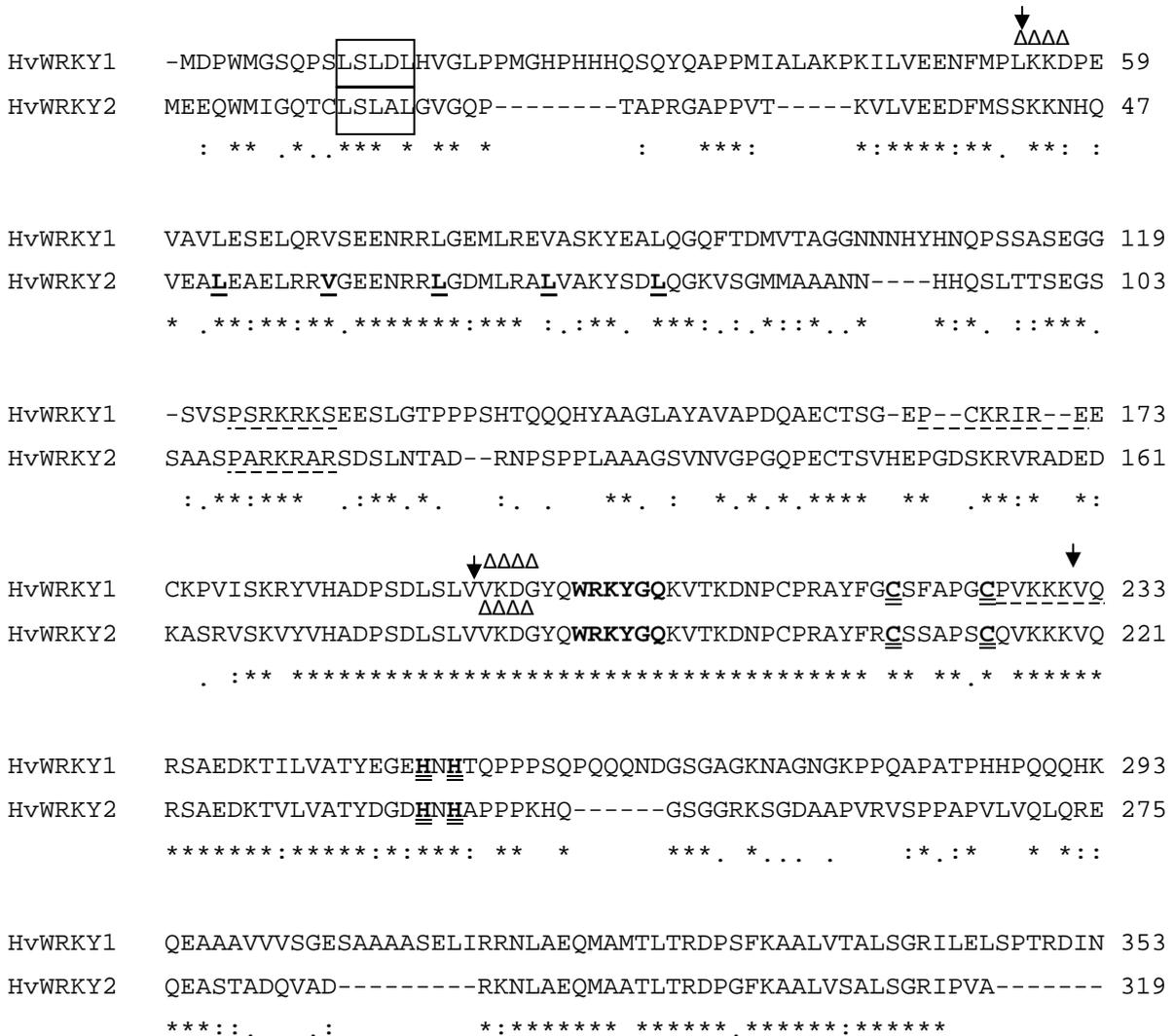


Abb. 3.1 *Alignment* der ORFs von *HvWRKY1* und 2 (erstellt mit ClustalW). Fett gedruckt ist der Anfang der etwa 60 aa langen, konservierten WRKY-Domäne (WRKYGQ). Die Elemente des C₂-H₂-Zinkfingermotivs in dieser WRKY-Domäne sind doppelt unterstrichen und fett gedruckt. Diese Struktur führt zu einer Einordnung der beiden WRKY-Faktoren in Gruppe II (Eulgem *et al.* 2000). Fett und einfach unterstrichen sind fünf Leucine und Valine, die Zip als *leucine zippers* identifizierte. Die von WoLF PSORT berechneten NLS sind unterbrochen unterstrichen. Die Sequenz LXLXLX von *HvWRKY1* und 2 stellt ein aktives Repressormotiv (Xie *et al.*, 2005) dar und ist mit einem Kästchen markiert. Der Pfeil weist auf konservierte Introns hin. Das erste ist in *HvWRKY38 = HvWRKY1* vorhanden, das zweite, sowie das dritte, zwischen K und V fehlen in Geste. (Maré *et al.*, 2004). Die mit SUMO plot™ berechneten Sumoylierungsmotive sind mit mit ΔΔΔΔ oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Sterne unterhalb der Sequenz geben identische Aminosäuren an, Doppelpunkte solche mit ähnlichen chemischen Eigenschaften, Punkte zeigen semikonservierte Substitutionen von Aminosäuren.

Um *HvWRKY1* und 2 in die Untergruppen der WRKY-Familie einzuordnen, wurde ein Stammbaum mit verschiedenen WRKY-Sequenzen aus *Arabidopsis*, Reis, Hafer

und Gerste erstellt. Die Generierung des Stammbaumes erfolgte aus einem *alignment* mit ClustalW mit Hilfe des Programmes TreeView. Beide WRKY-Transkriptionsfaktoren konnten in die Gruppe IIa eingeordnet werden.

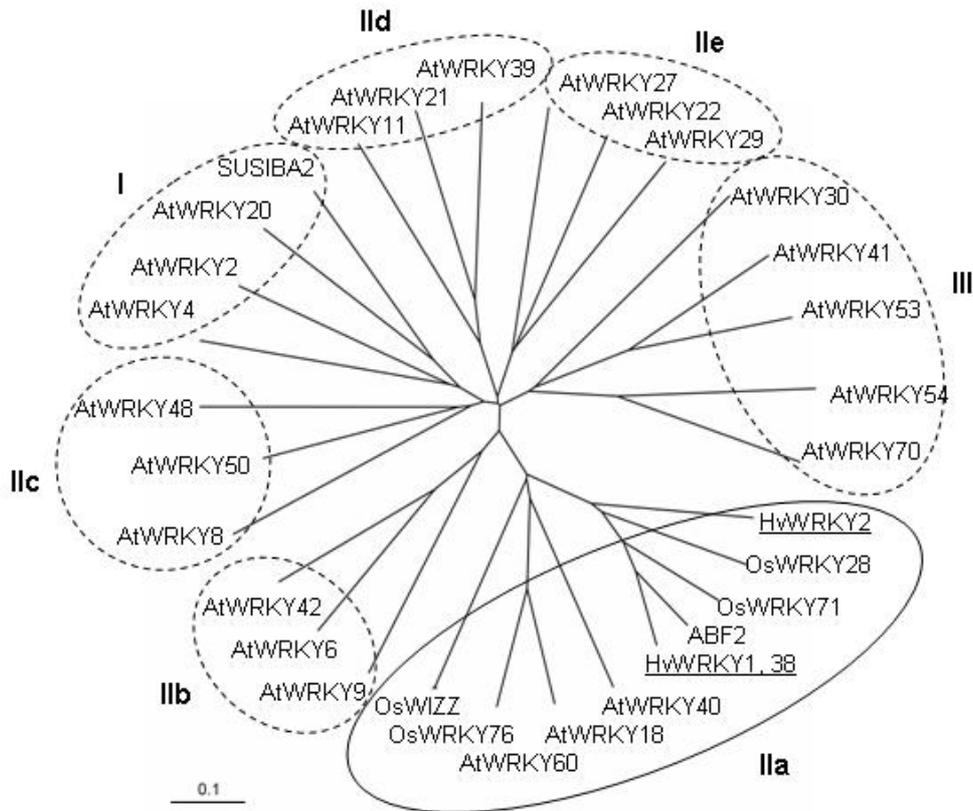


Abb. 3.2 Phylogenetischer Baum auf Grund Ähnlichkeit von H_vWRKY1 und H_vWRKY2 zu anderen WRKY-Transkriptionsfaktoren von Reis, *Arabidopsis thaliana*, Hafer und Gerste. H_vWRKY1 und 2 zeigen die größte Ähnlichkeit zu WRKY-Faktoren aus Gruppe IIa (Eulgem *et al.* 2000). Acc. Nummern: Gerste: H_vWRKY1 (AJ536667)= H_vWRKY38 (AY541586), H_vWRKY2 (AJ853838), SUSIBA2 (AY323206), Hafer: ABF2 (S61414), Reis: OsWRKY28 (DAA05093), OsWRKY71 (BK005074), OsWRKY76 (DAA05141), putative OsWIZZ (BAD29278), *Arabidopsis thaliana*: AtWRKY2 (AF425837), AtWRKY4 (AF425835), AtWRKY6 (AF331713), AtWRKY8 (AF404855), AtWRKY9 (AY052645), AtWRKY11 (AF404856), AtWRKY18 (AAM65594), AtWRKY20 (AF425837), AtWRKY21 (AF272747), AtWRKY22 (AF442392), AtWRKY27 (AF418310), AtWRKY29 (AF442394), AtWRKY30 (AF404858), AtWRKY39 (AF404860), AtWRKY40 (AF480149), AtWRKY41 (AF442396), AtWRKY42 (AY052650), AtWRKY48 (AF442397), AtWRKY50 (AY071847), AtWRKY53 (AF272748), AtWRKY54 (AF426253), AtWRKY60 (AF452177) und AtWRKY70 (AF421157).

Um weitere Informationen über WRKY-Faktoren in Gerste zu erhalten wurden die GABI Primärdatenbank (GabiPD, <http://gabi.rzpd.de/>) und die *Barley1*-Datenbank (Close *et al.*, 2004), die neben *full length* Sequenzen größtenteils so genannte ESTs (*expressed sequence tags*) ohne vollständige Sequenzinformation enthalten, nach WRKY-Faktoren durchsucht (Tab. 3.1). Dabei wurden, neben *HvWRKY1* und 2, weitere 26 putative WRKY-Faktoren identifiziert. Davon enthalten 16 Sequenzen eine WRKY-Domäne und zwei Sequenzen zwei Domänen (Gruppe I). Der Rest weist, wahrscheinlich aufgrund der Unvollständigkeit der Sequenzinformation, keine WRKY-Domäne auf, wurde aber trotzdem durch einen BLAST mit allen 81 bekannten WRKY-Faktoren aus Reis (Xie *et al.* 2005) identifiziert. Mit den verwendeten Parametern wurden auch wahrscheinlich falsch-positive Gene als WRKY-ähnlich identifiziert, die zwar Sequenzähnlichkeit zu einzelnen Reis WRKY-Faktoren besaßen, deren Ähnlichkeit zu anderen Proteinen ohne Transkriptionsfaktoraktivität aber deutlich höher war. Dazu zählten ein putatives Histon H2A (Contig137_x_at), ein Teil des Reaktionszentrums des Photosystem I (Contig03221_at), eine Ribonuklease (Contig10672_at), eine Chitinase (Contig22353_at) und ein Zellwandprotein (Contig8919_x_at). Die BLAST E-Werte dieser Sequenzen zu den jeweiligen Reis WRKY-Faktoren, über deren Sequenz diese *contigs* im BLAST gefunden wurden, lagen zwischen $8e^{-6}$ und $8e^{-27}$. Daneben wurden Proteine ohne Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen identifiziert. Die restlichen Proteine zeigen Sequenzähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren oder DNA-Bindeproteinen.

Tab. 3.1 Potentielle WRKY-Faktoren aus der Datenbank *Barley1*. Angegeben sind der *contig*-Name und der Name, unter dem der WRKY in Gerste veröffentlicht wurde (www.barleybase.org). Ferner wird das Protein mit dem BLAST E-Wert und der Acc. Nr. angegeben, das laut der *Barley1*-Datenbank die höchste Ähnlichkeit zu dem *contig* besitzt. Die letzte Spalte gibt die Anzahl der WRKY-Domänen innerhalb des jeweiligen *contigs* an.

Contig-Name	Name	Ähnlichkeit	WRKY-Domänen in contig
Contig04386_at	<i>HvWRKY1</i> <i>HvWRKY38</i>	<i>HvWRKY1</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , 0.0 Q6QHF4	1
Contig04387_at	<i>HvWRKY2</i>	<i>WRKY transcription factor 28</i> , <i>Oryza sativa</i> , $3e^{-93}$ Q6IEQ3	1
Contig20450_at	<i>HvWRKY4</i>	<i>WRKY transcription factor 47</i> , <i>Oryza sativa</i> , $3e^{-65}$ Q6IEN4	1
Contig18462_at	<i>HvWRKY5</i>	<i>WRKY transcription factor 28-like</i> , <i>Oryza sativa</i> , $4e^{-43}$ Q94D50	1
Contig14308_at	<i>HvWRKY6</i>	<i>Putative DNA-binding protein WRKY2</i> , <i>Oryza sativa</i> , $4e^{-58}$ Q6ZG02	1
Contig10167_at		<i>WRKY transcription factor 7</i> , <i>Oryza sativa</i> , $9e^{-72}$ Q6IES4	1
Contig21110_at		<i>Putative transcription factor WRKY5</i> , <i>Oryza sativa</i> , $2e^{-40}$ Q6ZA22	1
Contig15957_at		<i>WRKY transcription factor 45</i> , <i>Oryza sativa</i> , $2e^{-70}$ Q6IEN6	1
Contig12005_at		<i>WRKY transcription factor 74</i> , <i>Oryza sativa</i> , $7e^{-94}$ Q6IEK7	1
Contig07243_at	<i>SUSIBA2</i>	<i>SUSIBA2</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , 0,0 Q6VWJ6	2
Contig12033_at		<i>Putative zinc finger transcription factor WRKY</i> , <i>WRKY6</i> , <i>Oryza sativa</i> , $4e^{-88}$ Q84ZK2	2
Contig07517_at		<i>Putative WRKY DNA binding protein</i> , <i>Oryza sativa</i> , $6e^{-35}$ Q9XHY3	0
Contig07798_at		<i>WRKY transcription factor 68</i> , <i>Oryza sativa</i> , 0.0 Q6IEL3	1
Contig10168_at		<i>WRKY transcription factor 7</i> , <i>Oryza sativa</i> , $2e^{-69}$ Q6IES4	1
Contig12434_at		<i>Putative 50S ribosomal protein L21</i> , <i>Oryza sativa</i> , $3e^{-81}$ Q6I600 <i>WRKY family transcription factor</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , $1e^{-60}$ CAA18200	0
Contig13268_at		<i>Putative WRKY DNA binding protein</i> , <i>WRKY4</i> , <i>WRKY23</i> , <i>Oryza sativa</i> , $2e^{-49}$ Q942D2	1
Contig14337_at		<i>Myb-related protein Hv33</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , 0.0 MYB3_HORVU	0
Contig14416_at		Hypothetical protein, <i>Arabidopsis thaliana</i> , $1e^{-28}$ Q9SR67	0
Contig15657_at		<i>WRKY transcription factor</i> , <i>Oryza sativa</i> , 0.0 Q8H6W1	1

ERGEBNISSE

68

Contig16040_at		DNA-binding protein WRKY3, <i>Oryza sativa</i> , 0.0 Q9XFF0	1
Contig20358_at		WRKY transcription factor 48-like protein, WRKY transcription factor 21, <i>Oryza sativa</i> , $3e^{-22}$. Q8RV01	0
Contig22226_at		Somatic embryogenesis related protein, <i>Dactylis glomerata</i> , 0.0 Q9FNV1 WRKY family transcription factor, <i>Arabidopsis thaliana</i> $7e^{-59}$ AAM97106	1
Contig23011_at		WRKY family transcription factor 39, <i>Arabidopsis thaliana</i> , $2e^{-39}$ NP_566236 Sato unpublished cDNA library, cv. Akashinriki vegetative stage leaves <i>Hordeum vulgare</i> cDNA clone baak32a17 3', 0.0 BJ458448	1
Contig23697_at		DNA-binding protein (fragment), <i>Avena fatua</i> $1e^{-31}$ Q38704	0
Contig25945_at		Hypothetical protein <i>Oryza sativa</i> , $9e^{-51}$ NP_914458 HP <i>Hordeum vulgare</i> cDNA clone HP01K14, 0.0 BQ661881	0
Contig32920_at		WRKY transcription factor 28, <i>Oryza sativa</i> , $1e^{-10}$ Q6IEQ3	0
Ebro02_SQ004_H10_at		WRKY transcription factor 76, <i>Oryza sativa</i> , $1e^{-06}$ DAA05141	0
Ebro08_SQ008_D15_at		putative WRKY DNA-binding protein, <i>Oryza sativa</i> , $8e^{-12}$ XP_467301	0

Das in Abb. 3.3. dargestellte *alignment* aller 18 Sequenzen aus der *Barley1*-Datenbank, die mindestens eine WRKY-Domäne enthalten, zeigt die hohe Ähnlichkeit in diesem Bereich. Die Sequenzen Contig07798_at, Contig18462_at, Contig12005_at und Contig15657_at wurden manuell editiert: Es wurden in der Originalsequenz jeweils ein bis zwei fehlerhafte, mit einem X bezeichnete Nukleotide, die zu einer Verschiebung des Leserasters führten, entfernt. 14 der Sequenzen enthalten einen Zinkfinger mit dem Motiv C₂-H₂, das nach Eulgem *et al.* (2000) charakteristisch für die Gruppen I und II ist, und vier einen Zinkfinger vom Typ C₂-HC, was bedeutet, dass sie zu Gruppe III gehören.

Die Sequenzen Contig20450_at, Contig18420_at und Contig14308_at wurden außerdem in der GABI Primärdatenbank als WRKY-Faktoren identifiziert und kloniert. Sie wurden als *HvWRKY4*, *5*, und *6* in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) veröffentlicht (Acc. Nr. AJ853840, AJ853841 und AJ853842). Alle drei Gene werden nicht in der Epidermis von Gerstenblättern exprimiert, daher konnte keine funktionale Überprüfung ihrer Rolle in der Gerste-*Bgh*-Interaktion durchgeführt werden.

ERGEBNISSE

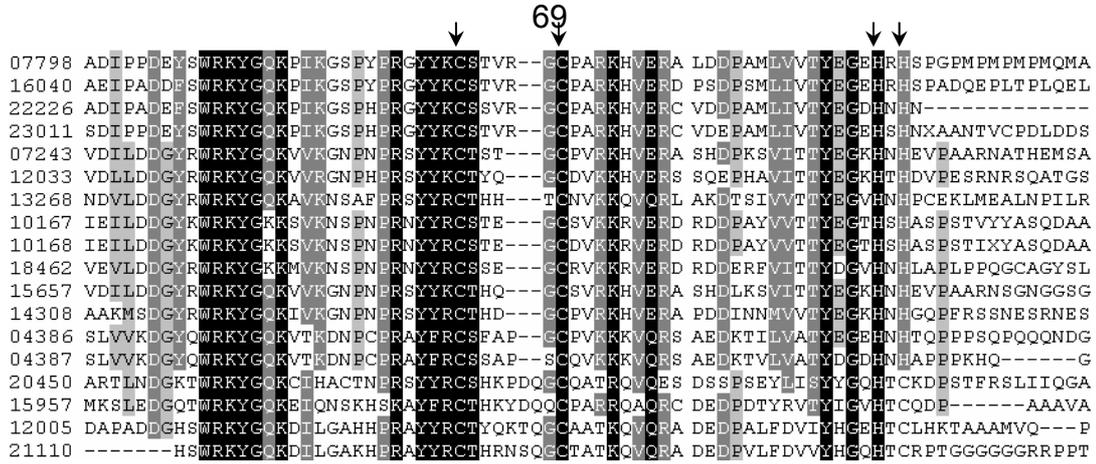


Abb. 3.3 *Alignment* aller 18 *contigs* aus der *Barley1*-Datenbank, die mindestens eine WRKY-Domäne enthalten. Gezeigt ist der Bereich der N-terminalen WRKY-Domäne. Das *alignment* wurde erstellt mit Hilfe der Programme ClustalW und GeneDoc. Die Pfeile geben die Position des Zinkfingermotives an. 14 der Sequenzen besitzen einen C₂-H₂-Zinkfinger, vier einen C₂-HC-Zinkfinger.

Nicht in der *Barley1*-Datenbank vorhanden war das 600 bp lange Fragment von *HvWRKY3* (Acc. Nr. AJ853839), das aus der EST-Datenbank des NCBI stammt. Das 5'-Ende des kodierenden Bereiches von etwa 535 bp wurde kloniert, während das 3'-Ende auch mittels RACE nicht verlängert werden konnte. Der klonierte 5'-Bereich des Proteins enthält keine WRKY-Domäne. Eine BLAST Suche gegen die GenBank Datenbank des NCBI ergab als ähnlichste Proteinsequenz OsWRKY76 (52 % identische Aminosäuren, Acc. Nr. DAA05141) und einem Reis WIZZ (51 % identische Aminosäuren, Acc. Nr. BAD29278). Beide gehören zu Gruppe II der WRKY-Familie.

4.2 Charakterisierung der Promotorregion von HvWRKY1, Poly85 und der putativen Phytochelatinsynthase

In den Arbeiten von Eckey (2002) und Jansen (2002) wurden mehrere *Bgh*-responsive Gene identifiziert. Um mehr über die potentielle Regulation dieser Gene zu erfahren, wurden 1882 bp des 5'-Bereiches vor dem wahrscheinlichen Translationsstartpunkt von *HvWRKY1*, 1932 bp des *blue copper binding* Protein Poly85 und 1762 bp der putativen *phytochelatinsynthase* sequenziert. Die dazu verwendeten BAC-Klone wurden vom IPK Gatersleben zur Verfügung gestellt.

Die *in silico* Analyse der oben genannten Sequenzen wurde mit den Programmen PLACE und PlantCARE durchgeführt. Der Fokus wurde auf pathogenresponsive Elemente gelegt, in diesem Fall auf die W-Boxen, an die WRKY-Transkriptionsfaktoren binden. Der Promotor von *HvWRKY1* (Abb. 3.4) enthält sechs vollständige W-Boxen mit der Konsensussequenz [(T)TGAC/T]. Außerdem sind weitere sechs Kernsequenzen (TGAC) der W-Box (Eulgem *et al.*, 2000) vorhanden. Inwieweit diese W-Boxen funktional sind, ist unbekannt. Einer weiteren W-Box fehlt eine Base (TGACT). Außerdem ist ein so genanntes EIRE-Element (*elicitor induced resistance element* aus *Nicotiana tabacum*, Shah und Klessing, 1996) mit der Konsensussequenz TTCGacg vorhanden. Diese Elemente sind über den ganzen Promotorbereich verteilt, ohne dass Häufungen auftreten, wie es typisch für funktionale W-Boxen ist (Eulgem *et al.* 1999). Außerdem konnten mindestens sieben putative TATA-Boxen über den gesamten sequenzierten Bereich identifiziert werden. Die dem ATG am nächsten liegende TATA-Box befindet sich 192 bp in 5' Richtung oberhalb des Translationsstarts (ATG). Mit Hilfe des Programmes FGENESH wurde der Transkriptionsstart berechnet. Er liegt ebenfalls bei -192 bp.

Außer den hier betrachteten Elementen enthält der Promotor z. B. noch acht WUN-Elemente (Pastuglia, *et al.*, 1997), für die eine Regulation durch Verwundungsreize beschrieben ist. Die Konsensussequenzen hierfür lauten CCATTtcat, tAATTgcca, gAATTtctt, aAATTcctt, aAATTcctt, tCATTtccc, tGATTgcca und aGATTgcca

```

CCTCAAATTT AGGCCTAAAA TGAATCATAA ACGGATAAAA AACGGACACG
CATCCGTTTA GATCACTGCG CTGGATCGTA TTTTGTGTCC GCGGCAACCT
AAACGAACAC GCGAGCATGA AATGGGTTGA CCGGTTAAAG TTGCTCTAAG
TTTTGCCCAT GTGGTGAGAG AGAAGGAGCG AGTTTGTGTGT GGGTAACAAC
GAGGTCCAGG TCCTACGTGT AATTGCCATT TTTCTCTGTT CTTGCCAACA
CCAAAGTCTA GCAGTGACTT GCCAACGGTT CACTACCCGT TCTGTCCCTGA
ATTTCTCCA TTAATTCTTG TCAATGCCAG GTCTCTGTAA CTACATCTCA
GGAAGGAAAA AAGTCTATGT AACAACCAGT ACCGAACTGC CAGCTCCATC
TTTGAATACG CCCTCCCGGA CCCGGGCCAT GAAGGAGAAA ACGGCCAGCC
ACGTACCGTA GGCCAGTAGG CGTAGATCAG ATCAAATGAT CAATGATAGC
AGTACATCAG GAAATTCCTT GCTAAAAACT GCTATTAGAA GCGAAGCGAA
CGTCGACGTC GGTCAGAAA AGGGGCACCG GCGATAGATT AATCCGCATC
ATCCGTCGTA AAACAACGTT TCATCCGGGC GGGACATTTGA CTCGTGTGGC
GTCTTCTTTT CCGAAAGGCA GGCATGTTGG GTCAGATTTT GGGCGCCCGT
CCAGGATAAC GGCGGTACCA CTGCTACAGA ATAGCTCGCC GGGTTTGATC
TGATTAGAGT ACTCCAGCCA GGAAAACTCG TAAAATGAAA AAGAATTAGT
TAACCAACCT ATCTTAGCCA GCCAAACCCT AGCCTGTACT ACTAATAAGA
TGCTGCTTCC ACGTAGGAGC ACACCTCCGA CAAGAAGGGA TAATTAGGGA
AGCGTTGCCG TCGAACGTGA CGGGGAGGAA TCGATTCCAG TCTACTCGAG
CTCAACTAAG CAGAGTAGAA TACAAATGGT TAGCCAGCCA AAGTTTTCCT
AACAAAGTGT CTAACAAAGT TTTTCCCTTG AAGGCACCAA AAGAAAGAAA
GAAAATGCTA GAGTCACAA GTCTTTCCTG TCCCCCTCTT TCCACTTTCT
CGCTCTCTC ATTTCCCGCA GGGGGCAAAG CCTAGTCGCA ATCAACTAAT
AACCACCGAA CGAGATTTT TTTTLAGGAA CCAAAAGAGA AATCATTCTT
CTCCTTTCTC CTCCCCGTGC ACCTCGCGAG CATGTGTGGT GCACTTCTT
GACCCGATCA TCAGCACCAC CACCACACTC CCCGAACCGA AGACAGAGCC
AGCCGACATC CACCGCTCCC GGCCCCCAC CCACCCGTTG AAAAGACGGC
TCCGGGCCCC CCACCCACCC GTTGAAAAGA TCCCCGCGCA GATTGCCAGC
ACCAAAAGAA AACGTCGCTG TGAGGTCAGT CGTCACCGCC CGCGCCCACC
CGCGCGCGTG CACGCACCCT CCGGTCTCCT TCCGCTGCCT CCGCATGCTC
CAATTCACC ACGCCCGTCC CCGTTTTCTT TTGTTTATTC CGCTTCTTCT
TCATCCGAGC CCTGCGTGAC CAAGAAGAGG ACAAGCGTGT GAGTTGTGAT
GTGATGTGAG CGGCCGAGTT CCTACGACCT GACCTTCTT CTTTCTTCTC
CTAGTAGTAG TAGCTGGCGA CTTGGCTAGA CCGTAGTCC TGTGCTCCGC
TATATAACGC CACTCCTCCA CGCCATTCTC CTCTCACTCG GAACTCGGAA
ATAGTTCTCC ATCCCAAGCT TCTCTCCCC TCTTCTCTT CTCTCTCTC
TCTCCTCTCT CGCGCGCGTG CCTCGAACCG GAAGGAAGTG AACATCGTAC
GTCCGTCCA GCGCGTGGTG TTTGAGGGAC CA ATG...

```

Abb. 3.4 *In silico* Analyse von 1882 bp des Promotorbereiches in 5'-Richtung oberhalb des ATG (*upstream*) von *HvWRKY1*. Unterstrichen sind der putative Translationsstart (ATG) und die potentielle TATA-Box (TATATAA). Der berechnete Transkriptionsstart ist mit einem Kreis gekennzeichnet. Fett gedruckt und unterstrichen sind die sechs vollständigen W-Box-Motive [(T)TGAC/T]. Nur fett gedruckt sind sechs weitere Kernsequenzen von W-Boxen (TGAC). Das gestrichelt unterstrichene W-Box-Motiv ist unvollständig (TGACT). Das EIRE-Element (*elicitor induced resistance element*) ist doppelt unterstrichen.

Der Promotor des *blue copper binding* Proteins Poly85 enthält nur eine vollständige W-Box, allerdings neun Kernsequenzen (TGAC). Außerdem sind zwei weitere unvollständige W-Boxen (TGACT) und ein EIRE vorhanden. Einige der unvollständigen W-Boxen treten gruppiert auf. Dieser Promotor enthält neun WUN-Elemente. Der Transkriptions- und Translationsstart wurde mit FGENESH berechnet. Der Transkriptionsstart liegt bei -107 bp, zwei potentielle TATA-Boxen - 110 bp und -335 bp vor dem ATG.

GACATTTGTG AAGCCGGTGC AAGCCYTGGA ATGTAAGAAG GAACCTTGATT
TTCATAATGC TCAAGCGGCG GCTGGAAAAG ATGTGGAGAG ATCATTTGGA
ATTTTACAAG CCAATTTGCG AATCATAAGA GGACTGGCTA GGTTTTGGGA
TCATGATATC YTGTGATACA TCATTCATGC ATGTGTGATC ATGCATAACA
TGATCATAAA GAACGAGCAT GGCAAAAATG TTGTCTACGG CACGTATGAG
TTGATGGGCC TGCCAGTTCG GCCAAGGAGA GGTGGAGACA AAGTTGCCCCG
CTTTCTTGAG TCCTACCAGT AGCGTAGCCA GCTCAATAAT TCAGGATGGT
TCAATAGTAA AACTTTCATT TATATTTAAT TACTCACATT AGATTTTACT
CATTCTTGAT ATAATATATA GGCTATAGAG AAATCTCAGG GTGGTCCATG
GACCACCCGA ATCACCCTCC TAGCTACAGC ATTGGGTCCT ACCATGACAT
TCTAGACTCC GATGTGCAT GAAGATCTTCA AAAGGATCTC ATTAAGGAGT
GATGGACATG GAATGAAAGG CAAAAATCAA TACCGTGTAC TTAATTTGTG
TGTATGTGGG ATGAACAATT TGTGTGTTGC TTGATGAACC ATTTGATGAA
CTATTCGTAT TGTGTTGTAA TAAATTAAGT ACTATTTAAG TTTTATTTGT
TTGAATTCAT TTTAGATCAT TTATCATATT ATTTGTTTGA TATGTATGCG
CAAATGTGTA AAACGATGCC TGGGCGTTCG GTTTATTTCGG TTCTATATAA
TTTTCCCGTT TTAAAGGAAT AGAAGCCGAA ATAATCATT ACAATTTAGA
AACCGAACCA TATTAACCAT AATATATTGG TTCGGTTTGT TAGGTTAACC
GAAAAACCAA AATTCATGCA CTTGTGAGTA TAAGTGTAAT **GACT**CGAGAT
CATTAATTTG GATTGTATAA TATGCAAAAT GATAATCACA AGTTCTAGCA
ACCTTAATAT CATTCTATGG TTTATTCCGGT **CAAACAAACT** AGTAACCATA
TTAAGTAGAA AAAGCACATG GGACGTGAAA TGTATTATGT GCGGAGATAT
GTGTGATGCC TCCATACTGT TGCATTTTGA GAAACAAGGT ATTACATGGC
GTATCTTACA TATCGGTTTG TTCGGTCTAT TCGATTTCTG AACACAAAAA
ACCAAACAAA AACAAAACAC CGAACAACCT TAAAATTTCC CACCCGAACC
AAAAATCAAA CCACCAAATA AACCGACAAA TCGGTTAATA CAGTCCGGTT
CGGTTTGGTT TTTTCAGTTT CGGTTTTATA GTGTCCACCC TTTAGATGAA
GGGGCGTGGA CGCGCTGTCC TAAAATAGGA CAGCTGTTGG AGAGGAGATG
CCTTATTATA GGGCAGCTAG TAAAGCAGGA AAAAAATTGA TACCCTAAAA
TACTAGAACA GATGCCCTAT ATAAAAACAG CCCTTCTAAA ACAGGGCACG
TTAAAGAAAG AAGCAGTTGC GAGCAAACCC **GGTC**ATAGTT AGCTGACAAC
TCCGT**GTCAA** CAAACCCTTC GAGAAAACGCT CGTGCTGTTG CCGCG**GTCA**T
GTTCAACCCC ATACTAAGGA CCGGCATCTG GACAACGGCT GCAATACTAC
TGCAAACGCG CAAAGCCGCA GAAATCTTTA TAGAAAGGGG CAGGAACCAA
ACCCGGCCTG TAGTCGTTCT CTTG**TGACC** TGGAGCCGCT TAATTTGAAC
AGTCCCTT**GT** **CAACT**AGCCG GACCGCGACG **GTGAC**AGCAC CAACATACAT
CCAATGCTAT ATTGCGATGG TCCACTGCAT GTAGCTTAGA CCGCGTCGGC
GTGGGAAAGC TGAACGGCGG CGAGGCCTGA AAAG**GTCA**GC CGGCCACCAA
CCAAGCCCCG GGCAGCGTCT **GAC**CGGTAC CG**TT**CGCTTG TTCAAACGCA
CATGACAATT CCACAGCAGA TTTTCAATAT CCAAGTGCCA TTTCCACGAA
CCTACCGCGC GCGCGCCAAC CGGCCTCCTG CGTATATAAG AATTCCGGTGT
AGGGAAGACA ACAGCAACCC GTCCCCTCCT AAGCACCAGC CTTCTACCTC
CTCTGCTCTG CGTTCCTCCT TCCGGTCACA AGAGCAATCG ATG...

Abb. 3.5 *In silico* Analyse von 2140 bp des Promotorbereiches in 5'-Richtung oberhalb des ATG (*upstream*) von *Poly85*. Unterstrichen sind der putative Translationsstart (ATG) und zwei potentielle TATA-Boxen (GCTATA und CGTATA) in der Nähe des putativen Transkriptionsstarts, der mit einem Kreis markiert ist. Fett gedruckt und unterstrichen ist die vollständige W-Box [(T)TGAC/T]. Nur fett gedruckt sind neun weitere Kernsequenzen von W-Boxen (TGAC). Bei beiden gestrichelt unterstrichenen W-Boxen sind unvollständig (TGACT). Das EIRE-Element (*elicitor induced resistance element*) ist doppelt unterstrichen.

Die Promotorsequenz der putativen *Phytochelatinsynthase* enthält zwei vollständige W-Boxen. Außerdem sind sechs Kernsequenzen vorhanden und zwei, denen eine Base zur vollständigen Konsensussequenz fehlt. Es tritt keine Häufung der

Elemente auf. Der berechnete Transkriptionsstart liegt -1086 bp oberhalb des ATG. Vor diesem Punkt liegen drei TATA-Boxen bei -1089 (TTAATATA), -1135 (TACAAA) und -1149 bp (AATATA). Es wurden neun WUN-Elemente von den Programmen identifiziert.

```

TGAACCTTTT TTACGTA CTT TTGAAAACAC AAACAATTTT AAAATTTTGA
AAAGCATATT AGAATGTGAA TAAACTTTAC CATTTTTTAAA AAGTATAAGA
ACAAAATTTT GTATTCTAAA CATTATTCT TGAACAAATT TTGAAAGCAT
GGAGAATTTT TGAAAATCCC CAAACTATTT TTAGAGTATG GACACTTTTG
TAAATTCCAA TTATTTTATA CAAAACACCA ATAAATTTAT TCAGGATTTA
TAATAATAAT ATTTTTCCAA TAAAAACATT TTTCGTCACC ATTTAAAAAGA
TGTTGAAATT TTAAGAATGT TCCTGCTTTT CAAATGGATG TTTATGATGT
TTTAATAAAT GCACCATA CA ATGGGAAAAA TCTTCACATT CAAAGAAATG
TTTGTGATAA TTTTTTTAAA GAACTTCAC ACATTTGAGA AAAATCATGA
CATTTCTAG AATTGTTTTT ATGCAATGTA AAGAAAATGT TCGCATAACT
TAAAAAATAA TCATACCATT AAGAAAAATG AGCAGTTGGA ATTTGTAAAA
TATTTACCAT GTTTCTAAAA AAAAATGCTC GGGCCTATAT TTGAAAAAAA
TTCCGTCATG CATTTAAAAA AGGTTAATGT GTGTTAAAAA TGTTCCACCAT
GTATCTTAAA AAAAATATAG TGTGCATTAC AAAGTGGAAA TGTATTTGCA
AAAAATGGCA CTCCCTCTGT AAATTAATAT AAAAACATTT AGTGTCTTAA
ATACTTTATA TTAGTTTACA AGGGAGTACA ACTGTATAAG GGTACTGAGT
TGGGAACGAG TTGCATGTCC AGTGTGGACA AGCAACTATA TCAGGCATGA
GTTGGATGTT TGACTTGACA TGTAACTGAG TCGGCTGAAT TTACATGTTG
AGGTTGGACG TGGAACTAAA TAGGGGTTGG AGCAAGTTGA CTACGAATTT
AGATTGAGAG TAGTTATTCA AAAGGTTTCA TCATCAAACC ATGCAAACGT
GTTGCGACGA TCCGTATGTT GAAATCAATC AACTGATTTG CTACCTTGTG
TCAAGAAAAA AAAAACTATT TTCCTACCTG CATTTTTTCCA GTTGCCATGC
ATGAAGCGCT GAAAGGCCCA CAAGCATCCT GGGATCCCCT GAATCCCTGG
TCGGCTCTGG TTTCGACGGA CCTTCGCAAA GCTCACATGA GAGACACACA
TGGCCGGGCC CCATCCCACC CCGCCGACA AAACGAAACG ACAGAACACG
AGCCATCCAT TCCGGCGCAC GCTAGAATCG GACGGCCAGC ACGCGCGCGA
CGCCGGTGG AACCCTACCG TTGGCACAGT CTCCGCCGCC GCGGTCAGC
ACGTCACAAG TACTCTACTA CCATCTGTGT CCGGGCCGGG CCCGCGCTTC
CTTGACCCCG AAGCCCCCCC GTCAATCAAT CATCGGGGCA CGCTCCTCCC
CTCTCCCCGA CCTCGCCTCC TCTCCGGCCG GCGTCGCTTT CCACGCCCTT
TTGTTCAAAC CGAGAAAAAC CCCGTCCATC TCTGCCTGCC TTCCCGAAAA
CTCGGAAAT AAAACAACGC GGACACGGAG GGAGCGAGGA AGCAGCAAAG
CAAGCCGCGG TCGCACGCAC GCCGCCCGC CAGTTCAAAC CCNACCACCC
CCCTCGTCTT CCCCAGCTGT GCCACGCGCT TTCCAATCGC CTCATCTATC
TGCTGCCTCG CCCCGCCTC CCTCGCTCCC CCAAATCGC CTCCTCCCTT
CCCGATCCAG CCATG

```

Abb. 3.6 *in silico* Analyse von 1762 bp des Promotorbereiches in 5'-Richtung oberhalb des ATG (*upstream*) der putativen *Phytochelatinsynthase*. Unterstrichen sind der Translationsstart (ATG) und drei potentielle TATA-Boxen in der Nähe des putativen Transkriptionsstarts, der mit einem Kreis markiert ist. Fett gedruckt und unterstrichen sind die beiden vollständigen W-Boxen [(T)TGAC/T]. Nur fett gedruckt sind sechs weitere Kernsequenzen von W-Boxen (TGAC). Den beiden gestrichelt unterstrichenen W-Boxen-Motiven fehlt eine Base.

Neben den hier angeführten Sequenzen kommen in allen drei Promotoren noch andere charakterisierte *cis*-Elemente vor, die, im Unterschied zu W-Boxen, hauptsächlich in Promotoren dikotyler Pflanzen identifiziert wurden. Die folgende Tabelle 3.2 listet einige der häufig vorkommenden Elemente auf.

Tab. 3.2 Auswahl von *cis*-Elementen in den Promotoren von *HvWRKY1*, *Poly85* und der putativen *Phytochelatinsynthase*. Die Elemente wurden mit den Programmen PlantCARE und PLACE ermittelt. Die erste Spalte gibt den Namen des jeweiligen Motivs an, die zweite die beschriebene Funktion. In der dritten Spalte wird der hochkonservierte Kernbereich der Sequenz genannt, der allerdings meist nicht das ganze Motiv erfasst. Die Spalte Zitat gibt die Veröffentlichung an, in der das entsprechende Motiv beschrieben wurde. Die letzten drei Spalten zeigen die Anzahl der Motive im Promotor des jeweiligen Gens.

Motiv	Funktion	Kernsequenz	Zitat	<i>HvWRKY1</i>	<i>Poly85</i>	<i>Phytochelatin synthase</i>
ABRE	ABA-responsiv	ACGT	Hobo <i>et al.</i> , 1999	15	4	7
CE1		TGCC	Shen, Ho, 1995	1	0	1
AuxRR-core	Auxin responsiv	GGTC	Sakai <i>et al.</i> , 1996	2	3	1
TGA-Motiv		TGACA AACG	Pastuglia <i>et al.</i> , 1997	0	1	1
CCAAT-Box	HvMyb Bindestelle	CAACGG	Wissenbach <i>et al.</i> , 1993	3	1	1
CGTCA-Motiv	MeJa responsiv	CGTCA	Rouster <i>et al.</i> , 1997	2	0	5
TGACG		TGACG	ebenda	2	0	5
ERE	Ethylen responsiv	ATTT	Itzhaki <i>et al.</i> , 1994	0	0	8
HSE	Hitzeschock	CAAA GAAA AAAA	Pastugia <i>et al.</i> , 1997	8	4	23
LTR	Niedrige Temperaturen	CCGAAA	Dunn <i>et al.</i> , 1998	1	3	1
MBS	MYB-Bindestelle	CGGT	Bondeau und Walbot, 1996	2	5	4
MRE		AACC	Feldbrugge <i>et al.</i> , 1997	0	15	1
MSA-like	Zellzyklus-Regulation	AAGG	Ito <i>et al.</i> , 1997	3	0	1
P-Box	Giberellin responsiv	CCTT	Kim <i>et al.</i> , 1992	3	4	5
TAGC-Box		TATC	Washida <i>et al.</i> , 1999	1	0	1
TCA-Element	Salicylsäure responsiv	AGAA	Pastuglia <i>et al.</i> , 1997	4	0	1

4.3 Heterologe Expression von *HvWRKY1* in *E. coli* und *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

Mit Hilfe des *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) ist es möglich, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an definierte DNA-Motive *in vitro* zu nachzuweisen. In dieser Arbeit sollte die mögliche Bindung von HvWRKY1 an zwei W-Boxen des eigenen Promotors untersucht werden, da für WRKY-Faktoren eine Autoregulation durch W-Boxen in den Promotoren beschrieben wurde (Eulgem *et al.*, 1999, Chen und Chen, 2002, Robatzek und Somssich, 2002). Es wurde rekombinantes Protein in *E. coli* überexprimiert und mit Hilfe eines N-terminalen 6xHis-tags aufgereinigt (Kap. 2.19). Die Aufreinigung des Proteins mittels einer Nickel-Säule erwies sich als schwierig (Eckey, IPAZ Gießen). Der EMSA wurde daher mit *E. coli* Lysat durchgeführt (Miao *et al.*, 2004, Rocher *et al.*, 2005). Um zu überprüfen, ob und wie viel HvWRKY1-Protein durch die Extraktion gelöst werden konnte, wurde eine His-tag Färbelösung verwendet. Es zeigte sich jedoch, dass im Unterschied zum DHFR-Kontrollprotein, HvWRKY1 nur im unlöslichen Pellet der *E. coli* Zellen vorhanden war (Abb. 3.6). Eine Proteinextraktion unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit anschließender Renaturierung funktioniert unzuverlässig, weshalb auf diese Vorgehensweise verzichtet wurde.

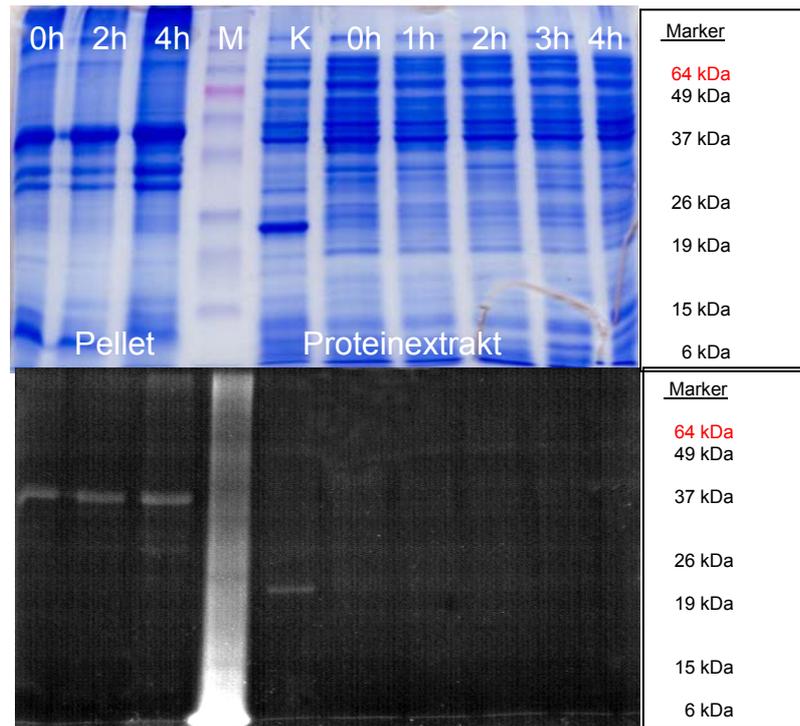


Abb. 3.7 Mit Bradford-Reagenz gefärbtes Proteingel (oben) und die His-tag-Färbung desselben Gels (unten). Links wurde in TE-Puffer aufgenommenes Bakterienpellet aufgetragen, rechts jeweils 20 µg *E. coli* Extrakt. Die Konzentration des DHFR-Kontrollproteinextrakts (K) betrug 10 µg Protein (ermittelt nach Bradford-Messung). Das Molekulargewicht des Kontrollproteins lag bei 28 kDa, für HvWRKY1 wurde eines von 38,5 kDa berechnet (laut Compute pI/Mw). Die Zeitangaben beziehen sich auf die Induktion der Proteinsynthese mit IPTG.

Da die Färbung des His-tag nicht sehr sensitiv ist, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass ein geringer Teil des His:WRKY1 Proteins im Extrakt vorhanden war, der zur Durchführung von EMSAs ausreichen könnte. Daher wurde im Weiteren mit diesem Rohextrakt gearbeitet. Oligonukleotide, die eine W-Box aus dem Promotor von *HvWRKY1* enthielten, wurden radioaktiv markiert (Kap. 2.19.6). Diese Probe wurde mit dem Rohextrakt inkubiert, um eine Bindung von W-Box und rekombinantem WRKY-Protein zu ermöglichen. Anschließend wurde ein Gellauf durchgeführt. Abbildung 3.8 zeigt einen solchen EMSA. Als Probe diente hier die erste W-Box *upstream* des ATG von *HvWRKY1* (W-box1, -635 nt). Man erkennt eine große Menge radioaktiv markierter, freier Probe. Der Pfeil zeigt eine schwache Bande, bei der es sich um eine Bindung der radioaktiv markierten Probe an rekombinantes Protein im *E. coli* Extrakt handeln kann. Allerdings ist diese Bande sehr schwach und zum Zeitpunkt 0 h vor der Induktion des rekombinanten Proteins mit IPTG vorhanden. Im Versuchsansatz mit WRKY1 ist eine Zunahme der Bandenintensität zum Zeitpunkt 4 h nach IPTG-Induktion sichtbar, für das WRKY2-

Protein ist diese Bande jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Es ist also unklar, ob es sich dabei um eine spezifische Bindung handelt. Als positive Kontrolle (K^+) diente das DFHR-Kontrollprotein Extrakt. Als negative Kontrolle wurde ein Überschuss an unmarkierter Probe zu dem Versuchsansatz gegeben, der die markierte Probe verdrängen sollte (K^-). In beiden Ansätzen konnte keine Änderung im Laufverhalten (*shift*) festgestellt werden. Dies spricht für eine spezifische Bindung. Allerdings ist die Menge an löslichem, nativem WRKY-Protein im *E. coli* Extrakt zu gering für eine genaue Aussage, da die *shift*-Bande nur sehr dünn ausfiel.

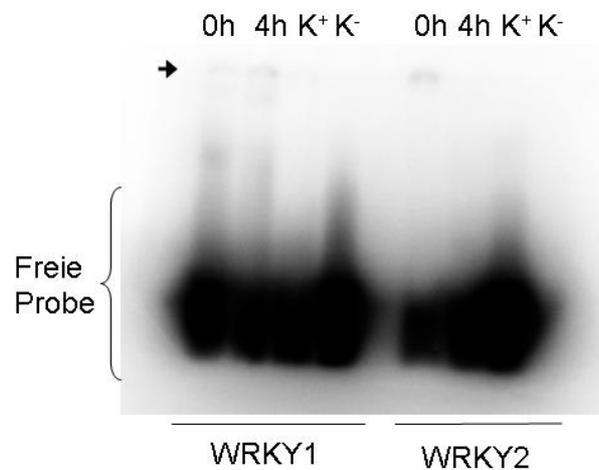


Abb. 3.8 *Electromobility shift assay* (EMSA) mit der W-Box1 und Rohproteinextrakt von *E. coli* Zellen, die mit His:HvWRKY1 (links) bzw. His:HvWRKY2 (rechts) transformiert waren. Es wurde Extrakt vor der Induktion des Proteins mittels IPTG (0 h) und 4 h nach Induktion aufgetragen. Als Positivkontrolle diente Rohextrakt aus *E. coli*, transformiert mit dem Kontrollprotein DHFR (K^+), als Negativkontrolle ein Überschuss an unmarkierter Probe. Der Pfeil zeigt auf eine schwache Bande, die einen WRKY1 spezifischen *shift* darstellt. Die Expositionsdauer betrug 43 h, die Aktivität der Probe 50 000 cpm. Es wurden jeweils 30 μ g Rohproteinextrakt aufgetragen.

4.4 Untersuchung der Expression Bgh-responsiver Gene mittels RT-PCR nach Inokulation mit verschiedenen Pathogenen und nach Verwundung

Ziel dieser Arbeit war es, die Frage nach der Beteiligung mehrerer Gene, insbesondere von WRKY-Transkriptionsfaktoren, an der Ausprägung von Resistenz bzw. Suszeptibilität von Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz zu untersuchen und diese Gene näher zu charakterisieren. Unter den von Eckey

(2002) als *BghA6* induziert dargestellten Genen befand sich u. a. *HvWRKY1*. Dieser WRKY-Transkriptionsfaktor war schon 3 h nach Inokulation deutlich induziert. Um zu untersuchen, inwieweit *HvWRKY2* und *3* ebenfalls durch Inokulation mit *Bgh* induzierbar sind, wurden etwa sieben Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) inokuliert und das Pflanzenmaterial zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation geerntet. Die Kontrollen wurden dabei scheininokuliert (*mock*-Behandlung) und direkt danach geerntet. 10 min später wurden die ersten inokulierten Blätter geerntet. Nach Extraktion der Gesamt-RNA wurde die Expression der Gene mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt (Abb. 3.9). Um eine gleichmäßige *template*-Menge zu erzielen, wurde diese mittels PCR auf das *housekeeping* Gen Ubiquitin normalisiert. In den Negativkontrollen zu den jeweiligen PCRs wurde keine Verunreinigung amplifiziert (nicht gezeigt).

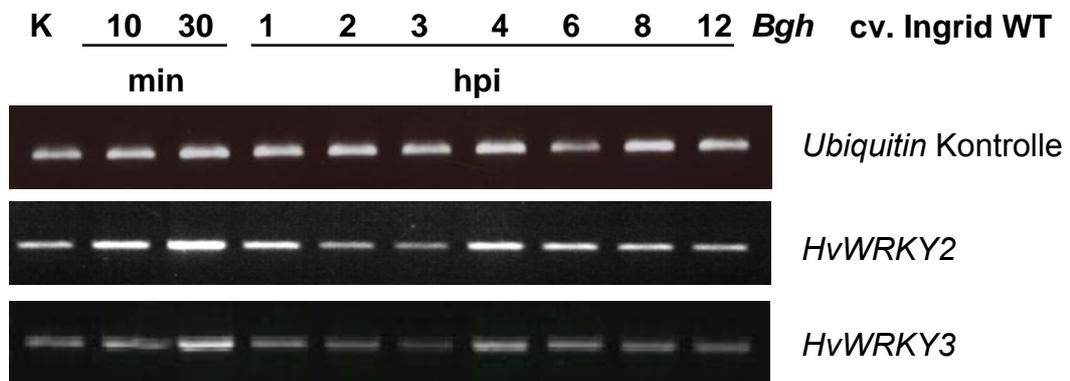


Abb. 3.9 Expressionsanalyse von *HvWRKY2* und *3* nach Inokulation von etwa sieben Tage alten Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) mit *BghA6*. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR verwendet. Kontrollen wurden scheininokuliert (*mock*-Behandlung, K). Primärblätter wurden 10 und 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 12 hpi geerntet. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin. Die PCRs wurden jeweils mindestens einmal wiederholt.

Eine deutliche Induktion von *HvWRKY2* konnte 10 bis 30 min nach Inokulation festgestellt werden. Die Transkriptmenge von *HvWRKY3* ist nur 30 min nach Inokulation erhöht um dann wieder auf das Niveau der Kontrolle abzusinken. Die Induktion von *HvWRKY3* ist weniger prominent wie von *HvWRKY2*. Vier Stunden nach Inokulation tritt bei beiden Genen eine weitere Transkriptakkumulation auf, die bei *HvWRKY2* ebenfalls stärker ausgeprägt ist als bei *HvWRKY3* und langsam abklingt. Das Transkriptionsmuster beider Gene ähnelt dem von *HvWRKY1* (Eckey *et al.*, 2004).

Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerste an der Etablierung von Resistenz gegenüber *Bgh* beteiligt sind. Daher wurde getestet,

ob sich die Expression der hier untersuchten WRKY-Faktoren *HvWRKY1* und 2 in resistenten und anfälligen Gerstenkultivaren unterscheidet. Es wurden dazu verschiedene Kultivare verwendet, die Mutationen im Signalweg der *mlo*-vermittelten Resistenz aufweisen. Ziel der Untersuchung des Expressionsprofils von *HvWRKY1* und 2 (Abb. 3.10) war es herauszufinden, ob die Expression von *HvWRKY1* bzw. 2 durch das Fehlen von *Mlo* beeinflusst wird, insbesondere im Hinblick auf die Überexpressions- und RNAi-Versuche (Kap. 4.6).

Mlo ist ein wichtiger Faktor für die Anfälligkeit von Gerste gegenüber dem Mehltreiberpilz. Genotypen ohne das funktionale Protein sind rassenunspezifisch resistent gegenüber Penetration (Büschges *et al.*, 1997, Jørgensen, 1994). Es ist weiterhin bekannt, dass die Funktion von *mlo* abhängig von *Ror1* und *Ror2* (*required for mlo specified resistance*) ist (Freialdenhoven *et al.*, 1996, Collins *et al.*, 2003). So ist die Gerste cv. I22 (genetischer Hintergrund Ingrid) mit dem Genotyp *mlo-5*, *Ror1*, *Ror2* komplett resistent gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz, wohingegen die Penetrationsrate in der Mutante A89, die eine Mutation in *Ror1* aufweist (*mlo-5*, *ror1-2*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid), 10 bis 30 % beträgt. Die Rückkreuzungslinie 105-6 besitzt das funktionale *Mlo* Gen, trägt aber eine Mutation in *Ror1* (genetischer Hintergrund Ingrid x Sultan5). Diese Linie ist hypersuszeptibel gegenüber *Bgh* und weist Penetrationsraten von über 80 % auf.

ERGEBNISSE

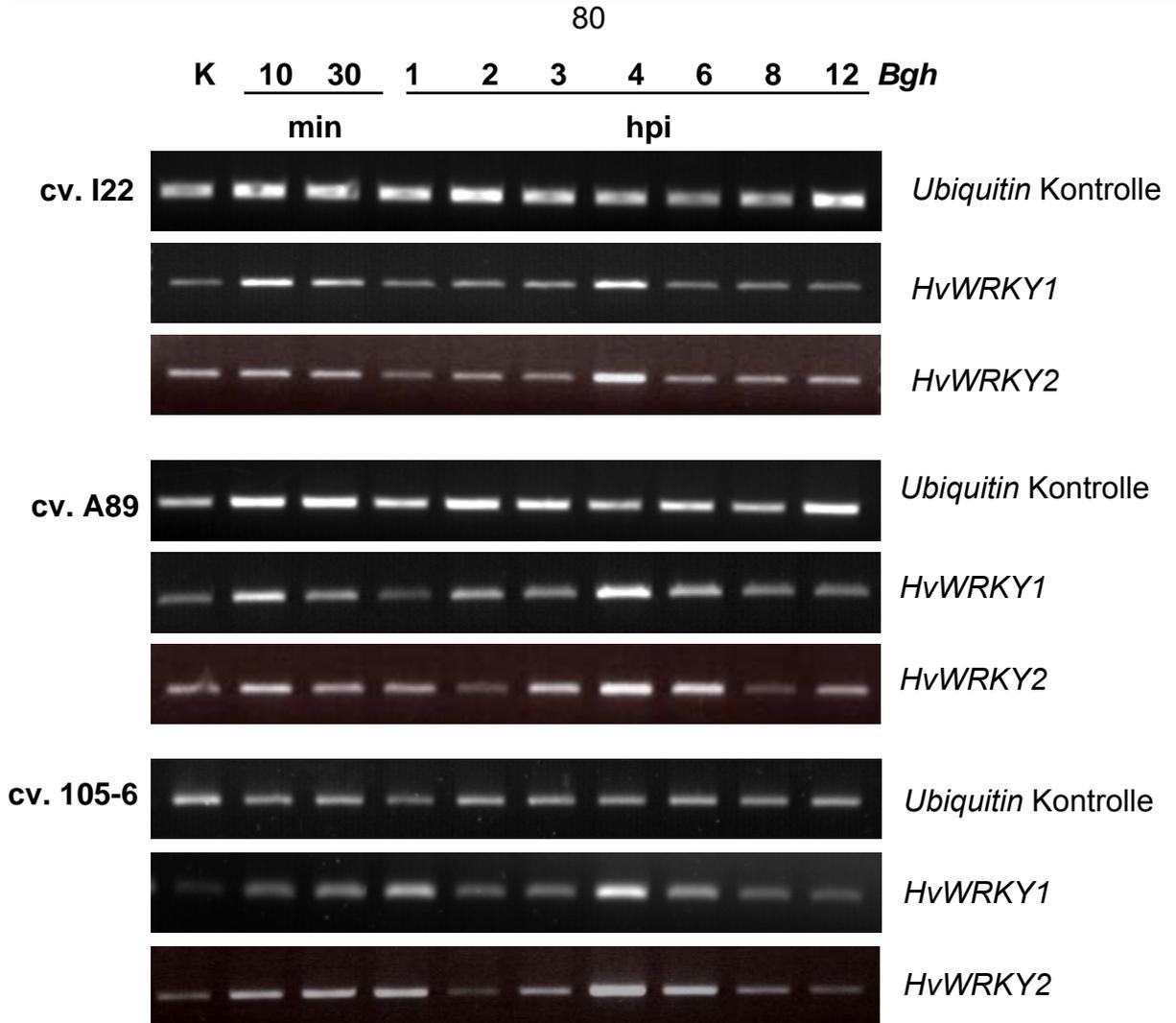


Abb. 3.10 Expressionsanalyse von *HvWRKY1* und 2 nach Inokulation von etwa sieben Tage alten Gerstenpflanzen cv. I22 (oben; *mlo-5*, *Ror1*, *Ror2* genetischer Hintergrund Ingrid), A89 (Mitte; *mlo-5*, *ror1-2*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid) und 105-6 (unten; *Mlo*, *ror1*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid x Sultan5) mit *BghA6*. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR verwendet. Kontrollen wurden scheininokuliert (*mock*-Behandlung, K). Primärblätter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen an cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin. Die PCRs wurden jeweils mindestens einmal wiederholt

In allen drei Kultivaren tritt jeweils eine frühe Induktion nach 10 min bis 1 h auf und eine zweite etwa 4 h nach Inokulation. Lediglich in cv. I22 scheint die frühe Induktion von *HvWRKY2* zu unterbleiben. Die erste Transkriptakkumulation beider Gene hat in A89 und I22 ihren Höhepunkt zum Zeitpunkt 30 min nach Inokulation. Da in cv. 105-6 das Expressionsniveau in der Kontrolle sehr niedrig ist, ist die Induktion von *HvWRKY1* 10 bis 30 min nach *Bgh* Applikation besonders stark. Sie erreicht ihren Höhepunkt 1 hpi und klingt dann ab, ohne wieder das in diesem Kultivar sehr niedrige Kontrollniveau zu erlangen. Dahingegen erfolgt die Induktion von *HvWRKY2* zügiger und bleibt bis 1 hpi auf diesem hohen Niveau, um dann

schnell auf das Kontrollniveau zu sinken. Die zweite Transkriptakkumulation nach 4 h tritt in allen drei Kultivaren für *HvWRKY1* und 2 auf, die Transkriptmenge von *HvWRKY1* sinkt danach schnell wieder ab, während die Induktion von *HvWRKY2* in den anfälligeren Kultivaren A89 und 105-6 langsamer ansteigt und auch langsamer abklingt. In allen drei Kultivaren können ähnliche Expressionsmuster für *HvWRKY1* und 2 beobachtet werden, die sich nicht grundlegend von dem in cv. Ingrid Wildtyp unterscheiden.

Da *HvWRKY1* und 2 nach Inokulation mit *BghA6* in verschiedenen Kultivaren deutlich induziert sind, wurden auch für einige weitere WRKY-Faktoren aus der *Barley1*-Datenbank (Kap. 4.1) RT-PCRs durchgeführt (Abb. 3.11). *Contig21110* und *Contig16040* sind 10 bis 30 min nach Inokulation deutlich und transient induziert. Etwas schwächer fällt die Induktion von *Contig07517* aus, dessen Expression 8 hpi bis zum Ende des untersuchten Zeitraumes 12 hpi erhöht ist.

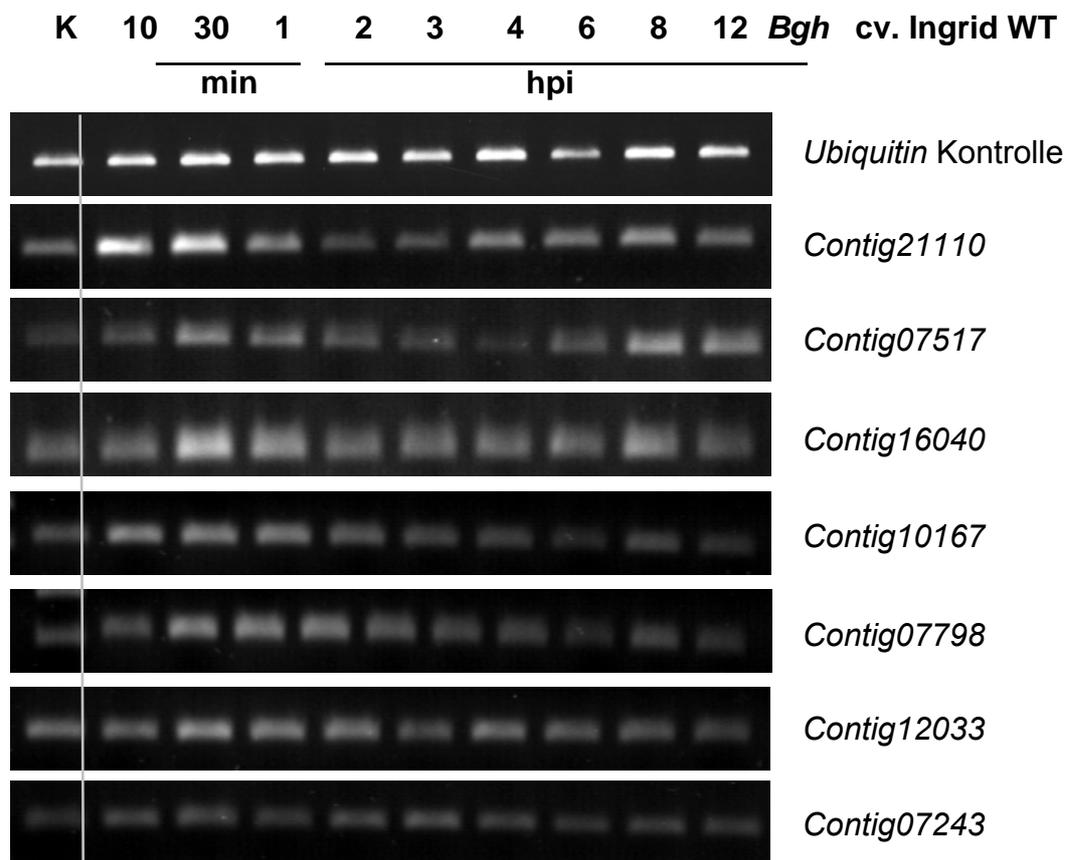


Abb. 3.11 Expressionsanalyse verschiedener WRKY-Sequenzen (*contigs*) der *Barley1*-Datenbank nach Inokulation von etwa sieben Tage alten Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) mit *BghA6*. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR verwendet. Kontrollen wurden Scheininokuliert (*mock*-Behandlung, K). Primärblätter wurden 10 und 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 12 h nach Inokulation geerntet. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin. Die PCRs wurden jeweils mindestens einmal wiederholt

In einem weiteren Experiment wurde die Expression von *HvWRKY1* und 2 im Nicht-Wirtssystem (*non-host interaction*) untersucht. Dazu wurden der Echte Weizenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*) und Gerste verwendet, da diese keine Wirtspflanze für den Pilz darstellt (Abb. 3.12).

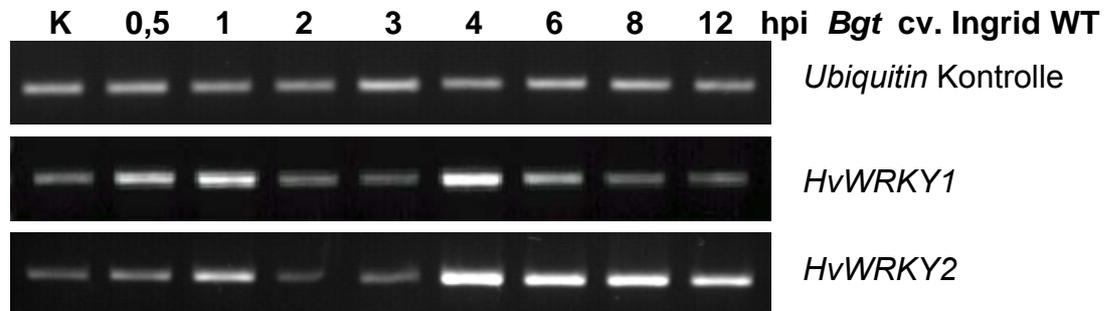


Abb. 3.12 Expressionsanalyse von *HvWRKY1* und 2 nach Inokulation von etwa sieben Tage alten Gerstenpflanzen cv. Ingrid mit *Bgt*. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR verwendet. Kontrollen wurden Scheininokuliert (*mock*-Behandlung, K). Primärblätter wurden nach 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 12 hpi geerntet. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin. Die PCRs wurden jeweils mindestens einmal wiederholt

Auch nach Inokulation mit *Bgt* zeigen *HvWRKY1* und 2 ein ähnliches Expressionsmuster wie nach *Bgh*-Applikation (Abb. 3.9 bzw. Eckey 2002). Eine erste Induktion von *HvWRKY1* ist 30 min bis 1 h nach Inokulation zu beobachten, die bei *HvWRKY2* erst nach 1 hpi auftritt und kürzer andauert, sowie eine zweite erhöhte Transkriptakkumulation 4 hpi. Diese ist für *HvWRKY1* sehr transient, bei *HvWRKY2* jedoch länger andauernd und auch 12 hpi noch deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle.

In dieser Arbeit wurde neben dem Einfluss des Echten Gersten- und Weizenmehltaupilzes auch die Wirkung des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf die Expression von *HvWRKY1*, 2 und 3 untersucht. Dabei wurde die Expression in drei Wochen alten Pflanzen überprüft. Das Transkriptniveau von unbehandelten Pflanzen (Kontrollpflanzen, K) wurde verglichen mit *Piriformospora*-infizierten Pflanzen (P), sowohl in Blättern als auch in Wurzeln. Außerdem wurde der Einfluss einer zusätzlichen Inokulation mit *BghA6* berücksichtigt. Als Zeitpunkt wurde hier 12 hpi gewählt. Dieser für WRKY-Faktoren späte Zeitpunkt wurde bestimmt, da für ihn auch vergleichbare Daten für die Gene des barley1 Affimetrix-Chips bekannt sind (Waller *et al.*, 2005). Abbildung 3.13 zeigt, dass in Blättern nur eine Induktion von *HvWRKY2* nach *Piriformospora*-Behandlung auftritt. Die mRNA-

Menge von *HvWRKY1* nimmt nur wenig zu, die von *HvWRKY3* eher ab. In Wurzeln konnte kein Unterschied zwischen mit *Piriformospora* inokulierten und Kontrollpflanzen festgestellt werden, was auch an der ohnehin geringen Expression von *HvWRKY1* und 2 in diesem Gewebe (siehe Abbildung 3.14) liegen kann. Zusätzliche Inokulation mit *Bgh* hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von *HvWRKY1*, führt aber für *HvWRKY2* und 3 zu einer leichten Verminderung der Transkriptlevel.

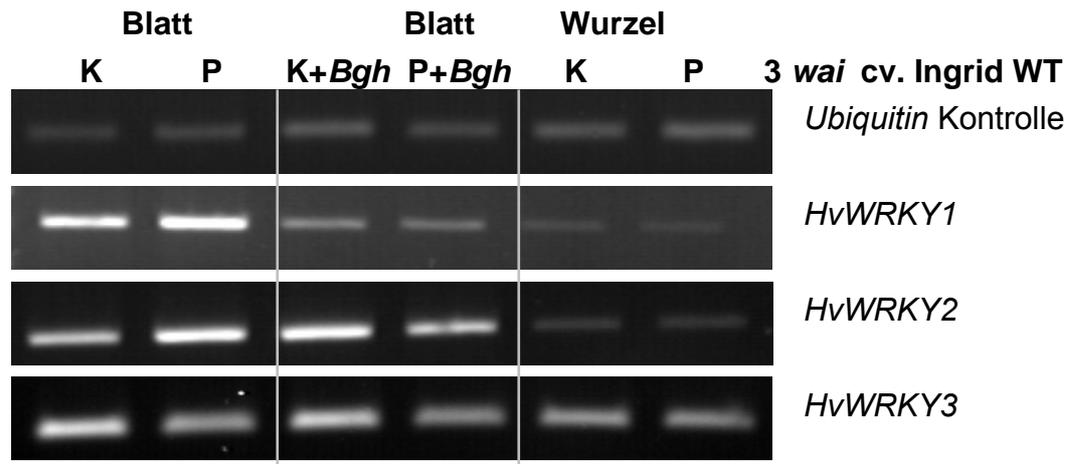


Abb. 3.13 Expressionsanalyse von *HvWRKY1*, 2 und 3. Die Analyse des jüngsten und zweitjüngsten Blattes (links, Mitte) bzw. der mit *Piriformospora indica* besiedelten Wurzel (rechts) erfolgte drei Wochen nach Inokulation mit *Piriformospora* (P). Es wurde Gersten cv. Ingrid eingesetzt und eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Als Kontrollen dienten parallel angezogene, nicht mit *Piriformospora* behandelte, Pflanzen (K). Wurden die Pflanzen zusätzlich mit *BghA6* inokuliert (Mitte), erfolgte die Ernte 12 hpi. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin. Die PCRs wurden jeweils einmal wiederholt.

Fast alle Experimente dieser Arbeit wurden mit Primärblättern von etwa einer Woche alten Gerstenpflanzen durchgeführt. Auch die meisten Veröffentlichungen über WRKY-Transkriptionsfaktoren beschäftigen sich mit Expressionsstudien in jungen Blättern. Somit stellte sich die Frage, in welchen anderen pflanzlichen Organen *HvWRKY1* und 2 exprimiert werden. Es wurden nach drei Wochen Wachstum der Pflanzen die Wurzeln, das dritte und vierte Blatt, sowie der Stängel geerntet. Außerdem wurden Primärblätter von einer Woche alten Pflanzen verwendet. Fahnenblatt und junge Ähre wurden zeitgleich während der Blüte abgeschnitten. Außerdem wurden Embryonen nach einem Tag Quellen aus Körnern präpariert. Für alle Versuche wurde cv. Ingrid benutzt und das Material mehrerer Pflanzen vereinigt. Da Pflanzen aus drei Ansätzen verwendet wurden, kann nicht

ausgeschlossen werden, dass diese trotz kontrollierter Anzuchtbedingungen leicht unterschiedlichen äußeren Einflüssen ausgesetzt waren.

In allen untersuchten Organen konnte mindestens eine schwache Expression von *HvWRKY1* und 2 festgestellt werden (Abb. 3.14). Während die Expression von *HvWRKY1* im Primärblatt am schwächsten ausfiel, war sie zwei Wochen später im dann jüngsten, vierten Blatt am stärksten. *HvWRKY2* hingegen wird in allen älteren pflanzlichen Geweben sowie in den reproduktiven Geweben wie Ähre und Embryo stark transkribiert. In der Wurzel sind beide WRKY-Faktoren nur schwach exprimiert.

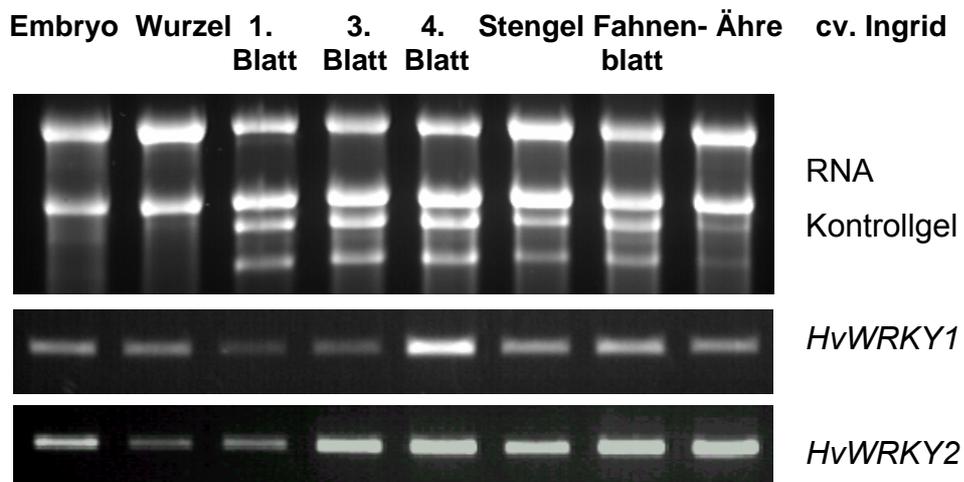


Abb. 3.14 Expressionsanalyse von *HvWRKY1* und 2. Es wurde Gersten cv. Ingrid verwendet und eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. RNA wurde aus Embryonen isoliert, die nach eintägigem Quellen der Körner präpariert wurden. Wurzeln, Stängel, drittes und viertes Blatt wurden von drei Tage alten Pflanzen geerntet, Primärblätter von einer Woche alten Pflanzen. Fahnenblätter und junge Ähren wurden gleichzeitig abgeschnitten. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen und Qualität der RNA wird ein mit Ethidiumbromid gefärbtes und im UV-Licht sichtbar gemachtes Gel gezeigt, auf dem jeweils 2 µg RNA aufgetragen wurden. Das Material wurde gesammelt, bei -80°C gelagert und alle Proben gemeinsam aufgearbeitet. Die PCRs wurden jeweils einmal wiederholt

Neben der konstitutiven, gewebsspezifischen ist auch die induzierbare Expression der WRKY-Faktoren von Interesse. Eckey (2002) konnte zeigen, dass *HvWRKY1* bereits 30 min nach Verwundung von Primärblättern stark induziert ist und die Transkriptmenge nach 2 Stunden das Ausgangsniveau erreicht hat. Dies korreliert mit der in dieser Arbeit gezeigten Häufung von Verwundungsreizen vermittelnden WUN-Elementen (Kap. 4.2) in dessen Promotor.

Daher war es nahe liegend zu untersuchen, ob auch *HvWRKY2* auf Verwundung reagiert. In dieser Arbeit erfolgte die Verwundung von Primärblättern der Gersten

cv. Ingrid mit dem Abrasiv Carborund. Wie Abbildung 3.15 zeigt, wird *HvWRKY2* schon 30 min nach der Behandlung induziert und sinkt dann schnell wieder auf das Grundniveau, welches 2 hpi wieder erreicht ist.

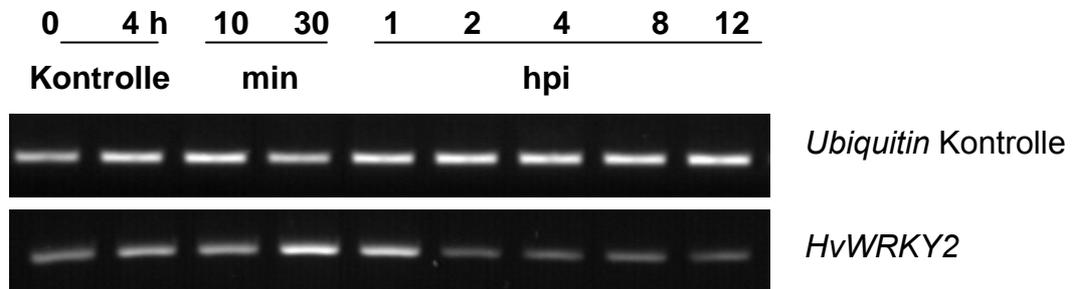


Abb. 3.15 Expressionsanalyse von *HvWRKY2*. Verwundung von etwa sieben Tage alten Gerstenpflanzen (cv. Ingrid) mit dem Abrasiv Carborund. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR verwendet. Primärblätter wurden nach 10 und 30 min, 1, 2, 4, 8 und 12 hpi geerntet, nicht verwundete Kontrollen zum Zeitpunkt 0 und nach 4 h. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin.

Es stellte sich die Frage, ob auch weitere *Bgh*-responsive Gene (Eckey, 2002, Jansen 2002) auf einen Verwundungsreiz hin induziert werden. Es wurden die Gene *putative phytohelatinsynthase*, *Poly85*, *Chorismatmutase*, *RLK (receptor-like protein kinase)* und *Poly73* untersucht. Da auch in den Promotoren des *blue copper binding* Proteins *Poly85* und der putativen *Phytochelatinsynthase* sechs bzw. neun WUN-Elemente vorhanden sind (Kap. 4.2), wurde auch für diese Gene eine entsprechende Analyse durchgeführt. Wie Abbildung 3.16 zeigt, ist die Expression beider Gene durch vorsichtiges Abreiben der Blätter mit Carborund induzierbar. Die *Phytochelatinsynthase* ist sehr schnell und transient induziert, eine Transkriptakkumulation ist 20 bis 30 min nach Verwundung zu beobachten. *Poly85* ist auch induziert, aber erst zu einem etwas späteren Zeitpunkt. Die Akkumulation beginnt 30 min nach Verwundung, das Grundniveau wird erst 4 h nach der Behandlung wieder erreicht. Die mRNA der *Chorismatmutase* scheint nach 30 min und 2 h vermehrt transkribiert zu werden. Wie Abbildung 3.16 zeigt, ist die Transkription der *receptor like protein kinase* (RLK) und von *Poly73* in dem untersuchten Zeitraum unverändert.

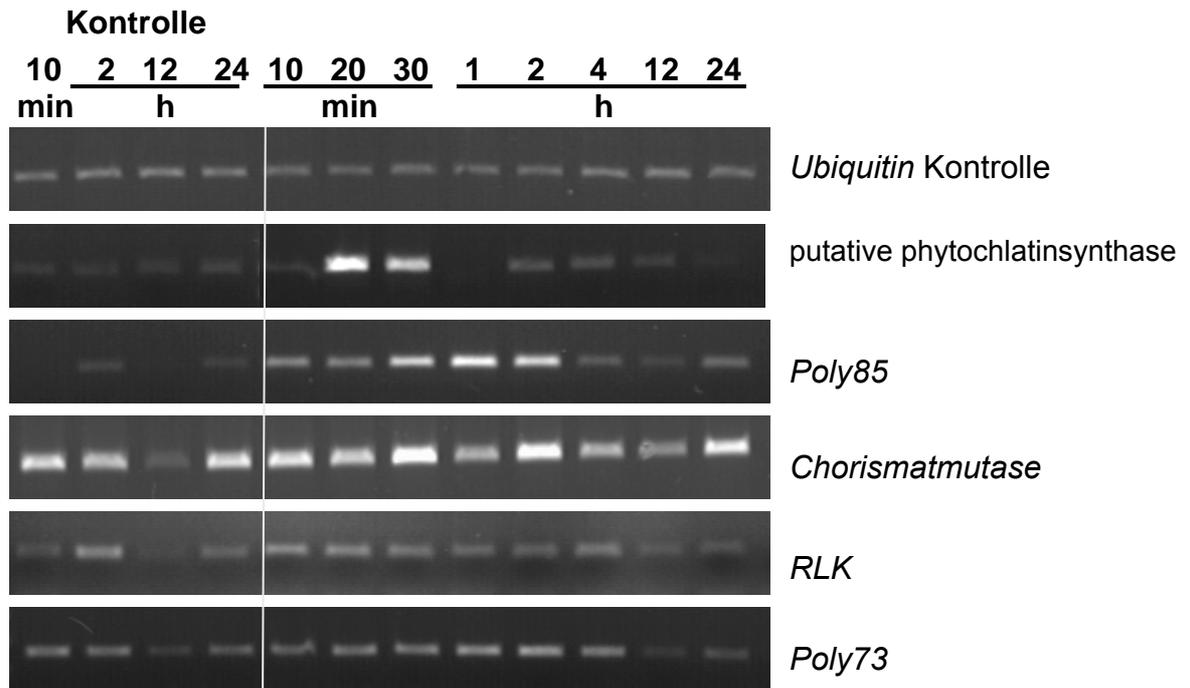


Abb. 3.16 Expressionsanalyse der *putativen Phytochelatinsynthase*, des *blue copper binding* Proteins *Poly85*, der *Chorismatmutase*, der *receptor like kinase* (RLK) und von *Poly73*. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR verwendet. Etwa eine Woche alte Gerstenpflanzen cv. Ingrid wurden mit dem Abrasiv Carborund verwundet. Primärblätter wurden nach 10, 20 und 30 min, 1, 2, 4, 12 und 24 hpt geerntet, nicht verwundete Kontrollen zum Zeitpunkt 10 min, 2, 12 und 24 hpt. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin.

Zusammenfassend kann man sagen, dass kein genereller Zusammenhang zwischen *Bgh*-Responsivität und einer Induktion durch Verwundung festgestellt werden konnte, dass aber die Expression der *putativen Phytochelatinsynthase*, von *Poly85* und der *Chorismatmutase* durch Verwundung induzierbar ist.

4.5 Untersuchung der Bindungsspezifität der Antikörper gegen HvWRKY1 und gegen die WRKY-Domäne mittels Western Blot und ELISA

Um die Expression des *HvWRKY1*-Gens auf Translationsebene zu untersuchen, wurden polyklonale Antikörper gegen zwei aus der *HvWRKY1*-Sequenz abgeleitete Peptide hergestellt. Die Synthese der Peptide und die Herstellung der Antikörper aus Kaninchen erfolgten durch die Firma Eurogentec EGT Group (Seraing, Belgien), je Peptid wurden zwei Kaninchen immunisiert (Kap. 2. 13.1). Der anti-WRKY α Antikörper war gegen die ersten, hoch konservierten, Aminosäuren der

WRKY-Domäne gerichtet. Die Sequenz des Peptides, gegen das er hergestellt wurde, lautet YQ**WRKYGQ**KVTKDNPC. Dieser Antikörper sollte möglichst viele WRKY-Faktoren detektieren. Ein zweiter Antikörper wurde spezifisch gegen HvWRKY1 erzeugt (anti-HvWRKY1). Er wurde gegen ein Peptid, dessen Sequenz den Aminosäuren 121-135 von HvWRKY1 entsprach, generiert (VSPSRKRKSEESLGT). Je Peptid wurden zwei Kaninchen immunisiert. Es wurde vorher im Western Blot getestet, wie stark der durch das Präimmunserum verursachte Hintergrund war. Da die mit dem HvWRKY1-Peptid immunisierten Kaninchen auch nach einer zusätzlichen Immunisierung nur eine schwache Reaktion aufwiesen, wurde für die Aufreinigung der letzten Blutung über eine AF-Amino TOYOPEARL 650 M Säule das Blut beider Kaninchen vereinigt. Zuerst wurde untersucht, bis zu welcher Verdünnung die beiden Antikörper das Peptid, das zu ihrer Erzeugung benutzt wurde, erkannten. Daraus lässt sich die Qualität der Antikörper ableiten, d.h. ob die Menge an HvWRKY1 in einem Proteinextrakt ausreicht, damit prinzipiell eine Erkennung durch den Antikörper möglich ist. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) durchgeführt. Das Peptid wurde in 500 µl destilliertem Wasser gelöst, was einer Konzentration von 50 µg/µl (anti-HvWRKY1) bzw. 38 µg/µl (anti-WRKYall) entspricht. Das gelöste Peptid wurde im ELISA in den Verdünnungen 1:100, 1:1000, 1:10 000 und 1:20 000 verwendet (Abb. 3.17). Die Verdünnung des Primären, d.h. anti-HvWRKY1-Antikörpers betrug 1:100, die des Sekundären 1:1 000. Der sekundäre Antikörper anti-*Rabbit* IgG war an gekoppelt an eine alkalische Phosphatase, die Detektion erfolgte mit p-Nitrophenylphosphat. Die Extinktion wurde nach 30 min Inkubationszeit gemessen (Kap. 2.13.4). Die Extinktionswerte wurden aus zwei Experimenten gemittelt, pro Experiment wurde die jeweilige Probe zweimal aufgetragen. Der Hintergrund, d. h. die Extinktion, die die Waschschrte und das Substrat mit dem Antikörper erzeugten, wurde abgezogen. Sie betrug 0,122 für anti-WRKYall und 0,035 für anti-HvWRKY1.

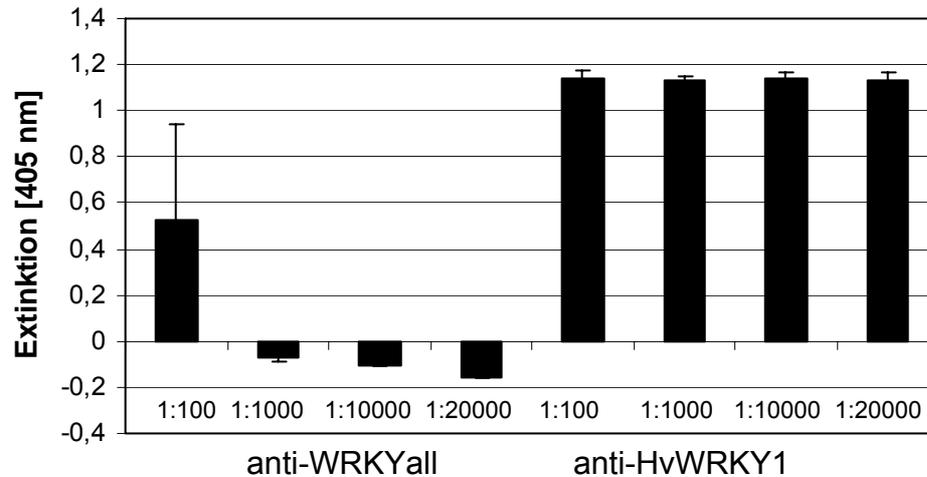


Abb. 3.17 ELISA mit den Antikörpern anti-HvWRKY1 und anti-WRKYall und verschiedenen Verdünnungen des Peptides, gegen das der jeweilige Antikörper hergestellt wurde (1:100 bis 1:1 000). Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurde die Verdünnung zweimal aufgetragen. Von den Werten wurden der jeweilige Hintergrund des Antikörpers und der Wert, den das Präimmunserum ergab, abgezogen. Gemessen wurde die Extinktion bei 405 nm (y-Achse).

Wie die Abbildung zeigt, erkannte der anti-WRKYall Antikörper das Peptid ab einer Verdünnung von 1:1 000 nicht mehr. Die Immunisierung führte zu keiner starken und spezifischen Immunantwort gegen das verwendete Peptid. Damit ist entweder dieser Antikörper unbrauchbar, da er nicht spezifisch oder genug sensitiv ist und Transkriptionsfaktoren wie WRKY-Faktoren nur in sehr geringer Konzentration in Proteinextrakten vorliegen, oder das Peptid ist zerstört. Anti-HvWRKY1 hingegen erkennt das Peptid sehr gut. In einem anderen Experiment konnte nachgewiesen werden, dass auch eine Verdünnung des Peptides von 1:40 000 nicht zu einer deutlichen Verminderung der Extinktion führte (Experiment nicht gezeigt).

Als nächstes wurde die Spezifität der Antikörper getestet. Dazu wurde der aufgereinigte Antikörper mit dem *large bleeding* und dem Präimmunserum verglichen (Abb. 3.18). Dazu ist ein ELSA nur bedingt geeignet, weshalb Western-Studien durchgeführt wurden, die eine Aussage über die Anzahl der von dem Antikörper detektierten Proteine in einem Extrakt ermöglicht. Es wurden 20 µg Protein aus Primärblättern der Gersten cv. Ingrid isoliert, die 0 h (Kontrolle), 2 h, 4 h, oder 12 h nach Inokulation mit *BghA6* geerntet wurden. Der Blot wurde nach Ponceau-Färbung geteilt und die einzelnen Abschnitte entweder mit dem aufgereinigten Antikörper, dem *large bleeding* oder dem Präimmunserum behandelt.

Für den Antikörper anti-*HvWRKY1* wurden zwei Kaninchen infiziert, und die *large bleedings* sowie die Präimmunseren getrennt getestet. Für den Antikörper wurde das Blut beider Kaninchen aufgearbeitet. Die optimale Verdünnung der Antikörper wurde mit Dot Blots, sowie weiteren Western Blots, ermittelt. Sie betrug für den ersten Antikörper 1:100, für den Zweiten 1:2 000. Als sekundärer Antikörper wurde *Anti-Rabbit IgG*, gekoppelt an alkalische Phosphatase, benutzt.

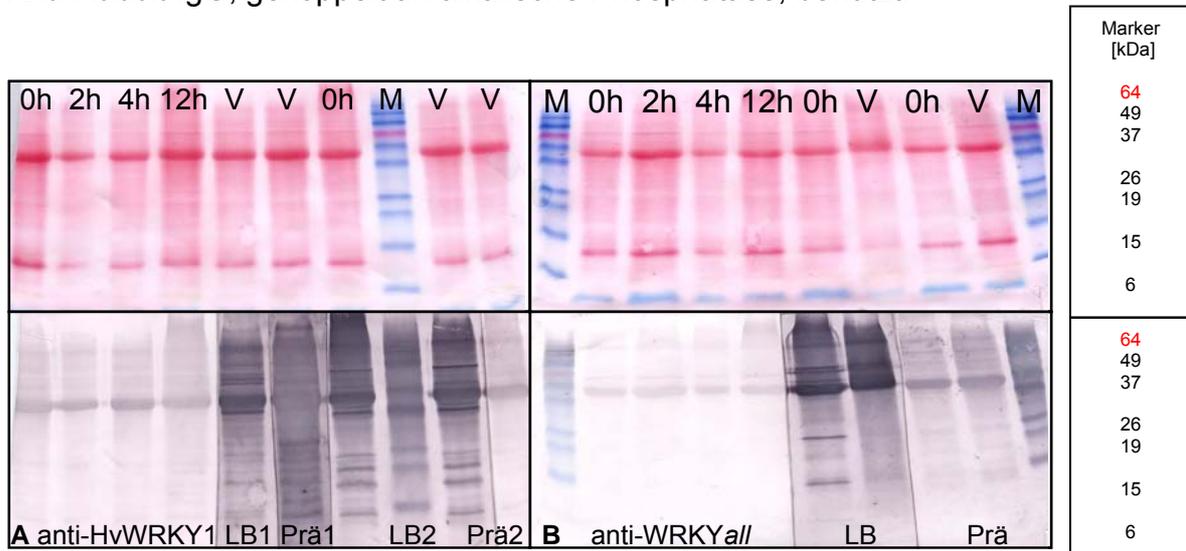


Abb. 3.18 Western Blot mit den Antikörpern anti-*HvWRKY1* (A) und anti-*WRKYall* (B). Es wurden 20 µg Protein aus einer Woche alten Primärblättern von Gersten cv. Ingrid aufgetragen. Die Blätter wurden 0 (Kontrolle), 2, 4 und 12 h nach Inokulation mit *BghA6* geerntet. V steht für „vereinigt“, dabei wurden die Proteinextrakte von 2, 4 und 12 hpi gemischt. Nach der Färbung des Blots mit Ponceau-Lösung (oben) wurde der Blot auseinander geschnitten und jeweils in aufgereinigtem Antikörper (anti-*HvWRKY1* bzw. anti-*WRKYall*), *large bleeding* (LB; LB1 und LB2 beziehen sich auf zwei verschiedene Kaninchen, deren Seren zusammen zu anti-*HvWRKY1* aufgereinigt wurden) und Präimmunserum (Prä) inkubiert. Die Verdünnung der ersten Antikörper war jeweils 1:100. Als sekundärer Antikörper wurde *Anti-Rabbit IgG*, gekoppelt an alkalische Phosphatase, in einer 1:2 000 Verdünnung benutzt. M = Marker, die rote Markerbande entspricht einem Molekulargewicht von 64 kDa.

Die Ponceau-Färbung zeigt eine ungefähr gleiche Beladung des Gels mit den verschiedenen Proteinproben. Nach Zugabe von sekundärem Antikörper und Substrat zeigt das Präimmunserum Prä1 im Vergleich zum *large bleeding* LB1 mehr Banden. Hingegen weist das Präimmunserum Prä2 deutlich weniger Banden auf als das zugehörige *large bleeding* 2. Auch das Präimmunserum des mit dem *WRKYall*-Peptid immunisierten Kaninchen zeigt nur wenige Banden im Präimmunserum während im *large bleeding* deutlich mehr Banden detektiert wurden. Interessanterweise wurden nach Induktion durch Inokulation mit *BghA6*

(V) nicht mehr, sondern weniger Banden detektiert. Dies deutet darauf hin, dass einige WRKY-Faktoren nach Inokulation herunterreguliert werden.

Allerdings konnten viele der Banden im *large bleeding*, aber auch im Präimmunserum 1, mit dem aufgereinigten Antikörper nicht mehr nachgewiesen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich um unspezifische Bindungen handelte.

Die Berechnung des Molekulargewichtes von HvWRKY1 mit dem *Compute pI/Mw Tool* (Kap. 2.2) ergab 38,5 kDa. In diesem Bereich (zwischen 49 und 37 kDa) konnte nur eine sehr ausgeprägte Bande nachgewiesen werden, die auch auf dem Ponceau-gefärbten Gel deutlich zu erkennen ist. Sie ist in allen Proben gleichermaßen vorhanden und auch mit dem Präimmunserum nachzuweisen. Deshalb wird es sich dabei höchstwahrscheinlich nicht um einen WRKY-Transkriptionsfaktor handeln. Allerdings könnte diese Bande die von HvWRKY1 überdecken. Letztlich kann auch das Molekulargewicht durch posttranslationale Modifikationen verändert sein. So besitzt HvWRKY1 eine mögliche N-Glycosylierungsstelle und mehrere mögliche Stellen für Phosphorylierungen und Myristylierungen (ScanProsite, Kap. 2.2).

Mit beiden Antikörpern ließ sich im Western Blot keine spezifische Bande erkennen, die nach Induktion auftritt. Insgesamt scheint das *large bleeding* zum Nachweis von HvWRKY1 besser geeignet zu sein als der aufgereinigte Antikörper, da dieser quasi keine Banden mehr erkennt.

Der Antikörper anti-WKRY α 11 detektiert auch nicht das Peptid, das zu seiner Herstellung verwendet wurde (Abb. 3.17). Daher wurden mit diesem Antikörper keine weiteren Experimente durchgeführt. Da eventuell die Sensitivität des Western Blots zu gering ist, wurden ELISA-Experimente mit anti-WRKY1 durchgeführt. Das Proteinextrakt hierfür stammte aus mit *BghA6* inokulierten Blättern des Kultivars Ingrid (Abb. 3.19 und 3.20)

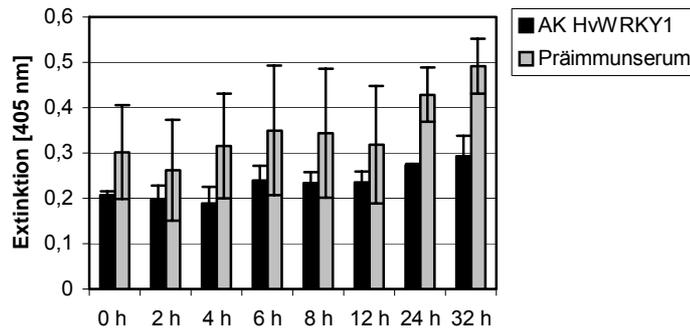


Abb. 3.19 ELISA mit dem Antikörper anti-HvWRKY1 und dem zugehörigen Präimmunserum. Je 20 µg Proteinextrakt aus einer Woche alten Gerstenpflanzen cv. Ingrid wurden aufgetragen. Die Pflanzen wurden 0 (Kontrolle), 2, 4, 6, 8, 12, 24 und 32 h nach Inokulation mit *BghA6* geerntet. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurde jeder Proteinextrakt zweimal aufgetragen. Von den Werten wurde der von dem Antikörper bzw. dem Präimmunserum jeweils verursachte Hintergrund abgezogen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes aus zwei Experimenten an. Gemessen wurde die Extinktion bei 405 nm (y-Achse). Als Substrat diente p-Nitrophenylphosphat. Die Extinktion wurde nach 45 min Inkubationszeit gemessen. Der Hintergrund war sowohl für anti-WRKY1 (-0,061) als auch für das Präimmunserum (-0,020) negativ und wurde daher nicht abgezogen.

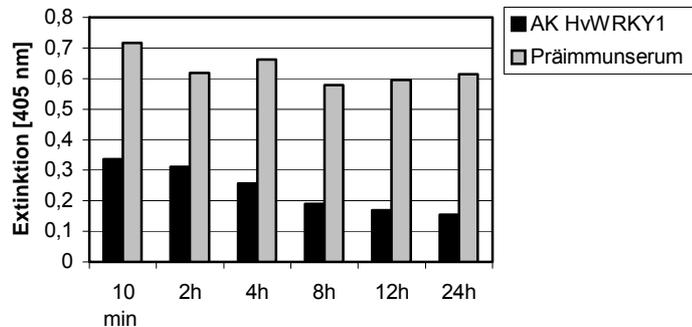


Abb. 3.20 ELISA mit dem Antikörper anti-HvWRKY1 und dem zugehörigen Präimmunserum. Je 20 µg Proteinextrakt aus einer Woche alten Gerstenpflanzen cv. Ingrid wurden aufgetragen. Die Pflanzen wurden 10 min (Kontrolle), 2, 4, 8, 12 und 24 h nach Inokulation mit *BghA6* geerntet. In diesem Experiment wurde jeder Proteinextrakt zweimal aufgetragen. Von den Werten wurde der von dem Antikörper bzw. dem Präimmunserum jeweils verursachte Hintergrund abgezogen. Gemessen wurde die Extinktion bei 405 nm (y-Achse). Als Substrat diente p-Nitrophenylphosphat. Die Extinktion wurde nach 50 min Inkubationszeit gemessen. Der abgezogene Hintergrund von anti-HvWRKY1 betrug 0,132 und der des Präimmunserums 0,180.

Für beide Abbildungen wurden unabhängige Kinetiken verwendet. Die verwendeten Pflanzen wurden gleich behandelt. Wie man erkennen kann, ist in dem untersuchten Zeitraum keine deutliche Induktion des Proteins erkennbar, in Abb. 3.20 nimmt die Extinktion sogar ab. Die Qualität des Proteinextraktes wurde im mit Coomassie gefärbten Proteingel überprüft (Stein, IPAZ, Gießen). In allen drei Experimenten war die Extinktion unter Verwendung des Präimmunserums deutlich größer als mit dem aufgereinigten Antikörper. Wie schon der Western Blot (Abb. 3.18) zeigt detektiert anti-HvWRKY1 zum Teil weniger Proteine als das Präimmunserum, das unspezifische Signale nachweist. Da nicht auszuschließen war, dass die schlechte Detektion von HvWRKY1 eventuell auf zu geringer Konzentration von HvWRKY1 im Extrakt beruht, wurden Zellkerne angereichert und aus diesen Protein extrahiert (Abb. 3.21). Diese Methode ist in Zusammenhang mit Western Blots zur Darstellung von WRKY-Transkriptionsfaktoren schon von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich angewandt worden (Turck *et al.*, 2004). Für die Präparation wurden etwa eine Woche alte Gerstenpflanzen cv. Ingrid verwendet, die 6 und 24 h nach Verwundung mit Carborund geerntet wurden. Diese, verglichen mit der nach 30 min bis 1 h auftretenden RNA-Akkumulation von *HvWRKY1* (Abb. 3.15 und Eckey *et al.*, 2002) relativ späten Zeitpunkte wurden gewählt, um sicher zu gehen, dass die Zeit nach der Induktion für eine Proteinakkumulation ausreichte.

Als Kontrollen dienten unverwundete, zum Zeitpunkt 0 und 24 h geerntete Pflanzen. Da die Kernanreicherungen nur geringe Proteinmengen ergaben, wurden von diesen je 10 µg Protein, vom zytosolischen Überstand hingegen 20 µg Protein aufgetragen. Als Antikörper wurden anti-HvWRKY1 in einer Verdünnung von 1:100 und ein Aktin-Antikörper 1:2 000 verwendet. Aktin diente als Marker für zytosolische Proteine und sollte in der mit Zellkernen angereicherten Fraktion in deutlich geringerer Konzentration als im Zytosol nachweisbar sein. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10 000 verdünnt. Der aufgelegte Film wurde nach 1 h Expositionszeit entwickelt (Abb. 3.21).

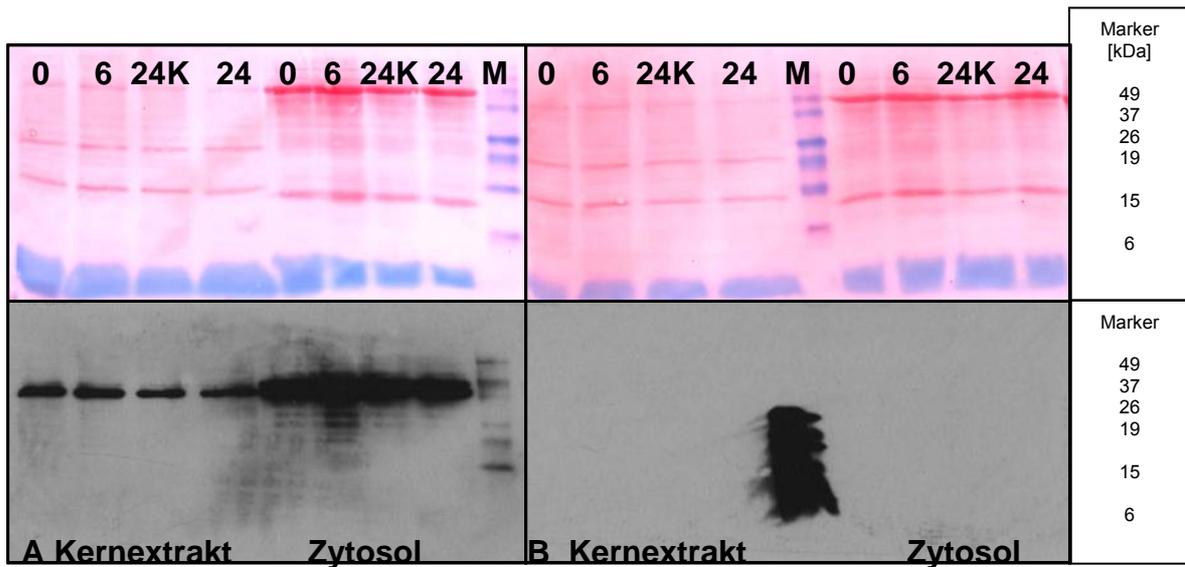


Abb. 3.21 Western Blot mit Antikörpern gegen Aktin (A) und HvWRKY1 (B). Es wurden 10 µg Protein aus der Kernextraktion und 20 µg der zytosolischen Fraktion aufgetragen. Gerstenpflanzen cv. Ingrid wurden 6 und 24 h nach Verwundung mit Carborund geerntet. Als Kontrollen dienten unverwundete Blätter zum Zeitpunkt 0 (vor der Verwundung) und 24 h. Die Zahlen (oben) beziehen sich auf die Stunden nach Verwundung, M bedeutet Marker. Die rote Markerspur entspricht 64 kDa. Der erste Antikörper wurde 1:100 (anti-HvWRKY1) bzw. 1:2 000 (anti-Aktin) verdünnt verwendet. Als sekundärer Antikörper diente anti-IgG gekoppelt an eine *horseradish* Peroxidase in der Verdünnung 1: 10 000.

Mit dem Antikörper gegen Aktin war ein deutliches Signal bei etwa 42 kDa zu erkennen. Dieses Signal war im zytosolischen Überstand sehr viel stärker als im Kernextrakt, allerdings wurde auch doppelt so viel Protein aufgetragen. Der Blot mit dem Antikörper gegen HvWRKY1 zeigte lediglich unspezifische Bindung an den Größenmarker. Sofern die Induktion durch Verwundung nicht nur sehr kurz auftritt und das Protein instabil ist, muss man davon ausgehen, dass der Antikörper HvWRKY1 nicht zuverlässig erkennt, oder die Proteinmenge für den Nachweis immer noch zu gering ist. Ein starker proteolytischer Abbau durch das Prozedere der Kernextraktion ist auf Grund des klaren Bandenmusters in der Ponceau-Färbung unwahrscheinlich. Man kann davon ausgehen, dass die Anreicherung erfolgreich war, Aktin konnte deutlich detektiert werden, ohne dass es zu Proteindegradation oder unspezifischen Bindungen kam. Die Frage ist, ob die Konzentration von HvWRKY1 noch unter der Nachweisgrenze lag. Wahrscheinlich ist, dass die Immunisierung der Kaninchen nicht erfolgreich war, oder dass ein Fehler während der Peptidsynthese oder der Aufreinigung des Antikörpers passierte.

Um auszuschließen, dass die mangelnde Sensitivität des Western Blots die Ursache für die fehlende Detektion war, wurde mit denselben Extrakten ein ELISA

durchgeführt, der sensitiver als ein Western Blot ist. Es wurden zwei Experimente gemacht und die Proben in jedem Versuch doppelt aufgetragen (Abb. 3.22). Im Vergleich zu Abbildung 3.19 und 3.20 ist das nach einer Kernanreicherung von den Antikörpern detektierte Signal bei gleicher Proteinmenge deutlich höher, es beträgt etwa das 1,5- bis 3-fache dieser Werte. Es konnte in Abb. 3.22 zu den untersuchten Zeitpunkten kein deutlicher Anstieg der Extinktion nach Verwundung festgestellt werden. Ob es sich bei den Signalen um HvWRKY1 handelt oder um unspezifische Signale kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

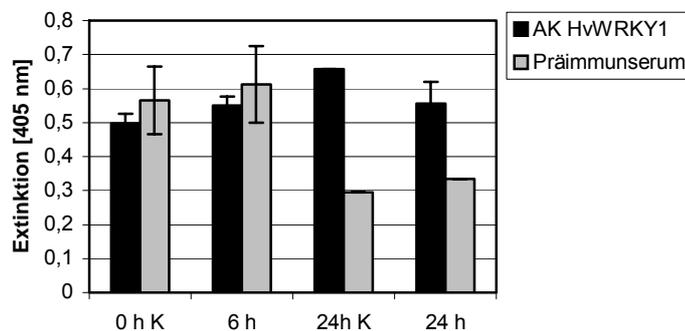


Abb. 3.22 ELISA mit dem Antikörper anti-HvWRKY1 und dem zugehörigen Präimmunserum. Es wurden 10 µg Protein der Kernextraktion aufgetragen. Die Gerstenpflanzen cv. Ingrid wurden 6 und 24 h nach Verwundung mit Carborund geerntet. Als Kontrollen dienen unverletzte Pflanzen, die zum Zeitpunkt 0 und 24 h geerntet wurden. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden die jeweiligen Proteinextrakte zweimal aufgetragen. Der Extrakt der 24 h Kontrolle wurde nur einmal eingesetzt. Von den Werten wurde der jeweilige Hintergrund des Antikörpers bzw. des Präimmunserums abgezogen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte aus beiden Experimenten an. Gemessen wurde die Extinktion bei 405 nm (y-Achse). Als Substrat diente p-Nitrophenylphosphat. Die Extinktion wurde nach 45 min Inkubationszeit gemessen. Der Hintergrund war sowohl für anti-WRKY1 (-0,004) als auch für das Präimmunserum (-0,014) negativ und wurde daher nicht abgezogen.

4.6 Transiente Überexpression und RNAi mit Bgh induzierten Genen

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss WRKY-Transkriptionsfaktoren und andere *Bgh*-responsive Gene auf das Resistenzverhalten von Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltau haben. Dazu wurden einzelne Gene mittels biolistischer Transformation transient überexprimiert oder ihre Expression durch RNA-Interferenz reduziert (*knock-down*).

In allen folgenden Experimenten wurden etwa eine Woche alte Primärblätter mit den entsprechenden Konstrukten beschossen und nach einer Regenerationszeit von 24 h mit *BghA6* inokuliert. Weitere 48 Stunden später erfolgte die mikroskopische Auswertung bezüglich Anzahl der erfolgreichen Penetrationen (Haustorien) bzw. der gestoppten Versuche (Papillenbildung). Als Kontrolle der Überexpression wurde der leere Expressionsvektor pGY-1, für die RNAi-Experimente doppelsträngige RNA (dsRNA) eines humanen Tyroidrezeptors verwendet. Für jedes Testgen wurde vorher mittels RT-PCR untersucht, ob es in der Epidermis exprimiert ist.

4.6.1 Überexpression und RNAi von WRKY-Transkriptionsfaktoren

Knock-down von *HvWRKY1* erhöht die Resistenz in Gerste gegen *Bgh* (Eckey et al. 2004). Um den Effekt der Überexpression dieses Transkriptionsfaktors zu überprüfen, wurde der ORF in den Expressionsvektor pGY1 kloniert (Kap. 2.14). Es zeigte sich, dass Überexpression von *HvWRKY1* in Gerste zu einer erhöhten Anfälligkeit führt (Abb. 3.23). Dazu wurden sieben unabhängige Versuche durchgeführt. Die Penetrationsrate in der Kontrolle variierte zwischen 35 % und 58 %, sie betrug im Mittel 48,9 %. Der Standardfehler lag bei $\pm 2,7$ %. Im Testansatz zur Überexpression von *HvWRKY1* ergab sich eine Schwankungsbreite von 51 bis 76 %, der Mittelwert (\pm Standardfehler SE) lag bei $64 \pm 2,8$ %, d.h. die Penetrationsrate wurde durchschnittlich um 15,1 % erhöht. In jedem Einzelexperiment führte die Transformation mit *HvWRKY1* zu einer um mindestens 10 % höheren Penetrationsrate als in der Kontrolle. Der *Student's t*-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Penetrationsraten von $p= 0,0015$. Daher spielt *HvWRKY1* in der Interaktion mit *Bgh* eine Rolle als Suszeptibilitätsfaktor.

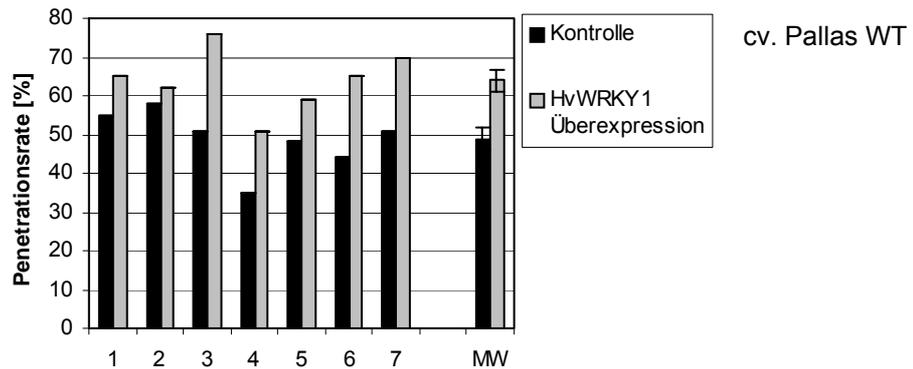


Abb. 3.23 Überexpression von *HvWRKY1* in Gerste (cv. Pallas WT). Die Penetrationsrate wurde in sieben unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dem leeren Expressionsvektor pGY-1 transformiert. 24 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die Penetrationsraten in den Kontrollversuchen in %, graue die der Überexpression von *HvWRKY1*. Der Mittelwert (MW ± SE) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle $48,9 \pm 2,7$ %, im Testansatz $64,0 \pm 2,8$ %. Der *Student's t*-Test ergab einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,0015$ zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

Auf Grund der hohen Ähnlichkeit von *HvWRKY1* und 2 wurde untersucht, ob RNAi bzw. Überexpression von *HvWRKY2* einen ähnlichen Einfluss wie *HvWRKY1* auf die Interaktion zwischen Gerste und *BghA6* hat. Dabei wurden für die Versuche zur RNA-Interferenz zwei verschiedene dsRNA-Konstrukte verwendet: Das eine umspannte den gesamten ORF des Gens, das andere nur die ersten 389 bp im 5'-Bereich des Gens („kurz“). Beide dsRNAs führten zu einem ähnlichen Ergebnis (Abb. 3.24): Die Penetrationsrate der Kontrolle schwankte zwischen 26 bis 61 % bzw. 26 bis 55 %, im Mittel (\pm SE) betrug sie $45,7 \pm 5,2$ % bzw. $42,8 \pm 6$ %. Im Testansatz lagen die Werte zwischen 23 bis 54 % bzw. zwischen 23 bis 48 %, das Mittel betrug $36,3 \pm 3,9$ % (Kontrolle) bzw. $34,5 \pm 5,4$ % (Versuch). Somit ergab sich eine Verringerung der Penetrationsrate um 11,2 bzw. um 8,3 %. Der *Student's t*-Test ergab einen Unterschied mit $p = 0,089$ bzw. $0,026$ zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

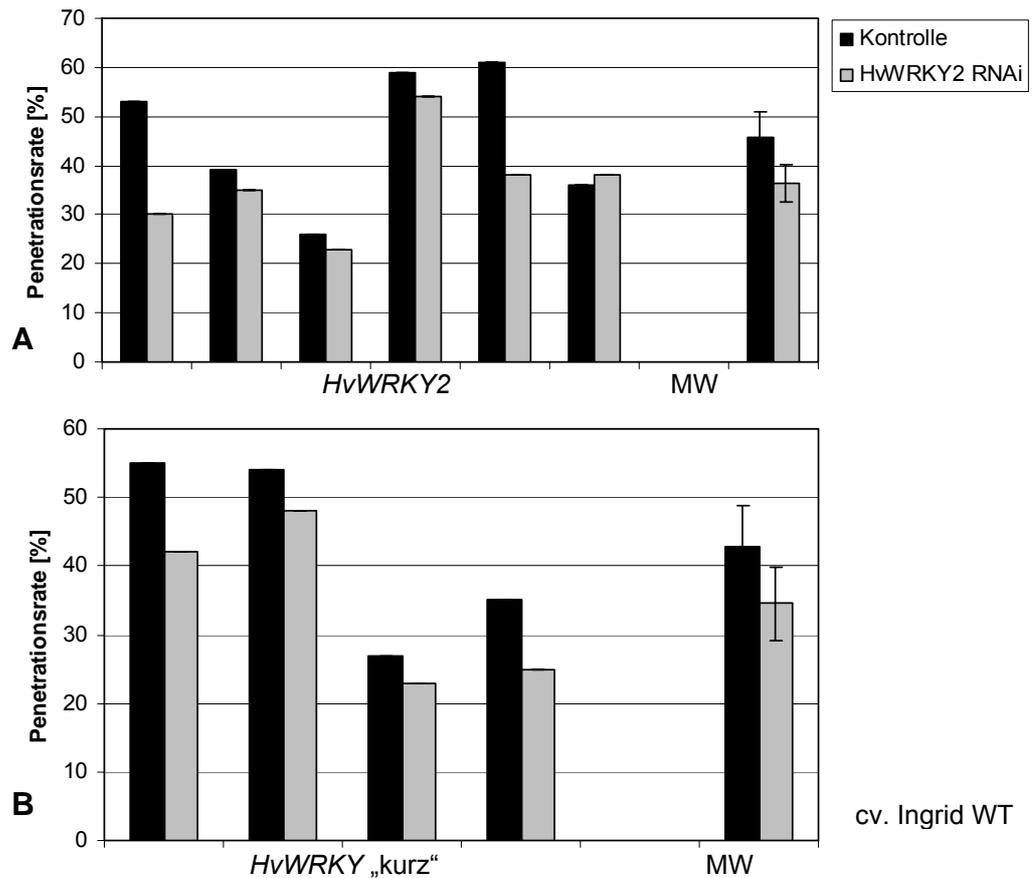


Abb. 3.24 RNAi Experiment mit dsRNA von *HvWRKY2* in Gerste (cv. Ingrid). Es wurden zwei verschiedene Konstrukte benutzt: das erste umfasst den gesamten ORF des Gens (A), das zweite („kurz“) die ersten 389 bp (B). Die Penetrationsrate wurde in sechs bzw. vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors beschossen. 24 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate in den Kontrollversuchen in %, graue die Effekte des *knock-outs* von *HvWRKY2*. Der Mittelwert (MW \pm Standardfehler) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle $45,7 \pm 5,2$ % bzw. $42,8 \pm 6$ %, im Testansatz $36,3 \pm 3,9$ % bzw. $34,5 \pm 5,4$ %. Der *Student's t-Test* ergab einen Unterschied mit $p = 0,089$ bzw. $0,026$ zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

Da die vollständige Sequenz von *HvWRKY2* bekannt ist, konnten auch Überexpressionsexperimente durchgeführt werden (Abb. 3.25). In Kultivar Ingrid betrug die mittlere Penetrationsrate der Kontrolle in fünf unabhängigen Versuchen $31,4 \pm 4,5$ %, die des Versuchsansatzes $55,6 \pm 5,7$ %. Die Penetrationsrate wurde also durch Überexpression von *HvWRKY2* durchschnittlich um 24,2 % erhöht. Die Werte variierten zwischen 22 und 50 % bzw. 38 und 74 %. Damit wurde gezeigt, dass *HvWRKY1* und 2 in der Interaktion von Gerste mit dem biotrophen Mehltaupilz als Suszeptibilitätsfaktoren wirken.

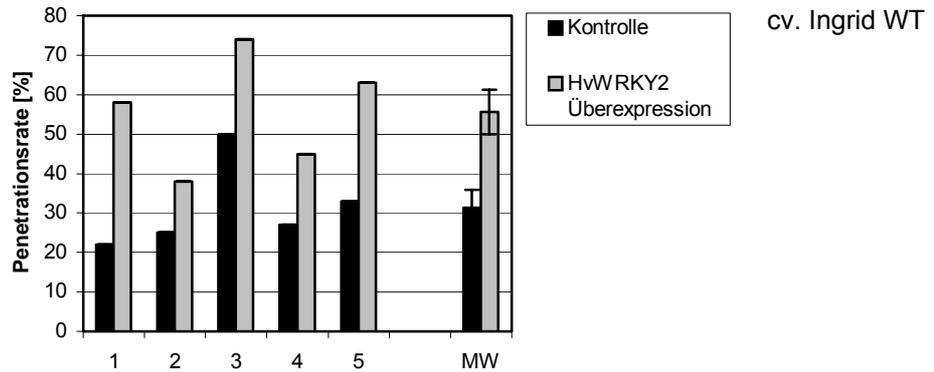


Abb. 3.25 Überexpression von *HvWRKY2* in Gerste (cv. Ingrid). Die Penetrationsrate wurde in fünf unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dem leeren Expressionsvektor pGY-1 transformiert. 24 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die der *HvWRKY2*-Überexpression. Der Mittelwert (MW ± SE) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle 31,4 ± 4,5 %, im Testansatz 55,6 ± 5,7 %. Der *Student's t-Test* ergab einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,0041$ zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

Sind die Signalwege von *HvWRKY1* und 2 mit dem von *Mlo* verknüpft?

Eine weitere Zielsetzung war, herauszufinden, ob die Erhöhung der Anfälligkeit durch *HvWRKY1* und 2 mit dem Signalweg des Resistenzgens *Mlo* verknüpft ist. Sollte dies der Fall sein, wäre ein Brechen der durch *mlo-5* vermittelten Resistenz durch die jeweilige Überexpression der Suszeptibilitätsfaktoren möglich. Hierfür ist Ingrid 22 (I22) geeignet, da sie eine Mutation in *Mlo* enthält (*mlo-5*, *Ror1*, *Ror2*) und daher fast völlig resistent gegenüber *BghA6* ist (Penetrationsrate 0 bis 2 %). Überexpression von *HvWRKY1* in I22 (Abb. 3.26 A) führte zu einer Penetrationsrate zwischen 0 und 0,08 % im Versuchsansatz, im Mittel lag sie bei 0,048 % ± 0,013 %. Die Penetrationsrate der Kontrolle schwankte zwischen 0 und 0,3 %, im Mittel betrug sie 0,084 % ± 0,05 %. Der *Student's t-Test* ergab eine Wahrscheinlichkeit von $p = 0,63$ mit der beide Werte gleich sind. Für die Überexpression von *HvWRKY2* (Abb. 3.26 B) ergab der *Student's t-Test* eine Wahrscheinlichkeit von $p = 0,056$. Im Versuchsansatz konnte in allen drei Versuchen keine Penetration beobachtet werden. In der Kontrolle lag die Penetrationsrate bei im Mittel 0,07 % ± 0,014 %, die Werte variierten zwischen 0,04 und 0,1 %.

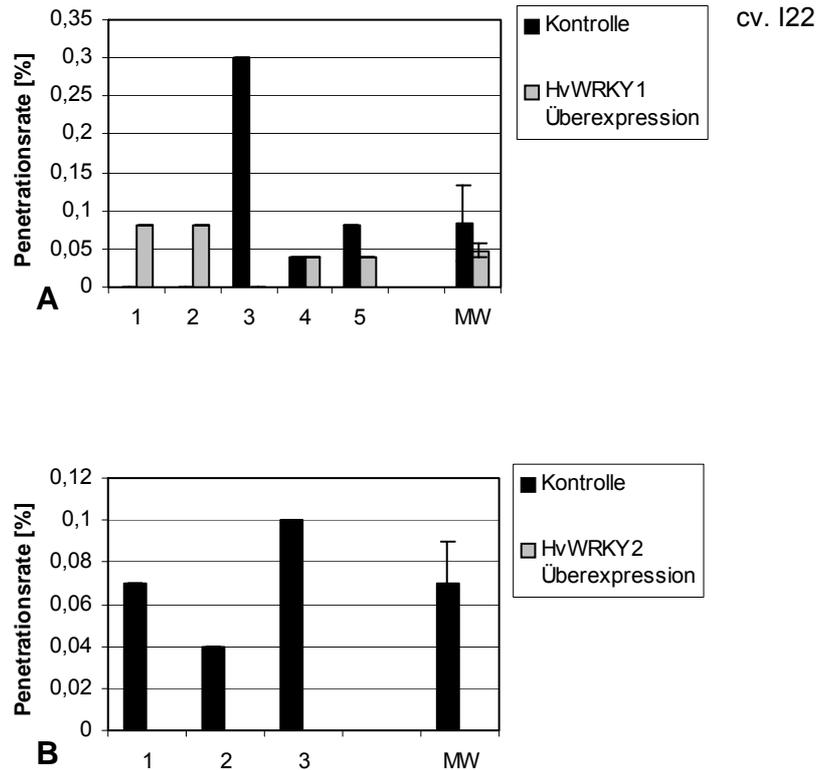


Abb. 3.26 Überexpression von *HvWRKY1* (A) und 2 (B) in Gerste cv. I22 (*mlo-5*, *Ror1*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid). Die Penetrationsrate wurde in fünf bzw. drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dem leeren Expressionsvektor pGY-1 transformiert. 24 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate in den Kontrollversuchen in %, graue die der *HvWRKY*-Überexpression. Der Mittelwert (MW \pm Standardfehler) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle $0,084 \pm 0,05$ %, im Testansatz $0,048 \pm 0,01$ % für *HvWRKY1* und $0,07 \pm 0,02$ %, im Testansatz 0 ± 0 % für *HvWRKY2*. Der Student's t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,63$ und $p = 0,056$) zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

Die Überexpression von *HvWRKY1* führte im Mittel zu keiner signifikanten Veränderung der Penetrationsrate gegenüber der Kontrolle. Während in den Versuchen eins und zwei keine Penetration in den Kontrollen zu beobachten war, fand im dritten Versuch keine Penetration im Versuchsansatz statt. Insgesamt kann man sagen, dass die Überexpression von *HvWRKY1* keinen Einfluss auf die Penetrationsrate in I22 hatte.

Die Überexpression von *HvWRKY2* führte dazu, dass in drei mikroskopisch ausgewerteten Versuchen keine Konidie in eine Epidermiszelle eindringen und ein Haustorium etablierten konnte. Da der Pilz auf den parallel inokulierten Blättern, die mit dem Kontrollkonstrukt transformiert waren, normal keimte und erfolgreich war,

lässt dies auf einen Einfluss der Überexpression auf die Penetrationsrate schließen. Allerdings wurde in den drei Versuchen auch ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen und somit auch der transformierten Zellen festgestellt (Abb. 3.28). In der Kontrolle waren etwa achtmal so viele GFP-exprimierende Zellen pro Blatt vorhanden wie im Testansatz ($4,8 \pm 0,12$ gegenüber $0,53 \pm 0,19$), dieser Unterschied war signifikant ($p= 0,0046$). Das heißt, es wurden achtmal mehr Zellen im Kontrollansatz ausgewertet als im Versuchsansatz, da auf den üblicherweise pro Ansatz 32 transformierten Blättern nur etwa 20 GFP-exprimierende Zellen im Versuchsansatz vorhanden waren. Der *mlo*-Hintergrund scheint somit im Unterschied zur Kontrolle einen Einfluss auf die Überexpression von *WRKY2* auszuüben.

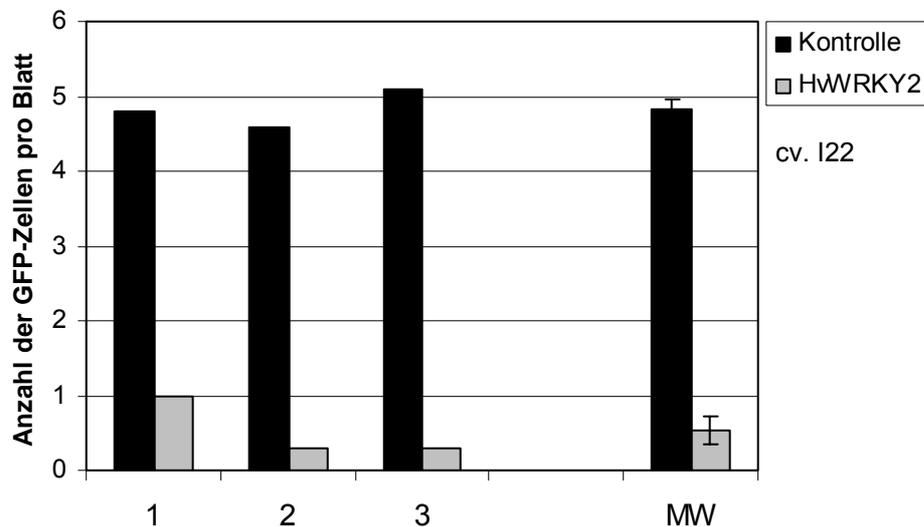


Abb. 3.27 Überexpression von *HvWRKY2* in Gerste cv. I22 (*mlo-5-Ror1*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid). Die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen pro Blatt wurde in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dem leeren Expressionsvektor pGY-1 transformiert. 24 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die Anzahl in den Kontrollversuchen, graue in den Versuchen zur *HvWRKY*-Überexpression. Der Mittelwert (MW \pm Standardfehler) 48 hpi beträgt in der Kontrolle $4,8 \pm 0,12$, im Testansatz $0,53 \pm 0,19$ für. Der *Student's* t-Test ergab einen signifikanten Unterschied von $p= 0,0046$ zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

Die fast vollständige *mlo-5*-vermittelte Resistenz in Gerste cv. I22 konnte, wie in Abb. 3.26 gezeigt, nicht durch Überexpression von *HvWRKY1* oder 2 gebrochen werden. Da *mlo*-tragende Kultivare wie I22 eine sehr hohe Penetrationsresistenz gegen *Bgh* besitzen, wurde untersucht, ob die Überexpression von *HvWRKY1* und 2 in *mlo*-tragenden Kultivaren, deren Resistenz durch eine zweite Mutation nur unvollständig ist, die Interaktion mit *Bgh* beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die Überexpressionsversuche in Gersten cv. A89 (*mlo-5*, *ror1-2*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid) wiederholt, deren Resistenz gegenüber *BghA6* im Gegensatz zu I22 unvollständig ist (Penetrationsrate ca. 10 bis 30 %). Wie Abb. 3.28 zeigt, konnte auch in A89 kein Unterschied in der Penetrationsrate zwischen Kontrolle und Testansatz festgestellt werden. Überexpression von *HvWRKY1* führte in fünf unabhängigen Experimenten in der Kontrolle zu einer Penetrationsrate zwischen 23 und 53 %, im Mittel (\pm SE) von $39,6 \pm 4,3$ %. Im Testansatz betrug die Penetrationsrate 25 bis 54 %, gemittelt $39 \pm 4,1$ %. Zur Überexpression von *HvWRKY2* wurden 13 Versuche durchgeführt, da *HvWRKY2* in ersten Experimenten einen Effekt auf die Penetrationsrate zu verursachen schien. Die mittlere Penetrationsrate der Kontrolle lag bei $38,8 \pm 3,3$ % (variierend zwischen 12 und 53 %) und im Testansatz bei $35,3 \pm 5,3$ % (zwischen 0 und 70 % variierend). Der *Student's* t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,9$ und $p= 0,31$). Diese Penetrationsraten sind verglichen mit den zu erwartenden 10 bis 30 % Penetration in A89 leicht erhöht (35 bis 40 %).

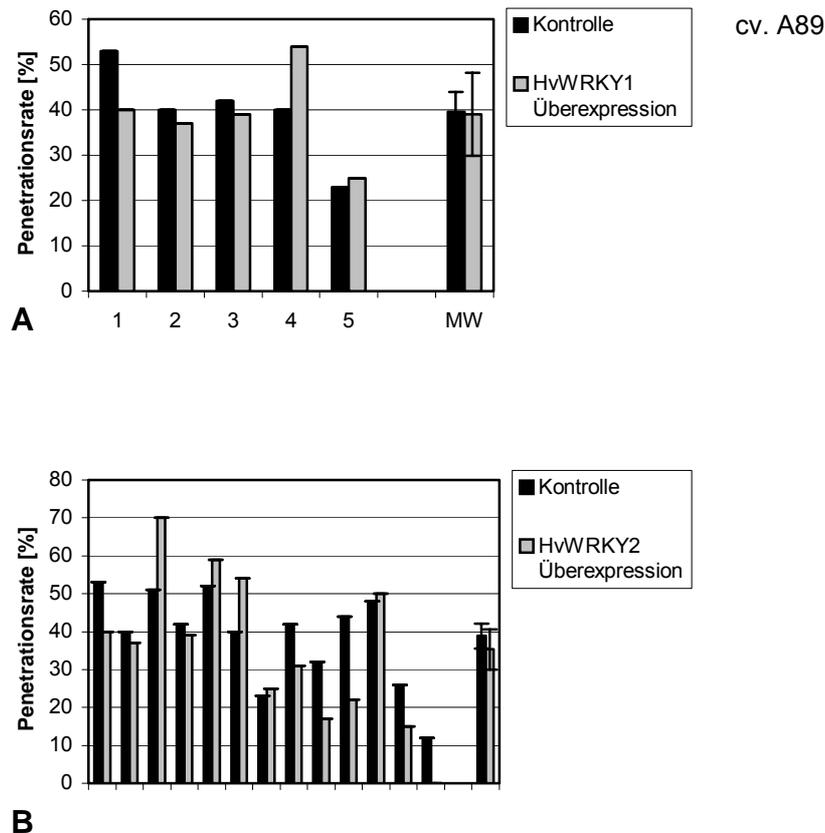


Abb. 3.28 Überexpression von *HvWRKY1* (A) und 2 (B) in Gerste cv. A89 (*mlo-5*, *ror1-2*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid). Die Penetrationsrate wurde in fünf bzw. 13 unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dem leeren Expressionsvektor pGY-1 transformiert. 24 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die der *HvWRKY*-Überexpression. Der Mittelwert (MW \pm Standardfehler) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle $39,6 \pm 4,3$ %, im Testansatz $39 \pm 4,1$ % für *HvWRKY1* und $38,8 \pm 3,3$ %, im Testansatz $35,3 \pm 5,3$ % für *HvWRKY2*. Der *Student's t*-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,9$ und $p = 0,31$) zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

Ein weiteres untersuchtes Gerstenkultivar ist 105-6. Dieses trägt das funktionstüchtige *Mlo*-Gen, besitzt aber eine Mutation in *Ror1*, so dass sie hypersuszeptibel gegenüber dem Echten Gerstenmehltau reagiert (Penetrationsrate > 80 %). Es wurde untersucht, ob transients *knock-down* von *HvWRKY1* oder 2 zu einer größeren Resistenz führt (Abb. 3.29). In drei bzw. vier unabhängigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Penetrationsrate in der Kontrolle und im Testansatz bestand (*Student's t*-Test $p = 0,83$ und $0,7$). Die Penetrationsraten in der Kontrolle lagen im Mittel (\pm SE) bei $77,3 \pm 2$ % für *HvWRKY1* bzw. $79,3 \pm 3,7$ % für *HvWRKY2*. Die Werte variierten zwischen 74 bis 81 % und 69 bis 90 %. Im Testansatz konnte eine gemittelte

Penetrationsrate von $78,7 \pm 7,3$ % bzw. $76,0 \pm 4,2$ % beobachtet werden (variierend zwischen 65 bis 90 % und 67 bis 87 %).

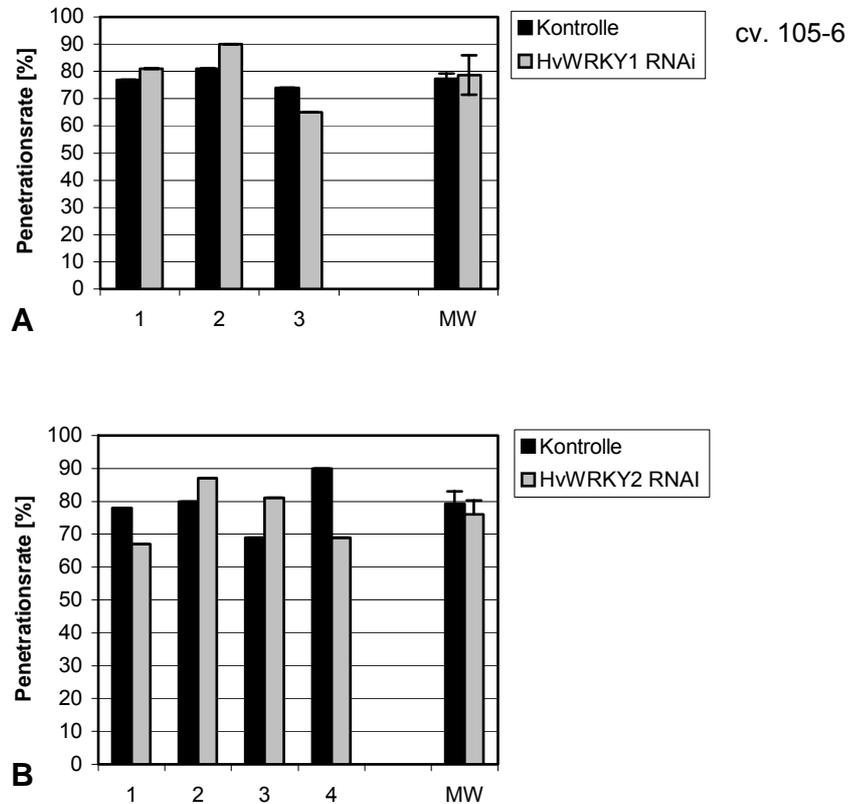


Abb. 3.29 RNAi Experimente mit dsRNA von *HvWRKY1* und 2 in Gerste cv. 105-6 (*Mlo*, *ror1*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid x Sultan5). Die Penetrationsrate wurde in drei bzw. vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors beschossen. 24 h nach dem Beschuss wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die des *knock-downs* von *HvWRKY*. Der Mittelwert (MW ± Standardfehler) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle $77,3 \pm 2$ % bzw. $79,3 \pm 3,7$ %, im Testansatz $78,7 \pm 7,3$ % bzw. $76,0 \pm 4,2$ %. Der *Student's t-Test* ergab keinen Unterschied zwischen Kontrolle und Versuchsansatz mit $p = 0,83$ bzw. $0,70$.

Folgende Abbildung fasst die Ergebnisse des *knock-downs* von *HvWRKY1* (Eckey, 2002) und *HvWRKY2* und der Überexpression beider Gene in cv. Ingrid, sowie die Überexpression in A89 zusammen (Abb. 3.30). Es wird die Penetrationsrate relativ zur Kontrolle angegeben. Wie man der Abbildung entnehmen kann, führt *knock-down* von *HvWRKY1* oder 2 in den Gersten cv. Ingrid und Pallas zu einer Reduktion der Penetrationsrate relativ zur jeweiligen Kontrolle um 32 % bzw. 17,7 %. Im Gegenzug führt die Überexpression des jeweiligen Gens zu einer verstärkten Penetration, die 35 % bzw. 84 % über der der jeweiligen Kontrolle liegt. Man kann

die beiden Gene also als Suszeptibilitätsfaktoren bezeichnen. Überexpression in cv. A89 (*mlo-5*, *ror1-2*, *Ror2*) hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Penetrationsrate, sie ist im Mittel um 0,88 % erhöht bzw. um 8,8 % erniedrigt. Auch in den Kultivaren I22 (*mlo-5*, *Ror1*, *Ror2*, Abb. 3.26) und 105-6 (*Mlo*, *ror1-2*, *Ror2*, Abb. 3.29) zeigten Überexpression bzw. RNAi keinen Effekt.

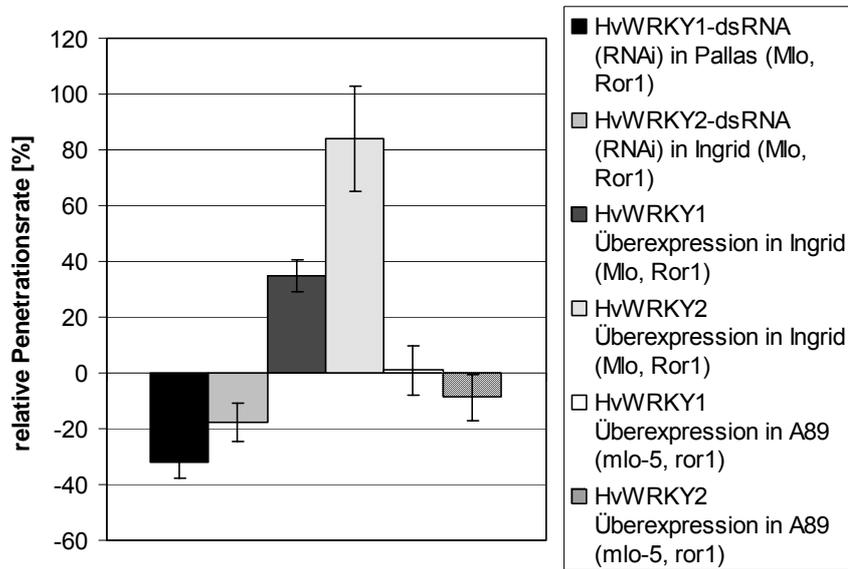


Abb. 3.30 Zusammenfassung der Ergebnisse der RNA-Interferenz mit dsRNA von *HvWRKY1* (n= 6, Eckey, 2002), *HvWRKY2* (n= 6) sowie die der Überexpression beider Gene (n= 7 und n= 5) in cv. Pallas bzw. Ingrid. Außerdem werden die Überexpressionsergebnisse in A89 gezeigt (n= 5 und n= 13). Die relative Penetrationsrate beträgt -32 % und -17,7 % für RNAi mit *HvWRKY1* und *HvWRKY2*, +35 und +84 % für die Überexpression beider Gene und +0,88 und -8,8 % für die Überexpression in cv. A89. Positive Balken= erhöhte Penetration gegenüber der Kontrolle, negative Balken = verminderte Penetration gegenüber der Kontrolle.

RNAi von *HvWRKY3*

In dieser Arbeit wurde noch ein weiterer WRKY-Transkriptionsfaktor mittels RNA-Interferenz charakterisiert: Mit *HvWRKY3* wurden in Gerste cv. Ingrid *knock-down* Experimente durchgeführt (Abb. 3.31). Der *knock-down* führte zu keiner signifikanten Veränderung der Penetrationsrate im Testansatz verglichen mit der Kontrolle. Die Penetrationsrate betrug $35,1 \pm 4,5$ % in der Kontrolle und $34,9 \pm 3,5$ % im Testansatz. Die Werte streuten dabei zwischen 19 und 53 % bzw. 16 und 49 %. Es war kein genereller Trend zu erkennen, die Penetrationsrate im Versuchsansatz lag in einigen Experimenten höher, in anderen niedriger als im Kontrollansatz. Dementsprechend waren die Mittelwerte beider Ansätze nicht signifikant verschieden ($p= 0,95$).

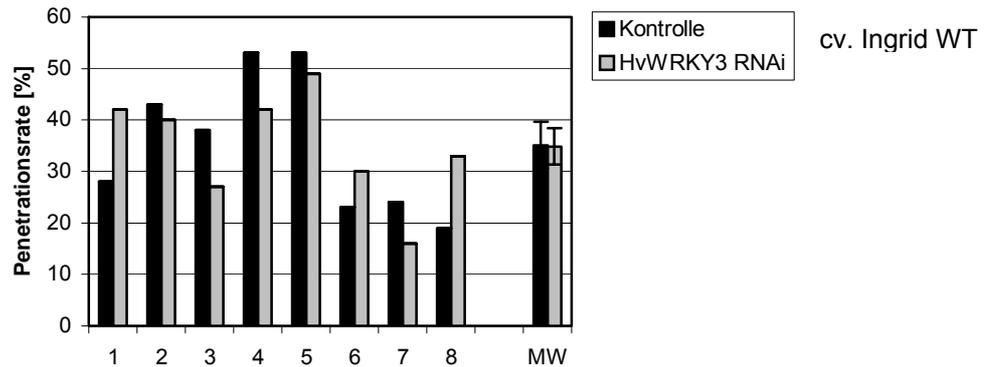


Abb. 3.31 RNAi Experimente mit dsRNA von *HvWRKY3* in Gerste (cv. Ingrid). Die Penetrationsrate wurde in acht unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors transformiert. 24 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die des *knock-downs* von *HvWRKY3*. Der Mittelwert (MW ± Standardfehler) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle 35,1 ± 4,5 %, im Testansatz 34,9 ± 3,5 %. Der *Student's t*-Test ergab mit $p = 0,95$ keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Versuchsansatz.

Spezifität von RNAi in einer großen Multigenfamilie

In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei WRKY-Transkriptionsfaktoren um eine große Multigenfamilie handelt, stellte sich die Frage, wie spezifisch der *knock-down* einzelner WRKY-Faktoren gelingt. Um diese Frage zu klären, wurden Plasmide konstruiert, die GFP:*HvWRKY1* und GFP:*HvWRKY2* Fusionsproteine unter der Kontrolle des CaMV-35S Promotors exprimieren (Kap. 2.16). Es wurde ein RNAi-Experiment zum möglichen *knock-down* des GFP:*HvWRKY1*-Fusionskonstruktes mittels dsRNA von *HvWRKY2* durchgeführt (Konstrukt: dsRNA *HvWRKY2* „kurz“, vergleiche Abb. 3.24). Als Kontrollexperiment diente ein *knock-down* mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors. Um die Funktionalität der dsRNA von *HvWRKY2* zu untersuchen, wurde parallel ein *knock-down*-Experiment mit dsRNA von *HvWRKY2* und GFP:*HvWRKY2* durchgeführt (Positivkontrolle). Als Marker für transformierte Zellen wurden die Zellen zusätzlich mit dem Gen für das rot fluoreszierende Protein DsRed transformiert. Am Mikroskop wurden etwa 100 DsRed-exprimierende Zellen pro Ansatz gezählt und untersucht, ob diese auch GFP exprimierten. Die Ergebnisse wurden auf die Anzahl der DsRed exprimierenden Zellen normiert. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (Abb. 3.32).

Die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen betrug - bezogen auf DsRed exprimierende - $54 \pm 2,7$ % im Testansatz und $56,8 \pm 3,9$ % in der Negativkontrolle. In der Positivkontrolle betrug die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nur $24,5 \pm 7,4$ %. Eine Varianzanalyse ergab eine Wahrscheinlichkeit von $p=0,078$, dass sich das Ergebnis in der Positivkontrolle von den beiden anderen Ergebnissen unterscheidet. Die Funktionalität beider *GFP:WRKY* Konstrukte wurde in Experimenten ohne den Einsatz von dsRNA überprüft (Kap.4.8), beide Fusionskonstrukte fluoreszierten subjektiv gleich stark unter dem Mikroskop. Mit diesem Experiment konnte nicht gezeigt werden, dass RNAi spezifisch zwischen zwei sehr ähnlichen Sequenzen unterscheiden kann, da das Ergebnis nicht signifikant war. Allerdings wurde *GFP:HvWRKY1* deutlich weniger von dsRNA von *HvWRKY2* beeinflusst als *GFP:HvWRKY2*. Außerdem war die Koexpressionsrate von DsRed und dem jeweiligen Fusionskonstrukt gering, zu erwarten wäre eine Koexpressionsrate von 70 bis 80 % gewesen.

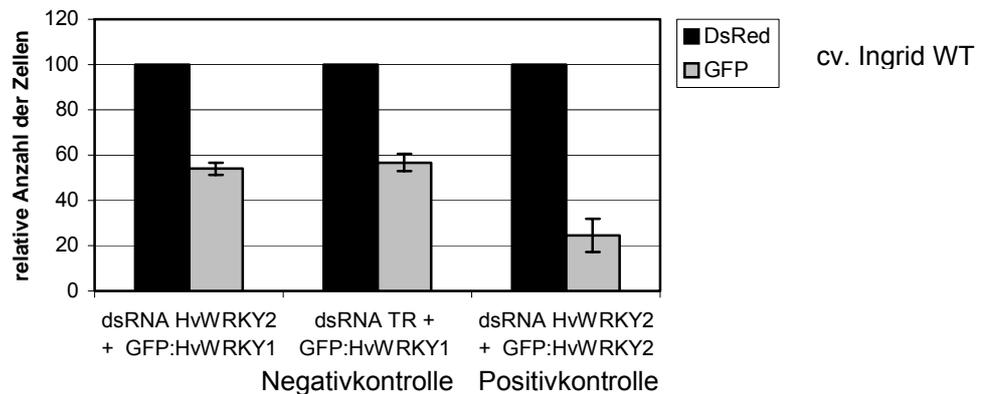


Abb. 3.32 Untersuchung zur Spezifität von RNAi bei WRKY-Transkriptionsfaktoren. Es wurde ein möglicher *knock-down* des *GFP:HvWRKY1* Fusionskonstruktes durch dsRNA von *HvWRKY2* untersucht. Als Kontrolle zu diesem Experiment wurde dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors (TR) verwendet und eine Positivkontrolle durchgeführt (dsRNA *HvWRKY1* + *GFP:HvWRKY1*). Zur Normierung der Zellzahl wurde DsRed verwendet. Es wurden jeweils etwa 100 DsRed Zellen gezählt und überprüft, ob diese auch GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Gemittelt aus drei Experimenten (\pm SE) betrug die Anzahl DsRed exprimierender Zellen, die auch GFP-Fluoreszenz aufwiesen $54 \pm 2,7$ % im Testansatz und $56,8 \pm 3,9$ % in der Kontrolle. Um die Funktionalität der dsRNA zu überprüfen, wurden Blätter parallel mit dsRNA von *HvWRKY2* zusammen mit *GFP:HvWRKY2* transformiert. Hier betrug die Anzahl der GFP-exprimierenden DsRed-Zellen nur $24,5 \pm 7,4$ %. Eine Varianzanalyse ergab, dass der *knock-down* von *GFP:HvWRKY2* mittels dsRNA von *HvWRKY2* mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,078$ verschieden von den beiden anderen Experimenten ist.

4.6.2 Überexpression und RNAi von weiteren *Bgh*-responsiven Genen

Isomerase

Neben den WRKY-Transkriptionsfaktoren wurden weitere *Bgh*-responsive Gene von Eckey (2002) und Jansen (2002) bezüglich ihres Einflusses auf die Interaktion Gerste-*Bgh* funktional untersucht. Eines der untersuchten Gene war ein Immunophilin der FKBP-Familie (*FK-506-binding protein*, Acc. Nr. AJ495769). Diese besitzen eine Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase Funktion, ihnen kommt also eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung zu. Außerdem haben sie einen Einfluss auf den Redox-Status von Zellen, besonders im Zusammenhang mit der Photosynthese (Romano *et al.*, 2005). Für einige Cyclosporine, die zweite Familie der Immunophiline, konnte gezeigt werden, dass sie nach Inokulation mit einem Pathogen induziert werden (Godoy *et al.*, 2000, Kong *et al.*, 2001).

Es wurden drei unabhängige RNAi Experimente in Kultivar Ingrid durchgeführt (Abb. 3.34 A), wobei die Blattsegmente der ersten beiden Versuche 4 h nach der Transformation, des dritten 24 h nach Transformation inokuliert wurden. Die in den beiden Überexpressionsversuchen verwendeten Blätter der Line Pallas wurden 24 h nach Transformation inokuliert.

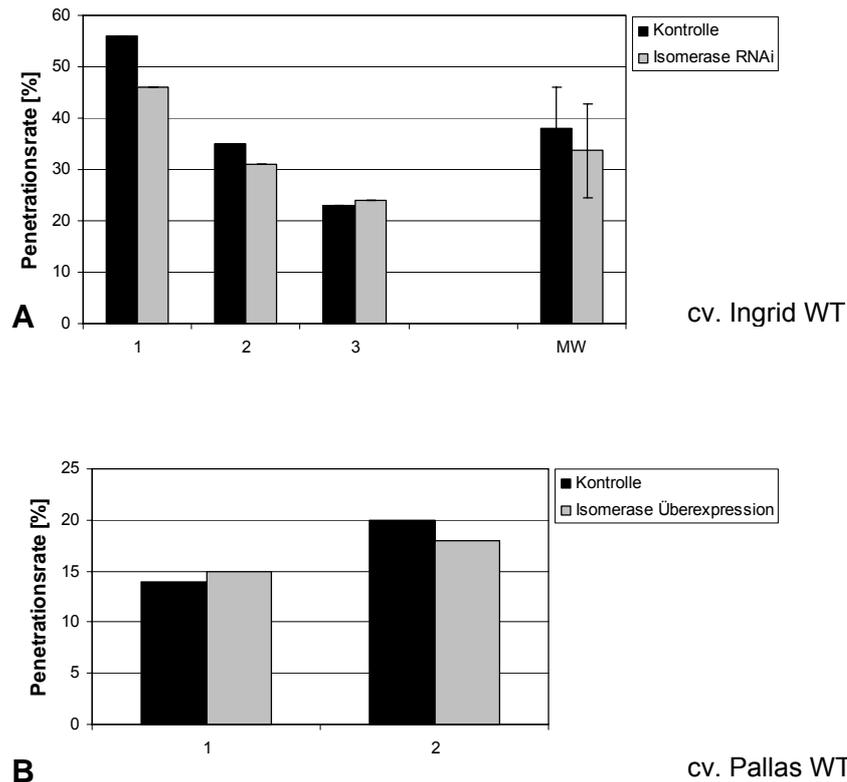


Abb. 3.33 RNAi (A, cv. Ingrid WT) und Überexpression (B, cv. Pallas) der *Isomerase* in Gerste. Die Penetrationsrate wurde in (A) drei bzw. (B) zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors (RNAi) bzw. mit dem leeren pGY-1 Vektor transformiert. 4 h (A Versuch 1 und 2) bzw. 24 h (Versuch 3) nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die des *knock-downs* bzw. der Überexpression der *Isomerase*. A: Der Mittelwert (MW ± Standardfehler) der Penetrationsrate 48 hpi beträgt in der Kontrolle $38,0 \pm 7,9$ %, im Testansatz $33,7 \pm 5,3$ %. Der *Student's t-Test* ergab keinen Unterschied ($p= 0,31$) zwischen Kontrolle und Versuchsansatz. Die beiden Überexpressionsversuche (B) ergaben 14 bzw. 20 % Penetration in der Kontrolle und 15 bzw. 18 % im Testansatz.

Für die drei RNA-Interferenz Experimente beträgt der Mittelwert (\pm SE) in der Kontrolle $38,0 \pm 7,9$ %, im Testansatz $33,7 \pm 5,3$ %. Der *Student's t-Test* ergab keinen signifikanten Unterschied mit $p= 0,31$ zwischen Kontrolle und Versuchsansatz. Die beiden Überexpressionsversuche ergaben eine Penetrationsrate von 14 bzw. 20 % in der Kontrolle und 15 bzw. 18 % im Testansatz. Weder RNAi noch Überexpression der *Isomerase* führte zu einem deutlichen Unterschied in der Penetrationsrate zwischen Kontrolle und Versuchsansatz, so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieses Gen als Einzelfaktor keine wichtige Rolle in der Interaktion Gerste – Mehлтаupilz spielt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieses Protein trotzdem für diese Interaktion von Bedeutung ist, seine Funktion aber durch andere Faktoren kompensiert werden kann. In diesem Fall sollte allerdings die Überexpression einen Effekt zeigen.

MAPKKK

Ein weiteres Gen, mit dem RNAi Versuche durchgeführt wurden, war eine *mitogen activated protein kinase kinase kinase* (MAPKKK, Acc. Nr. AJ495778) der Raf-Familie. Es wurden fünf Experimente in cv. Pallas (Abb. 3.35 A) und zwei weitere in Ingrid (Abb. 3.35 B) durchgeführt. RNAi der MAPKKK ergab einen signifikanten Unterschied in der Penetrationsrate zwischen Kontroll- und Versuchsansatz mit $p=0,009$, allerdings nur in cv. Pallas. In fünf unabhängigen Experimenten betrug die gemittelte Penetrationsrate (\pm SE) in der Kontrolle $32,6 \pm 3,1$ %, im Testansatz $41,8 \pm 2,2$ %. Die Ergebnisse der beiden Experimente in cv. Ingrid weisen jedoch auf einen entgegengesetzten Effekt hin. Die Penetrationsrate betrug 57 bzw. 46 % in der Kontrolle und 42 bzw. 44 % im Testansatz.

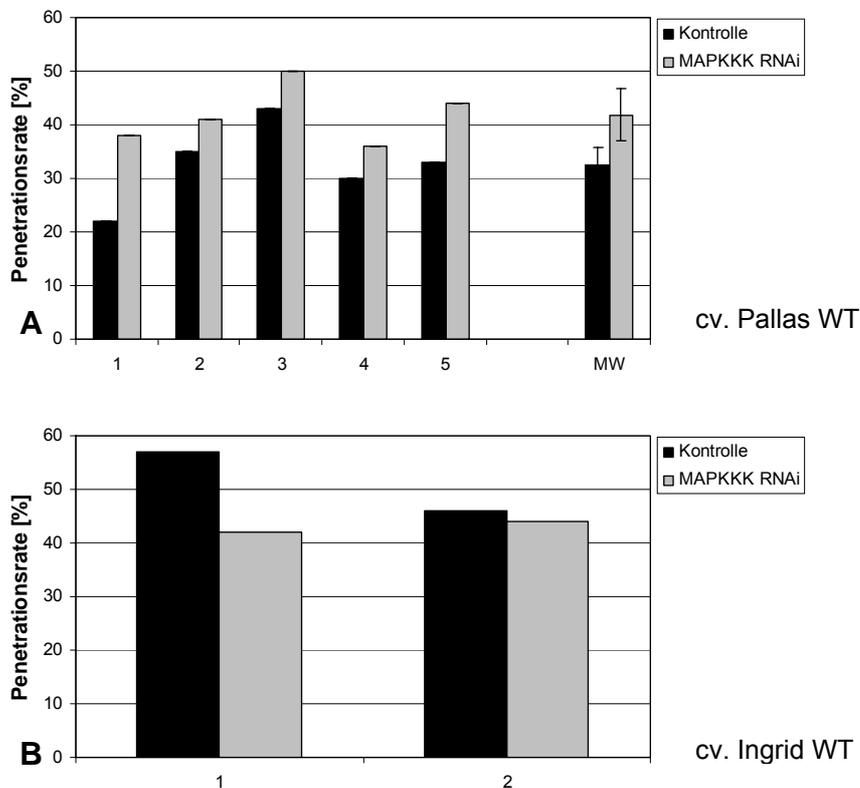


Abb. 3.34 RNAi der *MAPKKK* in Gerste in cv. Pallas (A) und cv. Ingrid (B). Die Penetrationsrate wurde in fünf bzw. zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors (RNAi) transformiert. 4 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die des *knock-downs*. Die mittlere Penetrationsrate in cv. Pallas (MW \pm SE) 48 hpi beträgt in der Kontrolle $32,6 \pm 3,1$ %, im Testansatz $41,8 \pm 2,2$ %. Der *Student's t-Test* ergab einen signifikanten Unterschied mit $p=0,009$ zwischen Kontrolle und Versuchsansatz. Die beiden RNAi-Versuche in cv. Ingrid ergaben 57 bzw. 46 % Penetration in der Kontrolle und 42 bzw. 44 % im Testansatz.

Scarecrow-like Protein

Als weiterer Transkriptionsfaktor wurde das *scarecrow-like* Protein (Acc. Nr. BF619080) mittels RNAi getestet (Abb. 3.36). Dieses Gen gehört zur Familie der GRAS-Transkriptionsfaktoren mit 57 Mitgliedern in Reis (Tian *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass *scarecrow* in *Arabidopsis* die Zellteilungen im Wurzel- und Sproßmeristem steuert (Di Lorenzo *et al.*, 1996, Helariutta *et al.*, 2000).

Erfolgte die Inokulation mit *Bgh* in cv. Pallas 4 h nach Transformation, so schwankten die Penetrationsraten stark zwischen 21 bis 72 % in der Kontrolle und 27 bis 60 % im Testansatz sowohl Richtung Resistenz als auch Richtung Anfälligkeit. Die Mittelwerte (\pm SE) lagen bei $46,3 \pm 9$ % und $44,8 \pm 5,9$ %. 24 h nach Beschuss betragen die Penetrationsraten in cv. Pallas 21 und 48 % in der Kontrolle und 15 bzw. 45 % im Versuchsansatz. Die mit dem Testgen beschossenen Blätter waren etwas resistenter als die Kontrollblätter. In cv. Ingrid hingegen war der Effekt umgekehrt, die Penetrationsrate in der Kontrolle lag bei 34 bzw. 27 %, die Blätter des Testansatzes waren anfälliger mit 50 sowie 39 %.

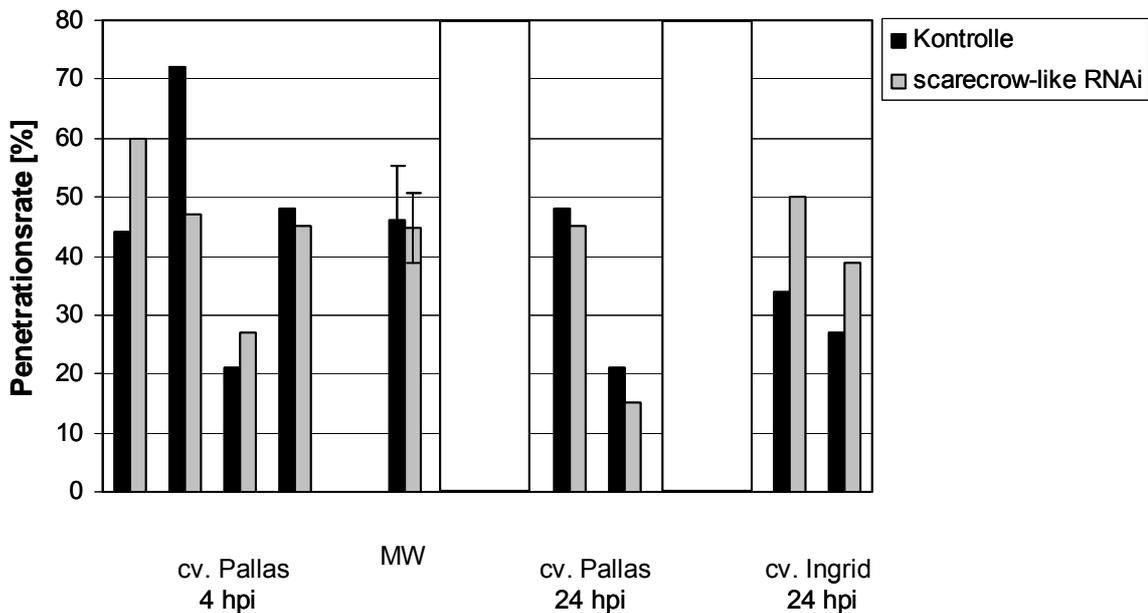


Abb. 3.35 RNAi des *scarecrow-like* Proteins in Gerste cv. Pallas und cv. Ingrid. Die Penetrationsrate wurde in vier bzw. je zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors (RNAi) transformiert und 4 h bzw. 24 h nach der Transformation mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die des *knock-downs*. Nach 4 h schwanken die Werte der Penetrationsrate zwischen 21 bis 72 % in der Kontrolle und 27 bis 60 % im Testansatz. 24 h nach Beschuss betragen die Werte in cv. Pallas 48 und 21 % in der Kontrolle, 45 und 15 % im Versuchsansatz, in cv. Ingrid 34 und 27 % bzw. 50 und 39 %.

Receptor-like Proteinkinase (RLK)

RNA-Interferenz Experimente mit einer *receptor-like* Proteinkinase (RLK, Acc. Nr. AJ427599) wurde in cv. Ingrid und Pallas durchgeführt (Abb. 3.37). Die Inokulation mit *BghA6* erfolgte in cv. Ingrid 24 h und in cv. Pallas 4 h nach der Transformation. Es wurden jeweils fünf unabhängige Experimente durchgeführt. RNAi in cv. Ingrid führte im Mittel zu einer Penetrationsrate von $36 \pm 3,9$ % in der Kontrolle und $27,8 \pm 4,2$ % im Testansatz (Abb. 3.37 A). Im cv. Pallas betrug die mittlere Penetrationsrate $37,4 \pm 4,6$ % (Kontrolle) und $38,6 \pm 3,1$ % (Abb. 3.37 B). Die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied zwischen Kontrolle und Versuchsansatz lag bei $p= 0,02$ für cv. Ingrid und $p= 0,87$ für cv. Pallas. Generell kann man sagen, dass ein *knock-down* der RLK in cv. Ingrid tendenziell in allen fünf Versuchen zu einer niedrigeren Penetrationsrate und damit erhöhter Resistenz führt. Durch die hohe Variabilität der Ergebnisse cv. Pallas, welche 4 h nach Transformation inokuliert wurde, ließen sich dort keine eindeutigen Effekte feststellen. Um genügend Zeit für die Normalisierung des Blattstoffwechsels nach der Verwundung durch die Transformation und die Etablierung des RNAi-Mechanismus' zur Verfügung zu stellen, was für den Erhalt stabiler Ergebnisse wichtig ist, erwies es sich als nötig, erst 24 h nach der Transformation zu inokulieren.

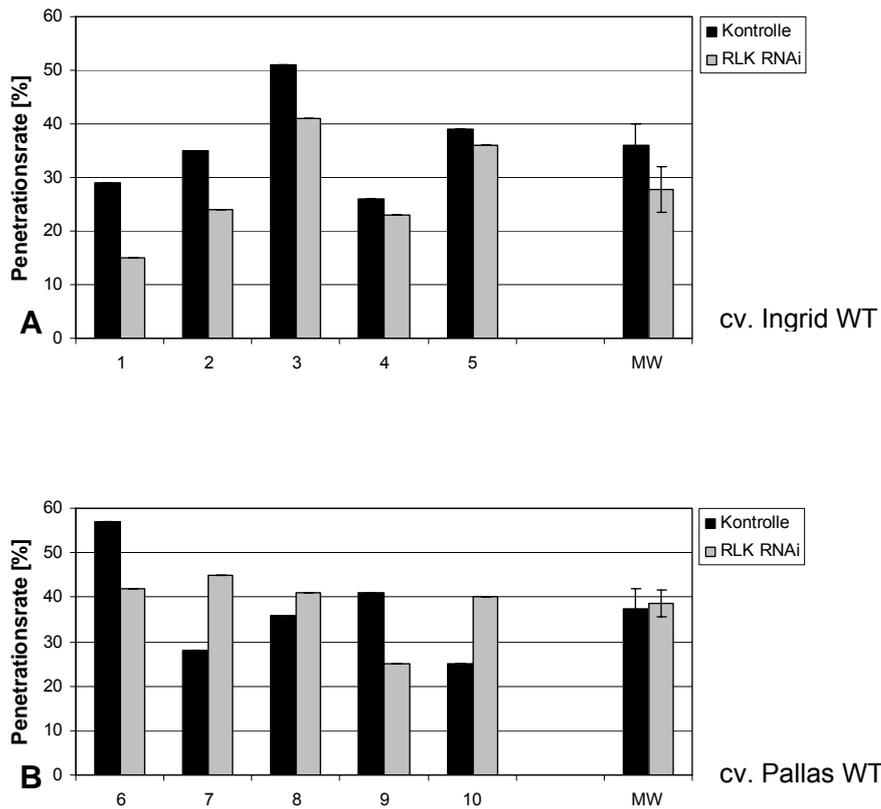


Abb. 3.36 RNAi der *receptor-like* Proteinkinase (RLK) in Gerste cv Ingrid (A) und cv. Pallas (B). Die Penetrationsrate wurde in jeweils fünf unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors (RNAi) transformiert. 24 h (A) bzw. 4 h (B) nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die des *knock-down*. In cv. Ingrid (24 h nach der Transformation inokuliert) beträgt die mittlere Penetrationsrate in der Kontrolle (\pm SE) $36 \pm 3,9$ %, im Testansatz $27,8 \pm 4,2$ %. In cv. Pallas (4 h nach Beschuss inokuliert) $37,4 \pm 4,6$ % und $38,6 \pm 3,1$ %. Der *Student's t-Test* ergibt für die Versuche in Ingrid eine Wahrscheinlichkeit von $p = 0,02$ und für die in Pallas von $p = 0,87$ dafür, dass Kontrolle und Testansatz verschieden sind.

ABA- and stress inducible Protein

Ferner wurden noch zwei *knock-down*-Experimente mit einem *ABA- and stress inducible* Protein (Eckey, 2002) in cv. Pallas durchgeführt. Die Inokulation erfolgte 4 h nach Transformation. Die Penetrationsraten in der Kontrolle betragen 44 und 66 % und im Testansatz 42 und 55 %. Es konnte in diesen beiden Experimenten kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Versuchsansatz festgestellt werden. Um das Ergebnis statistisch abzusichern, müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

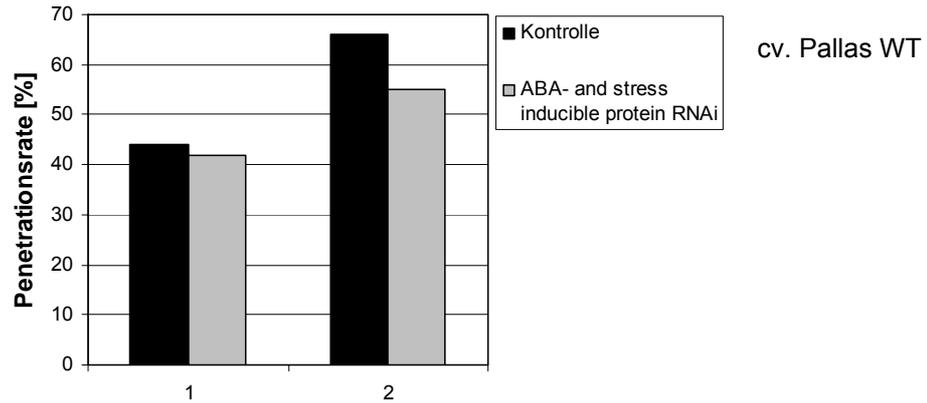


Abb. 3.37 RNAi Experiment mit dsRNA eines *ABA- and stress inducible protein* in Gerste cv. Pallas. Die Penetrationsrate wurde in zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollblätter wurden mit dsRNA eines humanen Thyroidrezeptors transformiert. 4 h nach der Transformation wurde mit *BghA6* inokuliert. Schwarze Balken zeigen die durchschnittliche Penetrationsrate der Kontrollversuche in %, graue die des *knock-outs* von *HvWRKY*. Die Penetrationsraten in der Kontrolle betragen 44 und 66 % und im Testansatz 42 und 55 %.

4.7 Charakterisierung von transgenen *HvWRKY1 RNAi* Gerstenpflanzen

Um die Ergebnisse der transienten Transformation zu verifizieren, wurden stabil transgene Gerstenpflanzen am IPK Gatersleben erzeugt, die mit dem in Kapitel 2.17 beschriebenen *HvWRKY1*-RNAi Konstrukt transformiert wurden. Insgesamt wurden am IPK Gatersleben 55 transgene Gerstenlinien (cv. Golden Promise) und fünf Weizenlinien (cv. Bobwhite) hergestellt (Tab. 7.2 und 7.3). Diese Pflanzen wurden auf Anwesenheit der Selektionsmarker Hygromycin oder der Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) überprüft, 52 der Gerstenlinien auch auf das RNAi-Konstrukt. Die Linien lagen als T₀-Pflanzen oder als T₁-Samen vor (Tab. 7.2 und 7.3).

RT-PCR

Es sollte untersucht werden, inwieweit die *HvWRKY1*-RNAi Pflanzen ein verändertes Resistenzverhalten gegenüber *BghA6* besaßen und ob die Ergebnisse der transienten Transformation bestätigt werden konnten. Es war zu erwarten, dass das Transgen nicht an alle Nachkommen der transgenen Pflanzen weitergegeben wurde, bzw. dass es nicht in allen Pflanzen aktiv sein würde. Daher wurde zuerst überprüft, ob mittels RT-PCR (*One-Step*) eine verminderte Expression des

HvWRKY1-Gens im Vergleich zu gleich alten Wildtyp Pflanzen des cv. Golden Promise zu beobachten war.

Die Sekundärblätter von vier *HvWRKY1*-RNAi Linien und zugehörigen Wildtyppflanzen wurden abgeschnitten und mit *BghA6* inokuliert. 4 hpi wurden die Blätter eingefroren und RNA daraus isoliert. Die Pflanzen gehörten der T₂-Generation an.

Die Abbildung 3.39 zeigt, dass die Expression zwar innerhalb einer Linie leichte Unterschiede aufweist, diese aber kaum geringer ausfällt als in den Wildtyppflanzen, in einigen Fällen sogar höher. Nur für die Pflanze Nr. 4 der Linie B17/2-9 zeigte sich im Vergleich zu den anderen transgenen Linien eine deutlich schwächere Expression. Diese ist jedoch lediglich auf dem Niveau der Wildtyppflanzen und konnte in einer Wiederholung (Abb. 3.39 C) nicht bestätigt werden.

ERGEBNISSE

115

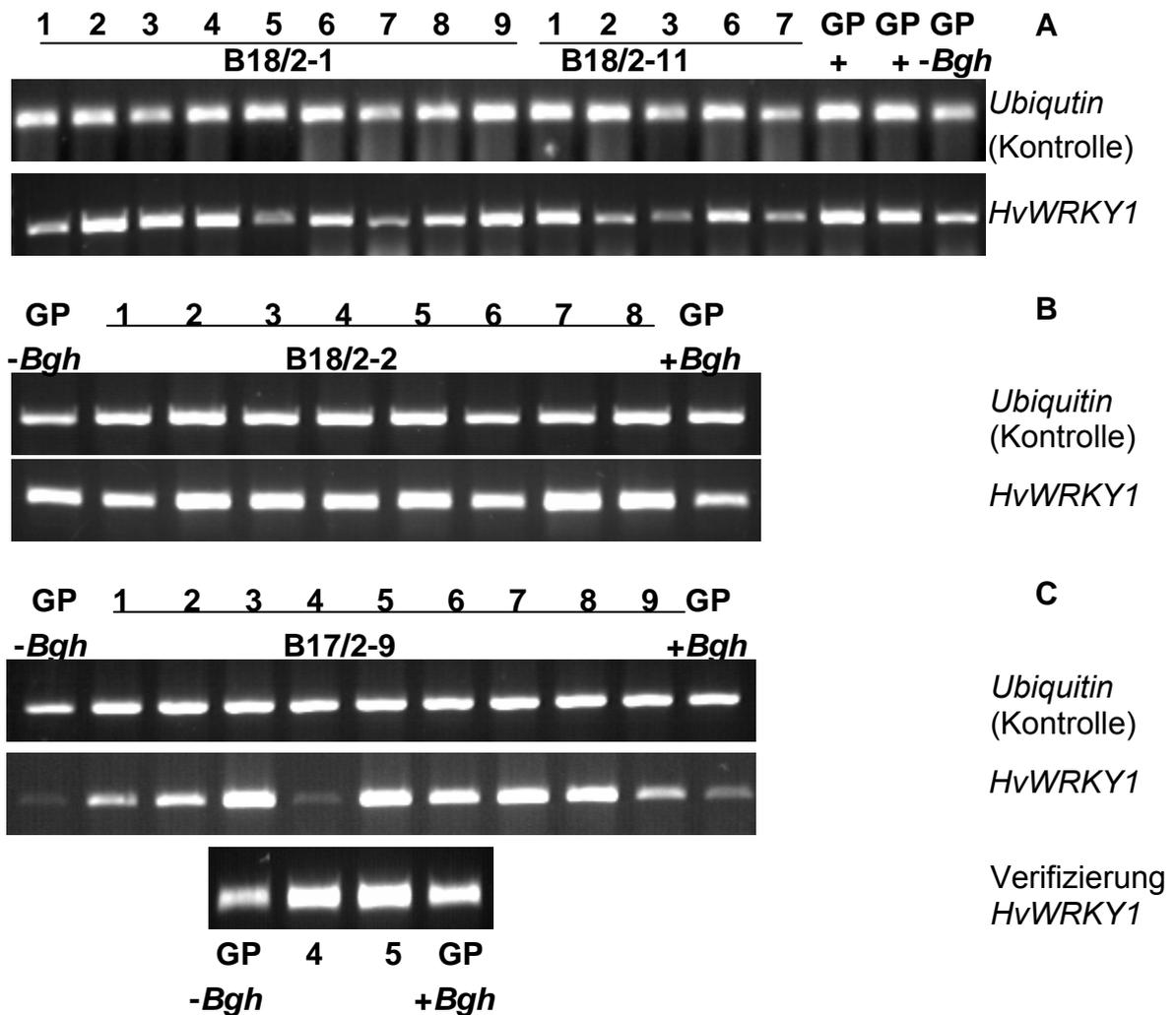


Abb. 3.38 Expressionsanalyse von *HvWRKY1* in transgenen Gerstenpflanzen (*HvWRKY1*-RNAi, cv. Golden Promise, GP). Gesamt-RNA wurde 4 hpi nach Inokulation mit *BghA6* aus Sekundärblättern der Linien B18/2-1 und B18/2-11 (A), B18/2-2 (B) und B17/2-9 (C) isoliert und mittels semiquantitativer RT-PCR getestet. Die nicht inokulierte Kontrolle (GP -*Bgh*) wurde Scheininokuliert (*mock*-Behandlung), als weitere Kontrollen dienten inokulierte Wildtyp-Pflanzen (GP + *Bgh*). Die Nummern geben die einzelnen T₂-Pflanzen an. Als Kontrolle für gleiche Ausgangsmengen cDNA diente eine RT-PCR mit Primern für Ubiquitin.

Resistenz gegen *Bgh*

Für die Linien B18/2-2 und B17/2-9 wurde auch überprüft, ob sie ein verändertes Resistenzverhalten gegenüber *BghA6* aufwiesen (Abb. 3.40). Dazu wurden von neun Pflanzen der T₂-Generation einer Linie je ein etwa eine Woche altes Primärblatt abgeschnitten, zur Regeneration 1,5 h lang auf Phytagar inkubiert, um Wundungseffekte zu minimieren und danach inokuliert. 48 hpi wurden die Blätter entfärbt und dann für jedes Blatt die Penetrationsrate ermittelt. Es wurden 200 Interaktionen aus verschiedenen Blattbereichen ausgewertet. Es handelte sich hier um dieselben Pflanzen, die bereits für die Expressionsanalyse (Abb. 3.39 B und C)

eingesetzt wurden. Erstaunlicherweise waren die Unterschiede innerhalb der Kontrollpflanzen cv. Golden Promise (Wildtyp) deutlich größer als zwischen den einzelnen transgenen Linien. Die Pflanzen 3, 4 und 5 der Linie B18/2-2 und 5 und 6 der Linie B17/2-9 zeigen die geringsten Penetrationsraten, die unter 20 bzw. 25 % liegen, im Unterschied zu 33 - 34 % für die Pflanzen beider RNAi-Linien (1 und 2 bzw. 3 und 9) mit der höchsten Penetrationsrate.

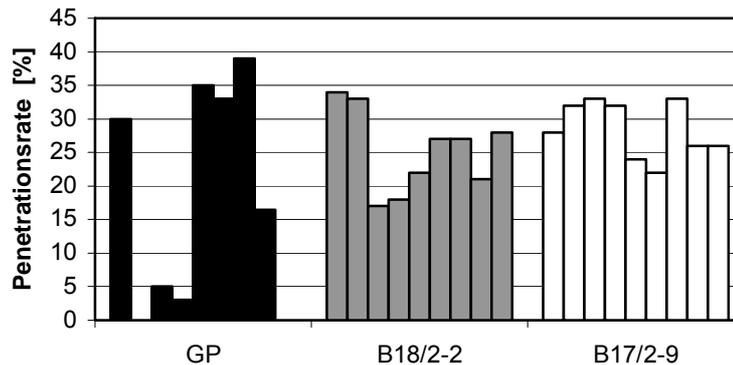


Abb. 3.39 Untersuchung der Penetrationsraten [%] von Primärblättern von neun Pflanzen der Linie B18/2-2 und neun Pflanzen der Linie B17/2-9. Die Inokulation erfolgte 1,5 h nach Abschneiden der Blätter, diese wurden 48 hpi entfärbt und dann mikroskopiert. Die Färbung des Pilzes erfolgte mit essigsaurer Tinte. Pro Blatt wurden 200 Interaktionen aus verschiedenen Blattbereichen ausgewertet. Als Kontrollpflanzen dienten gleich alte Blätter nicht transformierter Golden Promise Wildtyppflanzen.

Southern Blot

Man kann ohne einen DNase Verdau, der u. U. die RNA-Qualität beeinträchtigt, nur schwer zwischen endogenem, genomischen und transgenem *HvWRKY1* unterscheiden. Außerdem erhält man keine Auskunft über die Anzahl der integrierten Kopien des Gens. Deshalb wurden Southern Blot-Experimente zum Nachweis der Integration der T-DNA durchgeführt. Dazu wurden die Pflanzen 1 bis 9 der Linie B17/2-13a vereinigt und die genomische DNA in einem Ansatz mit dem Restriktionsenzym KpnI und einem weiteren mit PvuII verdaut. Als Wildtypkontrolle diente DNA von *Golden Promise* (ebenfalls mit PvuII und KpnI behandelt) und als Positivkontrolle KpnI-verdaute DNA aus Kallusmaterial, das mit GFP transformiert war und den CaMV-35S-Promotor enthielt (Jafar Imani, IPAZ Gießen), sowie 100 pg des leeren Transformationsvektors pLH6000, verdaut mit XbaI. Es wurden jeweils 10 µg DNA geschnitten und aufgetragen. Eine radioaktiv markierte Sonde für den CaMV-35S-Promotor wurde verwendet, der in dem *HvWRKY1*-RNAi Konstrukt und

dem leeren pLH6000 Vektor als Promotor des Hygromycin-Markergens diente. Die Expositionsdauer betrug 66 h.

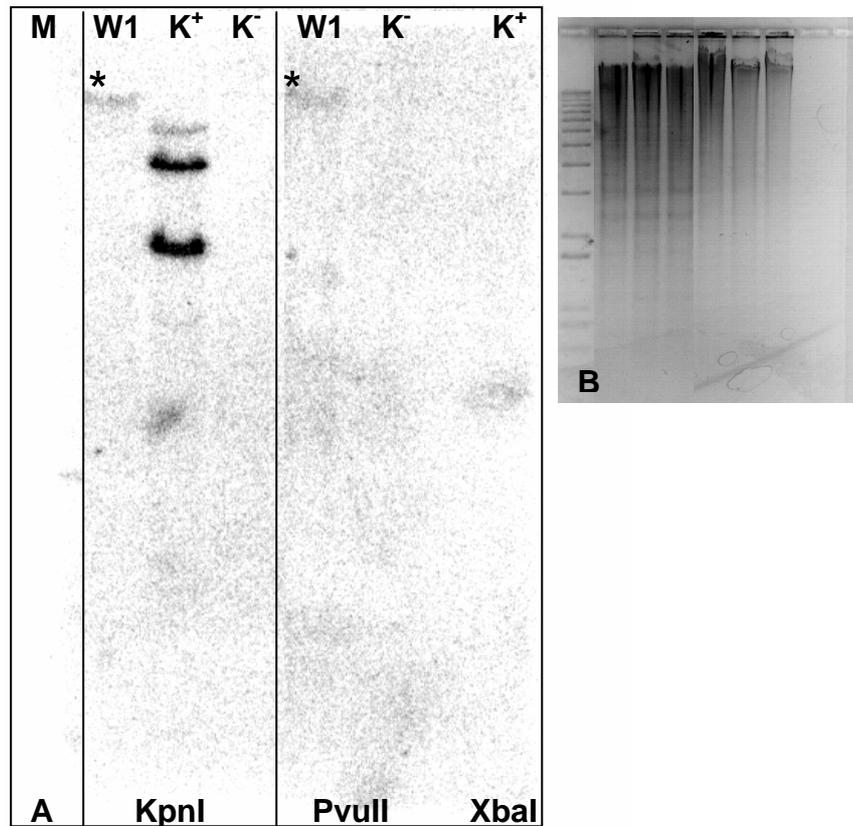


Abb. 3.40 **A** Southern Blot der Pflanzen 1 bis 9 (vereinigt) der *HvWRKY1*-RNAi Linie B17/2-13a (W1). 10 µg genomische DNA wurden entweder mit dem Restriktionsenzym KpnI oder mit PvuII geschnitten und aufgetragen. Als Positivkontrolle (K⁺) diente DNA aus mit GFP transformiertem Kallusmaterial, das den CaMV-35S-Promotor enthielt (geschnitten mit KpnI) sowie 100 pg des mit XbaI geschnittenen Transformationsvektors pLH6000. Als Negativkontrolle (K⁻) wurde DNA der Kontrollpflanzen Golden Promise Wildtyp eingesetzt. Es wurde eine radioaktiv markierte Sonde für den CaMV-35S-Promotor, der in pLH6000 die Expression des Hygromycin-Selektionsmarkers reguliert, verwendet. Die Expositionsdauer betrug 66 Stunden. M= DNA Größenmarker, *= Bande in Linie B17/2-13a (W1) **B** Ethidiumbromid-Färbung der verdauten genomischen DNA nach gelelektrophoretischer Trennung (invertiert).

Wie Abb. 3.40 zeigt, konnte mit der 35S-Sonde ein schwaches Signal (markiert mit *) in der Linie B17/2-13a (W1) nachgewiesen werden, welches in der Negativkontrolle (Wildtyp GP) nicht vorhanden ist. Im Unterschied dazu sind die drei Banden der Positivkontrolle des transformierten Kallus sehr stark. 100 pg des leeren pLH6000 Vektors (K⁺) hingegen ergaben auch nur ein schwaches Signal. Die Tatsache, dass nur eine Bande der Linie B17/2-13 zu erkennen ist, lässt auf eine einzelne Integration des RNAi-Konstruktes im Genom schließen.

Allerdings lässt sich durch das Vereinen der DNA keine Aussage darüber machen, wie viele der neun Pflanzen das Transformationskonstrukt enthalten. Daher wurde der Versuch wiederholt und die Pflanzen 1-9 der Linie B17/2-13a einzeln untersucht (Abb. 3.41). Zusätzlich wurden die Pflanzen 1 bis 9 der Linie B18/2-1 und 1 bis 5 von B18/2-11 jeweils vereint und aufgetragen. Es wurden diesmal die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII verwendet. Als Negativkontrolle diente wieder DNA von Golden Promise Wildtyp Pflanzen, als Positivkontrolle 1 ng von pLH6000, mit XbaI geschnitten. Es wurde eine Sonde für den CaMV-35S-Promotor verwendet. Die Expositionsdauer betrug drei Tage.

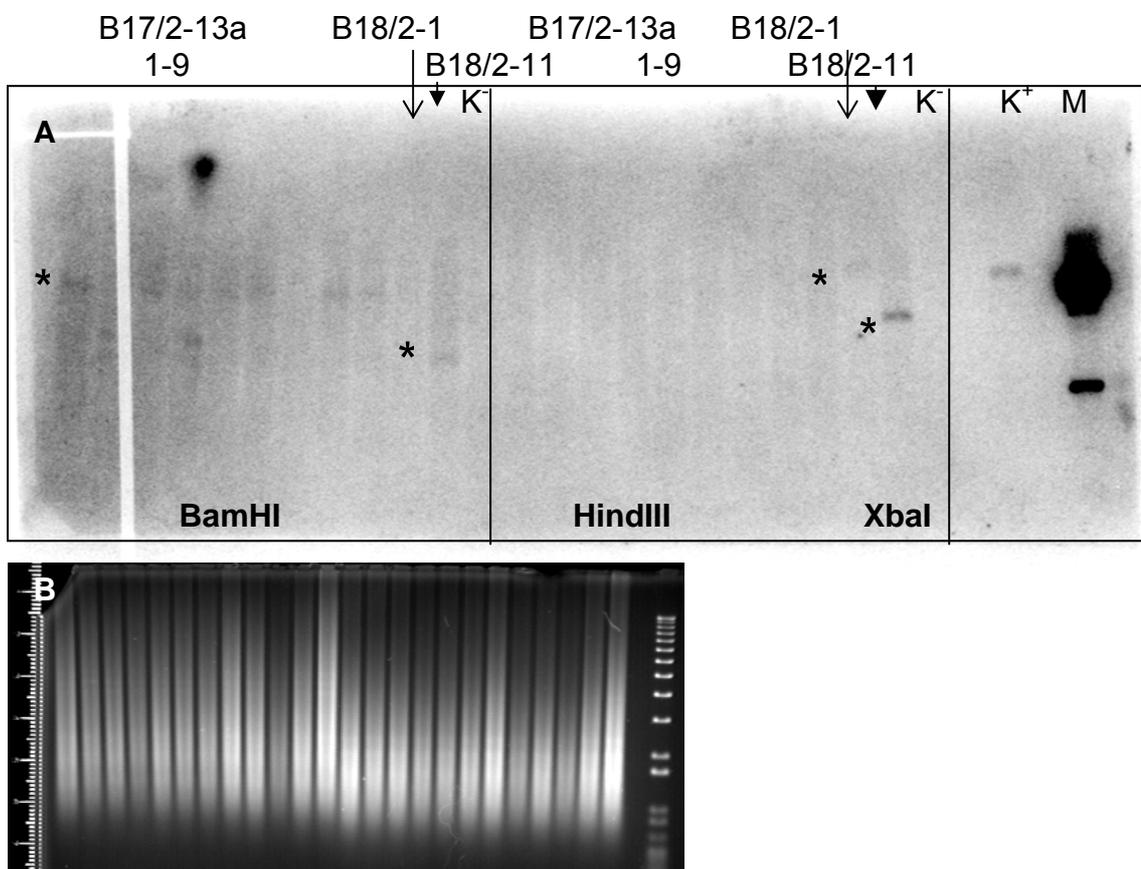


Abb. 3.41 **A** Southern Blot der einzelnen Pflanzen 1 bis 9 der *HvWRKY1*-RNAi Linie B17/2-13a und der Pflanzen 1 bis 9 (vereint) von B18/2-1 und 1 bis 5 (vereint) von B18/2-11. 10 µg genomische DNA wurden entweder mit dem Restriktionsenzym BamHI oder mit HindIII geschnitten und aufgetragen. Als Positivkontrolle (K⁺) diente 1 ng des mit XbaI geschnittenen Transformationsvektors pLH6000. Als Negativkontrolle (K⁻) wurde DNA der Kontrollpflanzen Golden Promise Wildtyp verwendet. Es wurde eine radioaktiv markierte Sonde für den CaMV-35S-Promotor, der in pLH6000 die Expression des Hygromycin-Selektionsmarkers reguliert, verwendet. Die Expositionsdauer betrug drei Tage. M= DNA Größenmarker, *= Bande. **B** Abbildung des DNA-Gels vor dem *blotting*.

Abb. 3.42 zeigt eine einzelne schwache Bande (*) in den Pflanzen 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9 der Linie B17/13a. Eine stärkere Bande war in der vereinigten DNA der Pflanzen 1 bis 5 der Linie B18/2-11 und in der Positivkontrolle zu erkennen. Einige Pflanzen der Linie B18/2-11 zeigten auch in der RT-PCR reduzierte Expression von *HvWRKY1* (Abb. 3.39), was auf einen durch das Transgen ausgelösten *knock-down* von *HvWRKY1* hindeutet. Die DNA der Linie B18/2-1 ergab kein Signal mit der Sonde gegen den CaMV-35S-Promotor, wenn mit BamHI geschnitten wurde, und nur ein sehr schwaches im HindIII-Verdau.

Phänotyp

Wie Abbildung 3.43 zeigt, unterscheiden sich die Pflanzen verschiedener transgener Linien in ihrem Wuchsverhalten. Allen vermehrten transgenen Linien war gemein, dass sie langsamer wuchsen und später Ähren schoben als die nicht-transgenen Wildtyppflanzen. Wie die Abbildung zeigt, war das Wachstum der Linie B18/2-11, die im Southern Blot ein Signal ergeben hatte, sehr gering. Diese Linie entwickelte keine Ähren und konnte deshalb nicht vermehrt werden.

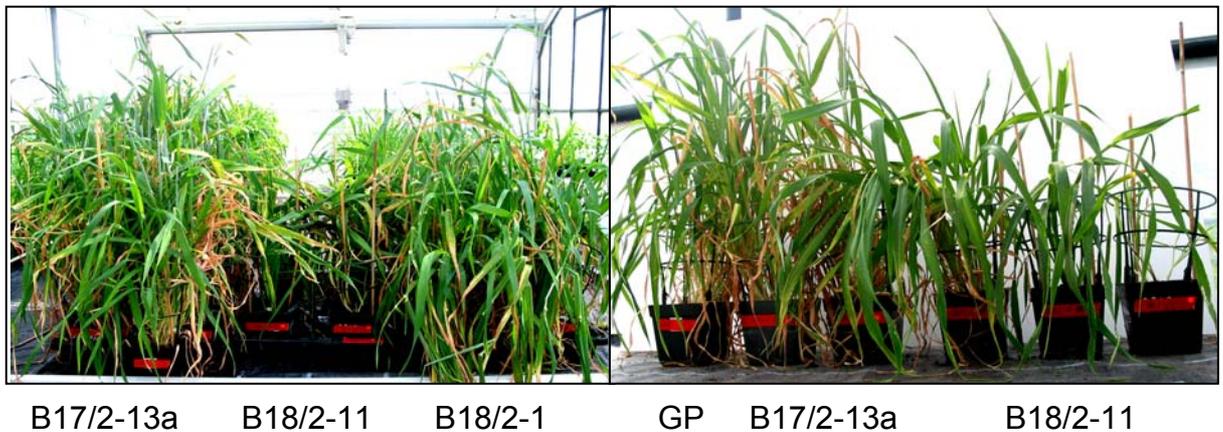


Abb. 3.42 Wachstum von transgenen Pflanzen der Linien B17/2-13a, B18/2-11 und B18/2-1 (links) sowie von einer nicht-transgenen Golden Promise Pflanze (GP) im Vergleich zu zwei Pflanzen der Linie B17/2-13a und drei von B18/2-11 unter Gewächshausbedingungen (rechts).

4.8 Subzelluläre Lokalisation von HvWRKY1 und 2

WRKY-Transkriptionsfaktoren wurden mehrfach in Zellkernen nachgewiesen (Eulgem *et al.*, 1999, Hara *et al.*, 2000, Kirsch *et al.*, 2000, Robatzek und Somssich, 2001, Cormack *et al.*, 2002, Yoda *et al.*, 2002, Marè *et al.*, 2004 und Xu *et al.*, 2004). Um vorherzusagen, wie wahrscheinlich eine Lokalisation im Zellkern für HvWRKY1 und 2 ist, wurde das Programm PSORT benutzt (Tab.3.4)

Tab. 3.4 Wahrscheinlichkeiten der Lokalisation von HvWRKY1 und 2 in verschiedenen subzellulären Kompartimenten. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm PSORT.

Kompartiment	HvWRKY1	HvWRKY2
mitochondriale Matrix	0,1	0,0
Nukleus	0,3	0,0
Endoplasmatisches Retikulum (Lumen)	0,0	0,1
Endoplasmatisches Retikulum (Membran)	0,0	0,1
Außerhalb der Zelle	0,0	0,37
Golgi-Apparat	0,0	0,1

Nur für HvWRKY1 wurde als höchste Wahrscheinlichkeit eine Lokalisation im Zellkern vorhergesagt. Um dieses Ergebnis experimentell zu überprüfen, wurde das Reporter-gen GFP N-terminal *in frame* vor den ORF von *HvWRKY1* und 2 in einen Pflanzen-Expressionsvektor kloniert (Kap. 7.2). Die subzelluläre Lokalisation dieses Konstruktes wurde mittels transienter Überexpression in Gerstenepidermiszellen ermittelt. Als Marker für das Zytosol und den Kern der Epidermiszellen diente das rot fluoreszierende Protein DsRed. Die Auswertung erfolgte drei Tage nach der Transformation. In Kontrollen, die mit *CaMV-35S:GFP* transformiert wurden, war die grüne GFP-Fluoreszenz über die ganze Zelle verteilt. Das *GFP:HvWRKY1*- bzw. *GFP:HvWRKY2*-Konstrukt war hingegen deutlich im Zellkern lokalisiert (Abb. 3.44). Es wurden keine Zellen mit einer davon abweichenden Lokalisation gefunden. Eine Inokulation mit *BghA6* 24 h nach der Transformation hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins.

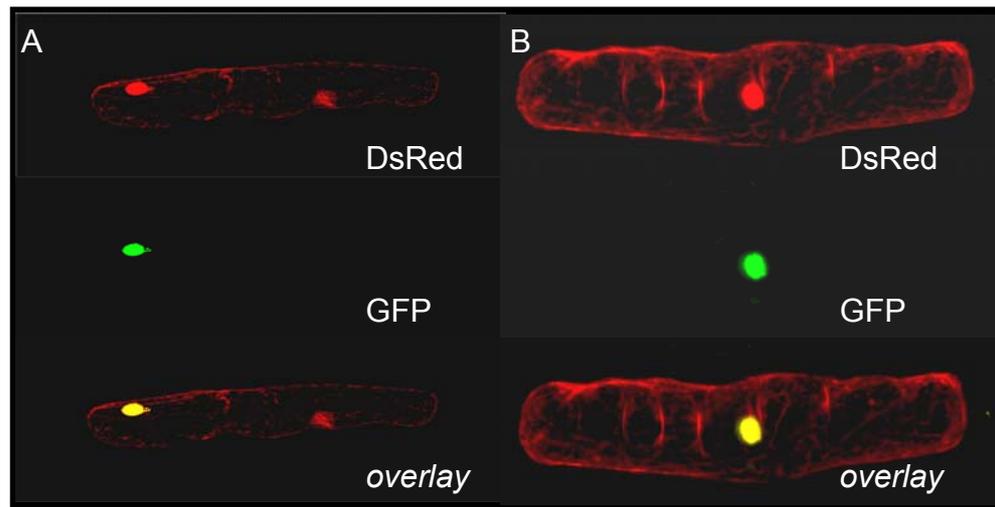


Abb. 3.43 Subzelluläre Lokalisation von HvWRKY1 (A) und HvWRKY2 (B) in Epidermiszellen der Gerste. Sieben Tage alte Primärblätter wurden transient mit *GFP:HvWRKY* Fusionskonstrukten und DsRed als Marker für Zytosol und Zellkern transformiert und drei Tage später mikroskopiert. Das obere Bild zeigt die Verteilung von DsRed im Zytosol und Kern, das Mittlere die Lokalisation des GFP-Fusionsproteins als grüne Fluoreszenz im Zellkern. In der unteren Abbildung sind beide Bilder übereinander gelegt.

Bei Experimenten mit Fusionsproteinen kann das fusionierte Markerprotein allerdings durch Veränderung der Größe und Konformation des zu untersuchenden Proteins die Lokalisation beeinflussen. Deshalb wurde die Funktionalität des Fusionsproteins mit Hilfe von transienter Überexpression in Gerstenpflanzen cv. Ingrid überprüft. Wie in Kap. 4.6 gezeigt, führt die Überexpression von *HvWRKY1* bzw. 2 zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *BghA6*. Es wurde daher überprüft, ob die Überexpression des *GFP:WRKY* Fusionsproteins auch eine erhöhte Anfälligkeit verursacht (Abb. 3.45).

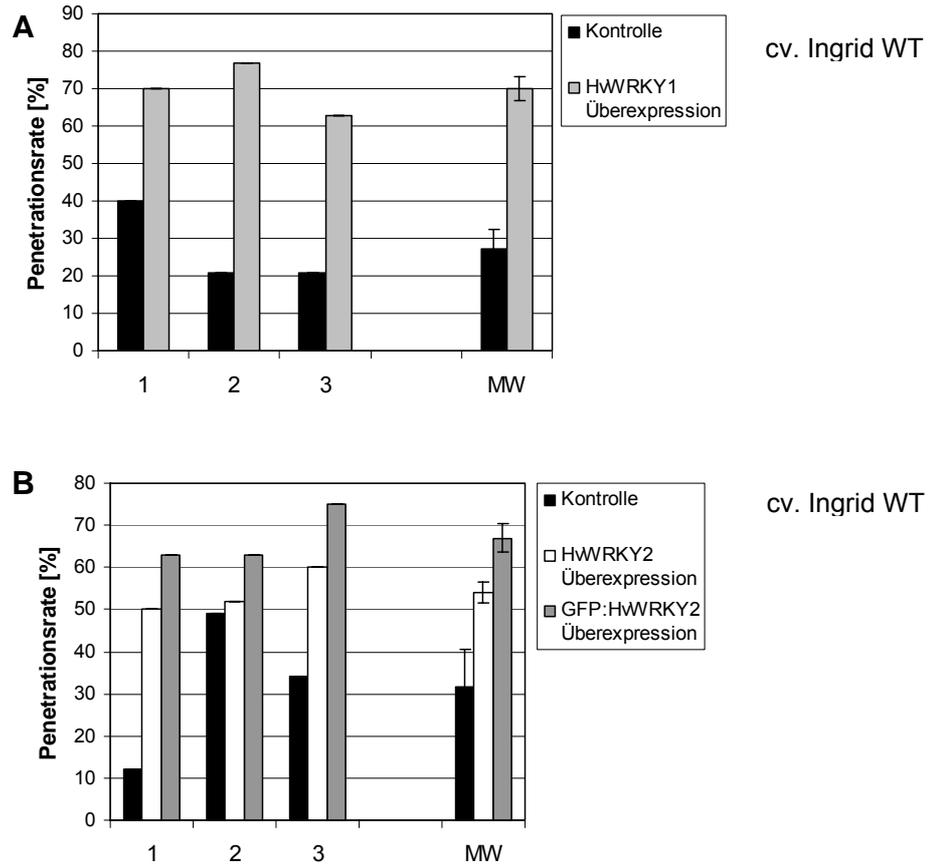


Abb. 3.44 Überprüfung der Funktionalität des *GFP:HvWRKY1* (A) und *GFP:HvWRKY2* (B) Fusionsproteins durch Überexpression in Gestenepidermiszellen cv. Ingrid. Die y-Achse zeigt die Penetrationsrate in %, die x-Achse die Nummer des Experimentes und den Mittelwert (MW) aus jeweils drei Versuchen. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. In B wurden die Überexpressionsversuche von *HvWRKY2* und *GFP:HvWRKY2* parallel durchgeführt. Als Kontrolle diente der leere pGY-1 Vektor.

Für beide WRKY-Faktoren führte eine Überexpression des Fusionsproteins in allen durchgeführten Experimenten zu einer erhöhten Penetrationsrate gegenüber der Kontrolle (leerer Vektor) und damit zu erhöhter Anfälligkeit. Der Effekt war sogar noch größer als der in den Überexpressionsexperimenten ohne Fusionsprotein. Diese wurden parallel als zusätzliche Kontrolle durchgeführt. Während in den sieben Versuchen zur Überexpression von *HvWRKY1* die Penetrationsrate im Mittel (\pm SE) von $48,9 \pm 2,7$ % (Kontrolle) auf $64 \pm 2,8$ % anstieg (Abb. 3.23), wurde für das Fusionsprotein ein Anstieg von $27,3 \pm 5,2$ % (Kontrolle) auf $70 \pm 3,3$ % beobachtet. Die Überexpression von *HvWRKY2* führte in fünf Versuchen zu einem gemittelten Anstieg der Penetration von $31,4 \pm 4,5$ % (Kontrolle) auf $55,6 \pm 5,7$ % (Abb. 3.25). In den drei parallel zur Überexpression des Fusionsproteins erfolgten Experimenten stieg die Penetrationsrate auf $54 \pm 2,5$ % gegenüber $31,7 \pm 8,8$ % in

der Kontrolle, während die Überexpression von *GFP:HvWRKY2* zu einer auf $67 \pm 3,3$ % erhöhten Penetration führte (siehe Abb. 3.45). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Fusionsproteine funktional sind und die beobachtete Lokalisation im Nukleus den natürlichen Zustand widerspiegelt.

4.9 Wird HvWRKY1 über einen MAPK-Signalweg reguliert?

Mehrere Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass die Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren nicht oder nur zum Teil auf Transkriptions- und Translationsebene erfolgt. Es mehren sich die Hinweise, dass eine MAPK-Signalkaskade (*mitogen activated protein kinase*) *upstream* von WRKY-Transkriptionsfaktoren liegt und direkt oder indirekt deren Aktivität beeinflusst (Asai *et al.*, 2002, Kim and Zhang, 2004; Liu *et al.*, 2004; Ülker und Somssich, 2004, Wan *et al.*, 2004, Menke *et al.*, 2005). Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob MAPKs auch in Gerste eine Rolle bei der Regulation von *HvWRKY1* spielen, wurde ein Inhibitor für MAPKKs (MEK Inhibitor U0126) verwendet. In einem *uptake*-Versuch wurden abgeschnittene Primärblätter (cv. Ingrid) für zwei Stunden mit einer 10 μ M Inhibitorlösung behandelt und anschließend mit *BghA6* inokuliert. Abb. 3.46 zeigt, dass die Inhibitorbehandlung, zu einer deutlichen Induktion von *HvWRKY1* führt. 4 h nach der Inokulation mit *BghA6* ist nur ein geringer Unterschied zwischen Kontrolle und Inhibitorbehandlung zu erkennen, die Expression ist in der Kontrolle etwas stärker. 8 hpi ist die Expression in beiden Behandlungen etwa gleich und erst 26,5 hpi ist die Expression in den mit dem MAPK-Inhibitor behandelten Pflanzen stärker.

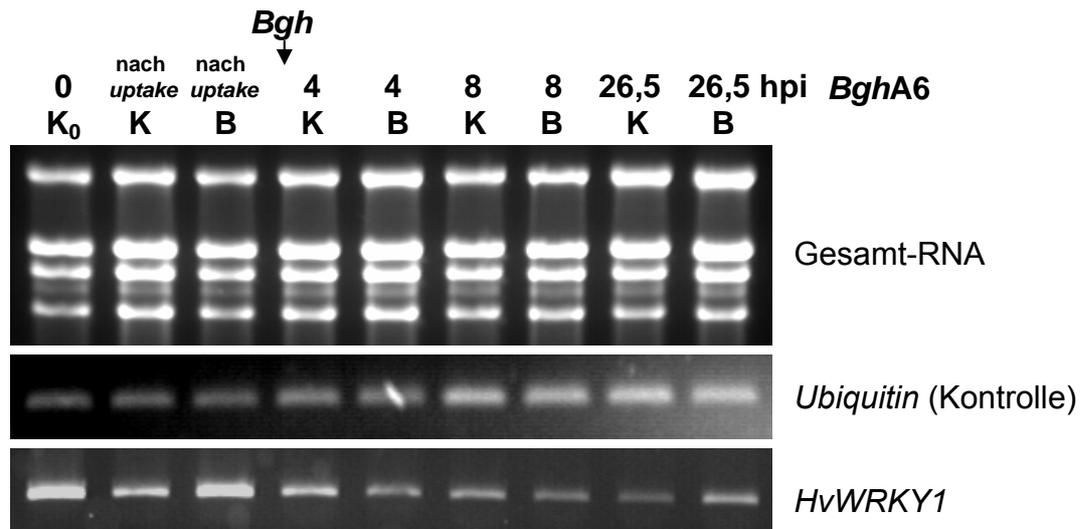


Abb. 3.45 RT-PCR mit Primern für *HvWRKY1* nach Behandlung von etwa eine Woche alten Primärblättern (cv. Ingrid) mit dem MEK Inhibitor U0126 (2 h *uptake*). Kontrollblätter wurden in die gleiche Lösung ohne Inhibitor gestellt. Direkt nach dem *uptake*, sowie 4, 8 und 26,5 h nach der folgenden Inokulation mit *BghA6* wurden Blätter geerntet und RNA isoliert. K= Kontrollbehandlung, B= Behandlung mit dem Inhibitor, K₀= vor der Behandlung. Es sind als Kontrollen für gleichmäßige *template*-Mengen jeweils 2 µg Gesamt-RNA und eine PCR für gleichmäßig Amplifizierung mit dem *housekeeping*-Gen Ubiquitin gezeigt. Die PCR wurde einmal wiederholt.

Gleichzeitig wurde auch untersucht, ob die Inhibitorbehandlung zu einer Veränderung der Penetrationsrate und damit der Resistenz führt. Es wurde dabei zwischen verschiedenen Blattbereichen (Spitze, Mitte, Basis) differenziert, da bekannt ist, dass diese sich hinsichtlich ihrer Resistenz unterscheiden. Die mikroskopische Auswertung 48 hpi (Abb. 3.47) ergab eine Penetrationsrate (\pm SE) im Bereich der Blattspitze von $42,2 \pm 5,1$ % in der Kontrolle gegenüber $70 \pm 6,0$ % in den behandelten Pflanzen. In der Mitte liegt sie bei $40,6 \pm 4,6$ % (Kontrolle) bzw. $36,6 \pm 2,8$ %. An der Basis beträgt sie in der Kontrolle $17,2 \pm 3,1$ und bei der Inhibitorbehandlung $37,6 \pm 6,9$. In diesem Versuch war die Blattbasis resistenter als die Blattspitze, unabhängig von der Inhibitorbehandlung. Auch im Mittel unterschieden sich die Werte deutlich, in der Kontrolle liegt der Mittelwert über das ganze Blatt bei $33,4 \pm 3,7$ % gegenüber $48 \pm 3,3$ % in der Behandlung. Die mit dem MAPKKK Inhibitor behandelten Blätter sind also insgesamt anfälliger gegenüber *BghA6*. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt an der Blattspitze und –basis, wohingegen im der mittleren Blattbereich kaum ein Unterschied in der Penetrationsrate zwischen den Behandlungen auftritt.

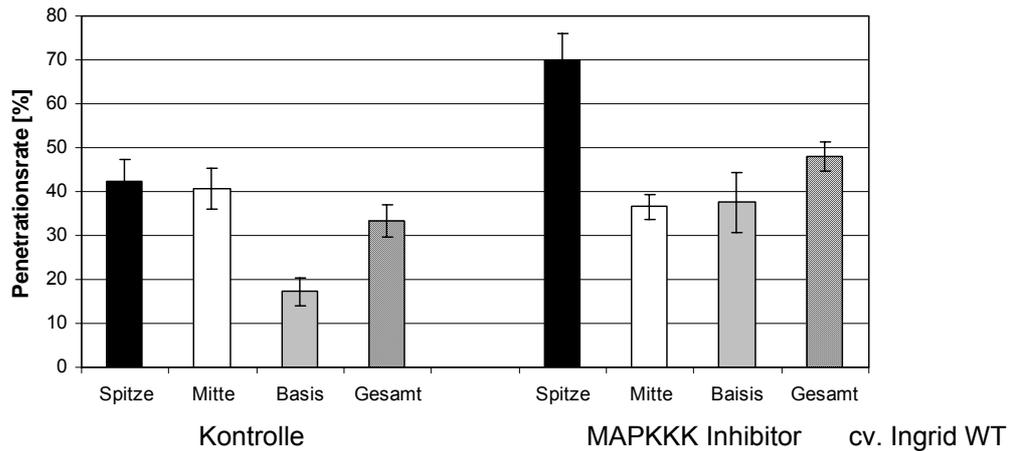


Abb. 3.46 Penetrationsrate in verschiedenen Blattbereichen (Blattspitze, Mitte, Basis) von etwa eine Woche alten Primärblättern (cv. Ingrid) nach Behandlung mit dem MAPKKK Inhibitor U0126. Direkt nach der zweistündigen *uptake*-Behandlung wurden die Blätter inokuliert und 48 h später mikroskopiert. Kontrollblätter wurden ebenso behandelt, allerdings ohne Inhibitor in der *uptake*-Lösung. In den Kontrollexperimenten wurden sieben Blätter, in denen mit dem Inhibitor zehn Blätter ausgewertet. Es wurden aus jedem Blattbereich jeweils 100 Interaktionen ausgewertet.

Neben dem *uptake*-Experiment wurde noch ein weiteres durchgeführt, in dem die Blätter für 12 h auf der Inhibitorlösung schwammen (*floating*). Die mikroskopische Auswertung dieses Experiments fand 48 hpi statt (Abb. 3.48). In der Kontrolle betrug die Penetrationsrate (\pm SE) in der Spitze $30,2 \pm 6,2$ %, in der Mitte $20,9 \pm 4,6$ % und an der Basis $20,3 \pm 4$ %. Das Mittel über das ganze Blatt beträgt $23,8 \pm 4$ %. Demgegenüber liegen die Werte der behandelten Blätter bei $35,2 \pm 6,1$ % an der Spitze, $22,7 \pm 4,5$ % in der Mitte und $25,8 \pm 2,3$ % an der Basis, im Mittel bei $25,8 \pm 3,4$ %. Verglichen mit dem *uptake*-Experiment aus Abb. 3.47 setzt sich der Trend zu mehr Anfälligkeit durch die Inhibitorbehandlung fort. Auch hier ist der Unterschied zwischen beiden Behandlungen in der Blattspitze am Größten, die gegenüber der Blattbasis in der Kontrolle und in der Behandlung anfälliger ist. Die Penetrationsrate ist insgesamt geringer im *floating*-Experiment als in der *uptake*-Behandlung, was an der 10 h längeren Inkubationszeit liegen könnte.

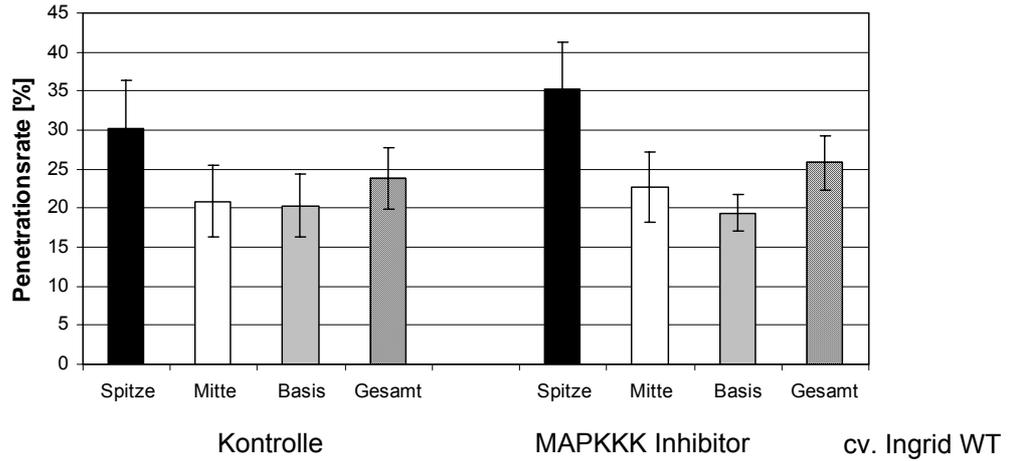


Abb. 3.47 Penetrationsrate in verschiedenen Blattbereichen (Blattspitze, Mitte, Basis) von etwa eine Woche alten Primärblättern cv. Ingrid nach Behandlung mit dem MAPKKK Inhibitor U0126. Direkt nach der 12-stündigen *floating*-Behandlung wurden die Blätter inokuliert und 48 h später mikroskopiert. Kontrollblätter wurden ebenso behandelt, allerdings ohne Inhibitor in der *uptake*-Lösung. In den Kontrollexperimenten wurden acht Blätter, in denen mit dem Inhibitor sieben Blätter ausgewertet. Es wurden aus jedem Blattbereich jeweils 100 Interaktionen ausgewertet.

5 DISKUSSION

5.1 WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerste

Die WRKY-Multigenfamilie in Gerste

WRKY-Transkriptionsfaktoren bilden eine große Multigenfamilie. In den sequenzierten Genomen von Reis und *Arabidopsis* sind 81 (Xie *et al.*, 2005) bzw. 74 Mitglieder (Ülker und Somssich, 2004) identifiziert worden. In anderen Pflanzen wurden bisher nur einzelne WRKY-Faktoren beschrieben. In Gerste wurden bisher zwei WRKY-Gene analysiert: *SUSIBA2* (*sugar signalling in barley2*, Sun *et al.* 2003), das eine Rolle in der Stärkesynthese im Gerstenendosperm spielt und *HvWRKY1*, das u. a. nach Pathogenbefall stark exprimiert wird (Eckey *et al.*, 2004, Maré *et al.*, 2004). Ein Ziel dieser Arbeit war es, weitere WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerste zu isolieren, um einen Einblick in die komplexe Interaktion dieser häufig in Zusammenhang mit der Transkriptionskontrolle nach Pathogenbefall stehenden Genfamilie zu erhalten. Wie Tab. 3.1 zeigt, wurden auf dem 22K *barley GeneChip* (Close *et al.*, 2004) im Rahmen dieser Arbeit 28 potentielle WRKY-Faktoren identifiziert, von denen 18 mindestens eine WRKY-Domäne aufweisen. Leider umfassen die *contigs* keine Vollängensequenzen ganzer Gene. Diese wären für eine korrekte Zuordnung der WRKY-Faktoren in Untergruppen notwendig. Mindestens zwei *contigs* enthalten zwei WRKY-Domänen und gehören somit zur Untergruppe I der WRKY-Familie (Eulgem *et al.*, 2000). Auch *HvWRKY1* und *SUSIBA2*, sowie *HvWRKY4*, 5 und 6, sind auf dem *GeneChip* vorhanden, nicht hingegen der im Rahmen dieser Arbeit isolierte und charakterisierte *HvWRKY3*. Da in den vollständig sequenzierten Reis- und *Arabidopsis*-Genomen eine große Anzahl WRKY-Gene vorhanden sind, kann man davon ausgehen, dass auch Gerste mehr als die bisher identifizierten 29 potentiellen WRKY-Faktoren besitzt. Zhang und Wang (2005) geben im Anhang ihrer phylogenetischen Studie über WRKY-Faktoren 53 potentielle WRKY-Gene aus Gerste an, die in der TIGR *Plant Gene Indices* Datenbank aus insgesamt fast 350 000 ESTs identifiziert wurden.

Konservierte Motive in der Proteinsequenz von HvWRKY1 und 2

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Charakterisierung von zwei nahe verwandten WRKY-Faktoren aus Gerste, *HvWRKY1* und 2. Abb. 3.1 zeigt ein

alignment der beiden Proteine. Neben einer WRKY-Domäne und einem C₂-H₂-Zinkfingermotiv, die die Einordnung in die Untergruppe IIa der WRKY-Familie ermöglichen (Eulgem *et al.*, 2000, Abb. 3.2), weisen beide Gene mindestens eine putative Kernlokalisierungssequenzen (NLS) auf (Kap. 4.4). Außerdem besitzt zumindest HvWRKY2 eine Reihe konservierter Leucine und Valine, die Bestandteil eines funktionalen *leucine-zippers* sein können, wie er für die WRKY-Gruppen IIa, IIb und III beschrieben wurde (Eulgem *et al.*, 2000). WRKY-Proteine, deren *leucine-zipper* deletiert wurde, sind zwar noch in der Lage, an W-Boxen zu binden, allerdings konnten Cormack *et al.* (2002) zeigen, dass die Fähigkeit zur Aktivierung eines *GUS*-Reportergens dadurch deutlich reduziert wurde. Wang *et al.* (2005) konnten für OsWRKY89 zeigen, dass die Deletion des *leucine-zippers* die Bindungsstärke an W-Boxen im EMSA deutlich verminderte. Außerdem konnten sie in einem *yeast two-hybrid assay* nachweisen, dass *leucine-zipper* Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. Sie könnten eine Di- oder Oligomerisierung von WRKY-Faktoren oder die Bindung an andere regulatorische Proteine und die Transkriptionsmaschinerie ermöglichen. Auch Sun *et al.* (2003) fanden Hinweise darauf, dass SUSIBA2, ein WRKY-Protein aus Gerste, oligomerisieren kann und dies die Bindung des Proteins an *cis*-Elemente beeinflusst.

Ein weiteres Motiv, das nur in der Sequenz von HvWRKY1 vorhanden ist, ist ein Sumoylierungsmotiv (Seeler und Dejean, 2003). Xie *et al.* beschrieben 2005 erstmalig das Vorhandensein dieses Motivs in 35 Reis WRKY-Faktoren. Unklar ist allerdings, inwieweit es funktional ist. SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) stellt ein etwa 100 Aminosäuren langes Peptid dar, das in einem der Ubiquitynylierung ähnlichen Prozess posttranslational an Proteine angehängt wird. Dabei kann die Sumoylierung an der positiven sowie der negativen Regulation der Transkription beteiligt sein, indem sie die Fähigkeit von Transkriptionsfaktoren mit ihren Partnern zu interagieren und ihre Stabilität modifiziert (Verger *et al.*, 2003). Auch die subzelluläre Lokalisation, insbesondere der Transport zwischen Zytosol und Zellkern, sowie die Verteilung in Subkompartimente des Nukleus, wird durch das Anhängen von SUMO beeinflusst (Pichler und Melchior, 2000). Sumoylierung ist in *Arabidopsis* eine der ersten Reaktionen auf Hitzestress und erfolgt auch unter anderen Stressbedingungen, wie Behandlung mit Ethanol, H₂O₂ und dem Aminosäureanalog Canavanin, dessen Einbau in Proteine zu fehlerhaften

Produkten führt (Kurepa *et al.*, 2003). Dieser Mechanismus könnte somit zur differenzierten Regulation der Aktivität von WRKY-Faktoren beitragen.

Ebenfalls von Xie *et al.* (2005) wurde in neun WRKY-Faktoren aus Reis ein so genanntes aktives Respressormotiv (LXLXL) beschrieben, das auch in den Sequenzen von HvWRKY1 und 2 vorhanden ist. Dieses Motiv wurde von Tiwari *et al.* (2004) in Aux/IAA-Proteinen von *Arabidopsis* charakterisiert. Aux/IAA Proteine sind Zellkernproteine, die die Expression von Genen der primären Auxinantwort reprimieren. Diese Repression wird durch die Domäne I eines Aux/IAA Proteins vermittelt, in der das LXLXL-Motiv von besonderer Bedeutung ist. Allerdings wurde die Funktionalität dieses Motives in WRKY-Proteinen bisher nicht nachgewiesen. Sehr ähnlich zu HvWRKY1 ist OsWRKY71 (Abb. 3.2). Beide enthalten ein ähnliches Muster von Motiven, einschließlich des LXLXL-Motives. Daraus könnte man auf ähnliche Funktionen beider Proteine schließen. OsWRKY71 spielt eine Rolle in der Regulation des Giberellinsignalwegs. So wird OsWRKY71 nach Giberellingabe reprimiert (Xie *et al.*, 2005) und wirkt als Repressor von *Amy32b*, das durch Giberellin induziert wird (Zhang *et al.*, 2004). Diese Wirkung als Repressor wäre z. B. mit dem Vorhandensein des LXLXL-Repressormotives zu erklären. Ebenfalls induziert wird OsWRKY71 nach Behandlung mit ABA. Allerdings hatte die transiente Überexpression von OsWRKY71 in Gerstenaleuronzellen keinen Einfluss auf die Induktion eines *GUS*-Reportergens unter der Kontrolle des ABA-responsiven *HVA22*-Promotors (Xie *et al.*, 2005).

5.2 Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren unterliegen gewebespezifischer, aber auch entwicklungs- und stimulusspezifischer Kontrolle. Diese Regulation kann auf mehreren Ebenen stattfinden, was die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren als Schlüsselregulatoren unterstreicht (Kap. 1.5, Calkhoven und Ab, 1996). Dazu zählen unter anderem die Ebene der Transkription, der Translation, posttranslationale Modifizierungen und der Transport in den Zellkern. Dabei ist bisher unbekannt, wie groß der Anteil der einzelnen Ebenen an der Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren tatsächlich ist. Da Transkriptionsfaktoren weitere Gene, einschließlich Transkriptionsfaktoren, regulieren, kann schon eine kleine Veränderung ihrer Expression und Aktivität zu weitreichenden Veränderungen in der Pflanze führen.

5.2.1 Regulation auf Transkriptionsebene

Regulation durch Pathogene: Induzierbarkeit durch den Echten Gerstenmehltaupilz

Eckey (2002 und Eckey *et al.*, 2004) konnten im Rahmen eines cDNA-AFLPs zeigen, dass die Expression von *HvWRKY1* nach Inokulation mit *BghA6* schnell und transient induziert wird. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit das auch für andere WRKY-Faktoren aus Gerste gültig ist. Es gibt eine Reihe von Arbeiten, in denen nachgewiesen werden konnte, dass viele dieser Transkriptionsfaktoren nach Inokulation mit Pathogenen oder Elizitorbehandlung induziert werden (Eulgem, *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2000, Asai *et al.*, 2002, Wan *et al.*, 2004, Zipfel *et al.*, 2004). Dabei können sowohl Viren (Yang *et al.*, 1999), als auch Bakterien (Dellagi *et al.*, 2000, Chen und Chen, 2002, Dong *et al.*, 2003, Wen *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2004), Pilze (Rushton *et al.*, 1996, Dellagi *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2000, Kirsch *et al.*, 2000, Wen *et al.*, 2003, Wan *et al.*, 2004) oder Herbivore (Hui *et al.*, 2003, Izaguirre *et al.*, 2003) diese Reaktion auslösen. Abb. 3.9 zeigt eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR von *HvWRKY2* und 3 nach Inokulation mit *BghA6* im Gerstenkultivar Ingrid. Beide Gene werden schnell (10 bis 30 min nach Inokulation) und transient induziert. Für *HvWRKY1* konnten Eckey *et al.* (2004) eine Induktion ab 1 hpi zeigen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vieler Studien, die eine schnelle Induktion von WRKY-Faktoren nach Pathogenbefall oder Elizitorstimulation nachwiesen. Wan *et al.* (2004) konnten den Anstieg der mRNA-Menge von *AtWRKY33* und *AtWRKY53* schon 15 min nach Elizitierung mit Chitin zeigen. Daher werden WRKY-Faktoren auch zur *immediate early response* gerechnet (Rushton *et al.*, 1996, Cheong *et al.*, 2002, Cormack *et al.*, 2002). Dong *et al.* (2003) untersuchten 72 WRKY-Faktoren aus *Arabidopsis* im Hinblick auf ihre Induzierbarkeit durch *Pseudomonas syringae*. 49 davon erwiesen sich als induzierbar, viele davon zeigten schon nach zwei Stunden eine deutliche Transkriptakkumulation. Bemerkenswert an der schnellen Induktion von *HvWRKY2* und 3 durch *Bgh* ist, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine Keimung der Konidie erfolgt. Die Keimung mit Ausbildung des primären Keimschlauchs findet erst 1 bis 2 Stunden nach Inokulation statt und aktiviert erste Abwehrreaktionen der Pflanze (Thordal-Christensen *et al.*, 1999). Daraus kann man schließen, dass eventuell die mechanische Stimulation der Blattoberfläche ausreicht, um die Expression von WRKY-Faktoren zu aktivieren.

Abb. 3.9 zeigt einen zweiten Höhepunkt der Expression von *HvWRKY2* und 3 vier Stunden nach Inokulation. Dies korreliert mit dem Beginn des Wachstums des appressorialen Keimschlauchs 4 bis 8 hpi. Diese Effekte sind stabil, sie konnten in mehreren Experimenten bestätigt werden.

RT-PCRs mit potentiellen WRKY-Faktoren des 22K *barley GeneChip* ergaben, dass drei der in Abb. 3.11 getesteten *contigs* im Zeitraum bis 12 hpi mit *Bgh* induziert waren. Eine Hybridisierung des 22K *barley GeneChip* mit Material von Gersten cv. Ingrid 12 h nach Inokulation mit *BghA6* (Waller *et al.*, 2005) zeigte keine Veränderung der 28 putativen WRKY-*contigs*. Zum Teil kann dieses Ergebnis mit dem für WRKY-Faktoren späten Zeitpunkt nach Inokulation erklärt werden.

Induktion im Nichtwirtssystem Gerste - Echter Weizenmehltaupilz

Im Weiteren wurde die Expression von *HvWRKY1* und 2 im Nichtwirtssystem Gerste (cv. Ingrid) und Echter Weizenmehltau *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) untersucht (Abb. 3.12). Es zeigte sich ein ähnliches Muster mit einer frühen Transkriptakkumulation 30 min bzw. 1 hpi und einer weiteren mit einem Maximum nach vier Stunden. Die Ähnlichkeit des Expressionsmusters kann damit erklärt werden, dass sich die Keimung der Konidien von *Bgh* und *Bgt* nicht unterscheidet. Die beobachteten Induktionsmaxima von *HvWRKY1* und 2 scheinen mit der Adhäsion der Konidie und der Bildung des zweiten Keimschlauches zu korrelieren, die unabhängig vom Ausgang des späteren Penetrationsversuches sind. Trotzdem gibt es kleine Unterschiede in der Transkriptakkumulation, deren Relevanz unbekannt ist. Z. B. blieb die Akkumulation der mRNA von *HvWRKY2* in dem untersuchten Zeitraum bis 12 hpi auf hohem Niveau. Es ist beispielsweise wahrscheinlich, dass eine etwas schnellere Reaktion der Pflanze ihr einen entscheidenden Vorteil verschaffen kann, um die Penetration des Pilzes zu verhindern.

Expression von *HvWRKY1* und 2 in *mlo*-tragenden Kultivaren

Ein wichtiger Faktor für die Resistenz in Gerste ist *mlo* (Kap. 1.3). Der Ausfall des 7-Transmembrandomänen Proteins Mlo vermittelt eine sehr dauerhafte, rassenspezifische Resistenz gegenüber *Bgh*, die vor allem auf einer Penetrationsresistenz beruht (Freialdenhoven *et al.*, 1996, Piffanelli *et al.*, 2002). Da die Abwehrmechanismen in *mlo*-tragenden Pflanzen dieselben sind wie in

Wildtyppflanzen, diese aber schneller ablaufen, wird vermutet, dass *Mlo* als Suppressor dieser Abwehrmechanismen wirkt (Büschges *et al.*, 1997, von Röpenack *et al.*, 1998). Freialdenhoven *et al.* (1996) identifizierten zwei für die *mlo*-Resistenz nötige Loci, *Ror1* und *Ror2* (*required for mlo-specified resistance*). Mutationen in *Ror1* oder *Ror2* führen zu einem partiellen Verlust der *mlo*-vermittelten Resistenz.

Da *mlo* eine so große Rolle für die Resistenz gegenüber *Bgh* spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwiefern sich die Expression von WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerstenkultivaren, die Mutationen im Signalweg der *mlo*-vermittelten Resistenz tragen von *Mlo*-tragenden Kultivaren unterscheiden. Wie Abb. 3.10 zeigt, ähnelt das Expressionsmuster in den Kultivaren I22 (*mlo-5*, *Ror1*, *Ror2* genetischer Hintergrund Ingrid), A89 (*mlo-5*, *ror1-2*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid) und 105-6 (*Mlo*, *ror1*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid x Sultan5) dem in cv. Ingrid Wildtyp, zumindest was das biphasische Muster betrifft. Nur Kultivar I22 zeigt keine schnelle Induktion von *HvWRKY2*. Es treten ansonsten lediglich kleinere Unterschiede in der Geschwindigkeit und eventuell in der Stärke der Transkriptakkumulation auf. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von *HvWRKY1* und 2 unabhängig von *Mlo* und *Ror1* reguliert wird. In der *Barley1*-Datenbank (Kap. 2.2) hat Achim Fischer die Daten einer Hybridisierung des 22K *barley GeneChip* (Close *et al.*, 2004) mit *Bgh*-inokuliertem (Rasse 4.8, Schweizer Feldisolat, 7 dpi) und nicht-inokuliertem Material von Gerstenpflanzen cv. Ingrid Wildtyp (*Mlo*) und des *mlo-5* tragenden cv. Ingrid BC7 hybridisiert (Experiment BB7). Fischer konnte für *HvWRKY1* (Contig04386_at) und *HvWRKY2* (Contig04387_at) zeigen, dass zum späten Zeitpunkt 7 dpi nach Inokulation ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge erfolgt, unabhängig davon, ob es sich um die *Mlo*- oder die *mlo-5*-tragende Kultivare handelte. Allerdings wurde keine Wiederholung des Experimentes durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Zeitpunkte der frühen Interaktion untersucht. Trotzdem bestätigt die Arbeit von Fischer, dass auch in *mlo*-tragenden Kultivaren die Induzierbarkeit von WRKY-Transkriptionsfaktoren durch *Bgh* erhalten bleibt.

Pathogenresponsive Elemente in den Promotoren von drei *Bgh*-induzierten Genen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Promotoren von drei stark *Bgh*-induzierbaren Genen untersucht. Dabei wurde der Schwerpunkt auf pathogenresponsive *cis*-Elemente gelegt. Diese werden durch W-Boxen und EIRE-Elemente repräsentiert.

In den ersten ca. 1880 bp des *HvWRKY1*-Promotors befinden sich sechs vollständige W-Boxen (Abb. 3.4). Die biologische Relevanz und Funktionalität eines Sequenzbereiches als regulatorisches *cis*-Element zeigt sich in der Häufigkeit dieses Elementes verglichen mit seiner statistischen Verteilung, da funktionale Motive konserviert sind und somit häufiger auftreten. Maleck *et al.* (2000) untersuchten die statistische Verteilung der W-Box mit der Sequenz TTGAC in den ersten 1,1 kb von Promotoren in *Arabidopsis*. Sie beträgt 2,1 W-Boxen pro Promotor. Für die längere W-Box-Sequenz TTGACC/T beträgt sie 1,1. Verglichen damit enthalten die ersten 1,1 kb der Promotoren des *PR1*-Regulons, also solcher Gene, die wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Mechanismus der SAR (Kap. 1.2) stehen, durchschnittlich 4,3 (TTGAC) bzw. 2,6 W-Boxen (TTGACC/T). Nimmt man diese Werte als Richtwerte auch für Gerste, so weist das Vorkommen von sechs vollständigen W-Boxen im Promotor von *HvWRKY1* auf eine biologische Relevanz hin.

Neben den sechs vollständigen W-Boxen enthält der Promotor von *HvWRKY1* noch sieben unvollständige W-Boxen, und ein EIRE-Motiv (*elicitor induced resistance element*, Shah und Klessing, 1996). Inwieweit diese unvollständigen W-Boxen funktional sind, ist unbekannt. Die Mutation einer Base des W-Box Kernmotives TGAC (Rushton und Somssich, 1998) führt zu einer starken Reduktion oder gar zum Verlust der Bindung (Ciolkowski, 2003). Mutationen außerhalb dieser Kernsequenz haben im EMSA einen weniger starken Einfluss auf die Bindung. Dieser Einfluss sinkt mit wachsendem Abstand. Allerdings konnten Hara *et al.* (2000) zeigen, dass keine Bindung von WIZZ, einem WRKY-Faktor aus Tabak, an ein *as1*-Motiv erfolgte, das ebenso wie W-Boxen das Kernmotiv TGAC trägt. Die Bindung an W-Boxen ist also sehr spezifisch, wenn auch noch unklar ist, wie diese Spezifität entsteht.

Bei den beiden anderen untersuchten Proteinen handelt es sich um Poly85 und eine putative Phytochelatinsynthase. Poly85 ist ein Typl-Membranprotein mit einer extrazytoplasmatischen Kupferbindedomäne. Ein Homolog aus *Arabidopsis* zeigte verstärkte Expression nach Behandlung mit verschiedenen abiotischen Faktoren

wie Schwermetallen (Richards *et al.*, 1998), Ozon und Dunkelheit (van Gysel *et al.*, 1993), Dehydrierung, Salzstress und Kälte (Yang *et al.*, 2002). Außerdem konnte ein Zusammenhang mit Seneszenzprozessen hergestellt werden (Himmelblau und Amasino, 2000). Da Kupferionen in den Oxidationsstufen +I und +II stabil sind, können sie Redoxreaktionen katalysieren, wie die Bildung von Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) im Apoplasten, die zytotoxisch wirken können. Poly85 könnte diese Cu^{2+} -Ionen binden und somit die Bildung von Hydroxylradikalen vermindern, die in der Zellwand durch den Abbau von Polysacchariden zu einer leichteren Penetrierbarkeit der Zellwand führen könnten (Jansen, 2002, Jansen *et al.*, 2005).

Phytochelatinsynthesen katalysieren im Zytosol die Synthese von Phytochelatinen (Cobbett, 2000). Phytochelatine haben die Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ und dienen der Detoxifizierung von Schwermetallen. Es werden auch andere Funktionen der Phytochelatine diskutiert, wie eine Rolle im Schwefelmetabolismus und als Antioxidantien (Rauser, 1995, Dietz *et al.*, 1999, Cobbett, 2000). Sowohl für die Phytochelatinsynthase als auch für Poly85 wurde die Induzierbarkeit durch *BghA6* nachgewiesen (Eckey *et al.*, 2004, Jansen *et al.*, 2005). Die Bedeutung von Poly85 für die Interaktion von Gerste mit *Bgh* wurde auch funktionell bestätigt: RNA-Interferenz führte zu einer erhöhten Penetrationsrate und damit zu Anfälligkeit (Jansen, 2002).

In den Promotoren von Poly85 und einer putativen Phytochelatinsynthase wurden eine bzw. zwei vollständige W-Boxen identifiziert. Dies stellt keine Häufung dieser Elemente dar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine Regulation über W-Boxen für diese Proteine nicht von großer biologischer Relevanz ist. Sie kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, da theoretisch eine W-Box für die Bindung eines WRKY-Transkriptionsfaktors ausreicht. Die deutliche Induktion der beiden Proteine nach *Bgh*-Inokulation kann ebenso durch andere, bisher unbekannt, pathogenresponsive Elemente vermittelt werden. Unwahrscheinlicher ist es, dass der sequenzierte Promotorbereich von über 2,1 bzw. 1,8 kb nicht alle für die Regulation der Genexpression relevante Elemente beinhaltet. Aus *Arabidopsis* ist bekannt, dass die meisten funktionalen *cis*-Elemente innerhalb der ersten 1 kb des Promotors liegen und die meisten untranslatierten Transkriptsequenzen kürzer als 150 kb sind (Maleck *et al.*, 2000). Allerdings gibt es Daten, die besagen, dass einige WRKY-Transkriptionsfaktoren untranslatierte 5'-Bereiche von mehr als 150 bp besitzen (Dong *et al.*, 2003).

Sind die W-Boxen im Promotor von *HvWRKY1* funktional?

Es konnte bisher schon für einige WRKY-Faktoren gezeigt werden, dass sie an Promotoren anderer WRKY-Proteine binden. So konnten Miao *et al.* (2004) zeigen, dass AtWRKY53 an den Promotor von AtWRKY6 und AtWRKY42 binden kann. Ebenso bindet AtWRKY53 seinen eigenen Promotor. Für AtWRKY6 konnte ein negativer Einfluss auf die Aktivität des eigenen Promotors nachgewiesen werden (Robatzek und Somssich, 2002), ebenso für AtWRKY18 (Chen und Chen, 2002). Auch Asai *et al.* (2002) postulieren Autoregulationsmechanismen für AtWRKY22 und AtWRKY29.

Dies könnte bedeuten, dass autoregulatorische Mechanismen unter WRKY-Faktoren verbreitet sind und auch für die Regulation von *HvWRKY1* eine Rolle spielen könnten, in dessen Promotor sich mehrere W-Boxen befinden (Abb. 3.4). Daher wurde mittels *electromobility shift assay* (EMSA) untersucht, ob *HvWRKY1* *in vitro* in der Lage ist, an eine W-Box seines eigenen Promotors zu binden, bzw. ob *HvWRKY2* an diese W-Box bindet (Abb. 3.8). Dazu ist es nötig, eine ausreichende Menge *HvWRKY*-Protein zu exprimieren, was in diesem Fall durch heterologe Überexpression in *E. coli* Bakterien geschehen sollte. Diese sind mit einem *HvWRKY1*- bzw. *HvWRKY2*-Protein transformiert worden, das einen 6x His-tag zur Aufreinigung enthielt. Es stellte sich heraus, dass rekombinantes *HvWRKY*-Protein unter nativen Bedingungen nicht in löslicher Form aus den Zellen isoliert werden konnte (Abb. 3.7). Ähnliches wurde von Maré *et al.*, (2004) berichtet, die ein GST-Fusionsprotein von *HvWRKY1* (*HvWRKY38*) in *E. coli* in Einschlusskörpern gebunden fanden und es nur partiell isolieren konnten. Es ist außerdem bekannt, dass die Aufreinigung rekombinanter WRKY-Faktoren nur selten gelingt und deshalb oft auf Rohextrakte ausgewichen wurde (Chen und Chen, 2000, Dong *et al.*, 2003). Der EMSA in Abb. 3.8 wurde mit einem *E. coli* Rohextrakt durchgeführt, der wahrscheinlich nur eine sehr geringe Konzentration gelöstes, rekombinantes *HvWRKY*-Protein enthält. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass nur ein sehr schwacher *shift*, d. h. eine schwache Veränderung im Laufverhalten, zu erkennen ist. Es ist unklar, ob es sich dabei um eine spezifische Bindung handelt, da auch vor der Induktion des rekombinanten *HvWRKY1*-Proteins mittels IPTG eine schwache Bande vorhanden ist (Abb. 3.7). Da diese Bande allerdings 4 h nach Induktion stärker ist, könnte das bedeuten, dass der LacZ-Promotor in *E. coli* eine gewisse Hintergrundaktivität aufweist.

Für eine spezifische Bindung spricht, dass weder mit dem Extrakt des Kontrollproteins DHFR noch in der Negativkontrolle ein *shift* beobachtet werden konnte (Abb. 3.8).

Ein weiterer Grund für den sehr schwachen *shift* könnte ein *in vitro* auftretende Mangel an für die Bindung *in vivo* möglicherweise benötigten Zellkomponenten sein. Einige Arbeitsgruppen verwendeten daher pflanzliche Zellkernextrakte, um die Bindung an W-Boxen nachzuweisen (Yang *et al.*, 1999). Damit kann aber nicht die spezifische Interaktion eines bestimmten WRKY-Faktors an eine W-Box im EMSA gezeigt werden, da der Extrakt auch andere WRKY-Faktoren enthält.

Es gibt mittlerweile Möglichkeiten, rekombinante Proteine mittels denaturierender Extraktionspuffer aus *E. coli* zu isolieren und anschließend wieder zu renaturieren. Diese Methoden sind aber je nach zu renaturierendem Protein unterschiedlich wirksam und müssen jeweils optimiert werden. Gleichzeitig wird diskutiert, dass Protein-Protein-Interaktionen wichtig für die Bindung von WRKY-Faktoren an DNA sind (Yang *et al.*, 1999, Eulgem *et al.*, 2000). Da diese Wechselwirkungen ebenfalls durch die De- und anschließende Renaturierung beeinträchtigt sein können und mögliche Interaktionspartner in *gel-shift* Experimenten mit rekombinantem Protein ohnehin nicht vorhanden sind, wurde in dieser Arbeit davon Abstand genommen.

Viele Arbeitsgruppen konnten bisher die Bindung von WRKY-Transkriptionsfaktoren an W-Boxen nachweisen, so dass an der Spezifität dieser Bindung nicht mehr gezweifelt werden kann (Rushton *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2000, 2002, Du und Chen, 2000, Hara *et al.*, 2000, Yoda *et al.*, 2002). Nur in einer Publikation von Sun *et al.* (2003) konnte bisher eine Bindung eines WRKY-Faktors an ein anderes Motiv als eine W-Box gezeigt werden. SUSIBA2 bindet ein SURE (*sugar responsive*) cis-Element (Giersen *et al.*, 1994), das keine W-Box Kernsequenz enthält.

Auffällig ist, dass die W-Boxen im Promotor von *HvWRKY1* nicht in *clusters*, also gehäuft, auftreten, sondern relativ gleichmäßig über den Promotor verteilt sind. Eulgem *et al.* (1999) und Rushton *et al.* (2002) konnten zeigen, dass W-Boxen oft gehäuft auftreten bzw. dass die Induzierbarkeit eines synthetischen Promotors steigt, wenn zwei bis vier W-Boxen hintereinander angeordnet sind. Ciolkowski (2003) zeigte, dass in *Arabidopsis* W-Boxen mit einem bestimmten Abstand (3, 9, 14, 19, 30 Basen) gehäuft auftreten. Dies lässt darauf schließen, dass ein definierter Abstand zwischen den W-Boxen favorisiert wird, damit keine Behinderung mehrerer

Faktoren auf einem Promotor auftritt oder damit eine kooperative Bindung dieser Faktoren stattfinden kann.

Nicht alle Transkriptionsfaktoren vermitteln die Induktion eines Gens, sie können die Promotoraktivität auch reprimieren. So sind sowohl positive (Eulgem *et al.*, 1999, Chen und Chen, 2000, 2002) als auch negative (Robatzek und Somssich, 2002) regulatorische Funktionen von WRKY-Faktoren bekannt. AtWRKY70 wirkt für JA-induzierbare Gene als Repressor und für durch SA induzierte Gene als Aktivator (Li *et al.*, 2004). Dabei ist allerdings unbekannt, ob es sich um eine direkte oder indirekte, z. B. durch einen Repressor vermittelte, Wirkung handelt. AtWRKY6 wirkt aktivierend auf den *PR1*-Promotor und hemmend auf seinen eigenen Promotor und den eines nahe verwandten WRKY-Proteins (Robatzek und Somssich, 2002).

Welche der W-Boxen eines Promotors seine Induzierbarkeit oder auch Repression vermittelt, ist im jeweiligen Kontext verschieden, abhängig von dem Stimulus, auf den die Reaktion erfolgt und von dem bindenden WRKY-Faktor. So bindet AtWRKY6 eine andere W-Box im *SIRK*-Promotor als AtWRKY15 (Ciolkowski, 2003).

Reaktion von WRKY-Transkriptionsfaktoren auf Inokulation mit *Piriformospora indica*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener pilzlicher Pathogene auf WRKY-Faktoren erklärt werden. *Piriformospora indica* ist ein Basidiomycet aus der indischen Thar Wüste. Die Symbiose mit diesem Wurzelendophyten führt zu einer gesteigerten Resistenz von Gerste gegenüber *Bgh*. Daran beiteiligt ist sowohl eine Penetrationsresistenz, als auch eine hypersensitive Reaktionen der attackierten Zellen. (Waller *et al.*, 2005). Eine Hybridisierung des 22K *barley GeneChip* mit Material aus Ingrid, 3 wai mit *Piriformospora* (Waller *et al.*, 2005) führte zu keiner Veränderung der Expression der 28 WRKY-*contigs*. Der Zeitpunkt 3 wai wurde gewählt, da die Etablierung der Symbiose diese Zeitspanne benötigt. Er ist für WRKY-Faktoren der *immediate early response* spät.

Das Ergebnis wurde im Rahmen dieser Arbeit im Wesentlichen durch eine Expressionsstudie mit *Piriformospora indica* inokuliertem Wurzel- und Blattmaterial cv. Ingrid, 3 wai bestätigt (Abb. 3.13). In Wurzeln konnte insgesamt nur eine sehr geringe Expression von *HvWRKY1*, 2 und 3 detektiert werden. Eine geringe Induktion konnte nur im Blattmaterial für *HvWRKY2* nachgewiesen werden. Eine

zusätzlich zur Inokulation mit *Piriformospora* durchgeführte Inokulation mit *Bgh* führte verglichen mit der nur mit *Bgh* inokulierten Kontrolle (12 hpi) überraschenderweise zu einer geringen Reduktion der Transkriptmenge von *HvWRKY2* und 3.

WRKY-Faktoren und *Fusarium graminearum* als nekrotropher Pilz

Für den nekrotrophen Pilz *Fusarium graminearum* konnte mit Hilfe des 22K *barley GeneChip* in der anfälligen Gerste cv. Rika eine Veränderung der Expression von 13 putativen WRKY-Faktoren festgestellt werden. Dazu wurden die Ährchen zum Zeitpunkt der Anthese inokuliert und fünf Tage danach das Expressionsmuster untersucht (Jansen, IPAZ Gießen). Zehn der *contigs* waren um das 2,6 bis bis 81,5fache induziert, einschließlich *HvWRKY1* und 2 (Contig04386 (*HvWRKY1*), Contig04387 (*HvWRKY2*), Contig23697, Contig7517, Ebro02_SQ004_H10, Contig10167, Contig16040, Contig7798, Contig12005, Contig15957) und drei um das 1,3 bis 2,2fache reprimiert (Contig12434, Contig7243 (SUSIBA2, Sun *et al.*, 2003), Contig12033). Diese Veränderung der Genexpression könnte durch den Pilz direkt verursacht werden. Dies würde bedeuten, dass sowohl biotrophe Pilze wie *Bgh* als auch nekrotrophe Pilze wie *Fusarium HvWRKY1* und 2 induzieren.

Es ist aber auch möglich, dass das von *Fusarium* als nekrotrophem Pilz induzierte Absterben des Gewebes das Signal für die veränderte Expression darstellt. Für WRKY-Faktoren aus anderen Pflanzen wurde schon ein Zusammenhang mit Mechanismen des Zelltodes nachgewiesen. So konnte in *Arabidopsis* gezeigt werden, dass *AtWRKY18* nach der Induktion von Zelltod durch das pilzliche Protein Nep1, das von *Fusarium oxysporum* produziert wird, schon nach 15 min stark induziert wurde (Keates *et al.*, 2003). Brodersen *et al.* (2002) zeigten, dass die Transkriptmenge von *AtWRKY70* in der *Arabidopsis* Mutante *acd11* (*accelerated-cell-death11*) deutlich erhöht ist. Die Mutante *acd11* zeigt einen der tierischen Apoptose ähnlichen Zelltod, der mit der Expression von Verteidigungsgenen (*defense related genes*) einhergeht, die normalerweise zusammen mit der durch avirulente Pathogene ausgelösten HR exprimiert werden. Kemp *et al.* (2005) konnten in Maniok zeigen, dass ein WRKY-Faktor mit Ähnlichkeit zu WRKY4 aus Tabak mit der durch *Xanthomonas axonopodis* ausgelösten HR exprimiert wird. In einer aktuellen Studie zeigten Menke *et al.* (2005), dass in Tabak die

Überexpression der MAPK SIPK zusammen mit ihrem Substrat WRKY1 zu einem schnelleren Zelltod führt, als die Überexpression von SIPK alleine.

Regulation durch abiotische Reize: Verwundung

Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Signalwege, die durch Pathogene induziert werden, eng mit durch Verwundung aktivierten Wegen vernetzt sind. So konnten Rushton *et al.* (2002) zeigen, dass viele *cis*-Elemente sowohl Pathogen- als auch auf Verwundungsreize vermitteln. Sie nehmen daher eine starke Konvergenz von Antworten auf Verwundung, Wirts- und Nichtwirtsinteraktionen auf der Ebene der Promotorelemente an. Durrant *et al.* (2000) zeigten mittels cDNA-AFLP, dass große Überlappungen zwischen der transkriptionalen Antwort von Tomaten auf Elizitoren und mechanischen Stress bestehen. Auch Cheong *et al.* (2002) wiesen in *Arabidopsis* nach, dass viele durch Verwundung regulierte Gene auch Komponenten der pathogeninduzierten Abwehrwege darstellen. Weiterhin zeigten viele durch osmotischen Stress und Hitzeschock induzierte Gene sowie einige, die auf die Phytohormone Ethylen, Jasmonsäure, Abscisinsäure und Auxin reagieren, eine Reaktion auf Verwundung. Unter den sehr schnell nach Verwundung induzierten Genen sind auch sieben WRKY-Faktoren.

Eckey wies 2002 nach, dass *HvWRKY1* früh und transient mit einem Maximum nach 30 min nach mechanischer Verwundung induziert wurde. Wie Abb. 3.15 zeigt, konnte dies auch für *HvWRKY2* gezeigt werden. Der Verlauf der Transkriptakkumulation ist nahezu identisch mit dem von *HvWRKY1*. Der WRKY-Faktor *WIZZ* (*wound-induced leucine zipper zinc finger*) aus Tabak wird ebenfalls sehr schnell und transient durch Verwundung induziert (Hara *et al.*, 2000). Diese Transkriptakkumulation erfolgte lokal und systemisch im Blatt oberhalb des Verwundeten innerhalb von 10 min mit einem Maximum nach 30 min. Das Eindringen von Pathogenen geht oft mit einer lokalen Verwundung der Zellen einher. Gus-Mayer *et al.* (1998) zeigten, dass viele, jedoch nicht alle, pflanzlichen Abwehrreaktionen die durch Behandlung mit einem Elizitor induziert werden, auch auftreten, wenn die Penetration eines Pilzes durch mechanische Stimulation von Petersilienzellen mit einer Nadel lediglich simuliert wurde. Auch herbivore Pathogene führen zu einer u. U. starken Verwundung des pflanzlichen Gewebes. Hui *et al.* (2003) und Izaguirre *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Verletzung von

Tabakpflanzen durch *Manduca sexta*, den Tabakswärmer, zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege führt, die auch WRKY-Transkriptionsfaktoren beinhalten. Die Induzierbarkeit von *HvWRKY1* durch Verwundung spiegelt sich möglicherweise in dem Vorhandensein von acht als wundinduzierbar beschriebenen WUN-Elementen im untersuchten Promotorbereich wider (Kap. 1.2). Auch in den beiden anderen untersuchten Promotoren der wundinduzierbaren Gene Poly85 und der putativen Phytochelatinsynthase waren jeweils neun WUN-Elemente vorhanden. Wie Abb. 3.16 zeigt, sind beide Transkripte durch Verwundung schnell induzierbar. Die Expression der *Chorismatmutase* stieg ebenfalls durch Behandlung mit Carborund an. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Komponente des Phenylpropanoid-Stoffwechsels. Es katalysiert die Umwandlung von Chorismat in Prephenat. Fast alle pflanzlichen Phenole stammen aus diesem Stoffwechselweg, an dessen Ende die sekundären Pflanzenstoffe Lignin, Flavonoide, Alkaloide, Phytoalexine, Salizylsäure, Stilbene und Glukosinolate gebildet werden, die vielfach im Zusammenhang mit der pflanzlichen Abwehr stehen.

Im untersuchten Zeitraum bis 24 h nach Verwundung war die Expression von zwei der getesteten, *Bgh*-induzierbaren Proteine nicht verändert: Das erste Gen war *Poly73*, ein Protein von unbekannter Funktion, dessen Sequenz die größte Ähnlichkeit zu einem putativen extrazellulären Glykoproteins mit *leucine-rich repeats* aus Hirse aufweist (Jansen, 2002). Weitere Proteine mit großer Ähnlichkeit zu *Poly73* sind Proteine der SERK-Klasse (*somatic embryogenesis receptor kinase*) der RLKs. OsBISERK1, eine *benzothiadiazole-induced somatic embryogenesis receptor kinase*, wird in Reis während der Pathogenabwehr induziert.

Ebenfalls zeigte eine *RLK* (*receptor-like protein kinase*) keine Reaktion auf Verwundung. Bei dieser handelt es sich um ein Transmembranprotein der Klasse der lecRLKs, die sich durch das Vorhandensein einer extrazellulären Lektindomäne auszeichnet (Herve *et al.*, 1996). Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine. Allerdings vermuten Herve *et al.*, dass nicht alle lecRLKs Oligosaccharide binden, auch die Bindung anderer hydrophober Liganden, wie z. B. Pflanzenhormone, ist denkbar.

Der Einfluss weiterer abiotischer Faktoren auf *HvWRKY1*

Wie die Tab. 3.2 beispielhaft zeigt, enthalten die untersuchten Promotoren noch weitere regulatorische Elemente. So besitzt der Promotor von *HvWRKY1* z. B. ein

LTR-Motiv (*low temperature*), was zu dem Ergebnis von Eckey (IPAZ, JLU Gießen) passt, die zeigen konnte, dass dieses Gen nach einem Transfer von Gerstenpflanzen von 20 °C nach 5 °C innerhalb einer Stunde induziert wird und erst zwischen 10 und 24 hpt wieder das Grundniveau erreicht. Maré *et al.* (2004) wiesen nach, dass die Expression von *HvWRKY1* durch Kälte- und Trockenstress verstärkt wird. Insgesamt konnten viele Studien eine Induktion durch Kältestress für WRKY-Faktoren aus verschiedenen Pflanzen feststellen (Fowler und Thomashow, 2002, Huang, und Duan, 2002, Yoda *et al.*, 2002, Chinnusamy *et al.*, 2003, Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Auch nach Hitzeschock werden WRKY-Faktoren verstärkt transkribiert (Rizhsky *et al.*, 2002).

Ebenso konnten *cis*-Elemente, die in einem möglichen Zusammenhang mit verschiedenen Phytohormonen stehen, in den Promotoren nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass WRKY-Faktoren an Signalketten von Abscisinsäure (Zou *et al.*, 2004, Xie *et al.*, 2005), Salizylsäure (Chen und Chen, 2000, Du and Chen, 2000, Dong *et al.*, 2003, Mahalingam *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2004, Rocher *et al.*, 2005), Giberellinen (Zhang *et al.*, 2004), Jasmonat (Li *et al.*, 2004) beteiligt sind. Dabei scheinen WRKY-Faktoren eine zentrale Rolle zu spielen: Beispielsweise wirkt AtWRKY70 als Aktivator von SA-induzierbaren Genen und als Repressor von JA-induzierbaren und stellt somit einen Konvergenzpunkt für zwei gegenläufige Signalwege dar (Li *et al.*, 2004).

Da es sich bei WRKY-Faktoren um eine große Multigenfamilie handelt, kann man nicht von einem Mitglied auf die Rolle anderer WRKY-Faktoren schließen. Da fast alle biotischen und abiotischen Reize zu einer Reaktion einzelner WRKY-Gene führen, kann man annehmen, dass diese Gene Teil einer allgemeinen, unspezifischen Stressantwort sind. Auf der anderen Seite konnten Kalde *et al.* (2003) zeigen, dass WRKY-Faktoren der Untergruppe III mehrheitlich pathogen- und SA-responsiv sind. In Bezug auf verschiedene Pathogene reagierten die 13 untersuchten WRKY-Faktoren allerdings unterschiedlich was das temporale Expressionsmuster betrifft. Deshalb ist es auch möglich, dass zwar eine gewisse Redundanz innerhalb der Genfamilie besteht, einzelne Faktoren aber ganz spezifische Aufgaben übernehmen. Es ist daher interessant, die Reaktion eines Gens auf mehrere Faktoren gleichzeitig zu beobachten, z. B. mittels Microarrays und dem *22K barley GeneChip*.

Expression in verschiedenen Organen

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Untersuchung der WRKY-Faktoren war die Frage, in welchen Organen *HvWRKY1* und 2 exprimiert werden. Dies kann einen wichtigen Hinweis auf weitere mögliche Funktionen der beiden Gene geben. Abb. 3.14 zeigt, dass beide in allen untersuchten Geweben exprimiert werden. Die Expression in der Wurzel und im Primärblatt, an dem die meisten Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist nur gering. Die Expression von *HvWRKY1* in Wurzeln und Blättern wurde von Maré *et al.* (2004) bestätigt. *HvWRKY1* wird im vierten Blatt am stärksten exprimiert, das zum Zeitpunkt seiner Ernte das jüngste Blatt war.

Die mRNA von *HvWRKY2* akkumulierte im Gegensatz zu *HvWRKY1* vor allem in älteren Blättern und in den reproduktiven Geweben wie Ähre und Embryo, aber auch im dritten und vierten Blatt. Die Expression in reproduktiven Geweben, besonders im Embryo nach dem Quellen des Samens, lässt auf eine Rolle von *HvWRKY2* in der pflanzlichen Entwicklung schließen. In mehreren Studien werden WRKY-Faktoren mit der Embryogenese in Verbindung gebracht: *ScWRKY* aus *Solanum chacoense* wird besonders stark im späten Torpedostadium des Embryos exprimiert, aber auch in Blättern, Wurzeln, Stängeln, reifenden Samen und Petalen (Lagacé und Matton, 2004). Alexandrova und Conger (2002) identifizierten ein *Dactylis glomerata* Embryogenesegen (DGE1), das große Sequenzähnlichkeit zu *AtWRKY21* aufwies. Ein weiteres WRKY-Gen, das eine Rolle in der Differenzierung von Trichomen und Samen spielt, ist *TTG2* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA2*) aus *Arabidopsis* (Johnson *et al.*, 2002).

Da *HvWRKY2* im Fahnenblatt zum Zeitpunkt der Ährenreife stark exprimiert wird, kann vermutet werden, dass dieses Gen auch eine Rolle im Zusammenhang mit Seneszenzprogrammen spielt, wie sie für viele WRKY-Faktoren aus *Arabidopsis* beschrieben wurde. Für *AtWRKY6* konnte die Expression in Blüten, aber auch in Wurzeln und deutlich schwächer auch in Schoten von *Arabidopsis* von Robatzek und Somssich (2001) gezeigt werden. Dieses Gen wird besonders in seneszenten Blättern exprimiert. Gleiches gilt für *AtWRKY3*, 4, 7 und 11, deren Transkripte nur schwach in jungen, stärker in voll entwickelten Blättern und besonders stark in Seneszenten akkumulierten. Auch andere Veröffentlichungen zeigen einen Zusammenhang von WRKY-Transkriptionsfaktoren und Seneszenzmechanismen (Hinderhofer und Zentgraf, 2001, Chen *et al.*, 2002, Lin und Wu, 2004, Miao *et al.*,

2004). Guo *et al.* (2004) untersuchten das Transkriptom von *Arabidopsis* während der Seneszenz. Dabei fanden sie 18 WRKY-Transkriptionsfaktoren, die in Zusammenhang mit den Alterungsprozessen stehen. WRKY-Faktoren bilden demnach die zweitgrößte Gruppe von Transkriptionsfaktoren in Verbindung mit Seneszenz. Die größte Gruppe stellen 20 Mitglieder der NAC-Familie dar, die auch in Zusammenhang mit der Pathogenabwehr steht (Ren *et al.*, 2000). Die Verbindung von Seneszenzprogrammen und der Pathogenantwort wurde auch von Quirino *et al.*, 2000) bestätigt.

5.2.2 Regulation auf Translationsebene

Um die Expression von WRKY-Faktoren in Gerste nicht nur auf der Transkriptionsebene, sondern auch auf der Ebene der Translation untersuchen zu können, wurden polyklonale Antikörper gegen zwei synthetische Peptide hergestellt (Kap. 2.13.1). Einer davon sollte HvWRKY1 spezifisch erkennen (anti-HvWRKY1), der zweite den hochkonservierten Bereich der WRKY-Domäne binden und damit gegen einen Großteil aller WRKY-Faktoren gerichtet sein (anti-WRKY*all*). Abb. 3.17 zeigt eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Peptides, die dazu diente, die Sensitivität des Antikörpers zu bestimmen. Wie sich herausstellte, erkennt der affinitätsgereinigte Antikörper anti-WRKY*all* das Peptid bereits ab einer Verdünnung von mehr als 1:100 nicht mehr. Da Transkriptionsfaktoren innerhalb der Zellen nur in geringer Konzentration vorliegen, erwies sich dieser Antikörper als unbrauchbar für Expressionsstudien. Der Western Blot mit Gerstenproteinen und anti-WRKY*all* in Abb. 3.18 zeigt eine Veränderung des Bandenmusters zwischen Präimmunserum und *large bleeding*. Dabei könnte es sich aber um unspezifische Banden handeln. Im Vergleich dazu detektierte der aufgereinigte Antikörper quasi keine Banden mehr.

Western Blot mit anti-HvWRKY1 nach Inokulation mit *Bgh*

Der Antikörper anti-HvWRKY1 erkannte das Peptid, gegen das er hergestellt wurde, zuverlässig auch bei starker Verdünnung (1:20 000). Daher wurde dieser Antikörper verwendet, um die Expression von HvWRKY1 nach *BghA6* Inokulation zu untersuchen. Wie von Eckey *et al.* (2004) mittels RT-PCR gezeigt, ist die Transkription von *HvWRKY1* ab 3 hpi deutlich erhöht. Daher ist auch zu vermuten, dass die Menge an gebildetem Protein nach Inokulation ansteigt.

Anti-HvWRKY1 erkennt im Western Blot mehrere Banden. Allerdings konnte, verglichen mit der Kontrolle, keine Veränderung des Bandenmusters 2, 4 oder 12 hpi (Abb.3.18) detektiert werden. In dem Bereich um 38,5 kDa, was dem berechneten Molekulargewicht von HvWRKY1 entspricht, befindet sich eine prominente Bande, die konstitutiv in allen untersuchten Proben auftritt und auch schon mit dem Präimmunserum detektiert wurde. Diese Bande, bei der es sich vermutlich um ein in großen Mengen produziertes Protein handelt, da es selbst mit Ponceau-Rot deutlich zu erkennen ist, könnte eine mögliche spezifische HvWRKY1-Bande überdecken.

Das exakte Molekulargewicht von HvWRKY1 ist unbekannt, Berechnungen zufolge liegt das der Aminosäuresequenz bei 38,5 kDa. Dieses kann aber durch posttranslationale Modifikationen verändert sein. HvWRKY1 besitzt eine mögliche N-Glycosylierungsstelle und mehrere Konsensussequenzen für Phosphorylierungen und Myristylierungen. Einen Hinweis für die weite Verbreitung von posttranslationalen Modifizierungen unter WRKY-Transkriptionsfaktoren fanden Turck *et al.* (2004). Sie zeigen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, dass die meisten WRKY-Faktoren eines Zellkernextraktes aus Petersilie im Gel als perlenkettenähnliches Muster wandern und postulieren, dass es sich dabei um den gleichen Faktor mit unterschiedlichen Modifikationen handelt.

ELISA mit anti-HvWRKY1 nach *Bgh*-Inokulation und Verwundung

Eine weitere Erklärung dafür, dass kein durch *Bgh*-induzierbares Signal von HvWRKY1 detektiert werden konnte, könnte in einer zu geringen Sensitivität der Methode des Western Blots liegen. Daher wurde zusätzlich die empfindlichere, jedoch unspezifischere, Methode des ELISA durchgeführt (Abb. 3.19 und 3.20). Hierbei gewinnt man keine Information über die Größe des nachgewiesenen Proteins, was von Nachteil ist, wenn, wie in diesem Fall, mehrere Banden im Western Blot zu erkennen waren. Allerdings sollen in diesem Fall Unterschiede in der Signalstärke zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation und keine Absolutwerte gemessen werden. Im Western Blot konnte keine deutliche Differenz zwischen den Bandenstärken zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden, so dass sich eine klare Induktion von HvWRKY1 vor den Hintergrundsignalen abheben sollte.

Man erkennt, dass schon das Präimmunserum eine höhere Extinktion verursacht, als der aufgereinigte Antikörper. Dies entspricht dem Ergebnis des Western Blots in Abb. 3.18. Dort ist zu erkennen, dass Präimmunserum und *large bleeding* deutlich mehr Hintergrundsignale verursachen als der aufgereinigte Antikörper.

In dem untersuchten Zeitraum zwischen zwei und 24 bzw. 32 hpi konnte keine Akkumulation von HvWRKY1 nachgewiesen werden, in Abb. 3.20 nimmt die Proteinmenge sogar kontinuierlich ab. Es ist zwar bekannt, dass die Menge einiger WRKY-Faktoren nach Induktion sinkt (Turck *et al.*, 2004), dies dürfte aber für HvWRKY1 nicht zutreffend sein, da es den Ergebnissen der RT-PCRs widerspricht, die eine deutliche Steigerung der Transkriptmenge nach Inokulation zeigten.

Es gibt bisher wenige Studien, die Antikörper gegen einzelne WRKY-Faktoren einsetzen, um deren temporale und oder spatiale Expression zu charakterisieren. Oft wurden Antikörper lediglich verwendet, um die Spezifität der Bindung von WRKY-Faktoren aus Zellkernextrakten (Yu *et al.*, 2001, Sun *et al.*, 2003) bzw. von rekombinantem Protein (Maré *et al.*, 2004) an W-Boxen in EMSA Experimenten zu belegen. Robatzek und Somssich (2001) wiesen mit anti-AtWRKY6 die Lokalisation von AtWRKY6 im Zellkern nach und Sun *et al.* (2003) gelang es, mit anti-SUSIBA2 zu zeigen, dass SUSIBA2 im Endosperm, aber nicht in Blättern von Gerste vorhanden ist. Maré *et al.* (2004) verwendeten ebenfalls einen Antikörper gegen HvWRKY1, den sie aber nur für EMSA-Experimente und nicht für Western Blots verwendeten. Sie generierten den Antikörper gegen zwei Peptide zwischen den Aminosäurepositionen vier und 18 und 174 und 181, wohingegen das hier verwendete Peptid zwischen den Positionen 121 und 135 lag und keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen in der NCBI-Datenbank aufwies, außer zu den Homologen zu HvWRKY1 aus anderen Spezies. Wie spezifisch der Antikörper von Maré *et al.* HvWRKY1 erkennt, wurde von ihnen nicht gezeigt.

Anreicherung von Zellkernen für Western Blot und ELISA

Die bisher einzige Arbeitsgruppe, die Western Blots und zweidimensionale Gelelektrophoresen mit Antikörpern gegen WRKY-Transkriptionsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Induktion publizierte (Turck *et al.*, 2004) verwendete dafür kein Gesamtproteinextrakt, sondern ein Proteinextrakt aus Zellkernen. Um die Konzentration von WRKY-Transkriptionsfaktoren im Proteinextrakt zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit, der Anleitung von Turck *et al.* im

Wesentlichen folgend, Zellkerne angereichert und aus diesen Proteine extrahiert. Dazu wurden Primärblätter mit Carborund verwundet. Abb. 3.21 und 3.22 zeigen einen Western Blot und einen ELISA durchgeführt mit Proteinextrakt aus einer an Kernproteinen angereicherten Fraktion. Während mit anti-Aktin als Marker für das Zytosol im Western Bolt deutliche Signale detektiert wurden, konnte mit anti-HvWRKY1 kein Protein nachgewiesen werden. Dass tatsächlich eine Anreicherung von Kernproteinen stattfand, demonstrieren das unterschiedliche Proteinmuster nach Färbung mit Ponceau-Rot und die geringere Aktinkonzentration im Kernextrakt. Im sensitiveren ELISA wurde nur ein sehr geringer Anstieg der Extinktion 6 h bzw. 24 h nach Verwundung gemessen. Diese relativ späten Zeitpunkte nach Verwundung wurden verwendet, um sicher zu gehen, dass ausreichend Zeit für eine Proteinakkumulation zur Verfügung stand. Es konnte jedoch auch mit aufgereinigten Kernproteinen keine Akkumulation von HvWRKY1 nachgewiesen werden.

Turck *et al.* (2004) untersuchten die Veränderung des Proteinmusters in Petersilie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit dem Elizitor pep25. Dabei fanden sie mit einem Antikörper gegen die meisten WRKY-Faktoren heraus, dass in Zellen einer Suspensionskultur zwei Stunden nach Elizitorgabe das WRKY-Proteinmuster deutlich differiert. Die meisten Proteine wurden stärker gebildet, wenige Signale auf dem zweidimensionalen Gel verschwanden auch. Nach 10 Stunden hatte die Menge der meisten Proteine wieder das Grundniveau erreicht, einige wiesen aber weiterhin eine deutlich erhöhte Konzentration auf. Für WRKY1 aus Petersilie konnten Turck *et al.* trotz der schnellen und transienten Transkriptakkumulation 15 min nach Zugabe von pep25 zeigen, dass die Akkumulation des Proteins 4 h nach Elizitorbehandlung das Maximum erreichte und erst nach 8 Stunden merklich abnahm. Somit kann festgehalten werden, dass der in dieser Arbeit untersuchte Zeitraum sich mit dem von Turck *et al.* gewählten, in dem deutlich sichtbare Veränderungen der Menge vieler WRKY-Faktoren nach Elizitorbehandlung auftraten, deckt.

Insgesamt ist die Extinktion in ELISAs mit angereicherten Zellkernproteine deutlich höher als unter Verwendung von Gesamtproteinextrakt. Dies spricht dafür, dass eine Anreicherung von Kernproteinen, einschließlich des kernlokalisierten HvWRKY1 (Kap. 4.4), stattgefunden hat, an das der Antikörper bindet. Allerdings kann man nicht ausschließen, dass im ELISA unspezifische Bindungen

nachgewiesen werden. Insgesamt sind die Bindung von anti-HvWRKY1 an HvWRKY1 oder die Expression von HvWRKY1 nur schwach, da sie nicht im Western Blot detektiert werden konnten. Weder nach Inokulation, noch nach Verwundung, konnte eine deutliche Veränderung der Proteinmenge festgestellt werden, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der RT-PCRs steht, die eine deutliche Steigerung der Transkription für *HvWRKY1* zeigten.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Qualität bzw. Spezifität des Antikörpers, der geringe Mengen HvWRKY1 nicht erkennt. Es wäre jedoch beispielsweise auch denkbar, dass das Protein einem schnellen Abbau unterliegt. Es häufen sich die Hinweise, dass posttranslationale Modifikationen eine große Rolle für die Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren spielen (Kap.5.2.3., Menke *et al.*, 2005). Diese könnten die Erkennung des Proteins durch einen Antikörper erschweren. Da die verwendeten Antikörper keine sichere Detektion von HvWRKY1 ermöglichten, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, wie die Veränderung der Transkription sich auf die HvWRKY1-Proteinmenge auswirkt.

5.2.3 Regulation durch MAP-Kinasen

Neben der relativ gut untersuchten Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren auf Transkriptionsebene (Kap. 4.2.1) gibt es neuere Publikationen, die eine Regulation über MAP-Kinase-Signalwege zeigen (Ülker und Somssich, 2004, Menke *et al.*, 2005). Dabei ist umstritten, ob der Transkriptionsfaktor direkt phosphoryliert wird, oder ein Repressor- oder Aktivatormolekül, das seinerseits die Aktivität des WRKY-Faktors beeinflusst.

Einen Hinweis dafür, dass die meisten WRKY-Faktoren in Petersilie posttranslational modifiziert werden, fanden Turck *et al.* (2004): Viele WRKY-Faktoren wandern während der zweidimensionalen Gelelektrophorese als perlenkettenähnlich angeordnete Punkte, die verschiedene Modifikationen eines Faktors darstellen könnten. Dieses Muster verändert sich nach Elizitation mit pep25. Für die posttranskriptionale Aktivierung von PcWRKY1 konnten Cormack *et al.* (2002) zeigen, dass keine *de novo* Proteinsynthese nötig ist.

Eine aktuelle Arbeit von Menke *et al.* (2005) wies eine direkte Phosphorylierung von WRKY1 aus Tabak durch die MAPK SIPK (*salicylic acid-induced protein kinase*) nach. Die Phosphorylierung führte zu einer verstärkten Bindung von WRKY1 an eine W-Box aus dem Promotor der Chitinase *CHN50* aus Tabak.

Asai *et al.* (2002) gelang es in *Arabidopsis*, die erste vollständige Signalkette von einem Elizitor bis zu den Effektorgenen aufzudecken. Sie beginnt mit dem Flagellin-Elizitor flg22 und seinem Rezeptor, der Rezeptorkinase FLS2, und endet bei den WRKY-Transkriptionsfaktoren AtWRKY22 und 29, die wiederum verschiedene Abwehrgene aktivieren. Das Bindeglied dazwischen bildet eine MAPK-Kaskade mit AtMEKK1, AtMKK5/AtMKK6 und AtMPK3/AtMPK6 (Zipfel *et al.*, 2004). Die Aktivierung dieser MAPK-Kaskade führt zu Resistenz gegenüber pilzlichen und bakteriellen Pathogenen. Asai *et al.* gehen davon aus, dass AtWRKY22 bzw. 29 nicht direkt phosphoryliert werden, sondern dass die Regulation über ein Repressorprotein erfolgt, welches die Transkription von AtWRKY22 oder 29 regelt, da AtWRKY22 oder 29 allein ausreicht, um den selben Effekt wie der Elizitor und die Aktivierung der MAPK-Kaskade zu erzielen.

Andreasson *et al.* (2005) postulieren ebenfalls eine indirekte Regulation von AtWRKY25 und 33. Sie konnten mit MKS1 einen Regulator pflanzlicher Abwehrmechanismen charakterisieren, der durch die Kinase MPK4 phosphoryliert wird und an AtWRKY25 und 33 bindet. Er fungiert möglicherweise als Adaptor für andere Proteine. Kim und Zhang (2004) fanden hingegen heraus, dass in *gel-shift* Experimenten die Bindung von WRKY-Transkriptionsfaktoren an W-Boxen unabhängig von einer Phosphorylierung ist. Eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase veränderte die Bindungseigenschaften nicht. Ähnlich wie Asai *et al.* (2002) bemerkten Wan *et al.* (2004), dass die Behandlung von Pflanzen mit dem Elizitor Chitin zu einem erhöhten mRNA-Level der MAPK *AtMPK3* führte und die Kinaseaktivität von *AtMPK3* und *AtMPK6* deutlich anstieg. Gleichzeitig wurde die Expression von *AtWRKY22*, *29*, *33* und *53* durch diese Behandlung verstärkt. Ferner war die Expression von *AtWRKY33* und *53* in transgenen NtMEK2^{DD}-*Arabidopsis*pflanzen, die die MAPKK NtMEK2 nach Applikation von Dexamethason überexprimieren, induziert. Die Autoren schließen daraus, dass WRKY-Transkriptionsfaktoren *downstream* von AtMPK6/AtMPK3 wirken und das Signal der MAPK-Kaskade zu anderen *downstream* gelegenen Genen weiterleiten (Wan *et al.*, 2004).

In NtMEK2^{DD}-Tabakpflanzen konnten Kim und Zhang (2004) ebenfalls eine gesteigerte Expression mehrerer WRKY-Faktoren (*NtWIZZ*, *NtWRKY3*, *NtDBP3*, *NtSubD48*) nachweisen. Ebenfalls in Tabak untersuchten Liu *et al.* (2004) Kandidatengene, die eine Rolle in der durch das Resistenzgen *N* vermittelten

Resistenz von Tabak gegenüber dem Tabakmosaikvirus (TMV) spielen. Neben der MAPK *NTF6/NRK1* und der MAPKK *MEK1/NQK1* sind auch *NtWRKY1*, 2 und 3 an der Ausprägung der Resistenz beteiligt. Liu *et al.* schließen daraus auf eine Verbindung zwischen der MAPK-Kaskade und den WRKY-Faktoren.

MAP-Kinasen spielen also eine Rolle in der Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren. Allerdings wurde dieser Zusammenhang bisher nur in dikotylen Pflanzen untersucht. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob dies auch für die monokotyle Gerste gilt, wurde in dieser Arbeit der MEK Inhibitor U0126 (Asai *et al.*, 2002) verwendet, der MAPKKs inhibiert. Dieser Inhibitor wurde für ein *uptake*- und einen *floating*-Experiment benutzt (Kap.1.9, Abb. 3.47 und 3.48), um Unterschiede in der Resistenzantwort der Gerste durch die Behandlung erkennen zu können. Es wurde die vom Hersteller empfohlene Konzentration von 10 µM des Inhibitors verwendet, was zu keiner sichtbaren Schädigung des Blattgewebes führte, obwohl dies die 10-fache der von Asai *et al.* in einem ähnlichen Experiment verwendeten Menge ist.

Zur Ermittlung der Penetrationsrate ist es besonders im *uptake*-Experiment wichtig, verschiedene Blattbereiche zu unterscheiden (Basis, Mitte, Spitze), da durch die Behandlung ein Gradient innerhalb des Blattes entsteht. Außerdem unterscheiden sich die verschieden alten Blattebereiche hinsichtlich ihrer Resistenz. Abb. 3.46 und 3.47 zeigen, dass die Blattbasis tendenziell resistenter ist als die Blattspitze. Insgesamt zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den Behandlungen (*floating* und *uptake* Experiment). In beiden Fällen führte die Behandlung zu einer leicht erhöhten Penetrationsrate, was zeigt, dass die Inhibierung aller MAPKKs einen Einfluss auf die Penetration von *Bgh* hat. Ein direkter Effekt des Inhibitors auf den Pilz kann ausgeschlossen werden, da die Blätter nach der Behandlung gründlich abgespült wurden.

Dass die Inhibitorbehandlung einen Effekt auf *HvWRKY1* hat, zeigt das Ergebnis der RT-PCR in Abb. 3.46. Verglichen mit der Kontrolle ist *HvWRKY1* nach zwei Stunden *uptake* der U0136-Lösung deutlich induziert. Dieser Effekt nivelliert sich 4 h nach Inokulation mit *Bgh*.

Da U0136 alle MAPKKs hemmt und somit viele Stoffwechselwege beeinflusst, kann nicht genau festgestellt werden, ob es sich bei der erhöhten Anfälligkeit um einen sekundären Effekt handelt, der u. U. einen auftretenden Effekt auf WRKY-Faktoren überdeckt. Daher haben Asai *et al.* (2000) den Effekt des MAPKK-

Inhibitors direkt auf den Promotor des entsprechenden Gens mit Hilfe von Promotor-Luziferase-Konstrukten in *Arabidopsis* Protoplasten untersucht.

Falls das Modell von Asai *et al.* (2002) zutrifft, so wird durch eine MAPK-Kaskade ein Repressor negativ beeinflusst, wodurch spezifische WRKY-Faktoren aktiviert werden. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Kap. 4.3.3), dass zumindest HvWRKY1 und 2 in Bezug auf *BghA6* als Suszeptibilitätsfaktoren wirken, würde eine Aktivierung dieser beiden WRKY-Faktoren zu einer erhöhten Penetrationsrate führen. Allerdings handelt es sich bei WRKY-Faktoren um eine große Genfamilie, so dass durch die Beeinflussung vieler WRKY-Faktoren durch einen Inhibitor auch gegenläufige Effekte entstehen können. Ülker und Somssich (2004) postulieren hingegen ein Modell der direkten Regulation von WRKY-Faktoren durch MAP-Kinasen, in dem alle W-Boxen eines Promotors bereits mit verschiedenen WRKY-Transkriptionsfaktoren besetzt sind. Ein Stimulus führt über eine MAPK-Kaskade zur Phosphorylierung dieser WRKY-Faktoren, die sich daraufhin von der jeweiligen W-Box lösen und dadurch die Bindung eines anderen WRKY-Familienmitgliedes ermöglichen, das dann die Transkription des Gens aktiviert. Dieses Modell konnte in Petersilie von Turck *et al.* (2004) mittels Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) bestätigt werden. Sie konnten zeigen, dass die W-Boxen im Promotor von *PcPR1-1* und *PcWRKY1* konstitutiv mit WRKY-Faktoren besetzt sind und dass sich dieses Muster nach Elizitorbehandlung ändert.

Es kann also festgehalten werden, dass die Regulation von WRKY-Transkriptionsfaktoren auf verschiedenen Ebenen erfolgt. Neben der Kontrolle der Expression (Kap. 5.2.1) findet wahrscheinlich eine Regulation mittels Phosphorylierung statt. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass der Transport in den Nukleus einen Regulationsmechanismus darstellt (Kap. 5.4). Neuere Ergebnisse konnten auch eine Interaktion von AtWRKY7 mit Calmodulin nachweisen (Park *et al.*, 2005). Zusammen mit der beschriebenen Redundanz innerhalb der Multigenfamilie und der Autoregulation von WRKY-Faktoren (Eulgem *et al.*, 1999, Asai *et al.*, 2002, Robatzek und Somssich, 2002) ergibt sich ein kompliziertes Regulationsnetzwerk.

5.3 Funktionsanalyse von WRKY-Faktoren mittels *particle bombardment*

Die Beschreibung der Expression von WRKY-Faktoren durch Inokulation mit dem Echten Gerstenmehltaupilz in Kapitel 4.2 lässt den Schluss zu, dass diese an der Ausbildung der Interaktion von Pflanze und Pilz beteiligt sind. Allerdings fehlt bisher noch die funktionale Überprüfung dieser Theorie. Eine Möglichkeit dazu bietet das von Schweizer *et al.* (1999, 2000) und Shirasu *et al.* (1999) für Getreide entwickelte System der transienten Transformation von Epidermiszellen mittels *particle bombardment* (Kap. 2.15).

5.3.1 Vor und Nachteile der Methode der transienten Transformation

Die Methode der transienten Transformation durch *particle bombardment* bietet den großen Vorteil, dass sich innerhalb relativ kurzer Zeit mit einem vergleichsweise geringen Kostenaufwand viele Kandidatengene bezüglich ihres Einflusses auf die Resistenz oder Suszeptibilität gegenüber einigen Pathogenen untersuchen lassen. Dies ermöglicht beispielsweise eine Vorauswahl von Kandidaten für die Erzeugung transgener Pflanzen, deren Herstellung in Gerste immer noch schwierig und zeitaufwendig ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass auch Gene untersucht werden können, deren Überexpression oder *knock-down* in definierten Phasen der pflanzlichen Entwicklung letal wären. Dies kann sich allerdings auch als Nachteil entpuppen: Unter definierten Bedingungen tritt möglicherweise kein Phänotyp auf. Da die Transformation mittels *particle bombardment* auf Epidermiszellen beschränkt ist, können nur solche Gene getestet werden, die auch in diesem Gewebe exprimiert werden. Dies wurde für alle hier untersuchten Gene überprüft. *HvWRKY4*, 5 und 6 werden in der Epidermis nicht exprimiert und konnten daher mit dieser Methode nicht getestet werden. Da bei dieser invasiven Methode das Gewebe verletzt wird kann es außerdem sein, dass Reaktionen auf diese Verwundung bis hin zum Zelltod den Effekt des untersuchten Gens überdecken. Der Effekt des jeweiligen Kandidatengens wird zwar auf Einzelzellniveau untersucht, er kann allerdings auch durch Einflüsse der Nachbarzellen moduliert werden. Weiterreichende Signalwege hingegen werden in einem artifiziellen System wie den hier verwendeten Blattsegmenten nicht berücksichtigt.

Da die Zellen nicht nur mit dem zu untersuchenden Gen, sondern auch mit dem Markergen *GFP* transformiert werden, spielt die Kotransformationsrate beider Gene

eine Rolle: Sie beträgt in diesem Gestensystem etwa 75 % (Schultheiß *et al.*, 2002). Es ist nötig, ausreichend viele Zellen auszuwerten, da nicht alle grün fluoreszierenden Zellen auch das Kandidatengen enthalten. Führt die Überexpression oder der *knock-down* des Kandidatengens zum Tod der transformierten Zellen, so sinkt die Zahl der *GFP*-exprimierenden Zellen, da *GFP* nur in lebenden Zellen gebildet wird. Daher können Gene, die an der Regulation des Zelltodes beteiligt sind, nur bedingt untersucht werden. In diesen Fällen wird der beobachtete Effekt eher unter- als überschätzt. Dies kann dazu führen, dass Gene mit nur geringem Einfluss auf die Interaktion von Gerste mit *Bgh* übersehen werden und nur solche, die einen starken Effekt verursachen, als Kandidaten für weitere Experimente ausgewählt werden.

Ein weiterer Grund für eine große Anzahl an auszuwertenden Zellen und Experimenten ist die Tatsache, dass die Größe der Penetrationsrate z. B. durch die Qualität des Pilzes, der Beschichtung (*coating*) der Wolframpartikel und der Effizienz jedes einzelnen Transformationsereignisses deutlich schwanken kann. Eine hohe Anzahl von Wiederholungen ermöglicht eine statistische Absicherung der Ergebnisse. Trotz aller Einschränkungen handelt es sich bei dieser Methode um ein zuverlässiges Instrument zur Untersuchung der Interaktion Gerste-Mehltau (Schultheiß *et al.*, 2002; Schultheiß *et al.*, 2003a; Schultheiß *et al.*, 2003b). Schultheiß *et al.* (2005) konnten vor kurzem zeigen, dass der im transienten Versuchsansatz beobachtete Effekt gesteigerter Suszeptibilität von Gerste gegenüber *Bgh* nach Überexpression von RACB auch in stabil transgenen Pflanzen reproduziert werden konnte.

5.3.2 Überexpression und RNA-Interferenz von Kandidatengen

Mit der Methode der transienten Transformation kann sowohl eine Überexpression als auch ein *knock-down* eines Gens durchgeführt werden. Die Überexpression setzt voraus, dass die vollständige Nukleotidsequenz des Gens fehlerfrei bekannt und kloniert ist. Da für die Überexpression der starke, konstitutive CaMV-35S-Promotor verwendet wird, kann es leicht zu unphysiologisch hohen Konzentrationen des Kandidatengens kommen, was wiederum zu Artefakten führen kann. Im Hinblick auf WRKY-Faktoren ist dies besonders bedeutsam, wenn man das Modell von Turck *et al.* (2004) berücksichtigt, wonach WRKY-Faktoren W-Boxen konstitutiv besetzen und die Regulation über einen konzentrationsabhängigen Verdrängungsmechanismus zwischen verschiedenen WRKY-Faktoren abläuft.

Zur Durchführung des *knock-downs* wurde der Mechanismus der RNA-Interferenz, auch *post transcriptional gene silencing* (PTGS) genannt, verwendet (Susi *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus basiert darauf, dass in die Pflanzenzelle eingebrachte doppelsträngige RNA (dsRNA) als fremd erkannt und die dazu homologe mRNA des Zielgens in einem sequenzspezifischen Mechanismus abgebaut wird. Die dsRNA wird von einem Enzym namens DICER in *small interfering* (si)RNAs zerteilt, die in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingelagert werden. Dieser Komplex vermittelt die Bindung von siRNA und mRNA des Zielgens, wodurch letztere für den Abbau markiert wird. Die biologische Funktion von RNA-Interferenz liegt wahrscheinlich in der Abwehr von viralen Infektionen und der Inaktivierung von Retrotransposons. Das *silencing* eines Gens mittels RNA-Interferenz erfolgt in hohem Maße sequenzspezifisch. Deshalb ist es gerade in einer Multigenfamilie wie der WRKY-Familie wichtig, für spezifische *knock-downs* den Bereich für die Erzeugung der dsRNA so zu wählen, dass er keine Sequenzähnlichkeit zu anderen Genen aufweist.

5.3.3 RNAi und Überexpression von WRKY-Transkriptionsfaktoren

Eckey (2002) konnte im Rahmen ihrer Dissertation zeigen, dass RNAi von *HvWRKY1* in Gersten cv. Pallas zu einer Reduktion der relativen Penetrationsrate um 32 % führte, die Epidermiszellen also resistenter gegenüber *BghA6* wurden (vgl. Abb. 3.30). Dieses Ergebnis konnte durch Überexpression desselben Gens bestätigt werden: Sie führte zu erhöhter Suszeptibilität (Abb. 3.23). Ein ähnliches Ergebnis lieferten Überexpression und RNAi von *HvWRKY2*, das eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *HvWRKY1* aufweist. Besonders für *HvWRKY2* fällt allerdings auf, dass der Effekt der Überexpression etwa viermal größer ist als der in den RNAi-Versuchen. Eine mögliche Erklärung dafür liegt darin, dass die Koexpressionsrate der dsRNA des Zielgens und des Reportergens *GFP* nur etwa 75 % beträgt (Schultheiß *et al.*, 2002). Der durch *knock-out* erzielte Effekt wird also eher unterschätzt. Eine weitere Ursache könnte im Mechanismus des RNAi selbst liegen, da manche dsRNAs besser als andere abgebaut werden (Dykxhoorn *et al.*, 2003). Außerdem kann der *knock-down* eines WRKY-Faktors durch andere Mitglieder der Multigenfamilie z. T. ausgeglichen werden kann, während der durch die Überexpression entstandene Effekt voll zum Tragen kommt. Daher ist es besonders wichtig, beide Experimente durchzuführen.

Beide Gene können als Suszeptibilitätsfaktoren bezeichnet werden. Es ist durchaus bekannt, dass WRKY-Transkriptionsfaktoren nicht nur als positive (Eulgem *et al.*, 1999, Chen und Chen, 2000, 2002), sondern auch als negative (Robatzek und Somssich, 2002) Regulatoren agieren. Zusätzlich kann sogar dasselbe Gen sowohl als Repressor als auch als Aktivator bestimmter Gene fungieren. Beispielsweise reprimiert AtWRKY70 JA-induzierbare Gene und induziert SA-regulierte Gene (Li *et al.*, 2004). AtWRKY6 aktiviert den *PR1*-Promotor und hemmt seinen eigenen Promotor und den eines anderen WRKY-Faktors (Robatzek und Somssich, 2002). Ein möglicher Mechanismus für die Funktion von HvWRKY1 als Suszeptibilitätsfaktor wäre, dass HvWRKY1 Abwehrgene inhibiert, indem er z. B. konstitutiv die Promotorbindestellen anderer Abwehrgene bindet, und nach einem Stimulus von anderen, aktivierenden WRKY-Faktoren aus der Bindung verdrängt wird. *Knock-down* von *HvWRKY1* könnte dann dazu führen, dass aktivierende Faktoren die Expression dieser Abwehrgene erhöhen bzw. dass deren Expression schneller abläuft und die Zellen resistenter gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz werden.

Spezifität von RNA-Interferenz innerhalb einer Multigenfamilie

Es stellt sich die Frage, wie spezifisch RNAi in der WRKY-Multigenfamilie wirkt. Wie Abb. 3.24 zeigt, ist der Effekt von RNAi mit dsRNA von *HvWRKY2* reproduzierbar, auch wenn unterschiedliche Bereiche des Gens für die Herstellung der dsRNA herangezogen wurden. Da es sich hier um ein Mitglied einer großen Multigenfamilie handelt, wurde zusätzlich die Spezifität von RNAi für *GFP:HvWRKY2* überprüft (Abb. 3.32). Verglichen mit der Negativkontrolle, für die Zellen mit *GFP:HvWRKY1* zusammen mit dsRNA eines humanen Tyroidrezeptors transformiert wurden, führte im Versuchsansatz dsRNA von *HvWRKY2* nur zu einer sehr geringen Reduktion der Anzahl *GFP:HvWRKY1* exprimierender Zellen. In der parallel durchgeführten Positivkontrolle konnte gezeigt werden, dass die verwendete dsRNA von *HvWRKY2* funktional war und die Anzahl der grün fluoreszierenden *GFP:HvWRKY2*-Zellen merklich reduzierte. Allerdings ergab eine Varianzanalyse nur ein $p = 0,078$. Auffällig ist, dass die Koexpressionsrate von *DsRed* und *GFP* in diesen Experimenten geringer war als die erwarteten 75 %. Sie betrug in der Kontrolle 57 %.

Die Sequenzähnlichkeit von *HvWRKY1* und 2 beträgt auf Nukleotidebene 88 %. Schweizer *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Expression einer

Dihydroflavonolreduktase in Mais nicht von der dsRNA des Homologs aus Gerste reprimiert werden konnte, obwohl die Sequenzähnlichkeit beider Gene 81 % betrug. Auch Schultheiß (2003c) konnte in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit zeigen, dass dsRNA von *RacB* die Expression anderer Mitglieder der RAC/ROP Familie nur leicht reduzierte, RNA-Interferenz innerhalb dieser Genfamilie also spezifisch zwischen den verschiedenen Mitgliedern unterscheidet. Lediglich *Rop4* wurde durch dsRNA von *RacB* beeinflusst, was Schultheiß darauf zurückführt, dass diese beiden Gene einen 52 bp langen, nicht unterbrochenen, identischen Bereich besitzen. Das für den RNAi-Mechanismus wichtige Enzym DICER spaltet in Pflanzen die dsRNA in etwa 22 nt kurze Fragmente (Bernstein *et al.*, 2001), die letztlich die Sequenzspezifität des RNA-Abbaus vermitteln.

Die Frage, wie spezifisch RNAi in der WRKY-Multigenfamilie ist, lässt sich nicht abschließend beantworten. Zur statistischen Absicherung des Ergebnisses könnte das Experiment mit größeren Zellzahlen wiederholt werden. Dazu wäre es wünschenswert weitere WRKY-Faktoren zu vergleichen.

RNA-Interferenz mit dsRNA von *HvWRKY3* führte zu einem anderen Ergebnis als der *knock-down* von *HvWRKY1* und 2. Abb. 3.31 zeigt, dass sich der Mittelwert der Penetrationsrate von Kontrolle und Versuchsansatz aus acht Experimenten nicht unterscheidet. Allerdings war *HvWRKY3* nur schwach in der Epidermis exprimiert, dafür stärker im Mesophyll des Blattes. Es könnte daher sein, dass der *knock-down* des schwach exprimierten Gens nur einen geringen Einfluss hatte.

5.3.4 Der Effekt von *mlo* auf WRKY-Faktoren

Eckey (2002) beobachtete in den RNAi-Experimenten mit dsRNA von *HvWRKY1* eine Abnahme der Anzahl GFP-exprimierender, d. h. lebender, Zellen im Vergleich zu mit dsRNA von TR transformierten Kontrollblättern. Sie schloss daraus, dass ein *knock-down* von *HvWRKY1* den Zelltod fördert und *HvWRKY1* ein negativer Zelltodregulator ist. Eckey spekuliert weiter, dass eine Verbindung zwischen *HvWRKY1* und dem negativen Regulator von Zelltod Mlo (Kap. 1.3) bestehen könnte, dessen *knock-down* ebenfalls zu Resistenz führt (Büschges *et al.*, 1997, Schweizer *et al.*, 2000). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit *knock-down* bzw. Überexpression von *HvWRKY1* und 2 in verschiedenen *mlo*-tragenden Kultivaren bzw. in solchen, die eine Mutation in dem für die *Mlo*-Wirkung benötigten Gen *Ror1* (*required for mlo-specified resistance*) besaßen, einen Einfluss auf die Penetrationsrate hatten. Hückelhoven *et al.* (2003b) konnten mit diesem

Versuchsansatz zeigen, dass die Überexpression des Suszeptibilitätsfaktors *BAX Inhibitor 1*, einem Inhibitor des BAX-vermittelten, programmierten Zelltods, in *mlo*-tragenden Kultivaren zu Suszeptibilität führte. Die *mlo*-vermittelte Resistenz konnte in diesem Falle überwunden werden. Dies zeigt, dass das Testsystem prinzipiell funktioniert. In dieser Arbeit konnte *mlo*-vermittelte Resistenz in keiner der drei verwendeten Kultivare die gebrochen werden.

Wie in Kap. 4.2 beschrieben, unterscheidet sich das Expressionsmuster von *HvWRKY1* und *2* in den drei untersuchten Kultivaren, die eine Mutation im *Mlo*-Signalweg aufwiesen, nicht wesentlich von dem in cv. Ingrid Wildtyp, in der der beschriebene Suszeptibilitätseffekt der beiden Gene festgestellt wurde. Dies gibt einige Hinweise drauf, dass die Regulation auf Transkriptionsebene für WRKY-Faktoren nicht die Hauptrolle spielt (Kap. 4.2) oder dass die Expression dieser WRKY-Faktoren unabhängig von *Mlo* reguliert wird. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die z. T. festgestellten geringfügigen Unterschiede in der Geschwindigkeit oder Dauer der Expressionssteigerung ausreichen, um die unterschiedliche Wirkung in den Kultivaren zu erklären.

Die Ergebnisse der Expressionsstudien und der transienten Transformationen lassen verschiedene Schlüsse zu: Es ist möglich, dass *HvWRKY1* bzw. *2* und *Mlo* unabhängig voneinander als Suszeptibilitätsfaktoren agieren. Die Induktion beider WRKY-Gene erfolgt unabhängig vom Vorhandensein von *Mlo*. Die Resistenz in *mlo-5* tragenden Kultivaren konnte durch Überexpression bzw. *knock-down* nicht gebrochen werden. Allerdings führte Überexpression von *HvWRKY1* bzw. *2* in *mlo-5* Kultivaren nicht zu Suszeptibilität. Dies könnte damit erklärt werden, dass der *mlo*-Effekt stärker ist als der der WRKY-Faktoren, der daher in diesem Testsystem nicht mehr beobachtet werden kann.

Ebenso können die beobachteten Effekte damit erklärt werden, dass die untersuchten WRKY-Faktoren *upstream* von *Mlo* wirken. Ausfall von *Mlo* (*mlo5*) würde dazu führen, dass trotz Überexpression der WRKY-Faktoren Resistenz auftritt. Das gleiche Ergebnis tritt nach RNAi der Transkriptionsfaktoren auf. So könnten WRKY-Transkriptionsfaktoren z. B. die Expression von *Mlo* direkt oder von Faktoren *upstream* von *Mlo* regulieren.

Letztendlich wäre es auch denkbar, dass WRKY-Faktoren *downstream* von *Mlo* wirken, wenn man davon ausgeht, dass WRKY-Faktoren nur nach vorhergehender Phosphorylierung aktiv sind (Menke *et al.*, 2005). Dann würde ein Ausfall von *Mlo*

dazu führen, dass *HvWRKY1* und 2 nach Überexpression zwar vorhanden, aber nicht aktiv und die Gerstenzellen resistent gegenüber *Bgh* sind, ebenso wie nach dem *knock-down* der WRKY-Faktoren direkt.

Bei diesen Interpretationen darf nicht vergessen werden, dass besonders die durch *knock-down* einzelner WRKY-Faktoren erzielten Effekte wahrscheinlich durch andere WRKY-Faktoren z. T. ausgeglichen werden können. Interessant wäre es daher, ein *silencing* mehrerer WRKY-Faktoren gleichzeitig durchzuführen.

Im Unterschied zu den RNAi-Experimenten von Eckey (2002) mit dsRNA von *HvWRKY1*, konnte in dieser Arbeit für den *knock-down* von *HvWRKY2* kein Unterschied in der Anzahl der *GFP*-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Auch ein *knock-down* in cv. 105-6 (*Mlo*, *ror1-2*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid x Sultan5, Abb. 3.29) führte für keines der beiden Gene zu einer Beeinflussung der Anzahl der *GFP*-exprimierenden Zellen. Lediglich die Überexpression von *HvWRKY2* in cv. 122 (*mlo-5*, *Ror1*, *Ror2*, genetischer Hintergrund Ingrid, Abb. 3.27) reduzierte die Anzahl *GFP*-exprimierender Zellen verglichen mit der Kontrolle. D. h. Überexpression von *HvWRKY2* vor einem *mlo*-Hintergrund könnte zu Zelltod führen. Einschränkend muss dabei berücksichtigt werden, dass die Zellzahl in den Kontrollen zwar achtmal größer war als im Versuchsansatz, gleichzeitig aber die Transformationsrate in allen drei Experimenten sehr gering ausfiel.

5.3.5 *Knock-down* und Überexpression weiterer *Bgh*-responsiver Gene

Außer den WRKY-Transkriptionsfaktoren wurden weitere Gene, deren Expression durch *Bgh*-Inokulation deutlich gesteigert war (Eckey, 2002, Jansen 2002), funktional untersucht (Kap. 1.6.2). Die Expression in der Epidermis wurde für alle Gene, mit denen *knock-downs* durchgeführt wurden, überprüft. Da von den meisten Genen nur ein kurzer Bereich der Sequenz bekannt war, musste dieser für die RNA-Interferenzexperimente verwendet werden, was bedeutet, dass nicht immer optimale Sequenzen ausgewählt werden konnten. Da nur von der Isomerase die komplette Sequenz bekannt war, wurden nur mit diesem Gen Überexpressionsversuche durchgeführt.

Lediglich der *knock-down* der MAPKKK (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*) der Raf-Familie in der cv. Pallas, nicht aber in Ingrid, und der RLK (*receptor-like protein kinase*, Kap. 4.2.1) in der cv. Ingrid, nicht in Pallas, hatten einen Einfluss auf die Penetrationsrate von *BghA6*: *Knock-down* der MAPKKK führte zu erhöhter

Anfälligkeit, *knock-down* der RLK zu größerer Resistenz. MAPK-Kaskaden spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion nach Pathogenbefall (Kap. 1.4). Asai *et al.* (2000) konnten eine vollständige Signalkaskade ausgehend von einem Elizitor über eine MAPK-Kaskade zu zwei WRKY-Transkriptionsfaktoren nachweisen. Die hier untersuchte MAPKKK weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu CTR1 (*constitutive triple response*; Kieber *et al.* 1993) und EDR1 (*enhanced disease resistance*; Frye *et al.*, 2001) auf, die in Zusammenhang mit Abwehrreaktionen gegenüber *Erysiphe chicoracearum*, dem *Arabidopsis*-Mehltaupilz, stehen (Frye und Innes, 1998, Frye *et al.* 2001). In dieses Bild passt die hier gezeigte Rolle der Gersten-MAPKKK in der Ausbildung von Resistenz gegenüber *Bgh*.

Der *knock-down* der RLK führte zu erhöhter Resistenz. Diese RLK besitzt eine extrazelluläre Lektindomäne, welche die Bindung von Oligosacchariden, aber auch von Phytohormonen vermitteln könnte (Herve *et al.*, 1996, 1998). Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass diese Klasse der lecRLKs eine Funktion in der Übermittlung externer Signale in eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters einzelner Gene hat. Man kann spekulieren, dass ein solches Protein einen pflanzlichen oder pilzlichen Suszeptibilitätsfaktor (Elizitor) binden könnte und dieses Signal dann an eine MAPK-Kaskade weiterleiten kann. Ähnliches konnten Asai *et al.* (2000) für den Flagellinrezeptor FLS2 zeigen, der neben einer Bindestelle für den Elizitor FLG22 ein LRR-Motiv (*leucine rich repeat*) und eine Kinasedomäne besitzt. Allerdings führte der *knock-down* der lecRLK zu erhöhter Resistenz. Die hier untersuchte lecRLK ist also – bezogen auf *Bgh* – ein Suszeptibilitätsfaktor.

Knock-down des *scarecrow-like* Proteins (Abb. 3.35) führte bei Inokulation 24 h nach der Transformation in cv. Ingrid zu mehr Anfälligkeit gegenüber *Bgh*, nicht aber in cv. Pallas, weder bei Inokulation nach 4 noch nach 24 h. Bei diesem Gen handelt es sich um einen putativen Transkriptionsfaktor der GRAS-Familie, die in Reis 57 und in *Arabidopsis* 32 Mitglieder besitzt (Riechmann *et al.*, 2000, Tian *et al.*, 2004). *Scarecrow*-Proteine regulieren in *Arabidopsis* die Zellteilung in Spross- und Wurzelmeristemen (Di Laurenzio *et al.*, 1996, Helariutta *et al.*, 2000). Es ist allerdings immer noch umstritten, ob GRAS-Proteine tatsächlich als Transkriptionsfaktoren wirken (Ogawa *et al.*, 2000, Richards *et al.*, 2000, Itoh, *et al.*, 2002, Morohashi, *et al.*, 2003).

Keinen Einfluss auf die Penetrationsrate von *Bgh* hatten Überexpression und *knock-down* mit dsRNA einer Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase sowie der *knock-down*

eines ABA- und stressinduzierbaren Proteins. Die Isomerase gehört zur FKBP-Familie der Immunophiline. Diese Proteine sind für die korrekte Faltung von Proteinen von Bedeutung. Ausserdem beeinflussen sie den Redox-Status von Zellen (Romano *et al.*, 2005).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine starke Induktion dieser Gene nach Inokulation nicht bedeutet, dass sie für die Abwehr der Penetration von *Bgh* direkt erforderlich sind. Möglicherweise werden Effekte dieser Gene aber auch durch andere Komponenten ausgeglichen oder überdeckt. Die Experimente mit dem *scarecrow-like* Protein und der RLK zeigen, welche große Rolle sowohl der Zeitpunkt der Inokulation als auch das verwendete Gerstenkultivar für das Ergebnis spielt: Der Effekt der MAPKKK in der cv. Pallas war deutlich zu erkennen, in Ingrid konnte in zwei Experimenten kein Unterschied zwischen Kontrolle und Versuchsansatz festgestellt werden (Abb. 3.34). Hingegen konnte für die RLK nur in Ingrid, nicht aber in Pallas eine Änderung der Penetrationsrate nachgewiesen werden (Abb. 3.36). Dies könnte aber auch daran liegen, dass in Ingrid erst 24 h nach der Transformation, in den Versuchen mit Pallas aber schon 4 h nach der Transformation inokuliert wurde. In den Experimenten, in denen zwei verschiedene Zeitpunkte für die Inokulation gewählt wurden und ein Unterschied in den Effekten auf die Penetrationsrate beobachtet wurde, trat dieser nach 24 h und nicht nach 4 h auf. Daher wurde in allen folgenden Experimenten 24 h nach der Transformation inokuliert. Laut Nielsen *et al.* (1996) liegt der mögliche Zeitraum für die Inokulation bei 4 bis 96 Stunden nach der Transformation, da die Penetrationsrate von *Bgh* durch die Verwundung der Blattoberfläche während des *particle bombardments* abnimmt, besonders wenn die Inokulation später als 24 h erfolgt (Schweizer *et al.*, 1999, Schultheiß 2003c). Andererseits benötigt es einige Zeit, bis sich der Blattstoffwechsel nach der Verwundung durch die Transformation normalisiert hat und der Mechanismus der RNA-Interferenz etabliert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Penetration von *Bgh* auf transformierten Blattbereichen verglichen mit nicht transformierten zunahm. Dieser Effekt war unabhängig von dem verwendeten Konstrukt. Dabei wurde 24 h nach Transformation inokuliert. Dies schließt nicht aus, dass die Penetrationsrate zu einem späteren Zeitpunkt abnimmt (Ergebnisse nicht gezeigt).

5.3.6 *Knock-down* von *HvWRKY1*: Transgene Gerstenpflanzen

Aufgrund der Ergebnisse der transienten Transformation für *HvWRKY1* wurden am IPK Gatersleben stabil transgene Gerstenpflanzen erzeugt. Da für die praktische Anwendung resistente Pflanzen interessanter sind als anfällige, wurden zuerst *HvWRKY1*-RNAi-Pflanzen hergestellt. Das *silencing* soll in diesen Pflanzen durch ein unter der Kontrolle des konstitutiven Mais-Ubiquitin-Promotors stehendes *antisense*-Intron-*sense* Konstrukt, ausgelöst werden.

Phänotyp der Pflanzen

Die ungestressten Pflanzen zeigten keinen deutlich vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Das Fehlen eines Phänotyps muss nicht zwangsläufig heißen, dass kein *knock-down* stattgefunden hat. Bouché und Bouchez (2001) berichten, dass nur wenige *Arabidopsis*-Insertionslinien einen Phänotyp aufweisen, der einen Hinweis auf die Funktion des jeweiligen Gens gibt. Sie erklären dies zum einen mit funktioneller Redundanz, was gerade in der großen WRKY-Multigenfamilie eine Rolle spielen könnte und z. T. schon gezeigt werden konnte (Asai *et al.*, 2000). Andererseits spielen viele Gene nur unter bestimmten Umweltbedingungen oder für bestimmte Entwicklungsschritte eine Rolle, während sie unter anderen Bedingungen keinen Einfluss haben. Unterschiede im Phänotyp können auch so gering sein, dass sie nicht festgestellt werden (Zhang, 2003). Beispielsweise wurde für *C. elegans* gezeigt dass nur etwa 10 % aller *knock-out* Mutanten einen Phänotyp aufwiesen (Kamath *et al.*, 2003). Da die transienten Transformationsexperimente nur an Primärblättern durchgeführt wurden, die sich für diese Versuche am besten eignen, ist es durchaus möglich, dass *HvWRKY1* in älteren Blättern eine andere Rolle spielt. Daher wurde die Resistenz von *HvWRKY1*-RNAi-Pflanzen mikroskopisch zuerst an Primärblättern untersucht (Abb. 3.39).

Das Wachstum der untersuchten T₁-Generation der *HvWRKY1*-Transgenen war gegenüber dem cv. *Golden Promise* verlangsamt und das Ährenschieben erfolgte später. Dies kann durch die Transformation an sich verursacht worden sein (Abb. 3.42). Da die Integration eines Konstruktes ins Genom zufällig erfolgt und dabei u. U. Gene zerstört werden, ist kein einheitlicher Phänotyp aller Pflanzen zu erwarten. Leider standen keine mit dem Leervektor transformierten Kontrollpflanzen zur Verfügung. Besonders auffällig war die Linie B18/2-11, die im Wachstum stark zurück blieb und keine Ähren entwickelte. Diese Linie war eine der Linien, die im

Southern Blot überprüft wurde und ein Signal ergab. Da dies die einzige der 15 vermehrten Linien mit diesem Phänotyp war, handelt es sich wahrscheinlich um einen Positionseffekt.

Testen der Pflanzen auf Integration und *knock-down* des Transgens

Da kein Phänotyp beobachtet werden konnte, anhand dessen man Pflanzen, in denen tatsächlich ein *silencing* von *HvWRKY1* stattfand, schnell von anderen hätte unterscheiden können, wurde versucht, das *silencing* mittels *One-Step* RT-PCRs nachzuweisen. Allerdings ist es dabei generell schwierig, zwischen RNA-*template* und DNA-Kontamination zu unterscheiden. Kürzlich haben Maré *et al.* (2004) die Position des einzigen Introns in *HvWRKY1* an Position 315 bp der cDNA bzw. der 59. Aminosäure veröffentlicht. Somit wird es jetzt möglich sein durch geeignete Primerwahl zwischen dem längeren, genomischen *HvWRKY1* PCR-Produkt und transgenem *HvWRKY1* ohne Intron zu unterscheiden. Die RT-PCRs dieser Arbeit (Abb. 3.39) zeigten keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyppflanzen und Transgenen bezüglich der Expressionsstärke nach Induktion mit *Bgh* oder durch Verwundung, auch wenn die Bandenstärke zwischen den verschiedenen Pflanzen variierte. Keine Pflanze zeigte einen deutlichen *knock-down* des Gens. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass der *knock-down* des Gens letal ist und daher keine homozygoten *knock-out*-Pflanzen vorhanden waren.

Für die Pflanzen der Linien B18/2-2 und B17/2-9 wurde außerdem auch mikroskopisch überprüft, ob das Resistenzverhalten gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz verändert war. Zwar wiesen einige der transgenen Pflanzen eine größere Resistenz als die Übrigen auf, aber insgesamt schwankte die Penetrationsrate der *Golden Promise* Kontrollpflanzen stärker als die zwischen den einzelnen Pflanzen einer transgenen Linie. Daraus kann man schließen, dass kein effektiver *knock-down* von *HvWRKY1* in den Pflanzen stattfand, oder dass dieser in den transgenen Pflanzen nicht zu einer deutlichen Penetrationsresistenz gegenüber *Bgh* führte. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse fehlten mit dem Leervektor transformierte Kontrollen. Dieser Nachteil könnte u. U. dadurch ausgeglichen werden, dass eine deutlich größere Anzahl Pflanzen der jeweiligen Linien untersucht wird und dadurch Unterschiede innerhalb und zwischen den einzelnen Linien deutlicher zutage treten.

Die transgenen Pflanzen wurden in Gatersleben auf die Anwesenheit der Selektionsmarker getestet, 52 der Gerstenlinien auch auf die des RNAi-Konstruktes. Um in der nachfolgenden Generation aus den 55 potentiell transgenen Gerstenlinien die Linien zu identifizieren, die nur eine Kopie des Transgens enthielten, wurden Southern Blots durchgeführt. Allerdings konnten nur mit der Sonde für den CaMV-35S-Promotor, der das Gen des Selektionsmarkers regulierte, schwache Signale erhalten werden. Mit einer spezifischen Sonde für *HvWRKY1*, die auch das endogene WRKY1-Gen nachweisen sollte, konnte kein Signal detektiert werden. Mit Hilfe der Sonde für den CaMV-35S-Promotor konnte in einzelnen Pflanzen der Linien B17/2-13a und B18/2-11 jeweils eine Kopie des RNAi-Konstruktes detektiert werden (Abb. 3.40 und 3.41). Das Vorhandensein des Konstruktes sagt aber noch nichts über die Auslösung des RNAi-Effekts aus. Da die Integration in das Genom nicht gerichtet erfolgt, ist nicht klar, ob das eingebrachte Gen auch transkribiert wird, oder ob ein beobachteter Effekt auf der Zerstörung anderer Gene beruht. Um die Methode des Southern Blots zum schnellen *screening* der transgenen Pflanzen einzusetzen, muss diese weiter optimiert werden. Vor allem ist es nötig, das Transgen direkt nachzuweisen und nicht nur den Selektionsmarker.

Es gibt mehrere Studien mit stabil transgenen Pflanzen, in denen ein WRKY-Faktor überexprimiert oder ein *knock-down* oder *knock-out* durchgeführt wurde. In Transposon markierten *Arabidopsis* Pflanzen wurde so der WRKY-Faktor *TTG2* auf Grund veränderter Trichomentwicklung entdeckt (Johnson *et al.*, 2002). Chen und Chen (2002) erzeugten *AtWRKY18* überexprimierende Pflanzen, deren Wachstum reduziert war. Pflanzen, die das gleiche Gen in moderaten Mengen überexprimierten, wiesen eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* auf. Eine ähnliche Wachstumsreduktion verbunden mit nekrotischen Blättern, früher Blüte und einer Reduktion der Apikaldominanz zeigten *AtWRKY6* überexprimierende Pflanzen (Robatzek und Somssich, 2002). Auch diese Effekte waren abhängig vom Ausmaß der Überexpression. Sie konnten diese Pflanzen, ebenso wie Insertionsmutanten, verwenden, um von *AtWRKY6* regulierte Gene zu identifizieren. Miao *et al.* (2004) fanden ähnliche Phänotypen für transgene Pflanzen mit veränderter Expression von *AtWRKY53*. Sie konnten ebenfalls eine dosisabhängige Veränderung des Wuchses in Richtung Zwergwuchs und Nekrosen feststellen. Überexprimierende Pflanzen zeigten vorzeitige Blüte und Seneszenzerscheinungen. Pflanzen mit reduzierter Expression hingegen wiesen

eine verzögerte Seneszenz und eine reduzierte Blattanzahl auf. Außerdem war die Expression von seneszensassoziierten Genen und von mehreren WRKY-Faktoren verändert. Pflanzen mit reduzierter oder ausgeschalteter Expression des *AtWRKY33* Gens zeigten neben geringerem Wachstum auch eine Akkumulation von *PR-1* mRNA (Andreasson *et al.*, 2005).

Diese Studien zeigen, dass transgene Pflanzen ein wichtiges Mittel zur Funktionsanalyse einzelner Gene darstellen. Bisher ist allerdings keine Studie veröffentlicht worden, die zeigt, dass RNA-Interferenz und *knock-down* eines bestimmten Gens in stabil transgener Gerste funktioniert. Daher empfiehlt Zhang (2003) für die Untersuchung von Transkriptionsfaktoren die Verwendung von Überexpressionslinien, da dadurch der Einfluss funktioneller Redundanz gemildert wird. Die Funktion einiger Transkriptionsfaktorgene konnte nur durch Überexpression geklärt werden (Baima *et al.*, 2001, Pontier *et al.*, 2001, Fan und Dong, 2002, van der Graaff *et al.*, 2002, Andreasson *et al.*, 2005). So ist es wahrscheinlich, dass die *HvWRKY1*-Überexpressionspflanzen, deren Herstellung in Gatersleben erfolgt, zu eindeutigeren Ergebnissen führen wird. Auch Überexpressionspflanzen von *HvWRKY2* werden bei der Funktionsanalyse zu neuen Erkenntnissen führen.

5.4 Lokalisation von WRKY-Transkriptionsfaktoren im Nukleus

Transkriptionsfaktoren erfüllen ihre Funktion der Genregulation durch Bindung an bestimmte Promotorelemente im Zellkern. Daher ist es interessant zu untersuchen, ob WRKY-Transkriptionsfaktoren im Zellkern lokalisiert sind und ob bzw. welche Stimuli einen Transport in den Nukleus auslösen. Zu diesem Zweck wurden *GFP:HvWRKY1* bzw. *GFP:HvWRKY2* Fusionskonstrukte hergestellt. Mit Hilfe von GFP und DsRed als Marker für transformierte Zellen ließ sich die subzelluläre Lokalisation von *HvWRKY1* und *HvWRKY2* *in vivo* unter dem konfokalen Laser-*Scanning* Mikroskop beobachten. Die Funktionalität dieser Fusionskonstrukte wurde zusätzlich durch transiente Transformation überprüft (Abb. 3.44). Überexpression dieser Konstrukte führte ebenso wie die von *HvWRKY1* und *HvWRKY2* ohne *GFP*-Fusion zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber *Bgh*.

Abb. 3.44 zeigt für beide WRKY-Faktoren eine Lokalisation ausschließlich im Zellkern. Bisher konnten mehrere Arbeitsgruppen die Lokalisation von WRKY-Faktoren im Zellkern nachweisen (Eulgem, *et al.*, 1999, Hara *et al.*, 2000, Robatzek

und Somssich, 2001, Yoda *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2003, Maré *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2004). Dazu wurden Zwiebelepidermiszellen oder Protoplasten von *Arabidopsis* oder Petersilie mittels *particle bombardment* transformiert. Lediglich Xu *et al.* (2004) führten eine Transformation mit *Agrobacterium* durch, um die Lokalisation von WRKY1 aus Baumwolle in Tabak BY2-Zellen zu untersuchen. Eine Studie von Sun *et al.* (2003) untersuchte die Lokalisation von Gersten SUSIBA2 in Gewebe aus demselben Organismus. Sie verwendeten Gerstenendosperm, ebenso wie Zhang *et al.* (2004), die die Lokalisation von *OsWRKY71* im Zellkern nachweisen konnten. Dieses Gen besitzt große Ähnlichkeit zu *HvWRKY1* und 2. Alle Studien stimmen mit dem Ergebnis dieser Arbeit überein: Alle untersuchen GFP- oder YFP- (*yellow fluorescent protein*) Fusionskonstrukte waren im Zellkern lokalisiert.

Transkriptionsfaktoren können auf verschiedenen Ebenen reguliert werden (Kap. 1.5). Eine Ebene der Regulation umfasst ihren Transport in den Zellkern (Calkhoven und Ab, 1996, Merkle, 2001), der abhängig von verschiedenen Stimuli sein kann. Zu diesen Auslösern eines Importes in den Zellkern gehören auch Pathogene (Merkle, 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation im Zellkern unabhängig von einer Inokulation mit *Bgh* war. Auch Eulgem *et al.* beschrieben 1999 die Zellkernlokalisierung von WRKY1 aus Petersilie als unabhängig von einer Elizitorbehandlung. Es ist aber nicht auszuschließen, dass diese Lokalisation durch die Methodik des *particle bombardments* ausgelöst wird und die Verwundung der Zellen durch die Wolframpartikel ausreicht, um eine Zellkernlokalisierung zu bewirken. Auch könnte das durch GFP veränderte Fusionsprotein eine andere Lokalisation als das Wildtypprotein besitzen. Wie Abb. 3.44 zeigt ist aber auch das Fusionsprotein im transienten Versuchsansatz funktional, zumindest was die erhöhte Suszeptibilität in den Überexpressionsexperimenten betrifft. Robatzek und Somssich (2001) konnten die Lokalisation von *AtWRKY6:GFP* im Zellkern von Protoplasten mittels konfokaler Laser-*Scanning*-Mikroskopie nachweisen. Dieses Ergebnis bestätigen sie durch eine Western Blot Analyse. Sie fanden kaum ein Signal in zytosolischen Extrakten, aber ein deutliches in gereinigtem Zellkernextrakt. Dieses Signal verstärkte sich acht Stunden nach Behandlung mit dem Elizitor flg22 auf Grund einer Expressionssteigerung.

Diese subzelluläre Lokalisation stimmt für *HvWRKY1* mit der durch das PSORT-Programm (Kap. 2.2) vorhergesagten überein (Tab. 3.4). Im Unterschied zu dem

Ergebnis des Experimentes soll HvWRKY2, das nur eine NLS aufweist, laut PSORT außerhalb der Zelle oder mit geringerer Wahrscheinlichkeit im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sein. Die Sequenz von HvWRKY1 enthält zwei weitere berechnete *nuclear localisation signals* (NLS), die in HvWRKY2 nicht vorhanden sind. Es ist bekannt, dass WRKY-Faktoren bisher unbekannte NLS besitzen können. So konnten Robatzek und Somssich für AtWRKY6 mittels Deletionen und einzelnen Aminosäureaustauschen ein neues funktionales NLS der Sequenz KR-n₂-₃-R-n₉₋₁₆K-n₂-K ermitteln, das trotz des Vorhandenseins weiterer putativer Kernlokalisierungssignale allein für den Transport in den Zellkern verantwortlich war. Es kann also davon ausgegangen werden, dass HvWRKY2 neue, bisher unbekannte *nuclear localisation signals* enthält.

5.5 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig systematisch der Fragestellung nachgegangen, inwieweit WRKY Faktoren in der Interaktion von Gerste mit dem biotrophen Mehltau-Pathogen eine Rolle spielen. Die bisher vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es für das Verständnis des Zusammenspiels von WRKY-Transkriptionsfaktoren in Gerste wichtig ist, weitere WRKY-Faktoren zu charakterisieren. Dazu gehört zum einen die Klonierung der in dieser Arbeit mittels verschiedener Datenbanken identifizierter Gene, zum anderen die *in-silico*-Suche nach weiteren Sequenzen und die Vervollständigung der Genfragmente. Expressionstudien der Gene nach Inokulation mit *Bgh*, aber auch nach anderen, biotischen und abiotischen Stimuli sind notwendig, um besonders interessante, d. h. *Bgh*-responsive, Gene zu charakterisieren. Dies kann durch transienten *knock-down* bzw. Überexpression geschehen. Da es sich bei WRKY-Faktoren um eine große Genfamilie handelt, sollte untersucht werden, inwieweit die einzelnen Mitglieder redundante Funktionen ausüben. Dies kann durch den gleichzeitigen *knock-down* von zwei oder mehreren WRKY-Faktoren im transienten Versuchsansatz geschehen.

Die Auswertung der Hybridisierung des 22K *barley1 GeneChip* von Jansen (IPAZ, Gießen) hat ergeben, dass die Expression einiger WRKY-Faktoren durch den nekrotrophen Pilz *Fusarium* beeinflusst wird. Der nächste Schritt besteht in der unabhängigen Bestätigung dieser Ergebnisse, z.B. mit quantitativer RT-PCR. Auch eine funktionale Überprüfung von WRKY-Faktoren im Nichtwirtssystem Gerste –

Echter Weizenmehltau wird Aufschluss darüber geben, inwieweit die beobachtete Induktion von HvWRKY1 und 2 außerhalb des Rahmes *Bgh*-Gerste von Bedeutung ist.

Da für einige WRKY-Faktoren gezeigt werden konnte, dass sie an Signalketten verschiedener Phytohormone beteiligt sind (Chen und Chen, 2000, Du and Chen, 2000, Dong *et al.*, 2003, Mahalingam *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2004, Zou *et al.*, 2004, Rocher *et al.*, 2005), sollte die Expression von *HvWRKY1* und 2 nach Behandlung von Gerstenpflanzen mit einzelnen Phytohormonen analysiert werden. Dies ist besonders interessant, da OsWRKY71 eine große Sequenzähnlichkeit zu HvWRKY1 und 2 besitzt und OsWRKY71 nach Behandlung mit ABA stärker exprimiert und nach Giberellingabe reprimiert wird (Xie *et al.*, 2005). Die Bedeutung einzelner Domänen der WRKY-Proteine kann mittels Deletion oder Mutation und anschließender Überexpression dieser Deletionskonstrukte ermittelt werden. Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen kann dabei die Funktionalität von NLS-Motiven überprüft werden.

Die *in silico* Ergebnisse der Analyse des *HvWRKY1*-Promotors müssen in biologischen Experimenten bestätigt werden. Dazu können Promotor-Deletionsstudien *in planta* mit einem Reportergen wie GUS durchgeführt werden. Auf diesem Weg können der Bereich des Minimalpromotors und die Lage der für die Pathogenresponsivität verantwortlichen Elemente bestimmt werden.

Letztendlich sollten mit den Genen, die in der transienten Überexpression und im *knock-down* einen deutlichen Effekt auf die Penetration von *Bgh* erzielten, stabil transgene Pflanzen hergestellt werden, um die Ergebnisse der transienten Transformationen zu bestätigen. Da die bisher untersuchten *HvWRKY1*-RNAi Pflanzen keinen deutlichen Phänotyp aufwiesen, müssen weitere Linien überprüft werden. Dazu muss die Methode des Southern Blots optimiert werden. *HvWRKY1* und *HvWRKY2* überexprimierende Pflanzen werden in Kooperation mit dem IPK in Gatersleben hergestellt. Sie werden auf ein verändertes Resistenzverhalten untersucht werden. Interessant wären auch stabil transgene Promotor-Reporterpflanzen, mit deren Hilfe die Aktivität eines bestimmten WRKY-Promotors unter verschiedenen Umweltbedingungen, aber auch die Gewebe- und Entwicklungsspezifität untersucht werden könnte. Mit diesen Pflanzen wäre es auch möglich, den direkten Einfluss eines MAPK-Inhibitors auf den WRKY-Promotor nachzuweisen.

Besonders wichtig für die Aufschlüsselung der Funktion wäre weiterhin die Identifizierung von Zielgenen einzelner WRKY-Transkriptionsfaktoren. Dazu wurde die Methode des X-ChIP entwickelt (Orlando, 2000), für die jedoch spezifische Antikörper benötigt werden. Alternativ könnten auch Microarraystudien durchgeführt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

WRKY-Transkriptionsfaktoren bilden eine Multigenfamilie mit mindestens 81 Mitgliedern in Reis. Sie binden an so genannte W-Boxen, die vor allem in Promotoren von Genen der Pathogenantwort und senseszenzassoziierten Genen gehäuft auftreten.

Bisher sind nur zwei WRKY-Faktoren aus Gerste, *SUSIBA2* und *HvWRKY1*, charakterisiert worden. In dieser Arbeit konnten *contigs* von 27 weiteren möglichen WRKY-Faktoren aus Gerste *in silico* identifiziert werden. Davon wurden vier Fragmente und eine vollständige Sequenz kloniert. Es wurde gezeigt, dass sechs von zehn *contigs* nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) zu frühen Zeitpunkten induziert werden. Detaillierte Studien wurden mit *HvWRKY1* und *HvWRKY2*, dessen Sequenz aus der GenBank EST-Datenbank gewonnen wurde, durchgeführt. *HvWRKY1* und 2 besitzen zu 51 % identische Aminosäuren. Das biphasische Muster der Expressionssteigerung beider Gene nach *Bgh*-Inokulation unterschied sich nur geringfügig zwischen Ingrid Wildtyp und drei Kultivaren, die eine Mutation im Signalweg von *Mlo* bzw. *Ror1* aufwiesen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression verschiedener WRKY-Faktoren in Gerste nach Inokulation mit dem Echten Weizenmehltau, mit *Fusarium graminearum* und nach Verwundung erhöht war. Die Untersuchung der Expression in verschiedenen pflanzlichen Organen zeigte, dass *HvWRKY1* und 2 in allen Geweben exprimiert werden, allerdings am stärksten in Blättern. *HvWRKY2*-mRNA akkumuliert außerdem in reproduktiven Geweben. Die Analyse der ersten 1,9 kb des Promotors von *HvWRKY1* ergab, dass dieser sechs vollständige W-Boxen enthält. Diese Anreicherung lässt darauf schließen, dass sie funktionell sind.

Mittels konfokaler Laser-*Scanning*-Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass *GFP*:Fusionskonstrukte beider Gene unabhängig von einer Inokulation mit *Bgh* konstitutiv im Zellkern lokalisiert sind.

Die Bedeutung von *HvWRKY1* und 2 für die Interaktion von Gerste und *Bgh* zeigt sich dadurch, dass beide Gene in transienten Transformationsexperimenten als Suszeptibilitätsfaktoren wirkten. Sie waren allerdings nicht in der Lage, die *mlo*-vermittelte Resistenz zu brechen. Transgene *HvWRKY1*-RNAi Pflanzen zeigen bisher keinen deutlichen Phänotyp. RNA-Interferenz Experimente mit anderen durch *Bgh* induzierten Genen demonstrierten, dass der *knock-down* einer *receptor-like*

protein kinase (RLK) zu erhöhter Resistenz und der *mitogen activated protein kinase* (MAPK) zu gesteigerter Anfälligkeit führten.

SUMMARY

WRKY-transcription factors form a large multigene family of at least 81 members in rice. They bind to so called W-boxes, clustered in promoters of defence-related and senescence-associated genes. Until now, only two WRKY-factors from barley, *SUSIBA2* and *HvWRKY1*, have been characterized.

Here, contigs of 27 additional putative WRKY-factors from barley could be identified *in silico*. Out of these, four fragments and one full length gene has been cloned. Six of ten contigs are part of the immediate early response to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*). The biphasic expression pattern of the induction of *HvWRKY1* and 2 after inoculation with *Bgh* did not differ between cv. Ingrid wildtype and three cultivars containing a mutation in the *Mlo*- and *Ror1*-signaling pathway. Besides this fact, the expression of several WRKY-factors was enhanced after inoculation with the inappropriate wheat powdery mildew (*Bgt*), *Fusarium graminearum* and after wounding. *HvWRKY1* and 2 are expressed in all investigated barley organs but strongest in leaves. *HvWRKY2* mRNA additionally accumulated in reproductive tissues.

Analysis of the first 1,9 kb of the *HvWRKY1* promoter revealed six complete W-boxes which is a clear accumulation compared to the estimated average occurrence. Nuclear localisation of *HvWRKY1* and 2 *GFP*:fusion constructs was shown by confocal laserscanning microscopy to be independent of inoculation with *Bgh*.

The significance of *HvWRKY1* and 2 in the interaction of barley and *Bgh* is emphasized by their effect as factors of susceptibility in a transient transformation assay. Both genes were not able to break *mlo*-mediated resistance. Transgene *HvWRKY1*-RNAi plants showed until now no clear phenotype. RNA-interference experiments with other *Bgh*-responsive genes demonstrated an increase in resistance after knock-down of a receptor-like protein kinase (RLK) and a decrease for an mitogen activated protein kinase (MAPK).

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agrios, G. N. (1997) Plant Pathology, San Diego, USA, Academic Press
- Aharon, G. S., Gelli, A., Snedden, W. A., Blumwald, E. (1998) Activation of a plant plasma membrane Ca^{2+} channel by TGalpha1, a heterotrimeric G protein alpha-subunit homologue. FEBS Letters 424: 17-21
- Alexandrova, K. S., Conger, B. V. (2002) Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*). Plant Science 162: 301-307
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H. T., Zhu, S., Qiu, J.-L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.-A., Nielsen, H. B., Hirt, H., Somssich, I. E., Mattsson, O., Mundy, H. (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. EMBO Journal 24: 2579-2589
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willman, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Asubel, F. M., Sheen, J. (2002) MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. Nature 415: 977-983
- Ashida, Y., Nishimoto, M., Matsushima, A., Watanabe, J., Hirata, T. (2002) Molecular cloning and mRNA expression of geraniol-inducible genes in cultured shoot primordia of *Matricaria chamomilla*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66: 2511-2514
- Baima, S., Possenti, M., Mattecci, A., Wisman, E., Altamura, M. M., Ruberti, I., Morelli, G. (2001) The *Arabidopsis* ATHB-8 HD-Zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. Plant Physiology 126: 643-655
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409: 363-366
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G., Kogel, K.-H. (2000) Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct resistance pathways. Molecular Plant Pathology 1: 277-286
- Beyer, K., Binder, A., Boller T., Collinge, M. (2001) Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. Molecular Plant Biology 2: 125-134
- Blumwald, E., Aharon, G. S., Lam, B. C.-H. (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science 3: 342-346
- Bodeau, J. P., Walbot, V. (1996) Structure and regulation of the maize Bronze2-promoter. Plant Molecular Biology 32: 599-609
- Bornberg-Bauer, E., Rivals, E., Vingron, M. (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. Nucleic Acids Research 26: 2740-2746
- Borrone, J. W., Kuhn, D. N., Schnell, R. J. (2004) Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. Theoretical and Applied Genetics 109: 495-507
- Bouché, N., Bouchez, D. (2001) *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. Current Opinion in Plant Biology 4: 111-117
- Boulikas, T. (1994) Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. Journal of Cellular Biochemistry 55: 32-58
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254
- Brisson, L. F., Tenhaken, L., Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell 6: 1703-1712
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H. M., Olszak, B., Skov, S., Ødum, N., Jørgensen, L. B., Brown, R. E., Mundy, J. (2002) Knockout of *Arabidopsis* ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. Genes and Development 16: 490-502
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA

- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Fijters, A., Van Daelen, R., Van der Lee, T., Diergaarde, P., Goenendijk J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705
- Calkhoven, C. F., Ab, G. (1996) Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochemistry Journal* 317: 329-342
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, S., Dong, X. (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6: 1583-1592
- Chen, C., Chen, C. (2000) Isolation and characterisation of two pathogen- and salicylic acid induced WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology* 42: 387-396
- Chen, C., Chen, Z. (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiology* 129: 706-716
- Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Witham, S. A., Budworth, P. R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J. A., Harper, J. F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J. L., Wang, X., Zhu, T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-574
- Cheong, Y. H., Chang, H.-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S. (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 661-667
- Chester, K. S. (1933) The problem of acquired physiological immunity in plants. *Ourat Reviews of Biology* 8: 275-324
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-L., Hong, X., Agarwal, M., Zhu, J.-K. (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 17: 1043-1054
- Ciolkowski, I. (2003) Die WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie in *Arabidopsis thaliana*: Untersuchungen zur Spezifität der Bindung an W-Box-Elemente und weiterführende Analyse von drei ausgewählten Vertretern. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Christensen, A. B., Cho, B. H., Naesby, M., Gregersen, P. L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D. B., Thordal-Christensen, H. (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* 3: 135-144
- Collinge, D. B., Gregersen, P. L., Thordal-Christensen, H. (2002) The nature and role of defence response genes in cereals. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. R. R. Belanger, W. R. Bushnell. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press, Chapter 10: 146-160.
- Collins, N. C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.-L., Hüchelhoven, R., Stein, M., Freialendhoven, A., Somerville, S. C., Schulze-Leffert, P. (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425: 973-977
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J., Mauch-Mani, B. (2002) Priming in plant pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7: 210-216
- Close, T. J., Wanamaker, S. I., Caldo, R. A., Turner, S. M., Ashlock, D. A., Dickerson, J. A., Wing, R. A., Muehlbauer, G. J., Kleinhofs, A., Wise, R. P. (2004) A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiology* 134: 960-968
- Cormack, R. S., Eulgem, T., Rushton, P. J., Köchner, R., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (2002) Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochimica et Biophysica Acta* 1576: 92-100

- Craver, T. L. W. (1986) Histology of infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in spring barley lines with various levels of partial resistance. *Plant Pathology* 35: 229-240
- Craver, T. L. W., Ingerson, S. M. (1987) Responses of *Erysiphe graminis* germplings to contact with artificial and host surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 30: 359-372
- Dehesh, K., Smith, L. G., Tepperman, J. M., Qail, P. H. (1995) Twin autonomous bipartite nuclear localization signals direct nuclear import of GT-2. *Plant Journal* 8: 25-36
- Delaney, T. P., Friedrich, L., Ryals, J. A. (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 6602-6606
- Dellagi, A., Heilbronn, J., Avrova, A. O., Montesano, M., Palva, E. T., Stewart, H. E., Toth, I. K., Cooke, D. E. L., Lyon, G. D., Birch, P. R. J. (2000) A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* sbsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1092-1101
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588
- De Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J., Kijne, J. (1996) Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 24: 4624-4631
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulières, F., Hirsch, J., Feng, D. X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J. Marco, Y. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 2404-2409
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounloatham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y. (2003) Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and *PapP2*, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100: 8024-8029
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., Von Heijne, G., Schulze-Lefert, P. (1999) Topology, subcellular localisation, and sequence diversity of the *Mlo* family in plants. *Journal of Biological Chemistry* 274: 34993-35004
- Dietrich, C., Maiss, E. (2002) Red formation protein DsREd from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *Biotechniques* 32: 286-293
- Dietz, K.-J., Baier, M., Krämer, U. (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M. N. V., Hagemeyer, J. (Hrsg.) *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Berlin, Springer Verlag, 73-97
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A., Benfey, P. N. (1996) The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-433
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 316-327
- Dong, J., Chen, C., Chen, Z. (2003) Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51: 21-37
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15
- Du, L., Chen, Z. (2000) Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 24: 837-847

- Duncia, J. V., Santella, J. B., Higley, C. A., Pitts, W. J., Wityak, J., Fietze, W. E., Rankin, F. W., Sun, J. H., Earl, R. A., Tabaka, A. C., Teleha, C. A., Blom, K. F., Favata, M. F., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Horiuchi, K., Copeland, R. A., Scherle, P. A., Trzaskos, J. M., Magolda, R. L., Trainor, G. L., Wexler, R. R., Hobbs, F. W., Olson, R. E. (1998) MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs and cyclization products. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 8: 2839-2844
- Dunn, M. A., White, A. J., Vural, S., Hughes, M. A. (1998) Identification of promoter elements in a low-temperature responsive gene (*blt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* 38: 551-564
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 10328-10333
- Durrant, W. E., Rowland, O., Pierdas, P., Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., Sharp, P. A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 457-467
- Eckey, C. (2002) Isolierung und Charakterisierung pathogen-induzierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für den *Mlg* Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP. Inaugural Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Eckey, C., Korell, M., Leib, K., Biedenkopf, D., Jansen, C., Langen, G., Kogel, K.-H. (2004) Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: Functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* 55: 1-15
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I. (1999) Early nuclear events in plant defence signaling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO Journal* 18: 4689-4699
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., Somssich, I. E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199-206
- Fan, W., Dong, X. (2002) *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1377-1389
- FAO (2003) World agriculture towards 2015/2030. An FAO perspective. FAO Rome and Earthscan, London
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K., Bairoch, A. (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research* 30: 235-238
- Feldbrugge, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. (1996) The transcriptional regulator CPRF1: expression analysis and gene structure. *Molecular and General Genetics* 251: 619-627
- Feldbrugge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. (1997) PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts *in vivo* with a light-regulatory promoter unit. *Plant Journal* 11: 1079-1093
- Fernandez, D., Santos, P., Agostini, C., Bon, M.-C., Petitot, A.-S., Silva, M. C., Guerra-Guimarães, L., Ribeiro, A., Argout, X., Nicole, M. (2004) Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Helmileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* 5: 527-536
- Finnie, C., Borch, J., Collinge, D. B. (1999) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Molecular Biology* 40: 545-554
- Flor, H. H. (1955) Host-parasite interactions in flax – its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685
- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene for gene concept. *Annual Reviews of Phytopathology* 9: 275-296
- Fowler, S., Thomashow, M. F. (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690
- Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzahler, F., Schulze-Leffert, 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

- Frye, C. A., Innes, R. W. (1998) An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* 10: 947-956
- Frye, C. A., Tang, D., Innes, R. W. (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98: 373-378
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J. M. (Hrsg.) *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa
- Gianinazzi, S., Martin, C., Vallée, J. C. (1970) Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez *Nicotiana glauca* L. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *CR Académie des Sciences Paris* 270: 2383-2386
- Gierson, C., Du, J. S., de Torres Zabala, M., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M., Bevan, M. W. (1994) Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant Journal* 5: 815-826
- Godoy, A. V., Lazzaro, A. S., Casalongué, C. A., Segundo, B. S. (2000) Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Science* 152: 123-134
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., *et al.* (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296 : 92-100
- Gramatikoff, K., Wu, C., Shi, X., Fang, F. (2004) SUMO: The proteome's little prince. In: *Frontiers of Biotechnology and Pharmaceuticals*, Science Press USA Inc. 4: 181 – 210
- Graner, A., Altschmied, L. (2001) Gerste - ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. *GenomXPress* 1: 5-12
- Guiltinan, M. J., Miller, L. (1994) Molecular characterization of the DNA-binding and dimerization domains in the bZIP transcription factor EmBP-1. *Plant Molecular Biology* 26: 1041-1053
- Guo, Y., Cai, Z., Gan, S. (2004) Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* 27: 521-549
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K., Schmelzer, E. (1998) Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 8398-8403
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 136: 557-580
- Hara, K., Yagi, M., Kusano, T., Sano, H. (2000) Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Molecular and General Genetics* 263: 30-37
- He, S. Y., Bauer, D. W., Collmer, A., Beer, S. V. (1994) Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 289-292
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajama, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T., Benfey, P. N. (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101: 555-567
- Herve, C., Dabos, P., Galaud, J. P., Rouge, P., Lescure, B. (1996) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. *Journal of Molecular Biology* 258: 778-788
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 297-300
- Himelblau, E., Amasino, R. M. (2000) Delivering copper within plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 205-210

- Hinterhofer, K., Zehntgraf, U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213: 469-473
- Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y., Hattori, T. (1999) ACGT containing abscisic acid responsive element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant Journal* 19: 679-689
- Huang, T., Duman, J. G. (2002) Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade (*Solanum dulcamara*). *Plant Molecular Biology* 48: 339-350
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Reis, C., Kogel, K.-H. (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H₂O₂ but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251-1260
- Hückelhoven R., Trujillo, M., Kogel, K.-H. (2000) Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Molecular Plant Pathology* 1: 287-292
- Hückelhoven R., Kogel, K.-H. (2003a) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216: 891-902
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Kogel, K.-H. (2003b) Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100: 5555-5560
- Hui, D., Iqbal, J., Lehmann, K., Gase, K., Saluz, H. P., Baldwin, I. T. (2003) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (*Lepidoptera*, *Sphingidae*) and its natural host *Nicotiana attenuata* V.: Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiology* 131: 1877-1893
- Ishiguro, S., Nakamura, K. (1994) Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics* 5: 563-571
- Ito, M., Criqui, M. C., Sakabe, M., Ohno, T., Hata, S., Kouchi, H., Hashimoto, J., Fukuda, H., Komamine, A., Watanabe, A., (1997) Cell-cycle regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *Plant Journal* 11: 983-992
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* 14: 57-70
- Itzhaki, H., Maxson, J. M., Woodson, W. R. (1994) An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 8925-8929
- Izaguirre, M. M., Scopel, A. L., Baldwin, I. T., Ballaré, C. L. (2003) Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology* 132: 1755-1767
- Jabs, T., Dietrich, R. A., Dagl, J. L. (1996) Initiation of runaway cell death in *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273: 1853-1856
- Jabs, T., Collig, C., Tschöpe, M., Hahlbrock, K., Schell, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and reactive oxygen species from the oxidative burst signal defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 4800-4805
- Jansen, C. (2002) 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
- Jansen, C., Korell, M., Eckey, C., Dagmar, B., Kogel, K.-H. (2005) Identification and transcriptional analysis of powdery mildew-induced barley genes. *Plant Science* 168: 373-380

- Jarosch, B., Kogel, K.-H., Schaffrath, U. (1999) The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 508-514
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* 19: 4004-4014
- Johnson, C. S., Kolevski, B., Smyth, D. R. (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14: 1359-1375
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Hirt, H. (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 11274-11279
- Jørgensen, J. H. (1994) Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Critical Reviews in Plant Science* 13: 97-119
- Kalde, M., Barth, M., Somssich, I. E., Lippok, B. (2003) Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 295-305
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M. *et al.* (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421: 231-237
- Katagiri, F., Siepel, K., Chua, N.-H. (1992) Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. *Molecular Cell Biology* 12: 4809-4816
- Keates, S. E., Kostman, T. A., Anderson, J. D., Bailey, B. A. (2003) Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiology* 132: 1610-1622
- Kemp, B. P., Beeching, J. R., Cooper, R. M. (2005) cDNA-AFLP reveals genes differentially expressed during the hypersensitive response of cassava. *Molecular Plant Pathology* 6: 113-123
- Kempin, S. A., Savidge, B., Yanofsky, M. F. (1995) Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science* 267: 522-525
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., Ecker, J. R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441
- Kikuchi, S., Stoh, K., Toshifumi, N., Kawagashira, N., Doi, K., Kishimoto, N. *et al.* (2003) Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. *Science* 301: 376-379
- Kim, C. Y., Lee, S. H., Park, H. C., Bae, C. G., Cheong, Y. H., Choi, Y. J., Han, C., Lee, S. Y., Lim, C. O., Cho, M. J. (2000) Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 470-474
- Kim, M. C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H. C., Ho, M. J., Schulze-Lefert, P. (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447-451
- Kim, J. K., Cao, J., Wu, R. (1994) Regulation and interaction of multiple protein factors with the proximal promoter regions of a rice high pl alpha-amylase gene. *Molecular and General Genetics* 23: 383-393
- Kim, C. Y., Zhang, S. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant Journal* 38: 142-151
- Kinkema, M., Fan, W., Dong, X. (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR*-gene expression. *Plant Cell* 12: 2339-2350
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I. (2000) A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley *ELI7* gene family members by fungal elicitor or pathogen infection. *Molecular Plant Pathology* 1: 243-251

- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., Dangl, J. L. (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology* 3: 73-78
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 8849-8855
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T., Kunoh, H. (1997) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant Journal* 11: 525-537
- Kobe, B., Kajava, A. V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 725-732
- Kølster, P., Munk, L., Stølen, O., Løhde, J. (1986) Near isogenic barley lines with genes for resistance to powdery mildew. *Crop Science* 26: 903-907
- Kong, H. Y., Lee, S. C., Hwang, B. K. (2001) Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 189-199
- Kumar, J., Hüchelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S., Kogel, K.-H. (2001) A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* 91: 127-133
- Kunoh, H., Komura, T., Yamaoka, N., Kobayashi, I. (1988) Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. IV. Escape of the second lobe of the *Erysiphe graminis* appressorium from inaccessibility enhanced by the previous attack of the first lobe. *Annual Review of the Phytopathology Society Japan* 54: 577-583
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D.-Y., Vierstra, R. D. (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 278: 6862-6872
- Lagacé, M., Matton, D. P. (2004) Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta* 219: 185-189
- Lahaye, T. (2002) The *Arabidopsis* *RRS1-R* disease resistance gene - uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defence? *Trends in Plant Science* 7: 425-427
- Lamb, C., Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275
- Lambais, M. R. (2001) *In silico* differential display of defence-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. *Genetics and Molecular Biology* 24: 1415-4757
- Lee, S. J., Lee, M. Y., Yi, S. Y., Sang, K. H., Choi, S. H., Her, N. H., Min, B. W., Yong, S. G., Harn, C. H. (2002) PPI1: A novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor from pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 540-548
- Li, J., Brader, G., Palva, E. T. (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319-331
- Liljegren, S., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., Yanofsky, M. F. (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770
- Lin, J.-F., Wu, S.-W. (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal* 39: 612-628
- Liu, L., White, M. J., MacRae, T. H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants. *European Journal of Biochemistry* 262: 247-257
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P. (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 38: 800-809

- Lyck, R., Harmenig, U., Höhfeld, I., Treuter, E., Scarf, K.-D., Nover, L. (1997) Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* 202: 117-125
- Maeo, K., Hayashi, S., Kojima-Suzuki, H., Morikami, A., Nakamura, K. (2001) Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65: 2428-2436
- Mahalingam, R., Gomez-Buitrago, A. M., Eckardt, N., Shah, N., Guevara-Garcia, A., Day, P., Raina, R., Fedoroff, N. V. (2003) Characterizing the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. *Genome Biology* 4: R20
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., Dietrich, R. A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26: 403-410
- Marè, C., Mazzucotelli, E., Crosatti, C., Francia, E., Stanca, A. M., Cattivelli, L. (2004) HvWRKY38: a new transcription factor involved in cold-and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology* 55: 399-416
- Mehdy, M. C. (1994) Active oxygen species in plant defence against pathogens. *Plant Physiology* 105: 467-472
- Menke, F. L. H., Kang, H.-G., Chen, Z., Park, J. M., Kumar, D., Klessig, D. F. (2005) Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 1027-1034
- Merckle, T. (2001) Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signaling. *Planta* 213: 499-517
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P., Zentgraf, U. (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 55: 853-867
- Morohashi, K., Minami, M., Takase, H., Hotta, Y., Hiratsuka, K. (2003) Isolation and characterisation of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 278: 20865-20873
- Muthukrishnan, S., Linag, G. H., Trick, H. N., Gill, B. S. (2001) Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 93-114
- Nakai, K., Kanehisa, M. (1991) Expert system for prediction of protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11: 95-110
- Nelson, A. J., Bushnell, W. R. (1997) Transient expression of anthocyanin genes in barley epidermal cells: Potential for use in evaluation of disease response genes. *Transgen Research* 6: 233-244
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. Jr. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author
- Nielsen, K., Olsen, O., Oliver, R. (1999) A transient expression system to assay putative antifungal genes on powdery mildew infected barley leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 1-12
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F., Dangl, J. L. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annual Reviews of Genetics* 37: 579-609
- Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M., Sano, H. (2000) Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* 245: 21-29
- Opalski, K. S., Schultheiß, H., Kogel, K.-H., Hüchelhoven, R. (2005) The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Plant Journal* 41: 291-303
- Orlando, V. (2000) Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehydes-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 99-104
- Page, R. D. M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358

- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. W. Goldman, S. L. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 2: 359-366
- Park, C. Y., Lee, J. H., Yoo, J. H., Moon, B. C., Choi, M. S., Kang, Y. H., Lee, S. M., Kim, H. S., Kang, K. Y., Chung, W. S., Lim, C. O., Cho, M. J. (2005) WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Letters* 579: 1545-1550
- Pastuglia, M., Roby, D., Dumas, C., Cock, J. M. (1997) Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* 9: 49-60
- Pearson, W. R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183: 63-98
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R., Schulze-Lefert, P. (1997) Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell* 9: 1397-1409
- Pichler, A., Melchior, F. (2000) Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* 3: 381-387
- Pieterse, C., Van Wees, S., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., Van Loon, L. C. (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571-1580
- Pieterse, C. M. J., Van Loon, L. C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4: 52-58
- Pieterse, C. M. J., Van Loon, L. C. (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 456-464
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N. C., Panstruga, R., Schulze-Lefert, P. (2002) The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology* 129: 1076-1085
- Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A., Mittler, R. (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant Journal* 31: 319-330
- Pontier, D., Miao, Z. H., Lam, E. (2001) Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant Journal* 27: 529-538
- Pozo, M. J., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. (2005) Jasmonates – signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 211-222
- Press, C. M., Wilson, M., Tuzun, S., Kloepper, J. W. (1997) Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 761-768
- Pryce-Jones, E., Carver, T., Gurr, S. J. (1999) ToF cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 175-182
- Quackenbush, J., Cho, J., Lee, D., Liang, F., Holt, I., Karamycheva, S., Parvizi, B., Perte, G., Sultana, R., White, J. (2000) The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Research* 29: 159-64
- Quirino, B. F., Noh, Y.-S., Himelblau, E., Amasino, R. M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5: 278-282
- Rausser, W. E. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology* 109: 1141-1149
- Ren, T. Q. F., Morris, T. J. (2000) *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12: 1917-1925
- Reymond, P., Farmer, E. E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 404-411

- Richards, D. E., Peng, J., Harberd, N. P. (2000) Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *Bioessays* 22: 573-577
- Riechmann, J. L., Hard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., Yu, G.-L. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2109
- Riechmann, J. L., Ratcliffe, O. J. (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 423-434
- Ritter, C., Dangl, J. L. (1996) Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes. *Plant Cell* 8: 251-257
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143-1151
- Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H., Mittler, R. (2004) The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 11736-11743
- Robatzek, S., Somssich, I. E. (2001) A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant Journal* 28: 123-133
- Robatzek, S., Somssich, I. E. (2002) Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defence. *Genes and Development* 16: 1139-1149
- Rocher, A., Dumas, C., Cock, J. M. (2005) A W-box is required for full expression of the SA-responsive gene *SFR2*. *Gene* 344: 181-192
- Romano, P., Gray, J., Horton, P., Luan, S. (2005) Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation. *New Phytologist* 166: 753-769
- Rombauts, S., Déhais, P., Van Montagu, M., Pouzé, P. (1999) PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Reserch* 27: 295-296
- Ross, A. F. (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14: 329-339
- Rotzen, S., Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Hrsg.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ: 365-386
- Rouster, J., Leah, R., Mundy, J., Cameron-Mills, V. (1997) Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant Journal* 11: 513-523
- Rushton, P. J., MacDonald, H., Huttley, A. K., Lazarus, C., M., Hooley, R. (1995) Members of a new family of DNA-binding proteins bind on a conserved *cis*-element in the promoters of *α -Amy2* genes. *Plant Molecular Biology* 29: 691-702
- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO Journal* 15: 5690-5700
- Rushton P. J., Somssich I. E. (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 311-315
- Rushton, J. R., Reinstädler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, I. E. (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insight into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14: 749-762
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *Pant 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., Ukenes, S. (1997) The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell* 9: 425-439
- Sainz, M. B., Goff, S. A., Chandler, V. L. (1997) Extensive mutagenesis of a transcriptional activation domain identifies single hydrophobic and acidic amino acids important for activation *in vivo*. *Molecular Cell Biology* 17: 115-122

- Sakai, T., Takahashi, Y., Nagata, T. (1996) Analysis of the promoter of the auxin-inducible gene, *parC*, of tobacco. *Plant Cell Physiology* 37: 906-913
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarias, L., Granell, A., Lafuente, M. T. (2003) A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruits. *Planta* 218: 65-70
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74: 5463-5467
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 305-310
- Schlösser, E. (1997) *Allgemeine Phytopathologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag
- Schultheiß, H., Dechert, C., Kogel, K.-H., Hüchelhoven, R. (2002) A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiology* 128: 1447-1454
- Schultheiß, H., Dechert, C., Kiraly, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K.-H., Hüchelhoven, R. (2003a) Functional assessment of the pathogenesis related protein PR-1B in barley. *Plant Science* 165: 1275-1280
- Schultheiß, H., Dechert, C., Kogel, K.-H., Hüchelhoven, R. (2003b) Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. *Plant Journal* 36: 589-601
- Schultheiß, H. (2003c) Identifizierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse von Determinanten der Suszeptibilität und Resistenz im Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schultheiß, S., Hensel, G., Imani, J., Broeders, S., Sonnewald, U., Kogel, K.-H., Kumlehn, J., Hüchelhoven, R. (2005) Ectopic expression of constitutively activated RACB in barley enhances susceptibility to powdery mildew and abiotic stress. *Plant Physiology* 139: 353-362
- Schulze-Lefert, P., Vogel, J. (2000) Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science* 5: 343-348
- Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., Dudler, R. (1999) A transient assay system for the functional assessment of defense related genes in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 647-654
- Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P., Dudler, R. (2000) Technical advance. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant Journal* 24: 895-903
- Seeler, J.-S., Dejan, A. (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 690-699
- Shah, J., Klessing, D. F. (1991) Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis related β -1-3 glucanase gene PR-2d. *Plant Journal* 10: 1089-1101
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W., Dixon, J. E. (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109: 575-588
- Shen, Q., Ho, T. H. (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* 7: 295-307
- Shen, L., Gong, J., Caldo, R. A., Nettleton, D., Cook, D., Wise, R. P., Dickerson, J. A. (2005) BarleyBase - an expression profiling database for plant genomics. *Nucleic Acids Research* 33: Database issue D614-D618
- Shirasu, K., Nielsen, K., Piffanelli, P., Oliver, R., Schulze-Lefert, P. (1999) Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system. *Plant Journal* 17: 293-299

- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Borén, M., Ahlandsberg, S., Jansson, C. (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *Plant Cell* 15: 2076-2092
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., Kilby, N. J. (2004) Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology* 54: 157-174
- Singh, K. B., Rhonda, C. F., Oñate-Sánchez, L. (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 430-436
- Somssich, I. E., Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defence in plants: a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3: 86-90
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Mertaux, J.-B. (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Reviews of Phytopathology* 35: 235-270
- Stolzenburg, M. C., Aist, J. R., Israel, H. W. (1984) The role of papilla in resistance to powdery mildew condition by the *ml-o* gene in barley. I. Correlative evidence. *Physiology of Plant Pathology* 25: 337-346
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Boren, M., Ahlandsberg, S., Jansson, C. (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *Plant Cell* 15: 1076-2092
- Swiderski, M. R., Innes, R. W. (2001) The *Arabidopsis* *PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant Journal* 26: 101-112
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R. T., Asubel, F. M., Katagiri, F. (2000) Mutational analysis of the *Arabidopsis* nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene *RPS2*. *Plant Cell* 12: 2541-2554
- Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J., Chen, M. (2004) Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 54: 519-532
- Tijan, R. (1995) Molecular machines that control genes. *Scientific American* 272: 54-61
- Trewavas, A. (2000) Signal perception and transduction. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists: 930-987
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P. L., Collinge, D. B. (1999) The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In: Slusarenko, A., Fraser, R., Van Loon, K. (Hrsg.): *Mechanisms of resistance to plant diseases*: 77-100
- Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J., Chen, M. (2004) Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 54: 519-532
- Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 16: 533-543
- Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Hockenfull, R., Jackson, R. W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M. A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J. D., Murillo, J. (2000) Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO Journal* 19: 3204-3214
- Turck, F., Zhou, A., Somssich, I. E. (2004) Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene PcPR1-1 in parsley. *Plant Cell* 16: 2573-2585
- Ülker, B., Somssich, I. E. (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 491-498
- Vandenabeele, S., Van der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S., Rottiers, P., Slooten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100: 16113-16118
- Van der Graaff, E., Hooykaas, P. J. J., Keller, B. (2002) Activation tagging of the two closely linked genes *LEP* and *VAS* independently affects vascular cell number. *Plant Journal* 32: 819-830
- Van Gysel, A., Van Montagu, M., 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., Van Kammen, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211
- Van Loon L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Reviews in Plant Pathology* 36: 453-483
- Van Loon L. C., Van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97
- Varagona, M. J., Raikhel, N. V. (1994) The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant Journal* 5: 207-214
- Varma, A., Verma, S., Sahay, S. N., Bütenhorn, B., Franken, P. (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable pant-growth promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2741-2744
- Verger, A., Perdomo, J., Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *European Molecular Biology Organization Reports* 4: 137-142
- Von Röpenack, E., Parr, A., Schulze-Lefert, P. (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to powdery mildew fungus in barley. *Journal of Biological Chemistry* 272: 9013-9022
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., Von Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.-H. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt stress tolerance, disease resistance and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102: 13386-13391
- Wan, J., Zhang, S., Stacey, G. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Molecular Plant Pathology* 5: 125-135
- Wang, H. H., Hao, Z. G., Xie, K., Wu, K. L., Guo, Z. J. (2005) Leucine zipper like structure in rice WRKY89 enhances its affinity for binding with W box elements. *Chinese Science Bulletin* 50: 980-989
- Washida, H., Wu, C. Y., Suzuki, A., Yamanouchi, U., Akihama, T., Harada, K., Takaiwa, F. (1999) Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1. *Plant Molecular Biology* 40: 1-12
- Wen, N., Chu, Z., Wang, S. (2003) Three types of defense-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. *Molecular and General Genetics* 269: 331-339
- Wiesenbach, M., Uberlacker, B., Vogt, F., Becker, D., Salamini, F., Rohde, W. (1993) Myb genes from *Hordeum vulgare*: tissue-specific expression of chimeric Myb promoter/Gus genes in transgenic tobacco. *Plant Journal* 4: 411-422
- Wolter, M., Hollricher, K., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1993) The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Molecular and General Genetics* 239: 122-128
- Wu, G., Shorrt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C., Shaw, 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
- Wu, G., Shorrt, B. J., Lawrence, E. B., Leon, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Raskin, I., Shaw, D. M. (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology* 115: 427-435
- Xie, Z., Zhang, Z.-L., Zou, X., Huang, J., Ruas, P., Thompson, D., Shen, Q. J. (2005) Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology* 137: 176-189
- Xu, Y.-H., Wang, J.-W., Wang, S., Wang, J.-Y., Chen, X.-Y. (2004) Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase A. *Plant Physiology* 135: 507-515

- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., Yokoyama, S. (2005) Solution structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA binding domain. *Plant Cell* 17: 944-956
- Yanagisawa, S., Sheen, J. (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 75-89
- Yang, H., Huang, H., Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive resistance in plants. *Cell* 73: 1255-1266
- Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., Chen, Z. (1999) A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant Journal* 18: 141-149
- Yang, K. Y., Im, Y. J., Chung, G. C., Cho, B. H. (2002) Activity of the *Arabidopsis* blue copper-binding protein gene promoter in transgenic tobacco plants upon wounding. *Plant Cell Reports* 20: 987-991
- Yoda, H., Ogawa, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H. (2002) Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Molecular and General Genomics* 267: 154-161
- Yu, Y., Tomkins, J. P., Waugh, R., Frisch, D. A., Kudrna, D., Keinhofs, A., Bueggeman, R. S., Muehlbauer, G. J., Wise, R. P., Wing, R. A. (2000) A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1093-1099
- Yu, D., Chen, C., Cerl, Z. (2001) Evidence for an important role for WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* 13: 1527-1539
- Zhang, S., Klessig, D. F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* 6: 520-527
- Zhang, J. Z. (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 430-440
- Zhang, Z.-L., Xie, Z., Zou, X., Casaretto, J., Ho, T.-H. D., Shen, Q. J. (2004) A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology* 134: 1500-1513
- Zhang, Y., Wang, L. (2005) The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology* 5: 10.1186/1471-2148-5-1
- Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 2751-2755
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767
- Zou, X., Seemann, J. R., Neumann, D., Shen, Q. J. (2004) A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the ABA signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279: 55770-55779

8 ANHANG

8.1 Primersequenzen

Tab. 7.1 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer (fett: eingefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen)

Primername	Sequenz
<u><i>Isomerase</i></u> 5-4for 5-4rev SAL5-4 Bam5-4	5'-CGCACCCCTCTCGCAAGTTC-3' 5'-CTGCGCCGAGCTGCCTACAGA-3' 5'-AC GTCGACT CATTGCGTCTGCCCTA-3' 5'-AC GGATCC TGCCGCATCCATGGCGAA-3'
<u><i>RLK</i></u> 8a-14for 8a-14rev	5'-CTTGTCCAGGCTACCGTTTG-3' 5'-ATCCAAGCAAGGGGTGAAG-3'
<u><i>scarecrow-like protein</i></u> 8a-4for 8a-4rev	5'-AGGTGCCAAAACGAGGTTCA-3' 5'-GTGGGTCTTGCAAGGATGGA-3'
<u><i>MAPKKK</i></u> 9-8for 9-8rev	5'-GGATGCGTATGGACAAGGTTCTGCAC-3' 5'-CTCTCGTCAGCACCACCTTCGT-3'
<u><i>Poly73</i></u> PI073s PI073as	5'-CCGGATATGCAGTAAAGATGC-3' 5'-GGAGCTTCAGGAGAACATGC-3'
<u><i>Poly85</i></u> RACEP855' Poly85as	5'-GGTAGGGATGCCGCAGATGAA-3' 5'-GTAGGGATGCCGCAGATGAAGTAG-3'
<u><i>putative Phytochelatinsynthase</i></u> RT 13b11f RT 13b11r	5'-CAAGCCCAAGTGCTGTGTCACC-3' 5'-CGACCCACTCATGTTGGTTTGC-3'
<u><i>HvWRKY1 = contig04386</i></u> 9-10Xbafor 9-10Sph RT9-10for RT9-10rev WRKY1Sal3' WRKY1Sph5' Pst9-10RNAi Spe9-10RNAi Xba9-10RNAi Bam9-10RNAi	5- TCTAGAG AGGGACCAATGGATCCA-3' 5'- GCATGCT GTGGGGATTAATTGATG-3' 5'-GACGAGGGACCCAGCTTCAA-3' 5'-CATGGAAATTATGGAACGGAACATTTG-3' 5'- GTCGAC GATTAATTGATGTCCCTGGTC-3' 5'-GCAT GCATCG ATCCATGGATAGGCAG-3' 5'- CTGCAGCT CGAGCTCTCGCCGACCA-3' 5'- TGATCAGG AAATTATGGAACGGAAC-3' 5'- TCTAGAGG AAATTATGGAACGGAAC-3' 5'- GGATCCT CGAGCTCTCGCCGACCA-3'
<u><i>HvWRKY2 = contig04387</i></u> WRKY3Spe5' WRKY3HindIII RTWRKY3for RT04387for RT04837rev RTW3Oktfor RTW3Oktrev WRKY3Sal5' WRKY3Hind3'	5'- ACTAGT CGAGGAAGACATGGAGGAGCA-3' 5'- AAGCTT GCTGGGAGATTTCCGATCA-3' 5'-CGAGGAAGACATGGAGGAGCA-3' 5'-CTACGTCTGAGGGCAGTTCC-3' 5'-CGTGGACGTAGACCTTGGAG-3' 5'-GGTTCGCTTCATTCTTGACG-3' 5'-AACGACTGGTGGTGGTTGTT-3' 5'- GTCGAC ACATCGAGGAGCAGTGGA-3' 5'- AAGCTT GCTGGGAGATTTCCGATCA-3'

<u>HvWRKY3</u> RTW6for RTW6rev RTHvWRKY3for RTHvWRKY3rev 3'RACEW6II nest3'RACEW6II 3'RACEW6 n3'RACEW6	5'-CGCAGTCTCAGCCTCTCAGGTTTC-3' 5'-TCCGCCATTGATACCCGTCTTTC-3' 5'-GGAGGTAAGCGAGGAGAACC-3' 5'-GCTCTCCCTGCTCCTTTTCT-3' 5'-GGCAAGAAAAGGAGCAGGGAGAGCATGGA-3' 5'-GATTCCGGCGATGGCAACAGCGACAA-3' 5'-TTGTGCTGTTGCCATCGCCGGAATC-3' 5'-TCCATGCTCTCCCTGCTCCTTTTCTTGCC-3'
<u>HvWRKY4 = contig20450</u> W15fwd W15rev RTHvWRKY4for RTHvWRKY4rev	5'-GCGGGCGATGACGGCG-3' 5'-GAAAAGCATCGAATGAAGATCAGCCG-3' 5'-AGCTGATGAAGGGGTTGTTG-3' 5'-AAGGGCTCTTCGACCTTCTC-3'
<u>HvWRKY5 = contig18462</u> W16fwd W16rev RTHvWRKY5for RTHvWRKY5rev	5'-CGGCACGAGGTGTGGACTTG-3' 5'-CCTGGACATATTATCAATTATCAGTTATGACGC-3' 5'-CGAGGAGCAAAGGCAGTAAG-3' 5'-TCGTAGGTGGTGTGATGACGAA-3'
<u>HvWRKY6 = contig14308</u> W17fwd W17rev RTHvWRKY6for RTHvWRKY6rev	5'-GGCTGCAAAGATGAGCGATGG-3' 5'-CTAACCCAACAACAGCTCACGTAACC-3' 5'-ATCACCCCAGCAATGACAAT-3' 5'-ATGCTGTGCAGAGTTTGTGC-3'
<u>HvWRKY8 = contig10167</u> RTW8for RTW8rev W8fwd W8rev	5'-GCACCAGTGCTCTACCAACA-3' 5'-ACTCGGAGATGTGCGAACTGC-3' 5'-GCTCTCGCCGGTGACAAACTCG-3' 5'-CAAGATGGAAGCCCCGTACGTG-3'
<u>HvWRKY9</u> RTW10for RTW10rev W9fwd W9rev	5'-CTGTGTCTCACCTCCGATGA-3' 5'-GGGTGCGAACTCGAAAAGGTA-3' 5'-CAGGTCCGGGTGGCGTCG-3' 5'-GTAGGATGCTGGCCGCTGCG-3'
<u>HvWRKY10 = contig21110</u> W10fwd W10rev	5'-GATTAATCCCTCCGTGTCCGCG-3' 5'-GATATGCTCTGTTGTCGTCCTCACATG-3'
<u>HvWRKY11 = contig15957</u> RTW11for RTW11rev W11fwd W11rev	5'-GACCACGACGAACACCAAC-3' 5'-GCATGAAGTCCTCGAGATACG-3' 5'-GTGCTCGTGCTTGGATCGATCT-3' 5'-CGATCCTCCCGACCCACG-3'
<u>HvWRKY12 = contig12005</u> W12fwd W12rev RT12005for RT12005rev	5'-GGAATCCACCTTACACCGGCGAG-3' 5'-CTTTTTTCAAACGTCTGATGCTAAGAAGGC-3' 5'-AGAAGTCCATCGGCATCATC-3' 5'-CCGACGTCTTCTCTTCTTG-3'
<u>HvWRKY13 = contig07243</u> RTW13for RTW13rev W13fwd W13rev	5'-CATGATGAGGGCATGTGAAG-3' 5'-ACCCATGGTTTGCATTTGAT-3' 5'-GCGGGCGCGAGGTACAAGG-3' 5'-GCATTTGCAGACACTCTCATTCCCTC-3'

<u>HVWRKY14 = contig12033</u> RTW14for RTW14rev W14fwd W14rev	5'-ACTCAATGATGCCGAGGAAC-3' 5'-CCTGGTGCATTCTTTTCATT-3' 5'-CGGCACGAGGTGATGATGGC-3' 5'-GCACGAACCACCGAAAGATTACACTAG-3'
<u>Gersten-WRKY-Faktoren auf dem 22K barley1 GeneChip, Affymetrix, High Whycombe, UK)</u> RT23697for RT23697rev RT07798for RT07798rev RT22226for RT22226rev RT13268for RT13268rev RT15657for RT15657rev RT20358for RT20358rev RT07517for RT07517rev RT16040for RT16040rev	5'-CACCGGCCACTACCTTAACC-3' 5'-GGTGCTGGCTCATGTACGAC-3' 5'-GTGACGTCCACGTCCTTCTT-3' 5'-CACTCTCACCGTCGTCTTCA-3' 5'-GCACCAGATGAAGTTGCAGA-3' 5'-ACGTCTGCGAGCCACTAACT-3' 5'-CTACCGGTGGAGGAAGTACG-3' 5'-AGCTGCGAGAGGAAGTGAAG-3' 5'-AAGATGCAGCTGATGTGTCCG-3' 5'-TCAACCTCGCTTGTGTCTG-3' 5'-CCGACAACTGGAACAGGAAC-3' 5'-CTCCTCGACAGGAGAAGCAC-3' 5'-AATGGCTTTGGTCAAGTTGG-3' 5'-GTGGGCGATGAAAAAGAACT-3' 5'-GGGAAGCAGCAGGTAGACTG-3' 5'-AGTCCAACGTCATGGACCTC-3'
<u>Sonstige</u> M13fw[-40] M13rev M13reverse[-21] M13forward[-29] HvUbi60degfor HvUbi60degrev 35S_for 35S_rev SeqpQE	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' 5'-AACAGCTATGACCATGA-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' 5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3' 5'-ACCCTCGCCGACTACAACAT-3' 5'-CAGTAGTGGCGGTCTGAAGTG-3' 5'-ATGGTGGAGCACGACACTCT-3' 5'-GGTCTTGCGAAGGATAGTGG-3' 5'-CGGATAACAATTTACACAG-3'
<u>Primer für EMSA</u> Wbox1f Wbox1r Wbox2f Wbox2r	5'-GGGCATGTGTGGTGCACCTTCTTGACCCGATCATCAGCAC-3' 5'-GGGGTGCTGATGATCGGGTCAAGGAAGTGCACCACACAT-3' 5'-GGGAACGTGACGTCGGTCAAGAAAAGGGGCACC-3' 5'-GGGGGTGCCCTTTTCTTGACCGACGTCGACGTT-3'

8.2 Vektorkarten

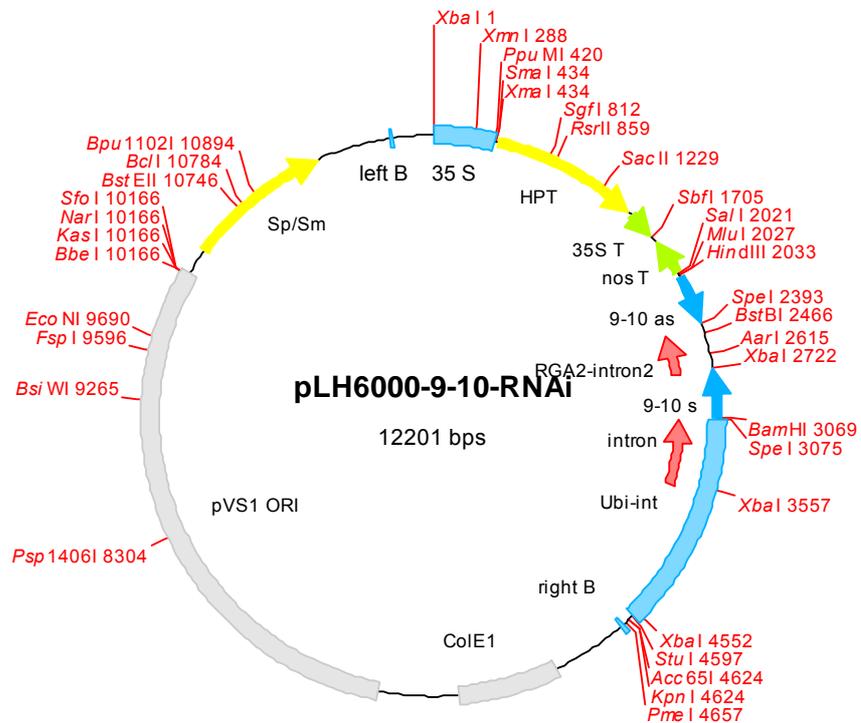


Abb. 7.1 Vektorkarte des Binärvektors pLH6000-9-10-RNAi für die stabile Transformation

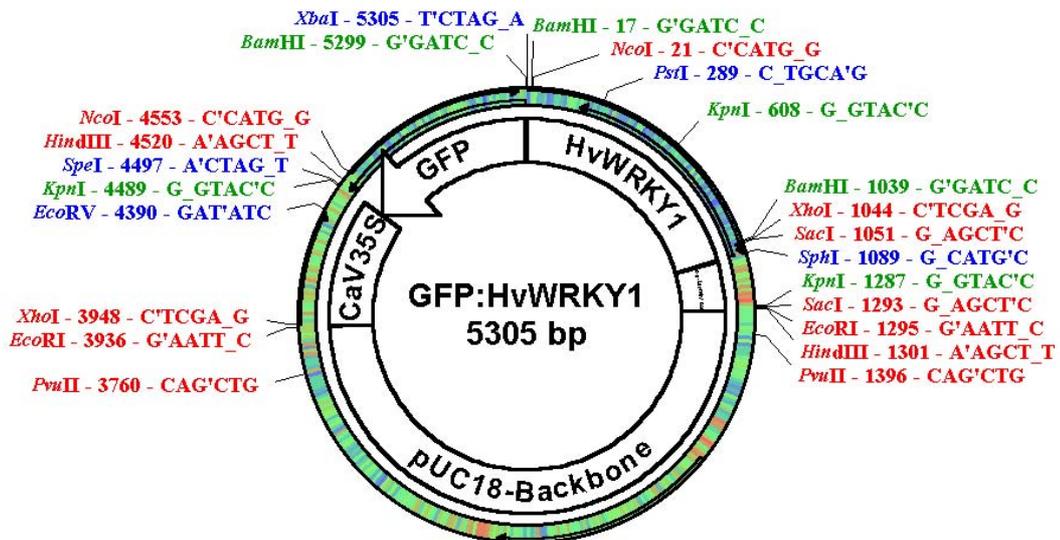


Abb. 7.2 Vektorkarte von GFP:HvWRKY1 in pGY-1 (Schweizer et al., 1999).

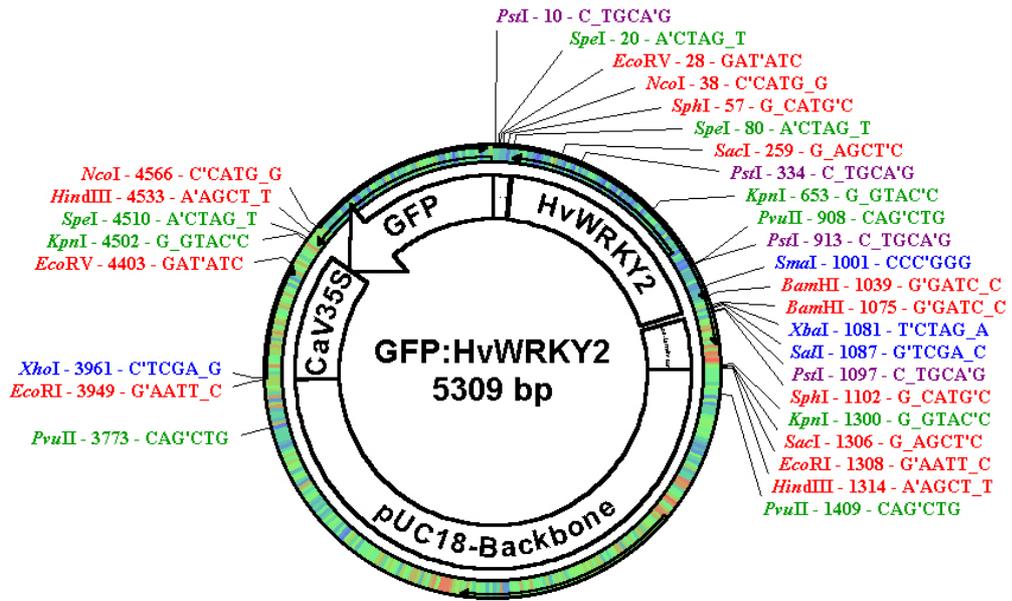


Abb. 7.3 Vektorkarte von *GFP:HvWRKY2* in pGY-1 (Schweizer *et al.*, 1999).

8.3 Übersicht über transgene *HvWRKY1-RNAi*-Gerstenpflanzen

Tab. 7.2 Auflistung der transgenen *HvWRKY1* RNAi Gerstenlinien mit Bezeichnung der Linie, Generation der Pflanzen, Kultivar, Ergebnis der Test-PCR auf den Selektionsmarker Hygromycin und auf das *HvWRKY1-RNAi* Konstrukt (GOI = *gene of interest*). + = positives Testergebnis, - = negatives Testergebnis, ? = nicht durchgeführt.

Linie	Generation	Kultivar	PCR Hygromycin	PCR GOI
B21/1-1a	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-1b	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-2	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-4	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-5	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-6	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-7	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-8	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-10	T ₀	Golden Promise	-	+
B21/1-12	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-13	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-14	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-15	T ₀	Golden Promise	-	+
B21/1-16	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-17	T ₀	Golden Promise	-	+
B21/1-18	T ₀	Golden Promise	+	+
B21/1-19	T ₀	Golden Promise	+	+
B17/2-1	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-2	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-3	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-4	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-5	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-6	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-7	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-8	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-9	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-10	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-11	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-12	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-13a	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-13b	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-14	T ₁	Golden Promise	+	+

ANHANG

191

B17/2-15	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-16	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-17	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-18	T ₁	Golden Promise	+	+
B17/2-19	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-1	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-2	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-3	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-5	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-6	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-7	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-9	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-10	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-11	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-12	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-13	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-15	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-16	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-17	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-21	T ₁	Golden Promise	+	+
B18/2-22	T ₁	Golden Promise	+	?
B18/2-23	T ₁	Golden Promise	+	?
B18/2-24	T ₁	Golden Promise	+	?

Tab. 7.3 Auflistung der transgenen *HvWRKY1* RNAi Weizenlinien mit Bezeichnung der Linie, Generation der Pflanzen, Kultivar, Ergebnis des PAT-assays + = positives Testergebnis.

Linie	Generation	Kultivar	PAT-assay
AMP 208	T ₁	Bobwhite	+
AMP 210	T ₁	Bobwhite	+
AMP 217	T ₁	Bobwhite	+
AMP 218	T ₁	Bobwhite	+
AMP 237	T ₁	Bobwhite	+

Tab. 7.4 Auflistung der vermehrten transgenen *HvWRKY1*-RNAi-Gerstenlinien mit Bezeichnung der Linie, Anzahl der gekeimten Körner pro ausgelegter Körner, daraus errechneter Keimrate, der Information ob eine Vermehrung stattfand und welche Linien wie getestet wurden. + = durchgeführt, - = nicht durchgeführt.

Linie	Körner gekeimt/ Körner ausgelegt	Keimrate [%]	Vermehrung	Testmethode
B17/2-1	19/20	95	+	-
B17/2-2	19/20	95	+	-
B17/2-3	19/20	95	+	-
B17/2-4	19/20	95	+	-
B17/2-5	16/20	80	+	-
B17/2-9	9/10	90	+	RT-PCR Mikroskopie
B17/2-13a	9/10	90	+	Southern Blot
B18/2-1	9/10	90	+	RT-PCR Southern Blot
B18/2-2	9/10	90	+	RT-PCR Mikroskopie
B18/2-3	15/20	75	+	-
B18/2-5	20/20	100	+	-
B18/2-6	16/20	80	+	-
B18/2-7	9/20	45	+	-
B18/2-11	5/10	50	-	RT-PCR Southern Blot
B18/2-20	10/20	50	+	-

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel danken für die Übertragung des Themas, sein reges Interesse am Fortschritt der Arbeit und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Bei Herrn Prof. Dr. Edwin Pahlich bedanke ich mich für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Biologie und ebenso wie bei Herrn Prof. Dr. Wagner für den guten Kontakt schon während des Studiums und die Bereitschaft zur Disputation.

Dr. Gregor Langen möchte ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit in fachlicher aber auch in persönlicher Hinsicht danken, besonders auch für die Lösung von Computerproblemen jeglicher Art und die stete Kommunikationsbereitschaft und viele, viele Ideen.

Ebenso möchte ich Dr. Christina Eckey danken, die sich engagiert um ihre „Kücken“ gekümmert hat und mir den Einstieg in das Thema und den Kollegenkreis erleichterte. Auch dankbar bin ich für die umfassende Vorarbeit zum Thema WRKY-Faktoren.

Dr. Lothar Altschmied danke ich für das *screening* der *BAC-library* und Dr. Götz Hensel und Dr. Jochen Kumlehn für die Erstellung der transgenen Gerstenpflanzen. Außerdem möchte ich Gamini Kanangara (*Washington State University, Pullman, USA*) für sein Southern Blot Protokoll und viele Tipps dazu danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ingo Ciolkowski, der zusammen mit Lenka Malinowski und Jutta Preuß immer für gute Stimmung und Motivation sorgte. Außerdem möchte ich ihm für die vielen Diskussionen über das Thema und das Manuskript dieser Arbeit sowie für viele eingefrorene PCRs danken.

Dipl. Biol. Sandra Karl gilt mein Dank für die stete Begleitung auf meinem bisherigen Weg und ihr reges Interesse an allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit sowie für Unmengen „Nervennahrung“.

Außerdem möchte ich mich bei Dirk Bastgen, meinen Eltern und allen Freunden bedanken, die mich durch ihr Interesse unterstützten, Teile dieser Arbeit Korrektur gelesen haben oder mich mit schönen Tangos ablenkten.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern des IPAZ für ihre Hilfe bei allen Problemen und neuen Methoden sowie allen für die vielen netten Gespräche – besonders am Mikroskop.

Ich möchte mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken, die dieses Projekt finanziell ermöglichte (FOR 343).

Lebenslauf

Name: Katja Leib
Geburtsdatum: 24.03.1978
Geburtsort: Gießen
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1984 bis 1988 Grundschule Rodheim-Bieber
1988 bis 1997 Landgraf-Ludwig-Schule Gießen
Juni 1997 Abitur

Studium

September 1997 bis
Mai 2002 Studium der Biologie an der Justus-Liebig
Universität Gießen, Abschluss: Diplom
Prüfungsfächer: Botanik, Zoologie,
Pflanzenphysiologie, Zellbiologie

April 2001 bis
Mai 2002 Diplomarbeit am Institut für
Pflanzenernährung der JLU Gießen
Tätigkeit als studentische Hilfskraft

Juni 2002 bis
Mai 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut
für Phytopathologie und Angewandte Zoologie
der JLU Gießen

seit Oktober 2005 Wirtschaftswissenschaftliches Aufbaustudium
an der Fern-Universität Hagen