

1. Einleitung

1.1 Die Getreidearten Weizen und Gerste in Wirtschaft und Wissenschaft

Zu den bedeutendsten Kulturpflanzen weltweit gehört neben dem Mais und dem Reis der Weizen (*Triticum aestivum*). Er wird als Grundnahrungsmittel und Tierfutter genutzt. Im Jahre 2006 wurden weltweit 606 Millionen Tonnen Weizen produziert (<http://faostat.fao.org/>). Die Hauptproduzenten von Weizen sind China (104 Millionen Tonnen), Indien (69 Millionen Tonnen) und die USA (57 Millionen Tonnen). Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 22 Millionen Tonnen Weizen geerntet. Damit ist Weizen das meist angebaute Getreide in Deutschland. An zweiter Stelle steht die Gerste (*Hordeum vulgare*). Die Gerste spielt weltweit mit 139 Millionen Tonnen (im Jahr 2006) ebenfalls eine bedeutende Rolle. In Deutschland, welches nach der Russischen Föderation auf Platz zwei der weltweiten Gerstenproduktion steht, wurden 12 Millionen Tonnen Gerste im Jahr 2006 produziert. Die Gerste spielt als Grundnahrungsmittel keine große Rolle, sondern findet in erster Linie beim Brauen und als Tierfutter Verwendung.

Da die Gerste und der Weizen zum Stamm der *Triticeae* gehören (Sandhu & Gill, 2002; Stein, 2007), wird in der Wissenschaft die diploide Gerste auch als Modell für den nahe verwandten Weizen betrachtet. Dies ist hilfreich, da sich die Arbeit mit dem hexaploiden Weizen besonders im molekulargenetischen Bereich oft als schwierig gestaltet (Keller et al., 2005). Erst die Etablierung von RNA *interference* (RNAi) hat die Arbeit mit Weizen erleichtert (Fu et al., 2007), da RNAi auf mRNA-Ebene wirkt und unabhängig von der Kopienzahl eines Gens im Genom ist. Da allerdings die stabile Transformation von Weizenpflanzen sehr aufwendig ist, wurde RNAi bisher meist in transienten Systemen genutzt.

Für beide Getreidesorten laufen weltweit Projekte um ihre Genome zu sequenzieren. Das ‚Internationale Gersten-Sequenzier-Konsortium‘ (IBSC, <http://barleygenome.org>) wurde 2006 gegründet und verfolgt das Ziel der Etablierung einer physischen Karte des Gerstengenoms, mit deren Hilfe Gene und 5'-regulatorischen Sequenzen präzise lokalisiert und identifiziert werden sollen.

Für die Sequenzierung des Weizengenoms wurde ebenfalls ein internationales Konsortium gebildet (IWGSC, <http://www.wheatgenome.org/>). In Kooperation versuchen

Wissenschaftler, Züchter und Landwirte die Struktur und Funktion des Weizengenoms zu entschlüsseln.

1.2 Phytopathogene Pilze

Wie alle Kulturpflanzen sind auch die Gerste und der Weizen durch eine Vielzahl von Krankheiten und Schädlingen bedroht. Die Ausbreitung der Pathogene und Schädlinge wird besonders durch die in Industrieländern verbreitete Monokultur und hohe Standdichte gefördert.

Zu den weit verbreiteten Phytopathogenen gehören die Pilze. Man unterscheidet phytopathogene Pilze nach ihrer Lebensweise. Es gibt zwei große Gruppen: nekrotroph und biotroph lebende Pilze. Die biotroph lebenden Pilze unterteilt man in obligat biotroph, fakultativ biotroph und hemibiotroph.

Nekrotrophe Pilze (z.B. *Cochliobolus heterostrophus*, *Botrytis cinerea*) töten die befallene Wirtszelle mittels toxischer Substanzen und lytischer Enzyme ab. Sie ernähren sich von abgestorbenem Pflanzenmaterial (van Kan, 2006).

Obligat biotrophe und fakultativ biotrophe Pilze benötigen den lebenden Wirt während ihres gesamten Lebenszyklus. Sie bilden spezielle Infektionsstrukturen, die Haustorien, aus, mit denen sie dem Wirt Nährstoffe entziehen. Sie sind fähig, den Stoffwechsel ihres Wirts zu ihren Gunsten zu beeinflussen (Panstruga, 2003). Die obligat biotrophen Pilze (echter und falscher Mehltau, viele Rost-Pilze wie z.B. *Uromyces sp.*) lassen sich nicht auf künstlichen Medien kultivieren. Dieser Umstand macht ihre Erforschung problematisch. Fakultativ biotrophe Pilze (*Ustilago maydis*, *Claviceps pupurea*) hingegen lassen sich auch *in vitro* kultivieren (Kahmann & Kämper, 2004; Tudzynski & Scheffer, 2004).

Hemibiotrophe Pilze (z.B. *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum spp.*) durchlaufen eine biotrophe Phase, die meist nur einige Stunden bis Tage andauert. Schließlich wird die Wirtszelle abgetötet und der Pilz bildet neue Infektionsstrukturen aus, um sich von der abgestorbenen Wirtszelle zu ernähren (Mendgen & Hahn, 2002).

1.2.1 Das obligat biotrophe Pathogen *Blumeria graminis*

Blumeria graminis, der Verursacher des echten Getreidemehltaus, gehört zur Klasse der Ascomyceten. Andere wirtschaftlich oder wissenschaftlich bedeutende Vertreter dieser Klasse sind *Saccaromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Magnaporthe*

und *Septoria*. *B. graminis* gehört zur Familie der Echten Mehltaupilze, der *Erysiphaceae*. Es handelt sich um ein obligat biotrophes Pathogen.

B. graminis zeichnet sich durch eine hohe Wirtsspezifität aus. Die einzelnen *formae speciales* wachsen jeweils nur auf einer bestimmten Getreidegattung.

B. graminis fällt durch seinen charakteristischen Phänotyp auf. Sein weißes Myzel bildet runde Pusteln auf den Getreideblättern (Abb. 1.1).



Abb. 1.1: Weißes Mehltaumyzel (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) auf Gerstenblättern

Das befallene Blattmaterial wird gelb und stirbt bei starkem Befall nach einiger Zeit ab. Die Photosyntheseleistung der Pflanze sinkt und die Transpirations- und Respirationsrate steigen. Dadurch können Kornertrag, Korngewicht, Proteingehalt der Körner, die Anzahl von Seitentrieben und Ähren ebenso wie das Wurzelwachstum reduziert werden. Die Folge ist ein geringerer Ernteertrag von 5- 20%, manchmal sogar bis zu 40% (Johnston, 1997; Chaure et al., 2000). *B. graminis* ist weltweit verbreitet.

Die Verbreitung von *B. graminis* erfolgt über Konidien, asexuell entstandene Sporen, die durch den Wind verbreitet werden. Da eine einzelne Kolonie bis zu 200.000 Konidien produzieren kann, kommt es unter günstigen Bedingungen zu einer epidemischen Ausbreitung (McDonald & Linde, 2002, Zhang et al., 2005).

Nach der Landung eines Konidiums auf einem potentiellen Wirt (Abb. 1.2, (1)) beginnt es sofort mit der Produktion einer extrazellulären Matrix. Diese dient einerseits dazu, das Konidium an den Wirt anzuheften (Wright et al., 2002), andererseits wurden auch Hinweise darauf gefunden, dass sie zur Kommunikation zwischen Wirt und Pathogen beiträgt (Zhang et al., 2005).

Eine halbe Stunde nach dem ersten Kontakt zwischen Wirt und Pathogen beginnt sich der primäre Keimschlauch (PGT, *primary germ tube*) auszubilden (Abb. 1.2, (2)). Nach zwei Stunden ist der PGT vollständig entwickelt und hat eine Länge von etwa 5- 10 µm. Seine Funktion ist nicht vollständig erforscht. Es wird vermutet, dass er zur Wasseraufnahme aus dem Wirt und zur Erkennung des Wirts benötigt wird (Carver & Bushnell, 1983; Carver & Ingerson, 1987).

Der zweite Keimschlauch, der appressoriale Keimschlauch (AGT, *appressorial germ tube*) wird 3- 8 Stunden nach dem ersten Kontakt ausgebildet und wird 30- 40 µm lang (Abb. 1.2, (3)). Er ist durch ein Septum von dem Konidium getrennt. An seinem Ende entwickelt er eine hakenförmige Verdickung, das Appressorium. Aus dem Appressorium wächst etwa 15 Stunden nach Landung der Penetrationsschlauch, welcher die pflanzliche Zellwand durchbricht. Dabei spielen wahrscheinlich sowohl Turgorkraft als auch enzymatische Auflösung der Zellwand eine Rolle (Francis et al., 1996; Pryce-Jones et al., 1999). Unter den *Erysiphaceae* ist *Blumeria* sp. einzigartig in der Ausbildung von zwei Keimschläuchen.

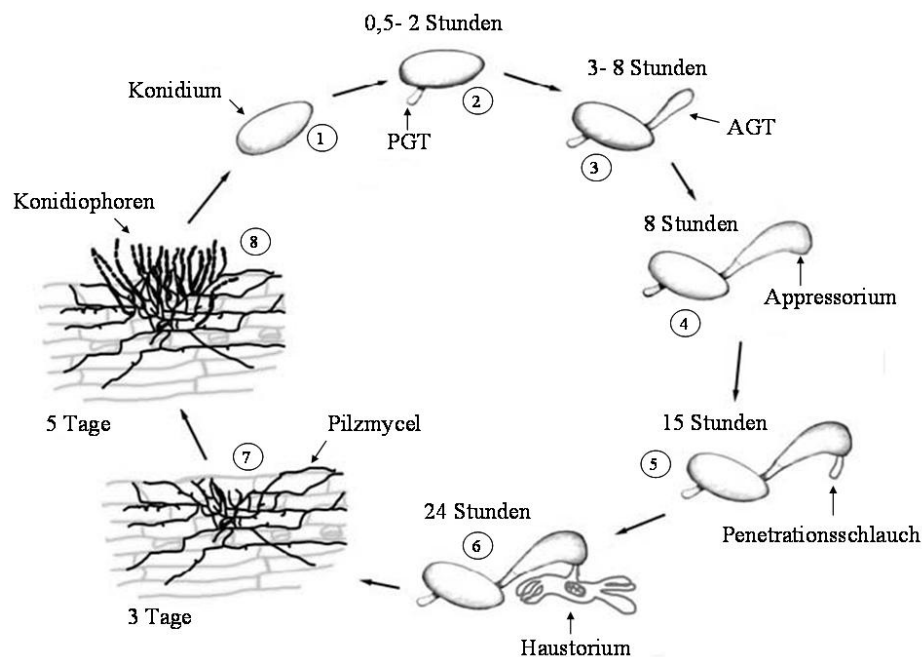


Abb. 1.2: Asexueller Lebenszyklus von *B. graminis* (abgewandelt von Both et al., 2005a)

Nach der Landung des Konidiums auf dem Wirt bildet sich zuerst der primäre Keimschlauch (PGT) und anschließend der appressoriale Keimschlauch (AGT) aus. An der Spitze des AGT bildet sich das Appressorium, woraus der Penetrationsschlauch entsteht. Nachdem der Penetrationsschlauch die pflanzliche Zellwand durchbrochen hat, wächst das Haustorium aus. Nach erfolgreicher Etablierung des Haustoriums wächst die Pilzkolonie, und nach fünf Tagen entstehen Konidiophoren, von denen sich Konidien abschnüren.

Nach Durchdringen der pflanzlichen Zellwand beginnt das Haustorium sich aus dem Penetrationsschlauch zu entwickeln. Bei der Bildung des Haustorium wird die Plasmamembran der Wirtszelle eingestülpt, aber nicht durchbrochen. Es können jedoch Modifikationen der Membran beobachtet werden. Zwischen der Plasmamembran des Wirts und der haustorialen Zellwand bildet sich die extrahaustoriale Matrix (Panstruga, 2003).

Das Haustorium ist für die Aufnahme von Nährstoffen aus der Wirtszelle und somit für die Ernährung des Pilzes zuständig. Zuerst entsteht eine blasenförmige Ausbildung, der zentrale Körper des Haustoriums. Dann werden zur Oberflächenvergrößerung bis zu 10 fingerförmige Ausstülpungen an den beiden Polen des zentralen Körpers gebildet (Abb. 1.2, (6)), womit das Haustorium eine Gesamtoberfläche von 120– 150 μm^2 erhält (Zhang et al., 2005).

Die Nährstoffversorgung des Pilzes ist gesichert, wenn ein Haustorium erfolgreich in der Wirtszelle etabliert wurde. Jetzt fängt der Pilz an sich auf der Wirtsoberfläche auszubreiten. Das pilzliche Myzel besteht aus elongierenden sekundären Hyphen (ESH), die etwa 24 Stunden nach dem ersten Kontakt zwischen Wirt und Pathogen zu wachsen beginnen. Aus ihnen differenzieren sich erneut AGTs, aus denen sekundäre Haustorien entstehen.

Nach drei bis vier Tagen ist die Mehltau-Kolonie so groß, dass sie makroskopisch erkennbar ist. Die Kolonie beginnt mit der Produktion von Konidiophoren, von denen sich die reifen Konidien abschnüren (Abb. 1.2, (8)).

Während seiner gesamten Entwicklung verbleibt *B. graminis* auf der Oberfläche des Wirtes und in seinen Epidermiszellen. Er dringt nie in tiefer gelegene Zellschichten wie das Mesophyll vor. *B. graminis* befällt alle oberirdischen, vegetativen Pflanzenteile.

Eine sexuelle Vermehrung ist ebenfalls bekannt. Sie erfolgt durch Ascosporen, die in Kleistothecien gebildet werden. In dieser Form überdauert der Pilz bei ungünstigen Umweltbedingungen wie z.B. extreme Trockenheit (Johnston, 1997). Durch die intensive Landwirtschaft in den gemäßigten Breiten steht dem Pilz das ganze Jahr hindurch grünes Pflanzengewebe in Form von Sommer- bzw. Wintergetreide zur Verfügung. Dadurch ist es ihm möglich in der asexuellen als auch in der sexuellen Form zu überwintern.

1.3 Resistenzen gegen *B. graminis*

Neben dem Einsatz von Fungiziden werden Mehltau-resistente Getreidesorten verwendet, um den Befall durch *B. graminis* zu kontrollieren. Es gibt unterschiedliche

Resistenzmechanismen in Getreidepflanzen gegen Mehltau. Ausführlich untersucht sind diese im Gersten-*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*)-System.

Die bekannten Resistenzmechanismen lassen sich in sechs Klassen einteilen (Jørgensen, 1994): Rassenspezifische Resistenzen, *mlo*-vermittelte Resistenz, partielle Resistenz (Jørgensen, 1994), induzierte Resistenz (Jørgensen, 1994; Kogel & Langen, 2005), passive Resistenz (Jørgensen, 1994) und Nicht-Wirtsresistenz (Heath, 2000; Schweizer, 2007). Die rassenspezifische Resistenz und die *mlo*-vermittelte Resistenz sind gut untersucht und werden im Folgenden kurz erläutert.

1.3.1 Rassenspezifischen Resistenz

Bei der rassenspezifischen Resistenz trägt der Wirt ein Resistenz (*R*)-Gen. Dieses dominante *R*-Gen vermittelt Resistenz gegen Pathogene, welche ein entsprechendes Avirulenz (*Avr*)-Gen tragen. Interagieren die Produkte beider Gene direkt oder indirekt miteinander, wird im Wirt die Abwehrreaktion eingeleitet (Dangl & Jones, 2001). Oft handelt es sich um eine hypersensitive Reaktion (HR), die mit dem Tod der attackierten Zelle endet.

In der Gerste wird der Locus, an dem sich das *R*-Gen befindet *Ml(Locus)* genannt (Jørgensen, 1994). Ein Beispiel für ein *R*-Gen ist *Mla*. Wird eine Epidermiszelle, die das *Mla12*-Gen trägt, von einem Mehltau-Konidium attackiert, welches das passende *Avr*-Gen trägt, wird der Zelltod ausgelöst. Das Pilzwachstum kann auch durch HR in den umgebenden Epidermis- und darunter liegenden Mesophyllzellen begrenzt werden, wenn das Konidium doch fähig war ein Haustorium zu etablieren und ESH auszubilden (Hückelhoven et al., 1999).

Ein Beispiel für *R*-Gene im Weizen gegen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) sind die *Pm*-Gene (Singrün et al., 2003; Yahiaoui et al., 2006; Wicker et al., 2007).

Während bereits über 85 *R*-Gene in der Gerste bekannt sind, wurden bisher nur etwa 25 *Avr*-Gene in *Bgh* identifiziert und nur wenige wurden bereits isoliert (Ridout et al., 2006). Die Erforschung von *Avr*-Genen im Getreide-*B. graminis*-System ist schwierig, da sich der Pilz nicht gentechnisch manipulieren lässt.

1.3.2 *mlo*-vermittelte Resistenz

Die *mlo*-vermittelte Resistenz ist eine monogene Resistenz. Das dominante Wildtyp *Mlo*-Gen ist ein negativer Regulator der Abwehrreaktion gegen Mehltau (Büschges et al., 1997). Die Pflanze ist resistent gegen jedes bekannte Mehltausolat, wenn das *Mlo*-Gen durch Mutation in seiner Funktion gestört wird. Dies nennt man Breitbandresistenz (Jørgensen, 1992).

Während in der Regel rassenspezifische Resistenzen durch das Pathogen immer wieder überwunden werden, ist die *mlo*-vermittelte Resistenz dauerhaft. Bereits 1993- 94 trugen in Deutschland und Großbritannien 70% der eingesetzten Sommergerstensorten ein rezessives *mlo*-Allel (Lyngkjaer et al., 2000). Trotzdem ist bisher noch keine wesentliche Durchbrechung der *mlo*-Resistenz bekannt geworden.

Da das Wildtyp *Mlo*-Gen auch ein negativer Regulator des Zelltods ist, kommt es bei Kultivaren, die ein mutiertes *mlo*-Allel tragen, oft zu nekrotischen Flecken auf den Blättern, die nicht nur durch Pathogenbefall hervorgerufen werden (Wolter et al., 1993). Sie entstehen spontan durch eine beschleunigte Blattseneszenz (Piffanelli et al., 2002). Dies führt zu Minderung der Photosyntheseleistung und somit zu Ertragsminderung.

Das *Mlo*-Gen kommt sowohl in der Gerste als auch im Weizen vor (Elliott et al., 2002), und *mlo*-vermittelte Resistenz gegen Mehltau wurde ebenfalls in Tomaten und *Arabidopsis* entdeckt (Chen et al., 2006; Bai et al., 2008).

1.4 Unterdrückung der Genexpression

Bei der Untersuchung von Genfunktionen bedient man sich oft eines reversen genetischen Ansatzes: Man unterdrückt die Expression eines Gens und beobachtet die Auswirkungen auf den Organismus. Dazu wird ein natürlicher Mechanismus genutzt: das RNA-vermittelte Gen-*Silencing*.

1.4.1 RNA-vermitteltes Gen-*Silencing*

RNA-vermitteltes Gen-*Silencing* (RvGS) wurde bereits in vielen unterschiedlichen Organismen gefunden und untersucht: Pflanzen (Napoli et al., 1990), Pilze (Romano & Macino, 1992), *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), Insekten (Misquitta & Paterson, 1999), Menschen (Elbashir et al., 2001) und Tieren (McCaffrey et al., 2002). Es gibt unterschiedliche Varianten dieses *Silencing*-Weges, die sich aber sehr gleichen und

wahrscheinlich eng miteinander verwandt sind. Die Mannigfaltigkeit und das universelle Vorkommen weisen auf die große Bedeutung dieses Mechanismus hin (Fagard et al., 2000; Pickford & Cogoni, 2003; Brodersen & Voinnet, 2006). So spielt RvGS z.B. eine Rolle bei der Genregulation und bei der Abwehr gegen Viren und Transposons (Voinnet, 2001; Tijsterman et al, 2002; Baulcombe, 2004). Die Wirkungsweise kann ganz unterschiedlich sein: RvGS kann sich durch DNA-Methylierung auf die Transkription auswirken, die Stabilität von mRNA beeinflussen oder die Translation behindern (Tijsterman et al, 2002; Schramke & Allshire, 2004; Matzke & Birchler, 2005). Im Folgenden wird in erster Linie das posttranskriptionale Gen-Silencing (PTGS) durch mRNA-Abbau beschrieben.

Die unterschiedlichen Varianten von PTGS scheinen im Wesentlichen dem gleichen Ablauf zu folgen. Als Auslöser dient in der Regel doppelsträngige RNA (dsRNA; Meister & Tuschl, 2004). DsRNA wird auf natürliche Weise z.B. bei der Reproduktion von Viren kurzfristig in der Zelle gebildet (Angell & Baulcombe, 1997). Künstlich kann die Bildung von dsRNA z.B. durch das Einbringen von ‚Haarnadel‘-Konstrukten (Abb. 1.3) oder *Antisense*-Konstrukten in die Zelle erfolgen (Kumagai et al., 1995; Waterhouse et al., 1998; Douchkov et al., 2005).

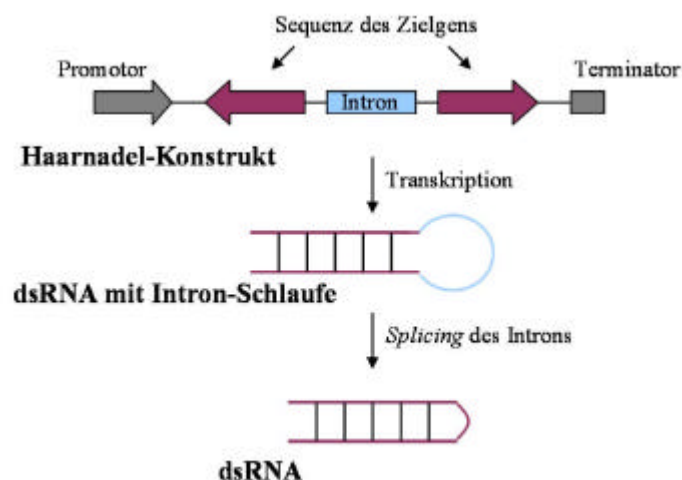


Abb. 1.3: Formierung von dsRNA aus einem ‚Haarnadel‘-Konstrukt

Ein Haarnadel-Konstrukt enthält neben einem Promotor und einem Terminator (grau) zweimal die Sequenz des Zielgens (lila). Die Wiederholung der Sequenz ist in umgekehrter Leserichtung in das Konstrukt eingebaut. Zwischen den beiden Wiederholungen liegt ein Intron (blau). Nach der Transkription schließen sich die beiden sequenzgleichen RNA-Stränge zu einem Doppelstrang (dsRNA) zusammen. Das Intron bildet eine Schleife am 3'-Ende. Durch *Splicing* wird das Intron entfernt (Wang et al., 1997; Smith et al., 2000).

Die Zelle ist darauf programmiert dsRNA abzubauen. Sie wird von dem Enzym Dicer, einem RNase III-ähnlichen Protein, welches ein oder zwei dsRNA-Bindedomänen und vermutlich RNA-Helikase-, RNaseIII- und PAZ (Piwi/ Argonaut/ Zwillie)-Domänen besitzt

(Bernstein et al., 2001), erkannt. An den unterschiedlichen RvGS-Wegen in Pflanzen sind unterschiedliche dicerähnliche (DCL) Enzyme beteiligt. DCL4 ist in erster Linie für RvGS induziert durch Haarnadel-Konstrukte verantwortlich (Dunoyer et al., 2005; Fusaro et al., 2006). DCL4 bindet die dsRNA und schneidet sie in 21 Nukleotide lange Stücke (Abb. 1.4, (2)), welche einen zwei Nukleotide-langen Überhang am 3'-Ende haben. Durch die Helikase-Aktivität von DCL4 werden die Doppelstränge gespalten und kurze RNA-Moleküle, auch *small interfering RNA* (siRNA) genannt, erzeugt (Susi et al., 2004).

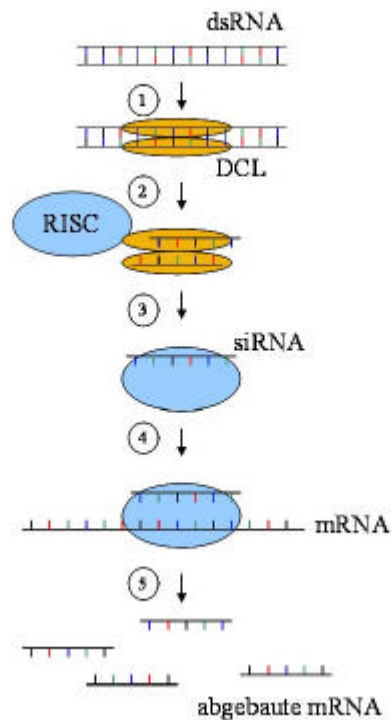


Abb. 1.4: RNA-vermitteltes Gen-Silencing

dsRNA Wird von einem dicerähnlichem Enzym (DCL) erkannt und in kurze RNA-Stücke (siRNA) gespalten. Ein siRNA-Strang wird an den Enzymkomplex RISC übergeben. Durch die Interaktion von RISC und siRNA werden homologe mRNA-Moleküle erkannt und abgebaut.

Ein Strang wird von einem Proteinkomplex, der *RNA-induced silencing complex* (RISC) genannt wird, übernommen (Abb. 1.4, (3)). Welcher Strang der doppelsträngigen siRNA als sogenannter Führungsstrang ausgewählt wird, hängt von der Sequenz und Struktur der siRNA ab. Der Führungsstrang wird verwendet, um komplementäre Einzelstrang-RNA aufzuspüren und abzubauen (Abb. 1.4, (4) und (5)). Verbleibt der Strang als Führungsstrang im RISC-Komplex, welcher komplementär zu der vom Experimentator ausgewählten Zielsequenz ist, wird die in der Zelle vorhandene mRNA abgebaut. Verbleibt der andere Strang im RISC-Komplex, hat dies keinen Einfluss auf die Expression des Gens, und das vom Experimentator eingebrachte Konstrukt ist unwirksam (Tomari and Zamore, 2005).

Von *C. elegans*, Pflanzen und Pilzen ist bekannt, dass sich das RvGS räumlich ausbreiten kann. Wie genau und in welcher Form die RNA durch den Organismus transportiert wird, ist noch nicht vollständig erforscht. In Pflanzen unterscheidet man zwischen systemischen *Silencing*, welches sich durch die gesamte Pflanze verbreitet und lokalem *Silencing*, welches sich nur von Zelle zu Zelle ausbreitet. Die dsRNA und die siRNA-Moleküle werden als mögliches Signalmolekül diskutiert (Waterhouse et al., 2001; Susi et al., 2004), wobei sich die Hinweise verdichten, dass es zumindest beim systemischen *Silencing* die siRNA-Moleküle sind (Kehr & Buhtz, 2008). Die RNA-Moleküle verbreiten sich beim systemischen *Silencing*, gebunden an ein kleines Protein, über das Phloem (Voinnet et al., 1998; Yoo et al., 2004). Die geringfügige Verbreitung bei lokalem *Silencing* läuft wahrscheinlich über die Plasmodesmata ab, wobei das Signalmolekül ebenfalls an ein kleines Protein gebunden zu sein scheint (Kobayashi & Zambryski, 2007).

RvGS wurde in vielen Organismen gefunden. Obwohl offenbar immer der gleiche Mechanismus zugrunde liegt, trägt der Vorgang viele Namen. In Pflanzen redet man gewöhnlich von *post-transcriptional gene-silencing* (PTGS). In Pilzen benutzt man den Begriff ‚*quelling*‘ und bei Tieren spricht man von *RNA interference* (RNAi).

Der Begriff RNAi wird im Allgemeinen benutzt, wenn man Haarnadel-Konstrukte in einen Organismus einbringt, um die Expression eines Gens zu unterdrücken.

1.4.2 Anwendungsformen von RNAi

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die für RNAi benötigte dsRNA in einen Organismus einzuführen. Im Folgenden werden die drei in dieser Arbeit angewandten Methoden kurz vorgestellt.

1.4.2.1 TIGS – *Transient-induced gene-silencing*

TIGS stellt eine Möglichkeit da, in verhältnismäßig kurzer Zeit eine breite Palette verschiedenster Gene zu testen. Hierbei wird neben z.B. einem RNAi- oder *Antisense*-Konstrukt noch ein Vektor mit einem Reportergen (z.B. GUS oder GFP) auf Mikropartikel (meist Gold oder Wolfram) gebracht. Diese Partikel werden unter hohem Druck auf das zu untersuchende Gewebe geschossen (biolistischer Gentransfer). Tritt dabei ein Partikel in den Zellkern einer Zelle ein, kann die mit dem Partikel eingebrachte DNA in der Zelle

exprimiert werden. Anhand des Reportergens erkennt man, welche Zellen beim Beschuss getroffen und erfolgreich transformiert wurden (Panstruga, 2004). Anschließend kann die Auswirkung des RNAi-Konstruktes auf Einzelzellebene untersucht werden.

Diese Methode wird oft bei Untersuchungen der Interaktion von Getreide und Mehltau angewandt, da diese Interaktion während einer frühen Phase auf Einzelzellen der Epidermis beschränkt ist (Schweizer et al., 1999; Schultheiss et al., 2002; Douchkov et al., 2005; Zimmermann et al., 2006).

1.4.2.2 VIGS – *Virus-induced gene-silencing*

TIGS ist zwar eine gute Methode, um schnell eine hohe Anzahl von Genen zu testen, allerdings ist es hier nur möglich einzelne Zellen zu untersuchen. VIGS liefert die Möglichkeit größere Bereiche von Pflanzen zu verändern. Mittels eines Virus wird ein Konstrukt in die Wirtspflanze eingeschleust. Über die Plasmodesmata und das Phloem breitet sich das Virus aus und mit ihm das eingebrachte Konstrukt. Somit wird die Expression des Zielgens fast in der gesamten Pflanze beeinflusst (Lu et al., 2003; Burch-Smith et al., 2004).

Bei der VIGS-Technologie macht man sich ein natürliches Phänomen zunutze. Wird eine Pflanze auf natürliche Weise von einem Virus infiziert, schaltet sich das auf RNA-Abbau basierendes Verteidigungssystem ein. In der Pflanzenzelle wird die dsRNA, welche während der Virusvermehrung gebildet wurde, erkannt und wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben abgebaut. Das mit dem Virus eingeschleuste Konstrukt wird ebenfalls zu siRNA-Molekülen degradiert (Benedito et al., 2004), und der RNAi-Effekt setzt ein.

Für VIGS können sowohl *Sense*-, *Antisense* (as)- als auch Haarnadel (hp)-Konstrukte eingesetzt werden. Da während der Virusreplikation dsRNA entsteht, welche die Produktion von siRNA-Moleküle auslöst, wird auch durch ein *Sense*-Konstrukt RNAi gegen das Zielgen ausgelöst. Ein *Sense*-Konstrukt scheint aber ineffizienter als as- oder hp-Konstrukte zu sein (Lacomme et al., 2003).

VIGS wurde mittlerweile für viele verschiedene Pflanzen erfolgreich etabliert. Neben vielen Dikotyledonen wird VIGS inzwischen auch routinemäßig in Getreidearten angewandt (Holzberg et al., 2002; Scofield et al., 2005).

Bei der Untersuchung von Wirt-Pathogen-Beziehungen wird VIGS immer häufiger eingesetzt. Auch im Getreide-*B. graminis*-System findet VIGS Verwendung (Hein et al., 2005; Shen et al., 2007).

1.4.2.3 RNAi in transgenen Pflanzen

Mit der Erzeugung von transgenen Pflanzen hat man die Möglichkeit, die Expression eines Gens im gesamten Organismus über mehrere Generationen zu beeinflussen. Dazu wird ein entsprechendes Konstrukt z.B. mittels *Agrobacterium* oder mittels biolistischen Gentransfers in eine Zelle eingebracht (Shrawat & Lörz, 2006; Goedeke et al., 2007). Die transformierten Zellen werden mittels eines Resistenzmarkers selektiert, und durch den Einsatz von Phytohormonen zur Regeneration von Pflanzen angeregt. Diese Pflanzen werden auf das Vorhandensein des eingebrachten Konstrukts getestet und Folgegenerationen aus ihnen gezüchtet (Goedeke et al., 2007).

RNAi in transgenen Pflanzen wird sowohl in Dikotyledonen (Kerschen et al., 2004) als auch in Monokotyledonen z.B. zur Untersuchung potentieller Resistenzgene in Wirt-Pathogen-Beziehungen eingesetzt (Travella et al., 2006).

Im Gegensatz zu TIGS oder VIGS ist die Herstellung transgener Pflanzen sehr zeitaufwendig. Dafür erhält man Pflanzen, bei denen das eingebrachte Konstrukt fest in das Genom integriert ist. Durch die Wahl des Promotors kann man die Expression des Transgens auf ein bestimmtes Gewebe oder einen bestimmten physiologischen Zustand beschränken, oder durch einen konstitutiven Promotor in der gesamten Pflanze exprimieren lassen (Goedeke et al., 2007).

1.4.2.4 RNAi in transgenen Pilzen

Bei den Arbeiten mit vielen nekrotrophen oder hemibiotrophen Pilzen gehört die genetische Transformation zur Routine. Zur Untersuchung von Genfunktionen wurden bisher Methoden wie die Erzeugung von Mutationen durch Chemikalien oder die Genzerstörung durch DNA-Insertion (homologe Rekombination) bevorzugt (Oliver & Osbourn, 1995; Mullins & Kang, 2001; Olmedo-Monfil et al., 2004). Seit der Entdeckung von RNAi wird dieser Ansatz auch in Pilzen immer häufiger genutzt (Liu et al., 2002; Kadotani et al., 2003; Rappleye et al., 2004; Henry et al., 2007).

Der in dieser Arbeit eingesetzte Pilz *B. graminis* ist ein obligat biotrophes Phytopathogen. Das Konidium keimt zwar auf Glasplatten oder Agar, entwickelt hier aber nur PGTs. Daraus schließt man, dass der PGT Signale des Wirts aufnimmt, durch welche die Bildung des AGT stimuliert wird (Carver & Ingerson, 1987). Eine vollständige Entwicklung des Pilzes ist auf künstlichen Medien nicht möglich, wodurch eine Selektion von Transformanten oder die

Kultivierung von Mutanten schwierig wird. Die Untersuchung von Pathogenizitätsfaktoren ist auf diese Weise unmöglich. Zwar gab es Versuche, *B. graminis* zu transformieren (Chaure et al., 2000), aber dieses Verfahren ist zeitaufwendig und nur selten erfolgreich. Daher beschränkten sich molekulare Studien von *B. graminis* bisher auf Expressionsanalysen mittels cDNA-Arrays (Both et al., 2005a; Both et al., 2005b) und SAGE (*serial analysis of gene expression*; Thomas et al., 2002).

1.4.3 Vor- und Nachteile von RNAi

RNAi ist eine mittlerweile routinemäßig in vielen Laboren angewandte Methode zur Analyse von Genfunktionen. Allerdings sollte man neben den zahlreichen Vorteilen auch die Nachteile bedenken.

1.4.3.1 Vorteile von RNAi

Im Folgenden werden einige Vorteile von RNAi aufgeführt.

Einen bedeutenden Vorteil bietet RNAi in Organismen, bei denen ein komplexes Genom (z.B. hexaploider Weizen, Travella et al., 2006) die Anwendung herkömmlicher Methoden wie Genmutation durch genetische Redundanz erschwert. Da RNAi auf RNA-Ebene wirkt, ist es unerheblich, ob mehrere Kopien eines Gens im Genom vorliegen, solange die Sequenzähnlichkeit zwischen den Kopien mindestens 88% beträgt (Parrish et al., 2000). Zudem entfällt die oft komplizierte und langwierige Erzeugung stabiler Mutanten.

RNAi ist sequenzspezifisch, und wählt man eine hochkonservierte Sequenz für das Konstrukt aus, kann man in einem Experiment die Expression einer ganzen Genfamilie unterdrücken.

Meist führt RNAi nur zu partiellem Abbau der mRNA. Deshalb ist es mit RNAi möglich, Gene zu untersuchen, deren völliger Verlust (z.B. durch Mutation) einen letalen Effekt auf den Organismus hätte.

RNAi wird dominant vererbt und lässt sich deshalb bereits in einer segregierenden T₁-Generation untersuchen, da rund 75% der T₁-Individuen *Silencing* zeigen sollte.

Diese Vorteile machen RNAi zu einer einfachen und kosteneffizienten Methode, die sie auch für groß angelegte Untersuchungen vieler Gene qualifiziert (Hilson et al., 2004; McGinnis et al., 2005).

1.4.3.2 Nachteile von RNAi

Wie jede Methode bringt auch RNAi einige Probleme mit sich.

Ein großes Problem bei RNAi ist das versehentliche *Silencing* anderer Gene neben dem Zielgen (*off target*-Effekt). Wie hoch die Übereinstimmung zwischen RNAi-Konstrukt und einer potentiellen *off target*-Sequenz sein muss, ist noch nicht vollständig erforscht. Bereits 88% Übereinstimmung auf einer Länge von 41 Nukleotiden der Sequenz des Konstrukts mit einer anderen mRNA scheint auszureichen, um *Silencing* zu erreichen (Parrish et al., 2000). Xu et al. (2006) berichten davon, dass eine unterschiedliche Base zwischen siRNA und der potentiellen *off target*-Sequenz bereits genügt, um *off target-Silencing* zu verhindern. Filichkin et al. (2007) berichten hingegen von einem *off target*-Effekt, obwohl keine 100% Übereinstimmung über 21 Nukleotide zwischen der Sequenz des Konstruktes und der Sequenz des *off target*-Gens bestand. Die Gefahr, dass neben dem eigentlichen Zielgen andere Gene (z.B. Mitglieder der gleichen Genfamilie) unbeabsichtigt ausgeschaltet werden, ist also gegeben. Es gibt die Möglichkeit durch Computerprogramme die Gefahr der Kreuzreaktion des RNAi-Konstrukts mit anderen Genen im Vorfeld zu überprüfen (Xu et al., 2006). Aber bei Organismen, deren Genom noch nicht vollständig sequenziert wurde, sind solche Resultate nur bedingt aufschlussreich.

Auch wenn man darauf achtet, dass das RNAi-Konstrukt nicht in einem hochkonservierten Genbereich liegt, kann die in *C. elegans*, Pflanzen und Pilzen gefundene RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) zu *off target*-Effekten führen. In *C. elegans* benutzt die RdRP siRNA-Moleküle als Primer und erstellt mit mRNA als Matrize dsRNA. Die Sequenz dieser dsRNA kann in 5'-Richtung über das eigentliche RNAi-Konstrukt hinausgehen (Sijen et al., 2001; Aoki et al., 2007). In Pflanzen scheint sich dieses Phänomen in 5'- und 3'-Richtung auszubreiten ohne die Zuhilfenahme von siRNA-Molekülen als Primer (Petersen & Albrechtsen, 2005). Dies kann ebenfalls zu unerwarteten Nebeneffekten führen.

Ineffiziente RNAi-Konstrukte können ein falsches Bild der Bedeutung des untersuchten Gens für den beobachteten Phänotyp hervorrufen. Dies kann z.B. an einer suboptimal gewählten Sequenz des Konstruktes liegen. Entweder wird die dsRNA verkehrt herum in den RISC eingeführt (siehe Kapitel 1.4.1) oder die siRNA-Moleküle können nicht an die mRNA binden, da der Zielbereich an Proteine gebunden oder durch sekundäre

Strukturen nicht zugänglich ist. Dies können auch Gründe für den oft beobachteten variablen Effekt von RNAi sein (Tomari & Zamore, 2005).

Aufgrund der Probleme, die bei RNAi-Experimenten auftreten können, sollte man zusätzliche Kontrollen einsetzen. Dies können z.B. mehrere Konstrukte mit unterschiedlichen Sequenzen gegen dasselbe Gen sein. Besteht die Möglichkeit, sind RT-PCR-Analysen oder Array-Experimente eine hervorragende Methode, um den Einfluss von RNAi auf die Expression des Zielgens und anderer Gene zu überprüfen.

1.5 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von RNAi-Konstrukten untersucht, die im pflanzlichen Wirt exprimiert wurden, aber gegen Gene aus *B. graminis* gerichtet sind.

Dieses Phänomen wurde im Verlauf einer TIGS-Versuchsreihe mit RNAi-Konstrukten gegen pflanzliche Gene, welche an der Gerste-*Bgh*-Interaktion beteiligt sein könnten, entdeckt. Die Zielgene für diese Experimente wurden aufgrund von Makroarraydaten ausgewählt (Zierold, 2005). Dieser Makroarray wurde aus einer cDNA-Bank, die auf mehltauinfizierter Gerstenepidermis basiert, erstellt. Daher waren auf dem Array sowohl cDNA-Klone der Gerste als auch aus *B. graminis* vorhanden. RNAi gegen einige dieser Gene aus *B. graminis* führte zu einer Reduktion der Infektionsrate im Gersten-*Bgh*-System.

Das Phänomen des Wirts-vermittelten Gen-*Silencing* (HIGS, *Host-induced gene-silencing*) wurde daraufhin an mehreren Zielgenen aus *B. graminis* im transienten Einzelzelltest (TIGS) im Gersten-*Bgh*-System getestet. Für ausgewählte Kandidatengene wurden HIGS-Effekte mittels VIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion und mittels RNAi-exprimierender transgener Gerstenpflanzen reproduziert.

Mittels Einzelzell-Transkriptanalysen in *Bgh*-infizierten Gerstenzellen und quantitativer *real time*-PCR mit cDNA, erstellt aus RNA epiphytischer *Bgh*-Strukturen, wurde versucht, die Wirkungsweise des HIGS-Phänomens zu analysieren.