

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

**Charakterisierung von keimungsinduzierten Genen  
pilzlicher Phytopathogene für ein targetspezifisches  
Fungiziddesign**

Michael Dilger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. K. H. Schneitz
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel
	2. Univ.-Prof. Dr. G. Müller-Starck
	3. Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald

Die Dissertation wurde am 15.09.2004 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.02.2005 angenommen.

## Vorveröffentlichungen

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden folgende Arbeiten in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht:

DILGER M, FELSENSTEIN FG, SCHWARZ G (2003) Identification and quantitative expression analysis of genes that are differentially expressed during conidial germination in *Pyrenophora teres*. Mol Gen Genomics 270: 147-155

TICHOPAD A, DILGER M, SCHWARZ G, PFAFFL MW (2003) Standardized determination of real-time PCR-efficiency from a single reaction set-up. Nucleic Acids Res e122

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Sporenkeimung bei Pilzen.....	2
1.1.1 Sporenkeimung und Entwicklung von <i>Phytophthora infestans</i> .....	4
1.1.2 Sporenkeimung und Entwicklung von <i>Pyrenophora teres</i> .....	6
1.1.3 Molekulare Grundlagen der Sporenkeimung.....	8
1.2 Molekulare Techniken zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....	11
1.2.1 Differential Display PCR (DD-PCR) .....	11
1.2.2 Representational Difference Analysis (RDA) .....	13
1.2.3 cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP).....	13
1.2.4 Suppression Subtractive Hybridisation (SSH).....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Material .....	17
2.1.1 Pilzmaterial.....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterial und Chemikalien .....	17
2.1.3 Enzyme, Puffer und Kits .....	19
2.1.4 Oligonukleotide.....	20
2.1.5 Medien und Lösungen .....	22
2.2 Methoden .....	24
2.2.1 Anzucht und <i>in vitro</i> Sporenkeimung der Phytopathogene.....	24
2.2.1.1 <i>Phytophthora infestans</i> .....	24
2.2.1.2 <i>Pyrenophora teres</i> .....	24
2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	25
2.2.3 Gelelektrophorese .....	25
2.2.3.1 Agarosegelelektrophorese .....	25
2.2.3.2 Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese .....	25
2.2.3.3 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	25
2.2.4 Standard-PCR .....	26
2.2.5 Klonierung von PCR-Produkten.....	27
2.2.6 Sequenzanalyse .....	27
2.2.7 cDNA-Synthese .....	28
2.2.7.1 RNA-Isolation.....	28
2.2.7.2 cDNA-Synthese für die cDNA-AFLP- und SSH-Analysen .....	29
2.2.7.3 cDNA-Synthese für die real-time RT-PCR.....	29

2.2.8	cDNA-AFLP-Analyse .....	30
2.2.8.1	Restriktion-Ligation (RL) .....	30
2.2.8.2	Präamplifikation .....	30
2.2.8.3	Hauptamplifikation .....	31
2.2.8.4	Auswertung.....	31
2.2.8.5	Isolierung einzelner cDNA-AFLP-Fragmente .....	32
2.2.9	SSH-Analyse .....	33
2.2.9.1	<i>Rsa</i> I-Verdau und Adaptor-Ligation.....	33
2.2.9.2	Subtraktive Hybridisierungen und Amplifikation .....	33
2.2.9.3	Sichtung der subtrahierten cDNA-Banken.....	34
2.2.10	Quantitative Analyse der Genexpression.....	35
2.2.10.1	Real-time RT-PCR.....	35
2.2.10.2	Endogenes Referenzgen .....	38
2.2.10.3	Quantifizierung der Genexpression.....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	<i>Phytophthora infestans</i> .....	40
3.1.1	<i>In vitro</i> Sporenkeimung und cDNA-Synthese .....	40
3.1.2	Isolierung von keimungsspezifischen Genen .....	42
3.1.3	Charakterisierung von keimungsspezifischen Genen.....	44
3.2	<i>Pyrenophora teres</i> .....	53
3.2.1	<i>In vitro</i> Sporenkeimung und cDNA-Synthese .....	53
3.2.2	Isolierung von keimungsspezifischen Genen .....	54
3.2.3	Charakterisierung von keimungsspezifischen Genen.....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1	Einsatz von PCR-basierten Techniken zur Isolierung differentiell exprimierter Gene bei phytopathogenen Pilzen .....	63
4.2	Charakterisierung und Funktion keimungsspezifischer Gene .....	67
4.2.1	Quantitative Analyse der Genexpression.....	67
4.2.2	Funktionale Charakterisierung .....	70
4.3	'target'-orientiertes Design von fungiziden Wirkstoffen .....	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Chemikalien und Agenzien .....	17
<b>Tabelle 2:</b> Enzyme .....	19
<b>Tabelle 3:</b> Puffer .....	19
<b>Tabelle 4:</b> Kits .....	19
<b>Tabelle 5:</b> Oligonukleotide.....	20
<b>Tabelle 6:</b> Ansätze für die cDNA-AFLP-Analyse .....	30
<b>Tabelle 7:</b> Ansätze für die SSH-Analyse .....	33
<b>Tabelle 8:</b> Vorgegebene Parameter beim Design der RT-PCR-Systeme .....	36
<b>Tabelle 9:</b> Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analysen bei <i>Phytophthora infestans</i> .....	42
<b>Tabelle 10:</b> Ähnlichkeiten der sequenzierten cDNA-AFLP- and SSH-Klone von <i>Phytophthora infestans</i> zu Datenbankeinträgen.....	47
<b>Tabelle 11:</b> n-fache Induktion von 18S rRNA von <i>Phytophthora infestans</i> zu den Probennahmezeitpunkten .....	48
<b>Tabelle 12:</b> E- und R <sup>2</sup> -Werte der linearen Regressionen der Referenz- und 'target' Gentranskripte sowie maximale und relative Expression in vegetativem Mycel der 'target' Gentranskripte von <i>Phytophthora infestans</i> .....	51
<b>Tabelle 13:</b> Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analysen bei <i>Pyrenophora teres</i> .....	55
<b>Tabelle 14:</b> Ähnlichkeiten der sequenzierten cDNA-AFLP- and SSH-Klone von <i>Pyrenophora teres</i> zu Datenbankeinträgen.....	59
<b>Tabelle 15:</b> n-fache Induktion von 18S rRNA von <i>Pyrenophora teres</i> zu den Probennahmezeitpunkten .....	60
<b>Tabelle 16:</b> E- und R <sup>2</sup> -Werte der linearen Regressionen der Referenz- und 'target' Gentranskripte sowie maximale und relative Expression in vegetativem Mycel der 'target' Gentranskripte von <i>Pyrenophora teres</i> .....	61

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Entwicklungszyklus von <i>Phytophthora infestans</i> .....	5
<b>Abbildung 2:</b>	Entwicklungszyklus von <i>Pyrenophora teres</i> .....	7
<b>Abbildung 3:</b>	Schematische Darstellung der SSH-Analyse .....	15
<b>Abbildung 4:</b>	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der indirekten Keimung von <i>Phytophthora infestans</i> .....	40
<b>Abbildung 5:</b>	Ermittlung der optimalen PCR-Zykluszahl für die SMART™ cDNA-Synthese über Gelelektrophorese.....	41
<b>Abbildung 6:</b>	'Dot Blot'-Analyse von 96 <i>Phytophthora infestans</i> -Klonen.....	44
<b>Abbildung 7:</b>	Klassifizierung der sequenzierten cDNAs von <i>Phytophthora infestans</i> in funktionale Kategorien.....	46
<b>Abbildung 8:</b>	Gehalte der 18S rRNA während der indirekten Keimung bei <i>Phytophthora infestans</i> .....	49
<b>Abbildung 9:</b>	Schmelzkurvenanalyse der 'real time' RT-PCR Produkte .....	50
<b>Abbildung 10:</b>	Amplifikation der 18S rRNA Sequenz aus cDNA-Verdünnungsstufen durch 'real-time' RT-PCR.....	50
<b>Abbildung 11:</b>	Expressionskinetik von 'target' Gentranskripten von <i>Phytophthora infestans</i> .....	52
<b>Abbildung 12:</b>	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Konidienkeimung von <i>Pyrenophora teres</i> .....	53
<b>Abbildung 13:</b>	Ermittlung der optimalen PCR-Zykluszahl für die SMART™ cDNA-Synthese von <i>Pyrenophora teres</i> .....	54
<b>Abbildung 14:</b>	Reduktion der Komplexität von cDNA-AFLP-Banden.....	55
<b>Abbildung 15:</b>	Dot Blot Analyse von 96 <i>Pyrenophora teres</i> -Klonen .....	57
<b>Abbildung 16:</b>	Klassifizierung der sequenzierten cDNAs von <i>Pyrenophora teres</i> in funktionale Kategorien.....	58
<b>Abbildung 17:</b>	Gehalte der 18S rRNA während der Konidienkeimung bei <i>Pyrenophora teres</i> .....	60
<b>Abbildung 18:</b>	Expressionskinetik von 'target' Gentranskripten von <i>Pyrenophora teres</i> ....	62

## Abkürzungsverzeichnis

5-FAM	5-Carboxy-fluorescin	gDNA	genomische DNA
A	Adenin	JOE	2',7'-Dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxy-fluorescin
AFLP	amplified fragment length polymorphisms	MGB	minor groove binding
APS	Ammoniumpersulfat	MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
bidest	bidestilliert	mRNA	messenger RNA
bp	Basenpaare	OD	optische Dichte
bq	Bequerel	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
C	Cytosin	PCR	polymerase chain reaktion
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat	Pi	<i>Phytophthora infestans</i>
Ci	Curie	Pt	<i>Pyrenophora teres</i>
cDNA	complementary DNA	Ptr	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>
cpm	counts per minute	Pu	<i>Phytophthora undulata</i>
Cy5	Amidite (5'-cyamine-d[seq]) fluorochrome	RAPD	random amplified polymorphic DNA
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	RDA	representational difference analysis
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	RL	Restriktion-Ligation
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid-5'-triphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
DD-PCR	differential display PCR	RNase	Ribonuklease
DEPC	Diethylpyrocarbonat	rpm	rounds per minute
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	rRNA	ribosomale RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	reverse Transkription
DNase	Desoxyribonuklease	SDS	Natriumdodecylsulfat
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat	ss	single stranded
ds	double stranded	SSC	Natriumsulfonatcitrat
DTT	1,4-Dithiothreitol	SSH	suppression subtractive hybridisation
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	T	Thymin
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat	TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxy-rhodamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	TKG	Tausendkorngewicht
EST	expressed sequence tags	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
EtBr	Ethidiumbromid	U	unit
G	Guanin		

## 1 Einleitung

Phytopathogene Pilze verursachen weltweit an den verschiedensten landwirtschaftlichen Kulturen immense volkswirtschaftliche Schäden. Diese entstehen vor allem durch Ernte- und Lagerungsverluste sowie durch Ausgaben für Pflanzenschutz- und Kontrollmaßnahmen. Aufgrund der hohen Variabilität, der schnellen Anpassungsfähigkeit und den kurzen Reproduktionszeiten vieler Pathogene wurden und werden Fungizide durch Resistenzbildung wirkungslos (DAVIDSE und ISHII 1995; GISI und COHEN 1996; VANDEN BOSSCHE 1997; BARTLETT et al. 2002). Es ist daher unerlässlich das bestehende Sortiment an Fungiziden durch Weiter- und Neuentwicklungen zu ergänzen, um auch zukünftig durch den Einsatz wirksamer Präparate eine hochproduktive und -qualitative Pflanzenproduktion zu sichern.

Neben den etablierten Methoden in der Fungizidentwicklung, wie dem Massenscreening potenziell fungizider Substanzen, stehen gegenwärtig auch molekularbiologische Verfahren zur Verfügung, die ein 'target'-orientiertes Design von Wirkstoffen ermöglichen. Vielversprechende Ansatzstellen sind unter anderem Gene, die essentiell für die Pilzentwicklung in epidemiologisch relevanten Entwicklungsabschnitten wie beispielsweise während der Sporulation oder der Sporenkeimung sind.

Insbesondere über die komplexen physiologischen und biochemischen Mechanismen, die die Keimung von Pilzsporen regulieren sowie über die daran beteiligten Gene ist bislang sehr wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, tiefere Einblicke in die molekularen Abläufe dieses Entwicklungsabschnittes zu ermöglichen, um diese möglicherweise bei Pflanzenschutzstrategien zu nutzen. Dazu wurde exemplarisch für die beiden phytopathogenen Pilze *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* versucht, sporenkeimungsspezifische Gene unter Verwendung der SSH- (Suppression Subtractive Hybridisation) und der cDNA-AFLP- (cDNA Amplified Fragment Length Polymorphisms) Technik zu identifizieren.

## 1.1 Sporenkeimung bei Pilzen

Im Lebenszyklus von Pilzen spielen Sporen eine äußerst wichtige Rolle. Für die meisten Pilze sind sie zur Überdauerung von Perioden mit ungünstigen Umweltbedingungen und für ihre Verbreitung unentbehrlich. Die Diversität der Pilze spiegelt sich in der Vielfalt der von ihnen produzierten Sporen wieder. So sind ein- oder mehrkernige, begeißelte oder unbegeißelte, zellwandlose sowie dick- oder dünnwandige Sporen zu finden. Sie werden durch Mitose (Zoosporen, Sporangien, Konidien, Uredosporen), Fusion (Oosporen, Zygosporien, Teliosporien) oder Meiose (Ascosporen, Basidiosporien) gebildet (GRIFFIN 1994). Eine definierende Eigenschaft von Sporen ist ihre Fähigkeit sich ohne Fusion mit einer anderen reproduktiven Zelle in ein neues Individuum zu entwickeln (OSHEROV und NISH 2001). Der erste Abschnitt dieser Entwicklung ist die Keimung der Spore. Die Keimung ist definiert durch den Übergang der dormanten Spore von einer Ruhephase in die Bildung eines Keimschlauches aus dem sich nach Verlängerung und Verzweigung neues Mycel entwickelt (D'ENFERT 1997).

Die Sporenkeimung kann in drei Abschnitte unterteilt werden:

**(1) Aktivierung:** Bestimmte Umweltbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, Nährstoffverfügbarkeit, Oberflächenbeschaffenheit) sind Voraussetzung für die Induktion der Sporenkeimung. Sie variieren zwischen den Sporentypen innerhalb einer Art und zwischen den Arten. Generell sind Wasser, Sauerstoff und Kohlendioxid zur Aktivierung der Sporenkeimung erforderlich. Daneben werden gegebenenfalls niedermolekulare Nährstoffe (Zucker, Aminosäuren) und anorganische Salze benötigt, die selbst bei niedrigsten Konzentrationen für die Eignung einer Umwelt maßgeblich sein können (CARLILE und WATKINSON 1994; GRIFFIN 1994; DEAN 1997; NIELSON et al. 2000). Auch die physische Oberflächebeschaffenheit kann einen Initialreiz für die Sporenkeimung darstellen. So wird bei *Magnaporthe grisea* oder *Colletotrichum gloeosporides* erst durch Kontakt mit einer entsprechend harten Oberfläche die Sporenkeimung vermutlich durch Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Systems induziert (TALBOT 1995; KIM et al. 1998). Die Inhibition der Sporenkeimung durch auf der Sporenoberfläche befindliche Substanzen (Selbstinhibitoren) ist für eine Vielzahl von Pilzarten bekannt (ALLEN 1976; TSURUSHIMA 1995). So finden sich beispielsweise auf der Konidienoberfläche von *Magnaporthe grisea* lipophile Substanzen, die die Sporenkeimung bei zu hohen Sporendichten inhibieren (HEDGE

und KOLATTUKUDY 1998). Pflanzenpathogene Pilze haben zusätzliche regulatorische Kontrollmechanismen entwickelt, wodurch die Keimungsinduktion erst nach Detektion von wirtspflanzenspezifischen Faktoren erfolgt (= Fungistasis; GARRAWAY und EVANS 1984). Bei *Colletotrichum*-Arten wird die Keimung durch von der Wirtspflanze produzierte Wachse und durch Ethylen induziert (KOLATTUKUDY et al. 1995). Die Sporen von *Fusarium solani* werden durch Pisatin, einem in Wurzelexudat enthaltenen Isoflavonoid, zur Keimung stimuliert (RUAN et al. 1995). Die sensorischen Einheiten (Rezeptoren), die die verschiedenen keimungsinduzierenden oder -inhibierenden Signale detektieren, sind bislang nicht identifiziert (OSHEROV und MAY 2001).

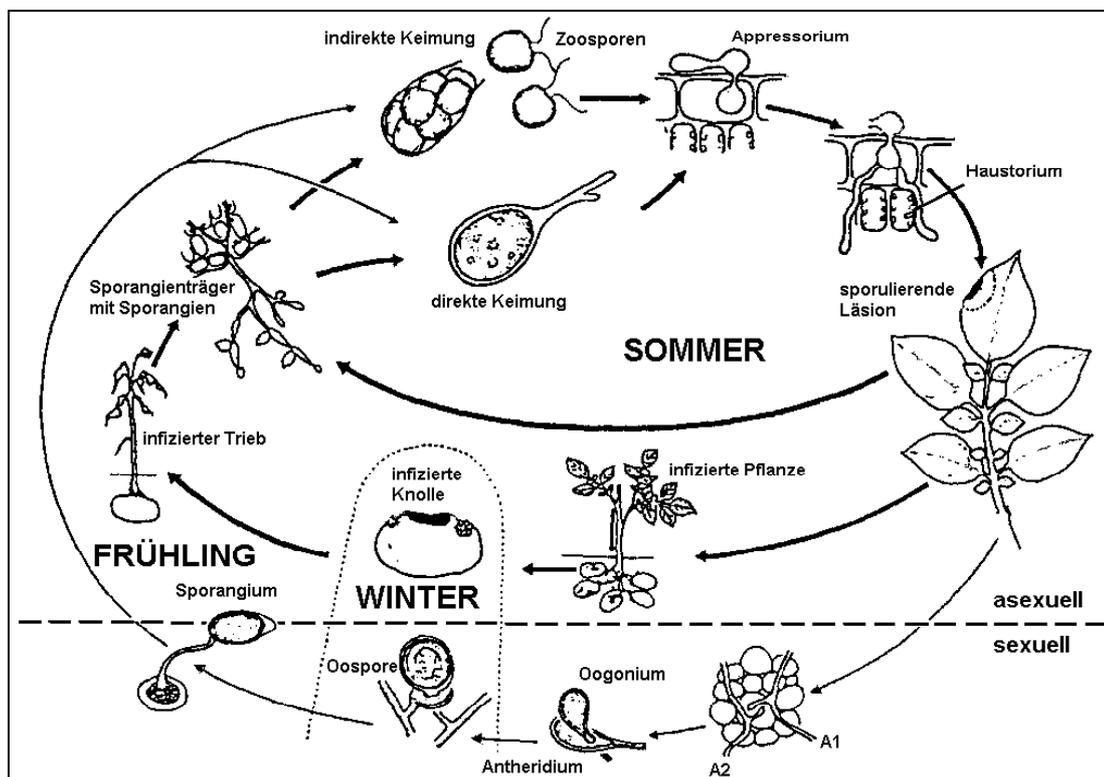
**(2) Isotropisches Wachstum:** Die erste morphologische Veränderung während der Keimung ist das mehr oder weniger stark ausgeprägte Anschwellen der Pilzspore (isotropisches Wachstum). Dies wird vor allem durch Wasseraufnahme, aber auch durch das Dickenwachstum der Sporenwand verursacht (GRIFFIN 1994). Das isotropische Wachstum geht einher mit der Wiederaufnahme zahlreicher metabolischer Aktivitäten, wie Respiration sowie RNA- und Proteinbiosynthese (VAN ETTEN et al. 1983). Die Energiebereitstellung erfolgt dabei durch Mobilisierung von Reservestoffen, wie Lipiden, Polyolen und Kohlenhydraten (TUCKER und TALBOT 2001). Trehalose ( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid) spielt mit einem Trockenmasseanteil von bis zu 15% in der Spore dabei in verschiedenen Pilzarten eine wichtige Rolle als Speicherkohlenhydrat (THEVELEIN 1984; THEVELEIN 1996). In *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* erfolgt die Mobilisierung von Trehalose unmittelbar nach Induktion der Keimung, bevor morphologische Veränderungen der Spore beobachtet werden können (SCHMIDT und BORDY 1976; D'ENFERT und FONTAINE 1997). Parallel vollziehen sich Veränderungen der Eigenschaften auf der Sporenoberfläche, die zur Adhäsion auf dem Substrat führen. Initial erfolgt die Anhaftung durch präformierte Substanzen, wie bei *Colletotrichum*-Arten durch wasserlösliche Glycoproteine (NICHOLSON 1992) oder bei *Uncinuliella australiana* durch nach Wasserkontakt ausgebildete Haftstrukturen (MIMS et al. 1995). Nachfolgend kommt es durch Sekretion von neusynthetisierten Adhäsinen zu verstärkter Anhaftung, wie bei *Colletotrichum musae* (SELA-BUURLAGE et al. 1991), *Magnaporthe grisea* (BRAUN und HOWARD 1994), *Botrytis cinerea* (DOSS 1999) oder *Blumeria graminis* (NIELSON et al. 2000).

**(3) Polarisiertes Wachstum:** Zu einem bestimmten Zeitpunkt wird das Zellwandwachstum punktuell. Dies stellt den Übergang vom isotropischen zum polarisierten Wachstum dar und es erfolgt die Ausbildung eines Keimschlauches. Definitionsgemäß endet die Sporenkeimung mit Erreichen einer Länge des Keimschlauches, die seinem Durchmesser entspricht. Mit dem Übergang in das vegetative Wachstum wird aus dem Keimschlauch ein sich verlängerndes und gegebenenfalls verzweigendes Mycel (D'ENFERT 1997). Eine entscheidende Rolle für das polarisierte Wachstum filamentöser Pilze spielt das Aktincytoskelett. Aktin findet sich vor allem an der Keimschlauchspitze und Inhibitoren von aktinabhängigen Prozessen beeinträchtigen die Keimung erheblich (BARJA et al. 1993; HARRIS et al. 1994). Es wird angenommen, dass durch das Aktincytoskelett der Transport von sekretorischen Vesikeln erfolgt, die für das Wachstum der Keimschlauchspitze erforderliche Komponenten beinhalten (D'ENFERT 1997; LIU 2001). Es konnte auch der Einfluss topographischer Begebenheiten auf den Ablauf des polarisierten Wachstums beobachtet werden. So wurde durch Veränderung der Oberflächenstruktur mit Spinnengewebefäden bei Konidien von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* die Austrittsstelle und die Wuchsorientierung des Keimschlauches beeinflusst (WRIGHT et al. 2000).

### 1.1.1 Sporenkeimung und Entwicklung von *Phytophthora infestans*

Der Oomycet *Phytophthora infestans* (MONT.) DE BARY ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule (engl. 'late blight') an der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) sowie der Braunfäule an der Tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.). Die Vertreter der Abteilung Oomycota zeigen filamentösen Wuchs und wurden deshalb früher fälschlicherweise den echten Pilzen zugeordnet. Moderne biochemische Analysen sowie auf ribosomalen und mitochondrialen Sequenzen basierende phylogenetische Studien legen jedoch nahe, dass die Oomyceten nur wenig taxonomische Verwandtschaft zu den echten Pilzen aufweisen (KUMAR und RZHETSKY 1996; PAQUIN et al. 1997; VAN DE PEER und DE WACHTER 1997). Infolgedessen werden Oomyceten jetzt dem Reich der Chromista (CAVALIER-SMITH 1998) oder dem Phylum der Straminopiles (SOGIN und SILBERMAN 1998) zusammen mit Braunalgen und Diatomeen zugeordnet.

*Phytophthora infestans* gilt weltweit als die Krankheit an der Kartoffel mit dem höchsten Schadpotential (HOOKER 1981). Jährlich entstehen Kosten in Milliardenhöhe durch Ertragsminderungen von bis zu 70%, durch Lagerverluste sowie durch Ausgaben für Pflanzenschutzmaßnahmen (GOODWIN 1997; HOFFMANN und SCHMUTTERER 1999; KAMOUN et al. 1999).



**Abbildung 1** : Entwicklungszyklus von *Phytophthora infestans* (verändert nach DRENTH et al. 1993)

*Phytophthora infestans* überdauert vorwiegend als vegetatives Mycel in der Kartoffelknolle (DE BARY 1876). Nach dem Einwachsen des Erregers von der Knolle in die oberirdischen Pflanzenteile entwickelt sich bei hoher Luftfeuchtigkeit und einem Temperaturoptimum zwischen 18 und 23°C sporulierendes Mycel. Aus den Stomata der Blattunterseite ragen Sporangienträger mit endständigen zitronenförmigen Sporangien (WEBSTER 1983). Ausgehend von diesen primären Befalls-herden erfolgt die epidemiologische Ausbreitung. Der Ablauf der Sporangien-keimung wird in erster Linie durch die Umgebungstemperatur beeinflusst. Es besteht die Möglichkeit zu direkter und indirekter Keimung (HOFFMANN 1962). Bei höheren Temperaturen um 25°C und niedriger Luftfeuchtigkeit erfolgt die direkte Keimung durch Bildung eines sekundären Sporangiums. Bei niedrigen Temperaturen von 12 bis 14°C und Vorhandensein von tropfbar flüssigem Wasser wird die indirekte Keimung induziert. Dabei beginnt nach Kompartimentierung des Sporangien-

cytoplasmas in heterokont biflagellate Zoosporen der Zoosporenschlupf (6 bis 16 Zoosporen pro Sporangium). Die Zoosporen schwimmen frei umher und setzen sich nach chemischen oder physischen Stimuli auf der Blattoberfläche fest (DEACON und DONALDSON 1993). Die Encystierung erfolgt binnen Sekunden nach Abwurf der Flagellen durch Zellwandneubildung (GRIFFITH et al. 1988). Die Cysten entwickeln einen Keimschlauch, der sich *in vitro* auf künstlichem Nährboden in neues Mycel differenziert (JUDELSON und ROBERTS 2002). *In vivo* werden nach Bildung eines Appressoriums an der Keimschlauchspitze die Epidermiszellen mittels einer Infektionshyphye invasiert (WEBSTER 1983). Von interzellulären Hyphen dringen Haustorien zur Nahrungsaufnahme in die Pflanzenzelle ein (COFFEY und WILSON 1983). Bei der geschlechtlichen Fortpflanzung (Oogamie) des heterothallischen Pilzes *Phytophthora infestans* werden nach Aufeinandertreffen zweier unterschiedlich determinierter Mycelien (Mating-Typ A1 und A2) sogenannte Oosporen gebildet (UMAERUS et al. 1983; WEBSTER 1983). (Abbildung 1)

### 1.1.2 Sporenkeimung und Entwicklung von *Pyrenophora teres*

Der Ascomycet *Pyrenophora teres* DRECHSLER (syn. *Helminthosporium teres* SACC.) (anamorph: *Drechslera teres* (SACC.) SHOEMAKER) ist der Erreger der Netzfleckenkrankheit (engl. 'net blotch') an der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Es wird zwischen zwei Erregerformen mit unterschiedlichen Befallsbildern unterschieden: dem Netz- ('net type') bzw. dem Flecken-Typ ('spot type') (SMEDEGÅRD-PETERSEN 1976).

Insbesondere in den Gerstenanbauregionen der gemäßigt humiden Klimazonen werden ökonomisch bedeutsame Ertragsverluste von bis zu 40% verursacht (STEFFENSON und WEBSTER 1992; MATHRE 1997; WEILAND et al. 1999). Ertrags- einbußen erfolgen vor allem durch die Zerstörung der Assimilationsfläche, auch direkt durch Pilztoxinwirkung, mit resultierender Reduktion sowohl des TKG als auch der Kornzahl pro Ähre (DEIMEL und HOFFMAN 1991).

Primärinfektionen werden vor allem durch auf Strohresten und auf Ausfallgerste ('Grüne Brücke') gebildeten Konidien sowie durch saatgutbürtiges Inokulum verursacht. Zudem reifen auf Pflanzenresten an der Bodenoberfläche in den Pseudothecien (Fruchtkörper) sexuelle Ascosporen, von denen im Frühjahr ebenfalls Primärinfektionen ausgehen (JORDAN 1981; MAULER und FEHRMANN 1983; OBST und PAUL 1993). Für die sekundäre Ausbreitung im Bestand und über größere Entfer-

nungen hinweg sind die windverbreiteten asexuellen Konidiosporen verantwortlich, die nur auf nekrotisiertem Blattgewebe an typischen Sporenträgern (Konidiophore) gebildet werden (HOFFMANN und SCHMUTTERER 1999). Sporulationsfördernde Bedingungen herrschen während feuchtwarmer Witterung bei 5 bis 35°C mit einem Optimum von ca. 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 95%. Nach Adhäsion an der Blattoberfläche wird die Konidienkeimung bei Temperaturen von 2 bis 30°C (Optimum 25°C) sowie hoher Luftfeuchtigkeit induziert (SHAW 1986). Die Konidien bilden Keimschläuche, die sich verlängern, bis an einer geeigneten Stelle auf der Blattoberfläche an der Keimschlauchspitze ein Appressorium entsteht. Nach dem Eindringen in die Epidermiszellen mittels einer Penetrationshyphe werden haustorienähnliche intrazelluläre Infektionsvesikel gebildet von denen aus der Pilz ausschließlich im Apoplasten des Mesophyllgewebes wächst (KEON und HARGREAVES 1983). (Abbildung 2)

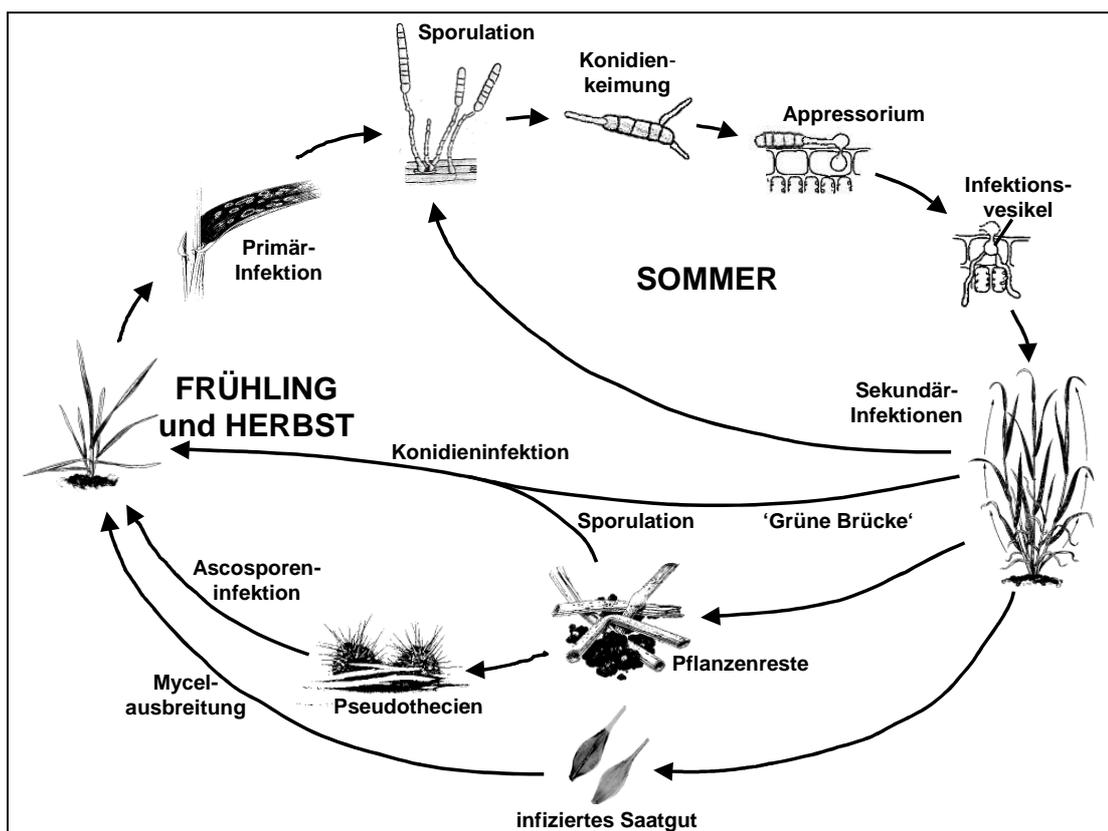


Abbildung 2 : Entwicklungszyklus von *Pyrenophora teres* (verändert nach OBST und PAUL 1993)

### 1.1.3 Molekulare Grundlagen der Sporenkeimung

Bislang gibt es noch keinen Beweis dafür, dass in filamentösen Pilzen einzelne Gene nur ausschließlich während der Sporenkeimung exprimiert sind. In verschiedenen Studien deutet sich jedoch die prädominante Expression bestimmter Gene während dieses Entwicklungsabschnittes an (D'ENFERT 1997). So ergaben Arbeiten über die Veränderung der mRNA-Konzentrationen im Lebenszyklus von *Neurospora crassa*, dass viele der in die Ribosomen- und Aminosäurebiosynthese sowie in die Respiration involvierten Gene während der Sporenkeimung eine signifikant höhere Expression als während des Mycelwachstums aufweisen (SACHS und YANOFKY 1991).

Von grundlegender Wichtigkeit für die Keimung von Pilzsporen ist die Proteinbiosynthese. Die Essentialität der Proteinsynthese während der Keimung konnte für *Fusarium solani*, *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* entweder durch den Einsatz von Proteinsyntheseinhibitoren oder mit temperatursensitiven Mutanten bewiesen werden (COCHRANE und COCHRANE 1970; LOO 1976; OSHEROV und MAY 2000). DNA-Synthese scheint dagegen für die frühe Keimung nicht essentiell zu sein (LOO 1976; OSHEROV und MAY 2000). Über die Notwendigkeit der RNA-Synthese für die Sporenkeimung liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. HOLLOMON (1970) beschreibt, dass die RNA-Synthese essentiell für die Sporenkeimung bei *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* nicht aber bei *Fusarium solani* und *Peronospora tabaciana* ist. Im Gegensatz dazu ergaben andere an *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* durchgeführte Studien, dass die RNA-Synthese nicht essentiell für die Sporenkeimung ist (MIRKES 1967; OSHEROV und MAY 2000). Das Vorhandensein von präformierten mRNAs, ebenso wie von freien Ribosomen in dormanten Sporen konnte für eine Vielzahl von Pilzarten nachgewiesen werden (VAN ETEN et al. 1983; GRIFFITH 1994; OSHEROV et al. 2002). Dadurch ist in frühen Phasen der Sporenkeimung eine Translation ohne vorhergehende Transkription möglich (GRIFFITH 1994).

Die Aktivierung der beschriebenen extra- und intrazellulären Vorgänge während der Sporenkeimung erfolgt nach Detektion der entsprechenden Umweltsignale durch spezifische membranständige Rezeptoren. In die Signalweiterleitung vom Rezeptor auf den jeweiligen Effektor sind insbesondere zwei Signaltransduktionswege impliziert:

## Ca<sup>2+</sup>/Phosphoinositid-Signalsystem

Eine wichtige Rolle in der Morphogenese und Entwicklung von Pilzen wird dem 'second messenger' Ca<sup>2+</sup> beigemessen (JACKSON und HEATH 1993). Die signalgesteuerte Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-durchlässigen Ionenkanälen mit resultierendem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus intra- oder extrazellulären Quellen führt zu einem transienten Anstieg des cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegels. Ca<sup>2+</sup> aktiviert entweder direkt Zielproteine oder bindet an das ubiquitäre Ca<sup>2+</sup>-Rezeptorprotein Calmodulin. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin aktiviert seinerseits eine große Anzahl von Zielproteinen, darunter Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMKs), die durch Phosphorylierung weitere Zielproteinen induzieren (VAN EDICK und WATERSON 1995). Die Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> wird unter anderem durch Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>), einem weiteren 'second messenger', induziert (BELDE et al. 1993). Dieser geht aus hydrolytischer Spaltung von Phosphatidylinositol-1,4-bisphosphat in IP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (DAG) durch aktivierte Phospholipase C hervor (BUCHNER 1995). Durch membranständige heterotrimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) erfolgt dabei die Signalweiterleitung von spezifischen Rezeptoren auf die Phospholipase C. DAG agiert ebenfalls als 'second messenger' und aktiviert weitere Proteinkinasen (BERRIDGE et al. 2000). Der Einfluss dieses Signaltransduktionsweges auf die frühe Sporenkeimung variiert zwischen den verschiedenen Pilzarten. So verlangsamt sich zwar die Wiederaufnahme des Zellzyklus bei keimenden Sporen von *Aspergillus nidulans* durch Deletion oder verzögerte Expression von CaMKs, eine komplette Unterdrückung der Sporenkeimung bleibt jedoch aus (JOSEPH und MEANS 2000). Bei *Colletotrichum gloeosporioides* hingegen konnte mit KN93, einem spezifischen Inhibitor von CaMKs sowie mit dem Ca<sup>2+</sup>-Chelator EGTA sowohl die Sporenkeimung als auch die Appressoriumbildung unterdrückt werden (KIM et al. 1998). Ebenfalls wurde bei *Phyllosticta ampellicida* durch verschiedene spezifische Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanalblocker die Konidienkeimung vollständig unterbunden (SHAW und HOCH 2000). Auch bei Oomyceten konnte eine eindeutige Abhängigkeit der frühen Sporenentwicklung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Signaltransduktionswegen nachgewiesen werden. So konnten JUDELSON und ROBERTS (2002) mit dem Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanalblocker Verapamil und dem Calmodulin-Antagonisten Trifluoroperazin die indirekte Keimung (= Zoosporenschlupf) sowie die Encystierung der Zoosporen von *Phytophthora infestans* inhibieren. Bei *Phytium aphanidermatum* wurden sowohl die Adhäsion als

auch die Keimung der Zoosporen durch Einsatz von EGTA, Verapamil oder Trifluoroperazin unterdrückt (DONALDSON und DEACON 1992).

### **cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg**

Der cAMP/PKA- (Protein-Kinase A) Signaltransduktionsweg ist für das filamentöse Wachstum vieler Pilze von entscheidender Bedeutung (LENGELER et al. 2000). Die Detektion externer Signale durch entsprechende membranständige Rezeptoren resultiert in der Dissoziation eines gekoppelten heterotrimeren G-Proteins in eine aktivierte G $\alpha$ -Untereinheit sowie ein membrangebundenes G $\beta\gamma$ -Heterodimer. Das G-Protein vermittelte Signal kommt zum Erliegen, sobald das GTP der  $\alpha$  Untereinheit zu GDP hydrolysiert wird und es zur erneuten Ausbildung des inaktiven, heterotrimeren G-Proteins kommt. Durch die G $\alpha$ -Untereinheit wird die membranintegrale Adenylat-Cyclase aktiviert, von der cAMP synthetisiert wird. cAMP aktiviert nachfolgend PKA durch Bindung an deren regulatorische Untereinheit. Die aktivierte PKA kontrolliert ihrerseits die Aktivität zahlreicher Zielproteine, indem sie Serin- und Threoninreste phosphoryliert (STRYER 1996). Der Einfluss des cAMP/PKA-Systems auf die frühe Sporenentwicklung konnte bei keimenden Konidien von *Neurospora crassa* nachgewiesen werden. Eine *mcb*-Mutation, durch welche die regulatorische Untereinheit der PKA affiziert wurde, verursachte abnormale Morphologie bei keimenden Konidien. Es wird vermutet, dass cAMP den Übergang vom isotropischen zum polarisierten Wachstum durch Organisation des Aktincytoskeletts kontrolliert (BRUNO et al. 1996). Die Ergebnisse von FILLINGER et al. (2002) mit *CyaA*-, *PkaA*- und *SchA*-Nullmutanten deuten darauf hin, dass das cAMP/PKA-System zwar wichtig, nicht aber essentiell für die Konidienkeimung von *Aspergillus nidulans* ist. Die Deletion des PKA-kodierenden Gens *pkaA* resultierte in verzögerter Keimschlauchbildung. Die Deletion des Adenylat-Cyclase-kodierenden Gens *cyaA* hatte eine ausgeprägtere Keimungsverzögerung zur Folge, eine vollständige Unterdrückung der Keimung blieb jedoch aus. Ein direkter Zusammenhang besteht darüber hinaus zwischen dem cAMP/PKA-System und dem Trehaloseabbau in sehr frühen Phasen der Sporenkeimung. In Sporen von *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* sowie von verschiedenen Hefen wird der Trehaloseabbau durch PKA-aktivierte neutrale Trehalasen katalysiert (THEVELEIN 1988; KOPP et al. 1993; CANSADO et al. 1998; D'ENFERT et al. 1999). Diese Beobachtungen wurden durch Ergebnisse von DE PINHO et al. (2001) bestätigt, wonach der Trehaloseabbau in

keimenden Konidien von *Neurospora crassa* bei *mcb*- und *cr-1*-Mutanten stark beeinträchtigt ist.

## **1.2 Molekulare Techniken zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene**

Eukaryotische Organismen besitzen wenige 1.000 bis mehrere 10.000 verschiedene Gene (ARNOLD und HILTON 2003; GALAGAN et al. 2003). Nur ein kleiner Teil davon ist zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Einzelzelle exprimiert. Es ist daher die zeitlich und örtlich abgestimmte Regulation der Genexpression, die die phänotypische Ausprägung von Zellen und Geweben bedingt. Die Klonierung und Identifizierung von differentiell exprimierten Genen eröffnet somit neue Einblicke in bislang unbekannt regulatorische und physiologische Prozesse. So können beispielsweise Gene isoliert werden, die in verschiedenen Zelltypen oder Geweben ausgeprägt sind oder deren Exprimierung für die Ausbildung bestimmter Entwicklungsstadien verantwortlich ist. Ebenso können stimulatorische oder inhibitorische Effekte auf die Transkriptionsraten einzelner Gene in einer Zellpopulation bestimmt werden. Für die Klonierung von differentiell exprimierten Genen steht eine Vielzahl von molekularen Techniken zur Verfügung. Die geläufigsten auf PCR basierenden molekularen Verfahren werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

### **1.2.1 Differential Display PCR (DD-PCR)**

Bei der Differential Display Technologie (LIANG und PARDEE 1992; LIANG et al. 1993) erfolgt die Amplifikation der 3'-Enden von zu vergleichenden mRNA-Populationen. Dabei bindet an die 3'-Enden der polyadenilierten mRNAs ein sogenannter Anker-Primer (5'-Oligo-dT<sub>n</sub>-Nukleotid mit zwei zusätzlichen selektiven Basen am 3'-Ende), der durch eine Reverse Transkriptase verlängert wird. Mit den resultierenden mRNA/cDNA-Hybriden wird nachfolgend eine Amplifikation unter Verwendung des Anker-Primers und eines kurzen sogenannten Arbitrary-Primers (8 bis 10mer Oligonukleotid) bei niedrigen Annealingtemperaturen durchgeführt. Die amplifizierten mRNA-Populationen werden nebeneinander auf denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert. Dadurch ist ein 'side-by-side'-Vergleich von mehreren mRNA-Subpopulationen möglich. Dies ist ein bedeu-

tender Vorteil von Differential Display Methoden gegenüber auf subtraktiver Hybridisierung basierenden Techniken, bei denen jeweils nur zwei Pools miteinander abgeglichen werden können (HARRIS et al. 1998; BOLE-FEYSOT et al. 2000).

Die DD-PCR ist die bislang am häufigsten eingesetzte Technik zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene. Knapp 60% der ca. 7.000 bis Anfang 2002 veröffentlichten Arbeiten auf dem Gebiet der Genexpressionsanalyse wurden unter Verwendung der DD-PCR durchgeführt (LIANG 2002). Gründe für den großen Erfolg der DD-PCR sind unter anderem die einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung dieser Technik sowie die geringen Mengen an benötigter mRNA (RENNER et al. 1998; BOSCH et al. 2000). Kritisch zu beurteilen sind der hohe Anteil falsch positiver Banden von typischerweise 50 bis 60% (BAUER et al. 1994; SUN et al. 1994; DEBOUCK 1995; SOMPAYRAC et al. 1995), die geringe Sensitivität (BERTIOLI et al. 1995) und die unzureichende Reproduzierbarkeit (HAAG und RAMAN 1994; ZHANG et al. 1998) der DD-PCR-Methode. Hauptursache dafür ist vor allem der Einsatz kurzer Arbitrary Primer bei niedrigen Annealingtemperaturen (DEBOUCK 1995). Unter solchen gering stringenten Reaktionsbedingungen ist die Menge der individuellen Amplifikationsprodukte nicht nur eine Funktion der Ausgangskopienzahl der cDNA-Spezies, sondern sie ist auch maßgeblich von der Qualität der jeweiligen Primer-Template-Paarung abhängig. Daraus resultiert, dass häufig vorliegende cDNAs mit geringer Spezifität zu den verwendeten Primern begünstigt amplifiziert und seltene Transkripte im Laufe der Amplifikation verdrängt werden (MCCLELLAND et al. 1995). Daneben erweist sich vor allem die Beschränkung auf den nicht translatierten 3'-terminalen Bereich von Transkripten als problematisch. Nachfolgende Charakterisierungen der sequenzierten Transkripte durch Datenbankrecherchen werden dadurch erschwert (BACHEM et al. 1996; BALDWIN et al. 1999). Um dieser Restriktion zu begegnen wurde in einem alternativen Protokoll (WELSH et al. 1992) sowohl die cDNA-Synthese als auch die Amplifikation ähnlich wie bei der RAPD-Methode (WILLIAMS et al. 1990) mit Arbitrary-Primern durchgeführt. Die aus der geringen Stringenz resultierende unzureichende Spezifität der Methode bleibt jedoch trotzdem problematisch (MCCLELLAND et al. 1995).

### **1.2.2 Representational Difference Analysis (RDA)**

Die RDA-Methode wurde ursprünglich zur Aufdeckung von Unterschieden zwischen komplexen Genomen entwickelt (LISITSYN et al. 1993) und fand bald Anwendung bei der Identifizierung von differentiell exprimierten Genen (HUBANK und SCHATZ 1994; O'NEIL and SINCLAIR 1997). Sie beruht auf subtraktiver Hybridisierung zweier zu vergleichender cDNA-Pools. Dazu werden im Anschluss an den Verdau der beiden cDNA-Pools mit einem Restriktionsenzym die cDNA-Fragmente der Probe, die differentiell exprimierte Gene beinhaltet (= 'Tester'), mit einem Adaptor ligiert. Die cDNA-Fragmente aus der Probe des nicht differentiellen Zustandes (= 'Driver') verbleiben nicht adaptiert. Beide Ansätze werden bei einem sehr hohen (100-fach) Driver-Überschuss miteinander vermengt, denaturiert und hybridisiert. In der nachfolgenden PCR mit einem adaptorspezifischen Primer werden nur die hybridisierten Tester-Tester-DNA-Sequenzen exponentiell amplifiziert. Aus dieser für differentielle Gene angereicherten Reaktion wird durch Klonierung eine subtrahierte cDNA-Bank hergestellt (HUBANK und SCHATZ 1999).

Bei auf subtraktiver Hybridisierung basierenden Methoden stehen differentiell identifizierte Sequenzen sofort als Klone für weitere Analysen zur Verfügung (NELSON und DENNY 1999). Bei Differential Display-Methoden muss hingegen jedes einzelne Fragment teilweise unter erheblichen Schwierigkeiten isoliert, reamplifiziert und kloniert werden (STURTEVANT 2000). Die RDA-Methode hat sich bei Arbeiten in verschiedenen Bereichen als gut reproduzierbare Technik mit hoher Sensitivität erwiesen (GRESS et al. 1997; ZHU et al. 1998; LI et al. 1998). Nachteilig wirkt sich aus, dass keine Normalisierung der Konzentrationsunterschiede zwischen den Transkripten stattfindet. Deshalb werden zum Teil ein oder zwei zusätzliche subtraktive Hybridisierungsschritte durchgeführt (HUBANK und SCHATZ 1994).

### **1.2.3 cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP)**

Bei der cDNA-AFLP-Methode (BACHEM et al. 1996) handelt es sich um eine auf cDNA-Ebene angewandte Form der üblicherweise mit genomischer DNA durchgeführten AFLP-Methode. Diese wurde von ZABEAU und VOS (1993) entwickelt und erstmals für Anwendungen im Hefen- und Humangenom sowie in diversen pflanzlichen Genomen von VOS et al. (1995) beschrieben. Die cDNA-AFLP-Technik beruht auf selektiver Amplifikation spezifischer cDNA-Restriktionsfragmente, die durch

Hydrolyse mit einem (HABU et al. 1997) oder zwei (BACHEM et al. 1996) Restriktionsenzymen erzeugt werden. An die Restriktionsfragmente werden Adaptoren ligiert, die als Bindungsstelle für spezifische Primer in der nachfolgenden Prä- bzw. Hauptamplifikation dienen. Je nach Komplexität der Transkriptome können durch den Einsatz einer unterschiedlichen Anzahl selektiver Basen an den 3'-Termini der Prä- bzw. Hauptamplifikationsprimer die Fragmente auf eine für die elektrophoretische Auftrennung optimale Anzahl reduziert werden (FUKUDA et al. 1999; QIN et al. 2000).

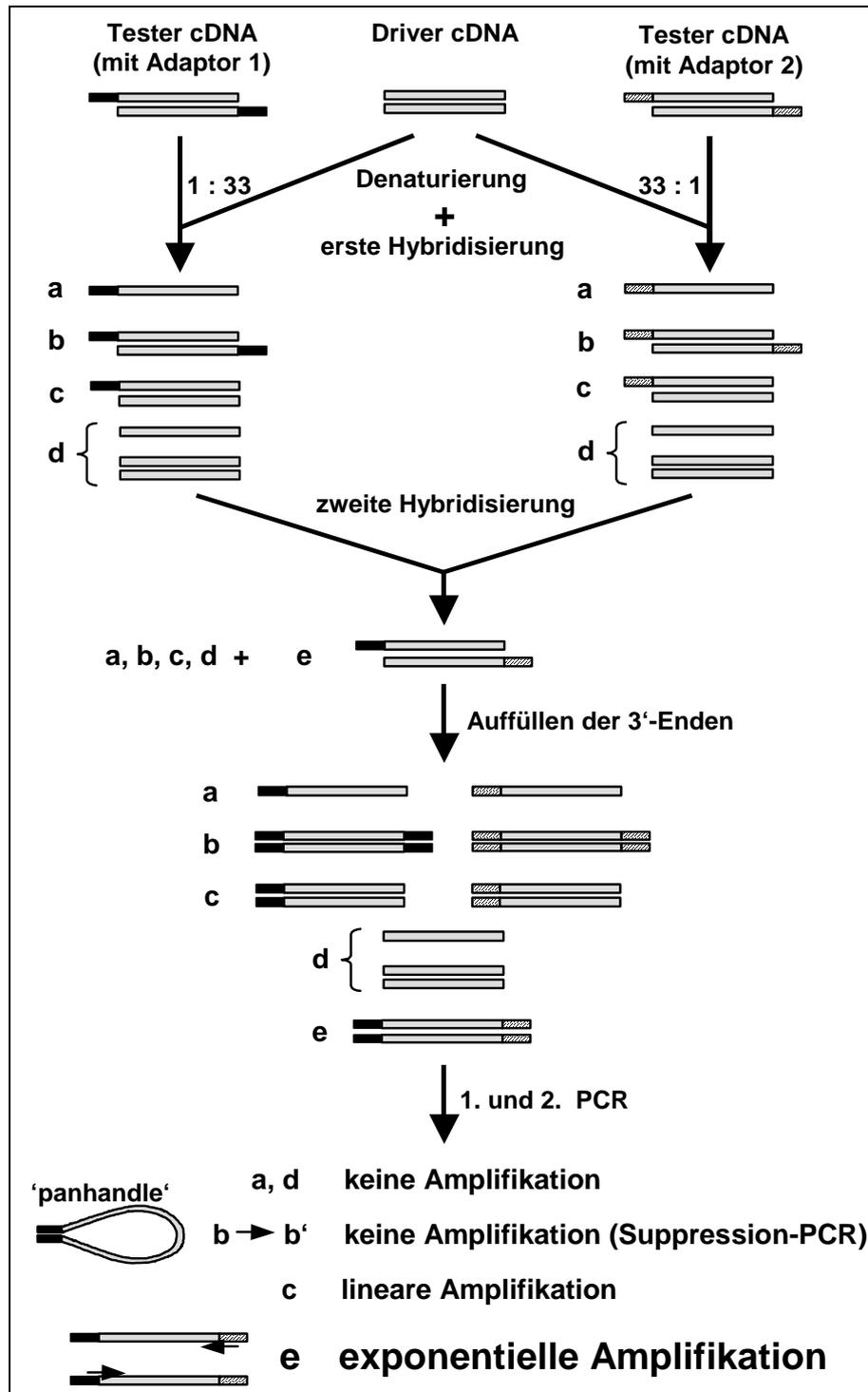
Die Menge des Amplifikationsprodukts eines Transkripts ist bei der cDNA-AFLP-Methode proportional zu seiner Ausgangskopienzahl. Dadurch können anhand der cDNA-AFLP-Gele nach Abgleich der Signalintensitäten über endogene Kontrollgene mit bekannter Fragmentgröße Aussagen über die Expressionsraten einzelner Transkripte gemacht werden (BACHEM et al. 1998; DURRANT et al. 2000; QIN et al. 2000). QIN et al. (2001) haben darüber hinaus ein Computerprogramm (GenEST) entwickelt, mit dem die Größe von virtuellen cDNA-Fragmente von *in silico* verdauten cDNA-Sequenzen kalkuliert werden können. Bei Organismen mit umfassenden EST-Datenbanken ist es dadurch möglich unverzüglich nach der Visualisierung der Expressionsmuster durch Vergleich mit den *in silico* cDNA-AFLPs differenzielle Fragmente hinsichtlich ihrer Sequenzen und Expressionsraten zu charakterisieren. Laborintensive Arbeitsschritte nach der elektrophoretischen Auftrennung wie Isolierung, Reamplifizierung, Klonierung und Sequenzierung einzelner cDNA-AFLP-Fragmente werden somit hinfällig.

#### **1.2.4 Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)**

Die SSH-Methode (siehe Abbildung 3; DIATCHENKO et al. 1996; DIATCHENKO et al. 1999) ist ein auf subtraktiver Hybridisierung basierendes Verfahren zur Aufdeckung quantitativer und qualitativer Unterschiede der Genexpressionsmuster zweier mRNA-Pools. Die Bezeichnungen Driver und Tester werden entsprechend der RDA-Methode verwendet (siehe Abschnitt 1.2.2).

Nach Restriktion der Tester- und Driver-cDNA werden an die in zwei Pools aufgeteilten Tester-Fragmente zwei unterschiedliche Adaptoren ligiert. In einer ersten Hybridisierungsreaktion wird nach Denaturierung in zwei getrennten Ansätzen jeweils Tester-cDNA mit einem hohen Überschuss an Driver-cDNA hybridisiert. Während dieser Hybridisierungsreaktion findet eine Normalisierung der einzelsträngigen

Tester-cDNA-Fragmente (Typ a) statt (BRITTEN und DAVIDSON 1985). Die Konzentrationen abundanter und seltener cDNAs gleichen sich an, da die Rehybridisierung zu homohybriden cDNAs (Typ b) für höher konzentrierte Moleküle schneller abläuft als für solche mit niedrigeren Konzentrationen.



**Abbildung 3** : Schematische Darstellung der SSH-Analyse (verändert nach DIATCHENKO et al. 1996)

Darüber hinaus werden die Moleküle vom Typ a signifikant für differentiell ausgeprägte Tester-cDNA-Fragmente angereichert. Nicht differentielle cDNAs bilden dagegen vermehrt Heterohybride (Typ c) mit komplementären Driver cDNAs. In einer zweiten Hybridisierungsreaktion werden die Produkte der ersten Reaktion ohne vorherige Denaturierung zusammen mit frischer denaturierter Driver-cDNA vermischt. Nur die verbleibenden normalisierten und subtrahierten einzelsträngigen Tester-cDNAs können sich zu Doppelsträngen aneinanderlagern. Es kommt zur Ausbildung der Moleküle vom Typ e, die vorwiegend differentiell exprimierte cDNA-Fragmente beinhalten. Durch zwei aufeinanderfolgende Amplifikationen mit adaptorspezifischen Primern werden nur Typ e Moleküle exponentiell amplifiziert. Die Amplifikation der Typ b Moleküle wird infolge intramolekularer Hybridisierung durch Ausbildung einer sogenannten 'panhandle'-Struktur ('Suppression PCR') stark herabgesetzt (SIEBERT et al. 1995). Die so angereicherten differentiell exprimierten Genfragmente können subkloniert und identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung von Genen die während der Sporenkeimung der beiden pilzlichen Phytopathogene *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* differentiell exprimiert sind. Die Isolierung solcher Gene erfolgt unter Verwendung der beiden differentiellen Techniken cDNA-AFLP und SSH. Mit den differentiell identifizierten Transkripten werden Sequenzanalysen durchgeführt, um Aufschluss über deren mögliche Funktionen während der Sporenkeimung zu erhalten. Des weiteren soll zur Verifizierung der differentiellen Genexpression für ausgewählte Transkripte eine Expressionskinetik während einer 24 stündigen *in vitro* Keimung mittels 'real time' RT-PCR erstellt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pilzmaterial

Für die Experimente wurden das auf dem Versuchsstandort Dürnast isolierte *Phytophthora infestans* Isolat 'DürA1' vom Maiting-Typ A1 (FLEISCHMANN 2000) sowie das aus Großbritannien stammende *Pyrenophora teres* Isolat 'GB 3/2.00' verwendet, welches freundlicherweise von der EpiLogic GmbH Freising zur Verfügung gestellt wurde.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

**Tabelle 1** : Chemikalien und Agenzien

Substanz	Spezifikation	Hersteller
β-Mercaptoethanol	14,3 M	Sigma, St. Louis
[α- <sup>32</sup> P]dTP	3.000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia, Uppsala
Agarose	NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	reinst	Boehringer, Mannheim
APS		Amresco, Ohio
ATP		Amersham Pharmacia, Uppsala
Bacto-Agar		Difco, Ditroit
Bacto-Tryptophan		Difco, Ditroit
Blocking Reagenz		Boehringer, Mannheim
Borsäure	p.a.	Amresco, Ohio
Bromphenolblau		Riedel-de Haën, Seelze
BSA	98%	Roth, Karlsruhe
CaCO <sub>3</sub>		J.T. Baker, Deventer
Chloroform	p.a.	Sigma, St. Louis
dATP		Boehringer, Mannheim
dCTP		Boehringer, Mannheim
DEPC		Sigma, St. Louis
dGTP		Boehringer, Mannheim
DTT	p.a.	Roth, Karlsruhe
dTTP		Boehringer, Mannheim
EDTA	0,5 M	Sigma, St. Louis
Eisessig		Riedel-de Haën, Seelze
EtBr	reinst	Serva, Heidelberg
Ethanol	p.a.	Riedel-de Haën, Seelze

<b>Chemikalie/Agenzien</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>
Formaldehyd	12,3 M	Sigma, St. Louis
Gemüsesaft	8 Gemüsesorten	handelsüblich
D(+)-Glucose	biochem.	Merck, Darmstadt
Glycerin	99,5%	Roth, Karlsruhe
Harnstoff		Amresco, Ohio
HCl	p.a.	Baker, Phillipsburg
Hefeextrakt		Roth, Karlsruhe
Hexanukleotide		Boehringer, Mannheim
Isopropanol	p.a.	Sigma, St. Louis
KCl		Riedel-de Haën, Seelze
Long Ranger™ Gel Solution	50% Acrylamidlösung	FMC, Rockland
Maleinsäure		Sigma, St. Louis
MgCl <sub>2</sub>	p.a.	J.T. Baker, Deventer
MgSO <sub>4</sub>	p.a.	Sigma, St. Louis
Mineralöl (leicht)		Sigma, St. Louis
MOPS	p.a.	Sigma, St. Louis
Na-Acetat	3 M	Sigma, St. Louis
NaCl	p.a.	J.T. Baker, Deventer
NaOH	p.a.	Sigma, St. Louis
Natriumcitrat	p.a.	Sigma, St. Louis
Natriumlaurosylsarcosin		Sigma, St. Louis
Phenol : Chloroform : Isoamyl Alkohol	25 : 24 : 1	Sigma, St. Louis
RNaseZap		Sigma, St. Louis
D(+)-Saccharose	p.a.	Merck, Darmstadt
SDS	krist.	Serva, Heidelberg
SDS	2 x krist.	Serva, Heidelberg
Sephadex-G50	fine	Amersham Pharmacia, Uppsala
TEMED		Amresco, Ohio
Tris	krist.	Roth, Karlsruhe
TRizol® Reagent		Invitrogen, Carlsbad

### 2.1.3 Enzyme, Puffer und Kits

**Tabelle 2 : Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Amplitaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
EcoRI	Amersham Pharmacia, Uppsala
Klenow-Enzym	Boehringer, Mannheim
<i>MseI</i>	New England Biolabs, Beverly
<i>PstI</i>	Amersham Pharmacia, Uppsala
T4 DNA-Ligase	Amersham Pharmacia, Uppsala
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

**Tabelle 3 : Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
10x NEB 2 Puffer	New England Biolabs, Beverly
10x PCR Puffer	Qiagen, Hilden
2x TaqMan <sup>®</sup> PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

**Tabelle 4 : Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Clontech PCR-Select <sup>™</sup> cDNA Subtraction Kit	BD Biosciences, Heidelberg
DNA-free <sup>™</sup> Kit	Ambion, Austin
DYEnamic <sup>™</sup> ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia, Uppsala
High Pure Mini Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
QuantiTect <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
SMART <sup>™</sup> PCR cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences, Heidelberg
TaqMan <sup>®</sup> Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems, Darmstadt
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit for Sequencing	Invitrogen, Groningen

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die cDNA-AFLP-Analysen wurden von Interactiva bezogen. Die Auftragssynthese der degenerierten Primer erfolgte durch Operon. Alle übrigen Oligonukleotide wurden von Applied Biosystems bezogen.

**Tabelle 5** : Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Temp. <sup>a</sup>	Verwendung	
<i>Mse</i> I-Adaptor a	GACGATGAGTCCTGAG	-	Adaptoren	cDNA-AFLP Analyse
<i>Mse</i> I-Adaptor b	TACTCAGGACTCAT	-		
<i>Eco</i> RI-Adaptor a	CTCGTAGACTGCGTACC	-		
<i>Eco</i> RI-Adaptor b	AATTGGTACGCACTG	-		
<i>Pst</i> I-Adaptor a	CTCGTAGACTGCGTACATGCA	-		
<i>Pst</i> I-Adaptor b	TGTACGCAGTCTAC	-		
<i>Mse</i> I	GATGAGTCCTGAGTAA		Präamplifikation	
<i>Eco</i> RI+A	GACTGCGTACCAATTCA			
<i>Pst</i> I+G	GACTGCGTACATGCAGG			
<i>Mse</i> I,+N,+NN,+NNN	GATGAGTCCTGAGTAA , +N <sup>b</sup> , +NN <sup>c</sup> , +NNN <sup>d</sup>		Hauptamplifikation	
<i>Eco</i> RI+ANN	GACTGCGTACCAATTCANN <sup>e, f</sup>			
<i>Pst</i> I+GAT	GACTGCGTACATGCAGGAT <sup>g</sup>			
<i>Pst</i> I+GCA	GACTGCGTACATGCAGGCA <sup>g</sup>			
M13-f (-20)	GTAAAACGACGGCCAG		Sequenzierung; Insertamplifikation	
M13-r	CAGGAAACAGCTATGAC			
Pi-Cytb-f	TCGTTAGCCGGTATTATGTTAGTA		SSH-Analyse	
Pi-Cytb -r	TGGATTATTAGAACCAACTTCATG			
Pi-G3PDH-f	TTGCATCGGTGAGACCAAGGACC			
Pi-G3PDH-r	CTTAGCACTGGCACGCAGCACAA			
Pu-18S-f	TCGGGCAATTGGAATGAGA		abgeleitete Primer	
Pu-18S-r	TCAATGAGCAAACGCCTGC			
Ptr-18S-f	CCTAATTCCCCGTTACCCGTT			
Ptr-18S-r	AAGCTGCTTGCATGTAGCCAG			
Pi-18S-f	GGCTGCCTTTCTGCCATTAAG	60	real-time RT-PCR	
Pi-18S-r	GCAAACGCCTGCTTTAAACACT	60		
Pi-cAFLP-5-f	CACGGTATTGGTCTGGTCCG	60		
Pi-cAFLP-5-r	ACAGCGGACAGTGGAACTCG	60		
Pi-cAFLP-7-f	GCGTCGTGTCGAGTCAAATGT	60		
Pi-cAFLP-7-r	CGGAACGTTGTTCGATGTCCG	60		

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Temp. <sup>a</sup>	Verwendung
Pi-cAFLP-8-f	GCAGTCACACGCAGACTGAGTC	60	
Pi-cAFLP-8-r	TGGTGCCCTATGGTCCTTGTC	60	
Pi-cAFLP-16-f	GCGTCAGCATGCGACTGATA	60	
Pi-cAFLP-16-r	GACCGCCAGAAGGCCATT	60	
Pi-SSH-A4-f	ATAGACGCTCGGAAGGCGATA	60	
Pi-SSH-A4-r	AGGCTCGTGTCCCTCAATCGTT	60	
Pi-SSH-A9-f	GCCAGCCTGGATCGGATT	60	
Pi-SSH-A9-r	AGAGCAGTCCGGTAGGATGACA	60	
Pi-SSH-D5-f	TCGTGAGATCGAGCGGAGTT	60	
Pi-SSH-D5-r	TGTGGCGTGGTGCAGACTT	60	
Pi-SSH-G4-f	GAGATGGAAGCGAGTGGCAA	60	
Pi-SSH-G4-r	CTCGAATTTCTCGCTCCGATAAT	60	
Pi-SSH-G11-f	CAAGCACGCAGCCAAGGTA	60	
Pi-SSH-G11-r	TCACCTTTGGCTACGGGTTTC	60	real-time RT-PCR
Pt-MGB-18S-f	AGCCTTGCGCTGGCG	60	
Pt-MGB-18S-r	TGCCCTATCAACTTTTCGATGGT	60	
Pt-MGB-18S-p	CGGTTTCATTCAAATTT <sup>h</sup>	-	
Pt-cAFLP-1-f	AAGCTGCTTGCATGTAGCCAG	60	
Pt-cAFLP-1-r	CGACCAGTATTCGATTGCATTG	60	
Pt-cAFLP-2-f	ACTTTTCGGTCGAGCCAGACAT	60	
Pt-cAFLP-2-r	GGCTTTGATGCTTTACTGGTGC	60	
Pt-SSH-B2-f	AAGCCCTTTTCAGAACCACACAA	60	
Pt-SSH-B2-r	TCCAACATGCTCTTCACGATTG	60	
Pt-SSH-H5-f	GCCCATGATCCAGAAGATTGAG	60	
Pt-SSH-H5-r	TTGCTCCTCTTCGCTAGAGTGG	60	
Pt-SSH-G12-f	CAGCGGCTGAAGATGCAAA	60	
Pt-SSH-G12-r	TTGGCAAAGTCGTACGTGGAG	60	

<sup>a</sup> Annealing-Temperatur in °C; Selektive Nukleotide sind unterstrichen; Es wurden *Mse*I-Primer mit den selektiven Nukleotiden <sup>b</sup>C, G, T; <sup>c</sup>CC, CG; <sup>d</sup>CAT, CCA verwendet; <sup>e</sup> Alle 16 durch Variation der 3'-terminalen Nukleotide möglichen *Eco*RI-Primer kamen zum Einsatz; <sup>f</sup> Die in der cDNA-AFLP-Analyse verwendeten *Eco*RI-Primer waren an ihrem 5'-Ende mit den Fluoreszenzfarbstoffen 5-FAM, JOE oder TAMRA modifiziert; <sup>g</sup> Die in der cDNA-AFLP-Analyse eingesetzten *Pst*I-Primer waren an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 modifiziert; <sup>h</sup> Die in der real-time RT-PCR verwendete Sonde 'PT-MGB-18S-p' war an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC bzw. am 3'-Ende mit einem nonfluoreszenten Quencher modifiziert

## 2.1.5 Medien und Lösungen

### Medien zur Anzucht der Phytopathogene

#### V8-Agar

20 % (v/v)	Gemüsesaft
1,5 % (w/v)	Bacto-Agar
0,2 % (w/v)	CaCO <sub>3</sub>

#### Gerstenblattagar

20 % (w/v)	frische, zerkleinerte Gerstenblätter (Sorte 'Venus'; anfällig gegen <i>Pyrenophora teres</i> )
2 % (w/v)	Bacto-Agar

### Medien für die Kultivierung von *E. coli*

#### SOC-Medium

2 % (w/v)	Bacto-Tryptophan
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	D(+)-Glucose

#### LB-Medium

2 % (w/v)	Bacto-Tryptophan
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
10 % (w/v)	NaCl

#### Selektivmediumplatten

LB-Medium	
1,5 % (w/v)	Bacto-Agar
75 µg/ml	Ampicillin

### Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

#### 1x TAE

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	EDTA
pH 8,0	

#### 10x DNA-Beladungspuffer

0,2 M	EDTA
40 % (v/v)	Glycerin
0,03 % (w/v)	Bromphenolblau

### Lösungen für die Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

#### 5x MOPS-Puffer

0,2 M	MOPS (pH 7,0)
50 mM	Na-Acetat
5 mM	EDTA (pH 5,0)

#### RNA-Beladungspuffer

1 x	MOPS-Puffer
1 x	DNA-Beladungspuffer
17,5 % (v/v)	Formaldehyd
50 % (v/v)	Formamid
2,5 % (v/v)	EtBr (10 µg/µl)

## Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese

### 5%iges Polyacrylamidgel

10 % (v/v)	Acrylamid-Lösung (Long Ranger™ Gel Solution, 50%)
6 M	Harnstoff
0,7 ‰ (v/v)	TEMED
0,5 ‰ (w/v)	APS
1 x	TBE

### 10x TBE

0,89 M	Tris-Cl
0,89 M	Borsäure
20 mM	EDTA (pH 8,0)

### ABI-Beladungspuffer

15 % (v/v)	GeneScan™-500 ROX™ (Applied Biosystems)
85 % (v/v)	Formamid (deionisiert)
0,01 % (v/v)	Dextranblau

### BRL-Beladungspuffer

100 % (v/v)	Formamid
0,01 % (v/v)	Dextranblau

## Lösungen für die cDNA-AFLP-Analyse

### 1x TE<sub>0,1</sub>

20 mM	Tris
0,1 mM	EDTA (pH 8,0)

## Lösungen für die SSH-Analyse

### 1x TNE

10 mM	Tris-Cl pH (8,0)
10 mM	NaCl
0,1 mM	EDTA

### Maleinsäurepuffer

100 mM	Maleinsäure
150 mM	NaCl
pH 7,5	

### Blockinglösung

10 % (w/v)	Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer
------------	---

### 10x Reaktionspuffer

500 mM	Tris-Cl (pH 7,2)
100 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT
2 mg/ml	BSA
62,5 A <sub>260</sub> /ml	Hexanukleotide

### AGT-Nukleotidmix

167 μM	dATP
167 μM	dGTP
167 μM	dTTP

### (Prä)-Hybridisierungslösung

5 x	SSC
10 % (w/v)	Blockinglösung
0,1 % (w/v)	Natriumlaurosylsarcosin
0,02 % (w/v)	SDS (2 x krist.)

### Waschlösung I

1 x	SSC
0,2 % (w/v)	SDS

### Waschlösung II

0,1 x	SSC
0,2 % (w/v)	SDS

### Striplösung

0,2 N	NaOH
0,2 % (w/v)	SDS

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht und *in vitro* Sporenkeimung der Phytopathogene

Zur Festlegung geeigneter Probennahmezeitpunkte für die RNA-Isolation wurde die *in vitro* Entwicklung der Sporen beider Phytopathogene unter einem Durchlichtmikroskop (Axioplan, Zeiss) bei 400-facher Vergrößerung erfasst und photographisch zwischen 0 und 48 h nach Induktion dokumentiert.

#### 2.2.1.1 *Phytophthora infestans*

Die Anzucht der Isolate von *Phytophthora infestans* erfolgte auf V8-Agar bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Sporangien wurden nach ca. zehn Tagen Wachstum mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  von der Agaroberfläche mit einem sterilen Objektträger abgeschabt und anschließend mittels Filtration durch eine sterile 50  $\mu\text{m}$  Nylonmembran von Mycelresten gereinigt. Der Zoosporenschlupf (indirekte Keimung) wurde in Petrischalen ( $\varnothing$  94 mm) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  bei einer Sporangienkonzentration von  $10^5/\text{ml}$  in Dunkelheit bei 4°C induziert. Nach ca. 1,5 h wurden in der Suspension Konzentrationen von 10 mM NaCl bzw. 25 mM D(+)-Saccharose eingestellt. Nach insgesamt 3 h Entwicklung bei 4°C wurden die keimenden Zoosporen bei 18°C weiter inkubiert. Die Probennahme für die RNA-Isolation erfolgte während der *in vitro* Entwicklung zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4, 8, 12 und 24 h nach Induktion des Zoosporenschlupfes. Der Inhalt der Petrischalen wurde dazu in 50 ml Falconröhrchen überführt und für 3 min bei 15°C und 1.500 g a bzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Sporenpellet sofort in RNA-Isolationspuffer resuspendiert oder bis zu RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.2 *Pyrenophora teres*

Die Isolate von *Pyrenophora teres* wurden auf Gerstenblattagar bei 20°C unter halbtägiger Beleuchtung mit Nah-UV- und Weißlicht kultiviert. Nach ca. 12 Tagen Wachstum wurde sporulierendes Mycel mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  von der Agaroberfläche mit einem sterilen Objektträger abgeschabt und durch eine sterile 50  $\mu\text{m}$  Nylonmembran filtriert. Die Konidienkeimung wurde in Petrischalen ( $\varnothing$  94 mm) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  bei 25°C unter Nah-UV- und Weißlicht bei einer Konidiendichte von  $5 \cdot 10^5/\text{ml}$  induziert. Während der *in vitro* Entwicklung wurden 0, 1, 2, 3, 6, 12 bzw. 24 h nach Induktion der Keimung Proben zur RNA-Isolation genommen. Die Probenaufbereitung erfolgte wie für *Phytophthora infestans* beschrieben.

## 2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Proben erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260nm}$ ) mit einem Spektralphotometer (Amersham Pharmacia). Eine  $OD_{260nm}$  mit dem Wert 1,0 entspricht einer Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l ss RNA bzw. 50 ng/ $\mu$ l ds DNA.

## 2.2.3 Gelelektrophorese

### 2.2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmentgemischen zur Größenbestimmung und Qualitätsabschätzung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese nach AUSUBEL et al. (1999) in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 5 V pro cm Elektrodenabstand. Die in 1x DNA-Beladungspuffer auf das Gel aufgetragene DNA wurde mittels  $UV_{254 nm}$ -Licht induzierter Fluoreszenz von Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ml EtBr in der Gellösung) sichtbar gemacht und dokumentiert (Herolab E.A.S.Y RH).

### 2.2.3.2 Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Die Qualität von RNA wurde mittels Elektrophorese in 1x MOPS-Puffer auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (1x MOPS-Puffer; 17,8% (v/v) Formaldehyd; 1,2% (w/v) Agarose) überprüft (SAMBROCK et al. 1989). Nach der Auftrennung der RNA-Proben für 2 h bei einer Elektrophoresespannung von 5 V/cm Elektrodenabstand wurde die RNA durch Detektion von  $UV_{254 nm}$ -Licht induzierter EtBr-Fluoreszenz dokumentiert.

### 2.2.3.3 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Größenfraktionierung von fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten wurde eine vertikale Elektrophorese in 5%igen Polyacrylamidgelen (PAGE) in 1x TBE durchgeführt. Je nach Anwendung erfolgte die PAGE auf einer der drei nachfolgend beschriebenen Vertikal-Gelelektrophorese-Apparaturen.

Auf dem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer; Gelabmessung: 26 cm x 36 cm x 0,2 mm) erfolgte die Auftrennung und multifluorophore Detektion sowohl von Sequenzierungsprodukten (Laufdauer: 7 h; Elektrophoresespannung: 1650 V) als auch von cDNA-AFLP-Fragmenten (Laufdauer: 4 h; Elektrophoresespannung: 2500 V). Die Rohdaten wurden mit der ABI Prism™ 377-96 Sequencer Data Collection Software Version 2.5 (Perkin Elmer) nach 'online' Detektion der Argon-

Laser induzierten Fluoreszenz von farbstoffmarkierten DNA-Fragmente mittels einer CCD-Kamera erfasst.

Auf der BRL Model AS Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (Life Technologies; Gelabmessung: 31 cm x 17,5 cm x 0,4 mm) wurden DNA-Fragmente für 1,5 h bei einer elektrischen Leistung von 50 W aufgetrennt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte durch nachfolgendes Scannen der Gele mit einem FluorImager™ 595 (Molecular Dynamics; Kameraeinstellung: High Sensitivity; Anregungswellenlänge: 488 nm; Emissionsfilter: 530DF30; PMT Spannung: 800 V; Pixelgröße: 100 µm).

Auf der BRL Model S2 Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (Life Technologies; Gelabmessung: 31 cm x 38,5 cm x 0,4 mm) erfolgte die Auftrennung von DNA-Fragmenten für 2,5 h bei 50 W Elektrophoresleistung. Zur Fragmentdetektion wurden die Polyacrylamidgele nach Laufende mit einem Storm™ 860 Imager (Molecular Dynamics) gescannt (Einstellungen: Red Fluorescence; 900 V PMT Spannung; 100 µm Pixelgröße).

#### 2.2.4 Standard-PCR

Alle DNA-Amplifikationen mittels Polymerase Chain Reaktion (PCR; MULLIS und FALOONA 1987) wurden auf einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Reaktionen fanden unter folgenden Bedingungen in 25 µl Reaktionsvolumen statt: 0,2 µM Primer; jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,025 U/µl Qiagen *Taq* DNA Polymerase; 1x PCR Puffer (Qiagen). Die Cyclerparameter waren wie folgt:

95 °C	2 min	
95 °C	15 s	} 30 Zyklen (Annealingtemperatur x je nach verwendeten Primern)
x °C	15 s	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	

### 2.2.5 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing in den Plasmidvektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO (Invitrogen). Die Plasmide wurden nachfolgend in One Shot<sup>®</sup> TOP10 chemisch kompetente *E. coli* (Invitrogen) transformiert. Beide Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll in halben Ansätzen durchgeführt. Der Transformationsansatz (150 µl) wurde 1 h in SOC-Medium bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend in Aliquots von 10 bis 100 µl auf Selektivmediumplatten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden Einzelkolonien gepickt und in mit selektivem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) befüllten Reaktionsgefäßen (5 ml in Reagenzglasern oder 1 ml in 96er Deepwell Platte (2,2 ml; Eppendorf)) wiederum über Nacht bei 37°C auf einem Horizontalschüttler (200 rpm) inkubiert. Die transformierten *E. coli* Zellen wurden nach Zugabe von 1 Vol. 70%igem Glycerol bei -80°C in Dauerkultur (35% (v/v) Glycerol) konserviert (SAMBROCK et al. 1989).

Die Isolierung von plasmidaler DNA erfolgte mit dem High Pure Mini Plasmid Isolation Kit (Roche) nach Herstellerangaben. Das Isolationsverfahren beruht auf alkalischer Lyse von Bakterienzellen nach der Methode von BIRNBOIM und DOLY (1979) mit nachfolgender säulenchromatographischer Aufreinigung (VOGELSTEIN und GILLESPIE 1979).

### 2.2.6 Sequenzanalyse

Zur Ermittlung von DNA-Sequenzen wurde der DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia) verwendet. Das Sequenzierverfahren basiert auf einer modifizierten Methode der Kettenabbruchreaktion nach SANGER et al. (1977). Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben auf einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Applied Biosystems) bei PCR-Bedingungen gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte unter Verwendung der plasmidspezifischen Primer M13-f (-20) und M13-r. Für die Direktsequenzierung von PCR-Produkten wurden die entsprechenden PCR-Primer verwendet. Zur Beseitigung nicht eingebauter fluoreszenzmarkierter ddNTPs (Terminatoren) wurden die Sequenzierungsprodukte mit Ethanol gefällt und in 2 µl Formamid Loading Dye (im Kit enthalten) rückgelöst.

Zur Detektion der fluoreszenzmarkierten Sequenzierungsprodukte wurde eine vertikale PAGE (siehe Abschnitt 2.2.3.3) durchgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden

mit Sequence Analysis Software Version 3.4.1 (Perkin Elmer) analysiert und mittels Sequence Navigator™ Software Version 1.0.1 (Perkin Elmer) editiert.

Mit den ermittelten DNA-Sequenzen wurde ein Datenbankabgleich unter Verwendung der BLASTN bzw. BLASTX Algorithmen (ALTSCHUL et al. 1997) durchgeführt.

## 2.2.7 cDNA-Synthese

### 2.2.7.1 RNA-Isolation

Um der Gefahr von RNA-Degradation durch Hydrolyse vorzubeugen, mussten verschiedene Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen getroffen werden. Dazu wurden vor Arbeitsbeginn die Arbeitsflächen und alle verwendeten Pipetten mit RNaseZap (Sigma) gereinigt. Es wurde nur RNase-freies oder mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandeltes H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verwendet. Sämtliche Lösungen wurden für mindestens 12 h mit 0,1%igem DEPC behandelt und anschließend autoklaviert. Alle verwendeten Plastikwaren waren als RNase-frei ausgewiesen.

Die RNA-Isolation aus Sporen und vegetativem Mycel erfolgte unmittelbar nach der Probenahme. Dazu wurden 100 mg Probenmaterial in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies) in 2 ml Reaktionsgefäßen mit 500 µl vorgelegten Glasperlen (0,75 bis 1 mm Durchmesser) suspendiert und in einer Kugelmühle (Retsch) für 10 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend dem TRIzol<sup>®</sup> Protokoll durchgeführt. Das gewaschene RNA Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> rückgelöst.

Um Phenolreste und weitere Enzyminhibitoren zu beseitigen wurde die RNA nachfolgend unter Verwendung des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) säulchenchromatographisch nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. In den RNA-Proben enthaltene gDNA-Reste wurde mit dem DNA-free™ Kit (Ambion; Austin) mittels Hydrolyse durch DNaseI beseitigt. Die vollständige Beseitigung der gDNA-Kontaminationen wurde durch Amplifikation der DNaseI-behandelten RNA-Proben (3 µl) mit den 18S rRNA spezifischen Primern Pt-18S-f/r bzw. Pi-18S-f/r nach Standard-PCR-Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.4; Annealingtemperatur 60°C) und anschließender Elektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft.

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch ermittelt. Die Qualität der RNA wurde nach Denaturierung von 2 µl RNA-Probe in 8 µl RNA-Beladungspuffer bei

65°C für 10 min mittels Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.3.2) überprüft.

### **2.2.7.2 cDNA-Synthese für die cDNA-AFLP- und SSH-Analysen**

Da für die Durchführung der cDNA-AFLP- und SSH-Analysen cDNA-Mengen im µg-Bereich benötigt werden, wurde zur Synthese der cDNA für diese Techniken der SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences) gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Die mit der SMART™ (**S**witch **M**echanism **A**t the 5' end of **R**NA **T**ranscripts) Technologie in der Erststrangsynthese erzeugte Vollängen-cDNA besitzt 5'- und 3'- Enden mit jeweils der gleichen Primerbindungsstelle. Dadurch ist es möglich in der sogenannten 'Long Distance' PCR (LD-PCR) mit einem zu den cDNA-Enden komplementären Primer aus geringsten RNA-Mengen ds cDNA im µg-Bereich zu synthetisieren. Alle Inkubations- und Reaktionsschritte wurden auf einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei der Erststrang-cDNA-Synthese wurden 500 ng aufgereinigte RNA in einem 50 µl Reverse Transkriptions (RT) Ansatz eingesetzt. Vorab wurde hierbei ein Versuch zur Ermittlung der optimalen Anzahl von Vermehrungszyklen für die cDNA-Amplifikation in der LD-PCR durchgeführt. Dazu wurden nach 15, 18, 21 und 24 Zyklen jeweils 5 µl aus dem LD-PCR Ansatz entnommen und anschließend elektrophoretisch auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Nachfolgend wurde je Probe eine 100 µl LD-PCR mit der jeweils ermittelten optimalen Zyklenzahl durchgeführt. Die amplifizierte ds cDNA wurde mit Ethanol gefällt (AUSUBEL et al. 1999). Die in 20 µl (für cDNA-AFLP-Analysen) bzw. 50 µl (für SSH-Analysen) H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> rückgelöste cDNA wurde auf einem 1,2%igen Agarosegel qualitativ überprüft und spektralphotometrisch quantifiziert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **2.2.7.3 cDNA-Synthese für die real-time RT-PCR**

Die Herstellung der cDNA für die real-time RT-PCR erfolgte mit den TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) auf einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Applied Biosystems) unter Verwendung von randomisierten Hexameren gemäß Herstellerprotokoll (halbe Ansätze). Je Probennahmezeitpunkt wurde 1 µg gereinigte RNA in einem 50 µl RT-Ansatz zur Synthese von ss cDNA (RNA/DNA-Hybrid) eingesetzt. Zusätzlich wurde in einem weiteren RT-Ansatz (mit RNA des Probennahmezeitpunktes 2 h nach Induktion) cDNA zur Herstellung von

Wasserverdünnungsstufen für die real-time RT-PCR synthetisiert. Die Ansätze wurden 1 : 1 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und bei -80°C bis zum Einsatz in der real-time RT-PCR gelagert.

### 2.2.8 cDNA-AFLP-Analyse

Die Durchführung der cDNA-AFLP-Analyse wurde in Anlehnung an Vos et al. (1995) und BACHEM et al. (1996) durchgeführt. Dabei erfolgt die Identifizierung differentiell exprimierter Gene durch den Vergleich der cDNA-AFLPs aus cDNA eines Grundzustandes mit denen aus cDNA eines differentiellen Zustandes (siehe Tabelle 6).

Alle Inkubations- und Reaktionsschritte wurden auf einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeführt.

**Tabelle 6** : Ansätze für die cDNA-AFLP-Analyse

Pathogen	Enzymkombination	Grundzustand	differentieller Zustand
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>MseI/EcoRI</i>	ungekeimte Sporangien (0 h nach Induktion)	Zoosporenschlupf (1 h nach Induktion)
	<i>MseI/PstI</i>	ungekeimte Sporangien + vegetatives Mycel	Zoosporenkeimung (4 h nach Induktion)
<i>Pyrenophora teres</i>	<i>MseI/EcoRI</i> bzw. <i>PstI</i>	ungekeimte Konidien (0 h nach Induktion)	Konidienkeimung (3 h nach Induktion)

#### 2.2.8.1 Restriktion-Ligation (RL)

Die Hydrolyse der cDNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (*MseI* und *EcoRI* bzw. *PstI*) und die Ligation der Adaptoren an die erzeugten cDNA-Fragmente erfolgte in einem Arbeitsschritt in einem Reaktionsvolumen von 20 µl (0,5 µg SMART™ cDNA; 1 mM ATP; 0,25 U/µl *MseI*; 0,25 U/µl *EcoRI* bzw. *PstI*; 0,05 U/µl T4 DNA Ligase; 2,5 µM *MseI*-Adaptor; 0,25 µM *EcoRI*- bzw. *PstI*-Adaptor; 1x NEB2 Reaktionspuffer). Der RL-Ansatz wurde bei 37°C für 3 h inkubiert und anschließend im Verhältnis 1 : 10 mit 1x TE<sub>0,1</sub> verdünnt.

#### 2.2.8.2 Präamplifikation

Die Präamplifikation wurde ebenfalls in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt (4 µl verdünnter RL-Ansatz; 0,2 mM dNTPs; 0,125 µM *MseI* Primer; 0,125 µM *EcoRI*+A bzw. *PstI*+G Primer; 0,025 U/µl Qiagen DNA Polymerase; 1x PCR-Puffer (Qiagen)). Während einer Anfangsinkubation bei 72°C für 2 min

wurden die 3'-Enden der Adaptoren durch die DNA Polymerase aufgefüllt. Die nachfolgende PCR umfasste 20 Zyklen (94°C 10 s; 56°C 30 s; 72°C 2 min) mit einem abschließenden Elongationsschritt bei 60°C für 30 min. Zur Erfolgskontrolle der Präamplifikation wurden 10 µl des Reaktionsansatzes auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert. Der restliche Präamplifikationsansatz wurde mit 1x TE<sub>0,1</sub> im Verhältnis 1 : 20 verdünnt. Die Lagerung nicht benötigter RL- und Präamplifikationsansätze erfolgte bei -20°C.

### 2.2.8.3 Hauptamplifikation

In der Hauptamplifikation kamen *MseI* Primer mit 0, 1, 2 oder 3 selektiven Nukleotiden sowie *EcoRI* bzw. *PstI* Primer mit je 3 selektiven Nukleotiden zum Einsatz. Die *EcoRI* Primer waren an ihrem 5'-Ende mit den Fluoreszenzfarbstoffen 5-FAM, JOE oder TAMRA, die *PstI* Primer mit Cy5 modifiziert. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl (4 µl verdünnter Präamplifikationsansatz; 0,2 mM dNTPs; 0,25 µM *MseI*, +N, +NN oder +NNN Primer; 0,1 µM *EcoRI*+ANN bzw. *PstI*+GAT oder +GCA Primer; 0,025 U/µl Qiagen DNA Polymerase; 1x PCR-Puffer (Qiagen)). Die Reaktionsparameter waren wie folgt:

95 °C	2 min	
94 °C	30 s	} 9 Zyklen (1°C-Temp.-Abnahme pro Cycle)
65 °C	30 s	
72 °C	2 min	
94 °C	30 s	
56 °C	30 s	
72 °C	2 min	
60 °C	30 min	

### 2.2.8.4 Auswertung

Die fluoreszenzmarkierten cDNA-AFLP-Fragmente wurden über vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.3.3).

Die Auftrennung und Detektion der mit *EcoRI*-Primern amplifizierten cDNA-AFLP-Fragmente wurde auf dem ABI Prism™ 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer) durchgeführt. Vor der Elektrophorese wurde 1 µl Hauptamplifikationsprodukt mit 0,5 µl ABI-Beladungspuffer versetzt und für 3 min bei 94°C denaturiert. Die Fragment-

analyse erfolgte semiautomatisch unter Verwendung von GeneScan™ Analysis Software Version 3.0 (Perkin Elmer).

Da eine Isolierung von Fragmenten auf dem ABI Prism™ 377 nicht möglich ist, folgte eine erneute Auftrennung der Primerkombinationen, die eindeutig differentielle Fragmente aufwiesen, auf einer BRL Model AS Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (Life Technologies). Vor der Elektrophorese wurde 1 µl Hauptamplifikationsprodukt mit 1 µl BRL-Beladungspuffer versetzt und für 3 min bei 94°C denaturiert.

Die mit *Pst*I Primern amplifizierten cDNA-AFLPs wurden mit Ethanol gefällt (AUSUBEL et al. 1999) und in 5 µl 50%igem (v/v) BRL-Beladungspuffer rückgelöst. Nach Denaturierung (94°C; 3 min) von 5 µl rückgelöstem Hauptamplifikationsprodukt folgte die Auftrennung auf einer BRL Model S2 Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (Life Technologies).

Die Auswertung der gescannten cDNA-AFLPs erfolgte mit ImageQuant Version 5.0 (Molecular Dynamics).

#### **2.2.8.5 Isolierung einzelner cDNA-AFLP-Fragmente**

Zur Isolierung einzelner cDNA-AFLP-Fragmente wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus dem noch feuchten Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Dabei diente ein 1 : 1 Ausdruck des Gelbildes zur Bestimmung der Position der Fragmente im Gel. Die erfolgreiche Isolierung der jeweiligen Fragmente wurde durch nochmaliges Scannen des Geles überprüft. Die Fragmente wurden über Nacht bei 4°C in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> passiv eluiert und nachfolgend mit den Primern der jeweiligen Hauptamplifikation unter Einsatz von 4 µl Eluat bei Standard-PCR-Parametern (siehe Abschnitt 2.2.4) und einer Annealingtemperatur von 56°C reamplifiziert.

Konnten nach elektrophoretischer Auftrennung von 5 µl Reamplifikationsansatz auf einem 1,5%igem Agarosegel diskrete Einzelbanden identifiziert werden, folgte im Anschluss an eine Ethanol-fällung (AUSUBEL et al. 1999) die Direktsequenzierung der PCR-Produkte mit den Präamplifikationsprimern (siehe Abschnitt 2.2.6).

Wurden nach der Gelelektrophorese des Reamplifikationsansatzes hingegen multiple Banden detektiert, folgte zur Vereinzelung der PCR-Produkte eine Klonierung mit anschließender Sequenzierung unter Verwendung der plasmidspezifischen Primer M13-f (-20) und M13-r (siehe Abschnitte 2.2.5 und 2.2.6).

### 2.2.9 SSH-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences) verwendet, um spezifische Gene der Sporenkeimung von *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* zu identifizieren. Im Folgenden werden die Bezeichnungen 'Driver' für den Grundzustand (ungekeimte Konidien bzw. Sporangien) und 'Tester' für den differentiellen Entwicklungsabschnitt (Konidienkeimung bzw. Zoosporenschlupf) verwendet (Tabelle 7). Alle Arbeitsschritte wurden soweit nicht näher erläutert nach den Angaben des PCR-Select™ User Manuals (PT1117-1) durchgeführt. Sämtliche Amplifikations- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Applied Biosystems).

**Tabelle 7** : Ansätze für die SSH-Analyse

Pathogen	Driver	Tester
<i>Phytophthora infestans</i>	ungekeimte Sporangien (0 h nach Induktion)	Zoosporenschlupf (1 h nach Induktion)
<i>Pyrenophora teres</i>	ungekeimte Konidien (0 h nach Induktion)	Konidienkeimung (3 h nach Induktion)

#### 2.2.9.1 RsaI-Verdau und Adaptor-Ligation

Für Driver und Tester wurden jeweils 2 µg der ethanolgefällten SMART™ cDNA mit *RsaI* Endonuklease verdaut. Um den Erfolg der Restriktion zu überprüfen wurden 5 µl des 50 µl Restriktionsansatzes zusammen mit 6 µl unverdauter cDNA auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Aufreinigung des Ansatzes erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol- und nachfolgender Ethanol-fällung. Das cDNA-Pellet wurde in 6,9 µl 1 x TNE aufgenommen. Mit 1,4 µl der rückgelösten cDNA wurde eine spektralphotometrische DNA-Quantifizierung vorgenommen. Wurden cDNA-Konzentrationen von mehr als 300 ng/µl festgestellt, erfolgte eine entsprechende Verdünnung mit 1 x TNE auf 300 ng/µl.

Zur Adaptor-Ligation wurde 1 µl *RsaI*-verdaute Tester-cDNA mit 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt. Die Ligation der Adaptoren 1 bzw. 2R an die Enden der Tester cDNA-Fragmente erfolgte jeweils mit 2 µl verdünnter Tester cDNA.

#### 2.2.9.2 Subtraktive Hybridisierungen und Amplifikation

In der ersten Hybridisierungsreaktion wurden in zwei getrennten Ansätzen jeweils 1,5 µl der mit Adaptor 1 bzw. 2R ligierten Tester-cDNA mit 1,5 µl Driver-cDNA

versetzt. Dies entspricht etwa einem 33-fachen Überschuss an Driver-cDNA. Vor einer Denaturierung bei 98°C für 1,5 min wurden die Hybridisierungsansätze mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und kurz abzentrifugiert. Die anschließende Hybridisierung erfolgte bei 68°C für 8 h. Nach Ablauf der 8 h wurden unverzüglich die Ansätze der ersten Hybridisierung zusammengeführt und mit 1 µl verdünnter, denaturierter Driver-cDNA vermengt. Der zweite Hybridisierungsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt und über Nacht bei 68°C inkubiert. Die subtrahierte cDNA wurde nach Verdünnung bei -20°C gelagert.

Vor der ersten Amplifikation von 1 µl verdünnter subtrahierter cDNA wurden die 3'-Enden der Adaptoren, während einer Inkubation des PCR-Ansatzes bei 75°C für 5 min, aufgefüllt. In der zweiten ('nested') Amplifikation wurden 3 µl verdünntes PCR-Produkt der ersten Amplifikation eingesetzt. Im Anschluss wurde das Produkt der zweiten Amplifikation in einen Plasmidvektor kloniert und in *E. coli* transformiert. Nach Inkubation über Nacht wurden je SSH-Ansatz 96 Einzelkolonien gepickt, in 96er Deepwell Platten (2,2 ml; Eppendorf) wiederum über Nacht kultiviert und als Dauerkultur gelagert. (siehe Abschnitt 2.2.5)

### 2.2.9.3 Sichtung der subtrahierten cDNA-Banken

Zur Durchführung eines 'differential screenings' der subtrahierten cDNA-Banken wurden 'dot blots' hergestellt und mit radioaktiv markierter Driver- bzw. subtrahierter cDNA hybridisiert (JIN et al. 1997).

Dazu wurden die inserierten cDNA-Abschnitte unter Verwendung der plasmidspezifischen Primer M13-f (-20) und M13-r aus 1 µl Dauerkultur nach Standard-PCR-Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.4) bei einer Annealingtemperatur von 55°C amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden einer Ethanol-fällung unterzogen (AUSUBEL et al. 1999) und in 8 µl 0,25 M NaOH rückgelöst. Je subtrahierter cDNA-Bank erfolgte die Herstellung von zwei identischen 96er 'dot blots' durch den Transfer von 2 µl des rückgelösten Plasmidinserts (20 ng/µl) mit einer Mehrkanalpipette (Eppendorf) auf eine Nylonmembran. Die Fixierung der DNA fand in einer GS Gene Linker™ UV-Chamber (BioRad) unter Einwirkung von 125 mJoule UV-Strahlung statt.

Die radioaktive Markierung der Driver- und subtrahierten cDNA wurde nach dem 'random primed labeling'-Verfahren (FEINBERG und VOGELSTEIN 1983) durchgeführt. Je Markierung wurden 50 ng cDNA bei 95°C für 5 min denaturiert und auf Eis

abgekühlt. Anschließend wurden 1,4 Mbq [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (300 Ci/mmol), 3  $\mu$ l AGT-Nukleotidmix, 2  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer und 2 U Klenow-Enzym zugegeben und der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l für 2 h bei 37°C inkubiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden über Sephadex-G50-Säulchen entfernt. Die spezifische Aktivität der Proben wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt.

Vor der Hybridisierung wurden die 'dot blots' zur Beseitigung von Verunreinigungen für 30 min bei 65°C in Waschlösung I gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Prähybridisierung für mindestens 4 h bei 65°C im Drehinkubator. Die eigentliche Hybridisierung fand nach Denaturierung der Proben bei 95°C für 10 min bei einer spezifischen Aktivität von  $1 \times 10^6$  cpm pro ml Hybridisierungsvolumen über Nacht bei 65°C im Drehinkubator statt. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proben-cDNA folgten Waschschriffe mit unterschiedlicher Stringenz unter Verwendung der Waschlösungen I und II bei 50 bis 60°C für 5 bis 30 min. Die Membranen wurden auf Whatman-Paper angetrocknet und in Klarsicht-hüllen zusammen mit einem Storage Phosphor Screen (Kodak) in Röntgenkassetten für mindestens 24 h bei Raumtemperatur exponiert.

Nach Scannen der Storage Phosphor Screens in einem Storm<sup>TM</sup> 860 Imager (Molecular Dynamics; Einstellungen: Phosphor Screen; 100  $\mu$ m Pixelgröße), folgte die Auswertung mit ImageQuant Version 5.0 (Molecular Dynamics). Solche Klone, die auf dem mit subtrahierter cDNA hybridisierten Filter ein kräftiges Signal zeigten, nicht aber auf dem mit Driver cDNA hybridisierten Filter, wurden als differentielle Sequenzen eingeordnet. Klone, die auf beiden Filtern eindeutige Hybridisierungssignale aufwiesen wurden als falsch positiv klassifiziert.

### **2.2.10 Quantitative Analyse der Genexpression**

Die quantitative Analyse der Genexpression während der Sporenkeimung von ausgewählten Sequenzen der cDNA-AFLP- und SSH-Analysen wurde mittels real-time Reverse Transkriptions- (RT) PCR (BUSTIN 2000) auf einem ABI Prism<sup>TM</sup> 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt.

#### **2.2.10.1 Real-time RT-PCR**

Die Quantifizierung der in der real-time RT-PCR synthetisierten PCR-Produkte erfolgt durch kontinuierliche Erfassung der laserinduzierten Fluoreszenzsignale von in der Reaktion enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals

ist dabei direkt proportional zur PCR-Produktmenge. Es wird davon ausgegangen, dass mit Erreichen eines Fluoreszenzschwellenwertes ('threshold') in jeder Probe die gleiche Kopienzahl der analysierten DNA-Sequenz enthalten ist. Der PCR-Zyklus, mit dem dieser 'threshold' überschritten wird, wird als Ct-Wert ('threshold cycle') bezeichnet.

Alle verwendeten Primer und die Sonde 'Pt-MGB-18S-p' wurden mit Primer Express™ Version 4.0 (Applied Biosystems) unter den in Tabelle 8 aufgeführten Vorgaben entworfen.

**Tabelle 8** : Vorgegebene Parameter beim Design der RT-PCR-Systeme

Parameter	5'-3'-Exonuklease Assay	SYBR® Green Assay
Primerlänge	18 – 22 bp	18 – 22 bp
Annealingtemperatur (Primer)	59 – 60°C	59 – 60°C
Templatelänge	60 – 80 bp	100 – 150 bp
Annealingtemperatur (Sonde)	10°C über Primerannealingtemp.	–

Zur Quantifizierung der endogenen Referenz von *Pyrenophora teres* wurde ein 5'-3'-Exonuklease Assay (HOLLAND et al. 1991; HEID et al. 1996) verwendet. Die eingesetzte 'minor groove binding' Sonde (MGB; KUTYAVIN et al. 2000) war am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC am 3'-Ende mit einem nicht fluoreszenten Quencher modifiziert. Die Reaktionen setzten sich wie folgt zusammen: 3 µl cDNA; jeweils 300 nM Primer (Pt-MGB-18S-f bzw. -r); 200 nM Sonde (Pt-MGB-18S-p); jeweils 400 µM dATP, dCTP, dGTP und 1 U Amplitaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) in 1 x TaqMan® PCR Master Mix und 25 µl Reaktionsvolumen.

Die Quantifizierung der übrigen Transkripte erfolgte unter Verwendung des QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I (WITTMER et al. 1997; MORRISON et al. 1998) interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA. Die Reaktionen erfolgten in einem 25 µl Ansatz mit 3 µl cDNA und 300 nM Primer in 1x QuantiTect™ SYBR® Green PCR Puffer.

Sämtliche Reaktionen wurden zwei mal wiederholt.

Das Temperaturprofil der '3 Step-real-time' RT-PCR auf dem ABI Prism™ 7700 SDS war sowohl für den 5'-3'-Exonuklease Assay als auch für den SYBR® Green I Assay wie folgt:

95 °C	15 min	
94 °C	15 s	} 45 Zyklen
60 °C	30 s	
72 °C	30 s	

Die Datenakquisition fand in jedem Zyklus während des Extensionsschrittes statt. Der Hersteller empfiehlt die Durchführung einer '2 Step-PCR', mit Datenakquisition während einer kombinierten Primeranlagerungs- und Verlängerungsphase bei 60°C. Bei einer Temperatur von 60°C während der Datenakquisition besteht die Gefahr, dass unspezifisch amplifizierte PCR-Produkte und Primerdimere durch die Verwendung von SYBR® Green I fälschlicherweise mit in die Quantifizierung eingehen. Durch Erhöhung der Temperatur auf 72°C mit resultierender Denaturierung der unspezifisch gebildeten ds DNA wurde eine Verfälschung der Messergebnisse minimiert.

Im Anschluss an die Amplifikation folgte ebenfalls auf dem ABI Prism™ 7700 SDS eine Schmelzkurvenanalyse (RIRIE et al. 1997) mit nachfolgender Auswertung durch die Anwendung Dissociation Curves 1.0f (Applied Biosystems). Dazu wurden die Amplifikationsprodukte für 5 s bei 95°C denaturiert und nach Abkühlung auf 60°C während 19 min 59 s wiederum auf 95°C erhitzt. Während dieses Temperaturanstieges wurden die PCR-Produkte mit Erreichen der molekülspezifischen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) denaturiert. Dies hat eine abrupte Reduzierung des SYBR™ Green I Signals zur Folge. Die erste Ableitung dieser Kinetik weist im Idealfall, für singuläre PCR-Produkte, ein diskretes Maximum bei der entsprechenden Schmelztemperatur auf. Diese Temperatur sollte mit der durch Primer Express™ für das Amplikon kalkulierten Schmelztemperatur übereinstimmen. Zusätzlich wurden die PCR-Ansätze hinsichtlich unspezifischer Amplifikation auf einem 3,5%igen Agarosegel analysiert.

### 2.2.10.2 Endogenes Referenzgen

Um systemimmanente Schwankungen wie Unterschiede der eingesetzten RNA-Mengen zur cDNA-Synthese oder Variationen der Reverse Transkriptase- bzw. DNA-Polymerase-Aktivitäten in den einzelnen cDNA-Proben auszugleichen ist ein endogenes Referenzgen notwendig. Ein geeignetes Referenzgen darf in seiner Expression durch den experimentellen Ansatz nicht beeinflusst werden, d.h. das Expressionsniveau sollte über alle Probennahmezeitpunkte konstant bleiben. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Teilsequenz der 18S ribosomalen RNA als endogene Referenz ausgewählt. Die Sequenzen für *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* wurden von den 18S rRNA Sequenzen der nahe verwandten Phytopathogene *Phytophthora undulata* (EMBL Akzessionsnummer PUN238654) bzw. *Pyrenophora tritici-repentis* (EMBL Akzessionsnummer PT42486) abgeleitet. Dazu wurde eine Standard-PCR (siehe Abschnitt 2.2.4) mit den Primern Pu-18S-f und -r bzw. Ptr-18S-f und -r bei 60°C Annealingtemperatur unter Einsatz von jeweils 3 µl cDNA des Probennahmezeitpunktes 0 h nach Induktion von *Phytophthora infestans* oder *Pyrenophora teres* durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden kloniert und anschließend unter Verwendung der plasmidspezifischen Primer M13-f (-20) und M13-r sequenziert (siehe Abschnitte 2.2.5 und 2.2.6).

Zur Überprüfung auf konstante Expressionsraten von 18S rRNA während der *in vitro* Sporenkeimung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Dabei wurde die Beziehung zwischen 18S rRNA-Gehalten in der Gesamt-RNA und den Zeitpunkten während der Sporenkeimung analysiert (SCHMITTGEN und ZAKRAJSEK 2000). Die Reaktionen erfolgten in 5 Wiederholungen für jeden Probennahmezeitpunkt auf dem ABI Prism™ 7700 SDS unter den in Abschnitt 2.2.10.1 beschriebenen Bedingungen. Die n-fache Induktion der 18S rRNA-Menge war die abhängige Variable. Ein *P*-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Zur Durchführung der ANOVA wurde SPSS Version 11.0.1 (SPSS Inc.) verwendet.

### 2.2.10.3 Quantifizierung der Genexpression

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die PCR-Effizienz (*E*) für jedes Primer-Template-System ermittelt. Dazu wurden Wasserverdünnungsstufen aus der dafür synthetisierten cDNA (siehe Abschnitt 2.2.7.3) mit den Verdünnungsfaktoren 1, 0.3, 0.1, 0.03 und 0.01 hergestellt und mit jedem Primerpaar der differentiellen Gene und

der endogenen Referenzen amplifiziert. Der  $E$ -Wert wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$E = 10^{\frac{-1}{m}} - 1$$

Wobei  $m$  die Steigung der Regressionsgerade durch die Ct-Werte der Verdünnungsstufen ist.

Die Berechnung der relativen Genexpression eines 'target'-Gentranskripts erfolgte nach PFAFFL (2001):

$$\text{relative Genexpression} = \frac{(1 + E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}}}{(1 + E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}}}$$

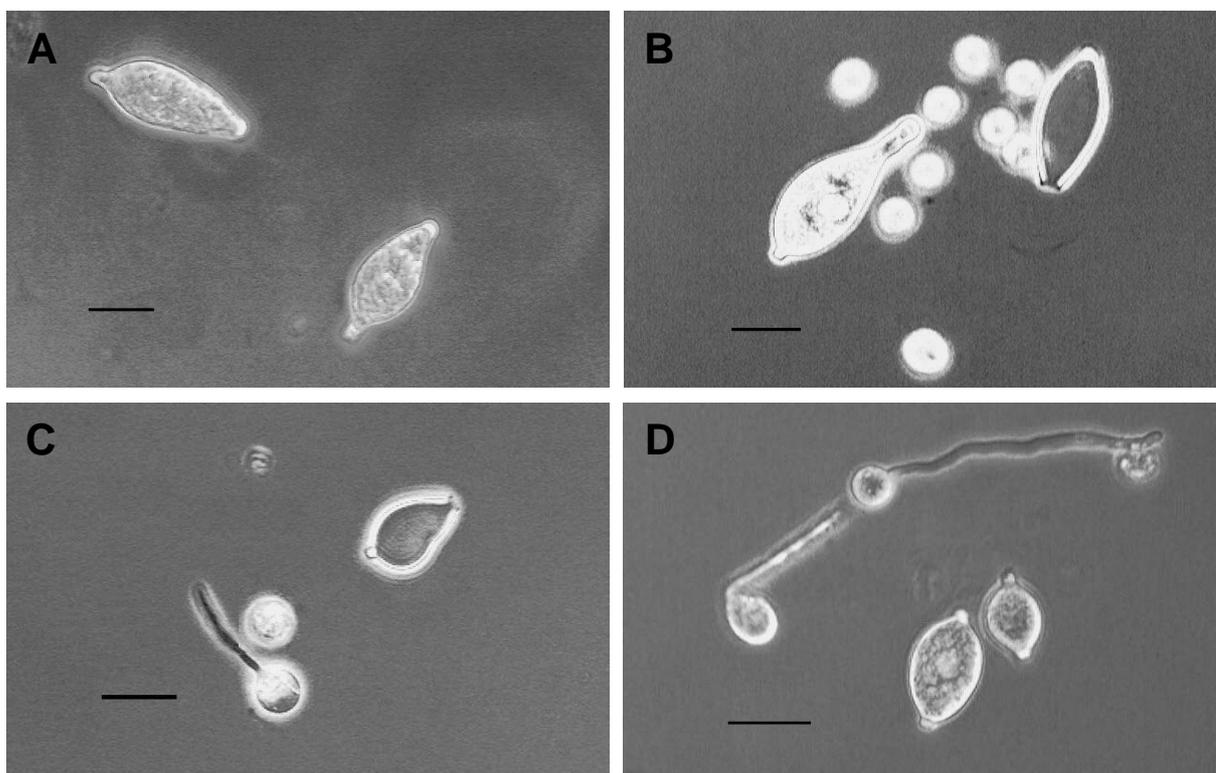
Dabei ist  $E_{\text{target}}$  die PCR-Effizienz des 'target'-Gentranskripts und  $E_{\text{ref}}$  die PCR-Effizienz des endogenen Referenzgentranskripts. Der durchschnittliche Ct-Wert der Transkripte von ungekeimten Sporen (0 h nach Induktion) wurde als Kalibrator zur Berechnung der relativen Expression des 'target'-Gentranskripts zu jedem Probenahmezeitpunkt herangezogen. Die relative Expressionsrate zum Zeitpunkt 0 h nach Induktion hat daher für jedes analysierte Gen den Wert 1.  $\Delta Ct_{\text{target}}$  ist die Differenz der durchschnittlichen Kalibrator-Ct-Werte und der durchschnittlichen Proben-Ct-Werte des 'target'-Gentranskripts.  $\Delta Ct_{\text{ref}}$  ist die Differenz der durchschnittlichen Kalibrator-Ct-Werte und der durchschnittlichen Proben-Ct-Werte des endogenen Referenzgentranskripts.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Phytophthora infestans*

##### 3.1.1 *In vitro* Sporenkeimung und cDNA-Synthese

Zur Festlegung geeigneter Probennahmezeitpunkte für die RNA-Isolation ist eine genaue Kenntnis der zeitlichen Entwicklungsabfolge des verwendeten Isolates während der Sporenkeimung erforderlich. Durch Beobachtung der morphologischen Veränderungen frischer Sporangien (Abbildung 4 A) während der *in vitro* Keimung konnte einem bestimmten Entwicklungsabschnitt eine entsprechende Zeit nach Induktion der Sporenkeimung zugeordnet werden. Die Entwicklung wurde unter einem Durchlichtmikroskop während 24 h verfolgt.



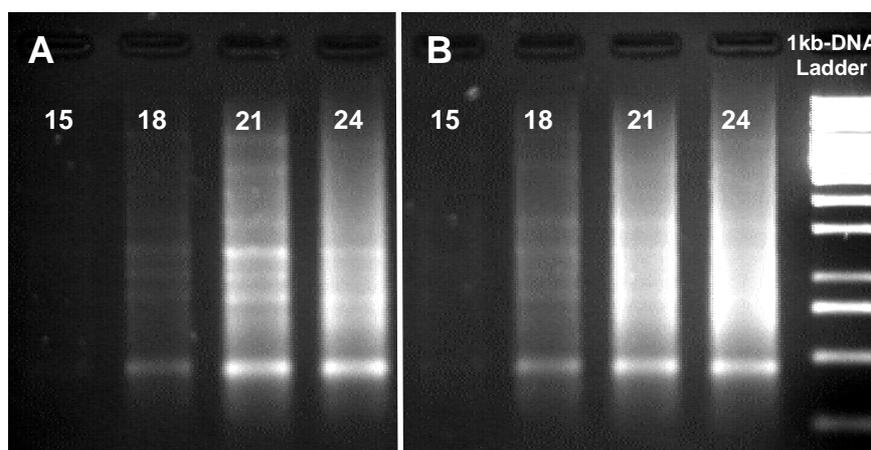
**Abbildung 4 A-D:** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) der indirekten Keimung (*in vitro*) von *Phytophthora infestans* (— = 20 µm). **A** ungekeimte Sporangien (0 h). **B** Zoosporenschlupf (1,5 h nach Induktion). **C** keimende Zoospore (6 h nach Induktion). **D** keimende Zoosporen (12 h nach Induktion).

Nach 1,5 h bei 4°C konnte der Zoosporenschlupf fest gestellt werden, wobei ungefähr 60% der Sporangien hatten freischwimmende Zoosporen freigesetzt (Abbildung 4 B). 6 h nach Induktion zeigten ca. 30% der encystierten und auf der Oberfläche festgesetzten Zoosporen ausgeprägte Keimschläuche mit einer Länge von bis zum Dreifachen des Sporendurchmesser (Abbildung 4 C: Zoospore mit Keimschlauch,

neben ungekeimter Zoospore und einem leeren Sporangium). Nach 12 h waren etwa 45% der Zoosporen gekeimt, bei einer Keimschlauchlänge von bis zum Zehnfachen des Sporendurchmessers (Abbildung 4 D). 24 h nach Induktion konnte mycel-ähnliches Geflecht aus sich verzweigenden und weiter verlängernden Hyphen beobachtet werden.

Zur Identifizierung von induzierten Genen während des Zoosporenschlupfes wurde aufgrund obiger Beobachtungen der Zeitpunkt 1 h nach Induktion festgesetzt. Der Zeitpunkt 4 h nach Induktion wurde zur Identifizierung induzierter Gene während der Zoosporenkeimung herangezogen. Um eine Expressionskinetik der identifizierten Gene während der ersten 24 h der Sporenentwicklung erstellen zu können wurde darüber hinaus zu den Zeitpunkten 2, 8, 12 und 24 h nach Induktion, aus ungekeimten Sporangien (0 h) sowie aus vegetativem Mycel RNA isoliert.

Die Integrität der RNA wurde mittels Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Eine im Anschluss an die enzymatische Hydrolyse von gDNA-Resten durchgeführte Kontroll-PCR mit den 18S rRNA spezifischen Primern Pi-18S-f und -r führte zu keiner Fragmentamplifikation. Verfälschende gDNA-Kontaminationen konnten demzufolge ausgeschlossen werden. Der Versuch zur Ermittlung der optimalen Zyklenzahl zur cDNA-Synthese für die cDNA-AFLP- und SSH-Analyse ergab eine optimale Zyklenzahl von jeweils 18 Zyklen für die Probenahmezeitpunkte 0 h (ungekeimte Sporangien), 1 h (Beginn Zoosporenschlupf) bzw. 4 h (Beginn Zoosporenkeimung) nach Induktion (Abbildung 5).



**Abbildung 5 A,B:** Ermittlung der optimalen PCR-Zyklenzahl für die SMART™ cDNA-Synthese über Gelelektrophorese. **A** RNA von ungekeimten Sporangien. **B** RNA während des Zoosporenschlupfes von *Phytophthora infestans*.

Als optimale Zyklenzahl wird nach SMART™ PCR cDNA Synthese Protokoll derjenige Zyklus definiert, bei dem nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein deutlicher, aber nicht zu intensiver cDNA-Schmier mit noch diskreten Einzelbanden erkennbar wird. Die RNA-Proben wiesen folglich aufgrund ähnlichen Verhaltens in der cDNA-Synthese hohe Homogenität bezüglich ihrer Qualität und Quantität auf.

### 3.1.2 Isolierung von keimungsspezifischen Genen

#### cDNA-AFLP-Methode

Zur Aufdeckung der Expressionsunterschiede zwischen ungekeimten Sporangien (0 h) und zu Beginn des Zoosporenschlupfs (1 h) bzw. zu Beginn der Zoosporenkeimung (4 h) wurde die cDNA-AFLP-Methode unter Verwendung der Enzymkombinationen *MseI/EcoRI* sowie *MseI/PstI* angewandt. Die *PstI*-Primer der *MseI/PstI*-Primerkombinationen besaßen drei selektive Nukleotide (GAT bzw. GCA), während die *MseI*-Primer mit null bis drei Basen verlängert waren. Beim *MseI/EcoRI*-Enzymsystem wurden die 16 möglichen *EcoRI*+ANN-Primer in Kombination mit *MseI*-Primern ohne selektive Base verwendet. Wie bei SCHWARZ (2000) führten die Reaktionen mit den Primern *EcoRI*+AAA und *EcoRI*+ATT zu keiner Fragmentamplifizierung. Es wurden Banden mit einer Sequenzlänge von 100 bis 900 bp analysiert. Eine Übersicht der Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analyse ist in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9** : Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analysen bei *Phytophthora infestans*

differentieller Zustand	Zoosporenschlupf (1h nach Induktion)	Zoosporenkeimung (4h nach Induktion)
verwendete Enzymkombination	<i>MseI/EcoRI</i>	<i>MseI/PstI</i>
Anzahl verwendeter Primerkombinationen	16	10
Gesamtzahl detektierter Banden (Ø)	447 (27,9)	169 (16,9)
Gesamtzahl monomorpher Banden (Ø; %)	307 (19,2; 68,7%)	120 (12; 71,0%)
Anzahl polymorpher Banden in ungekeimten Sporangien (Ø; %)	87 (5,4; 19,5%)	30 (3; 17,8%)
Anzahl polymorpher Banden im differentiellen Zustand (Ø; %)	53 (3,3; 11,8%)	19 (1,9; 11,2%)

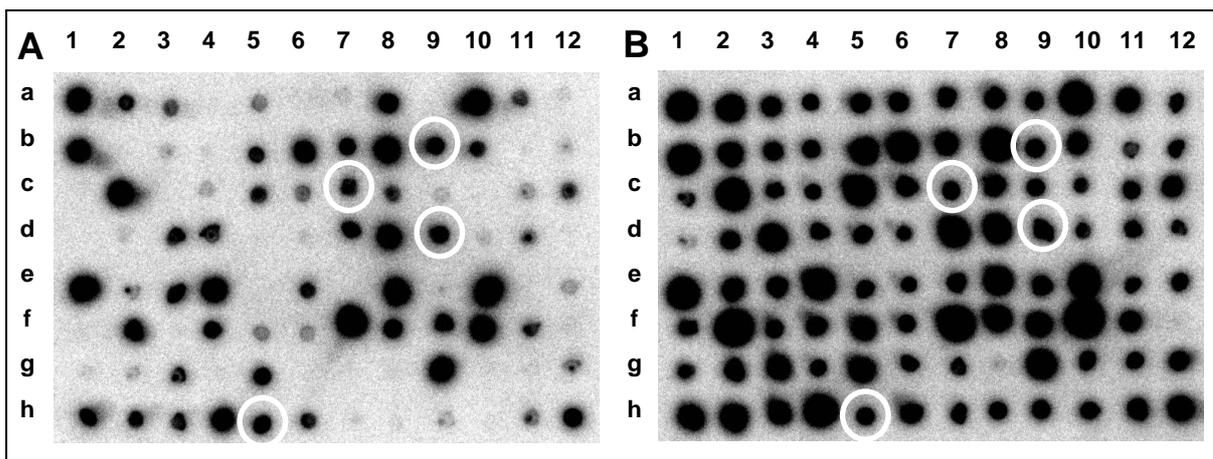
Ø = durchschnittliche Anzahl je Primerkombination  
% = Anteil an der Gesamtzahl der detektierten Banden

Um die Sequenzen der im differentiellen Zustand induzierten Gene zu erhalten, mussten die entsprechenden Banden aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten werden. Nur Fragmente der *MseI/PstI*-Enzymkombination wurden verfolgt. Es

wurden 17 für die Zoosporenkeimung polymorphe Banden ausgeschnitten, von denen 9 erfolgreich reamplifiziert und sequenziert werden konnten.

### **SSH-Methode**

Zur Isolierung differentiell exprimierter Gene während des Zoosporenschlupfes wurde die SSH-Methode angewandt. Als Driver diente cDNA des Probenahmezeitpunktes 0 h (ungekeimte Sporangien). Als Tester wurde cDNA des Probenahmezeitpunktes 1 h nach Induktion (Beginn Zoosporenschlupf) verwendet. Nach subtraktiver Hybridisierung und Klonierung der subtrahierten cDNA in den Plasmidvektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> wurden zufällig 96 Einzelkolonien gepickt. Eine Amplifikation mit den plasmidspezifischen Primern M13-f (-20) und M13-r ergab cDNA-Inserts mit einer Länge von etwa 200 bis 900 bp. Sechs Klone enthielten kein Insert. Mit den denaturierten PCR-Produkten der verbliebenen 90 Klone wurden zwei identische 'dot blots' angefertigt. Um die Signalintensitäten der beiden 'dot blots' vergleichen zu können, wurden auf vier der sechs freien Positionen jeweils zwei PCR-Produkte der konstitutiv exprimierten 'housekeeping' Gene Cytochrom *b* (Cyt *b*; Positionen: H5, C7) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (G3PDH; Positionen: B9, D9) gespottet. Die beiden 528 bzw. 457 bp langen Fragmente wurden mit den Primern Pi-Cytb-f/-r bzw. Pi-G3PDH-f/-r nach Standard-PCR-Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.4; Annealingtemperatur: 56°C) amplifiziert. Nach Sichtung der subtrahierten cDNA-Banken (siehe Abschnitt 2.2.9.3) wiesen die Signale der 'housekeeping' Gene Cyt *b* und G3PDH bei beiden Hybridisierungen vergleichbare Intensitäten auf (Abbildung 6). Ein direkter Vergleich der beiden 'dot blots' zur Identifizierung induzierter Gene war somit möglich. Quantitative Aussagen über die Induktionsraten der einzelnen Gene ließen sich jedoch nicht vornehmen, da die cDNA-Proben durch PCR-Amplifikation hergestellt worden waren. Die ursprünglichen Konzentrationsverhältnisse in der Ausgangs-RNA lagen somit nicht mehr vor. Die Quantifizierung der Expressionsraten ausgewählter differentiell exprimierter Gene erfolgte mittels real-time RT-PCR (siehe Abschnitt 3.1.3). 45 Klone (50%) zeigten nur Signale nach Hybridisierung mit subtrahierter cDNA und konnten somit als differentiell exprimierte Gene charakterisiert werden. Ebenfalls 45 Klone (50%) mussten aufgrund eindeutiger Signale nach Hybridisierung mit Driver-cDNA als falsch positiv eingestuft werden.



**Abbildung 6 A,B:** 'Dot Blot'-Analyse von 96 *Phytophthora infestans*-Klonen, die während des Zoosporenschlupfes putativ induziert sind. **A** Hybridisierung mit cDNA von ungekeimten Sporangien. **B** Hybridisierung mit subtrahierter cDNA. Klone, die mit beiden cDNA-Proben Hybridisierungssignale zeigten wurden als falsch positiv klassifiziert. Die Positionen der 'housekeeping' Gene *Cyt b* bzw. GAPDH sind mit Kreisen gekennzeichnet.

### 3.1.3 Charakterisierung von keimungsspezifischen Genen

#### Sequenzanalyse

Mit den neun erfolgreich reamplifizierten cDNA-AFLP-Fragmenten sowie mit den 45 als differentiell klassifizierten SSH-Klonen wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Zur Überprüfung des Ausschlussverfahrens beim 'differential screening' wurden darüber hinaus fünf als falsch positiv klassifizierte SSH-Klone (Pi-SSH-A1, Pi-SSH-A2, Pi-SSH-A3, Pi-SSH-B1, Pi-SSH-C12) mit unterschiedlichen Signalintensitäten nach der Hybridisierung mit Driver-cDNA sequenziert.

Die Sequenzen der beiden Klone Pi-cAFLP-4 und Pi-cAFLP-6 erwiesen sich als identisch. Beide Fragmente wurden mit dem gleichen *PstI*-Primer (*PstI*-GAT) sowie den *MseI*-Primern *MseI*+C bzw. *MseI*+CC amplifiziert. Sämtliche mit dem Primer *MseI*+CC amplifizierten Banden werden auch durch den Primer *MseI*+C amplifiziert. Ebenfalls identische Sequenzen besaßen die beiden falsch positiven SSH-Klone Pi-SSH-A1 und Pi-SSH-B1 sowie die differentiellen Klone Pi-SSH-B3, Pi-SSH-F5, Pi-SSH-G12 und Pi-SSH-H11. Alle anderen Sequenzen waren singulär.

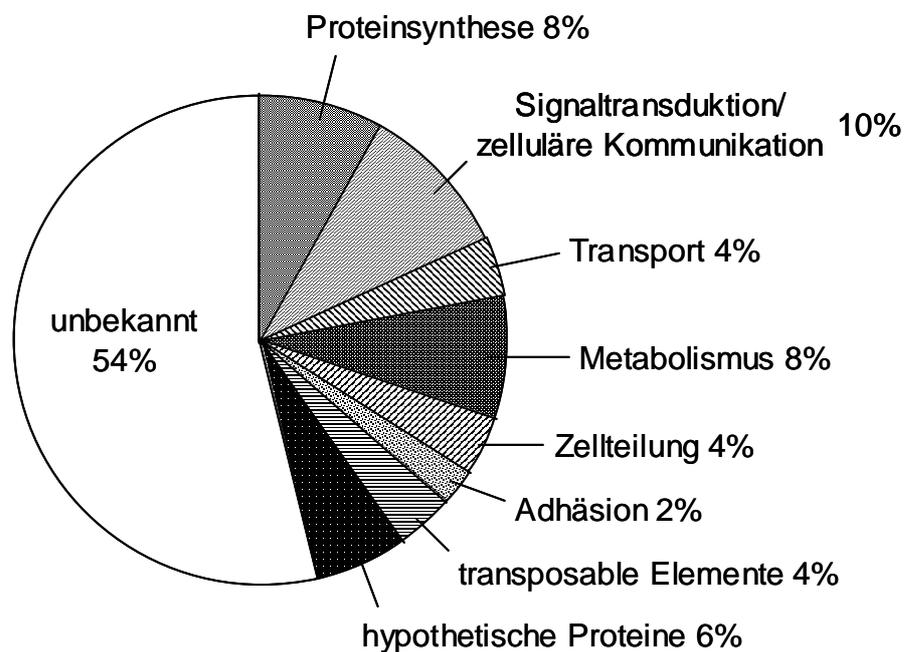
Um Ähnlichkeiten und Homologien der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der differentiell exprimierten Klone zu Datenbanksequenzen ausfindig zu machen, wurde ein Datenbankabgleich unter Verwendung des BLASTX Algorithmus (ALTSCHUL et al. 1997) durchgeführt. Die Einteilung der Datenbanktreffer erfolgte in Anlehnung an NELSON et al. (1997). Dabei werden die Datenbankeinträge nach ihrem

$P$ -Wert ( $P$ ; Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Treffer mit der entsprechenden Datenbanksequenz zufallsbedingt ist) eingeteilt in hoch signifikant ( $P \leq 10^{-20}$ ), signifikant ( $10^{-20} < P \leq 10^{-5}$ ) sowie gering signifikant ( $10^{-5} < P \leq 10^{-2}$ ). Treffer mit einem  $P > 10^{-2}$  werden als nicht signifikant erachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden nur signifikante und hoch signifikante Sequenzen berücksichtigt. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

27 (54%) von 50 einmalig identifizierten cDNA-Sequenzen erzielten keine signifikanten Treffer zu Sequenzen in Datenbanken und wurden als unbekannt klassifiziert. Davon hatten sieben (14%) Sequenzen einen gering signifikanten  $P$ -Wert. 15 (30%) Sequenzen wiesen einen signifikanten und acht (16%) Sequenzen einen hoch signifikanten  $P$ -Wert auf. Davon zeigten drei cDNA-Sequenzen (6%) Homologien zu hypothetischen Proteinen. Für die verbleibenden 20 cDNA-Sequenzen (40%) konnte aufgrund der Ähnlichkeit zu Datenbankeinträgen ihre mutmaßliche Funktion vorhergesagt werden.

Von diesen 20 Genen, zu denen die als differentiell identifizierten cDNA-Sequenzen von *Phytophthora infestans* die höchsten Ähnlichkeiten aufwiesen, sind jeweils vier (8%) in die Proteinsynthese bzw. den Metabolismus involviert, fünf cDNA-Sequenzen (10%) sind dem Bereich Signaltransduktion bzw. zelluläre Kommunikation zuzuordnen, je zwei cDNA-Sequenzen (4%) übernehmen Aufgaben im zellulären Transport sowie bei der Zellteilung bzw. sind transposable Elemente. Eine cDNA-Sequenz (2%) ist an der Adhäsion von Sporen von *Phytophthora parasitica* auf cellulosehaltigen Oberflächen beteiligt. (siehe Abbildung 7 und Tabelle 10)

Von den fünf sequenzierten falsch positiven SSH-Klonen waren die beiden Klone Pi-SSH-A3 und Pi-SSH-C12 mit der großen ribosomalen Untereinheit 28S rRNA bzw. dem intern transkribierten Spacer der 5.8S rRNA von *Phytophthora infestans* identisch. Die beiden falsch positiven und sequenzgleichen SSH-Klone Pi-SSH-A1 und Pi-SSH-B1 zeigten 97%ige Sequenzübereinstimmung mit der 28S rRNA von *Phytophthora megasperma*. Ein falsch positiver Klon (Pi-SSH-A2) wurde aufgrund nicht signifikanter Datenbanktreffer als unbekannt eingestuft.



**Abbildung 7** : Klassifizierung der sequenzierten cDNAs von *Phytophthora infestans* in funktionale Kategorien und Anteil (%) an der Gesamtzahl der sequenzierten cDNA-Fragmente.

**Tabelle 10** : Ähnlichkeiten der sequenzierten cDNA-AFLP- and SSH-Klone von *Phytophthora infestans* zu Datenbankeinträgen

cDNA Klon	Länge <sup>a</sup>	Genprodukt bzw. Funktion	Kategorie <sup>b</sup>	Akz.-Nr. <sup>c</sup>	Organismus	Homologie <sup>d</sup>	P-Wert <sup>e</sup>	
Pi-cAFLP-4 <sup>f</sup>	222	reverseTranskriptase		Q8NIP3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	52/75	8,0*10 <sup>-6</sup>	+
Pi-cAFLP-7	238	Cellulose-bindendes Protein CBEL	Adhäsion	O42830	<i>Phytophthora parasitica</i>	42/59	1,4*10 <sup>-7</sup>	+
Pi-cAFLP-16	319	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor eIF4E	Prot.Synth.	P48597	<i>Xenopus laevis</i>	43/60	3,4*10 <sup>-8</sup>	+
Pi-SSH-A4	852	Phosphatidylinositol 3-Kinase 2	Sig./Komm.	P54674	<i>Dictyostelium discoideum</i>	38/57	1,8*10 <sup>-39</sup>	++
Pi-SSH-A5	141	hypothetisches Protein		Q8TGM5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73/75	1,6*10 <sup>-8</sup>	+
Pi-SSH-A7	552	putative Cytochrom c Oxidoreduktase	Metabolismus	Q84WN3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	42/59	2,2*10 <sup>-13</sup>	+
Pi-SSH-A9	212	Zellteilungskontrollprotein cdc16	Zellteilung	Q9ZV95	<i>Arabidopsis thaliana</i>	65/79	1,6*10 <sup>-19</sup>	+
Pi-SSH-A12	180	CDH-D	Zellteilung	Q8UWJ5	<i>Gallus gallus</i>	67/78	6,8*10 <sup>-8</sup>	+
Pi-SSH-B2	241	GTP-bindendes Protein Rag C	Sig./Komm.	Q9HB90	<i>Homo sapiens</i>	61/72	4,4*10 <sup>-13</sup>	+
Pi-SSH-B4	424	GTP-bindendes Protein	Sig./Komm.	Q9U4Y2	<i>Euprymna scolopes</i>	77/86	3,4*10 <sup>-56</sup>	++
Pi-SSH-C1	411	hypothetisches Protein		AAP54082	<i>Oryza sativa</i>	41/57	5,3*10 <sup>-16</sup>	+
Pi-SSH-C3	540	Protonen/Glutamat Symporter	Transport	Q88B00	<i>Pseudomonas syringae</i>	33/56	1,2*10 <sup>-7</sup>	+
Pi-SSH-C5	316	Xylitoldehydrogenase	Metabolismus	Q876R2	<i>Trichoderma reesei</i>	56/77	1,4*10 <sup>-25</sup>	++
Pi-SSH-C9	367	vakuoläre ATP Synthase Untereinheit A	Metabolismus	Q7ZY12	<i>Xenopus laevis</i>	90/95	3,4*10 <sup>-56</sup>	++
Pi-SSH-D12	338	mitochondrialer Phosphattransporter	Transport	Q26027	<i>Plasmodium falciparum</i>	76/90	3,0*10 <sup>-6</sup>	+
Pi-SSH-E2	518	putative Pyruvat Kinase	Metabolismus	Q8ICA4	<i>Plasmodium falciparum</i>	43/58	6,9*10 <sup>-29</sup>	++
Pi-SSH-E5	506	hypothetisches Protein		EAA31334	<i>Neurospora crassa</i>	71/83	3,3*10 <sup>-58</sup>	++
Pi-SSH-E12	696	Elongationsfaktor EF-3	Prot.Synth.	P25997	<i>Candida albicans</i>	34/50	2,3*10 <sup>-25</sup>	++
Pi-SSH-G2	443	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor eIF3	Prot.Synth.	Q9C5Z2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	52/65	1,1*10 <sup>-16</sup>	+
Pi-SSH-G10	189	extrazelluläre signalregulierte Kinase 2	Sig./Komm.	Q8IS81	<i>Giardia lamblia</i>	48/78	8,7*10 <sup>-10</sup>	+
Pi-SSH-G11	392	Putatives Ribophorin I	Prot.Synth.	Q9SFX3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	37/56	2,8*10 <sup>-14</sup>	+
Pi-SSH-H9	483	Retrotransposon		Q9XZR7	<i>Drosophila buzzatii</i>	45/65	1,1*10 <sup>-34</sup>	++
Pi-SSH-H10	511	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Adenylat-Cyclase	Sig./Komm.	Q8I759	<i>Paramecium tetraurelia</i>	42/63	1,2*10 <sup>-16</sup>	+

E-value = erwarteter Wert (BLASTX Suchergebnisse, unter Verwendung der DDBJ/EMBL/GenBank Datenbanken)  
 unbekannt = Klon dessen E-value für die Aminosäuresequenz mit der höchsten Ähnlichkeit größer als 10<sup>-5</sup> war.

<sup>a</sup> Länge der cDNA-Fragmente in bp

<sup>b</sup> Eingruppierung der Datenbanksequenzen in entsprechende funktionale Kategorien: Prot.Synth. = Proteinsynthese; Sig./Komm. = Signaltransduktion/zelluläre Kommunikation

<sup>c</sup> EMBL Datenbank Akzessionsnummer

<sup>d</sup> maximale Homologie (Identität/Ähnlichkeit) auf Aminosäureebene in % zum Datenbankeintrag mit dem geringsten E-value

<sup>e</sup> P-Wert (Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Treffer mit der entsprechenden Datenbanksequenz zufallsbedingt ist); + = signifikant; ++ = hoch signifikant

<sup>f</sup> Sequenz wurde zwei mal identifiziert

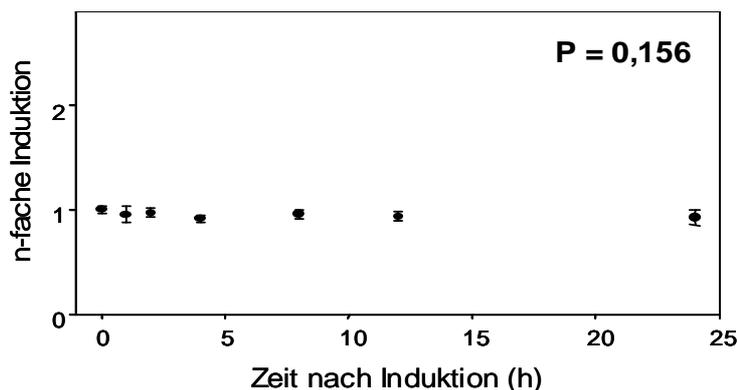
### Expressionsanalyse ausgewählter Gene mittels real-time RT-PCR

Die Quantifizierung der Expressionsraten einzelner während der Sporenkeimung putativ induzierter Gene erfolgte mittels real-time RT-PCR auf einem ABI Prism™ 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Aus den Expressionsraten der jeweiligen Probennahmezeitpunkte wurden Expressionskinetiken für die 'target'-Gene während der ersten 24 h der Sporenkeimung erstellt.

Um die Expressionsraten der induzierten Gene zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten miteinander vergleichen zu können, musste jede Probe durch Abgleich mit einem endogenen Referenzgen normalisiert werden. Dies ist notwendig, um systemimmanente Schwankungen in der 'real time' RT-PCR zwischen den einzelnen Proben, wie unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkriptase und der Polymerase sowie variierende Mengen der eingesetzten cDNA eliminieren zu können. Grundvoraussetzung für die Eignung eines Gens als endogene Referenz ist eine konstante sowie vom Probennahmezeitpunkt und dem experimentellen Ansatz unabhängige Expressionsrate ('steady-state level'). Zur Überprüfung auf konstante Expression des endogenen Referenzgens 18S rRNA während der *in vitro* Sporenkeimung von *Phytophthora infestans* wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Je Probennahmezeitpunkt wurden 5 Wiederholungen der aus gleichen RNA-Mengen synthetisierten cDNA mittels 'real time' RT-PCR analysiert (Tabelle 11). Es konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt von 18S rRNA an der Gesamt-RNA durch den experimentellen Ansatz während der 24stündigen *in vitro* Sporenkeimung nicht signifikant beeinflusst worden ist (P = 0,156; Abbildung 8). Bei Einbeziehung der Induktionswerte von 18S rRNA aus vegetativem Mycel (vM) ergibt sich ebenfalls ein nicht signifikanter Wert von P = 0,084.

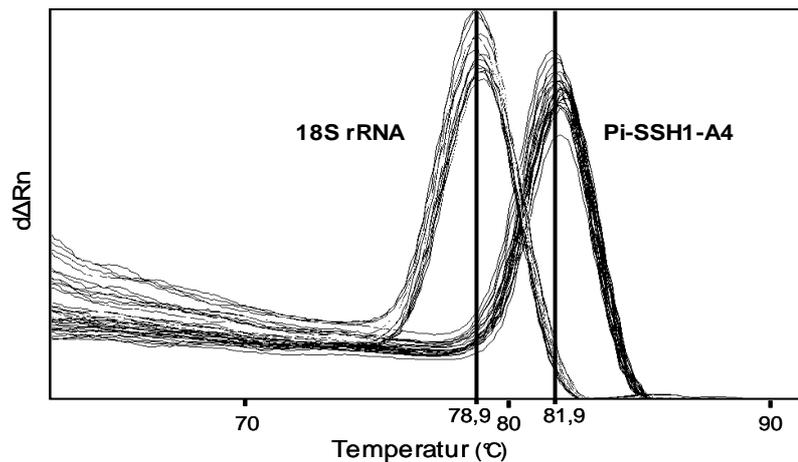
**Tabelle 11** : n-fache Induktion von 18S rRNA von *Phytophthora infestans* zu den Probennahmezeitpunkten

Probennahmezeitpunkt	0	1	2	3	6	12	24	vM
n-fache Induktion (5 Wiederholungen)	0,994	1,039	0,943	0,949	0,969	0,936	0,963	0,930
	1,008	0,904	0,956	0,904	0,911	0,892	0,867	0,930
	0,994	1,017	0,949	0,917	1,010	0,904	0,990	0,930
	0,954	0,930	0,976	0,861	0,963	0,923	0,983	0,969
	1,051	0,861	1,032	0,923	0,930	1,010	0,821	0,923
Mittelwert	1,000	0,950	0,971	0,911	0,956	0,933	0,925	0,936
Standardabweichung	0,035	0,075	0,036	0,032	0,038	0,046	0,076	0,019



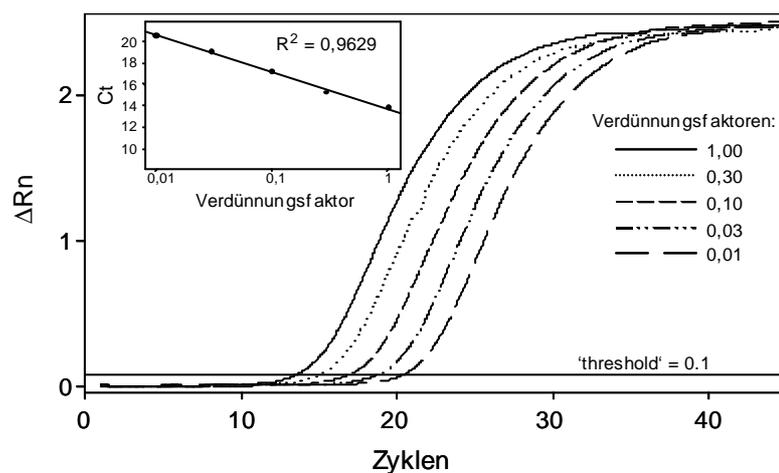
**Abbildung 8** : Gehalte der 18S rRNA (n-fache Induktion) in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach Induktion der indirekten Keimung bei *Phytophthora infestans*. (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 5 Wiederholungen)

Quantitative Analysen der Genexpression während der *in vitro* Keimung von *Phytophthora infestans* wurden mit fünf SSH-Klonen (Pi-SSH-A4, Pi-SSH-A9, Pi-SSH-D5, Pi-SSH-G4, Pi-SSH-G11; Zoosporenschlupf) und vier cDNA-AFLP-Sequenzen (Pi-cAFLP-5, Pi-cAFLP-7, Pi-cAFLP-8, Pi-cAFLP-16; Zoosporenkeimung) durchgeführt. Zur Detektion der Amplifikationsprodukte der in der 'real time' RT-PCR analysierten Gensequenzen wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green verwendet. Da durch SYBR<sup>®</sup> Green jede in der Reaktion vorliegende dsDNA sequenzunabhängig detektiert wird, musste jedes Primer-Template-System auf Dimerbildung bzw. unspezifische Amplifikationsprodukte getestet werden. Für alle eingesetzten Primerpaare zeigten sowohl die Agarosegelanalysen als auch die Schmelzkurvenanalysen Banden der erwarteten Größen bzw. singuläre Peaks bei den durch Primer Express<sup>™</sup> Version 4.0 (Applied Biosystems) kalkulierten Temperaturen (Abbildung 9).



**Abbildung 9 :** Schmelzkurvenanalyse der 'real time' RT-PCR Produkte der 18S rRNA Referenzgensequenz und Gensequenz Pi-SSH1-A4 mit Dissociation Curves 1.0f (Applied Biosystems). Abgebildet ist die erste Ableitung ( $d\Delta Rn$ ) der SYBR<sup>®</sup> Green Fluoreszenzsignale ( $\Delta Rn$ ) über einen Temperaturgradienten von 60 bis 95°C.

Zur Ermittlung der für die Expressionsquantifizierung benötigten PCR-Effizienz ( $E$ ) wurden Standardkurven für das endogene Referenzgen 18S rRNA und die 'target' Gensequenzen durch Abbildung der Ct-Werte gegen die entsprechenden cDNA-Verdünnungsstufen erstellt (Abbildung 10). Die Amplifikation der 18S rRNA Sequenz zeigte Linearität über drei Größenordnungen bei einem durchschnittlichen Regressionskoeffizienten von  $R^2 = 0,938$ . Die aus der Steigung der Standardkurve abgeleitete mittlere PCR-Effizienz lag bei  $E = 115,8\%$ . Die  $R^2$ - und  $E$ -Werte der 'target' Gentranskripte variierten zwischen 0,929 und 0,974 bzw. 72,9% und 118,4% (Tabelle 12).



**Abbildung 10 :** Amplifikation der 18S rRNA Sequenz aus cDNA-Verdünnungsstufen durch 'real-time' RT-PCR auf einem ABI Prism<sup>™</sup> 7700 SDS. Die Amplifikationskurven zeigen die Änderung der Fluoreszenz von SYBR<sup>®</sup> Green ( $\Delta Rn$ ) während 45 Zyklen in der 'real-time' RT-PCR. Die Standardkurve ergibt sich durch Auftragen der 'threshold'-Cycle Werte (Ct) gegen die entsprechenden cDNA-Verdünnungsstufen.

Zur Erstellung einer Expressionskinetik der ausgewählten 'target' Gentranskripte während der indirekten Keimung von *Phytophthora infestans* wurden deren Expressionsraten zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4, 8, 12 und 24 h nach Induktion ermittelt. Im Vergleich zu ungekeimten Sporangien wiesen die 'target' Gensequenzen maximale Expressionsraten auf, die um das 1,5- bis 29-fache erhöht waren. Bis auf zwei Sequenzen verringerten sich die Expressionsraten aller Transkripte kontinuierlich nach Erreichen der Maxima bis 24 h nach Induktion. Die Expression der Sequenz Pi-SSH-G11 nahm während der *in vitro* Keimung beständig zu und erreichte den Höchstwert 24 h nach Induktion. Das Transkript Pi-cAFLP-16 zeigte ein zweites ausgeprägtes lokales Maximum 12 h nach Induktion. Die Expressionsraten im vegetativen Mycel reduzierten sich bei allen Transkripten auf ein sehr niedriges Niveau und erreichten mit Ausnahme der Sequenz Pi-cAFLP-8 einen niedrigeren Wert als in ungekeimten Sporangien (siehe Tabelle 12 und Abbildung 11).

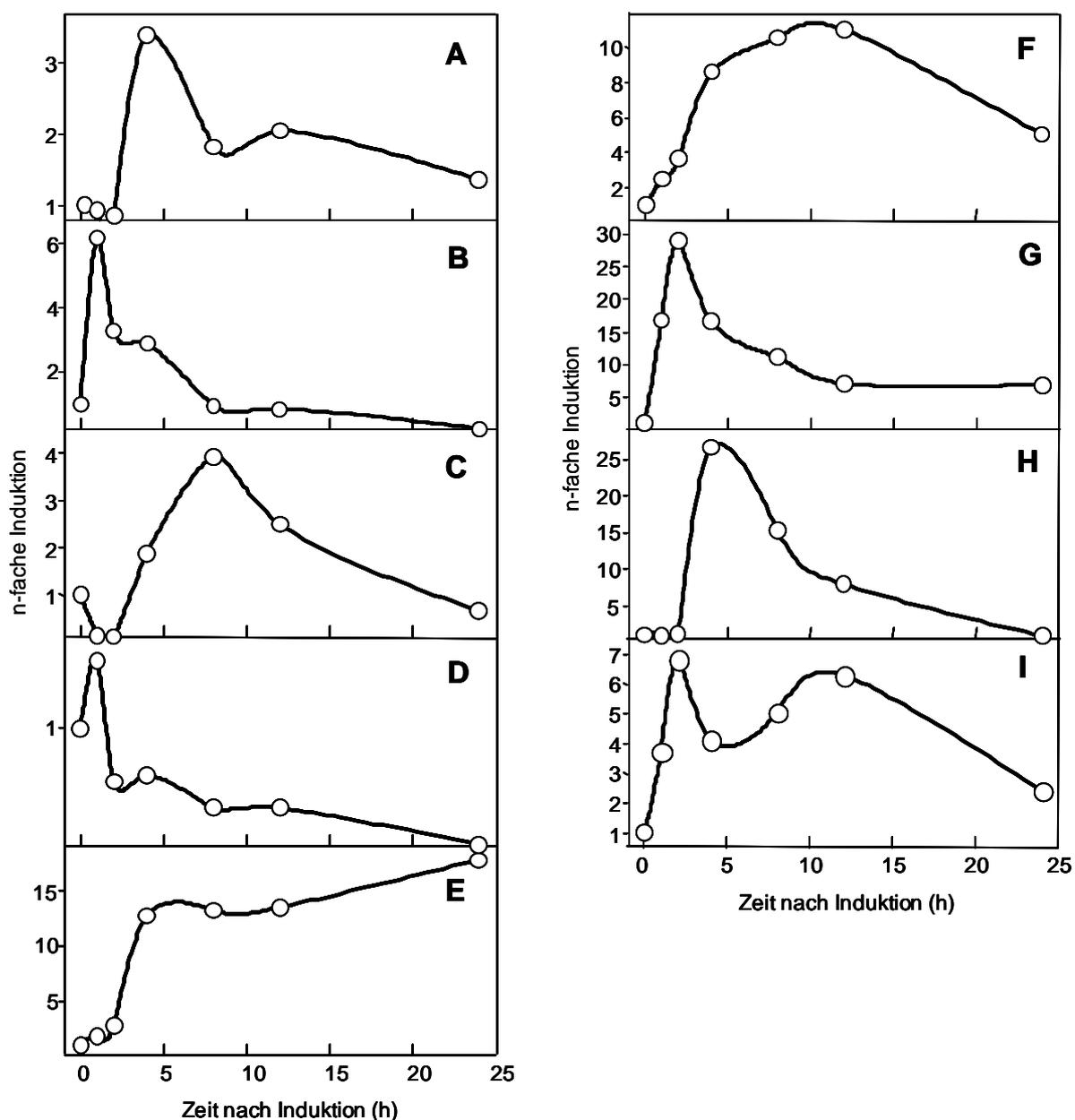
**Tabelle 12** : *E*- und  $R^2$ -Werte der linearen Regressionen der Referenz- und 'target' Gentranskripte sowie maximale und relative Expression in vegetativem Mycel der 'target' Gentranskripte von *Phytophthora infestans*.

Sequenz	<i>E</i>	$R^2$	max. Expression (Zeit nach Induktion)	rel. Expression (veg. Mycel)
18S rRNA	115,8% ( $s^2 = 15,3\%$ )	0.938 ( $s^2 = 0.025$ )	-	-
Pi-SSH-A4	118,4%	0.929	6,17 (1 h)	0,36
Pi-SSH-A9	112,1%	0,960	3,38 (4 h)	0,49
Pi-SSH-D5	106,6%	0,954	3,92 (8 h)	0,28
Pi-SSH-G4	94,1%	0,957	1,52 (1 h)	0,23
Pi-SSH-G11	101,6%	0,956	17,80 (24 h)	0,87
Pi-cAFLP-5	79,3%	0,963	11,06 (12 h)	0,82
Pi-cAFLP-7	88,6%	0.942	26,71 (8 h)	0,31
Pi-cAFLP-8	84,4%	0.973	28,97 (2 h)	1,10
Pi-cAFLP-16	72,9%	0.974	6,84 (2 h)	0,98

*E* = PCR-Effizienz

$R^2$  = Regressionskoeffizient

$s^2$  = Standardabweichung



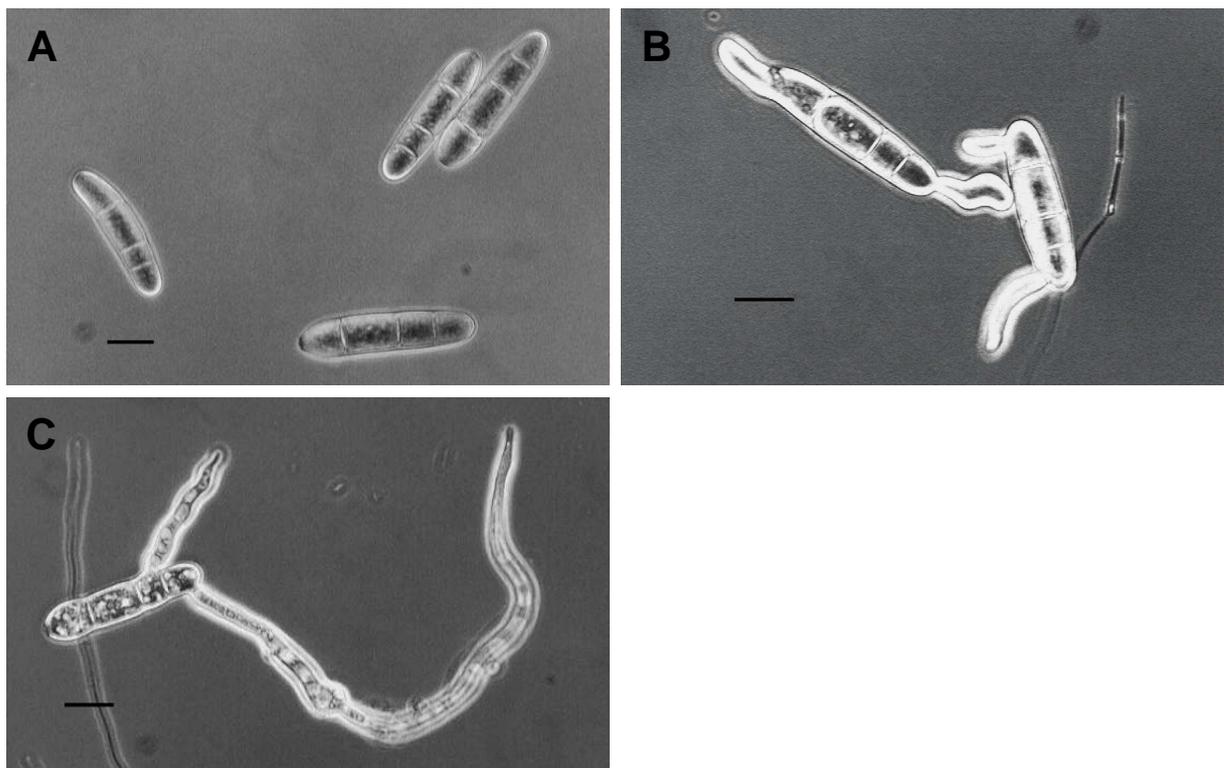
**Abbildung 11 A-I:** Expressionskinetik von 'target' Gentranskripten von *Phytophthora infestans*. Die n-fache Induktion der 'target' Gentranskripte während der indirekten Keimung wurde relativ zur Expression in ungekeimten Sporangien (0 h; Kalibrator) ermittelt.

**A** Pi-SSH-A9, **B** Pi-SSH-A4, **C** Pi-SSH-D5, **D** Pi-SSH-G4, **E** Pi-SSH-G11, **F** Pi-cAFLP-5, **G** Pi-cAFLP-7, **H** Pi-cAFLP-8, **I** Pi-cAFLP-16.

## 3.2 *Pyrenophora teres*

### 3.2.1 *In vitro* Sporenkeimung und cDNA-Synthese

Zur Feststellung geeigneter RNA-Probennahmezeitpunkte wurde die Keimung von *Pyrenophora teres* Konidien (Abbildung 12 A) bei 25°C in sterilem Wasser induziert und während 24 h beobachtet. 2 h nach Induktion zeigten 29 von 218 (13,3%) unter einem Durchlichtmikroskop beobachtete Konidien kleine Ausstülpungen auf der Sporenoberfläche. Nach 4 h hatten sich bei 24,3% (49 von 202) der Konidien aus den Ausstülpungen Keimschläuche von bis zu halber Sporenlänge entwickelt (Abbildung 12 B). Die Keimschlauchlänge nahm im weiteren Verlauf der *in vitro* Entwicklung kontinuierlich zu. 12 h nach Induktion hatte sich die Keimschlauchlänge auf bis zum Fünffachen der Konidienlänge erhöht (Abbildung 12 C). Eine Zunahme der Keimungsrate konnte nicht mehr verzeichnet werden, sie stagnierte bei 24,2% (51 von 211) keimenden Konidien.

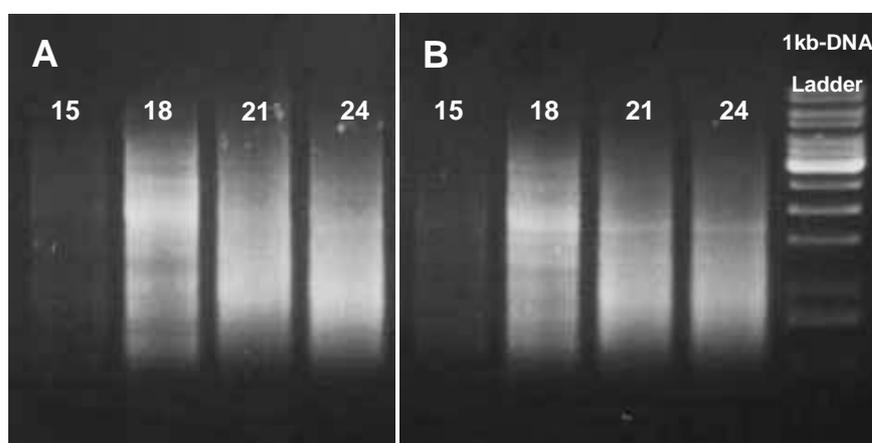


**Abbildung 12 A-C:** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) der *in vitro* Konidienkeimung von *Pyrenophora teres* in sterilem Wasser (— = 20 µm). **A** ungekeimte Konidien (0 h). **B** keimende Konidien (4 h nach Induktion). **C** keimende Konidie (12 h nach Induktion).

Zur Isolierung von induzierten Genen während der Konidienkeimung wurde der Zeitpunkt 3 h nach Induktion festgesetzt. Zur Erstellung einer Expressionskinetik der isolierten Gene während der ersten 24 h der Konidientwicklung wurde überdies RNA

zu den Zeitpunkten 1, 2, 6, 12 und 24 h nach Induktion sowie aus ungekeimten Konidien (0 h) und aus vegetativem Mycel isoliert.

Durch Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese konnte die Integrität der aufgereinigten und mit DNaseI behandelten RNA-Proben nachgewiesen werden. Eine Kontroll-PCR mit den 18S rRNA spezifischen Primern Pt-MGB-18S-f und -r führte zu keiner Fragmentamplifikation. Verunreinigungen der RNA-Proben mit gDNA wurden somit quantitativ beseitigt. Der Zyklussteigerungsversuch zur cDNA-Synthese für die cDNA-AFLP- und SSH-Analyse ergab eine optimale Zykluszahl von jeweils 18 Zyklen für die Probennahmezeitpunkte 0 h (ungekeimte Konidien) und 3 h (Beginn Konidienkeimung) nach Induktion (Abbildung 13).



**Abbildung 13** A,B: Ermittlung der optimalen PCR-Zykluszahl für die SMART™ cDNA-Synthese über Gelelektrophorese. **A** RNA von ungekeimten Konidien. **B** RNA während der Konidienkeimung von *Pyrenophora teres*.

### 3.2.2 Isolierung von keimungsspezifischen Genen

#### cDNA-AFLP-Methode

Die cDNA-AFLP-Methode wurde zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene bei *Pyrenophora teres* während der Konidienkeimung angewandt. Dabei wurde cDNA aus ungekeimten Konidien (0 h) und keimenden Konidien (3 h nach Induktion) unter Verwendung der Enzymkombinationen *MseI/EcoRI* sowie *MseI/PstI* hydrolysiert. Es wurden Banden mit einer Länge von 100 bis 900 bp analysiert. Die Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analyse sind in Tabelle 13 dargestellt.

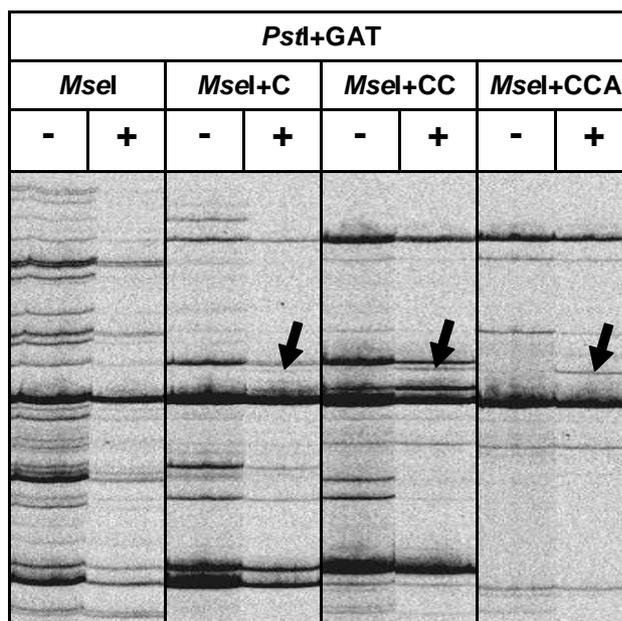
**Tabelle 13** : Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analysen bei *Pyrenophora teres*

verwendete Enzymkombination	<i>MseI/EcoRI</i>	<i>MseI/PstI</i>
Anzahl verwendeter Primerkombinationen	17	12
Gesamtzahl detektierter Banden (Ø)	656 (38,6)	414 (34,5)
Gesamtzahl monomorpher Banden (Ø; %)	533 (31,4; 81,3%)	257 (21,4; 62,1%)
Anzahl polymorpher Banden in ungekeimten Konidien (Ø; %)	81 (6,8; 12,3%)	129 (10,8; 31,1%)
Anzahl polymorpher Banden in keimenden Konidien (Ø; %)	42 (3,5; 6,4%)	28 (2,3; 6,8%)

Ø = durchschnittliche Anzahl je Primerkombination

% = Anteil an der Gesamtzahl der detektierten Banden

Bei den *MseI/PstI*-Primerkombinationen besaßen die *PstI*-Primer drei selektive Nukleotide (GAT bzw. GCA), während die *MseI*-Primer mit null bis drei Basen verlängert waren. Die Primerkombinationen *PstI*+GAT/*MseI*, *PstI*+GAT/*MseI*+C, *PstI*+GAT/*MseI*+CC und *PstI*+GAT/*MseI*+CCA resultierten in der Amplifikation von 56, 45, 38 bzw. 26 detektierbaren Banden (Abbildung 14). Die Abweichung der beobachteten Abnahme der Bandenkomplexität von der erwarteten vierfachen Reduktion der Fragmentanzahl mit jeder zusätzlichen selektiven Base lässt sich durch die begrenzte Detektions- und Auflösungskraft Cy5-gelabelter Fragmente in Polyacrylamidgelen erklären. Aufgrund der Ergebnisse bei *Phytophthora infestans* wurden die ungeeigneten Primer *EcoRI*+AAA und *EcoRI*+ATT nicht verwendet. Statt dessen wurden neben den 14 Kombinationen *EcoRI*+ANN plus *MseI* die Primer *EcoRI*+ACC, *EcoRI*+AGA und *EcoRI*+ATG mit dem Primer *MseI*+C kombiniert.



**Abbildung 14** : Reduktion der Komplexität von cDNA-AFLP-Banden durch Verwendung des Primers *PstI*-GAT in Kombination mit durch eine unterschiedliche Anzahl selektiver Nukleotide verlängerter *MseI*-Primern. – ungekeimte Konidien (0 h); + keimende Konidien (3 h nach Induktion); Der Pfeil kennzeichnet ein für keimende Konidien polymorphes Fragment.

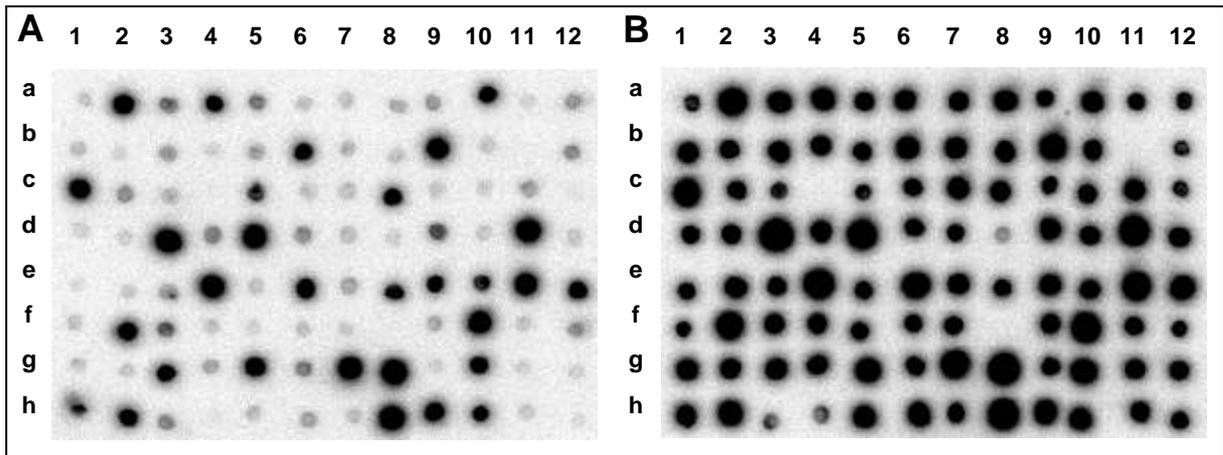
Zum Ausschneiden polymorpher Fragmente der *EcoRI/MseI*-Enzymkombination wurden drei Hauptamplifikationsansätze (*EcoRI*+*AAC/MseI*; *EcoRI*+*AAT/MseI*; *EcoRI*+*ACC/MseI*) mit für die Konidienkeimung polymorphen und intensiven Banden nochmalig auf der BRL Model AS Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (Life Technologies) aufgetrennt. Von insgesamt 21 der auf dem ABI Prism™ 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer) identifizierten polymorphen Fragmente konnte jeweils nur ein Fragment pro Primerkombination nach Auftrennung auf der BRL Model AS Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (Life Technologies) wiedergefunden und ausgeschnitten werden. Die geringe Wiederfindungsrate lässt sich durch die niedrige Sensitivität des FluorImager™ 595 (Molecular Dynamics) für die zur 5'-Modifikation der *EcoRI*-Primer verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe 5-FAM, JOE und TAMRA erklären. Infolgedessen wurden keine weiteren *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen verfolgt.

Daneben wurden 12 Fragmente der *PstI/MseI*-Enzymkombination ausgeschnitten, von denen nur drei erfolgreich reamplifiziert und sequenziert werden konnten.

### **SSH-Methode**

Neben der cDNA-AFLP-Methode wurde ebenfalls die SSH-Methode angewandt, um Gene zu identifizieren, deren Expression während der Konidienkeimung von *Pyrenophora teres* induziert ist. Als Driver wurde cDNA aus ungekeimten Konidien (0 h), als Tester cDNA aus keimenden Konidien (3 h nach Induktion) eingesetzt.

Im Anschluss an die subtraktive Hybridisierung und die Klonierung der subtrahierten cDNA in den Plasmidvektor pCR®4-TOPO® wurden zufällig 96 Einzelkolonien gepickt. Eine Amplifikation mit den plasmidspezifischen Primern M13-f (-20) und M13-r ergab cDNA-Inserts mit einer Länge von etwa 200 bis 850 bp. Drei der Klone enthielten kein Insert. Mit den denaturierten PCR-Produkten der verbliebenen 93 Klone wurden zwei identische 'dot blots' angefertigt. Das 'differential screening' der mit Driver- oder subtrahierter cDNA hybridisierten 'dot blots' ergab einen Anteil von 68% (63 Klone) für die Konidienkeimung differentieller SSH-Klone. 30 Klone (37%) mussten aufgrund eindeutiger Hybridisierungssignale mit beiden cDNA-Proben als falsch positiv klassifiziert werden. (Abbildung 15)



**Abbildung 15 A,B: Dot Blot Analyse** von 96 *Pyrenophora teres*-Klonen, die während der Konidienkeimung putativ induziert sind. **A** Hybridisierung mit cDNA von ungekeimten Konidien. **B** Hybridisierung mit subtrahierter cDNA. Klone, die mit beiden cDNA-Proben Hybridisierungssignale zeigten wurden als falsch positiv klassifiziert.

### 3.2.3 Charakterisierung von keimungsspezifischen Genen

#### Sequenzanalyse

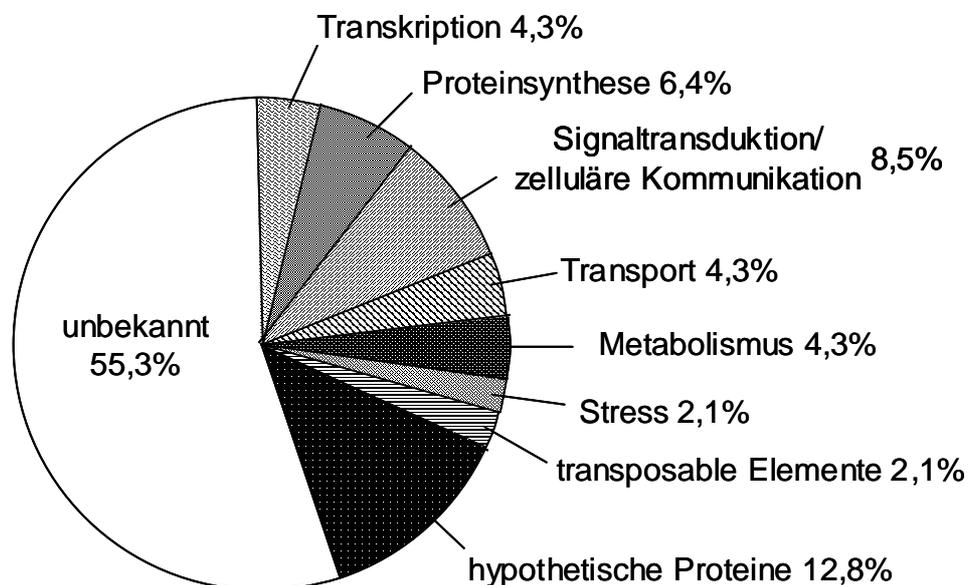
Mit den sechs reamplifizierten cDNA-AFLP-Fragmenten sowie mit 46 zufällig ausgewählten und als differentiell klassifizierten SSH-Klonen wurden Sequenzanalysen durchgeführt.

Die drei reamplifizierten cDNA-AFLP-Fragmente der *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen (Pt-cAFLP-1, Pt-cAFLP-2, Pt-cAFLP-3) waren gleich lang (911bp) und stimmten in ihren Sequenzen trotz verschiedener selektiver Nukleotide am *EcoRI*-Primer überein. Im folgenden werden sie als Pt-cAFLP-1 bezeichnet. Ein Fragment der *PstI/MseI*-Primerkombinationen war an beiden Enden mit *MseI*-Primerbindungsstellen adaptiert. Das eigentliche als polymorph identifizierte Fragment wurde folglich nicht aus dem Gel ausgeschnitten und reamplifiziert.

Die Nukleotidsequenzen der Klone Pt-SSH-B2 und Pt-SSH-C12 sowie Pt-SSH-C2 und Pt-SSH-C3 waren identisch. Alle anderen Sequenzen wurden jeweils nur einmal identifiziert. Nachfolgend wurde ein Datenbankabgleich unter Verwendung des BLASTX Algorithmus (ALTSCHUL et al. 1997) durchgeführt, um Ähnlichkeiten der differentiellen cDNAs zu Datenbankeinträgen ausfindig zu machen. Die Einteilung der Datenbanktreffer erfolgte nach NELSON et al. (1997). Sequenzen mit gering signifikanten *P*-Werten wurden nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche sind in Tabelle 14 aufgelistet.

25 (53,2%) von 47 einmalig identifizierten cDNA-Sequenzen erzielten keine signifikanten Treffer und wurden als unbekannt charakterisiert. Davon wiesen sechs Sequenzen einen gering signifikanten *P*-Wert auf. Neun (19,1%) Sequenzen zeigten einen signifikanten und 13 (27,7%) Sequenzen einen hoch signifikanten *P*-Wert. Von diesen zeigten sieben Klone (14,9%) Homologie zu hypothetischen Proteinen des Ascomyceten *Neurospora crassa*. Für 15 (31,9%) Klone konnte deren mutmaßliche Funktion aufgrund signifikanter Homologien zu Datenbankeinträgen anderer Ascomyceten vorhergesagt werden.

Von diesen 15 Genen, zu denen die als differentiell identifizierten Sequenzen die höchsten Ähnlichkeiten zeigten, sind vier (8,5%) dem Bereich Signaltransduktion bzw. zelluläre Kommunikation zuzuordnen, drei cDNA-Sequenzen (6,4%) sind an der Proteinsynthese beteiligt, jeweils zwei cDNA-Sequenzen (4,3%) sind in die Transkription sowie in den Metabolismus bzw. Stoffwechsel involviert, je eine cDNA-Sequenzen (2,1%) ist ein stressinduziertes Gen bzw. ist ein transposables Element (siehe Abbildung 16 und Tabelle 14).



**Abbildung 16** : Klassifizierung der sequenzierten cDNAs von *Pyrenophora teres* in funktionale Kategorien und Anteil (%) an der Gesamtzahl der sequenzierten cDNA-Fragmente.

**Tabelle 14** : Ähnlichkeiten der sequenzierten cDNA-AFLP- and SSH-Klone von *Pyrenophora teres* zu Datenbankeinträgen

cDNA Klon	Länge <sup>a</sup>	Genprodukt bzw. Funktion	Kategorie <sup>b</sup>	Akz.-Nr. <sup>c</sup>	Organismus	Homologie <sup>d</sup>	P-Wert <sup>e</sup>	
Pt-cAFLP-1	911	Transkriptionsfaktor Cph2	Sig./Komm.	Q96V45	<i>Candida albicans</i>	41/62	1,0*10 <sup>-8</sup>	+
Pt-cAFLP-4	368	putatives Cytochrom c Oxidase Biogeneseprotein	Transport	O94587	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	35/54	1,1*10 <sup>-8</sup>	+
Pt-cAFLP-11	946	hypothetisches Protein		EAA27399	<i>Neurospora crassa</i>	56/72	1,0*10 <sup>-104</sup>	++
Pt-SSH-A3	473	hypothetisches Protein		EAA29093	<i>Neurospora crassa</i>	53/73	2,3*10 <sup>-15</sup>	+
Pt-SSH-A9	281	konserviertes hypothetisches Protein		Q9HE30	<i>Neurospora crassa</i>	68/81	8,7*10 <sup>-7</sup>	+
Pt-SSH-B2 <sup>f</sup>	362	regulatorisches Protein AmdA	Sig./Komm.	Q00170	<i>Aspergillus nidulans</i>	52/71	1,6*10 <sup>-27</sup>	++
Pt-SSH-B5	467	60S ribosomales Protein L5	Prot.Synth.	O59953	<i>Neurospora crassa</i>	65/83	4,7*10 <sup>-27</sup>	++
Pt-SSH-B8	195	putative Transposase		Q8NIQ2	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	68/89	2,9*10 <sup>-16</sup>	+
Pt-SSH-C2 <sup>f</sup>	628	Uricase	Metabolismus	P33282	<i>Aspergillus nidulans</i>	65/79	8,0*10 <sup>-48</sup>	++
Pt-SSH-C7	522	verwandt mit regulatorischem Protein TOM1	Sig./Komm.	Q9P4Z1	<i>Neurospora crassa</i>	45/64	2,8*10 <sup>-33</sup>	++
Pt-SSH-D1	318	Threoninesynthase	Prot.Synth.	P16120	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47/65	3,3*10 <sup>-20</sup>	+
Pt-SSH-D9	287	hypothetisches Protein		EAA16552	<i>Neurospora crassa</i>	74/74	5,6*10 <sup>-8</sup>	+
Pt-SSH-F3	574	DNA damage-responsive Gen DDR48	Stress	P18899	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54/67	1,7*10 <sup>-29</sup>	++
Pt-SSH-F5	719	mögliche Kinase mit Ca <sup>2+</sup> -Bindungsdomäne	Sig./Komm.	Q8N JL6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	29/51	2,1*10 <sup>-15</sup>	+
Pt-SSH-F7	400	Phenylalanin-tRNA-Synthase Untereinheit	Prot.Synth.	CAD71236	<i>Neurospora crassa</i>	51/70	1,2*10 <sup>-26</sup>	++
Pt-SSH-F11	605	hypothetisches Protein		EAA28591	<i>Neurospora crassa</i>	51/66	1,5*10 <sup>-37</sup>	++
Pt-SSH-G2	327	DNA-abhängige RNA Polymerase I Polypeptid 2	Transkr.	O74633	<i>Neurospora crassa</i>	66/81	2,3*10 <sup>-34</sup>	++
Pt-SSH-G12	346	konserviertes hypothetisches Protein		Q9P391	<i>Neurospora crassa</i>	48/63	6,2*10 <sup>-21</sup>	++
Pt-SSH-H5	622	Kationentransportprotein ALR2	Transport	P43553	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62/79	1,3*10 <sup>-47</sup>	++
Pt-SSH-H6	405	vakuoläre ATP Synthase Untereinheit d	Metabolismus	P53659	<i>Neurospora crassa</i>	80/86	1,1*10 <sup>-37</sup>	++
Pt-SSH-H7	613	hypothetisches Protein		Q871W4	<i>Neurospora crassa</i>	49/68	2,7*10 <sup>-31</sup>	++
Pt-SSH-H12	573	RNA prozessierendes Protein SEN1	Transkr.	Q9HFI5	<i>Neurospora crassa</i>	23/46	6,6*10 <sup>-9</sup>	+

E-value = erwarteter Wert (BLASTX Suchergebnisse, unter Verwendung der DDBJ/EMBL/GenBank Datenbanken)

unbekannt = Klon dessen E-value für die Aminosäuresequenz mit der höchsten Ähnlichkeit größer als 10<sup>-5</sup> war.

<sup>a</sup> Länge der cDNA-Fragmente in bp

<sup>b</sup> Eingruppierung der Datenbanksequenzen in entsprechende funktionale Kategorien: Sig./Komm. = Signaltransduktion/zelluläre Kommunikation; Prot.Synth. = Proteinsynthese; Transkr. = Transkription

<sup>c</sup> EMBL Datenbank Akzessionsnummer

<sup>d</sup> maximale Homologie (Identität/Ähnlichkeit) auf Aminosäureebene in % zum Datenbankeintrag mit dem geringsten E-value

<sup>e</sup> P-Wert (Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Treffer mit der entsprechenden Datenbanksequenz zufallsbedingt ist); + = signifikant; ++ = hoch signifikant

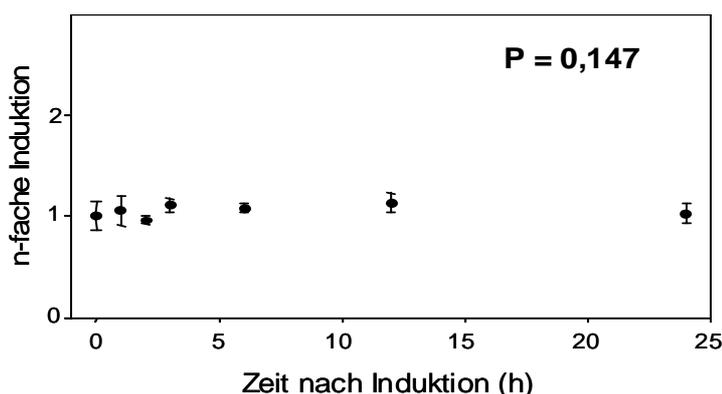
<sup>f</sup> Sequenz wurde zwei mal identifiziert

### Expressionsanalyse ausgewählter Gene mittels real-time RT-PCR

Zur Überprüfung auf konstante Expression des endogenen Referenzgens 18S rRNA während der *in vitro* Konidienkeimung von *Pyrenophora teres* wurden je Probenahmezeitpunkt 5 Wiederholungen der aus gleichen RNA-Mengen synthetisierten cDNA mittels 'real time' RT-PCR analysiert (Tabelle 15). Eine ANOVA ergab, dass der Gehalt von 18S rRNA an der Gesamt-RNA durch den experimentellen Ansatz während der 24 stündigen *in vitro* Keimung nicht signifikant beeinflusst wurde ( $P = 0,147$ ; Abbildung 17). Unter Einbeziehung der Induktionswerte von 18S rRNA aus vegetativem Mycel (vM) ergibt sich ebenfalls ein nicht signifikanter Wert von  $P = 0,135$ .

**Tabelle 15** : n-fache Induktion von 18S rRNA von *Pyrenophora teres* zu den Probennahmezeitpunkten

Probennahmezeitpunkt	0	1	2	3	6	12	24	vM
n-fache Induktion (5 Wiederholungen)	0,889	0,944	0,909	1,047	1,018	1,062	0,891	1,020
	0,996	1,000	0,958	1,206	1,065	1,069	1,146	0,994
	0,965	0,968	0,971	1,060	1,107	1,139	0,975	1,026
	0,941	1,060	1,017	1,095	1,151	1,089	1,034	0,994
	1,243	1,312	0,965	1,138	1,079	1,294	1,110	1,087
Mittelwert	1,007	1,057	0,964	1,109	1,084	1,131	1,031	1,024
Standardabweichung	0,137	0,149	0,038	0,065	0,049	0,096	0,103	0,038



**Abbildung 17** : Gehalte der 18S rRNA (n-fache Induktion) in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach Induktion der Konidienkeimung bei *Pyrenophora teres*. (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 5 Wiederholungen)

Quantitative RT-PCR Analysen wurden mit fünf potentiell induzierten Genen durchgeführt. Die Sequenzen Pt-cAFLP-1, Pt-cAFLP-4, Pt-SSH-B2 und Pt-SSH-H5 zeigten Homologie zu Genen, die bekanntermaßen in die Keimung und Entwicklung

anderer Ascomyceten involviert sind. Pt-SSH-G12 wies hohe Ähnlichkeit zu einem konservierten hypothetischen Protein von *Neurospora crassa* mit unbekannter Funktion auf. Sowohl die Agarosegelanalysen als auch die Schmelzkurvenanalysen der eingesetzten Primerpaare zeigten Banden der erwarteten Größen bzw. singuläre Peaks bei den durch Primer Express™ Version 4.0 (Applied Biosystems) kalkulierten Temperaturen.

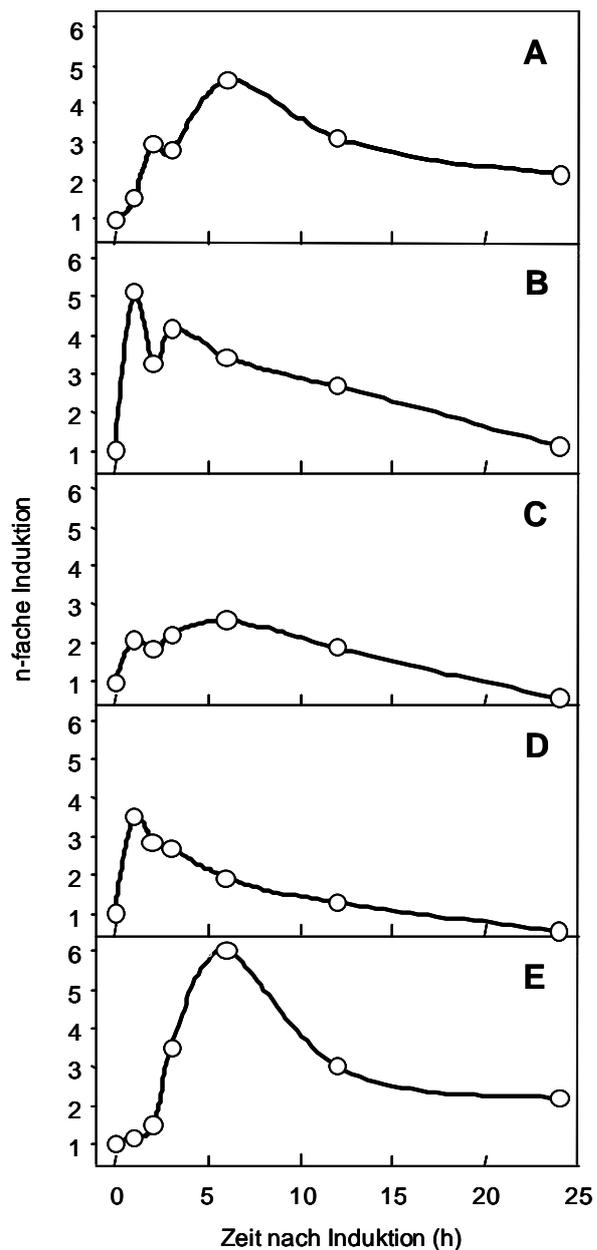
Der mittlere Regressionskoeffizient der Standardkurven der 18S rRNA Sequenz lag bei  $R^2 = 0,995$ . Die daraus abgeleitete durchschnittliche PCR-Effizienz betrug  $E = 82,6\%$ . Die  $R^2$ - und  $E$ -Werte der 'target' Gentranskripte variierten zwischen 0,975 und 0,999 bzw. 78,9% und 101,5% (Tabelle 16).

Zur Ermittlung der Expressionskinetik der ausgewählten 'target' Gentranskripte während der Konidienkeimung wurden deren Expressionsraten zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 6, 12 und 24 h nach Induktion ermittelt. Alle Sequenzen zeigten zu frühen Zeitpunkten der Konidienkeimung erhöhte Transkriptionsraten mit Maxima bei 1 h (Pt-SSH-G12, Pt-cAFLP-4) bzw. 6 h (Pt-SSH-B2, Pt-SSH-H5, Pt-cAFLP-1) nach Induktion. Die maximalen Expressionsraten der 'target' Gensequenzen waren im Vergleich zu ungekeimten Konidien 2,6 - bis 6,0-fach erhöht. Bei einer beobachteten Konidienkeimungsrate von knapp 25% (siehe Abschnitt 3.2.1) kann somit von einer etwa 10- bis 24-fachen Induktion in keimenden Konidien ausgegangen werden. Nach Erreichen der Maxima verringerten sich die Expressionsraten aller Transkripte kontinuierlich bis 24 h nach Induktion. Die Expressionsraten im vegetativen Mycel lagen teilweise deutlich über den Werten zum Versuchsende (24 h). (siehe Abbildung 18 und Tabelle 16)

**Tabelle 16** :  $E$ - und  $R^2$ -Werte der linearen Regressionen der Referenz- und 'target' Gentranskripte sowie maximale und relative Expression in vegetativem Mycel der 'target' Gentranskripte von *Pyrenophora teres*.

Sequenz	$E$	$R^2$	max. Expression (Zeit nach Induktion)	rel. Expression (veg. Mycel)
18S rRNA	81,6% ( $s^2 = 7,4\%$ )	0,990 ( $s^2 = 0.008$ )	-	-
Pt-cAFLP-1	78,9%	0,986	4,64 (6 h)	1,83
Pt-cAFLP-4	79,6%	0,999	5,12 (1 h)	1,70
Pt-SSH-B2	81,8%	0,988	2,61 (6 h)	2,33
Pt-SSH-G12	101,5%	0,975	3,51 (1 h)	0,87
Pt-SSH-H5	81,4%	0,997	6,04 (6 h)	3,87

$E$  = PCR-Effizienz  
 $R^2$  = Regressionskoeffizient  
 $s^2$  = Standardabweichung



**Abbildung 18 A-E:** Expressionskinetik von 'target' Gentranskripten von *Pyrenophora teres*. Die n-fache Induktion der 'target' Gentranskripte während der Konidienkeimung wurde relativ zur Expression in ungekeimten Konidien (0 h; Kalibrator) ermittelt.  
**A** Pt-cAFLP-1; **B** Pt-cAFLP-4; **C** Pt-SSH-B2; **D** Pt-SSH-G12; **E** Pt-SSH-H5.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einsatz von PCR-basierten Techniken zur Isolierung differentiell exprimierter Gene bei phytopathogenen Pilzen

Während der Sporenkeimung von Pilzen sind komplexe morphologische und physiologische Veränderungen zu beobachten. Stoffwechselforgänge sind genreguliert und erfolgen nach Detektion entsprechender Umweltsignale durch spezifische Rezeptoren. Die Signalweiterleitung vom Rezeptor auf den jeweiligen Effektor erfolgt häufig über rezeptorinduzierte Signaltransduktionskaskaden. Über die an diesen Vorgängen beteiligten Gene ist bislang nur wenig bekannt. Der gezielte Eingriff in diese frühe Entwicklungsphase hätte eine massive Beeinträchtigung des Pilzwachstums und somit einen nachhaltigen Schutz der Wirtspflanze zur Folge. Solche Gene stellen folglich aussichtsreiche Angriffsorte für protektiv wirkende Fungizide dar. Der Chinolinwirkstoff Quinoxifen greift beispielsweise als 'Growth Signal Disrupter' spezifisch in die Sporenkeimung echter Mehltäupilze ein (WHEELER et al. 2003). Die Wirkung von Quinoxifen beruht auf der Unterbrechung eines G-Protein vermittelten Signaltransduktionsweges, was das Ausbleiben der Appressorienbildung und ein daraus resultierendes 'Totwachsen' des Keim-schlauches zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit konnten aus den beiden untersuchten phytopathogenen Pilzen Gene isoliert und charakterisiert werden, die während der Sporenkeimung erhöhte Expressionsraten aufweisen und somit potentielle Ansatzstellen für neue keimungsinhibierende Wirkstoffe darstellen.

Verschiedene PCR-basierte Techniken wie 'Differential Display PCR' (DD-PCR; LIANG und PARDEE 1992) 'Representational Difference Analysis' (RDA; LISITSYN et al. 1993; HUBANK und SCHATZ 1994), cDNA 'Amplified Fragment Length Polymorphisms' (cDNA-AFLP; BACHEM et al. 1996) oder 'Suppression Subtractive Hybridisation' (SSH; DIATCHENKO et al. 1996) stehen zur Identifizierung und Klonierung differentiell exprimierter Gene zur Verfügung. Die zwei wichtigsten Anforderungen die an die verwendeten Techniken gestellt wurden, um in der vorliegenden Arbeit ihren Einsatz zu finden, waren hohe Sensitivität sowie gute Reproduzierbarkeit. Insbesondere die cDNA-AFLP- und die SSH-Methode haben sich als äußerst sensitive und sehr gut reproduzierbare Techniken erwiesen. Beide Methoden wurden bereits erfolgreich zur Identifizierung entwicklungsstadienspezifischer Gene bei phytopathogenen Vertretern sowohl der Ascomyceten (GELLATLY et al. 2001: *Leptosphaeria maculans*

(cDNA-AFLP); SHIM und WOLOSHUK 2001: *Fusarium verticillioides* (SSH); DILGER et al. 2003 (cDNA-AFLP und SSH)) als auch der Oomyceten (VAN DER BIEZEN et al. 2000: *Peronospora parasitica* (cDNA-AFLP); BEYER et al. 2002 und FABRITIUS et al. 2002 beide: *Phytophthora infestans* (SSH)) eingesetzt.

Microarray-basierte Verfahren kamen nicht in Frage, da nach vorliegendem Kenntnisstand von keiner der beiden untersuchten Pilzarten *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* vorgefertigte Arrays zu beziehen waren. Zudem wurde die Verwendung kommerziell erhältlicher Microarrays nah verwandter Pilzarten wie beispielsweise der Ascomyceten *Neurospora crassa* oder *Candida albicans* aufgrund zu hoher Kosten nicht in Betracht gezogen. Als Nachteil von Microarrays ist außerdem anzuführen, dass nur über die auf dem Array befindlichen Gene Aussagen hinsichtlich ihrer Expressionsraten gemacht werden können. Unbekannte Sequenzen, deren Identifizierung in der vorliegenden Arbeit von großem Interesse war, sind bei Microarray-basierten Verfahren nicht erfassbar (BALDWIN et al. 1999; BREYNE und ZABEAU 2001; LIANG 2002).

Eine wichtige Verbesserung der SSH-Technik gegenüber der vergleichbaren RDA-Technik ist in der Beseitigung von Unterschieden der Konzentrationen zwischen den einzelnen Transkripten zu sehen (DIATCHENKO et al. 1996). Dies wird durch einen Hybridisierungsschritt erreicht, der zu einer Normalisierung der Sequenzhäufigkeiten im SSH-Ansatz führt (GURSKAYA et al. 1996). Als Folge dieser Normalisierung können seltene differentiell exprimierte Transkripte ungefähr 1.000-fach angereichert werden (REBRIKOV et al. 2000). Eine Aussagen über die Normalisierungseffizienz von Konzentrationsunterschieden zwischen den einzelnen cDNA-Spezies in der SSH-Prozedur kann durch Betrachtung des Anteils redundanter Sequenzen in den subtrahierten cDNA-Banken getroffen werden (DIATCHENKO et al. 1996). Dieser war sowohl innerhalb der subtrahierten cDNA-Bank von *Phytophthora infestans* als auch der von *Pyrenophora teres* sehr gering. Bei insgesamt 97 analysierten SSH-Sequenzen wurden 91 (93,8%) verschiedene Transkripte identifiziert (*Phytophthora infestans*: 46 (92%) von 50; *Pyrenophora teres* 45 (95,7%) von 47). Diese Zahlen entsprechen in etwa den Relationen anderer mit der SSH-Technik erzielter Ergebnisse (DIATCHENKO et al. 1996: 91,9% bzw. BIRCH et al. 1999: 82% verschiedene Transkripte) und belegen den Erfolg der Normalisierung in der vorliegenden Arbeit. Bei auf der RDA-Methode basierenden Arbeiten werden wesentlich höhere Anteile redundanter Sequenzen identifiziert. Bei COOPER et al.

(2000) beispielsweise betrug der Anteil einmalig identifizierter Transkripten nur 62,7%.

Der Anteil falsch positiver Sequenzen, also jener Sequenzen, die sowohl nach Hybridisierung mit Driver- als auch mit subtrahierter Tester-cDNA signifikante Signale zeigten, betrug durchschnittlich für beide Phytopathogene 41% (75 von insgesamt 183 SSH-Klonen; *Phytophthora infestans*: 45 (50%) von 90; *Pyrenophora teres* 30 (32%) von 93). Dies bewegt sich ebenfalls im Rahmen dessen, was in vergleichbaren SSH-Studien vorgefunden wurde. Bei BIRCH et al. (1999) sowie VON STEIN et al. (1997) wurden Anteile von 25% bzw. 50% falsch positiver SSH-Klone in den subtrahierten cDNA-Banken ermittelt. Überwiegend handelt es sich bei diesen Sequenzen um ribosomale RNA. In der vorliegenden Arbeit waren vier von fünf, bei BIRCH et al. (1999) alle 15 exemplarisch sequenzierten falsch positiven SSH-Sequenzen ribosomale RNAs. Eine vollständige Reduzierung der redundanten ribosomalen RNA-Sequenzen ist bei einem Anteil von 80 bis 85% an der Gesamt-RNA durch die subtraktive Hybridisierung offensichtlich nicht möglich. Es findet jedoch zumindest eine kalkulierte Reduktion des Anteils der ribosomalen RNA-Sequenzen am Gesamttranskriptom um etwa 50% statt. Eine Möglichkeit den Anteil der ribosomalen RNAs und damit den der falsch positiven Sequenzen zu verringern wäre durch Verwendung von aufgereinigter mRNA statt, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, von Gesamt-RNA in der SSH-Prozedur zu erreichen. Dies war allerdings aufgrund nur geringer zur Verfügung stehender RNA-Mengen nicht möglich.

Als besonders vorteilhaft erweist sich bei der SSH-Methode im Gegensatz zu der cDNA-AFLP-Methode, dass einzelne Transkripte bereits als Einzelklone vorliegen und ohne weitere Arbeitsschritte für weitere Analysen zur Verfügung stehen (NELSON und DENNY 1999). Bei der cDNA-AFLP-Methode muss jedes einzelne Fragment teilweise unter erheblichen Schwierigkeiten aus der PAGE-Gelmatrix isoliert, reamplifiziert und kloniert werden (STURTEVANT 2000). Nicht zu vergessen sind allerdings die verglichen mit der cDNA-AFLP-Methode relativ hohen anfallenden Kosten bei der Anschaffung des Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences) ebenso, wie bei der vorliegenden Arbeit erfolgt, die mit der Verwendung von radioaktiven Isotopen verbundenen Auflagen und Risiken.

Die cDNA-AFLP-Methode hat sich in den verschiedensten Arbeitsbereichen als zuverlässige Technik erwiesen, die sowohl sehr gute Reproduzierbarkeit als auch

hohe Sensitivität zeigt (MONEY et al. 1996; BACHEM et al. 1998; JONES und HARROWER 1998; DURRANT et al. 2000; JONES et al. 2000; KUHN 2001). Aufgrund sehr stringenter PCR-Bedingungen treten die durch die niedrigen Annealingtemperaturen bedingten Probleme der DD-PCR-Methode nicht mehr auf (BACHEM et al. 1996; BALDWIN et al. 1999). Ein bedeutender Vorteil der cDNA-AFLP-Technik gegenüber subtraktiven Hybridisierungstechniken besteht darin, dass auch Expressionsmuster von Vertretern der gleichen Genfamilie mit hoher Sequenzübereinstimmung differenziert werden können. Die Problematik von falsch positiven Signalen durch Kreuzhybridisierung zwischen Hybridisierungssonde und beprobter DNA-Sequenz auf Grund hoher aber nicht vollständiger Sequenzübereinstimmung ist bei der cDNA-AFLP-Technik nicht gegeben (NOËL et al. 2001). QIN et al. (2000) berichten beispielsweise von zwei mittels der cDNA-AFLP-Methode identifizierten Genen aus *Globodera rostochiensis*, *GR-eng-1* und *GR-eng-2*, die 95% Sequenzübereinstimmung über knapp 900 bp zeigten.

Des weiteren bietet die cDNA-AFLP-Methode die Möglichkeit, anders als bei der SSH-Methode wo nur ein Abgleich zwischen zwei RNA-Pools machbar ist, die Transkriptome von mehreren Keimungsstadien direkt zu vergleichen. Durch den erhöhten Platzbedarf bei der elektrophoretischen Auftrennung wird zwar der Durchsatz an verschiedenen Primerkombinationen je Gel reduziert, doch erhält man dadurch ein wesentlich genaueres Bild von den genregulatorischen Vorgängen und Wechselwirkungen während der Keimung.

Nicht unproblematisch gestaltet sich bei gelbasierten Methoden wie der DD-PCR oder der cDNA-AFLP-Technik die Isolierung der differentiellen Banden aus der Gelmatrix. Häufig sind in einer Bande unterschiedliche cDNA-Fragmente enthalten, wodurch die Vereinzelung der differentiellen Sequenzen nach der Klonierung erheblich erschwert wird (BALDWIN et al. 1999). Daneben bestehen zwischen differentiellen und monomorphen Banden zuweilen nur sehr geringe Längenunterschiede, so dass trotz ausgedehnter elektrophoretischer Auftrennung das Ausschneiden der differentiellen Bande aus der Gelmatrix nicht ohne Anteile an monomorphen Banden erfolgen kann. Im Anschluss sind ein oder weitere Reamplifikationschritte durchzuführen um Einzelbanden zu erhalten.

Zwar bieten der Einsatz von verschiedenen Restriktionsenzymen sowie einer unterschiedlichen Art und Anzahl von selektiven Banden die Möglichkeit alle im Zielorganismus enthaltenen Transkripte zu analysieren, doch ist dies mit erheblichem

Arbeitsaufwand verbunden (DURRANT et al. 2000). Wie aus Abbildung 14 ersichtlich wird, ist die optimale Anzahl selektiver Nukleotide an den Hauptamplifikationsprimern nicht eindeutig festzulegen. Mit zunehmender Anzahl selektiver Basen reduziert sich die Anzahl der detektierbaren Fragmente. Es muss daher eine entsprechend höhere Zahl von Primerkombinationen für eine komplette Erfassung des Transkriptoms analysiert werden. Dabei können allerdings auch Transkripte detektiert werden, die bei Verwendung von weniger selektiven Basen nicht erfassbar sind. Dies kann möglicherweise auf die Konkurrenz zwischen cDNA-Sequenzen innerhalb der *in vitro* Amplifikation zurückgeführt werden, woraus eine nur schwache und auf dem Gel nicht detektierbare Amplifikation von Genen mit niedriger Kopienzahl resultiert.

## **4.2 Charakterisierung und Funktion keimungsspezifischer Gene**

Das Artenspektrum pilzlicher Phytopathogene ist sehr umfangreich und umfasst Vertreter aller Pilzklassen. Um eine höhere Aussagekraft und bessere Vergleichbarkeit bezüglich der identifizierten Gene auch über die Artgrenzen hinweg zu erhalten wurden in der vorliegenden Arbeit als Untersuchungsobjekte Repräsentanten zweier weit entfernter Pilzklassen ausgewählt. Dies waren zum einen der Oomycet *Phytophthora infestans*, zum anderen als Vertreter der echten Pilze der Ascomycet *Pyrenophora teres*. Die Identifizierung homologer Gensequenzen, die gleichermaßen für die Keimung von Ascomyceten und Oomyceten von essentieller Bedeutung sind, erlaubt gegebenenfalls sogar die Entwicklung hochprofitabler Breitbandfungizide, sog. 'Blockbuster', wie es beispielsweise bereits die Vertreter der Wirkstoffgruppe der QoI-Inhibitoren (Strobilurine) darstellen.

### **4.2.1 Quantitative Analyse der Genexpression**

Die quantitativen Analysen der Expressionsraten von mutmaßlich differentiell identifizierten Genen erfolgte mittels real-time RT-PCR. Dieses Verfahren erlaubt im Vergleich zur Quantifizierung über 'Northern blots' eine wesentlich sensitivere und exaktere Charakterisierung der Genexpression, insbesondere bei schwach exprimierten Genen (GIBSON et al. 1996; LOCKEY et al. 1998; ORLANDO et al. 1998; FREEMAN et al. 1999; SCHMITTGEN 2001; BUSTIN 2002). Für den Einsatz in der vorliegenden Arbeit war neben der hohen Sensitivität vor allem der geringe RNA-Bedarf der PCR-basierten real-time RT-PCR verglichen mit 'Northern blots', wo RNA im µg-Bereich benötigt wird, ausschlaggebend. Darüber hinaus sind bei der

real-time RT-PCR Arbeiten mit radioaktiven Isotopen durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen hinfällig. Die geringeren Probendurchsätze im Vergleich zur 'Northern blot' Analyse wurden deshalb in Kauf genommen.

Ein wichtiger Aspekt bei der real time RT-PCR ist die Normalisierung systemimmanenter Schwankungen zwischen den einzelnen zu analysierenden Proben (BUSTIN 2000; PFAFFL 2001). Diese Differenzen werden durch unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkriptase oder der DNA-Polymerase sowie durch variierende Mengen der eingesetzten cDNA verursacht (PFAFFL 2003). Ein Vergleich der Expressionsraten von Genen zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten ist erst nach einer Normalisierung mit einem geeigneten endogenen Referenzgen möglich. Grundvoraussetzung für die Eignung eines Gens als endogene Referenz ist eine konstante sowie vom Probennahmezeitpunkt und dem experimentellen Ansatz unabhängige Expressionsrate ('steady-state level'). Eine Reihe von Referenzgenen wie G3PDH, Albumin,  $\beta$ -Actin, Tubulin oder Cyclophilin finden zur Normalisierung solcher systemimmanenter Variationen in der real time RT-PCR ihre Anwendung. Verschiedene Studien ergaben jedoch, dass von einem derart idealisierten 'steady-state level' *a priori* nicht ausgegangen werden kann. Vielmehr unterliegen die Expressionsraten der genannten Gene in Abhängigkeit vom experimentellen Ansatz teilweise erheblichen Schwankungen (RÉVILLION et al. 2000; SCHMITTGEN und ZAKRAJSEK 2000; GOIDIN et al. 2001; Kirsch 2001; BUSTIN 2002). Geringen Veränderungen bezüglich des Anteils an der Gesamt-RNA innerhalb einer Einzelzelle unterliegen dagegen die rRNAs. Sie haben in etwa einen Anteil von 80 bis 85% an der Gesamt-RNA und variieren darin unter sich ändernden experimentellen Bedingungen in geringerem Ausmaß als die Expression einzelner mRNAs (THELLIN et al. 1999). Demzufolge wurden rRNAs in verschiedenen quantitativen Expressionsstudien erfolgreich als endogenes Referenzgen eingesetzt (SPIESS und IVELL 1998; MATHEWS et al. 1999; GOIDIN et al. 2001). Um die Annahme der konstanten Expression von 18S rRNA für die *in vitro* Sporenkeimung von *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* zu überprüfen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für die Expressionsraten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Keimung durchgeführt. Bei beiden Erregern konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt von 18S rRNA an der Gesamt-RNA durch den experimentellen Ansatz während der 24-stündigen *in vitro* Sporenkeimung nicht signifikant beeinflusst worden ist. Demzufolge kann die 18S rRNA als ein

geeigneter endogener Standard zur Normalisierung von differentiell exprimierten Genen in quantitativen Expressionsstudien während der Sporenkeimung von Pilzen angesehen werden (DILGER et al. 2003).

Die Berechnung der Expressionsraten aus den Ct-Werten erfolgte nach PFAFFL (2001). Dieses Quantifizierungsverfahren unterscheidet sich gegenüber der von Applied Biosystems vorgeschlagenen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (LIVAK 1997; LIVAK und SCHMITTGEN 2001) darin, dass bei der Methode nach PFAFFL (2001) die tatsächlichen PCR-Effizienzen sowohl des 'target' Gens als auch des endogenen Referenzgens in der Quantifizierung berücksichtigt werden. Um die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode anwenden zu können muss mit Hilfe eines relativen Effizienzblots nachgewiesen werden, dass beide Primer-Template-Systeme annähernd die gleichen PCR-Effizienzen aufweisen (LIVAK 1997; LIVAK und SCHMITTGEN 2001). Ist dies der Fall, wird bei beiden Systemen eine idealisierte Effizienz von 100% angenommen. Die realen Werte liegen jedoch meist unter 100%, wodurch eine Überschätzung der tatsächlichen Expressionsraten zustande kommt (LIU und SAINT 2002). Weichen dagegen die PCR-Effizienzen des 'target' Gens und des endogenen Referenzgens signifikant voneinander ab, so müssen, um die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode anwenden zu können, die Effizienzen der beiden Primer-Template-Systeme durch Anpassung der Reaktionsparameter oder durch Verwendung neuer Primer einander angeglichen werden (LIVAK 1997; SCHWARZ et al. 2004). Bei der Methode nach PFAFFL (2001) können unmittelbar aus den Ct-Werten und den über die Wasserverdünnungsstufen ermittelten PCR-Effizienzen die relativen Expressionsraten der zu analysierenden Gene errechnet werden. Eventuelle langwierige und zusätzliche Kosten verursachende Optimierungen sind somit hinfällig. In der vorliegenden Arbeit variierten die Werte der einzelnen PCR-Effizienzen zwischen dem niedrigsten Wert von 72,9% und dem Höchstwert von 118,4% (siehe Tabelle 12 bzw. Tabelle 16). Bei Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ergibt sich beispielsweise für die Sequenzen Pt-SSH-G12 und Pi-cAFLP-16 eine Überschätzung der maximalen Expressionsraten um 35,9% (4,8- statt 3,5-fache Induktion) bzw. um 94,0% (45,7- statt 29,0-fache Induktion).

Alle 14 Transkripte, die zusätzlich über real-time RT-PCR quantitativ analysiert wurden, zeigten während der Keimung im Vergleich zur ungekeimten Spore einen signifikanten Anstieg ihrer relativen Expressionsraten. Die maximale Expressionsrate variierte zwischen dem 1,5- und 29,0-fachen der Ausgangsexpression. Hierzu ist

anzumerken, dass selbst geringe Induktionslevel nach entsprechendem Stimulus bedeutende Auswirkungen auf nachfolgende Stoffwechselfvorgänge haben können. Bei *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise zeigte ein 'knock-out' Experiment, dass ein durch Sorbitolbeahandlung induziertes Hitzeschockprotein bei nur zweifacher Induktion Resistenz gegenüber Sorbitol vermittelt (DE NOBEL et al. 2001). Die Expressionsmaxima der Transkripte von *Pyrenophora teres* lagen zwischen 1 und 6 h nach Keimungsinduktion und umspannten somit den Bereich der maximalen Keimungsrate von 24,3% aller Konidien bei etwa 4 h nach Induktion. Im weiteren Verlauf nahmen die Expressionsraten bis 24 h nach Induktion kontinuierlich ab. Die Expressionsmaxima der Transkripte von *Phytophthora infestans* zeigten eine weitere Streubreite und wurden zwischen 1 und 12 h nach Induktion der Keimung erreicht. Eine Sequenz (Pi-SSH-G11) zeigte während der *in vitro* Keimung eine beständige Zunahme ihrer Expressionsrate und erreichte den Höchstwert erst 24 h nach der Keimungsinduktion. Die höchste Zoosporenschlupfrate mit 60% konnte ca. 1,5 h nach Induktion beobachtet werden, die maximale Keimungsrate von 30% aller Zoosporen wurde etwa 6 h nach Induktion erreicht. Die Expressionsraten im vegetativen Mycel reduzierten sich bei allen Transkripten auf ein sehr niedriges Niveau und erreichten mit Ausnahme der Sequenz Pi-cAFLP-8 einen niedrigeren Wert als in ungekeimten Sporangien. Die Wirksamkeit der beiden eingesetzten Techniken cDNA-AFLP und SSH zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde somit durch die real-time RT-PCR bestätigt.

#### 4.2.2 Funktionale Charakterisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei beiden Phytopathogenen Gene aus den unterschiedlichsten Bereichen des zellulären Lebens identifiziert.

Die hohen Anteile von 54% (27 von 50) bei *Phytophthora infestans* bzw. 53,2% (25 von 47) bei *Pyrenophora teres* aller analysierten Sequenzen ohne signifikante Treffer zu Datenbankeinträgen entsprechen den Werten vergleichbarer Arbeiten. Unter Einbeziehung der Sequenzen mit gering signifikanten  $P$ -Werten ( $10^{-5} < P \leq 10^{-2}$ ) nach NELSON et al. (1997) verringert sich der Anteil nicht zuordnungsbarer Sequenzen auf 40% (20 von 50) bei *Phytophthora infestans* bzw. auf 40,4% (19 von 47) bei *Pyrenophora teres*. Bei einem SSH-Ansatz zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene von *Phytophthora infestans* während der Interaktion mit

Kartoffelpflanzen betrug der Anteil nicht klassifizierbarer Transkripte 60% bei 600 zufällig sequenzierten SSH-Klonen (BEYER et al. 2002). Hierbei wurde ebenso wie in der vorliegenden Arbeit ein Schwellenwert von  $P \leq 10^{-5}$  angesetzt. Ebenfalls ein hoher Wert von etwa 50% nicht zuordnungsbarer cDNA-Sequenzen wurde bei einer SSH-Studie zur Identifizierung von Expressionsunterschieden zwischen Fest- und Flüssigkulturen des Deuteromyceten *Aspergillus oryzae* festgestellt (AKAO et al. 2002). Im Zuge der Gesamtgenomsequenzierung des Ascomyceten *Neurospora crassa* zeigten 4.140 von 10.082 (41%) vorhergesagten proteinkodierenden Genen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Datenbankeinträgen. Lediglich 13% (1.336) aller Sequenzen konnten bekannten Genen zugeordnet werden (in der vorliegenden Arbeit 36,1%). Der überwiegende Teil mit 4.606 Sequenzen (46%; in der vorliegenden Arbeit 9,3%) wurde den konserviert hypothetischen Proteinen zugeordnet (GALAGAN et al. 2003). Durch diesen Sachverhalt wird der noch sehr geringe Kenntnisstand sowie die Vielfalt der noch zu beschreibenden Gene aus pilzlichen Genomen deutlich. Alle 22 Sequenzen aus *Pyrenophora teres* mit signifikanter Homologie zu Datenbankeinträgen zeigten Ähnlichkeit zu Pilzen, bei denen es sich ebenfalls um Vertreter der Ascomyceten handelt. Bei knapp 60% (13 Sequenzen) war dies zu Sequenzen aus *Neurospora crassa*. Demgegenüber wies von 23 Sequenzen aus *Phytophthora infestans* nur eine Sequenz Ähnlichkeit zu einem anderen Oomyceten auf. Die verbleibenden 22 Sequenzen zeigten Homologie zu Sequenzen aus Organismen unterschiedlichster systematischer Bereiche wie z.B. den Vertebraten, den Protozoen oder den Pflanzen. Diese Beobachtung ist auf den Umstand zurückzuführen, dass insbesondere die Oomyceten in weitaus geringerem Umfang molekular charakterisiert sind als etwa die echten Pilze wie Asco- oder Basidiomyceten (JUDELSON 1997).

Neben den wissenschaftlichen Gesichtspunkten der Isolierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene sind diese genetischen Faktoren von besonderer Bedeutung als potentielle Zielorte neuer fungizider Wirkstoffe für eine gezielte Bekämpfung pilzlicher Phytopathogene zu einem frühem Befallsstadium.

Nachfolgend werden deshalb die als differentiell identifizierten Gene nicht nur hinsichtlich ihrer potentiellen Funktion während der Sporenkeimung bei Pilzen sondern auch hinsichtlich ihrer Eignung als Ansatzstelle für ein 'target'-orientiertes Design von fungiziden Wirkstoffen diskutiert.

Zwar wurden in *Phytophthora infestans* und in *Pyrenophora teres* keine identischen Gensequenzen isoliert, doch finden sich in beiden Pathogenen Gene, die dem nachweislich keimungsrelevanten  $\text{Ca}^{2+}$ /Phosphoinositid-Signalsystem und cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg sowie der für die Keimung vermutlich essentiellen Transkription und Proteinsynthese zugeordnet werden können.

### **Signaltransduktion/zelluläre Kommunikation**

Zwei identifizierte Klone weisen Ähnlichkeit zu Genen auf, die dem  $\text{Ca}^{2+}$ /Phosphoinositid-Signalsystem zugeordnet werden können. Der Klon Pt-SSH-F5 zeigt über eine Länge von 550 bp signifikante Homologie zu einer Kinase aus *Aspergillus fumigatus* mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomäne. Der 'second messenger'  $\text{Ca}^{2+}$  bindet zum einen an das ubiquitäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Rezeptorprotein Calmodulin oder aktiviert direkt Zielproteine wie die identifizierte Proteinkinase. Proteinkinasen kontrollieren ihrerseits durch Phosphorylierung die Aktivität zahlreicher weiterer Zielproteine (STRYER 1996). Der Klon Pi-SSH-A4 besitzt hoch signifikante Sequenzähnlichkeit über knapp 800 bp zu der Phosphatidylinositol 3-Kinase 2 (PI3K) aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (ZHOU et al. 1995). Neben den 'second messengern' Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) übernehmen verschiedene andere Phosphoinositide wichtige regulatorische Funktionen in eukaryotischen Organismen und sind dabei beispielsweise an der Regulation der Cytoskelettorganisation oder des Zellwachstums beteiligt (ZHOU et al. 1995). Studien mit dominant-negativ PI3K-Mutanten sowie mit den PI3K-spezifischen Inhibitoren Wortmannin und LY294002 implizieren vier zelluläre Funktionen der PI3K: Mitogensignaltransduktion, Inhibition von Apoptose, intrazellulärer Vesikeltransport bzw. -sekretion sowie Regulation der Aktin- und Integrinfunktion (zusammengestellt in CARPENTER und CANTLEY 1996). Die Relevanz dieses Signalsystems für die Sporenkeimung von Pilzen wurde bereits im Abschnitt 1.1.3 anhand verschiedener Beispiele verdeutlicht. Aufgrund ihrer Wichtigkeit für die Sporenkeimung und die pilzliche Entwicklung im Allgemeinen stellen die Mitglieder des  $\text{Ca}^{2+}$ /Phosphoinositid-Signalsystem vielversprechende Ansatzstellen für ein 'target'-orientiertes Design neuer fungizider Wirkstoffe dar.

Eine intermediäre Stellung zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ /Phosphoinositid-Signalsystem und dem cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg nimmt die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Adenylat-Cyclase aus dem Pantoffeltierchen *Paramecium tetraurelia* ein. Zu dieser

zeigt das Transkript Pi-SSH-H10 signifikante Homologie in zwei Sequenzabschnitten über eine Fragmentlänge von insgesamt 400 bp. Die aktivierte Adenylat-Cyclase synthetisiert den 'second messenger' cAMP, welcher wiederum nachfolgend PKA aktiviert. Aktivierte PKA kontrolliert ihrerseits zahlreiche Zielproteine, indem sie deren Serin- und Threoninreste phosphoryliert (STRYER 1996). Die Höhe der intrazellulären cAMP-Konzentration hat erheblichen Einfluss auf die Entwicklung und die Virulenz von Pilzen. So weisen *MAC1* Adenylat-Cyclase Mutanten von *Magnaporthe grisea* verringerte vegetative Wachstumsraten auf, sind steril und die Appressorienbildung auf induktiven Oberflächen bleibt aus. Die Infektion von Reisblättern ist dadurch nicht möglich (CHOI und DEAN 1997). Durch Zugabe von exogenem cAMP wird bei dem obligat biotrophen Gerstenpathogen *Blumeia graminis* f. sp. *hordei* die ansonsten *in vitro* nicht erfolgende Appressorienbildung induziert (HALL et al. 1999). Auch bei der Appressoriendifferenzierung des Bohnenrostpilzes *Uromyces phaseoli* nimmt cAMP eine Schlüsselrolle ein (HOCH und STAPLES 1984). ROCHA et al. (2001) konnten mit Hilfe von *CaCDC35* Adenylat-Cyclase Mutanten die Essentialität der Adenylat-Cyclase für das Hyphenwachstum und die Virulenz der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* nachweisen. Da sich pilzliche Adenylat-Cyclasen in ihrer Regulationsweise von denen anderer Lebewesen unterscheiden und cAMP generell bei pathogenen Pilzen Virulenz zu vermitteln scheint, stellen auch Adenylat-Cyclasen und ihre Regulatoren attraktive Ziele für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren mit fungizider Aktivität dar (HAMER und HOLDEN 1997; ROCHA et al. 2001).

Die Aktivität von Adenylat-Cyclasen wird vor allem durch die G $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen kontrolliert. Unter den identifizierten Klonen sind zwei Sequenzen, die Homologie zu G-Proteinen aufweisen. G-Proteine sind Mitglieder einer Familie von regulatorischen GTP-Hydrolasen, die sich aus einer Vielzahl von Proteinen zusammensetzen. Vertreter sind unter anderem die Proteine der Ras-Familie, die Elongationsfaktoren TU und G sowie die  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (SPRANG 1997). Pi-SSH-B2 zeigt signifikante Homologie zu dem G-Protein Rag C des Menschen im Bereich der GTP-bindenden Domäne (SEKIGUCHI et al. 2001). Pi-SSH-B4 wies hoch signifikante Sequenzähnlichkeit zu einem G-Protein der Tintenfischart *Euprymna scolopes* über mehr als 400 bp auf. LAXALT et al. (2002) identifizierten unlängst die erste G $\alpha$  bzw. G $\beta$  Untereinheit von Oomyceten aus *Phytophthora infestans* und gehen basierend auf Expressionsstudien von einer gewissen Bedeutung dieser G-Proteine während der Sporangienbildung sowie

während der Sporenkeimung aus. Für verschiedene human- und pflanzenpathogene Pilze konnte bereits gezeigt werden, dass G-Protein vermittelte Signaltransduktion entscheidend während präinfektioneller Entwicklungsabschnitte und für die nachfolgende Invasion von Wirtsgewebe ist (LENGELER et al. 2000). WHEELER et al. (2003) konnten kürzlich die bislang unbekannte Wirkung des Fungizids Quinoxifen auf einen G-Protein vermittelten Signaltransduktionsweg während der Sporenkeimung des Gerstenmehltaus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* nachweisen. Der Eingriff in diesen Signaltransduktionsweg stellt somit einen erfolgversprechenden Ansatz für ein 'target'-orientiertes Fungiziddesign dar.

Der Klon Pi-SSH-G10 zeigt signifikante Sequenzähnlichkeit zu der extrazellulären signalregulierten Kinase *ERK2* aus dem Protozoen *Giardia lamblia* (ELLIS et al. 2003). *ERK2* gehört zu der MAPK (Mitogen aktivierte Protein Kinase) Familie, deren Mitglieder an der Transmission von Signalen aus der Zellperipherie in den Zellkern beteiligt sind (HERSKOWITZ 1995; GUSTIN et al. 1998). *Saccharomyces cerevisiae* besitzt sechs MAPK-Signaltransduktionswege, die unter anderem den Übergang zu filamentösem Wuchs sowie die Ascosporenbildung regulieren (HERSKOWITZ 1995; GUSTIN et al. 1998). In phytopathogenen Pilzen wurden ebenfalls eine Vielzahl MAPKs identifiziert, die für deren Virulenz und Pathogenität von eminenter Bedeutung sind. *Pyrenophora teres* *ptk1* Mutanten mit nicht funktionaler *PTK1* (extrazelluläre signalregulierte MAPK) bilden keine Konidien bzw. Appressorien und haben die Fähigkeit verloren sowohl Gerstenblätter als auch künstlich verwundetes Wirtsgewebe zu infizieren (RUIZ-ROLDÁN et al. 2001). *CMK1* aus *Colletotrichum lagenarum* ist essentiell für die Konidienanhaftung auf der Wirtsoberfläche, für die Konidienkeimung und für den invasiven Wuchs (TAKANO et al. 2000). Auch bei *Aspergillus nidulans* spielt eine MAPK, nämlich *MPKA*, eine wichtige Rolle bei der Sporenkeimung sowie dem polarisierten Wuchs (BUSSINK und OSMANI 1999). Aufgrund der Wichtigkeit für die Sporenkeimung und generell für die Virulenz von phytopathogenen Pilzen stellen die Vertreter der MAPK-Familie vielversprechende Ansatzstellen für eine 'target'-spezifische Entwicklung fungizider Wirkstoffe dar.

Der Klon Pt-cAFLP-1 weist signifikante Homologie zu dem 'myc-type basic helix-loop-helix' Transkriptionsfaktor *Cph2* von *Candida albicans* auf, welcher an der Regulierung der Hyphenentwicklung beteiligt ist (LANE et al. 2001). Die Ausbildung von Hyphen sowie die Induktion hyphenspezifischer Gene in flüssigem Lee's Medium unterbleiben bei *cph2/cph2* Mutantenstämmen. Der Transkriptionsfaktor *Cph2* ist

überdies Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerkes, wobei die Expression von *Cph2* durch einen weiteren Transkriptionsfaktor *Tec1* während des Hyphenwachstums induziert wird (LIU 2001). Die Funktion von *Cph2* während der Hyphenentwicklung wird teilweise von *Tec1* übernommen. Durch ektopische Expression von *Tec1* werden die *cph2/cph2* bedingten Defekte unterdrückt, weshalb *Cph2* als Ansatzstelle für ein 'target'-orientiertes Fungiziddesign ungeeignet sein dürfte.

Der Klon Pt-SSH-B2 hingegen zeigt hoch signifikante Ähnlichkeit zu dem regulatorischen Protein *AmdA* von *Aspergillus nidulans*. *AmdA* besitzt eine DNA-bindende C2H2 Zinkfingerdomäne sowie zwei weitere Regionen, welche Motive repräsentieren, die mit transkriptioneller Aktivierung assoziiert werden (ANDRIANOPOULOS et al. 1997). *AmdA* kontrolliert die Expression von zumindest drei bekannten strukturellen Genen: das die Alkoholdehydrogenase II kodierende Gen *alcB*, das die Formatdehydrogenase kodierende Gen *aciA* sowie das Gen *amdS*, welches für eine Acetamidase kodiert, die die Nutzung bestimmter Amide als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle während Nährstoffmangelzuständen ermöglicht. Die erhöhte Expression des regulatorischen Proteins *AmdA* während der Konidienkeimung von *Pyrenophora teres* könnte somit auf den im *in vitro* Ansatz in  $H_2O_{\text{bidest}}$  gegebenen Nährstoffmangelzustand zurückzuführen sein. Ähnliche Bedingungen hinsichtlich der Nährstoffversorgung können auch *in vivo* auf der Blattoberfläche des Wirtes angenommen werden. Über die Essentialität der Nutzung solcher alternativer Nährstoffquellen für die Sporenkeimung und somit über die Eignung des regulatorischen Gens *AmdA* für ein 'target'-orientiertes Design von Fungiziden kann ohne weiterführende Analysen keine Aussagen gemacht werden.

Der Klon Pt-SSH-C7 erzielte einen hochsignifikanten *P*-Wert zu einem Protein von *Neurospora crassa*, welches analog zu dem regulatorischen *TOM1* Protein der Hefe ist. Die Hect-Domäne von *TOM1* reguliert die Funktion des ADA Komplexes durch Ubiquitinierung (SALEH et al. 1998). Die ADA Gene haben wichtige regulierende Funktionen bei der Aktivierung und Repression der Transkription, unter anderem durch Interaktion mit TATA-bindenden Proteinen (GUARANTE 1995). Die Sequenzhomologie von Pt-SSH-C7 zu *TOM1* liegt allerdings außerhalb der Hect-Domäne. Analysen der rRNA-Prozessierung in *TOM1* Mutanten zeigten, dass das *TOM1* Protein ebenfalls an der Reifung der 18S rRNA durch Einflussnahme in verschiedenen frühen Schritten der rRNA-Prozessierung beteiligt ist (TABB et al.

2001). Aussagen über die Essentialität von *TOM1* für das Wachstum von *Neurospora crassa* liegen nicht vor.

### **Transkription**

Der Klon Pt-SSH-G2 zeigt hoch signifikante Sequenzhomologie zu dem Polypeptid 2 der DNA-abhängigen RNA-Polymerase I (ONAI et al. 1998). Die RNA-Polymerase I transkribiert in Eukaryonten ausschließlich ribosomale RNAs. Pt-SSH-H12 ist homolog zu dem RNA prozessierenden Protein *SEN1* von *Neurospora crassa* (URSIC et al. 1997). Bei den prozessierten RNAs handelt es sich um rRNAs, tRNAs sowie um kleine nukleare und nukleolare RNAs. Die Detektion solcher Gene entspricht den Beobachtungen von SACHS und YANOFKY (1991) an *Neurospora crassa*, wonach Gene, die an der Bildung von Ribosomen beteiligt sind, während der Sporenkeimung von Pilzen eine signifikant höhere Expression aufweisen als während des Mycelwachstums. Über die Notwendigkeit der Transkription und der RNA-Synthese für die Sporenkeimung liegen allerdings wie im Abschnitt 1.1.3 beschrieben widersprüchliche Ergebnisse vor. Aussagen über die Eignung dieser Gene als Ansatzstellen für keimungsinhibierende Fungizide sind somit ohne weiterführende Analysen nicht zu treffen.

### **Proteinsynthese**

Vier Transkripte zeigen Homologie zu Genen, die in die Initiation der Proteinsynthese oder in die Elongation involviert sind. Die beiden Klone Pi-cAFLP-16 und Pi-SSH-G2 zeigen signifikante Sequenzähnlichkeit zu den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF4E aus *Xenopus laevis* (MOTOAKI et al. 1995) bzw. eIF3 aus *Arabidopsis thaliana* (BURKS et al. 2001). Beide Faktoren sind in der Initialphasen der Proteinsynthese von grundlegender Bedeutung. Das Cap-bindende Protein eIF4E bindet dabei an die m<sup>7</sup>G-enthaltende Cap-Sequenz eukaryotischer mRNAs und ist Teil des mRNA-Initiationsfaktorenkomplexes. eIF3 ist an der Bildung des 43S Präinitiationskomplexes beteiligt. Der mRNA-Initiationsfaktorenkomplex bildet zusammen mit dem 43S Präinitiationskomplex den 48S Präinitiationskomplex. Nach Anlagerung der 60S ribosomalen Untereinheit an den 48S Präinitiationskomplex und nachfolgender Dissoziation der Initiationsfaktoren entsteht der 80S Initiationskomplex mit einsetzender Elongation (HOCK 1995). Die cDNA-Sequenz Pt-SSH-B5 weist hoch signifikante Homologie zu dem 60S ribosomalen Protein L5 von *Neurospora crassa* auf. Verschiedene antibiotische Hemmstoffe sind bereits verfügbar, die die Initiation

der Proteinsynthese blockieren. Aurintricarboxylsäure beispielsweise verhindert spezifisch die Bildung des 48S Präinitiationskomplexes und damit die Initiation der Proteinsynthese ohne Beeinträchtigung der Elongation und Termination ('read-out-System'). Das Antibiotikum Edein A blockiert die P-Stelle der 40S ribosomalen Untereinheit und damit nachfolgend die Bildung des 43S Präinitiationskomplexes (HOCK 1995). Der Klon Pi-SSH-E12 zeigt hoch signifikante Sequenzähnlichkeit zu dem der Familie der G-Proteine angehörenden Elongationsfaktor EF-3 von *Candida albicans* (MYERS et al. 1992). EF-3 stellt eine Besonderheit des pilzlichen Translationssystems dar und wurde erstmals von SKOGERSON und WAKATAMA (1979) in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. In andere Eukaryonten sind nur zwei Typen von Elongationsfaktoren zu finden (EF-1 und EF-2). Bemerkenswert ist die Isolierung dieses für die echten Pilze typischen Elongationsfaktors EF-3 aus dem Oomyceten *Phytophthora infestans*. Aufgrund der Essentialität in der Proteinsynthese von Pilzen und dem Fehlen in anderen eukaryotischen Organismen stellt EF-3 somit ein vielversprechendes Ziel für ein 'target'-orientiertes Design neuer fungizider Wirkstoffe dar (MYERS et al. 1992).

Daneben wurden drei weitere Sequenzen identifiziert, die ebenfalls Homologie zu in die Proteinsynthese involvierten Genen zeigen. Pt-SSH-F7 weist hoch signifikante Ähnlichkeit zu der Phenylalanin-tRNA-Synthase  $\beta$ -Untereinheit von *Neurospora crassa* auf (SANNI et al. 1988). MARCILLA et al. (1998) gehen basierend auf Untersuchungen an sich regenerierenden Protoplasten von *Candida albicans* von einer Doppelfunktion der tRNA-Synthasen aus, wonach sie neben ihrer Funktion bei der Synthese von tRNA auch zusätzlich regulierenden Einfluss auf die Synthese von in die Zellwandsynthese involvierten Proteinen nehmen. Dies erfolgt durch Initiation einer Proteinphosphorylierungskaskade infolge bestimmter Stresssituationen wie beispielsweise Mangel an Aminosäuren (CLEMENS 1990). Eine solche Mangelsituation kann auch während der Sporenkeimung von Pilzen angenommen werden, wo auch in besonderem Ausmaß die Synthese neuer Zellwandkomponenten erforderlich ist. Das Transkript Pt-SSH-D1 zeigt hoch signifikante Sequenzähnlichkeit zu der Threoninsynthase aus *Saccharomyces cerevisiae*, die den letzten Schritt der Biosynthese der essentiellen Aminosäure Threonin katalysiert. Da sich die Fähigkeit zur Threoninbiosynthese auf Bakterien, Pilze und Pflanzen beschränkt, stellt sie eine interessante Ansatzstelle für die Entwicklung neuer Fungizide dar. Verschiedene Substratanaloga wurden auf eine mögliche Wirkung als mechanismusspezifische

Inhibitoren der Threoninsynthase getestet. Im Hinblick auf ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign wurde bereits die Kristallstruktur der Threoninsynthase von *Saccharomyces cerevisiae* aufgeklärt (GARRIDO-FRANCO et al. 2001).

Der Klon Pi-SSH-G11 zeigt signifikante Sequenzähnlichkeit zu der Oligosaccharyltransferaseuntereinheit Ribophorin I aus *Arabidopsis thaliana*. Oligosaccharyltransferasen sind im Lumen des rauhen endoplasmatischen Reticulums lokalisiert und sind für die Anlagerung von asparaginverknüpften Oligosacchariden an Polypeptide zuständig und somit an der Proteinreifung beteiligt. Die Modifikation frisch synthetisierter Polypeptide mit Oligosacchariden ist für deren Faltung und spätere Funktionalität als Glycoprotein von grundlegender Voraussetzung (HELENIUS 1994). SILBERSTEIN et al. (1995) konnten durch Disruption des Genlocus der entsprechenden Oligosaccharyltransferaseuntereinheit von *Saccharomyces cerevisiae* dessen Essentialität für das vegetative Wachstum nachweisen, woraus sich eine grundsätzliche Eignung für ein 'target'-orientiertes Fungiziddesign ableiten lässt.

Nachfolgend werden die den übrigen funktionalen Kategorien zugeordneten Sequenzen diskutiert. Auf eine strikte Abgrenzung der einzelnen Kategorien voneinander wird aufgrund von teilweise gegebenen Wechselwirkungen zwischen Vertretern unterschiedlicher Kategorien verzichtet.

Der Klon Pt-cAFLP-4 zeigt Homologie zu Genen, die die OXA1 Domäne beinhalten. OXA1 ist an der Insertion von Proteinen in die innere mitochondriale Membran beteiligt (DALBEY und KUHN 2000). Die höchste Ähnlichkeit besteht zu dem Cytochrom c Oxidase Biogeneseprotein von *Schizosaccharomyces pombe*, welches essentiell für die Bildung funktionaler Cytochrom c Oxidase ist (BONNEFOY et al. 2000). In dormanten Sporen des Ascomyceten *Botryodiplodia theobromae* ist enzymatische Aktivität der Cytochrom c Oxidase nicht nachweisbar. Diese steigt erst während der Sporenkeimung rapide an, was auf die Bildung von Cytochrom c Oxidase aus Untereinheiten in den Sporen zurückzuführen ist (BRAMBL 1980). Die Annahme, dass die Regulation der in die Respiration involvierten Gene während der Sporenkeimung bei Pilzen allgemein in dieser Weise erfolgt, wird dadurch bekräftigt, dass auch in der subtrahierten cDNA-Bank von *Phytophthora infestans* ein Klon (Pi-SSH-A7) mit Homologie zu einer Cytochrom c Oxidoreduktase aus *Arabidopsis thaliana* gefunden wurde. Eine Erhöhung der Transkription von Genen der Atmungskette während der Sporenkeimung von Pilzen könnte dazu beitragen Hungerstress zu bewältigen. Als direkte Folge resultiert daraus oxidativer Stress, da der größte Teil

der reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff durch die Cytochrom *c* Oxidase entsteht und ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl aktiver Atmungsketten und dem Umfang von oxidativem Stress besteht (GONZÁLEZ-FLECHA und DEMPLE 1995). Die spezifischen metabolischen Anforderungen während der Sporenkeimung könnten also interne Stressfaktoren erzeugen, denen mit der verstärkten Expression von Enzymen zur Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies oder zur Reparatur der durch sie verursachten Schäden begegnet werden muss. In diesem Zusammenhang kann der Klon Pt-SSH-F3 mit hoch signifikanter Homologie zu dem DNA-Reparaturproteinen *DDR48* aus *Saccharomyces cerevisiae* gesehen werden (SHENG und SCHUSTER 1993). Enzyme der Atmungskette sind bereits Wirkorte fungizider Substanzen. Die Qol-Inhibitoren (Qol; z.B. Strobilurine) beispielsweise unterbinden den Elektronen-fluss am  $bc_1$ -Komplex der mitochondrialen Atmungskette von phytopathogenen Pilzen bei einem äußerst breiten Wirkungsspektrum. Allerdings reduziert sich die Bedeutung von Qol aufgrund erst wenige Jahre nach Markteinführung aufgetretener qualitativer Resistenz bei nahezu allen Ziel-organismen (BARTLETT et al. 2002; FELSENSTEIN mündliche Mitteilung).

Der Klon Pi-cAFLP-7 weist signifikante Homologie zu der cDNA-Sequenz des Glycoprotein Elicitors CBEL (Cellulose-Binding Elicitor Lectin) aus *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* auf. CBEL setzt sich aus zwei homologen Cystein-reichen Domänen zusammen, die durch eine Threonin/Prolin-reiche Linkerregion getrennt sind und besitzt Cellulose-bindende sowie Lektin-ähnliche Aktivitäten (VILLABA MATEOS et al. 1997). CBEL<sup>-</sup>-Stämme zeigen abnormale Eigenschaften der Zellwand, was vermutlich auf Deregulierung der Cellulosesynthese oder der Cellulose-integration in die Zellwand zurückzuführen ist. Daneben besitzen Sporen von CBEL<sup>-</sup>-Stämmen ein reduziertes Anhaftungsvermögen auf Cellulose-haltigen Substraten (GAULIN et al. 2002). Die Organisation und die strukturelle Integrität der Zellwand ist für Mikroorganismen von grundlegender Wichtigkeit, weshalb die daran beteiligten Proteine, wie CBEL, interessante Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen darstellen (GOLDMANN und BRANSTORM 1999). STANLEY et al. (2002) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Inhibierung der Sporen-adhäsion zu einer deutlichen Reduktion der Ausbildung von Krankheitssymptomen führt, die durch die beiden phytopathogenen Pilze *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum lindemuthianum* an Reis bzw. an der Bohne verursacht werden. CBEL

stellt somit in doppelter Hinsicht ein potentielles Ziel für die Entwicklung neuer fungizider Wirkstoffe dar, wobei bezüglich der Wirkung auf die Zellwandorganisation eine Beschränkung auf Oomyceten vorgegeben ist, da Cellulose in der Zellwand echter Pilze nicht vorhanden ist.

Das Transkript Pt-SSH-H5 zeigt hoch signifikante Homologie zu der CorA Domäne der Kationentransportproteine *ALR2* bzw. *ALR1* vom *Saccharomyces cerevisiae* (MACDIARMID und GARDNER 1998). CorA ist ubiquitär in Bakterien und Archaea, daneben existieren analoge Proteine in Eukaryonten, die den transmembralen Transport von bi- und trivalenten anorganischen Kationen bewerkstelligen. *ALR1* wird für das Wachstum bei niedrigen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen benötigt. Die Expression von Pt-SSH-H5 in keimenden Sporen von *Pyrenophora teres* könnte daher auf die Verwendung von  $H_2O_{bidest}$  während der *in vitro* Keimung zurückzuführen sein. Da die Inaktivierung von *ALR1* in *Saccharomyces cerevisiae* letal ist, stellt es ein interessantes Ziel für die 'target'-spezifische Entwicklung fungizider Wirkstoffe dar.

Die beiden Klone Pt-SSH-H6 und Pi-SSH-C9 weisen hoch signifikante Sequenzähnlichkeit zu den vakuolären ATP-Synthase (V-ATPase) Untereinheiten d und A aus *Neurospora crassa* bzw. aus *Xenopus laevis* auf. V-ATPasen hydrolysieren ATP und pumpen Protonen durch die vakuoläre Membran, um diese zu hyperpolarisieren oder um zelluläre Kompartimente anzusäuern. Ihnen kommt eine wichtige Rolle bei der Zellmorphogenese und -entwicklung zu. Mutantenstämme der V-ATPase Untereinheit A von *Neurospora crassa* zeigen keine apikale Dominanz, ein eindeutiges Charakteristikum von filamentösen Pilzen. Des weiteren wurde die Sporenkeimung sowohl durch Concanamycin, einem spezifischen Inhibitor von V-ATPasen, als auch bei Mutanten mit fehlender Untereinheit A stark beeinträchtigt (BOWMAN et al. 1997; BOWMAN und BOWMAN 2000). Da sich pilzliche Protonenpumpen darüber hinaus innerhalb ihrer transmembralen Strukturen von denen anderer Organismen deutlich unterscheiden, stellen sie potentielle Ansatzstellen für selektiv wirkende Fungizide dar (ORTH 1999).

Drei Klone (Pi-cAFLP-4, Pi-SSH-H9, Pt-SSH-B8) zeigten Homologien zu Elementen aus Retrotransposons. Retrotransposons sind mobile genetische Elemente, durch welche asexuelle Rekombination in Genomen mittels intermediärer Replikation durch RNA und nachfolgender Reintegration ins Genom stattfindet. Bislang ist eine hypothetische Funktion von Retrotransposons während der Sporenkeimung bei Pilzen nicht beschrieben. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass

aktive retrotransposable Elemente nicht essentiell für die Keimung und somit für eine spezifische Inhibition der Pilzentwicklung nicht geeignet sind.

Das Transkript Pi-SSH-C5 weist hoch signifikante Homologie zu der Xylitoldehydrogenase des Ascomyceten *Trichoderma reesei* auf. Xylitol ist das erste Zwischenprodukt beim enzymatischen Abbau von Xylose, einem wichtigen Bestandteil von Hemicellulosen wie Xylan in der Zellwand von Pflanzen. Xylane sind die häufigsten Nicht-Cellulose-Polysaccharide in den meisten Angiospermen, mit einem Trockenmasseanteil von 20 bis 30% (ASPINALL 1980). Die erhöhte Expression eines am Abbau des Zellwandbestandteils Xylose beteiligten Enzyms während der Sporenkeimung kann eventuell auf dessen Notwendigkeit für das Eindringen des Pathogens in die Epidermiszellen des Wirtes zurückzuführen sein. Würde das Pathogen bei Inhibition der Xylitoldehydrogenase nicht mehr in der Lage sein den Wirt erfolgreich zu penetrieren, wäre dieses Enzym ein potentielles Ziel für die Entwicklung neuer fungizider Wirkstoffe.

### **4.3 'target'-orientiertes Design von fungiziden Wirkstoffen**

Insbesondere die Initialphase der Infektion, in denen sich der Pilz in der Wirtspflanze etabliert, ist entscheidend für seine erfolgreiche sukzessive Ausbreitung. Aus diesem Grund sind gerade die frühen, epidemiologisch relevanten Entwicklungsabschnitte wie Adhäsion an die Blatt- bzw. Wurzeloberfläche, Sporenkeimung, Keimschlauchwachstum, Appressoriumbildung und Penetration des Wirtsgewebes geeignete Angriffspunkte für eine frühzeitige und nachhaltige Bekämpfung von phytopathogenen Pilzen. Durch den Einsatz moderner biochemischer und molekularer Techniken wie der in der vorliegenden Arbeit verwendeten SSH- und cDNA-AFLP-Methode ist ein vertieftes Verständnis der physiologischen und molekularen Vorgänge während diesen frühen Phasen möglich. Daraus resultierende detaillierte Kenntnisse über die molekularen Zusammenhänge des Infektionsverlaufes eröffnen die Aussicht auf die Entwicklung neuer spezifischer Fungizide, die keine Nebenwirkungen auf Nichtzielorganismen haben und ein den aktuellen Anforderungen entsprechendes Umweltverhalten aufweisen.

Bei den klassischen Verfahren in der Fungizidneuentwicklung wie *in vivo* und zellbasierenden *in vitro* Biotests ist der komplette Erreger Ansatzstelle der zu testenden potentiell fungiziden Substanzen. Grundlegend ist hierbei die Vorgehensweise

nach dem Prinzip 'trial and error', d.h. sehr hoher Durchsatz an Substanzen bzw. Substanzfamilien über deren Wirkung auf den Zielorganismus vorher nichts bekannt ist. Mittels *in vivo* Tests, die auf infizierten Wirtspflanzen durchgeführt werden, sind die genauesten Vorhersagen bezüglich der möglichen Wirkung einer Kandidatensubstanz auf das Pathogen auch unter Feldbedingungen zu treffen. Neben der direkten Wirkung auf den Zielorganismus können bei *in vivo* Tests zudem Aussagen über weitere wichtige physikalische und chemische Eigenschaften der Testsubstanz wie Stabilität, Aufnahmevermögen und Verteilungseigenschaften innerhalb der Wirtspflanze gemacht werden. Darüber hinaus ermöglichen *in vivo* Verfahren Experimente mit obligat biotrophen Pilzen wie beispielsweise den echten Mehltaupilzen (BALDWIN und RATHMELL 1988; KNIGHT et al. 1997). Durch den Einsatz von zellbasierenden *in vitro* Verfahren im Mikrotiter-plattenmaßstab konnte der Durchsatz an zu testenden Substanzen von wenigen 10.000 pro Jahr auf mehr als 10.000 pro Woche gesteigert werden (MAJOR 1995). Neueste hoch automatisierte 'Ultra High Throughput *Vivo* Screening' Verfahren (UHTVS) ermöglichen die Evaluierung von bis zu 500.000 Komponenten pro Jahr parallel auf deren potentielle fungizide, insektizide und herbizide Wirkung (STENZEL 2003). Entscheidend für die Güte eines *in vitro* Ansatzes ist, wie eng die Aktivität einer Substanz im *in vitro* Test mit der beobachteten Aktivität *in vivo* korreliert. Dabei sind auseinander gehende Erfahrungen zu beobachten (STILLER et al. 1983; TROKE et al. 1988). *In vitro* Verfahren sind außerdem auf in Medium kultivierbare Erreger beschränkt. Tests mit obligat biotrophen Pilzen können demzufolge nicht durchgeführt werden. Aussagen über den Wirkort und das Wirkprinzip der getesteten Substanzen sind bei beiden Verfahren ohne nachfolgende Analysen nicht zu treffen.

Die höchste Aussagekraft hinsichtlich der biochemischen Wirkung und des Wirkortes einer Testsubstanz bieten neue Verfahren, bei denen die Validierung potentiell fungizider Substanzen auf die biochemische Ebene verlagert wird. Ansatzstelle ist hierbei ein einzelnes Genprodukt, wobei auch Gene aus obligat biotrophen Erregern analysiert werden können. Für die Eignung eines solchen Genes als brauchbare Angriffsstelle muss vor allem die Grundvoraussetzung der Essentialität erfüllt sein (READ et al. 2001). Ein Essentialitätsbeweis kann nur durch Ausschalten des jeweiligen Gens und daraus resultierender Letalität erbracht werden. Es stehen bereits verschiedene Verfahren zum 'knock out' einzelner Gene von pilzlichen Organismen zur Verfügung. Neben dem ungerichteten und auf zufälliger

Insertionsmutagenese beruhenden REMI-Verfahren ('Restriction Enzyme-Mediated Integration') (SCHIELTL und PETES 1991; KUSPA und LOOMIS 1992) ist durch homologe Rekombination (RUIZ-ROLDÁN et al. 2001) bzw. mit 'antisense' mRNA basierenden Verfahren (DE BACKER et al. 2001) ein zielgerichteter genspezifischer 'knock out' möglich. Die beiden letzteren Methoden erweisen sich allerdings im Rahmen von Hochdurchsatzverfahren zur Evaluierung potentieller Zielgene aufgrund den mit Transformationen verbundenen Schwierigkeiten wie geringen Transformationsraten als nicht praktikabel. Eine Alternative zu diesen etablierten 'knock out' Verfahren stellt möglicherweise ein mittels RNAi ('RNA interference') geführter Essentialitätsbeweis dar. Dieses Phänomen wurde erstmals durch FIRE et al. (1998) bei *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Bei der RNAi-Methode wird kurze, zur Zielsequenz komplementäre, dsRNA (21 bis 23 Nukleotide) in den entsprechenden Organismus eingeführt, woraus eine spezifische Degradation der betreffenden mRNA und ein Ausbleiben der Expression dieses Genes resultiert (HANNON 2002; TIJSTERMAN et al. 2002). Die RNAi-Methode wurde bereits erfolgreich in Hochdurchsatzanalysen zur Funktionsaufdeckung bestimmter Gene in *Caenorhabditis elegans* eingesetzt (MAEDA et al. 2001). Da weder für Ascomyceten noch für Oomyceten die Wirksamkeit von RNAi belegt ist, müsste durch ein geeignetes System die Anwendbarkeit von RNAi bei beiden Pathogengruppen nachgewiesen werden. Die Hauptanforderung, die an ein solches System gestellt wird, ist eine einfache und eindeutige Boniturmöglichkeit des ausgeschalteten Genes. Hierzu eignen sich besonders optisch bonitierbare Merkmale wie Färbung. Da Mycel und Sporen von *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* farblos sind, bietet es sich an, GFP- ('Green Fluorescent Protein') transformante Linien dieser Pathogene herzustellen (BOTTIN et al. 1999). Die Grünfluoreszenz ist bei diesem Verfahren *in vivo* während Anregung mit einer entsprechenden Wellenlänge unter einem Fluoreszenzmikroskop detektierbar. Die Wirksamkeit von RNAi bei *Phytophthora infestans* und *Pyrenophora teres* wäre somit durch das Ausbleiben der Grünfluoreszenz nach dem Ausschalten des GFP mittels RNAi bewiesen.

Im Falle eines erfolgreichen Nachweises der Essentialität des Kandidatengenes für die Pathogene folgt beim 'target'-orientierten Ansatz zur Neuentwicklung fungizider Wirkstoffe ein auf der dreidimensionalen Struktur des Genes basierendes Wirkstoffdesign (ORTH 1999). Zur Ermittlung der dreidimensionalen Struktur des Zielgenes kommen Röntgenkristallographie, Kernmagnetresonanzspektroskopie oder

Elektronenmikroskopie zum Einsatz (OAKLEY und WILCE 2000; STEWART et al. 2002). Die Strategie beim 'target'-orientierten Ansatz ist nachfolgend, anhand der durch die Strukturermittlung abgeleiteten Informationen, einen zum Zielgen strukturell und chemisch komplementären Liganden zu finden. Verschiedene Computerprogramme (DOCK: MENG et al. 1993; GRID: GOODFORD 1985; LUDI: BOHM 1992) können dazu genutzt werden, um verfügbare elektronische Datenbanken nach potentiellen Wirkstoffen zu sichten oder um Liganden anhand der biomolekularen Struktur des Zielgenes *de novo* zu designen. Die Vorhersagbarkeit des Bindungsverhaltens von Ligand und Zielgen durch mathematische Modelle ist allerdings aufgrund vielfältiger möglicher Interaktionen mit gewissen Unsicherheiten behaftet. Unter Umständen sind zur Optimierung mehrere Zyklen von Strukturermittlung des Zielgen-Ligand-Komplexes mit nachfolgender Modifizierung oder Neusynthese von verbesserten Liganden notwendig (OAKLEY und WILCE 2000).

Die Entwicklung von Liganden mit hoher Affinität zum Zielgen ist nur ein Schritt beim Wirkstoffdesign. Die ausgewählten Liganden müssen überdies eine Reihe weiterer Voraussetzungen wie chemische Stabilität, Nichttoxizität gegenüber Nichtzielorganismen, gute Aufnahmefähigkeit durch das Pathogen und hohe Mobilität in der Wirtszelle erfüllen, um für weitere Entwicklungsschritte in Betracht zu kommen.

Bislang wurde kein Wirkstoff im agrochemikalischen Bereich mittels der beschriebenen Vorgehensweise entwickelt. Als Beispiele für die Anwendung der Röntgenkristallographie zur Aufdeckung der molekularen Wirkungsweise eines potentiellen Pflanzenschutzmittels sei die Aufklärung der Interaktion zwischen dem Melaninbiosyntheseinhibitor Carpropamid und dem an der Melaninsynthese des Reispathogens *Magnaporthe grisea* beteiligten Enzyms Scytalondehydrogenase (MOTOYAMA et al. 1999) sowie dem potentiellen Herbizid Hydantocidin und der Adenylosuccinatsynthetase aus *Ocimum basilicum* (FONNÉ-PFISTER et al. 1996) genannt. Im pharmazeutischen Bereich findet dagegen der 'target'-orientierte Ansatz zur Entwicklung neuer Wirkstoffe bereits breite Anwendung und wird auch zukünftig von sehr großer Wichtigkeit sein (OHLSTEIN et al. 2000; OAKLEY und WILCE 2000; BETZ et al. 2002). Beispiele für die Umsetzung dieses Ansatzes sind unter anderem der Influenzawirkstoff 'Relenza' (VON ITZSTEIN 1993), verschiedene Inhibitoren des bei Krebserkrankungen relevanten Enzyms Thymidilat Synthase (JACKMAN und CLAVERT 1995) sowie diverse Inhibitoren der HIV-1 reversen Transkriptase, Protease

und des transmembralen Glycoproteins gp41 (MARKOWITZ et al. 1995; DEBNATH et al. 1999).

Aufgrund der vorliegenden Erfahrungen und Erfolge im Bereich der Humanmedizin kann also auch von der Umsetzung solcher Ansätze bei der Neuentwicklung von Fungiziden ausgegangen werden. Umfassende Ansätze mit systematischen genomischen 'knock-out' Programmen in Kombination mit 'Ultra High Throughput Biochemical Screening' Verfahren (UHTBS) werden bereits intensiv verfolgt (STENZEL 2003). Die Einführung der ersten auf einem 'target'-orientierten Design basierenden Pflanzenschutzmittel ist somit nur noch eine Frage der Zeit.

## 5 Zusammenfassung

Der Entwicklung von Fungiziden mit neuen Ansatzstellen und Wirkmechanismen hat aufgrund stetiger Resistenzbildung gegen landwirtschaftlich genutzte Fungizide eine herausragende Bedeutung für die Sicherung einer auch zukünftig hochproduktiven und -qualitativen Pflanzenproduktion. Insbesondere durch Fungizidmaßnahmen während früher Infektionsstadien kann ein nachhaltiger Schutz der Nutzpflanze erreicht werden.

Unter Verwendung der cDNA-AFLP-Methode sowie durch Einsatz der SSH-Technik konnten insgesamt 50 bzw. 47 singuläre differentiell exprimierte cDNA-Sequenzen aus keimenden Sporen von *Phytophthora infestans* bzw. *Pyrenophora teres* identifiziert werden.

Zur exakten Quantifizierung der Expression wurden 14 dieser Transkripte zusätzlich über real-time RT-PCR analysiert. Die Normalisierung von differentiell exprimierten Genen erfolgte mit der 18S rRNA, die sich als geeigneter endogener Standard in quantitativen Expressionsstudien mittels real-time RT-PCR während der Sporenkeimung von phytopathogenen Pilzen erwiesen hat. Alle Transkripte zeigten während der 24-stündigen *in vitro* Keimung einen im Vergleich zur ungekeimten Spore signifikanten Anstieg ihrer relativen Expressionsraten, was die Wirksamkeit der angewandten differentiellen Techniken bestätigt. Die maximalen Expressionsraten variierten zwischen dem 1,5- und 29,0-fachen der Ausgangsexpression. In vegetativem Mycel wurden im Vergleich zu den Expressionsmaxima während der Sporenkeimung deutlich niedrigere Expressionsniveaus festgestellt.

Nach einem Datenbankabgleich der 97 differentiell exprimierten Gene konnte für 35 Sequenzen deren mutmaßliche Funktion aufgrund signifikanter Homologien zu Datenbankeinträgen vorhergesagt werden. Darunter befinden sich 18 Gene, die dem nachweislich keimungsrelevanten  $\text{Ca}^{2+}$ /Phosphoinositid-Signalsystem und cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg sowie der für die Keimung vermutlich essentiellen Transkription oder Proteinsynthese zugeordnet werden können. Des Weiteren wurden Gene identifiziert, denen Bedeutung im zellulären Metabolismus und Transport, bei der Sporenadhäsion und zellulären Kommunikation sowie bei der Zellteilung und Stressabwehr zu kommt.

Neue 'target'-orientierte Verfahren erlauben eine im Vergleich zu den etablierten auf Massenscreenings basierenden Methoden eine schnellere und zielgerichtete

Entwicklung von neuen fungiziden Wirkstoffen. Verschiedene im Rahmen dieser Arbeit identifizierte und charakterisierte Gene stellen aufgrund teilweise hoher Sequenzspezifität für pilzliche Organismen und möglicher Essentialität bei der Sporenkeimung vielversprechende Ansatzstellen für ein 'target'-orientiertes Fungizid-design dar.

## **Identification and characterisation of genes that are differentially expressed during spore germination of phytopathogenic fungi**

Due to occurrence of resistance to agriculturally used fungicides there is a permanent need for development of new fungicidal agents to guarantee a high productive and high qualitative crop production in the future. The aim of this work was to isolate genes which are up regulated during fungal spore germination for further use as targets in target-specific development of new antifungal agents. Two PCR-based differential screening techniques, cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) and suppression subtractive hybridisation (SSH), were successfully applied to clone 50 and 47 cDNA copies with up regulated expression during spore germination in the plant pathogens *Phytophthora infestans* and *Pyrenophora teres* respectively. 14 cDNA clones were further analysed by real time RT-PCR. The normalisation of differentially expressed transcripts was done with 18S rRNA sequence, which has proven to be a suitable standard for normalisation in quantitative gene expression studies on germinating fungal spores. All transcripts showed a significant increase of expression during spore germination, confirming the reliability of the cDNA-AFLP and SSH results. Sequence analysis with 97 cDNA clones revealed 35 unique sequences with significant similarity to database entries. 18 sequences showed homology to genes which are essential in spore germination, including genes of the Ca<sup>2+</sup>/phosphoinositide signalling system and the cAMP/PKA signal transduction pathway, as well as genes involved in transcription and protein biosynthesis. The remaining genes have predicted functions in cellular metabolism, cellular transport, cellular communication, cell division, spore adhesion, and stress defence. New target-specific methods allow a more rapid and specific development of new antifungal agents compared to conventional on high throughput screenings based methods. Due to high sequence specificity to fungal organisms and potential essentiality in fungal spore germination several of the identified and characterised genes represent promising candidates in a target-specific fungicide design.

## 6 Literaturverzeichnis

- ALLEN PJ (1976) Spore germination and its regulation. In: HEITEFUSS R, WILLIAMS PH (eds.) Encyclopedia of plant physiology. Springer-Verlag, New York: 51-85
- 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
- ANDRIANOPOULOS A, BRONES J, DAVIS MA, HYNES MJ (1997) The *amdA* regulatory gene of *Aspergillus nidulans*: Characterisation of gain-of-function mutations and identification of binding sites for the gene product. Fung Gen Biol 21: 50-63
- ARNOLD J, HILTON N (2003) Revelations from a bread mould. Nature 422: 821-822
- ASPINALL GO (1980) Chemistry of cell wall polysaccharides. In: The biochemistry of plants. Preiss J, Stumpf PK, Conn EK (eds.) New York; Academic Press 473 – 499
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K (eds.) (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4<sup>th</sup> Edition
- BACHEM CWB, OOMEN RJFJ, VISSER RGF (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. Plant Mol Biol Rep 16: 157-173
- BACHEM CWB, VAN DER HOEVEN RS, de BRUIJN SM, VREUGDENHIL D, ZABEAU M, VISSER RGF (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. The Plant Journal 9: 745-753
- BALDWIN BC, RATHMELL WG (1988) Evolution of concepts for chemical control of plant disease. Ann Rev Plantpathol 26: 265-283
- BALDWIN D, CRANE V, RICE D (1999) A comparison of gel-based, nylonfilter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. Curr Opin Plant Biol 2: 96-103
- BARJA F, CHAPPUIS ML, TURIAN G (1993) Differential effects of anticytoskeletal compounds on the localization and chemical patterns of actin in germinating conidia of *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol Lett 107: 261-266
- BARTLETT DW, CLOUGH JM, GODWIN JR, HALL AA, HAMER M, PARR-DOBRZANSKI B (2002) The strobilurin fungicides. Pest Manag Sci 58: 649-662
- BAUER D, WARTHOF P, ROHDE M, STRUSS M (1994) PCR methods and applications manual supplement. Cold Spring Harbour University Press, NY: 805-809
- BELDE PJM, VOSSEN JH, BORST-PAUWELS GWFH, THEUVENET APR (1993) Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 323: 113-118
- BERRIDGE MJ, LIPP P, BOOTMAN MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 1: 11-21
- BERTIOLI DJ, SCHLICHTER UH, ADAMS MJ, BURROWS PR, STEINBISS HH, ANTONIW JF (1995) An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNA. Nucleic Acids Res 23: 4520-4523
- BETZ ST, BAXTER SM, FETROW JS (2002) Function first: a powerful approach to post-genomic drug discovery. Drug Discovery Today 7: 865-871
- BEYER K, JIMÉNEZ JIMÉNEZ S, RANDALL TA, LAM S, BINDER A, BOLLER T, COLLINGE MA (2002) Characterization of *Phytophthora infestans* genes regulated during the interaction with potato. Mol Plant Pathol 3: 473-485

- BIRCH PR, AVROVA AO, DUNCAN JM, LYON GD, RACHEL LT (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 356-361
- SEKIGUCHI T, HIROSE E, NAKASHIMA N, NISHIMOTO T (2001) Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J Biol Chem* 276: 7246-7257
- FABRITIUS AL, CVITANICH C, JUDELSON HS (2002) Stage-specific gene expression during sexual development in *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiol* 45: 1057-1066
- KIRSCH T (2001) Differentielle Genexpression in den Blut-Hirnschrankkapillaren von Stroke-Prone Spontan Hypertensiven Ratten. Dissertation FU Berlin
- COOPER P, MUECK B, YOUSEFI S, POTTER S, JARAI G (2000) cDNA-RDA of genes expressed in fetal and adult lungs identifies factors important in development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L284-L293
- SPIESS AN, IVELL R (1998) Normalization of RNA hybridization signals by means of SYBR<sup>®</sup> Green II-stained 28S or 18S ribosomal RNA and a phosphorimager. *Biotechniques* 26: 46-50
- MATHEWS SA, VOLP KM, TIMMS P (1999) Development of a quantitative gene expression assay for *Chlamydia trachomatis* identified temporal expression of  $\sigma$  factors. *FEBS Lett* 458: 354-358
- GURSKAYA NG, DIATCHENKO L, CHENCHIK A, SIEBERT PD, KHASPEKOV GL, LUKYANOV KA, VAGNER LL, ERMOLAEVA OD, LUKYANOV SA, SVERDLOV ED (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240: 90-97
- DEBOUCK D (1995) Differential display or differential dismay. *Curr Opin Biol* 6: 597-599
- REBRIKOV DV, BRITANOVA OV, GURSKAYA NG, LUKYNOV KA, TARABYKIN VS, LOKYANOV SA (2000) Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridisation. *Nucleic Acids Res* 28: e90
- VON STEIN O, THIES WG, HOFMANN M (1997) A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 25: 2598-2606
- AKAO T, GOMI K, GOTO K, OKAZAKI N, AKITA O (2002) Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. *Curr Genet* 41: 275-281
- BIRNBOIM HGC, DOLY J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7: 1513-1523
- BOHM HJ (1992) The computer program LUDI. A new method for the *de novo* design of enzyme inhibitors. *J Compute Aid Mol Design* 6: 61-71
- BOLE-FEYSOT C, PERRET E, ROUSTAN P, BOUCHARD B, KELLY PA (2000) Analysis of prolactin-modulated gene expression profiles during the Nb2 cell cycle using differential screening techniques. *Genome Biol* 1: research0007.1-0007.15
- BONNEFOY N, KERMORGANT M, GROUDINSKY O, DUJARDIN G (2000) The respiratory gene *OXA1* has two fission yeast orthologues which together encode a function essential for cellular viability. *Mol Microbiol* 35: 1135-1145
- Bosch I, Melichar H, Pardee AB (2000) Identification of differentially expressed genes from limited amounts of RNA. *Nucleic Acids Res* 28: e27
- BOTTIN A, LARCHE L, VILLALBA F, GAULIN E, ESQUERRÉ-TUGAYÉ MT, Rickauer M (1999) Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *FEMS Microbiol Lett* 176: 51-56

- BOWMAN EJ, BOWMAN BJ (2000) Cellular role of the V-ATPase in *Neurospora crassa*: Analysis of mutants resistant to concanamycin or lacking the catalytic subunit A. *J Exp Biol* 203: 97-106
- BOWMAN EJ, O'NEILL FJ, BOWMAN BJ (1997) Mutations of *pma-1*, the gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Neurospora crassa*, suppress inhibition of growth by concanamycin A, a specific inhibitor of vacuolar ATPases. *J Biol Chem* 272: 14776-14786
- BRAMBL R (1980) Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: Biosynthesis and assembly of cytochrome c oxidase in *Botryodiplodia theobromae*. *J Biol Chem* 255: 7673-7680
- BRAUN EJ, HOWAR RJ (1994) Adhesion of fungal spores and gemlings to host plant surfaces. *Protoplasma* 181: 202-212
- BREYNE P, ZABEAU M (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr Opin Plant Biol* 4: 136-142
- BRITTEN RL, DAVIDSON EH (1985) In: HAMES BD, HIGGINS SJ (eds.) *Nucleic acid hybridization: A practical approach*. IRL, Oxford: 3-15
- BRUNO KS, ARAMAYO R, MINKE PF, METZENBERG RL, PLAMANN M (1996) Loss of growth polarity and mislocalization of septa in a *Neurospora* mutant altered in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* 15: 5772-5782
- BUCHNER K (1995) Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur J Biochem* 228: 211-221
- BURKS EA, BEZERRA PP, LE H, GALLIE DR, BROWNING KS (2001) Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit. *J Biol Chem* 276: 2122-2131
- BUSTIN SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193
- BUSTIN SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39
- CANSADO J, SOTO T, FERNANDEZ J, VINCENT-SOLER J, GACTO M (1998) Charakterization of mutants devoid of trehalase activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a partial protection from heat-shock and high-salt stress. *J Bacteriol* 180: 1342-1345
- CARLILE MJ, WATKINSON SC (1994) *The fungi*. Academic Press, London
- CARPENTER CL, CANTLEY LC (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr Biol* 8: 153-158
- CAVALIER-SMITH T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 73: 203-266
- CHOI W, DEAN RA (1997) The adenylat cyclase MAC1 gene of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell* 9: 1973-1983
- CLEMENS MJ (1990) Does protein phosphorylation play a role in translational control by eukaryotic aminoacyl-tRNA synthases? *Trends Biochem Sci* 15: 172-175
- COCHRANE VW, COCHRANE JC (1970) Chlamydospore development in the absence of protein synthesis in *Fusarium solani*. *Dev Biol* 23: 345-354
- COFFEY MD, WILSON UE (1983) Histology and cytology of infection and disease caused by *Phytophthora*. In: ERWIN DC, BARTNICKI-GARCIA S, TSAO PH (eds.) *Phytophthora - its biology, taxonomy, ecology and pathology*. American Phytopathological Society, St. Paul: 289-302

- D'ENFERT C (1997) Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Gen Biol* 21: 163-172
- D'ENFERT C, BONINI BM, ZAPPELLA PDA, FONTAINE T, DA SILVA AM, TERENCE HF (1999) Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 32: 471-484
- D'ENFERT C, FONTAINE T (1997) Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol Microbiol* 24: 203-216
- DALBEY RE, KUHN A (2000) Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 51-87
- DAVIDSE LC, ISHII H (1995) Benzimidazoles, *N*-phenylcarbamates and *N*-phenylformamidoxines and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: LYR H (ed.) *Modern selective fungicides*. Gustav Fisher, Jena, Germany: 305-322.
- DE BARY HA (1876) Researches into the nature of the potato-fungus, *Phytophthora infestans*. *J R Agric Soc Eng 2<sup>nd</sup> series* 12: 239-269
- DE NOBEL H, LAWRIE L, BRUL S, KLIS F, DAVIS M, ALLOUSH H, COOTE P (2001) Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18: 1413-1428
- DE PINHO CA, DE LOURDES M, POLIZELI TM, JORGE JA, TERENCE HF (2001) Mobilisation of trehalose in mutants of the cyclic AMP signalling pathway, *cr-1* (CRISP-1) and *mcb* (microcycle conidiation), of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Lett* 199: 85-89
- DE BACKER MD, NELISSEN B, LOGGHE M, VIAENE J, LOONEN I, VANDONINCK S, DE HOOGT R, DEWAELE S, SIMONS FA, VERHASSELT P, VANHOOF G, CONTRERAS R, LUYTEN WHML (2001) An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. *Nature Biotech* 19: 235-241
- DEACON JW, DONALDSON SP (1993) Molecular recognition in the homing response of zoospore fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*. *Mycol Res* 97: 1153-1157
- DEAN RA (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 35: 211-234
- DEBNATH AK, RADIGAN L, JIANG S (1999) Structure-based identification of small molecule antiviral compounds targeted to the gp41 core structure of the human immunodeficiency virus type 1. *J Med Chem* 42: 3203-3209
- DEIMEL H, HOFFMANN GM (1991) Grundlagen der Schädigung der Netzfleckenkrankheit an Gerste. *Z Pflkrankh Pflschutz* 98: 137-161
- DIATCHENKO L, LAU YFC, CAMPBELL AP, CHENCHIK A, MOQADAM F, HUANG B, LUKYANOV S, LUKYANOV K, GURSKAYA N, SVERDLOV ED, SIEBERT PD (1996) Suppression subtractive hybridisation: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025-6030
- DIATCHENKO L, LUKYANOV S, LAU YF, SIEBERT PD (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303: 349-380
- DILGER M, FELSENSTEIN FG, SCHWARZ G (2003) Identification and quantitative expression analysis of genes that are differentially expressed during conidial germination in *Pyrenophora teres*. *Mol Gen Genomics* 270: 147-155
- DONALDSON SP, DEACON JW (1992) Role of calcium in adhesion and germination of zoospore cysts of *Pythium*: a model to explain infection of host plants. *J Gen Microbiol* 138: 2051-2059

- DOSS RP (1999) Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl Envir Microbiol* 65: 404-408
- DRENTH A, TURKENSTEEN LT, GOVERS F (1993) The occurrence of A2 mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands; significance and consequence. *Neth J Plant Pathol* 99: 57-67
- DURRANT WE, ROWLAND O, PIEDRAS P, HAMMOND-KOSACK KE, JONES JDG (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977
- ELLIS JG, DAVILA M, CHAKRABARTI R (2003) Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 278: 1936-1945
- FEINBERG, AP, VOGELSTEIN B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- FILLINGER S, CHAVEROCHE MK, SHIMIZU K, KELLER N, D'ENFERT C (2002) cAMP and ras signalling control spore germination in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 44: 1001-1016
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811
- FLEISCHMANN F (2000) Untersuchungen zur Resistenz von Kartoffeln gegen *Phytophthora infestans* mit Hilfe biochemischer Parameter. Diss TU München
- FONNÉ-PFISTER R, CHEMILA P, WARD E, GIRARDET M, KREUZ KE, HONZATKO RB, FROMM HJ, SCHÄR HP, GRÜTTER MG, CWAN-JACOB SW (1996) The mode of action and the structure of a herbicide in complex with its target: Binding of activated hydantocidin to the feedback regulation site of adenylosuccinate synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9431-9436
- FREEMAN WM, WALKER SJ, VRANA KE (1999) Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques* 26: 112-125
- FUKUDA T, KIDO A, KAJINO K, TSUTSUMI M, MIYAUCHI Y, TSUJIUCHI T, KONISHI Y, HINO O (1999) Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 35-40
- GALAGAN JE, CALVO SE, BORKOVICH KA, SELKER EU, READ ND, JAFFE D, FITZHUGH W, MA LJ, SMIRNOV S, PURCELL S, REHMAN B, ELKINS T, ENGELS R, WANG S, NIELSEN CB, BUTLER J, ENDRIZZI M, QUI D, IANAKIEV P, BELL-PEDERSEN D, NELSON MA, WERNER-WASHBURNE M, SELITRENNIKOFF CP, KINSEY JA, BRAUN EL, ZELTER A, SCHULTE U, KOTHE GO, JEDD G, MEWES W, STABEN C, MARCOTTE E, GREENBERG D, ROY A, FOLEY K, NAYLOR J, STANGETHOMANN N, BARRETT R, GNERRE S, KAMAL M, KAMVYSSSELIS M, MAUCELI E, BIELKE C, RUDD S, FRISHMAN D, KRYSOFOVA S, RASMUSSEN C, METZENBERG RL, PERKINS DD, KROKEN S, COGONI C, MACINO G, CATCHESIDE D, LI W, PRATT RJ, OSMANI SA, DESOUZA CPC, GLASS L, ORBACH MJ, BERGLUND JA, VOELKER R, YARDEN O, PLAMANN M, SEILER S, DUNLAP J, RADFORD A, ARAMAYO R, NATVIG DO, ALEX LA, MANNHAUPT G, EBBOLE DJ, FREITAG M, PAULSEN I, SACHS MS, LANDER ES, NUSBAUM C, BIRREN B (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422: 859-868
- GARRAWAY MO, EVANS RC (1984) Fungal nutrition and physiology. Wiley-Science Publications, New York
- GARRIDO-FRANCO M, EHLERT S, MESSERSCHMIDT A, MARINKOVIĆ S, HUBER R, LABER B, BOURENKOV GP, CLAUSEN T (2002) Structure and function of threonine synthase from yeast. *J Biol Chem* 277: 12396-12405

- GAULIN E, JAUNEAU A, VILLABA F, RICKAUER M, ESQUERRÉ-TUGAYÉ MT, BOTTIN A (2002) The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J Cell Sci* 115: 4565-4575
- GELLATLY KS, ASH GJ, TAYLOR JL (2001) Development of a method for mRNA differential display in filamentous fungi: Comparison of mRNA differential display reverse transcription polymerase chain reaction and cDNA amplified fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Can J Microbiol* 47: 955-960
- GIBSON UE, HEID CA, WILLIAMS PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6: 1095-1101
- GISI U, COHEN Y (1996) Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Ann Rev Phytopathol* 34: 549-572
- GOIDIN D, MAMMESSIER A, STAQUET MJ, SCHMITT D, BERTHIER-VERGNESS O (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 295: 17-21
- GOLDMANN RC, BRANSTORM A (1999) Targeting cell wall synthesis and assembly in microbes: similarities and contrasts between bacteria and fungi. *Curr Pharm Des* 5: 473-501
- GONZALEZ R, GAVRIAS V, GOMEZ D, SCAZZOCCHIO C, CUBERO B (1997) The integration of nitrogen and carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* requires the GATA factor AreA and an additional positive-acting element, ADA. *EMBO J* 16: 2937-2944
- GOODFORD PJ (1985) A computational procedure for determining energetically favourable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* 28: 849-857
- GOODWIN SB (1997) The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87: 462-473
- GRESS TM, WALLRAPP C, FROHME M, MÜLLER-PILLASCH F, LACHER U, FRIESS H, BÜCHLER M, ADLER G, HOHEISEL JD (1997) Identification of genes with pancreatic cancerspecific expression by use of cDNA representational difference analysis. *Genes Chromosom Cancer* 19: 97-103.
- GRIFFIN DH (1994) Fungal physiology, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-Liss, New York
- GRIFFITH JM, ISER JR, GRANT BR (1988) Calcium of differentiation in *Phytophthora palmivora*. *Arch Microbiol* 149: 565-571
- GUARANTE L (1995) Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem Sci* 20: 517-521
- GUSTIN MC, ALBERTYN J, ALEXANDER M, DAVENPORT K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1264-1300
- HAAG E, RAMAN V (1994) Effects of primer choice and source of *Taq* DNA polymerase on the banding patterns of differential display RT-PCR. *Biotechniques* 2: 226-228
- HABU Y, FUKADA-TANAKA S, HISATOMI Y, IIDA S (1997) Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-pb sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 516-521
- HALL AA, BINDSLEV L, ROUSTER J, RASMUSSEN SW, OLIVER RP, GURR SJ (1999). Involvement of cAMP and protein kinase A in conidial differentiation by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 960-968
- HAMER JE, HOLDEN DW (1997) Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: A commentary. *Fung Gen Biol* 21: 11-16
- HANNON GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251

- HARRIS AJ, SHADDOCK JG, MANJANATHA MG, LIENBEY JA, CASCIANO DA (1998) Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B-1-treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344 rats. *Carcinogenesis* 19: 1451-1458
- HARRIS SD, MORRELL JL, HAMER JE (1994) Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutant defective in cytokinesis. *Genetics* 136: 517-532
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994
- HELENIUS A (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 5: 253-265
- HERSKOWITZ I (1995) MAP kinase pathways in yeast: from mating and more. *Cell* 80: 187-197
- HOCH HC, STAPLES RC (1984) Evidence that cAMP initiates nuclear division and infection structure formation in the bean rust fungus *Uromyces phaseoli*. *Exp Biol* 8: 37-46
- HOCK B (1995) Grundlagen toxischer Mechanismen: Hemmung wichtiger Funktionen durch Antibiotika und andere Zellgifte. In: HOCK B, ELSTNER EF (eds.) *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 218-283
- HOFFMANN GM (1962) Pilz- und Bakterienkrankheiten. In: SCHICK R, KLINKOWSKI M: *Die Kartoffel - Ein Handbuch Band II*, Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin: 1139-1297
- HOFFMANN GM, SCHMUTTERER H (1999) *Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen*. Stuttgart
- HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7276-7280
- HOLLOMON DW (1970) RNA synthesis during fungal spore germination. *J Gen Microbiol* 62: 75-87
- HOOVER WJ ed. (1981) *Compendium of potato diseases*. The American Phytopathological Society, St Paul, MN
- HUBANK M, SCHATZ DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* 22: 5640-5648
- HUBANK M, SCHATZ DG (1999) cDNA representational difference analysis: A sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303: 325-349
- JACKMAN AL, CLAVERT AH (1995) Folate-based thymidylate synthase inhibitors as anticancer drugs. *Ann Oncol* 6: 871-881
- JACKSON SL, HEATH IB (1993) Roles of calcium ions in hyphal tip growth. *Microbiol Rev* 57: 367-382
- JIN H, CHENG X, DIATCHENKO L, SIEBERT PD, HUANG CC (1997) Differential screening of a subtracted cDNA library: a method to search for genes preferentially expressed in multiple tissues. *Biotechniques* 23: 1084-1086
- JONES CS, DAVIES HV, TAYLOR MA (2000) Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. *Planta* 211: 708-714
- JONES JT, HARROWER BE (1998) A comparison of the efficiency of differential display and cDNA-AFLPs as tools for the isolation of differentially expressed parasite genes. *Fund Appl Nematol* 21: 81-88

- JORDAN VWL (1981) Aetiology of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres* and some effects on yield. *Plant Pathol* 30: 77-78
- JOSEPH JD, MEANS AR (2000) Identification and characterization of Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinases required for normal nuclear division in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 275: 38230-38238
- JUDELSON HS (1997) The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fung Gen Biol* 22: 65-76
- JUDELSON HS, ROBERTS S (2002) Novel protein kinase induced during sporangial cleavage in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Eukaryotic Cell* 1: 687-695
- KAMOUN S, HUITEMA E, VLEESHOUWERS VGAA (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci* 4: 196-200
- KARLSON P, DOENECKE D, KOOLMAN J (1994) *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- KEON JPR, HARGREAVES JA (1983) A cytological study of net blotch disease of barley caused by *Pyrenophora teres*. *Physiol Plant Pathol* 22: 321-329
- KIM YK, LI D, KOLATTUKUDY PE (1998) Induction of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *J Bacteriol* 180: 5144-5150
- KNIGHT SC, ANTHONY VM, BRADY AM, GREENLANS AJ, HEANEY SP, MURRAY DC, POWELL KA, SCHULZ MA, SPINKS CA, WORTHINGTON PA, YOULE D (1997) Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Ann Rev Plantpathol* 35: 349-372
- KOLATTUKUDY PE, ROGERS LM, LI D, HWANG CS, FLAISHMAN MA (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4080-4087
- KOPP M, MÜLLER H, HOLZER H (1993) Molecular analysis of the neutral trehalase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 4766-4774
- KUHN E (2001) From library screening to microarray technology: Strategies to determine gene profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals Bot* 87: 139-155
- KUMAR S, RZHETSKY A (1996) Evolutionary relationships of eucaryotic kingdoms. *J Mol Evol* 42: 183-193
- KUSPA A, LOOMIS WF (1992) Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8803-8807
- KUTYAVIN IV, AFONINA IA, MILLS A, GORN VV, LUKHTANOV EA, BELOUSOV ES, SINGER MJ, WALBURGER DK, LOKHOV SG, GALL AA, DEMPCY R, REED MW, MEYER RB, HEDGPETH J (2000) 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucl Acids Res* 28: 655-661
- LANE S, ZHOU S, PAN T, DAI Q, LIU H (2001) The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via Tec1. *Mol Cell Biol* 21: 6418-6428
- LENGELER KB, DAVIDSON RC, D'SOUZA C, HARASHIMA T, SHEN WC, WANG P, PAN X, WAUGH M, HEITMAN J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 746-785
- LI HY, GUO ZF, ZHU YX (1998) Molecular cloning and analysis of a pea cDNA that is expressed in darkness and very rapidly induced by gibberellic acid. *Mol Gen Genomics* 259: 393-397
- LIANG P (2002) A decade of differential display. *Biotechniques* 33: 338-346

- LIANG P, AVERBOUKH L, PARDEE AB (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 21: 3269-3275
- LIANG P, PARDEE AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger-RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971
- LISITSYN NA, LISITSYN NM, WIGLER M (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951
- LIU H (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 4: 728-735
- LIU W, SAINT DA (2002) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaktino assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 302: 52-59
- LIVAK KJ (1997) ABI Prism 7700 Sequence detection System, User Bulletin No. 2 (P/N 4303859) PE Applied Biosystems
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 402-208
- LOCKEY C, OTTO E, LONG Z (1998) Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques* 24: 744-746
- LOO M (1976) Some required events in conidial germination of *Neurospora crassa*. *Dev Biol* 54: 201-213
- MACDIARMID CW, GARDNER RC (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminium ion. *J Biol Chem* 273: 1727-1732
- MAEDA I, KOHARA Y, YAMAMOTO M, SUGIMOTO A (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 11: 171-176
- MAJOR JS (1995) Current screening practices in the pharmaceutical industry. *Proc Brighton Crop Prot Conf – Weeds* 1: 89-96
- MARCILLA A, PALLOTTI C, GOMEZ-LOBO M, CABALLERO P, VALENTIN E, SENTANDREU R (1998) Cloning and characterization of the phenylalanin  $\beta$  subunit gene from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 161: 179-185
- MARKOWITZ M, SAAG M, POWDERLY WG, HURLEY AM, HSU A, VALDES JM, HENRY D, SATTLER F, LA MARCA A, LEONARD JM, HO DD (1995) A preliminary study of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med* 333: 1534-1539
- MATHRE DE, ed. (1997) *Compendium of Barley Diseases*. Second Edition. St. Paul, MN, U.S.A.: APS Press
- MAULER A, FEHRMANN H (1983) Wie Netzflecken an der Gerste bekämpfen? Beizung oder Spritzung gegen den Erreger der Netzfleckenkrankheit (*Drechslera teres*) an Gerste. *DLG-Mitteilungen* 10: 587-590
- MCCLELLAND M, MATHIEU-DAUDE F, WELSH J (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrary primed PCR. *Trends Genet* 11: 242-246
- MENG EC, GSCHWEND DA, BLANEY JM, KUNTZ ID (1993) Orientational sampling and rigid-body minimization in molecular docking. *Proteins* 7: 266-278
- MIMS CW, LILJEBJELKE KA, RICHARDSON EA (1995) Surface morphology, wall structure, and initial adhesion of powdery mildew fungus *Uncinulielle australiana*. *Phytopathology* 85: 352-358
- MIRKES PE (1967) Polysomes, ribonucleic acid, and protein synthesis during germination of *Neurospora crassa* conidia. *J Bakteriol* 117: 196-202

- MONEY T, READER S, QU LJ, DUNFORD RP, MOORE G (1997) AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 24: 2616-2617
- MORRISON TB, WEIS JJ, WITWER CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-962
- MOTOAKI W, SAIGOH M, SHIOKAWA K, MIURA KI (1995) mRNA encoding the translation initiation factor eIF-4E is expressed early in *Xenopus* embryogenesis. *FEBS Lett* 360: 191-193
- MOTOYAMA T, NAKASAKO M, YAMAGUCHI I (1999) Modern fungicides and antifungal compounds II. Andover UK. 111-119
- MULLIS KB, FALOONA FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
- MYERS KK, FONZI WA, SYPHERD PS (1992) Isolation and sequence analysis of the gene for translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 20: 1705-1720
- NELSON MA, KANG S, BRAUN EL, CRAWFORD ME, DOLAN PL, LEONARD PM, MICHELL J, ARMIJO AM, BEAN L, BLUEYES E, CUSHING T, ERRETT A, FLEHARTY M, GORMAN M, JUDSON K, MILLER R, ORTEGA J, PAVLOVA I, PEREA J, TODISCO S, TRUJILLO R, VALENTINE J, WELLS A, WERNER-WASHBURNE M, YAZZIE S, NATVIG DO (1997) Expressed sequences from conidial, mycelial, and asexual stages of *Neurospora crassa*. *Fung Gen Biol* 21: 348-363
- NELSON SF, DENNY CT (1999) Representational difference analysis for efficient cloning and screening of differentially expressed genes. In: SCHENA M (ed.) *DNA Microarrays – a practical approach*. Oxford University Press: 43-59
- NICHOLSON RL (1992) In: BAILEY JA, JEGER MJ (eds.) *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford: 186-202
- NIELSON KA, NICHOLSON RL, CARVER TLW (2000) First touch: An immediate response to surface recognition in conidia of *Blumeria graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 56: 63-70
- NOËL L, THIEME F, NENNSTIEL D, BONAS U (2001) cDNA-AFLP analysis unveils a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 41: 1271-1281
- O'NEIL MJ, SINCLAIR AH (1997) Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Res* 25: 2681-2682
- OAKLEY AJ, WILCE MCJ (2000) Makromolekulare crystallography as a tool for investigating drug, enzyme and receptor interactions. *Clin Exp Pharm Physiol* 27: 145-151
- OBST A, PAUL VH (1993) *Krankheiten und Schädlinge des Getreides*. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen
- OERKE EC, DEHNE HW, SCHONBECK F, WEBER A (1994) *Crop protection and crop production*. Elsevier. Amsterdam
- OHLSTEIN EH, RUFFOLO RR, ELLIOTT JD (2000) Drug discovery in the next milenium. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 40: 177-191
- ONAI K, KATAGIRI S, AKIYAMA M, NAKASHIMA H (1998) Mutation of the gene for the second-largest subunit of RNA polymerase I prolongs the period of length of the circadian conidiation rhythm in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genomics* 259: 264-271
- ORLANDO C, Pinzani P, Pazzagli M (1998) Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 36: 255-269
- ORTH AB (1999) New targets for fungicide discovery. Modern fungicides and antifungal compounds II. Andover UK. 19-29

- OSHEROV N, MAY GS (2000) Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* 155: 647-650
- OSHEROV N, MAY GS (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett* 199: 153-160
- OSHEROV N, MEATHEW J, ROMANS A, MAY GS (2002) Identification of conidial-enriched transcripts in *Aspergillus nidulans* using suppression subtractive hybridisation. *Fung Gen Biol* 37: 197-204
- PAQUIN B, LAFOREST MJ, FORGET L, ROEWER I, WANG Z, LONGCORE J, LANG BF (1997) The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr Genet* 31: 380-395
- PFAFFL MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45
- PFAFFL MW (2003) Livestock transcriptomics: quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology and physiology. Habilitation TU München
- QIN L, OVERMARS H, HELDER J, POPEIJUS H, VAN DER VOORT JR, GROENINK W, VAN KOERT P, SCHOTS A, BAKKER J, SMANT G (2000) An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 830-836
- QIN L, PRINS P, JONES JT, POPEIJUS H, SMANT G, BAKKER J, HELDER J (2001) GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP. *Nucleic Acids Res* 29: 1616-1622
- READ TD, GILL SR, TETTELIN H, DOUGHERTY BA (2001) Finding drug targets in microbial genomes. *Drug Discovery Today* 6: 887-892
- RENNER C, TRÜMPER L, PFITZENMEIER JP, LOFTIN U, GERLACH K, STEHLE L, WADLA A, PFREUNDSCHUH M (1998) Differential mRNA display at the single-cell level. *Biotechniques* 24: 720-724
- RÉVILLION F, PAWLOWSKI V, HORNEZ L, PEYRAT JP (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 36: 1038-1042
- RIRIE KM, RASMUSSEN RP, WITTEWIT CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245: 154-160
- ROCHA CRC, SCHRÖPPEL K, HARCUS D, MARCIL A, DIGNARD D, TAYLOR BN, THOMAS DY, WHITEWAY M, LEBERER E (2001) Signaling through adenylat cyclase is essential for hyphal growth and virulence for the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 12: 3631-3643
- RUAN Y, KOTRAIAH V, STRANEY DC (1995) Flavonoids stimulate germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Plant-Microbe Interact* 8: 929-938
- RUIZ-ROLDÁN MC, MAIER FJ, SCHÄFER W (2001) *PTK1*, a mitogen-activated-protein kinase gene is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 116-125
- SACHS MS, YANOFSKY C (1991) Developmental expression of genes involved in conidiation and amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Dev Biol* 148: 117-128
- SALEH A, COLLART M, MARTENS JA, GENEREAUX J, ALLARD S, COTE J, BRANDL CJ (1998) TOM1p, a yeast hect-domain protein which mediates transcriptional regulation through the ADA/SAGA coactivator complexes. *J Mol Biol* 282: 933-946
- SAMBROCK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY

- SANGER F, NICKLEN S, COULSEN AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- SANNI A, MIRANDE M, EBEL JP, BOULANGER Y, WALLER JP, FASIOLO F (1988) Structure and expression of the genes encoding the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of yeast phenylalanin-tRNA synthase. *J Biol Chem* 263: 15407-15415
- SCHIESTL RH, PETES TD (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7585-7589
- SCHMIDT JC, BORDY S (1976) Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol Rev* 40: 1-41
- SCHMITTGEN TD (2001) Real-time quantitative PCR. *Methods* 25: 383-385
- SCHMITTGEN TD, ZAKRAJSEK BA (2000) Effects of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Meth* 46: 69-81
- SCHWARZ G, BÄUMLER S, BLOCK A, FELSENSTEIN FG, WENZEL G (2004) Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Res* 32: e24
- SCHWARZ G (2000) Physikalische Eingrenzung des *Mla*-Locus in Gerste. Diss TU München
- SELA-BUURLAGE MB, EPSTEIN L, RODRIGUEZ RJ (1991) Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiol Mol Plant Pathol* 39: 345-352
- SHAW BD, HOCH HC (2000) Ca<sup>2+</sup> regulation of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospore germination and appressorium formation. *Fung Gen Biol* 31: 43-53
- SHAW MW (1986) Effects of temperatur and leaf wetness on *Pyrenophora teres* growing on cv. Sonja. *Plant Pathol* 35: 294-309
- SHENG S, SCHUSTER SM (1993) Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* damage-responsible protein 48 (*DDRP 48*). *J Biol Chem* 7: 4752-4758
- SHIM WB, WOLOSHUK CP (2001) Regulation of Fumonisin B<sub>1</sub> biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, *FCC1*. *Appl Envir Microbiol* 67: 1607-1612
- SIEBERT PD, CHENCHIK A, KELLOGG DE, LUKYANOV KA, LUKYANOV SA (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23: 1087-1088
- SILBERSTEIN S, COLLINS PG, KELLEHER DJ, RAPIEJKO PJ, GILMORE R (1995) The  $\alpha$  subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase complex is essential for vegetative growth of yeast and is homologous to mammalian ribophorin I. *J Cell Biol* 128: 525-536
- SKOGERSON L, WAKATAMA E (1979) A ribosome-dependent GTPase from yeast distinct from elongationfactor 2. *Biochemistry* 73: 73-76
- SMEDEGÅRD-PETERSEN V (1976) Pathogenesis and genetics of netspot blotch and leaf stripe of barley caused by *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. DSR Forlag Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark: 176 pp
- SOGIN ML, SILBERMAN JD (1998) Evolution of the protists and protistan parasites from perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol* 28: 11-20
- SOMPAYRAC L, JANE S, BURN TC, TENEN DG, DANNA KJ (1995) Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res* 23: 4738-4739
- SPRANG SR (1997) G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66: 639-678

- STANLEY MS, CALLOW ME, PERRY R, ALBERTE RS, SMITH R, CALLOW JA (2002) Inhibition of fungal spore adhesion by zosteric acid as the basis for a novel, nontoxic crop protection technology. *Phytopathology* 92: 378-383
- STEFFENSON B J, WEBSTER RK (1992) Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley. *Phytopathology* 82: 170-177
- STENZEL K (2003) From genes to compound discovery - unique research platform combining innovative screening technologies. Bayer CropSciences. [www.bayercropsciences.de](http://www.bayercropsciences.de)
- STEWART L, CLARK R, BEHNKE C (2002) High-throughput crystallization and structure determination in drug discovery. *Drug Discovery Today* 7: 187-196
- STILLER RL, BENNETT JE, SCHOLER HJ, WALL M, POLAK A, STEENS DA (1983) Correlation of *in vitro* susceptibility results with *in vivo* response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. *J Infect Dis* 147: 1070-1077
- STRYER L (1996) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: 377
- STURTEVANT J (2000) Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin Microbiol Rev* 13: 408-427
- SUN Y, HEGAMYER G, COLBURN NH (1994) Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Cancer Res* 5: 1139-1144
- TABB AL, UTSUGI T, WOOTEN-KEE CR, SASAKI T, EDLING SA, GUMP W, KIKUCHI Y, ELLIS SR (2001) Genes encoding ribosomal proteins Rps0A/B of *Saccharomyces cerevisiae* interact with *TOM1* mutants defective in ribosome synthesis. *Genetics* 157: 1107-1116
- TALBOT NJ (1995) Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends Microbiol* 3: 9-16
- THAU N, MONOD M, CRESTANI B, ROLLAND C, TRONCHIN G, LATGE JP, PARIS S (1994) Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 62: 4380-4388
- THELLIN O, ZORZI W, LAKAYE B, DE BORMAN B, COUMANS B, HENNEN G, GRISAR T, IGOUT A, HEINEN E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295
- THEVELEIN JM (1984) Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev* 48: 42-59
- THEVELEIN JM (1988) Regulation of the trehalose activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transition in fungi. *Exp Mycol* 12: 1-7
- THEVELEIN JM (1996) Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: BRAMBL R, MARZLUF GA (eds.) *The Mycota III. Biochemistry and molecular biology*. Springer Verlag, Berlin: 395-420
- TIJSTERMAN M, KETTING RF, PLASTREK RHA (2002) The genetics of RNA silencing. *Ann Rev Genet* 36: 489-519
- TROKE PF, MARRIOTT MS, RICHARDSON K, TARBIT MH (1988) *In vitro* potency and *in vivo* activity of azoles. *Ann NY Acad Sci* 544: 284-293
- TSURUSHIMA T, UENO T, FUKAMI H, IRIE H, INOUE M (1995) Germination self-inhibitors from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussiaea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 8: 652-657
- TUCKER SL, TALBOT NJ (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 39: 385-417
- UMAERUS V, UMAERUS M, ERJEFÄLT L, NILSSON BA (1983) Control of *Phytophthora* by host resistance: Problems and progress. In: ERWIN DC, BARTNICKI-GARCIA S, TSAO PH (eds.) *Phytophthora - its biology, taxonomy, ecology and pathology*. American Phytopathological Society, St. Paul: 315-326

- URSIC D, HIMMEL KL, GURLEY KA, WEBB F, CLUBERTSON MR (1997) The yeast *SEN1* gene is required for the processing of diverse RNA classes. *Nucleic Acids Res* 25: 4778-4785
- VAN DE PEER Y, DE WACHTER R (1997) Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *J Mol Evol* 45: 619-630
- VAN DER BIEZEN EA, JUWANA H, PARKER JE, JONES JDG (2000) cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 895-898
- VAN EDICK CG, WATERSON DM (1995) Calmodulin structure and function. In: MARME D (ed.) *Calcium and cell physiology*. Springer-Verlag, Berlin: 105-126
- VAN ETTEN JL, DAHLBERG KR, RUSSO GM (1983) Fungal spore germination. In: SMITH EJ (ed.) *Fungal differentiation. A contemporary synthesis*. Dekker, New York: 235-266
- VANDEN BOSSCHE H (1997) Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 14: 44-49
- VILLABA MATEOS FV, RICKAUER M, ESQUERRÉ-TUGAYÉ MT (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* that shows cellulose-binding and lectin-like activities. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 1045-1053
- VOGELSTEIN B, GILLESPIE D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 615-619
- VON ITZSTEIN M, WU WY, KOK GB (1993) Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza replication. *Nature* 363: 418-423
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DE LEE T, HORNES M, FRIFITERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M, ZABEAU M (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414
- WEBSTER J (1983) *Pilze - Eine Einführung*. 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- WEILAND JJ, STEFFENSON BJ, CARTWRIGHT RD, WEBSTER RK (1999) Identification of molecular genetic markers in *Pyrenophora teres* f. *teres* associated with low virulence on 'Harbin' barley. *Phytopathology* 89: 176-181
- WELSH J, CHADA K, DALAL SS, CHENG R, RALPH D MCCLELLAND (1995) Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 20: 4965-4970
- WHEELER IE, HOLLOMON DW, GUSTAFSON G, MITCHELL JC, LONGHURST C, ZHANG Z, GURR SJ (2003) Quinoxifen perturbs signal transduction in barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*). *Mol Plant Pathol* 4: 177-186
- WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY SV (1990) DANN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- WITTEWITZ CT, HERRMANN MG, MOSS AA, RASMUSSEN RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130-138
- WRIGHT AJ, CARVER TLW, THOMAS BJ, FENWICK NID, KUNOH H, NICHOLSON RL (2000) The rapid and accurate determination of germ tube emergence site by *Blumeria graminis* conidia. *Physiol Mol Plant Pathol* 57: 281-301
- Zabeau M, Vos P (1993) Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. Patent 92402629.7; Publikationsnummer 0 534 858 A1
- ZHANG JS, DUNCAN EL, CHANG ACM, REDDEL RR (1998) Differential display of mRNA. *Mol Biotechnol* 10: 155-165

ZHOU K, TAKEGAWA K, EMR SD, FIRTEL RA (1995) A Phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in *Dictyostelium discoideum*: Biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development. *Mol Cell Biol* 15: 5645-5656

ZHU YX, ZHANG YF, LUO JC, DAVIES PJ, HO DTH, ZHU YX, ZHANG YF, LUO JC (1998) *PPF-1*, a post-floral-specific gene expressed in short-day-grown G2 pea, may be important for its never-senescing phenotype. *Gene* 208: 1-6

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. G. Wenzel für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Durchsicht des Manuskripts danken.

Den Herren Prof. Dr. G. Müller-Starck und Prof. Dr. W. Oßwald danke ich für die Übernahme der Koreferate sowie Herrn Prof. Dr. K. H. Schneitz für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die immerwährende und oft genutzte Diskussionsbereitschaft, für zahlreiche Anregungen und die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich in besonderer Weise bei Herrn Dr. G. Schwarz bedanken.

Mein Dank gilt außerdem der EpiLogic- und EpiGene-Truppe, allen voran Dr. F. Felsenstein, dem ich für das in meine Arbeit gesetzte Vertrauen und die finanzielle Unterstützung des Projektes ganz besonders danke. Ich wünsche Dir weiterhin viel Erfolg mit und bei der Umsetzung Deiner Ideen.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe 'Molekulare Marker' am Lehrstuhl für Pflanzenbau und –züchtung danke ich für die herzliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Dies gilt insbesondere für meine MitstreiterInnen Annette Block, Barbara Ros, Magdalena Bäumlner und Tristan Funk sowie Herrn Dr. S. Bäumlner, der mich durch Studium und Promotion freundschaftlich begleitete.

Meiner Freundin Sylvia Strübing und unseren Kindern Joseph und Paula danke ich für ihre unerschöpfliche Liebe, ihre Geduld und Stütze.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meinen lieben Eltern für ihre großartige Unterstützung und für ihre Hilfe in allen Lebenslagen.

Diese Arbeit wurde durch die Bayerische Forschungsförderung im Rahmen des Förderprojektes: "Etablierung und Durchführung eines molekulargenetischen Verfahrens zur Identifizierung von Resistenzen bei pilzlichen Pflanzenpathogenen gegenüber der Fungizidwirkstoffklasse der Strobilurine" (Aktenzeichen 381 - 00) finanziert.

## Lebenslauf

Name	Michael Dilger
Geburtsdatum	16.02.1973 in Babenhausen
Familienstand	ledig
Kinder	Joseph Dilger (10.08.2000); Paula Dilger (07.05.2003)
Wohnort	Sambach 175, 96178 Pommersfelden
Schulbildung	1979-1983 Grundschule Babenhausen 1983-1992 Simpert-Kraemer-Gymnasium Krumbach Allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst	1992-1994 Artilleriekaserne Kempten, Lehrtruppenkaserne Landsberg/Lech
Betriebspraktikum	1994 Landwirtschaftlicher Familienbetrieb G. Rehm/Lauben
Berufsausbildung	1996-1998 Inntalwerkstätten Attl bei Wasserburg/Inn Landwirtschaftlicher Familienbetrieb H. Stölzle/Pless Staatlich anerkannter Landwirt
Studium	1994-2000 Studium der Agrarwissenschaften (Pflanzenproduktion) an der TU München/Weihenstephan Diplom-Agraringenieur (univ.)
Tätigkeit	2000-2003 Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der TU München/Weihenstephan seit 2003 Referendariat beim Bayerischen Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten