

2. Material und Methoden

2.1 Das Pathosystem Gerste und Mehltau

2.1.1 Versuchsorganismen

Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>)	Sommergerste Sorte „Ingrid“
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>)	Sommergerste Sorte „Ingrid <i>mlo5</i> “
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>)	Sommergerste Sorte „Golden Promise“
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>)	Sommergerste Sorte „Pallas“
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>)	Sommergerste Sorte „Pallas P22“
Weizen (<i>Triticum</i> subsp. <i>aestivum</i>)	Winterweizen Sorte „Kanzler“

Gerstenmehltau (<i>Blumeria graminis</i> (DC) Speer f. sp. hordei)	Rasse 4.8
Weizenmehltau (<i>Blumeria graminis</i> (DC) Speer f. sp. tritici)	Rasse FAL 92315

Die isogene Sommergerstenlinie „Ingrid *mlo5*“ entstand durch Einkreuzung der Mutante Risoe 5678 (Carlsberg II = *mother variety*) und sieben Rückkreuzungen mit Ingrid. Bei der Gerstenmehltaukultur handelt es sich um ein helvetisches Feldisolat mit dem Avirulenzgen *avrMla9*, bei der Weizenmehltaukultur um ein helvetisches Feldisolat ohne bekanntes Avirulenzgen.

2.1.2 Anzucht der Versuchspflanzen

Zur Anzucht der Versuchspflanzen wurden Plastiktöpfe mit Pikiererde locker gefüllt, die mit einer Holzscheibe bis 2 cm unterhalb des Randes leicht verdichtet wurde. Dann wurden etwa 60 Gerstenkörner pro Topf ausgesät, mit einer 1 cm dicken Erdeschicht abgedeckt und anschließend mit Leitungswasser gegossen.

Pflanzen für TIGS-Experimente wuchsen in einer Klimakammer (SIEMENS; SIMATIC OP7; 16 Stunden Metallhologenlicht/Halogenlicht 1:1; 8 Stunden Dunkelheit; Temperatur konstant 20°C; relative Luftfeuchtigkeit 60%; Pflanztopfe in Schalen mit 1 cm Wasser). Pflanzen für alle übrigen Experimente und für die Präparation der cDNA-Bank wuchsen im Gewächshaus auf Pikiertischen mit täglich befeuchteten Matten (16 Stunden Licht von Natriumhalogenlampen und 21±1°C; 8 Stunden und 17,5±0,5°C°).

2.1.3 Erhaltung und Konidienproduktion von *Blumeria graminis*

B. graminis ist ein obligat biotropher Pilz. Erhaltung und Konidienproduktion sind daher nur auf lebenden anfälligen Pflanzen möglich. Für die Erhaltung des Gerstenmehltaus (*Bgh*) wurde die Gerstensorte „Golden Promise“, für die Erhaltung des Weizenmehltaus (*Bgt*) die Weizensorte „Kanzler“ verwendet. Beides sind stark anfällige Sorten, der Pilz kann reichlich Konidien bilden. Die Aussaat der Pflanzen erfolgte wie unter Kapitel 2.1.2 beschrieben. Die Anzucht erfolgte in Klimaschränken (SANYO Biomedical MLR-350; Tokio, Japan) (16 Stunden Licht Fluoreszenzröhren FL40SS W/37; 8 Stunden Dunkelheit; 20°C konstant;

ca. 60% relative Luftfeuchtigkeit, Pflanztöpfe in Schalen mit 1 cm Wasser). Nach jeweils sieben Tagen wurden die Pflanzen durch Abschütteln von mehлтаubefallenen Pflanzen inokuliert und weiter in den Klimaschränken inkubiert. Als Spenderpflanzen für die Inokulation der Experimente wurden sieben bis 11 Tage gewachsene Mehлтаukulturen verwendet, wobei die Konidien ab sieben Tagen nach dem Überimpfen etwa alle zwei Tage abgeschüttelt wurden. Dadurch wurde gewährleistet, dass immer genügend virulente (frische) Sporen vorhanden waren.

2.1.4 Inokulation der Versuchspflanzen im Pflanztopf

Die Versuchspflanzen für die Genexpressionsanalysen und die Erstellung der cDNA-Bank wurden jeweils sieben Tage nach Aussaat inokuliert. Die Pflanztöpfe wurden dazu in einen Inokulationsturm (55x55x55 cm) gestellt und durch Abschütteln der Konidiosporen von Spenderpflanzen inokuliert. Die Inokulationsdichte betrug 150 bis 200 Sporen/mm².

2.1.5 Biologisches Material für HO-cDNA-Bank und für Expressionsanalysen

Ausgangsmaterial für die HO-cDNA-Bank waren abgezogene Epidermen von Primärblättern sieben Tage alter Ingrid BC *mlo5*-Pflanzen, die mit *Bgt* oder *Bgh* inokuliert wurden. Im Zeitraum von 4-8 Stunden und nach 22–28 Stunden wurden die Epidermen der abaxialen Seite mittels Skalpell und Präparierpinzette abgezogen und in flüssigem Stickstoff gesammelt (Abbildung 2.1). Insgesamt wurden sieben Inokulationsexperimente durchgeführt. Das Epidermismaterial wurde dabei im Gewichtsverhältnis 1:1:1:1 gemischt. Insgesamt wurden 2 g Epidermismaterial gewonnen. Teilweise blieben Mesophyllreste an der Epidermis haften (Abbildung 2.1 C). Für die Arraysonden und die HPLC-Messungen wurden jeweils ca. 300 mg Epidermisgewebe, und das verbliebene „Restblatt“ gesammelt. Für *Northern-Blot*-Experimente wurden dagegen ganze Blätter verwendet.

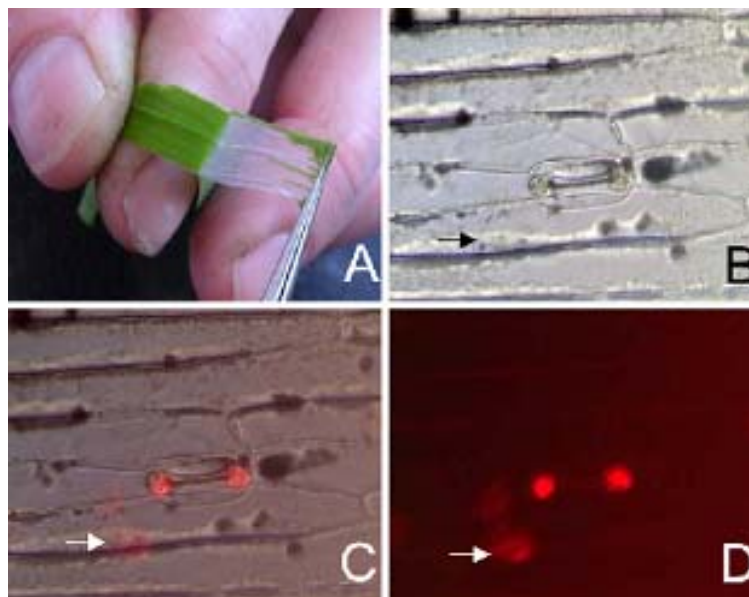


Abbildung 2.1: Die Epidermis wurde mit Hilfe einer Pinzette abgezogen. (A) Mesophyllreste wurden mit einem Skalpell entfernt. Dennoch blieben Reste von Mesophyllzellen (Pfeile) mit der epidermalen Zellschicht verbunden, wie in den mikroskopischen Aufnahmen zu sehen ist (B Hellfeld, C Phasenkontrast, D Grünfilter). Die beiden grünen (B) sowie die roten (D) Punkte zeigen das Chlorophyll in den Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates.

2.2 Die HO-cDNA-Bank

Eine cDNA-Bank ist eine rekombinante DNA-Bank, die alle exprimierten mRNA-Moleküle mit PolyA-Schwanz eines Organismus bzw. eines Gewebes in Form von cDNA (komplementäre DNA) enthält. Die cDNA-Klone repräsentieren die Häufigkeit der entsprechenden mRNA-Moleküle eines Gewebes bzw. einer ganzen Pflanze. Die HO-cDNA-Bank wurde aus Epidermis von Primärblättern siebentägiger Gerstenkeimlinge der isogenen Linie Ingrid *mlo5* 6 und 24 hpi mit *Bgh* bzw. *Bgt* erstellt (siehe Kapitel 2.1.5).

2.2.1 Erstellung der HO-cDNA-Bank

Für die Konstruktion der HO-cDNA-Bank wurde zunächst RNA und dann mRNA isoliert. Alle weiteren Klonierungsschritte wurden mit einem Kit (pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit, STRATAGEN, La Jolla, USA) durchgeführt. Folgende Arbeitsschritte wurden ausgeführt:

- (1) Gesamt-RNA-Isolation (Kapitel 2.2.1.1)
- (2) mRNA-Isolation (Kapitel 2.2.1.2)
- (3) cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.1.3)
- (4) Klonierung in pBluescript (Kapitel 2.2.1.3)
- (5) Transformation in *E. coli* (Kapitel 2.2.1.3)
- (6) Anlegen der cDNA-Bank (Kapitel 2.2.1.4)

2.2.1.1 RNA-Isolation

2 g in flüssigem Stickstoff pulverisierte Epidermen (siehe Kapitel 1.7) wurden in 3 ml RNA-Extraktions-Puffer und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol in Röhrcchen (15 ml; PP, Greiner, Nürtingen) suspendiert und anschließend auf einem Rotationsschüttler (30 min, 150 rpm) liegend geschüttelt. Nun wurde die Suspension zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) und mit 1,5 ml Chloroform versetzt. Das Röhrcchen wurde dann fünf mal vorsichtig umgedreht und erneut zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues Röhrcchen (15 ml; PP-Röhrcchen, Greiner, Nürtingen) abgegossen, mit 3 ml 6 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt und gut geschüttelt. Über Nacht wurde die RNA bei 4°C gefällt und dann abzentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet in 450 µl TE aufgenommen. Um das verbliebene Lithiumchlorid zu beseitigen wurde die RNA mit 70%igem Ethanol und 0,3 M Na-Acetat gefällt und einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in 500 µl Aqua dest. aufgenommen.

RNA Extraktions-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	0,5 M
Na-EDTA	0,25 M
SDS	5 % g/v

2.2.2.2 mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolation erfolgte mit Hilfe von magnetischen Polystyren-Kügelchen (Dynabeads mRNA Purification Kit; Dynal, Oslo, Norwegen), an die Oligo-(dT)₂₅Nukleotide kovalent gebunden sind. Diese werden kurz als „Dynabeads“ bezeichnet. Das Anreichern der mRNA-Moleküle beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung zwischen den für mRNA typischen Poly(A)-Schwänzen und den Oligo-(dT)₂₅-Nukleotiden sowie der Separation der „Dynabeads“ durch einen Magneten. RNA-Moleküle ohne Poly(A)-Schwanz werden anschließend gewaschen.

Die mRNA Isolation erfolgte unter Verwendung von 1 ml „Dynabead“-Suspension. Die „Dynabeads“ wurden zweimal mit 500 µl Binde-Puffer gewaschen, in 500 µl Binde-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die RNA (300 µg in 500 µl Aqua dest.) 2 min bei 65°C inkubiert und zu der „Dynabead“-Suspension gegeben. Um die RNA zu binden, wurde die Mischung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die „Dynabeads“ an den Magneten gebunden und zweimal mit jeweils 1 ml Wasch-Puffer gewaschen. Die mRNA wurde mit 40 µl Tris-HCl (2 mM, 65°C, 2 min) eluiert. Die verwendeten Puffer sind Bestandteile des Kits.

2.2.1.3 cDNA-Synthese, Klonierung und Transformation

Die cDNA-Synthese, die Klonierung und die Transformation wurden mit einem Kit (pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit, STRATAGEN, La Jolla, USA) durchgeführt. Die Größenfraktionierung erfolgte abweichend vom Statagene Protokoll mit Sephacryl-Säulen (cDNA Size Fractionation Columns, GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien), um möglichst große cDNA-Moleküle zu klonieren und verbliebene *EcoRI*-Adaptoren zu entfernen. Kloniert wurden die Fragmente durch Ligation in den mit *EcoRI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pBluescriptSK+ (Abbildung 2.2). Die Transformation wurde mit den kompetenten Zellen XL10-Gold laut der Arbeitsanleitung (pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit) durchgeführt.

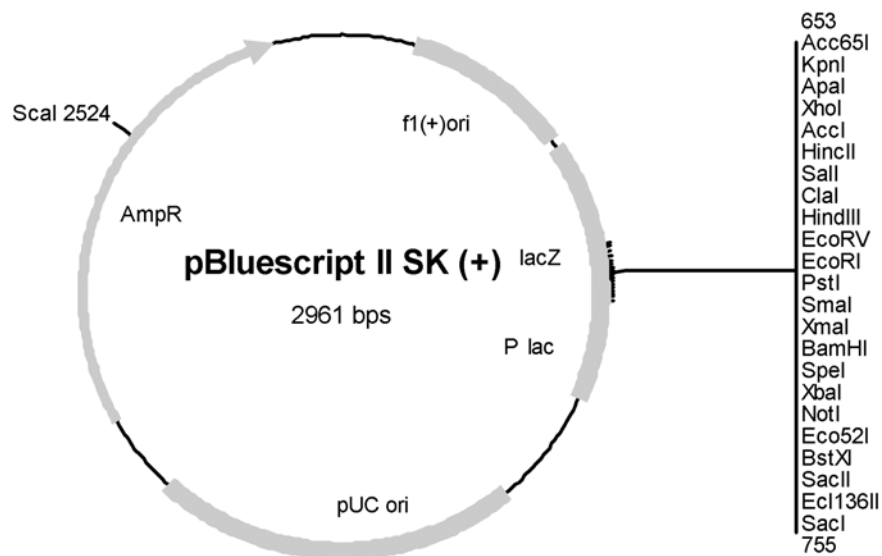


Abbildung 2.2: pBluescript II SK (+) ist ein 2.961 bp großer Vektor der sich von pUC19 ableitet. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; f1(+)-ori: Replikationsursprung für Helferphage; *LacZ*: α -Komplementation für Blau-Weiß-Selektion; P lac: *LacZ* Promotor, pUCori: Replikationsursprung des Plasmides

2.2.1.4 Etablierung der HO-cDNA-Bank

Die transformierten Bakterienkulturen enthalten ein Gemisch von verschiedenen cDNA-Klonen. Um Einzelzellkolonien die ein cDNA-Insert tragen zu präparieren, wurde die Bakterien-Suspension mit Hilfe von sterilen Glaskugeln (100 Stück/Platte, Durchmesser 4 mm) auf quadratische Petrischalen (24x24x2 cm LB-Agar-Medium, 0,5 cm Füllhöhe) ausplattiert. Dem LB-Agar-Medium wurde IPTG und X-Gal zugegeben (siehe Kapitel 2.8.11). Dann wurde 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Bis zum Picken der Kolonien wurden die Platten bei 4°C gelagert. Das Picken und Selektionieren der Kolonien erfolgte mit einem Roboter (BiopickI; Genomic Solutions, Huntingdon, England), der die weißen Kolonien in 384er Mikrotiterplatten (Genetix X6001, New Milton, England) übertrug. In jedem Loch der Mikrotiterplatten befanden sich 50 µl Lagermedium. Ausschließlich weiße Kolonien wurden gepickt, da diese ein cDNA-Insert tragen (Blau-Weiß-Selektion). Die Kolonien wuchsen 18 Stunden bei 37°C und wurden anschließend bei -80°C eingelagert.

Lagermedium

Bacto-Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
ad 2 M NaOH	pH 7,4
ad Aqua dest.	900 ml
10 x HMF-Medium	100 ml
Ampicillin	(Endkonzentration 50 µg/ml)

10 x HMF-Medium*

Lösung A)

MgSO ₄ + 7 H ₂ O	3 mM
Na ₃ -Citrat + 2 H ₂ O	15 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	68 mM
Glycerin**	56%
Aqua dest.	ad 800 ml

Lösung B)

K ₂ HPO ₄	270 mM
KH ₂ PO ₄	130 mM
Aqua dest.	ad 200 ml

*10 x HMF-Medium=4/5 Lösung A + 1/5 Lösung B. **Glycerin separat autoklavieren.

2.2.3 EST-Sequenzierung und Analyse der HO-cDNA-Bank

Die Sequenzierung der cDNA-Klone erfolgte vom 5'-Ende mit dem Primer SK (5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3') ausgehend von Plasmid-Präparationen und wurde im Sequenzierlabor des IPK bzw. von der Firma AGOWA (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Um eine vergleichbare Qualität der Sequenzen zu gewährleisten und um *Clustering*-Prozesse zu ermöglichen, wurden von allen Sequenzen die Vektorreste und die qualitativ minderwertigen Enden mittels der Software Seqman II (DNASTAR Inc., Madison, USA) (vorgegebene Einstellungen) entfernt. In einem weiteren Schritt wurden alle Sequenzen von der Analyse ausgeschlossen die kürzer als 100 bp waren (EST Trimmer, Thomas Thiel 2002, IPK Gatersleben).

Die 5'-Sequenzen aller HO-Klone wurden untereinander mit der Software StackPack 2.1 (Electric Genetics PTY Ltd., Reston, USA) verglichen, um die Redundanz der HO-cDNA-Bank zu untersuchen, ein Unigenet zu definieren und paraloge Sequenzen zu identifizieren

und statistisch zu erfassen. Mit Hilfe dieser Software wurden Sequenz-Cluster gebildet, die sich in Contigs und diese wieder in Primärconsensi und alternative Consensi aufteilen (Miller *et al.* 1999).

Um homologe Nukleotid- oder Proteinsequenzen der ESTs zu identifizieren, wurden die Sequenzen mittels Blast-Algorithmen (Altschul *et al.* 1990) mit denen der Datenbank EMBL Plant (BlastN; alle öffentlich verfügbaren Gene aus Pflanzen), der Datenbank EMBL Fungi (BlastN; alle öffentlich verfügbaren Gene aus Pilzen) und den Datenbanken SwissProt und SwissPir (BlastX, alle Protein-Sequenzen) auf dem Server Husar des DKFZ in Heidelberg (<http://genome.dkfz-heidelberg.de>) verglichen. Um die anfallenden großen Datenmengen in excelkompatible und durch Tabulator gegliederte Dateien umzuwandeln, wurden hausinterne Perl *Skripts* des IPK verwendet (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/owntools.php>). Außerdem wurde die Sequenzanalyse-Software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, USA) verwendet.

2.3 Transkriptomanalyse der Interaktion Gerste und *Bgh* mittels Makroarray

Die Transkriptomanalyse der Interaktion Gerste und *Bgh* wurde mit Hilfe eines auf Nylonmembran gespotteten Makroarrays durchgeführt. In einem ersten sehr zeitaufwendigen Arbeitsschritt wurden die HO-Array-Membranen erzeugt (Kapitel 2.3.1). Dann wurden die cDNA-Sonden hergestellt (Kapitel 2.3.2), mit denen die Membranen hybridisiert wurden (Kapitel 2.3.3). Im Anschluss wurden die Daten analysiert (Kapitel 2.3.4). Methodische Kontrollexperimente wurden mit Hilfe von *Northern-Blots* (Kapitel 2.4) durchgeführt.

2.3.1 Herstellung der HO-Array Membran

Auf die HO-Arraymembran wurden 3.595 Unigene, in Form von PCR-Fragmenten, übertragen (gespottet). Dazu waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- (1) Neuordnung der cDNA-Klone (Kapitel 2.3.1.1)
- (2) PCR-Amplifikation der cDNAs (Kapitel 2.3.1.2)
- (3) „Spotting“ auf die Trägermembran (Kapitel 2.3.1.3)

2.3.1.1 Neuordnung der cDNA-Klone des Unigenesets

Die physische Umsetzung des definierten Unigenesets (3.595 Unigene), aus den ursprünglichen Plasmid-Präparationen (Platten HO01-HO15), in neue 384er Mikrotiterplatten (X6001, Genetix, New Milton, England) erfolgte mit einem Pipettier-Roboter (GENISIS Workstation 100; TECAN Co., Männedorf, Schweiz). Dieser Prozess wird als Rearranging bezeichnet. Dabei wurde von verdünnten Plasmid-Präparationen ausgegangen. Verdünnt wurde mit Hilfe eines Stempels (BioRad, Hercules, Kalifornien), der je einmal in die ursprünglichen Lösungen und dann in neue 384er Mikrotiterplatten (X6001, Genetix, New Milton, England) eingetaucht wurde. In den neuen Mikrotiterplatten waren je 80 µl Aqua dest. vorgelegt. Kontaminationen wurden durch Abflammen des Stempels vermieden.

2.3.1.2 PCR-Amplifikation der cDNA-Klone des Unigensets

Die Amplifikation der cDNA-Klone erfolgte, ausgehend von den verdünnten neuangeordneten Plasmid-Präparationen, mit den Universalprimern M13-20 (5'-CAT TTT GCT GCC GGT CA-3') und SK (5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3') und wurde im 96er Plattenformat in 50 µl Ansätzen durchgeführt.

Endkonzentration der PCR Reagenzien: 1xPCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und 200 µM dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland); 1 µM M13-20 Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland); 1 µM SK Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland); 1 U Taq Polymerase (Roche Co., Basel, Schweiz).

Folgendes Temperatur-Zeit Profil wurde verwendet: Nach dem Vorheizen des Heizdeckels auf 110°C wurden die PCR Platten in den Thermoblock (94°C) gestellt. Danach wurde das PCR Programm mit einem vierminütigen Denaturierungsschritt (94°C) gestartet. Diesem folgten 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung der DNA (94°C; 30 s), Primer-Anlagerung (50°C, 30 s) und Primer-Extension (72°C, 80 s). Mit einem letzten Extensionsschritt (72°C, 5 min) wurde die PCR beendet. Alle DNA-Fragmente wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

Ca. 87,8% der Amplifikationen zeigten eine einzelne Bande im Größenbereich 300-2.000 bp. Bei 10,6% der Amplifikationen war keine Bande, bei 1,6% eine Doppelbande sichtbar. Die DNA-Ausbeute lag bei 40 µg bis 80 µg DNA pro Reaktion. Die DNA-Fragmente wurden bis zur Übertragung auf die Arraymembran bei -20°C gelagert.

2.3.1.3 Übertragen der DNA-Fragmente auf die Arraymembran

Die DNA-Fragmente aus den PCR wurden mit dem Roboter Biogrid II (Genomic Solutions, Huntingdon, England) auf eine 9x12 cm große, positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membrane; PALL Co., Dreieich, Deutschland) übertragen, die als „Arraymembran“ verwendet wurde. Das Übertragen wird als „Spotten“, die punktuell aufgebracht DNA-Fragmente werden als „Spots“ bezeichnet. Insgesamt wurden 72 Membranen hergestellt, 48 in Serie (1) und 24 in Serie (2) (Abbildung 2.3). Für das *Spotting* mit dem Roboter wurden je 30 µl PCR-Produkte, manuell mit einer 12-Kanalpipette, aus dem 96er Plattenformat der PCR in das 384er Mikrotiterplattenformat (Mikrotiterplatte X6001, Genetix, New Milton, England) übertragen. Anschließend wurden die DNA-Doppelstränge durch Zugabe von 40 µl basischer Denaturierungs-Lösung aufgeschmolzen. Für das *Spotting* wurde ein Pintool verwendet, das 384 Nadeln mit einem Spitzendurchmesser von 0,2 mm hatte. Jeder Klon wurde durch fünfmaliges Eintauchen des Pintools in die denaturierte DNA-Lösung und anschließendes Aufsetzen auf die Arraymembran, die auf einer Moosgummiunterlage lag, übertragen. Pro Durchgang wurden so ca. 0,2 µl übertragen, was bei fünfmaligen Aufsetzten ca. 250 ng DNA entsprach.

Denaturierungs-Lösung

NaOH	0,5 M
NaCl	2,5 M
Bromphenolblau	Spatelspitze

2.3.1.4 Anordnung der Spots auf der Membran

Der Array war in 384 Subarrays unterteilt (Abbildung 2.3 A). Jedes Subarray bestand aus 25 Spots. Diese wurden im 5x5 Muster mit dem Roboter aufgetragen. Jeder cDNA-Klon wurde von zwei Spots innerhalb eines Subarrays repräsentiert. Das heißt, jeder Subarray repräsentiert 12 verschiedene cDNA-Klone bzw. Gene des Unigensets. Dieses Auftragsverfahren wird als Doppelspotting bezeichnet. Jeder Spot ist mit einer Spotnummer in der „Spotting“-Liste (http://www.pgrc.ipk-gatersleben/epidermis_mlo) eindeutig zu identifizieren. Insgesamt wurden zwei verschiedene Membranserien mit jeweils unterschiedlicher Anordnung der cDNA-Klone in den Subarrays gespottet. Die Anordnung der cDNA-Klone in den Subarrays ist in Abbildung 2.3 B dargestellt. Jeder Spot besitzt eine „Spotting“-Nummer (zum Beispiel A-01:01) in der „Spotting“-Liste. A-01:01 bedeutet beispielsweise Subarray A01 und cDNA-Klon-Position 01. Dasselbe Gen befindet sich noch in Position 02 (Abbildung 2.3 A und 2.3 B).

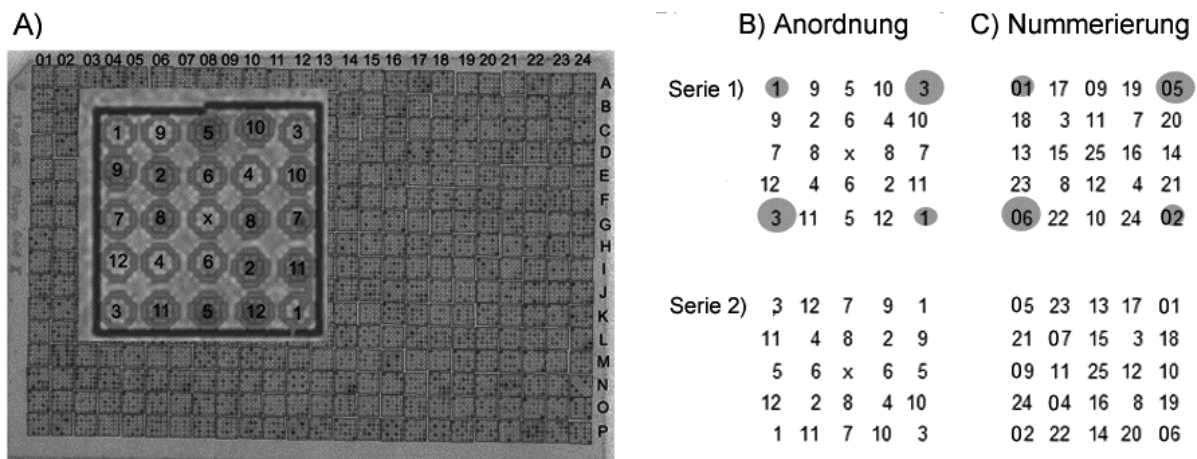


Abbildung 2.3: Anordnung der cDNA-Klone auf dem Array. A) Beispielmembran. B) Anordnung der cDNA-Klone in einem Subarray. Pro Subarray wurde jeder Klon zweimal gespottet. C) Nummerierung der cDNA-Klone in der „Spotting“-Liste.

2.3.1.5 Nachbehandlung der hergestellten Arraymembranen

Folgende Nachbehandlungen wurden durchgeführt: Zunächst wurden die Membranen je 5 min auf mit Fixierungs-Puffer und dann mit Neutralisations-Puffer getränktes Filter-Papier (0,4 mm; Whatman; Brentford, England) gelegt. Dann wurde die DNA auf der Membran durch UV Licht gebunden (1.200 J; UV Stratalinker 2400; Stratagene, La Jolla, USA), mit Wasch-Puffer (2 x SSC) für 5 min gewaschen und anschließend 30 min bei 80°C gebacken. Die getrockneten Membranen wurden zwischen Filterpapier (0,2 mm, Whatman, Brentford, England) gelegt und bei Raumtemperatur bis zur Hybridisierung gelagert.

Fixierungs-Puffer

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M
add HCl	pH 7,5

Neutralisations-Puffer

NaCl	1,5 M
Tris-HCl	0,5 M
add NaOH	pH 7,4

2.3.2 Herstellung von cDNA-Sonden aus Epidermis- und Blattmaterial

Die Herstellung der cDNA-Sonden erfolgte in vier Arbeitsschritten. Die cDNA-Sonden eines Zeitpunktes wurden jeweils parallel hergestellt.

- 1) RNA-Isolation (Kaptitel 2.3.2.1)
- 2) mRNA-Isolation (Kaptitel 2.3.2.2)
- 3) cDNA-Synthese (Kaptitel 2.3.2.3)
- 4) ³³P-Markierung (Kapitel 2.3.2.4)

2.3.2.1 RNA-Isolation

Aus ca. 200 mg, in flüssigem Stickstoff homogenisierten, Epidermis- bzw. „Restblatt“-Material wurden zwischen 50 und 100 µg RNA isoliert (NucleoSpin-RNA L Kit Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Die RNA-Lösungen wurden in einer Vakuumentrifuge (SpeedVac SC110, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) bis auf ein Volumen von ca. 60 µl einrotiert, dann photometrisch bei 260 nm/280 nm vermessen und auf eine Konzentration von 0,75 µg/µl eingestellt. Zusätzlich wurde die Integrität der isolierten RNA in einem FA-Agarose Gel beurteilt (siehe Kapitel 2.4.2).

2.3.2.2 mRNA-Isolation

Für die mRNA-Isolation wurde ein Kit basierend auf *magnetic beads* verwendet (Dynabead mRNA Purification Kit, Dynal, Oslo, Norwegen) (siehe auch Kaptitel 2.2). Mit einem speziellen Magnethalter (MPC-S; Dynal, Oslo, Norwegen) war es möglich jeweils vier mRNAs gleichzeitig zu isolieren.

- 1) Jeweils 100 µl resuspendierte „Dynabead“-Suspension wurde eingesetzt. Die „Dynabeads“ wurden mit 50 µl Binde-Puffer gewaschen, in 50 µl Binde-Puffer wieder aufgenommen und auf Eis gestellt.
- 2) 50 µl RNA-Lösung (0,75 µg/µl) wurde 2 min bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen.
- 3) Die RNA-Lösung wurde zu der „Dynabead“-Suspension gegeben.
- 4) Die Mischung wurde 5 min mit den Händen gerollt, um die mRNA an Oligo (dT)₂₅ Nukleotide der „Dynabeads“ zu binden.
- 5) Die „Dynabeads“ mit der anhybridisierten mRNA wurden zweimal mit 100 µl Wasch-Puffer und zweimal mit 250 µl RT-Puffer gewaschen und anschließend auf Eis gestellt.

2.3.2.3 Synthese von cDNA

Für die cDNA-Synthese wurde das Enzym Reverse Transkriptase, eine modifizierte MMLV-RT, verwendet. Die MMLV-RT wurde aus dem *Moloney murine leukemia virus* isoliert und ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. SuperScript™ II besitzt keine intrinsische RNase Aktivität, was sehr lange Transkripte ermöglicht.

- 1) Die „Dynabeads“ mit der gebundenen mRNA wurden in 50 µl RT-Mix suspensiert und für 2 min bei 42°C inkubiert.
- 2) Durch Zugabe von 1 µl RT (200 U/µl; Superscript; GibcoBRL; Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) wurde die Reverse Transkription gestartet. Dazu wurde die Mischung 60 min bei 42°C inkubiert, wobei die „Dynabeads“ alle 15 min aufgeschüttelt wurden.
- 3) Nun wurde der RT-Mix von den „Dynabeads“ mit kovalent gebundenen mRNA::cDNA-Heteroduplices entfernt. Anschließend wurde zweimal mit 250 µl 1xRT-Puffer gewaschen.
- 4) Die „Dynabeads“ wurden in 50 µl Elutions-Puffer aufgenommen und

2 min bei 95°C inkubiert, um die mRNA von der entstandenen cDNA abzuschmelzen. 5) Danach wurden die „Dynabeads“ magnetisch separiert. Der Überstand mit der gelösten mRNA wurde verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. 6) Anschließend wurden die „Dynabeads“ mit der anhybridisierten cDNA in 250 µl Aqua dest. gewaschen.

RT-Mix

H ₂ O	34,8 µl
5 x RT-Puffer	10,0 µl
100 mM DTT	1,0 µl
10 mM dNTP	2,5 µl
RNAse Inhibitor	1,3 µl

Elutions-Puffer

Na-EDTA	2 mM
add NaOH	pH 8,0

2.3.2.4 Radioaktive Markierung der cDNA mit ³³P

Die cDNA wurde mittels *random priming* radioaktiv markiert, einer Methode bei der Zufallshexamere „*random primers*“ als Primer für die DNA-Polymerase während der Synthese des zweiten DNA-Stranges verwendet werden. Als DNA-Polymerase wurde exonucleasefreies Klenow-Fragment (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), zur Markierung [α -³³P]dCTP (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet.

1) Die „Dynabeads“ mit der gebundenen cDNA wurden in 18 µl Aqua dest. und 6 µl dNTP-Mix (0,5 mM dATP; 0,5 mM dGTP; 0,5 mM dTTP; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) resuspendiert, 3 min auf 95°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gestellt, um Sekundärstrukturen der cDNA aufzulösen. 2) Zur Synthese des zweiten Stranges wurden 4 µl Hexanucleotid-Mix (Roche Co., Basel, Schweiz), 6 µl [α -³³P]dCTP (10 mCi/ml) und 2 µl Klenow Fragment (10 U/µl, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) dazu pipettiert. Anschließend wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. 3) Die „Dynabeads“ mit den synthetisierten Sonden wurden magnetisch separiert. Der Überstand mit den nichteingebauten Nukleotiden wurde abgenommen und zur Bestimmung der Einbauraten aufbewahrt. 4) Zu den „Dynabeads“ wurden 50 µl Elutions-Puffer gegeben. Dann wurde 2 min bei 95°C inkubiert, um die cDNA-Sonden vom Erststrang zu lösen. 5) Anschließend wurde wieder magnetisch separiert. Im Überstand befinden sich nun die cDNA-Sonden. 6) Durch Zentrifugation (2 min, 805 g) über einen Filter (0,2 µm Ausschlussvolumen, Anapore, Whatman, Brentford, England) wurde der Überstand von den noch verbliebenen „Dynabeads“ befreit. 7) Der Einbau radioaktiver Nukleotide wurde mittels eines Geiger-Müller-Zählrohres (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland), über das Verhältnis freier Nukleotide im Überstand zu eingebauten Nukleotiden in den cDNA-Sonden abgeschätzt.

2.3.3 Hybridisierung des Makroarrays mit ³³P-markierten cDNA-Sonden

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte in vier Arbeitsschritten: 1) Zunächst wurden die Membranen in Hybridisierungsrohre (5 x15 cm) gegeben und 4 Stunden mit 7 ml Dextransulfat-Puffer in einem Drehofen (65°C und 7 rpm) vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. 2) Die ³³P-markierten-cDNA-Sonden und je 100 µl Lachsperma-DNA (10 mg /ml); (Salmon Sperm DNA; Stratagene, La Jolla, USA) wurden denaturiert (3 min 95°C, 5 min nasses Eisbad). 3) Der Dextransulfat-Puffer auf den Membranen wurde durch 7 ml neuen Puffer (65°C) ersetzt. Dann wurden die denaturierten cDNA-Sonden und die denaturierte Lachsperma-DNA zugegeben. Die Hybridisierung dauerte 18 Stunden (65°C und 7 rpm). 4) Die Membranen wurden, jeweils zweimal für 20 min, mit Wasch-Puffer (0,1 x SSC/0,1% SDS) bei 65°C gewaschen.

Dextransulfat-Puffer*

Dextransulfat	10% w/v
SDS	0,8% w/v
NaCl	1 M

*Vor Gebrauch wurde der Puffer auf 65°C erwärmt um eventuell präzipitiertes SDS zu lösen.

2.3.4 Datenerfassung- und -analyse des ³³P -markierten cDNA-Makroarrays

Zur Datenerfassung und -analyse des ³³P-markierten cDNA-Makroarrays waren prinzipiell fünf Arbeitsschritte notwendig:

- (1) Array-Scanning (Kaptitel 2.3.4.1),
- (2) Quantitative Bildanalyse (Kaptitel 2.3.4.2)
- (3) Normalisierung (Kaptitel 2.3.4.3).
- (4) Qualitätskontrolle (Kaptitel 2.3.4.4)
- (5) Genexpressions-Clusteranalyse (Kaptitel 2.3.4.5)

2.3.4.1 Array-Scanning

Zur Detektion der ³³P-Signale auf den Makroarraymembranen und deren Umwandlung in Bildpunkte wurde ein PhosphoImager™-System (BAS3000 Reader; Fuji, Tokio, Japan) verwendet. Die zugrunde liegende „*storage phosphor*“ Technik wandelt radioaktive Strahlung in Licht um, was eine densitometrische Auswertung ermöglicht und 10 bis 100x empfindlicher als herkömmliche Röntgenfilme ist (Johnston *et al.* 1990).

Die Membranen wurden auf befeuchtetes *Blotting*-Papier (Gel Blotting-Papier, 0,4 mm, Whatman; Brentford, England) gelegt, welches mit Wasch-Puffer (0,1 x SSC/0,1% SDS) getränkt war, anschließend zusammen mit dem *Blotting*-Papier in PE-Folie (SARAN) eingeschlagen und für 96 Stunden gegen einen Phosphoimager-Screen (23 x 40 cm; MS40080022 Fuji, Tokio, Japan) in einer Kassette (Biomax) exponiert. Die Bilder wurden mit den Einstellungen *IP Reading*, 16 Bits/Pixel und 100 µm Pixelgröße mit dem PhosphoImager™ System gescannt und gespeichert.

2.3.4.2 Quantitative Bildanalyse

Zur Detektion der Bildpunkte und deren Quantifizierung wurden die entstandenen Bilder, mit der Software *Array Vision* (Image Research, St. Catharines, Ontario, Canada) analysiert. Die Intensität der Bildpunkte entspricht den Hybridisationssignalen auf der Membran. Die Software erkennt und definiert alle *Spots* und alle im Muster 5x5 gespotteten Subarrays. Um den Mittelpunkt der *Spots* wird ein definierter Kreis und um die Subarrays ein definierter Rahmen gelegt. Der definierte Rahmen um die Subarrays ermöglicht die Messung der lokalen Hintergrund-Intensitäten. Folgende Software-Einstellungen (*Array Vision*) wurden verwendet: *study type: expression; array type: radio isotopic arrays; measure type: density*,

spot parameters: 5 pixel, spot shape: cycle; background: surrounding spot groups; alignment: spot search parameters: sensitivity 4 und serach radius 7.

2.3.4.3 Normalisierung

Die Normalisierung der Arraydaten wurde mit „Normalizer“, einem speziellen R-Skript (Altschmied, IPK Gatersleben), durchgeführt. Dabei wurden die Daten folgendermaßen bearbeitet: 1) Von allen Intensitäten wurde die jeweilige lokale Hintergrundintensität des Subarrays subtrahiert. 2) Intensitäten, die kleiner bzw. bis zu 0,2 x über dem lokalen Hintergrund lagen, wurden durch einen Wert, der 0,2 x dem lokalen Hintergrund entspricht ersetzt. 3) Von den hintergrundkorrigierten, logarithmierten Signalintensitäten wurde der logarithmierte Median der Signalintensitäten dieser Membran subtrahiert. Die Differenz wurde anschließend entlogarithmiert. Ausgehend von den so normalisierten Werten wurden alle weiteren Berechnungen angestellt.

2.3.4.4 Qualitätskontrolle

Es wurden nur Gene in die Analyse einbezogen deren Hybridisierungssignale (nicht normalisiert) auf mindestens zwei von 24 möglichen Membranen die lokale Hintergrundintensität um das 2,5-fache überstiegen, um zu schwache schlecht reproduzierbare Signale auszuschließen. Stark abweichende Doppelpotverhältnisse wurden durch den Minimalwert der doppelt gespotteten Gene ersetzt (siehe Kapitel 3.2.4 Qualität der hergestellten Arraymembranen).

2.3.4.5 Genexpressions-Clusteranalyse

Ähnliche Expressionsmuster von Genen wurden mit der Software „J-Express“ (Dysvik und Jonassen 2001) nach dem „K-means“-Algorithmus errechnet und detektiert. Die membrannormalisierten Werte wurden dazu zusätzlich genzentriert: 1) Die normalisierten Werte wurden logarithmiert. 2) Der logarithmierte Mittelwert der Signalintensitäten eines Genes auf den Membranen wurde subtrahiert. 3) Die Differenz wurde entlogarithmiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Cluster (16), *Squared Euclidian*, *Random initialisation*. Alle weiteren Berechnungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel durchgeführt.

2.3.5 Entfernen von cDNA-Sonden von der Arraymembran

Die Entfernung von cDNA-Sonden wird notwendig, um die Membranen ein weiteres Mal zu markieren. Dazu sind folgende Arbeitsschritte notwendig: 1) Die Membranen wurden mit kochendem Wasch-Puffer I (0,1 x SSC/0,1% SDS) übergossen und 15 min langsam im Wasserbad geschüttelt. 2) Wasch-Puffer I wurde durch einen basischen Puffer (0,4 M NaOH/0,1% SDS) ersetzt, anschließend wurde weitere 15 min bei 65°C langsam geschüttelt (Rotationsschüttler; Belly dancer, Stovall Life Science Inc, New York, USA). 3) Dann wurden die Membranen 15 min bei RT in Wasch-Puffer II (0,1 x SSC/0,1% SDS/0,2 M Tris pH 7,5) geschüttelt. Benutzte Membranen müssen ständig feucht gehalten werden! Zur längerfristigen Lagerung wurden die Membranen bei -20°C tiefgefroren.

2.4 Northern-Blots

Für *Northern-Blots* wird RNA in denaturierenden Agarose-Elektrophoresegelen aufgetrennt (Kapitel 2.4.2), auf eine Trägersubstanz (Nylonmembran) übertragen (Kapitel 2.4.3) und immobilisiert. Die gemäß ihrer Größe aufgetrennten mRNA-Moleküle können anschließend durch Hybridisierung (Kapitel 2.4.5) mit radioaktiv markierten Sonden (Kapitel 2.4.4) nachgewiesen (Kapitel 2.4.6) werden. Die RNA-Isolation wurde in leicht modifizierter Form gemäß Vallelian-Bindschedler *et al.* (1998) durchgeführt (Kapitel 2.4.1).

2.4.1 RNA-Isolation aus Blattmaterial der Gerste für *Northern-Blots*

1) 1,5 g in flüssigem Stickstoff homogenisiertes Pulver aus Blattmaterial der Gerste wurde in 3 ml RNA-Extraktions-Puffer und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol in Röhrchen (15 ml; PP, Greiner, Nürtingen, Deutschland) suspendiert und anschließend auf einem Rotationsschüttler (30 min, 150 rpm) liegend geschüttelt. 2) Die Suspension wurde zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) und mit 1,5 ml Chloroform versetzt. Das Röhrchen wurde dann fünf mal vorsichtig umgedreht und erneut zentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). 3) Der Überstand, der durch einen Zelltrümmer-Pfropfen von der organischen Phase getrennt war, wurde dann vorsichtig in ein neues Röhrchen (15 ml) abgegossen, mit 3 ml 6 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt und gut geschüttelt. 4) Über Nacht wurde die RNA bei 4°C gefällt und dann abzentrifugiert (30 min, 3200 g, Raumtemperatur, swing out, Heraeus Varifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). 5) Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet in 300 µl TE aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Um die RNA wieder vollständig zu lösen wurden die Reaktionsgefäße 10 min bei 75°C inkubiert.

RNA-Extraktions-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	0,5 M
Na-EDTA	0,25 M
SDS	5% g/v

2.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese zur Trennung von RNA

Um die RNA gemäß ihrer Größe zu trennen wurden denaturierende Gelelektrophoresen mit Formamid durchgeführt (Sambrook *et al.*, 2002). Jeweils 10 µg RNA wurden mit 2,5 Vol Proben-Puffer gemischt und für 10 min auf 75°C erhitzt, 5 min in ein nasses Eisbad gestellt und anschließend in die Geltaschen eines FA-Agarosegels gefüllt. Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte bei 120 V; 80 mA für jeweils 90 min in 1x MOPS-Puffer. Alle Gele wurden unter Bestrahlung mit UV-Licht fotografisch dokumentiert.

10 x MOPS-Puffer

MOPS	0,2 M; pH 7,0
Natriumacetat	80 mM
Na-EDTA	5 mM; pH 8,0

<u>FA-Agarosegel (denaturierend)*</u>		<u>Proben-Puffer</u>	
Agarose	1,2% (w/v)	Formamid	57,4% (v/v)
Formaldehyd (37%)	18% (v/v)	Formaldehyd (37%)	20,3% (v/v)
10 x MOPS-Puffer	10% (v/v)	Glycerin (86%)	6% (v/v)
		10 x MOPS-Puffer	10% (v/v)
*Formaldehyd erst nach abkühlen (ca. 65°C) zugeben		Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)	3% (v/v)
		EtBr-Lösung (10g/l)	3% (v/v)

2.4.3 RNA-Transfer auf positiv geladene Nylonmembran (Blotten)

Die nach Größe und Ladung im denaturierenden Agarosegel getrennte RNA wurde durch Kapillartransfer über Nacht auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) übertragen. Folgender *Blotting*-Aufbau wurde gewählt (von oben gegen unten):

- (1) Gewicht (1 kg)
- (2) Stapel *Blotting*-Papier
- (3) fünf Lagen Whatman Papier 0,4 mm
- (4) neutrale Nylonmembran
- (5) denaturiertes Elektrophoresegel
- (6) *Blotting*-Brücke: Filterpapier (0,4 mm, Whatman Brentford, England)

Als Transfer-Puffer wurde Na-Phosphat-Puffer (25 mM, pH 6,5) verwendet. Nach der Übertragung wurden die RNA-Moleküle auf der noch feuchten Nylonmembran durch UV-Bestrahlung (1.200 Units, Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, USA) kovalent gebunden. Bis zur Hybridisierung wurden die Membranen bei -20°C gelagert.

2.4.4 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten für *Northern*-Hybridisierung

Für die radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten waren folgende Arbeitsschritte erforderlich: 1) Zunächst wurde Plasmid-DNA der entsprechenden cDNA-Klone in PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.3.1.2). 2) Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. 3) Die entsprechenden Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktions Kit (Qiaquick Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. 4) Die radioaktive Markierung mit [α -³²P]dCTP erfolgte mit *Random priming* (Random Prime Labelling Kit, Boehringer, Mannheim). Hierbei wird die doppelsträngige Template-DNA denaturiert und mit hexameren Zufallsprimern hybridisiert, welche als Primer für die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) dienen. Für die Markierung wurden je 5 μ l PCR-Fragmente (25-50 ng), 3 μ l dNTP-Mix (0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dTTP) und 6 μ l Aqua dest. zusammen pipettiert und denaturiert (3 min 95°C, 5 min nasses Eisbad). Dann wurden 2 μ l Hexanucleotidmix, 1 μ l Klenow Enzym und 3 μ l [α -³²P]dCTP (10 mCi/ml) zu den denaturierten DNA-Doppelsträngen gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert, ein zweiter markierter DNA-Strang wurde gebildet. 5) Im Anschluss wurden die Sonden von nichteingebauten Nukleotiden befreit. Je 20 μ l markierte Sonde und 50 μ l TE wurden dazu auf Sephadex-Säulen (MicoSpinTM, S200 HR Columns, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) pipettiert. Dann wurde 2 min bei 805 g zentrifugiert.

2.4.5 Hybridisierung der *Northern-Blots*

Die Membranen wurden in Hybridisierungsrohre (5 x 15 cm) gegeben und zunächst eine Stunde in 7 ml Hybridisierungs-Puffer (Church-Puffer) in einem Drehofen (65°C und 7 rpm) vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Zur Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Sonden wurde der Hybridisierungs-Puffer durch 7 ml neuen Puffer ersetzt. Anschließend wurde die denaturierte cDNA-Sonde (3 min 95°C, 5 min Eisbad) und je 100 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml, Salmon Sperm DNA; Stratagene, La Jolla, USA) dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Im Anschluss wurden die Membranen jeweils zweimal für 20 min mit Wasch-Puffer (0,1 x SSC/0,1% SDS) bei 65°C gewaschen.

0.5 M Natriumphosphat-Puffer

NaH₂PO₄ 1 M
add 1 M Na₂HPO₄ pH 6,8

Hybridisierungs-Puffer (Church)

Natriumphosphat (pH 6,8) 0.5 M
SDS 7%
Na-EDTA 1 mM

2.4.6 Detektion der mRNA-Transkripte

Zur Detektion der gebundenen, radioaktiv markierten DNA-Sonden auf den Membranen wurde ein Phosphoimager System (BAS2000; Fuji, Tokio, Japan) verwendet. Die Membranen wurden dazu in Klarsichtfolie (PE, SARAN) eingeschlagen und 12 Stunden bis 96 Stunden exponiert. Bilder wurden mit folgenden Einstellungen aufgenommen: IP *Reading*; 8 Bit pro Pixel; 100 µm Pixelgröße.

2.5 Unterscheidung zwischen *Blumeria*- und Gerste-Transkripten

Die cDNA-Bank wurde aus den interagierenden Organismen, Gerste Sorte Ingrid BC *mlo5* und *Bgh*, hergestellt. Für weiterführende Untersuchungen war es notwendig, cDNA-Klone nach ihrer pflanzlichen oder pilzlichen Herkunft, zu unterscheiden. Daher wurden PCR mit genspezifischen Primern und genomischer DNA aus *Blumeria* und Gerste für eine Auswahl an Kandidatengenomen durchgeführt. Nach Vergleich der Bandenmuster konnte auf Pflanze bzw. *Blumeria* rückgeschlossen werden.

2.5.1 Isolation genomischer DNA von Gerste und *Bgh*

Ausgangsmaterial für die Isolation genomischer DNA waren nicht-inokulierte Gerstenblätter (Ingrid BC *mlo5*) bzw. Konidiosporen von *Bgh*. Die Konidiosporen der Mehltaukulturen wurden über einer Petrischale (15x15 cm) befüllt mit 20 ml Aqua dest. abgeschüttelt und anschließend abzentrifugiert (1811 g, 30 min, Raumtemperatur). Jeweils 50 mg Konidien- bzw. Blattmaterial wurden dann in flüssigem Stickstoff homogenisiert und jeweils in bis zur Hälfte gefüllte Reaktionsgefäße mit Glasperlen (0,25-0,5 mm, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 1 ml QBT-Puffer, 1 µl RNase A (10 mg/ml) und 1 µl Proteinase K (10 mg/ml) gegeben, 90 s mit Vortex geschüttelt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert (1 min; 2300 g, 4°C). Der Überstand wurde auf eine mit 2 ml QBT-Puffer equilibrierte Anionenaustauschersäule (Qiagen Tipp-20, Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Um die an die Anionenaustauschersäule gebundene DNA von den restlichen Bestandteilen zu trennen, wurde mit 4 ml QC Wasch-Puffer gewaschen. Dann wurde die DNA mit 2 ml Elutions-Puffer von der Säule gewaschen, mit 0,8 Vol Isopropanol (2 Stunden bei Raumtemperatur) ausgefällt und abzentrifugiert (9300 g, 20 min). Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (9300 g, 20 min), dann unter dem Abzug getrocknet und in 10 µl TE aufgenommen.

<u>QBT-Puffer</u>		<u>QC-Wasch-Puffer</u>		<u>QF-Elutions-Puffer</u>	
NaCl	750 mM	NaCl	1 M	NaCl	1,25 M
MOPS	50 mM	MOPS	50 mM	Tris-HCl	50 mM
add NaOH	pH 7,0	Isopropanol	15%	add NaOH	pH 8,5
Isopropanol	15%			Isopropanol	15%
Triton X-100	0,15%				

2.5.2 PCR-Amplifikation aus genomischer DNA von Ingrid *mlo5* und *Bgh*

Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit spezifischen Primerpaaren (Tabelle 2.1), ausgehend von genomischer DNA (Ingrid *mlo5* bzw. *Bgh*; 0,1 ng/ml). Die PCR wurde in 25 µl Ansätzen durchgeführt. Endkonzentration der PCR-Reagenzien: 1 x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl₂ und 200 µM dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland); 2 µM *sense* Primer; 2 µM *antisense*-Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland); 1 U Taq-Polymerase (Roche Co., Basel, Schweiz).

Folgendes Temperatur-Zeit-Profil wurde verwendet: Nach dem Vorheizen des Heizdeckels auf 110°C wurden die PCR-Platten in den Thermoblock (94°C) gestellt. Danach wurde das PCR-Programm mit einem vierminütigen Denaturierungsschritt (94°C) gestartet. Diesem folgten 32 bzw. 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung der DNA (94°C; 30 s), Primeranlagerung [(A) *touch down* von 61°C auf 54,8°C, (B) 58°C konstant; (C) *touch down* von 59°C auf 52,2°C] und Extension (72°C, 30 s). Mit einem letzten Extensionsschritt (72°C, 5 min) wurde die PCR beendet.

Tabelle 2.1: Genspezifische *sense* bzw. *antisense*-Primer für Zuordnung *Bgh* und Pflanze

ID	<i>sense</i> Primer	<i>antisense</i>-Primer
HO07O11	5'-CAAGCTGACTGTGCCATTCT-3'	5'-GGCCGTGTCCATCTTGTTA-3'
HO09I03	5'-CTCGTACAGTGGTGATTCCGT-3'	5'-GAAGCGAAGACCGGAATGTA-3'
HO01C21	5'-GACGAGATCGGCTGAAGAAC-3'	5'-TTCCTTCGTTTCATTCCCAG-3'
HO04M11	5'-GTCATCGACACATGGCTCAG-3'	5'-GATTAGCAGGGGCCACAA-3'
HO14D22	5'-GGACACGGCATATAACAGCA-3'	5'-GCCGTTTTTAAGCTCGATTG-3'
HO02I03	5'-GTTCTAGAGCGTTCGGCAC-3'	5'-CTCCGAGCTGTACACCCAC-3'
HO14N21	5'-TGACACATCCTCCAAGTCCA-3'	5'-TGGATCAACACTCCTGGTTG-3'
HO02B06	5'-ACAGTAATGGGTCCCCTGAA-3'	5'-TGGATTCGTTTTCGTTTGAA-3'
HO04A02	5'-TTTACTAGACGAATCGCTCC-3'	5'-CACAGTCAACGCCTGATTTG-3'
HO09E08	5'-CGCGGTACATTATTGATTACA-3'	5'-TTTCCCAACTCCACTATCGC-3'
HO09F06	5'-CCCTCGCTGCAATCAACTA-3'	5'-TGCTTCTCTACTGCACCG-3'

HO06F12	5'-GTTATCAGTGGTTGTCCGCC-3'	5'-AAAACATGAATCGGTGTCCC-3'
HO04F20	5'-TCTTTGGTTTGGTGCCCT-3'	5'-TCCTCGCACAGCTCAGTT-3'
HO12P05	5'-GTTTTCTCTTGCAGCCGT-3'	5'-TGATTCTTCGATTCCGCTG-3'
HO02P04	5'-GTGTGCTACTGCGAAAGGAA-3'	5'-GAGCTGCGGGTTGTAGGT-3'
HO06G10	5'-GCGACATGTTCCAGAAGGT-3'	5'-CAGGATGCACTCCACGAG-3'
HO09M16	5'-CCAAGAGGAGCTTGACATCG-3'	5'-GCGGCTGACATCACCATAG-3'
HO09I06	5'-ACTGTTTGAGCCCATCTACGA-3'	5'-TTTATGTACACATTGGGGCG-3'
HO10M21	5'-CGCAATGCTCAAGTCAGTTC-3'	5'-CTCTCTCCGGGTCTATGTGG-3'
HO12N23	5'-TTGTCTGGGATTTCTGTGGA-3'	5'-TCAAAGAAGCCATCCAAACC-3'
HO14F24	5'-AGCGAAGTGAGAGCTTTTGC-3'	5'-GAGAAGGACCTGCAGTTGTTG-3'
HO11H17	5'-ATTGGTCTCATGGCAGGC-3'	5'-ATCCTTGGCTTGTGCGAGATT-3'
HO13H24	5'-CAGGAGCTTCGTGCAATGT-3'	5'-CTAGTCTTCTCGCCGGTCAA-3'
HO03M02	5'-AGCATAATGGAGGGATGGC-3'	5'-AGGTTCCCTATCGTCGTGGG-3'
HO14M23	5'-CCACTATGATGGGCGTGTG-3'	5'-CCCCAAGGTCTTCATCCC-3'
HO12F18	5'-CGTGCAGATGTTCCCTGTGCG-3'	5'-GTCTCGCTCGGGATCAGC-3'
HO02F02	5'-AGGGAGAACAAGAGCGACAG-3'	5'-ACCAGATGCACCTCCAGAAG-3'
HO09F07	5'-TTATGAGGTTGCCCAGAAGC-3'	5'-TCACCAAGAGCCAAAAGAAAA-3'
HO14F03	5'-CGGAAATTGTCAAGGCTGAT-3'	5'-GCGTCATCAATTTCCCGTAG-3'
HO14P06	5'-AAGGTTTGGGTCGTAAGAAATG-3'	5'-CTCATGCGGATGGTTTTTCT-3'
HO06K04	5'-TACTGCTCGCCTTCTTGTG-3'	5'-GACACTGTTGTTGGTCCCAG-3'
HO06J21	5'-ACTCACAGCTCACAAGGCAGT-3'	5'-ACGGTTAGGGTCCAGAGTCC-3'
HO12G01	5'-GGAGGGTTACACACATTCCG-3'	5'-GCTGGTTTTTGAACCTTCTGG-3'
HO06M04	5'-CCTATTCGTGTGGCAGTTCC-3'	5'-TATCGGAGATCCGTGAGCAT-3'
HO14J02	5'-ACGAACACGGTTCCGGACT-3'	5'-CGAGGGTGACCGAGTCGT-3'
HO11H08	5'-AACATGGACCTTGTCTTCGG-3'	5'-AACGTAATCATCGCCGAGAA-3'
HO11N14	5'-GGAGCAACACAACCAAGATG-3'	5'-CGTTCTTGACATTCTCCTCG-3'
HO07H20	5'-CTGTTCCGAGCTTCAGTTCC-3'	5'-CGACCAAAAATGTCGAGGAC-3'
HO07K06	5'-GACCGCGGAATATCATCCTA-3'	5'-CTGTGGGTGAACCATGGAC-3'
HO05L14	5'-GGATTTGTACAGTCCAACCT-3'	5'-ATTGGCAATTGTGATAGCCC-3'
HO02E07	5'-GCTTCTCGAGGTCATGCAA-3'	5'-TAAGCAGCATCGACATGGAC-3'
HO01I09	5'-CGACAGCTCCAAGATGACAA-3'	5'-ACGGTCAGGAGCTTGTTCAC-3'
HO02K10	5'-GCTGTACATGTTCTTCTGTCAGC-3'	5'-CAGGTCTGAATAGAGTGCCG-3'
HO02A01	5'-CATTTGAAAACCTCTCCA-3'	5'-TGCTGCACTCTCCTGCATAG-3'
HO07H15	5'-GAGCCGTTCAAGGTCAAGTC-3'	5'-CCATCCTTGTGCGATGGTGT-3'
HO10N20	5'-ATCGACAAGGCCAAGATGAC-3'	5'-CGGTCCAATAGTTCACCACC-3'
HO05A19	5'-GTGGGTACGGGAGTCATACG-3'	5'-GTTTGTGCTACCGGCATCT-3'
HO11A09	5'-CCAGCATCGACAAACATCAC-3'	5'-CCCTGTAGTTGCCACCTGT-3'

2.6 Funktionelle Untersuchung der Kandidatengene mittels TIGS

TIGS (*transient induced gene silencing*) ist ein transientes RNAi-Testsystem (siehe auch Schweizer *et al.*, 2000), das bei der molekularen Analyse von Genen in Getreide-*Blumeria*-Interaktionssystemen seit ca. vier Jahren Anwendung findet (Panstruga 2004). Die für das Pathosystem Gerste und *Blumeria* angepasste Methode funktionierte folgendermaßen (Abbildung 2.5):

Segmente siebentägiger Primärblätter der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* wurden zunächst durch biolistisches Bombardement mit Goldpartikeln, die ein Reportergenkonstrukt und ein RNAi-Konstrukt trugen, transformiert. In der Zeit von 0 bis 96 Stunden nach dem Beschuss wurde das unter Kontrolle des Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotors (CamV35S) stehende Reportergenkonstrukt in den getroffenen Epidermiszellen exprimiert und im Anschluss translatiert. Das Reportergen kodierte für das Enzym β -Glucuronidase (GUS), welches nach

der GUS-Färbung die türkisblaue Farbe der Zelle ausbildet und zusätzlich den Kontrast von Zelle und eventuell vorhandenen Haustorien über einen unbekanntem Mechanismus verstärkt. Parallel zu dem Reportergergenkonstrukt wurden ein oder mehrere RNAi-Konstrukt(e), die nach ihrer Expression Haarnadelstrukturen ausbilden sollten, exprimiert (Abbildung 2.6).

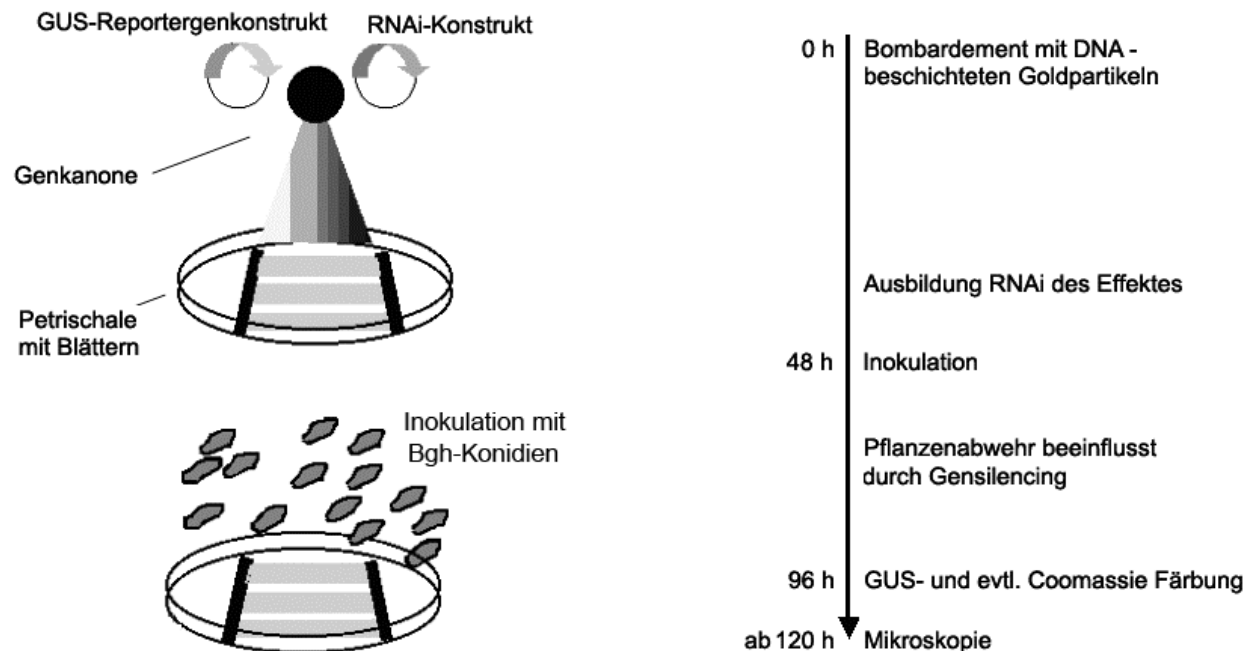


Abbildung 2.5: TIGS (*Transient induced gene silencing*).

Die Blätter wurden erst 48 Stunden nach Beschuss inkubiert, um den RNAi-Effekt vollständig auszubilden. Die Inkubation erfolgte in feuchten Kammern, auf Phytoagar liegend, bei Tageslicht (Nordfenster) und einer Temperatur von 18°C bis 22°C. Nach 48 Stunden wurden die transformierten Blattsegmente mit *Bgh*-Konidien inokuliert. Der Pilz wuchs nun 48 Stunden auf den Blättern, einschließlich auf den Zellen, die durch gezieltes Ausschalten von Genen in ihrer Abwehr möglicherweise gestört waren, und bildete in anfälligen Zellen Haustorien.

Jetzt wurden die Reportergergenprodukte (β -Glucuronidase) in den erfolgreich transformierten Zellen mittels GUS-Färbung detektiert. Die pilzlichen Strukturen auf der Blattoberfläche wurden mittels Coomassie-Färbung alternativ detektiert. Da *Bgh* neben nicht-transformierten auch transformierte Zellen befällt, erlaubt die mikroskopische Analyse von GUS- und Kandidatengen exprimierenden Epidermiszellen, Rückschlüsse auf die Funktion des Kandidatengens.

Es wird erwartet, dass sich in den normalerweise vollständig resistenten Zellen von Ingrid BC *mlo5* Haustorien durch das Ausschalten eines wichtigen, resistenzassoziierten Gens etablieren können. Für die funktionelle Untersuchung der Kandidatengene mittels TIGS wurden zunächst die RNAi-Konstrukte erstellt (Kapitel 2.6.1). In einem zweiten Arbeitsabschnitt wurde das biolistische Bombardement durchgeführt (Kapitel 2.6.2).

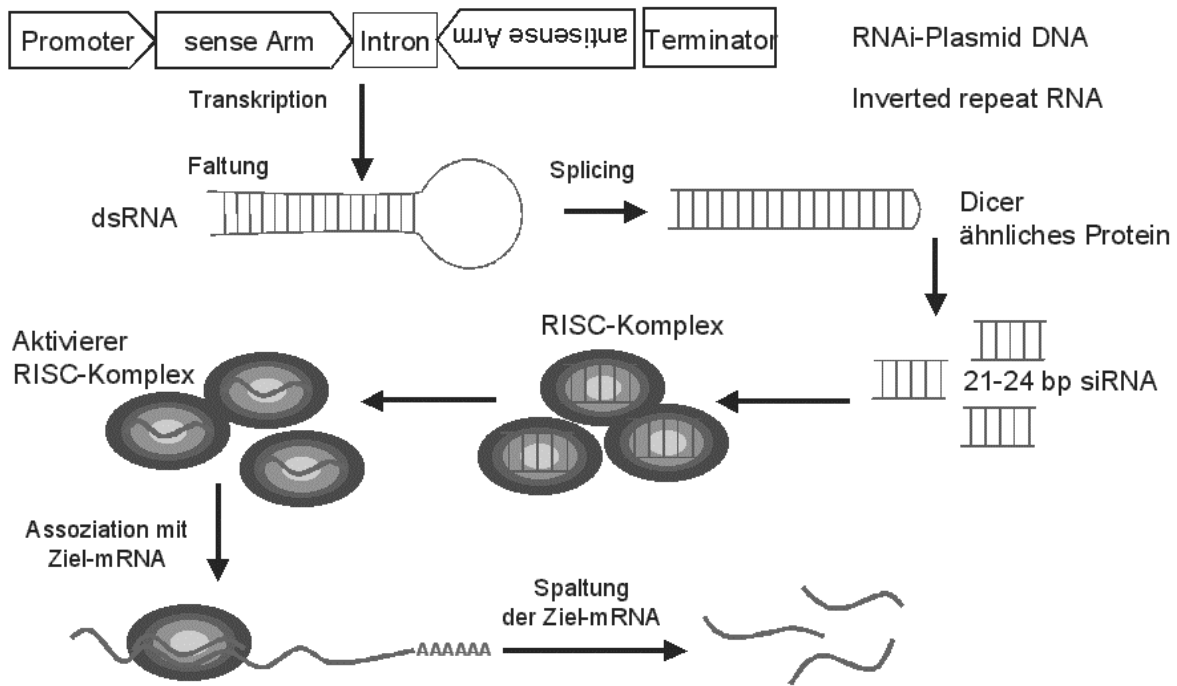


Abbildung 2.6: RNAi mit Haarnadelkonstrukten.

2.6.1 Herstellung der RNAi-Konstrukte für TIGS

Basis für die Herstellung der RNAi-Konstrukte war eine Technologie die auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ beruht (Gateway, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien). Mit Hilfe des Rekombinase-Systems lassen sich DNA-Fragmente zwischen verschiedenen Vektoren des Systems, die spezielle Erkennungssequenzen aufweisen, gerichtet austauschen. Die Erkennungssequenzen, die auch als Rekombinationsstellen (*attB* und *attP* Integration; *attL* und *attR* Excision) bezeichnet werden, können spezifisch mit Hilfe von Rekombinationsproteinen (Integrase und Excisionase aus dem Bakteriophagen λ und den *Integration Host Factor* aus *E. coli*) miteinander rekombiniert werden. Als negativer Selektionsmarker befindet sich in jedem „Gateway“-Vektor das *ccdB*-Killergen, das von den Rekombinationsstellen eingerahmt ist. Das Gen kodiert für eine wachstumshemmende bakterielle DNA-Gyrase. Bei einer Rekombination wird das *ccdB*-Gen und das einzubringende Gen ausgetauscht (Wesley *et al.* 2001). Bei dem hier verwendeten Ansatz wurden *attL*-Stellen (pIPKTA33, *entry vector*) und *attR*-Stellen (pIPKTA30N, *destination vector*) rekombiniert. Aus dieser Rekombination ergibt sich eine sogenannte *attB*-Stelle. Zunächst wurden die cDNA-Fragmente aus der HO-cDNA-Bank also in einen „Gateway“-kompatiblen Vektor (pIPKTA33) (Douchkov und Schweizer nicht veröffentlicht) kloniert, da die HO-cDNA-Bank in einem Vektor erstellt wurde, der nicht mit dem „Gateway“-System kompatibel ist. Bis zu 500 bp lange cDNA-Fragmente wurden durch Verwendung eines sequenzspezifischen Primers in PCR amplifiziert (Kapitel 2.6.1.1) und konventionell mittels Ligase in pIPKTA33 kloniert (Kapitel 2.6.1.2). Die Verwendung von sequenzspezifischen Primern hatte auch den Vorteil, dass so auf die 3'-Bereiche der Gene selektiert werden konnte. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente von pIPKTA33 in den RNAi-Vektor pIPKTA30N (*destination vector*) (Douchkov und Schweizer, nicht veröffentlicht) durch genetische Rekombination überführt (Abbildung 2.7).

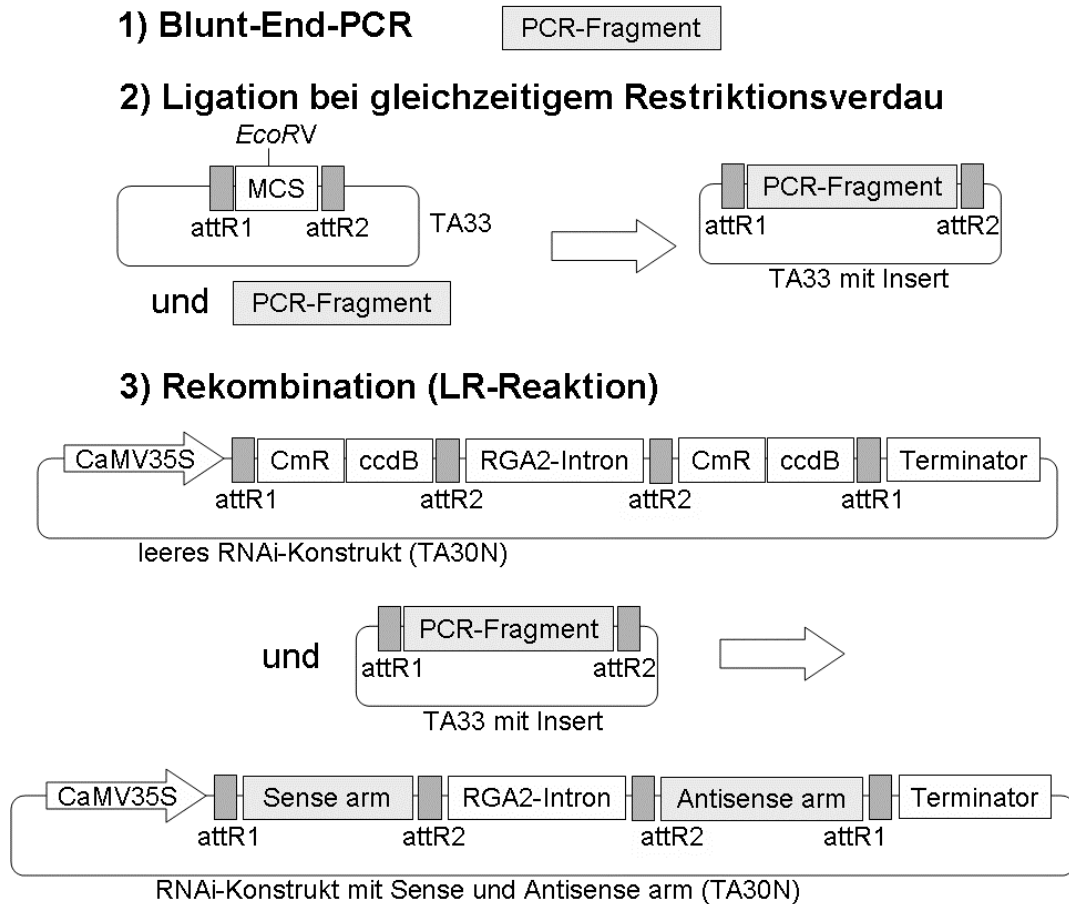


Abbildung 2.7: Klonierungsstrategie bei der Erstellung der RNAi Konstrukte.

2.6.1.1 PCR-Amplifikation der HO-cDNA-Templates und Aufreinigung der Fragmente

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in 25 µl Ansätzen mit spezifischen *antisense*- (3'-Ende der EST's, siehe Tabelle) und den unspezifischen *sense*-Primer (Uniprimer) MVR-26 (5'-CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AG-3'), ausgehend von Verdünnungen der Plasmid-Präparationen (1:100). Für ESTs die kürzer als 200 bp waren, wurde der Standardprimer M13-20 (5'-CAT TTT GCT GCC GGT CA-3') eingesetzt. Durch die Verwendung der thermostabilen Thermal-Ace-Polymerase (Thermal Ace Kit, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) wurden PCR Produkte mit glatten Enden amplifiziert.

Endkonzentration der PCR-Reagenzien: 1 x Puffer (Thermal Ace Kit); 200 µM dNTP (Thermal Ace Kit); 2 µM *antisense*-Primer; 2 µM *sense* Primer; 1 U Polymerase (Thermal Ace Kit). Folgendes Temperatur-Zeit-Profil wurde verwendet: Nach dem Vorheizen des Heizdeckels auf 110°C wurden die PCR-Platten in den Thermoblock (94°C) gestellt. Danach wurde das PCR-Programm mit einem vierminütigen Denaturierungsschritt (94°C) gestartet. Diesem folgten 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung der DNA (94°C; 30 s), Primer-Anlagerung (65°C; 45 s) und Primer-Extension (74°C, 45 s). Mit einem letzten Extensionsschritt (72°C, 10 min) wurde die PCR beendet. Im Anschluss an die PCR wurden die DNA-Fragmente durch Ultrafiltration (MinElute 96 UF PCR-Purification-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) von Salzen, nichteingebauten Nukleotiden und Primern befreit. Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Tabelle 2.2: Genspezifische Primer für cDNA-Amplifikation (RNAi-Konstrukte)

Klon-ID	Primer
pIPKTA30_HO11F10	5'-GGAAAACGTGAAGAGCCCAG-3'
pIPKTA30_HO06F18	M13-21 PE
pIPKTA30_HO14H18	5'-ATCTGCATTCACGATGGCAA-3'
pIPKTA30_HO03K07	5'-AAACGAGCTGCAGCAAAAGC-3'
pIPKTA30_HO14K08	5'-TCAACGATCAGGGGAACTGG-3'
pIPKTA30_HO04F20	5'-CCTAGCCAGCAAAGTGTGCG-3'
pIPKTA30_HO14K07	5'-CGTGTAGTAGCCGATGCGGT-3'
pIPKTA30_HO03C22	5'-GGGAGCTAGTGGCTCGTTCA-3'
pIPKTA30_HO13M15	5'-AGCCAGATTCAAGCGAGGTG-3'
pIPKTA30_HO01P12	5'-ACCGTGAGGATCTCAGTGGC-3'
pIPKTA30_HO09L22	5'-GTATGTGGCGGGTTCTGACC-3'
pIPKTA30_HO11H17	5'-TGGAAGTGAATGAGGCCAC-3'
pIPKTA30_HO15E16	5'-GGTGCGTATGTGGTGGGTTT-3'
pIPKTA30_HO15O20	5'-CAGCACACCCTTGAGCCTCT-3'
pIPKTA30_HO13I11	5'-CTACCTTGTACGCACGCACG-3'
pIPKTA30_HO12F09	5'-GCAACAAGAAAACGAACCGC-3'
pIPKTA30_HO06G10	5'-AGCGAGCAAGAGCAAGATGG-3'
pIPKTA30_HO15I12	5'-CTTCCGAAACGGAGGACTT-3'
pIPKTA30_HO02A01	5'-TGACTCTCCAGCTAGGCACG-3'
pIPKTA30_HO09M16	5'-TCGTCGATCTGGATCACCTG-3'
pIPKTA30_HO09F07	5'-TATTTGGCCTTCTTGCCCCT-3'
pIPKTA30_HO11H08	5'-GCTTCATGCAGAAAGGTAGCG-3'
pIPKTA30_HO13D15	5'-GATTGTGTGTGCACCGGAGA-3'
pIPKTA30_HO03B04	5'-TTGCAATGTGACGTGATAACCA-3'
pIPKTA30_HO07B06	5'-CTCCATCAGGCAAGACCCTG-3'
pIPKTA30_HO10N20	5'-TGCTCAAACATCCGACTCA-3'
pIPKTA30_HO11C08	5'-CGCGAATTTTTCCCAACGTA-3'
pIPKTA30_HO12P14	5'-AGCTAGGACACGGGTGTTGC-3'
pIPKTA30_HO10N20	5'-TGCTCAAACATCCGACTCA-3'
pIPKTA30_HO08B09	5'-TGCTGCTGCTTGTTTGGTGT-3'
pIPKTA30_HO06N14	5'-GAGCAACCGCAGAGAGCTACA-3'
pIPKTA30_HO12J07	5'-TGGCATGTAAGTGAAGAACGAGTG-3'
pIPKTA30_HO13M17	5'-GTAGCCCATCGTGCCTCTTG-3'
pIPKTA30_HO14K07	5'-CGTGTAGTAGCCGATGCGGT-3'
pIPKTA30_HO15N01	5'-GGGAAGTTGCTCTCCACGAA-3'
pIPKTA30_HO05C04	5'-TTCGCCACCAGGAGTACGTT-3'
pIPKTA30_HO10M21	5'-GCCTTGAAGTCTCTGCCGTG-3'
pIPKTA30_HO14K19	5'-AAAGCCGTGCGGTGTTTCAGAG-3'
pIPKTA30_HO08G22	5'-CAAACACGAAATGCTTCTGGC-3'

2.6.1.2 Subklonierung der DNA-Fragmente in pIPKTA33

Die Ligation der PCR-Fragmente in pIPKTA33 (Abbildung 2.8) wurde in 10 µl Ansätzen im 96er Plattenformat, in Anwesenheit des glatt schneidenden Restriktionsenzym *EcoRV* durchgeführt. Dadurch wurde eine Religation des Vektors verhindert, was eine hohe Inserationsrate zur Folge hatte und so die Klonierung im 96er Plattenmaßstab ermöglichte.

Der Ligationsmix wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert. In 25 µl Ansätzen wurden folgende Mengen/Volumina an Ligationsreagenzien (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet: 5 U *EcoRV*, 1 U T4-DNA-Ligase, 2,5 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 150 ng Plasmid-DNA (pIPKTA33) und ca. 300 ng des jeweiligen PCR-Fragmentes. Die Transformation und die Plasmid-Isolation erfolgten wie unter Kapitel 2.8.6 und 2.8.7 beschrieben. Selektioniert wurde auf Kanamycin-LB-Medium.

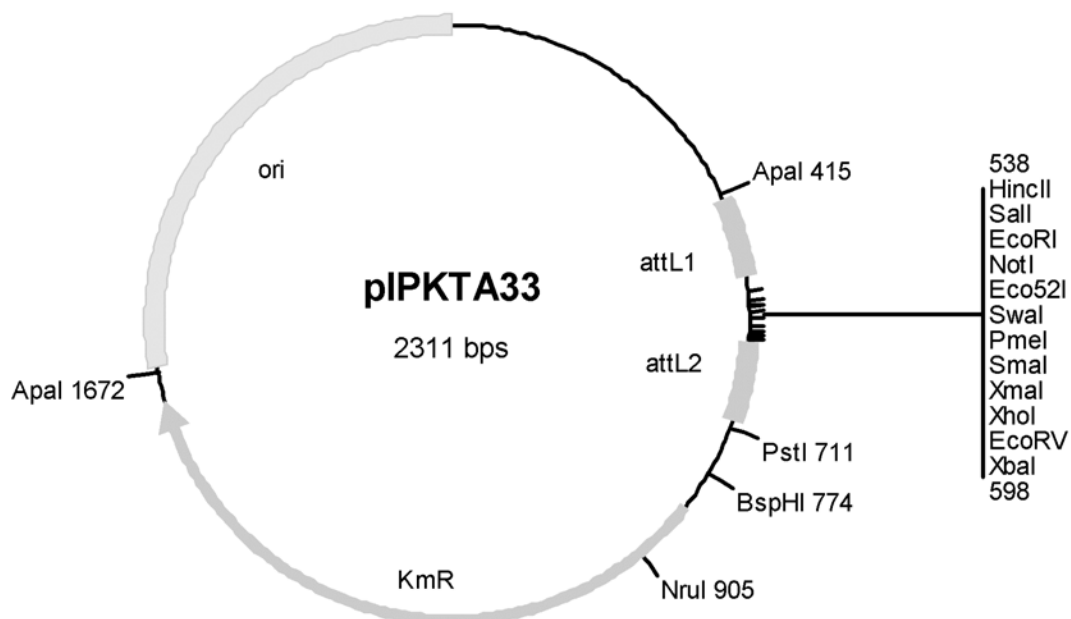


Abbildung 2.8: IPKTA33: ori: Replikationsursprung von *E.coli*; KmR: Kanamycin-Resistenz; *attL1* und *attL2*: Rekombinationsstellen

2.6.1.3 Klonierung in RNAi-Kassette pIPKTA30N

Die Umklonierung in die RNAi-Kassette pIPKTA30N (Abbildung 2.9) erfolgte durch genetische Rekombination in einer sogenannten LR-Reaktion (Nomenklatur „Gateway“-System). In 10 µl Ansätzen wurden folgende Mengen bzw. Volumina an Rekombinationsreagenzien verwendet: 100 ng der jeweiligen Plasmid-DNA (pIPKTA33); 1 µl LR Enzymmix; 15 ng pIPKTA30N; 1 µl LR-Puffer. Die LR-Reaktionen wurden sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation und die Plasmid-Isolation erfolgten wie unter 8.6 und 8.7 beschrieben. Es wurde positiv auf Ampicillin-LB-Medium und negativ mittels *ccdB*-Killergen selektioniert.

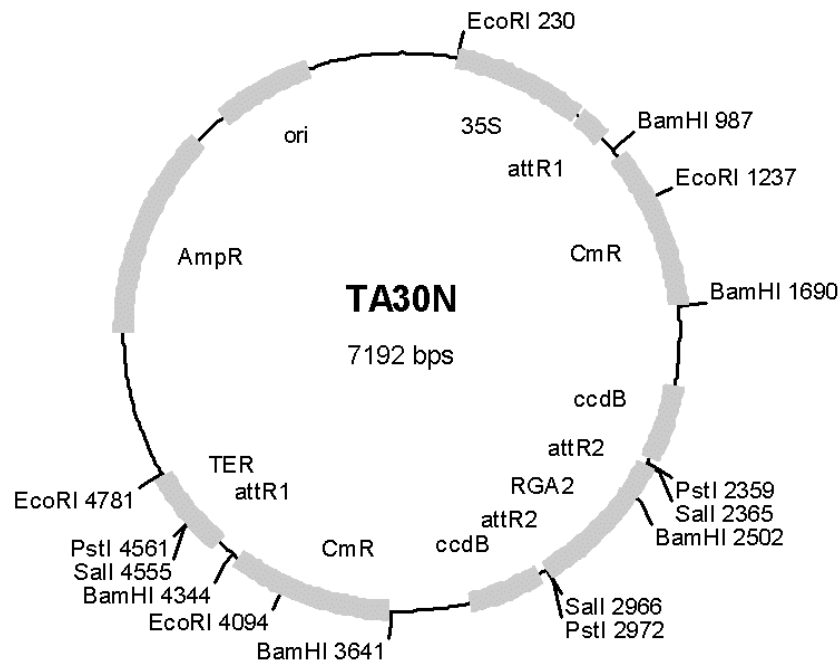


Abbildung 2.9: IPKTA30N; 7.192 bp; ori: Replikationsursprung von *E.coli*; AmpR: Ampicillin-Resistenz; TER: CaMV35S Terminator; CmR: Chloramphenicol-Resistenz; *ccdB*: negativer Selektionsmarker; *attR1* und *attR2*: Rekombinationsstellen; RGA2: Intron RGA2; 35S: CaMV35S: Promotor aus Blumenkohl-Mosaik-Virus.

2.6.2 TIGS: Vom Biolistischen Gentransfer bis zur Detektion transformierter Zellen

Die transiente Transformation der Plasmide in abgeschnittene Gerstenblatt-Segmente wurde durch biolistisches Bombardement mit Goldpartikeln in der Kanone (Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System; BioRad, Hercules, Kalifornien) (Abbildung 2.10) ausgeführt, wozu folgende Arbeitsschritte notwendig waren. Als erstes wurde die Gold-Suspension hergestellt und beschichtet, dann wurden die Mikro- und Makrocarrierscheiben und die Blattsegmente vorbereitet. Nach der vollständigen Beladung der Kanone wurde der eigentliche biolistische Gentransfer durchgeführt. Die Blattsegmente wurden dann 48 Stunden inkubiert und anschließend inokuliert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die GUS-Färbung die Coomassie-Färbung bzw. die Chlorophyll-Entfärbung durchgeführt.

- 1) Herstellung der Gold-Suspension
- 2) Beschichtung der Goldpartikel
- 3) Vorbereitung der Mikro- und Makrocarrierscheiben
- 4) Vorbereitung der Blattsegmente
- 5) Biolistischer Gentransfer
- 6) Inkubation und Inokulation
- 7) GUS-Färbung
- 8) Coomassie-Färbung (optional)
- 9) Chlorophyll-Entfärbung
- 10) Mikroskopie



Abbildung 2.10: Die Genkanone wurde zur Transformation von RNAi- und Reporter-genkonstrukten in Gerstenblattsegmente verwendet Kanone (Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System; BioRad, Hercules, Kalifornien).

2.6.2.1 Präparation der Gold-Suspension

Zur Präparation der Gold-Suspension wurden 25 mg Goldpartikel (Microcarrier, 1.0 μm Durchmesser; BioRad) in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen. Anschließend wurden die Goldpartikel zweimal mit Aqua dest. und einmal mit Ethanol (96%) gewaschen (vortexen; 20 s Ultraschallbad; 30 s, 16100 g), für 10 min bei 50°C getrocknet und jeweils in 1 ml Glycerol (50% v/v) aufgenommen. Die Suspension wurde bei -20°C gelagert.

Gold-Suspension

Goldpartikel	25 mg/ml
Glycerol (86%)	50% v/v

2.6.2.2 Vorbereiten der Blattsegmente für den Beschuss

Pro geplantem Schuss wurden jeweils je sieben Primärblattsegmente (ca. 7 cm lang) vorsichtig mit einer Pinzette auf eine Petrischale (9 cm Durchmesser), befüllt mit einer 0,5 cm dicken Schicht aus Phytoagar A, aufgelegt (adaxiale Seite oben, parallele Anordnung). Auf die Blätter wurden Magnetrührstäbe so gelegt, dass sie einander abstoßen und die Blätter auf den Phytoagar drücken.

*Phytoagar A

Phytoagar	0,5% w/v
Benzimidazol	0,002% w/v

*Phytoagar B

Phytoagar	1% w/v
Benzimidazol	0,002% w/v

*Die Phytoagar-Suspension wurde 10 min gekocht. Nach dem Abkühlen (ca. 50°C) wurde Benzimidazol zugegeben. Benzimidazol Stammlösung in Ethanol: 4% w/v.

2.6.2.3 Beschichtung der Goldpartikel

Die Fixierung der Plasmide auf den Goldpartikeln funktionierte wie folgt: 1) Pro Schuss wurden jeweils 87,5 µl Gold-Suspension und 7 µl pUbiGUS DNA mit jeweils X µl Plasmid-DNA (7 µg) eines oder mehrerer RNAi-Konstrukte gemischt. 2) Anschließend wurden unter schütteln (vortexen) Y µl Ca(NO₃)₂-Lösung tröpfchenweise zugeben (siehe Beschichtungsschema). 3) Die Suspension wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dabei mehrmals aufgeschüttelt und dann zentrifugiert (15 sec, 16100 g). 4) Die beschichteten Goldpartikel wurden zweimal mit je 1 ml Aqua dest. und einmal mit 1 ml reinstem Ethanol gewaschen, letztlich in 30 µl Ethanol aufgenommen.

Beschichtungsschema

Gold-Suspension	87,5 µl
Plasmid-DNA pIPKTA33	X µl*
pUBIGUS	7 µl
Ca(NO ₃) ₂ -Lösung	Y µl*

Ca(NO₃)₂-Lösung

Ca(NO ₃) ₂	1 M
add 0,1 M KOH Lösung	pH 10

*Y µl = 94,5 µl + X µl

2.6.2.4 Vorbereitung der Makrocarrier-Scheiben und der Zerreischeibe

Die Makrocarrier-Scheiben (BioRad, Hercules, Kalifornien) und die Zerreischeibe (900 psi, BioRad, Hercules, Kalifornien) wurden in Ethanol (96%) 30 s gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zerreischeibe wurde dann in die Sprühkopfvorrichtung mit einer Pinzette eingesetzt. Auf die Makrocarrier-Scheiben wurden die plasmidbeschichteten Goldpartikel aufgetragen. Dazu wurde das jeweilige Reaktionsgefäß mit der Suspension plasmidbeschichteter Goldpartikel für 10 s in ein Ultraschallbad gehalten und anschließend gut mit einer Pipette gemischt. Pro Scheibe wurden jeweils 3 µl Suspension in kreisförmigen Bewegungen mit der Pipette auf jeden Makrocarrier auftragen.

2.6.2.5 Bombardementformation der Genkanone

Pro Schuss wurden zunächst jeweils sieben vollständig abgetrocknete Makrocarrier-Scheiben mit plasmidbeschichteten Goldpartikeln in den BioRad Hepta-Adaptor eingesetzt. Dann wurde der BioRad Hepta-Adaptor zusammen mit einem Stopgitter (Hepta Stop Screen) in den dritten Einschub von oben, eine Petrischale mit Blättern in den fünften Einschub und eine Zerreischeibe (Rupture disc; 900 psi, BioRad), in die Sprühkopfvorrichtung der Kanone eingesetzt. Mittels einer Membranvakuumpumpe wurde ein Vakuum von 27 mm Hg in der Kammer angelegt. Bei 900 psi zerrissen die Zerreischeiben und die Makrocarrier-Scheiben wurden gegen das Stopnetz geschleudert. Durch die wirkenden Trägheitskräfte wurden die beschichteten Goldpartikel in die Kammer geschleudert und drangen in die Epidermiszellen der Blattsegmente ein.

2.6.2.6 Inkubation und Inokulation bombardierter Blattsegmente

Die Blattsegmente in den Petrischalen (9 cm Durchmesser) wurden nach dem Beschuss zunächst ca. vier Stunden mit leicht geöffnetem Deckel inkubiert, um die Bildung von Exudationströpfchen an Mikroverwundungen der Blätter zu vermeiden. Dann wurden die Deckel geschlossen und die Blattsegmente wurden so über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Blattsegmente auf viereckige Petrischalen (24 x 24 x 2 cm) umgelegt, die mit einer 1 cm dicken Schicht aus Phytoagar B ausgegossen waren. Die Blattsegmente wurden mit jeweils zwei Reißzwecken an den Enden befestigt. Die Inokulation der Blätter erfolgte in einem Inokulationsturm durch Abschütteln der Konidien von Spenderpflanzen. 10 cm über den Blättern wurde ein Gazenetz (0,1 mm Maschenweite, Millipore, Billerica, USA) angebracht, um Konidien-Aggregate auf den Blättern zu vermeiden. Die Inokulationsdichte von wurde mikroskopisch ausgezählt. Optimal waren 150 bis 200 Sporen/mm². Gegebenenfalls wurde ein weiteres Mal inokuliert, um die gewünschte Inokulationsdichte zu erreichen. Die inokulierten Blätter wurden bei natürlichem Tag/Nacht Rhythmus bei indirektem Tageslicht (Nordfenster) und einer Temperatur von 18°C-22°C inkubiert. Diese Inkubationsbedingungen verhindern im Gegensatz zu allen bisher getesteten Bedingungen in Klimaschränken eine verfrühte Blattseneszenz.

2.6.2.7 GUS-Färbung transformierter Zellen

Die Blätter wurden 48 Stunden nach Inokulation vorsichtig mit einer Pinzette eingesammelt, übereinander gelegt, an den Blattenden auf gleiche Länge geschnitten und in die GUS-Färbelösung (PP-Röhrchen; 15 ml, Greiner, Nürtingen) überführt, um diese zu infiltrieren. Die Röhrchen mit den Blättern wurden in eine Saugflasche gestellt. Das Vakuum wurde zweimal so anlegt, dass die Färbelösung fast überkochte. Dann wurde die Saugflasche sofort wieder belüftet. Sobald die Blätter durchsichtig waren und absanken war die Infiltration der Blätter vollständig. Im Anschluss wurden die Röhrchen auf 14 ml mit GUS-Lösung aufgefüllt, verschlossen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

GUS-Färbelösung

Na-Phosphat End.-pH 7,0	100 mM
Na-EDTA	10 mM
K-hexacyanoferrat(II)	1,4 mM
K-hexacyanoferrat(III)	1,4 mM
Triton X-100	0,1%
Methanol	20%
X-Gluc	1 mg/ml

2.6.2.8 Coomassie-Färbung der Blattsegmente

Um Pilzstrukturen auf den Blättern anzufärben wurde zunächst die X-Gluc-Lösung vorsichtig abgegossen und durch 8 ml Coomassie-Lösung ersetzt. Anschließend wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde zweimal mit Aqua dest. vorsichtig gewaschen.

Coomassie-Färbelösung

- A) 1,5 g Coomassie R 250 (0,3%) in 250 ml Methanol lösen
 B) 37,5 g Trichloressigsäure (7,5%) in H₂O vorlösen

A und B mischen und mit H₂O auf Endvolumen von 500 ml auffüllen
 Lösung durch Papierfilter in Blaukappen-Flaschen filtrieren

2.6.2.9 Entfärbung der Blattsegmente

Falls keine Coomassiefärbung durchgeführt wurde, wurden die Blattsegmente für 8 min in TCA-Entfärbelösung inkubiert. Dadurch wird das Chlorophyll aus den Blättern herausgelöst und die GUS gefärbten Zellen erscheinen beim Mikroskopieren kontrastreicher gegenüber dem Hintergrund. Anschließend wurden die Blattsegmente zweimal vorsichtig mit Aqua dest. gewaschen.

TCA-Entfärbelösung

TCA 7,5% w/v
 Methanol 50%

2.6.2.10 Mikroskopie der Blattsegmente

Nach erfolgter Färbung wurden die Blätter aus dem Röhrchen genommen und mit der adaxialen Seite nach oben auf Objektträger gelegt. Pro Objektträger wurden 200 µl Aqua dest. zugegeben und dann mit einem Deckglas abgedeckt. Aufbewahrt wurden die Deckgläser in feuchten Kammern bei 4°C. Mikroskopiert wurde mit Auflicht und 20-facher Vergrößerung an einem Zeiss Forschungsmikroskop (Axioplan 2 bzw. Axiolab, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

2.7 Messung von Aminosäure-Gehalten in der Epidermis und im ganzen Blatt

Die Konzentrationsmessungen der AS GABA und aller proteinogenen AS in der Epidermis- und „Restblatt“-fraktion von Gerstenblättern wurde mittels HPLC in der AG: Molekulare Pflanzenphysiologie des IPK Gatersleben durchgeführt. HPLC (*high pressure liquid chromatography*) ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu analysierende Substanz (aufgearbeitete Epidermisfraktion und „Restblatt“-fraktion) zusammen mit einem flüssigen Laufmittel (mobilen Phase) auf eine sogenannte Trennsäule (stationäre Phase) gegeben und gemäß Affinität und Größe aufgetrennt wird.

Für die HPLC-Messungen wurden die Epidermis bzw. „Restblatt“-Proben in flüssigem Stickstoff homogenisiert (100-200 mg), in Extraktions-Puffer (80% Ethanol; 20 mM Hepes-KOH; pH 7,5) aufgenommen, 90 min bei 80°C inkubiert und dann abzentrifugiert (16100 g, Raumtemperatur). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, bis zur Trockne eingedampft und in Aqua dest. resuspendiert. Vor der Messung wurden die präparierten Proben mit dem fluoreszierenden Reagenz AQC (6-aminoquinoly1-N-hydroxysuccinimidylcarbamate) derivatisiert. Die Derivatisierung mit AQC wurde nach dem Protokoll des verwendeten Kits durchgeführt (ACCQ FLUOR™ REAGENT KIT; Waters Co., Milford, USA). Das gelöste Reagenz wurde bei 4°C bis zu sechs Wochen aufbewahrt.

Die AS Messungen wurden mit einem Reversed-Phase-HPLC-System (Waters Co., Milford, USA) durchgeführt. Das System bestand aus einer Gradientenpumpe (600), einer Entgasungseinheit, einem Autosampler (717) und einem Fluoreszenz-Detektor (474). Die Chromatogramme wurden mit der Software Millennium 32 ausgewertet. Als HPLC-Säule diente eine Silicamatrix mit apolarer C18 Gruppe (*reversed phase colum*, AccQ Tag, 3,9x 150 mm).

Der Druckgradient wurde mit Puffer A (140 mM Natriumacetat, pH 5,8, Suprapur, Merk, 7 mM Triethanolamin Sigma, München, Deutschland) ausgebildet. Die Equilibrierung der Säule erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min und bei einer Temperatur von 37°C, die während der gesamten Messung konstant blieben. Eluiert wurde mit Acetonitril (Roti C Solv HPLC, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und Aqua dest. (HPLC Water, Baker Co., Phillipsburg, USA), wobei ein Konzentrationsgradient ausgebildet wurde. Die Konzentration wurde dabei folgendermaßen variiert: 1% 0,5 min; 5% 27 min; 9% 28,5 min; 18% 44,5 min; 60% 47,5 min; 0% 50,5 min. Zur Regeneration der Säule zwischen den Messungen wurde jeweils 10 min mit Puffer A gespült.

2.8 Standardprotokolle und -lösungen

2.8.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i>	XL Gold (Stratagene, La Jolla, USA)
<i>Escherichia coli</i>	DH10B
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1 Competent Cells (Invitrogen, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien)

2.8.2 Oligonukleotidprimer

SK	5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'
M13-20	5'-CAT TTT GCT GCC GGT CA-3'
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
MVR26	5'-CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AG-3'

2.8.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA und DNA

Zur photometrischen Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration wurden 5 µl der RNA- bzw. DNA-Lösung in 495 µl Aqua dest. gegeben und anschließend bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette vermessen (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die Nukleinsäurekonzentration ist das Produkt aus OD_{260nm} , Verdünnungsfaktor und dem spezifischen Multiplikationsfaktor der Nukleinsäure.

2.8.4 Gelelektrophorese zur Trennung von DNA nach der Fragmentgröße

Die DNA wurde mit 0,2 Volumen Proben-Puffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Trennung der DNA erfolgte bei 120 V. Alle Gele wurden mit einem DNA-Größenmarker (Smart Ladder, Eurogentec, Liège, Belgien) durchgeführt und fotografisch

durch UV-Transillumination bei 312 nm mit der einer Bildverarbeitungssoftware (E.a.s.y.Win32; Herolab, Wiesloch, Deutschland) dokumentiert. Für die Auftrennung von sehr kleinen DNA-Molekülen mit Fragmentgrößen zwischen 100 und 400 bp wurde eine Spezialagarose (Agarose 50-1.000 bp; Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

<u>Agarosegel</u>		<u>50 x TAE-Puffer</u>		<u>5 x Proben-Puffer</u>	
Agarose*	0,8%-1,5% w/v	Tris-HCl	2 M	Bromphenolblau	0,001% w/v
50 x TAE-Puffer	2%	Natriumacetat	50 mM	Glycerin	30% v/v
Ethidiumbromid	0,5 µg/ml	Na-EDTA (pH 8,0)	50 mM	Na-EDTA (pH 8,0)	50 mM

* *Elektrophoresis grade*, Invitrogen

2.8.5 Präparation transformations-kompetenter Bakterienzellen

Kompetente Zellen von *E. coli* wurden routinemäßig nach einer modifizierten Methode von (Hanahan, 1983) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer Einzelzell-Kultur von *E. coli*, DH10B angeimpft und auf einem Schüttler bei 37°C solange inkubiert bis die Suspension eine OD₅₅₀ von 0,6 erreichte (ca. 3 Stunden). Dann wurde die Suspension auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (10 min; 800 g; 0°C). Das Pellet wurde in 7,5 ml TFB1-Puffer aufgenommen und resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde zentrifugiert (10 min, 800 g, 0°C). Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TFB2-Puffer aufgenommen, resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Die kompetenten Zellen wurden in 200 ml Aliquots abgefüllt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

<u>TFB1-Puffer*</u>		<u>TFB2-Puffer*</u>	
RbCl	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl	245 mM	CaCl ₂	75 mM
K-acetat	35 mM	RbCl	10 mM
CaCl ₂	10 mM	Glycerin	15%
LiCl	0,5 mM	add 0,1 M NaOH	pH 7,0
Glycerin	15%		
add 0,2 M Essigsäure	pH 5,8		

*sterilfiltrieren

2.8.6 Transformation von kompetenten Bakterienzellen

1 µl Plasmid-DNA (0,001-1 µg/µl) und 50 µl Suspension von kompetenten Zellen wurden auf Eis vermischt und inkubiert. Die Mischung wurde einem Hitzeschock (42°C; 45 s) ausgesetzt und mindestens 2 min auf Eis gestellt. Die Suspension der nun transformierten Zellen wurde in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen, 30 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (3 min; 2300 g). Der Überstand wurde bis auf 50 µl verworfen.

Im restlichen Überstand wurden die Bakterien resuspendiert. Die Suspension wurde ausgestrichen.

2.8.7 Plasmid-Präparationen

Einzelne Plasmid-Präparationen im kleinen bzw. mittleren Maßstab wurden mit Kits (JETstar 2.0 Plasmid MINI Kit 200 bzw. MIDI Kit50, GENOMED, Löhne, Deutschland) durchgeführt. Plasmid-Präparationen im 96er Platten Format wurden mit einem Kit (NucleoSpin Robot-96 Plasmid, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Beide Kits basieren auf Silica Anionenaustauschersäulen, die positiv geladene Gruppen enthalten und DNA, Proteine und RNA unterschiedlich stark binden.

2.8.8 Restriktionsverdau

Alle Restriktionsverdau wurden unter denen vom Hersteller (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) empfohlenen Pufferbedingungen, Enzymkonzentrationen und Temperaturen durchgeführt. Inkubiert wurde eine Stunde. Folgender Standardansatz wurde verwendet.

Restriktionsverdau

DNA	1 µl
Restriktionsenzym	2 µl
Puffer	2 µl
Aqua dest.	15 µl

2.8.9 Arbeiten mit RNA

Um RNase Kontaminationen beim Arbeiten mit RNA zu vermeiden, wurden die allgemein üblichen Vorkehrungen getroffen (Sambrook und Russell 2002). Alle RNA-Arbeiten wurden mit DEPC-Wasser ausgeführt.

DEPC-Wasser*

DEPC	0,1% v/v
------	----------

*Die Lösung wurde 40 min bei 121°C autoklaviert.

2.8.10 Mikroskopie und Fotografie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss Forschungsmikroskop (Axioplan 2 bzw. Axiolab, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) durchgeführt. Für das TIGS *Screening* wurde mit der 200-facher Vergrößerung gearbeitet. Mikroskopische Fotos wurden mit der Digital-Kamera (Axiocam HRc, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) aufgenommen. Für makroskopische Fotos wurde die Kleinbild Digital-Kamera (Nikon Coolpix SQ 3,1) verwendet.

2.8.11 Standardlösungen

1) LB-Medium

NaCl	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
Agar	15 g/l
add NaOH	pH 7,5

Selektionsmarker

Ampicillin-Resistenz:	100 µg Ampicillin (Roth)/ml LB-Medium
Kanamycin-Resistenz:	50 µg Kanamycin (Roth)/ml LB-Medium
Blau-Weiß-Selektion:	60 µg X-Gal (Roth)/ml LB-Medium
	60 µg IPTG (Roth)/ml LB-Medium

*Die Mischung wurde autoklaviert und anschließend, bis zum Gießen, bei einer Temperatur von 65°C gehalten. Für LB-Medium (flüssig) wurde kein Agar zugesetzt. Dem Medium wurden bei Bedarf folgende Selektionsmarker zugesetzt.

2) TE-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
Na-EDTA, pH 8,0	1 mM

3) SOC-Medium

Bacto-Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl (1M)	2,5 ml/l
add NaOH	pH 7,0
MgCl ₂ (1M)*	10 ml/l
Glucose (1M)*	20 ml/l

* Die Lösung wurde autoklaviert. Die MgCl₂- und die Glucoselösung wurden gesondert sterilfiltriert.

4) 50 x TAE

Tris-Base	2 M
Eisessig	5,7%
add 0,5 M Na-EDTA-Lösung	pH 8,0

