

Institut für Pflanzenzüchtung von Pflanzenschutz
der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



**“Transkriptomanalyse mehлтаubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des
mlo-Resistenzgenes”**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von:

Diplombiologe Uwe Zierold
geb. am 20.11.1969

Gutachter:
Prof. Dr. Holger Deising
Prof. Dr. Andreas Graner
Dr. Patrick Schweizer

Verteidigung am: 20.06.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009668

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009668>]

Halle/Saale 01/2005

Institut für Pflanzenzüchtung von Pflanzenschutz

Zusammenfassung

“Transkriptomanalyse mehлтаubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des *mlo*-Resistenzgenes”

Die pflanzliche Epidermis ist von grundlegender Bedeutung für die Wirts- und Nichtwirts-Abwehr einer großen Anzahl von Pilzkrankheiten, einschließlich des Gerstenmehltaus, der durch *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer *f.sp.* hordei verursacht wird. Um die Mechanismen in der Epidermis, die letztlich zu Anfälligkeit oder dauerhafter Resistenz führen, besser zu verstehen, wurde das Transkriptom der isogenen Linien Ingrid *Mlo* (anfällig) und Ingrid BC *mlo5* (resistent) charakterisiert. Ein cDNA-Array, das mit 3.136 Genen die mRNA-Population der Epidermis mehltaugestresster resistenter Gerste (Ingrid BC *mlo5*) repräsentiert, wurde erstellt und mit cDNA-Sonden aus inokulierter und nichtinokulierter Sprossepidermis beider isogener Linien hybridisiert. 233 differentiell exprimierte Gene wurden bei dem Vergleich von Kontrolle und inokulierter Epidermis gefunden, von denen 26 Gene pilzlichen Ursprungs waren. Die pflanzlichen Gene des Kandidatengensets wurden bevorzugt in der Epidermis reguliert, wie aus *split-sample* Experimenten hervorging. Transkripte der meisten abwehrkorrelierten Gene akkumulierten in Anwesenheit des *mlo5* Resistenzgenes stärker als in der anfälligen Interaktion. Dies deutet darauf hin, dass die *mlo*-vermittelte Resistenz auf einem komplexen Abwehrmechanismus beruht. Möglicherweise lässt sich damit auch die Dauerhaftigkeit der *mlo*-vermittelten Resistenz im Feld erklären. Das ermittelte Kandidatengenset von in der Epidermis exprimierten Genen stellt eine wertvolle Ressource für nachfolgende Studien von Abwehrmechanismen der Pflanze im Allgemeinen und für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der *mlo*-vermittelten-Resistenz im Speziellen dar. Das gesamte Kandidatengenset wurde in einem systematischen TIGS-Screening (*Transient Induced Gene Silencing*) getestet, wobei ein Gen gefunden wurde, welches die Resistenz der vollständig resistenten Gerstenlinie Ingrid BC *mlo5* durchbricht. Hierbei handelt es sich um das am Vesikeltransport beteiligte t-SNARE-Protein HvSNAP34. In ersten weiterführenden Experimenten wurden einzelne in *mlo5* stärker exprimierte Kandidatengene auf ihre mögliche Funktion im Resistenzmechanismus untersucht. Die Glutamat-Decarboxylase als Schlüsselenzym der GABA-Synthese ist ein solches Kandidatengen. GABA-Konzentrationen wurden gemessen und Resistenzinduktionsexperimente durchgeführt. Die Daten deuten darauf hin, dass GABA möglicherweise eine Rolle bei der anaplerotischen Reaktion, nicht aber bei der Signaltransduktion in der Zelle, spielt.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor agriculturarum (Dr. agr.) der
Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplombiologe Uwe Zierold
geb. am 20.11.1969 in Meerane

Halle/Saale 01/2005

Institut für Pflanzenzüchtung von Pflanzenschutz

Abstract

“Gene expression in the epidermis of powdery mildew-attacked barley carrying the *mlo* resistance gene”

The shoot epidermis of plants is of prime importance for host and nonhost defence against a large number of fungal diseases including powdery mildew of barley, caused by *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer *f.sp.* hordei. In order to better understand mechanisms within the epidermis leading to susceptibility as well as durable host resistance, we characterized the transcriptome of two *Blumeria*-attacked, near isogenic barley lines differing in the presence of the *mlo5* resistance gene. A cDNA array from epidermal tissue of pathogen-attacked resistant barley plants was established containing 3.136 unique sequences that was then hybridized with cDNA probes from pathogen-challenged epidermis. Expression analysis resulted in the identification of 233 candidate genes that were differentially expressed in a reproducible manner in control and inoculated epidermis. Among the upregulated genes 26 of fungal origin were found. Split-sample-experiments revealed a bias for expression of defence-related genes in the epidermis. Transcripts of many defence-related genes accumulated to higher levels in the presence of the *mlo5* resistance gene, as compared to a susceptible interaction. This suggests that *mlo*-mediated resistance is based on multiple defence mechanisms leading to durable resistance even under field conditions. The identified set of epidermally expressed host genes represents a valuable resource for further studies of plant defence mechanisms in general and especially the molecular mechanisms involved in *mlo* mediated resistance. TIGS (transient induced gene silencing) approaches were used for candidate genes in order to identify genes which are essentially responsible for *mlo*-resistance. HvSNAP34 was identified as a first candidate leading to the offset of resistance in Ingrid BC *mlo5* in the silencing approach. HvSNAP34 encodes a vesicel trafficking associated t-SNARE protein. Further experiments to elucidate the functional relevance of interesting candidate genes in this plant pathogen interaction were initiated. In the context of these analyses glutamate decarboxylase producing γ -aminobutyric acid was found to be induced in epidermal tissue. Therefore we measured γ -aminobutyric acid concentrations and carried out resistance induction experiments. The data suggest a possible role of γ -aminobutyric acid in the anaplerotic reaction rather than in signal transduction.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor agriculturarum (Dr. agr.) der
Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplombiologe Uwe Zierold
geb. am 20.11.1969 in Meerane

Halle/Saale 01/2005

Lebensabschnitt

Ich mache eine Amnestie
Aus herzlichem Verlangen.
Und sei auch Du und sein auch Sie
Zu mir ganz unbefangen.

Das Leben ist ein Rutsch-Vorbei.
Nur das, was echt gewesen,
Nährt weiterhin. –Ein Besen,
Zu wild geschwenkt, schlägt viel enzwei.

Seid gut zu mir und macht Radau,
Verzeihend und auch Reue!
Wollt ihr? Wer reist aufs neue
Mit mir ins Himmelblau?

Joachim Ringelnatz

Vorwort

An dieser Stelle soll es nicht um Stress bei Pflanzen sondern vielmehr um Stress in meinem sozialen Umfeld gehen. Ich weiß, dass ich positiven als auch negativen Stress induziert habe. Egal, um welche Art Stress es sich handelte, möchte ich mich für das bedanken, was bei den Pflanzen als Pathogenantwort bezeichnet wird.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Dr. Patrick Schweizer danken, von dem die Idee für diese Arbeit stammt und der mich stets freundschaftlich betreut hat. Er wird mir mit seiner Beharrlichkeit immer Vorbild bleiben. Herrn Professor Dr. Holger Deising möchte ich für die Betreuung in der Endphase meiner Arbeit und die Begutachtung der Arbeit danken. Herrn Professor Dr. Andreas Graner möchte ich ebenfalls für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. Lothar Altschmied, der mir bei schwierigen Problemen der Arrayerstellung und Auswertung stets behilflich war, Herrn Dr. Volodja Radschuk, der mich bei der Erstellung der cDNA-Bank unterstützte, Herrn Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei, in dessen Labor die GABA-Messungen durchgeführt wurden, Herrn Dr. Uwe Scholz und Matthias Lange mit denen ich bei der Sequenzanalyse der HO-EST-Bank zusammenarbeitete und Herrn Dr. Mitko Douchkov der mir sein *know how* für die Erstellung der RNAi-Bibliothek weitergab.

Ich möchte mich recht herzlich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken. Großen Anteil am Gelingen meiner Arbeit hatte Frau Gabi Brandtin. Ich möchte mich bedanken bei Frau Ines Walde, die den Array und ab und an mit mir spottete, bei Frau Susanne König, bei Frau Sonja Genz, bei Frau Stefanie Lück, bei Manuela Knauff, bei Frau Bettina Brückner, bei Herrn Roland Schnee, bei Mr. Vasu Kumanduri und bei Thomas Münch.

Für die Durchsicht des Manuskriptes möchte ich mich bei Herrn Dr. Patrick Schweizer, bei meiner Freundin Astrid Vorwieger, bei Ines Walde, Anja Hahnemann, Sebastian Eulenstein und Corinn Espig bedanken.

Ich möchte mich bei allen Freunden/innen bedanken die mir Mut zugesprochen und die zu mir gestanden haben. Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Großvater danken, die mir in einer Zeit finanzieller und persönlicher Abhängigkeit Sicherheit und Optimismus gegeben haben.

Wäre interessant, welche Gene bei positivem als auch negativem Stress induziert bzw. reprimiert werden. Manche Leute sind ja bekanntlich resistent und manche anfällig. Nichtsdestotrotz möchte ich mich bei allen nochmals recht herzlich bedanken, egal welche phänotypischen Ausprägungen charakteristisch waren. Und Dank denen, die ich in dieser kurzen Abhandlung vergessen habe. *You know, nobody is perfect* ☺.

Bemerkungen: Proteine (MLO), Gene (*Mlo*) und Mutanten (*mlo*) wurden entsprechend den *Arabidopsis*-Nomenklaturregeln dargestellt. Entlehnte fremdsprachliche Wörter wurden *kursiv* gedruckt. Die Arbeit wurde nach den Regeln der "neuen Rechtschreibung" verfasst.

Eigene Veröffentlichungen

Zeitschriften:

Zierold, U., Scholz, U. and Schweizer, P. (2004) Influence of the *mlo* resistance gene on gene expression in powdery mildew-attacked epidermal cells of barley; *Molecular Plant Pathology* 6 (2): 139-151

Temp, U., Zierold, U., Eggert, C. (1999) Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*; *Gene* 236, 169-177

Maucher, H., Stenzel, I., Miersch, O., Stein, N., Prasad, M., Zierold, U., Schweizer, P., Dorer, C., Hause, B., Wasternack, C. (2004) The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)-cloning and organ-specific expression; *Phytochemistry* 65(7): 801-811

Zhang, H., Sreenivasulu, N., Weschke, W., Stein, N., Rudd, S., Radchuck, V., Potokina, E., Scholz, U., Schweizer, P., Zierold, U., Langridge, P., Varshney, R. K. and Graner, A. (2004) Determination of Structure and Size for the Barley Transcriptome Based on Expressed Sequence Tag (EST); *The Plant Journal* 40, 276-290

Douchkov, D., Nowara, D., Zierold, U., Schweizer, P. (2005) A high-throughput gene silencing system for the functional assessment of defence related genes in barley epidermal cells; *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (8): 755-761

Vorträge:

Zierold, U.; Schweizer, P., (2004) Transkriptomanalyse mehltaubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des *mlo*-Resistenzgens. Tagung der DPG Arbeitskreise Mykologie und Wirt-Parasit-Beziehungen

Zierold, U.; Schweizer, P., (2003, 2004) Transkriptomanalyse mehltaubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des *mlo*-Resistenzgens. Kolloquien für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz

Poster:

Zierold, U.; Schweizer, P., (2001) The interaction transcriptome of *mlo*-resistant barley "Durable Resistance in Cereals-SAR and other strategies to improve plant production", SAR Workshop, Rauischholzhausen

Zierold, U.; Schweizer, P., (2002) The transcriptome of powdery mildew-attacked *mlo*-resistant barley, Plant Genomics European Meetings, Berlin

Zierold, U.; Schweizer, P., (2002) The interaction transcriptome of *mlo*-resistant barley, 6th Gatersleben Research Conference, Meisdorf

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Vorwort	IV
Eigene Veröffentlichungen	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Das Abwehrsystem der Pflanzen.....	1
1.1.1 Pathogenerkennung	2
1.1.2 Unspezifische Elizitoren.....	2
1.1.3 Spezifische Elizitoren und R-Protein-vermittelte Resistenz	3
1.1.4 Reaktionen der Pflanze nach Pathogenkontakt	4
1.1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies.....	5
1.1.4.2 Hypersensitive Reaktion	5
1.1.4.3 Induktion von pathogenassoziierten Genen	5
1.1.4.4 Induzierte Resistenz	6
1.2 Die Interaktion zwischen Gerste und <i>Blumeria graminis</i>	6
1.2.1 Die Kulturpflanze Gerste.....	7
1.2.2 Die Echten Mehltaupilze	7
1.2.3 Resistenzen in Gerste	7
1.2.4 Entwicklung von <i>Blumeria graminis</i> auf Gerste.....	9
1.2.5 Physiologie, Genexpression und Enzyme in <i>Blumeria graminis</i>	12
1.2.6 Antwort der Gerste nach Inokulation mit <i>Blumeria graminis</i>	12
1.2.6.1 Frühe zelluläre Ereignisse	12
1.2.6.2 Papillenbildung.....	13
1.2.6.3 Hypersensitive Reaktion	13
1.2.7 Induzierte Resistenz in Gerste.....	14
1.2.8 Expression von pathogenregulierten Komponenten der Gerste	14
1.2.9 Bedeutung des Pathosystems Echter Mehltau und Gerste	15
1.3 Die <i>mlo</i> -vermittelte Breitband-Resistenz	16
1.3.1 Der <i>mlo</i> -Resistenz-Phänotyp.....	16
1.3.2 Die Gen- und Protein Struktur von <i>Mlo</i> und <i>mlo</i>	16
1.3.3 Die biologische Funktion von MLO	18
1.3.4 <i>Downstream</i> -Komponenten der <i>mlo</i> -Resistenz.....	18
1.4 Genomforschung in Gerste.....	19
1.4.1 Strukturelle Genomforschung	19
1.4.2 cDNA-Banken und EST-Datenbanken	20
1.4.3 Funktionelle Genomforschung	21
1.4.3.1 Transkriptomanalysen	22

1.4.3.2 Revers-genetische Ansätze.....	23
1.5 Ziel der Dissertation.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Das Pathosystem Gerste und Mehltau.....	27
2.1.1 Versuchsorganismen.....	27
2.1.2 Anzucht der Versuchspflanzen.....	27
2.1.3 Erhaltung und Konidienproduktion von <i>Blumeria graminis</i>	27
2.1.4 Inokulation der Versuchspflanzen im Pflanztopf.....	28
2.1.5 Biologisches Material für HO-cDNA-Bank und für Expressionsanalysen.....	28
2.2 Die HO-cDNA-Bank.....	29
2.2.1 Erstellung der HO-cDNA-Bank.....	29
2.2.1.1 RNA-Isolation.....	29
2.2.2 mRNA-Isolation.....	30
2.2.1.3 cDNA-Synthese, Klonierung und Transformation.....	30
2.2.1.4 Etablierung der HO-cDNA-Bank.....	31
2.2.3 EST-Sequenzierung und Analyse der HO-cDNA-Bank.....	31
2.3 Transkriptomanalyse der Interaktion Gerste und <i>Bgh</i> mittels Makroarray.....	32
2.3.1 Herstellung der HO-Array Membran.....	32
2.3.1.1 Neuordnung der cDNA-Klone des Unigensets.....	32
2.3.1.2 PCR-Amplifikation der cDNA-Klone des Unigensets.....	33
2.3.1.3 Übertragen der DNA-Fragmente auf die Arraymembran.....	33
2.3.1.4 Anordnung der <i>Spots</i> auf der Membran.....	34
2.3.1.5 Nachbehandlung der hergestellten Arraymembranen.....	34
2.3.2 Herstellung von cDNA-Sonden aus Epidermis- und Blattmaterial.....	35
2.3.2.1 RNA-Isolation.....	35
2.3.2.2 mRNA-Isolation.....	35
2.3.2.3 Synthese von cDNA.....	35
2.3.2.4 Radioaktive Markierung der cDNA mit ³³ P.....	36
2.3.3 Hybridisierung des Makroarrays mit ³³ P-markierten cDNA-Sonden.....	36
2.3.4 Datenerfassung- und -analyse des ³³ P-markierten cDNA-Makroarrays.....	37
2.3.4.1 Array-Scanning.....	37
2.3.4.2 Quantitative Bildanalyse.....	37
2.3.4.3 Normalisierung.....	38
2.3.4.4 Qualitätskontrolle.....	38
2.3.4.5 Genexpressions-Clusteranalyse.....	38
2.3.5 Entfernen von cDNA-Sonden von der Arraymembran.....	38
2.4 <i>Northern-Blots</i>	39
2.4.1 RNA-Isolation aus Blattmaterial der Gerste für <i>Northern-Blots</i>	39
2.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese zur Trennung von RNA.....	39
2.4.3 RNA-Transfer auf positiv geladene Nylonmembran (<i>Blotten</i>).....	40
2.4.4 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten für <i>Northern-Hybridisierung</i>	40
2.4.5 Hybridisierung der <i>Northern-Blots</i>	41
2.4.6 Detektion der mRNA-Transkripte.....	41
2.5 Unterscheidung zwischen <i>Blumeria</i> - und Gerste-Transkripten.....	41
2.5.1 Isolation genomischer DNA von Gerste und <i>Bgh</i>	41

2.5.2 PCR-Amplifikation aus genomischer DNA von Ingrid <i>mlo5</i> und <i>Bgh</i>	42
2.6 Funktionelle Untersuchung der Kandidatengene mittels TIGS	43
2.6.1 Herstellung der RNAi-Konstrukte für TIGS	45
2.6.1.1 PCR-Amplifikation der HO-cDNA-Templates und Aufreinigung der Fragmente.....	46
2.6.1.2 Subklonierung der DNA-Fragmente in pIPKTA33	48
2.6.1.3 Klonierung in RNAi-Kassette pIPKTA30N	48
2.6.2 TIGS: Vom Biolistischen Gentransfer bis zur Detektion transformierter Zellen ...	49
2.6.2.1 Präparation der Gold-Suspension.....	50
2.6.2.2 Vorbereiten der Blattsegmente für den Beschuss	50
2.6.2.3 Beschichtung der Goldpartikel.....	51
2.6.2.4 Vorbereitung der Makrocarrier-Scheiben und der Zerreischeibe.....	51
2.6.2.5 Bombardementformation der Genkanone	51
2.6.2.6 Inkubation und Inokulation bombardierter Blattsegmente.....	52
2.6.2.7 GUS-Färbung transformierter Zellen	52
2.6.2.8 Coomassie-Färbung der Blattsegmente.....	52
2.6.2.9 Entfärbung der Blattsegmente.....	53
2.6.2.10 Mikroskopie der Blattsegmente	53
2.7 Messung von Aminosäure-Gehalten in der Epidermis und im ganzen Blatt.....	53
2.8 Standardprotokolle und -lösungen	54
2.8.1 Bakterienstämme	54
2.8.2 Oligonukleotidprimer	54
2.8.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA und DNA	54
2.8.4 Gelelektrophorese zur Trennung von DNA nach der Fragmentgröße	54
2.8.5 Präparation transformations-kompetenter Bakterienzellen.....	55
2.8.6 Transformation von kompetenten Bakterienzellen	55
2.8.7 Plasmid-Präparationen.....	56
2.8.8 Restriktionsverdau.....	56
2.8.9 Arbeiten mit RNA	56
2.8.10 Mikroskopie und Fotografie.....	56
2.8.11 Standardlösungen	57
3. Ergebnisse	59
3. 1 Die HO-cDNA-Bank aus der Epidermis mehлтаubefallener Gerste.....	59
3.1.1 Sequenzvergleiche gegenüber Gen- bzw. Proteindatenbanken.....	60
3.1.2 Die Komplexität der HO-cDNA-Bank: Definition des Unigensets	61
3.1.3 Vergleich der HO-cDNA-Bank mit der IPK-EST-Kollektion (135031 ESTs).....	61
3.1.4 Pilzgene in der HO-cDNA-Bank.....	62
3.2 Transkriptomanalyse	63
3.2.1 Globale Transkriptmusteranalyse.....	65
3.2.2 Kandidatengenset	66
3.2.2.1 Kriterien für die Auswahl des Kandidatengensets	66
3.2.2.2 Zeitlicher Verlauf der Genexpression nach Pathogenbefall.....	67
3.2.2.3 Bildung von funktionellen Kategorien innerhalb des Kandidatengensets	68
3.2.2.4 Transkriptmusteranalyse der pflanzlichen Kandidatengene	69
3.2.2.5 Regulationsfaktoren innerhalb der funktionellen Kategorien	70
3.2.2.6 Detektion genotypspezifisch exprimierter Gene	72

3.2.2.7 Elektronischer <i>Northern</i> des Kandidatengensets	75
3.2.3 Lokalisierung der Genexpression	77
3.2.3.1 Theoretischer EM-Wert.....	77
3.2.3.2 Biologische und methodische Bestätigung der EM-Werte	78
3.2.3.4 Epidermissonden contra Mesophyllsonden.....	82
3.2.4 Qualität der hergestellten Arraymembranen	83
3.2.5 <i>Northern-Blots</i> zur Bestätigung der Arrayexperimente	86
3.2.6 Bestätigung der Arrayergebnisse in isogenen Linien Pallas und Pallas P22	88
3.2.7 Unterscheidung zwischen pilzlichen und pflanzlichen ESTs.....	89
3.2.8 Bildung von Flavonoidderivaten, Indolalkaloiden und ligninartigen Substanzen ..	90
3.3 Systematisches TIGS- <i>Screening</i> aller Kandidatengene in <i>mlo</i> -resistenter Gerste.....	95
3.3.1 TIGS- <i>Screening</i> -Strategie	96
3.3.2 Klonierungsstrategie für RNAi-Konstrukte	96
3.3.3 Der Suszeptibilitätsindex (SI)	96
3.3.4 Auswertung der TIGS-Versuche und der Kontrollversuche	96
3.3.5 TIGS- <i>Screening</i> mit <i>Pools</i> von RNAi-Konstrukten.....	97
3.3.6 TIGS- <i>Screening</i> mit einzeln geschossenen RNAi-Konstrukten	98
3.3.7 Das RNAi-Konstrukt pIPKTA30_HO12F09	99
3.4 Messung von γ -Aminobuttersäure (GABA) und proteinogener Aminosäuren.....	100
3.4.1 Die Glutamat-Decarboxylase (GAD).....	100
3.4.2 GABA-Gehalte in Blättern von Gerste	101
3.4.3 Resistenzinduktionsexperimente: GABA als Signalmolekül.....	102
3.4.5 Gehalte proteinogener Aminosäuren.....	103
4. Diskussion	109
4.1 Etablierung von Ressourcen.....	109
4.1.1 Die HO-cDNA-Bank.....	109
4.1.2 <i>Large-scale</i> -Transkriptomanalyse im Pathosystem Gerste und Mehltau.....	110
4.1.3 Das TIGS- <i>Screening</i> System.....	112
4.2 Das epidermale Transkriptom der Gerste nach Pathogenbefall	113
Suche nach genotypspezifischen Komponenten der <i>mlo</i> -vermittelten Resistenz bzw. der	
<i>Mlo</i> -vermittelten Anfälligkeit.....	115
Gewebespezifische Expression: pathogenregulierte Gene wurden stärker in der	
Epidermis exprimiert.....	117
4.3 Mechanismen der <i>mlo</i> - bzw. <i>Mla</i> -vermittelten Resistenz.....	123
4.4 Weiterführende funktionelle Analysen	126
4.4.1 TIGS- <i>Screening</i> für 128 pathogeninduzierte Kandidatengene	126
4.4.2 Die Rolle von γ -Aminobuttersäure (GABA) in der <i>mlo</i> -vermittelten Resistenz ..	128
4.4.3. Die Messung aller proteinogenen Aminosäuren	130
4.5 Ausblick	130
Thesen.....	133
Literaturverzeichnis.....	135
Werdegang	159
Eidesstattliche Erklärung	161

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	entionisiertes von organischen Bestandteilen befreites Wasser (MilliQ-Anlage)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Avr-Gen	Avirulenz-Gen (vom Pathogen exprimiert)
BC	Rückkreuzung (<i>backcross</i>)
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
<i>Bgt</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. tritici</i> (Echter Weizenmehltau)
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BlastN	Nukleotidsequenz der Abfrage wird mit einer Nukleotiddatenbank verglichen
BlastX	Proteinsequenz der Abfrage wird mit einer Proteindatenbank verglichen
bp	Basenpaare (<i>base paires</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus (cauliflower mosaic virus)
CC	<i>coiled-coil</i> -Anhang
cDNA	komplementäre-DNA (<i>complementary DNA</i>)
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CR-EST	<i>Crop-EST</i> -Datenbank des IPK
CTP	Cytosintriphosphat
cv.	Sorte (cultivar)
CWA	Papillen (<i>cell wall appositions</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCINA	2,6-Dichlorisonicotinsäure (<i>2,6-dichloroisonicotinic acid</i>)
DI	Differentialindex
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EM-Wert	Verhältnis der Transkriptabundanz eines Gens von Epidermis und Mesophyll
ESH	Sekundärhype (<i>elongating secondary hyphae</i>)
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
E-Werte	<i>E-value</i>
<i>f.sp.</i>	<i>forma specialis</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
GABI	Genominitiative im biologischen System Pflanze
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GFP	grünes fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GLP	Germin ähnliches Protein (<i>germin like proteine</i>)
GTP	Guanidintriphosphat
GUS	β -Glucuronidase
HAU	Haustorium
HMFM	<i>Hogness Modified Freezing Medium</i>
HO	Identifikationscode der „HO-cDNA-Bank“ des IKP
hpi	Stunden nach der Inokulation (<i>hours post inoculation</i>)
HR	Hypersensitive Reaktion (<i>hypersensitive response</i>)

ID	Identifikationscode
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
IR	Induzierte Resistenz
ISR	<i>Induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonat
kB	Kilobase(n)
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LRR	Leucin reiche Wiederholung (<i>leucin rich repeat</i>)
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
Mb	Megabasen
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MOPS	Morpholin-3-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBS	<i>Nukleotide binding site</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat (Zucker: Ribose; ATP, GTP, CTP, UTP)
OD	Optische Dichte
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGRC	<i>Plant genome resources centre</i>
psi	<i>pounds per square inch</i>
R-Gen	resistenzvermittelndes Gen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	<i>Real-time-PCR</i>
SA	Salizylsäure
SAGE	<i>Serial analysis of gene expression</i>
SAR	SA-abhängige Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
SCRI	<i>Scottish Crop Research Institute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SNAP	<i>Synaptosome associated protein</i>
SNARE	SNAP-Rezeptor
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Natriumchlorid und -citrat (<i>sodium-salt-citrat</i>)
TIGS	<i>Transient induced gene silencing</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-SNARE	<i>Target-SNARE</i>
TTP	Thymidintriphosphat
U	enzymatische Einheit (<i>Unit</i>)
UV	ultraviolett
VIGS	<i>Virus induced gene silencing</i>
v-SNARE	<i>Vesikel-SNARE</i>