

**Die Rolle der S-Typ Anionenkanäle in der Reaktion von  
Gerstenschließzellen auf *Blumeria graminis* f. sp. *hordei***

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Sandra Koers**  
aus Hattingen a. d. Ruhr

Würzburg 2013

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

1. Gutachter: PD. Dr. M Rob G Roelfsema

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Riederer

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

## Meinen Freunden:

Es gibt nicht Ödes, nichts Unfruchtbares, nichts Totes in der Welt, kein Chaos, keine Verwirrung, außer einer Scheinbaren, ungefähr wie sie in einem Teiche zu herrschen schiene wenn man aus einiger Entfernung eine verworrene Bewegung und sozusagen ein Gewimmel von Fischen sähe, ohne die Fische selbst zu unterscheiden.

Gottfried Wilhelm Leibniz

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die Dissertation weder in der hier vorliegenden noch in einer ähnlichen Fassung in anderen Prüfungsverfahren oder an anderen Fakultäten vorgelegt. Zudem habe ich bislang noch keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Sandra Koers

## Danksagung

Ich möchte zuallererst PD Dr. Rob Roelfsema danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe dieses Projekt bearbeiten zu können. Vielen Dank für die Diskussionen, Anstöße, Aufklärungen, das Zurückführen auf den richtigen Weg und ein stetiges offenes Ohr in jeder Angelegenheit.

Prof. Dr. Rainer Hedrich möchte ich dafür danken, dass ich am Institut arbeiten konnte, sowie für die Anregungen für weitere Versuche, Hilfe bei der Finanzierung und die Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Markus Riederer möchte ich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur danken.

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Dr. Irene Marten für die Übernahme meiner Betreuung danken, sowie für die nachdenklichen und fruchtbaren Gesprächen und der großen Anteilnahme am Fortschreiten dieser Arbeit.

Prof. Dr. Dietmar Geiger möchte ich für seine Geduld danken, die viel dazu beigetragen hat, dass ich mich im SLAC-Gewimmel nicht vollends verlaufen habe. Dr. Ulrich Hildebrand möchte ich für die Übernahme meiner Drittbetreuung im GK 1342 und die Gespräche über Pilzphysiologie danken.

Ich danke der DFG für die Finanzierung der Arbeit über den SFB567 und das GK1342.

Allen Kollegen in der Botanik I, insbesondere den TAs und den Gärtnern gilt mein Dank für die Aufrechterhaltung der Arbeitsfähigkeit im Institut und schneller Hilfe bei absolut spontanen Problemen, die man bei der Planung der Experimente nicht bemerkte.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt den Grazien aus der Kaffeerunde für unendliche Gespräche, Ausflüge, neue Geschmackserlebnisse, wieder auf den Teppich holen und alles, was man an einem Montagmorgen sonst noch benötigt. Vielen Dank Annette, Caroline, Claude, Diana, Jule, Steffi, und Ute.

Ich möchte meinen Freunden inner- und außerhalb des Institutes danken für meine Betreuung abseits der Arbeit und besonders Katrin und Oli für die andauernde Beherbergung wenn ich es mal aus Würzburg herausgeschafft habe. Especially I would like to thank Aysin and Uğur, who stayed in Merşin during the hottest time of the year to show me around and to give me an understanding of a real breakfast.

Bei meiner Familie möchte ich mich, neben der materiellen Unterstützung, vor allem für all die aufmunternden Gespräche und die einfordernden Telefonate bedanken. Ohne Euch wäre das alles so nicht möglich gewesen.

Und last but not least: Liebe ATVler, das halbe Jahr mit euch war anstrengend fantastisch. Ich finde einfach keine angemessenen Worte. Danke!

**Inhaltsverzeichnis**

**1. Einleitung ..... 1**

**1.1 Die Abteilung Ascomycota..... 1**

    1.1.1 Phytopathogene in den Ascomycota..... 3

    1.1.2 Der Lebenszyklus der Mehltäupilze ..... 5

**1.2 Die Immunantwort der Pflanze ..... 7**

    1.2.1 PAMP-ausgelöste Immunität..... 8

    1.2.2 Effector-ausgelöste Immunität..... 11

**1.3 Die Spaltöffnung in der Immunantwort..... 12**

    1.3.1 Die Reaktion der Stomata auf Pathogene ..... 13

    1.3.2 Mechanismus des Stomaschlusses..... 15

    1.3.3 Der Anionenkanal *AtSLAC1* ..... 17

**1.4 Zielsetzung der Arbeit ..... 21**

**2. Material und Methoden ..... 22**

**2.1 Anzuchtbedingungen ..... 22**

    2.1.1 Pflanzen und Pilze..... 22

    2.1.2 *Escherichia coli* ..... 22

**2.2 Vorbereitung der Pflanzen ..... 22**

**2.3 Messung der Spaltöffnungsweiten ..... 23**

**2.4 Elektrophysiologische Methoden ..... 23**

    2.4.1 Einstich in intakte Pflanzen ..... 24

    2.4.2 BiFC- und DEVC-Messungen in Oozyten von *Xenopus laevis* ..... 28

**2.5 Nanoinjektion ..... 32**

    2.5.1 Kapillarenherstellung..... 32

    2.5.2 Injektionslösungen ..... 32

    2.5.3 Platzierung der Injektionskapillare und Injektion..... 33

    2.5.4 Auswertung ..... 33

**2.6 Molekularbiologische Methoden..... 34**

    2.6.1 Isolierung von RNA aus Gerste ..... 34

    2.6.2 Klonierung und Transformation ..... 35

<b>2.7 <i>in silico</i>-Analysen</b> .....	40
2.7.1 Identifizierung von homologen Genen aus Datenbanken.....	40
2.7.2 Phylogenetische Analysen .....	41
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Mehltau- und Elicitor-induzierte Änderungen im Öffnungsverhalten und der     Physiologie der Schließzellen</b> .....	42
3.1.1 Öffnungsverhalten von Gerstenstomata nach der Infektion des Blattes mit Mehltausporen.....	42
3.1.2 Reaktion der Stomata auf die Injektion von Elicitoren.....	44
3.1.3 Effekt der Mehltaupilze auf das Membranpotential von Nebenzellen. ....	47
3.1.4 Änderungen in den Kanalaktivitäten der Schließzellen während der Infektion .....	48
3.1.5 Veränderungen in der Anionenkanalaktivität während der Infektion.....	52
3.1.6 Die Blaulichtantwort der Schließzellen in An- und Abwesenheit des Mehltau pilzes.....	53
3.1.7 Die Änderungen der Kanalaktivitäten nach Stimulation mit einem Elicitor .....	55
<b>3.2 Untersuchungen zur Genfamilie der S-Typ Anionenkanäle in Gerste</b> .....	57
3.2.1 Identifizierung von Homologen des Anionenkanals AtSLAC1 in Gerste.....	57
3.2.2 Expression der AtSLAC1 Homologen in Gerstenblättern.....	63
3.2.3 Charakterisierung der Interaktionspartner des putativen Anionenkanals HvSLAC1 .....	64
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>68</b>
<b>4.1 Die Reaktionen der Schließzellen auf <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i></b> .....	68
<b>4.2 Der Effekt von Elicitoren auf die Spaltöffnungen der Gerste</b> .....	70
<b>4.3 Die Reaktion der Nebenzellen der Gerste auf den Mehltau</b> .....	72
<b>4.4 Die Lichtantwort des Membranpotentials von Schließzellen der Gerste</b> .....	72
<b>4.5 Die Infektion mit Mehltau verändert die Aktivität der Ionenkanäle in den     Schließzellen der Gerste</b> .....	73
<b>4.6 Die Identifizierung und Charakterisierung von AtSLAC1-Homologen in Gerste</b> .....	77
4.6.1 Die Genfamilie der S-Typ Anionenkanäle in Gerste .....	77
4.6.2 Die Struktur und Expression des putativen Hv1008-Kanals .....	78
4.6.3 Die Regulation des Hv1008-Kanals.....	81

<b>4.7 Ausblick.....</b>	<b>82</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>88</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>104</b>
<b>Sequenzen und Vektorkarten .....</b>	<b>104</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>112</b>
<b>Veröffentlichungsverzeichnis.....</b>	<b>113</b>

## 1. Einleitung

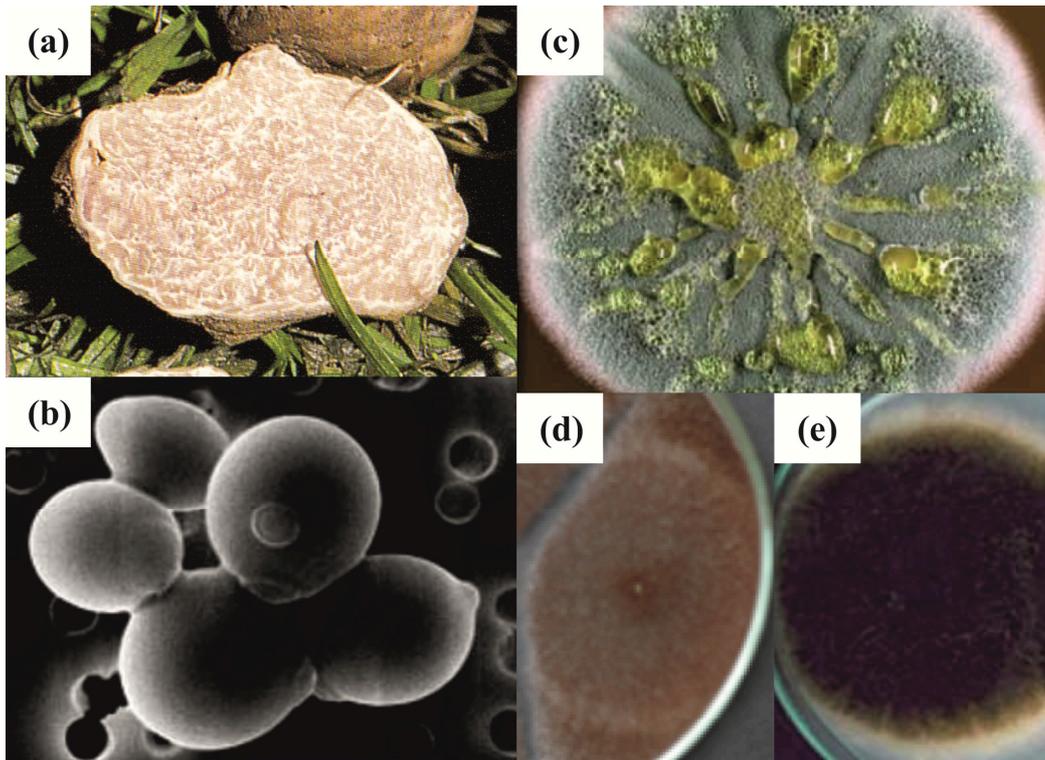
Pflanzen sind sowohl in der Rhizo- als auch in der Phyllosphäre ständig mit Mikroorganismen konfrontiert, die Einfluss auf ihre Entwicklung nehmen. Häufig werden dabei in den Pflanzen Prozesse ausgelöst, die zu erheblichen Ernteverlusten bei Getreide- und Gemüsearten führen können. Für die Gerste können etwa 10% des Verlustes auf Mehltau zurückgeführt werden (Jørgensen; 1994). Diese Interaktion ist gut beschrieben und man weiß heute schon recht viel über die molekularen Mechanismen, die der Infektion des Pilzes und der Antwort der Gerste zugrunde liegen. Dennoch sind nicht alle Aspekte der Interaktion hinreichend geklärt, so etwa die Rolle der Stomata, die eine wichtige Funktion innerhalb der Immunantwort der Pflanze einnehmen. In den ersten Kapiteln soll zunächst die Abteilung der Ascomycota mit verschiedenen Vertretern, insbesondere dem Gerstenmahltau *Blumeria graminis* (Speer) f. sp. *hordei* (DC) vorgestellt werden (Kapitel 1.1). Das Kapitel 1.2 beschäftigt sich anschließend mit der Immunantwort der Pflanze. Im abschließenden Kapitel 1.3 soll kurz die Rolle der Stomata in der Immunantwort, sowie der Mechanismus des Stomaschlusses dargelegt werden.

### 1.1 Die Abteilung Ascomycota

Innerhalb des Pilzreiches gibt es viele Pathogene, die sich auf Pflanzen spezialisiert haben. Wohl die meisten dieser Pathogene stammen aus der Abteilung der Ascomycota. Diese Abteilung versammelt neben den Pathogenen auch Speisepilze, wie Morcheln und Trüffelarten (Abb. 1.1a), sowie Arten, die in der modernen Forschung und der Biotechnologie Verwendung finden.

So wird die seit mehreren tausend Jahren kultivierte Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen) (Abb. 1.1b) heute nicht nur zum Bierbrauen verwendet, sondern ist auch ein unerlässlicher Bestandteil der Forschungslandschaft geworden. Mit diesem Pilz werden etwa Interaktionen und Funktionen von Proteinen untersucht (Djamei et al. 2011, Pulsifer et al. 2012).

Die Revolution der Medizin durch die Antibiotika verdanken wir Flemming, der seine mit dem Pilz *Penicillium chrysogenum* (Thom) (Abb. 1.1c) überwachsenen Bakterienkulturen genauer untersuchte und dessen wachstumshemmende Wirkung erkannte. Desweiteren gehen auch die modernen Antibiotika verschiedener Klassen auf Moleküle zurück, die aus Pilzen isoliert wurden (Weidenbörner 2000).



**Abbildung 1.1: Vertreter der Abteilung Ascomycota.** (a) Der Fruchtkörper des weißen Trüffels *Tuber magnatum* (Lev.) gehört zu den teuersten Speisepilzen der Welt (verändert nach Cetto 1988). (b) Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen) wird bereits seit 5000 Jahren von den Menschen kultiviert und unter anderem zum Backen von Brot und zum Bierbrauen verwendet (verändert nach Malherbe et al. 2003). (c) Der Pilz *Penicillium chrysogenum* (Thom) wurde durch die Entdeckung des Penicillins bekannt (verändert nach Frisvad und Samson 2004). (d) Sein Verwandter *Aspergillus niger* (Tiegh) wird heute in der Biotechnologie als Produzent von Zitronensäure genutzt (verändert nach Silva et al. 2011). (e) Der Schwarzschiimmel *Alternaria alternata* ((Fr.) Keissl.) produziert verschiedene Mycotoxine, die Mutagenesen in tierischen Geweben hervorrufen können (verändert nach Malviya et al. 2009).

Ebenso wird heute der Großteil des Bedarfs der Industrie für Zitronensäure durch den Einsatz von *Aspergillus niger* (Tiegh)-Stämmen gedeckt (Abb. 1.1d), die in Fermentationsanlagen kultiviert werden (Weidenböner 2000).

Einige der heute in der Biotechnologie genutzten Stämme haben eine eher unrühmliche Vorgeschichte. Sie wurden meist von verschimmelten Lebensmitteln isoliert und von einigen ist bekannt, dass sie Gifte produzieren, die in Verdacht stehen, verschiedene Krebsarten auszulösen. Dies konnte etwa für Pilze der Gattung *Alternaria* nachgewiesen werden (Abb. 1.1e), die auf verschiedenen Obst- und Gemüsearten vorkommen (Liu et al. 1991, Liu et al. 1992, Pozzi 2005).

Im folgenden Kapitel wird die Vielfalt der Infektionsmechanismen kurz dargestellt. Das Kapitel 1.1.2 soll als Hinführung zum Thema der Arbeit den untersuchten Pilz *Blumeria graminis* (Speer) f. sp. *hordei* (DC) mit seinem Lebenszyklus vorstellen.

### 1.1.1 Phytopathogene in den Ascomycota

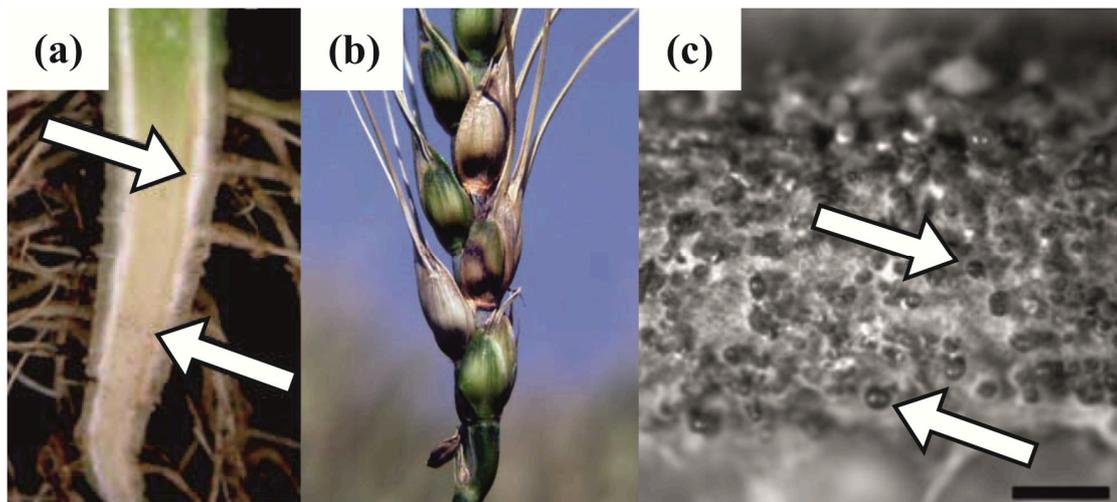
Neben den oben genannten Pilzen, die der Allgemeinheit im Großen und Ganzen nutzen, gibt es noch solche, die durch den Befall von Pflanzen einen enormen wirtschaftlichen Schaden anrichten. Dabei gibt es große Unterschiede, auf welche Art der Pilz seine Wirtspflanze infiziert und schädigt.

Der im Boden vorkommende Pilz *Verticillium longisporum* (C. Stark) (Abb. 1.2.a) umhüllt zunächst die Wurzelhaare seines Wirtes *Brassica napus* (L.) mit seinen Hyphen und dringt dann in den Zentralzylinder vor, wo er beginnt, die Xylemgefäße zu besiedeln (Eynck et al. 2006, Fradin und Thomma 2006). Dieser Pilz vollzieht während seines Lebenszykluses einen Wechsel von einem rein saprophytisch lebenden hin zu einem necrotrophen Parasiten. Dabei induziert *V. longisporum* die vorzeitige Seneszenz der Pflanze, so dass die Pflanze verfrüht absterbt (Fradin und Thomma 2006).

Der Erreger des Getreidebrandes *Fusarium graminearum* (Schwabe) (Abb. 1.2b) befällt die Blüten verschiedener Getreidearten und wächst in den Leitbündeln von Blüte zu Blüte der Wirtspflanze (Goswami und Kistler 2004, Stephens et al. 2008). Durch die Produktion mehrerer Mycotoxine werden die Getreidekörner der befallenen Pflanzen kontaminiert und können nicht mehr für die Aussaat oder die Weiterverarbeitung zu Nahrungsmitteln genutzt werden (Desjardins und Hohn 1997).

Andere Pilze nutzen natürliche Öffnungen der Pflanzen, um in deren Inneres vorzustoßen. Der parasitische Pilz *Phomopsis (Fusicoccum) amygdali* (Del.) produziert das Toxin Fusicoccin. Es nutzt die Bindung eines 14-3-3-Proteins an den C-Terminus der  $H^+$ -ATPase der Plasmamembran, der als autoinhibitorische Domäne dient (Oecking und Hagemann 1999, Würtele et al. 2003). Die Interaktion des Fusicoccins mit dem Proteinkomplex führt zu einer dauerhaften Aktivierung der  $H^+$ -ATPase. Durch die Erniedrigung des Membranpotentials als Folge der Aktivität der  $H^+$ -ATPase erfolgt die Aktivierung der  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter, was wiederum eine irreversible Öffnung der Stomata zur Folge hat (Roelfsema und Hedrich, 2005). Durch diese Öffnungen gelangt der Pilz in den Apoplasten und kann sich dort ausbreiten. Die dauerhaft geöffneten Stomata führen zu einem hohen Wasserverlust und die befallenen Blätter bilden Necrosen aus. Unterhalb der Borke bilden sich im Holz der befallenen Pflanze im folgenden Jahr Polster von asexuellen Sporen aus, die nach dem Aufbrechen der Borke durch den Wind verbreitet werden (Esser; 2000, Abb. 1.2c).

Eine der größten Familien mit Phytopathogenen innerhalb der Ascomycota sind die Erysiphaceae. Mit 152 Arten allein in Europa decken die „Echten MehltauPilze“ ein breites Wirtsspektrum ab, das viele wirtschaftlich bedeutsame Pflanzen beinhaltet (Braun 1995).



**Abbildung 1.2: Phytopathogene der Abteilung Ascomycota.** (a) Der auf Raps und *Arabidopsis thaliana* (L.) parasitierende *Verticillium longisporum* (C. Stark) befällt die Wurzeln und etabliert sich in den Gefäßen des Xylems der Wirtspflanzen, die anschließend bräunlich verfärbt erscheinen (Pfeile) (verändert nach Fradin und Thomma 2006). (b) Der Brandpilz *Fusarium graminearum* (Schwabe) nutzt die exponierten Blüten, um in die Leitbündel der von ihm befallenen Getreidearten zu gelangen (Goswami und Kistler 2004). (c) Der Produzent des Toxins Fusicoccin, *Phomopsis amygdali* (Del.), nutzt selbiges, um sich durch die Stomata Zugang zum Apoplasten seines Wirtes zu verschaffen. Nach der erfolgreichen Infektion verholzter Strukturen bilden sich Sporenlager aus, welche die Borke der Pflanze durchbrechen und als schwarze Kugeln sichtbar werden (Pfeile, verändert nach Diogo et al. 2010).

So beschäftigen sich momentan Arbeitsgruppen mit der Interaktion von Mehltau mit Wein (Gadoury et al. 2012, Ramming et al. 2011), Tomaten (Li et al. 2011, Seifi et al. 2011), Erbsen (Pavan et al. 2011) und Weizen (Ma et al. 2011, Wang et al. 2012).

Zudem werden verschiedene Pflanzen als Modellorganismen genutzt, an denen die grundlegenden Mechanismen der Interaktion zwischen Mehltau und seiner Wirtspflanze untersucht werden. Besonders hervorzuheben ist hier die Interaktion zwischen *Golovinomyces orontii* (Castagne) V.P. Heluta und *Arabidopsis thaliana* L., der Ackerschmalwand. Da *A. thaliana* eine der bedeutendsten Modellpflanzen darstellt, können die Ergebnisse dieser Interaktionsforschung direkt in einen größeren Zusammenhang gestellt werden, der auch andere Stressantworten der Pflanze beinhaltet.

Die Erysiphaceae sind sogenannte obligat biotrophe Pilze, was bedeutet, dass sie nicht ohne Wirtspflanze überleben können. Die Anzucht muss also immer auf einem kompatiblen Wirt erfolgen, so dass sich Untersuchungen des Pilzes allein als schwierig erweisen. In den letzten Jahren konnte im Labor von Ulrich Hildebrandt eine Methode entwickelt werden, die zumindest eine Erforschung der ersten Entwicklungsstadien außerhalb des Pathosystems ermöglicht (Hansjakob et al. 2010, Zabka et al. 2008). Es war bereits bekannt, dass der Pilz *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) auf hydrophoben Oberflächen durchaus in der Lage ist, Keimhy-

phen auszubilden, wenn bestimmte chemische Komponenten wie etwa *n*-Hexacosanal vorliegen (Tsuba et al. 2002). Da allerdings die Versorgung des Pilzes mit Nährstoffen hauptsächlich durch das Haustorium erfolgt, stoppt die Entwicklung des Pilzes nach der Bildung der zweiten Keimhyphne und des Appressoriums.

### **1.1.2 Der Lebenszyklus der Mehltäupilze**

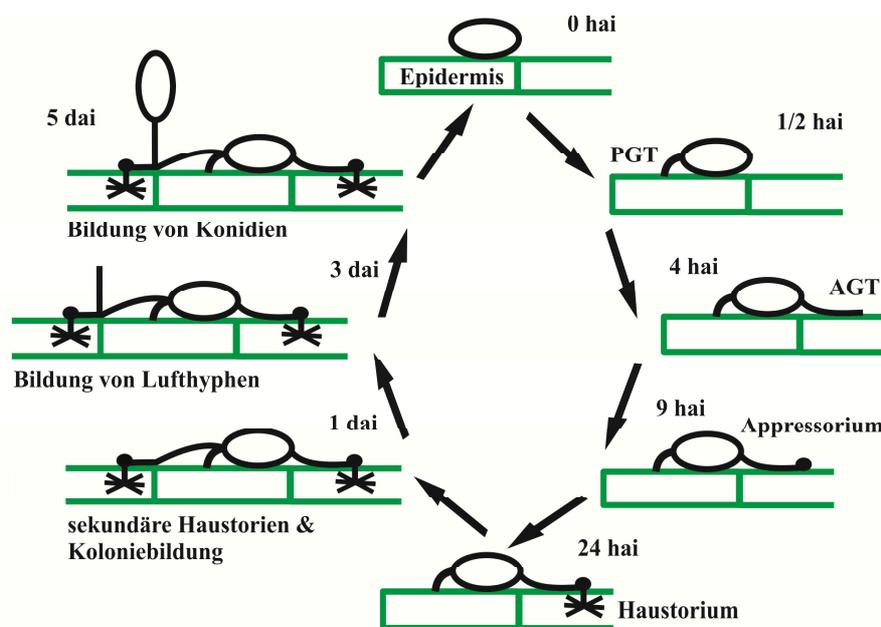
Sobald die durch Wind verbreiteten asexuellen Sporen, die Konidien, auf der pflanzlichen Kutikula landen, beginnt das Entwicklungsprogramm des Pilzes (Abbildung 1.3). Direkt nach dem Kontakt mit hydrophoben Oberflächen wird eine extrazelluläre Matrix (engl. extracellular matrix, ECM) abgegeben, welche Cutinasen und andere hydrolytische Enzyme enthält (Carver et al. 1999, Kunoh et al. 1988, Pascholati et al. 1992). Erst nach der Bildung eines hydrophilen Bereiches um die Konidie kann diese auskeimen (Carver et al. 1999, Nielsen et al. 2000). Zudem werden niedermolekulare Stoffe aus der pflanzlichen Kutikula aufgenommen, wenn die Konidie auf einem Blatt des Wirtes liegt (Nielsen et al. 2000). Daher wird angenommen, dass einige dieser Stoffe als Auslöser der Keimung dienen und auch die Richtung angeben, in welche die pilzlichen Hyphen wachsen (Carver et al. 1999, Nielsen et al. 2000).

Die erste Hyphe (engl. primary germ tube, PGT), die aus der Spore austritt, bildet sich in der ersten halben Stunde voll aus und reicht nur wenige Mikrometer weit (Kinane et al. 2000, Zhang et al. 2005). An deren Spitze bildet sich ein kleiner Haken aus, der in die Kutikula des Blattes eindringt (Ewards 2002). Kinane und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass die PGT ebenfalls zur Erkennung einer kompatiblen Oberfläche beiträgt, da der Entwicklungszyklus auf künstlich hergestellten Celluloseoberflächen nach der Bildung der PGT abgebrochen wurde. Erst nach der Ausbildung dieser primären Keimhyphne erscheint nach etwa zwei Stunden eine sekundäre Keimhyphne (engl. appressorial germ tube, AGT) (Yamaoka et al. 2006). Diese kann eine Länge von bis zu 60 µm erreichen (Zhang et al. 2005). Durch Komponenten der ECM wird diese Hyphe an der Blattoberfläche festgehalten und bildet an der Spitze nach etwa neun Stunden einen Haken aus, aus dem sich anschließend das Appressorium entwickelt (Wright et al. 2002, Zhang et al. 2005). Um die Ausbildung des Appressoriums zu unterstützen, wird ein Septum in der zweiten Keimhyphne gebildet. Direkt unterhalb des Appressoriums bildet sich anschließend eine Struktur aus, die in die Kutikula und in die Zellwand der Pflanze vordringt (Pryce-Jones et al. 1999). Diese wird Penetrationshyphne genannt.

Anders als bei einigen Phytopathogenen der Basidiomyceten werden die Appressoria der Mehltäupilze nicht melanisiert. Auch der Turgordruck innerhalb des Appressoriums bleibt

hinter den in anderen Pathogenen gemessenen Werten zurück (Dean et al. 2005, Zhang et al. 2005). Die Mehлтаupilze geben dafür vermehrt hydrolytische Enzyme ab, die das Vordringen der Penetrationshyph durch die Zellwand unterstützen (Nicholson et al. 1988, Pryce-Jones et al. 1999).

Nach dem Durchdringen der Zellwand, versucht der Pilz nicht in das Cytoplasma der Epidermiszelle vorzudringen, sondern weitet die Penetrationshyph zum Haustorium aus, das vollständig von der Plasmamembran der Pflanzenzelle umschlossen wird (Mackie et al. 1991). Um eine möglichst große Oberfläche auszubilden, entstehen die typischen fingerförmigen Ausstülpungen des reifen Appressoriums. Am Hals des Haustoriums bildet sich eine korkenartige Struktur, so dass ein neues Kompartiment zwischen der extrahaustoriellen Membran der Pflanze (EHM) und der Zellwand des Haustoriums entstehen, durch welches die Aufnahme der Nährstoffe erfolgt (Mackie et al. 1991).



**Abbildung 1.3: Lebenszyklus des Gerstenmehltaus.** Nach Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche bildet die Konidie innerhalb der ersten halben Stunde eine primäre Keimhyph (PGT) aus. Diese dringt bereits in die Kutikula der Pflanze ein und produziert Signale, welche die weitere Entwicklung einleiten. Eine sekundäre Keimhyph (AGT) wird nach etwa 2 h gebildet. Diese ist länger und bildet ein Septum aus, so dass sich an der Spitze ein von der Konidie abgetrenntes Kompartiment befindet. Dieses Kompartiment bildet nach etwa 9 h das Appressorium aus. Nach Abschluss der Appressorienbildung wird ein Haken an der Spitze der AGT erkennbar. Die Penetrationshyph bildet sich unterhalb des Appressoriums, durchdringt die Zellwand und wölbt die Plasmamembran nach innen ein. In dem entstehenden extrazellulären Raum entwickelt sich das pilzliche Haustorium. Nach etwa 24 h hat dieses seine typischen fingerförmigen Ausläufer ausgebildet. Erst jetzt bilden sich neue Hyphen am Konidium und es werden weitere Haustorien in Nachbarzellen etabliert. Nach drei Tagen wird auf der Oberfläche die pilzliche Kolonie mit ihren weißlichen Hyphen sichtbar. Fünf Tage nach der Keimung hat die Kolonie Konidienträger ausgebildet, auf denen die asexuellen Sporen, die Konidien, reifen und abgeschnürt werden. Durch Wind oder bei Berührung lösen sich die reifen Konidien und können einen neuen Infektionszyklus beginnen.

Die Infektion des Mehltaus kann somit in zwei Phasen eingeteilt werden, die in den ersten 24 h der Interaktion stattfinden. Die erste umfasst den Zeitraum von der Keimung bis zur Fertigstellung des Appressoriums und wird im weiteren Verlauf der Arbeit Präpenetrationsphase genannt. Die zweite Phase beginnt mit dem Eindringen der Penetrationshyphe in die Zellwand und reicht bis zur Reifung des primären Haustoriums in der Epidermiszelle. Anschließend werden sekundäre Haustorien in benachbarten Zellen ausgebildet, wodurch ein verzweigtes Mycel auf der Blattoberfläche versorgt werden kann.

Etwa drei Tage nach der Inokkulation (dai) bilden sich die ersten Lufthyphen, aus denen sich Konidienträger entwickeln. Auf diesen reifen die Konidien und schnüren sich nacheinander ab, so dass eine geringe Erschütterung ausreicht, um sie von den Trägern zu lösen. Durch die Masse an weißen Konidien scheint die Wirtspflanze mit Staub oder Mehl bedeckt zu sein, was den Pilzen den allgemeinen Namen Mehltau einbrachte.

Meistens erfolgen durch die Konidien sekundäre Infektionen des gleichen Blattes. Da die Pflanze nun zusätzlich den parasitierenden Pilz versorgt, kommt es zu einem Mangel an Nährstoffen, die für die Fruchtanlage und -reifung der Pflanze benötigt werden (Walters und Boyle 2005).

## 1.2 Die Immunantwort der Pflanze

Pflanzen müssen sich nicht nur gegen Pilze wehren, sondern auch gegen Bakterien, Läuse und andere Fraßfeinde. Alle diese Organismen nutzen unterschiedliche Strategien, um sich den Pflanzen anzunähern und sie auszunutzen. Daher besitzen Pflanzen ein Immunsystem, das sich im Laufe der Evolution immer weiter an die, im Ökosystem vorhandenen, Pathogene angepasst hat. Anders als das Immunsystem der Tiere wirkt dieses aber nicht adaptiv, so dass Anpassungen an sich verändernde Pathogene nicht innerhalb einer Generation erworben werden können (Nürnberger et al. 2004).

Das „zigzag“-Modell von Jones und Dangl, welches sie 2006 in einem Übersichtsartikel vorstellten, teilt die Immunantwort der Pflanze in vier Phasen ein, welche die Koevolution von Wirt und Pathogen umfassen. Dabei unterscheiden sie zwischen der PAMP-angestörten Immunität (PTI) und der durch Effektoren angestörten Immunität (ETI). PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) sind kleine Moleküle, welche in ihrer Struktur hoch konserviert sind. Sie kommen meist bei mehreren Klassen von Pathogenen vor. Daher vermittelt die PTI eine breite, unspezifische Resistenz. Im Kapitel 1.2.1 werden, nach einer allgemeinen Einführung, stellvertretend zwei Signalwege der PTI vorgestellt. Die Effektoren sind hinge-

gen sehr spezifische Moleküle, die meist von einer bestimmten Varietät eines Pathogens gebildet werden. Die ETI vermittelt somit eine spezifische Resistenz. Das Kapitel 1.2.2 widmet sich dieser Art der pflanzlichen Immunität. Auch wenn in einem neueren Übersichtsartikel diese Einteilung kritisch betrachtet und ihre Probleme diskutiert werden (Thomma et al. 2011), soll sie für diese Arbeit dennoch verwendet werden.

### 1.2.1 PAMP-ausgelöste Immunität

Die PAMP-ausgelöste Resistenz bildet die erste Verteidigungslinie der Pflanze. Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums wird sie auch Nichtwirtsresistenz genannt (Nürnberger und Lipka 2005). Zu den molekularen Mustern, die als PAMPs bezeichnet werden, gehören unter anderem Komponenten der pathogenen Zellwand, etwa die pilzlichen Elicitoren Chitin und Chitosan oder Teile von extrazellulären Proteinen, wie Flagellin. Es werden allerdings nicht die ganzen Proteine erkannt, sondern kurze Peptidsequenzen wie etwa das 22 Aminosäuren lange Peptid flg22 des Flagellins. Auffallend ist, dass die meisten dieser Moleküle alle wichtig für die Proliferation des Pathogens sind. Chitinsynthase-Mutanten in *Ustilago maydis* zeigen etwa Defekte in der Ausbreitung und der Infektionsrate (Weber et al. 2006). Die Erkennung der PAMPs erfolgt durch Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. pattern recognition receptors; PRRs) in der Plasmamembran, die meist auf der intrazellulären Seite eine Kinasedomäne aufweisen (Boller und Felix; 2009). Für den Rezeptor FLS2 (FLAGELLIN SENSITIVE 2), der das Peptid flg22 erkennt, wurde zudem die Interaktion mit der Rezeptorkinase BAK1 nachgewiesen (Chinchilla et al. 2007). Nur bei einer Interaktion dieser beiden Proteine konnte die Immunantwort der Zelle ausgelöst werden (ebenda).

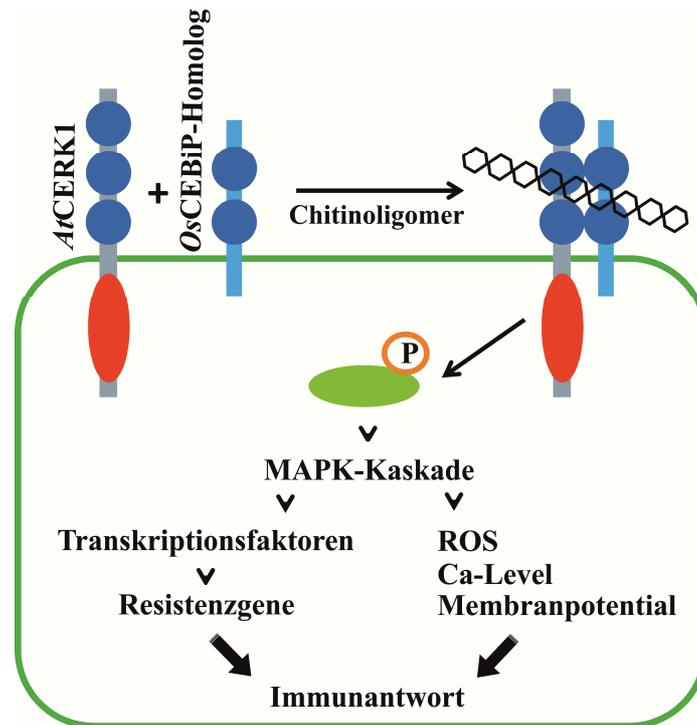
Als wichtigster Bestandteil der pilzlichen Zellwand spielt Chitin eine große Rolle in der Interaktion zwischen Pflanze und pathogenen aber auch symbiontischen Pilzen. Die Rezeptoren, die in beiden Signalwegen zum Einsatz kommen, besitzen die gleichen extrazellulären Domänen, die der Erkennung der Mikroorganismen dienen (Knogge und Scheel 2006). Trotz dieser hohen Ähnlichkeit führen die, von den Rezeptoren aktivierten Signalwege zu unterschiedlichen Antworten der Pflanze auf die Mikroorganismen (Felle et al. 2000). In diesem Kapitel soll lediglich die Einleitung der Immunantwort durch Chitinfragmente näher betrachtet werden.

Chitinfragmente werden während der Infektion durch pflanzliche Chitinasen erzeugt, die im extrazellulären Raum lokalisiert sind (Wan et al. 2008). Die Chitinfragmente können in Zellkulturen der Tomate bereits in Konzentrationen von weniger als 1 nM die Immunantwort auslösen (Felix et al. 1993). Obwohl die Antwort auf Chitin schon recht lange bekannt ist,

konnten erst 2006 und 2007 die beiden Moleküle gefunden werden, die den Rezeptorkomplex für Chitin bilden. Zunächst konnte aus Reis das Bindeprotein CEBiP (engl. CHITIN ELICITOR BINDING PROTEIN) gefunden werden, das N-Acetylglucosamin(GlucNAc)-Oligomere mit einer Kettenlänge von acht Monomeren erkennt (Kaku et al. 2006). Es besitzt an seinem N-Terminus zwei extrazelluläre LysM-Domänen. Diese enthalten ein Motiv, das auch in Kinasen gefunden wurde, welche die Nod-Faktoren der Rhizobium-Leguminosen-Interaktion erkennen (Radutoiu et al. 2003). Des Weiteren besitzt das Protein eine einzelne Transmembranhelix aber keine cytosolische Proteinkinasedomäne. Dies legt nahe, dass die Transduktion der Chitinerkennung nur mit einem Interaktionspartner durchgeführt werden kann, der die typische Kinasedomäne der PRRs besitzt. Ein Jahr später wurde dann ein Protein in *A. thaliana* isoliert, dessen Fehlen ebenfalls die Immunantwort auf Chitin verhindert (Miya et al. 2007). Das Protein CERK1 (CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1) enthält am N-Terminus drei LysM-Domänen. Es konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass das Protein selbst GlucNAc-Oligomere bindet. *At*CERK1 besitzt neben einer einzelnen Transmembranhelix auch die für PRRs typische cytosolische Kinasedomäne.

Momentan wird davon ausgegangen, dass sowohl in Reis als auch in Arabidopsis beide Proteine vorkommen und interagieren (Wan et al. 2008, Abbildung 1.4). Durch die Erkennung von Chitin soll sich ein CERK-CEBiP-Komplex bilden und CERK1 phosphoryliert werden. CERK1 phosphoryliert anschließend vermutlich eine MAPKK-Kinase, wodurch eine MAPK-Signalkaskade gestartet wird (Wan et al. 2008). An dieser Kaskade scheinen die MAPK-Kinasen *At*MEK4 und *At*MEK5 beteiligt zu sein (Ren et al. 2002). Diese können wiederum die MAP-Kinasen *At*MPK3 und *At*MPK6 phosphorylieren (Wan et al. 2004). Am Ende der Kette stehen unter anderem die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wozu etwa Mitglieder der WRKY-Familie gehören (Wan et al. 2004).

Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Transkription von Resistenzgenen, welche die Gegenwehr der pflanzlichen Zelle einleiten. Zu der Immunantwort der Pflanzen gehören unter anderem die Bildung von reaktiven Sauerstoffarten, Phytoalexinen und anderen sekundären Pflanzenstoffen (Mysore und Ryu 2004). Diese wirken toxisch auf das Pathogen und verhindern so die Infektion der Pflanze. Zudem reagieren Mesophyllzellen mit einer Depolarisation des Membranpotentials (Felle et al. 2000, Jeworutzki et al. 2010), einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol (Ranf et al. 2008, Jeworutzki et al. 2010) und der Anhebung des apoplastischen pH-Wertes (Felix et al. 1993, Felle et al. 2004).



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Chitin-Signalweges.** Die beiden Proteine CEBiP und CERK bilden zusammen den Rezeptor für den Elicitor N-Acetylglucosamin (Chitin) an der Plasmamembran. Durch die Phosphorylierung eines bislang noch nicht bekannten Proteins durch CERK wird eine Signalkaskade gestartet. Diese beinhaltet die typischen Komponenten eines MAPK-Signalweges. Durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, unter anderem aus der WRKY-Familie, wird die Transkription von Resistenzgenen ermöglicht. Dies leitet die Immunantwort der Zelle ein. Verändert nach Wan et al. 2008.

Bei Pathogenen, welche die Zellwand einer Pflanzenzelle zu durchdringen versuchen, verstärkt die pflanzliche Zelle zudem die Zellwand. Dies resultiert in sogenannten Papillen, die sich immer unterhalb einer Penetrationsstelle finden und die Penetrationshypho komplett umschließen (Hippe-Sanwald et al. 1992). Um diese Papillen aufzubauen, werden in der attackierten Zelle vermehrt Vesikel gebildet. Diese werden gerichtet an die Stellen des Eindringens befördert, was durch eine Reorganisation des Cytoskeletts bewerkstelligt wird (Takemoto und Hardham 2004, Opalski et al. 2005). Eine wichtige Rolle bei der Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran nimmt dabei das Membranprotein MLO3 (MILDEW RESISTANCE LOCUS Q 3) ein. Das Protein ist Teil einer großen und evolutionär alten Genfamilie, die in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien der Pflanzen vorkommt (Devoto et al. 2003, Devoto et al. 1999, Wuest et al. 2010). Obwohl das Gen *Mlo3* in vielen, vielleicht allen, Pflanzen vorkommt, zeigen Mutanten ohne funktionierendes MLO3-Protein lediglich in der Interaktion mit Mehltaupilzen eine gesteigerte Resistenz (Büschges et al. 1997, Panstruga 2005). In Interaktionen mit anderen Pathogenen kann in *mlo3*-Mutanten so-

gar eine höhere Anfälligkeit gegenüber dem pathogenen Pilz beobachtet werden (Jarosch et al. 1999, Kumar et al. 2001).

Das Protein MLO3 erscheint als Regulator der Vesikelfusion an der Zellmembran, da es unter anderem mit Syntaxinen interagiert (Bhat et al. 2005). Während der normalen Entwicklung verhindert es spontanen Zelltod und Resistenzantworten in Arabidopsis und Gerste (Consonni et al. 2006, Peterhänsel et al. 1997, Piffanelli et al. 2002, Wolter et al. 1993). Die Mehltreiberpilze korrumpieren MLO3, um die Vesikelfusion an den Penetrationsstellen zu verzögern (Asaad et al. 2004). Dadurch werden die Papillen verspätet gebildet und das Eindringen der Penetrationshyphe in den Raum zwischen Zellwand und Plasmamembran kann nicht mehr verhindert werden. Fehlt das Protein, so können die Vesikel, die als Stressantwort gebildet wurden, ungehindert mit der Plasmamembran fusionieren und zum Aufbau der Papillen beitragen (Panstruga 2005, Underwood und Somerville 2008).

Die Vesikel enthalten neben Materialien für den Aufbau von Papillen auch Substanzen, welche etwa in Peroxisomen gebildet werden (Koh et al. 2005). Diese besitzen meist eine toxische Wirkung gegenüber dem attackierenden Pathogen (Lipka et al. 2005, Panstruga 2005). Zum Teil konnten zudem innerhalb der Papillen Membranfragmente und Proteine der Vesikelmembran nachgewiesen werden (An et al. 2006, Collins et al. 2003).

### **1.2.2 Effektor-angefasste Immunität**

Während die PAMP-vermittelte Resistenz eine Abwehr gegen mehrere Arten von Pathogenen ermöglicht, ist die durch Effektoren angefasste Resistenz sehr spezifisch. Sie wird auch als Gen-für-Gen-Resistenz bezeichnet, da hier spezifische Moleküle eines Pathogenstammes, oder deren Wirkung in der Pflanzenzelle, erkannt und zum Starten der Immunantwort genutzt werden. Dies geschieht im Normalfall nicht wie bei den molekularen Mustern der PAMPs an der Plasmamembran, sondern durch Rezeptoren im Cytoplasma der Pflanzenzelle.

Um die Immunantwort der Pflanze zu umgehen, werden von den Pathogenen sogenannte Effektoren gebildet. Diese werden vom Pathogen in die pflanzliche Zelle eingeschleust und interagieren dort mit Proteinen der Signalkaskaden, welche die Immunantwort auslösen. Im Laufe der Evolution scheinen Pflanzen daraufhin Rezeptoren entwickelt zu haben, welche die Effektoren der Pathogene erkennen und so eine Unterdrückung der Immunantwort verhindern. Diese Rezeptoren werden kurz R-Proteine (Resistenz-Proteine) genannt und bilden den Kern der zweiten Lage der pflanzlichen Immunantwort, der ETI (Nürnberg et al. 2004). Sie lassen sich in zwei Klassen aufteilen, den sogenannten CC-NBS-LRR und den TIR-NBS-LRR. Die Proteine beider Klassen enthalten eine Nukleotid-Bindestelle (NBS) und zeichnen

sich durch eine Region mit Leucin-reichen Wiederholungen aus (engl. *leucin-rich repeats*, LRR) (Takken und Joosten 2000). Die erste Klasse enthält zudem eine sogenannte „coiled-coil“-Domäne, bei der zwei oder mehr  $\alpha$ -Helices umeinander gewunden vorliegen (Mason und Arndt, 2004). Die zweite Klasse enthält eine TIR-Domäne (Toll/Interleukin1 Rezeptor), die sich auch im tierischen Immunsystem finden lässt (Takken und Joosten, 2000). Durch die Erkennung der Effektoren wird in den Pflanzenzellen der programmierte Zelltod ausgelöst, was auch als hypersensitive Antwort (HR) bezeichnet wird (Heath 2000). Dieser führt zur Bildung von Nekrosen um den Infektionsort herum (Nimchuk et al. 2003).

Zu den Rezeptoren der Effektor-Moleküle gehören auch die MLA-Proteine (mildew resistance locus A) aus Gerste. Sie vermitteln eine Resistenz gegen einzelne Stämme des Mehltau-pilzes *B. graminis* f. sp. *hordei*. Für diese Proteine gibt es in Gerste verschiedene Allele (Jørgensen 1994), wobei zwischen sogenannten frühen und späten Allelen unterschieden werden kann (Caldo et al. 2006). Die früh aktivierenden Mla-Allele stoppen die Infektion vor der Fertigstellung des Haustoriums und bewirken den Zelltod der infizierten Zelle. Enthalten die Pflanzen hingegen ein spät aktivierendes Allel, so kann sich ein Haustorium in der Epidermiszelle ausbilden. Durch den programmierten Zelltod der Wirtszelle und der sie umgebenden Zellen wird dem Pilz allerdings seine Ernährungsgrundlage entzogen und die weitere Ausbreitung des Pathogens wird verhindert. Mit Hilfe einiger Mla- und MLO-Linien der Gerste wurden erste Hinweise auf die Reaktion der Stomata gegenüber dem Mehltau der Gerste gefunden (Prats et al. 2006, vergleiche Kapitel 1.3.1).

### **1.3 Die Spaltöffnung in der Immunantwort**

Der interzelluläre Raum der Blätter bietet mit seinen Nährstoffen ein ideales Umfeld für die Vermehrung pathogener Bakterien und Pilze. Wenn keine Verwundung der Blätter vorliegt, bilden die Spaltöffnungen den geeignetsten Zugang für Mikroorganismen in der Phyllosphäre. Daher ist es für die Pflanzen wichtig, die Öffnungsweite der Stomata nicht nur als Reaktion auf abiotische Faktoren zu regulieren, sondern auch bei Anwesenheit von potentiell schädlichen Mikroorganismen.

In Kapitel 1.3.1 soll kurz der Stand der Forschung bis zum Beginn dieser Arbeit in Bezug auf die Reaktion der Stomata auf Pathogene dargestellt werden. Das Kapitel 1.3.2 enthält eine Zusammenfassung der Vorgänge, die in Schließzellen zu einem Turgorverlust und somit zum Verschluss der Spaltöffnungen führen. Für den Stomaschluss sind die Anionenkanäle der Schließzelle von großer Bedeutung. Daher wird im Kapitel 1.3.3 der Kanal *AtSLAC1* vorge-

stellt. Verlustmutanten dieses Kanals zeigen einen Defekt in der Regulation der Spaltöffnungsweite in *A. thaliana*.

### 1.3.1 Die Reaktion der Stomata auf Pathogene

Frühe Untersuchungen an Tomate und *Commelina communis* ergaben bereits, dass die Anwesenheit der Elicitoren Chitosan oder Oligogalacturonsäure (OGA) die Stomaöffnung verändert wird (Lee et al. 1999). Der pilzliche Elicitor Chitosan, der durch Deacetylierung von Chitin entsteht, bewirkt, dass die Spaltöffnungsweite in beiden untersuchten Pflanzen nicht die der Kontrollen erreicht. Diese Wirkung des Elicitors wird allerdings durch die Zugabe des Enzyms Katalase oder des Komplexbildners EGTA vollständig aufgehoben. In diesen Experimenten konnte zudem mittels bildgebender Verfahren eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in den Schließzellen nach Zugabe der PAMPs festgestellt werden (Lee et al. 1999).

Für bakterielle Pathogene wurde weiter davon ausgegangen, dass Stomata nicht auf die Anwesenheit der Pathogene reagieren und diese daher als Zugang zum Apoplasten genutzt werden können (Melotto et al. 2006). Zunächst fand man nur heraus, dass die Vermehrung von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*PstDC3000*) in Blättern von zwei *A. thaliana*-Linien stark von der Art der Inokulation der Bakterien abhing (Zipfel et al. 2004). Bei einer Infiltration der Bakterien in die Blätter vermehrten sich *PstDC3000* sowohl in Wildtyp-Pflanzen, als auch in solchen, denen der Rezeptor für den bakteriellen Elicitor flg22 fehlt (vergl. auch Kap. 1.2.1). Werden die Bakterien hingegen auf die Blattoberfläche aufgebracht, so konnten nur in den Rezeptormutanten erhöhte Bakterienzahlen festgestellt werden. In dieser Studie wurden allerdings keine weiteren Aussagen darüber gemacht, wie genau die Wildtyp-Pflanzen das Eindringen der Bakterien in das Innere des Blattes verhindern. Wenig später wurde gezeigt, dass Bakterien nicht nur den Stomaschluss als Immunantwort auslösen können (Melotto et al. 2006), sondern auch, dass *PstDC3000* diesen durch die Abgabe des Phytotoxins Coronatin unterbinden kann (ebenda). Dies war der erste Hinweis, dass der Stomaschluss eine zentrale Rolle in der Immunantwort einnimmt, da bakterielle Pathogene die Stomaöffnungen benötigen, um in das Blattinnere zu gelangen.

Durch weitere Untersuchungen und Erkenntnissen aus anderen Feldern der Pflanzenphysiologie konnte so ein Teil des Weges von der Erkennung von *PstDC3000* hin zum Stomaschluss postuliert werden. Demnach aktiviert die Erkennung des Pathogens einen Teil der Immunantwort, der durch Salicylsäure (SA) reguliert wird (Melotto et al. 2006, Zeng und He 2010). Durch die Aktivierung der PRRs werden verschiedene Gene der SA-Biosynthese vermehrt transkribiert, was letztendlich zu einer erhöhten Konzentration von SA in den Zellen führt

(Delaney et al. 1994). In Folge dessen wird unter anderem das Protein NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-related Proteins 1) aktiviert, das in den Nukleus transportiert wird und dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert (Übersicht in Glazebrook 2005). Diese Transkriptionsfaktoren kontrollieren wiederum die Expression von Resistenzgenen, deren Translationsprodukte zur hypersensitiven Reaktion und, letztendlich, zum Zelltod führen. Dieser Signalweg wird aufgrund der Aktivität der Resistenzgene zur ETI der Pflanze gezählt und dient der Abwehr von biotrophen Pathogenen, die Nährstoffe aus den Pflanzenzellen aufnehmen, diese aber nicht nachhaltig schädigen (Glazebrook 2005). Es wurden Hinweise gefunden, die den SA-Signalweg mit dem ABA-Signalweg verknüpfen, da ABA-insensitive Mutanten nicht länger in der Lage sind, Pathogene korrekt zu erkennen (Zeng und He 2010). Wo genau allerdings diese Verknüpfung ansetzt ist bislang nicht erforscht.

Im Gegensatz zu Bakterien nutzen die wenigsten Pilze die Stomata als Zugangspunkt. Stattdessen dringen sie mit einem Appressorium und durch lytische Enzyme durch die Kutikula und die Zellwand (vergleiche auch Kap. 1.1.2). Dennoch konnten in Experimenten mit Gerste eine Veränderung der stomatären Leitfähigkeit festgestellt werden, wenn die Blätter mit Mehltau inokuliert waren (Prats et al. 2006). Dabei zeigte sich, dass sich in anfälligen Pflanzen die Leitfähigkeit der Blätter im Licht erniedrigte, während sie im Dunkeln zunächst gleich blieb. Wurden Pflanzen verwendet, die das Mla1-Gen trugen, zeigte sich zunächst ebenfalls diese Erniedrigung. Etwa 22 Stunden nach der Inokulation glich sich allerdings die Leitfähigkeit der Stomata an die Werte der uninfizierten Blätter an. Das Genprodukt von Mla1 vermittelt eine Resistenz gegen den Mehltaupilz und löst in Zellen die HR aus, welche die Zellen absterben lässt. Durch mikroskopische Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass in den frühen Phasen der Interaktion die Öffnung der Stomata in Anwesenheit des Pilzes verringert war (Prats et al. 2006). In den Pflanzen, deren befallene Epidermiszellen eine HR zeigen, konnten die Stomata nach dem Absterben der benachbarten Epidermiszellen nicht mehr schließen, sondern blieben immer geöffnet. Dies lässt sich auf die Struktur des stomatären Komplexes in Getreideblättern zurückführen. Dieser besteht aus den Schließzellen, die durch eine Änderung des Turgordruckes ihr Volumen und Form verändern, und den Nebenzellen, die nicht nur Ionen mit den Schließzellen austauschen, sondern auch als Widerlager für die Bewegung der Schließzellen dienen (Franks und Farquhar 2007, Mumm et al. 2011). Fällt die Spannung weg, welche die benachbarten Epidermiszellen auf den Komplex ausüben, so wird die Bewegung der Schließzellen unterbunden und die Spaltöffnung kann nicht komplett geschlossen werden.

### 1.3.2 Mechanismus des Stomaschlusses

Die Gerste besitzt Spaltöffnungen des Gramineen-Types, der aus den porenbildenden Schließzellen und den sogenannten Nebenzellen besteht. Durch diesen speziellen Aufbau muss die Aktivierung der Kanäle in beiden Zelltypen aufeinander abgestimmt werden um eine Öffnung der Stomata zu ermöglichen. Nebenzellen sind, im Gegensatz zu den Schließzellen, nicht elektrisch isoliert, so dass lediglich die Membranpotentiale der Zellen aufgezeichnet werden können (Mumm et al. 2011). Die Regulation des Ionentransports in den Schließzellen ist hingegen gut untersucht, meist in Experimenten mit den dicotylen Pflanzen *A. thaliana*, *Vicia faba* und Tabak (Übersicht bei Kim et al. 2010, Ward et al. 2009). Bei dem Stomaschluss spielen besonders die  $H^+$ -ATPase, der  $K^+$ -Auswärtsgleichrichter GORK und die auswärtsgerichteten Anionenkanäle eine große Rolle. Die Vorgänge der Ionenaufnahme und -abgabe in und aus der Vakuole sind ebenfalls von großer Bedeutung bei der Stomabewegung, dienen die Vakuolen doch als größter interzellulärer Speicher verschiedener Ionen (MacRobbie 1998). Zur besseren Übersicht sollen in diesem Kapitel dennoch nur die Transportvorgänge an der Plasmamembran der Schließzellen betrachtet werden.

Die  $H^+$ -ATPase der Schließzellen pumpt unter Verbrauch von ATP Protonen in den Apoplasten und ist somit für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verantwortlich (Pandey et al. 2007). Durch das Halten des Membranpotentials bei Werten negativ des Nernst-Potentials von Kalium, werden die Zellen als hyperpolarisiert bezeichnet. Die einwärtsgerichteten  $K^+$ -Kanäle öffnen sich bei Potentialen um -100 mV und die Kationen gelangen in die Schließzelle (Roelfsema et al. 2001). Anionen werden durch Symporter zusammen mit Protonen aufgenommen oder in den Schließzellen etwa in Form von Malat synthetisiert (Roelfsema und Hedrich 2005). Dadurch steigt der Turgordruck der Zellen an, was zu einer Verformung der Zelle und der Öffnung des Stomas führt (Roelfsema und Hedrich 2005, Roelfsema und Hedrich 2009).

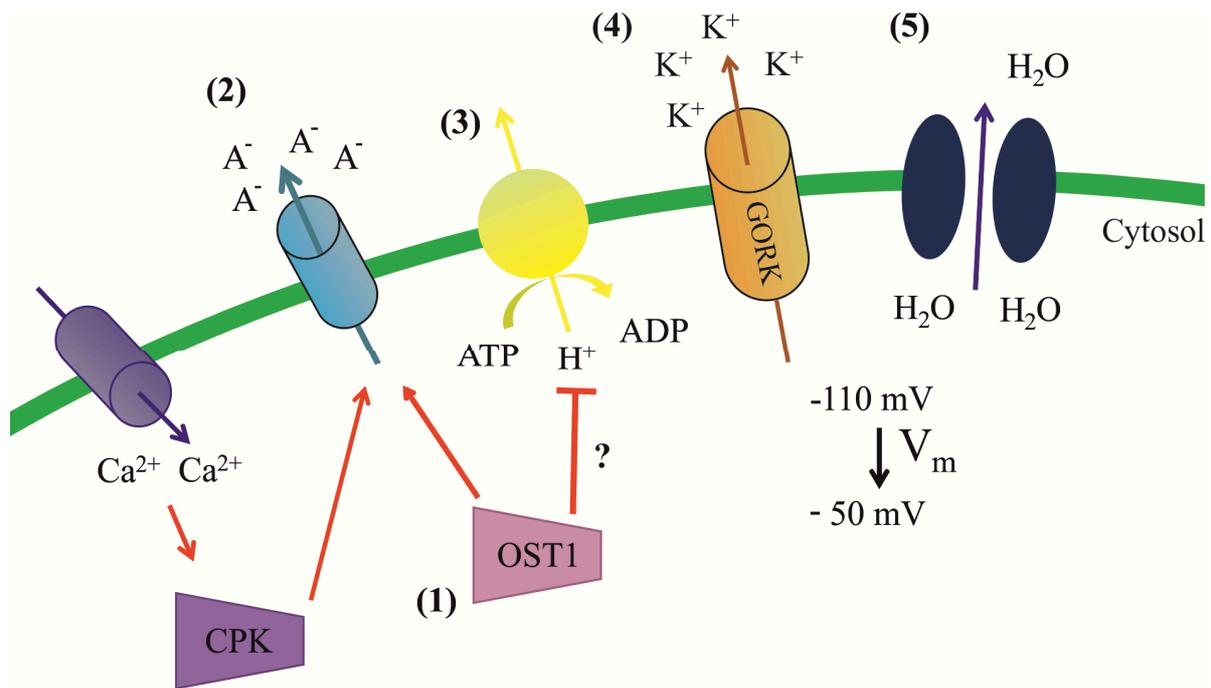
Erkennen die Schließzellen nun das Trockenstresshormon Abscisinsäure (ABA), verringert sich die Lichteinstrahlung oder der  $CO_2$ -Partialdruck, oder erfolgt ein Angriff durch ein Pathogen, so wird der Stomaschluss ausgelöst. Am besten untersucht ist in diesem Zusammenhang wohl der ABA-Signalweg, der hier näher ausgeführt werden soll. Bis heute ist nicht genau geklärt, ob ABA aus den Wurzeln in die Blätter transportiert wird, oder ob ein anderes Signal die Blatt- oder sogar die Schließzellen veranlasst, selbst ABA zu produzieren (Christmann et al. 2007, Endo et al. 2008, Jiang und Hartung 2008, Koiwai et al. 2004).

Obwohl die Identität des ABA-Rezeptors in den Schließzellen lange nicht bekannt war, waren die Antworten der Zelle auf das Trockenstresshormon gut untersucht. So konnte die

Kinase OST1 (OPEN STOMATA 1) isoliert werden, nach deren Verlust die Spaltöffnungen auch bei Trockenstress geöffnet blieben (Mustilli et al. 2002). Diese interagiert unter anderem mit der NADPH-Oxidase *AtRBOHF*, wodurch ein ROS-Signal ausgelöst wird (Kwak et al. 2003). Des Weiteren konnten Kinasen der CDPK-Familie gefunden werden, deren Verlustmutanten eine unvollständige ABA-Antwort verursachen (Mori et al. 2006, Zhu et al. 2007). Diese Kinasen sind im Gegensatz zu OST1 Calcium-sensitiv, was auf eine Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in der ABA-Antwort hindeutet. In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass als Antwort auf ABA durch einige der Kinasen und die Aktivität der NADPH-Oxidasen Calciumkanäle aktiviert werden und das Signalmolekül im Cytosol angereichert wird (Kwak et al. 2003, Pei et al. 2000).

Durch die verschiedenen Kinasen werden anschließend auch Anionenkanäle in der Plasmamembran phosphoryliert, bei denen zwischen den R- und S-Typ Anionenkanäle unterschieden wird. Die R-Typ Anionenkanäle (engl. Rapid, schnell) aktivieren innerhalb weniger Millisekunden und inaktivieren anschließend wieder. Die S-Typ Kanäle aktivieren hingegen langsam (engl. Slow) (Raschke et al. 2003, Schroeder und Keller 1992). Beide Arten von Anionenkanälen sind an der ABA-Antwort der Schließzellen beteiligt (Roelfsema et al. 2004). Im Kapitel 1.3.3 wird die Identifizierung des S-Typ Anionenkanals der Schließzellen ausgeführt, so dass hier nur auf die Kanäle des R-Typs eingegangen werden soll. Beim Transport der Anionen ist, neben den anorganischen Ionen  $\text{Cl}^-$  und  $\text{NO}_3^-$ , auch das organische Anion Malat wichtig (Roelfsema und Hedrich; 2005). Für den R-Typ Anionenkanal kamen daher auch die Mitglieder der Familie der Aluminium-aktivierten Malat-Transporter in Frage. In der Wurzel dienen diese Transporter der Aluminiumtoleranz, indem sie Malat in den Boden abgeben, wo es mit den Metallionen komplexiert (Hoekenga et al. 2006). Durch die Analyse der Genfamilie gelang die Identifizierung von *AtALMT12*, eines Teils des R-Typ Anionenkanals, der QUAC1 genannt wurde (Meyer et al. 2010, Sasaki et al. 2010). Über die Regulation des QUAC1 ist bislang wenig bekannt (Konrad und Hedrich 2008, Meyer et al. 2010). Die Regulation der S-Typ Kanäle ist hingegen recht gut untersucht. Sie wird in Kapitel 1.3.3 näher betrachtet.

Vor kurzem konnten die Rezeptoren für ABA in den Schließzellen identifiziert werden (Ma et al. 2009, Park et al. 2009). Proteine der PYR/PYL/RCAR-Familie bilden in Anwesenheit von ABA einen Komplex mit der Phosphatase ABI1, wodurch diese inhibiert wird. In Verlustmutanten von ABI1 konnten weder die typischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten, noch die Aktivierung der OST1-Kinase oder der S-Typ Anionenkanäle beobachtet werden (Allen et al. 1999, Grabov et al. 1997, Mustilli et al. 2002). Das Stresshormon ABA führt zudem, durch die Inhi-



**Abbildung 1.5: Elektrophysiologische Vorgänge beim Stomaschluss.** Durch Dunkelheit, Trockenstress oder die Erkennung eines Pathogens werden die Anionenkanäle (2) der Schließzellen aktiviert. Dies geschieht durch eine Phosphorylierung der Anionenkanäle durch verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -ab- und -unabhängige Kinasen, wie etwa OST1 (1). Da gleichzeitig die Aktivität der  $\text{H}^+$ -ATPase (3) gehemmt wird, verringert sich das Membranpotential der Schließzellen auf Werte positiv des Nernst-Potentials für Kalium. Erreicht das Membranpotential Werte von mehr als  $-80$  mV, wird der  $\text{K}^+$ -Auswärtsleiter GORK aktiviert (4) (Ache et al. 2000). Den Ionen folgt nun Wasser (5) durch die Membran, so dass sich der Turgor der Schließzellen erniedrigt und der Spalt geschlossen wird. Abbildung nach Roelfsema und Hedrich (2005).

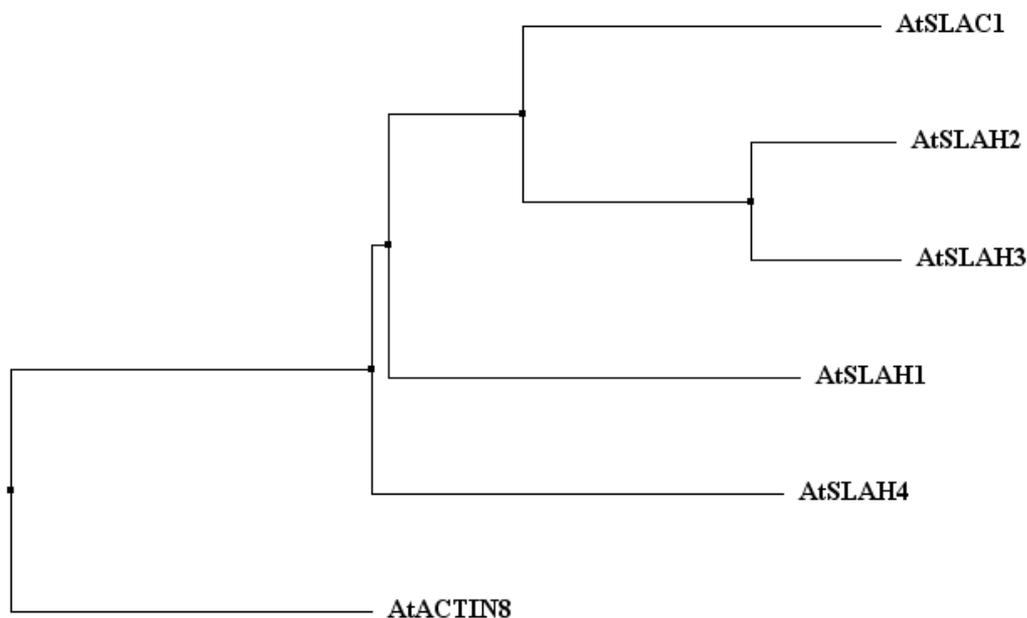
bierung einer bislang nicht bekannten Kinase, zu einer Hemmung der  $\text{H}^+$ -ATPase der Plasmamembran (Goh et al. 1996, Brault et al. 2004, Zhang et al. 2004). Zusammen mit der Aktivierung von Anionenkanälen wird dadurch die Plasmamembran auf Werte positiv des Nernst-Potentials von  $\text{K}^+$  depolarisiert (Pei et al. 1997, Schroeder et al. 1993). Die Vorgänge beim Stomaschluss sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst.

### 1.3.3 Der Anionenkanal *AtSLAC1*

Die Rolle der S-Typ Anionenkanäle im Stomaschluss war lange bekannt (Keller et al. 1989, Schroeder und Hagiwara 1989). Dennoch blieb unklar, welches Gen den S-Typ-Kanal der Schließzellen kodiert. Das Gen wurde dann 2008 parallel von Arbeitsgruppen in verschiedenen Ländern identifiziert. Die ersten Hinweise fanden sich bei der Untersuchung von Ozonsensitiven Mutanten in *Arabidopsis thaliana*, die einen Defekt in der Leitfähigkeit der Stomata aufweisen. Dabei wurde eine Mutation im Gen *At1g12480* gefunden, welches große Ähnlichkeit zu einem  $\text{C}_4$ -Dicarboxylat-Transporter aufwies (Negi et al. 2008, Vahisalu et al.

2008). Diese Familie von Transportern vermittelt unter anderem in Bakterien eine Resistenz gegen das Metallion Tellurit, so etwa das Protein TehA aus *Escherichia coli* (Taylor et al. 1994). Für das Protein aus *Arabidopsis* wurde eine Lokalisation in der Plasmamembran der Schließzellen vorhergesagt, was mittels Promotor-GUS-Linien und GFP-Fusionslinien bestätigt werden konnte (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008). In den Veröffentlichungen wurden zudem vier weitere Homologe Gene in *A. thaliana* erwähnt. In Abbildung 1.6 wurde aus diesen Sequenzen ein phylogenetischer Baum berechnet, der die Verwandtschaft der fünf Gene dieser Familie darstellt. Dazu wurden die Regionen der Transmembranen verwendet, da der N-Terminus der Proteine hoch variabel ist (Vahisalu et al. 2010). Das Alignment ähnelt dem aus der Literatur, das auf den Proteinsequenzen der fünf gefundenen Homologen beruht (Saji et al. 2008).

Nach der *in silico*-Analyse des Gens wurde die Reaktion der Stomaöffnung auf verschiedene Umweltreize wie Licht, Ozon und erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentrationen untersucht. Es stellte sich heraus, dass die *slac1*-Mutante eine verminderte Reaktion der Stomaöffnungen auf alle Reize aufwies (Saji et al. 2008). Daher wurde eine allgemeine Rolle des Proteins im Stomaschluss angenommen.



**Abbildung 1.6: Verwandtschaft der Proteinfamilie um SLAC1 aus *A. thaliana*.** Mittels des Programms Jalview wurde ein Baum berechnet, um die verwandtschaftlichen Beziehungen der Proteine untereinander zu verdeutlichen. Dazu wurde den Proteinen der N-Terminus bis zum Beginn der ersten Transmembranhelix entfernt, da dieser stark variabel ist. Dabei zeigt sich, dass die Homologen Proteine SLAH2 und SLAH3 die jüngsten Mitglieder der Genfamilie sind, während SLAH1 und SLAH4 sich bereits sehr früh gebildet haben. Als „Outgroup“ wurde hier ACTIN8 (NM\_103814.3) aus der Modellpflanze *A. thaliana* verwendet. Die Berechnung erfolgte nach dem „Neighbour-Joining“-Algorithmus auf der Grundlage der Blosom64-Matrix.

Das Fehlen des Genproduktes resultierte zudem in einem Wegfall der Anionenströme in Schließzellprotoplasten (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008). Das kodierte Protein wurde daher in SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1) umbenannt. Die vier bekannten homologen Gene in Arabidopsis bekamen die Bezeichnungen *slah1* bis *slah4* (SLAC1 Homologe).

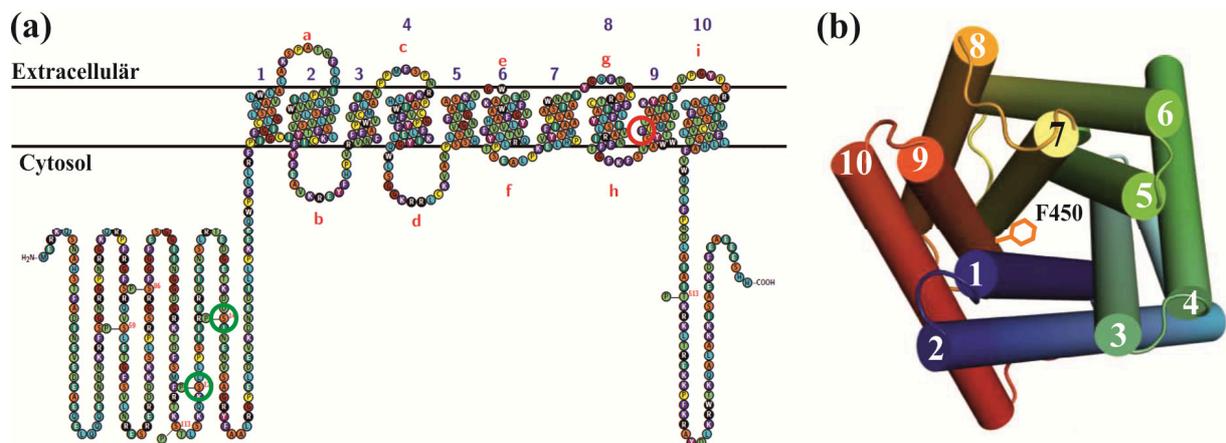
Die ersten elektrophysiologischen Messungen mit SLAC1 wurden in Schließzellprotoplasten aus *A. thaliana* durchgeführt (Vahisalu et al. 2008). Dabei zeigte sich, dass SLAC1 Einfluss auf die Ströme der langsam deaktivierenden Anionenkanäle nimmt, da keine Ströme dieses Kanals in den Verlustmutanten *slac1-1* und *slac1-3* gemessen werden konnten. Später konnte dann mit Messungen an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* nachgewiesen werden, dass *AtSlac1* tatsächlich selbst den S-Typ-Anionenkanal der Schließzellen kodiert (Geiger et al. 2009). Der Kanal zeigt eine für Anionenkanäle typische Ionenpräferenz, mit einer 5- (Lee et al. 2009) bis 8-fach (Geiger et al. 2009) höheren Permeabilität für Nitrat- gegenüber Chloridionen.

In den folgenden Jahren wurde mehr über die Regulation des Kanals herausgefunden. Zunächst konnte für die Kinase *AtOST1* eine Interaktion mit dem Kanal in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* und Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* nachgewiesen werden (Geiger et al. 2009, Lee et al. 2009). Diese Kinase ist Bestandteil des ABA-Signalweges und somit am Stomaschluss als Antwort auf Wassermangel beteiligt (vergl. Kap. 1.3.2).

In den Untersuchungen mit *X. laevis*-Oozyten zeigte sich zudem, dass das Serin120 im N-Terminus des Kanals wichtig für die Aktivierung durch OST1 ist (Geiger et al. 2009, s. Abbildung 1.7a). Anschließend wurde dann die Interaktion mit verschiedenen Calcium-abhängigen Kinasen der CDPK-Familie gezeigt (Geiger et al. 2010). Diese große Familie besteht in *A. thaliana* aus 34 Mitgliedern, die sich durch eine N-terminale Kinasedomäne und eine C-terminale Calmodulin-Domäne auszeichnen (Cheng et al. 2002). In BiFC-Studien zeigte der Kanal *AtSLAC1* eine Interaktion mit vier Kinasen dieser Familie, wobei *AtCPK23* die höchste Komplementation zeigte (Geiger et al. 2010). Bei elektrophysiologischen Messungen in *X. laevis*-Oozyten zeigte diese Kinase auch die größte Aktivierung des Kanals. Im Gegensatz zu *AtCPK21*, die ebenfalls den Kanal aktiviert, zeigt *AtCPK23* eine sehr geringe Calciumabhängigkeit (Geiger et al. 2010). Neben den bereits erwähnten Aminosäuren gibt es weitere, von denen angenommen wird, dass sie in der Regulation des Kanals durch Kinasen eine Rolle spielen. Dabei wurden drei weitere Serine im N-Terminus identifiziert (Positionen 59, 86 und 146), die in Peptid-Essays von *AtOST1* modifiziert wurden (Geiger et al. 2009,

Vahisalu et al. 2010). Im C-Terminus wurde zudem ein von *AtOST1* modifiziertes Threonin an Position 513 gefunden (Geiger et al. 2009).

Trotz der Erkenntnisse über die Regulation ist der genaue Mechanismus der Aktivierung noch ungeklärt. Durch Voraussagen über die Topographie des Proteins wurde angenommen, dass es zehn Transmembrandomänen besitzt (Saji et al. 2008, vergleiche auch Abbildung 1.7). Ein wichtiger Schritt hin zu einem tieferen Verständnis war die Strukturanalyse eines TehA-Proteinkristalls aus *Haemophilus influenzae* und die Modellierung des *AtSLAC1* aufgrund seiner Homologie zu diesem Protein (Chen et al. 2010). Die vorhergesagten zehn Transmembrandomänen ordnen sich in beiden Proteinen in zwei Ringen an. Die Helices 1, 3, 5, 7 und 9 bilden dabei den inneren Ring, der die Pore des Kanals definiert (Abbildung 1.7b). Diese hat eine Breite von 5 Å und wird in der Mitte durch die Seitenkette eines Phenylalanins in der neunten Helix verengt (Abb. 1.7b). Die Helices der Pore erscheinen dabei in den Alignments höher konserviert als die äußeren Helices (Chen et al. 2010). Die Bedeutung des Phenylalanins an Position 450 konnte in Experimenten mit Oozyten nachgewiesen werden, da Kanalmutanten, die anstelle eines Phenylalanins ein Alanin enthielten, konstitutiv aktiv waren (Chen et al. 2010).



**Abbildung 1.7: Modell des Anionenkanals *AtSLAC1*.** In den letzten Jahren ergab sich ein recht umfangreiches Bild der Struktur von *AtSLAC1* und der regulatorisch wichtigen Aminosäuren. (a) Aus *in silico*-Vorhersagen und dem Vergleich mit der Struktur des TehA-Proteins aus *E. coli* konnte die Topographie des Proteins in der Plasmamembran der Schließzelle abgeleitet werden. Dabei zeigen der N- und C-Terminus des Proteins in das Cytosol und sind so für Modifikationen durch Kinasen und Phosphatasen zugänglich. Es wird vermutet, dass die Serine an Position 120 und 146 ein Ziel für die Kinase *AtOST1* darstellen (grüne Kreise). Durch Peptid-Essays konnten zudem drei weitere Aminosäuren identifiziert werden, die für eine Phosphorylierung in Frage kommen. Zehn Transmembranhelices spannen sich durch die Membran, wobei die Helices 1, 3, 5, 7 und 9 die Pore des Kanals ausbilden. Ein Phenylalanin an Position 450, innerhalb der neunten Helix verschließt die Pore (roter Kreis). (b) Modell des Proteins TehA aus *Haemophilus influenzae*. Aufgrund der Struktur des Proteinkristalls von *HiTehA* konnte ein Modell von *AtSLAC1* erstellt werden. Durch die Ansicht von der extrazellulären Seite auf das Protein wird die Anordnung der Helices und die Lage der Pore, sowie des verschließenden F450 verdeutlicht (verändert nach Chen et al. 2010).

Momentan wird davon ausgegangen, dass der Aktivierung des Kanals durch die bekannten Kinasen eine Konformationsänderung des N- bzw. C-Terminus vorausgeht (Vahisalu et al. 2010). Dadurch werden wahrscheinlich die Helices bewegt, was in einer Verschiebung des Phenylalanins und der Öffnung der Pore resultiert (Chen et al. 2010, T. Maierhofer, pers. Mitteilung).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Phytopathogene lösen auf ihren Wirtspflanzen einen vorübergehenden Stomaschluss aus. Obwohl bereits einiges über diesen Teil der Immunantwort bekannt ist, bleiben gerade im Bezug auf den Mehltaupilz noch Fragen offen. Die dauerhafte Öffnung der Stomata etwa, die während der späten Infektionsstadien auftritt, wird auf ein Absterben der benachbarten Epidermiszellen zurückgeführt (Prats et al. 2006). Der Effekt des Stomaschlusses, der in den frühen Stadien der Infektion auftritt, ist bislang nicht näher untersucht worden, so dass der genaue Zeitpunkt unbekannt ist, an dem die Immunantwort der Stomata durch den Pilz ausgelöst wird. In dieser Arbeit wird daher zunächst untersucht, ab welchem Stadium der Infektion die Stomata der Gerste auf den Pilz reagieren und die Spaltöffnungen schließen.

Es wird weiterhin untersucht, welche Bedeutung den Ionen-transportprozessen der Gerstenschließzellen in der Immunantwort zukommt. Dafür wird zunächst die Änderung des Ionen-transportes in Antwort auf Licht und Dunkelheit dokumentiert um sie anschließend mit der Reaktion auf den Mehltaupilz *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* und verschiedene Elicitoren zu vergleichen. So sollen diejenigen Transportprozesse isoliert werden, die eine zentrale Rolle in der Immunantwort der Schließzellen einnehmen.

Als gesonderter Teil dieser Arbeit wird zudem die Genfamilie der langsam aktivierenden Anionenkanäle in Gerste untersucht, deren Homologen in *Arabidopsis thaliana* als ein wichtiger Bestandteil der verschiedensten physiologischen Signalwege angesehen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Anzuchtbedingungen

#### 2.1.1 Pflanzen und Pilze

Für die Experimente wurden Gerstenpflanzen der Linie „Ingrid“ (zur Verfügung gestellt von R. Panstruga, MPI für Züchtungsforschung, Köln) angezogen. Die Pflanzen wurden in einem Klimaschrank mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden angezogen. Die Temperatur betrug während des Tages 22 °C und in der Nacht 16 °C. Die Pflanzen wurden mit 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durch Leuchtstoffröhren (Osram, L363W/25; [www.osram.de](http://www.osram.de)) beleuchtet. Experimente wurden mit den ersten voll entwickelten Blättern von einer Woche alten Pflanzen durchgeführt. Für die Samenernte wurden die Pflanzen in den Gewächshäusern des Institutes gehalten.

Der Stamm CC1 des obligat biotrophen Pilzes *Blumeria graminis* (Speer) f. sp. *hordeii* (DC.) (T. Carver, Institute of Grassland and Environmental Research, Aberystwyth; Großbritannien) wurde in einem Klimaschrank auf der Gerstenlinie „Bonus“ angezogen. Der Tag-/Nachtzyklus betrug hier 16/8 h mit Temperaturen von 22 °C am Tag und 18 °C in der Nacht. Konidien des Pilzes wurden verwendet, wenn weiße Kolonien auf den Blättern sichtbar waren. Um frisch gebildete Konidien zu erhalten, deren Keimungsrate sehr hoch ist, wurden die Pflanzen am Tag zuvor geschüttelt, um alte Konidien zu beseitigen.

#### 2.1.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Klonierungsexperimente dieser Arbeit wurde der *E. coli*-Sicherheitsstamm XL1-Blue MRF<sup>c</sup> ( $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$  [F<sup>+</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]) (Agilent Technologies, [www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com)) genutzt. Die Bakterien wurden in Luria-Bertani-Medium (LB, 10% Trypton, 10% NaCl, 5% Hefeextrakt) bei 37° C in Flüssigkultur mit 300 rpm angezogen. Bei der Anzucht auf Platten, wurde dem LB-Medium 15% Agar zugegeben. Für die Anzucht transgener Bakterien wurden dem Medium je 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin zur Selektion zugesetzt.

### 2.2 Vorbereitung der Pflanzen

Am Abend vor dem Experiment wurde das erste Blatt einer intakten *Hordeum vulgare*-Pflanze mit der adaxialen Seite mit doppelseitigem Klebeband auf einer Plexiglasscheibe fixiert. Diese war auf dem Objektisch eines aufrechten Mikroskops (Axioskop 2FS; Zeiss,

<http://www.zeiss.com>) platziert. Durch diesen Aufbau sind die Stomareihen auf der abaxialen Blattseite für Injektions- und Einstichexperimente, sowie für die digitale Fotografie zugänglich. Für Experimente mit *B. graminis* f. sp. *hordeii* wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators (MM3A; Kleindieck Nanotechnik, <http://nanotechnik.com>) zehn bis 15 Sporen von *B. graminis* auf ein Blatt von „Ingrid“ übertragen. Nach 15 h wurde bei Einstichexperimenten ein Tropfen Badlösung (Zusammensetzung s. Beschreibung der einzelnen Experimente) auf die Blattoberfläche aufgebracht.

### **2.3 Messung der Spaltöffnungsweiten**

Die Gerstenblätter wurden für die Experimente mit Licht einer Photonenflussdichte von  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belichtet. Zusätzlich wurde ein wassergesättigter  $\text{CO}_2$ -freier Luftstrom ( $400 \text{ ml min}^{-1}$ ) mit Hilfe eines Plastiksuspensors ( $14 \times 2 \text{ mm}$ ) über das Blatt geleitet. Durch ein Objektiv mit langem Arbeitsabstand (Epiplan LD 50x, Zeiss) wurden die Stomata über einen Zeitraum von 30 min beobachtet und dabei alle 20 - 30 s Bilder mit einer CCD Kamera (IMAG-K4, Walz, [www.walz.com](http://www.walz.com)) aufgenommen. Die Kamera wurde dabei durch die Kappa CameraControl Software (<http://www.kappa.de>) gesteuert. Das Ausmessen der Stomata erfolgte mit der Metamorph (Molecular Devices, <http://www.moleculardevices.com>) oder der ImageJ (NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) Software. Dabei wurde in jedem Bild die Breite der Spaltöffnung mit Hilfe des internen Messprogramms der jeweiligen Software an der linken Seite des Stomas bestimmt (s. Abb. 2.1). Der Umrechnungsfaktor zum Erhalt der Breite in  $\mu\text{m}$  wurde mit Hilfe eines Objektmikrometers bestimmt und beträgt für das verwendete Objektiv  $2,83 \text{ px} \mu\text{m}^{-1}$ . Da die absolute Stomaweite in  $\mu\text{m}$  stark schwanken kann, wurden die Werte normiert. Dabei wurde die Öffnungsweite direkt vor der Injektion als Wert „1“ festgelegt.

### **2.4 Elektrophysiologische Methoden**

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik (engl. two electrode voltage clamp, DEVC) können in elektrisch isolierten Zellen, wie den Schließzellen oder Oozyten, nicht nur die Membranspannungen aufgezeichnet werden, sondern auch die Leitfähigkeit der Plasmamembran durch die Anwendung der Spannungsklemmtechnik. Hierbei wird durch die zweite Elektrode ein Strom in die Zelle injiziert, der zum Erreichen einer vorgegebenen Spannung benötigt wird. So können Veränderungen in der Leitfähigkeit der Membran in Abhängigkeit ihres Potentials untersucht werden.

Bei Oozyten werden für diese Methode zwei Elektroden verwendet, die an verschiedenen Stellen in die Zelle eingestochen werden. Im Gegensatz dazu verwendet man für kleinere Pflanzenzellen Elektroden, die aus zwei Kapillaren bestehen, die miteinander verschmolzen sind, und bei denen die Öffnungen der Kapillaren nur wenige nm voneinander entfernt sind. Mit diesen Elektroden werden, durch einen einzigen Einstich, zwei elektrische Zugänge zu der Zelle hergestellt.

### **2.4.1 Einstich in intakte Pflanzen**

#### 2.4.1.1 Herstellung der Elektroden

Elektroden zur Messung des Membranpotentials wurden mit einem Laserpuller (P-2000; Sutter Instrument Co., <http://www.sutter.com>) aus einzelnen Borsilicat-Kapillaren (Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 1 mm; Hilgenberg, <http://www.hilgenberg-gmbh.de>) hergestellt. Dabei wurden die Kapillaren punktuell erhitzt und schnell auseinandergezogen, so dass Spitzen mit einem Widerstand von 100-150 M $\Omega$  entstanden.

Für doppelläufige Elektroden, mit denen auch die durch verschiedene Spannungen induzierbare Ströme aufgezeichnet werden können, wurden zunächst zwei Kapillaren in einen vertikalen Elektrodenpuller (L/M-3P-A, Heka, <http://www.heka.com>) eingespannt und in der Mitte durch eine Glühwendel erhitzt. Durch das Drehen um 360° werden die beiden Kapillaren umeinander gewunden und aneinander geschmolzen. Nach einer Abkühlungsphase werden die Kapillaren erneut erhitzt und 4 mm auseinander gezogen. Nachdem die Kapillaren ausgekühlt sind, werden sie in den Laserpuller eingespannt und in der Mitte punktuell durch den Laser erhitzt. Durch das Auseinanderziehen entstehen so zwei spitze Doppelelektroden mit Widerständen zwischen 80 und 240 M $\Omega$ .

Die Glaskapillaren der Einzel- und Doppelelektroden wurden anschließend mit den Halbzellen verbunden. Diese bestanden aus einem etwa 3 cm langen Stück Silberdraht, welches von einem Polyvinylschlauch mit einem Innendurchmesser von 1.3 mm ummantelt war. Der Schlauch wurde so gekürzt, dass der Silberdraht an beiden Enden frei lag. An einem Ende wurde nun ein dünner Kupferdraht von etwa 5 cm Länge angelötet, der über einen Stecker am Vorverstärker (HS-2A x 0,01, Eingangswiderstand  $\sim 10^{13}$   $\Omega$ ; Axon Instruments, Molecular Devices) befestigt wurde. Das andere Ende des Silberdrahtes wurde in eine 0.5 M KCl-Lösung getaucht und mit Hilfe einer Gleichspannung mit einer Silberchloridschicht überzogen.

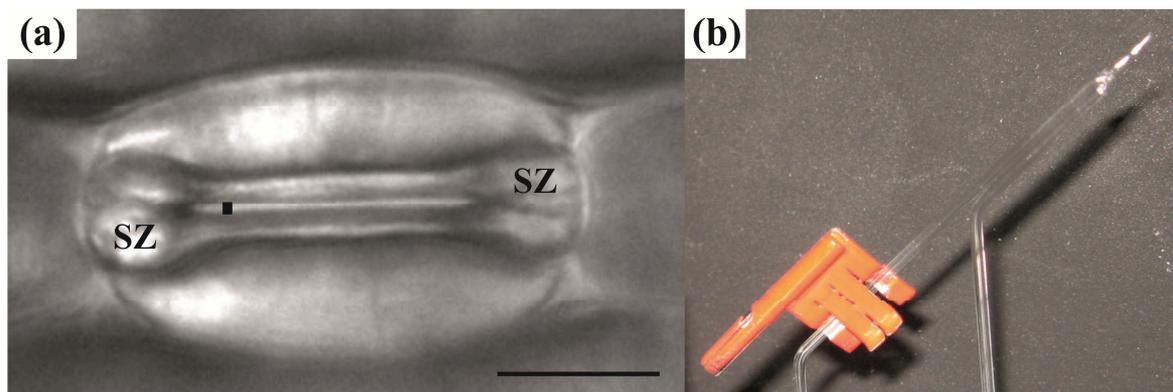
### 2.4.1.2 Einstich in Schließzellen

Für DEVC- und Membranpotentialmessungen wurden die Blätter so unter einem Wasserimmersionsobjektiv (ACHROPLAN 40x, Zeiss) fixiert, dass die Längsachse der Stomata von links nach rechts verlief (Abb. 2.1a). Die doppelläufigen Kapillaren (Abb. 2.1b) wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators (MM3A; Kleindieck Nanotechnik) in die Mitte der Stomaöffnung gebracht.

Von dort werden sie bei einer geringen Geschwindigkeit des Mikromanipulators auf die linke Seite des Spaltes zubewegt und direkt vor der Stelle platziert, an der die beiden Schließzellen aufeinandertreffen. Die Spitze der Elektrode wird jetzt so weit nach vorn bewegt, bis das eingeschaltete akustische Signal das Durchbrechen der Plasmamembran anzeigt.

### 2.4.1.3 Einstich in Nebenzellen

Zur Bestimmung des Membranpotentials in Nebenzellen wurden fixierte Gerstenblätter so unter dem Objektiv platziert, dass die Längsachse der Stomata im Okular von hinten nach vorne verlief. Dadurch waren die Nebenzellen gut für die einzelkapillarigen Elektroden zugänglich. Diese wurden zunächst mit einem Mikromanipulator (MM3A; Kleindieck Nanotechnik) über der Mitte des Stomas platziert. Mit einer geringen Geschwindigkeit des Manipulators wurden die Elektroden nun dicht über den Schließzellen auf die Nebenzellen zubewegt. Das Berühren der Zellwand wurde durch einen Ton hörbar gemacht. Änderungen in der Tonhöhe weisen auf Änderungen des gemessenen Potentials hin und helfen so, die Platzierung der Elektrode im Cytoplasma vorzunehmen.



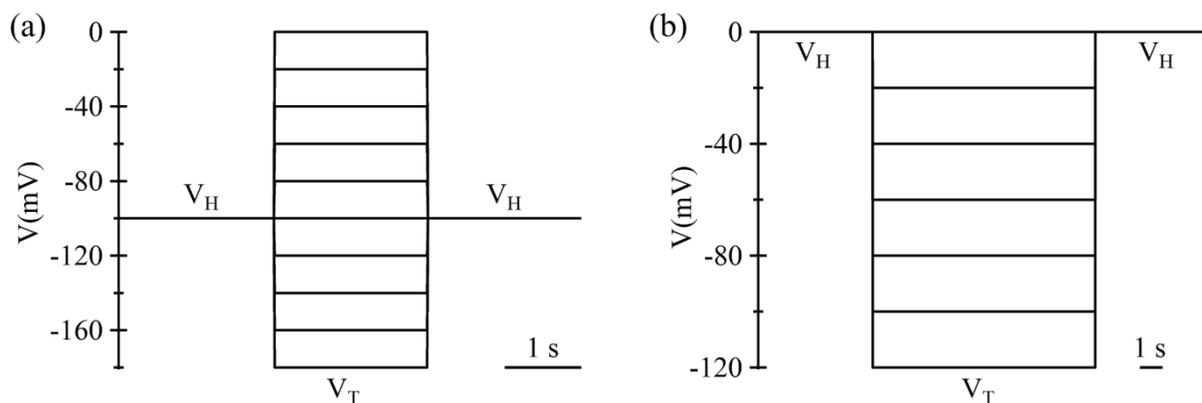
**Abbildung 2.1: Lage der Messstelle, Ausrichtung der Stomata und verwendete Elektroden.** (a) Die Weite des Spaltes zwischen den Schließzellen wurde in den Experimenten am linken Rand des Stomas gemessen. Die Stelle wurde im Bild durch eine Markierung (■) gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken gibt 10  $\mu\text{m}$  an. (b) Für das Einstechen der Schließzellen wurden doppelläufige Elektroden aus Glaskapillaren verwendet, die mit Silber-Chlorid-Halbzellen verbunden wurden. Durch den Einsatz dieser Elektroden waren sowohl Potential- als auch Strommessungen möglich.

## 2.4.1.4 Pulsprotokolle

Für die DEVC-Messungen von Schließzellen wurden in der Software PULSE (HEKA) verschiedene Protokolle programmiert, die über ein Interface (ITC-16, HEKA) vermittelt werden. Für die Aufzeichnung des Membranpotentials wurde der Strom auf 0 pA geklemmt und die Änderungen des Potentials über die Zeit aufgezeichnet. Dabei wurden die Daten mit einer Rate von 33 Hz aufgenommen. Für die zeitabhängigen Ströme, die während der Experimente gemessen wurden, wurde eine Frequenz von 1 kHz verwendet.

Das Pulsprotokoll für die Aufzeichnung der Aktivität aller Ionenkanäle in Schließzellen bestand aus drei Abschnitten, die mehrfach wiederholt wurden (Abb. 2.2a, Tab. 2.1). Die Zellen wurden bei -100 mV geklemmt, da bei dieser Spannung die Kaliumkanäle inaktiv sind. Von dieser Haltespannung ( $V_H$ ) aus wurde die Membran auf verschiedene Testspannungen ( $V_T$ ) geklemmt und für 2 s gehalten. Anschließend wurde die Zelle wieder auf die Haltespannung geklemmt. Zwischen den einzelnen Testpulsen lagen jeweils 4 s. Die Testspannung wurde bei jeder Wiederholung um 20 mV erhöht.

Elektrodenfüllung	Haltespannung (mV)	1. Testspannung (mV)	Differenz der Testspannungen (mV)
KCl	-100	-180	+ 20
CsCl	0	0	- 20



**Abbildung 2.2: Diagramme zur Darstellung der Pulsprotokolle.** (a) Für die Aufnahme der Kanalaktivität in Schließzellen wurde ein Protokoll programmiert in dem, ausgehend von der Haltespannung  $V_H$  für jeweils 2 s zu Testspannungen  $V_T$  gesprungen wird. Diese Testsprünge wiederholen sich alle 4 s, wobei die Spannung jeweils um 20 mV erhöht wird. (b) Für die Messung der S-Typ Anionenkanäle wurden die Elektroden mit CsCl gefüllt. Dadurch wurden die  $K^+$ -Auswärtsgleichrichter gehemmt, so dass in deren Spannungsbereich nur die Aktivität der Anionenkanäle beobachtet werden konnte. Hierfür wurden die Zellen kurz vor den Testpulsen auf 0 mV geklemmt und die Deaktivierung der Kanäle durch 10 s lange Sprünge hin zu negativen Membranpotentialen sichtbar gemacht. Die Sprünge wiederholten sich alle 10 s und wurden dabei jeweils um 20 mV erniedrigt.

Da dieses Protokoll sich vor allem für die Messung der Kaliumein- und -auswärtsgleichrichter eignet, wurde für die Untersuchung der Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen ein anderes Protokoll verwendet. Bei diesem Protokoll wurde die Länge der Testsprünge verändert, so dass  $V_T$  nun für 10 s gehalten und auch die Pause zwischen den Testpulsen verlängert wurde (Abb. 2.2b, Tab. 2.1). Die Klemmspannung betrug bei diesen Versuchen zudem 0 mV.

#### 2.4.1.5 Vorzeichenkonvention

Durch Konvention ist ein Influx von Kationen in die Zelle bzw. ein Efflux von Anionen aus der Zelle hinaus ein Einwärtsstrom, der als negativer Strom in den Diagrammen angezeigt wird. Es wird von einem Auswärtsstrom gesprochen, wenn ein Kationenaus- oder ein Anioneneinstrom vorliegt. Dieser wird in den Diagrammen als positiver Strom dargestellt. Die Membranspannung wird dabei relativ zum Potential der extrazellulären Matrix angegeben, welches durch die Referenzelektrode geerdet wird. Das Potential setzt sich dabei aus dem des extrazellulären Raumes im Blattinneren und dem Potential über der Kutikula zusammen.

#### 2.4.1.6 Lösungs- und Lichtbedingungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad *per analysis* verwendet und von den Firmen Sigma (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>), Roth (<http://www.carlroth.com>), oder AppliChem (<http://www.applichem.com>) bezogen.

Bei den Einstichexperimenten wurde eine Lösung mit 5 mM KCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> und 5 mM KCitrat pH 6.0 appliziert. Um den Effekt von ABA (Alfa Aesar, <http://www.alfa.com>) auf Stomata in un- und infizierten Blättern zu untersuchen, wurde der Badlösung 50 µM ABA zugesetzt. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Perfusionssystems auf die Blattoberfläche gebracht. Dabei erfolgte das Einlaufen der Badlösung mittels Schwerkraft. Für das Abfließen der Badlösung wurde eine Membranpumpe genutzt.

Für das Experiment mit Rot- und Blaulicht wurde die Lampe des Mikroskops mit einem „Long pass“-Glasfilter bedeckt ( $\lambda_{1/2}$  610 nm, RD610; Schott, [www.schott.com](http://www.schott.com)) und auf eine Photonenflussdichte von 300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> eingestellt. Für die Applikation von Blaulicht wurde eine Blaulichtdiode verwendet, deren Licht durch das zum Einstechen verwendete Objektiv geleitet wurde.

Die Mikroelektroden wurden bei Messungen an Schließzellen mit 0,3 M KCl befüllt. Für die Messung der Anionenkanalaktivität, wurden die Elektroden mit 0,3 M CsCl gefüllt. Cäsium-Ionen dienen als Inhibitoren der Kaliumauswärtsgleichrichter, die in den übrigen Experimenten die Aktivität von Anionenkanälen überlagern.

#### 2.4.1.7 Auswertung

Die elektrischen Signale der Zellen wurden mit Hilfe der Software PULSE (HEKA) aufgezeichnet. Aus diesem Programm wurden die zeitabhängigen Ströme, die Werte für instantane - und Gleichgewichtsströme und das Membranpotential exportiert. Die instantanen Ströme wurden direkt nach dem Spannungssprung über einen Zeitraum von 40 ms bestimmt, die Gleichgewichtsströme direkt vor dem Sprung zurück zur Haltespannung, ebenfalls über 40 ms. Die Mittelwerte der einzelnen Experiment-Gruppen wurden mit Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation) bestimmt.

Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software IGOR Pro 6.0 (WaveMetrics, <http://www.wavemetrics.com>).

#### **2.4.2 BiFC- und DEVC Messungen in Oozyten von *Xenopus laevis***

Durch die heterologe Expression von Ionenkanälen in den unreifen Eiern von *X. laevis* können die Kanäle auf ihre Ionenselektivität, Spannungs- und pH-Wert-Abhängigkeit hin getestet werden.

##### 2.4.2.1 *In vitro* Transkription (IVT)

Das Gen des zu untersuchende Kanal wurde in einen Vektor kloniert, der neben einem T7-Promotor für die Initiation der Transkription in RNA, Teile oder die Volllänge des YFP-Genes (engl. yellow fluorescent protein, gelbfluoreszierendes Protein) enthielt. Eine genauere Beschreibung der verwendeten Klonierungsstrategie ist unter dem Punkt 2.6.2 zu finden. Das zu transkribierende Konstrukt wurde für die IVT entweder mit einer PCR amplifiziert oder der Vektor wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisiert.

Die IVT wurde mit dem Kit „AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker“ nach Angaben des Herstellers (CellScript, Inc.; [www.cellscript.com](http://www.cellscript.com)) durchgeführt. Für die Fällung der cRNA werden 20 µl 5M Ammoniumacetat-Lösung zugegeben und das Gemisch bei -20° C über Nacht inkubiert. Anschließend wird das Gemisch bei 20.000 g und 4° C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um Verunreinigungen durch Salze und Proteine zu beseitigen. Das Pellet wird getrocknet und in 20 µl RNase-behandeltem Wasser gelöst. Die Qualität der RNA wird mit Hilfe eines Photometers (NanoDrop 2000; Thermo Scientific, [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)) und eines Agarosegels überprüft.

Für das Gel werden zunächst 300 ml 1x MEN hergestellt (200 mM MOPS, 50 mM NaAcetat, 5 mM EDTA, pH 7.0). Anschließend wird ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt, und

mit einigen  $\mu\text{l}$  des Farbstoffes GelRed™ (Biotium, [www.biotium.com](http://www.biotium.com)) versetzt. Zur Inhibierung von RNasen wird dem Gel 8,2 % Formaldehyd zugegeben. In einer Elektrophoresekammer mit 1x MEN werden die vorbehandelten RNA-Proben auf das Gel aufgetragen. Die RNA wurde für 1 h mit einer Spannung von 60 mV aufgetrennt.

#### 2.4.2.2 Vorbereitung der Oozyten

Die Froschweibchen wurden in Aquarien bei einer Lufttemperatur von 18 bis 20° C gehalten. Für die Entnahme der Oozyten aus den Ovarien wurden die Frösche zunächst narkotisiert (Tricaine 0,75 g/l). Durch einen Schnitt im Unterleib wurden anschließend mit Pinzetten vorsichtig Teile des Ovargewebes entfernt, welches sich nach der Operation wieder regenerierte. Unter einem Binokular wurden die Oozyten aus dem Gewebe gelöst und vereinzelt. Nach mehreren Waschgängen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ND96-Lösung (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, pH 7.4, 220 mosmol mit D-Sorbitol) wurden die Oozyten mit Kollagenase für 2h RT inkubiert um verbliebene Blutgefäße und Follikelzellen zu entfernen. Nach weiteren Waschgängen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ND96-Lösung wurden die Oozyten in eine weitere ND96-Lösung überführt (zusätzlich 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ), die mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycin versetzt war. Die Lagerung erfolgte bei 16° C.

#### 2.4.2.3 Injektion der cRNA

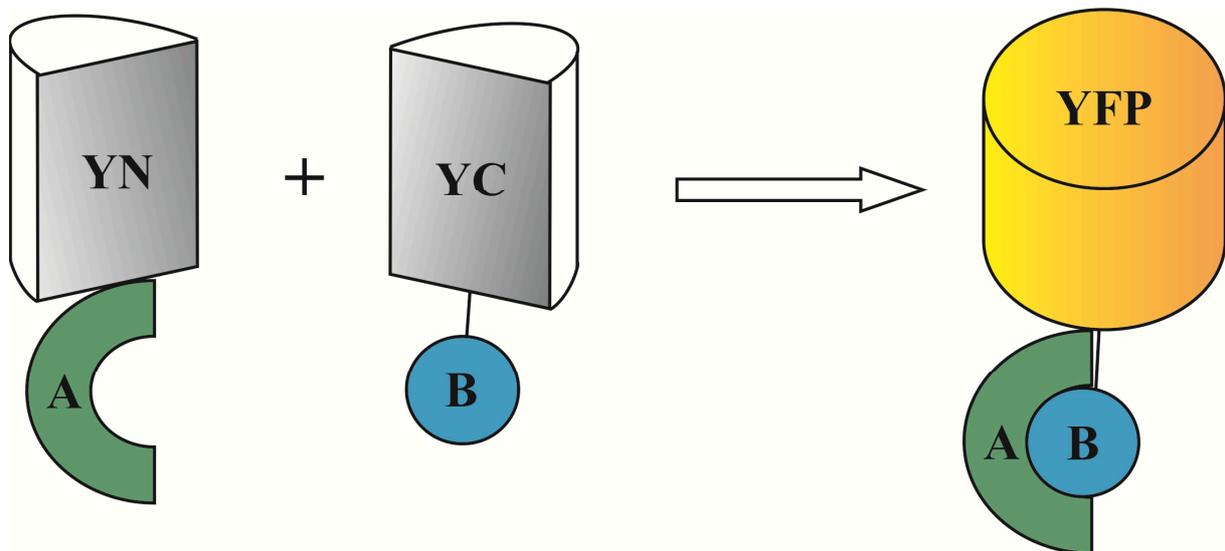
Am Tag nach der Präparation der Oozyten wurden die verschiedenen cRNAs injiziert. Die hierfür verwendeten Borsilicat-Kapillaren (Drumond #3-00-203-G/X, Drumond Scientific Company) wurden zunächst mit einem Puller (PP-83, Narishige; <http://www.narishige-group.com>) zu zwei Injektionspipetten ausgezogen. Um die Injektion in die Oozyten zu ermöglichen wurden die Spitzen mit Hilfe eines Drahtes unter einem Binokular abgebrochen, bis der Spitzendurchmesser etwa 5 $\mu\text{m}$  betrug. Die Injektionskapillare wurde anschließend von hinten mit Öl gefüllt und in ein Injektionsgerät (Nanoliter 200; World Precision Instruments, <http://www.wpiinc.com>) eingespannt, das definierte Flüssigkeitsmengen durch das Vorschieben eines Stabes in der Kapillare ermöglicht. So wurden je 25 ng cRNA in die Oozyten injiziert. Die behandelten Oozyten wurden anschließend bei 16 °C inkubiert und nach 2 Tagen mittels der DEVC-Methode vermessen.

#### 2.4.2.4 BiFC-Messungen

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) ist eine Methode für die Durchführung von Interaktionsstudien. Dabei wird die besondere Struktur der fluoreszierenden Proteine

genutzt, die aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) generiert wurden. Diese Proteine benötigen keine Co-Faktoren um die Fluoreszenz auszulösen, da das Fluorophor durch drei Aminosäuren im inneren eines  $\beta$ -Barrels gebildet wird (Ormö et al. 1996). Bei dem zumeist verwendeten gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) besteht das Fluorophor aus den gleichen Aminosäuren wie beim GFP. Zusätzlich interagiert allerdings ein Tyrosin mit dem Fluorophor, wodurch die Verschiebung der Fluoreszenz hin zu längeren Wellenlängen erfolgt (Wachter et al. 1998). Wird das YFP in zwei Hälften geteilt und in Zellen exprimiert, so liegen diese Aminosäuren nicht in räumlicher Nähe zueinander und es kann keine Fluoreszenz erzeugt werden. Werden die beiden Hälften jedoch an zwei Proteine gekoppelt, so kann die Struktur des YFP und das Fluorophor rekonstituiert werden, wenn eine Interaktion der beiden Proteine gegeben ist (Abb. 2.3).

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem konfokalen Laserscanner-Mikroskop TCS SP5 II und der Software „Leica Application Suite Advanced Fluorescence“ (LAS AF 2.5.1) von Leica Microsystems (<http://www.leica-microsystems.com>). Für die Anregung wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 514 nm verwendet. Die Fluoreszenz der injizierten Oozyten wurde bei einer 100-fachen Vergrößerung photographiert.



**Abbildung 2.3: Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation.** Diese Methode macht sich zu Nutze, dass das Fluorophor des YFP durch Aminosäuren innerhalb des  $\beta$ -Barrels gebildet wird. Wird das Protein geteilt, so befinden sich diese Aminosäuren nicht mehr in räumlicher Nähe zueinander und es entsteht kein Fluorophor (linke Seite). Werden die beiden Hälften mit Proteinen fusioniert, die interagieren (A und B), kann die natürliche Struktur des YFP wieder hergestellt werden und die Fluoreszenz tritt erneut auf (rechte Seite) (Prinzip nach Kerppola 2008).

### 2.4.2.5 Lösungsbedingungen für Messungen an Oozyten

Um zu untersuchen, welche Art von Anionen der untersuchte Kanal aus Gerste leitet, wurden drei verschiedene Lösungen verwendet, die sich in den leitenden Ionen unterschieden.

Lösung 1: 10 mM Tris/MES pH 6.0, 1 mM MgGluconat<sub>2</sub>, 1 mM CaGluconat<sub>2</sub>,  
100 mM NaGluconat

Lösung 2: 10 mM Tris/MES pH 6.0, 1 mM MgGluconat<sub>2</sub>, 1 mM CaGluconat<sub>2</sub>,  
100 mM NaCl

Lösung 3: 10 mM Tris/MES pH 6.0, 1 mM MgGluconat<sub>2</sub>, 1 mM CaGluconat<sub>2</sub>,  
100 mM NaNO<sub>3</sub>

### 2.4.2.6 Pulsprotokolle

Für die DEVC-Messungen von Oozyten wurden in der Software Patch Master (HEKA) verschiedene Protokolle programmiert, die über ein Interface (ITC-16, HEKA) vermittelt werden.

Das Pulsprotokoll für die Aufzeichnung der Aktivität der heterolog exprimierten Ionenkanäle in den Oozyten bestand aus drei Abschnitten, die mehrfach wiederholt wurden (vergleiche Abb. 2.2a). Die Zellen wurden dazu bei 0 mV geklemmt. Von dieser Haltespannung ( $V_H$ ) aus wurde die Membran auf verschiedene Testspannungen ( $V_T$ ) geklemmt und für jeweils 50 ms gehalten. Anschließend wurde die Zelle wieder auf die Haltespannung geklemmt. Zwischen den einzelnen Testpulsen wurde für je 100 ms bei der Haltespannung geklemmt. Die Testspannungen begannen mit 70 mV und wurden bei jeder Wiederholung um 10 mV erniedrigt, bis ein Wert von -150 mV erreicht war.

### 2.4.2.7 Auswertung der Messdaten

Die Auswertung der Daten erfolgte über das Programm „Patch Master“ (HEKA). Die Werte der Gleichgewichtsströme wurden über einen Zeitraum von 2ms vor dem Sprung von der Testspannung zurück zur Haltespannung gemittelt. Mittelwerte und Fehler wurden mit Hilfe von Excel (Microsoft Corporation) berechnet. Die graphische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit der Software IGOR Pro 6.0 (WaveMetrics).

## **2.5 Nanoinjektion**

Um die Wirkung einzelner Chemikalien auf das Verhalten der Stomata zu untersuchen, wurde die Nanoinfusion von Flüssigkeiten in den Apoplasten erprobt (Hanstein und Felle; 2004). Zeitgleich wurde ausgetestet, ob sich diese Methode mit den Einstichmessungen an intakten Pflanzen kombinieren lässt.

### **2.5.1 Kapillarenherstellung**

Eine Borsilicat-Kapillare (Spezifikationen s. 2.4.1.1) wurden in einen horizontalen Laser-Puller (Sutter Instruments Co.) eingespannt. Die Mitte wurde durch einen gebündelten Laserstrahl erhitzt und die beiden Enden wurden langsam auseinandergezogen. Da der Laser sich automatisch während des Auseinanderziehens abstellt, sobald bricht die Kapillare nicht in der Mitte ab. Daher wird die Kapillare erneut erhitzt und auseinandergezogen. Nach zwei weiteren Wiederholungen trennen sich die beiden Seiten der Kapillare und man erhält zwei stumpfe Spitzen, die einen Widerstand von weniger als 10 G $\Omega$  besitzen, wenn sie mit den Injektionslösungen befüllt waren.

### **2.5.2 Injektionslösungen**

#### **2.5.2.1 ABA**

Um die Methode der Nanoinfusion zu etablieren wurde eine ABA-Lösung verwendet, da der Effekt von ABA auf die Stomata von Gerste zu diesem Zeitpunkt bereits untersucht war. Als Negativkontrolle wurde eine 10 mM K-MES Lösung verwendet, deren pH 6.0 betrug. Für die Untersuchung von ABA wurde zu der Kontrolllösung 50  $\mu$ M ABA (Alfa Aesar, <http://www.alfa.com>) zugegeben.

#### **2.5.2.2 Chitosan**

Chitosan ist ein Bestandteil der pilzlichen Zellwand und kann durch Deacetylierung von Chitin gewonnen werden. Das hier verwendete Chitosan stammt aus Krabbenpanzern und wurde mit 1M Acetat zu einer 10 mg\*ml<sup>-1</sup> enthaltenden Stammlösung gelöst. Diese wurde dann mit demineralisiertem Wasser zu einer Lösung mit 1 mg\*ml<sup>-1</sup> Chitosan und 0,1 M Acetat verdünnt. Die Injektionslösung enthielt letztlich 10  $\mu$ g\*ml<sup>-1</sup> Chitosan, 10 mM Acetat und 1 mg\*ml<sup>-1</sup> Lucifer Yellow in 10 mM K-MES pH 6.0. Die Kontrolllösung enthielt entsprechend 10 mM Acetat, 1 mg\*ml<sup>-1</sup> Lucifer Yellow und 10 mM K-MES pH 6.0.

### 2.5.3 Platzierung der Injektionskapillare und Injektion

Die gefüllte Kapillare wird auf einem Messingadapter befestigt. Dieser ist über einen Schlauch und eine Ventilvorrichtung mit einem Druckinjektor (PEDS-02, NPI-electronics <http://www.npielectronics.com>) verbunden. Der Messingadapter wird in die Halterung eines Mikromanipulators (MHW-3, Narishige) gespannt. Mit Hilfe des Mikromanipulators wird die Kapillare nun über einem Stoma platziert und vorsichtig durch diese in die substomatäre Höhlung eingeführt, so dass die Spitze unter dem rechten Ende der Schließzellen zu liegen kommt (Abb. 2.4, linke Seite).

Durch den Druckinjektor wurde nun ein Druck von 1,25 - 1,4 bar angelegt. Dadurch wurde die Lösung aus der Kapillare in den substomatären Raum gedrückt und konnte sich im Apoplasten verteilen. Wenn ein Fluoreszenzfarbstoff in der Lösung vorhanden war, so konnte man die Ausbreitung mit Hilfe einer Blaulichtdiode verfolgen, die den Farbstoff anregte. Die Fluoreszenz wurde dabei vom Anregungslicht mit Hilfe eines Filtersets (F36-525 HC-Set EGFP, Zeiss) getrennt.

Die Ausbreitung konnte aber auch ohne Farbstoff verfolgt werden, da sich durch die große Menge an Flüssigkeit im Apoplasten die Lichtbrechung des Blattes veränderte und es dadurch im Durchlicht heller erschien. Wenn die injizierte Lösung das benachbarte Stoma erreicht hatte, wurde der zusätzliche Druck wieder weggenommen. Dies war meist nach 1 - 3 s der Fall. Für die parallele Ableitung der Ströme, welche durch die verschiedenen Injektionslösungen induziert werden, wurde bei einigen Experimenten das benachbarte rechte Stoma eingestochen (Abb. 2.4, rechte Seite). Hierzu wurden die unter 2.4.1 beschriebenen doppelkapillaren Elektroden verwendet.

### 2.5.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie bereits unter den Punkten 2.3 und 2.4.1.7 beschrieben.



**Abbildung 2.4: Schema zur Platzierung von Kapillaren und Elektroden während der Experimente.** Zwei benachbarte Stomata werden mittig im Sichtfeld des Mikroskops platziert. Durch das linke Stoma wird die Injektionskapillare (IK) in den substomatären Raum geführt. Das Rechte der beiden Stoma wird mit einer doppelkapillaren Elektrode (DE) eingestochen, so dass Potential- und Strommessungen möglich sind.

### 2.6 Molekularbiologische Methoden

#### 2.6.1 Isolierung von RNA aus Gerste

Für die Arbeiten mit RNA wurde spezielles Wasser der Firma Roth verwendet, das mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt wurde, um eventuell vorhandene RNasen und DNasen zu deaktivieren. Des Weiteren wurden alle verwendeten metallischen Gegenstände mit dem Spray RNase-Exitus™ der Firma Applichem behandelt.

##### 2.6.1.1 RNA aus ganzen Blättern

Die Spitze des ersten voll entwickelten Blattes einer 1 Woche alten Gerstenpflanze wurde mit der Pinzette abgetrennt und in einem Eppendorf-Cup in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Das Blattstück wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend noch einmal mit Metallkugeln in der Kugelmühle für zwei mal 90 s geschüttelt.

Die gesamte RNA der Pflanzenzellen wurde anschließend mit dem „Plant RNA Isolation Kit“ (OMEGA Bio-Tek) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Nach der Isolierung der gesamten Nucleinsäuren aus den Pflanzen wurde zunächst die Konzentration derselben photometrisch bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Elution mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) vermessen.

Zu dem Volumen an Elutionslösung, das 2,5 µg RNA enthält, wurden 2 µl 10x DNaseI-Puffer, 10 U RNase-freie DNaseI und 20 U RNase-Inhibitor zugegeben und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37° C inkubiert, damit die enthaltenen DNA-Fragmente abgebaut werden.

Zum Abschluss der Isolierung wird die RNA gefällt, um Proteine und Salze aus den zuvor verwendeten Puffern zu entfernen. Dazu wurde der gesamte Ansatz des DNase-Verdau mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 75 µl Isopropanol und 10 µl 5 M Ammoniumacetat in 0,1 M EDTA versetzt. Nach der Durchmischung wurde die RNA bei 4° C und 14 000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das entstandene RNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei 37° C getrocknet und in 7 µl Wasser aufgenommen.

##### 2.6.1.2 RNA aus Schließzellen

Beide Blätter einer 7-9 Tage alten Gerstenpflanze wurden mit einer Pinzette abgetrennt und in einem gekühltem Mixer mit 100 ml kaltem, demineralisiertem Wasser für anderthalb Minuten zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension durch ein Netz gefiltert, das eine Porenweite von 300 µm aufwies. Diese Schritte wurden noch zweimal wiederholt. Zum Abschluss wur-

den große längliche Trümmer, die Leitgewebe enthielten, und noch grünlich erscheinende Bestandteile aussortiert. Das Pflanzenmaterial wurde schnell mit einem Tuch getrocknet, mit einer sterilen Pinzette in einen Eppendorf-Cup überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nachdem auch diese Proben mit der Kugelmühle zweimal geschüttelt wurden, erfolgte die Isolierung der gesamten RNA wie unter Punkt 2.6.1.1 beschrieben.

#### 2.6.1.3 Reverse Transkription (RT)

Zur Gewinnung der cDNA aus den isolierten RNA-Proben wurde die M-MLV-RT (engl.: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Promega) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.6.2 Klonierung und Transformation

#### 2.6.2.1 Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli*

Die Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Klonen wurde verändert nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Eine Übernachtskultur von *E. coli* wurde für 60 s bei 6000 g in einer Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf, [www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de)) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer (10 mM TRIS pH 7.2, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) resuspendiert und mit 0,5% SDS, 100 mM NaOH und 200  $\mu\text{g/ml}$  RNase versetzt. Die Lyse der Zellen wurde durch 3 M NaAcetat, pH 5.2, gestoppt und neutralisiert. Die Überreste der Zellwand, die freigesetzten Proteine sowie die genomische DNA wurden für 5 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand, wird mit 100% Isopropanol gemischt um die DNA auszufällen. Dies geschah bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 15 min. Nach einer Zentrifugation für 5 min wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet und anschließend in 30  $\mu\text{l}$  sterilem, demineralisiertem Wasser aufgenommen.

#### 2.6.2.2 Restriktionsanalysen

Um Fragmentgrößen und Insertionen in Vektoren während der Klonierung zu überprüfen, wurden Analysen mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Die Zusammensetzung der Restriktionsansätze hielt sich an die Vorgaben des Herstellers (Fermentas, jetzt Thermo Scientific [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)).

## 2.6.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde die „proof-reading“ Polymerase Phusion (Finnzymes, [www.finnzymes.com](http://www.finnzymes.com)) genutzt, eine Weiterentwicklung der *Pfu*-Polymerase. Sie besitzt eine sog. „proof-reading“-Funktion, was heißt, dass sie selbständig Fehler bei der Vervielfältigung der DNA erkennen und reparieren kann. Dadurch werden Basenaustausche verhindert, die zu einer fehlerhaften Translation des codierten Proteins führen können. Die Polymerase füllte nach der Anlagerung der Primer den Einzelstrang mit Hilfe von Desoxyribonucleotiden wieder zum Doppelstrang auf.

Mit Hilfe der PCR wurden auch gezielt Punktmutationen in das amplifizierte Fragment eingebaut werden. Hierzu wurden bereits in den Primern bewusst Basenaustausche eingeführt, um die Aminosäuresequenz des codierten Proteins zu verändern. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet. Die Primer enthalten an einer Position ein Uracil anstelle eines Thymidins, da die Fragmente im Weiteren mit dem USER™-System verarbeitet wurden. Eine Erläuterung zu diesem System ist unter 2.6.2.6 zu finden.

**Tabelle 2.1:** PCR-Primer für die Klonierung und Mutagenese des putativen Anionenkanals HvSLAC1. Alle verwendeten Primer wurden von metabion ([www.metabion.com](http://www.metabion.com)) bezogen.

Name	Sequenz
Hv1008 corr fwd	5'-accgccgccucagagggccttcagccg-3'
Hv1008 corr rev	5'-aggcggcgugggcctccggctcgtcc-3'
Hv1008 USER oSrev	5'-ggtttaaucgtctgtttctcctctctcttg-3'
HvSLAC1 user ATG1 fwd	5'-ggcttauatggcgggagcggagccatc-3'

Ein Ansatz für eine Standard-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

DNA-Template	~ 10 ng
dNTPs (25 mM)	1 µl
sense Primer (10 µM)	1 µl
antisense Primer (10 µM)	1 µl
Reaktionspuffer (10x)	5 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	add 50 µl

Falls erforderlich wurden die PCR-Fragmente der richtigen Größe aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) aufgereinigt.

#### 2.6.2.4 Gelelektrophorese von DNA

In dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer (40 mM TRIS, 20 mM NaAcetat, 1 mM EDTA, pH 7,8) verwendet. Um die DNA-Banden später sichtbar zu machen, wurde dem Gel noch der DNA-Farbstoff GelGreen™ (Biotium, <http://www.biotium.com>) mit einer Endkonzentration von 0,05 ‰ (v/v) zugegeben. Dieser Farbstoff wird nur durch die Interaktion mit DNA sichtbar und wird durch UV-Licht angeregt.

Die DNA-Proben wurden mit 5x Probenpuffer vermischt (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v), 50 %igem Glycerin und 100 mM EDTA). Um die Größen der Fragmente bestimmen zu können, wurde auf jedem Gel ein  $\lambda$ /*Pst*I-Marker aufgetragen, der DNA-Fragmente bekannter Größen enthält. Die Aufnahme des entstandenen Bandenmusters geschah mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Intas UV Imager; Intas UV Systeme, [www.intas.de](http://www.intas.de)).

#### 2.6.2.5 quantitative *Real Time* PCR (qPCR)

Mit Hilfe der *Real Time* PCR ist man heute in der Lage mittels einer einzelnen Probe Vergleiche zwischen mehreren Transkripten und physiologischen Bedingungen herzustellen. Als Vergleich wird ein Haushaltsgen herangezogen, das in allen Zelltypen und in allen Entwicklungsstadien des Versuchsorganismus vorhanden ist. In dieser Arbeit wurde dazu die mRNA von Actin7 aus Gerste verwendet. Da mRNA nicht mittels einer PCR amplifiziert werden kann, wird die transkribierte cDNA verwendet, deren Herstellung unter 2.6.1 beschrieben wurde.

Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgt hier während eines jeden Zykluses der PCR durch die Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes. Dieser Farbstoff (SYBR®Green I; ABgene®, jetzt Thermo Scientific) lagert sich nur an doppelsträngige DNA an, so dass nur die Menge des amplifizierten Fragmentes gemessen wird. Die daraus resultierenden Kurvenverläufe lassen Rückschlüsse auf die Häufigkeit der amplifizierten cDNA zu und somit auch auf die Menge an mRNA eines bestimmten Gens.

Die verwendeten Primer wurden so ausgewählt, dass die amplifizierten Fragmente alle in der 3' UTR der untersuchten Gene lagen. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Detektion durch einen vorzeitigen Abbruch der cDNA während der reversen Transkription beein-

flusst wird. Zugleich wurde darauf geachtet, dass die entstehenden Fragmente nicht größer als 500 bp waren. Nachdem die Primer (max. 18 bp) ausgewählt wurden, wurde noch eine abschließende BLAST-Suche in der Datenbank des National Institutes of Health ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi); sh. auch Punkt 2.7) durchgeführt. Diese Suche sollte erste Hinweise darauf geben, ob die Primer lediglich an die cDNA des untersuchten Genes bindet, oder ob auch andere cDNAs erkannt werden. Da das Gerstengenom zurzeit noch nicht vollständig annotiert ist, muss aber vor der eigentlichen *qReal-Time* Untersuchung immer eine normale PCR durchgeführt werden um dies zu überprüfen.

Obwohl für die einzelnen Primer mit Hilfe von Vector NTI (Invitrogen, [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) die Annealingtemperaturen errechnet wurden (sh. Tab. 2.2), wurde für die verwendeten Primerpaare vor dem eigentlichen Experiment mittels einer Gradienten-PCR die optimale Anlagerungstemperatur bestimmt. Anhand der Stärke und Spezifität der Banden im Gel konnte dann die später verwendete Temperatur bestimmt werden. Die während dieser PCR entstehenden Fragmente der einzelnen zu untersuchenden Gene wurden für die Herstellung des Standards genutzt. Die spezifischen PCR-Fragmente für ein Gen wurden zusammengefügt und aus dem Gel eluiert. Anschließend wurde die Konzentration mit Hilfe des Nanodrop-Photometers (Thermo Scientific) vermessen. Anhand der Konzentration wurde dann eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen von 10 bis  $0,01 \text{ fg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  erstellt, welche als Referenz in der qPCR genutzt wurden.

**Tabelle 2.2. Auflistung der verwendeten Primer für die qPCR.** Die Primer liegen im Bereich der 3'-UTR, um sicherzustellen, dass das Detektieren nicht durch eine unvollständige Transkription der mRNA in cDNA beeinflusst wird.

Name	Sequenz
Hv_actin_fwd	5'-gggacatcaaggagaagc-3'
Hv_actin_rev	5'-ccagacactgtactctctc-3'
RT1008 fwd1	5'-caagagggtgaacgac-3'
RT1008 rev1	5'-ccttctagctctagctta-3'
RT1132 fwd2	5'-cgtcaccaaggcaagccg-3'
RT1132 rev1	5'-tgcactcacggtctcacgccg-3'
RT2067 fwd1	5'-tggaccaaccatcgccact-3'
RT2067 rev1	5'-gacggcagatgatggacgcta-3'
RT3105 fwd1	5'-gtacctggacgtgtctt-3'
RT3105 rev1	5'-aggatggccgtctgtt-3'

Für die qReal-Time PCR wurden die zu untersuchenden cDNAs 1:10 mit tRNA-Wasser verdünnt. Dieses Wasser wurde mit tRNA aus Rindern versetzt (Sigma; TypXI; 10µg/ µl) und verhindert die Anlagerung von cDNA-Fragmenten an die Reaktionsgefäße.

Zu dieser cDNA wurde ein „SYBR Green Enzym Mix“ (ABgene) gegeben, der den benötigten Puffer, die dNTPs und die Polymerase enthielt. Anschließend wurden noch die Primer in einer Endkonzentration von 4 nM zugegeben. Die Messungen wurden im Realplex (Eppendorf) durchgeführt. Zusätzlich zu einem PCR-Programm wurde immer nach der Elongation ein weiterer Schritt bei 79° C eingefügt, um die Fluoreszenz des SYBR® Greens zu vermessen.

Die erhaltenen Daten wurden auf ein Gen der Actin-Familie aus Gerste bezogen, welches ein Ortholog zum *Actin 2* aus *Arabidopsis thaliana* ist. Für das *AtAct2* ist eine konstitutive Expressierung in allen Geweben der Pflanze bekannt. Daten über die Expressierung des verwendeten Actins aus Gerste liegen bislang noch nicht vor. Mit Hilfe von Excel (Microsoft) wurde die Menge an Transkripten pro Actin-Transkripten bestimmt.

#### 2.6.2.6 USER™-Klonierung

Für die Klonierung eines S-Typ Anionenkanals aus Gerste wurde die USER-Strategie verwendet (Nour-Eldin et al. 2006). Bei dieser werden in die Primer Uracile eingebracht, die bei der PCR nicht durch die Polymerasen erkannt werden. Durch diesen Fehler in der Sequenz entstehen anschließend die Überhänge, welche durch die Uracil-DNA-Glykosylase und DNA-Glykosylase-Lyase Endo VIII erzeugt werden. Der Vektor wurde zuvor mit *PacI* und *Nt.BbvCk* behandelt. So können das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor hybridisieren und die Rate der falsch positiven Klone nach der Transformation wird vermindert, da der Vektor nun nicht mehr in der Lage ist zu religieren.

Durch das Enzym *Nt.BbvCk* wurde nur einer der beiden DNA-Stränge in der Erkennungssequenz geschnitten und es kann so ein Überhang am 3'-Ende entstehen, der acht Basen beträgt.

Für die USER™-Klonierung wurden spezielle Vektoren verwendet, die eine *in vitro* Transkription ermöglichen und speziell für diese Klonierung konzipierte Überhänge besitzen. Die Karten zu den Vektoren finden sich im Anhang.

Wenn Punktmutationen in die Vektoren eingebracht wurden, so lagen, nach der PCR, neben den erzeugten Fragmenten auch immer der Ursprungsvektor in den Ansätzen vor. Um eine Weiterbearbeitung dieses Ursprungsvektors zu vermeiden, wurde vor der Transformation in *E. coli* ein *DpnI*-Verdau nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch diese Behandlung

wurde die bereits durch Bakterien prozessierte DNA abgebaut, da das Restriktionsenzym *DpnI* nur methylierte DNA hydrolysiert.

### 2.6.2.7 Transformation von *E. coli*-Bakterien

Zur Vervielfältigung der für die Arbeit benötigten Plasmide wurde der schnell wachsende Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>c</sup>-Bakterien genutzt.

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde aus einem *E. coli*-Stammkultur eine Vorkultur in LB mit 50 µg/ml Tetracyclin angeimpft, die über Nacht bei 37° C bei 300 rpm angezogen wurde. Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Morgen die Hauptkultur 1 % (v/v) angeimpft. Als Medium wurde dabei LB mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 mM KCl verwendet. Die Hauptkultur wurde weiter inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,5 erreichte. Bei diesem Wert befindet sich die Kultur im Normalfall in der sog. log-Phase. Für das weitere Arbeiten wurden die Bakterien in 50 ml Röhrchen abgefüllt und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für 15 min bei 4000 g und 4° C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde in jedes verwendete Röhrchen 15 ml TFB 1 (30 mM KAcetat, 10 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> und 5,8 % Glycerol, pH 5,8) gegeben und das Pellet resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4° C und 4000g für 15 min wurde das Pellet in 2 ml TFB 2 (10 mM NaMOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 5,8 % Glycerol, pH 6,8) resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

Die Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>c</sup> erfolgte mittels Hitzeschock. Hierzu wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 45° C getaucht. Anschließend wurde der Ansatz erneut für 2 Minuten auf Eis gehalten. Es wurden 450 µl SOC-Medium zugegeben und etwa 45 min bei 37° C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

## 2.7 *in silico*-Analysen

### 2.7.1 Identifizierung und Charakterisierung von homologen Genen aus Datenbanken

Für die Analyse von Homologen SLAC1-Genen in Gerste wurde der BLAST-Algorithmus (Altschul et al. 1990, Altschul et al. 1997) verwendet. Dieser wurde zunächst auf das annotierte Genom von *Brachypodium distachyon* angewandt, wodurch in diesem Gras homologe

Gene zu den S-Typ Anionenkanälen aus *A. thaliana* identifiziert werden konnten. Die Sequenzen der gefundenen Gene wurden anschließend von der Internetseite der Internationalen Brachypodium Initiative (IBI) heruntergeladen ([db.brachypodium.org/sequence.html](http://db.brachypodium.org/sequence.html)). Da es zum Zeitpunkt der Arbeit noch keine öffentlich zugänglichen Datenbanken mit den vollständigen Sequenzen der Gersten cDNA gab, wurden die möglichen Homologe in Gerste durch Dr. Matsumoto am National Institute of Agrobiological Science (NIAS) in Japan durchgeführt. Die Rohdaten der BLAST-Analysen aus Japan wurden dann gesichtet und sortiert, so dass verschiedene cDNA-Klone bestimmt werden konnten, die anschließend als Vollsequenz angefordert wurden. Genauere Erläuterungen zur Identifizierung der Gersten Homologe von SLAC1 finden sich im Ergebnisteil dieser Arbeit (Kapitel 3.3.1). Zur Vorhersage der Transmembrandomänen wurde der Algorithmus TMPred verwendet ([www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)), der auf den statistischen Analysen von Hofmann und Stoffel 1993 basiert.

### **2.7.2 Phylogenetische Analysen**

Um die Struktur der Genfamilien um *AtSlac1* und *Hv1008* aufzuklären, wurde das Programm Jalview 2.6.1 (Waterhouse et al. 2009) verwendet. Aus den von Jalview errechneten Alignments können dann phylogenetische Bäume erstellt werden, welche die verwandtschaftlichen Verhältnisse der einzelnen Mitglieder der Genfamilie darstellten. Als Berechnungsverfahren wurde der „Neighbour-Joining“-Algorithmus verwendet (Saitou und Nei 1987, Studier und Keppler 1988). Der Algorithmus vergleicht alle Sequenzen miteinander und fasst die beiden ähnlichsten Sequenzen zu einem Ast des Baumes zusammen. Diese Sequenzen werden in der nächsten Runde der Berechnung nur noch als eine Sequenz gewertet und mit der nächst ähnlichen Sequenz wieder zu einem Ast zusammengefasst. Dies wird solange wiederholt, bis alle Sequenzen gepaart wurden. Zum Schluss wird ein einfacher Baum ausgegeben, der die Distanz der einzelnen Sequenzen wiedergibt. Dabei stehen die jüngsten Mitglieder der Genfamilie an der letzten Abzweigung des Baumes. Das ursprünglichste Gen der Familie steht an der Basis des Baumes als erste Abzweigung. In dieser Arbeit wurde zusätzlich zu den Sequenzen der SLAC1-Familie auch eine Actin-Sequenz in die Analysen mit eingebracht. Diese Sequenz wurde als sogenannte „Outgroup“ verwendet, welche dem Baum die letzte Abzweigung vor der Wurzel angibt.

### 3. Ergebnisse

Die Regulation der Öffnungsweite von pflanzlichen Stomata wird durch verschiedene Signale, zum Beispiel durch ABA oder Lichtrezeption, kontrolliert. Beim Schließen der Stomata durch die Perzeption von ABA werden zunächst Anionenkanäle aktiviert, was zur Depolarisation der Zelle führt (Roelfsema et al. 2004, Levchenko et al. 2005). Erst anschließend öffnen Kaliumkanäle, die K<sup>+</sup>-Ionen in den Apoplasten leiten und so die Reduktion des Schließzellvolumens einleiten, was wiederum zum Stomaschluss führt (Roelfsema et al. 2004).

Wenn Pflanzen durch Pathogene befallen werden, kann ebenfalls ein Stomaschluss beobachtet werden (Melotto et al. 2006, Prats et al. 2006). Die Mechanismen, die dieser Antwort zu Grunde liegen sind jedoch noch nicht verstanden. Diese Arbeit soll daher als erster Schritt verstanden werden um den Ablauf der Pathogenantwort der Schließzellen auf molekulare Ebene zu aufzuklären.

#### 3.1 Mehltau- und Elicitor-induzierte Änderungen im Öffnungsverhalten und der Physiologie der Schließzellen

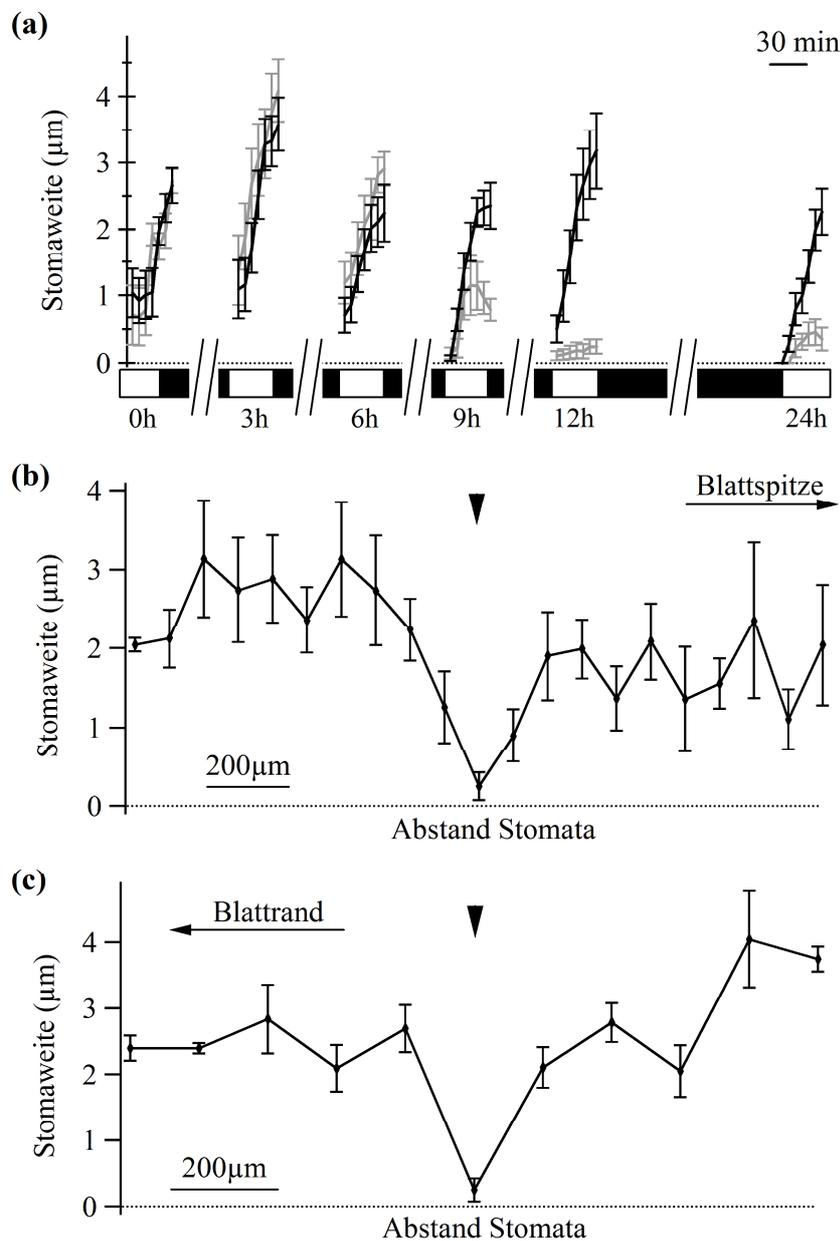
Zur Charakterisierung der Immunantwort von Schließzellen, sollte neben dem genauen Zeitpunkt auch die Veränderung der Ionenkanalaktivität während der Interaktion untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, welche Kanäle für den Stomaschluss verantwortlich sind. Ebenso wurde die Lichtantwort der Schließzellen untersucht, um festzustellen, ob dieser grundlegende physiologische Vorgang ebenfalls von der Immunantwort beeinflusst wird.

##### 3.1.1 Öffnungsverhalten von Gerstenstomata nach der Infektion des Blattes mit Mehltausporen

Die Infektion von Blättern durch den Mehltaupilz lässt sich bis zur Etablierung der Haustorien in den Epidermiszellen in zwei Phasen aufteilen. Zunächst charakterisiert der Pilz die Oberfläche auf der er liegt. Dies geschieht bei *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* innerhalb der ersten halben Stunde nach der Inokulation. Durch das Sekretieren von Enzymen direkt nach der Adhäsion (Nielsen et al. 2000) und dem Ausbilden eines primären Keimschlauches, der nach Fertigstellung in die Cuticula eindringt (Edwards 2002), erkennt die Pilzspore ihre Umgebung. Auf geeigneten Oberflächen wird das weitere genetische Programm induziert und es kommt zur Infektion. Die zweite Phase beinhaltet die eigentliche Infektion und beginnt mit der Bildung des zweiten Keimschlauches. Es folgt die Erstellung eines Appressoriums und das Eindringen der Pilzhyphe in die Zellwand der Epidermiszellen. Die erste Frage dieser

Arbeit war daher, in welcher Phase die Pflanze auf die Anwesenheit des Pilzes mit dem Verschluss der Spaltöffnungen reagiert.

Hierzu wurde ein Experiment entwickelt, bei dem alle drei Stunden die Bereitschaft der Stomata zur Öffnung der Pore getestet wurde (vergl. Kapitel 2.2 und 2.3). Abbildung 3.1a zeigt die Ergebnisse dieses Experimentes, wobei die Spaltweite gegen die Zeit aufgetragen wurde. Zum besseren Vergleich wurden die Kontrollen (schwarze Linien) und die Messungen mit Pilz (graue Linien) in derselben Graphik dargestellt. In der ersten Phase der Infektion, die von 0 bis 4 Stunden nach der Inokulation (kurz hai) angelegt ist, erkennt man keine Unterschiede zwischen den Stomataweiten der Kontrollen und der in infizierten Blättern. Auch zu Beginn der zweiten Phase nach 6 h ist noch kein Unterschied bemerkbar.



**Abbildung 3.1: Der Mehltaupilz wird von der Gerste recht früh und nur lokal erkannt.** (a) Zu sehr frühen Zeitpunkten (0, 3 und 6 hai) zeigen die Kontrollen (schwarze Linien) und infizierte Blätter (graue Linien) kein unterschiedliches Öffnungsverhalten. Nach der Ausbildung eines Appressoriums (9 hai) ist die Stomabewegung inhibiert. Auch nach 12 h und 24 h öffnen die Stomata in infizierten Blättern nur wenig (n = 15). Stomata sind in Gerstenblättern in Reihen angeordnet. (b) Die Inhibition entlang der Blattlängsachse betrifft nur die Stomata, welche direkt neben der Infektionsstelle (schwarze Pfeilspitze) liegen (n = 8). (c) Betrachtet man die der Infektionsstelle benachbarten Reihen, so sind diese von der Inhibition nicht betroffen (n = 8). Alle Fehlerbalken stellen den Standardfehler (SE) dar.

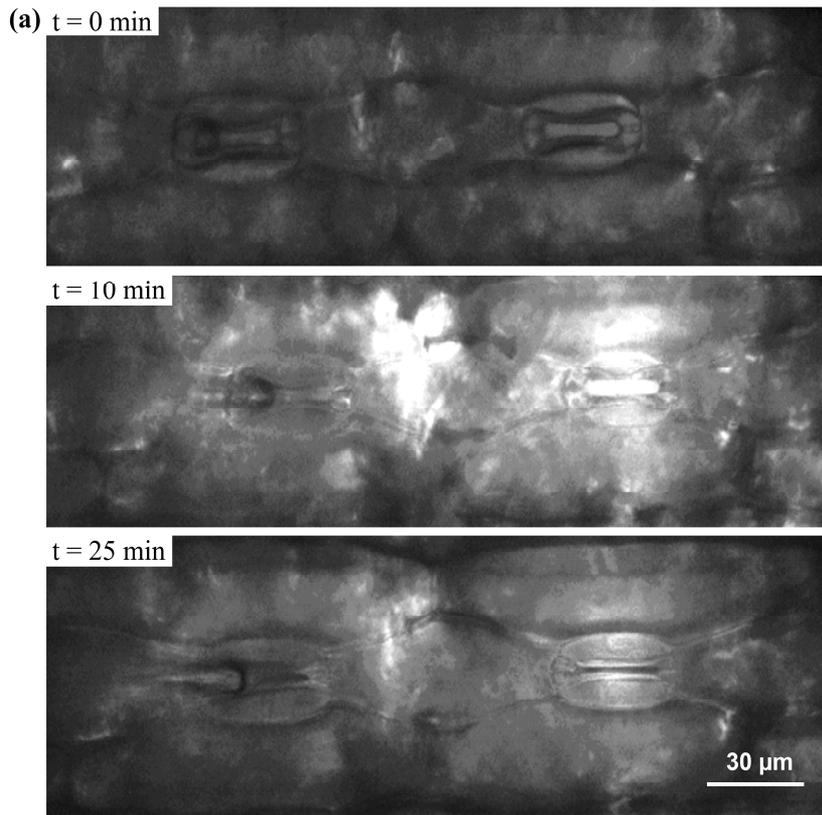
Nach 9 Stunden hingegen zeigt sich, dass die Öffnung der Stomata in infizierten Blättern inhibiert wird. Auch in den späten Phasen des Experimentes, 12 und 24 Stunden nach Inokulation der Pilzsporen zeigt sich weiter diese Inhibierung der Stomabewegung.

Um herauszufinden, ob die Inhibierung der Stomabewegung ein lokaler Effekt ist, wurden die Spaltweiten in Abhängigkeit von der Entfernung zum Inokulationsort ausgewertet. Da die Stomata in Gräsern in Reihen angeordnet sind, lässt sich dies in Gerste gut untersuchen (Roelfsema und Hedrich, 2009). Abbildung 3.1b zeigt, dass nur bei den, der Infektionsstelle (schwarze Pfeilspitze) direkt benachbarten Stomata eine Beeinflussung der Bewegung beobachtet werden kann. Das Signal gelangt nicht in Stomatareihen, die neben der Inokulationsstelle liegen (Abb. 3.1c, schwarze Pfeilspitze). Die Inhibierung durch den Pilz scheint sich nur auf einen kleinen Bereich von etwa 120-150 µm um die Inokulationsstelle auszuwirken.

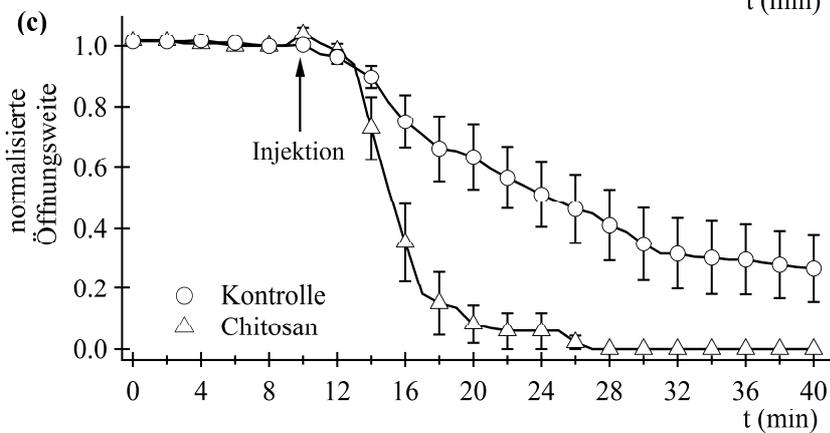
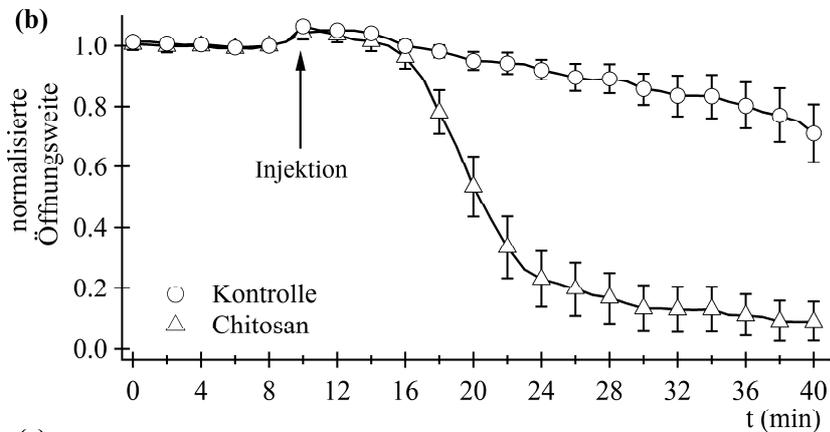
### 3.1.2 Reaktion der Stomata auf die Injektion von Elicitoren

Chitosan ist in den Zellwänden der meisten Pilze enthalten und ist ein Elicitor der pflanzlichen Immunantwort (Maffi et al. 1998, Lee et al. 1999). Das durch Deacetylierung von Chitin gewonnene Polymer wird von Pflanzen erkannt und führt etwa bei Schließzellen von Tomaten zum Stomaschluss in Folge einer Produktion von  $H_2O_2$  (Lee et al. 1999). In dieser Arbeit wurde dieser Elicitor daher genutzt um, mit Hilfe der Nanoinfusion den zeitlichen Ablauf der Antwort von Schließzellen auf einen Elicitor zu untersuchen.

In diesem Experiment wurde getestet, ob und wann die Reaktion der Schließzellen auf Chitosan einsetzt. Hierzu wurden Lösungen mit und ohne Chitosan in Gerstenblätter injiziert (Zusammensetzung s. 2.5.2.2) und die Stomaweite über einen Zeitraum von insgesamt 40 min vermessen. Dazu wurde eine Applikationspipette durch eine Stomaöffnung in die substomatäre Höhle eingeführt (Abb. 3.2a oberes Bild). Die rechte benachbarte Stomaöffnung wurde für die Auswertung des Experimentes verwendet. Nach dem Einführen der Injektionspipette in die Stomaöffnung wurde zunächst einige Minuten abgewartet, bevor mit dem Experiment begonnen wurde. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass eine Reaktion der Stomata auf den mechanischen Reiz, der durch die Positionierung der Pipette entsteht, Einfluss auf die Auswertung des Experimentes nimmt. Wird nun zehn Minuten nach Beginn des Experimentes Flüssigkeit in den Apoplasten injiziert, so kann die Ausbreitung der Lösung durch den zugesetzten Farbstoff Lucifer Yellow verfolgt werden (Abb. 3.2a mittleres Bild). Enthielt die Injektionslösung Chitosan, so konnte etwa 4 min nach Zugabe der Lösung der Beginn des Stomaschlusses festgestellt werden (Abb. 3.2a unteres Bild).



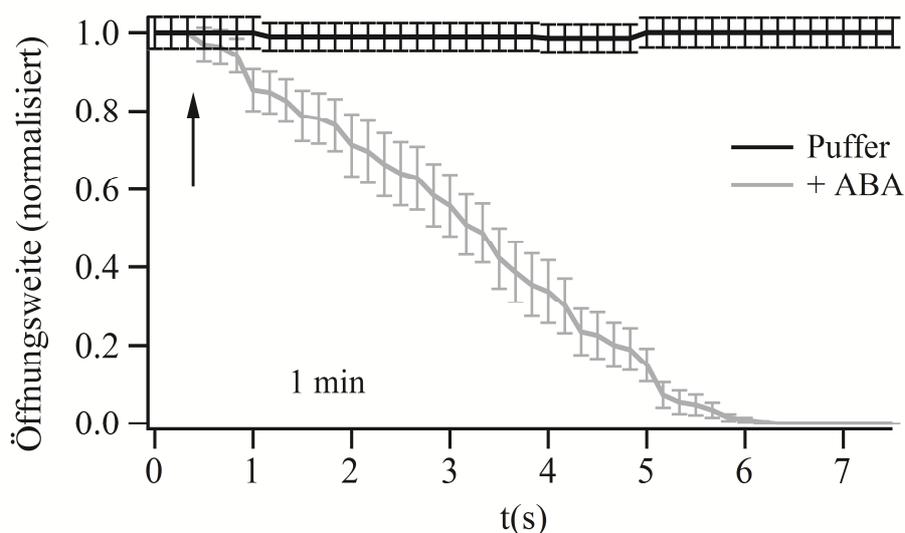
**Abbildung 3.2: Stoma-schluss nach Injektion von Chitosan.** (a) Der pilzliche Elicitor wurde durch eine Stomaöffnung in den Apoplasten von Gerstenblättern appliziert (oberes Bild). Durch die Zugabe des Farbstoffes Lucifer Yellow konnte die Ausbreitung der Injektion im Apoplasten verfolgt werden (mittleres Bild). Die Injektion erfolgte 10 min nach dem Beginn des Experimentes, wenn sich die Öffnungsweite der Stomata nicht stark veränderte. Nach der Injektion von Chitosan schlossen sich die Stomata (a unteres Bild, b und c). (b) Die Messungen der Spaltöffnungsweite ergaben bei der Injektion einer Kontrolllösung nur geringe Schwankungen (O). Die Injektion von Chitosan ( $\Delta$ ) führte hingegen zu einer starken Verringerung der Spaltöffnungsweite (n=13-15).



Bei der Durchführung der Experimente wurde deutlich, dass die Reaktion der Stomata auf Chitosan abhängig von der Tageszeit war. Wurden die Experimente zwischen 9 h und 15 h durchgeführt, so zeigte sich, dass die Stomata der Kontrolle weiterhin geöffnet blieben und ihre Öffnungsweite nur minimal veränderte, während die mit Chitosan behandelten Stomata etwa 10 min nach der Injektion bereits zur Hälfte geschlossen waren (Abb. 3.2b). Bei Messungen, die nach 15 h durchgeführt wurden, zeigte sich hingegen, dass auch die Stomata der Kontrolle ihre Öffnungsweite stark veränderten und zum Teil sogar geschlossen wurden (Abb. 3.2c).

Zusätzlich wurden Injektionsexperimente mit dem Phytohormon ABA durchgeführt. So konnte getestet werden, ob der Verlauf des Stomaschlusses von der injizierten Chemikalie abhängt, oder ob er einen allgemeingültigen Verlauf nimmt. Hierzu wurde zunächst wieder eine Pufferlösung (10 mM K-MES, pH 6.0) durch eine Stomaöffnung in den Apoplasten injiziert und die Öffnungsweite der direkt benachbarten Stomaöffnung dokumentiert (Abbildung 3.3). Die Öffnungsweite der Stomata verändert sich nach der Injektion der Kontrolllösung nicht (schwarze Linie). Wurde der Lösung noch 10  $\mu$ M ABA zugegeben, so konnte festgestellt werden, dass der Beginn des Stomaschlusses direkt nach der Injektion einsetzt und nach etwa 6 min abgeschlossen ist (graue Linie).

Der zeitliche Verlauf des Stomaschlusses unterscheidet sich zwischen der Injektion von ABA und der von Chitosan. Während der Schluss kurz nach der Zugabe von ABA einsetzt,

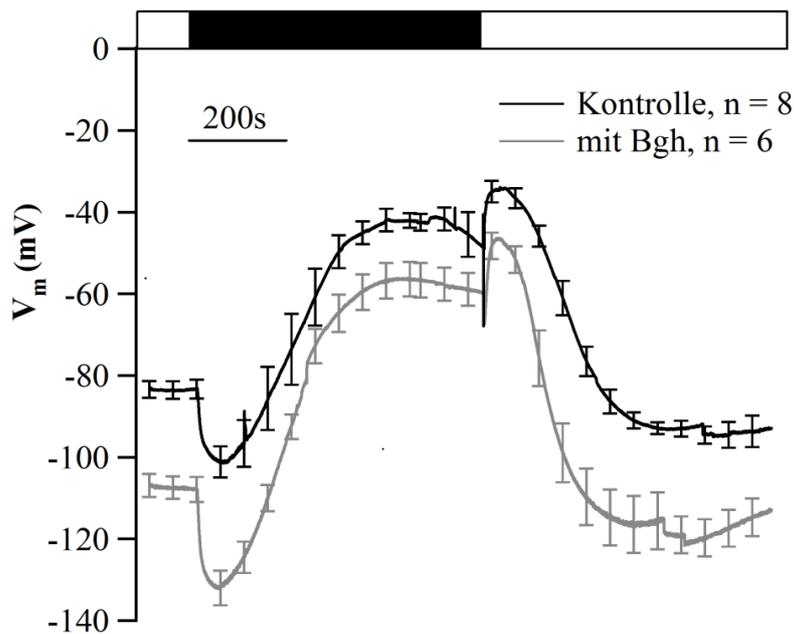


**Abbildung 3.3: Die Injektion von ABA führt zum Stomaschluss.** Durch eine Stomaöffnung wurde eine Kontroll- oder eine ABA-Lösung in den Apoplasten injiziert. Die Öffnungsweite eines benachbarten Stomas wurde dabei über sieben Minuten beobachtet. Die Öffnungsweiten wurden normiert und daraus Mittelwerte und Standardfehler berechnet. Im Experiment zeigte sich, dass die Injektion des Phytohormons ABA (graue Linie) einen schnellen und vollständigen Stomaschluss auslöst.

zeigt sich bei der Injektion des pilzlichen Elicitors erst nach 4 min eine Abnahme der Spaltöffnungsweite. Auch die Zeit, die verstreicht bis die Spaltöffnungen halb geschlossen sind, unterscheidet sich in den beiden Experimenten. Für die Injektion von ABA beträgt dieser Wert 3 min, während er für Chitosan 10 min beträgt.

### 3.1.3 Effekt der Mehлтаupilze auf das Membranpotential von Nebenzellen.

Die Stomakomplexe in Gerste bestehen, anders als in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, nicht nur aus den Schließzellen, sondern besitzen auch zusätzlich sogenannte Nebenzellen. Bei einer Untersuchung der Interaktion zwischen Mehltau und den Spaltöffnungen von Gerste sollte also auch dieser Zelltyp berücksichtigt werden. In diesen Zellen sind im Gegensatz zu den Schließzellen keine genauen Aufzeichnungen der Ströme über die Plasmamembran möglich, da der Widerstand über die Plasmamembran zu gering ist. Dies wird dadurch verursacht, dass die Nebenzellen mit den sie umgebenden Epidermiszellen über Plasmodesmata in Kontakt stehen und Ionen und Metabolite ausgetauscht werden können (Mumm et al. 2011). Die Aufzeichnung des Membranpotentials der Nebenzellen ist hingegen möglich. In Abbildung 3.4 ist das mittlere Membranpotential der Nebenzellen in Ab- und Anwesenheit von *Bgh* auf den Gerstenblättern dargestellt. Die Nebenzellen der Gerste besitzen im Licht ein Membranpotential von -83 mV (SE 3 mV, n=8), das auf einen Wechsel von Licht in die Dunkelheit mit einer vorübergehenden Hyperpolarisation der Plasmamembran reagiert (schwarze Linie). Diese Phase folgt eine Depolarisation der Plasmamembran, woraufhin das Membranpotential auf einem Wert um -40 mV verbleibt. Umgekehrt reagieren die Nebenzellen bei einem Wechsel vom Dunkeln ins Licht zunächst mit einer Depolarisation der Plasmamembran, die nach einer Hyperpolarisation wieder auf das Ausgangspotential vor Beginn des Experimentes zurückkehrt. Für die Untersuchung des Einflusses von *Bgh* wurden die Gerstenblätter über Nacht mit Konidien inokuliert. Bei der Messung des Membranpotentials von Nebenzelle, die sich in der Nähe einer Infektionsstelle befanden, konnte dann eine Verschiebung um etwa -20 mV, hin zu negativeren Potentialen, festgestellt werden (Abb. 3.4, graue Linie). So betrug das Membranpotential im Licht nun -107 mV (SE 4 mV, n = 6). Der Verlauf der Änderungen im Membranpotential bei einem Wechsel der Lichtquantität war indes der gleiche wie bereits bei den Kontrollmessungen beobachtet.



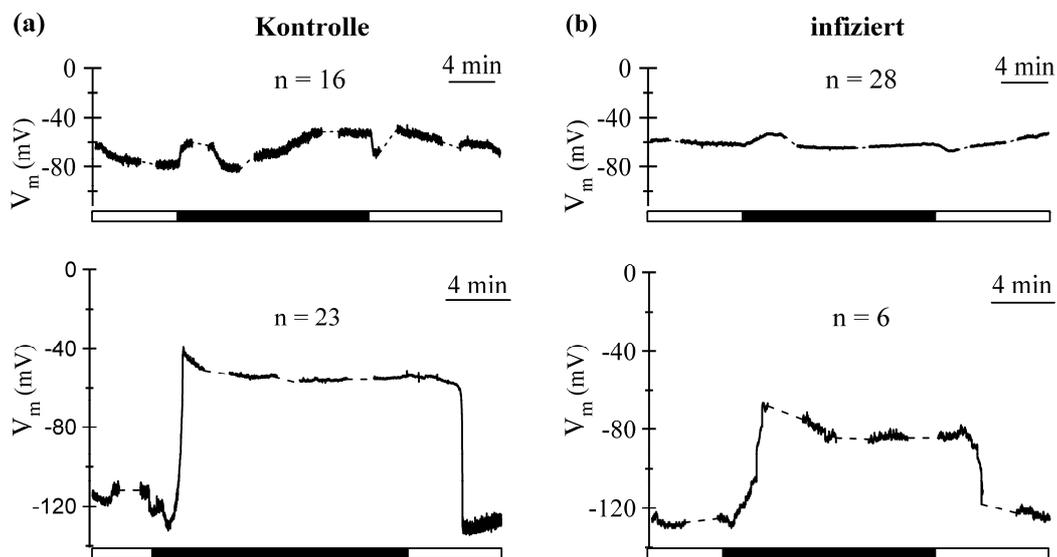
**Abbildung 3.4: Durch die Anwesenheit von Mehltausporen verändert sich das Membranpotential der Nebenzellen.** In Kontrollzellen (schwarze Linie) beträgt das Membranpotential im Licht -83 mV. Wird die Lichtquelle abgeschaltet (schwarzer Balken), so nimmt das Membranpotential zunächst negativere Werte an, bevor es auf einen Wert von -40 mV depolarisiert. Wird wieder Licht auf die Nebenzellen gegeben, so wird nach einer vorübergehenden Depolarisierung des Membranpotentials wieder ein Wert um -80 mV erreicht. In Nebenzellen, die in der Nachbarschaft einer Infektionsstelle liegen (graue Linie), lag das Membranpotential im Licht bei -107 mV. Nach dem Übergang ins Dunkel findet hier eine vorübergehende Hyperpolarisation des Membranpotentials statt. Anschließend verbleibt das Membranpotential im Dunkeln bei etwa -60 mV. Wird wieder Licht auf die Blätter gegeben, so kehrt das Potential nach einer Phase der weiteren Depolarisation wieder auf einen Wert um -100 mV zurück.

### 3.1.4 Änderungen in den Kanalaktivitäten der Schließzellen während der Infektion

Für das Öffnen der Stomata müssen die Schließzellen ein hyperpolarisiertes Membranpotential erreichen. Nach der Rezeption des Lichtes werden Protonenpumpen aktiviert, welche  $H^+$ -Ionen in den Apoplasten befördern. Dies ermöglicht die Hyperpolarisation der Plasmamembran und die Öffnung der Stomata. Erst nach einer Hyperpolarisation öffnen die  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter und den einströmenden Ionen folgt Wasser, welches das Volumen der Schließzellen vergrößert. Veränderungen des Membranpotentials konnten in Schließzellen von *V. faba* mittels des Einstichs von Mikroelektroden gezeigt werden (Roelfsema et al. 2001).

Um einzugrenzen, welche Ionenkanäle der Schließzellen an der Immunantwort beteiligt sind, wurden Schließzellen, die sich in räumlicher Nähe zu einer Infektionsstelle befanden, mittels der sogenannten DEVC-Methode untersucht (Kap. 2.4.1) und mit Zellen aus nicht infizierten Kontrollpflanzen verglichen.

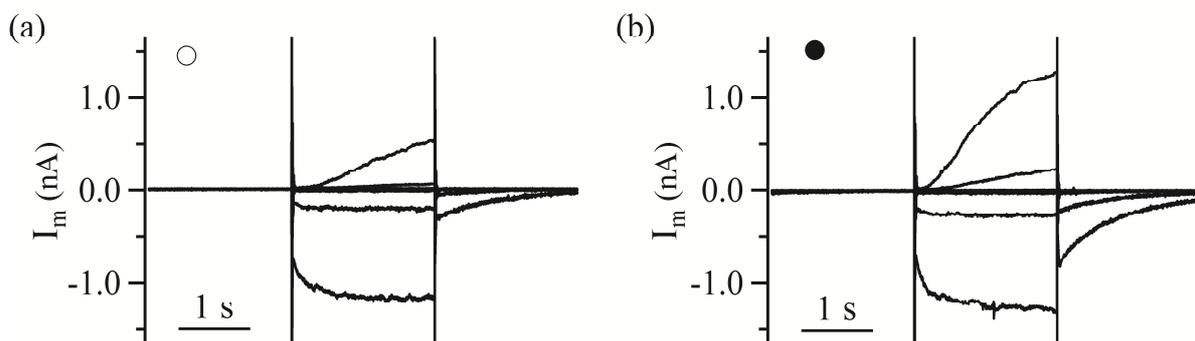
Für diese Arbeit wurde die Lichtantwort der Gerstenschließzellen untersucht, um etwaige Änderungen durch den Mehltaupilz *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) benennen zu können. Dabei zeigte sich bei 23 von 39 Schließzellen aus Kontrollpflanzen eine Hyperpolarisation der Plasmamembran nach dem Einstichvorgang im Licht (Abb. 3.5a unteres Bild). Bei Dunkelheit vollzog sich nach etwa zwei Minuten ein rascher Übergang von einer hyperpolarisierten Membran von durchschnittlich  $-124$  mV (SE 4 mV) hin zu einer Depolarisation bei etwa  $-60$  mV (SE 6 mV). Wird Licht erneut appliziert, so konnte der Wechsel von De- zurück zur Hyperpolarisation beobachtet werden. Bei 16 von 39 Zellen konnte jedoch keine Hyperpolarisierung im Licht verzeichnet werden und das Membranpotential blieb sowohl im Licht als auch im Dunkeln bei etwa  $-60$  mV (Abb. 3.5.a oberes Bild).



**Abbildung 3.5: Membranpotentiale von Gerstenschließzellen.** (a) Die Schließzellen lassen sich ihrer Antwort entsprechend in zwei Gruppen einteilen. Die untere Abbildung zeigt den typischen Verlauf eines Membranpotentials in einer hyperpolarisierten Zelle. Hierbei erkennt man eine schnelle Änderung des Potentials als Antwort auf die Änderung der Lichtintensität. Zwei Minuten nach Überführung ins Dunkel (dargestellt durch den schwarzen Balken) depolarisiert die Zelle und verbleibt bei einem Membranpotential von ca.  $-60$  mV. Wird wieder Licht zugegeben, so hyperpolarisiert die Membran wieder mit zwei Minuten Verzögerung. Die zweite Population zeigte hingegen ein stabiles Membranpotential (obere Abbildung), das unabhängig von der Lichtquantität bei ca.  $-60$  mV lag und durch den Wechsel zwischen Licht und Dunkel nicht verändert wurde. (b) Schließzellen in infizierten Gerstenblättern sind in der Lage die typische Lichtantwort zu zeigen (unteres Bild). Das Membranpotential steigt 2 min nach der Abdunkelung des Blattes auf etwa  $-80$  mV und fällt wieder auf ein Potential von  $-123$  mV sobald wieder Licht zugegeben wird. Dies geschieht jedoch nur bei 6 von 34 untersuchten Zellen. Der Großteil der Zellen zeigt während des gesamten Experimentes ein depolarisiertes Membranpotential von  $-60$  mV mit kurzen transienten Änderungen bei Änderung der Lichtintensität.

In Schließzellen aus infizierten Blättern zeigte sich, dass von 34 untersuchten Zellen lediglich sechs die typische Lichtantwort mit De- und Hyperpolarisation zeigen (Abbildung 3.5b unteres Bild). Trat diese allerdings auf, so war der Ablauf gegenüber dem in nicht infizierten Blättern derselbe (vergl. Abb. 3.5a). Der Großteil der Zellen zeigt hingegen eine ständige Depolarisation der Plasmamembran bei etwa -60 mV (Abb. 3.5b oberes Bild).

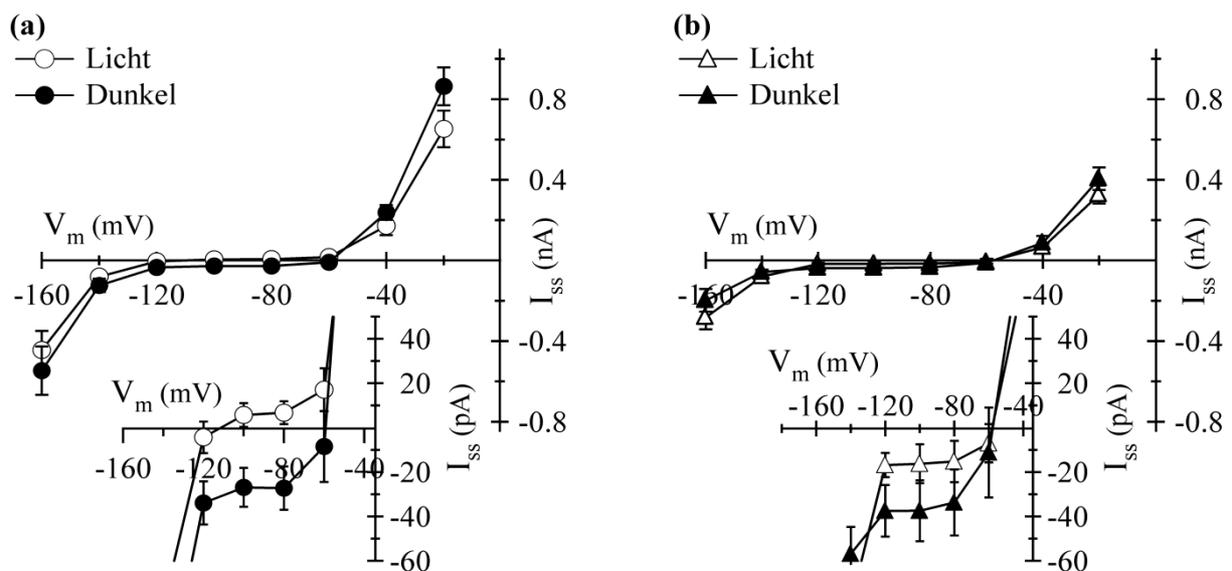
Bei der Aufzeichnung der zeitabhängigen Ströme von Zellen, deren Membranpotential bei -100 mV gehalten wurde, können die einwärts- und auswärtsgerichtenden  $K^+$ -Kanäle in Kontrollzellen deutlich identifiziert werden. Im Licht ( $\circ$ ) und im Dunkeln ( $\bullet$ ) aktivieren die Einwärtsgleichrichter während der Spannungssprünge negativ von -120 mV, während die Auswärtsgleichrichter bei Potentialen positiv von -80 mV aktivieren (vergl. Abb. 3.6a). Zwischen -120 mV und -80 mV können keine zeitabhängigen Änderungen der  $K^+$ -Kanalaktivitäten festgestellt werden. In Abbildung 3.7a sind die Gleichgewichtsströme abgebildet, die direkt vor dem Sprung von den Testspannungen zurück auf die Haltespannung von -100 mV gemessen wurden. Dort erkennt man die Aktivierung der  $K^+$ -Gleichrichter, die bei Hyper- (für den Einwärtsgleichrichter) bzw. bei Depolarisation (Auswärtsgleichrichter) erfolgt. Bei Membranspannungen zwischen -120 mV und -80 mV kann man nur geringe Änderungen in den Gleichgewichtsströmen ausmachen. Ändert man die Einteilung der Y-Achse für diesen Bereich und vergleicht die Werte im Licht ( $\circ$ ) und in der Dunkelheit ( $\bullet$ ), so erkennt man eine Verschiebung der Gleichgewichtsströme im Dunkeln um ca. 33 pA hin zu negativeren Werten. Das Gleichgewichtspotential der Schließzellen verschiebt sich dadurch im Dunkeln von -110 mV hin zu -60 mV.



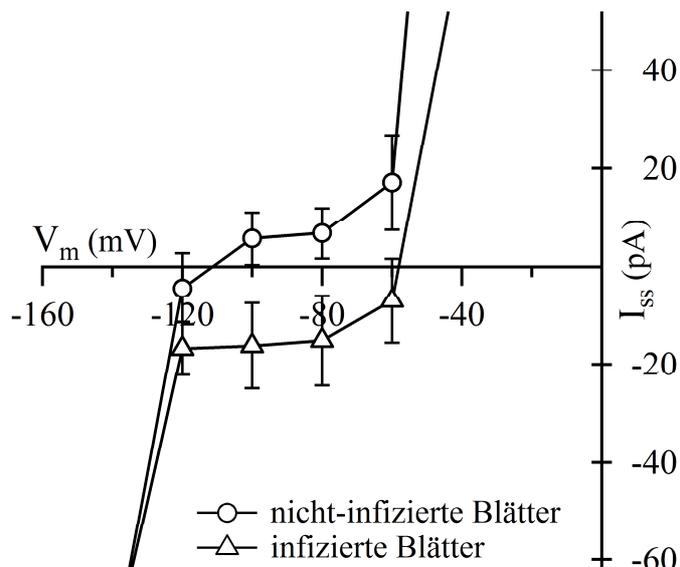
**Abbildung 3.6: Zeitabhängige Ströme in den Schließzellen der Gerste.** (a) Im Licht ( $\circ$ ) zeigen sich große einwärtsgerichtete Ströme. Bei stark depolarisierten Testspannungen kann man eine verringerte Aktivität des  $K^+$ -Auswärtsgleichrichters erkennen. (b) In der Dunkelheit ( $\bullet$ ) ist die Aktivität des  $K^+$ -Auswärtsgleichrichters im Vergleich zu der im Licht gesteigert, während die Aktivität des  $K^+$ -Einwärtsgleichrichters unverändert bleibt. Zudem kann man erkennen, dass die einwärtsgerichteten Ströme eine hohe instantane Komponente aufweisen.

Bei Zellen, die in der räumlichen Nähe zu Infektionsstellen lagen, erscheint die Aktivität der  $K^+$ -Ein- und -Auswärtsgleichrichter sowohl im Licht ( $\triangle$ ) als auch im Dunkeln ( $\blacktriangle$ ) gegenüber der Kontrolle vermindert (Abb. 3.7b). Zudem ist in dem Plateau zwischen -120 und -60 mV, das durch die Spannungsabhängigkeit der Kaliumkanäle verursacht wird, ist keine signifikante Verschiebung der Ströme im Dunkeln mehr erkennbar (Abb. 3.7b Vergrößerung).

Durch die Anwesenheit des Mehltaupilzes verschiebt sich das Gleichgewichtspotential im Licht zu -58 mV. Zum besseren Vergleich wurden diese Gleichgewichtsströme im Licht in einem Strom-Spannungs-Diagramm aufgetragen (Abb. 3.8). In dieser Abbildung ist im Plateaubereich zwischen -120 mV und -80 mV eine Verschiebung von etwa -25 pA in infizierten Blättern zu erkennen.



**Abbildung 3.7: Lichtabhängige Änderungen der Ströme in Gerstenschließzellen.** Für die Messung der Ströme wurde das Membranpotential der Zellen bei -100 mV geklemmt und anschließend das unter 2.4.1.3 beschriebene Pulsprotokoll appliziert. (a) Die gezeigten Gleichgewichtsströme in Kontrollzellen weisen negativ von -120 mV und positiv von -80 mV prominente Ströme auf. Dazwischen ändern sich die Werte der Ströme hingegen kaum. Vergrößert man den Bereich der Strom-Spannungskurve zwischen -120 mV und -80 mV, so erkennt man, dass in der Phase der Dunkelheit ( $\bullet$ ) die Ströme bei -100 mV um etwa -33 pA im Vergleich zum Licht ( $\circ$ ) verschoben sind. Das Gleichgewichtspotential verschiebt sich hierdurch in der Dunkelheit von -110 mV im Licht hin zu -60 mV in der Dunkelheit. (b) Trägt man die Gleichgewichtsströme aus Zellen auf, die sich in der Nähe einer Infektionsstelle befanden, erkennt man im Vergleich zur Kontrolle negativ von -120 mV und positiv von -80 mV kleinere Ströme im Licht ( $\triangle$ ) und im Dunkeln ( $\blacktriangle$ ). Vergrößert man den Plateaubereich zwischen -120 und -60 mV, so erkennt man keine signifikanten Unterschiede zwischen Licht und Dunkelheit. Für die Strom-Spannungskurven wurden die Mittelwerte mit Standardfehlern (SE) aus den gemessenen Zellen aufgetragen ( $n = 11-15$ ).

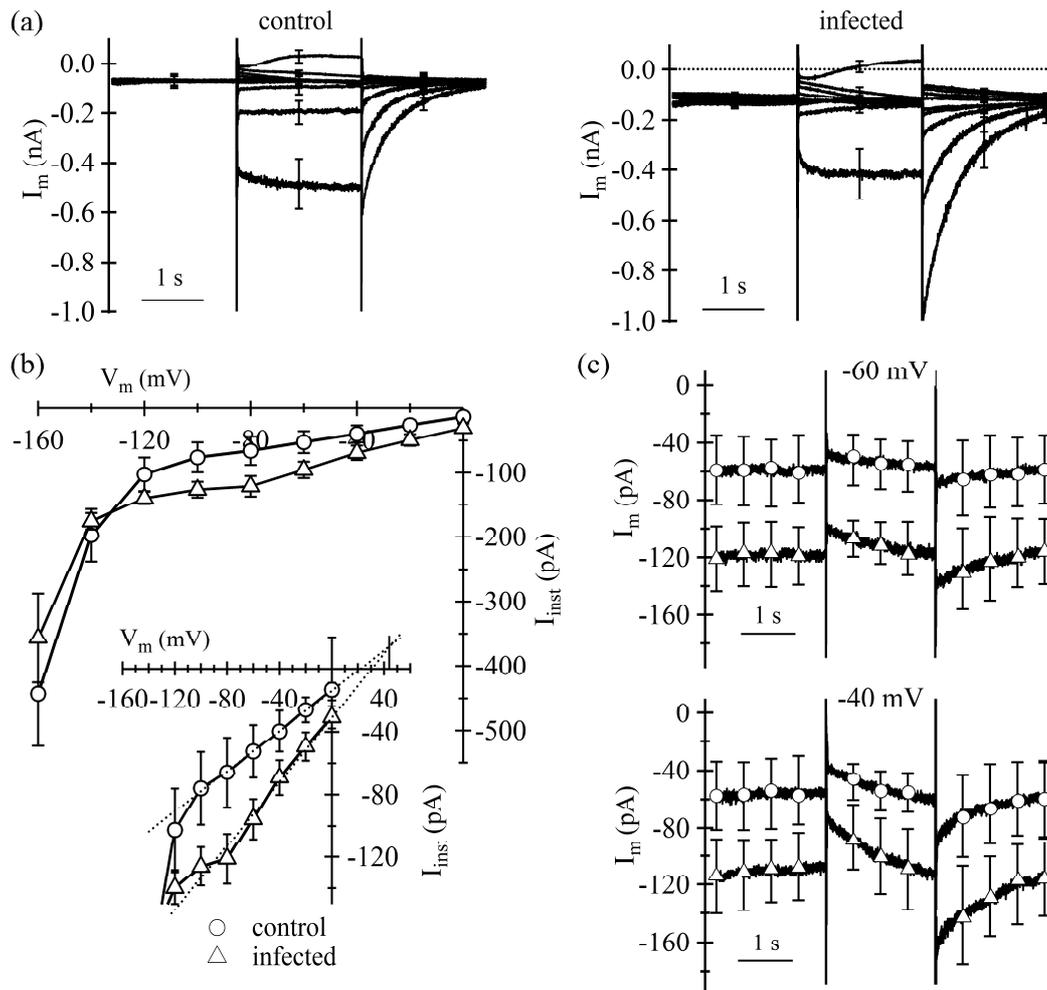


**Abbildung 3.8: Vergleich der Gleichgewichtsströme von Zellen aus infizierten und Kontrollblättern.** Die Mittelwerte der Gleichgewichtsströme der Zellen aus den Experimenten mit nicht-infizierten (O) und infizierten (Δ) Blättern wurden zusammen in einem Strom-Spannungsdiagramm aufgetragen. Das Gleichgewichtspotential der Schließzellen in nicht-infizierten Blättern liegt bei -110 mV im Licht, das der Zellen in infizierten Blättern bei -58 mV. Die Ströme, die im Bereich zwischen -120 und -60 mV gemessen wurden, sind in infizierten Blättern hin zu negativeren Werten hin verschoben. Die angegebenen Fehlerbalken sind Standardfehler (n = 11-15).

### 3.1.5 Veränderungen in der Anionenkanalaktivität während der Infektion

Um zu untersuchen, ob Anionenkanäle für die verminderte Fähigkeit zur Hyperpolarisation verantwortlich sind, wurden im Folgenden Experimente mit Elektroden durchgeführt, die mit 300 mM CsCl gefüllt waren. Wird das Plasmamembranpotential der Schließzelle bei -100 mV gehalten, so kann man wie bei denen mit 300 mM KCl-gefüllten Elektroden die Aktivität von  $K^+$ -Ein- und -Auswärtsgleichrichtern erkennen (Abb. 3.9a). Die Aktivität der Auswärtsgleichrichter ist allerdings durch die Anwesenheit von Cäsium stark gehemmt. Dadurch kann nun die Aktivität der Anionenkanäle in einem Bereich von -120 bis 0 mV sichtbar gemacht werden (Marten et al. 2007a).

Die Stromspuren der Anionenkanäle zeichnen sich durch eine hohe instantane Komponente aus (Marten et al. 2007a), die direkt nach dem Sprung von -100 mV hin zu verschiedenen Testspannungen zwischen -160 und 0 mV über einen Zeitraum von 40 ms abgelesen wurden. Trägt man die Mittelwerte dieser instantanen Ströme in einem Strom-Spannungs-Diagramm auf (Abb. 3.9b), so erkennt man in den Zellen aus infizierten Blättern signifikant negativere Ströme in einem Bereich zwischen -120 und -40 mV. Dies deutet auf eine erhöhte Aktivität der Anionenkanäle hin. Legt man eine Gerade durch diesen Bereich der beiden Telexperimenten, so ist keine Verschiebung im Umkehrpotential zu erkennen (Abb. 3.9b Vergrößerung), was etwa als Antwort auf die Zugabe von ABA bekannt ist (Roelfsema et al. 2004). Betrachtet man die gemessenen Stromspuren bei -60 mV und -40 mV genauer, so erkennt man, dass die Aktivität der Anionenkanäle nach dem Potentialsprung ausgehend von -100 mV langsam zunimmt (Abb. 3.9c), was typisch ist für die sogenannten S-Typ Anionenkanäle.



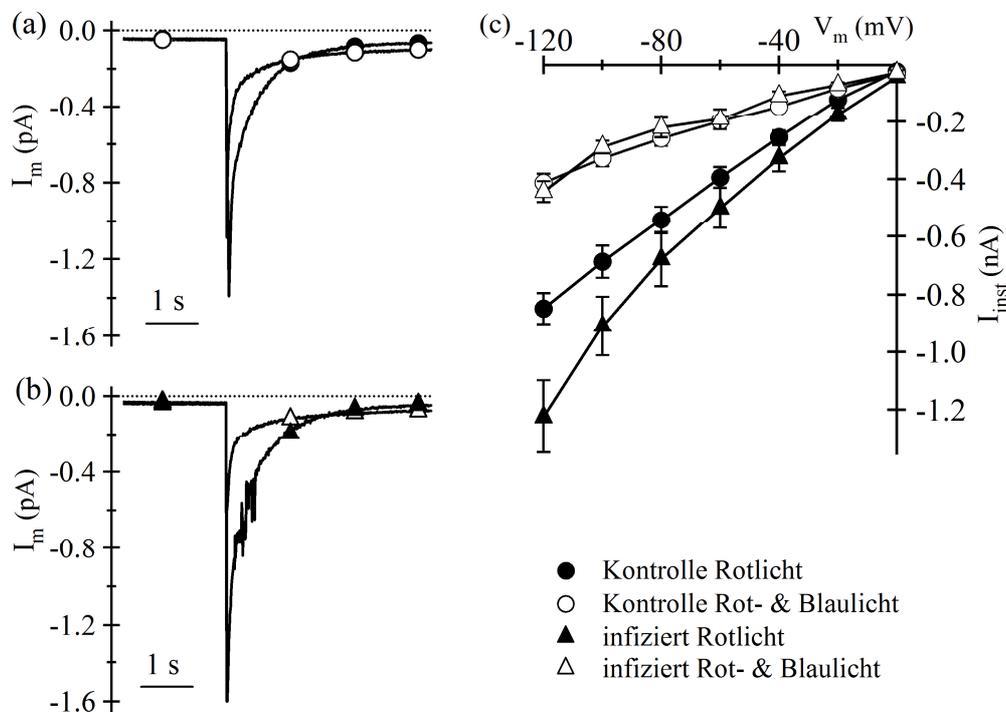
**Abbildung 3.9: Aktivität der Anionenkanäle in infizierten und nicht infizierten Blättern.** (a) Werden die Durchschnittswerte der zeitabhängigen Ströme aus diesem Experiment aufgetragen, so erkennt man zunächst keinen großen Unterschied. Betrachtet man hingegen die Stromspuren, die nicht der Aktivität der  $K^+$ -Kanäle zuzuordnen sind, so sieht man, dass die Spuren in infizierten Blättern (rechtes Bild) denen ähneln, die durch die sogenannten S-Typ Anionenkanäle erzeugt werden. (b) Trägt man die Mittelwerte der instantanen Ströme aus infizierten ( $\triangle$ ) und nicht-infizierten Blättern ( $\circ$ ) in einem Strom-Spannungs-Diagramm auf, so erkennt man im Bereich zwischen -100 und 0 mV negativere Ströme in Zellen aus infizierten Blättern. (c) Vergleicht man einzelne Stromspuren zwischen den infizierten und nicht infizierten Blättern, so fällt auf, dass die Aktivität der Anionenkanäle in den infizierten Blättern erhöht ist. Alle dargestellten Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern.

### 3.1.6 Die Blaulichtantwort der Schließzellen in An- und Abwesenheit des Mehltäupilzes

Es ist aus *Vicia faba* bekannt, dass die Aktivität der Anionenkanäle durch die Gabe von blauem Licht gehemmt werden kann (Marten et al. 2007a). Um zu untersuchen, ob dieser Mechanismus in infizierten Blättern noch funktioniert, wurden entsprechende Versuche durchgeführt. Da hier nur die Anionenkanäle untersucht werden sollten, wurden das Membranpotential der Schließzellen bei 0 mV geklemmt und anschließend Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -20 und -120 mV vorgenommen (vergl. Kap. 2.4.1).

Betrachtet man zunächst nur die zeitabhängigen Ströme von Schließzellen aus nicht-infizierten Blättern (Abb. 3.10a), so erkennt man im Rotlicht (610 nm) bei einer Testspannung von -120 mV, das langsame Schließen der Kanäle (●).

Wurde nun zusätzlich zum Rotlicht noch Blaulicht zugegeben, so verringerten sich die instantanen Ströme deutlich (○). Diese Reduzierung der Kanalaktivität wurde auch in den Schließzellen aus infizierten Zellen sichtbar (Abb. 3.10b). Wurden die instantanen Ströme in einem Strom-Spannungs-Diagramm aufgetragen, so wurde zudem deutlich, dass die Aktivität der Anionenkanäle in infizierten Blättern erhöht war. Die Zugabe von Blaulicht setzte die Aktivität aber in gleichem Maße zurück wie in den nicht infizierten Blättern (Abb. 3.10c, Spuren ○ und △).



**Abbildung 3.10: Die Anionenkanäle werden auch in infizierten Blättern durch Blaulicht gehemmt.** (a) Anhand der zeitabhängigen Ströme bei einer Testspannung von -120 mV kann man in nicht infizierten Blättern deutlich die Inhibierung der Anionenkanäle durch Blaulicht (offene Symbole) erkennen. Nach dem Sprung hin zur Testspannung erkennt man im Rotlicht (gefüllte Symbole) große negative Ströme, die anschließend deaktivieren. (b) Bei Zugabe von Blaulicht fallen die instantanen Ströme kleiner aus und es tritt eine schnellere Deaktivierung ein. (c) Strom-Spannungs-Diagramm der Mittelwerte der instantanen Ströme aller Testspannungen mit SE. Die Ströme der Zellen aus nicht infizierten (○) und infizierten (△) Blättern in Rotlicht und mit zusätzlichem Blaulicht (● und ▲), sind zusammen aufgetragen. Im Rotlicht zeigen die Anionenkanäle der Zellen aus infizierten Blättern (▲) eine leicht erhöhte Aktivität. Durch Zugabe von Blaulicht wird die Anionenkanalaktivität im gleichen Maße in infizierten und Kontrollblättern gehemmt.

### 3.1.7 Die Änderungen der Kanalaktivitäten nach Stimulation mit einem Elicitor

Im weiteren Verlauf dieses Projektes wurden mittels Einstich mit Doppelektroden die Stromantworten der Schließzellen auf den Elicitor Chitosan aufgezeichnet. Dazu wurde eine Applikationspipette durch ein Stoma an den Apoplasten geführt und eine benachbarte Schließzelle mit einer Doppelektrode eingestochen (siehe auch Abb. 2.4). Auf Grund der Ergebnisse der ersten Injektionsexperimente (s Abb. 3.2) wurden nun keine Messungen nach 15 h vorgenommen, um einen Einfluss der Applikation auf die Messung zu vermeiden. Ebenso wie bei den einführenden Experimenten wurde hier nach der Platzierung der Pipette zunächst etwa 10 min gewartet, bevor mit der Messung begonnen wurde (vergl. Kap. 3.1.2). So konnten die gemessene Stromantwort auf den Einfluss des Elicitors zurückgeführt werden. Das Plasmamembranpotential Schließzellen wurden nach dem Einstechen bei -100 mV geklemmt. Jeweils vor und nach der Injektion wurde die Aufzeichnung unterbrochen, um die Aktivierung der spannungsabhängigen Plasmamembrankanäle aufzuzeichnen.

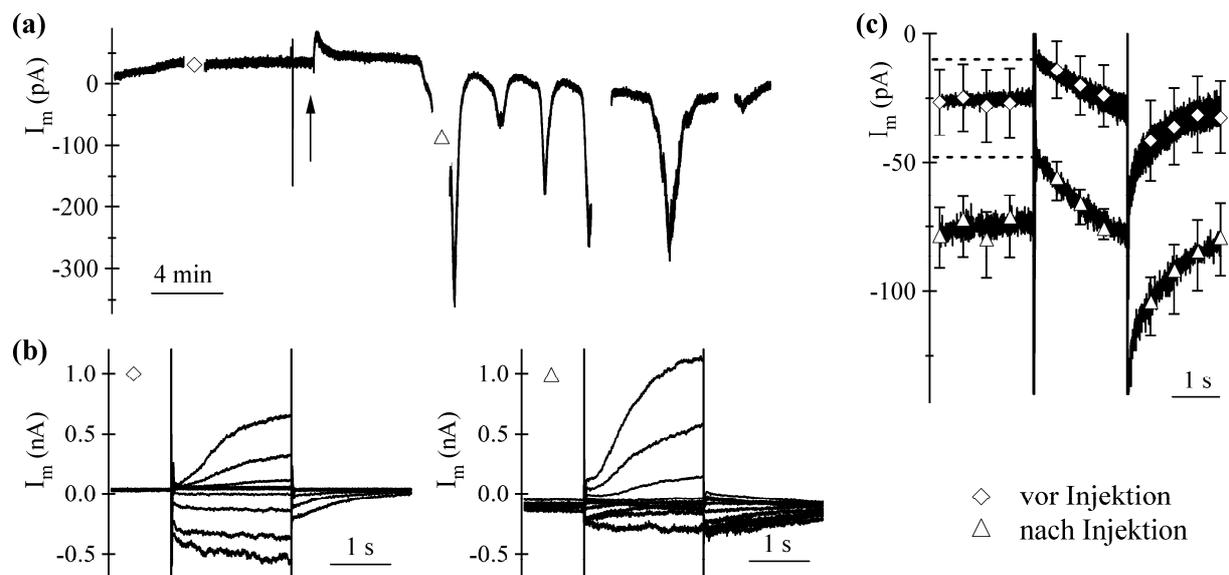
Zu Beginn des Experimentes ändert sich der Strom über die Plasmamembran bei -100 mV nicht. Direkt nach der Injektion konnte sowohl bei der Injektion der Kontrolle, als auch der des Elicitors eine leichte Verschiebung hin zu positiveren Werten beobachtet werden (Abb. 3.11a). Durch die Injektion einer Kontrolllösung werden allerdings keine Änderungen in der Physiologie der Kanäle der Plasmamembran verursacht, so dass alle beobachteten Änderungen auf den injizierten Elicitor zurückgeführt werden können.

Bei einer Injektion mit Chitosan setzt nach der anfänglichen positiven Verschiebung um etwa 15 pA ein negativer Strom ein, der im Mittel nach 7 ½ Minuten seine größte Amplitude bei -163 pA erreicht (n=8). Dieser Vorgang wiederholt sich bei einmaliger Applikation von Chitosan drei- bis viermal pro Zelle, wobei die Werte der maximalen Amplitude allerdings immer hinter dem des ersten zurückbleiben (Abb. 3.11a).

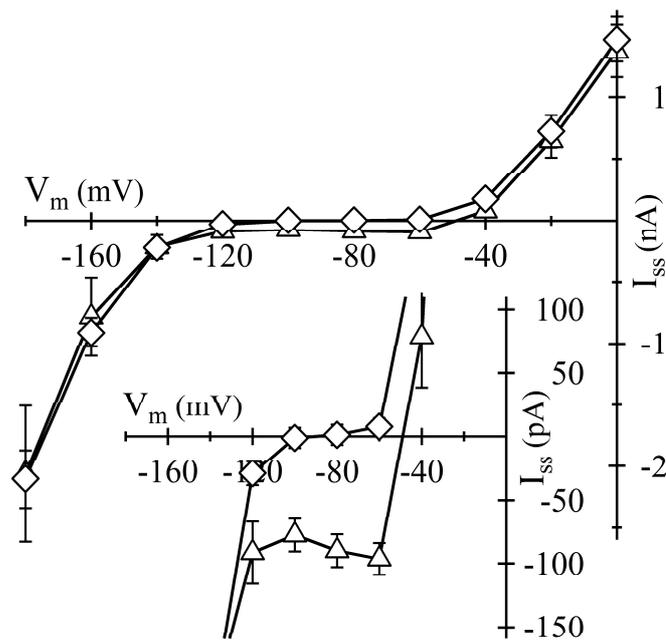
Vergleicht man die zeitabhängigen Ströme (Abb. 3.11b) bei verschiedenen Spannungen vor ( $\diamond$ , oberes Bild) und nach ( $\triangle$ , unteres Bild) der Injektion, so erkennt man, dass Chitosan in den Zellen die Aktivität der ein- und auswärtsgerichteten  $K^+$ -Kanäle beeinflusst. Da diese Kanäle bei -100 mV jedoch nicht aktiv sind, können die transienten negativen Ströme nicht durch die Aktivierung dieser Kanäle erzeugt werden. Im Durchschnitt konnte keine Änderung der  $K^+$ -Kanalaktivität aufgezeichnet werden (Abb. 3.11b). Die S-Typ Anionenkanäle weisen hingegen nach der Injektion mit Chitosan im Durchschnitt eine höhere Aktivität auf (Abb. 3.11b und c). Diese erhöhte Aktivität konnte mit Spannungssprüngen von -100 mV auf -60 mV sichtbar gemacht werden (Abb. 3.11c, n = 8). Bei dieser Testspannung

öffnen die S-Typ Anionenkanäle langsam, was in einer Zunahme des Einwärtsstromes resultiert.

Die Mittelwerte der Gleichgewichtsströme vor und nach der Injektion wurden in einem Strom-Spannungs-Diagramm aufgetragen (Abb. 3.12). Dazu wurden die Ströme direkt vor dem Sprung der Testspannungen (-180 bis 0 mV) zurück zum Haltepotential von -100 mV über einen Zeitraum von 40 ms gemittelt. Die Gleichgewichtsströme vor und nach der Injektion zeigen in den Bereichen von -180 bis -120 mV und von -80 bis 0 mV keine signifikanten Unterschiede. Die Aktivität der Kaliumein- und -auswärtsgleichrichter wird durch die Injektion von Chitosan also nicht beeinträchtigt. Bei Testpotentialen zwischen -120 mV und -80 mV, mV aktivieren keine Spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle und für diese Messpunkte konnten signifikante Änderungen im Strom über die Plasmamembran aufgezeichnet werden. Chitosan bewirkt, dass die Ströme zwischen -120 mV und -60 mV wieder negativere Werte annehmen. Hierdurch verschiebt sich auch das Gleichgewichtspotential von etwa -100 mV hin zu -50 mV nach der Stimulation mit Chitosan.



**Abbildung 3.11: Effekt von Chitosan auf die Membran- und zeitabhängigen Ströme in Gerstenschließzellen.** (a) Nach der Injektion mit Chitosan ergibt sich wie bei der Kontrolle eine Verschiebung hin zu positiveren Strömen. Nach durchschnittlich  $7\frac{1}{2}$  min wird hingegen ein Tiefpunkt von -163 pA erreicht. Diese transienten negativen Ströme wiederholen sich drei- bis viermal. (b) In den zeitabhängigen Strömen kann vor (◇) und nach (△) der Injektion keine Änderung in der Aktivität der Kaliumkanäle erkannt werden. Die Anionenkanäle weisen hingegen nach der Injektion eine größere Aktivität auf. (c) Hier werden die Stromspuren der Kontrolle und der Injektion von Chitosan gezeigt, welche durch eine Änderung der Membranspannung von -100 mV auf -60 mV verursacht werden, um die Änderungen in den Anionenkanälen zu verdeutlichen. Bereits bei der Haltespannung können Unterschiede in den Strömen festgestellt werden, was auf die Auswahl der Messzeitpunkte zurückzuführen ist. Nach dem Spannungssprung auf -60 mV erkennt man nach der Injektion von Chitosan eine größere Differenz in den Strömen als davor (gekennzeichnet durch die gestrichelte Linie).



**Abbildung 3.12: Strom-Spannungskurve der durchschnittlichen Gleichgewichtsströme in den Injektionsexperimenten mit Chitosan.** Chitosan hat keinen Einfluss auf die Stromwerte in den Bereichen zwischen -180 und -140 mV, sowie zwischen -40 und 0 mV. Die Injektion des Elicitors ( $\Delta$ ) löst jedoch eine Änderung in den Strömen über die Plasmamembran zwischen -120 bis -60 mV aus. Das Gleichgewichtspotential der Zellen verschiebt sich von -90 mV vor der Injektion ( $\diamond$ ) auf etwa -50 mV danach.

### 3.2 Untersuchungen zur Genfamilie der S-Typ Anionenkanäle in Gerste

Die vorhergehenden Experimente machten deutlich, dass bei der Reaktion der Schließzellen auf Pathogene und ihre Elicitoren, die S-Typ Anionenkanäle eine wichtige Rolle einnehmen. Zur genaueren Charakterisierung des S-Typ Anionenkanals aus Schließzellen der Gerste sollte dieser kloniert und in Oozyten mittels der DEVC-Methode untersucht werden (vergl. Kap. 2.4.2).

#### 3.2.1 Identifizierung von Homologen des Anionenkanals *AtSLAC1* in Gerste

Da das Genom von Gerste bislang auf Grund hoher repetitiver Sequenzanteile nicht vollständig bekannt ist, konnte nicht auf eine annotierte Datenbank mit Gen- und Proteinsequenzen zurückgegriffen werden. Erst vor kurzem wurde in Japan durch das „National Institute of Agrobiological Sciences“ (NIAS) eine Datenbank mit cDNA-Sequenzen freigegeben, welche die Identifizierung von Genen erleichtert (Matsumoto et al. 2011). Dennoch bleibt die Klonierung eines Gens aus Gerste schwierig, da immer noch wenig über die nicht-codierenden Bereiche des Genoms bekannt ist (Dr. Schweizer, IPK Gatersleben, pers. Mitteilung).

Um die homologen Gene zum *A. thaliana*-Kanal SLAC1 zu identifizieren, konnte durch Vermittlung des IPK Gatersleben bereits vor der Veröffentlichung auf die oben genannte Datenbank zugegriffen werden. Zunächst wurden dazu die homologen Gene aus *Arabidopsis*

*thaliana* gegen das annotierte Genom der „Lilafarbigen Falschen Trespe“ (*Brachypodium distachyon* (L.) Beauv) verglichen, um dadurch einen ersten Eindruck der untersuchten Genfamilie und ihre Organisation in Gräsern zu erhalten. In *A. thaliana* besteht die Familie aus fünf Genen *Slac1* und *Slah1* bis *Slah4*. Das Gen *Slac1* wird vorwiegend in Schließzellen exprimiert, nicht aber in anderen Geweben von *A. thaliana* (Geiger et al. 2009, Geiger et al. 2011, Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008). *Slah3* findet sich ebenfalls in Schließzellen, allerdings nicht in so hohem Maße wie *Slac1* (Geiger et al. 2011). Das Gen *Slah3* wird hingegen auch stark in Mesophyllzellen exprimiert. *Slah2* kann in geringen Mengen in Mesophyllzellen gefunden werden. Ob es allerdings auch in anderen Geweben exprimiert wird, wurde bisher nicht untersucht (Geiger et al. 2011). Die beiden Homologen *Slah1* und *Slah4* sind wahrscheinlich die ältesten Mitglieder der Familie (vergleiche Abb. 1.6) und konnten weder in Schließ- noch in Mesophyllzellen nachgewiesen werden (Geiger et al. 2011).

In *B. distachyon* konnten vier Homologe zu der SLAC1-Familie gefunden werden. Anhand der BLAST-Analyse (s. Tab. 3.1) und einer phylogenetischen Analyse wurde allerdings eine andere Organisation der Genfamilie erarbeitet. Wie in Tab. 3.1 zu sehen, weist das Gen *Bradi5g18980* die höchste Homologie zu *Atslac1* auf. Die drei weiteren Gene lassen sich ebenfalls den einzelnen *Slah*-Genen aus *A. thaliana* zuweisen. Zwei Gene zeigen hohe Homologien zu *Slah3* oder *Slah2*, das Dritte zu *Slah1* und *Slah4*, allerdings nicht in dem Maße wie die anderen Homologe. Das homologe Gen *Bradi2g31960* konnte im Herbst 2011 nicht mehr in den Datenbanken des Projektes gefunden werden. Vermutlich wurde es durch Qualitätskontrollen entfernt und daher in Tab. 3.1 grau hinterlegt. Die Analysen dieser Arbeit wurden allerdings mit allen vier Homologen aus *Brachypodium distachyon* durchgeführt.

**Tabelle 3.1: Homologie zwischen den Genen der SLAC1-Familie aus *Brachypodium distachyon* zu den Mitgliedern aus *A. thaliana*.** Es wurden die translatierten Gensequenzen aus *B. distachyon* mit den Proteinen aus *A. thaliana* verglichen. Die jeweils höchste Homologie wurde für jedes Gen farblich unterlegt.

	e-values (blastx, NCBI)				
	<i>AtSlac1</i>	<i>AtSlah3</i>	<i>AtSlah2</i>	<i>AtSlah1</i>	<i>AtSlah4</i>
Bradi5g18980	4,00E-128	4,00E-77	2,00E-78	6,00E-33	2,00E-28
Bradi2g43950	1,00E-125	2,00E-154	1,00E-154	3,00E-62	5,00E-59
Bradi2g31960	1,00E-119	1,00E-157	6,00E-144	3,00E-54	3,00E-51
Bradi2g08670	3,00E-43	3,00E-43	1,00E-42	3,00E-69	1,00E-66

Die Sequenzen der Genfamilie aus *A. thaliana* wurden Dr. Matsumoto in Japan zugesandt, der die BLAST-Suche in der cDNA-Datenbank aus Gerste durchführte. Die Ergebnisse der Suche wurden zur Verfügung gestellt und aus den Alignments und Ähnlichkeitswerten wurden daraufhin Klone ermittelt, die als putative Homologe zu *Atslac1* angesehen werden (Tab. 3.2).

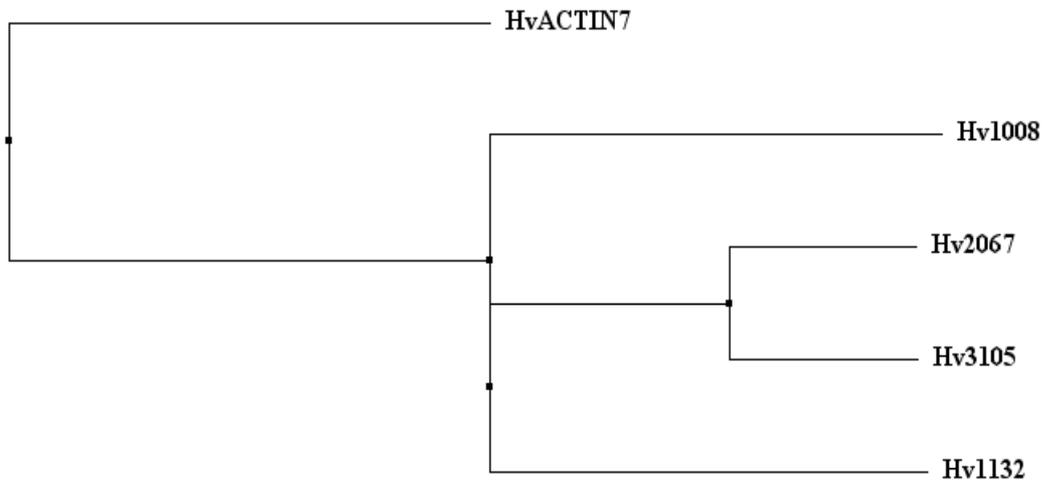
**Tabelle 3.2: Ergebnisse der blast-Suche in der NCBI-Datenbank.** Es wurden translatierte Nucleotidsequenzen aus Gerste gegen die Proteindatenbank aus *Arabidopsis thaliana* verglichen. Die jeweils höchsten Homologien wurden farbig unterlegt.

	e-values (blastx, NCBI)				
	<i>AtSlac1</i>	<i>AtSlah3</i>	<i>AtSlah2</i>	<i>AtSlah1</i>	<i>AtSlah4</i>
Hv1008D01	5,00E-168	4,00E-104	9,00E-104	9,00E-56	2,00E-51
Hv2067E12	1,00E-116	3,00E-156	2,00E-141	1,00E-54	6,00E-53
Hv1132L02	2,00E-120	2,00E-154	1,00E-149	6,00E-59	1,00E-51
Hv3105L09	6,00E-113	3,00E-150	2,00E-134	3,00E-55	4,00E-54

Der Klon mit der Bezeichnung Hv1008D01, im weiteren Verlauf *Hv1008* genannt, zeigte in Sequenzvergleichen mit den Genen aus *A. thaliana* und *B. distachyon* die höchste Homologie zu *slac1*. Auch in Gerste finden sich drei weitere Homologe. Im Gegensatz zu den Genen aus *Brachypodium distachyon* sind diese allerdings alle homolog zu *slah3*. Die Sequenzen der cDNAs aus Gerste finden sich im Anhang dieser Arbeit.

Für die Genfamilie aus Gerste wurde mit der Software „Jalview“ Alignments erstellt, um die Verwandtschaft der einzelnen Gene untereinander zu bestimmen. Dazu wurden die sehr variablen N-Termini der einzelnen Gene entfernt, so dass die Berechnung nur auf den hoch konservierten Regionen der Transmembrandomänen und dem kurzen C-Termini basiert. Hier zeigt sich ebenfalls, dass es in Gerste keine Homologen zu den Genen *Slah1* und *Slah4* aus *A. thaliana* gibt (Abb. 3.13).

Obwohl in 5'-Bereich der cDNA vier verschiedene ATGs gefunden wurden, lieferte nur das letzte ein Protein, das zu AtSLAC1 homolog war. Bei diesem Protein fehlten allerdings die ersten 69 Aminosäuren. In dem Protein aus *B. distachyon* fehlt dieser Bereich des N-Terminus hingegen nicht (Abb. 3.14). Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenzen fällt auf, dass der Mittelteil der Proteine große Homologien aufweist. Zwischen *A. thaliana* und *H. vulgare* beträgt diese Homologie 73%. Der N-Terminus fällt hingegen in allen drei Proteinen variabler aus, mit einer Homologie von etwa 54%. Im C-Terminus ist ein Unterschied zwischen den beiden Gräsern und *A. thaliana* zu erkennen. Hier beträgt die Homologie lediglich 42%.



**Abbildung 3.13: Phylogenetische Analyse der SLAC-Genfamilie in Gerste.** Mittels des „Neighbour-Joining“-Algorithmus wurden die einzelnen Gene miteinander verglichen. Dabei wurden die variablen N-Termini nicht berücksichtigt. In der Genfamilie finden sich keine *Slah1*- und *Slah4*-Homologen. Drei Gene bilden den Zweig der *Slah2/3*-Homologe. Als Outgroup diente eines der Actin-Gene aus Gerste.

Bd5g18980	1	V	L	G	M	D	R	V	G	G	G	R	N	G	G	R	R	S	A	L	P	R	S	G	K	S	L	G	V	L	N	N	N	I	N	H	S	G	A	L	G	G	G	G	E	R	R	G	G	D	F	S	M	F	R	T	K	S						
NIAS_Hv1008	1	-	M	G	M	D	R	G	G	R	S	G	G	R	P	G	Q	R	A	L	P	R	S	G	K	S	L	G	V	L	N	-	-	-	-	H	S	G	L	G	P	D	G	A	R	R	S	G	-	D	F	S	M	F	R	T	K	S						
AtSLAC1	1	E	T	G	F	S	V	L	N	R	E	S	R	E	R	D	D	K	K	S	L	P	R	S	G	R	S	F	G	G	F	E	-	-	-	-	S	G	I	N	G	D	G	R	K	T	D	F	S	M	F	R	T	K	S									
Bd5g18980	61	T	L	N	K	Q	N	S	M	L	P	S	R	I	R	E	E	L	D	V	D	I	G	R	V	E	G	G	Q	S	A	G	R	P	D	E	D	P	L	N	K	S	V	P	A	G	R	Y	F	A	A	L	R	G	P	E	L	D						
NIAS_Hv1008	55	T	L	G	K	Q	N	S	M	L	P	S	R	I	K	E	E	L	D	S	V	D	I	D	H	V	E	G	Q	-	P	A	G	R	P	A	D	V	D	P	L	N	K	S	V	P	A	G	R	Y	F	A	A	L	R	G	P	E	L	D				
AtSLAC1	54	T	L	S	K	Q	K	S	L	L	P	S	I	I	R	E	R	D	I	E	N	S	L	R	T	E	D	G	E	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	D	S	I	N	E	N	V	S	A	G	R	Y	F	A	A	L	R	G	P	E	L	D			
Bd5g18980	121	V	R	D	Y	E	D	I	L	L	P	K	D	E	V	W	F	L	L	R	F	I	G	C	F	G	V	C	L	G	L	G	S	Q	A	I	L	W	G	A	L	A	A	S	P	A	M	R	F	L	R	V	T	P	M	I	N	L	A					
NIAS_Hv1008	114	V	R	D	Y	E	D	I	L	L	P	K	D	E	V	W	F	L	L	R	F	I	G	C	F	G	V	C	L	G	L	G	S	Q	A	I	L	W	G	A	L	A	A	S	P	A	M	G	F	L	R	V	T	P	M	I	N	V	A					
AtSLAC1	108	V	K	D	N	E	D	I	L	L	P	K	E	E	Q	W	F	L	L	R	F	I	G	C	F	G	I	C	L	G	L	S	S	Q	A	V	L	W	T	A	L	A	K	S	P	A	T	N	F	L	H	I	T	P	L	I	N	L	V					
Bd5g18980	181	V	W	L	L	A	A	V	L	A	A	T	S	V	T	Y	A	L	K	C	V	E	F	E	A	I	R	R	E	F	F	H	P	V	R	V	N	F	F	F	T	P	S	I	A	A	M	F	L	A	I	G	L	P	R	A	L	A	P					
NIAS_Hv1008	174	V	W	L	L	A	T	A	V	L	V	A	T	S	V	T	Y	A	L	K	C	V	E	F	E	A	I	R	R	E	F	H	P	V	R	V	N	F	F	F	T	P	S	I	A	A	M	F	L	A	I	G	L	P	R	A	F	A	P					
AtSLAC1	168	V	W	L	F	S	L	V	V	L	V	S	V	S	F	T	Y	L	K	C	T	F	Y	E	A	V	K	R	E	Y	F	H	P	V	R	V	N	F	F	A	P	W	V	V	C	M	F	L	A	I	S	V	P	P	M	F	S							
Bd5g18980	241	A	D	G	R	A	M	H	P	A	V	W	C	A	S	V	A	P	L	F	A	L	E	L	K	I	Y	G	Q	W	L	S	G	G	K	R	R	L	C	K	G	R	L	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
NIAS_Hv1008	234	A	R	-	-	-	L	H	P	A	V	W	C	A	F	V	A	P	L	F	A	L	E	L	K	I	Y	G	Q	W	L	S	G	G	K	R	R	L	C	K	V	A	N	P	S	S	H	L	S	V	V	G	N	F	V	G	A	I	L	A				
AtSLAC1	228	N	R	-	K	Y	L	H	P	A	I	W	C	V	F	M	G	P	V	E	F	L	E	L	K	I	Y	G	Q	W	L	S	G	G	K	R	R	L	C	K	V	A	N	P	S	S	H	L	S	V	V	G	N	F	V	G	A	I	L	A	S			
Bd5g18980	285	-	-	-	-	G	R	G	K	F	L	W	A	I	G	V	A	H	Y	I	V	V	F	V	T	L	Y	Q	R	L	P	T	N	E	A	L	P	M	E	L	H	P	V	Y	S	M	F	I	A	T	P	S	A	A	S	L	A	W	A	A				
NIAS_Hv1008	291	R	V	G	W	E	E	A	G	K	F	L	W	A	I	G	V	S	H	Y	I	V	V	F	V	T	L	Y	Q	R	L	P	T	S	E	A	L	P	K	E	L	H	P	V	Y	S	M	F	I	A	A	P	S	A	A	S	T	A	W	N	T			
AtSLAC1	287	K	V	G	W	D	E	V	A	K	F	L	W	A	V	G	F	A	R	Y	L	V	V	F	V	T	L	Y	Q	R	L	P	T	S	E	A	L	P	K	E	L	H	P	V	Y	S	M	F	I	A	A	P	S	A	A	S	T	A	W	N	T			
Bd5g18980	340	I	Y	G	S	F	D	A	V	A	R	T	F	F	F	M	A	L	F	L	Y	M	S	L	V	V	R	I	N	F	F	R	G	F	R	F	S	I	A	W	S	Y	T	F	P	M	T	T	A	S	L	A	T	V	K	Y	A	E	A	V				
NIAS_Hv1008	351	I	Y	G	S	F	D	A	V	A	R	T	F	F	F	M	A	L	F	L	Y	M	S	L	V	V	R	I	N	F	F	R	G	F	R	F	S	I	A	W	S	Y	T	F	P	M	T	T	A	S	L	A	T	V	K	Y	A	E	A					
AtSLAC1	347	I	Y	G	Q	F	D	G	C	S	R	T	C	F	F	I	A	L	F	L	Y	T	S	L	V	A	R	I	N	F	F	T	G	F	K	F	S	V	A	W	S	Y	T	F	P	M	T	T	A	S	V	A	T	I	K	Y	A	E	A					
Bd5g18980	400	P	C	F	L	S	R	A	L	A	L	S	L	S	L	M	S	T	T	M	V	S	L	L	V	S	T	L	L	H	A	F	V	W	R	S	L	F	P	N	D	L	A	I	A	I	T	K	D	R	O	N	G	G	A	R	P	H	G	K				
NIAS_Hv1008	411	P	C	F	T	S	R	A	L	A	L	S	L	S	L	M	S	T	T	M	V	S	L	L	V	S	T	L	L	H	A	F	Y	W	R	S	L	F	P	N	D	L	A	I	A	I	T	K	D	R	O	G	G	A	G	R	P	H	G	K				
AtSLAC1	407	P	G	Y	P	S	R	A	L	A	L	T	L	S	F	I	S	T	A	M	V	C	V	L	F	V	S	T	L	L	H	A	F	V	W	Q	T	L	F	P	N	D	L	A	I	A	I	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	K	L	T	R
Bd5g18980	460	G	R	K	A	G	K	R	V	D	I	K	R	W	A	K	Q	A	P	L	S	I	V	S	S	I	T	K	T	N	S	A	D	K	E	E	E	E	E	K	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
NIAS_Hv1008	471	G	R	K	A	G	K	R	V	N	D	I	K	R	W	A	K	Q	V	P	L	S	V	S	S	I	T	K	T	N	S	A	D	K	E	E	E	E	E	K	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-									
AtSLAC1	460	E	K	K	P	F	K	R	A	Y	D	L	K	R	W	T	K	Q	A	L	A	K	K	I	S	A	E	K	D	F	E	A	E	E	E	S	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												

**Abbildung 3.14: Alignment der SLAC1-Proteinsequenzen aus *A. thaliana*, Gerste und *B. distachyon*.** Es besteht eine höhere Identität zwischen dem Gersten-Homolog und dem Protein aus *B. distachyon* als zu dem Protein *AtSLAC1*. Da der N-Terminus der Proteine der Proteine kaum Homologien zeigt, enthält das Alignment nicht den Beginn der drei Proteine.

In den Datenbanken des Leibniz-Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung wurde nach Identifizierung der cDNA daher durch Dr. Schweizer nach einem BAC-Klon gesucht, der die genomische Sequenz zu dem Gen *Hv1008* enthielt. Diese Sequenz wurde ebenfalls für die Analysen zur Verfügung gestellt.

Anhand der genomischen Sequenz konnte die Intron-Exon-Struktur des Gens bestimmt werden. So enthält es, ebenso wie das entsprechende Gen Bd5g18980 aus *B. distachyon*, zwei kurze Introns (s. Abb. 3.15, farbige Buchstaben) von 108 bzw. 69 Basenpaaren. Es wurden zwei Basenaustausche in der cDNA gefunden (Abb. 3.15, grüne Kästen). Diese haben allerdings nur eine geringe Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des codierten Proteins. Im ersten Fall wurde im N-Terminus das Glycin an Stelle 112 zu einem Serin (BAC-Klon zu cDNA). Im zweiten Fall wurde das Threonin an Position 390 zu einem Isoleucin. Diese zweite Mutation liegt am Ende einer Membranhelix. Aufgrund der Struktur der beiden Aminosäuren kann aber davon ausgegangen werden, dass keine Änderung in der Proteinstruktur vorliegen. Des Weiteren konnte eine Insertion (Abb. 3.15, roter Kasten) in der Sequenz des cDNA-Klons aus Japan identifiziert werden, die davon ausgehen lässt, dass ein N-Terminus verkürztes Protein gebildet wird.

Ohne diese Insertion würde ein Protein entstehen, das einen längeren N-Terminus besitzt. Da der N-Terminus Phosphorylierungsstellen und weitere Aminosäuren enthält, die für die Regulation des Kanals wichtig sind, ist er besonders wichtig für die Regulation des Kanals (Geiger et al., 2009, 2010 und 2011).

Für die geplante Erzeugung von Kanalmutanten wurde die Aminosäuresequenz von *Hv1008* auf die Anwesenheit der Phosphorylierungsstellen und andere konservierte Aminosäuren hin überprüft. Fünf der bislang bekannten Phosphorylierungsstellen in *AtSLAC1* finden sich auch in *Hv1008* (Abb. 3.16, farbige Kästen).

Im N-Terminus finden sich vier Serin-Reste, welche in *AtSLAC1* regulierend wirken. Zudem wurde im C-Terminus ein Threonin gefunden, das eine Phosphorylierung im Arabidopsis-Kanal vermittelt. In *AtSLAC1* findet man an Position 450 in der neunten Transmembranhelix ein Phenylalanin, das in die Pore hineinragt und diese geschlossen hält, bis der Kanal aktiviert wird. Diese Aminosäure findet man ebenfalls in *Hv1008*, hier an der Position 462 (Abb. 3.16, roter Kasten).

Die Bestimmung der Transmembrandomänen wurde mit dem Algorithmus TMpred vorgenommen. Dabei werden Bereiche mit gehäuft auftretenden hydrophoben Aminosäuren getestet, ob sie eine  $\alpha$ -Helix ausbilden. Es konnten so zehn Domänen gefunden werden, die

sich mit den bekannten Domänen aus *AtSLAC1* decken. In Abbildung 3.16 sind die Regionen durch fett gedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

GL gDNA	ATGGCGGGAGCGGAGCCATCGTCGTCATCGGCGGGCAATGGCCAGCACGCGGGCGGTGGACATCCGCGTGGCGGCGGGCGGGCGGGCCCG
NIAS cDNA	ATGGCGGGAGCGGAGCCATCGTCGTCATCGGCGGGCAATGGCCAGCACGCGGGCGGTGGACATCCGCGTGGCGGCGGGCGGGCGGGCCCG
GL gDNA	AGGAGCCGAGGCAGACGTCATGAGCGGGCCGCTCAACCTCCGGAGCGACCGGAGGCCGCGCCGCGCCGCGCAGAGGGCCCTTACGCCGGC
NIAS cDNA	AGGAGCCGAGGCAGACGTCATGAGCGGGCCGCTCAACCTCCGGAGCGACCGGAGGCCGCGCCGCGCCGCGCAGAGGGCCCTTACGCCGGC
GL gDNA	AGGTGTCCCTGGGCAGCGGCGTGACGGTGATGGGCATGGACAGAGGCGGGAGGAGCGGGCGGGCCGGGCGAGCGCGCTCC
NIAS cDNA	AGGTGTCCCTGGGCAGCGGCGTGACGGTGATGGGCATGGACAGAGGCGGGAGGAGCGGGCGGGCCGGGCGAGCGCGCTCC
GL gDNA	GCGCAGCGGCAAGAGCCTCGGGGTGCTCAACCACAGCGGGCGGCTCGGCCCGGACGGCGGGCGCGCAGCGCGGCGACTTCAGCATG
NIAS cDNA	GCGCAGCGGCAAGAGCCTCGGGGTGCTCAACCACAGCGGGCGGCTCGGCCCGGACGGCGGGCGCGCAGCGCGGCGACTTCAGCATG
GL gDNA	TTCGGACCAAGTCCACGCTCGGCAAGCAGAATCCATGCTGCCGTCGAGGATCAAGGAGGAGCTCGACAGCGTCGACCTGGACCACG
NIAS cDNA	TTCGGACCAAGTCCACGCTCGGCAAGCAGAATCCATGCTGCCGTCGAGGATCAAGGAGGAGCTCGACAGCGTCGACCTGGACCACG
GL DNA	TTCGAGGGCCAGCCCGCGGCGAGGCTGCGGACCTGCTCAACAAGAGCGTCCCAGCGGGCGCTACTTCGCGCCCTCCGCGG
NIAS cDNA	TTCGAGGGCCAGCCCGCGGCGAGGCTGCGGACCTGCTCAACAAGAGCGTCCCAGCGGGCGCTACTTCGCGCCCTCCGCGG
GL gDNA	CCCCGAGCTCGACGAAGTCCCGGTAAGCCATCCATCCATCTTTGTCCCTGCTTGCCGATCACCAAGGACGAAGCCTACGTAGTACAAA
NIAS cDNA	CCCCGAGCTCGACGAAGTCCCGG-----
GL gDNA	AATGAAAAATCACACCAGCTGACCCGGAGTTTGTGACAGTAGGACTACGAGGACATCCTGCTGCCAAGGACGAGGTGTGGCCGTTCCT
NIAS cDNA	-----GACTACGAGGACATCCTGCTGCCAAGGACGAGGTGTGGCCGTTCCT
GL gDNA	GCTGCGGTTCCCGATCGGCTGCTTCGGCGTCTGCCTGGGGCTCGGCAGCCAGGCCATCCTGTGGGGCGCGCTGGCGGCAGCCCGGGCG
NIAS cDNA	GCTGCGGTTCCCGATCGGCTGCTTCGGCGTCTGCCTGGGGCTCGGCAGCCAGGCCATCCTGTGGGGCGCGCTGGCGGCAGCCCGGGCG
GL gDNA	ATGGGGTTCTCCCGCTGACGCCATGATCAACGTCGCGTGTGGCTGCTGGCGACGGCGGTGCTGCTGGCCACCTCCGTACCTACG
NIAS cDNA	ATGGGGTTCTCCCGCTGACGCCATGATCAACGTCGCGTGTGGCTGCTGGCGACGGCGGTGCTGCTGGCCACCTCCGTACCTACG
GL gDNA	CGCTCAAGTGCCTTCTACTTCGAGGCGATCCGGCGCGAGTTCCTCCACCCGGTGCCTCAACTTCTTCTTCACGCCCTCCATCGC
NIAS cDNA	CGCTCAAGTGCCTTCTACTTCGAGGCGATCCGGCGCGAGTTCCTCCACCCGGTGCCTCAACTTCTTCTTCACGCCCTCCATCGC
GL gDNA	CGCCATGTTCCCTCGCCATCGGCTGCCCCGCGCTTCGCGCGCGGCGAGGCTGCACCCCGCGCTGCTGTTGCGCGTTCGTTGGCGCGCTC
NIAS cDNA	CGCCATGTTCCCTCGCCATCGGCTGCCCCGCGCTTCGCGCGCGGCGAGGCTGCACCCCGCGCTGCTGTTGCGCGTTCGTTGGCGCGCTC
GL gDNA	TTCGCGCTGGAGCTCAAGATCTACGGGCGAGTGGCTGTCGGGCGGCAAGCGCGGCTGTGCAAGGTGGCCAAACCCCTGCTCGCACCTGT
NIAS cDNA	TTCGCGCTGGAGCTCAAGATCTACGGGCGAGTGGCTGTCGGGCGGCAAGCGCGGCTGTGCAAGGTGGCCAAACCCCTGCTCGCACCTGT
GL gDNA	CCGTGTTGGCAACTTCGTGGGCGCCATCCTGGCGGCGAGGGTTCGGGTGGGAGGAGGCCGGCAAGTTCCTCTGGGCCATCGGGCTCTC
NIAS cDNA	CCGTGTTGGCAACTTCGTGGGCGCCATCCTGGCGGCGAGGGTTCGGGTGGGAGGAGGCCGGCAAGTTCCTCTGGGCCATCGGGCTCTC
GL gDNA	CCACTACATCGTCTTTCGTACGCTTACCAGCGCTGCCCCAACGAGGCGCTGCCCATGGAGCTGCACCCGGTCTACTCCATG
NIAS cDNA	CCACTACATCGTCTTTCGTACGCTTACCAGCGCTGCCCCAACGAGGCGCTGCCCATGGAGCTGCACCCGGTCTACTCCATG
GL gDNA	TTCATCGCCACGCCCTCCGCGCGCGGCTCGCTGGGGCGCCATCTACGGCAGCTTCGACGCGCGTTCGCGCGCACCTTCTTCTTCATGG
NIAS cDNA	TTCATCGCCACGCCCTCCGCGCGCGGCTCGCTGGGGCGCCATCTACGGCAGCTTCGACGCGCGTTCGCGCGCACCTTCTTCTTCATGG
GL gDNA	CGCTCTTCTTACATGTCACGTCGTCGTCGTCGATCAACTTCTTCCGTGGCTTCCGTTGAGCACCACCATGACCCCATCCATCCGCTT
NIAS cDNA	CGCTCTTCTTACATGTCACGTCGTCGTCGTCGATCAACTTCTTCCGTGGCTTCCGTTGAGCACCACCATGACCCCATCCATCCGCTT
GL gDNA	GTACCACCAGCAACTGACGACGATCATTCGCACAGGTTCTCCATCGCATGGTGGTCC TACACGTTTCCCATGACGACGGCGTTCGCTG
NIAS cDNA	-----GTTCATCGCATGGTGGTCC TACACGTTTCCCATGACGACGGCGTTCGCTG
GL gDNA	GCCACCGTCAAGTACGCCGAGGCGGTCGCGTCTACGAGCAGAGCCCTCGCGTGGAGCTGCTCCATGTCGACGACCATGGTGT
NIAS cDNA	GCCACCGTCAAGTACGCCGAGGCGGTCGCGTCTACGAGCAGAGCCCTCGCGTGGAGCTGCTCCATGTCGACGACCATGGTGT
GL gDNA	CGCTGCTGCTCGTTCGACGCTCCCTGCACGCTTCTACTGGCGGTGCTCTTCCCAACGACCTGGCCATCGCCATCACCAAGGACCG
NIAS cDNA	CGCTGCTGCTCGTTCGACGCTCCCTGCACGCTTCTACTGGCGGTGCTCTTCCCAACGACCTGGCCATCGCCATCACCAAGGACCG
GL gDNA	GCAGGGCGGCGGGGAGGCGCACGGCAAGGGGAGGAAGGCCGGCAAGAGGGTGAACGACATCAAGCGGTGGGCCAAGCAGGTGCCG
NIAS cDNA	GCAGGGCGGCGGGGAGGCGCACGGCAAGGGGAGGAAGGCCGGCAAGAGGGTGAACGACATCAAGCGGTGGGCCAAGCAGGTGCCG
GL gDNA	CTCTCGGTCGTCCTCCATCACCAAGACCAACTCTGCAGACAAGGAGGAAGAGGAGAAAACAGACTAG
NIAS cDNA	CTCTCGGTCGTCCTCCATCACCAAGACCAACTCTGCAGACAAGGAGGAAGAGGAGAAAACAGACTAG

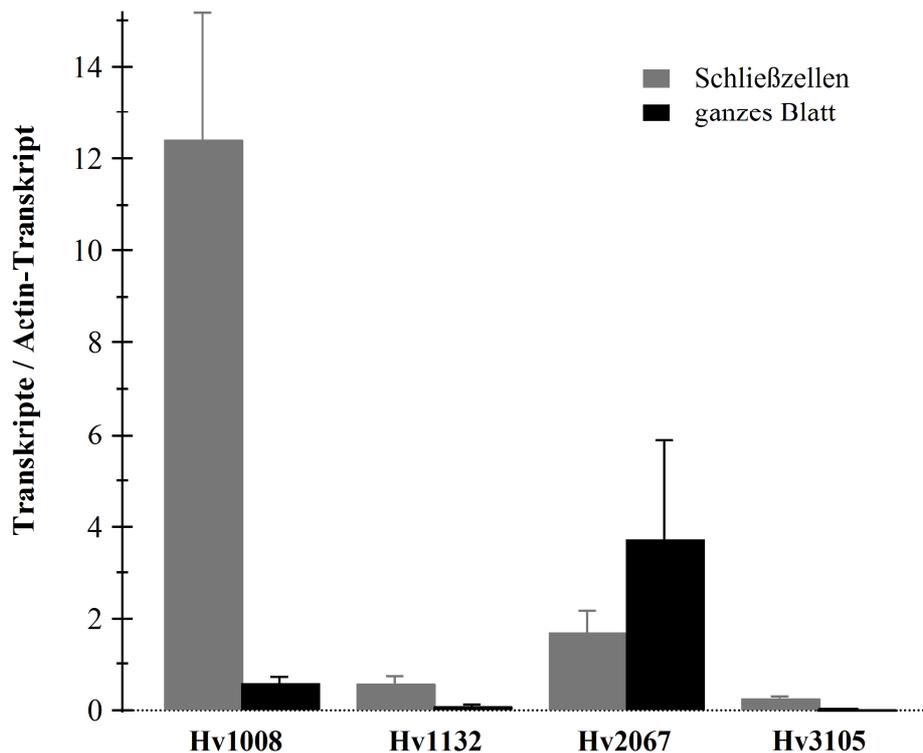
**Abbildung 3.15: Sequenzvergleich des Gens *Hv1008*.** Der Vergleich der codierenden Sequenz aus der genomischen Sequenz vom IPK in Gatersleben (oben) mit der aus der cDNA des NIAS in Japan, zeigen zwei kurze Introns, die hier durch farbige Basen angegeben sind. Eine Insertion (Pos. 57, roter Kasten) in der cDNA verändert den Leserahmen des Gens, so dass vermutlich nur eine verkürzte Version des Proteins entstehen kann. In den beiden Sequenzen wurden zwei Basenaustausche gefunden (grüne Kästen).

AtSLAC1	1	MERKQSNAHSTFADINEVEDEAEQELQQENNNNKRFSGNRGPNRGKQRPFRGF
Hv1008	1	MAGAEPPSSSSAGNGQAAVDIRVAAAAAPEEPROTSMSGPLNLRSDRPF----PPFQRAF
AtSLAC1	55	SRQVSL <sup>■</sup> ETGF <sup>■</sup> SVLNRE--SRE---RDDKKS <sup>■</sup> LPRSGF <sup>■</sup> SFGGFE-SGGI-INGGDGRKTD <sup>■</sup> DFS
Hv1008	57	SRQVSL <sup>■</sup> IGSGVIVMGMDRGGRS <sup>■</sup> GGGRPGQ <sup>■</sup> RALPRSGK <sup>■</sup> SLGVLNHS <sup>■</sup> GGLGPDGGARRSGDFS
AtSLAC1	108	MFRTK <sup>■</sup> S <sup>■</sup> FLSKQK <sup>■</sup> S <sup>■</sup> LLPSI <sup>■</sup> IRERDIENS <sup>■</sup> LRTEDG-----ETK <sup>■</sup> DD <sup>■</sup> S <sup>■</sup> INENVS <sup>■</sup> AGRYFAALRG
Hv1008	117	MFRTK <sup>■</sup> S <sup>■</sup> FLGKQ <sup>■</sup> S <sup>■</sup> MLPSRIKEELDSVDLDHVEGQ <sup>■</sup> PAGRPADVD <sup>■</sup> PLNKS <sup>■</sup> VFPAGRYFAALRG
AtSLAC1	163	PELDEVKIDNEDILLPKEEQWPFLLRFP <sup>■</sup> IGCFG <sup>■</sup> ICLGL <sup>■</sup> SSQAVLWLALAKSPATN <sup>■</sup> FLHITP
Hv1008	177	PELDEVRIYEDILLPKDEVVWPFLLRFP <sup>■</sup> IGCFV <sup>■</sup> CLGL <sup>■</sup> GSQAILWGALAA <sup>■</sup> SPAMGFLRVTP
AtSLAC1	223	LINLVVWLFSLVVLVSVSFTYILKCI <sup>■</sup> FYFEAVKREYFHPV <sup>■</sup> RVNFF <sup>■</sup> FAPWV <sup>■</sup> VC <sup>■</sup> MFLAIS <sup>■</sup> VP
Hv1008	237	MINVAVWLLATAVLVATSVTYALKCVFYFEAIRREFFHPV <sup>■</sup> RVNFF <sup>■</sup> FTPSIAAMFLAIGLP
AtSLAC1	283	PMFSENRKYLHPAIVCFVFMGFYFFLELKIYQ <sup>■</sup> WLSGGKRRRLCKVANPSSHL <sup>■</sup> SVVGNFVGA
Hv1008	297	RAFAEAPR--LHPAVWCA <sup>■</sup> FVAE <sup>■</sup> FALELKIYQ <sup>■</sup> WLSGGKRRRLCKVANPSSHL <sup>■</sup> SVVGNFVGA
AtSLAC1	343	ILASKV <sup>■</sup> GWDEVAKFLWAVGFAHYLVV <sup>■</sup> FTLYQ <sup>■</sup> RLP <sup>■</sup> TSEALPKELHPVYS <sup>■</sup> MFIAAPSAASI
Hv1008	355	ILAA <sup>■</sup> RVGWEEAGKFLWAI <sup>■</sup> GVSHYIVV <sup>■</sup> FTLYQ <sup>■</sup> RLP <sup>■</sup> INEALPMELHPVYS <sup>■</sup> MFIAATPSAAGL
AtSLAC1	403	AWNTIY <sup>■</sup> GF <sup>■</sup> DFGCSRT <sup>■</sup> CF <sup>■</sup> FIALFLYISLVARINFF <sup>■</sup> TGFKFSVAWWSY <sup>■</sup> TE <sup>■</sup> PMTTASVATIKY
Hv1008	415	AWAAIY <sup>■</sup> GSFLAVART <sup>■</sup> FF <sup>■</sup> MAFLYMSLV <sup>■</sup> VRINFF <sup>■</sup> RGFRFSIAWWSY <sup>■</sup> TE <sup>■</sup> PMTTASLATVKY
AtSLAC1	463	AEAV <sup>■</sup> EGYPSRALAL <sup>■</sup> TL <sup>■</sup> SFISTAMVCVLFVSTLLHAFVWQ <sup>■</sup> TLFPNDLAIAT <sup>■</sup> TKRKL <sup>■</sup> TRE--
Hv1008	475	AEAV <sup>■</sup> ECFTSRALALSLSLMST <sup>■</sup> TMVSL <sup>■</sup> LLVSTLLHAFYWRSLFPNDLAIAT <sup>■</sup> TKDRQGGAGR
AtSLAC1	521	-----KKPFKRAYDLKRWTKQALAKKISAEKDFEAEESHH
Hv1008	535	PHGKGRKAGKRVNDIKRWAKQVPLSVVSSITKTNSADKEEEKTD

**Abbildung 3.16: Vergleich der Proteine Hv1008-NIAS und AtSLAC1.** Für die Identifizierung von regulatorisch wichtigen Aminosäuren wurde das berichtete Protein von Hv1008-NIAS erneut mit AtSLAC1 verglichen. Dabei konnten vier der bekannten Phosphorylierungsstellen im N-Terminus von AtSLAC1 auch in Hv1008-NIAS identifiziert werden (grüne Kästen). Auch eine weitere Aminosäure, Threonin-525, die bei einer Mutation zu einer unterschiedlich aktivierbaren Variation von AtSLAC1 führt, konnte gefunden werden (blauer Kasten). Ein Phenylalanin, das für den Verschluss der Pore verantwortlich ist, konnte ebenfalls gefunden werden (roter Kasten). Die vorausgesagte Lage der zehn Transmembranhelices ist durch fett gedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

### 3.2.2 Expression der AtSLAC1 Homologen in Gerstenblättern

Nachdem in der *in silico*-Analysen vier homologe Gene zu den S-Typ Anionenkanälen aus *A. thaliana* gefunden wurden, sollte mit Hilfe der semiquantitativen Real-Time-PCR untersucht werden, welche dieser vier homologen Gene in den Schließzellen von Gerste vorrangig exprimiert werden. Es wurden in diesen Experimenten die Expression in ganzen Blättern und speziell in Schließzellen untersucht (s. Abschnitt 2.6.1.2). Dabei zeigte sich, dass das homologe Gen *Hv1008* etwa 7mal höher in Schließzellen exprimiert wird als die anderen drei Gene *Hv1132*, *Hv2067* und *Hv3105* (Abb. 3.17). Von diesen drei Homologen wird *Hv2067* vermehrt im Gesamtblatt exprimiert, während die anderen beiden im Blatt kaum exprimiert werden.



**Abbildung 3.17: Auswertung der Real-Time-Experimente zur Expression von Homologen der S-Typ Anionenkanäle in Gerste.** Es wurden sieben Proben von ganzen Blättern mit allen enthaltenen Zelltypen und sieben Proben mit angereicherten Schließzellen vermessen. Dabei zeigte sich, dass das Gen *Hv1008* besonders häufig in Schließzellen vorkommt (grauer Balken, ganz links), während *Hv2067* in den Mesophyllzellen exprimiert wird (schwarzer Balken, zweiter von rechts). Die Gene *Hv1132* und *Hv3105* zeigten nur eine geringe Exprimierung in den untersuchten Blattgeweben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

### 3.2.3 Charakterisierung der Interaktionspartner des putativen Anionenkanals *HvSLAC1*

Der cDNA-Klon *Hv1008* scheint nach den bisherigen Analysen das Gen zu enthalten, welches für den SLAC1-Kanal in Gerste codiert. Um diese Hypothese weiter zu untermauern und um nachzuweisen, dass der Kanal auch als funktionales Protein vorliegt, sollte dieser heterolog in Oozyten von *X. laevis* exprimiert und mittels der DEVC-Methode getestet werden (vergl. Kap. 2.4.2).

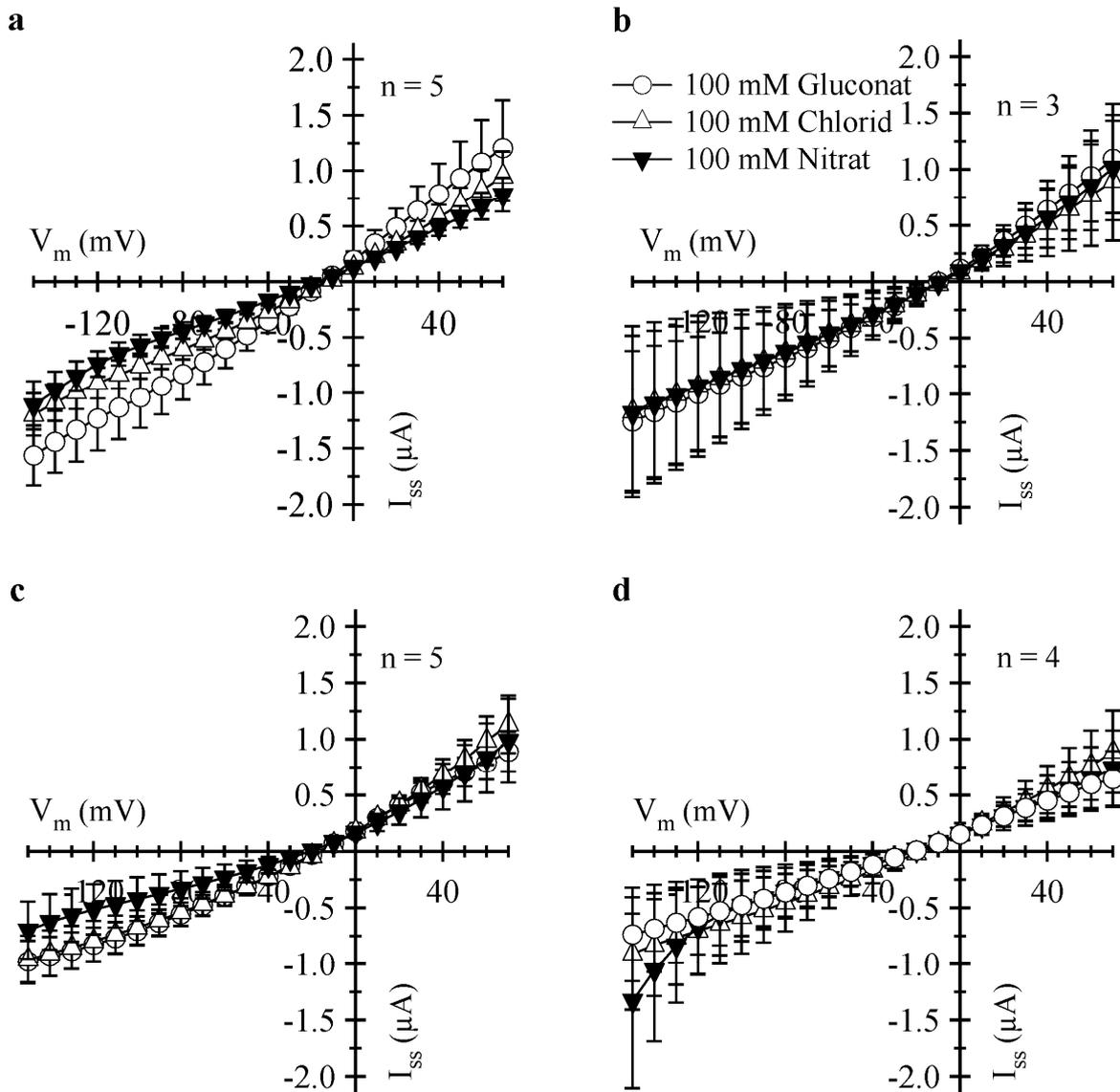
Aufgrund der hohen Homologie zwischen *AtSLAC1* und *Hv1008* wurde als Arbeitshypothese angenommen, dass die Regulierung des Kanals aus Gerste ähnlich zu der in Arabidopsis ist. Daher wurde die Aktivierung des Gerstenkanals mit Kinasen in Oozyten untersucht, von denen bereits die Interaktion mit *AtSLAC1* bekannt war. Es wurden verschiedene Lösungen getestet, die entweder Gluconat, Chlorid oder Nitrat in einer Konzentration von 100 mM enthielten (sh. Kap. 2.4.2). Für Chlorid und Nitrat ist bekannt, dass SLAC1 aus *A. thaliana* für sie permeabel ist. Dabei zeigt der Kanal eine höhere

Permeabilität für Nitrationen als für Chloridionen (Geiger et al. 2009). Es wurde erwartet, dass der Kanal aus Gerste sich in Bezug auf die Permeabilität ähnlich wie *AtSLAC1* verhält.

Im Experiment wurde die Membran der Oozyten bei 0 mV geklemmt und Testpulse zu verschiedenen Spannungen zwischen +40 und -160 mV durchgeführt, die jeweils 50 ms dauerten. Direkt vor der Rückkehr zur Klemmspannung wurden über einen Zeitraum von 4 ms die Gleichgewichtsströme ermittelt. Für jedes Experiment wurden der Mittelwert und der Standardfehler bestimmt. Die Mittelwerte wurden anschließend gegenüber der Testspannung aufgetragen, so dass eine Strom-Spannungskurve entstand (Abb. 3.18). Wird der Kanal allein in Oozyten exprimiert, so konnten im Vergleich zu der 100 mM Gluconatlösung (○) weder bei der Lösung mit 100 mM Chlorid (△), noch bei der Lösung mit 100 mM Nitrat (▼) erhöhte Ströme gemessen werden (Abb. 3.18a). Dies gilt ebenso für Messungen mit Oozyten, die den Kanal *Hv1008* zusammen mit den Kinasen *AtOST1* (Abb. 3.18b), *PpOST1.1* (Abb. 3.18c) oder *AtCPK23* (Abb. 3.18d) enthalten. Beim Vergleich der Stromamplituden in Gegenwart und Abwesenheit der Kinasen kann kein Unterschied festgestellt werden. Die Höhe der Ströme lag bei allen Teilexperimenten zwischen -1,5  $\mu\text{A}$  und +1,25  $\mu\text{A}$ . Keine der Kinasen scheint den Kanal zu aktivieren.

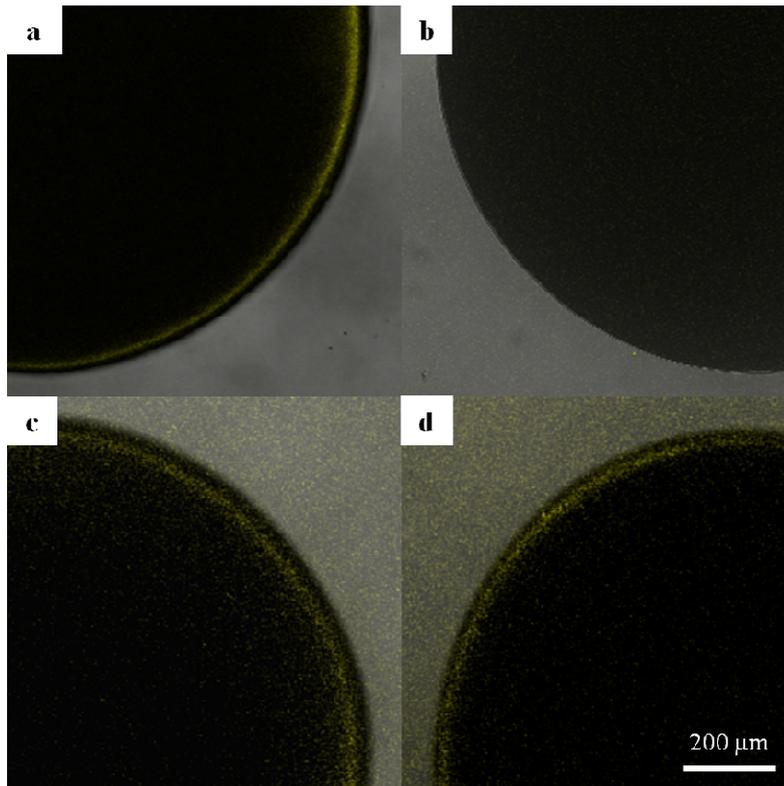
In früheren Experimenten konnte für *AtSLAC1* eine Verschiebung des Umkehrpotentials festgestellt werden, wenn anstelle von Gluconat- Nitrationen in der umgebenden Lösung vorliegen (Geiger et al. 2009). Für *Hv1008* konnte in keinem der durchgeführten Experimente eine solche Verschiebung festgestellt werden. Das Umkehrpotential lag bei allen getesteten Ionen und Kinasen bei einem Wert um -15 mV.

Zusätzlich wurden Interaktionsstudien mit den Kinasen durchgeführt, die Auskunft über mögliche Interaktionspartner des Kanals geben sollten. Es ist aus früheren Versuchen bekannt, dass der Kanal *AtSLAC1* mit *AtOST1* und verschiedenen Proteinkinasen der CPK-Familie interagiert (Geiger et al. 2010, Lee et al. 2009). Zudem konnte bei allen untersuchten Mitgliedern der SLAC-Familie aus *Arabidopsis* eine Interaktion mit der OST1.1-Proteinkinase aus *Physcomitrella patens* nachgewiesen werden (E. Lopez-Sanjurjo; pers. Mitteilung). Für erste Untersuchungen wurde die Proteinkinasen *AtCPK23*, *AtOST1* und *PpOST1.1* ausgewählt. Mit Hilfe des BiFC-Systems wurde zunächst die Interaktion überprüft (vergl. Kap. 2.4.2). Dazu wurden der Kanal und die Kinasen mit einer Hälfte des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) fusioniert. Im Gegensatz zur Fusion des Kanals mit einem Vollängen-YFP (Abb. 3.19a), kann bei der Fusion mit nur einer Hälfte des Proteins keine Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3.19b).



**Abbildung 3.18: Strom-Spannungs-Kurve von *Hv1008* unter Kontrolle verschiedener Kinasen.** Aus der Literatur war die Permeabilität des SLAC1-Kanals aus *A. thaliana* für Nitrat- und Chloridionen bekannt (Geiger et al. 2009). Da ebenfalls bekannt ist, dass *AtSLAC1* durch eine Kinase Phosphoryliert werden muss, um Ionen leiten zu können, wurden Experimente mit verschiedenen Kinasen durchgeführt. Dabei wurden die Oozyten mit verschiedenen Lösungen umspült, die entweder 100 mM Gluconat (○), Chlorid (△) oder Nitrat (▼) enthielten. (a) Wurde der Kanal *Hv1008* ohne Kinase gemessen, so erkennt man keinen Unterschied in der Amplitude der Ströme bei der Präsentation von verschiedenen Ionen. (b) Die Anwesenheit der Kinase *AtOST1* verändert sich die Amplitude der Ströme in Gegenwart verschiedener Ionen nicht. (c) Auch bei Anwesenheit der Kinase *OST1.1* aus *Physcomitrella patens* konnte keine Ionenpräferenz des Kanals festgestellt werden. (d) Dies war ebenfalls in Gegenwart der Kinase *AtCPK23* festzustellen. Alle gezeigten Fehler sind Standardfehler.

Die Fluoreszenzkomplementation des YFP wurde durch die Interaktion mit der Kinase *AtCPK23* erreicht (Abb. 3.19c). Dies gilt auch für die Interaktion mit der Kinase *PpOST1.1* (Abb. 3.19d). Ein ähnliches Bild ergab sich zudem für die Interaktion zwischen *Hv1008* und *AtOST1* (hier nicht dargestellt).



**Abbildung 3.19: Interaktionsstudien von *HvSLAC1* mit verschiedenen Kinasen.** Für die Durchführung wurden der Kanal und verschiedene Kinasen mit je einer Hälfte des YFP fusioniert, so dass bei einer Interaktion die Fluoreszenz komplementiert wurde. (a) Als Positivkontrolle wurde *HvSLAC1* mit einem Voll-längen-YFP fusioniert und in Oozyten exprimiert. (b) Für die Negativkontrolle wurde *HvSLAC1* mit einer Hälfte des YFP fusioniert und zusammen mit Wasser in die Oozyten injiziert. (c) Es konnte eine schwache Interaktion zwischen *HvSLAC1* und *AtCPK23* festgestellt werden. (d) Des weiteren interagiert *HvSLAC1* mit *PpOST1.1*.

## 4. Diskussion

Pflanzen sind ständig pathogenen Mikroorganismen und Herbivoren ausgesetzt. Als Schutz gegen die Mikroorganismen haben sie ein Immunsystem entwickelt, das auf zwei Ebenen diese Pathogene abwehrt. Die Mustererkennung ermöglicht die Erkennung einer Klasse von Pathogenen und führt bei Erfolg nicht zu einem Eindringen des Pathogens in die Pflanze. Die zweite Ebene der Immunantwort ist spezifischer und führt nach der Erkennung einer Rasse eines Pathogens zu einem programmierten Zelltod von infizierten oder dem Pathogen benachbarten Zellen.

Ebenso wie in der Rhizosphäre sind die Pflanzen in der Phyllosphäre den verschiedensten Pathogenen ausgesetzt. Verschiedene Pilze bilden in den Epidermiszellen der Blätter Haustorien aus, über die die Ernährung der Kolonie gewährleistet wird (Bushnell et al. 1987). Der Apoplast der Blätter bildet zudem ein geeignetes Medium für die Vermehrung von Bakterien und einigen Pilzen. Um in den Apoplasten zu gelangen nutzen die Bakterien daher natürliche Öffnungen in der Blattoberfläche, etwa die Stomata (Melotto et al. 2006). Für die Pflanze ist es daher von großer Bedeutung die Immunantwort nicht nur auf die Epidermis- und Mesophyllzellen zu beschränken. Auch die Öffnung der Stomata in Anwesenheit von Pathogenen muss reguliert werden. Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von Bakterien die Stomata geschlossen werden, um das Eindringen derselben in das Blattinnere zu verhindern (Melotto et al. 2006). Für den Stomaschluss sind die Anionenkanäle der Schließzellen wichtig (Roelfsema und Hedrich; 2005). Besonders gut ist dabei der S-Typ Anionenkanal *AtSLAC1* untersucht, der in *Arabidopsis thaliana* durch verschiedene Signalwege der Stressantworten reguliert wird (Vahisalu et al. 2008, Geiger et al. 2009; 2010, Stange et al. 2010).

Obwohl der Mehltau nicht die Spaltöffnungen der Pflanze nutzt, um in den Apoplasten einzudringen, konnte in seiner Anwesenheit eine verringerte Öffnung der Stomata gemessen werden (Prats et al. 2006). Auf welcher Ebene der Immunantwort der Stomaschluss bei dieser Interaktion zwischen den beteiligten Spezies einzuordnen ist, war Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit.

### 4.1 Die Reaktionen der Schließzellen auf *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Über die Interaktion zwischen dem Mehltaupilz *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) und seiner Wirtspflanze *Hordeum vulgare* ist bereits viel bekannt. Der Großteil der bisherigen Forschung bezog sich allerdings auf die Reaktion der direkt attackierten Epidermiszellen der Gerste. Die Schließzellen verhindern durch den Stomaschluss das Eindringen bakterieller

Pathogene in den pflanzlichen Apoplasten (Melotto et al. 2006). Wieso die Spaltöffnung allerdings auch in Gegenwart von *Bgh* eine verringerte Öffnung zeigen (Prats et al. 2006), wurde bislang noch nicht untersucht.

Die Spaltöffnungen der Gerste öffnen im Licht innerhalb einer halben Stunde (Abbildung 3.1a). Dieses Verhalten lässt sich in dunkeladaptierten Pflanzen zu allen Zeitpunkten des Experimentes zeigen. Werden die Blätter der untersuchten Pflanze mit Konidien des Mehltaus inokuliert, so erkennt man zunächst keinen Unterschied im Öffnungsverhalten der Stomata (Abbildung 3.5a, 0h - 6h). Neun Stunden nach Beginn des Experimentes zeigt sich allerdings, dass die Weite des stomatären Spaltes nach einer halbstündigen Belichtung geringer ist, als in der nicht infizierten Pflanze (Abb. 3.1). Obwohl die Bewegung der Spaltöffnung zunächst identisch zu der in den Kontrollpflanzen abläuft, verlangsamt diese sich nach 12 Minuten und nach 20 Minuten verringert sich die Spaltöffnungsweite wieder. Wird die Öffnungsweite nach 12 Stunden erneut kontrolliert, so zeigt sich nun, dass kaum noch eine Bewegung der Spaltöffnung stattfindet. Diese verringerte Öffnungsweite hält bis zum Ende des Experimentes nach 24 Stunden an. Der Zeitpunkt der Inhibierung der Spaltöffnung kann dabei der Ausbildung der Penetrationshyphe zugeordnet werden. Die Ausbildung beginnt etwa neun Stunden nach der Inokulation der Pilzsporen (Both et al. 2005). Der Pilz dringt nicht wie etwa *Magnaporthe grisea* durch die Erzeugung eines hohen Druckes durch die Kutikula und die Zellwand der Pflanze (Dean et al. 2005), sondern sekretiert hydrolytische Enzyme, wie etwa Cutinasen und Cellulasen, die das Vordringen der Penetrationshyphe erleichtern (Nicholson et al. 1988, Pryce-Jones et al. 1999). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu klären, ob *M. grisea* dieselben Bestandteile der pflanzlichen Immunantwort aktiviert wie *Bgh*.

Durch den Abbau der pflanzlichen Kutikula und der Zellwand entstehen sogenannte verwundungs-assoziierte Moleküle, wie etwa Oligogalacturonsäure (OGA), die durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu einer Immunantwort führen (Aziz et al. 2004). Gleichzeitig werden durch pflanzliche Enzyme weitere pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erzeugt, die durch membranständige Rezeptorproteine erkannt werden. Die durch OGA oder PAMPs eingeleitete Immunantwort der Pflanze ist gegen ein breites Spektrum von Pathogenen angelegt und versucht die Penetration der pflanzlichen Zellwand durch den Aufbau von sogenannten Papillen oder durch die Abgabe von Phytoalexinen zu verhindern (Hippe-Sanwald et al. 1992, Mysore und Ryu 2004). Die PAMPs oder andere molekulare Signale können wahrscheinlich auch den Stomaschluss in der Interaktion zwischen Gerste und Mehltau auslösen. Ebenso käme allerdings auch ein anderes

apoplastisches Signal in Frage, etwa der pH-Wert, der sich im Laufe der Interaktion hin zu alkalischeren Werten verschiebt (Felle et al. 2004).

Die Inhibierung der Spaltöffnung durch *Bgh* ist auf einen kleinen Bereich um die Infektionsstelle herum limitiert (Vergl. Abb. 3.1b und c), was auf eine Verbreitung des Signals durch Diffusion und somit auf die Verbreitung des Signals durch PAMPs hindeutet. Durch die Verteilung im Apoplasten sinkt die Konzentration des Signalmoleküles, so dass möglicherweise in einer Entfernung von mehr als 200  $\mu\text{m}$  ein Schwellenwert unterschritten und somit keine Reaktion der Schließzellen ausgelöst wird. Frühere Experimente mit Mesophyllzellen ergaben etwa, dass für jeden PAMP ein spezifischer Schwellenwert ermittelt werden kann, ab dem die Aktivierung der Immunantwort erfolgte (Jeworutzki et al. 2010).

Ebenso wie in vorherigen Arbeiten konnte nur das Eindringen von Appressorien in die Epidermiszellen, aber nicht in Schließ- oder Nebenzellen der Stomata beobachtet werden. In Nebenzellen können Haustorien nur unter speziellen Bedingungen gefunden werden (Jørgensen und Mortensen; 1977). Möglicherweise spielt bei den Schließzellen die besondere Struktur der Zellwand eine Rolle. Die Zellwand der Schließzellen ist besonders dick und besitzt eine spezielle Anordnung der Lamellen, damit eine Verformung beim Öffnen und Schließen der Spaltöffnungen möglich ist (Roelfsema und Hedrich; 2009). Zudem weisen die Schließzellen nur eine geringe Größe auf und sind nicht durch Plasmodesmata mit den benachbarten Zellen verbunden (Roelfsema und Hedrich; 2005), so dass bei der Etablierung eines Haustoriums nicht genug Nährstoffe in der Zelle zur Verfügung stehen um eine pilzliche Kolonie zu ernähren. Nebenzellen sind zwar größer, machen aber ebenso wie Schließzellen nur einen geringen Anteil der Blattoberfläche aus (Shirasu et al. 1999). Daher werden sie in Wildtyp-Pflanzen wahrscheinlich ebenso selten von Appressorien attackiert.

#### **4.2 Der Effekt von Elicitoren auf die Spaltöffnungen der Gerste**

Erste Effekte des Mehltaus auf die Schließzellen in Gerste waren bereits vor dem Beginn des Projektes bekannt. Es stellte sich allerdings weiter die Frage, welche Art von Signal den Stomaschluss in diesem Pathosystem auslöst. Daher wurde in den nächsten Experimenten Chitosan, ein Bestandteil der pilzlichen Zellwand, verwendet, um die Möglichkeit zu untersuchen, dass PAMPs zu diesem Bestandteil der Immunantwort führen und dieser somit zur sogenannten PAMP-ausgelösten Immunität (PTI) gehört. Dabei zeigte sich, dass Chitosan tatsächlich in der Lage ist, den Stomaschluss auszulösen (vergleiche dazu Abbildung 3.2).

Diese Antwort wurde mit der Reaktion der Spaltöffnung auf das Trockenstresshormon ABA verglichen. Diese gleicht derjenigen in *V. faba* und Tabak (vergl. Abb. 3.3, Levchenko et al. 2005, Roelfsema et al. 2004, Stange 2010). Wird ABA in den Apoplasten von Gerste injiziert, so beginnt sich die Spaltöffnung nach einer Minute zu schließen. Dieser Vorgang ist bereits nach fünf Minuten abgeschlossen. Diese Verzögerung in der Reaktion der Stomata auf den Elicitor Chitosan ist wohl auf eine indirekte Wirkung auf die Anionenkanäle zurückzuführen. ABA wird in den Schließzellen durch einen Rezeptorkomplex aus PYR/PYL/RCAR und der Phosphatase erkannt (Ma et al. 2009, Park et al. 2009) wodurch die Kinase OST1 nicht länger inaktiviert vorliegt und die Anionenkanäle phosphoryliert werden (Scherzer et al. 2012). Elicitoren wie Chitosan werden nicht durch PR-Rezeptoren (PRR) im Cytosol erkannt, sondern an der Plasmamembran. Die Kinasedomäne dieser PRRs wird zunächst phosphoryliert und startet anschließend eine Signalkaskade (vergl. Kap. 1.2.1). Es ist wahrscheinlich, dass die Kinase OST1 erst durch einen Teil der späten Signalkaskade aktiviert wird und nicht direkt durch die Kinasedomäne der PRRs. Dies wird durch die Annahme gestärkt, dass der ABA-Signalweg als zentraler Knotenpunkt der verschiedenen Signalwege von Phytohormonen fungiert (Übersicht in Acharya und Assmann; 2009). So wirken etwa die Phytohormone Ethylen und JA-Ile, die aktive Form von Jasmonat, direkt auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) ein, die sich an die Erkennung von ABA in den Schließzellen anschließt (Pei et al. 2000, Zhang et al. 2001). Auch das Phytohormon Salicylsäure (engl. salicylic acid, SA), das die Immunantwort der Pflanzen auf biotrophe Pathogene auslöst, trägt wohl direkt, durch die Produktion von ROS und indirekt, durch die Aktivierung des ABA-Signalweges zum Stomaschluss innerhalb der Immunantwort bei (Melotto et al. 2008).

Da die verschiedenen Phytohormone im Stomaschluss alle eine ähnliche Rolle einnehmen, stellt sich die Frage, ob die ausgelösten Signalwege in Schließzellen und den anderen Zelltypen des Blattes gleich verlaufen. In der hier vorliegenden Arbeit, aber auch in vorherigen, wurde etwa keine hypersensitive Antwort (HR) der Schließzellen beobachtet, die in Epidermiszellen als Reaktion auf Pathogene ausgelöst wird und zum Zelltod führt (Nimchuk et al. 2003). An dieser Antwort ist unter anderem das Phytohormon SA beteiligt, dass in Schließzellen zum Stomaschluss führt (Melotto et al. 2008). Ebenso ist bekannt, dass die Phytohormone Ethylen und JA-Ile, die größtenteils als Antagonisten des SA-Signalweges in Epidermis- und Mesophyllzellen fungieren, in Schließzellen ebenfalls zum Stomaschluss beitragen können (Übersichten in Acharya und Assmann; 2009; Bari und Jones; 2009). Es liegen also Zelltyp-spezifische Signalwege in den Blättern von Pflanzen vor.

### 4.3 Die Reaktion der Nebenzellen der Gerste auf den Mehltau

Auch in den Transportprozessen der Nebenzellen konnten Änderungen während einer Infektion gefunden werden. Nach der Etablierung eines Haustoriums in einer benachbarten Epidermiszelle zeigt das Membranpotential der Nebenzellen eine Verschiebung hin zu negativeren Potentialen, im Licht etwa von -83 mV auf -107 mV. Die Kinetik der Potentialänderungen bleibt hingegen unverändert (vergl. Abbildung 3.4). Sie ähnelt dabei stark derjenigen, die in Nebenzellen aus Mais gemessen wurde (Mumm et al. 2011). Ebenso wie in den Schließzellen, unterliegt die Aufnahme und Abgabe von Ionen einer engen Regulation, da beide Zelltypen kooperieren um die Öffnung der Stomata zu gewährleisten. Dabei dienen die Nebenzellen wohl als Reservoir der für die Stomabewegung benötigten Ionen (Raschke und Fellows; 1971).

Es ist bekannt, dass sich der pH-Wert im Apoplasten im Laufe der Interaktion zwischen Mehltau und Gerste alkalisiert (Felle et al. 2004). Ebenso bekannt ist die Veränderung der Regulation der  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter in Schließzellen von *Solanum tuberosum* bei einer Verschiebung des pH-Wertes im Apoplasten (Hoth et al. 1997). Es erscheint daher denkbar, dass sich die Änderung des Membranpotentials der Nebenzellen ebenfalls auf diese Verschiebung im pH-Wert zurückführen lässt.

### 4.4 Die Lichtantwort des Membranpotentials von Schließzellen der Gerste

Auf genetischer und cytologischer Ebene ist das Pathosystem der Gerste und ihres Mehltaus gut etabliert. Viele Untersuchungen zu den verschiedenen bekannten Resistenzgenen werden dabei parallel in Gerste und *Arabidopsis thaliana* bearbeitet (Übersicht in Hückelhoven und Panstruga 2011). Arbeiten zur Elektrophysiologie in Gräsern sind hingegen kaum zu finden (Wolf et al. 2006, Mumm et al. 2011).

Zunächst wurde die Lichtantwort des Membranpotentials der Schließzellen getestet. Dabei zeigte sich, dass in Gerste, ebenso wie in den Schließzellen von *V. faba*, Tabak und, wie kürzlich festgestellt, Mais ein Wechsel von einem de- hin zu einem hyperpolarisierten Membranpotential vollzogen wird, wenn die Zellen mit weißem Licht bestrahlt werden (s. Abb. 3.5, Roelfsema et al. 2001, Marten et al. 2008, Mumm et al. 2011). Durch die Hyperpolarisierung der Membran werden die  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter aktiviert, was durch den Einstrom von  $K^+$  zu einer Erhöhung des Turgors in den Schließzellen und zur Öffnung des Stomas führt. Ebenso kann beim Übergang in Dunkelheit die Depolarisation der Plasmamembran beobachtet werden, die dem Schließen der Spaltöffnung vorausgeht. Wie bereits

bei anderen Pflanzen beobachtet, geschehen diese Änderungen im Membranpotential nicht sofort, sondern beginnen erst zwei Minuten nach dem Transit von einer Lichtquantität in die andere. Licht wirkt nicht direkt auf die Ionenkanäle und Pumpen der Zelle, sondern wird durch eine verringerte CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blatt und durch Rezeptoren, die Phototropine, erkannt (Kinoshita et al. 2001, Roelfsema et al. 2002). Die genannten Rezeptoren erkennen Blaulicht und stehen am Beginn eines Signalweges, der über Phosphorylierungen schließlich zur Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase, der Deaktivierung der Anionenkanäle und schließlich zur Veränderung des Membranpotentials führt (Übersicht in Shimazaki et al. 2007). Der genaue Signalweg, der zur Deaktivierung der Anionenkanäle führt, ist allerdings bisher noch nicht aufgeklärt.

Schließzellen, die sich in räumlicher Nähe zu Infektionsstellen befinden, sind grundsätzlich noch in der Lage, die typische Lichtantwort mit schneller De- und Hyperpolarisation zu zeigen. Allerdings ist der Anteil der Zellen, die diese Übergänge zeigen, in Mehltau-infizierten Blättern stark verringert, was auf eine Änderung der Ionenkanalaktivität durch die Anwesenheit des Pathogens hindeutet.

#### **4.5 Die Infektion mit Mehltau verändert die Aktivität der Ionenkanäle in den Schließzellen der Gerste**

Beim Vergleich der Ströme in Schließzellen von gesunden und infizierten Pflanzen konnten verschiedene Unterschiede ausgemacht werden. In Schließzellen aus gesunden Blättern konnten die prominenten Ströme der K<sup>+</sup>-Gleichrichter aufgezeichnet werden. In Schließzellen aus infizierten Blättern waren die durch K<sup>+</sup>-Kanäle erzeugten Auswärtsströme um den Faktor zwei geringer (Abb. 3.7). Dieser Effekt konnte nicht durch eine Erhöhung der externen K<sup>+</sup>-Konzentration behoben werden, was darauf schließen lässt, dass ein anderer Faktor für diese Änderung der Leitfähigkeit des Kanals verantwortlich ist. So ist es etwa möglich, dass eine Veränderung des apoplastischen pH-Wertes während des Infektionsprozesses auch Auswirkungen auf die Aktivität der K<sup>+</sup>-Kanäle der Plasmamembran hat. Diese pH-Abhängigkeit ist sowohl für den K<sup>+</sup>-Einwärts-, als auch für den -auswärtsgleichrichter bekannt (Hedrich et al. 1995, Roelfsema und Prins, 1998).

Bei der Aufzeichnung der Gleichgewichtsströme in den Schließzellen aus uninfizierten Blättern zeigen sich Unterschiede zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen an dicotylen Pflanzen. Während etwa in *V. faba* und Tabak die K<sup>+</sup>-Einwärtsgleichrichter nur eine geringe instantane Komponente aufweisen, zeigen die Ströme der Gerstenzellen bereits hohe Ströme

direkt nach dem Sprung von der Halte- hin zur Testspannung (Abbildung 3.6, Marten et al. 2007b, Roelfsema et al. 2001). Dies könnte auf veränderte Eigenschaften der  $K^+$ -Kanäle in Gräsern zurückzuführen sein, da auch Messungen an Mais diese hohen instantanen Ströme zeigten (Mumm et al. 2011).

Der bemerkenswerteste Unterschied zwischen Gerstenschließzellen in Kontroll- und infizierten Blättern findet sich indes in der Verschiebung des Umkehrpotentials der Plasmamembran von -110 mV in gesunden Blättern hin zu -60 mV in den Schließzellen aus infizierten Blättern (Abb. 3.8), sowie der Beobachtung, dass die Schließzellen aus infizierten Blättern nicht so häufig im Licht hyperpolarisieren, wie in gesunden Blättern (Abb. 3.5). Dies zusammen weist auf eine Beeinträchtigung der  $H^+$ -ATPase hin, die für die Erniedrigung des Membranpotentials verantwortlich ist (Shimazaki et al. 2007). Aber auch eine erhöhte Aktivität der Anionenkanäle in den Schließzellen kann die fehlende Hyperpolarisation erklären (Roelfsema und Hedrich 2005). In dieser Arbeit stand daher die Analyse der Aktivität der Anionenkanäle während der Infektion im Mittelpunkt.

Die Anionenkanäle der Schließzellen werden durch die unterschiedlichsten Signalwege reguliert um eine genaue Anpassung des Gasaustausches mit der Umgebung zu erzielen. Am besten verstanden ist hierbei der ABA-Signalweg, der den Stomaschluss als Antwort auf Trockenstress auslöst. Hinzu kommen unter anderem noch der Signalweg, der den Stomaschluss im Dunkeln auslöst und der Signalweg, der in die Immunantwort der Pflanze eingebettet ist. Für die Immunantwort der Pflanze konnte bereits gezeigt werden, dass der Salicylsäure-abhängige Signalweg durch die Erkennung eines biotrophen Pathogens angeschaltet wird (Glazebrook; 2005). Dabei wechselwirkt diese Signalkaskade vermutlich mit dem ABA-Signalweg (Zeng und He; 2010), wodurch letztendlich auch der Stomaschluss eingeleitet wird. Die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet wurden an dem Pathosystem *Pseudomonas syringae* und *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. In diesen Experimenten wurden allerdings meist die Ströme von Mesophyllzellen gemessen, so dass eine genaue Zuordnung der Ströme nicht erfolgen konnte.

Auch in den Membranströmen der mit Chitosan behandelten Zellen zeigten sich Stromspitzen, die im Mittel Werte von -163 pA erreichten (Abb. 3.10). Während dieser Spitzen konnte mittels der DEVC eine erhöhte Aktivität der Anionenkanäle gemessen werden. Diese erhöhte Aktivität zeigte sich zudem auch in Schließzellen, die in infizierten Blättern lagen und in Rotlicht gehalten wurden. Wurde zusätzlich zum Rotlicht auch Blaulicht auf die Schließzellen appliziert, so zeigte sich hingegen kein Unterschied in den Strömen der

Zellen aus infizierten und Kontrollblättern. Die Blaulichtantwort der Schließzellen bleibt anscheinend der Immunantwort übergeordnet. Die Aufklärung dieses Zusammenhangs und der zugrunde liegenden Regulation sollte Gegenstand einer weiterführenden Arbeit sein.

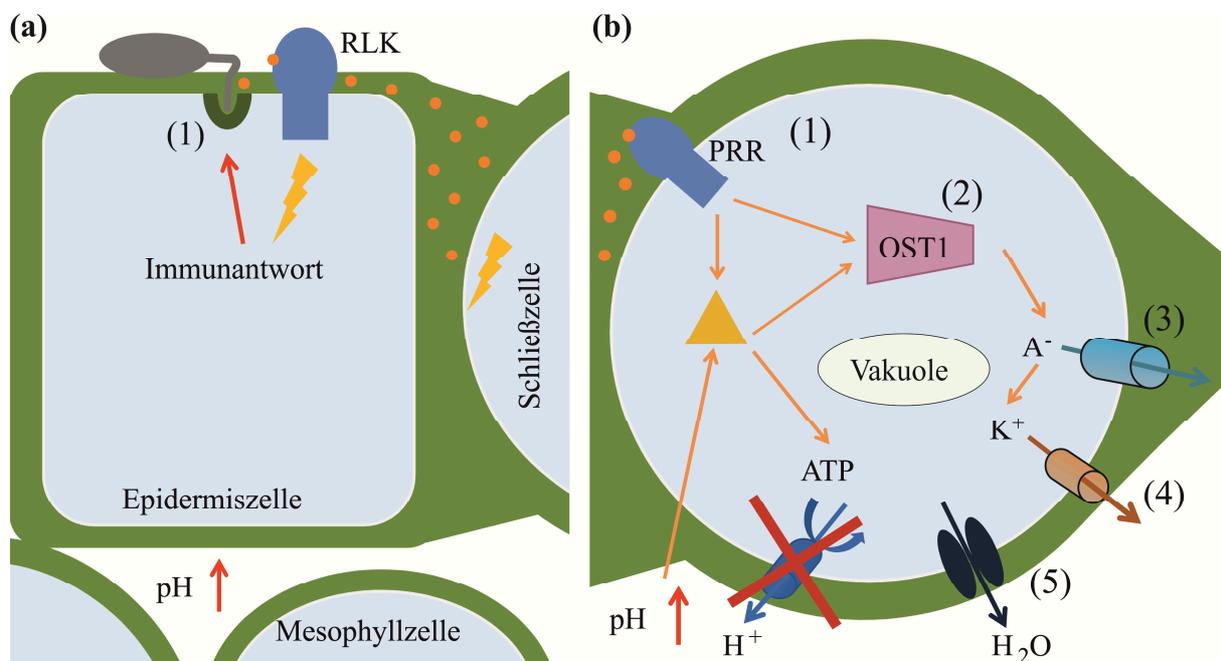
Die Anionenkanäle der Schließzellen können auch durch die gezielte Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden (Stange et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass Calciumsignale in den verschiedensten Stressantworten der Pflanzenzelle eingebunden sind (Roelfsema und Hedrich; 2010, Tena et al. 2011). Dabei wird wohl durch die Amplitude und die Frequenz der Calciumsignale zwischen den möglichen Antworten unterschieden (Roelfsema und Hedrich; 2010). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch bei der Auslösung des PTI-assoziierten Stomaschlusses ein Calciumsignal beteiligt ist, das in weiteren Experimenten identifiziert werden kann.

Da auch in dem hier bearbeiteten Pathosystem Gerste/Mehltau die veränderte Regulation der Anionenkanäle festgestellt werden konnte (Abb. 3.8 und 3.10), kann man davon ausgehen, dass der Stomaschluss ein evolutionär sehr alter Bestandteil der pflanzlichen Immunantwort ist und zur PTI der Gerste zählt. Dies kann erklären, warum die Pflanze mit dem Schluss der Spaltöffnungen auf *Bgh* reagiert, obwohl der Pilz die Stomata nicht für die Vollendung der Infektion benötigt. Durch die Erkennung der Elicitoren wird lediglich die Anwesenheit eines pathogenen Mikroorganismus erkannt. Ob diese Organismen jedoch die Stomata der Pflanze nutzen, um ihre Infektionsstrategie voranzutreiben kann und muss die Pflanze zu diesem Zeitpunkt nicht feststellen. Die Nachteile, die der befallenen Pflanze durch den unspezifischen Stomaschluss entstehen, wie etwa Neuverteilung von Ressourcen, Verzögerung der Fruchtreife (siehe dazu Withers et al. 2011), sind dem Befall durch Pathogene vorzuziehen. Zudem kann als Folge des verringerten Gasaustausches und anhaltender Lichtabsorption in den Blättern zu einer erhöhten Bildung von ROS kommen (ebenda). Dies kann durch den photooxidativen Stress möglicherweise auch zu einer Initiierung von anderen Signalwegen führen, die ebenfalls Bestandteil der Immunantwort der Pflanze sind.

#### **Modell zum pathogen-assoziierten Stomaschluss**

Mit den bisher herausgestellten Ergebnissen dieser Arbeit und mit der Annahme, dass an der Einleitung des Stomaschlusses in der Interaktion zwischen Mehltau und Gerste auch Komponenten des ABA-Signalweges beteiligt sind (Zeng und He 2010), ergibt sich folgendes Modell: Durch das Eindringen der Penetrationshyphe in die Cuticula und die Zellwand einer

Epidermiszellen werden verwundungs- und pathogen-spezifische Moleküle freigesetzt (DAMPs/PAMPs). Diese diffundieren durch den Apoplasten des Blattes und lösen in den verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Immunantworten aus (Abbildung 4.1a). In den Schließzellen wird dabei eine Signalkaskade ausgelöst, die letztendlich zum Stomaschluss führt (Abbildung 4.1b). Ob diese Kaskade durch die Aktivität von PRRs oder durch andere Mechanismen gestartet wird, konnte bislang allerdings noch nicht zufriedenstellend geklärt werden. Es lässt sich aber vermuten, dass der Salicylsäure-Signalweg aktiviert wird, der in Epidermis- und Mesophyllzellen zur Resistenz gegen biotrophe Pathogene genutzt wird (Glazebrook; 2005). Dieser Signalweg wechselwirkt unter anderem mit der ABA-Signalkaskade (Melotto et al. 2006).



**Abbildung 4.1: Modell für die Auslösung des Stomaschlusses in Gerste bei einer Infektion mit Mehltau.** (a) Die Erkennung von DAMPs/PAMPs durch PRRs löst in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Immunantworten aus. In attackierten Epidermiszellen werden Papillen (1) gebildet, um das Vordringen der Penetrationshyphe zu verhindern. In Schließzellen wird der Stomaschluss ausgelöst. (b) Nach der Erkennung der Elicitoren durch die PRRs (1) der Schließzelle wird eine Signalkaskade aktiviert, die möglicherweise neben Elementen der SA-Signalkaskade auch Bestandteile des ABA-Signalweges enthält. Die Kinase OST1 (2) wird nicht mehr in ihrer Aktivität gehemmt und kann nun die S-Typ Anionenkanäle (3) in der Plasmamembran phosphorylieren. Parallel werden durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Cytoplasma Calcium-abhängige Kinasen (CPKs) (4) aktiviert, die ebenfalls die Anionenkanäle phosphorylieren können. Die nun aktiven Kanäle entlassen Anionen in den Apoplasten, wodurch das Membranpotential der Schließzelle depolarisiert wird. Die spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Auswärtsgerichte (5) öffnen und mit dem  $\text{K}^+$  fließt auch Wasser (6) aus dem Cytoplasma in den Apoplasten. Durch den Turgorverlust verformt sich die Schließzelle und die Spaltöffnung wird geschlossen.

Durch die ABA-Signalkaskade wird unter anderem die Protein-Phosphatase ABI1 von der Protein-Kinase OST1 gelöst, wodurch letztere aktiviert wird. Anschließend wird durch OST1 der S-Typ Anionenkanal SLAC1 phosphoryliert (Geiger et al. 2009). Dieser entlässt Anionen in den Apoplasten des Blattes und die Plasmamembran wird depolarisiert. Dadurch öffnen die auswärts-gerichteten  $K^+$ -Kanäle der Schließzelle und Wassermoleküle folgen den Ionen in den Apoplasten. Durch die so induzierte Absenkung des Turgors kommt es zum Stomaschluss. Möglicherweise werden gleichzeitig  $Ca^{2+}$ -Kanäle aktiviert, so dass über den Einfluss von Calciumionen in das Cytoplasma  $Ca^{2+}$ -abhängige Kinasen (CPKs) aktiviert werden (Boudsocq et al. 2010). Einige dieser CPKs aktivieren weiter die S-Typ Anionenkanäle, so dass es zu einem „Feedforward“-Mechanismus kommt. Bei diesem wird durch die Depolarisierung der Plasmamembran die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $Ca^{2+}$ -Kanäle gesteigert, so dass sich die cytoplasmatische Calciumkonzentration erhöht. Die CPKs bleiben dadurch aktiv und ermöglichen eine gesteigerte Aktivität der Anionenkanäle. Des Weiteren wird der Apoplast infizierter Blätter alkalisiert, was unter anderem eine Auswirkung auf die Aktivität der  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter der Schließzellen hat, der nun eine geringere Aktivität bei solchen Membranpotentialen zeigt, die unter Kontrollbedingungen zu großen Strömen führen.

#### 4.6 Die Identifizierung und Charakterisierung von *AtSLAC1*-Homologen in Gerste

In dieser Arbeit konnten vier homologe Gene zu *AtSlac1* in Gerste identifiziert werden. Von diesen wies *Hv1008* die größte Homologie zum Anionenkanal der Schließzellen auf, weswegen in der weiteren Arbeit die Struktur dieses Kanals ermittelt und mit der bereits bekannten Familie aus *A. thaliana* verglichen wurde (Kap. 4.6.1). Eine genauere Analyse des Gens *Hv1008* gab Rückschlüsse auf die Struktur des codierten Proteins (Kap. 4.6.2) und ermöglichte die Entwicklung von Experimenten zur Überprüfung seiner Funktion in Oozyten (Kap. 4.6.3).

##### 4.6.1 Die Genfamilie der S-Typ Anionenkanäle in Gerste

Mittels der Datenbankanalysen konnten in Gerste vier homologe Gene zu *Slac1* aus *A. thaliana* gefunden werden (Tab. 3.2). Auch in dem genetischen Modellorganismus *Brachypodium distachyon* fanden sich zunächst vier Homologe. Die Struktur der Genfamilie unterscheidet sich allerdings in den drei genannten Organismen. Während sich die Gene aus *B. distachyon* den einzelnen Genen in *A. thaliana* zuordnen lassen (Tab. 3.1), finden sich in

der Gerste nur Homologe Gene zu *Slac1* und *Slah3*. Zu dem Zeitpunkt der Analysen lag noch keine öffentlich zugängliche Datenbank für Gerste vor. Zudem wurde die Analyse auf die Identifizierung des Homologs zu *AtSlac1* ausgerichtet. Daher ist es möglich, dass die homologen Sequenzen zu *AtSlah1* und *AtSlah4* zwar in Gerste vorhanden sind, aber nicht identifiziert wurden. In *B. distachyon* etwa betragen die „e-values“ der BLAST-Analysen für diese beiden Homologen nur etwa  $e^{-64}$  und weisen damit eine entferntere Verwandtschaft zu *AtSlac1* auf als die restlichen Homologen, die Werte von  $e^{-150}$  und besser aufwiesen. Im Genom von Reis konnten sogar insgesamt neun Homologe zu *AtSlac1* gefunden werden, die sich ebenfalls auf die verschiedenen Zweige der Genfamilie verteilen lassen (Vahisalu et al. 2008). In den für diese Arbeit durchgeführten Analysen zeigen vier dieser homologen Gene putative Translationsprodukte, welche die Eigenschaften der SLAC/SLAH-Familie, wie etwa 10 Transmembrandomänen oder konservierte Phosphorylierungsstellen aufweisen (vergl. Abbildungen 3.12, 3.15). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Vahisalu et al. (2008), die bei Arabidopsis über die gesamte Länge des analysierten Bereiches eine hohe Homologie zeigen.

Es stellt sich die Frage, wieso in den drei untersuchten Gräsern *B. distachyon*, Gerste und Reis so unterschiedliche Strukturen der Genfamilie der Anionenkanäle zu finden sind. Möglicherweise sind in den landwirtschaftlich intensiv genutzten Reissorten mehrere Genduplikationen von statten gegangen, so dass nun mehrere redundante Kopien der Kanäle im Genom vorliegen. Warum dies nicht auch bei Gerste der Fall ist, ist möglicherweise auf die unvollständige Analyse des Genoms zurückzuführen, oder auf die unterschiedlichen Umweltbedingungen, unter denen Gerste und Reis landwirtschaftlich genutzt werden.

Den für diese Arbeit errechneten phylogenetischen Bäumen der Genfamilie aus *A. thaliana* unterscheiden sich von bereits veröffentlichte, indem die variablen N-Termini nicht berücksichtigt wurden. Dabei ergab sich in *A. thaliana*, dass die beiden SLAC1 Homologen *Slah1* und *Slah4* früh in der Entwicklung der Genfamilie entstanden sind, während *Slac1*, sowie *Slah3* und *Slah2* neuere Vertreter darstellen, die einen N-Terminus entwickelten, der für die Regulation des kodierten Kanals von großer Bedeutung ist. Frühere Analysen setzten hingegen die Homologen *Slah2* und *Slah3* an die Basis des Stammbaumes (vergleiche Abb. 1.6 und 3.12 und Vahisalu et al. 2008).

#### 4.6.2 Die Struktur und Expression des putativen *Hv1008*-Kanals

Der S-Typ Anionenkanal *AtSLAC1* ist bereits eingehend auf seine Regulation durch Kinasen und auf seine Expression hin intensiv untersucht worden (Lee et al. 2009; Geiger et al. 2009;

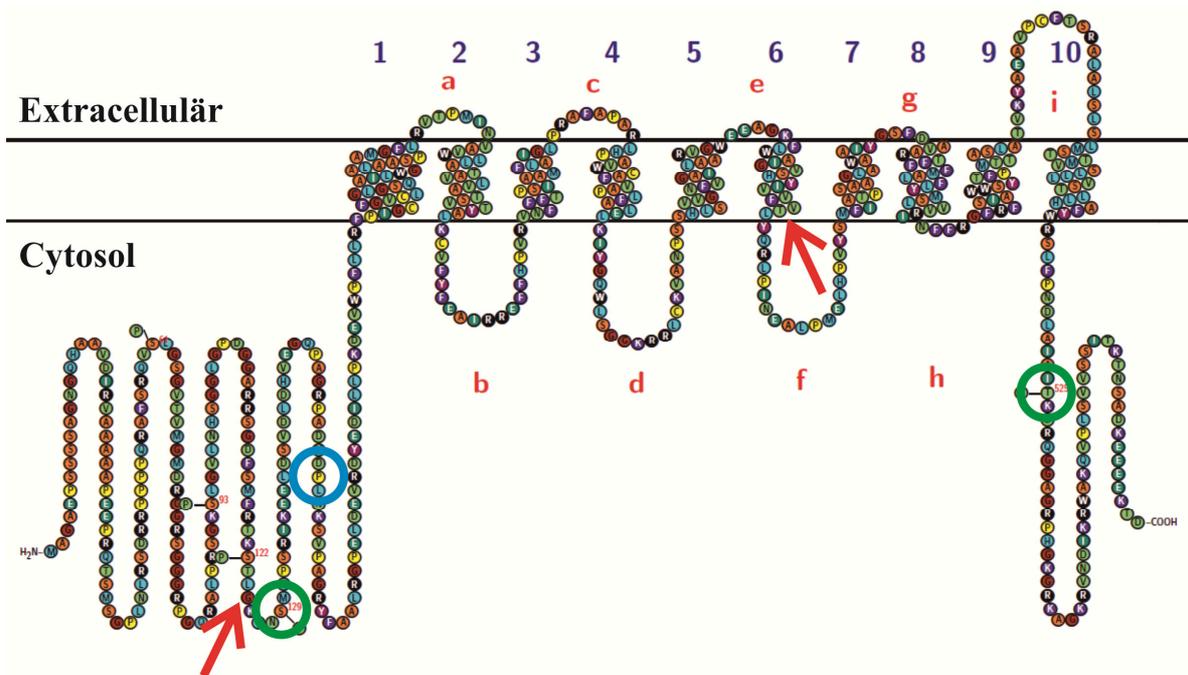
2010; 2011). Zudem ist für diesen Kanal bereits ein Strukturmodell erstellt worden (Chen et al. 2010). Diese Daten können herangezogen werden, um erste Aussagen über die Expression, die Struktur und die mögliche Regulation des putativen Kanals *Hv1008* zu treffen.

Vergleicht man etwa die Abbildungen 1.7a und 4.2, sowie das Alignment in Abbildung 3.15, so wird die große Ähnlichkeit in der Sequenz der beiden Proteine *AtSLAC1* und *Hv1008* deutlich. Es findet sich die gleiche Topologie innerhalb der Plasmamembran und man kann wohl auch von einer sehr ähnlichen Struktur in der Anordnung der Transmembranhelices ausgehen. Die N- und C-Termini unterscheiden sich hingegen in Länge und Sequenz. Diese Bereiche der Proteine enthalten Elemente der Regulation, wie etwa Phosphorylierungsstellen. Alle putativen Phosphorylierungsstellen aus *AtSLAC1* (S59, S83, S113, S120, T518) finden sich auch in *Hv1008* (Abbildung 4.2, Geiger et al. 2009, Vahisalu et al. 2010). Die beiden gesicherten Phosphorylierungsstellen für OST1 sind in der Abbildung durch grüne Kreise gekennzeichnet. Lediglich das Serin, das in *AtSLAC1* an der Position 146 steht, kommt in *Hv1008* nicht vor (Abbildung 4.2 blauer Kreis).

Es wurden mehrere Proteinkinasen identifiziert, die *AtSLAC1* als Substrat verwenden. Dazu gehört die Kinase *AtOST1*, die als Bestandteil des ABA-Signalweges zu der Antwort der Schließzellen auf abiotischen und biotischen Stress beiträgt (Geiger et al. 2009, Vahisalu et al. 2010). *AtOST1* phosphoryliert ein Threonin im C-Terminus des Kanals und vermittelt so die Aktivierung des selbigen.

Zudem wurden auch mehrere Calcium-abhängige Kinasen gefunden, die Serine im N-Terminus des Kanals phosphorylieren. Es ist bekannt, dass vier CPKs aus *A. thaliana* an der Reprogrammierung der Epidermiszellen beteiligt sind, welche die Immunantwort der Pflanze einleitet (Boudsocq et al. 2010). Die in dieser Studie untersuchten Kinasen *AtCPK4* und *AtCPK11* gehören zu den CPKs, die mit an der Trockenstressantwort beteiligt sind (Zhu et al. 2007). Zudem wird durch Experimente mit Protoplasten von Verlustmutanten nahegelegt, dass *AtCPK3* und *AtCPK6* die Aktivität von *AtSLAC1* regulieren (Mori et al. 2006). Hier zeigt sich ein weiterer Unterschied in den Signalwegen der verschiedenen Zelltypen (siehe dazu auch Kapitel 4.2).

Beim Vergleich der beiden Gensequenzen von *Hv1008* konnten zwei Änderungen in der Aminosäuresequenz festgestellt werden (Abbildung 4.2, rote Pfeile). Im N-Terminus liegt an der Position 125 in der cDNA der NIAS-Datenbank ein Triplet für Glycin vor, in der genomischen DNA aus der Datenbank des IPK ein Triplet für Serin. Die korrespondierende Position 116 in *AtSLAC1* entspricht einem Serin, das möglicherweise ein Bestandteil einer



**Abbildung 4.2: Modell zur Topographie von *Hv1008*.** Anhand der Aminosäuresequenz und der Voraussagen über die Lage der Transmembranhelices wurde ein topographisches Modell für den putativen Kanal *Hv1008* erstellt. Die Topographie weist die zehn Transmembrandomänen (1-10) auf, die für die Mitglieder der Genfamilie typisch sind. Einige der Aminosäuren, die in *AtSLAC1* phosphoryliert werden können, wurden hier durch grüne Kreise markiert. Eine weitere Aminosäure, die in *AtSLAC1* durch Kinasen phosphoryliert wird, ist in *Hv1008* nicht vorhanden (blauer Kreis). In verschiedenen Gerstenlinien lassen sich zwei Varianten des Proteins finden. Die Abweichungen in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Proteinen aus Gerste sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

oder beider Phosphorylierungsstellen um die Positionen S113 und S120 ist (vergl. Geiger et al. 2009).

Der zweite Austausch einer Aminosäure in *Hv1008* liegt entweder am Ende der sechsten Helix (siehe Abb. 4.2) oder im Folgenden cytoplasmatischen Bogen (vergl. Chen et al. 2010). Dieser Austausch von Threonin an Position 390 zu einem Isoleucin verursacht trotz der unterschiedlichen Struktur der beiden Aminosäuren keine Änderungen in der Struktur der sechsten Transmembranhelix.

In den Expressionsanalysen zeigte sich, dass das Gen *Hv1008* ebenso wie sein Homolog *AtSlac1* in Schließzellen erhöht exprimiert wird (Abb. 3.16). Im Gegensatz zu den Analysen in *A. thaliana*, bei denen die Transkriptmenge in 1/10.000 Actin-Fragmente gemessen wurde, mussten hier die Mengen in 1/1 Actin-Fragmenten angegeben werden. Es erscheint allerdings unwahrscheinlich, dass regulatorisch wichtige Proteine wie die Anionenkanäle in einer höheren Zahl in den Zellen vorliegen, als die Komponenten des Cytoskeletts. Aufgrund der unvollständigen Datenlage über die Expression der verschiedenen Actin-Gene aus Gerste, wurde für die Expressionsanalyse der SLAC/SLAH-Homologen das Actin-Gen verwendet, welches

die höchste Homologie zu *AtActin2* zeigt. Dieses Gen bildet zusammen mit *AtActin8* den größten Teil des in den Schließzellen von *Arabidopsis* vorkommenden Actins. Vermutlich übernimmt das in diesem Experiment verwendete Homolog der Gerste nicht die gleiche Funktion wie in *A. thaliana*. Analysen der nun vorliegenden cDNA-Bank aus Japan (Matsumoto et al. 2011) können nun weitere Analysen zur Genfamilie des Actins in Gerste ermöglichen, die ein genaueres Bild der Expression der einzelnen Actin-Gene in den verschiedenen Zelltypen der Gerste ergeben werden. Dadurch wird eine erneute Durchführung der Expressionsanalysen der Anionenkanäle auf eine solidere Basis gestellt, die nicht nur die Verhältnisse der Transkriptmenge in verschiedenen Zelltypen aufzeigen werden.

#### 4.6.3 Die Regulation des Hv1008-Kanals

Der Stomaschluss in der Immunantwort enthält wahrscheinlich auch Komponenten des ABA-Signalweges (Zeng und He; 2010). Die Kinase *AtOST1* etwa phosphoryliert den S-Typ Anionenkanal *AtSLAC1* in Schließzellen und ermöglicht so die Abgabe von Anionen in den Apoplasten und die Depolarisation der Plasmamembran (Geiger et al. 2009, Roelfsema und Hedrich; 2005).

Nach den einführenden BiFC-Studien wurde eine Interaktion des Kanals *Hv1008* mit verschiedenen Kinasen, unter anderem *AtOST1* und *PpOST1.1* angenommen (vergleiche dazu Abb. 3.18). Dennoch konnten in den folgenden elektrophysiologischen Experimenten mit Oozyten keine erhöhten Ströme in der Gegenwart von Kinasen gemessen werden (Abb. 3.17). Bereits Versuche mit dem Kanal *AtSLAC1* zeigten, dass einige Interaktionen mit den Kinasen nur durch das split-YFP vermittelt werden. Nicht die Kinase und der Kanal interagieren, sondern die beiden Hälften des gelb fluoreszierende Protein (YFP) (Geiger et al. 2009). Um diese beiden Arten der Interaktion zu unterscheiden, könnte etwa mit einem halben YFP gearbeitet werden, dass nicht an ein Protein gekoppelt wurde. Dieses würde nicht mit dem *Hv1008-hYFP* interagieren und diene so als zweite Negativkontrolle der Interaktion.

Es konnte in dieser Arbeit zudem keine Aussagen zur Permeabilität des Gerstenkanals gemacht werden. Zukünftige Experimente sollten daher mit Hilfe der cDNA-Datenbank von Gerste zunächst Kinasen und Kanalmutanten identifizieren, die in der Lage sind, dieses Charakteristikum des S-Typ Anionenkanals in Gerstenschließzellen zu untersuchen (Matsumoto et al. 2011).

#### 4.7 Ausblick

Durch diese Arbeit sollte die Rolle der Schließzellen in der Immunantwort der Pflanzen genauer untersucht werden. Die Antwort der Spaltöffnungen auf den verwendeten Mehltaupilz setzt bereits in der Präpenetrationsphase ein, sobald der Pilz in die Zellwand der Epidermiszellen eindringt und durch hydrolytische Enzyme PAMPs wie Chitosan freisetzt. Dies festigt die Annahme, dass der Stomaschluss einen festen Bestandteil der pflanzlichen PTI darstellt.

Aus dem Pathosystem *A. thaliana* und *P. syringae* wurde ein Zusammenhang der Immunantwort mit dem ABA-Signalweg abgeleitet (Zeng und He 2010). In dieser Arbeit konnte die Beteiligung der S-Typ-Anionenkanäle an der Immunantwort der Gerste gezeigt werden, die auch in der ABA-Antwort der Schließzellen eine große Bedeutung besitzen. In wie weit die Signalwege allerdings ineinander fassen muss noch geklärt werden.

Die Bewegungen der Schließzellen in Gräsern erfordert eine enge Abstimmung mit den Nebenzellen. Messungen des Membranpotentials der Nebenzellen in infizierten Blättern zeigte, dass auch in diesen Zellen Änderungen in der Regulation des Ionentransportes vorgenommen werden. Dies geschieht zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie die Aktivierung der Anionenkanäle in den Schließzellen.

Diese Arbeit konnte erste Erkenntnisse zur Rolle der Ionenkanäle in der Immunantwort der Pflanze liefern. Aufbauend auf diesen lassen sich nun weitere Fragestellungen entwickeln, die diesen Teil der Immunantwort genauer charakterisieren und ihn in das Gesamtbild einordnen lassen. Weiterführende Experimente können sich mit der Antwort auf verschiedene PAMPs und Virulenzfaktoren beschäftigen. Es gilt herauszufinden, in wie weit die Aktivierung der Anionenkanäle allgemein durch Komponenten der PTI ausgelöst wird.

Durch den Klimawandel und die zunehmende Weltbevölkerung muss die Landwirtschaft neue Möglichkeiten finden, die Versorgung mit Getreide zu gewährleisten. So werden die Erforschung der Trockenresistenz und der des pflanzlichen Immunsystems immer wichtiger. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die S-Typ Anionenkanäle in beiden Bereichen eine wichtige Rolle spielen. Dies kann Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen genutzt werden um diese wichtigen Probleme anzugehen.

Coronatn wurde zunächst nur als Virulenzfaktor in der späten Phase der *Arabidopsis-Pseudomonas*-Interaktion erkannt (Brooks et al. 2004, Mittal und Davis; 1995). Später konnte dann allerdings auch die Aufhebung des Pathogen-induzierten Stomaschlusses in der Interaktion auf Coronatn zurückgeführt werden (Melotto et al. 2006). Dies wurde auf den

Umstand zurückgeführt, dass in den Studien die Inokulation mit Bakterien meist durch Infiltration in den Apoplasten der Pflanzen erfolgte. Effekte auf den Stomaschluss konnten bei dieser Durchführung nicht untersucht werden, da diese erste Barriere der pflanzlichen Immunantwort umgangen wurde (Baker et al. 2010). Coronatin bildet ein Struktur analogon zu Jasmonat und startet durch Komplexierung mit dem Jasmonatrezeptor die Jasmonat-induzierte Immunantwort, die der Abwehr von Herbivoren und der Reaktion auf Verwundung dient (Übersicht in Fonseca et al. 2009). Interessanterweise wird bei der Aktivierung dieses Signalweges die Einleitung des Salicylsäuresignalweges gehemmt (Übersicht in Pieterse et al. 2009). Dieser dient jedoch der Auslösung der hypersensitiven Reaktion in der Immunantwort und nimmt auch Einfluss auf die Regulation der Spaltöffnungsweite (Übersicht in Mur et al. 2008 und Underwood et al. 2007).

Es wird davon ausgegangen, dass Coronatin direkt auf die  $H^+$ -ATPase der Schließzellen wirkt und durch deren Aktivierung die Depolarisation der Plasmamembran verhindert (Übersicht in Baker et al. 2010). Ob dies ausreicht, um die Aktivierung der  $K^+$ -Auswärtsgleichrichter zu verhindern, oder ob hier noch ein weiterer Signalweg beteiligt ist, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Es wäre etwa möglich, dass Coronatin zusätzlich über die Inhibierung von Kinasen wirkt, die sonst zu einer Aktivierung der Anionenkanäle geführt hätten, so dass keine Depolarisation stattfinden kann. Zudem sollte der Einfluss von Blaulicht auf die Anionenkanalaktivität näher untersucht werden. Besonders die Frage, warum die Inhibierung der Anionenkanäle durch Blaulicht möglich ist, wenn gleichzeitig in den Experimenten mit Weißlicht eine stark verringert Öffnung festgestellt werden kann, bedarf der Klärung.

Bei der Untersuchung der Schließzellantwort auf Chitosan konnten wiederholte Aktivierungen der Anionenkanäle beobachtet werden. Weiter elektrophysiologische Experimente könnten einen tieferen Einblick in die Erzeugung dieser transienten Anionenströme geben. Man weiß etwa, dass *AtSLAC1* durch Calcium-abhängige Kinasen aktiviert wird (Geiger et al. 2010). Gleichzeitig geht man davon aus, dass verschiedene Muster der Calciumsignale innerhalb einer Zelle unterschiedliche Antworten einleiten (Roelfsema und Hedrich; 2010). Ob Calciumsignale eine Auswirkung auf die pathogen-induzierte Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle haben, kann durch Experimente mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff FURA-2 geklärt werden. Der Zusammenhang zwischen Calciumsignalen und der Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle konnte vor kurzem mit solchen Experimenten gezeigt werden (Stange et al. 2010). Bisläng ist es allerdings nicht gelungen FURA-2 in Schließzellen der Gerste

einzubringen (M.R.G. Roelfsema, pers. Mitteilung). Daher muss zunächst ein geeignetes System für die Durchführung der Experimente etabliert werden.

Für die weitere Charakterisierung des S-Typ Anionenkanals aus Gerste liegen Mutanten vor, die in *AtSLAC1* zu einem konstitutiv aktiven Kanal führten. So wurde das Threonin an Position 525 des C-Terminus zu einem Aspartat umgewandelt, wodurch eine Phosphorylierung des Proteins vorgespiegelt wird. Das Phenylalanin an Position 462 des Proteins *Hv1008* wurde in einer Einzelmutante zu einem Alanin mutiert. Diese Aminosäure entspricht dem Phenylalanin 450 in *AtSLAC1*, das die Öffnung der Kanalpore normalerweise verschließt. Durch eine Mutation dieser Aminosäure in *AtSLAC1* konnte ebenfalls ein konstitutiv aktiver Kanal erzeugt werden (T. Maierhofer, pers. Mitteilung). Mittels BiFC- und DEVC-Messungen in *X. laevis*-Oozyten können die Eigenschaften dieser Kanalmutanten in *Hv1008* untersucht werden. Hierbei sollten auch die beiden Mutationen berücksichtigt werden, die bei dem Vergleich der beiden Proteinsequenzen des Kanals *Hv1008* gefunden wurden. Gerade die Mutation an Position 125 bedarf einer genaueren Betrachtung, da hier möglicherweise eine der beiden benachbarten Phosphorylierungsstellen nicht mehr funktionell ist.

Möglicherweise sind die verwendeten Kinasen aus *A. thaliana* und *P. patens* nicht in der Lage die Phosphorylierung des Kanals durchzuführen. *In silico*-Analysen mit der nun öffentlich zugänglichen cDNA-Datenbank aus Japan könnten helfen, die homologen Kinasen in Gerste zu identifizieren. Durch eine Zusammenarbeit mit Dr. Matsumoto in Japan könnten anschließend die Kinasen kloniert und für Interaktionsstudien und elektrophysiologische Messungen in Oozyten verwendet werden. Gleichzeitig können vertiefte Analysen der SLAC-Genfamilie die genaue Struktur der selbigen in Gerste verdeutlichen und erste Ansätze liefern, um die unterschiedliche Struktur zwischen Dicotyledonen und Gräsern, aber auch innerhalb der Gräser zu erklären.

Durch die Zugänglichkeit dieser Datenbank wird die Arbeit mit Gerste insgesamt einfacher, da nun Gene nicht länger über degenerierte Primer kloniert und über Homologie-Analysen mit bekannten Genen aus andern Organismen identifiziert werden müssen. Dies, zusammen mit den TILLING-Sammlungen, die Gerstenlinien mit Punktmutationen in nahezu allen Genen der Gerste enthalten (Gottwald et al. 2009), sowie neuen Transformationstechniken, die durch die Verwendung von Zink-Finger-Proteinen hohe Raten für eine homologe Rekombination aufweisen (Wright et al. 2005), kann sich die Gerste zu einer nützlichen Modellpflanze in der Phytopathologie entwickeln.

Neben den Einflüssen der PAMPs auf die Anionenkanäle wäre es allerdings auch interessant, die Rolle von anderen Änderungen auf die Kanalaktivität in Schließ- und Nebenzellen zu untersuchen. So muss immer noch geklärt werden, in wie weit der pH-Wert des Apoplasten den Ionentransport in Nebenzellen beeinflusst und ob sich so die verstärkte Hyperpolarisation der Nebenzellen in infizierten Blättern erklären lässt. Durch die Manipulation des apoplastischen pH-Wertes, mittels eines erweiterten Gebrauchs der Nanoinjektion, und der gleichzeitigen Aufzeichnung des Membranpotentials kann dies untersucht werden.

In diesem Zusammenhang können auch die Auswirkungen der verschiedenen Phytohormone auf die Immunantwort der Schließzellen weiter analysiert werden. Es ist anzunehmen, dass sich die Signalwege der Immunantwort in den Epidermis- Mesophyll- und Schließzellen unterscheiden. Dies kann durch weitere Untersuchungen am Pathosystem Gerste-Mehltau nicht nur auf der genetischen, sondern auch auf der elektrophysiologischen Ebene erfolgen. Auch hierfür können die neu generierten TILLING-Linien gute Dienste leisten.

Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften beschränkte sich in dieser Arbeit auf die Schließzellen der Gerste. In weiterführenden Arbeiten ist es allerdings von genauso großem Interesse, die Änderungen der Ionenflüsse des Mehлтаupilzes zu untersuchen. Ähnlich den Wurzeln der Pflanzen nutzen Pilzhypen Transporter und Kanäle um Nährstoffe aus der Umgebung aufzunehmen, beziehungsweise das umliegende Medium für die Aktivitäten des Pilzes zu optimieren (Carver et al. 1999). Da *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* zu den Ascomyceten gehört und ein geringer Hyphendurchmesser eine Untersuchung der Ströme mittels der Doppel-Elektroden-Spannungs-Klemmtechnik erschwert, kann hierfür etwa das MIFE genutzt werden. Bei dieser Technik wird durch eine vibrierende Elektrode die Oberfläche der Hyphe abgetastet. Da die Elektrode Unterschiede in der Ionenkonzentration wahrnehmen kann, können so Änderungen im Ionentransport über die pilzliche Zellwand abgeleitet werden.

## 5. Zusammenfassung

In ihrer Evolution mussten Pflanzen Strategien entwickeln um sich sowohl gegen Pathogene aus der Luft als auch solche im Boden zu verteidigen. Diese Resistenzmechanismen der Pflanzen zu verstehen ist von höchster Wichtigkeit für die moderne Gesellschaft. Die Weltbevölkerung wächst schnell, was zu der Notwendigkeit führt, die landwirtschaftlichen Flächen möglichst optimal zu nutzen. Ohne die Weiterentwicklung der landwirtschaftlichen Methoden wird eine ausreichende Versorgung mit Grundnahrungsmitteln nicht möglich sein. Obwohl nicht viele Daten zu diesem Thema vorliegen, ist es sehr wahrscheinlich, dass ein hoher Prozentsatz der jährlichen Ernteverluste auf Pflanzenkrankheiten zurückzuführen ist (Orke et al. 1994, Pinstrup-Andersen; 2001). Der Ernteverlust ist nicht ausschließlich auf den Tod der infizierten Pflanze zurückzuführen, sondern vielmehr auf die sogenannten Resistenzkosten Walters und Heil; 2007). Um sich gegen das Pathogen zu schützen müssen Ressourcen genutzt werden, die sonst für die korrekte Entwicklung der Pflanze, sowie der Samen und Früchte verwendet würden.

Die pflanzliche Cuticula, welche die Blattoberfläche bedeckt, ist die erste Verteidigungslinie gegen pathogene Mikroorganismen, die durch die Luft verbreitet werden. Um diese Barriere zu umgehen nutzen Bakterien und einige Pilze die Stomata als Eingang in den Apoplasten der Blätter. Dies kann durch die Pflanze allerdings verhindert werden, indem diese Poren geschlossen werden. Diese Schließzellantwort wurde zunächst als Teil der Immunantwort auf Bakterien angesehen (Melotto et al. 2006). Nichtsdestotrotz konnte beobachtet werden, dass die Stomata auch während der Infektion des Mehltaupilzes schließen, obwohl dieser nicht durch die Stomata in das Blatt eindringen. Daher haben wir Einzelzellstudien an intakten Gerstenpflanzen vorgenommen um zu klären, wie die Signale erkannt und weitergeleitet werden, die schließlich zum pathogen-induzierten Stomaschluss führen (Koers et al. 2011).

- **Mehltau** löst die Inhibierung der Stomaöffnung bereits neun Stunden nach der Sporenablage aus. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Penetrationshypothese in die Cuticula der Pflanze einzudringen.
- **Die** Inhibierung ist räumlich begrenzt und kann nur in einem Radius von 120 µm um die Infektionsstelle herum beobachtet werden. Dies legt nahe, dass das Signal durch sogenannte Mikroben-assoziierte molekulare Muster (MAMPs) verbreitet wird. Die MAMPs diffundieren durch den Apoplasten der Blätter und lösen Abwehrreaktionen aus, sobald sie durch Rezeptoren in der Plasmamembran erkannt wurden.

- **Die** Anwesenheit des pilzlichen Pathogens verursacht verschiedene Änderungen in der Regulation des Ionentransportes über die Plasmamembran der Schließzellen. Dies führt unter anderem dazu, dass Schließzellen in der Nähe von Infektionsstellen weniger häufig im Licht hyperpolarisieren.
- **Der** Mehлтаupilz führt zu einer erhöhten Aktivität der S-Typ Anionenkanäle in der Plasmamembran der Schließzellen.
- **Chitosan**, ein pilzlicher Elicitor, löst den Stomaschluss aus. Dies geht konform zu der Annahme, dass Chitosan verschiedene Immunreaktionen der Pflanze auslöst. Seine Injektion in den Apoplasten verursacht nur wenige Minuten später die transiente Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle in Schließzellen.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Stomaschluss ein wichtiger Bestandteil der pflanzlichen Immunantwort ist. Innerhalb dieser Antwort der Stomata auf durch Wind übertragene Pathogene, spielt die Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle eine entscheidende Rolle. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Immunantwort die Licht-induzierte Inhibierung dieser Anionenkanäle außer Kraft setzt.

S-Typ Anionenkanäle sind aber nicht allein in der Pathogenabwehr von Bedeutung, sondern auch in der Reaktion der Pflanzen auf Trockenstress. Es ist jedoch nicht bekannt, in wie weit sich die beiden Signalwege überschneiden. Zusammen mit den neuen mutierten Gerstenlinien, werden die in dieser Arbeit beschriebenen Techniken zur Messung von Einzelzellen tiefere Einsichten in das Zusammenspiel zwischen Trockenstress und Pathogenabwehr in Pflanzen ermöglichen. Die daraus resultierenden Ergebnisse können zur Optimierung von Getreide für die moderne Landwirtschaft genutzt werden. Dies wird einer der wichtigsten Ansätze sein, um die Menschheit auch in Zukunft mit ausreichend Nahrung versorgen zu können.

## 6. Summary

During evolution, plants had to evolve potent strategies to defend themselves against airborne pathogens, as well as against those encountered in the soil. Understanding the mechanisms that provide plant immunity is crucial for modern society. The world population is growing at rapid pace, leading to the necessity of using agricultural areas as productive as possible. Without improvement of agricultural practice, a sufficient supply with staple foods will not be possible. It is very likely that an important percentage of crop loss is due to plant diseases, even though precise data on this issue are lacking, (Orke et al. 1994, Pinstrup-Andersen; 2001). Crop loss is not exclusively caused by the death of infected plants, but more often by so called costs of resistance (Walters and Heil; 2007). To gain protection against an attacking pathogen, resources have to be consumed, which otherwise would be used for proper plant, crop and fruit development.

Plant cuticles, that cover the leaf surface, are the first line of defence to airborne pathogenic microorganisms. To bypass this barrier, bacteria and some fungi use stomata as an entry site into the apoplastic space of leaves. The entry of pathogens through stomata can be prevented by plants upon closure of these pores. This guard cell response was proposed to contribute to plant innate immunity against bacteria (Melotto et al. 2006). However, stomata were found to close during the infection of powdery mildew fungi, which do not use open stomata to enter the leaf. We therefore pursued single cell studies within intact barley plants to elucidate the signal perception and transduction mechanisms that evoke stomatal closure during a pathogen attack (Koers et al. 2011).

- **Powdery** mildew triggers the inhibition of stomatal opening as early as nine hours after the inoculation of fungal spores on the leaf surface, linking this event to the emergence of the fungal penetration peg.
- **The** inhibition is spatially restricted to a region of approximately 120  $\mu\text{m}$  surrounding the infection site. This suggests that propagation of the signal by so called Microbe Associated Molecular Patterns (MAMPs) is most likely the case. MAMPs spread through the apoplastic lumen of leaves by diffusion, triggering the innate immunity responses upon their recognition by plasma membrane receptors.
- **The** presence of the fungal pathogen elicits several changes in the regulation of ion transport at the plasma membrane of guard cells. As a result, guard cells neighbouring the infection site are less likely to hyperpolarize in high light.

- **Powdery** mildew leads to a higher activity of S-type anion channels in the plasma membrane of guard cells.
- **The** fungal elicitor chitosan triggers stomatal closure in line with its role in provoking the plant immunity response. Its injection into the apoplast elicits transient activation of S-type anion channels in guard cells, within minutes after application.

All results taken together, stomatal closure is an integral part of plant innate immunity. Within the stomatal response to airborne pathogens, the activation of S-type anion channels is essential. It is shown, that the immunity responses of guard cells bypass light induced inhibition of anion channels.

S-type anion channels are not only crucial for responses to pathogens, but they are also involved in the response of guard cells towards drought. However, it is unknown to which extent both signals share mutual components. Together with the, now available, mutant lines of barley, the single cell techniques described in this thesis can provide a further insight into the interplay of drought and pathogen responses in plants. The results are likely to be used for optimizing crops for the future agriculture, which is a pivotal step in providing enough food for mankind in the near future.

## 7. Literaturverzeichnis

- Acharya BR, Assmann SM (2009)** Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol Biol* 69:451-462
- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R (2000)** GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Letters* 486: 93-98
- Allen GJ, Kuchitsu K, Chu SP, Murata Y, Schroeder JI (1999)** Arabidopsis *abi1-1* and *abi2-1* Phosphatase Mutations Reduce Abscisic Acid Induced Cytoplasmic Calcium Rises in Guard Cells. *The Plant Cell Online* 11: 1785-1798
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990)** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- An Q, Hückelhoven R, Kogel K-H, Van Bel AJE (2006)** Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cell Microbiol* 8: 1009-1019
- Assaad FF, Qiu J-L, Youngs H, Ehrhardt D, Zimmerli L, Kalde M, Wanner G, Peck SC, Edwards H, Ramonell K, Somerville CR, Thordal-Christensen H (2004)** The PEN1 Syntaxin Defines a Novel Cellular Compartment upon Fungal Attack and Is Required for the Timely Assembly of Papillae. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5118-5129
- Aziz A, Heyraud A, Lambert B (2004)** Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* 218: 767-774
- Baker CM, Chitrakar R, Obulareddy N, Panchal S, Williams P, M. M (2010)** Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. *Braz J Med Biol Res* 43: 698-704
- Bari R, Jones JDG (2009)** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69:473-488
- Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005)** Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3135-3140
- Birnboim HC, Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523
- Boller T, Felix G (2009)** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60: 379-406
- Both M, Csukai M, Stumpf MP, Spanu PD (2005)** Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen. *Plant Cell* 17: 2107-2122
- Boudsoq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J (2010)** Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases. *Nature* 464:418-423

- Braut M, Amiar Z, Pennarun A-M, Monestiez M, Zhang Z, Cornel D, Dellis O, Knight H, Bouteau F, Rona J-P (2004)** Plasma Membrane Depolarization Induced by Abscisic Acid in Arabidopsis Suspension Cells Involves Reduction of Proton Pumping in Addition to Anion Channel Activation, Which Are Both Ca<sup>2+</sup> Dependent. *Plant Physiology* 135: 231-243
- Braun U (1995)** The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe. Gustav Fischer Verlag : Jena, Germany
- Brooks DM, Hernández-Guzmán G, Kloek AP, Alarcón-Chaidez F, Sreedharan A, Rangaswamy V, Peñaloza-Vázquez A, Bender CL, Kunkel BN (2004)** Identification and Characterization of a Well-Defined Series of Coronatine Biosynthetic Mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe In* 17: 162-174
- Büchenschütz K, Marten I, Becker D, Philippar K, Ache P, Hedrich R (2005)** Differential expression of K<sup>+</sup> channels between guard cells and subsidiary cells within the maize stomatal complex. *Planta* 222: 968-976
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, vanDaelen R, vanderLee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997)** The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705
- Bushnell WR, Mendgen K, Liu Z (1987)** Accumulation of Potentiometric and Other Dyes in Haustoria of *Erysiphe Graminis-F-Sp-Hordei* in Living Host Cells. *Physiol Mol Plant P* 31: 237-250
- Caldo RA, Nettleton D, Peng J, Wise RP (2006)** Stage-specific suppression of basal defense discriminates barley plants containing fast- and delayed-acting *Mla* powdery mildew resistance alleles. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 939-947
- Carver TLW, Kunoh H, Thomas BJ, Nicholson RL (1999)** Release and visualization of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. *Mycological Research* 103: 547-560
- Cetto B (1988)** Enzyklopädie der Pilze Bd.4: Täublinge, Milchlinge, Boviste, Morcheln, Becherlinge u. a. BLV Verlagsgesellschaft, München, Wien, Zürich
- Chen Y-h, Hu L, Punta M, Bruni R, Hillerich B, Kloss B, Rost B, Love J, Siegelbaum SA, Hendrickson WA (2010)** Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature* 467: 1074-1080
- Cheng S-H, Willmann MR, Chen H-C, Sheen J (2002)** Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiology* 129: 469-485
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007)** A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497-500
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007)** A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal* 52: 167-174
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu J-L, Huckelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P (2003)** SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425: 973-977

- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, Somerville SC, Panstruga R (2006)** Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet* 38: 716-720
- Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu J-R, Pan H, Read ND, Lee Y-H, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeyer C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun M-H, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma L-J, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW (2005)** The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434: 980-986
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994)** A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* 266: 1247-1250
- Desjardins AE, Hohn TM (1997)** Mycotoxins in plant pathogenesis. *MPMI* 10: 147-152
- Devoto A, Hartmann HA, Piffanelli P, Elliott C, Simmons C, Taramino G, Goh C-S, Cohen FE, Emerson BC, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2003)** Molecular Phylogeny and Evolution of the Plant-Specific Seven-Transmembrane MLO Family. *Journal of Molecular Evolution* 56: 77-88
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I, Wallin E, Panstruga R, von Heijne G, Schulze-Lefert P (1999)** Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J Biol Chem* 274: 34993-35004
- Diogo E, Santos J, Phillips A (2010)** Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity* 44: 107-115
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, Feussner K, Meinicke P, Stierhof Y-D, Schwarz H, Macek B, Mann M, Kahmann R (2011)** Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478: 395-398
- Edwards HH (2002)** Development of primary germ tubes by conidia of *Blumeria graminis* f.sp *hordei* on leaf epidermal cells of *Hordeum vulgare*. *Can J Bot* 80: 1121-1125
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, Nakazono M, Kamiya Y, Koshiha T, Nambara E (2008)** Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells. *Plant Physiology* 147: 1984-1993
- Esser K (2000)** Kryptogamen - Praktikum und Lehrbuch. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stoecker G, Karlovsky P, von Tiedemann A (2007)** Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* 118: 259-274
- Felix G, Regenass M, Boller T (1993)** Specific Perception of Subnanomolar Concentrations of Chitin Fragments by Tomato Cells - Induction of Extracellular Alkalinization, Changes in Protein-Phosphorylation, and Establishment of a Refractory State. *Plant Journal* 4: 307-316
- Felle HH, Herrmann A, Hanstein S, Huckelhoven R, Kogel KH (2004)** Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp *hordei*. *Mol Plant Microbe In* 17: 118-123

- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M (2000)** How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant Physiol* 124: 1373-1380
- Fonseca S, Chico JM Solano R (2009)** The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr Opin Plant Biol* 5: 539-547
- Fradin EF, Thomma BPHJ (2006)** Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7: 71-86
- Franks PJ, Farquhar GD (2007)** The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control. *Plant Physiology* 143: 78-87
- Frisvad J, Samson R (2004)** Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49: 1-173
- Gadoury DM, Cadle-Davidson L, Wilcox WF, Dry IB, Seem RC, Milgroom MG (2012)** Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology* 13: 1-16
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2011)** Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Sci Signal* 4: ra32
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KA, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2010)** Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct  $Ca^{2+}$  affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8023-8028
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009)** Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21425-21430
- Glazebrook J (2005)** Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227
- Goh CH, Kinoshita T, Oku T, Shimazaki K (1996)** Inhibition of Blue Light-Dependent  $H^+$  Pumping by Abscisic Acid in *Vicia* Guard-Cell Protoplasts. *Plant Physiol* 111: 433-440
- Goswami RS, Kistler HC (2004)** Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515-525
- Gottwald S, Bauer P, Komatsuda T, Lundqvist U, Stein N (2009)** TILLING in the two-rowed barley cultivar 'Barke' reveals preferred sites of functional diversity in the gene *HvHox1*. *BMC Res Notes*. 2009;2:258. doi: 10.1186/1756-0500-2-258
- Grabov A, Leung J, Giraudat J, Blatt MR (1997)** Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *The Plant Journal* 12: 203-213
- Hansjakob A, Bischof S, Bringmann G, Riederer M, Hildebrandt U (2010)** Very-long-chain aldehydes promote in vitro prepenetration processes of *Blumeria graminis* in a dose- and chain length-dependent manner. *New Phytol* 188: 1039-1054
- Hanstein SM, Felle HH (2004)** Nanoinfusion: an integrating tool to study elicitor perception and signal transduction in intact leaves. *New Phytologist* 161: 595-606

- Heath MC (2000)** Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334
- Hedrich R, Moran O, Conti F, Busch H, Becker D, Gambale F, Dreyer I, Küch A, Neuwinger K, Palme K (1995)** Inward rectifier potassium channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. *European Biophysics Journal* 24: 107-115
- Hématy K, Cherk C, Somerville S (2009)** Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 12: 406-413
- Hippe-Sanwald S, Hermanns M, Somerville SC (1992)** Ultrastructural comparison of incompatible and compatible interactions in the barley powdery mildew disease. *Protoplasma* 168: 27-40
- Hoekenga OA, Maron LG, Piñeros MA, Cançado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV (2006)** *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 9738-9743
- Hofmann K, Stoffel W (1993)** TMBASE - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 166
- Hoth S, Dreyer I, Dietrich P, Becker D, Müller-Rober B, Hedrich R (1997)** Molecular basis of plant-specific acid activation of K<sup>+</sup> uptake channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4806-4810
- Hückelhoven R, Panstruga R (2011)** Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 738-746
- Jarosch B, Kogel K-H, Schaffrath U (1999)** The Ambivalence of the Barley Mlo Locus: Mutations Conferring Resistance Against Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) Enhance Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe In* 12: 508-514
- Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anschuetz U, Krol E, Elzenga JTM, Felix G, Boller T, Hedrich R, Becker D (2010)** Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca<sup>2+</sup>-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant Journal* 62: 367-378
- Jiang F, Hartung W (2008)** Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* 59: 37-43
- Jones JDG, Dangl JL (2006)** The plant immune system. *Nature (London)* 444: 323-329
- Jørgensen JH (1994)** Genetics Of Powdery Mildew Resistance In Barley. *Critical reviews in plant sciences* 13: 97-119
- Jørgensen JH, Mortensen K (1977)** Primary Infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* of Barley Mutants with Resistance Genes in the ml-o Locus. *Phytopathology* 67: 678-685
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006)** Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 11086-11091
- Keller BU, Hedrich R, Raschke K (1989)** Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* 341: 450-453

- Kerppola TK (2008)** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37: 465-487
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010)** Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61: 561-591
- Kinane J, Dalvin S, Bindslev L, Hall A, Gurr S, Oliver R (2000)** Evidence that the cAMP Pathway Controls Emergence of Both Primary and Appressorial Germ Tubes of Barley Powdery Mildew. *Mol Plant Microbe In* 13: 494-502
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K-i (2001)** phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656-660
- Knogge W (1996)** Fungal Infection of Plants. *The Plant Cell Online* 8: 1711-1722
- Knogge W, Scheel D (2006)** LysM receptors recognize friend and foe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10829-10830
- Koers S, Guzel-Deger A, Marten I, Roelfsema MRG (2011)** Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. *The Plant Journal* 68: 670-680
- Koh S, Andre A, Edwards H, Ehrhardt D, Somerville S (2005)** *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *Plant J* 44: 516-529
- Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsuhashi W, Toyomasu T, Koshiba T (2004)** Tissue-Specific Localization of an Abscisic Acid Biosynthetic Enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1697-1707
- Konrad KR, Hedrich R (2008)** The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant J* 55: 161-173
- Kumar J, Hückelhoven R, Beckhove U, Nagarajan S, Kogel K-H (2001)** A Compromised Mlo Pathway Affects the Response of Barley to the Necrotrophic Fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and Its Toxins. *Phytopathology* 91: 127-133
- Kunoh H, Nicholson RL, Yosioka H, Yamaoka N, Kobayashi I (1990)** Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*: Degradation of the host cuticle. *Physiol Mol Plant P* 36: 397-407
- Kunoh H, Yamaoka N, Yoshioka H, Nicholson RL (1988)** Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*: I. Contact-Mediated changes in morphology of the conidium surface. *Experimental Mycology* 12: 325-335
- Kwak JM, Mori IC, Pei Z-M, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI (2003)** NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 22: 2623-2633
- Lee S, Choi H, Suh S, Doo IS, Oh KY, Choi EJ, Schroeder Taylor AT, Low PS, Lee Y (1999)** Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* 121: 147-152
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S (2009)** A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 21419-21424

- Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R (2005)** Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4203-4208
- Li C, Faino L, Dong LIN, Fan J, Kiss L, De Giovanni C, Lebeda A, Scott J, Matsuda Y, Toyoda H, Lindhout PIM, Visser RGF, Bonnema G, Bai Y (2011)** Characterization of polygenic resistance to powdery mildew in tomato at cytological, biochemical and gene expression level. *Molecular Plant Pathology*: 13: 148-159
- Lipka V, Dittgen J, Bednarek P, Bhat R, Wiermer M, Stein M, Landtag J, Brandt W, Rosahl S, Scheel D, Llorente F, Molina A, Parker J, Somerville S, Schulze-Lefert P (2005)** Pre- and Postinvasion Defenses Both Contribute to Nonhost Resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310: 1180-1183
- Liu GT QY, Zhang P, Dong WH, Qi YM, Guo HT (1992)** Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin Med J (Engl)* 105: 394-400
- Liu GT QY, Zhang P, Dong ZM, Shi ZY, Zhen YZ, Miao J, Xu YM (1991)** Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci Publ.* 105: 258-262
- Ma H, Kong Z, Fu B, Li N, Zhang L, Jia H, Ma Z (2011)** Identification and mapping of a new powdery mildew resistance gene on chromosome 6D of common wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 123: 1099-1106
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009)** Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* 324: 1064-1068
- Mackie AJ, Roberts AM, Callow JA, Green JR (1991)** Molecular differentiation in pea powdery-mildew haustoria. *Planta* 183: 399-408
- MacRobbie EAC (1998)** Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353: 1475-1488
- Maffi D, Bassi M, Brambilla A, Conti CG (1998)** Possible role of chitosan in the interaction between barley and *Erysiphe graminis* after tetraconazole treatment. *Mycological Research* 102: 599-606
- Malherbe DF, du Toit M, Cordero Otero RR, van Rensburg P, Pretorius IS (2003)** Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 502-511
- Malviya M, Pandey A, Trivedi P, Gupta G, Kumar B (2009)** Chitinolytic Activity of Cold Tolerant Antagonistic Species of *Streptomyces* Isolated from Glacial Sites of Indian Himalaya. *Current Microbiology* 59: 502-508
- Marten H, Hedrich R, Roelfsema MRG (2007a)** Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *Plant J* 50: 29-39
- Marten H, Hyun T, Gomi K, Seo S, Hedrich R, Roelfsema MRG (2008)** Silencing of NtMPK4 impairs  $\text{CO}_2$ -induced stomatal closure, activation of anion channels and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals in *Nicotiana tabacum* guard cells. *Plant J* 55: 698-708
- Marten H, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R (2007b)**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and -independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* 143: 28-37

- Mason JM, Arndt KM (2004)** Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. *ChemBioChem* 5: 170-176
- Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T, Sato K (2011)** Comprehensive Sequence Analysis of 24,783 Barley Full-Length cDNAs Derived from 12 Clone Libraries. *Plant Physiology* 156: 20-28
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006)** Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980
- Melotto M, Underwood W, He SY (2008)** Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* 46:101-122
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010)** AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* 63: 1054-1062
- Mittal S, Davis KR (1995)** Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae*. *MPMI* 8:165-171
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007)** CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 19613-19618
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, Schroeder JI (2006)** CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* 4: e327
- Mumm P, Wolf T, Fromm J, Roelfsema MRG, Marten I (2011)** Cell Type-Specific Regulation of Ion Channels Within the Maize Stomatal Complex. *Plant and Cell Physiology* 52: 1365-1375
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008)** The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 59: 501-520
- Mustilli A-C, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002)** *Arabidopsis* OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *The Plant Cell Online* 14: 3089-3099
- Mysore KS, Ryu C-M (2004)** Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* 9: 97-104
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K (2008)** CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-486
- Nicholson RL, Yoshioka H, Yamaoka N, Kunoh H (1988)** Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*: II. Release of esterase enzyme from conidia in response to a contact stimulus. *Experimental Mycology* 12: 336-349
- Nielsen KA, Nicholson RL, Carver TLW, Kunoh H, Oliver RP (2000)** First touch: An immediate response to surface recognition in conidia of *Blumeria graminis*. *Physiol Mol Plant P* 56: 63-70
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt III BF, Dangl JL (2003)** RECOGNITION AND RESPONSE IN THE PLANT IMMUNE SYSTEM. *Annual Review of Genetics* 37: 579-609

- Nour-Eldin HH, Hansen BG, Nørholm MHH, Jensen JK, Halkier BA (2006)** Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Research* 34: e122
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004)** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249-266
- Nürnberg T, Lipka V (2005)** Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6: 335-345
- Oecking C, Hagemann K (1999)** Association of 14-3-3 proteins with the C-terminal autoinhibitory domain of the plant plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase generates a fusicoccin-binding complex. *Planta* 207: 480-482
- Opalski KS, Schultheiss H, Kogel K-H, Hückelhoven R (2005)** The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *The Plant Journal* 41: 291-303
- Orke EC, Dehne HW, Schonbeck F, Weber A (1994)** Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam: Elsevier
- Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996)** Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* 273: 1392-1395
- Pandey S, Zhang W, Assmann SM (2007)** Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* 581: 2325-2336
- Panstruga R (2005)** Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochem Soc T* 33: 389-392
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T-ff, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provarnt NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu J-K, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009)** Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324: 1068-1071
- Pascholati SF, Yoshioka H, Kunoh H, Nicholson RL (1992)** Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*: cutinase is a component of the conidial exudate. *Physiol Mol Plant P* 41: 53-59
- Pavan S, Schiavulli A, Appiano M, Marcotrigiano A, Cillo F, Visser R, Bai Y, Lotti C, Ricciardi L (2011)** Pea powdery mildew *er1* resistance is associated to loss-of-function mutations at a *MLO* homologous locus. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 123: 1425-1431
- Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI (1997)** Differential Abscisic Acid Regulation of Guard Cell Slow Anion Channels in Arabidopsis Wild-Type and *abi1* and *abi2* Mutants. *The Plant Cell Online* 9: 409-423
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000)** Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734
- Peterhänsel C, Freialdenhoven A, Kurth J, Kolsch R, Schulze-Lefert P (1997)** Interaction Analyses of Genes Required for Resistance Responses to Powdery Mildew in Barley Reveal Distinct Pathways Leading to Leaf Cell Death. *The Plant Cell Online* 9: 1397-1409

- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009)** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308-316
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC, Panstruga R, Schulze-Lefert P (2002)** The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol* 129: 1076-1085
- Pinstrup-Andersen P (2001)** The Future World Food Situation and the Role of Plant Diseases. *The Plant Health Instructor*; DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0425-01
- Pozzi CR, Braghini R, Arcaro JRP, Zorzete P, Israel ALM, Pozar IO, Denucci S, Correa B (2005)** Mycoflora and Occurrence of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Brazilian Sunflower from Sowing to Harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5824-5828
- Prats E, Gay AP, Mur LA, Thomas BJ, Carver TL (2006)** Stomatal lock-open, a consequence of epidermal cell death, follows transient suppression of stomatal opening in barley attacked by *Blumeria graminis*. *J Exp Bot* 57: 2211-2226
- Pryce-Jones E, Carver TIM, Gurr SJ (1999)** The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp.*hordei*. *Physiol Mol Plant P* 55: 175-182
- Pulsifer IP, Kluge S, Rowland O (2012)** Arabidopsis LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. *Plant Physiology and Biochemistry* 51: 31-39
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2003)** Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592
- Ramming DW, Gabler F, Smilanick JL, Margosan DA, Cadle-Davidson M, Barba P, Mahanil S, Frenkel O, Milgroom MG, Cadle-Davidson L (2011)** Identification of Race-Specific Resistance in North American *Vitis spp.* Limiting *Erysiphe necator* Hyphal Growth. *Phytopathology* 102: 83-93
- Ranf S, Wünnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P (2008)** Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *The Plant Journal* 53: 287-299
- Raschke K, Fellows MP (1971)** Stomatal movement in *Zea mays*: Shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells. *Planta* 101: 296-316
- Raschke K, Shabahang M, Wolf R (2003)** The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO<sub>2</sub>. *Planta* 217: 639-650
- Ren D, Yang H, Zhang S (2002)** Cell Death Mediated by MAPK Is Associated with Hydrogen Peroxide Production in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 277: 559-565
- Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R (2002)** CO<sub>2</sub> provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant Journal* 32: 65-75
- Roelfsema MRG, Hedrich R (2005)** In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* 167: 665-691
- Roelfsema MRG, Hedrich R (2009)** Stomata. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd

- Roelfsema MRG, Hedrich R (2010)** Making sense out of  $\text{Ca}^{2+}$  signals: their role in regulating stomatal movements. *Plant Cell and Environment* 33: 305-321
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R (2004)** ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant Journal* 37: 578-588
- Roelfsema MRG, Prins HBA (1998)** The membrane potential of *Arabidopsis thaliana* guard cells; depolarizations induced by apoplastic acidification. *Planta* 205: 100-112
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R (2001)** Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J* 26: 1-13
- Saitou N, Nei M (1987)** The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425
- Saji S, Bathula S, Kubo A, Tamaoki M, Kanna M, Aono M, Nakajima N, Nakaji T, Takeda T, Asayama M, Saji H (2008)** Disruption of a Gene Encoding  $\text{C}_4$ -Dicarboxylate Transporter-Like Protein Increases Ozone Sensitivity Through Deregulation of the Stomatal Response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 49: 2-10
- Sasaki T, Mori IC, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y (2010)** Closing Plant Stomata Requires a Homolog of an Aluminum-Activated Malate Transporter. *Plant and Cell Physiology* 51: 354-365
- Scherzer S, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Geiger D, and Hedrich R (2012)** Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels. *Mol. Plant* first published online August 29, 2012 doi:10.1093/mp/sss084
- Schroeder JI, Hagiwara S (1989)** Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338: 427-430
- Schroeder JI, Keller BU (1992)** Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 5025-5029
- Schroeder JI, Schmidt C, Sheaffer J (1993)** Identification of High-Affinity Slow Anion Channel Blockers and Evidence for Stomatal Regulation by Slow Anion Channels in Guard Cells. *The Plant Cell Online* 5: 1831-1841
- Seifi A, Nonomura T, Matsuda Y, Toyoda H, Bai Y (2012)** An avirulent tomato powdery mildew isolate induces localized acquired resistance to a virulent isolate in a spatiotemporal manner. *Mol Plant Microbe In* 25: 372-378
- Shimazaki K-i, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007)** Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology* 58: 219-247
- Shirasu K, Lahaye T, Tan M-W, Zhou F, Azevedo C, Schulze-Lefert, P (1999)** A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99: 355-366
- Silva DM, Batista LR, Rezende EF, Fungaro MHP, Sartori D, Alves E (2011)** Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 761-773
- Stange A (2010)** Beziehung zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und Aktivität der S-Typ Anionenkanäle in Schließzellen. Fakultät für Biologie. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

- Stange A, Hedrich R, Roelfsema MR (2010)** Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization. *Plant J* 62: 265-276
- Stephens AE, Gardiner DM, White RG, Munn AL, Manners JM (2008)** Phases of Infection and Gene Expression of *Fusarium graminearum* During Crown Rot Disease of Wheat. *Mol Plant Microbe In* 21: 1571-1581
- Studier JA, Keppler KJ (1988)** A Note on the Neighbor-Joining Algorithm of Saitou and Nei. *Mol Biol Evol* 5: 729-731
- Suh SJ, Wang Y-F, Frelet A, Leonhardt N, Klein M, Forestier C, Mueller-Roeber B, Cho MH, Martinoia E, Schroeder JI (2007)** The ATP Binding Cassette Transporter AtMRP5 Modulates Anion and Calcium Channel Activities in *Arabidopsis* Guard Cells. *Journal of Biological Chemistry* 282: 1916-1924
- Takemoto D, Hardham AR (2004)** The Cytoskeleton as a Regulator and Target of Biotic Interactions in Plants. *Plant Physiology* 136: 3864-3876
- Takken FLW, Joosten MHAJ (2000)** Plant Resistance Genes: Their Structure, Function and Evolution. *European Journal of Plant Pathology* 106: 699-713
- Taylor DE, Hou Y, Turner RJ, Weiner JH (1994)** Location of a potassium tellurite resistance operon (tehA tehB) within the terminus of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 176: 2740-2742
- Tena G, Boudsocq M, Sheen J (2011)** Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 519-529
- Thomma BP, Nurnberger T, Joosten MH (2011)** Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23: 4-15
- Tsuba M, Katagiri C, Takeuchi Y, Takada Y, Yamaoka N (2002)** Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiol Mol Plant P* 60: 51-57
- Underwood W, Melotto M, He SY (2007)** Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol* 9: 1621-1629
- Underwood W, Somerville SC (2008)** Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *Journal of Experimental Botany* 59: 3501-3508
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J (2008)** SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452: 487-491
- Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Lindgren O, Salojärvi J, Loog M, Kangasjärvi J, Kollist H (2010)** Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *The Plant Journal* 62: 442-453
- Wachter RM, Elsliger MA, Kallio K, Hanson GT, Remington SJ (1998)** Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 6: 1267-1277
- Walters DR, Boyle C (2005)** Induced resistance and allocation costs: What is the impact of pathogen challenge? *Physiol Mol Plant P* 66: 40-44

- Walters D, Heil M (2007)** Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol Mol Plant P* 71: 3-17
- Wan J, Zhang S, Stacey G (2004)** Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Molecular Plant Pathology* 5: 125-135
- Wan J, Zhang X-C, Stacey G (2008)** Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signaling & Behavior* 3: 831-833
- Wang J-M, Liu H-Y, Xu H-M, Li M, Kang Z-S (2012)** Analysis of differential transcriptional profiling in wheat infected by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using GeneChip. *Molecular Biology Reports* 39: 381-387
- Ward JM, Maser P, Schroeder JI (2009)** Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annu Rev Physiol* 71: 59-82
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009)** Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191
- Weber I, Aßmann D, Thines E, Steinberg G (2006)** Polar Localizing Class V Myosin Chitin Synthases Are Essential during Early Plant Infection in the Plant Pathogenic Fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online* 18: 225-242
- Weidenbörner M (2000)** *Lexikon der Lebensmittelmykologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Withers CM, Gay AP, Mur LAJ (2011)** Are stomatal responses the key to understanding the cost of fungal disease resistance in plants? *J Sci Food Agric* 91: 1538-1540
- Wolf T, Heidelmann T, Marten I (2006)** ABA regulation of K(+)-permeable channels in maize subsidiary cells. *Plant Cell Physiol* 47: 1372-1380
- Wolter M, Hollricher K, Salamini F, Schulze-Lefert P (1993)** *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Molecular and General Genetics MGG* 239: 122-128
- Wright AJ, Thomas BJ, Carver TLW (2002)** Early adhesion of *Blumeria graminis* to plant and artificial surfaces demonstrated by centrifugation. *Physiol Mol Plant P* 61: 217-226
- Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, Voytas DF (2005)** High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *The Plant Journal* 44: 693-705
- Würtele M, Jelich-Ottmann C, Wittinghofer A, Oecking C (2003)** Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J* 22: 987-994
- Wuest SE, Vijverberg K, Schmidt A, Weiss M, Gheyselinck J, Lohr M, Wellmer F, Rahnenführer J, von Mering C, Grossniklaus U (2010)** *Arabidopsis* Female Gametophyte Gene Expression Map Reveals Similarities between Plant and Animal Gametes. *Current Biology* 20: 506-512
- Yamaoka N, Matsumoto I, Nishiguchi M (2006)** The role of primary germ tubes (PGT) in the life cycle of *Blumeria graminis*: The stopping of PGT elongation is necessary for the triggering of appressorial germ tube (AGT) emergence. *Physiol Mol Plant P* 69: 153-159
- Zabka V, Stangl M, Bringmann G, Vogg G, Riederer M, Hildebrandt U (2008)** Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus. *New Phytologist* 177: 251-263

- Zeng W, He SY (2010)** A Prominent Role of the Flagellin Receptor FLAGELLIN-SENSING2 in Mediating Stomatal Response to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 in Arabidopsis. *Plant Physiology* 153: 1188-1198
- Zhang X, Wang H, Takemiya A, Song CP, Kinoshita T, Shimazaki K (2004)** Inhibition of blue light-dependent H<sup>+</sup> pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol* 136: 4150-4158
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song CP (2001)** Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol* 126:1438-1448
- Zhang Z, Henderson C, Perfect E, Carver TLW, Thomas BJ, Skamnioti P, Gurr SJ (2005)** Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Molecular Plant Pathology* 6: 561-575
- Zhu S-Y, Yu X-C, Wang X-J, Zhao R, Li Y, Fan R-C, Shang Y, Du S-Y, Wang X-F, Wu F-Q, Xu Y-H, Zhang X-Y, Zhang D-P (2007)** Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 19: 3019-3036
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T (2004)** Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767

## 8. Anhang

### Sequenzen und Vektorkarten

Die in der Arbeit verwendeten Gerstensequenzen sind hier im FASTA-Format mit Angabe der Quelle aufgelistet. Alle weiteren Sequenzen wurden mit ihrer „Accession number“ der NCBI-Datenbank oder der Quellenseite angegeben.

#### Gersten Sequenzen:

National Institute of Agrobiological Sciences, Japan, Dr. Matsumoto

Der Beginn und das Ende der kodierenden Sequenz sind durch fett gedruckte Buchstaben, die für die Expressionsanalysen verwendeten Bereiche durch graue Buchstaben angegeben.

>NIAS Hv1008D01, cDNA 2006bp

```
CGAGGTCGAGGGCCAAATCGGCCATCACGGGGAACACCCGAGTTCTTGCTGCCGCCGAGTAG
CTAGCTTCGACCGGGATGGCGGGAGCGGAGCCATCGTCGTCATCGGCCGGGCAATGGCCAGCA
CGCGGCGGTGGACATCCGCGTGGCGGCGGCGGCGGCCCGAGGAGCCGAGGCAGACGTCCA
TGAGCGGGCCGCTCAACCTCCGGAGCGACCGGAGGCCGCCGCCGGCCGCAGAGGGCCTTCAG
CCGGCAGGTGTCCCTGGGCAGCGGCGTGACGGTGATGGGCATGGACAGAGGCGGGAGGAGCG
GCGGCGGCAGGCCCGGGCAGCGCGCGCTCCCGCGCAGCGGCAAGAGCCTCGGGGTGCTCAAC
CACAGCGGCGGCCTCGGCCCGGACGGCGGCGCGCAGGAGCGGCGACTTCAGCATGTTCCG
GACCAAGTCCACGCTCGGCAAGCAGAACTCCATGCTGCCGTCGAGGATCAAGGAGGAGCTCG
ACAGCGTCGACCTGGACCACGTCGAGGGCCAGCCCGCCGGCAGGCCTGCCGACGTGGACCCT
CTCAACAAGAGCGTCCCCGCCGGCCGCTACTTCGCCGCCCTCCGCGGCCCCGAGCTCGACGA
AGTCCGCGACTACGAGGACATCCTGCTGCCAAGGACGAGGTGTGGCCGTTCTGCTGCGGT
TCCCGATCGGCTGCTTCGGCGTCTGCCTGGGGCTCGGCAGCCAGGCCATCCTGTGGGGCGCG
CTGGCGGCGAGCCCGGCGATGGGGTTCCTCCGCGTGACGCCCATGATCAACGTCGCCGTGTG
GCTGCTGGCGACGGCGGTGCTCGTGGCCACCTCCGTCACCTACGCGCTCAAGTGCCTTCT
ACTTCGAGGCGATCCGGCGCGAGTTCTTCCACCCGGTGCGCGTCAACTTCTTCTCACGCCG
TCCATCGCCGCCATGTTCTCGCCATCGGCCTGCCCGCGCCTTCGCGCCGGCGAGGCTGCA
CCCGGCCGTCTGGTGC GCGTTCGTGGCGCCGCTCTTCGCGCTGGAGCTCAAGATCTACGGGC
AGTGGCTGTGGGCGGCAAGCGGCGGCTGTGCAAGGTGGCCAACCCGTCGTCGCACCTGTCC
GTGGTGGGCAACTTCGTGGGCGCCATCCTGGCGGCGAGGGTCGGGTGGGAGGAGGCCGGCAA
GTTCTCTGGGCCATCGGCGTCTCCACTACATCGTCGTCTTCGTCACGCTCTACCAGCGCC
TGCCCATCAACGAGGCGCTGCCATGGAGCTGCACCCGGTCTACTCCATGTTTCATCGCCAG
CCCTCCGCCCGCCGGCCTCGCCTGGGCCGCCATCTACGGCAGCTTCGACGCCGTGCGCGCAC
CTTCTTCTTCATGGCGCTCTTCTCTACATGTCACTCGTTCGTCGTCATCAACTTCTTCCGTG
GCTTCCGGTTCCTCATCGCATGGTGGTCTACACGTTTCCCATGACGACGGCGTCGCTGGCC
ACCGTCAAGTACGCCGAGGCCGTGCCGTGCTTACGAGCAGAGCCCTCGCGCTGAGCCTGTC
CCTCATGTGACGACCATGGTGTGCTGCTGCTCGTGTGACGCTCCTGCACGCCTTCTACT
GGCGGTGCTCTTCCCAACGACCTGGCCATCGCCATACCAAGGACCAGGCGGGCGGCGCG
GGGAGGCCGCACGGCAAGGGGAGGAAGGCCGGCAAGAGGGTGAACGACATCAAGCGGTGGGC
CAAGCAGGTGCCGCTCTCGGTGCTCTCCTCCATCACCAAGACCAACTCTGCAGACAAGGAGG
AAGAGGAGAAAAACAGACTTAGTTGTATATATATATATACAGTAGCATATATGTGATTAAACAGC
ATTACAGGATTCCATGGCTTGATCGGCATAAATAAGACACTTGCTACTACATGGAATTATCA
ACTGTAGTAAGCTAGAGCTAGAAGGAACACAGTACTACTATTTATGGATTGATCAAAAAAAAA
AAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

>NIAS Hv1132L02, AK361113.1, cDNA 2506bp

GGAGAACCCTAGTGCCAGTTAACGAGCCAGTCATCTCCTTCCCTCCCCTTGCCCACCAAGAA  
 AAGAAAAGAGAGCCTGCAGCACATTGTTCCCTCGGTCAGATCAAACCTTATCGTCGTCGCTGC  
 TTTCGCATCTCGCAGCTCCGTCGGGCTCGGAAGAGCGCCGCTGCCGTTGGCACCAGCGCGCGC  
 AGTCCATCAAGTTGCACGGCAGGAAGCTTGGAGAGTAGCGGCCCGGCACTACTTTCGCCAGGC  
 TTCTTGATCGGT**ATG**GAGTTGAGCAACAAAGAGGTCCAGATCCAAATGCCACCCAGCTGAA  
 CGAGAGGTCATCCAGAGAAGACCTCCCGTCGCTGCTCATCCAGGTTCCGTCGCGGACCATCG  
 CCGGCTTCGACTGCGTCGGCCGGGACGCCGCTCCTCCGCCTCCCTGCACCTGCACGAGCAC  
 AACACAGGGACACTGTCATTAGCATCCAGGCGCCGGCGACCCACCGGCAGCTGCCCTGT  
 GCCCGGTACGACGACGCGCAGATAACCCTACTCCCTTTCGTCAGCATGCCGGCGTCGCCGT  
 CGGGGTTGCACTTTTCGCAGTTCAGGGCGGCGGCCGTCGCCGCAACGAGGCGCGCGCGGCA  
 GTGGCAGTGGCACCCTCTGACAGCAAGCCGGTCGGGCAGGTGGAGGTGCACCCGCCGCGGCT  
 GCTGGAGCAGACGCGGTTCCACTCGCAGCCGATCCTCCATGCGTCCAGATGAACGAGGGGA  
 CGCGGAGGGCCGACAGCACGCGCGACAAGCGGTTTCGATCCGTTCAAGACCTTCTCCGGCCGC  
 CTCGAGCGGCAACTCTCCAACCTGCGCGGCCGGCCGCTGGACCCCATGGACCTCGGCTCCCA  
 CCATTCCAAGATCTCCGAGGAGACCGACCAGGTTCCCGGCACCGACCGCTACTTCGACGCC  
 TGGAAGGCCCCGAGCTCGACACCCTCAGGGCGACGGAGGTAGCGGTGCTGCCCAAGGACGAG  
 AAGTGGCCGTTTCTGCTGCGGTTCCCGATCAGCGCGTTCGGGATGGTGCTCGGCGTGAGCAG  
 CCAGGCGATCCTGTGGAAGACGCTGGCGTCAGCGCCGCCGACGGCGTTCCTGCACGTGAGCC  
 TCGTGGTGGCCACGCACTGTGGTACATCTCGCTGGCGCTGATGGGCCTCGTGTCTCCATC  
 TACCTGCTCAAGATCGTCTTCTACTTTCGAGGCGGTCCGGCGCGAGTTCTACCACCCTATACG  
 CGCCAACCTTCTTCTTCGCGCCGTGGATCGCCTGCCTTTCCTCGTGACGGGCGCGCCGCGGG  
 AGCTGGCCGAGGTGCACCACGGCGTCTGGTACATGCTCATGGCGCCCATCTTCTGCCTCGAG  
 CTCAAGATCTACGGCCAGTGGATGTCCGGCGGCCAGCGTCCGTTGTCCAAGGTGGCCAACCC  
 GTCCAACCACCTCTCCATCGTCGGCAACTTTGTGGGCGCGTTGCTGGGAGCCAAAATGGGCA  
 TCCGCGAGGGGCCCATCTTCTTCTTCGCCATCGGGCTTGGCGACTACACTGTCTCTTTCGTC  
 ACGTCTTACCAGCGCCTCCCCACCAACGTACGCTCCCCAAGGAGCTACACCCGGTCTTCTT  
 CCTCTTCGTTGCCGCGCCAGCGTTCGCTCCATGGCTTGGGCCAAGATCAACGGCGAGTTCG  
 ACAACGGGGCACGGATAGCCTACTTTCATTGCGCTCTTTCCTTTACATGTGCTGGCCGTGCGG  
 ATCAACTTCTTACAGGATTCCGCTTCTCGCTGGCGTGGTGGGCTACACGTTCCCGATGAC  
 CGGCGCATCGATCGCCACCATAACGTACGCGACGGAGGTGACCAACGTGCTGACGCGGACGC  
 TGTCCATCGGCCTCTCGGGCATTGCCACCGTCACCGTAGCCGGCCTGCTGGTGACCACCATG  
 TTCCACGCCTTCGTGCTCAGGGACCTTTTCCCAACGACGTCTCCATCGCCATCACCCGGAG  
 GAAGCCCAAGTTCAGCAAGATCCTCGCGCACTTCCGCTCCTCCAGCTCCGACATGAAGGAGC  
 TCGTGTCTTCCGTCTCCAAGTCGCCCAACACCGACTCCGATTCTTCGGTGCTGGGCTCCACA  
 GACACCCATCCGGCCGTCACCAAAGGCAAAGCCGAGCCG**TAG**AGCGACAGAGCGACACCCCG  
 CGCGCTCTCTCGCGCATGCCTAGCTGTACATAATTATTTTCAGTCTCTTGGACAAGATGAGCT  
 TGAGAGGTGAGAGCAGAATGGAAGCATGCAGCTGGTCGGCGTGAGACCGTGAGTGCACATAC  
 TACCGTTCGAAGGCATGGGTGTATATCCTTGGAGCAAATTTTGTGGTGATGAGGGTATAATG  
 TGAGGCACGTAGGTTCGATCGATCTGTGTATAAGTCTACGGATATATATCACGAATAAAACAA  
 CAAACAATGTGTGGAACCTGCAGATTTGTTTGGATGATTACAGCGTACAACATTTATCTACTC  
 CGTCGGTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>NIAS Hv2067E12, AK368060.1, cDNA 2191bp

GACACTGGCTACAGGTCTGGAGCC**ATG**GAAAGCCAACACAAGCAGCAAGACCGGCGAGGTGCC  
 GTCCCTCCTCGCCAACGTTGAGGTTTCCCATCTCGACGGCTTCGATACGACGAGCACCCCGT  
 TACCGAGCCCCAAACCGGTGCTTACCCCCGCCCCCGCCGGATGCGGCCGCCGGACCGCGTG  
 GCTCCGCGCAGCGAGGCGGTGCTCCAGCTTTCGACTCGCGGTTCAACCCGCCGGGGATGCG  
 CTCGGGCCACCCGGTGTCTATCAGCCTGCCGTCGTCGCCGACCGGCTTCGAGCCCTCG  
 TGGCGCCCGGCGGTGACTTGCACGAGCGGAAGCAGGCCATGCCTAACGCGGCACAGGAGCCG

GCGAAGCACGTGAGGTTTCGTGCAGCAGCCGCACAAGCTGATGTTCCGGTTCGACGCCGATCCC  
 CGGCGGGGTGCCACCCACGGCGTGAGACGGATCAGTAGCAGGACGATGAACCGGGACAAGC  
 GCTACGACTCGTTCAAGGCGTTTTCCGGGAAGCTGGAGCGGCAGATCACCCATCTAGCCGGC  
 GGCGGCGTGCCGGCTAGTACCCCGAGGAGGAGGAGTTGGCTCAGGGACAGGGAGAAGCCGT  
 GAGTAGCGAAAATGTTGATCACTTCTTCGCCGACTGGAGGGGCCCGAGCTGGACAAACTCA  
 AGTCGTCCGAGGAGCTGGCGCTGCCGGCGGACAAGAAGTGGCCGTTCCCTGCTCCGATTCCCC  
 ATTTCCGGCATTTCGGTATGTGCCTTCGGGGTTCAGCAGCCAGGCGATCCTGTACAAGACGATCGC  
 AACGGCGGCGCCGACCGAGTTCCTGCACGTGAGCCCCAAGGTGAACCTGGTGCTTTGGTACA  
 TCTCCGTGGTGCTCATGTCCATCATCACGGCCGTCTACGCATTCAAGATCATCTTCTTCTTC  
 GAGGCGGTCCGTTCGCGAGTACTACCACCCCATCCGTGTCAACTTCTTCTTCGCGCCGTGGAT  
 CGCATGCCTGTTCCCTGGCCATGGGTGTGCCCCCTCGGTTCACCACCCAGCTGCCTGCCTGGC  
 TATGGTACGCGCTCATGTCTCCGGTGTGTGCCTGGAGCTCAAGATCTACGGGCAATGGATG  
 TCTGGTGGGCAGAGGCGGTGTCCAAGGTGGCCAACCCGTCCAACCACCTGTCCGTGGTGGG  
 CAACTTCGTTGGAGCGCTGATGGGCGCGTCCATGGGGCTCAAGGAAGGTCCCATCTTCTTCT  
 TTGGCGTTCGGGATGGCGCACTACACCGTGTGTTTCGTGACGCTGTACCAGAGGCTGCCACC  
 AACGCGACGCTGCCCAAGGACCTGCACCCGGTTTTCTTCTCTTCGTGGCGGCGCCGAGCGT  
 GCGTCCATGGCGTGGGCCAGGATCGTGGACGAGTTCGGCGTTCGGGGCCAAGCTCGTTACT  
 TCATCGCCATGTTCTCTACGCGTTCGCTCGCCGTCCGGATCAACTTCTTCAGAGGGTTCAGG  
 TTCTCGCTGTGTTGGTGGGCTACACGTTCCCGATGACCGGCGCCTCCATCGCATCCATCCG  
 GTACGCCACCGTGGTGGACAACGCCTTCACCAAGGCGCTGTGCCTAGGGCTGTGCTGCTGG  
 CCACGCTCACCGTGACGGGCCTCTTCGCCACCACCATGGTGCACGCCTTGGTGTTCACAAC  
 CTTTTCCCAACGACATCGCCATCGCCATCACGGACCGCAAGATGAAGCCTATCATGGAGCT  
 GCAGGAGAGTGGCAAGGACGACGACAGCCTCTCCGGCAGCAGCTGCAGCAAGGACATCGAGG  
 CCGGCGCCACTGCCGCGTAGCACCACAAGCT**TGAAC**GAGTGCCTGCACGATATATCATATA  
 CGAGTATGTGCGTGGAACTAGAAATCAAAGATGATGGCACCAACCATCGGCCACTTGGTGGC  
 ATACACAAGTTTCGCTTCCGCTGTACAGTACAAAACGGAGAGCAGCTGTCCACAACAGTCACT  
 GCCATAGAATAAGCAAGCAAGGTCCGTTTTGGAATTGCGACAATCTCACTGGAAACATGAGTT  
 TTGTTTCAAGAATCATAACGGCACCTCTCCTCTTCTAGGCCCAAATGAGTAGATAGCGTCCAT  
 GCATCTGCCGTCCACTTTCGATTTCTGCTTCTCCACTCCTAAATATAAAATCTTTTTTACAG  
 ATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>NIAS Hv3105L09, AK375807.1, cDNA 2469bp

AAATGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAGATGTGTAACATAACGGTCCTAAGG  
 TAGCGAGTCGAGGTCGAGGGCCAAATCGGCCATCACGGGGCAGCTGGTTTTGGCTTCAGTTC  
 CAGTACCAGTGGCACCCAACCTGAAGAATAGCCGAGCAACTGACGATAGATAGATAACGTCAG  
 GTTGCAAAGTTTGTCTCTCGTAAGATTTCTCGAGGTT**GATG**GAGACGGACGAATCTGTGCGAC  
 AGTGGGCGCCGGTGTCTCGCGCCCGGCGAGCCGATCCGCCGTGGAGCAGGCCTTCAGGGAG  
 CGGCATGACGACCCGATGATGGCGTCCCCGGACCAAGACTCGCCGTTTCGACGCGTCCGCGCT  
 GCGCGTTCGCGGCGCACCCGGTCTCCGTACGCTGCCGGCCTCTCCGTCCAGTTTCGACGCCG  
 CCCGGACGGAGGCGGGGTTCCCGCCGCGCCACGCTCCCGCGTTCGCGCATGCTGTCCCTCCCG  
 CCGCGGCCGCGCCGATGGTGTCCGTTCGCGTTCGAGCACCTGGAGGTGGTGTTCGCTCTCA  
 GCCGATCGCCGCGGCGGCCTCCGAGCTGCCAGCGCCAGGACTCACAGTCCCAGGTGCTGC  
 ACGACGACTCGATGAGCCGCGGGAGCGGGGCGCGCATGGGGACGAGCAAGGCGCGGAGGGAC  
 ACGAGCTATGACTCGTTCAAGACGTGGTCCGGGAAGCTGGAGAAGCAGCTGACCACCCACCT  
 CCGCGTTCGTCAGGCAGCCACAGCCGCGAGGAGGCTGAGCCCAGGAAGACGACGGCGCGGCGA  
 CGAGCGGCCCGCCCTGCTCCATGCCAGAGTCCAGCGCTTCTTCGCGGGCGCTGGAAGGCCCC  
 GAACTCGACAAGCTACGGTTCGTTCGAGGAGCTCGTCTTCCGTTCGAACAAGACGTGGCCGTT  
 TCTGCTCCGGTTCCCGGTGTTCGGCCTTCGGCATGTGCCTCGGCATGAGCAGCCAGGCCATCC  
 TGTGGAAGAACATCGCCATCTCGGCGTCCACGCGGTTCCCTGCACATCACGCTCCGGACAAAC  
 CTCGTGCTGTGGTGCCTGTTCGGTGGCGCTCATGTGCTTGGTGTTCGGCGCTGTACGCGTGCAA  
 GGTCATCTTCTACTTCGAGGCGGTGCGGCGGGAGTACTACCATCCGATCCGCGTCAACTTCT  
 TCTTCGCGCCGTGGATCGCCTGCCTCTTCTTGGCCATCGGCGTTCGGGAGCTGGTGTGGAG

AGCCTGCCGCACTGGCTCTGGTACGTGCTCATGGCCCCATCGTGTGCCTGGAGCTCAAGAT  
 ATACGGGCAATGGATATCCGGCGGGCAGAGGCGGCTGTGAGGGTGGCGAACCCGTCCAACC  
 ACCTGTCCATCGTCGGCAACTTCGTCGGCGCGCTGCTGGGGGCCATCATGGGGTTGAGGGAG  
 GGCCCCATCTTCTTCTTCGCCGTCGGGCTCGCGCACTACATCGTGTGTTTCGTGACGCTGTA  
 CCAGCGGCTGCCACCAGCGAGACGCTGCCGAGGGACCTCCACCCGGTCTTCTTCTTCTTCG  
 TGGCCGCGCCAGCGTCGCCTGCCTCGCCTGGGCGCGGATCACCGGCGAGTTCGGCTACGGC  
 TCCCGCATCGCCTACTTCATCGCCATGTTTCTTCTACGCCTCGCTGGCCGTGCGGATCAACAT  
 GTTCAGGGGGTTTTCAGTTTCTCGCTGGCGTGGTGGGCGTACACGTTCCCGATGACCAGCGCGG  
 CCATCGCGTCGATACTACTCGTCGGAGGTGAAGAAAGCCTTCACGCAGGCCATGTGCATC  
 GTGCTGACCGTGGGGGCCACGCTCACGGTGACGGCGCTCCTCCTGACCACGGGTTGCACGCC  
 ACCGTGCACCACGACCTCTTCCCCAACGACATCTCCATCGCCATCACGGAGCGCAGGCCCAA  
 GCACAGCACCATCGCCGAGCT**TAA**ACGAGCTGCACGCCAACAAAGGACGCCGACGCCGCATGCA  
 GAGACCTCGAAGCCGCTATAGACCATGATCGGATCGACGCCGACTGGATTCTTCATGCATG  
 TGACGGAGCAAACCGGTGGCGACTGGTTGGTTCGATCGTGCATACCGAGCAGGAGCACGCAG  
 TACGTAGCCTGGACGTGTCTTCGAGAGTTGTCTGTGGCTCGAATTGACTGCCGTGCGGGGCA  
 GTGCGCTCTCGGAGTCGGGATCAGCACGTACGTACGTAGCTAGCTGATGGGAATGTGCTATA  
 TGTTGCAACTCTCATTAAAGTATAATCTAGAAAAATACGGCAGCTAAAACATAGTCGCTATAA  
 TCATAGTGAATCATCAAATCAAGTACTTGATGTAAGTAGTCATGTAGTCATGCATACATAAC  
 AGACGGCCATCCTATGCATATCGATAGGCAAAAATAGTAGACCGAATGGGCGCAATCTTCCC  
 TAATAATAAAACGACGATCGCTTCGGCGTTTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAA

Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Dr. Schweizer  
 Der Beginn und das Ende der kodierenden Sequenz sind durch fett gedruckte Buchstaben  
 angegeben. Die Introns des Gens wurden durch eine graue Schriftfarbe markiert.

>HVVMRXALLhA0548D01\_c2, BAC-Fragment, gDNA, 2154bp  
 GGCGCTGGACGGCGACGCCGCAACATTTTCGAGAACACCCGAGTTCTTGCTGCCGCGGAGTA  
 GCTAGCTTCGACCGGG**ATG**GCGGGAGCGGAGCCATCGTCGTCATCGGCGGGCAATGGCCAGC  
 ACGCGGCGGTGGACATCCGCGTGGCGGCGGCGGCGGCCCGAGGAGCCGAGGCAGACGTCC  
 ATGAGCGGGCCGCTCAACCTCCGGAGCGACCGGAGGCCGCCGCCGCGCAGAGGGCCTTTCAG  
 CCGGCAGGTGTCCCTGGGCAGCGGCGTGACGGTGTGGGCATGGACAGAGGCGGGAGGAGCG  
 GCGGCGGCAGGCCCGGGCAGCGCGCGCTCCCGCGCAGCGGCAAGAGCCTCGGGGTGCTCAAC  
 CACAGCGGCGGCTCGGCCCGGACGGCGGCGCGCAGGGGCGGCGACTTCAGCATGTTCCG  
 GACCAAGTCCACGCTCGGCAAGCAGAACTCCATGCTGCCGTCGAGGATCAAGGAGGAGCTCG  
 ACAGCGTCGACCTGGACCAGTCGAGGGCCAGCCCGCGGCAGGCTGCCGACGTGGACCCT  
 CTCAACAAGAGCGTCCCCGCCGCGCTACTTCGCCGCCCTCCGCGGCCCGGAGCTCGACGA  
 AGTCCGCGTAAGCCATCCATCCATCTTTGTCCCTGCTTGCCGATCACCAAGGACGAAGCCTA  
 CGTAGTACAAAAATGAAAAATCACACCGACTGACCGGAGTTTTTGCACGTAGGACTACGAGG  
 ACATCCTGCTGCCAAGGACGAGGTGTGGCCGTTTCTGCTGCGGTTCCCGATCGGCTGCTTC  
 GGCGTCTGCCTGGGGCTCGGCAGCCAGGCCATCCTGTGGGGCGCGCTGGCGGCGAGCCCGGC  
 GATGGGGTTCTTCCGCGTGACGCCATGATCAACGTCGCCGTGTGGCTGCTGGCGACGGCGG  
 TGCTCGTGGCCACCTCCGTACCTACGCGCTCAAGTGCCTTCTACTTTCGAGGCGATCCGG  
 CGCGAGTTCTTCCACCCGGTGCGCGTCAACTTCTTCTTACGCCGTCCATCGCCGCCATGTT  
 CCTCGCCATCGGCCTGCCCGCGCCTTCGCGCCGGCGAGGCTGCACCCGGCCGTCTGGTGCG  
 CGTTCGTGGCGCCGCTCTTTCGCGCTGGAGCTCAAGATCTACGGGCAGTGGCTGTGCGGGCGC  
 AAGCGGCGGCTGTGCAAGGTGGCCAACCCGTCGTCGCACCTGTCCGTGGTGGGCAACTTCGT  
 GGGCGCCATCCTGGCGGCGAGGGTTCGGGTGGGAGGAGGCCGGCAAGTTCTTCTGGGCCATCG  
 GCGTCTCCCACTACATCGTTCGTCACGCTCTACCAGCGCCTGCCACCAACGAGGCG  
 CTGCCCATGGAGCTGCACCCGGTCTACTCCATGTTTCATCGCCACGCCCTCCGCCGCCGCGCT  
 CGCCTGGGCGCCATCTACGGCAGCTTCGACGCCGTGCGCGCACCTTCTTCTTTCATGGCGC  
 TCTTCTTCTACATGTCACTCGTTCGTCGCGCATCAACTTCTTCCGTGGCTTCCGGTGGAGCACA

CCATGCACCCCATCCATCCGCTTGTACCACCGACCAACTGACGACGATCATTTCGCACAGGTT  
 CTCCATCGCATGGTGGTCTTACACGTTTCCCATGACGACGGCGTCGCTGGCCACCGTCAAGT  
 ACGCCGAGGCCGTGCCGTGCTTACGAGCAGAGCCCTCGCGCTGAGCCTGTCCCTCATGTGC  
 ACGACCATGGTGTGCTGCTGCTCGTGTGACGCTCCTGCACGCCTTCTACTGGCGGTGCT  
 CTCCCCAACGACCTGGCCATCGCCATCACCAAGGACCGGCAGGGCGGCGGGGAGGCCGC  
 ACGGCAAGGGGAGGAAGGCCGGCAAGAGGGTGAACGACATCAAGCGGTGGGCCAAGCAGGTG  
 CCGTCTCGGTGCTCTCCTCCATCACCAAGACCAACTCTGCAGACAAGGAGGAAGAGGAGAA  
 AACAGACTAGTTGTATATATATTATACAGTAGCATATATGTGATTAAACAGCATTACAGGAT  
 TCCATGGCTTGATCGGCATAAATAAGACACTTGCTACTACATGGAATTATCAACTGTAGTAA  
 GCTAGAGCTAGAAGGAACACAGTACTACTATTTATGGATTGATCAC

NCBI-Datenbank:

*Hordeum vulgare*:

>HvActin2/7 cDNA, AY145451, 1421bp

GAATTCATTCTGTAGGAAATGGCTGACGGTGAGGACATCCAGCCCCTTGTCTGCGACAATG  
 GAACCGGAATGGTCAAGGCTGGTTTCGCTGGAGATGATGCGCCAAGGGCTGTTTTCCCTAGC  
 ATAGTTGGTTCGCCCTCGGCACACTGGTGTGATGGTAGGGATGGGGCAGAAGGATGCTTATGT  
 TGGTGATGAGGCGCAGTCCAAGAGAGGTATCCTCACGCTCAAGTACCCCATCGAGCACGGTA  
 TCGTAAGCAACTGGGATGACATGGAGAAAATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCTCCGT  
 GTGGCACCCGAGGAGCACCTGTGTTGCTCACTGAGGCCCTTTGAACCCAAAAGCCAACAG  
 AGAGAAGATGACCCAGATTATGTTTTGAGACTTCAATGTTTCTGCCATGTACGTCGCTATTC  
 AGGCCGTGCTTTCCCTCTATGCAAGTGGTTCGTAATACTGGTATCGTTCTCGACTCTGGTGAT  
 GGTGTCAGCCACACTGTGCCATTTATGAAGGATACGCGCTTCCCCATGCCATTCTTCGTTT  
 GGATCTCGCTGGTCCGGATCTCACGGACTCCCTTATGAAGATCCTCACCGAGAGAGGTTACT  
 CCTTACAACTCAGCTGAGCGGAAATTGTAAGGGACATCAAGGAGAAGCTTGCCTACGTT  
 GCCCTTGATTATGAACAGGAGCTGGAGACTGCCAAGAACAGCTCCTCAGTTGAGAAGAGCTA  
 CGAGCTTCTGATGGTCAAGGTGATCACGATTGGCGCAGAGAGGTTCAAGGTGCCCTGAGGTCC  
 TCTTCCAGCCATCCATGATCGGCATGGAGTCTTCTGGAATCCACGAGACGACCTACAACCTCC  
 ATCATGAAGTGTGACGTGGATATCAGGAAGGACTTGTATGGAAACATCGTGCTCAGTGGTGG  
 CACAACATGTTCCCAGGTATCGCTGACCGTATGAGCAAGGAGATCACCGCCCTTGCTCCGA  
 GCAGCATGAAGATCAAGGTGCTCGCTCCACCTGAGAGGAAGTACAGTGTCTGGATCGGAGGG  
 TCCATCCTAGCCTCACTCAGCACTTTCCAACAGATGTGGATATCCAAGGATGAGTACGACGA  
 GTCTGGCCCAGCGATCGTCCACAGGAAGTGTCTTCTGATCTCCACGAGCGCTCCACTGCTGTT  
 ATCATCTAGTCTTCGGTTATGTTTGGTTCATTCTTCTAGAAATGTATTGCGTATTTGCAAGC  
 TATGTTTTTTTTCCAGACGTGACGTGGGTAATACTTGGGATACGCCACCTATATACGTGGCGGC  
 TCCATGGTGCAAGTGCAAGTACACTATCTATGTTTTGTGCATTGTCAGTGTGTTTGTGGGATC  
 AGTTGTCAAACCTGGGTTGGCTTGATTTGTTGTTGGGAATTGTCTGTAAAGGAATTC

*Arabidopsis thaliana*:

ACT8 Protein: AAC49523

SLAC1 Protein: Q9LD83

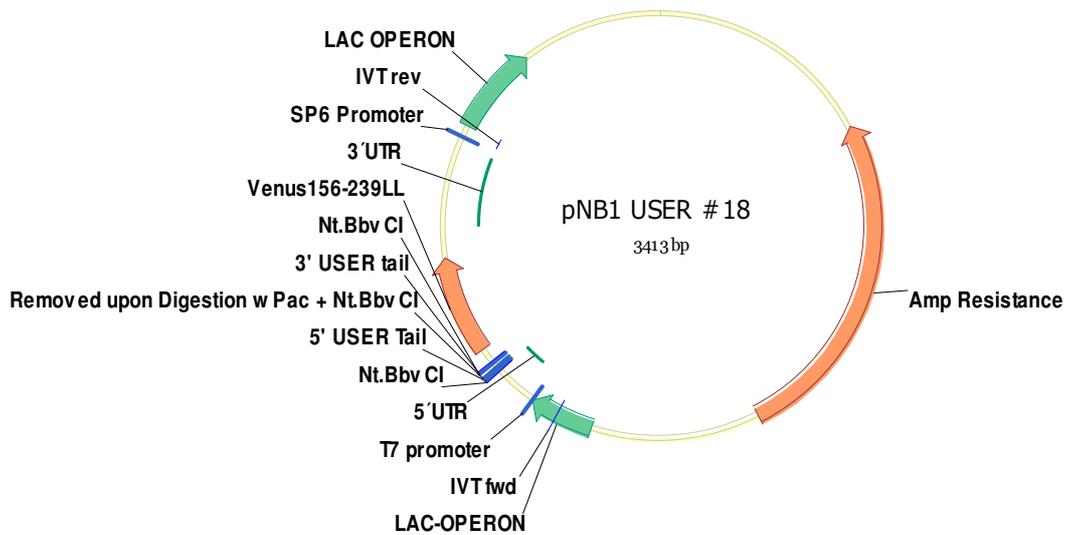
SLAH1 Protein: AEE33945.1

SLAH2 Protein: AEE85415.1

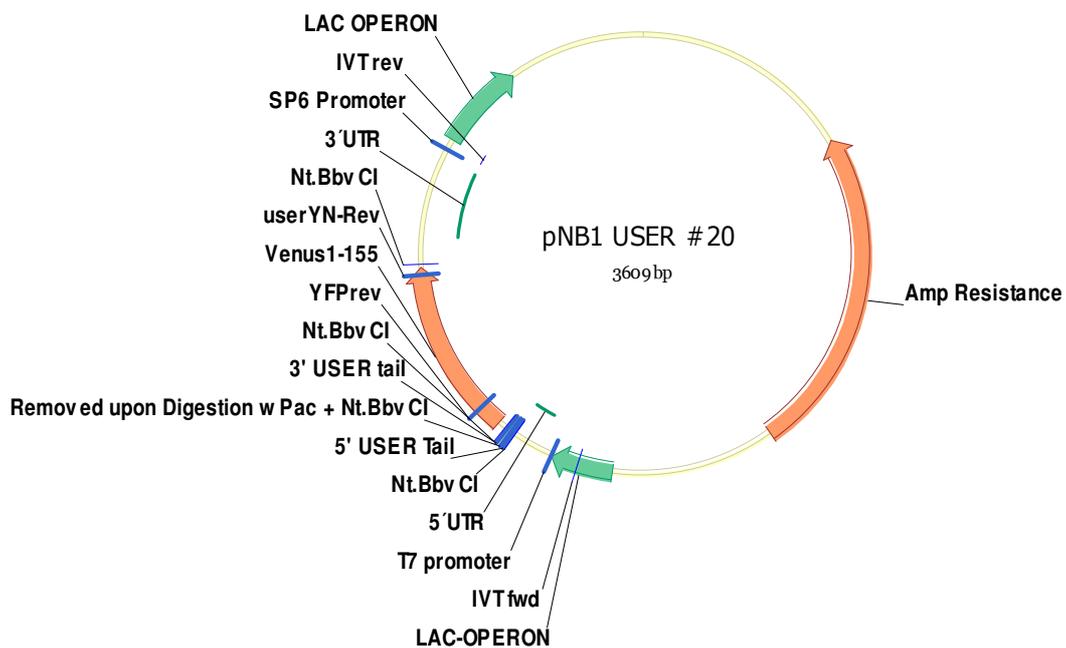
SLAH3 Protein: AED93247.1

SLAH4 Protein: AEE33943.1

Die Sequenzen der cDNAs aus *Brachypodium distachion* wurden der Datenbank der Internationalen Brachypodium Initiative (IBI) (<http://db.brachypodium.org/sequence.html>) entnommen.



**Vektorkarte pNB1 USER #18.** Diese Vektoren werden für die Klonierung von cDNA verwendet, damit das kodierte Protein in Oozyten elektrophysiologisch untersucht werden kann.



**Vektorkarte pNB1 USER #20.** Diese Vektoren werden für die Klonierung von cDNA verwendet, damit das kodierte Protein in Oozyten elektrophysiologisch untersucht werden kann.

## Abkürzungsverzeichnis &amp; Anmerkungen

ABA	<u>A</u> bscisinsäure (engl. - <u>a</u> cid)
AGT	sekundäre Keimhype (engl. <u>a</u> ppressorial <u>g</u> erm <u>t</u> ube)
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
BiFC	<u>B</u> imolekulare <u>F</u> luoreszenz <u>k</u> omplementation (engl. <u>c</u> omplementation)
CC	Doppelwendel (engl. coiled-coil)
CEBiP	<u>C</u> hitin <u>e</u> licitor- <u>B</u> indeprotein (engl. <u>c</u> hitin <u>e</u> licitor <u>b</u> inding <u>p</u> rotein)
CERK1	<u>C</u> hitin <u>e</u> licitor- <u>R</u> ezeptor <u>k</u> inase 1
dai	Tage nach der Inokulation (engl. <u>d</u> ays <u>a</u> fter <u>i</u> noculation)
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
DEVC	engl. <u>d</u> ouble <u>e</u> lectrode <u>v</u> oltage <u>c</u> lamp
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleinsäure (engl. - <u>a</u> cid)
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> mintetra <u>e</u> ssigsäure (engl. - <u>a</u> cid)
EHM	<u>E</u> xtra <u>h</u> austorielle <u>M</u> embran
ETI	Effektor-ausgelöste Immunität (engl. <u>e</u> ffector- <u>t</u> riggered <u>i</u> mmunity)
hai	Stunden nach der Inokulation (engl. <u>h</u> ours <u>a</u> fter <u>i</u> noculation)
HR	<u>h</u> ypersensitive Antwort (engl. <u>r</u> esponse)
IPK	Leibniz <u>I</u> nstitut für <u>P</u> fanzengenetik und <u>K</u> ulturpflanzenforschung; Gatersleben
JA-Ile	Jasmonat-Isoleucin; an die Aminosäure Isoleucin gekoppelte Jasmonsäure, die als aktive Form des Phytohormons angesehen wird
LRR	<u>L</u> eu <u>c</u> in- <u>r</u> eiche Wiederholungen (engl. <u>r</u> epeats)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MES	2-(N- <u>m</u> orpholino) <u>e</u> thansulfonat
MOPS	3-(N- <u>m</u> orpholino) <u>p</u> ropansulfonat
NBS	Nukleotidbindestelle (engl. <u>n</u> ucleotide <u>b</u> inding <u>s</u> ite)
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation; Bethesda, Maryland, USA
NIAS	<u>N</u> ational <u>I</u> nstitute of <u>A</u> gro <u>b</u> iological <u>S</u> ciences; Tsukuba, Japan
Ω	Ohm
OGA	<u>O</u> ligo <u>g</u> alacturonsäure (engl. - <u>a</u> cid)
PAMP	engl. <u>p</u> athogen <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern
Pep	<u>P</u> eptid; ein Verwundungs-assoziiertes Signalmolekül

PGT	primäre Keimhype (engl. <u>p</u> rimary <u>g</u> erm <u>t</u> ube)
PRR	engl. <u>p</u> attern <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptor
PTI	PAMP-ausgelöste Immunität (engl. <u>P</u> AMP- <u>t</u> riggered <u>i</u> mmunity)
RLK	Rezeptorähnliche Kinase (engl. <u>r</u> eceptor <u>l</u> ike <u>k</u> inase)
RNA	<u>R</u> ibonucleinsäure (engl. - <u>a</u> cid)
rpm	Umdrehungen pro Minute
SE	<u>S</u> tandardfehler (engl. <u>E</u> rror), errechnet mit der Formel: Standardabweichung * $(\sqrt{n})^{-1}$
SLAC	assoziiert mit dem langsam deaktivierenden Anionenkanal (engl. <u>S</u> LOW <u>A</u> NION <u>C</u> HANNEL ASSOCIATED)
SLAH	<u>S</u> LAC1- <u>H</u> omolog
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA-Puffer
TIR	<u>T</u> oll-like/ <u>I</u> nterleukin-1 <u>R</u> ezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units (definiert als $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )
USER	engl. <u>u</u> racil- <u>s</u> pecific <u>e</u> xcision <u>r</u> eagent
(w/v)	weight per volume: Masse pro Volumen
(v/v)	volume per volume: Volumen pro Volumen

### Zur Verwendung von Abkürzungen und Fachbegriffen

Abkürzungen, die im Allgemeinen deutschen Sprachgebrauch üblich sind, werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Englische Fachbegriffe werden dann verwendet, wenn keine entsprechenden deutschen Bezeichnungen existieren oder üblich sind.

### Konvention zur Bezeichnung von Genen und Proteinen

*Slac1* Bezeichnung für ein Gen

*slac1-1* Bezeichnung einer Mutante

SLAC1 Bezeichnung des codierten Proteins

Den Genen und Proteinen werden jeweils die zwei Anfangsbuchstaben des Organismus vorangestellt, aus dessen Genom/Proteom sie entnommen wurden, etwa *At*SLAC1 für SLAC1 aus *Arabidopsis thaliana*.

## WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

Vortrag:

„Impact of powdery mildew and derived molecular patterns on stomata of barley“ Koers S, Guzel-Deger A, Marten I, Roelfsema MRG, Botanikertagung, Berlin-Dahlem

2011

Journal:

“Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating S-type anion channels” Koers S, Guzel-Deger A, Marten I, Roelfsema MRG; Plant Journal 68: 670 - 680

2011

“The novel ER membrane protein PRO41 is essential for sexual development in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*” Nowrousian M, Frank S, Koers S, Strauch P, Weitner T, Ringelberg C, Dunlap JC, Loros JJ, Kück U; Mol Microbiol. 64(4):923-37

2007