

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein neues System vorgestellt mit dem es möglich zu sein scheint die Expression spezifischer Gene in dem obligat biotrophen Pilz *Blumeria graminis* zu hemmen. Das Phänomen wurde HIGS (*Host-induced gene-silencing*) genannt.

4.1 HIGS – Eine neue Methode, um Genfunktionen in *B. graminis* zu untersuchen

Bis lang war es nicht möglich, die Funktion einzelner Gene und ihrer Beteiligung an der Wirts-Pathogen-Interaktion in dem obligat biotrophen Pathogen *B. graminis* direkt zu untersuchen (siehe Kapitel 1.4.2.4). Aus diesem Grund blieben molekulare Analysen dieses Pathogens bisher rein deskriptiv und waren auf Analogieschlüsse aus anderen Pathogenuntersuchungen angewiesen (Bindslev et al., 2001). Jetzt besteht die Möglichkeit den Einfluss von Genen aus *B. graminis* durch Unterdrückung der Expression (*Silencing* des Gens) mittels HIGS zu untersuchen. Dazu wird ein RNAi-Konstrukt gegen ein ausgewähltes Gen aus *B. graminis* in der pflanzlichen Wirtszelle exprimiert.

4.1.1 Die Entdeckung von HIGS mittels eines transienten Einzelzell-Assays (TIGS)

In dieser Arbeit sollte das TIGS-System ursprünglich als revers-genetischer Ansatz genutzt werden, um pflanzliche Gene zu finden, die an der anfälligen Interaktion zwischen Mehltau und Getreidepflanze beteiligt sind. Dazu lag bereits eine Anzahl von RNAi-Konstrukten vor (Zierold, 2005), und weitere RNAi-Konstrukte wurden aufgrund von cDNA-Makroarray-Daten erstellt (Zierold et al., 2005). Dieser Makroarray enthielt etwa 90% pflanzliche und etwa 10% pilzliche cDNA-Sequenzen. Daher konnte mit ihm prinzipiell neben der Expression pflanzlicher Gene auch diejenige pilzlicher Gene während der Interaktion von Gerste und Mehltau analysiert werden. Alle Gene, deren Transkription auf dem Makroarray als hochreguliert erschien, wurden als Grundlage für die Erstellung von RNAi-Haarnadel-Konstrukten ausgewählt, unter der vereinfachenden Annahme, dass es sich um pflanzliche Gene handelt.

Während der ersten Experimente wurde entdeckt, dass eines der Konstrukte (in dieser Arbeit als HIGS 47.1 vorgestellt), welches die Anfälligkeit des Gerste-*Bgh*-Systems beeinflusste, gegen ein pilzliches Gen gerichtet war. Nachdem andere RNAi-Konstrukte, die ebenfalls gegen pilzliche Gene gerichtet waren, auch einen Effekt auf die Anfälligkeit hatten, wurden die Konstrukte gegen pflanzlichen Gene aus den Experimenten ausgeschlossen und RNAi gegen pilzliche Gene genauer untersucht.

4.1.1.1 Auswahl der Kandidaten für die TIGS-Experimente

4.1.1.1.1 Überprüfung der Kandidaten mittels blast-Analyse

Die verfügbaren RNAi-Konstrukte basierten sowohl auf EST-Sequenzen aus der Gerste als auch aus *B. graminis*. Für die geplanten TIGS-Experimente wurden nur die RNAi-Konstrukte benötigt, die auf EST-Sequenzen aus *B. graminis* basierten. Diese wurden mittels blast-Analysen aus den verfügbaren 265 Kandidaten-Sequenzen herausgefiltert.

Die Kriterien wurden so gewählt, dass alle EST-Sequenzen pflanzlichen Ursprungs mit hoher Wahrscheinlichkeit eliminiert werden konnten. Ein Kandidat wurde aussortiert, wenn bei den megablast-Analysen eine Sequenz mit einem e-Wert kleiner als 1×10^{-20} in einer EST-Datenbank aus pflanzlichem Gewebe, welches nicht mit einem Pilz infiziert worden war, gefunden wurde. Alle anderen blast-Resultate wurden dann nicht mehr berücksichtigt. Es wurde z.B. ein Kandidat (CD056916, HO13K06) aussortiert, welcher mit einem e-Wert von 1×10^{-145} hohe Homologie zu einer EST-Sequenz von *Mycosphaerella graminicola* aufwies. Dieser Kandidat zeigte außerdem sehr hohe Homologie zu einer EST-Sequenz aus Gerste (e-Wert = 0) (Tab 6.1). Ein RNAi-Konstrukt gegen diese EST-Sequenz könnte durchaus ein pilzliches Gen ausschalten, würde aber bestimmt auch das pflanzliche Gen beeinflussen. Deshalb war dieser Kandidat für die hier durchgeführten Experimente nicht geeignet.

Kandidaten, bei denen sich unter den drei megablast-Resultaten mit den niedrigsten e-Werten keine Sequenz aus einer EST-Datenbank aus rein pflanzlichem Gewebe befand aber eine Sequenz pilzlichen Ursprungs mit einem e-Wert kleiner gleich 1×10^{-50} , wurden für die TIGS-Experimente verwendet. So wurden in der NCBI-Datenbank für den Kandidaten mit der *Accession*-Nummer CD054762 (HO07E08) zwei homologe Sequenzen gefunden. Das megablast-Resultat mit dem niedrigsten e-Wert war eine EST-Sequenz aus pilzinfiziertem Gerstengewebe. Aufgrund dieses Resultats war noch keine Zuordnung möglich. Das zweite

Resultat mit einem e-Wert von 1×10^{-151} war eine Sequenz aus *B. graminis* (Tab. 6.1). Es gab keine Homologie zu einer Sequenz aus EST-Datenbanken aus rein pflanzlichem Gewebe. Daher wurde der Kandidat in die Liste der Kandidaten für die RNAi-Experimente gegen pilzliche Gene aufgenommen.

Insgesamt konnten 50 Kandidaten durch blast-Analysen dem pilzlichen Transkriptom zugeordnet werden. Die Herkunft von fünf Kandidaten-Sequenzen konnte vorerst nicht geklärt werden. Diese Kandidaten wurden zunächst in das Kandidaten-Set aufgenommen (Tab. 3.2).

4.1.1.1.2 Einordnung der Kandidaten aufgrund ihres Codon-Gebrauches

Für jede Art lässt sich eine Tendenz im Gebrauch bestimmter Codons erkennen. Eng verwandte Arten zeigen eine ähnliche Tendenz beim Gebrauch bestimmter Codons, während sich Gene entfernt verwandte Arten durch ihren bevorzugten Codon-Gebrauch unterscheiden (Bennetzen & Hall, 1982; Sharp et al., 1988; Kawabe & Miyashita, 2003).

Friedel et al. (2005) haben eine Software entwickelt, mit der Sequenzen auf ihren bevorzugten Codon-Gebrauch untersucht werden können. Dadurch ist man unabhängig von Sequenz-Vergleichen und umgeht das Problem, dass viele Gene in den Datenbanken noch nicht vorhanden sind. Da von beiden Organismen, mit denen hier gearbeitet wurde, das vollständig sequenzierte Genom nicht verfügbar war, stellte dies ein Problem bei den blast-Analysen dar.

Die Eclat-Software wurde speziell entwickelt um EST-Banken, die Sequenzen aus Gerste und *Bgh* enthalten, zu bearbeiten und die Sequenzen nach ihrer Herkunft aus einem der beiden Organismen zu unterscheiden. Alle 55 Kandidaten-Sequenzen (Tab. 3.2) wurden mit der Eclat-Software nochmals auf ihren Ursprung untersucht (Friedel et al., 2005). Die Zuverlässigkeit dieser Software ist abhängig von der Länge und der Qualität der Sequenzen und wird mit etwa 82% angegeben. Dennoch wurden alle als ‚Gerste‘ klassifizierten Sequenzen aussortiert um sicher zu stellen, dass alle Sequenzen pflanzlichen Ursprungs aus dem Kandidaten-Set eliminiert wurden. So wurde der Kandidat mit der *Accession*-Nummer CD053651 aussortiert, da die Eclat-Software ihn aufgrund des Codon-Gebrauchs als Gerstengen identifiziert hatte (Tab. 3.2). Bei den megablast-Analysen zeigte dieser Kandidat mit 2×10^{-175} hohe Homologie zu einer cDNA-Sequenz aus *Bgh* (Tab. 6.1). Es besteht trotzdem die Möglichkeit, dass es sich hier um ein Gerstengen handelt. Eine hohe

Homologie zu einem *Bgh*-Gen würde auftreten, wenn es ein stark konserviertes Gen ist. Das entsprechende Gerstengen wurde bei den blast-Analysen vielleicht nur aus dem Grund nicht gefunden, weil es noch nicht sequenziert wurde und daher in keiner EST-Datenbank vorliegt.

Andere Kandidaten wie CD053363 (HIGS 1) wurden aufgrund des Ergebnis der Eclat-Software in die TIGS-Experimente aufgenommen, obwohl die blast-Analysen weder signifikante Resultate in der Gerste noch in *Bgh* fanden.

Schließlich wurden 47 Kandidaten für die TIGS-Experimente ausgewählt (Tab. 3.2). Es ist immer noch möglich, dass sich unter diesen 47 Kandidaten RNAi-Konstrukte befinden, die ebenfalls gegen pflanzliche Gene gerichtet sind. Alle Kandidaten, die in den TIGS-Experimenten eine statistisch signifikante Veränderung der Anfälligkeit in Relation zur Kontrolle mit dem leeren RNAi-Vektor zeigten, wurden deshalb noch mittels PCR auf ihre Herkunft getestet (siehe Kapitel 4.1.1.4). Kandidaten, welche keine statisch signifikante Veränderung bewirkten, werden in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert und wurden daher auch nicht nochmals genauer auf ihren Ursprung untersucht.

4.1.1.2 Test der Kandidaten mittels TIGS im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘

4.1.1.2.1 Primärscreening

Die primären Experimente mit den HIGS-Kandidaten wurden im TIGS-System mit Gerstenblättern (Kultivar ‚Golden Promise‘) durchgeführt, welche mit *Bgh* inokuliert wurden.

Zunächst wurde jedes RNAi-Konstrukt nur einmal getestet und aufgrund der beobachteten Effekte eine Vorauswahl der Kandidaten getroffen. Danach scheint RNAi *in planta* gegen Gene aus *B. graminis* eher die Anfälligkeit zu reduzieren (14,9% der Konstrukte, Tab. 3.3) als sie zu erhöhen (8,5%, Tab. 3.5). Die Mehrzahl der Konstrukte (76,6%, Tab. 3.4) hatte allerdings gemäß der Auswahlkriterien keine Auswirkungen auf die Anfälligkeit.

Die Kandidaten, welche die Anfälligkeit verringern, waren von besonderem Interesse. Deshalb wurden für diese Kandidaten weitere Experimente durchgeführt, um mindestens fünf Datenpunkte zu erhalten mit denen sich statistische Analysen durchführen ließen. Aus der Gruppe der Konstrukte, welche keinen Einfluss auf die Anfälligkeit hatten, wurden

willkürlich einige Kandidaten ausgewählt, um die Zuverlässigkeit dieses Auswahlsystems zu überprüfen. Aus der Gruppe der Konstrukte, welche die Anfälligkeit erhöhten wurde nur ein Kandidat genauer untersucht. Diese Gruppe wird in diesem Kapitel nicht diskutiert, da sie nicht genug Daten enthält, um aussagekräftig zu sein.

Die Ergebnisse in den Tabellen 3.3 bis 3.6 zeigen, dass es durchaus möglich ist, aus dem Resultat des ersten Experiments Rückschlüsse auf die Wirkung eines RNAi-Konstruktes zu ziehen. Für beinahe dreiviertel (71,4%) aller RNAi-Konstrukte, die im ersten Experiment die Anfälligkeit reduzierten, konnte dieses Ergebnis nach mehreren Experimenten signifikant bestätigt werden. In der zweiten Gruppe sind die Verhältnisse ähnlich. Etwa zweidrittel (61,5%) der wiederholt getesteten RNAi-Konstrukte hatte keinen signifikanten Effekt auf die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems und bestätigt damit das Ergebnis des ersten Experiments. Etwa ein Drittel (38,5%) der RNAi-Konstrukte der zweiten Gruppe reduzierte allerdings die Anfälligkeit über mehrere Experimente gemittelt signifikant.

Somit erweist sich die Auswahl der Kandidaten nach dem *Primärscreening* als sinnvoll, wenn man eine größere Anzahl von Konstrukten testen möchte. Man sollte aber bedenken, dass sich einviertel bis ein Drittel der Kandidaten über mehrere Experimente anders verhalten können als im ersten Experiment. Es besteht also das Risiko von falsch negativen Ergebnissen, wenn man sich nur nach dem Ergebnis des ersten Experiments richtet.

4.1.1.2 Endergebnisse des TIGS

Von 47 RNAi-Konstrukten gegen Gene aus *B. graminis* liegen für 21 Daten aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Experimenten vor (Tab. 3.6). Davon haben etwa 50% (11 Konstrukte, Abb. 3.2) die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems statistisch signifikant beeinflusst.

Nur eines der Konstrukte (HIGS 6.1, Abb. 3.2) bewirkte eine signifikante Erhöhung des relativen HI. HIGS 6.1 erhöhte die Anfälligkeit um den Faktor 1,75. Dies war der stärkste Effekt, der in diesen Experimenten gemessen wurde. Die anderen 10 Konstrukte bewirkten alle eine Reduktion der Anfälligkeit. Im Mittel sank sie um den Faktor 1,44. Die stärkste Reduktion der Anfälligkeit wurde durch HIGS 35.1 verursacht, wo sie um den Faktor 1,69 auf 59,1% absank.

Keines der getesteten RNAi-Konstrukte bewirkte eine völlige Resistenz des Gersten-*Bgh*-Systems. Ob dies an einer partiellen Effizienz des HIGS-Systems liegt oder an einer

suboptimalen Auswahl an Genen als Ziele der RNAi-Konstrukte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die einzelnen Kandidaten werden in Kapitel 4.2 ausführlicher diskutiert.

4.1.1.3 *Off target*-Effekte gegen pflanzliche Gene

Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt um zu testen, ob es sich bei den beobachteten Effekten um Resultate handelt, die auf unbeabsichtigtem *Silencing* von pflanzlichen Genen beruhen (*off target*-Effekt, Xu et al., 2006). Es wurden verschiedene RNAi-Konstrukte gegen ein Gen erstellt und überprüft, ob sie vergleichbare Effekte bewirkten. Außerdem wurde HIGS in einem weiteren Gerstenkultivar und im Weizen-*Bgt*-System getestet. Schließlich wurde noch eine Software zur Detektion von *off target*-Zielen genutzt.

Zwei der Kandidaten, welche die Anfälligkeit signifikant reduziert hatten, wurden mit weiteren Konstrukten genauer untersucht. Die Konstrukte wurden gegen unterschiedliche Regionen des jeweiligen Gens gerichtet. Sowohl für den Kandidaten HIGS 25 als auch für den Kandidaten HIGS 47 konnte mit vier bzw. drei unterschiedlichen Konstrukten immer eine Reduktion der Anfälligkeit herbeigeführt werden (Abb. 3.3 bis 3.6). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei den durch diese Konstrukte verursachten Effekten nicht um *off target*-Effekte gehandelt hat. Bei zwei Konstrukten war die herbeigeführte Reduktion der Anfälligkeit allerdings statistisch nicht signifikant. Ob die Gründe dafür an unterschiedlicher Qualität des pflanzlichen Versuchsmaterials oder an Konstrukten, die relativ ineffizient und z.B. gegen mRNA-Bereiche mit starken Sekundärstrukturen gerichtet waren, konnte hier nicht geklärt werden.

Um zu testen, ob HIGS-Effekte unabhängig vom pflanzlichen Genotyp auftreten, wurden ein paar ausgewählte Konstrukte anschließend im Gerstenkultivar ‚Pallas‘ und im Weizenkultivar ‚Kanzler‘ getestet.

Für die Experimente in ‚Pallas‘ wurden drei Konstrukte ausgewählt, welche in den Experimenten in ‚Golden Promise‘ die Anfälligkeit signifikant reduziert hatten und spezifisch gegen *Bgh*-Gene gerichtet waren (Abb. 3.7). Alle drei Konstrukte reduzierten die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems über sechs Experimente betrachtet, aber nur bei

einem Konstrukt (HIGS 47.1) war dieser Effekt auch im zweiseitigen t-Test statistisch signifikant. Der erzielte Effekt dieses Konstruktes war mit einem relativen HI von 47,7 % allerdings fast doppelt so stark wie der beobachtete Effekt im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ (rHI = 74,9%). Die Effekte, die durch die beiden anderen Konstrukte verursacht wurden, entsprachen den Ergebnissen der Experimente in ‚Golden Promise‘, abgesehen davon, dass sie statistisch nicht signifikant waren. Die Resultate deuten also darauf hin, dass HIGS-Effekte nicht ausschließlich auf die Gerstensorte ‚Golden Promise‘ beschränkt ist.

Die TIGS-Experimente im Weizenkultivar ‚Kanzler‘ wurden mit fünf Konstrukten, welche bereits in den Gersten-TIGS-Experimenten verwendet worden waren und gegen *Bgt*-Gene gerichtet waren, durchgeführt. Gegen das *Bgh*-Gen HIGS 47 wurde ein neues Konstrukt angefertigt, welches auf der *Bgt*-Sequenz basierte (HIGS 47.5).

Die TIGS-Experimente in Weizen gestalteten sich als schwierig. Die Blätter waren trotz der Expression des *HvMlo*-Gens in der Regel sehr resistent, was die Auswertung erschwerte. Allerdings zeigten vier von sechs Konstrukten die Tendenz, die Anfälligkeit des Weizen-*Bgt* Systems zu reduzieren, wobei dieser Effekt bei einem Konstrukt statistisch signifikant war (Abb. 3.8). Diese Resultate deuten darauf hin, dass HIGS-Effekte auch im Weizen-*Bgt*-System beobachtet werden können. Um zu zeigen, dass HIGS ein universelles Instrument ist, um die Expression von Genen des Pathogens durch RNAi *in planta* zu unterdrücken, sind Experimente mit Weizen und *Bgt* von Bedeutung. Daher wurde HIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion mittels VIGS weiter untersucht (siehe Kapitel 4.1.2) und die TIGS-Experimente in Weizen aufgegeben.

Eine öffentlich verfügbare Software wurde angewandt, um die Möglichkeit von *off target*-Effekten in der Pflanze zu überprüfen. Das Programm (siRNA-Scan, Xu et al., 2006) zerlegt die Sequenz eines RNAi-Konstruktes in 21 Nukleotide lange Stücke und vergleicht diese unter Verwendung von spezifischen Kriterien mit einem ausgewählten Genom.

Für das Konstrukt HIGS 6.1 wurden mit Hilfe dieses Programms neben Zielsequenzen aus EST-Banken von inokuliertem Material auch Zielsequenzen in EST-Banken aus Wurzel- bzw. Blattmaterial gefunden, welches nicht mit einem Pilz infiziert worden war (Tab. 3.7). Natürlich ist es möglich, dass beide EST-Banken durch Pilzsequenzen kontaminiert waren. Es wurden Übereinstimmungen zwischen der Sequenz von HIGS 6.1 und einigen Genen aus *Oryza sativa* gefunden, die ausreichend wären, um *Silencing* auszulösen. Andererseits wurden allerdings keine Homologien zu Gersten-Sequenzen gefunden. Dies könnte daran liegen,

dass die entsprechenden Gerstengene noch nicht sequenziert worden sind. Obwohl das Konstrukt HIGS 6.1 auf einer Sequenz aus *B. graminis* beruht, konnte hier nicht ausgeschlossen werden, dass mit diesem Konstrukt neben dem Zielgen aus *B. graminis* auch ein Gerstengen *silenced* wurde. Daher wurde dieser Kandidat von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Die weiteren Ergebnisse, welche mit dem siRNA-Scan erzielt worden waren, sprachen gegen *off target*-Effekte. Für alle Konstrukte außer HIGS 6.1 wurden nur Homologien zu EST-Sequenzen aus pilzinfiziertem Pflanzenmaterial gefunden (Tab. 3.7). Allerdings stammt die Version des Genindex der Gerste, welcher von diesem Programm verwendet wird, von 2004. Viele Gerstensequenzen werden daher bei der Suche nach Homologien zum Gerstentranskriptom nicht berücksichtigt. Die Möglichkeit, dass mit den verwendeten Konstrukten Gerstengene ausgeschaltet werden, ist daher aufgrund der Ergebnisse des siRNA-Scans unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen.

4.1.1.4 Erneutes Überprüfen der Kandidaten auf ihren Ursprung

Um sicher zu stellen, dass die 11 Konstrukte aus den TIGS-Experimenten, welche signifikante Effekte verursacht hatten, wirklich gegen Gene aus *B. graminis* und nicht gegen Gerstengene gerichtet waren, wurden mehrere Tests durchgeführt.

Zum einen wurden weitere blastN-Analysen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die RNAi-Konstrukte auf Sequenzen aus *B. graminis* basierten. Diesmal wurde nicht gegen eine öffentliche Datenbank wie zu Beginn dieser Arbeit, sondern gegen die noch nicht veröffentlichte Genomsequenz von *Bgh* geblastet. Aufgrund der sehr niedrigen e-Werte, die alle unter dem festgesetzten Schwellenwert von 1×10^{-50} lagen, konnten alle Kandidaten dem Genom von *B. graminis* zugeordnet werden (Tab. 3.8).

Als weitere Methode zur Überprüfung des Ursprungs der Kandidatensequenzen wurden PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt. Es wurde DNA pflanzlicher und pilzlicher Herkunft als *Template* für die PCR-Reaktionen verwendet. Da es sich bei allen Kandidatengenen um Gene pilzlichen Ursprungs handeln sollte, wurden mit *Bgh*- und *Bgt*-DNA die meisten PCR-Produkte erwartet. Über die Anzahl der positiven PCR-Reaktionen ließ sich teilweise eine Aussage über die Zugehörigkeit der EST-Sequenz zu der entsprechenden *forma specialis* von *B. graminis* treffen (Tab. 3.9).

Bei dem Kandidaten HIGS 2 zeigten mit *Bgh*- und mit *Bgt*-DNA fast alle PCR-Reaktionen das erwartete Produkt. Es handelt sich definitiv um ein *B. graminis*-Gen. Mit vier Primerkombinationen wurden PCR-Produkte aus Gersten-DNA amplifiziert (Abb. 3.9). Die Produkte haben zwar nicht die erwartete Größe, aber das PCR-Ergebnis zeigt, dass auf kurzen Abschnitten Sequenz-Ähnlichkeit zwischen dem *B. graminis*-Gen und einem Gerstengen besteht. Wenn die verwendeten Primer an Gersten-DNA binden können, besteht auch die Möglichkeit, dass eine siRNA mit gleicher Sequenz an das entsprechende Gersten-Transkript binden könnte, woraufhin die mRNA abgebaut werden würde (*Cross Silencing*). Der hier gewählte Versuchsaufbau ist allerdings nur ein Indiz für *Cross Silencing*. Es ist nicht möglich zu sagen, ob die Homologie zwischen dem Gerstengen und dem RNAi-Konstrukt hoch genug ist, um wirklich *Cross Silencing* auszulösen.

Bei den Kandidaten HIGS 9 (Abb. 3.10), HIGS 13 (Abb. 3.11), HIGS 20 (Abb. 3.12), HIGS 25 (Abb. 3.13), HIGS 35 (Abb. 3.16), HIGS 36 (Abb. 3.17) und HIGS 47 (Abb. 3.18) waren keine PCR-Produkte mit Gersten- oder Weizen-DNA amplifiziert worden. Es gibt also keine zusätzlichen Hinweise auf *Cross Silencing* von pflanzlichen Genen. Für alle diese Kandidaten konnten mit der Mehrzahl der Primerkombinationen PCR-Produkte mit DNA von wenigstens einer *forma specialis* von *B. graminis* amplifiziert werden, was einen klaren experimentellen Hinweis auf deren pilzlichen Ursprung lieferte.

Für die Kandidaten HIGS 31 und HIGS 32 ließen sich schwache PCR-Produkte aus Gersten-DNA amplifizieren (Abb. 3.14 bzw. 3.15). Bei den multiplen Banden mit sehr geringer Intensität scheint es sich aber um unspezifische Produkte zu handeln. Daher lieferten diese PCR-Ergebnisse keinen Hinweis auf *Cross Silencing* von Gerstengenen.

4.1.1.5 Zuordnung der Kandidatengene zum Transkriptom von *Bgh* bzw. *Bgt*

Anhand von blastN-Resultaten gegen das *Bgh*-Genom und *Bgh*-EST-Sequenzen in der Cogeme-Datenbank, kombiniert mit den Ergebnissen der PCR-Analysen, wurden die Kandidaten einer *forma specialis* von *B. graminis* zugeordnet (Tab. 3.9).

Die Schlussfolgerungen, welche aus den blast-Analysen gezogen wurden, stimmten in allen Fällen mit den Schlussfolgerungen, welche aus den PCR-Resultaten gezogen wurden überein. Von den Konstrukten, welche eine statistisch signifikante Reduktion des relativen HI im Gersten-*Bgh*-System verursacht hatten, scheinen 60% auf einem *Bgt*-Gen und 40% auf einem *Bgh*-Gen zu basieren. Es scheint keinen Unterschied zu machen, gegen welche *forma specialis* das Konstrukt gerichtet ist. Allerdings ist diese Aussage aufgrund des

geringen Probenumfangs von 10 Kandidaten spekulativ. Andererseits war dieses Ergebnis zu erwarten, da bei RNAi eine Identität zwischen Zielgen und RNAi-Konstrukt von 88%, gemittelt über 41 Basen, ausreicht (Parrish et al., 2000), um *Silencing* zu verursachen. Dieser empirische Grenzwert wurde nur in einem Fall (HIGS 35, Tab. 3.9) um 1% unterschritten, was darauf hindeutet, dass die kodierenden Genombereiche von *Bgh* und *Bgt* sich sehr ähnlich sind.

4.1.2 Bestätigung von HIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion

Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass bei HIGS das RNAi-Konstrukt im pflanzlichen Wirt exprimiert wird, das *Silencing* des Zielgens aber im pilzlichen Pathogen stattfindet und die beobachtete Reduktion der Anfälligkeit nicht auf *Cross Silencing* von Wirtsgenen beruht. Um diese Hypothese zu unterstützen ist es wichtig zu zeigen, dass HIGS nicht nur in der Gersten-*Bgh*-Interaktion wirksam ist. Bei den TIGS-Experimenten war dies aufgrund von experimentellen Schwierigkeiten nicht möglich (siehe Kapitel 4.1.1.3). Daher wurde HIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion mittels *Virus-induced gene-silencing* (VIGS) untersucht.

Mit dem *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) wurden *Antisense*-Konstrukte in Weizenpflanzen eingebracht. Haarnadel-Konstrukte scheinen zwar etwas effizienter *Silencing* auszulösen (Lacomme et al., 2003), allerdings ist ihre Herstellung sehr zeitaufwendig. Daher wurden hier *Antisense*-Konstrukte verwendet.

Es wurden drei Kandidaten ausgewählt: HIGS 25, HIGS 35 und HIGS 47. HIGS 25 und HIGS 47 sind zwei unterschiedliche Gene, die beide für eine β -1,3-Glukanosyltransferase kodieren (siehe Kapitel 4.2). Sie wurden bereits im TIGS-System eingehend untersucht (siehe Kapitel 4.1.1.3) und sind von besonderem Interesse, da sie für pilzspezifische Enzyme kodieren, d.h. es sind keine β -1,3-Glukanosyltransferasen aus Pflanzen bekannt.

HIGS 35 kodiert für eine Serin-Protease. Bei den TIGS-Experimenten im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ verursachte das Konstrukt HIGS 35.1 im Mittel die stärkste Reduktion der Anfälligkeit mit hoher statistischer Signifikanz (Tab. 3.6: rHI = 59,1, p = 0,002).

Bei den VIGS-Experimenten zeigte sich, dass die drei ausgewählten Kandidaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung von *Bgt* eine Rolle zu spielen scheinen. *Antisense*-Konstrukte gegen die Kandidaten HIGS 25 und HIGS 35 hatten keine

Auswirkung auf die Ausbildung von Haustorien (Abb. 3.20). Allerdings beeinflussten sie das Wachstum der ESH (Abb. 3.21). Diese beiden Gene scheinen eine Rolle in der späteren Entwicklung des Pilzes zu spielen und nicht für die Ausbildung des Haustoriums verantwortlich zu sein.

Das *Antisense*-Konstrukt gegen den Kandidaten HIGS 47 beeinflusste die Haustorienbildung (Abb. 3.20), wohingegen die Länge der ESH nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.21). HIGS 47 scheint ein Gen zu sein, welches in der frühen Etablierung der Pathogen-Wirts-Beziehung eine wichtige Rolle spielt.

Bruun-Rasmussen et al. (2007) haben nachgewiesen, dass ins BSMV-Genom integrierte Konstrukte mit einer Länge ab etwa 130 Nukleotiden instabil werden. Die in dieser Arbeit verwendeten *Antisense*-Konstrukte hatten eine Länge von 468 Nukleotiden (pT7-BSMV- γ .HIGS 25as), 509 Nukleotiden (pT7-BSMV- γ .HIGS 35as) bzw. 775 Nukleotiden (pT7-BSMV- γ .HIGS 47as) und gelten gemäß den Resultaten von Bruun-Rasmussen et al. als potentiell instabil. Möglicherweise sind die eher geringen Effekte, die bei der Mikroskopie beobachtet wurden, auf die Instabilität der Konstrukte zurückzuführen. Untersuchungen zeigten allerdings, dass die Stabilität eines BSMV-Konstruktes nicht nur von der Länge sondern auch von der Umgebungstemperatur (Bruun-Rasmussen et al., 2007) und der Sequenz (Zhong et al., 2005) abhängt. Hier wurde nicht untersucht, ob die *Antisense*-Konstrukte in allen für die Mikroskopie verwendeten Blättern intakt waren, da dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war.

Bei den VIGS-Experimenten konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das Virus den RNAi-Effekt im Pilz direkt verursacht. Aus *Bgt*, welcher auf BSMV-infizierten Pflanzen gewachsen war, wurde RNA isoliert. Dabei wurde in allen Proben Transkript des α - bzw. β -Genoms von BSMV nachgewiesen (Abb. 3.22). Da keine pflanzlichen Transkripte aus diesen Proben amplifiziert werden konnten, ist es unwahrscheinlich, dass es sich um eine Kontamination der Proben mit pflanzlichem Gewebe, welches das Virus enthielt, handelte.

Dies bedeutet, dass der HIGS-Effekt, welcher bei *Bgt* auf BSMV-infizierten Pflanzen beobachtet wurde, durchaus auf Virus-Partikel zurückzuführen sein kann, welche vom Pilz aufgenommen wurden. Der RNAi-Effekt könnte somit unabhängig von der RNAi-Maschinerie des pflanzlichen Wirts sein und über die RNAi-Maschinerie im Pilz ablaufen.

In den vorliegenden Experimenten ist allerdings nicht nachgewiesen worden, dass das vollständige funktionsfähige Virus im Pilz vorhanden war. Die PCR-Resultate zeigen aber, dass offenbar größere (virale) RNA-Fragmente aus der Pflanzenzelle in den Pilz gelangen können. Die amplifizierte PCR-Produkte hatten eine Größe von 480 bp (BSMV-a) bzw. 510 bp (BSMV-β).

4.1.3 HIGS basiert nicht auf DNA-Übertragung zwischen Wirt und Pathogen

Um der Frage nachzugehen, ob der beobachtete HIGS-Effekt auf die Aufnahme von RNA oder im Fall der TIGS-Experimente von Plasmid-DNA oder im Fall der VIGS-Experimente von Viruspartikel zurückzuführen ist, wurde eine weitere Methode RNAi in einer Pflanze auszulösen genutzt: Es wurden transgene Pflanzen erstellt, welche ein RNAi-Konstrukt gegen ein pilzliches Gen trugen. Zu diesem Zweck wurde wiederum HIGS 47 als Zielgen ausgewählt. In transgenen Pflanzen ist das RNAi-Konstrukt fest in das pflanzliche Genom integriert. Ein RNAi-Effekt, der hier beobachtet wird, kann nicht auf die Aufnahme von Plasmid-DNA durch den Pilz zurückzuführen sein.

Mittels PCR-Reaktionen (Abb. 3.24 und 3.25) und *Northern Blot*-Analysen (Abb. 3.26) wurden drei Gerstenlinien (E12, E25 und E39) identifiziert, welche das Resistenzgen Hygromycin-Phosphotransferase Hpt^r und beide Wiederholungssequenzen des Haarnadel-Konstrukts trugen, und welche das RNAi-Konstrukt auch exprimierten. Die Linie E24 wurde zwar mittels PCR negativ auf das Hpt^r -Gen getestet, allerdings konnten die Wiederholungssequenzen der RNAi-Kassette und die Expression des Transgens nachgewiesen werden. Daher wurde E24 ebenfalls als transgene Linie behandelt.

Die Linie E26 wurde positiv für das Resistenzgen Hpt^r getestet (Abb. 3.25), aber keine der beiden Wiederholungssequenzen des Haarnadel-Konstrukts konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Bei wiederholten *Northern Blot*-Analysen wurde ferner keine Expression des Konstruktes pIPKb007_HIGS 47.2 detektiert (Abb. 3.26). Die Linie E26 enthält somit wahrscheinlich keine vollständige RNAi-Kassette. Aus diesem Grund wurden Pflanzen der Linie E26 in den folgenden Experimenten neben den nicht transformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen (Wildtyp) als Kontrollen eingesetzt.

Die Anfälligkeit gegen *Bgh* wurde an den transgenen Pflanzen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch bestimmt. Bei den makroskopischen Analysen wurde mittels eines

Vier-Klassen-Boniturschemas die mittlere infizierte Blattoberfläche (miB) bestimmt (Schweizer et al., 1995). Pflanzen der nicht exprimierende Linie E26 und des Wildtyp unterschieden sich kaum in ihrer Anfälligkeit. Pflanzen der transgenen Linien E12, E24 und E39 zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine signifikant reduzierte Anfälligkeit gegenüber *Bgh*. Die Anfälligkeit wurde in allen Fällen um etwa 20% reduziert. Pflanzen der Linie E25 reduzierten die miB sogar um 30%, wobei dieser Effekt allerdings statistisch nicht signifikant war (Abb. 3.27).

Für die Pflanzen der Linien E24 und E39 bestätigten die Mikroskopie-Daten (Abb. 3.28) das Ergebnis der Bonitur. Die Pflanzen der Linie E12 zeigten zum Zeitpunkt der Mikroskopie (48 Stunden nach Inokulation) noch keine erhöhte Resistenz (Abb. 3.28), sondern erst sieben Tage nach Inokulation bei der Bonitur (Abb. 3.27). Die *Northern Blot*-Ergebnisse deuteten daraufhin, dass Pflanzen der Linie E12 das Transgen deutlich schwächer exprimieren als Pflanzen der Linie E39 und auch etwas schwächer als Pflanzen der Linie E24 (Abb. 3.26). Bei der Mikroskopie 48 Stunden nach Inokulation war eventuell noch nicht genug siRNA oder dsRNA in den Pilz übergegangen, um RNAi effektiv auszulösen. In *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass zwar schon wenige Moleküle dsRNA genügen um *Silencing* auszulösen, aber der beobachtete Effekt ist dann nicht sehr ausgeprägt (Fire et al., 1998). Möglicherweise war der HIGS-Effekt auf Pflanzen der Linie E12 48 Stunden nach Inokulation noch so gering, dass er nicht detektierbar war.

4.1.4 Versuchter Nachweis einer veränderten Transkriptabundanz im Pilz

Bei RNAi im Pilz sollte sich ein reduzierter Transkriptgehalt des Zielgens nachweisen lassen. Dies wurde sowohl mit *Bgt* auf BSMV-infizierten Pflanzen als auch mit *Bgh* auf transgenen Pflanzen versucht.

Es konnte kein Unterschied in der Transkriptabundanz von HIGS 47 in epiphytischen Pilzstrukturen von *Bgt* isoliert von BSMV-infizierten Pflanzen, die entweder den pT7-BSMV- γ .MCS-Kontrollstamm, den pT7-BSMV- γ .PDSas- oder pT7-BSMV- γ .HIGS 47as-Stamm trugen, festgestellt werden (Abb. 3.23). Dies könnte darauf beruhen, dass das Virus sich nicht gleichmäßig in der Pflanze verteilt. Hein et al. (2005) stellten fest, dass die in ihren Experimenten beobachtete Durchbrechung der *Mla*-Resistenz der Gerste gegen *Bgh* nur auf begrenzten Bereichen der Blätter von BSMV-infizierten Pflanzen auftrat. In den hier durchgeführten Experimenten war es schwer festzustellen, ob der beobachtete Phänotyp nur

auf bestimmte Bereiche der Blätter beschränkt blieb, da keine vollständige sondern nur eine leicht erhöhte Resistenz festgestellt wurde. Dies bringt auch das inhärente Problem mit sich, dass bei RNA-Extraktionen aus dem Pilz gegen die Hyphen selektioniert wurde, in denen HIGS wirksam war und die, als Folge, nicht weiterwuchsen oder abstarben. Mit diesem Versuch war es daher nicht möglich, Kenntnisse darüber zu erlangen, ob HIGS wirklich im Pilz gewirkt hat.

Nachdem die Analyse der Transkriptabundanz von HIGS 47 in *Bgt* auf BSMV-infizierten Pflanzen negative Ergebnisse gebracht hatte, wurde diese Analyse mit *Bgh*, welcher auf den HIGS 47-transgenen Pflanzen gewachsen war, erneut durchgeführt. Zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die epiphytischen *Bgh*-Strukturen geerntet und RNA aus ihnen isoliert. Mittels *real time*-PCR wurde der Transkriptgehalt von HIGS 47 untersucht (Abb. 3.29).

Die Transkriptanalysen zeigten keine deutliche Reduktion des HIGS 47-Transkriptgehalts relativ zur Kontrolle (Abb. 3.29). *Bgh* auf Pflanzen der Linie E39 zeigte allerdings einen erhöhten HIGS 47-Transkriptgehalt zu den Zeitpunkten drei und acht Tage nach Inokulation. Eventuell deutet der erhöhte Transkriptgehalt auf eine Reaktion des Pilzes zur Kompensation des RNAi-Effektes hin. Die Pflanzen der Linie E39 exprimieren nach *Northern Blot*-Daten (Abb. 3.26) das RNAi-Konstrukt stärker als die anderen Linien, weshalb man auf diesen Pflanzen einen stärkeren RNAi-Effekt erwarten würde. Die Unterschiede in der Penetrationsrate (Abb. 3.28) bzw. der mittleren infizierten Blattoberfläche (Abb. 3.27) zwischen Pflanzen der Linie E39 und Pflanzen der transgenen Linien E12, E24 und E25 sind allerdings gering. Der erhöhte HIGS 47-Transkriptgehalt deutet daraufhin, dass der Pilz als Reaktion auf den RNAi-Effekt die Transkriptionsrate dieses Gens erhöht hat und deshalb ähnliche Penetrationsraten auf Pflanzen der Linie E39 zeigt wie auf Pflanzen der anderen drei transgenen Linien.

Das Monoglyzeridlipase-Gen, welches zur Normalisierung der Transkriptabundanz verwendet wurde, ist während der Interaktion von *Bgh* mit Wildtyp-Gerste kaum reguliert (Both et al, 2005a). Wir wissen allerdings nicht wie sich das *Silencing* von HIGS 47 auf das gesamte Transkriptom des Pilzes auswirkt und ob andere Gene wie z.B. das der Monoglyzeridlipase beeinflusst werden. Manchmal wird durch das *Silencing* eines Gens eine Kettenreaktion im Organismus ausgelöst, die die Expression anderer Gene beeinflusst. Wie für die VIGS-Experimente bereits diskutiert, könnte auch auf den transgenen Pflanzen eine Selektion gegen die pilzlichen Kolonien stattgefunden haben, in denen HIGS 47 in

seiner Expression unterdrückt war und die in ihrem Wachstum gehemmt und somit in der RNA-Probe unterrepräsentiert waren. Man müsste eventuell einzelne Mehltaukolonien analysieren, bei denen eine Veränderung im Wachstum sichtbar ist. Allerdings dürfte sich die Ernte einer einzelnen Kolonie als äußerst schwierig erweisen.

Dieses Problem zeigte sich möglicherweise ebenfalls in ähnlichen Experimenten, die mit Wurzelgallennematoden durchgeführt worden. Huang et al. (2006) zeigten, dass *Arabidopsis thaliana*, welche RNAi-Konstrukte gegen das Wurzelgallennematoden-Gen 16D10 exprimieren, geschützt sind gegen die Besiedlung durch *Meloidogyne* spp. Es sind aber keine Daten über den Transkript-Gehalt von 16D10 in Nematoden, die auf den transgenen Pflanzen siedelten, gezeigt.

Fairbairn et al. (2007) führten Untersuchungen mit *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, welche RNAi-Konstrukte gegen den Transkriptionsfaktor MjTis11 aus *Meloidogyne javanica* exprimierten, durch. Obwohl sie keine Reduktion der Fruchtbarkeit oder der Schlupf-Rate bei den Nematoden beobachten konnten, gelang ihnen der Nachweis, dass die Transkriptabundanz von MjTis11 in Wurzelgallen von transgenen Pflanzen reduziert war.

Die Suche nach einem Konstrukt, welches zwar RNAi in *B. graminis* auslöst, aber keinen letalen Effekt hat, wäre also eine attraktive Möglichkeit RNAi direkt im Pilz nachzuweisen. Gut geeignet wären Konstrukte gegen Gene, die z.B. die Pigmentierung des Pilzes oder die Morphologie der Hyphen beeinflussen. Allerdings sind solche Gene in *B. graminis* noch nicht bekannt.

4.2 Die Kandidatengene

In diesem Kapitel werden die Kandidatengene, die den RNAi-Konstrukten mit signifikanten Effekten im Gersten-*Bgh*-Systems zugrunde liegen, diskutiert. Zu Kandidaten, bei denen RNAi keinen Effekt auf die Anfälligkeit des Systems hatte, ist keine Aussage möglich, da es sich möglicherweise um falschnegative Ergebnisse handelt.

4.2.1 Kandidaten, welche das Gersten-*Bgh*-Systems signifikant beeinflusst hatten

RNAi gegen 10 unterschiedliche Gene aus *B. graminis* führte zu reduzierter Anfälligkeit. Diese Kandidatengene lassen sich aufgrund ihrer Funktion nicht in eine bestimmte Gruppe einordnen (Tab. 4.1). Es gibt Gene, deren Produkte am Stoffwechsel (HIGS 2 und HIGS 9)

oder am Transport (HIGS 32) beteiligt sind. Diese Gene haben wahrscheinlich keine spezifische Virulenzfunktion in der Wirt-Pathogen-Beziehung, sondern sind an der Aufrechterhaltung der allgemeinen Stoffwechselfunktionen in der Zelle beteiligt. Wenn eines dieser Gene (oder eine ganze Genfamilie) durch RNAi ausgeschaltet wird, stirbt der Pilz ab. Bei der Bewertung dieser RNAi-Experimente darf nicht vergessen werden, dass für keines dieser Konstrukte geklärt ist, ob nur ein Gen oder vielleicht mehrere verwandte Gene z.B. einer Genfamilie ausgeschaltet wurden.

Hingegen könnten die Kandidaten HIGS 25 und HIGS 47, die am Zellwand-Metabolismus beteiligt sind, durchaus spezifisch für die Wirt-Pathogen-Interaktion sein (siehe Kapitel 4.2.2). Ebenso sind Proteasen (HIGS 35) und Peptidasen (HIGS 20) potentielle Pathogenizitätsfaktoren (Bindschedler et al., 2003; Xia et al., 2004). Betrachtet man die Expressionsmuster der Kandidaten (Abb. 4.1) zeigen diese vier Kandidaten ein ähnliches Expressionsmuster wie Cap20, welches aus *Colletotrichum gloeosporioides* als wichtiger Faktor bei der Virulenz bekannt ist (Hwang et al., 1995).

Tab. 4.1: Funktionen der Genprodukte der Kandidaten

	Funktion des Genprodukts	Klasse
HIGS 2	Riboflavin-Aldehyde-formendes Enzym	Primär-Metabolismus
HIGS 9	3-oxo-5-a-Steroid 4-Dehydrogenase	Lipid-, Fettsäure- und Isoprenid-Metabolismus
HIGS 13	unbekannt	
HIGS 20	Serin-Carboxypeptidase	Proteinabbau
HIGS 25	β -1,3-Glukanosyltransferase	Zellwand-Metabolismus
HIGS 31	Hitzeschock-Protein 70	Stress
HIGS 32	ADP-ATP Translokase	Transport
HIGS 35	Serin-Protease	Proteinabbau
HIGS 36	unbekannt	
HIGS 47	β -1,3-Glukanosyltransferase	Zellwand-Metabolismus

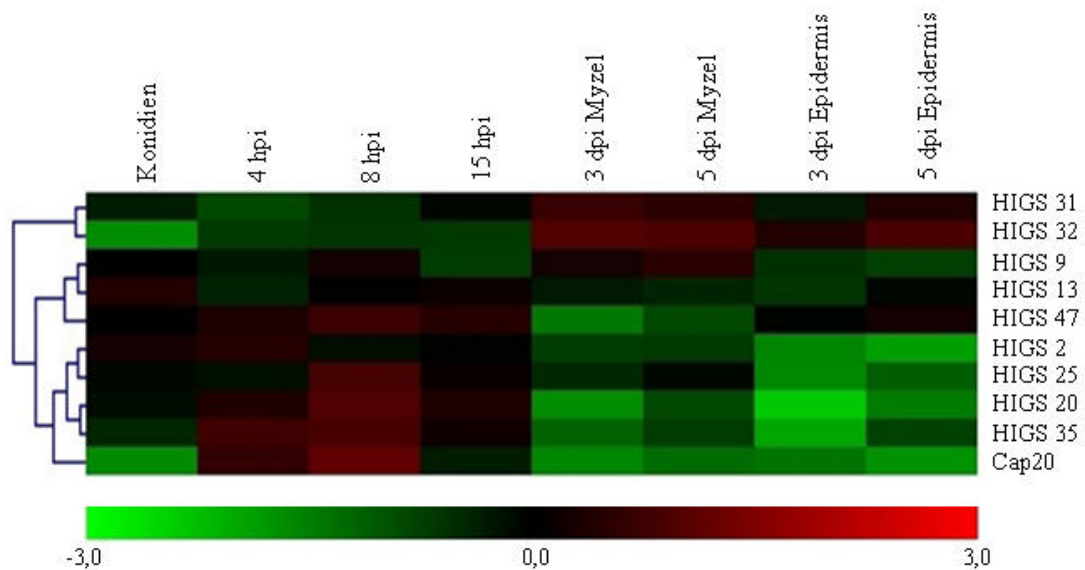


Abb. 4.1: Expressionsmuster der Kandidaten, welche signifikante Veränderung der Anfälligkeit in den TIGS-Experimenten verursacht hatten

Die Expressionsdaten entstammen Array-Analysen von Both et al. (2005b). Die Daten wurden Median-zentriert und die euklidische Distanz berechnet. Um die Expressionsdaten für die HIGS-Kandidaten zu ermitteln, wurden die Daten von EST-Sequenzen mit hoher Homologie zum Kandidatengen (e-Wert = 1×10^{-100}) gemittelt (Tab. 6.22).

Einige Kandidaten (HIGS 31 und HIGS 32) zeigen sogar ein gegenläufiges Expressionsprofil und werden erst drei Tage nach Inokulation hochreguliert. Sie haben also wahrscheinlich keine Funktion bei der Etablierung der Wirt-Pathogen-Beziehung.

Es scheint mit HIGS also möglich zu sein sowohl Gene, deren Produkte an allgemeinen Stoffwechsel-Prozessen beteiligt sind zu untersuchen, als auch Gene, deren Produkte für die Wirt-Pathogen-Interaktion wichtig sind.

4.2.2 Die Kandidaten HIGS 25 und HIGS 47

Zwei der Kandidatengene zeigen bei blast-Analysen hohe Homologie zu β -1,3-Glukanosyltransferasen. Dies sind Enzyme, die über Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die äußere Seite der Plasmamembran von Pilzen gebunden sind (Popolo et al., 1993), wo sie am Aufbau der Zellwand beteiligt sind. Die β -1,3-Glukanosyltransferase hydrolysiert β -1,3-Glukan-Moleküle und transferiert das neue reduzierende Ende auf ein nicht-reduzierendes Ende eines anderen β -1,3-Glukan-Moleküls. Dadurch werden β -1,3-Glukan-Seitenketten verlängert (Mouyna et al., 2000).

Caracuel et al. (2005) erzeugten eine Mutante in *Fusarium oxysporum* (Δ gas1-Mutante), welcher ein Gen mit starker Ähnlichkeit zu dem Gas1-Gen aus Hefe fehlt, das für eine β -1,3-Glukanosyltransferase kodiert. Die Δ gas1-Mutante in *F. oxysporum* zeigte reduziertes Wachstum auf festem Substrat, und außerdem konnte eine stark reduzierte Virulenz auf Wurzeln und Früchten von Tomatenpflanzen nachgewiesen werden.

Während Untersuchungen bei Human-Pathogenen darauf hinweisen, dass die β -1,3-Glukanosyltransferasen selbst als pilzliche Antigene vom Wirt erkannt werden (Delgado et al., 2003; Arroyo et al., 2007), wird bei Phytopathogenen eine andere Hypothese diskutiert. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine Δ Gas1-Mutante untersucht, welche vermehrt β -1,3-Glukan in das Medium abgibt (Ram et al., 1998). Glukan ist als Elizitor bei Pflanzen-Phytopathogen-Beziehungen bekannt (Hahn, 1996). Dies könnte den Effekt erklären, der in den hier vorgestellten RNAi-Experimenten mit HIGS 47 beobachtet wurde. Möglicherweise gab *B. graminis* nach *Silencing* des HIGS 47-Gens vermehrt Glukan-Moleküle ab und wurde daher leichter von der Wirtszelle erkannt, was zu einer Verminderung der Anfälligkeit führte.

β -1,3-Glukanosyltransferasen sind aus vielen Pilzarten bekannt und gehören zur GH72 (*Glycoside hydrolase*)-Familie wie in der CAZY- (*Carbohydrate active enzymes*)-Datenbank (<http://www.cazy.org/>) beschrieben. In *Saccharomyces cerevisiae* hat man bereits fünf Mitglieder gefunden (GAS1 bis GAS5; Ragni et al., 2007), in *Aspergillus fumigatus* kennt man drei Vertreter (GEL1 bis GEL3), und von *Magnaporthe grisea* sind vier Sequenzen in der CAZY-Datenbank verfügbar. In *B. graminis* haben wir zwei β -1,3-Glukanosyltransferasen gefunden. Wir bezeichnen sie als *BgGTF1* (HIGS 47) und *BgGTF2* (HIGS 25). Die Nukleinsäuresequenzen haben nur eine geringe Ähnlichkeit zueinander, und lassen sich nicht *alignen*. Dies bestätigt die Annahme, dass mit den verschiedenen RNAi-Konstrukten immer nur das Zielgen und nicht das andere GTF-Gen *silenced* worden ist. Die bekannten Aminosäuresequenzen zeigen untereinander eine Übereinstimmung von 40% (blastp in NCBI bl2seq; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Eine ähnlich geringe Übereinstimmung wurde auch für GEL1 und GEL2 in *Aspergillus fumigatus* beschrieben. Ebenso wie bei *BgGTF1* und *BgGTF2* führen die Deletionen von *AfGel1* bzw. *AfGel2* zu unterschiedlichen Phänotypen. So zeigt eine Δ gel1-Mutante keinen Wachstums-Phänotyp während eine Δ gel2-Mutantion zu reduziertem Wachstum führte (Mouyna et al., 2005). RNAi gegen *BgGTF1* führte zu einer verminderten Penetrationseffizienz, welche eventuell auf die vermehrte Abgabe von Elizitoren zurückzuführen ist. RNAi gegen

BgGTF2 führte zu einem reduzierten Hyphenwachstum. Scheinbar handelt es sich um zwei Gene einer Familie, die sich aber in ihrer Funktion unterscheiden wie *AfGel1* und *AfGel2*. Interessant wäre die Suche nach weiteren β -1,3-Glukanosyltransferasen in *B. graminis*. Vielleicht würde RNAi *in planta* gegen alle β -1,3-Glukanosyltransferasen sogar zu vollständiger Resistenz führen.

4.3 Erkenntnisse über das *Host-induced gene-silencing* (HIGS)

4.3.1 Hypothesen zur Funktionsweise von HIGS

Es konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Anfälligkeit in der Gersten-*Bgh*- und der Weizen-*Bgt*-Interaktion erzielt werden indem RNAi-Konstrukte gegen unterschiedliche *B. graminis*-Gene *in planta* exprimiert wurden. Der Wirkungsmechanismus konnte aber bis jetzt nicht im Detail geklärt werden. Im Folgenden werden drei Arbeitshypothesen formuliert.

A) Aufnahme von Plasmid-DNA oder Viruspartikeln durch den Pilz.

Bei der beobachteten Reduktion der Anfälligkeit in den TIGS-Experimenten könnte es sich um einen Artefakt handeln, welcher auf die angewandte Methode zurückzuführen ist. Durch das Beschießen der Getreideblätter mit Goldpartikeln, an deren Oberfläche Plasmid-DNA gebunden ist, gelangt wahrscheinlich auch DNA auf die Blattoberfläche. Dies geschieht z.B. wenn Goldpartikel in der Kutikula stecken bleiben. Außerdem ist es möglich, dass die Goldpartikel DNA abstreifen, wenn sie die Kutikula durchdringen. Diese DNA wäre an der Oberfläche des Blattes für den Pilz verfügbar, nachdem das Konidium dort gelandet ist. Über die Fähigkeit von *B. graminis* Stoffe, speziell DNA, von der Blattoberfläche aufzunehmen ist nicht viel bekannt. Nielsen et al. (2000) haben gezeigt, dass ein Farbstoff in das Konidium eindringen kann, der auf eine künstliche Oberfläche gegeben wurde. Ob hier aktive Aufnahme beteiligt ist, ist nicht geklärt. Der primäre Keimschlauch scheint für Wasseraufnahme aus dem Wirt (Carver & Bushnell, 1983) und Aufnahme von anorganischen Substanzen verantwortlich zu sein (Kunoh et al., 1978; Carver & Ingerson, 1987). Dabei könnte zufällig auch Plasmid-DNA oder Fragmente des Plasmids aufgenommen werden. Ascomyceten sind in der Lage den CaMV 35S-Promotor, welcher der in den TIGS-Experimenten verwendeten RNAi-Kassette vorgeschaltet ist (Abb. 2.1), zu nutzen (Hirt et al., 1990). Enthält das aufgenommene DNA-Fragment eine vollständige

RNAi-Kassette, die exprimiert werden kann, wird die Expression des entsprechenden Gens im Pilz gehemmt. RNA-vermitteltes Gen-*Silencing* in Ascomyceten ist weit verbreitet und für viele Arten beschrieben (Romano & Macino, 1992; Kadotani et al., 2003; Nakayashiki et al., 2005; Henry et al., 2007). Auch im Transkriptom von *B. graminis* wurden Gene gefunden, welche für Komponenten der RNAi-Maschinerie kodieren (Zhang et al., 2005). Der beobachtete Effekt könnte somit auf Gen-*Silencing* beruhen, welches vollständig im Pilz abläuft.

Auch für die VIGS-Experimente ist es denkbar, dass der beobachtete Effekt unabhängig von der RNAi-Maschinerie des Wirtes ist. Mittels PCR konnte BSMV-Transkript im den epiphytisch gewachsenen Pilzstrukturen nachgewiesen werden. Es ist nicht bekannt, ob *B. graminis* im Stande ist ganze BSMV-Partikel aus der Wirtszelle aufzunehmen. Möglicherweise gelangen die einzelnen RNA-Komponenten des Virus auch getrennt voneinander in den Pilz, wo sie trotz der geringen Abundanz, möglicherweise *Silencing* auslösen.

Die HIGS 47-transgenen Pflanzen erbrachten den entscheidenden Hinweis darauf, dass der HIGS-Mechanismus *in planta* transkribierte dsRNA einbezieht. Das RNAi-Konstrukt ist stabil in das Pflanzengenom integriert, und eine DNA-Aufnahme durch den Pilz praktisch ausgeschlossen. Unklar bleibt ob das *Silencing* im Pilz oder in der Wirtszelle stattfindet. Nimmt der Pilz RNA aus der Pflanzenzelle auf und wird dadurch RNAi im Pilz ausgelöst? Oder sekretiert *B. graminis* mRNA in die Pflanzenzelle, um vielleicht die pflanzliche Abwehrreaktion zu unterdrücken oder den pflanzlichen Stoffwechsel zu seinen Gunsten zu beeinflussen? Die beiden folgenden Hypothesen beschäftigen sich mit diesen Fragen.

B) Der Pilz sekretiert RNA in die Wirtszelle.

Von Agrobakterien ist es seit langer Zeit bekannt, dass es ihnen möglich ist DNA in das Genom ihrer Wirtszelle zu integrieren (Gelvin, 2003; McCullen & Binns, 2006).

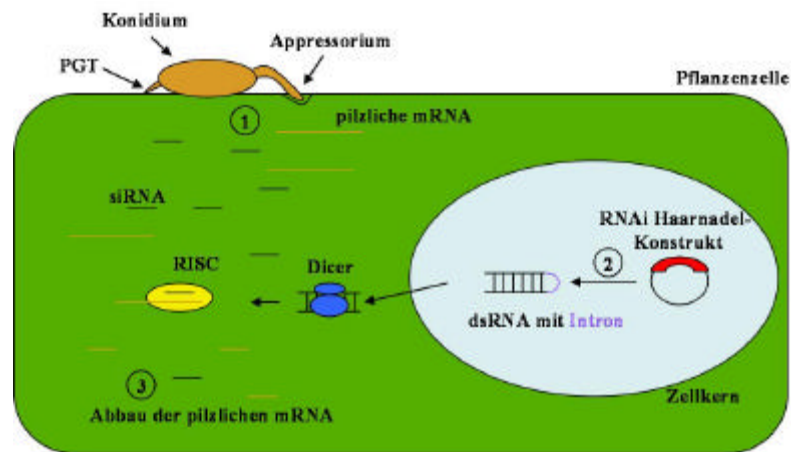


Abb. 4.2: Abbau von sekretierter mRNA von *B. graminis* in der pflanzlichen Wirtszelle

B. graminis könnte mRNA in die Wirtszelle sekretieren (1), um den Stoffwechsel des Wirts zu manipulieren. Wenn die Wirtszelle ein RNAi-Konstrukt gegen diese pilzliche mRNA exprimiert (2), wird die mRNA abgebaut (3) ohne den Stoffwechsel des Wirts zu beeinflussen.

Vielleicht nutzt *B. graminis* eine ähnliche Methode, um seine Wirte zu manipulieren und exportiert RNA in die Wirtszelle (Abb. 4.2). Es ist bekannt, dass in pflanzlichen Zellen, die von einem obligat biotrophen Pathogen befallen sind, die Seneszenz verlangsamt wird. Dies wurde als *Green Island*-Effekt beschrieben (Scholes & Rolfe, 1996; Hückelhoven, 2005). Die zugrunde liegenden molekularen Prozesse sind aber bisher nicht völlig entschlüsselt. Es wird diskutiert, dass der Pilz Proteine sekretiert, um die Pflanze zu beeinflussen (Kemen et al., 2005). Die Möglichkeit, dass auch RNA sekretiert wird, wurde bisher experimentell nicht ausgeschlossen.

In dieser Arbeit wurde versucht, über Einzellzellanalysen nachzuweisen, ob *B. graminis* RNA in die Wirtszelle sekretiert. Dazu wurde aus einzelnen *Bgh*-infizierten Gerstenzellen mit einer Glaskapillare Zytoplasma entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass das in der Pflanzenzelle vorhandene Haustorium nicht beschädigt wurde und auch keine epiphytischen Pilzstrukturen verletzt wurden. In jeder Probe, welche *Bgh*-infizierten Gerstenzellen entstammte, konnte aber neben pilzlicher RNA auch mitochondriale DNA des Pilzes nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Die Extrakte waren offensichtlich, trotz der Vorsichtsmaßnahmen, durch Zytoplasma aus dem Haustorium verunreinigt. Eine Erklärung dafür könnte im plötzlichen Druckabfall, welcher beim Anstechen der Pflanzenzelle auftritt, liegen. Wenn die Glaskapillare ins Zellinnere eindringt, wird durch den in der Zelle herrschenden Turgor der Zellinhalt in die Glaskapillare gedrückt und der Zelldruck schlagartig auf 1 bar gesenkt (Karrer et al., 1995). Dieser Druckabfall kann Zytoplasma samt mRNA und Mitochondrien aus dem Haustorium austreten lassen, wenn z.B. Haustorienfinger aufplatzen.

Diese Experimente sind kein Beweis für das Vorhandensein von pilzlichen Transkripten in der Wirtszelle, aber bisher konnte diese Möglichkeit auch nicht ausgeschlossen werden.

C) Der Pilz nimmt RNA aus der Wirtszelle auf.

Da bei den TIGS-Experimenten eine reduzierte Haustorien-Anzahl beobachtet werden konnte (Abb. 3.2), muss die Aufnahme des Überträgers von RNAi durch den Pilz zu einem frühen Zeitpunkt des Kontakts erfolgen. RNAi wird offensichtlich im Pilz ausgelöst, bevor das Haustorium in der Zelle etabliert worden ist. Es wurde kein vermehrtes Auftreten von unreifen Haustorien beobachtet. Das entsprechende Szenario könnte folgendermaßen aussehen.

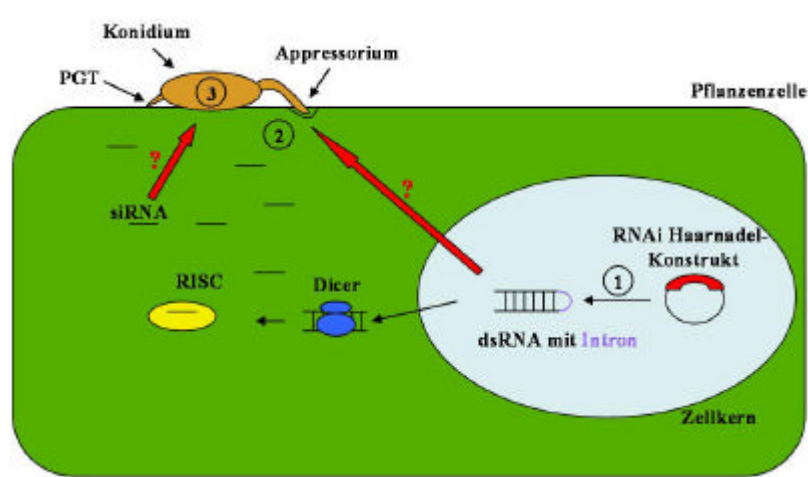


Abb. 4.3: Aufnahme von Komponenten der RNAi-Maschinerie des Wirtes durch *B. graminis*

Die Wirtszelle exprimiert ein RNAi-Konstrukt gegen ein pilzliches Gen (1) und bildet dsRNA und siRNA-Moleküle. Möglicherweise nimmt der Pilz dsRNA oder siRNA-Moleküle aus dem Wirt auf (2) und RNAi im Pilz wird eingeleitet (3).

Die Pflanze exprimiert ein RNAi-Konstrukt und es wird dsRNA gebildet, die im Zytoplasma zu siRNA-Molekülen abgebaut wird. Wenn das RNAi-Konstrukt mit einem starken Promotor versehen ist, liegen dsRNA oder siRNA-Moleküle in großer Anzahl in der Pflanzenzelle zum Zeitpunkt der Herstellung des Kontaktes zwischen Pilz und Wirt vor (Abb. 4.3). Der PGT reicht nicht bis ins Zytoplasma der Wirtszelle (Edwards, 2002) und kann daher nicht für die RNA-Aufnahme verantwortlich sein. Aus dem AGT wachsen das Appressorium und der Infektionsschlauch aus und durchdringen die Zellwand des Wirts nicht aber seine Plasmamembran. Es sind keine Berichte bekannt, die einen Hinweis über einen gerichteten Transport von Nukleinsäuren über die Plasma membran der Pflanze in den Pilz liefern könnten. RNAi verbreitet sich zwar systemisch in der Pflanze, aber sowohl Langstrecken- als auch Kurzstreckentransport laufen über den Symplasten ab (siehe Kapitel

1.4.1). Zumindest deutet der Nachweis von BSMV-Transkripten in *Bgt*, der auf BSMV-infizierten Pflanzen wuchs, darauf hin, dass der Pilz durchaus fähig ist längere RNA-Fragmente aufzunehmen (Abb. 3.22).

Eine Möglichkeit für die Aufnahme von dsRNA durch den Pilz ist die Endozytose. Endozytose spielt eine wichtige Rolle in vielen Aspekten der pilzlichen Entwicklung und tritt schon in sehr frühen Stadien auf. Sie wurde bei vielen unterschiedlichen Pilz-Arten beobachtet (Fischer-Parton et al., 2000). Endozytose spielt in *Ustilago maydis* beim Hyphenwachstum und der Sporenbildung eine Rolle (Fuchs & Steinberg, 2005; Fuchs et al., 2006). Bei *Magnaporthe grisea* wird die Beteiligung von Endozytose u.a. bei der Erkennung des Wirts und Transport und Recycling von Membran-Proteinen und –Lipiden diskutiert (Atkinson et al., 2002). Bei der Infektion eines Wirts werden über Exozytose viele Komponenten abgegeben. Dazu gehören lytische Enzyme oder adhesive Materialien (Braun & Howard, 1994). Endozytose scheint auch zu diesem Zeitpunkt bedeutend zu sein. Es werden nicht nur Komponenten des Wirts aufgenommen, sondern auch überschüssige Membran, welche bei Exozytose an die äußere Plasmamembran des Pilzes transportiert wurde, wird wieder entfernt (Atkinson et al., 2002). Von *B. graminis* ist bekannt, dass er lytische Enzyme einsetzt, um die Wirtszellwand zu durchdringen (Francis et al., 1996; Pryce-Jones et al., 1999). Nachdem die Enzyme sekretiert wurden, wäre Endozytose ein logischer Schritt, um einerseits Zellwandkomponenten des Wirts als Signalmoleküle aufzunehmen und andererseits überflüssige Membran von der äußeren Plasmamembran wieder dem inneren Membransystem zuzuführen. Endozytose bedeutet aber, dass Komponenten von außerhalb in einem Vesikel eingeschlossen werden und zu bestimmten Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat oder der Vakuole transportiert werden. Daher ist es fraglich, ob dsRNA auf diesem Weg in das Zytoplasma oder den Zellkern des Pilzes gelangen und dort RNAi auslösen könnte.

Die siRNA-Moleküle dagegen sind nur 21 Nukleotiden lang. Diese kleinen Moleküle könnten durchaus zufällig in den Pilz transportiert werden (,hitchhiking'-Mechanismus). Sie könnten durch Tunnelproteine, die normalerweise deutlich größere, ebenfalls negativ geladene Moleküle transportieren, eindringen. Allerdings wird es zum Beginn des Kontaktes zwischen Wirt und Pathogen kaum Proteine geben, die die beiden miteinander verbinden.

Die Aufnahme von anderen Komponenten wie Dicer oder RISC, welche dsRNA oder siRNA gebunden haben, scheint unwahrscheinlich, da es sich um sehr große Proteinkomplexe handelt (Pickford & Cogoni, 2003).

4.3.2 Vorerst keine Beweise für *Silencing* im Pilz

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich zu zeigen, dass die Transkriptabundanz von Zielgenen in *B. graminis* herunterreguliert wurde. Sowohl mit Pilzmyzel von BSMV-infizierten Pflanzen als auch mit Pilzmyzel von transgenen Pflanzen, welche RNAi gegen HIGS 47 exprimierten, wurde erfolglos versucht mittels *real time*-PCR eine Veränderung des Transkriptlevels im Pilz festzustellen (siehe Kapitel 4.1.4).

Der stärkste Hinweis für HIGS, der mit unterschiedlichen Methoden erbracht wurde, ist die Zugehörigkeit der Kandidaten zum *B. graminis*-Transkriptom. Solange weder die Genomsequenz von Gerste noch die des Weizens vollständig bekannt ist, wird es allerdings schwierig sein nachzuweisen, dass kein Pflanzengen durch die eingebrachten Konstrukte ausgeschaltet wurde. Eventuell könnten Array-Experimente mit den transgenen Gerstenpflanzen weiterhelfen. Man könnte überprüfen, ob Gerstengene in den Pflanzen, die das RNAi-Konstrukt gegen HIGS 47 tragen anderes reguliert sind als in Wildtyp-Pflanzen.

Die Anzahl und die Diversität der Kandidaten, welche eine statistisch signifikante Reduktion der Anfälligkeit des Getreide-Mehltau-Systems verursacht hatten, ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass es sich nicht um *off target*-Effekte gegen pflanzliche Gene handelt. Es ist durchaus möglich, dass der ein oder andere beobachtete Effekt auf *Silencing* von pflanzlichen Genen beruht, wie bei dem Kandidaten HIGS 6 (siehe Kapitel 3.3.1). Ein Vergleich mit Daten aus Experimenten mit RNAi-Konstrukten gegen pathogeninduzierte Gerstengene (unveröffentlichte Daten) spricht jedoch dafür, dass dies nur für wenige Kandidaten der Fall ist. Für eine willkürliche Auswahl von RNAi-Konstrukten gegen Gerstengene, wurden zwei Experimente im TIGS-System durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet. Von 52 RNAi-Konstrukten gegen Gerstengene erhöhen 36,5% den relativen HI auf über 100% und 63,5% verringern ihn unter 100%. Von 30 RNAi-Konstrukten gegen *B. graminis*-Gene erhöhen nur 13,3% den relativen HI auf über 100% und 86,7% verringern ihn unter 100%. Dieser Unterschied ist im χ^2 -Test mit einem p-Wert von 0,0121 signifikant. Würde man davon ausgehen, dass diese 30 RNAi-Konstrukte ebenfalls hauptsächlich Gerstengene ausschalten, dann sollte die Verteilung des relativen HI gleich sein. Es besteht also kein Grund zur Annahme, dass in den beschriebenen Experimenten in erster Linie Gerstengene mittels RNAi ausgeschaltet wurden.

Bei HIGS handelt es sich hier außerdem um kein völlig neuartiges System. Aus Nematoden ist es schon länger bekannt und wurde anhand mehrerer Beispiele beschrieben (Huang et al., 2006; Yadav et al., 2006; Fairbairn et al., 2007). In diesem Pathosystem gelang auch bereits der Nachweis, dass der Transkriptgehalt des Zielgens in den Nematoden reduziert wurde (Yadav et al., 2006; Fairbairn et al., 2007).

4.3.3. Ausblicke

Die dem HIGS-System zugrunde liegenden molekularen Mechanismen konnten in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es wurden drei unterschiedliche Hypothesen aufgestellt. Die Hypothese, dass der HIGS-Effekt nur auf einem Artefakt des Einzelzellsystems beruht, indem der Pilz DNA von der Oberfläche des Wirts aufnimmt, konnte durch die Resultate mit den transgenen Pflanzen widerlegt werden. Ob eine der beiden anderen Hypothesen zutrifft, bleibt noch zu untersuchen. Möglicherweise wirkt HIGS auch je nach Zielsequenz entweder in der Pflanzenzelle oder im Pilz und beide Hypothesen treffen zu. Diese müsste noch näher untersucht werden, wofür es mehrere Optionen gibt:

Mittels *in situ*-Hybridisation könnte sich eventuell der *Antisense*-Strang der dsRNA in den pilzlichen Strukturen nachweisen lassen. Dies wäre auch eine Möglichkeit Transkripte, die der Pilz sekretiert hat, in der pflanzlichen Zelle nachzuweisen (Matsuda et al., 1997). Ferner könnte so die Reduktion der Zielgen-RNA im Pilz untersucht werden.

Mittels *Microdissection* könnte man eventuell den Pilz, der auf transienten Wirtszellen, welche RNAi gegen ein pilzliches Gen exprimieren, gewachsen ist und reduziertes Wachstum aufweist, abtrennen (Kehr, 2003). In diesem ausgewählten Material müsste sich der reduzierte Transkriptgehalt des Zielgens nachweisen lassen, wenn HIGS wirklich die Expression von Genen aus *B. graminis* unterdrückt.

Es gibt die Möglichkeit siRNA-Moleküle mit einem Farbstoff zu markieren (Williams et al., 2004). Die markierten siRNA-Moleküle könnten in die pflanzliche Wirtszelle eingebracht werden. Man müsste die markierten siRNA-Moleküle im Pilz nachweisen können, wenn sie die Moleküle sind, welche RNAi in den Pilz übertragen.

Die Wahl eines anderen Phytopathogens würde viele neue Optionen eröffnen. Dazu müsste man sich allerdings von den obligat biotrophen Pilzen trennen und HIGS an hemibiotrophen Phytopathogenen untersuchen. Da auch hemibiotrophe Pathogene eine Phase durchlaufen, in

der sie sich biotroph ernähren (Mendgen & Hahn, 2002), sollte HIGS hier anwendbar sein. Die Getreide-Pathogene *Magnaporthe* sp., *Fusarium* sp. oder *Colletotrichum* sp. würden bedeutende Vorteile bringen, da hier die Möglichkeit besteht den Pilz zu transformieren, Mutanten vorliegen und das Genom einiger Pathogene bereits sequenziert worden ist (<http://www.broad.mit.edu/annotation/cgi/>).

Man könnte versuchen mittels HIGS den charakteristischen Phänotyp einer bekannten Mutante zu phänokopieren.

Man könnte einen hemibiotrophen Pilz auf Medium wachsen lassen, welches dsRNA oder siRNA-Moleküle enthält oder damit beschichtet ist, um nachzuweisen, dass die Aufnahme von RNA-Molekülen möglich ist.

Man könnte ein transformiertes GFP (*green fluorescent protein*)-exprimierendes Pathogen auf einem pflanzlichen Wirt wachsen lassen, der RNAi gegen GFP exprimiert und beobachten, ob die GFP-Fluoreszenz abnimmt oder ganz erlischt.

Dies ist nur eine kleine Auswahl an möglichen Experimenten an hemibiotrophen Pathogenen mit denen man zweifelsfrei beweisen könnte, ob das durch HIGS verursachte *Silencing* im Pilz stattfindet.

Eine interessante Frage ist auch, ob HIGS in nekrotrophen Pilzen stattfindet. Nekrotrophe Pilze gehen keine intime Interaktion mit dem Wirt ein, sondern töten die Wirtszelle mit toxischen Substanzen und lytischen Enzymen ab und ernähren sich von der abgestorbenen Zelle (z.B. *Botrytis cinerea*, van Kan, 2006). RNA ist nicht sehr stabil und würde wahrscheinlich in der abgestorbenen Zelle schnell abgebaut werden. Vielleicht liegen aber dsRNA und siRNA lange genug stabil vor, um vom Pilz aufgenommen zu werden und RNAi auszulösen.

4.3.4. Anwendungsmöglichkeiten von HIGS

HIGS bietet die Möglichkeit zur Untersuchung von Genfunktionen in obligat biotrophen Pilzen. Dies war bisher nicht möglich (siehe auch Kapitel 1.4.2.4). HIGS könnte nicht nur zur Erforschung von Pathogenen, sondern auch zur Erforschung von Pilzen, die in Symbiose mit Pflanzen leben, beitragen.

HIGS bietet die Möglichkeit eines auf dsRNA basierenden antifungalen Wirkprinzips im Sinne eines Fungizids. So könnte man ein RNAi-Konstrukt erstellen, dass Sequenz-

Fragmente von mehreren Genen unterschiedlicher Pathogene enthält. Die einzelnen Fragmente müssten kurz sein, so dass ein paar wirksame siRNA-Moleküle entstehen können. Dadurch ließen sich Pflanzen erzeugen, welche resistent gegen eine Palette von Pathogenen sind. Alternativ könnte man auch als Zielgen ein unter pilzlichen Pathogenen hochkonserviertes Gen auswählen. Der entscheidende Vorteil dieses Systems wäre, dass in den transgenen Pflanzen kein zusätzliches Protein gebildet wird, welches toxisch für einen Konsumenten sein könnte.

Allerdings bringt dieses System auch einige Probleme mit sich. Bisher ist nicht geklärt, was bei RNAi ohne Zielgen in einer transgenen Pflanze geschieht. Möglicherweise werden dsRNA und siRNA produziert, sind aber zu instabil und werden bald wieder abgebaut. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Zelle mit siRNA übersättigt ist und diese sich an Sequenzen anlagern zu denen keine 100% Homologie besteht, was pleiotrophe Nebeneffekte zur Folge hätte.

Im Umfeld einer Pflanze leben nicht nur schädliche Pilze. Viele Pflanzen gehen Symbiosen mit Wurzelpilzen ein, den Mykorrhiza. Ein universelles RNAi-Konstrukt, welches gegen viele Pilzarten wirkt, würde wahrscheinlich auch Mykorrhiza schädigen. Man könnte das RNAi-Konstrukt durch einen spezifischen Promotor z.B. nur in der Epidermis der Pflanze exprimieren lassen (Altpeter et al., 2005; Himmelbach et al., 2007). Allerdings breitet sich RNAi systemisch in Pflanzen aus und könnte so in andere Bereiche der Pflanze wie die Wurzeln gelangen (Kobayashi & Zambryski, 2007; Kehr & Buhtz, 2008).

Wichtig ist es Zielgene zu meiden, die zwischen Pilz und Pflanze konserviert sind. Kurze identische Sequenz-Abschnitte reichen bereits aus, um *Silencing* von Genen in der Pflanze zu erreichen (Parrish et al., 2000; Xu et al., 2006 und siehe Kapitel 1.4.3.2). Es wäre von Vorteil, wenn das Genom des pflanzlichen Wirts vollständig bekannt wäre, um solche *off target*-Effekte zu vermeiden. Selbst wenn der *off target*-Effekt nicht letal für die Pflanze wäre, könnte er negative Auswirkungen auf ihre Entwicklung und den Ernteertrag haben.

Es ist noch zu wenig über HIGS als potentielle Methode des Pflanzenschutzes bekannt, um alle Probleme beurteilen zu können. Nachdem erforscht wurde, wie das System funktioniert und wie die Barriere für dsRNA oder siRNA zwischen Wirt und Pathogen überwunden wird, können effizientere RNAi-Konstrukte erstellt werden und Probleme, wie *off target*-Effekte im Wirt und in Symbionten des Wirts gelöst werden.