

4. Diskussion

4.1 Etablierung von Ressourcen

Die Aufgabe der Arbeitsgruppe Transkriptomanalyse am IPK Gatersleben besteht darin, „Genfunktionen in der Gerste für Resistenz gegen Pilzkrankheiten in einem genomweiten Ansatz zu untersuchen“ (<http://www.ipk-gatersleben.de/de/02/04/04/index.html>). Im Mittelpunkt steht dabei das Modellsystem Gerste und *Bgh* (Schweizer *et al.* 1995; Schweizer *et al.* 1996; Schweizer *et al.* 1998; Schweizer *et al.* 1999; Schweizer *et al.* 1999; Schweizer *et al.* 2000; Schweizer *et al.* 2000; Christensen *et al.* 2004). Da die Arbeit in der Aufbauphase der Arbeitsgruppe entstand, wurden in diesem Rahmen grundlegende Ressourcen für die Transkriptomforschung im Modellsystem geschaffen. Dies waren:

- (1) eine cDNA-Bank (HO-cDNA-Bank) und eine EST-Kollektion (HO);
- (2) eine Plattform für Transkriptomanalysen im Modellsystem Gerste und *Bgh*; und
- (3) ein neu entwickeltes hochdurchsatztaugliches Klonierungsverfahren für RNAi-Konstrukte (Douchkov *et al.*, unveröffentlicht). Das Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals getestet und die Konstrukte wurden im TIGS-*Screening* eingesetzt (Kapitel 4.4).

4.1.1 Die HO-cDNA-Bank

Die HO-cDNA-Bank repräsentiert das epidermale Transkriptom mehltauattackierter Gerste. Die Epidermis der Gerste ist ein hochspezialisiertes, differenziertes, nicht photoautotrophes Gewebe. Es wird angenommen, dass sich entscheidende physiologische und transkriptionelle Veränderungen nach Mehltaubefall in der Epidermis ausbilden. Die HO-cDNA-Bank, bestehend aus 14.592 Klonen, wurde aus den Epidermen von mehltauattackierten resistenten Gerstenkeimlingen der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* präpariert. Gründe für die Präparation der cDNA-Bank aus abgezogener Epidermis waren:

- 1) Die Interaktion von *Bgh* und Gerste bleibt in allen Entwicklungsstadien auf die Sprossepidermis beschränkt.
- 2) Das Epidermis-*Blumeria*-System ist ein System von reduzierter Komplexität.
- 3) Mit theoretischen Berechnungen wurde gezeigt, dass in cDNA-Banken, die aus dem gesamten Blatt präpariert wurden, nur jeder zwanzigste Klon ein in der Epidermis exprimiertes Gen repräsentiert. Ursache dafür ist, dass nur ca. fünf Prozent der mRNA eines Blattes aus der Epidermis stammen. Der restliche Anteil resultiert aus den wesentlich dichter gepackten Mesophyllzellen (Kapitel 3.2.3.1).

Die Anreicherung der cDNA-Bank mit epidermisspezifischen Transkripten konnte rückwirkend experimentell, auch anhand der Transkriptomanalysedaten mit Mesophyll- bzw. „Gesamtblatt“-Sonden, bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2.3.4).

Insgesamt wurden von der HO-cDNA-Bank im Rahmen dieses Projektes 5.952 Klone sequenziert. Dabei entstanden 5.163 5'-ESTs, die in die EST-Kollektion des IPK integriert wurden und diese ergänzen (Zhang *et al.* 2004). Innerhalb der sequenzierten ESTs wurden 3.595 Unigene gefunden. Zahlreiche Sequenzen waren bisher in keiner Sequenzdatenbank vorhanden. In einem *Clustering*-Projekt mit 135.031 ESTs der Gerste wurden beispielsweise 294 HO-spezifische Cluster gefunden (siehe Kapitel 3.1). Sowohl die cDNA-Klone als auch die ESTs stehen für zahlreiche weitere Projekte, unter anderem für die Erstellung von RNAi-Bibliotheken für TIGS-*Screening*-Ansätze, zur Verfügung.

4.1.2 Large-scale-Transkriptomanalyse im Pathosystem Gerste und Mehltau

Bei *large scale* Transkriptomanalysen auf der Basis von Arrays, wie sie im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, handelt es sich um erst kürzlich in der Pflanzengenomforschung etablierte Methoden, die entweder auf der Basis von cDNA- und Oligonukleotid-Mikroarrays oder auf Makroarrays beruhen. Erste Analysen in Pflanze-Pathogen-Modellsystemen wurden im Jahre 1999 bekannt. Seither wurden ca. 20 Analysen, darunter eine im Modellsystem *Gerste und Bgh* veröffentlicht (Maleck *et al.* 2000; Reymond *et al.* 2000; Ramonell *et al.* 2002; Scheideler *et al.* 2002; Huitema *et al.* 2003; Tao *et al.* 2003; Yazaki *et al.* 2003; Caldo *et al.* 2004; Cluzet *et al.* 2004; Dowd *et al.* 2004; Eulgem *et al.* 2004; Manthey *et al.* 2004; Moy *et al.* 2004; Narusaka *et al.* 2004; Ros *et al.* 2004; Verhagen *et al.* 2004; Voelckel und Baldwin 2004; Zhang *et al.* 2004). Eine Übersicht ist in Tabelle 1.1 gezeigt.

Auf dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Makroarray sind ca. 3.136 Unigene der HO-cDNA-Bank in Form von cDNA-Fragmenten vorhanden, die einen Teil des epidermalen Transkriptoms repräsentieren. Neben der hier vorliegenden Transkriptomanalyse in der Epidermis mehltaubefallener Gerste wurde der Array in Kooperationsprojekten des IPK mit Torben Gjetting (RISOE, Dänemark) und Pietro Piffanelli (CIRAD, Frankreich) genutzt. Hierbei wurde die Möglichkeit getestet, den Array für Untersuchungen einzelner Zellen bzw. zur Untersuchung des Transkriptoms von mit *Magnaporthe grisea* befallenen Reis zu nutzen. Von Gjetting *et al.* (2004) wurde eine Methode etabliert, die es möglich macht, RNA aus einzelnen Zellen zu gewinnen. Mit der daraus synthetisierten cDNA wurden PCR-amplifizierte Sonden für *Dot Blots* hergestellt, mit denen bekannte pathogeninduzierte Gene detektiert werden konnten (zum Beispiel GLP4, PR17a, PR17b, 14-3-3a, Prx7, Prx8) (Gjetting *et al.* 2004). In ersten Versuchen wurde der hier erstellte Array mit diesem Material getestet.

Anfang 2000 stand keine Plattform für Transkriptomanalysen in Gerstenepidermis zur Verfügung. Daher wurde beschlossen eine derartige Plattform auf der Basis von cDNA-Makroarrays aufzubauen. Der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erstellte Makroarray (5x5 *Spotting*) mit 3.136 Unigenen der HO-cDNA-Bank stellt den Vorläufer eines umfassenderen Makroarrays (6x6 *Spotting*) mit 10.480 Unigenen der Gerste dar. Von diesem wurden 600 Membranen hergestellt. Gründe für die Wahl der makroarraybasierten Plattform auf Nylonmembranen waren: 1) Makroarrays sind im Vergleich zu Mikroarrays, die auf Glasobjektträgern durchgeführt werden, einfacher und schneller herzustellen, da die Bindung der Nukleinsäuren an Nylonmembranen sehr effizient ist. 2) Makroarrays sind kostengünstiger, zumal die Methoden und die Robotertechnik in der Arbeitsgruppe Expressionskartierung des IPK bereits etabliert waren (Sreenivasulu *et al.* 2002; Potokina *et al.* 2004). *Know-how*-Transfer konnte so sehr effizient durchgeführt werden.

Eine weitere Plattform für Expressionsstudien in Gerste, die mit dem hier erstellten Array konkurriert, ist der kürzlich entwickelte, wesentlich teurere Oligonukleotid-basierte Mikroarray der Firma Affymetrix (Barley1 GeneChip) mit einem Unigeneset der Gerste, für dessen Design ca. 350.000 ESTs aus 84 EST-Kollektionen (einschließlich der am IPK erzeugten ESTs) und 1.145 bekannte cDNA- und Gensequenzen von Gerste verwendet wurden (www.affymetrix.com). Mit Hilfe eines stringenten Sequenz-*Clusterings* (*CAP3-Clustering*) wurden hier 53,030 vorläufige Unigene (26,634 Contigs and 26,396 Singletons) ermittelt (Close *et al.* 2004). Tatsächlich wurden aber nur 22.600 Gene auf den Array gespottet. Außerdem überlappen sich der IPK-Unigen-Array und der Affymetrixchip nur teilweise. 30% der Gene des IPK-Unigen-Arrays sind nicht auf dem Affymetrixchip vorhanden (persönliche Mitteilung Scholz, IPK Gatersleben).

Allgemein konnte gezeigt werden, dass mit der verwendeten Makroarraytechnologie trotz einer gewissen Fehlerbehaftung (Abbildung 3.17) ein Pflanze-Pathogen-Interaktions-transkriptom analysiert werden kann. Hierfür lassen sich zahlreiche Belege anführen:

- (1) Mit den verwendeten Auswahlkriterien wurden 207 in beiden biologischen Experimenten reproduzierbare Transkriptmuster von pathogenregulierten Kandidatengenen gefunden (siehe Auswahlkriterien 3.2.2.1).
- (2) In der Kandidatengenauswahl befinden sich zahlreiche bekannte pathogenregulierte Gene der Gerste (zum Beispiel Chitinase 2b=PR-3 Klon: HO14K07; Protease-Inhibitor=PR-6 Klon: HO14F24; pBH6-12: Klon HO14D20; PAL: Klon HO13H24; GRP94=Endoplasmin Klon: HO05L01; GLP4=Klon HO09L22 (Gregersen *et al.* 1997)).
- (3) Etwa zwei Drittel der annotierten Kandidatengene wurden in der Literatur allgemein als stressinduziert beschrieben (Suchanfrage: „stress & plant“ und „pathogen & plant“, ISI Web of Science, www.isinet.com).
- (4) Mit *Northern-Blots* war es möglich ca. 90% der ausgewählten Kandidatengene zu bestätigen (siehe Kapitel 3.2.5).
- (5) Bekannte epidermis- und mesophyllspezifisch exprimierte Transkripte ließen sich über den EM-Wert korrekt zuordnen (Abbildung 3.12). Nahezu alle mehrfach vorhandenen Spots, die ein cDNA-Fragment von HvGLP4 enthielten, ergaben erwartungsgemäß eine epidermisspezifische Expression für das HvGLP4-Gen.
- (6) Verschiedene, auf dem Array vorhandene cDNA-Fragmente des gleichen Gens (Amplifikation von unterschiedlichen Klonen ausgehend) ergaben ähnliche Expressionsmuster (siehe Abbildung 3.16).

- (7) Erwartungsgemäß hatten *Bgh*-Transkripte ihren Expressionsschwerpunkt in der Epidermis (hohe EM-Werte), da sie in der Epidermispräparation angereichert wurden (Abbildung 3.12).
- (8) Durch Einführung des Differentialindex (DI) waren auch genotypspezifische Unterschiede der Genexpression nachzuweisen (Abbildung 3.9).

Im Vergleich zu genspezifischeren Oligonukleotid-Arrays stellt sich bei cDNA-basierten Arrays die Frage nach kreuzhybridisierenden Transkripten homologer Gene. Kreuzhybridisierungen von Gersten- und *Bgh*-Transkripten sollten aufgrund der geringen Abundanz der *Bgh*-Transkripte und des unterschiedlichen GC-Gehaltes kein Problem darstellen. Dagegen sind Kreuzhybridisierungen von stark homologen Genen möglich. Ein weiteres Problem stellen Mischsignale des gleichen Gens aus unterschiedlichen Geweben dar. Eine mögliche Fehlerquelle in der hier vorliegenden Transkriptomanalyse sind Verunreinigungen der Epidermissonden mit Mesophyllresten. Beispiele dafür, dass Gene in der Epidermis und im Mesophyll unterschiedlich reguliert zu sein scheinen, sind HvSNAP34 und HvGAD. Die reproduzierbaren Expressionsmuster in der Epidermis aus der Arrayanalyse ließen sich nicht mit „Gesamtblatt“-*Northern-Blots* bestätigen (Abbildung 3.18 bzw. Abbildung 3.8).

4.1.3 Das TIGS-Screening System

Prinzipiell ist es möglich, die dsRNA für RNAi (RNA-Interferenz) in Pflanzen *in vitro* als auch *in vivo* zu synthetisieren. Die *in vivo* Synthese (in der Pflanze) der dsRNA hat sich in letzter Zeit mehr und mehr durchgesetzt, da so ständig neusynthetisierte genspezifische dsRNA in der Zelle zur Verfügung steht, was die *silencing*-Effizienz erhöht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neu entwickeltes hochdurchsatztaugliches Klonierungsverfahren für RNAi-Konstrukte auf der Basis von „Gateway“-Vektoren (Douchkov *et al.*, unveröffentlicht) erstmals getestet. Die Konstrukte wurden im TIGS-*Screening* eingesetzt (Kapitel 4.4).

- (1) Das neu entwickelte Klonierungssystem war effizient. Von 171 geplanten RNAi-Konstrukten konnten 128 gleichzeitig erstellt werden. Mittlerweile wurde das Klonierungsverfahren insofern verfeinert, dass anstelle von *EcoRV* ein 8 Basenpaar schneidendes Restriktionsenzym (*SwaI*) beim Ligationsschritt in den Zwischenvektor verwendet wird. Mit diesem ist es möglich, noch höhere Ausbeuten bei der Erzeugung der RNAi-Konstrukte zu erreichen (ca. 90%) (Douchkov *et al.*, unveröffentlicht).
- (2) Mit dem hier durchgeführten systematischen TIGS-*Screening* wurde die Funktionalität dieses neu etablierten Systems gezeigt, indem mit einem von 128 getesteten RNAi-Konstrukten (HvSNAP34: Klon pIPKTA30_HO12F09) die *mlo*-vermittelte Resistenz im Testsystem durchbrochen werden konnte.
- (3) Mit *Pools* verschiedener RNAi-Konstrukte war es entgegen unserer Erwartungen allerdings nicht möglich die Resistenz zu durchbrechen.
- (4) Innerhalb einer Arbeitswoche (eine Arbeitskraft) war es möglich, 24 Kandidatengene in TIGS-Ansätzen zu testen und auszuwerten.
- (5) Problematisch waren TIGS-*Screening*-Serien mit Inokulationsstärken über 200 Sporen/mm². Hierbei wurden normalerweise anfällige Kontrollpflanzen (Ingrid *Mlo*) bereits relativ resistent, sodass einige Versuche nicht auswertbar waren. Es ist allgemein bekannt, dass mit Verwundung (Abschneiden, Bombardement), Alter, zunehmender Inokulationsstärke und Länge der Blätter die Anfälligkeit der Gerste für *Bgh* abnimmt (Bushnell 2002).

Mit dem Durchbrechen der *mlo*-vermittelten Resistenz durch transiente Unterdrückung der Expression von HvSNAP34 (Klon HO12F09) konnte die Funktionalität von TIGS-Experimenten mit den klonierten RNAi-Konstrukten belegt werden. Der Effekt von HvSNAP34 konnte durch Einzelbeschuss mehrfach reproduziert werden. In *Pools* wurde aber niemals ein RNAi-Effekt des HvSNAP34-Gens gezeigt. Möglicherweise wird die zelluläre Maschinerie, die für den RNAi-Effekt notwendig ist, mit *co*-bombardierten RNAi-Konstrukten überfordert. So stellen zum Beispiel die für RNAi notwendigen DICER-Proteine und RISK-Komplexe möglicherweise limitierende Faktoren dar, die bei *co*-bombardierten RNAi-Konstrukten nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen könnten (Abbildung 2.6).

4.2 Das epidermale Transkriptom der Gerste nach Pathogenbefall

Nach der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze werden zahlreiche Stressreaktionen ausgelöst. Die Pflanze stellt ihren Stoffwechsel von „housekeeping“ auf „Abwehr“ um. Hieraus resultieren eine Reihe von basalen Abwehrreaktionen, die in den verschiedenen Modellsystemen abhängig von der Lebensweise des Pathogens einerseits ähnlich ablaufen, andererseits aber auch für das Pathosystem spezifische Merkmale aufweisen.

Blumeria graminis ist ein obligat biotropher Organismus. Daher hat sich, im Gegensatz zu nekrotrophen bzw. hemibiotrophen Pathogenen, ein Infektionsmechanismus ausgebildet, der der Pflanze möglichst wenig Schaden zufügt und der möglicherweise auf Tarnung, Detoxifikation von pflanzlichen Substanzen oder der Blockade von Signalkomponenten der Abwehr beruht (Panstruga und Schulze-Lefert 2002). Innerhalb des Modellsystems Gerste und *Blumeria* lassen sich prinzipiell drei verschiedene Formen von Resistenz unterscheiden. Diese sind die papillenassoziierte Nichtwirtsresistenz, die HR-assoziierte, R-Gen vermittelte, rassenspezifische Resistenz und die SNARE- und papillenassoziierte, *mlo*-vermittelte Breitbandresistenz (Panstruga und Schulze-Lefert 2002; Schulze-Lefert und Panstruga 2003). Ein gemeinsames Merkmal der Resistenzen ist, dass Gene der Basalabwehr durch PAMPs in kompatiblen als auch inkompatiblen Interaktionen reguliert werden und eine Reihe von basalen Abwehrreaktionen auslösen (Schweizer *et al.* 2000; Zipfel *et al.* 2004). Mit Arraystudien konnten hier zahlreiche elizitorregulierte Gene in Monokotylen als auch Dikotylen Pflanzen gezeigt werden (Ramonell *et al.* 2002; Cluzet *et al.* 2004; Fujiwara *et al.* 2004). Andererseits sollten aber auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Resistenzformen existieren. Die vorliegende Transkriptomanalyse in mehltaubefallenen Gerstenblättern hatte daher drei Schwerpunkte:

- (1) Beschreibung der basalen Abwehrmechanismen
- (2) Suche nach *downstream*-Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit
- (3) Lokalisierung der Genexpression im Blatt

Pathogenregulierte Gene im Pathosystem Gerste und *Bgh*

Arrayanalysen zu den oben beschriebenen Themenkomplexen wurden bisher im Pathosystem Gerste und *Blumeria* noch nicht durchgeführt. Die einzige kürzlich veröffentlichte Arrayanalyse beschränkt sich auf die Suche nach Komponenten der *Mla*-vermittelten Resistenz (Caldo *et al.* 2004).

Mit der vorliegenden Transkriptomanalyse konnte die bisher bekannte Anzahl von ca. 50 pathogenregulierten Genen (Christensen *et al.*, 2002) im Pathosystem Gerste und

Blumeria beträchtlich erhöht werden. Innerhalb von 3.136 analysierten Unigenen wurden 207 in beiden biologischen Experimenten reproduzierbare, pathogenregulierte, pflanzliche Gene gezeigt. Für zahlreiche Gene (47 Gene) wurden keine Sequenzhomologien zu annotierten Genen bekannter oder vermuteter Funktion gefunden, was bedeutet, dass es sich um völlig neue, unbekannte Gene handelt (Kategorien „unbekannt“ und „kein Treffer“). Die Gene mit Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen konnten in Gruppen wie Primär-, Sekundärmetabolismus, Photosynthese, Signalkomponenten, Transkription, Translation, Proteolyse, Zelltod, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Membran und Transport eingeteilt werden (Tabelle 3.0).

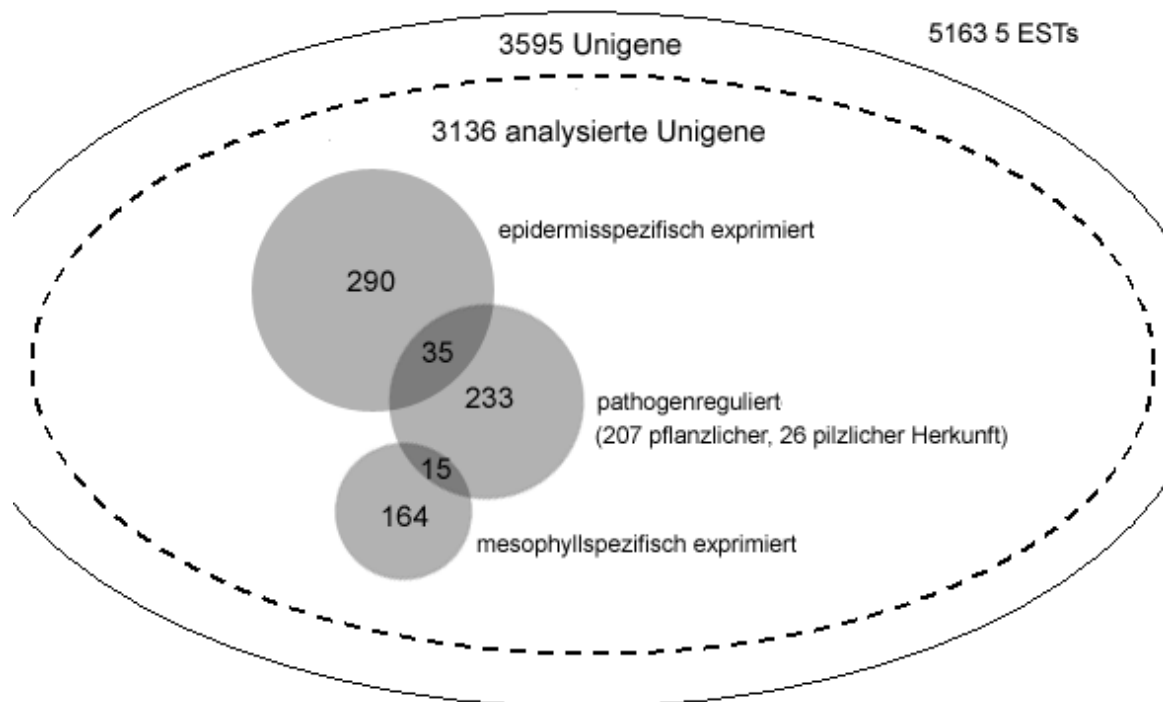


Abbildung 4.1: Circa 3.136 Unigene des epidermalen Interaktionstranskriptoms wurden analysiert. Es wurden 233 pathogenregulierte, 290 epidermisspezifisch exprimierte und 164 mesophyllspezifisch exprimierte Gene definiert.

Zusätzlich zu den 207 pflanzlichen Kandidatengenen wurden 26 pilzliche, vermeintlich „induzierte“ Gene detektiert. Bei einer geschätzten Anzahl von insgesamt 240 pilzlichen Genen auf dem Array (8 %), erscheint eine Zahl von 26 pilzlichen Genen relativ gering, da theoretisch alle pilzlichen Gene „induziert“ sein müssten. Ursache hierfür dürfte der geringe Anteil pilzlicher Biomasse im Vergleich zur Epidermis sein. Die Transkriptabundanz vieler Pilzgene dürften unterhalb der Detektionsgrenze liegen. In einer ähnlichen Transkriptomanalyse im Pathosystem Sojabohne und *Phytophthora sojae* waren von 820 induzierten Genen 517 pathogener Herkunft. Allerdings waren auf dem Array auch dreimal mehr Gene des Pathogens (ca. 800) vorhanden (Moy *et al.* 2004).

Mit 207 wird die Zahl pathogenregulierter Gene der Gerstenepidermis mit Sicherheit weit unterschätzt, da erstens nur ein Teil des epidermalen Transkriptoms (3.136 Gene) analysiert wurde und zweitens zahlreiche Transkripte unter der Nachweisgrenze lagen. Ferner waren die Auswahlkriterien für pathogenregulierte Gene relativ stringent, was sich in der hohen Bestätigungsrate von 90 % in den *Northern*-Experimenten widerspiegelt. In anderen Pflanze-

Pathogen-, Interaktionstranskriptomen“ wurden zum Teil Hunderte bis Tausende regulierter Gene beschrieben (Scheideler *et al.* 2002; Tao *et al.* 2003; Moy *et al.* 2004; Narusaka *et al.* 2004).

Von den 207 pathogenregulierten Genen waren 83% induziert und 17% reprimiert. Höchstwahrscheinlich werden in der Zeit von 6 bis 12 hpi zunächst mehr Gene induziert als reprimiert. 24 hpi kehrte sich dieser Trend zumindest in der inkompatiblen Interaktion um (Abbildung 3.2), sodass möglicherweise die Zahl reprimierter Gene mit den Auswahlkriterien des Kandidatengensets unterschätzt wird, da hier drei Zeitpunkte integrativ erfasst werden. Ein großer Teil der Gene wurde sowohl in der kompatiblen als auch der inkompatiblen Interaktion induziert (6 hpi 23 Gene, 12 hpi 90 Gene, 24 hpi 45 Gene; gemäß Auswahlkriterium 1; Kapitel 3.2.2.2, Tabelle 3.6). Die Amplituden der Regulation sind dabei in der inkompatiblen Interaktion stärker ausgebildet (Abbildung 3.4). Dies reflektiert die Tatsache, dass von beiden isogenen Linien das gleiche Set von PAMPS erkannt wird. Ähnliche Szenarien wurden auch in anderen Pathosystemen beschrieben, in denen inkompatible und kompatible Interaktionen miteinander verglichen wurden, so zum Beispiel im Pathosystem *Arabidopsis* und *P. syringae*. Auch hier wurde ein hoher Überlappungsgrad von Genen gefunden, die in beiden Interaktionen induziert waren. In der inkompatiblen Interaktion war auch hier, die stärkere pflanzliche Antwort auf das Pathogen zu sehen (Tao *et al.* 2003).

Suche nach genotypspezifischen Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit

Der zweite Schwerpunkt der Untersuchung war die Suche nach *downstream*-Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit. Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) Die Abundanz pathogeninduzierter Transkripte war in *mlo*-resistenter Gerste erhöht. Der Effekt war sowohl in nichtinokulierten als auch in inokulierten Pflanzen zu sehen. In inokulierten Pflanzen war er stärker ausgebildet.
- (2) Es wurden 31 genotypspezifisch exprimierte Gene, bei denen es sich möglicherweise um Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz bzw. der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit handelt, definiert (Abbildung 4.2, Abbildung 3.9). Genotypspezifisch exprimierte Gene, die nicht pathogenreguliert waren wurden nicht gefunden.
- (3) Von den 31 genotypspezifisch exprimierten Genen waren 25 resistenzassoziiert und nur sechs anfälligkeitsassoziiert. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Tatsache, dass die cDNA-Bank aus Epidermen *mlo*-resistenter Gerstenkeimlinge hergestellt wurde. Daher sind Komponenten, die in Zusammenhang mit Anfälligkeit stehen, möglicherweise unterrepräsentiert (Kapitel 4.2.1).
- (4) Funktionelle Zusammenhänge aufgrund von Sequenzhomologien innerhalb der Auswahl genotypspezifisch exprimierter Gene wurden nicht gefunden.
- (5) Es wurden keine qualitativen Unterschiede in den Genexpressionsmustern einzelner Gene der isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5* gefunden.

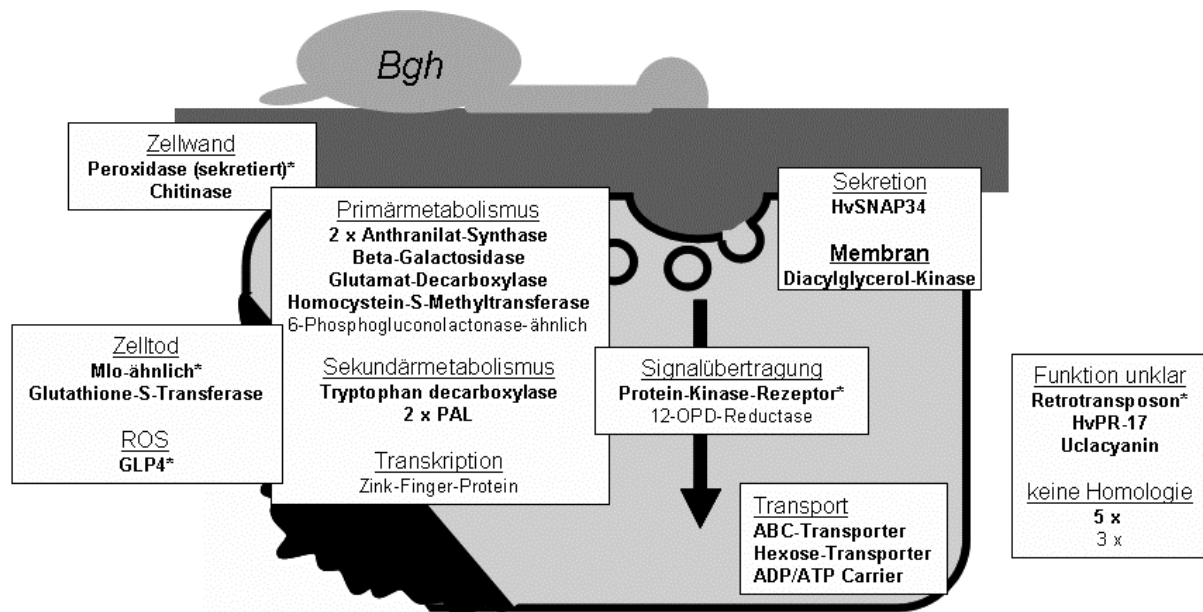


Abbildung 4.2: Epidermiszelle mit Genen, die als genotypspezifisch exprimiert eingestuft wurden. Resistenzassoziierte Gene wurden in Fettdruck und anfälligkeitsassoziierte Gene wurden dünn dargestellt. Fünf der pathogenregulierten Gene waren epidermisspezifisch und gleichzeitig in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert (siehe „*“).

Aufgrund der parallel durchgeführten Inokulation der beiden isogenen Linien mit einer Pilzrasse sind Unterschiede, verursacht durch den genetischen Hintergrund des Pathogens oder die Inokulationsstärke, unwahrscheinlich. Die beiden isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5* sollten sich aufgrund von sieben Rückkreuzungen genetisch stark gleichen. Allerdings sind restliche Donor-Genom-Blöcke im Modell Ingrid BC *mlo5* nicht völlig ausgeschlossen. Die Ergebnisse konnten durch den Vergleich der isogenen Linien Pallas (*Mlo*) und Pallas P22 (*mlo5*) bestätigt werden.

Durch Verwendung eines robusten Algorithmus in Kombination mit statistischer Analyse (siehe Differentialindex Kapitel 3.2.2.5) konnte zunächst für die Mehrzahl der pathogenregulierten Gene in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* eine stärkere Induktion bzw. Repression im Vergleich zu Ingrid *Mlo* gezeigt werden (Abbildung 3.7 A). Interessanterweise wurde dieser quantitative Effekt in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* nicht nur in den inokulierten sondern auch in den nichtinokulierten Pflanzen gefunden (Abbildung 3.7 B). Die Maxima der Regulationsfaktoren lagen bei den inokulierten Pflanzen allerdings weitaus höher.

Mittlerweile wurde die mRNA-Expressionsanalyse mehltreifiger Gerstenepidermis mit einer neu entwickelten *Open-source*-Analysemethode namens iGentifier der Firma Gentana weitergeführt (www.gentana.de). Diese Methode wurde dabei zum ersten Mal in Pflanzen getestet (Schweizer *et al.*, unveröffentlicht). Der Trend zur Anreicherung von PR-Gen-Transkripten in *mlo*-resistenter Gerste konnte bestätigt werden.

Dieser allgemeine quantitative Trend wird ferner durch Berichte von Peterhänsel *et al.* (1997) und Maucher *et al.* (2003) bestätigt, die für das PR1-Protein, eine Peroxidase, eine Chitinase und eine Allene-Oxid-Cyclase (AOC) eine stärkere Expression in der *mlo*-resistenten Interaktion zeigen konnten. Die Tatsache, dass die pathogenregulierten Kandidatengene auch in nichtinokulierten Pflanzen der resistenten Linie Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert wurden, korreliert mit der verstärkten Neigung zu spontanen Abwehrreaktionen (Zelltod, Papillenbildung) in axenisch angezogenen Pflanzen (Peterhänsel *et al.*, 1997). Möglicherweise handelt es sich daher bei der *mlo*-vermittelten Resistenz also um einen Mechanismus, der einen sogenannten *Priming*-Effekt auslöst (Conrath *et al.* 2002). Damit ist

die Fähigkeit von Pflanzen gemeint, nach Kontakt mit einem nekrotischen Pathogen oder einer natürlichen oder synthetischen Signalkomponente wie zum Beispiel SA, β -Aminobuttersäure oder BTH verstärkt Abwehrkomponenten zu bilden. Das würde bedeuten, dass sich die *mlo*-Pflanzen in einem „Vorwarnstadium“ befinden und entsprechende Abwehrmechanismen schneller ausbilden.

Entgegen unserer Erwartungen wurden keine qualitativen Unterschiede in den Genexpressionsmustern einzelner Gene der isogenen Linien Ingrid *Mlo* und Ingrid BC *mlo5* gefunden. Möglicherweise waren Spezifität und Sensitivität der Analyse zu gering, sodass entsprechende Gene entweder nicht ins Unigenet aufgenommen wurden oder durch eine zu geringe Transkriptabundanz auf dem Array nicht detektiert wurden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass keine qualitativen Unterschiede auf transkriptionellem Niveau existieren und die entscheidenden Weichenstellungen der *mlo*-vermittelten Resistenz durch posttranslationale Modifikationen von Proteinen ausgelöst werden, die in Signalkaskaden, Abwehr oder unbekannte Mechanismen verwickelt sind.

Gewebespezifische Expression: pathogenregulierte Gene wurden stärker in der Epidermis exprimiert

Der dritte Schwerpunkt der Untersuchung war die Lokalisierung der Genexpression. Vermutlich werden viele Gene des Grundstoffwechsels etc. aufgrund ihrer physiologischen Funktion in der Epidermis und im Mesophyll gleichermaßen exprimiert. Andererseits sollten aber auch Gene existieren, die aufgrund ihrer Funktion ausschließlich in einem der beiden Gewebe exprimiert werden. Dies sind zum Beispiel Gene, die mit Photosynthese, Schließzellapparat oder Kutikulabildung assoziiert sind. Entscheidende pathogeninduzierte Veränderungen bei der pflanzlichen Abwehr werden im untersuchten Pathosystem Gerste und *Blumeria* höchstwahrscheinlich in der Epidermis ausgebildet, da die Interaktion auf die Epidermis beschränkt bleibt.

Die Lokalisierungsmethode konnte mit Markergenen, deren Expressionsort im Blatt bekannt ist, verifiziert werden. So wurden pilzliche und HvGLP4-Transkripte erwartungsgemäß in der Epidermis angereichert. Photosyntheseassoziierte Transkripte wurden dagegen im Mesophyll lokalisiert (Abbildung 3.11). Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) Die Mehrzahl der Gene wurde sowohl in der Epidermis als auch im Mesophyll exprimiert (Abbildung 3.13).
- (2) Die Vermutung, dass sich pathogeninduzierte Veränderungen im Transkriptom des Blattes verstärkt im epidermalen Teil ausbilden, konnte bestätigt werden (Abbildung 3.13 und Kapitel 3.2.3.4). Im Gegensatz zu einer Zufallsauswahl von Genen hatte die Mehrzahl der pathogenregulierten Kandidatengene ihren Expressionsschwerpunkt in der Epidermis ($EM > 0$).
- (3) Insgesamt wurden 290 gemäss den festgelegten Kriterien epidermisspezifisch exprimierte Gene gefunden ($EM > 2$). 35 dieser Gene waren pathogenreguliert (Abbildung 4.3). Ferner wurden 164 mesophyllspezifische Gene identifiziert ($EM < -2$).
- (4) Es wurde gezeigt, dass Gene der Kategorien „Zellwand“, „Sekretion“ und „Reaktive Sauerstoffspezies“ hauptsächlich in der Epidermis exprimiert werden (Abbildung 3.13 B und 3.14). Möglicherweise reflektiert dies die Tatsache, dass bei der *mlo*-vermittelten Resistenz verstärkt Papillen gebildet werden, auf die die Resistenz vermutlich zurückzuführen ist.

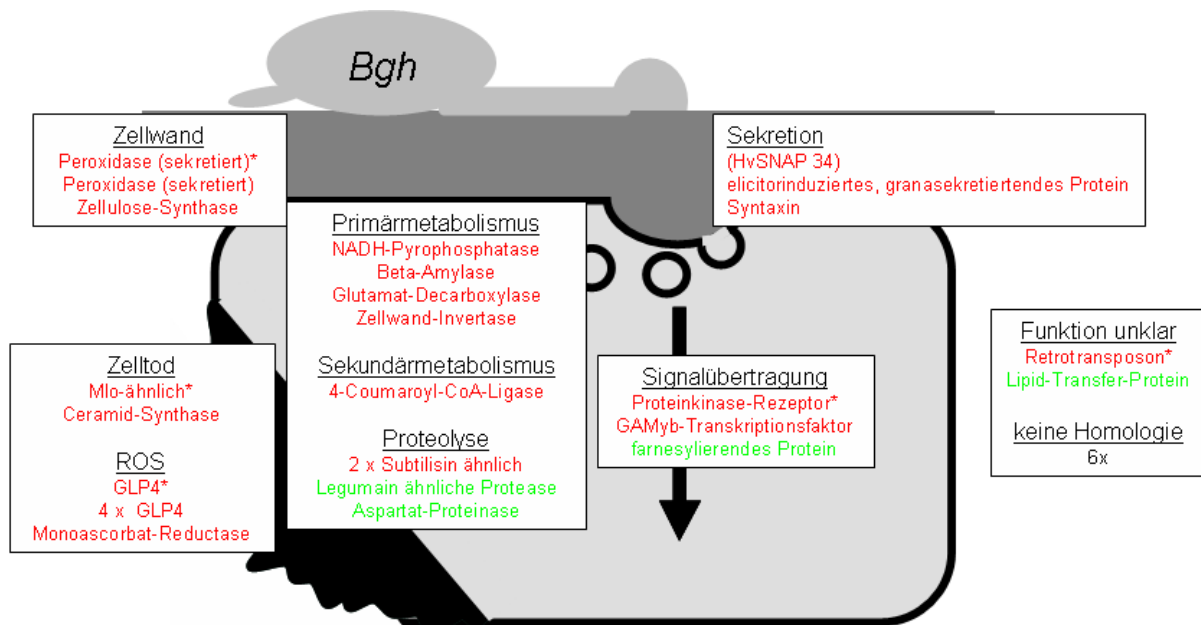


Abbildung 4.3: Epidermiszelle pathogenregulierten Genen, die als epidermisspezifisch exprimierte Gene eingestuft wurden. Induzierte Gene wurden rot und reprimierte Gene wurden grün dargestellt. Fünf der pathogenregulierten Gene waren epidermisspezifisch und gleichzeitig in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert (siehe „*“).

Reaktive Sauerstoffspezies, CWAs und die *mlo*-vermittelte Resistenz

mlo-Pflanzen lassen die Entwicklung des Pilzes bis zur Ausbildung des PGT und des AGT zu. Im Penetrationsstadium (12 hpi) kommt es zum Abbruch der weiteren Entwicklung. Eine vermutliche Ursache hierfür sind die verstärkt gebildeten CWAs in *mlo*-Pflanzen, an denen bei der papillären *mlo*-vermittelten Resistenz wahrscheinlich verstärkt Wasserstoffperoxid an den Penetrationsstellen gebildet wird. Nachgewiesen wurde dies durch DAB-Färbung (3,3-diaminobenzidine) (Thordal-Christensen *et al.* 1997). Die Synthese von Wasserstoffperoxid wird im Zusammenhang mit Zellwand-crosslinking diskutiert. Das Protein HvGLP4 scheint aufgrund seiner extrazellulären Superoxiddismutase-Aktivität in die Bildung von Wasserstoffperoxid involviert zu sein (Christensen *et al.* 2004). Mit der vorliegenden Analyse konnte bestätigt werden, dass die sehr stark pathogeninduzierten Gene, die für HvGLP4 kodieren, ausschließlich in der Epidermis exprimiert sind. Es wurden vier verschiedene HvGLP4-Gene gezeigt (Tabelle 3.0). Insgesamt sind ca. ein Drittel der epidermalen, pathogenregulierten Gene im Zusammenhang (Zellwand, Sekretion und ROS) mit CWA-Bildung zu diskutieren (Abbildung 4.3).

In der Interaktion des hemibiotrophen Pilzes *Colletotrichum higginsianum* mit *Arabidopsis* kommt es gleichermaßen in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion zur Bildung von Papillen. Die resistente Interaktion korreliert, wie bei der *mlo*-vermittelten Resistenz auch mit der Bildung von H₂O₂. Das GLP4-Gen wurde hier interessanterweise nicht als pathogeninduziert beschrieben, wohl aber eine Superoxiddismutase und ein GLP3b-Gen (homolog zu HvGLP4) (Narusaka *et al.* 2004).

Sekretion

Im Zusammenhang mit der Papillenbildung sind auch die Komponenten der Kategorie „Sekretion“ zu sehen. Bei dem wohl bedeutsamsten Gen dieser Arbeit handelt es sich um HvSNAP34, das für ein in Sekretion involviertes t-SNARE Protein kodiert. Mit dem RNAi-Konstrukt gegen HvSNAP34 konnte in den TIGS-Versuchen die *mlo*-vermittelte Resistenz durchbrochen werden. HvSNAP34 wird in Kapitel 4.4.1 näher diskutiert.

Sekundärmetabolismus und die mlo-vermittelte Resistenz

Mit der vorliegenden Analyse war es möglich die Expressionsmuster vieler Gene, die für Enzyme des Shikimat-, des Phenylpropanoid- und des Tryptophan-Weges kodieren, zu untersuchen (Abbildung 3.21 und 3.23). Enzyme aus diesen Stoffwechselwegen sind höchstwahrscheinlich Komponenten der Basalabwehr, die in zahlreichen pflanzlichen Antworten auf Pathogene bzw. Elizitoren involviert sind (Reymond *et al.* 2000; Cluzet *et al.* 2004; Dowd *et al.* 2004; Moy *et al.* 2004; Voelckel und Baldwin 2004). Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) Es wurde gezeigt, dass der Stoffwechselweg, der zu Tryptamin führt, pathogeninduziert ist (mit einer Präferenz für stärkere Aktivierung in *mlo*-resistenter Gerste). Möglicherweise führt dies zur Bildung des Indolalkaloides Gramin (Abbildung 3.23 und 3.22).
- (2) Der Biosyntheseweg von Zimtsäurederivaten scheint in beiden isogenen Linien nach Pathogenbefall stark induziert zu sein (Abbildung 3.21).
- (3) Gene, die für Enzyme kodieren, die zur Bildung von Flavonoiden bzw. ligninartigen Substanzen führen, sind ebenfalls induziert (Abbildung 3.21 und 3.23).
- (4) Innerhalb der untersuchten Stoffwechselwege wurden ausschließlich induzierte Gene gefunden, was darauf hindeutet, dass entsprechende Sekundärmetabolite angereichert werden.

Die verstärkte Bildung von Zimtsäurederivaten wird möglicherweise durch die Induktion von Genen begleitet, die für Enzyme kodieren, welche an der Bereitstellung von Vorstufen des TCA-Zyklus beteiligt sind. Aus den Intermediate-Pools werden ständig Moleküle für den Shikimatweg und die Bildung phenolischer Verbindungen abgezogen. Derartige Enzyme sind zum Beispiel die stressinduzierte NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase (Klon: HO01P15) und die Glutamat-Decarboxylase (Klone HO05N02 und HO07F11). Während die GAD über ihr Produkt GABA möglicherweise eine anaplerotische Funktion im TCA-Zyklus erfüllt, (siehe Kapitel 4.4.2) entsteht bei der durch die plastidenständige Malat-Dehydrogenase katalysierten Reaktion aus Malat CO_2 und Pyruvat. Pyruvat ist die Vorstufe von PEP, welches im TCA-Zyklus und bei der Synthese von Shikimat benötigt wird. Gleichzeitig entsteht bei dieser Reaktion NADPH, welches als Reduktionsäquivalent bei der Bildung von Phytoalexinen und Lignin bzw. ROS dienen könnte (Casati *et al.* 1999).

Die verstärkte Tryptaminsynthese steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Bildung des Indolalkaloides Gramin (N,N-dimethyl-3-aminomethylindol). Eine Tryptamin-N-Methyltransferase, die die notwendige Reaktion katalysiert, wurde in der HO-cDNA-Bank allerdings nicht gefunden. Matsuo *et al.* (2001) konnten aber zeigen, dass Gramingehalte ca. 12 Stunden nach Inokulation mit *Bgh* und Verwundung ansteigen und dass die Keimung von *Bgh*-Konidiosporen durch Gramin gehemmt wird. Gramin ist eine in Gerste konstitutiv vorhandene Substanz, die unter anderem eine resistenzvermittelnde Funktion gegenüber

Nematoden (Brandt *et al.* 1935) und Blattläusen (Zuniga *et al.* 1985) aufweist. Es wird vermutet, dass die steigenden Gramingehalte in Zusammenhang mit SAR stehen (Matsuo *et al.* 2001).

Mit pharmakologischen Untersuchungen, in denen Enzyminhibitoren gegen PAL und CAD eingesetzt wurden, wurde gezeigt, dass die Ablagerung von phenolischen Substanzen in den Papillen eine Barrierefunktion gegenüber der Penetration von Pathogenen hat (Zeyen *et al.* 1995). Ob die Lignin- bzw. Flavonoid-Biosynthese präferentiell in Ingrid BC *mlo5* hochreguliert ist, konnte anhand der Transkriptomdaten nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die verstärkte Bildung von Transkripten des Phenylpropanoidweges deutet aber darauf hin, dass ligninartige Substanzen bzw. Flavonoidderivate oder Hordatine verstärkt in *mlo*-resistenter Gerste gebildet werden. Von Röpenack *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die phenolische Substanz p-Cumaroylhydroxyagmatin, die eine Vorstufe der Hordatine darstellt, nach Pathogenbefall verstärkt in der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* gebildet wurde. Ob die phenolische Verbindung p-Cumaroylhydroxyagmatin, die *in vitro* Phytoalexinaktivität besitzt (von Röpenack *et al.* 2000), oder Gramin tatsächlich eine Rolle bei der *mlo*-vermittelten-Resistenz oder bei der Basalresistenz in prinzipiell anfälligen Pflanzen die das *Mlo*-Gen tragen, spielen, bleibt unklar. Möglicherweise sind sie nur Nebenprodukte einer allgemein stärkeren Abwehrreaktion.

Interessanterweise beschreiben Caldo *et al.* (2004) ganz ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung *Mla*-resistenter bzw. *mlo*-anfälliger Gerste. Koordiniert regulierte Gene, die für Enzyme kodieren, welche an der Bildung von Tryptophan (Chorismat-Synthase, Anthranilat-Synthase) Phenylalanin und Tyrosin (Chorismat-Synthase, Chorismat-Mutase), phytoalexinen Phenylpropanoiden (Agmatin-Cumaroyl-Transferase, N-hydroxycinnamoyl/benzoyl-Transferase, Anthranilate-N-benzoyltransferase) und Lignin (Cinnamoyl-CoA-Reduktase) beteiligt sind, wurden gezeigt. 16 hpi geht die Bildung dieser Transkripte in der kompatiblen Interaktion zurück. Caldo *et al.* (2004) deuten dies als Unterdrückung von Komponenten der Basalabwehr durch den erfolgreichen Pilz.

Photosynthese

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse deuten darauf hin, dass die Photosynthese in den Schließzellen als Antwort auf das Pathogen reprimiert wird (innerhalb des Kandidatengensets waren vier Gene, die in Zusammenhang mit Photosynthese stehen reprimiert, Tabelle 3.0). Dies bestätigt Berichte über andere Pflanze-Pathogen-Interaktionen. Nach Befall von *Nicotiana attenuata* mit saugenden Insekten (Voelckel und Baldwin 2004) bzw. nach Fusariumbefall (*Fusarium oxysporum*) von Baumwolle (Dowd *et al.* 2004) kommt es beispielsweise ebenfalls zur Repression von Photosynthesegenen. Allerdings wurde hier nicht nach Geweben wie Epidermis und Mesophyll differenziert. Möglicherweise werden Energieressourcen nicht mehr für die Photosynthese verwendet sondern vielmehr zur Transkription und Translation von Abwehrkomponenten eingesetzt.

Transport

Von Interesse sind außerdem die vier pathogeninduzierten ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporter*), von denen drei zur Gruppe der PDR-ähnlichen (*pleiotropic drug resistance*) (Klone HO14E18; HO40A12; HO01L03) und einer (Klon HO03A06) zur Gruppe der MRP-ähnlichen Transporter (*multidrug resistance related protein*) gehören (Tabelle 3.0).

Der MRP-ähnliche Transporter (Klon HO3A06) war stärker in der isogenen Linie Ingrid BC *Mlo* exprimiert. ABC-Transporter sind ATP-getriebene Efflux-Pumpen, die in Detoxifikations- und Wachstumsprozesse verwickelt sind. Im Allgemeinen ist wenig über ihre Funktion und Substratspezifität bekannt (Martinoia *et al.* 2002). In phytopathogenen Pilzen allerdings wurden PDR-ähnliche ABC-Transporter beschrieben, die Resistenz gegenüber Phytoalexinen (Schoonbeek *et al.* 2001) und Fungiziden vermitteln (Deising *et al.* 2002). Möglicherweise funktionieren die hier gezeigten pflanzlichen ABC-Transporter in ähnlicher Weise, indem sie entweder an der Kompartimentierung der Zelle (Speicherung von Sekundärmetaboliten, wie zum Beispiel Phytoalexinen) oder aber am Transport von antifungalen Substanzen zu den Penetrationsorten beteiligt sind. Für AtPCR12 wird vermutet, dass dieser am Transport des Diterpenoids Sclareol beteiligt ist (Campbell *et al.* 2003). Die gezeigten Zuckertransporter spielen möglicherweise eine Rolle beim aktiven Transport von Zuckern durch die extrahaustoriale Membran. Verschiedene teilweise widersprüchliche Experimente zeigen, dass Glucose, Fructose und Sucrose von der Pflanze in den Pilz transportiert werden (Green *et al.* 2002). Möglicherweise haben die ABC- und Zucker-Transporter ein Potential für Resistenzzüchtung, da diese wahrscheinlich nicht an komplexen Reaktionen beteiligt, aber sehr substratspezifisch sind.

Proteolysegene

Proteinabbau hilft bei der Anpassung der Zelle an veränderte Umweltbedingungen, indem AS wiedergewonnen werden. Auffällig ist die große Anzahl von pathogenregulierten Genen (insgesamt sieben), die im Zusammenhang mit Proteolyse stehen. Vier der Gene waren epidermisspezifisch exprimiert, zwei reprimiert (Legumain-ähnliche Protease: Klon HO12H22; Aspartat-Proteinase: Klon HO13E23) und zwei weitere induziert (Serin-Proteasen: Klone HO10M21, HO14K19). Sechs der sieben Gene waren gemäß Definition genotypspezifisch exprimiert ($-0,4 < DI < 0,4$). Dies reflektierte möglicherweise die unterschiedlichen Umbauprozesse innerhalb von anfälligen bzw. resistenten epidermalen Zellen.

Für die *downstream*-Komponente der *Mla*-vermittelten Resistenz HvRAR1 konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese mit HvSGT1 interagiert. HvSGT1 spielt eine Rolle im SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der möglicherweise in den Proteinabbau verwickelt ist (Azevedo *et al.* 2002).

Signalweitergabe

Eine der größten Gruppen der identifizierten pathogenregulierten Gene (Abbildung 3.3) bildet die Kategorie „Signalweitergabe“. Mit einem Anteil von 18% liegt diese Kategorie weit über der geschätzten Anzahl von 6,6% für alle ESTs (Zhang *et al.*, 2004). Auffällig ist, dass in der inkompatiblen Interaktion zu 6 hpi wesentlich mehr Gene induziert waren als in der kompatiblen Interaktion.

Bei dem größten Teil der Gene handelt es sich um Proteinkinasen und rezeptorähnliche Proteine, die in MAPK-Signalwege der Basalabwehr und der spezifischen Abwehr involviert sein dürften. Dies bestätigt frühere Berichte über pathogenregulierte Signalkomponenten (Haltermann *et al.*, 2003; Piffanelli *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 1998). Möglicherweise handelt es sich bei den rezeptorähnlichen Proteinen um ein Set verschiedener PAMP-Rezeptoren der Gerste (Tabelle 3.0).

Signalkomponenten, die in Zusammenhang mit der Bildung von SA oder Ethylen stehen, wurden in der vorliegenden Analyse nicht gefunden, wohl aber zwei Komponenten die in Zusammenhang mit JA diskutiert werden. Dies sind zwei Gene der OPD-Reduktase.

Außerdem wurde ein Gen gefunden, das für einen GAMyb-Transkriptionsfaktor kodiert, von dem gezeigt werden konnte, dass er bei der Gibberellin-Signaltransduktion in Gerste eine entscheidende Rolle spielt (Gubler *et al.* 2002).

Eine weitere hochinteressante Komponente im Zusammenhang „Signalweitergabe“ ist die Glutamat-Decarboxylase, die die Bildung von GABA katalysiert (siehe Kapitel 4.4.2)

Phospholipide

Die Diacylglycerolkinase (DAK) (Klon HO12G01) katalysiert die Bildung von Phosphatidylsäure (PA) aus Diacylglycerol (DAG). PA ist ein kleines Phospholipid, welches eine Schlüsselsubstanz bei der Biosynthese von Phosphoglyceriden darstellt. Daneben ist PA aber auch ein Lipid-*Second-Messenger*, der in Pflanzen bereits nach Minuten als Antwort auf Stress (Verwundung, osmotischer Stress, Elizitoren, Ethylen, Abscisinsäure) akkumuliert und dem in letzter Zeit viel Beachtung geschenkt wurde (Meijer und Munnik 2003). Kürzlich konnten zahlreiche Zielmoleküle der PA identifiziert werden. Dies sind ein 14-3-3-Protein, HSP90, PEP-Carboxylase (PEPC), SNF1 und Tubulin (Testerink *et al.* 2004). Aufgrund der stärkeren Genexpression (bereits 6 hpi) der pathogenregulierten Diacylglycerolkinase (DAK) in *mlo*-resistenter Gerste, wurden Gene, die in Zusammenhang mit dem Phospholipidstoffwechsel stehen, näher betrachtet (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5).

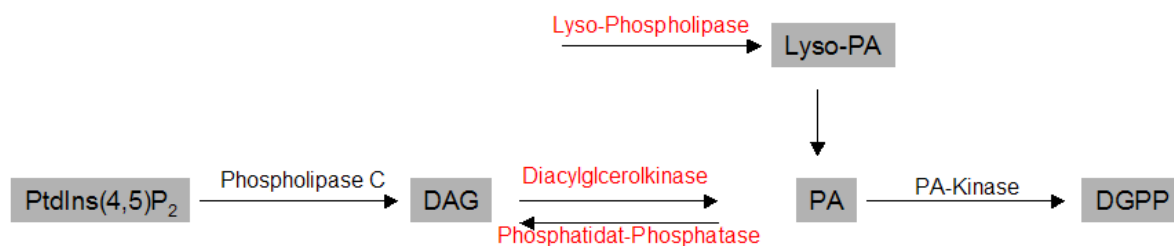


Abbildung. 4.4: Bildung der Phosphatidylsäure. Rot wurden pathogeninduzierte Gene dargestellt. (DAG: Diacyl-glycerol; PA: Phosphatidylsäure, PtdIns(4,5)P₂: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, DGPP: Diacylglycerol-pyrophosphat)

Zwei weitere Gene die im Zusammenhang mit PA stehen, waren pathogeninduziert. Diese kodieren für eine Phosphatidyl-Phosphatase (Klon HO06M04) und eine Lysophospholipase (Klon HO02A01). Während die Lysophospholipase zur Bildung von Lyso-PA führt, welches durch Anlagerung einer weiteren Fettsäure möglicherweise ebenfalls in PA überführt wird, katalysiert die Phosphatidat-Phosphatase die inverse Reaktion der Diacylglycerolkinase. Möglicherweise werden damit PA-Gehalte stringent kontrolliert. Aufgrund dieser Ergebnisse ist geplant, PA in der Epidermis und im Mesophyll mehлтаubefallener Gerstenkeimlinge (Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo*) zu messen und in Resistenzinduktionsexperimenten analog zur Untersuchung von GABA zu testen. Weitere Proteine, die mit der Bildung von PA assoziiert sind (Datenbanksuche: Phospholipase C und Phospholipase D), waren auf dem Array vorhanden, aber nicht pathogenreguliert.

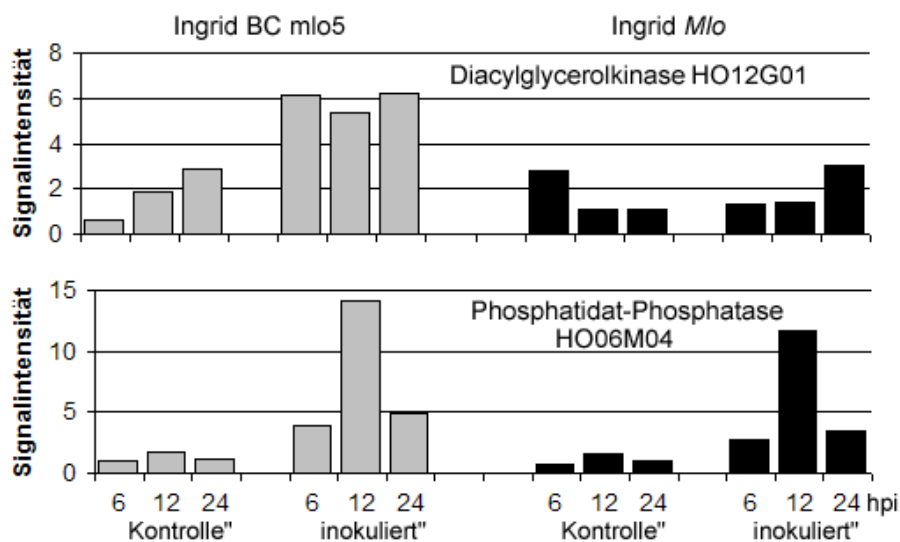


Abbildung 4.5: Signalintensitäten der pathogeninduzierten Diacylglycerolkinase und der Phosphatidat-Phosphatase.

4.3 Mechanismen der *mlo*- bzw. *Mla*-vermittelten Resistenz

Kürzlich wurde eine weitere Transkriptomanalyse im Pathosystem Gerste und *Bgh* bekannt, deren Ziel es unter anderem war, *downstream*-Komponenten der rassenspezifischen, HR-assoziierten, *Mla*-vermittelten Resistenz zu finden (Caldo *et al.* 2004). Während die hier vorliegende Analyse mit einem cDNA-basierten Makroarray (3.136 Unigene der Epidermis) durchgeführt wurde, verwendeten Caldo *et al.* den Barley 1 Chip von Affymetrix. Gene der Basalabwehr wurden in dieser Analyse nicht beachtet. Die Analyse bietet dennoch eine gute Vergleichsbasis für die hier vorliegende Analyse papillenassoziierter *mlo*-vermittelter Breitbandresistenz der Gerste.

Caldo *et al.* verglichen je zwei Paare von kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen (zwei isogene Linien und eine Pilzrasse bzw. eine isogene Linie und zwei Pilzrassen). Nach einer stringenten statistischen Analyse wurden 22 in beiden Vergleichspaaren hoch reproduzierbare induzierte Markergene der *Mla*-vermittelten Resistenz gezeigt. Bis 16 hpi stiegen die Transkriptabundanzen der Gene an. Ab 16 hpi kam es jeweils in der kompatiblen Interaktion zu einem Abfall der Transkriptabundanzen, während die Gene in der inkompatiblen Interaktion kontinuierlich weiter auf hohem Niveau exprimiert wurden (Abbildung 4.6).

Abgeleitet davon wurde ein Modell der *Mla*-vermittelten Resistenz vorgeschlagen, das nach Inokulation mit *Bgh* zunächst die Induktion von Abwehrgentranskripten durch PAMPS herausstellt. Aufgrund des koordinierten Abfallens der mRNA-Abundanzen der differentiell exprimierten Gene, ab dem Zeitpunkt zudem die haustoriale Membran in Kontakt mit der Plasmamembran tritt, wurde von Caldo *et al.* folgender Resistenzmechanismus vorgeschlagen (Abbildung 4.6 und 4.7): Mit dem Eindringen des Pilzes werden pilzliche Moleküle (Suppressoren) freigesetzt, die die Abwehr der Pflanze unterdrücken (Lyngkjaer und Carver 1999). Infolge der Unterdrückung der Pathogenabwehr kommt es in der kompatiblen Interaktion zur Ausbildung aller Lebensstadien des Pilzes. Laut des vorgeschlagenen Modells geschieht diese Unterdrückung durch den Verlust der spezifischen Erkennung des Pathogens über den *Mla/AvrMla*-Komplex (siehe auch Gen-für-Gen-Hypothese und GUARD-Hypothese

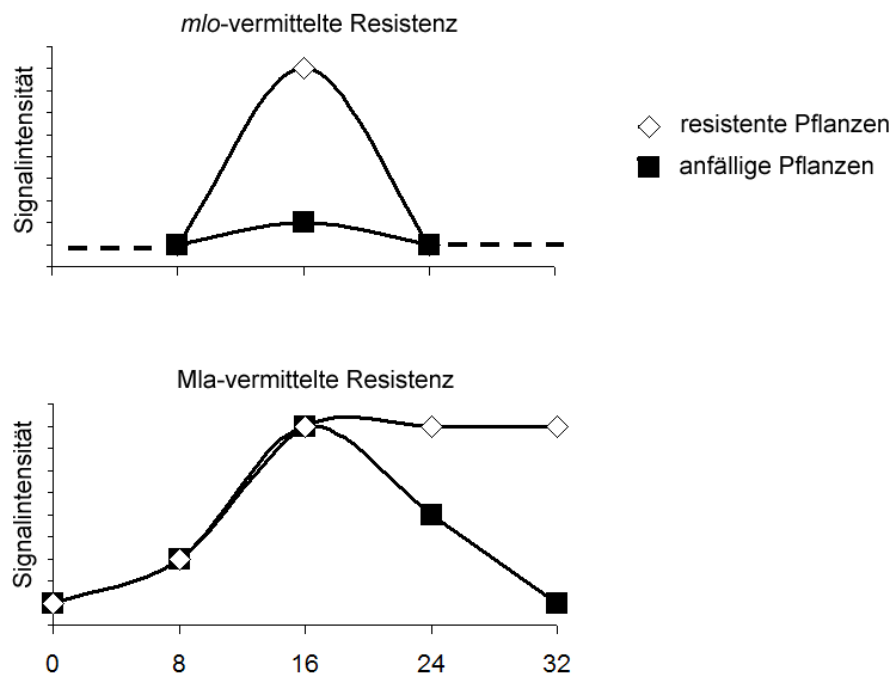


Abbildung 4.6: Markergene der *mlo*-vermittelten Resistenz im Vergleich zur *Mla*-vermittelten Resistenz

Kapitel 1.1.3). *m1a/AvrM1a* bzw. *M1a/Avrmla* kann demzufolge pilzliche Suppressoren nicht unterdrücken. Im Falle einer inkompatiblen Interaktion wird ein direkter oder indirekter funktioneller *AvrM1a/M1a*-Erkennungskomplex ausgebildet, der die Wirkung pilzlicher Suppressoren aufhebt. Hierbei kommt es zu einer aktiven Unterdrückung der pilzlichen Suppressoren (Derepression suppressorunterdrückter Gene), infolgedessen sich die pflanzliche Abwehr ausbildet. Dies würde mit dem späten Einsetzen von Abwehr (HR) korrelieren.

Für die *mlo*-vermittelte Resistenz wird dagegen aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse ein anderer Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 4.6 und 4.7). Dieser besagt, dass MLO als negativer Regulator der pflanzlichen Abwehr funktioniert und ein „Überschießen von Abwehr“ verhindert. Bei Wegfall von MLO scheinen die Pflanzen ständig vorgewarnt (*Priming*-Effekt) und können so schneller bzw. stärker auf das Pathogen reagieren. Diese Vermutung basiert auf den erhöhten Transkriptabundanz pathogenregulierter Gene in nicht-inokulierten Pflanzen. In dieses Bild passt auch die nichtparasitäre Verbräunung *mlo*-resistenter Gerste im Feld und die spontane Entstehung von Papillen auf den Blättern dieser Pflanzen (Wolter *et al.* 1993).

In der hier gezeigten Transkriptomanalyse mit *mlo*-resistenter Gerste wurden deutliche Unterschiede zwischen den isogenen Linien, bereits zu 6 hpi gezeigt, zu einem Zeitpunkt währenddessen sich der Pilz noch im Prä-Penetrationsstadium befindet (Abbildung 3.9, zum Beispiel Diacylglycerolkinase, Uclacyanin oder HvSNAP34). Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass die massiv stärkere Induktion von Abwehrgentranskripten in den *mlo*-resistenten Pflanzen durch den Wegfall pilzlicher Suppressoren unterdrückt wird. Hinzu kommt, dass die Entwicklung des Pilzes auf *mlo*-resistenten Pflanzen zu einem früheren Zeitpunkt aufhört als die vermutete Produktion von Suppressoren.

Insgesamt konnten in der hier vorliegenden Analyse 25 *downstream*-Komponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz vorgeschlagen werden (Abbildung 3.9, Abbildung 3.22). Die stärksten Unterschiede zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion waren zu 12 hpi zu sehen, wobei zu beachten ist, dass nur die Zeitpunkte 6, 12 und 24 hpi untersucht wurden (Abbildung 4.6). Allerdings gingen die Transkriptabundanzen im Gegensatz zur *Mla*-vermittelten Resistenz bereits 12 hpi wieder zurück.

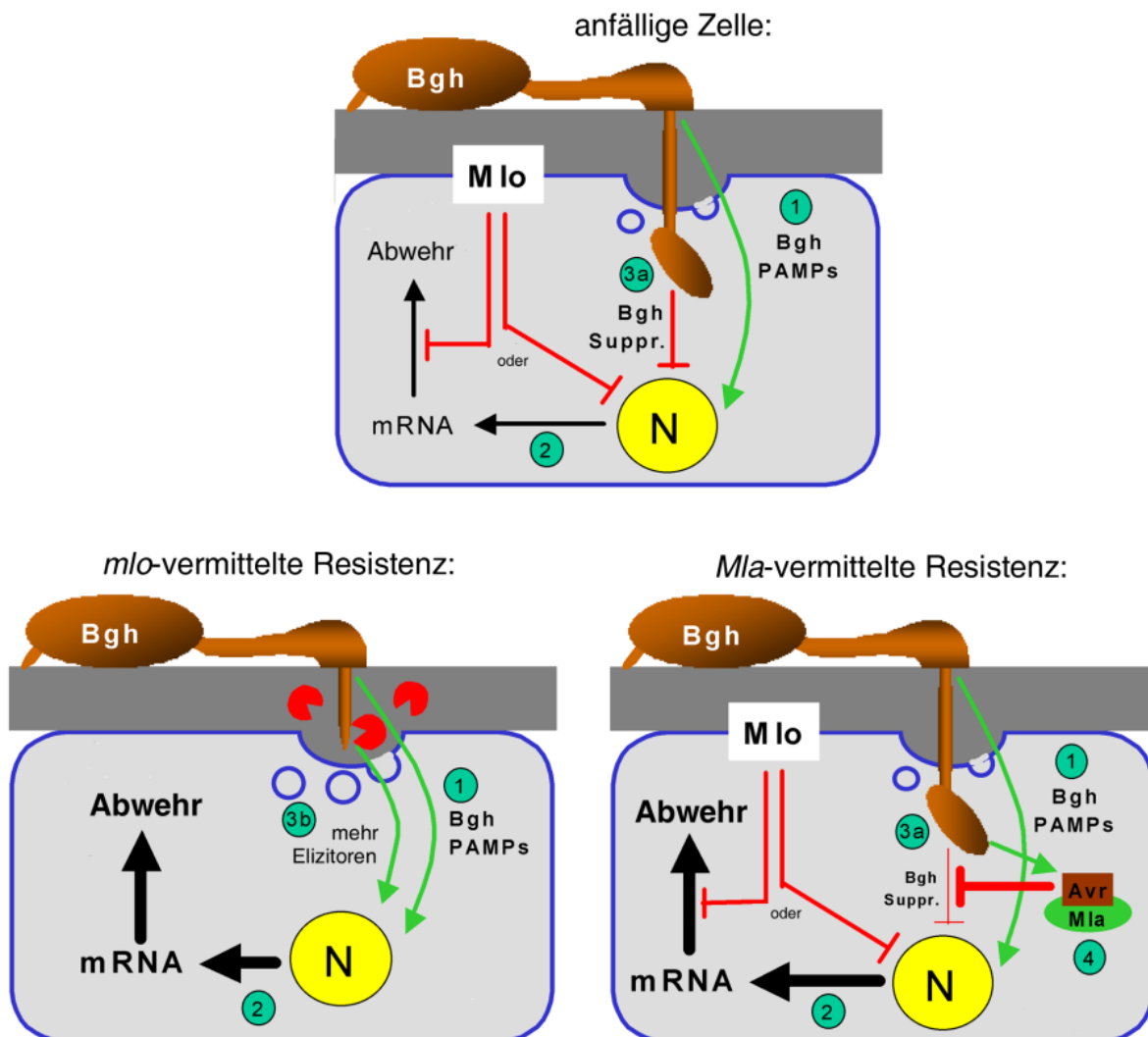


Abbildung 4.7: Modell der *mlo*-vermittelten und der *Mla*-vermittelten Resistenz

Sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion wurde ein sehr ähnliches Subset von Genen reguliert. Daher wird in Übereinstimmung mit Caldo *et al.* vermutet, dass zunächst zahlreiche Gene durch *Blumeria*-spezifische PAMPS induziert werden. Für die hier gezeigte ungedämpfte Abwehrreaktion in *mlo*-resistenten Pflanzen werden zwei mögliche Erklärungen vorgeschlagen (Abbildung 4.7).

Eine Möglichkeit ist, dass MLO die Abwehrreaktion der Pflanze durch Interaktion mit einer Komponente der Signalkaskade inhibiert. Die Signalkaskade erstreckt sich vom Elizitorsignal bis hin zur Induktion von Abwehrgentranskripten. Dies würde bei fehlender MLO-Aktivität zu dem massiven Anstieg von pathogenregulierten Transkripten in *mlo*-Pflanzen führen. Eine

zweite Möglichkeit, die den Mechanismus der negativen Regulation erklären könnte, ist die direkte Interaktion von MLO mit einer Abwehr-Komponente. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Mechanismus, der zur verminderten Abgabe von hydrolytischen Enzymen in den epidermalen Apoplasten führt. In Pflanzen ohne MLO-Aktivität führt dies zur verstärkten Freisetzung von Elizitoren an pilzlichen oder pflanzlichen Zellwänden. Dies wiederum führt zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus mit der induzierten Abwehr.

4.4 Weiterführende funktionelle Analysen

Transkriptomanalysen geben nur in begrenztem Umfang Informationen zur Funktion der Gene. Perspektivisch sind weitergehende Untersuchungen notwendig, welche die Transkriptomdaten mit Daten aus revers-genetischen Ansätzen, Genom-, und Metabolomdaten bzw. Ergebnissen aus Untersuchungen einzelner Stoffwechselwege verknüpfen und korrelieren. Erste Schritte in dieser Richtung wurden mit dem revers-genetischen TIGS-*Screening*, und den Untersuchungen zur Funktion von GABA gegangen.

4.4.1 TIGS-*Screening* für 128 pathogeninduzierte Kandidatengene

Es wurde versucht, alle 171 gefundenen pathogeninduzierten Gene durch TIGS (Abbildung 3.20 und Abbildung 2.5) systematisch in ihrer Expression zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu basieren bisher durchgeführte Untersuchungen auf rationellen Überlegungen, bei denen beispielsweise alle Gene, die mit Sekretion in Verbindung stehen, ausgeschaltet, oder bei denen bekannte Abwehrgene überexprimiert wurden (Panstruga 2004). Ziel des hier gewählten Ansatzes war es, das Transkriptom von Ingrid BC *mlo5* systematisch so zu beeinflussen, dass die Resistenz durchbrochen und es zur Ausbildung von Haustorien in den manipulierten, normalerweise resistenten Zellen kommt. Neben den Kandidatengenen, die in Ingrid BC *mlo5* stärker exprimiert waren als in Ingrid *Mlo*, wurden auch Gene getestet, die in beiden Genotypen gleiche Expressionsmuster zeigten und die möglicherweise mit Basalresistenz assoziiert sind.

Weder die 128 RNAi-Konstrukte, die in zufällig zusammengesetzten *Pools* zu je vier Genen getestet wurden, noch die funktionellen *Pools* mit Genen verschiedener Kategorien zeigten reproduzierbare Effekte. In keinem der Ansätze konnte die *mlo*-vermittelte Resistenz aufgehoben werden. Im folgenden wurde auf Beschluss mit einzelnen Konstrukten umgestellt, sodass nunmehr alle 128 Kandidatengene einzeln getestet wurden. Es blieb allerdings bei der Entdeckung eines einzigen Genes (HvSNAP34, Klon HO12F09).

Aufgrund der geringen Zahl von funktionell wirksamen Genen im TIGS-*Screening* kann davon ausgegangen werden, dass für die *mlo*-vermittelte Resistenz nur wenige Komponenten essentiell sind. Eine weitere Erklärung wäre, dass essentielle Komponenten nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert oder äußerst niederabundant exprimiert werden und nicht detektiert wurden.

HvSNAP34

HvSNAP34 kodiert ein membranständiges Protein der t-SNARE-Gruppe. t-SNARE-Proteine sind am Vesikeltransport beteiligt, vermitteln Membranfusionen und stellen Energie für Fusionen bereit. Möglicherweise handelt es sich bei HvSNAP34 um ein Protein, dass am Vesikeltransport hin zu den resistenzvermittelnden Papillen beteiligt ist. SNAPs binden an v-SNAREs und t-SNAREs (SNAREs sind SNAP Rezeptoren, v=Vesikel, t=Target) und sorgen

dafür, dass die richtigen Proteine miteinander in Kontakt treten. Das heißt, dass die Vesikel ihre Andockstelle in der Zielmembran finden (Pratelli *et al.* 2004).

Mit dem funktionellen Nachweis im TIGS-*Screening*-System, dass HvSNAP34 für die *mlo*-vermittelte Resistenz notwendig ist, wurden Ergebnisse von Collins *et al.* (2003) in einem unabhängigen methodischen Ansatz bestätigt. Collins *et al.* führten ebenfalls RNAi-Experimente in Ingrid *mlo5* durch, um gezielt Komponenten zu untersuchen, die mit der Funktion von HvROR2, einem Syntaxin, möglicherweise logisch assoziiert sind. Kandidaten waren SNARE und SNARE-assoziierte Proteine wie zum Beispiel HvSNAP34, α/γ -SNAP, SEC1 und NSF. Diese Gene stehen mit Exozytose-Prozessen in Zusammenhang. Im Gegensatz dazu wurden im hier vorliegenden Ansatz alle pathogeninduzierten Gene der Interaktion Gerste und *Bgh* getestet (systematisches *Screening*).

Ausgangspunkt der Untersuchung von Collins war die Entdeckung der *Arabidopsis*-Penetrationsmutante *pen1*. Hier wurde die Nichtwirtsresistenz gegen *Bgh* durchbrochen. *AtPen1* wurde durch *map-based-cloning* isoliert und als Syntaxin-Homolog identifiziert. Interessanterweise handelte es sich bei den Proteinen HvPEN1 und HvROR2 um funktionell homologe Syntaxine mit 62% Sequenzhomologie (Collins *et al.* 2003). *HvRor2* ist eine seit langem bekannte *downstream*-Komponente der *mlo*-vermittelten Resistenz, die durch EMS-Mutagenisierung von *mlo*-resistenten Gerstenpflanzen gefunden wurde (Freialdenhoven *et al.* 1996). *HvRor2* wurde durch *map-based-cloning* identifiziert (Collins *et al.* 2003). Mit *Yeast-Two-Hybrid*-Protein-Assays konnte gezeigt werden, dass zytosolische Bereiche von HvROR2 und das vollständige HvSNAP34 Protein interagieren (Collins *et al.* 2003).

Auffallend ist, dass HvSNAP34 nur in der Epidermis pathogeninduziert war. Mit „Gesamtblatt“-Sonden konnte dagegen keine Induktion gefunden werden. Auch der hohe EM-Wert deutet darauf hin, dass das Protein ausschließlich in der Epidermis reguliert wird. Möglicherweise wurde also die Geninduktion in der Epidermis, bei den Untersuchungen mit Gesamtblattsonden, von ubiquitär sehr hoch exprimierten SNAP-Transkripten überdeckt. Interessanterweise waren zwei weitere pathogeninduzierte Proteine, die auch mit Vesikeltransport in Zusammenhang stehen, in der Epidermis exprimiert. Eines davon ist ein sogenanntes granulasekretierendes, elizitorinduziertes Protein (Klon HO02F02). Bei dem zweiten Protein handelt es sich wie bei HvROR2 um ein Syntaxin (Klon HO12N23). Homologie zu HvROR2 besteht allerdings nicht.

Nachdem das TIGS-*Screening* mit den pathogeninduzierten Kandidatengen in *mlo*-resistenter Gerste (Ingrid BC *mlo5*) beinahe abgeschlossen ist, sollen die RNAi-Konstrukte in anfälliger Gerste (Sorte: Golden Promise) getestet werden, um hier möglicherweise Supersuszeptibilität bzw. Resistenz zu erzeugen. Weiterhin werden alle Konstrukte in dem Nichtwirtssystem von Gerste und *Bgt* getestet, da es sich bei der Nichtwirtsresistenz gegen *Bgt* ähnlich wie bei *mlo* um eine papilläre Resistenz handelt. Beide Formen der Mehltau-Resistenz in Gerste werden auf die Bildung von Papillen zurückgeführt (Collins *et al.* 2003). Im Nichtwirtssystem wurden bisher drei Kandidaten, mit denen die Resistenz gegen *Bgt* durchbrochen werden konnte, gefunden. Bei einem der Gene handelt es sich um das bekannte HvSNAP34. Bei den beiden anderen um Proteine, die aus patentrechtlichen Gründen nicht genannt werden können. (Douchkov, persönliche Mitteilung).

4.4.2 Die Rolle von γ -Aminobuttersäure (GABA) in der *mlo*-vermittelten Resistenz

Im Rahmen der Transkriptomanalyse mehлтаubfallener Gerstenepidermis wurde eine Glutamat-Decarboxylase (HvGAD) identifiziert, die epidermal und im resistenten Genotyp stärker exprimiert ist. Die HvGAD ist das Schlüsselenzym bei der Synthese des aus Tieren bekannten, im ZNS vorherrschenden, inhibierenden Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA). GABA, GABA-Rezeptoren sowie GADs wurden aber auch in Pflanzen gefunden und mit allgemeinen Stressreaktionen in Verbindung gebracht. GABA scheint Stresssignale zu verstärken, die Ethylenbiosynthese zu induzieren und eine anaplerotische Funktion beim Stressmetabolismus einzunehmen (Bouche und Fromm 2004). Der GABA-Stoffwechsel, der als GABA-*Shunt* bezeichnet wird, ist in Pflanzen durch drei Enzyme katalysiert: 1) GAD (cytosolisch, kalzium- und calmodulinabhängig), 2) GABA-Transaminase (GABA-T, mitochondrial) und 3) Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH, mitochondrial). Dabei existieren zwei Verknüpfungspunkte mit dem TCA-Zyklus. Dies ist einerseits die Bildung von Glutamat aus α -Ketoglutarat und andererseits die Bildung und Einspeisung von Succinat in den TCA-Zyklus über Glutamat, GABA und Succinat-Semialdehyd (SSA) (Shelp *et al.*, 1999) (Abbildung 4.6).

Um die Rolle von GABA in der *mlo*-vermittelten Resistenz näher zu untersuchen, wurden die Aminosäurekonzentrationen separat in der Epidermis und im Mesophyll in mehлтаubattackierten und mehлтаubfallenen Pflanzen von Ingrid BC *mlo5* und Ingrid *Mlo* gemessen. Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- (1) GABA war im Gegensatz zu allen proteinogenen Aminosäuren, die im Mesophyll höher konzentriert waren, in beiden untersuchten Geweben in ähnlicher Konzentration vorhanden.
- (2) Eine einfache Korrelation zwischen den GABA-Konzentrationen und den pathogeninduzierten HvGAD-Genen in *mlo*-resistenten Pflanzen existiert nicht. Trotz der hohen mRNA-Abundanzen von HvGAD in der Epidermis von *mlo*-resistenten Pflanzen, wurden weder in Epidermis noch im Mesophyll erhöhte GABA-Konzentrationen nach Pathogenbefall festgestellt.
- (3) Pflanzen der isogenen Linie Ingrid *Mlo*, die mit GABA behandelt wurden, zeigten keinerlei Veränderung in der Resistenz gegenüber *Bgh*. Abwehrgentranskripte wurden dabei nicht induziert.

GABA scheint vermutlich keine Rolle in der stressinduzierten Signaltransduktion in Gerste zu spielen. Allerdings konnten Kinnersley und Turano (2000) nach Behandlung von Weizen mit „AuxiGro“, einer Mischung aus 30% GABA und 30% Glutamat (*L-glutamic-acid*), eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Mehлтаub verbunden mit einer Akkumulation von Mangan nachweisen.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Transkriptabundanzen von GAD während des Pathogenbefalls geben Shelp *et al.* (1999), die eine anaplerotische Funktion von GABA vorschlagen. Dabei wird verstärkt gebildete GABA möglicherweise sofort über Succinat in den TCA-Zyklus eingespeist. Warum sollte dies aber passieren? Eine primäre Funktion des TCA-Zyklus in Pflanzen ist die Bereitstellung von Vorstufen für die Synthese zahlreicher proteinogener AS, die bei der Biosynthese von stressinduzierten Proteinen notwendig sind. Kommt es zum verstärkten Abzug von Intermediaten des TCA-Zyklus, müssen diese wieder aufgefüllt werden, da konstante Intermediat-Konzentrationen für das Funktionieren des TCA-Zyklus notwendig sind (Matthews und Van Holde 1996). Diese Auffüllreaktion des TCA-Zyklus erfolgt in Pflanzen unter anderem durch Oxalacetat, welches durch die PEP-Carboxylase aus Phosphoenolpyruvat (PEP) synthetisiert wird. Ein Faktor, der den TCA-Zyklus möglicherweise zum Stillstand bringt, ist der Abzug von PEP durch einen gesteigerten

Bedarf im Shikimat-Weg, der zu Phenylpropanoiden führt. Wie in der Transkriptomanalyse gezeigt werden konnte, scheint der Phenylpropanoidstoffwechsel nach Pathogenbefall in der Gerste deutlich gesteigert zu sein und in der Bildung von Phytoalexinen (von Röpneck *et al.* 1998), Flavonoidderivaten als auch Ligninverbindungen zu münden. Daher erscheint eine Rolle von GABA bei der anaplerotischen Bildung von TCA-Intermediaten in der Epidermis am wahrscheinlichsten.

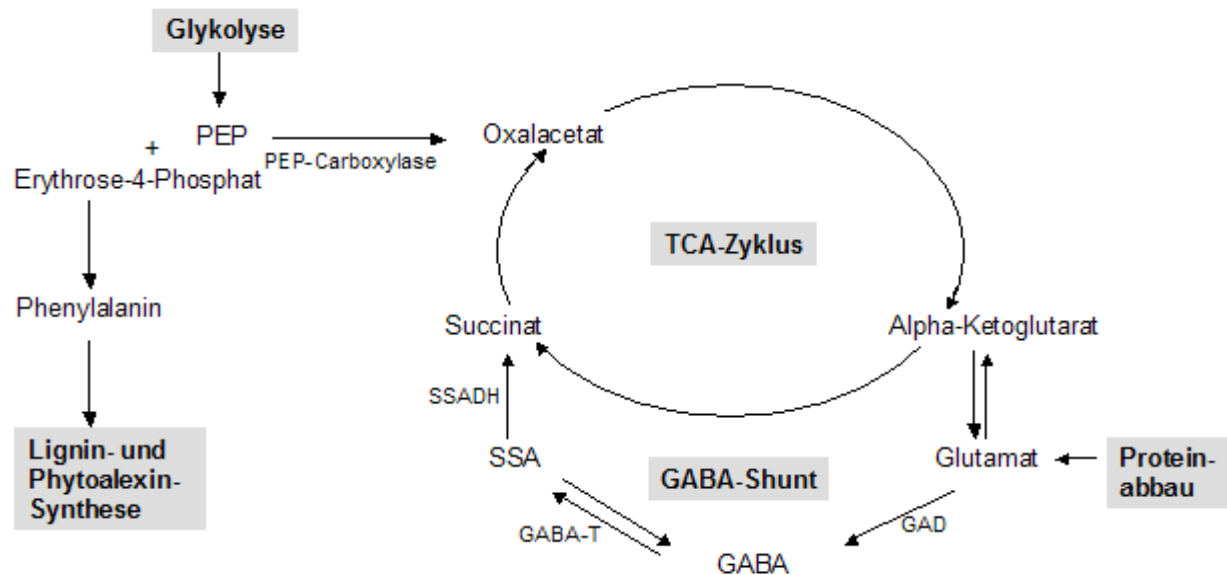


Abbildung 4.6: Die anaplerotische Funktion von GABA. GABA-T: GABA-Transaminase, SSADH: Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase, SSA: Succinat-Semialdehyd, GABA: γ -Amino-Buttersäure, GAD: Glutamat-Decarboxylase, PEP: Phosphoenolpyruvat (nach Bouche und Fromm, 2004).

Bouche *et al.* (2003) konnten in *Arabidopsis* durch Unterbrechen des GABA-Shunts eine alternative Funktion von GABA zeigen, indem das Enzym SSADH ausgeschaltet wurde (GABA sollte hierbei theoretisch angereichert werden, gemessen wurden die GABA-Konzentrationen aber nicht). Dies führte bei Licht- und Hitzestress zu einer verstärkten Bildung von H_2O_2 und spricht für eine Rolle von GABA beim *Scavenging* von ROS bzw. bei der Regulation des Zelltods.

Im Zusammenhang mit der Funktion von GABA und HvGAD sind weitere Untersuchungen notwendig, wobei die transienten Überexpressions- und RNAi-Versuche weiteren Aufschluss über die Funktion von GABA bzw. GAD bei der Resistenz gegenüber Mehltau geben sollen. Im durchgeführten TIGS-Screening in *mlo*-resistenter Gerste (Ingrid BC *mlo5*) wurden bisher keine RNAi-Konstrukte gegen HvGAD getestet.

Interessant dürfte weiterhin sein, ob die HvGAD wie zahlreiche andere GADs eine CaM-Bindungsstelle besitzt (Baum *et al.* 1996) und ihre Aktivität durch Ca^{2+} -CaM-Komplexe reguliert wird (Bouche und Fromm 2004). In Reis wurden kürzlich zwei verschiedene OsGAD-Isoformen beschrieben, die sich unter anderem in der Anwesenheit einer CaM-Bindungsstelle unterscheiden (Akama *et al.* 2001). Hierzu sind Protein-Bindungsstudien erforderlich.

4.4.3. Die Messung aller proteinogenen Aminosäuren

Im Zusammenhang mit der Messung der Aminosäure GABA wurden zusätzlich die Gehalte aller proteinogenen Aminosäuren gemessen, die als interne Standards verwendet wurden. Proteinogene AS, die nach Pathogenbefall verstärkt oder vermindert gebildet werden, wurden nicht gefunden. Während alle proteinogenen AS sich vorwiegend im Mesophyllgewebe (ca. Faktor 2-10) anreicherten, war GABA im Mesophyll und in der Epidermis in etwa gleicher Konzentration vorhanden. Interessante, aber im zweiten Experiment, nicht reproduzierbare Ergebnisse wurden für die AS Methionin, Leucin und Isoleucin gefunden. Weitere Experimente wären notwendig, um präzisere Aussagen zu treffen.

4.5 Ausblick

Momentan wird das Transkriptom *mlo*-resistenter Gerstenepidermis mit weiteren Analysemethoden (iGentifier und Barley-Chip von Affymetrix) untersucht. Dies stellt, zusammen mit rund 20.000 ESTs der HO cDNA-Bank und der vorliegenden Transkriptomanalyse, eine wichtige Ressource für die detaillierte Untersuchung einzelner Stoffwechselwege und Proteinfamilien in mehltreuerer Gerste dar.

Die bioinformatische Zusammenführung der Transkriptomdaten von Gerste und *Bgh* mit solchen aus anderen Pathosystemen eröffnet zusätzliche Möglichkeiten der Erkenntnis. So ist zum Beispiel der Vergleich des Wirtssystems Gerste und *Bgh* und des Nichtwirtssystems Gerste und *Bgt* naheliegend und wird im Projekt GABI-Nonhost bearbeitet. Ein hoher Überlappungsgrad pathogenregulierter Gene wird erwartet. Möglicherweise lassen sich hier Gene finden, die für die Wirtsanfälligkeit verantwortlich sind. Weiterhin wäre es von Interesse, welches Subset von pathogeninduzierten Genen der Gerste bereits mit Elizitoren (Chitin, Cutin, KH-Elizitor) induzierbar ist. Auch ein Vergleich der Transkriptome verschiedener Pflanze-Pilz-Interaktionen (nekrotrophe Pilze, hemibiotrophe Pilze, biotrophe Pilze, vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilze) dürfte weiteren Einblick in den allgemeinen und den pathogenspezifischen Teil des Gerstentranskriptoms geben. Bioinformatische Projekte sollten sich außerdem mit der Zusammenführung von Transkriptom-, Proteom- und Metabolomdaten befassen.

Da es sich bei den hier diskutierten Kandidatengenen um gemeinsam regulierte Gene handelt, die wahrscheinlich im Zusammenspiel wirken, hat es kaum Sinn, einzelne Gene einzukreuzen, um Pflanzen mit erhöhten Resistenzen zu züchten. Es sei denn, es gelänge Schlüsselkomponenten der *mlo*-vermittelten Resistenz wie zum Beispiel HvSNAP34 oder ROR2 und evtl. weitere Kandidaten, die aus funktionellen Ansätzen resultieren, einzukreuzen.

Um epidermisspezifisch pathogeninduzierbare Promotoren zu identifizieren, wurde mit einigen pathogeninduzierten Genen bereits eine erste Promotoranalyse durchgeführt. 3-5 kb lange Promotorfragmente von 11 Genen liegen vor (persönliche Mitteilung Maucher, IPK Gatersleben). Epidermisspezifische Promotoren haben den Vorteil, dass sich damit Gene ausschließlich in der Epidermis überexprimieren lassen. Abwehrgene könnten so mit weniger pleiotropen Nebenwirkungen überexprimiert werden. Dies brächte erhebliche Vorteile für gentechnisch erzeugte Resistenz in Pflanzen. Im Pro-GABI-Projekt sollen weitere Promotoranalysen durchgeführt werden. Hierfür stehen auch die gezeigten 290 epidermisspezifischen Gene zur Verfügung.

Direkt fortgeführt werden die Arbeiten in einem neuen Projekt des IPK mit dem Titel: „Modifikation der Basalresistenz im Pathosystem Gerste und Bgh mittels RNAi“. Die gefundenen Kandidatengene und das TIGS-System sind hierbei die Grundlage. Aufgrund ihrer Homologie bzw. aufgrund erster funktioneller Daten von Kandidatengenen ist die Erzeugung von transgenen RNAi *Knock-down*- oder TILLING-Mutanten für einzelne Gene denkbar und sinnvoll. Ein erstes Beispiel wäre das t-SNARE kodierende Gen HvSNAP34.

Weitere direkt aus der Arbeit abzuleitende und bereits im Kontext diskutierte Untersuchungen sind die Messung von Gramin und Tryptamin in *mlo*-resistenter Gerste, die weitere molekulare Untersuchung der Stoffwechselwege von GABA und die Untersuchung der Rolle von Phosphatidinsäure. Im TIGS-*Screening* sollen alle restlichen pathogeninduzierten Kandidatengene getestet werden.

