



**A study of pathogenesis-related (PR) proteins from
pearl millet (*Pennisetum glaucum*) after infection with
the downy mildew pathogen (*Sclerospora graminicola*).**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr.rer nat

genehmigte Dissertation
von

M.Sc. Manjula Mundakana

geboren am 15.03.1980, in Kumbbla, Indien

2011

Zusammenfassung

Pathogenesis-related Proteine (PR) bilden einen Hauptbestandteil der Pflanzenabwehr gegenüber Pathogenen. Bis heute sind siebzehn PR-Proteinfamilien beschrieben worden. In der Perlhirse (*Pennisetum glaucum*), die vom Flaschen Mehltau (*Sclerospora graminicola*) befallen werden kann, wurden bisher die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, Peroxidase, Superoxiddismutase und Glucanase näher charakterisiert. Jedoch liegen zu Chitinasen und Thaumatin-ähnliche Proteine (TLP), die eine wichtige Rolle in der Verteidigung gegenüber Oomyceten spielen, keine Erkenntnisse aus der Perlhirse vor. In dieser Arbeit wurde die Chitinase der Perlhirse durch chromatographische Methoden aufgereinigt. Das Protein besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 24 kDa auf einer SDS PAGE und zeigte eine chitinolytische Aktivität im „In Gel“ Assay. Außerdem konnte das Protein durch eine immunologische Kreuzreaktion mit dem Antichitinase Antikörper aus Tabak identifiziert werden. Darüberhinaus fand eine Identifizierung des Proteins durch *de novo* Sequenzierung von tryptischen Fragmenten mittels ESI Q-ToF Massenspektrometrie statt. Die Homologiesuche der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab, dass das Protein zur Gruppe I der Chitinasen (Lysozym-Superfamilie) gehört und somit zu den PR-3 Proteinen. Zusätzlich wurden Primer von einer Mais-Chitinase für die Amplifikation des Volllängengens abgeleitet. Mit ihnen konnte ein 482 bp Fragment der Perlhirse amplifiziert werden, welches Homologien zu einer Mais Chitinase (NCBI Zugriffsnummer gi: 195627425) der Familie 19 der Glycosyl-Hydrolasen (GH 19) aufweist. Die Nukleotidsequenz der Perlhirsens Chitinase wurde unter der NCBI Zugriffsnummer gi: 296011300 hinterlegt und beinhaltet zwischen den Positionen 241 und 348 ein Intron von 107 Basen. Das zweite wichtige Protein, das untersucht wurde, ist das Thaumatin-ähnliche PRotein (TLP) der Perlhirse, das zur Familie der PR-5 Proteine gehört. Das TLP (23 kDa) der Perlhirse wurde partiell durch Chromatographie aufgereinigt und zeigte eine immunologische Kreuzreaktion mit einem Anti-Thaumatin Antikörper der Douglasie. Durch *de novo* Sequenzierung von tryptischen Fragmenten mittels ESI Q-ToF Massenspektrometrie des TLPs wurden partielle Aminosäuresequenzen erzeugt, die für die Ableitung von Primer genutzt wurden. Mit diesen konnte ein 422 bp Fragment des TLP Gens amplifiziert werden. Die Homologiesuche der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab eine große Übereinstimmung zu einem hypothetischen Protein mit 231 Aminosäure und Ähnlichkeiten zu einem Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus *Sorghum bicolor* (NCBI Zugriffsnummer gi:242038635). Darüber hinaus zeigte das TLP *in vitro* eine Curdlan-bindende (Wasser-unlösliches Glucan) Aktivität, die essentiell für das Binden an die mykotische Membran ist. Durch diesen Kontakt wird die Pilzmembran permeabel und durch das anschließende Ausströmen von Ionen aus der Pilzzelle deren Zelltod eingeleitet. Der positive Nachweis von *S. graminicola* Sporangien mit Alcain Blau, einem Kompetitor für die TLP-Bindestelle an der Zellwand des Pilzes, zeigte die Existenz einer solchen Bindungsstelle beim Falschen Mehltau auf. Die Hemmung der Beweglichkeit von *S. graminicola* Zoosporen durch ein Glucan-bindendes Protein zeigte den toxischen Effekt des TLPs auf den Falschen Mehltau. Die Permeabilisierung der pilzlichen Membran durch das TLP kann mit Sytox Grün, einem Nukleinsäurefarbstoff, nachgewiesen werden. Dieser Nachweis konnte erstmalig durch Messung der Sytox Fluoreszenz für das TLP aus der Perlhirse bestätigt werden. Zusätzlich wurden verschiedene Primer basierte Techniken (Genome walking) für die Amplifizierung der Volllängenkclone der Chitinase und des TLPs aus Perlhirse durchgeführt. Das Multiple Sequenzalignment der Chitinase und des TLPs aus der monocotylen Perlhirse ergab eine phylogentische Verwandtschaft zu anderen Pflanzenspezies und zeigte eine Divergenz zu den bisher bekannten monocotylen Chitinasen und TLPs. Interessanterweise sind die Chitinase und das TLP der Perlhirse in einer eigenen Untergruppe einzuordnen.

Schlüsselworte: Chitinase, Falscher Mehltau (*Sclerospora graminicola*) Perlhirse (*Pennisetum glaucum*).

Summary

Pathogenesis-related (PR) proteins constitute a major defense mechanism of plants against pathogens. Seventeen PR protein families have been classified till date. Some of the defense related proteins studied in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) downy mildew pathogen (*Sclerospora graminicola*) interaction include phenyl alanine ammonia lyase, peroxidase, super oxide dismutase, and glucanase are characterized; however, chitinase and thaumatin like proteins (TLPs) from pearl millet which play in general an important role in host defense against oomycete pathogen are not characterized. Therefore this doctoral study concentrated on the characterization of pearl millet chitinase and TLP.

In this study pearl millet chitinase was purified by chromatography. The purified protein had an apparent molecular weight of 24 kDa on SDS PAGE and showed a chitinolytic activity in an in gel assay. The protein also showed immunological cross reaction with an anti-chitinase antibody from tobacco. Moreover, the protein was identified by *de novo* sequencing of trypsin digested peptide fragments by ESI Q-TOF. Homology search of the deduced amino acid sequence revealed that the purified protein belongs to class I chitinase (lysozyme super family) belonging to the PR-3 family of pathogenesis related proteins. Additionally, primers were designed for the amplification of the full length gene considering the deduced amino acid sequence and a maize chitinase gene. The 482 bp (partial length) pearl millet chitinase gene shared homology with many plant chitinases belonging to family 19 of glycosyl hydrolases (GH 19) classification system. The sequence was submitted to NCBI (NCBI accession number: gi|296011300). It was also observed that the pearl millet *chitinase* gene is interrupted by a 107 bp intron at the position 241 bp to 348 bp. The obtained nucleotide sequence shared homology to the chitinase from Maize (NCBI Accession number: gi|195627425). The second important PR protein studied was the pearl millet thaumatin like protein belonging to PR-5 family. TLP from pearl millet was partially purified by chromatography. The 23 kDa pearl millet TLP showed immunological cross reaction with anti-TLP antibody from Douglas fir. The protein was characterized by *de novo* sequencing of trypsin digested peptide fragments by ESI Q-TOF. Based on the deduced partial amino acid sequence primers were designed and a 422 bp (partial length) pearl millet tlp gene was amplified. The obtained nucleotide sequence was translated and the partial amino acid sequence showed homology to the hypothetical protein (231 aa) from *Sorghum bicolor* (similar to thaumatin like protein NCBI Accession number: gi|242038635). Moreover, the protein also exhibited *in vitro* curdlan (water insoluble glucan) binding activity, which is essential before TLP acts on fungal membrane and hydrolyzes the fungal plasma membrane leading to ion leakage and death of invading fungal pathogen. Positive staining of *S. graminicola* sporangium with alcian blue – a competitor of TLP for binding sites on cell wall of the fungus showed the presence of TLP binding sites on cell wall of downy mildew. Inhibition of *S. graminicola* zoospore motility by the glucan bound protein showed toxic effect of TLP on downy mildew pathogen. Fungal membrane permeabilization by TLP was investigated with Sytox green, a nucleic acid dye that enters the cells with compromised plasma membrane. Fluorescence of Sytox green stained sporangia after treatment with curdlan bound protein proved membrane permeabilization by pearl millet TLP. Different primer based genome walking techniques were employed to amplify the full length gene of pearl millet chitinase and TLP. Multiple sequence analyses of both chitinase and TLP revealed their phylogenetic relationship of pearl millet chitinases and TLPs with that of other plant species. Interestingly both pearl millet chitinase and TLP showed divergence from other monocotyledonous chitinases and TLPs and it was placed in separate subgroup.

Key words: Chitinase, Downy mildew pathogen (*Sclerospora graminicola*), Pearl millet (*Pennisetum glaucum*).