

*Patrick Schweizer, Alexander Ihlow und Udo Seiffert:*

***Hochdurchsatz-Phänomanalyse in Getreide : Auf der Jagd  
nach der Funktion pflanzlicher Gene bei Pathogenbefall***

---

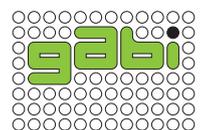
*Zuerst erschienen in:*

GenomXPress, 2006, 2, S. 16-19. – ISSN-p 1617-562X

URL: <http://www.genomxpress.de/seiten/archivdetail-ausgabe-2006-2.php>  
[Download: 14.03.2014]

---

# Hochdurchsatz-Phänomanalyse in Getreide



*Auf der Jagd nach der Funktion pflanzlicher Gene bei Pathogenbefall*

*Patrick Schweizer, Alexander Ihlow und Udo Seiffert*

## **Phänomanalyse als Werkzeug der funktionellen Genomforschung**

Die Sequenzierung prokaryotischer und eukaryotischer Genome legte den Grundstein für eine ganze Reihe von sogenannten „post-genomics“ Forschungsansätzen, die mehr oder

weniger direkt nach der Funktion der Gene oder Genomfragmente fragen. Hochdurchsatz-Phänomanalyse z. B. mittels RNAi (s. Glossar) ist die „Königskategorie“ der funktionellen Genomforschung und entsprechend aufwendig, setzt sie doch das quantitative und robu-

ste Erfassen von Merkmalen eines komplexen Organismus in Abhängigkeit von einzelnen Genomveränderungen voraus. Erste Beispiele für erfolgreiche „phenomics“ Screenings sind z.B. in der Hefe oder im Fadewurm *C.elegans* zu finden. Bemerkenswerterweise können Phänom-

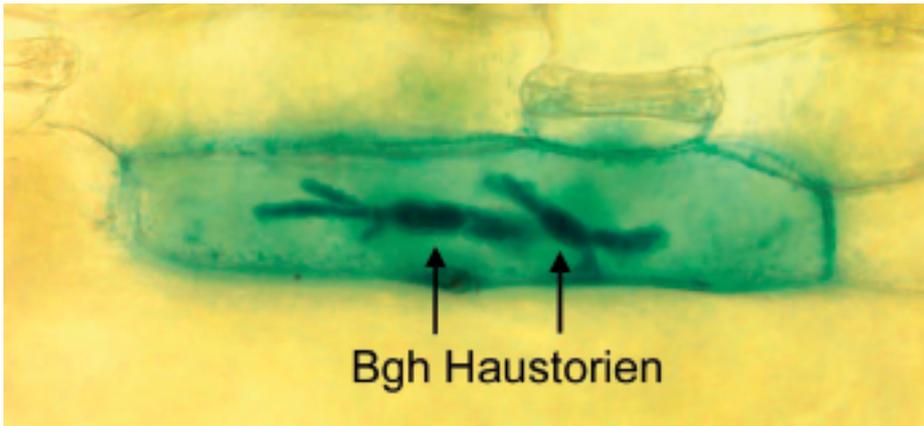


Abb. 1: Eine transformierte Epidermiszelle der Gerste (blau) trägt zwei Haustorien von Bgh, reagierte also anfällig auf die Pathogenattacke. Die Blaufärbung stammt von der transienten Expression des GUS-Gens. Die Pilzhyphen auf der Blattoberfläche sind nicht gefärbt und daher unsichtbar.

analyse und weitere „post-genomics“ Ansätze auch in Organismen angewandt werden, deren Genom noch nicht sequenziert wurde. Dazu braucht es aber hinreichende Sequenzinformation des exprimierten Genoms, die sich ausgehend von extrahierter Boten-RNA (mRNA) mit einem Bruchteil des Aufwandes einer kompletten Genomsequenzierung als ESTs (s. Glossar) gewinnen lässt. Günstig ist diesbezüglich die Situation in der Gerste, für die weltweit rund 460.000 ESTs vorliegen, wobei das Projekt GABI-Plant am IPK rund die Hälfte aller ESTs beige-steuert hat.

### Pflanzen-Pathogeninteraktionen

Eine der wichtigsten Fragen in der pflanzlichen Forschung betrifft Mechanismen der Resistenz oder Anfälligkeit gegen Pathogene und Schädlinge. Obwohl dieses Forschungsgebiet in den letzten Jahren stark von den weit entwickelten Werkzeugen und Ressourcen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* profitiert hat, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alle Daten 1:1 auf Kulturpflanzen übertragbar sein. Daher sind hoch entwickelte Werkzeuge und Ressourcen für die wichtigsten Kulturpflanzen, zu denen Getreidearten gehören, unbedingt notwendig. In Europa kommt dabei der Gerste und dem Weizen eine besondere Stellung zu.

Mehltau, verursacht durch den Pilz *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Bgh), ist eine Hauptkrankheit der Gerste und wird entsprechend intensiv mit Fungiziden behandelt, nebst dem Einsatz resistenter Sorten. Abgesehen von ihrer agronomischen Bedeutung stellt die Gersten-Mehltauinteraktion aber auch eines der bestuntersuchten Modellsysteme in der Phytopa-

thologie dar. Dies liegt einerseits daran, dass Bgh ein epiphytisches Pathogen ist und sich auf der Blattoberfläche ausbreitet, daher für mikroskopische und cytologische Studien extrem gut zugänglich ist. Andererseits existieren viele Resistenzgene und hoch entwickeltes Rückkreuzungsmaterial der Gerste für weiterführende genetische Analysen.

### Phänomanalyse in der Gerste

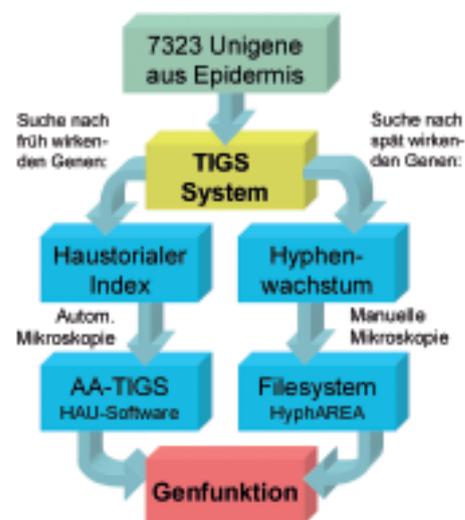
In den letzten Jahren wurde für die Gersten-Mehltauinteraktion eine Reihe von molekularen Ressourcen und Werkzeugen entwickelt, die funktionelle Genomforschung ermöglichen. Dazu gehören eine Kollektion von 36.887 ESTs aus mehltaubefallenen Blättern oder isolierter Epidermis, mehrere Oligonukleotid- oder cDNA-basierte Arrays für Expressionsanalysen, als auch RNAi-basierte Testsysteme. In unserem Labor wurde im Rahmen des

Abb. 2: Die teilweise automatisierte TIGS Pipeline für Hochdurchsatz-Phänomanalyse in der Gerstenepidermis. Mit dieser Pipeline lassen sich Gene, die für Pflanzen-Pathogeninteraktionen relevant sind, identifizieren. AA-TIGS = Bilddatenbank, gekoppelt mit dem automatischen Mikroskopiesystem. HAU-Software = Werkzeug zur vollautomatischen Erkennung transformierter Zellen und der Haustorien in diesen Zellen. HyphArea = Software zur vollautomatischen Quantifizierung von Hyphenwachstum.

GABI-Nonhost-Projekts eine Methode „Transient-Induced Gene Silencing“ (TIGS) entwickelt, die auf transienter Expression von RNAi-Konstrukten basiert und hochdurchsatztauglich ist. Dabei nutzt TIGS das günstige Zusammenfallen von zwei Eigenschaften: Erstens transformiert die Methode mittels Mikroprojektilen aus Gold vorwiegend Epidermiszellen. Zweitens interagiert Bgh resp. alle Mehltaupilze während den ersten rund 40 Stunden ausschließlich mit einer einzigen Epidermiszelle und versucht darin ein erstes Haustorium zu bilden (Abbildung 1, Glossar). Diese zellautonome Eigenschaft der frühen Mehltauinteraktion erlaubt es nun, präzise Fragen zu stellen bezüglich der Wirkung eines bestimmten RNAi-Konstruktes auf die Interaktion. Der dabei gemessene Haustorale Index berechnet sich aus der Anzahl Haustorien in transformierten Zellen, dividiert durch die Anzahl transformierter Zellen, die das co-bombardierte GUS-Reporter gen exprimieren und blau gefärbt sind. Der Haustorale Index ist proportional zur Anfälligkeit der Epidermiszellen.

### Erfolgreiche Suche nach Genkandidaten

Im Projekt GABI-Nonhost wurde ein TIGS Screening durchgeführt für die Durchbrechung der Nichtwirtsresistenz der Gerste gegen Weizenmehltau. Von 774 getesteten RNAi-Konstrukten bewirkten 44 einen erhöhten Haustorale Index im ersten Durchgang. Von diesen 44 RNAi-Konstrukten bestätigten sich 11 als statistisch signifikant wirksam in mindestens 5 wiederholten Experimenten. Eines dieser Konstrukte ist gegen ein Gen der Gerste, *HvSNAP34*, gerichtet, das für ein tSNARE Protein kodiert und bereits als Kandidat der *mlo*-vermittelten Resistenz gegen Bgh bekannt war



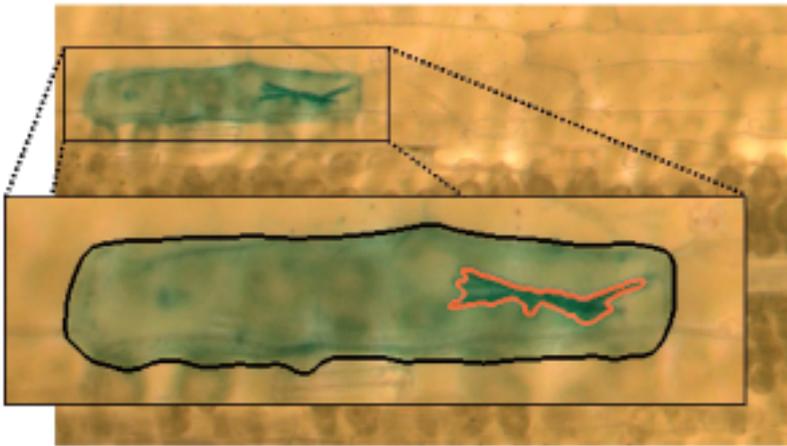


Abb. 3: Beispiel einer automatischen Auswertung des Bildmaterials. Zunächst werden die GUS-positiven Zellen extrahiert (Bestimmung der Zellberandung) und anschließend auf das Vorhandensein von Haustorien untersucht (rote Markierung kennzeichnet ein identifiziertes Haustorium).

(Collins *et al.* 2003). Unser Vertrauen in die neue TIGS Methode wurde durch die Tatsache gestärkt, dass das RNAi Konstrukt gegen *HvS-NAP34* in zwei weiteren laufenden Screenings für Durchbrechung der *mlo*-vermittelten Resistenz und für Veränderung der quantitativen Basalresistenz ebenfalls identifiziert wurde (Douchkov *et al.* 2005). Wir wissen nun also, dass dieses tSNARE Protein eine zentrale Rolle in verschiedenen Formen der rassenspezifischen, dauerhaften Resistenz einnimmt. Die bereits mit TIGS identifizierten Gene *Rnr1-11* (Required for Nonhost Resistance) stellen „leads“ für vertiefende, weitere Analysen dar, wie sie im Projekt PRO-GABI bereits angelaufen sind. Hier sollen transgene Gerstenlinien, die Überexpressions- oder RNAi-Konstrukte gegen *Rnr*-Gene unter der Kontrolle verschiedener konstitutiver und regulierter Promotoren tragen, auf Wirts- und Nichtwirtsresistenzen und Entwicklungstypen hin untersucht werden.

### Automatisierung und Erweiterung des TIGS Systems

In den erwähnten 3 TIGS Screenings (Nichtwirtsresistenz, *mlo*-Resistenz, quantitative Basalresistenz) wurden bis jetzt rund 0,45 Mio. transformierte Zellen manuell unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein von Haustorien abgesucht. Dies entspricht mehr als 10 Personenjahren Arbeit für die Analyse von rund 1000 Genen der Gerste. In durch Bgh attackierter Gerstenepidermis wurden aber über 7000 Unigene identifiziert (Abbildung 2). Um überhaupt eine Chance zu haben, eine umfassende, genomweite Phänomanalyse in dem System

durchzuführen, wurden im Projekt „Erkennung räumlich-zeitlicher Entwicklungsmuster“ des Bioinformatik-Zentrums Gatersleben-Halle (<http://mue.bic-gh.de/>) Werkzeuge zu einer Hochdurchsatz-Automatisierung entwickelt (Abbildung 2). Basis dieses neuen Hochdurchsatz-Screeningsystems (AA-TIGS, Automated Analysis-TIGS) ist ein motorisiertes Mikroskop „Axioplan Imaging 2“ der Firma Carl Zeiss. Angesteuert über eigens dafür entwickelte Softwaremodule stellt das Mikroskop zunächst hochaufgelöste Digitalbilder der transformierten Epidermiszellen bereit und legt diese in einer Bilddatenbank ab. Dieses Bildmaterial wird anschließend vollautomatisch mittels einer eigens dafür entwickelten Analysesoftware ausgewertet, welche zunächst die GUS-Zellen extrahiert und diese anschließend auf das Vorhandensein von Haustorien untersucht. Methodisch kommen dabei moderne Verfahren der Farbbildverarbeitung und Mustererkennung zur Anwendung (Segmentierung, Merkmalsextraktion, Objektklassifikation; Tautenhahn *et al.* 2006). Im Ergebnis werden die Parameter jeder untersuchten GUS-Zelle (z. B. Lage, Größe, Färbungsintensität etc.) sowie der Befund des haustorialen Befalls strukturiert in der Datenbank abgelegt und stehen dem Experimentator für Abfragen zur Verfügung. Momentan befindet sich das Screeningsystem in der fortgeschrittenen Testphase und wird in der Weiterführung des TIGS Screenings demnächst zur Untersuchung der quantitativen Basalresistenz eingesetzt werden. Mittels dieses Automatisierungskonzepts wird nicht nur eine genomweite Phänomanalyse ermöglicht, sondern auch eine lückenlose Dokumentation der Rohdaten reali-

siert – denn im Gegensatz zu den rasch verderblichen Frischpräparaten ist das erzeugte digitale Bildmaterial unbegrenzt haltbar.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Gersten-Bgh-Interaktion ist die Effizienz eines einmal gebildeten Haustoriums. Diese kann z. B. durch spät einsetzende Resistenzmechanismen der Wirtszellen beeinflusst werden und spiegelt sich in der Wachstumsgeschwindigkeit der Pilzhypphen auf der Blattoberfläche wider. Leider entzieht sich der Parameter „Hyphenwachstum“ durch die Charakteristik seiner zeitlichen Dynamik fast vollständig einer manuellen, quantitativen Erfassung. Aus diesem Grund wurde die Software HyphAREA entwickelt, welche in der Lage ist, vollautomatisch das Hyphenwachstum von Bgh zu erfassen (Seiffert und Schweizer, 2005). Somit kann das TIGS System auf einen weiteren Parameter der Phänomanalyse erweitert werden.

### Ausblick

Experimente an Einzelgenen wie z.B. *TaGLP4* haben gezeigt, dass TIGS auch auf Weizen anwendbar ist (Christensen *et al.* 2004). Somit eröffnet das hier beschriebene TIGS System die Möglichkeit einer systematischen

### Glossar

**EST:** „Expressed Sequence Tag“, cDNA-Sequenz basierend auf zufällig ausgewählten mRNA-Molekülen eines Organismus, eines Gewebes oder einer Zelle.

**GUS:**  $\beta$ -Glucuronidase aus *Escherichia coli*, ein weitverbreitetes Reporter-Protein für transgene Pflanzen oder Zellen.

**Haustorium:** Nährstoffaufnahmezelle von Mehltau- und weiteren biotrophen phytopathogenen Pilzen, die sich unter Einstülpung der Wirtszellmembran bildet.

**RNAi:** RNA Interferenz, eine neue Methode zur Unterdrückung von Genexpression („gene silencing“) basierend auf doppelsträngiger RNA, die entweder exogen zugegeben oder *in vivo* durch entsprechende Genkonstrukte gebildet wird.

**Segmentierung:** Teilaufgabe in der digitalen Bildverarbeitung, bei der ein Bild in inhaltlich zusammenhängende Regionen zerlegt wird.

Phänomanalyse in der agronomisch weltweit wichtigsten Gruppe der *Triticeae* Getreidearten, um Genfunktionen für Pathogenresistenz oder -anfälligkeit zu entdecken. Diese Resultate werden sich ferner mit anderen phänotypischen Daten aus Ganzpflanzensystemen verknüpfen lassen.

#### **Literatur:**

- Christensen, A. B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjaer, M. F., Dudler, R., and Schweizer, P. (2004). The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley, *Mol Plant Microbe Interact* 17, 109-117.
- Collins, N. C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J. L., Huckelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S. C., and Schulze-Lefert, P. (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall, *Nature* 425, 973-977.
- Douchkov, D., Nowara, D., Zierold, U., and Schweizer, P. (2005). A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 755-761.
- Seiffert, U., and Schweizer, P. (2005). A pattern recognition tool for quantitative analysis of in planta hyphal growth of powdery mildew fungi, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 906-912.
- Tautenhahn R., Ihlow, A., and Seiffert, U. (2006). Adaptive Feature Selection for Classification of Microscope Images. In Isabelle Bloch, Alfredo Petrosino, and Andrea G. B. Tettamanzi (editors): *Fuzzy Logic and Applications, Lecture Notes in Computer Science, Volume 3849*, pages 215-222, Springer.

#### **Kontakt:**

Patrick Schweizer  
 Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und  
 Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben  
 E-Mail: schweiz@ipk-gatersleben.de