

Die Funktion von Proteinphosphatasen in der Etablierung der Arbuskulären Mykorrhiza in *Medicago truncatula*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte
DISSERTATION

von

Nina Rieger

aus

Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Natalia Requena

Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Februar 2013

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich genannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Ich versichere außerdem, dass ich die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Mutualistische Lebensformen: ein Geben und Nehmen	1
1.2 Die Arbuskuläre Mykorrhiza	2
1.3 Molekulare Kommunikation in der frühen symbiotischen Phase.....	5
1.4 Die symbiotische Rezeptor-ähnliche Kinase DMI2	8
1.5 Proteinphosphatasen sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt	13
1.6 Die Familie der Proteinphosphatasen 2C in Pflanzen	15
1.7 Ziel der Arbeit	19
2 Ergebnisse	21
2.1 Yeast-Two-Hybrid Analysen: Putative Interaktionspartner der Rezeptor- ähnlichen Kinase MtDMI2	21
2.2 Bioinformatische Analysen der isolierten Proteinphosphatase 2C	24
2.3 Die Expression von MtPP2C2 und MtNPP2C1 in mykorrhizierten Wurzeln.....	25
2.4 Verifizierung der Interaktion MtDMI2-ICD und MtPP2C2.....	27
2.5 Die Juxtamembrandomäne von MtDMI2 ist für eine Interaktion mit MtPP2C ausreichend	31
2.6 Analyse von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-ereignissen zwischen MtDMI2-ICD und MtPP2C2	32
2.7 Funktion der Phosphatase MtPP2C2 in der AM-Symbiose	38
2.8 Funktion der Phosphatasen MtNPP2C1 und MtPP2C2 in der Rhizobien- Symbiose	42
2.9 MtDMI2 interagiert mit weiteren Mitgliedern der PP2C2-Familie	46
3 Diskussion	61
3.1 Die PP2C-Familie in <i>M. truncatula</i>	61
3.2 Die PP2Cs der Gruppe F und ihre Expression in Pflanzen.....	62
3.3 Die symbiotische Rezeptor-ähnliche Kinase MtDMI2 interagiert mit PP2Cs der Gruppe F	65
3.4 Ist MtDMI2 ein Substrat von MtPP2C2?	68
3.5 Funktionelle Analyse von MtPP2C2 und Mt60935.....	71

3.6	Ein Modell der Funktion von Proteinphosphatasen in der AM-Symbiose	73
3.7	Fazit und Ausblick	74
4	Material und Methoden.....	77
4.1	Organismen.....	77
4.2	Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Kits	79
4.3	Lösungen und Puffer	80
4.4	Kulturmedien	83
4.5	Verwendete Plasmide.....	85
4.6	Verwendete Primer.....	87
4.7	Molekularbiologische Methoden	90
4.8	Das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H)	97
4.9	Biochemische Methoden	98
4.10	Kultivierung und Transformation von <i>M. truncatula</i>	102
5	Literaturverzeichnis	107
6	Anhang.....	121
	Lebenslauf	123
	Mein herzlicher Dank gilt... ..	125

Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTD	Carboxyterminus
DMI	<i>Does not make infections</i>
DsRED	<i>Discosoma spec.</i> red fluorescent protein
HMGR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase
IPD3	Interacting protein of DMI3
JM	Juxtamembrandomäne
Kin	Kinasedomäne
LCO	Lipochoitooligosaccharide
LRR	Leucin rich repeats
LysM	Lysin Motiv
NFP	Nod Factor Perception
OE	Overexpression
PP2C	Proteinphosphatase 2C
RLK	Receptor-like Kinase
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Rotationen pro Minute
SD-LWHA	Synthetisches Dropoutmedium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin, Adenin
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gelectrophoresis
SP	Signalpeptid
SYMRK	Symbiosis Receptor Kinase
TEF1	Translation elongation factor 1 alpha
Tm	Schmelztemperatur
Y2H	Yeast-two-hybrid
YFP	Yellow fluorescent protein

Zusammenfassung

Phosphat ist für alle Organismen essentiell und ist insbesondere für Pflanzen ein limitierender Faktor für Wachstum und Entwicklung. Da Phosphat im Boden häufig schwer zugänglich ist, haben Pflanzen schon früh in der Evolution Strategien entwickelt, um eine ausreichende Versorgung mit Phosphat sicherzustellen. Als besonders erfolgreich hat sich die Etablierung einer Symbiose mit Pilzen des Phylums Glomeramycota erwiesen. Kennzeichnend für diese Symbiose ist das Eindringen des Pilzes in die Wurzelzellen und das Ausbilden von bäumchenartig verzweigten Hyphenstrukturen, die Arbuskel genannt werden und der Symbiose den Namen Arbuskuläre Mykorrhiza (AM) geben. In den Arbuskel findet der Austausch von Nährstoffen statt. Während der Pilz die Pflanze hauptsächlich mit Phosphat versorgt, stellt die Pflanze Photosynthese-Assimilate zur Verfügung.

Die Etablierung einer Symbiose benötigt einen molekularen Dialog zwischen beiden Symbiosepartnern. Die Entdeckung einer pflanzlichen Signaltransduktionskaskade (SYM-Signalweg), die nicht nur von der Arbuskulären Mykorrhiza, sondern auch von der Wurzelknöllchensymbiose genutzt wird, war ein Meilenstein in der Erforschung von Pflanzen-Mikroben-Interaktionen. An der Spitze dieser Signalkaskade steht die Rezeptor-ähnliche Kinase DMI2, die essentiell für eine erfolgreiche Kolonisierung der Wurzel mit symbiotischen Bakterien und Pilzen ist. Welche Liganden an diese Plasmamembran-lokalisierte Rezeptorkinase binden und wie diese Signale über die Kinasedomäne in die Zelle weitergeleitet werden, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

In dieser Arbeit wurde in der Pflanze *M. truncatula* mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems das Protein MtPP2C2, eine Proteinphosphatase vom Typ 2C, als Interaktionspartner der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 identifiziert. Diese Interaktion wurde *in planta* mit BiFC-Untersuchungen und biochemisch mit *in vitro* Pull-down-Analysen verifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass ein kurzer Bereich direkt nach der Transmembrandomäne von MtDMI2 ausreichend für eine Interaktion mit MtPP2C2 ist. Sowohl die Inaktivierung von MtPP2C2 durch RNA-Interferenz als auch die Expression unter einem konstitutiv aktiven Promotor resultierten nicht in einer veränderten AM-Symbiose. Phylogenetische Analysen der gesamten Familie der Proteinphosphatasen 2C in *M. truncatula* offenbarten eine Vielzahl an hoch konservierten Proteinen. Eine mögliche Redundanz innerhalb der Phosphatasen ist daher wahrscheinlich. Interaktionsstudien in Hefe zeigten, dass MtDMI2 mit weiteren PP2Cs interagieren kann, die zusammen mit MtPP2C2 eine Untergruppe innerhalb der PP2C-Familie bilden. Genexpressionsanalysen ergaben, dass eine dieser Phosphatasen, namentlich Mt60935, während der frühen Phase der AM-Symbiose induziert ist. Die Inaktivierung dieser Phosphatase führte zu einer verzögerten Mykorrhizierung und ist ein Hinweis auf eine Funktion von Mt60935 als Positivregulator in der AM-Symbiose.

Desweiteren wurden biochemische Analysen, um Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse zwischen der Kinase MtDMI2 und den interagierenden Phosphatasen nachzuweisen, durchgeführt. Auto- sowie Transphosphorylierungsaktivität von MtDMI2 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Phosphatasen sind gemeinsam mit Kinasen am wichtigen Mechanismus der reversiblen Proteinphosphorylierung beteiligt und regulieren zahlreiche Signaltransduktionsprozesse. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal Proteinphosphatasen beschrieben werden, die eine Rolle in der Etablierung der AM-Symbiose spielen.

Abstract

Phosphate is essential for all living organisms and is, especially for plants, often a limiting factor for growth and development. In the soil, phosphate is predominantly present in unavailable forms for plant roots. As a consequence, plants have developed strategies to ensure sufficient phosphate supply. Very successful was the establishment of a symbiosis with fungi from the phylum Glomeromycota. This symbiosis is characterized by the entrance of the fungus into the plant cell forming tree-like structures, so called arbuscles. The symbiosis is therefore designated as arbuscular mycorrhiza. Arbuscles are the sites of nutrient exchange. The fungus delivers primarily phosphate and, in return, receives photosynthetic assimilates from the plant.

The establishment of this symbiosis requires a molecular dialogue between both partners. The discovery of a plant signal transduction pathway (SYM-pathway) that is shared between arbuscular mycorrhiza and root nodule symbiosis was a breakthrough in research of plant-microbe interactions. The receptor-like kinase DMI2 is regarded as entry point into the signal cascade and is crucial for proper colonization of roots with either symbiotic bacteria or fungi. Which ligands bind to this plasma membrane located receptor and how the signal is transferred to the kinase domain is currently under investigation.

In a yeast-2-hybrid screen, the protein phosphatase MtPP2C2 could be identified as an interacting protein of DMI2. This interaction was verified using *in planta* BiFC-analysis and *in vitro* pull down assays. The juxtamembrane domain of DMI2 was shown to be sufficient for the interaction with MtPP2C2. Inactivation of the phosphatase by RNA interference as well as overexpression did not significantly affect AM-symbiosis.

Phylogentic analysis of the whole phosphatase family 2C in *M. truncatula* revealed an extensive number of highly conserved proteins. It is therefore likely that some of them share redundant functions. Interaction studies in yeast demonstrated that MtDMI2 is able to bind further PP2Cs, which cluster together with MtPP2C2 in one subgroup of the PP2C-family. Gene expression analysis indicated that one of these phosphatases, namely *Mt60935*, is induced in early stages of AM-symbiosis. Transcriptional inactivation of this gene led to delayed colonization indicating a role as positive regulator during mycorrhization.

Biochemical assays in order to examine phosphorylation or dephosphorylation events between the kinase and the interacting phosphatases have been performed. Autophosphorylation as well as transphosphorylation activity of DMI2 could be demonstrated in this study.

Phosphatases play a crucial role in a huge variety of signal transduction processes. In this study it could be shown for the first time that phosphatases are involved in establishing AM-symbiosis. The phosphatase *Mt60935* was identified as a putative positive regulator within the central SYM-pathway.

1 Einleitung

1.1 Mutualistische Lebensformen: ein Geben und Nehmen

Die eingeschränkte Verfügung von Wasser und Nährstoffen wie Phosphat und Stickstoff limitiert das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen in vielen terrestrischen Ökosystemen. Mutualistische Interaktionen der Wurzeln mit Bakterien und Pilzen helfen der Pflanze mit diesen Einschränkungen zurechtzukommen. In diesen Wurzelsymbiosen profitieren beide Partner voneinander. Während der Mikroben-Partner anorganische Nährstoffe an die Pflanze abgibt, versorgt die Pflanze ihren Partner mit Photosynthese-assimilaten.

Eine der ältesten Symbiosen stellt die Mykorrhiza, eine Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzenwurzeln, dar. Die Mykorrhiza kann dabei in verschiedenen Formen und Strukturen auftreten. Am auffälligsten ist die Ektomykorrhiza, deren Pilzpartner zu den Basidiomyceten und Ascomyceten gehören und auffällige Fruchtkörper ausbilden. Im Bereich der Wurzeln findet man ein dichtes Hyphengeflecht auf der Wurzeloberfläche und in den Extrazellularräumen, der Pilz dringt jedoch nicht in die Pflanzenzelle ein. Die ericoide Mykorrhiza ist eine Zwischenform von Endo- und Ektomykorrhiza. Hier befinden sich wie bei der Ektomykorrhiza große Teile des Pilzes außerhalb der Wurzel, aber zusätzlich sind einzelne Zellen intrazellulär mit Pilzhyphen infiziert. Eine echte Endosymbiose findet bei der Orchideenmykorrhiza statt. Der pilzliche Partner breitet sich hauptsächlich im Wurzelcortex aus, wo er intrazellulär dichte Hyphenknäuel bildet.

Am weitesten verbreitet ist die Arbuskuläre Mykorrhiza (AM). Fossile Funde belegen, dass diese Lebensgemeinschaft schon bei Pflanzen vor circa 450 bis 500 Millionen Jahren existiert hat (Remy *et al.*, 1994; Redecker *et al.*, 2000; Brundrett, 2002). Da in dieser Zeit die Pflanzen begannen den Lebensraum Land zu erobern, wurde die Theorie einer Koevolution von Pflanze und Pilz aufgestellt, die die erfolgreiche Besiedlung der Landmassen überhaupt erst möglich machte (Pirozynski & Malloch, 1975, Simon *et al.*, 1993, Wang & Qiu, 2006). Auch heute existiert diese Symbiose bei über 80% aller Landpflanzen und schließt Angiospermen, Gymnospermen, Pteridophyten und Bryophyten mit ein (Read *et al.*, 2000). Dennoch gibt es wenige Pflanzenfamilien, die keine Symbiose mit Mykorrhiza-Pilzen eingehen können, wie zum Beispiel *Brassicaceae* (Glenn *et al.*, 1985), *Chenopodiaceae* (Hirrel *et al.*, 1978) und *Urticaceae* (Vierheilig *et al.*, 1996). Die pilzlichen Partner dieser Symbiose gehören ausschließlich dem monophyletischen Phylum Glomeromycota an (Schüßler *et al.*, 2001). Nach Eindringen des Pilzes in die Wurzel breitet er sich im Wurzelcortex aus und bildet intrazellulär bäumchenartige Strukturen, sogenannte Arbuskel, über die dann der Stoffaustausch erfolgt. Die Pflanze profitiert bei dieser Symbiose hauptsächlich vom extraradikalen Myzel des Pilzes. Dieses durchdringt den Boden und ist vor allem auf die Aufnahme von Phosphat spezialisiert, welches dann durch die Hyphen zu den Kortexzellen transportiert

wird (Ezawa *et al.*, 2005). Außer Phosphat werden noch andere anorganische Nährstoffe wie Stickstoff, Kupfer und Zink von dem Pilz aus dem Boden aufgenommen und zu den Wurzeln der Pflanze weitergeleitet (Jin *et al.*, 2005). Der Pilz wird als Gegenleistung von der Pflanze mit Kohlenstoffquellen in Form von Zucker versorgt (Pfeffer *et al.*, 1999; Helber *et al.*, 2011). Die Pflanze stellt dabei 20% ihres assimilierten Kohlenstoffs dem Pilz zur Verfügung (Jakobsen & Rosendahl, 1990). Während Ektomykorrhiza-Pilze sich auch saprophytisch ernähren können, sind AM-Pilze auf die Kohlenstoffversorgung durch die Pflanze angewiesen, da sie selbst keine Kohlenstoffverbindungen aus dem Boden aufnehmen können. Neben der Belieferung der Pflanze mit Nährstoffen und dem daraus resultierenden positiven Effekt auf das Pflanzenwachstum sind AM-Pflanzen auch resistenter gegen abiotischen Stress wie Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen, niedrige pH-Werte und Schwermetallbelastung (Augé, 2001; Jacquot-Plumey *et al.*, 2003; Gianinazzi *et al.*, 2005). Eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen konnte ebenso beobachtet werden (Colditz *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Doch nicht nur Pilze gehen mutualistische Lebensformen mit Pflanzen ein, auch Bakterien haben die Vorteile einer Symbiose „erkannt“. Die wichtigste Symbiose ist die Wurzelknöllchen-Symbiose, bei der gramnegative Bodenbakterien das Wurzelgewebe der Pflanze infizieren und dort die Bildung eines stickstofffixierenden Knöllchens induzieren. Diese Symbiose ist allerdings auf Mitglieder der Pflanzenfamilie *Fabaceae* (Leguminosen) beschränkt und hat sich daher in der Evolution sehr viel später entwickelt als die AM-Symbiose. Leguminosen gehen mit vielen verschiedenen Bakterien eine Symbiose ein, diese werden allgemein als Rhizobien bezeichnet, obwohl sie phylogenetisch verschiedenen Gattungen angehören (Young, 1992; Sprent, 2007). Die Interaktion zwischen einer Rhizobien- und einer Leguminosenart ist dabei meistens selektiv, im Gegensatz zur AM-Symbiose, wo eine Pilzart mehrere Pflanzen kolonisieren kann.

1.2 Die Arbuskuläre Mykorrhiza

AM-Pilze sind obligat biotroph und können daher ihren Lebenszyklus (Abbildung 1.1) nur in Anwesenheit einer Pflanze vollziehen. Man unterscheidet dabei die präsymbiotische Phase und die symbiotischen Phase. Während der präsymbiotischen Phase keimen die Sporen nach einer Phase der Dormanz aus und mobilisieren dabei Reservestoffe wie Lipide und Glykogen um das Myzelwachstum zu ermöglichen. Die Keimung wird durch abiotische Faktoren wie pH, Feuchtigkeit und Temperatur (Green *et al.*, 1976), aber auch durch Wurzelexsudate einer passenden Wirtspflanze beeinflusst (Bécard & Piché, 1989; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1990; Nair *et al.*, 1991). Gelangt die Keimhülle in die Nähe eines Symbiosepartners, so beginnt sie sich stark zu verzweigen. Als Auslöser für das Verzweigen der Hyphen konnte das von Pflanzen sezernierte Strigolakton 5-Deoxystrigol identifiziert werden (Akiyama *et al.*, 2005). Erst kürzlich konnte der erste Strigolakton-Exporter, PDR1 aus *Petunia hybrida*, charakterisiert werden. Dieser ist wahrscheinlich auch für den Export von 5-Deoxystrigol zuständig, da *pdr1* Mutanten eine reduzierte Mykorrhizierung zeigen und die Verzweigung der pilzlichen Hyphen vor dem eigentlichen physischen Kontakt reduziert ist (Kretschmar *et al.*, 2012).

Der Kontakt zwischen Keimhypho und Wurzeloberfläche läutet die symbiotische Phase ein, in dessen Verlauf der Pilz ein Hyphopodium, auch Appressorium genannt, bildet und die Wurzelepidermis penetriert. Der Eintritt in die Wurzel kann dabei direkt in eine Zelle oder zwischen zwei Zellen stattfinden (Demchenko *et al.*, 2004). Gelangen die Pilzhyphen in den interzellulären Raum, verbreiten und verzweigen sie sich im Kortex und beginnen dann an mehreren Stellen gleichzeitig die Wurzelzellen zu penetrieren. Beim intrazellulären Eintritt der Hypho bereitet sich die pflanzliche Epidermiszelle schon vor der Appressorienbildung durch die Bildung eines Prepenetrationsapparates (PPA) auf das Eindringen des Pilzes vor. Der PPA wirkt wie ein Kanal, der die pilzliche Hypho durch die Zelle leitet (Genre *et al.*, 2005).

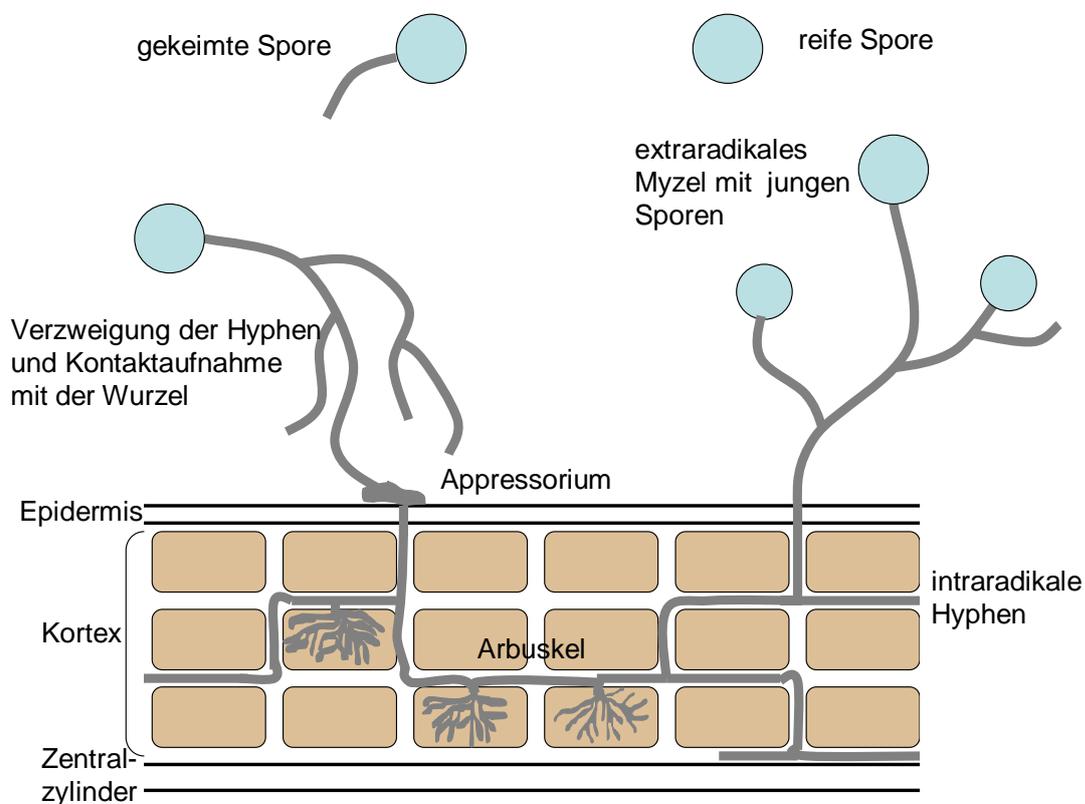


Abbildung 1.1: Lebenszyklus einer Arbuskulären Mykorrhiza

Reife Sporen keimen bei geeigneten Bedingungen aus und bilden ein Myzel. Trifft eine Hypho auf eine Wurzel, bildet sie verstärkt Verzweigungen aus und nimmt mit der Wurzel Kontakt auf. Der Pilz dringt über Appressorien in die Wurzel ein und kolonisiert den Kortex. Beim Eintritt der intraradikalen Hyphen in eine Zelle formiert sich ein Arbuskel, das dem Austausch von Nährstoffen zwischen Pilz und Pflanze dient. Der Lebenszyklus endet mit der Bildung von Sporen außerhalb der Wurzel.

Der Eintritt in eine Zelle findet ohne die Zerstörung der Plasmamembran der Pflanzenzelle statt. Stattdessen stülpt sich die pflanzliche Membran wie ein Handschuh über die pilzlichen Strukturen. Im inneren Wurzelkortex verzweigen sich die Hyphen stark und bilden bäumchenartige Gebilde, die Arbuskel, aus. Die Morphologie der Arbuskelenthaltenden Wurzelzelle wird dabei stark verändert: die Vakuole wird fragmentiert, die Anzahl an Zellorganellen wird erhöht, der Zellkern wandert von der Peripherie ins Zellinnere und das Cytoskelett wird völlig neu angeordnet (Scannerini & Bonfante-Fasolo,

1983; Bonfante & Perotto, 1995; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Genre & Bonfante, 1997; Genre & Bonfante, 1998; Harrison, 1999; Blancaflor *et al.*, 2001; Fester *et al.*, 2001; Lohse *et al.* 2005; Genre *et al.*, 2008) Die pflanzliche Zellmembran, nun periarbuskuläre Membran genannt, erfährt eine enorme Oberflächenvergrößerung. Zusammen mit der pilzlichen Membran umschließt sie den periarbuskulären Raum, über den der bidirektionale Stoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze stattfindet (Bonfante und Perotto, 1995). Dazu wird bei beiden Symbiosepartnern die Expression von Transportproteinen induziert. Auf pflanzlicher Seite konnten Phosphattransporter aus verschiedenen Pflanzen identifiziert werden. Diese weisen entweder nur eine erhöhte Expression während der AM-Symbiose auf oder sind ausschließlich AM-spezifisch exprimiert und lokalisieren in der periarbuskulären Membran. Besonders gut charakterisiert ist MtPT4 aus *M. truncatula*, der in Arbuskel-enthaltenden Zellen lokalisiert und die Aufnahme von Phosphat aus dem periarbuskulären Raum in die Pflanzenzelle steuert (Harrison *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007; Pumplin *et al.*, 2012). Hinweise auf einen Stickstofftransport vom Pilz zur Pflanze lieferte die Identifizierung des pflanzlichen Ammonium-Transporters LjAMT2;2, der vor allem in arbuskulierten Zellen hochreguliert ist (Guether *et al.*, 2009). Auf der pilzlichen Seite wurde erst vor kurzem der erste Zuckertransporter, GiMST1, charakterisiert, der hauptsächlich Glukose, aber auch Xylose, Mannose und Galaktose transportiert und in Arbuskel und intraradikalen Hyphen exprimiert wird (Helber *et al.*, 2011). Die Energie für die Transportvorgänge wird durch den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über beide Membranen durch die Aktivität von Protonen-ATPasen bereitgestellt (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000; Ferrol *et al.*, 2002; Krajinski *et al.*, 2002; Requena *et al.*, 2003). Nach einigen Tagen werden die Arbuskel abgebaut und die ursprüngliche Struktur der Wurzelzelle wieder hergestellt, die erneut vom Pilz kolonisiert werden kann (Dickson & Smith, 2001).

Neben den Arbuskel bilden alle Pilze der Familie *Glomeraceae* auch Vesikel aus, die der Bildung und Speicherung von Reservestoffen, hauptsächlich Lipiden, dienen (Cooper & Lösel, 1978). Doch der Pilz wächst nicht nur innerhalb der Wurzel, sondern bildet auch ein umfangreiches extraradikales Myzel im Boden um die Aufnahme von Phosphat und anderen anorganischen Nährstoffen zu gewährleisten. Dort findet auch die Bildung neuer Sporen statt, die dann wieder auskeimen und neue Wurzeln kolonisieren können.

1.3 Molekulare Kommunikation in der frühen symbiotischen Phase

1.3.1 Lipochitooligosaccharide als Signalmoleküle von Rhizobien und AM-Pilzen

Noch bevor der erste physische Kontakt zwischen symbiotischen Mikroorganismen und ihren pflanzlichen Partnern besteht, findet ein reger Signalaustausch in der Rhizosphäre statt. Rhizobien erkennen von Pflanzen sekretierte Flavonoide und synthetisieren und sekretieren daraufhin Lipochitooligosaccharide (LCO), auch Nod-Faktoren genannt (Lerouge *et al.*, 1990; Dénarié *et al.*, 1996; D'Haese & Holsters, 2002). Diese werden spezifisch von der Wirtspflanze erkannt und der Infektionsprozess sowie die Organogenese der Wurzelknöllchen werden in Gang gesetzt (Oldroyd & Downie, 2008). Für die AM-Symbiose konnte in vielen Arbeiten gezeigt werden, dass der Pilz diffusionsfähige Signalmoleküle in die Rhizosphäre entlässt, die die Genexpression und Signaltransduktionsprozesse der Pflanze schon vor dem physischen Kontakt signifikant ändern (Kosuta *et al.*, 2003; Weidmann *et al.*, 2004; Navazio *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2010) und ein verzweigtes Wachstum der Wurzeln auslösen (Oláh *et al.*, 2005; Mukherjee & Ané, 2011). Lange Zeit konnten die Signalmoleküle nicht identifiziert werden. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass auch AM-Pilze Lipochitooligosaccharide, auch Myc-LCOs genannt, sezernieren und diese unter anderem das verzweigte Wachstum der Wurzeln auslösen (Maillet *et al.*, 2011).

Die fast identische chemische Natur der Nod-Faktoren und der Myc-LCOs wirft die Frage auf, ob und wenn ja wie die Pflanze die Signale unterscheiden kann. Rezeptoren in der Plasmamembran der Pflanzenzelle, die für die Perzeption der Nod-Faktoren verantwortlich sind, sind schon bekannt. Diese Rezeptoren enthalten in ihrer extrazellulären Domäne mehrere Lysin-Motive. Solche Motive finden sich in zahlreichen Proteinen in Pro- und Eukaryoten und sind für die Bindung von N-Acetyl-glucosamin, welches auch Bestandteil der Peptidoglycan-Zellwand von Bakterien und der Chitin-Zellwand von Pilzen ist, verantwortlich (Buis *et al.*, 2008, Ohnuma *et al.*, 2008). Nur in Pflanzen sind diese LysM-Domänen an eine Kinase-ähnliche Domäne verknüpft und werden als LysM-RLKs bezeichnet. In *M. truncatula* und *L. japonicus* werden die LysM-RLKs MtNFP/LjNFR5 und MtLYK3/LjNFR1 für eine Nod-Faktoren-abhängige Rhizobien-Infektion benötigt (Radutoiu *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006; Smit *et al.*, 2007). Überraschenderweise ist MtNFP auch an der Perzeption von Myc-LCOs beteiligt und führt zu einer Stimulation von Wurzelverzweigungen (Maillet *et al.*, 2011). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass MtNFP nicht essentiell für die AM-Symbiose ist (Ben Amor *et al.*, 2003). Das deutet darauf hin, dass es einen weiteren LysM-Rezeptor für Myc-LCOs geben muss oder dass Myc-LCOs nicht essentiell für die AM-Symbiose sind. Die erste Hypothese wird auch durch Experimente unterstützt, die beweisen, dass es unabhängig von MtNFP eine weitere LCO-Bindestelle gibt (Hogg *et al.*, 2006). Ein sehr guter Kandidat für einen Myc-LCO Rezeptor ist MtLYR1. *MtLYR1* ist ein Paralog zu *MtNFP* und ist während der AM-Symbiose verstärkt exprimiert (Gomez *et*

al., 2009). Besonders interessant ist die Tatsache, dass in *Parasponia andersonii*, die einzige Nicht-Leguminose, die eine Symbiose mit Rhizobien eingehen kann, ein Homolog zu MtNFP/MtLYR1 existiert und diese LysM-RLK sehr relevant für beide Symbiosen ist (Op den Camp *et al.*, 2011). Es ist daher wahrscheinlich, dass während der Evolution der Landpflanzen ein ursprünglicher Myc-LCO Rezeptor die Fähigkeit erhalten hat, auch Nod-Faktoren zu erkennen. In den Leguminosen hat dann eine Genduplikation dieses Rezeptors stattgefunden und eine Genkopie wurde als Myc-LCO Rezeptor erhalten, während die andere Genkopie sich im Laufe der Zeit weiterentwickelt hat, um spezifisch die Nod-Faktoren der entsprechenden Rhizobien zu erkennen (Op den Camp *et al.*, 2011). Weitere Experimente fehlen, um diese Hypothese zu belegen. Sehr interessant wäre auch, ob ein Myc-LCO Rezeptor (eventuell MtLYR1) auch Nod-Faktoren binden kann. Die Entdeckung der Myc-LCOs ist also nur der Anfang einer spannenden Suche nach der Antwort auf die Frage, wie Leguminosen Rhizobien und AM-Pilze unterscheiden und wie die Spezifität in der Erkennung von Nod-Faktoren und Myc-LCOs erreicht wird.

1.3.2 Der SYM-Signalweg

Die Existenz von diffusionsfähigen Signalmolekülen in Form von LCOs ist nicht die einzige Gemeinsamkeit zwischen der Rhizobien- und AM-Symbiose. Durch Analysen von *M. truncatula* Mutanten konnten Gene identifiziert werden, die in beiden Symbiosen entweder essentiell sind oder zumindest einen starken Einfluss haben (Catoira *et al.*, 2000). Diese Tatsache verstärkte die Vermutung, dass beide Symbiosen einen gemeinsamen Signalweg besitzen. Da die AM die ältere Form der Symbiose darstellt, wurde die Theorie aufgestellt, dass die RNS Teile dieses Signaltransduktionsweges für ihre Zwecke adaptiert hat (Kistner und Parniske, 2002). In dem ursprünglichen Mutantenscreen wurden drei Gene identifiziert: *dmi1*, *dmi2* und *dmi3*, wobei *dmi* für „does not make infections“ steht (Catoira *et al.*, 2000). Das Gen *dmi1* codiert für einen Zellkernmembran-lokalisierten Ionenkanal (Ané *et al.*, 2004). DMI2 ist eine plasmamembranständige Rezeptor-ähnliche Kinase, die in ihrer extrazellulären Domäne eine Region mit drei Leucin-rich-repeats (LRR) aufweist (Stracke *et al.*, 2002; Endre *et al.*, 2002). Das Gen *dmi3* codiert für eine Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Lévy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004), die sich im Zellkern befindet (Smit *et al.*, 2005).

Schon vor der Entdeckung dieser drei Gene war bekannt, dass durch die Sekretion des Nod-Faktors physiologische Änderungen in der Pflanzenzelle hervorgerufen werden: die Membran depolarisiert und es kommt zu schnellen Fluktuationen der intrazellulären Calciumkonzentration, dem sogenannten Calcium-Spiking (Ehrhardt *et al.*, 1996; Shaw und Long, 2003). Neuerer Untersuchungen ergaben, dass nicht nur Nod-Faktoren, sondern auch pilzliche Signale Calcium-Oszillationen auslösen, die aber im Vergleich zu den Nod-Faktor-induzierten Oszillationen unregelmäßiger sind (Kosuta *et al.*, 2008, Chabaud *et al.*, 2011). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese pilzlichen Signale Myc-LCOs sind. Erste Ergebnisse bestätigen diese Hypothese (Giles Oldroyd, persönliche Kommunikation). Da Mutationen in *dmi1* und *dmi2* zu einem Ausfall des Calcium-Spiking führen, dieses aber in der *dmi3* Mutante noch erhalten ist, wurden die beiden Proteine

DMI1 und DMI2 in der Signalkette über das Calcium-Spiking gestellt, während DMI3 erst nach den Calcium-Oszillationen aktiv wird und daher in der Signalkette weiter unten stehen muss. Bisher konnten allerdings keine Calcium-Kanäle identifiziert werden, die für das Calcium-Spiking verantwortlich sind. Auch die Rolle von DMI2 und DMI1 in der Generierung der Calcium-Oszillationen sind noch unverstanden. In *L. japonicus* wurden drei Kernporen-assoziierte Proteine (LjNUP85, LjNUP133 und LjNENA) entdeckt, die ebenfalls für das Calcium-Spiking benötigt werden und für beide Symbiosen essentiell sind (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2010). Aber auch ihre Funktion ist noch unbekannt.

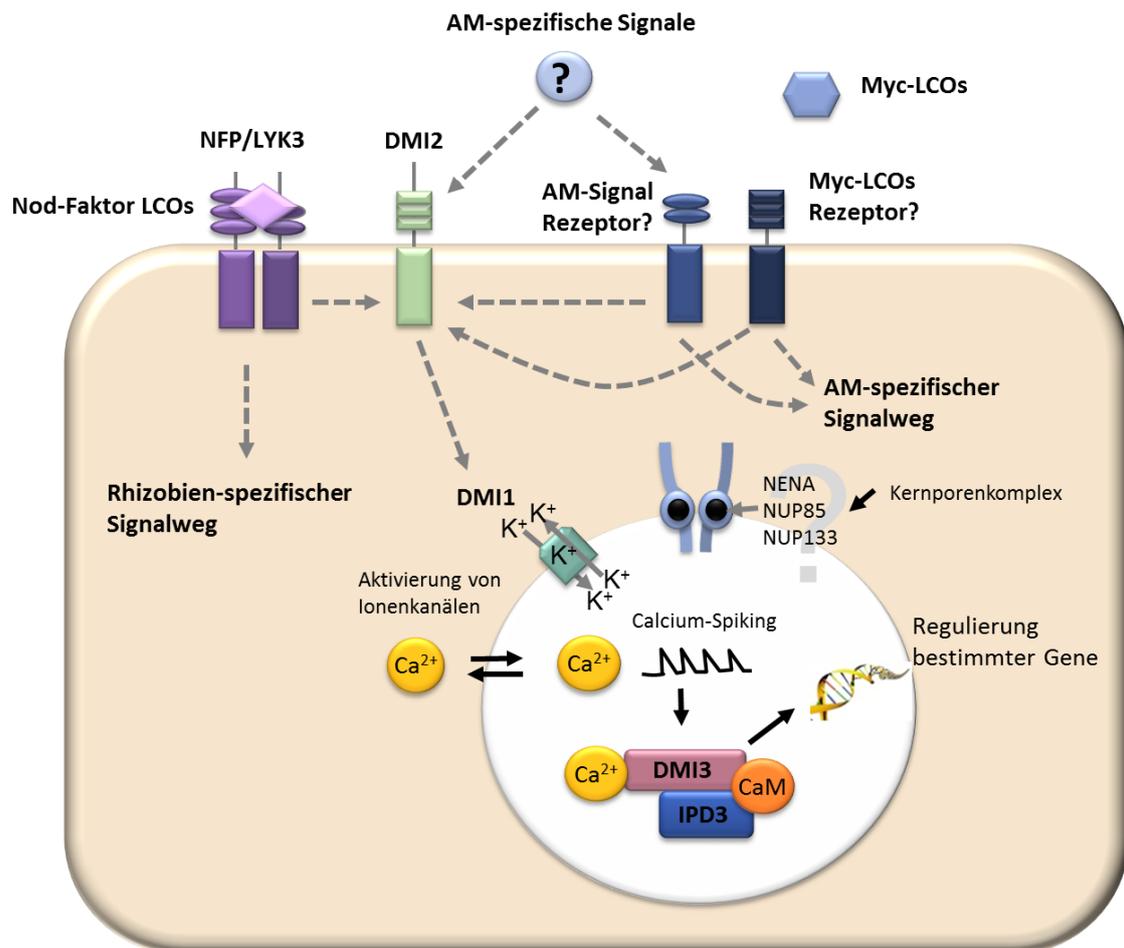


Abb. 1.2: Model des SYM-Signalwegs in *M. truncatula*

Die Perzeption von AM- und Rhizobien-spezifischen Signalen erfolgt durch Rezeptoren in der Plasmamembran und steuert die frühe Signaltransduktion. Die symbiotische Rezeptor-ähnliche Kinase DMI2 und der Kalium-Kanal DMI1 sind den durch Nod- und Myc-Faktoren induzierten Calcium-Oszillationen übergeordnet. Die Kernporenproteine NUP85, NUP133 und NENA werden in *L. japonicus* für das Calcium-Spiking benötigt, ihre genaue Funktion ist bis jetzt nicht bekannt. Auch wurden noch keine Orthologe in *M. truncatula* beschrieben. Die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase DMI3 interagiert im Zellkern mit IPD3 und entschlüsselt das Calcium-Signal, was zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt.

Die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase DMI3 wird durch die Calciumströme aktiviert und induziert zusammen mit dem Zellkern-Protein IPD3 die Expression bestimmter Gene (Messinese *et al.*, 2007). DMI3 kann dabei die unterschiedlichen Muster der Calciumantwort erkennen und aktiviert entsprechend Mykorrhiza- oder Rhizobien-

spezifische transkriptionelle Programme (Kosuta *et al.*, 2008). In der Rhizobien-Symbiose aktiviert der DMI3/IPD3-Komplex die Expression der Transkriptionsfaktoren NSP1, NSP2, ERN1, ERN2 und ERN3 (Kaló *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005; Heckmann *et al.*, 2006; Andriankaja *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007; Middleton *et al.*, 2007). Vor kurzem konnte der Transkriptionsfaktor RAM1 identifiziert werden, der ausschließlich in der AM-Symbiose involviert ist und dessen Expression DMI2- und DMI3-abhängig ist. RAM1 reguliert die Expression von RAM2, eine Glycerol-3-phosphat Acyltransferase, die in der Biosynthese von Cutin-Monomeren involviert ist und so die Hyphopodien-Bildung auf der Wurzeloberfläche fördert (Gobbato *et al.*, 2012). Interessanterweise ist RAM2, aber nicht RAM1, auch in der Appressorienbildung während der pathogenen Oomyceten-Kolonisation beteiligt (Wang *et al.*, 2012). Das ist ein Hinweis darauf, dass Oomyceten die Funktion von Cutin-Monomeren als Signalmoleküle von den AM-Pilzen übernommen haben.

Die Tatsache, dass sowohl Nod-Faktoren als auch diffusible pilzliche Signale ein Calcium-Spiking auslösen und dieses in Nod-Faktor-Rezeptor Mutanten aufgehoben ist, setzt die Rezeptoren dieser Signalmoleküle an die Spitze des SYM-Signalwegs. Mehrere Arbeiten liefern allerdings auch Hinweise darauf, dass es sowohl in der Rhizobien-Symbiose als auch in der AM-Symbiose weitere Signalwege geben muss. So kann zum Beispiel ein konstitutiv aktives DMI3 Protein, welches in Nod-Faktor-Rezeptor Mutanten exprimiert wird, die Ausbildung von Wurzelknöllchen induzieren, nicht aber die Infektion mit Rhizobien (Hayashi *et al.*, 2010). Außerdem existierten Mykorrhiza-spezifische Gene, deren Expression unabhängig vom SYM-Signalweg, aber als Antwort auf diffusionsfähige pilzliche Signale, angeschaltet wird (Kosuta *et al.*, 2003; Gutjahr *et al.*, 2009; Kuhn *et al.*, 2010). Diese Signale sind zwar noch nicht identifiziert, sind aber Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.4 Die symbiotische Rezeptor-ähnliche Kinase DMI2

DMI2 ist eine Rezeptor-ähnliche Kinase, die in der Plasmamembran lokalisiert und in Wurzeln konstitutiv exprimiert wird (Limpens *et al.*, 2003, Bersoult *et al.*, 2005). Der zytoplasmatische Teil des Proteins enthält eine Serin/Threonin-Kinase, die funktional ist und Auto- sowie Transphosphorylierungsaktivität besitzt (Yoshida & Parniske, 2005 und diese Arbeit). Eine kurze C-terminale Verlängerung mit unbekannter Funktion ist der Kinasedomäne angeschlossen. Eine Transmembrandomäne verankert das Protein in der Zellmembran. Zwischen der Kinasedomäne und der Transmembrandomäne befindet sich eine kurze Sequenz von 56 Aminosäuren, die als Juxtamembrandomäne bezeichnet wird. Für das Ortholog LjSYMRK konnte gezeigt werden, dass ein Threoninrest in dieser Region, welcher auch in DMI2 konserviert ist, die Kinaseaktivität reguliert (Yoshida & Parniske, 2005). Im extrazellulären Bereich, kurz hinter der Transmembrandomäne, befinden sich drei Leucin-rich-repeats. Leucin-rich-repeats (LRRs) sind Sequenzmotive mit einer Länge von 20 bis 29 Aminosäuren, die in vielen Proteinen mit verschiedensten Funktionen in bis über 30facher Wiederholung vorkommen können (Shiu & Blecker, 2001). DMI2 besitzt mit drei LRRs also nur wenige dieser Sequenzmotive. Jeweils ein

LRR-Motiv bildet eine β -Faltblattstruktur mit einer Länge von etwa 11 Aminosäuren, gefolgt von einem α -helikalen Bereich der gegenüber des β -Faltblatts zu liegen kommt. Diese dreidimensionale Struktur bildet sich allerdings nur aus, wenn die charakteristische Sequenz LxxLxLxxNxL vorhanden ist. Einzelne Leucinreste können dabei durch Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt werden. Eventuell existiert noch eine weitere LRR-Domäne kurz vor der Transmembrandomäne. Sie weist auch die Sequenz LxxLxLxxNxL auf, wobei aber zwei Leucine durch andere Aminosäuren ersetzt sind. LRRs können Proteine, aber auch andere Moleküle binden (Shiu & Bleecker, 2001). Eine weitere interessante Proteinregion befindet sich N-terminal von den LRRs: die LRRNT_2-Domäne. Sie enthält mehrere Cysteine und zwei Tandem LRRs. Die Funktion dieser Domäne ist nicht bekannt, sie könnte eventuell dazu dienen die LRRs zu stabilisieren. Am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid, welches das Protein an die Plasmamembran lokalisiert und während der Proteinprozessierung abgespalten wird.

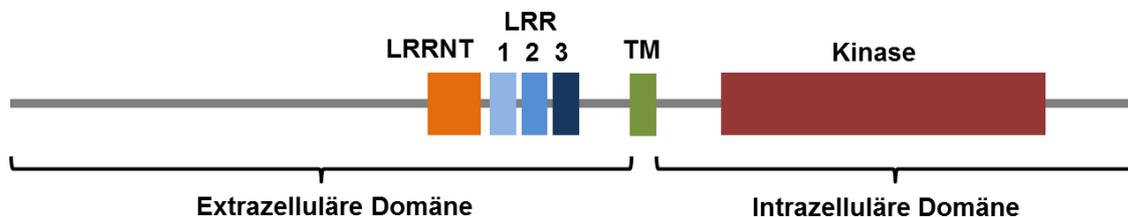


Abb. 1.3 Die Proteinstruktur der Rezeptor-ähnlichen Kinase MtDMI2

Das Protein ist über eine Transmembrandomäne (TM, grün) in der Plasmamembran verankert. Im extrazellulären Bereich finden sich drei Leucin-rich-repeats (LRR, blau) und eine LRRNT_2-Domäne mit unbekannter Funktion (orange). Die intrazelluläre Domäne besteht aus einer funktionalen Kinasedomäne (dunkelrot).

Für DMI2 konnten Orthologe in verschiedenen Pflanzen identifiziert werden, unter anderem SYMRK in *Lotus japonicus*, NORK in *Medicago sativa* und SYM19 aus *Pisum sativum* (Endre *et al.*, 2002). Die Rezeptorkinase ist in Leguminosen stark konserviert. Die Nichtleguminosen *Lycopersicon esculentum*, *Oryza sativa* und *Zea mays* weisen im Vergleich zu den Leguminosen eine fast identische Kinase-Domäne auf, besitzen aber eine stark unterschiedliche extrazelluläre Domäne (siehe Abbildung 1.4). Während die LRRNT_2 Domäne sowie die LRR1- und LRR2-Region konserviert sind, existiert eine LRR3-Domäne nur in den Leguminosen. Sehr interessant ist auch das Fehlen großer Teile der extrazellulären Domäne bei den Nichtleguminosen Reis und Mais, während bei der ebenfalls Nichtleguminose Tomate diese Regionen vorhanden sind (Markmann *et al.*, 2008).

Untersuchungen der extrazellulären Domäne ergaben, dass die kurze Proteinversion aus Reis ausreichend ist, um in *L. japonicus symrk* Mutanten die AM-Symbiose wiederherzustellen. Die Rhizobien-Symbiose hingegen benötigt für eine erfolgreiche Infektion das SYMRK-Protein einer Leguminose (Markmann *et al.*, 2008). Dies unterstützt die Theorie, dass das ursprüngliche DMI2/SYMRK Protein in seiner kurzen Version für die Erkennung von AM-spezifischen Signalen verantwortlich war und im Laufe der Evolution

durch das Zufügen weiterer Proteindomänen die Fähigkeit erlangt hat, Signale von Rhizobien zu erkennen. Welche Liganden an die extrazelluläre Domäne binden, konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden.

<i>DMI2_Medicago_truncatula/1-924</i>	1	ME	LQ	V	I	R	I	F	R	L	V	V	A	F	V	L	C	L	C	I	F	I	R	S	A	S	A	T	K	G	F	E	S	I	A	C	C	A	D	S	N	Y	T	D	P	K	T	T	L	T	Y	T	T	D	H	I	W	59				
<i>NORK_Medicago_sativa/1-925</i>	1	M	E	L	Q	V	I	R	I	F	R	L	V	V	A	C	V	L	C	L	C	I	F	I	R	S	A	S	A	T	K	G	F	E	S	I	S	C	C	A	D	S	N	Y	T	D	P	K	T	T	L	T	Y	T	T	D	H	I	W	59		
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	1	M	M	E	L	R	V	I	C	I	I	R	L	V	V	A	C	V	L	C	L	C	I	F	I	R	S	A	S	A	T	E	G	F	E	S	I	A	C	C	A	D	S	N	Y	T	D	P	K	T	N	L	N	Y	T	T	D	Y	R	W	60	
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	1	M	M	E	L	P	A	T	R	I	L	S	Q	A	V	T	C	F	L	C	L	I	F	I	G	S	A	S	A	T	E	G	F	E	S	I	A	C	C	A	D	L	N	Y	T	D	P	L	T	L	N	Y	T	T	D	Y	T	W	59			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	1	M	E	V	D	N	C	W	N	I	R	L	V	N	C	V	I	I	C	L	V	I	I	Q	S	A	F	A	Q	E	G	F	L	S	I	Q	C	C	A	T	A	N	F	T	E	P	R	T	N	L	S	W	I	S	D	G	I	W	58			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	60	F	S	D	K	R	S	C	R	Q	I	P	E	I	L	F	S	H	R	S	N	K	N	V	R	F	E	I	Y	E	G	K	R	C	Y	N	L	P	T	V	K	D	Q	V	Y	L	I	R	G	I	F	F	D	S	L	N	116					
<i>NORK_Medicago_sativa/1-925</i>	60	F	S	D	K	R	S	C	R	P	I	E	I	L	F	S	H	R	S	N	K	N	V	R	F	E	I	D	E	G	K	R	C	Y	L	P	T	I	K	D	Q	V	Y	L	I	R	G	V	F	F	D	S	L	N	116							
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	61	Y	S	D	K	S	N	C	R	Q	I	P	E	I	L	L	S	H	R	S	N	I	N	F	R	L	F	D	I	D	E	G	K	R	C	Y	N	L	P	T	I	K	D	Q	V	Y	L	I	R	G	T	F	F	D	S	V	N	117				
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	60	F	S	D	K	R	S	C	R	K	I	P	E	T	E	L	R	N	S	N	E	N	V	R	L	F	D	I	D	E	G	K	R	C	Y	N	L	P	T	I	K	N	G	V	Y	L	I	R	G	T	F	F	D	S	L	N	116					
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	59	F	P	E	N	Q	S	C	I	S	R	P	V	Y	K	S	E	H	Y	E	R	A	R	S	F	S	S	I	S	H	K	W	C	Y	S	L	P	T	R	K	E	H	D	Y	L	V	R	G	T	F	L	S	V	K	Q	E	K	T	L	117		
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	117	S	S	F	Y	V	S	I	G	V	T	E	L	G	E	L	R	S	S	R	L	E	D	L	E	I	E	G	V	F	R	A	T	K	D	Y	I	D	F	C	L	L	K	E	D	V	N	P	F	I	S	Q	I	E	L	R	P	L	P	174		
<i>NORK_Medicago_sativa/1-925</i>	117	S	S	F	Y	V	S	I	G	V	T	E	L	G	E	L	R	S	S	R	L	E	D	L	E	I	E	G	V	F	R	A	T	K	D	Y	I	D	F	C	L	L	K	E	D	V	N	P	F	I	S	Q	I	E	L	R	P	L	P	174		
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	118	T	S	F	Y	S	I	G	A	T	E	L	G	E	V	T	S	S	R	L	E	D	L	E	I	E	G	V	F	R	A	P	K	D	N	I	D	F	C	L	L	K	E	D	V	N	P	F	I	S	Q	L	E	L	R	P	L	P	175			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	117	S	S	F	N	A	S	I	G	V	T	L	G	A	V	R	S	S	R	L	E	D	L	E	I	E	G	V	F	R	A	T	K	D	Y	I	D	F	C	L	L	K	E	V	Y	P	F	I	S	Q	L	E	L	R	P	S	174					
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	118	P	H	S	S	F	V	V	L	I	G	V	T	P	I	A	T	V	K	S	S	D	E	L	K	V	E	G	I	F	R	A	T	R	S	Y	T	N	F	C	L	L	K	K	G	N	P	I	S	K	V	E	L	R	P	I	N	175				
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	175	E	E	Y	L	H	G	F	T	S	V	L	K	L	I	S	R	N	L	G	D	T	N	D	I	R	F	P	D	D	Q	N	D	R	I	W	K	R	K	E	T	S	T	P	S	A	L	P	L	S	F	N	V	S	N	V	233					
<i>NORK_Medicago_sativa/1-925</i>	175	E	E	Y	L	H	G	F	A	T	S	V	L	K	L	I	S	R	N	L	G	D	T	N	D	I	R	F	P	D	D	Q	N	D	R	I	W	K	R	K	E	T	S	T	P	S	S	A	L	P	L	S	S	N	V	S	N	V	233			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	176	E	E	Y	L	H	D	F	S	T	N	V	L	K	L	I	S	R	N	L	C	G	E	D	D	I	R	F	P	D	Q	N	D	R	I	W	K	K	E	T	S	T	P	S	S	A	L	P	L	S	F	N	V	S	N	V	232					
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	175	E	E	Y	L	D	F	P	T	S	V	L	K	L	I	S	R	N	L	G	D	T	K	D	I	R	F	P	D	Q	S	D	R	I	W	K	K	E	T	S	S	S	A	L	P	L	S	F	N	V	S	N	V	231								
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	176	S	D	Y	L	K	K	E	P	S	E	I	L	K	L	V	H	R	V	D	A	G	N	K	A	E	I	R	P	Y	D	Q	Y	D	R	I	W	R	P	A	S	N	L	E	S	Q	V	T	Q	T	P	S	I	I	K	H	V	F	235			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	234	D	L	K	D	S	V	T	P	P	L	Q	V	L	Q	T	A	L	T	H	P	E	R	L	F	V	H	D	G	L	E	T	D	D	Y	E	S	V	F	L	H	F	L	E	L	N	G	T	R	A	G	Q	R	V	F	D	I	Y	293			
<i>NORK_Medicago_sativa/1-925</i>	234	D	L	K	D	S	V	T	P	P	L	Q	V	L	Q	T	A	L	T	H	P	E	R	L	F	V	H	D	G	L	E	T	D	D	Y	E	S	V	F	L	H	F	L	E	L	N	G	T	R	A	G	Q	R	V	F	D	I	Y	293			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	233	E	L	N	G	K	V	T	P	L	Q	V	L	Q	T	A	L	T	H	P	E	R	L	F	V	H	D	G	L	E	T	D	D	Y	E	S	V	L	F	L	E	L	N	D	T	L	K	A	G	Q	R	V	F	D	I	Y	292					
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	232	D	L	N	A	N	T	P	P	L	Q	V	L	Q	T	A	L	T	H	P	E	R	L	F	I	H	T	D	L	E	T	E	D	Y	G	R	V	F	L	Y	F	L	E	D	R	T	L	D	R	T	L	K	A	G	Q	R	V	F	D	I	Y	291
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	236	A	R	K	H	S	L	L	P	P	A	F	V	L	R	T	A	L	T	H	P	E	R	L	D	F	L	H	E	D	L	D	G	Y	T	Y	S	L	F	L	Y	F	L	E	P	N	D	S	V	Q	A	G	E	R	V	F	Y	I	Y	295		
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	294	L	N	N	E	I	K	K	E	K	F	D	V	L	A	G	G	S	K	N	S	Y	T	A	L	N	I	S	A	N	G	S	L	N	I	T	L	V	K	A	S	G	S	E	F	G	P	L	L	N	A	Y	E	I	L	Q	A	R	S	W	352	
<i>NORK_Medicago_sativa/1-925</i>	294	L	N	N	E	I	K	K	E	K	F	D	V	L	A	G	G	S	K	N	S	Y	T	A	L	N	I	S	A	N	G	S	L	N	I	T	L	V	K	A	S	G	S	E	F	G	P	L	L	N	A	Y	E	I	L	Q	A	R	S	W	352	
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	293	L	N	S	E	I	K	K	E	F	D	V	L	E	G	G	S	K	Y	S	T	V	L	N	I	S	A	N	G	S	L	N	I	T	L	V	K	A	S	G	S	E	F	G	P	L	L	N	A	Y	E	I	L	Q	A	R	P	W	351			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	292	V	N	S	E	I	K	K	E	F	D	V	L	A	G	G	S	N	Y	R	D	V	L	D	I	S	A	S	G	S	L	N	V	T	L	V	K	A	S	G	S	E	F	G	P	L	L	N	A	Y	E	I	L	Q	A	R	P	W	350			
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	296	I	N	N	E	K	R	L	K	V	D	I	L	A	S	G	S	R	Y	L	D	V	V	L	N	F	R	A	N	R	S	V	N	L	T	M	I	K	A	S	N	S	Q	L	G	P	I	C	N	G	Y	E	I	L	K	A	L	P	R	S	354	
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	1	M	A	A	R	F	G	P	L	L	V	L	P	L	S	A	L	L	V	L	S	A	A	T	A	P	R	S	28																																	
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>	1	M	A	A	R	S	L	L	L	A	L	L	A	L	A	T	A	A	P	S	22																																									
<i>SYM19_Pisum_sativum/1-924</i>																																																														

DMI2_Medicago_truncatula/1-924	636	FDNELNLLSAIQHENLVPLLLGYCNEYDQQILVYPFMSNGSLLDRLYGEASKRRI LDWPT R	695
NORK_Medicago_sativa/1-925	637	FDNELNLLSAIQHENLVPLLLGYCNEYDQQILVYPFMSNGSLLDRLYGEASKRRI LDWPT R	696
SYM19_Pisum_sativum/1-924	636	FDNELNLLSAIQHENLVPLLLGYCNEYDQQILVYPFMSNGSLLDRLYGEASKRRI LDWPT R	695
SYMRK_Lotus_japonicus/1-923	635	FDNELNLLSAIQHENLVPLLLGYCNEYDQQILVYPFMSNGSLLDRLYGEASKRRI LDWPT R	694
SYMRK_Lycopersicon_esculentum/1-903	616	FNNELNLLSAITHENLVPLLLGYCNEYDQQILVYPFMSNGSLLDRLYGEASKRRI LDWPT R	675
SYMRK_Oryza_sativa/1-576	284	FNNELRLLSAVVRHDLNVLPLLLGYCNEYDQQILVYPFMSNGSLLDRLYGEASKRRI LDWPT R	343
SYMRK_Zea_mays/1-579	290	FNNELRLLSAVWHENLVPLLLGYCNEYDQQILVYPFMSNGSLLDRLYGEASKRRI LDWPT R	349
DMI2_Medicago_truncatula/1-924	696	LSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDVKSSNILLDQSMCAKVADFGFSKYAPQEGDSYVS	755
NORK_Medicago_sativa/1-925	697	LSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDVKSSNILLDQSMCAKVADFGFSKYAPQEGDSYVS	756
SYM19_Pisum_sativum/1-924	696	LSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDVKSSNILLDQSMCAKVADFGFSKYAPQEGDSYVS	755
SYMRK_Lotus_japonicus/1-923	695	LSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDIKSSNILLDQSMCAKVADFGFSKYAPQEGDSYVS	754
SYMRK_Lycopersicon_esculentum/1-903	676	LSIALGAARGLLYLHTFSEKCIHRDVKSSNILLDQSMCAKVADFGFSKYASQEGDSST	735
SYMRK_Oryza_sativa/1-576	344	LSVCI GAARGLAHLHGFAGRCIHRDVKSSNILLDQSMCAKVADFGFSKYAPQEGDSNAS	403
SYMRK_Zea_mays/1-579	350	LSVCI GAARGLVYLHNFAGRCIHRDIKSSNILLDQSMCAKVADFGFSKYAPQEGDSNPS	409
DMI2_Medicago_truncatula/1-924	756	LEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSFGVVLLLEIVSGREPLN IKRPR IEWSLVEWAKP	815
NORK_Medicago_sativa/1-925	757	LEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSFGVVLLLEIVSGREPLN IKRPR IEWSLVEWAKP	816
SYM19_Pisum_sativum/1-924	756	LEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSFGVVLLLEIVSGREPLN IKRPR IEWSLVEWAKP	815
SYMRK_Lotus_japonicus/1-923	755	LEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSFGVVLLLEIVSGREPLN IKRPR IEWSLVEWATP	814
SYMRK_Lycopersicon_esculentum/1-903	736	LEVRGTAGYLDPEYYSTQRLSAKSDVFSFGVVLLLEIVSGREPLN IKRPR IEWSLVEWAKP	795
SYMRK_Oryza_sativa/1-576	404	MEVRGTAGYLDPEYYSTQSLSTKSDVFSFGVVLLLEIVTGREPLDVKRPR DEWSLVEWAKP	463
SYMRK_Zea_mays/1-579	410	MEVRGTAGYLDPEYYSTQVLSSTRSDVFSFGVVLLLEIVTGREPLDVKRPR HEWSLVEWAKP	469
DMI2_Medicago_truncatula/1-924	816	YIRASKVDEIVDPG IKGGYHAEALWRVVEVALQCLEPYSTYRPCMVDI VRELEDAL IEN	875
NORK_Medicago_sativa/1-925	817	YIRASKVDEIVDPG IKGGYHAEALWRVVEVALQCLEPYSTYRPCMVDI VRELEDAL IEN	876
SYM19_Pisum_sativum/1-924	816	YIRASKVDEIVDPG IKGGYHAEALWRVVEVALQCLEPYSTYRPCMVDI VRELEDAL IEN	875
SYMRK_Lotus_japonicus/1-923	815	YIRGSKVDEIVDPG IKGGYHAEAMWRVVEVALQCLEPFSTYRPSMVAI VRELEDAL IEN	874
SYMRK_Lycopersicon_esculentum/1-903	796	LIRSSRVEEIVDPTI KGGYHGEALWRVVEVALACTETYSTYRPCMADI VRELEDAL IEN	855
SYMRK_Oryza_sativa/1-576	464	YIREYRIEELVDPG IKGGYCEAMWRVLEVASAGTEPFSTFRPSMEDVYVRELEDAL IEN	523
SYMRK_Zea_mays/1-579	470	YIREYKIEEMVDPG IKGGYCEAMWRVLEVASVTEPFSTFRPTMEDVLRLEDAL IEN	529
DMI2_Medicago_truncatula/1-924	876	NASEYMKSIDSLG - -GSNRYSI VMDKRALPSTTSTAES - - TITQTLSHPQPR	924
NORK_Medicago_sativa/1-925	877	NASEYMKSIDSLG - -GSNRYSI VMDKRALPSTTSTAES - - TITQTLSHPQPR	925
SYM19_Pisum_sativum/1-924	876	NASEYMKSIDSLG - -GSNRYSI VMDKRALPSTTSTAES - - TITQTNVSHPPQR	924
SYMRK_Lotus_japonicus/1-923	875	NASEYMKSIDSLG - -GSNRYSI IEKRVLPSTTSTAES - - TITQSLSHPPQR	923
SYMRK_Lycopersicon_esculentum/1-903	856	NASEYLSLDSF6 - -GSNRF SVERS - I VLPPIKSTEP - - SLLSKPAPPQPR	903
SYMRK_Oryza_sativa/1-576	524	NASEYMRS IESTGTLGSNRY - LSI DRKMFASGSARFASFDATKGHQLQTMPSPRG	576
SYMRK_Zea_mays/1-579	530	NASEYMRS IESTGTLGSNRY - LSI DRKMFASGSARIES - - MKGNLQAMPSPR	579

Abb. 1.4: Alignment von DMI2 mit Orthologen aus Leguminosen und Nicht-Leguminosen

Mit den Aminosäuresequenzen von DMI2 und Orthologen aus vier Leguminosen (*M. truncatula*, *M. sativa*, *P. sativum* und *L. japonicus*) und drei Nichtleguminosen (*L. esculentum*, *O. sativa* und *Z. mays*) wurde ein Alignment mit dem Programm ClustalW erstellt. In grün ist das Signalpeptid, in orange die LRRNT_2-Domäne, in türkis die drei LRRs, in violett die putative LRR4, in gelb die Transmembrandomäne und in rot die Kinasedomäne dargestellt.

Untersuchungen von Kosuta *et al.* (2011) lieferten erst kürzlich weitere Hinweise auf die Funktion der extrazellulären Domäne. Die *symRK-14* Mutante in *L. japonicus* ist in der epidermalen Kolonisierung durch Rhizobien und AM-Pilze stark eingeschränkt, aber zeigt eine normale Kolonisierung des Wurzelkortex. So können sowohl Wurzelknöllchen als auch Arbuskel gebildet werden, aber das Calcium-Spiking sowie die Bildung von Infektionsschläuchen in der Rhizobien-Symbiose und Hyphopodien in der AM-Symbiose sind drastisch reduziert. Die mutierte Aminosäure befindet sich in einem konservierten Motiv (GDPC) der LRRNT_2-Domäne im extrazellulären Teil von SYMRK (Kosuta *et al.*, 2011). *symRK*-Mutanten, die Mutationen in der Kinasedomäne aufweisen, haben bezüglich der AM-Symbiose einen ähnlichen Phänotyp. In der Rhizobien-Symbiose hingegen führen Mutationen in der Kinasedomäne nicht nur zu einer Blockierung der Symbiose in der Epidermis, sondern auch zu einer Unterdrückung der Wurzelknöllchen-Organogenese (Endre *et al.*, 2002, Stracke *et al.*, 2002). Dies bedeutet einerseits, dass das Motiv GDPC das epidermale vom kortikalen symbiotischen Programm entkoppelt und die Extrazellulärdomäne wahrscheinlich an der Transduktion von unterschiedlichen Signalwegen beteiligt ist. Da dieses Motiv nicht nur in allen DMI2/SYMRK Orthologen sondern auch in LRR-RLKs der nicht AM-Pflanze *Arabidopsis thaliana* vorkommt, ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Motiv direkt an der Bindung von symbiotischen Liganden beteiligt ist, sondern vielmehr zu einer korrekten Faltung des Proteins beiträgt

(Kosuta *et al.*, 2011). Andererseits zeigen die identischen Phänotypen der unterschiedlichen *symRK*-Mutanten in der AM-Symbiose, dass dieses Protein während der Mykorrhizierung nur in der epidermalen, nicht aber in der kortikalen Kolonisierung eine Rolle spielt.

Während für die extrazelluläre Domäne noch keine Interaktionspartner oder Liganden identifiziert werden konnten, sind für die intrazelluläre Kinasedomäne mittlerweile mehrere Interaktionspartner beschrieben. Eine Interaktion mit dem Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGR) wurde für die Kinasedomäne von DMI2 in *M. truncatula* gezeigt (Kevei *et al.*, 2007). Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Mevalonat aus 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA. Mevalonat ist ein Ausgangsprodukt für die Synthese von Isoprenoiden, die in Pflanzen in zahlreichen verschiedenen Verbindungen vorkommen und viele unterschiedliche Funktionen erfüllen. So ist auch das Pflanzenhormon Cytokinin eine Isoprenoid-Verbindung. Es stimuliert die Zellteilung und ist an der Organogenese von Wurzelknöllchen beteiligt. Die pharmakologische Inhibition von HMGR resultiert in einer verminderten Anzahl an Wurzelknöllchen. Die Aktivität von HMGR könnte daher durch DMI2 reguliert werden und durch eine verstärkte Cytokininbildung die Rhizobien-Symbiose positiv beeinflussen. Ebenso denkbar ist eine DMI2-HMGR-abhängige Modifizierung von spezifischen Isoprenoiden, die als Signalproteine zum Beispiel im SYM-Signalweg involviert sind. Die Synthese von Sterolen steht ebenfalls unter der Kontrolle von HMGR. Diese sind unter anderem Bestandteile der Zellmembran und in Säugerzellen an der Endozytose beteiligt. HMGR könnte daher die Sterolsynthese fördern und somit zu einer verbesserten Aufnahme der Rhizobien beitragen (Kevei *et al.*, 2007). Ob HMGR auch eine Funktion in der AM-Symbiose hat, ist nicht bekannt. Interessanterweise konnte in *M. truncatula* ein Membran-Steroid-bindendes Protein (MtMSBP1) identifiziert werden, dessen Expression in der AM-Symbiose schon vor dem Kontakt von Pilz und Wurzel induziert ist. Die Inaktivierung von MtMSBP1 führt zu einer Beeinträchtigung der Appressorienbildung und einer anormalen Morphologie der Arbuskel. Da Homologe dieses Proteins in Säugern in der Sterolsynthese beteiligt sind, könnte auch MtMSBP1 in diesem Syntheseweg involviert sein und zur Sterol-Homöostase beitragen (Kuhn *et al.*, 2010). Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch HMGR durch seine Aktivität in der Sterolsynthese zu einer erfolgreichen Etablierung der AM-Symbiose beiträgt.

Die *Mitogen-activated protein kinase kinase* (MAPKK) SIP2 konnte als Interaktionspartner von SYMRK in *L. japonicus* identifiziert werden. Die beiden Proteine phosphorylieren sich nicht gegenseitig, aber es konnte gezeigt werden, dass SIP2 eine MAPK aus *Arabidopsis* phosphorylieren kann und dies durch SYMRK inhibiert wird. Die Inaktivierung von SIP2 in der Rhizobien-Symbiose führt zu einer reduzierten Ausbildung von Infektionsschläuchen und Wurzelknöllchen. Dies würde bedeuten, dass SIP2 als positiver Regulator in der Rhizobiensymbiose fungiert, aber SYMRK den SIP2-Signalweg durch Inaktivierung von SIP2 inhibiert und somit als Negativregulator wirkt (Chen *et al.*, 2012). Da bisher alle Arbeiten zu DMI2/SYMRK ausschließlich eine positive Funktion dieser

Rezeptorkinase nachgewiesen haben, gilt es herauszufinden, wie die Kinase zusätzlich auch als Negativregulator funktionieren kann.

Ein Protein, was am Protein-Turnover von SYMRK beteiligt ist, wurde kürzlich in *L. japonicus* beschrieben. Die E3-Ubiquitin-Ligase SINA4, die zur Familie der SINA (*seven in absentia*) E3 Ligasen gehört, interagiert mit SYMRK und führt zur einer Relokalisierung des Proteins von der Plasmamembran in das Zytoplasma und in die Zellkernperipherie und damit zu Orten der proteosomalen Degradation. Eine ektopische Expression der E3-Ligase in *L. japonicus* resultiert in einer Reduzierung der Rhizobien-Symbiose. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die E3-Ligase SYMRK ubiquitiniert, das Protein so für den Proteinabbau markiert und damit indirekt einen negativen Einfluss auf die Rhizobien-Symbiose hat (Den Herder *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse sind gegensätzlich zu den Befunden von Yuan *et al.* (2012), die eine E3-Ubiquitin-Ligase (SIE3) einer anderen Familie als Positivregulator von LjSYMRK beschrieben haben. So konnten sie zeigen, dass eine Inaktivierung der Ubiquitin-Ligase die Infektion durch Rhizobien reduziert und die ektopische Expression von SIP3 zu einer verbesserten Infektion führt (Yuan *et al.*, 2012). Dies macht deutlich, dass die Regulation der DMI2/SYMRK-Aktivität und die daraus resultierende Effekte auf die Rhizobien-Symbiose weitaus komplizierter sind als bisher angenommen.

Hinweise auf eine mögliche Lokalisierung von DMI2 und den Nod-Faktor-Rezeptoren NFP und LYK3 in Mikrodomänen in der Plasmamembran konnten durch die Entdeckung eines Remorin-Proteins in *M. truncatula* erlangt werden. Dieses Protein, SYMREM, ist an die Plasmamembran angeheftet und interagiert dort sowohl mit DMI2 als auch mit NFP und LYK3. Das Remorin könnte daher als eine Art Gerüst dienen, was die symbiotischen Rezeptoren in eine räumliche Nähe bringt und so den Infektionsprozess reguliert. Die Inaktivierung von SYMRREM führt auch hier zu einer Reduzierung der Rhizobien-Infektion (Lefebvre *et al.*, 2010).

Auffällig ist, dass bei keiner der gefundenen Interaktionen eine Funktion in der AM-Symbiose beschrieben wurde, obwohl dies zumindest für die Ubiquitin-Ligase LjSINA4 und die MAPKK LjSIP2 untersucht wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass DMI2/SYMRK in der Lage ist, Signale von Rhizobien und AM-Pilzen zu unterscheiden und dadurch spezifische Signalwege angeschaltet werden.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen mit der Intrazellulärdomäne von DMI2 aus *M. truncatula* als Bait eine Proteinphosphatase als Interaktionspartner identifiziert werden. Die Funktion von Proteinphosphatasen soll daher im nächsten Kapitel näher beschrieben werden.

1.5 Proteinphosphatasen sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt

Proteinphosphatasen existieren in allen Pro- und Eukaryoten und sind am wichtigsten Mechanismus der Proteinregulation beteiligt: der reversiblen Proteinphosphorylierung.

Dieser Mechanismus ist Bestandteil zahlreicher Signalkaskaden und somit an der Regulation vieler zellulärer Prozesse beteiligt. (Cohen, 2000 und 2002a; Hunter, 2007). Es wird angenommen, dass 70% aller Proteine irgendwann im Laufe ihres Lebens phosphoryliert werden (Olsen *et al.*, 2010). Die am häufigsten phosphorylierten Aminosäuren sind Serin, Threonin und Tyrosin, wobei in *Arabidopsis* der prozentuale Anteil für phospho-Serin bei 82,7%, für phospho-Threonin bei 13,1% und für phospho-Tyrosin bei 4,2% liegt (Nakagami *et al.*, 2010). Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren erfolgt durch Proteinkinasen, ihre Gegenspieler, die Proteinphosphatasen, sind für die Dephosphorylierung zuständig. Im *Arabidopsis* Genom existieren über 1100 Proteinkinasen (Tchieu *et al.*, 2003) und ungefähr 150 Proteinphosphatasen (Kerk *et al.*, 2008). Dieser offensichtliche Zahlenunterschied spiegelt die Art der Spezifität wieder: während einzelne Kinasen aufgrund der Spezifität ihrer Kinasedomäne und weiterer Domänen und Motiven ihre Zielproteine spezifisch erkennen, sind viele Phosphatasen an sich nicht sonderlich spezifisch, sondern formen Multiproteinkomplexe mit weiteren regulatorischen Proteinen um Spezifität zu erlangen (Moorhead *et al.*, 2009).

Man unterscheidet drei Gruppen von Proteinphosphatasen: die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), die Serin/Threonin-Phosphatasen und die Aspartat-abhängigen Phosphatasen (Moorhead *et al.*, 2007). Phosphatasen mit dualer Spezifität (*dual specificity phosphatase*, DSP), die sowohl Serin/Threonin als auch Tyrosin dephosphorylieren können, werden zu der Familie der Tyrosin-Phosphatasen gestellt.

Die PTPs sind durch das Motiv CX₅R, das für die Katalyse verantwortlich ist, und durch eine große Vielfalt an Domänenstrukturen und Substratpräferenzen charakterisiert. So dephosphorylieren manche PTPs auch komplexe Kohlenhydrate, mRNA oder Phosphoinositide (Tonks, 2006). Das humane Genom codiert für mehr als 100 PTPs (Alonso *et al.*, 2004), die viele zelluläre Prozesse wie Zellteilung, -wachstum und -differenzierung regulieren (Hunter, 2009). In Pflanzen ist die Tyrosin-Phosphorylierung nur wenig erforscht, da hier keine typischen Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) und nur wenige PTPs existieren (Luan, 2002). Das Vorhandensein von 57 Kinasen (Rudrabhatla *et al.*, 2006) und 24 Phosphatasen (Kerk *et al.*, 2008) mit dualer Spezifität im Genom von *Arabidopsis* und der Nachweis von Tyrosin-Phosphorylierung durch Massenspektrometrie (Sugiyama *et al.*, 2008; Nakagami *et al.*, 2010) sprechen allerdings für eine nicht ganz unerhebliche Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung in Signalwegen der Pflanze. Ebenso konnten für einige der dual-spezifischen PTKs und PTPs Funktionen in der Pflanzenentwicklung, in der abiotischen und biotischen Stressantwort oder in der Cytoskelettorganisation nachgewiesen werden (Ghelis, 2011).

Die Serin/Threonin-Phosphatasen werden aufgrund enzymatischer Kriterien, die durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren und Aktivatoren bestimmt wurden, in zwei weitere Gruppen unterteilt: die Proteinphosphatasen 1 (PP1) und 2 (PP2) (Cohen, 1989). Eine weitere Unterteilung der PP2 wird durch den Bedarf an Metallionen für ihre Aktivität charakterisiert. So benötigt die Gruppe PP2A keine Metallionen, die Gruppe PP2B Ca²⁺ und die Gruppe PP2C Mg²⁺ oder Mn²⁺. Basierend auf Sequenzanalysen und Kristallstrukturen gibt es eine neuere Einteilung der Serin/Threonin-Phosphatasen in die

Gruppen Phosphoprotein Phosphatasen (PPP) und Phosphoprotein Metallophosphatasen (PPM). Die Gruppe der PPP umfasst PP1, PP2A und PP2B Phosphatasen sowie die Phosphatasen PP4 bis PP7. Alle PP2Cs und die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatasen gehören zur Gruppe der Metallophosphatasen (Cohen, 1997; Moorhead *et al.*, 2007). Erstaunlicherweise sind die PPP-Familie und die PPM-Familie in Bezug auf ihre Gensequenzen nicht miteinander verwandt, sondern haben sich wahrscheinlich aus zwei unterschiedlichen ancestralen Genen entwickelt. Eine anschließende konvergente Entwicklung beider Familien resultiert aber heute in sehr ähnlichen Strukturen im katalytischen Zentrum (Das *et al.*, 1996). Die PPP-Familie hat sich evolutionsgeschichtlich früh entwickelt, so dass es in allen Eukaryoten und in den meisten Bakterien und Archaeen mindestens einen Vertreter gibt (Moorhead *et al.*, 2009). Die als Heteromere agierenden Enzyme PP1 und PP2A zählen zu den am höchsten konservierten Proteinen überhaupt. Ihre Spezifität erlangen sie durch die Interaktion mit regulatorischen Untereinheiten, von denen für PP1 in Säugern über 140 existieren (Bollen *et al.*, 2010). Im *Arabidopsis* Genom konnten durch Sequenzvergleiche bisher nur 5 putative regulatorische Proteine gefunden werden (Farkas *et al.*, 2007). In Pflanzen besteht die PPP-Familie aus PP1, PP2A und PP4-7, zusätzlich besitzen sie 6 weitere Phosphatasen, für die es keine Orthologe in Säugern gibt (Moorhead *et al.*, 2009). Für einige Mitglieder konnten regulatorische Funktionen im Metabolismus, in der Entwicklung und im Zellzyklus, sowie in der Licht-, Stress- und Hormonperzeption gezeigt werden (Farkas *et al.*, 2007). Die zweite Untergruppe der Serin/Threonin-Phosphatasen, die PPM Phosphatasen, bilden die größte Familie aller pflanzlichen Phosphatasen, wobei vor allem die PP2Cs in Pflanzen stark vertreten sind. Da die in einem Y2H-Screen als Interaktionspartner von MtDMI2 identifizierte Phosphatase zur Familie der PP2Cs gehört, wird diese Familie im nächsten Kaptiel näher beschrieben.

Die Aspartat-abhängigen Phosphatasen sind im Gegensatz zu den anderen Phosphatasefamilien noch wenig erforscht. Diese Phosphatasen benutzen Aspartat als Nukleophil bei der Katalyse und besitzen alle das Motiv DXDXT/V (Moorhead *et al.*, 2007). Die einzelnen Enzyme enthalten neben der katalytischen Domäne weitere zusätzliche Domänen, die sich in Sequenz und Funktion unterscheiden. Man unterteilt die Phosphatasen in zwei Gruppen: die FCP/SCP-Phosphatasen und die HAD-Phosphatasen, die aber beide zur Familie der HAD-Proteine gehören (Moorhead *et al.*, 2009). Die FCP/SCP-Familie hat im Mensch 8 Mitglieder, in *Arabidopsis* sind es 19 (Kerk *et al.*, 2008). Für FCP1 konnte gezeigt werden, dass diese Phosphatase den C-Terminus der größten Untereinheit der RNA Polymerase II dephosphoryliert und in allen Eukaryoten konserviert ist (Archambault *et al.*, 1998, Kerk *et al.*, 2008).

1.6 Die Familie der Proteinphosphatasen 2C in Pflanzen

Die PP2C-Familie ist die größte Phosphatase-Familie in Pflanzen. In *Arabidopsis* konnten 80 und in Reis 90 PP2Cs identifiziert werden (Xue *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu besteht die PP2C-Familie im Menschen nur aus 18 Mitgliedern (Kerk *et al.*, 2008). PP2Cs existieren sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten und ihre

Anzahl sowie Diversität nimmt abgesehen von tierischen Organismen im Laufe der Evolution zu (Fuchs *et al.*, 2012). Die Enzyme sind als Monomere aktiv und neben einer konservierten katalytischen Domäne besitzen sie N- oder C-terminal weitere Domänen, die sich stark voneinander unterscheiden und für die Substratspezifität verantwortlich sein könnten (Schweighofer *et al.*, 2004). In einer Genom-weiten Analyse konnten 11 verschiedene charakteristische Motive in den PP2Cs von *Arabidopsis* und Reis identifiziert werden. Manche dieser Motive sind in allen PP2Cs weit verbreitet, während andere spezifisch für eine oder zwei Unterfamilien sind (Xue *et al.*, 2008). Bisher konnte nur einem kleinen Teil der pflanzlichen PP2Cs eine Funktion zugeordnet werden. In *M. truncatula* wurde bisher noch keine PP2C näher untersucht. In *Arabidopsis* ist die Anzahl an charakterisierten PP2Cs am höchsten. Neuste phylogenetische Analysen in *Arabidopsis* ergaben eine Unterteilung der PP2C-Familie in die 12 Unterfamilien A-L (Fuchs *et al.*, 2012).

Die Phosphatasen der Gruppe A sind am besten untersucht und sind ausschließlich an der Regulation von Abscisinsäure (ABA)-Signalwegen beteiligt. Dieses Phytohormon kontrolliert das vegetative Wachstum, die Samenkeimung und die stomatäre Transpiration (Finkelstein *et al.*, 2002). Weiterhin spielt ABA eine Rolle in der abiotischen und biotischen Stressantwort (Umezawa *et al.*, 2006). An der präzisen Regulation der unterschiedlichen ABA-Signalwege sind viele verschiedene Proteine beteiligt, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Die beteiligten PP2Cs interagieren mit cytoplasmatischen und kernlokalisierten Proteinen und übernehmen zahlreiche verschiedene Funktionen in den zellulären Reaktionen auf das ABA-Signal (Raghavendra *et al.*, 2010; Sreenivasulu *et al.*, 2012). Die meisten PP2Cs agieren hierbei als Negativregulatoren, indem sie in Abwesenheit von ABA mit SnRK2 Kinasen interagieren und diese in einem dephosphoryliertem Zustand halten, was eine Signalweiterleitung verhindert. In Anwesenheit von ABA bindet dieses an eine Gruppe von ABA-Rezeptoren (PYR/PYL/RCAR), die daraufhin an die PP2Cs binden und so die Inhibition der SnRK2 Kinasen aufheben. Die Kinasen können nun das ABA-Signal durch die Phosphorylierung weitere Proteine weitergeben (Santiago *et al.*, 2012, Fuchs *et al.*, 2012). Die Kombination verschiedener ABA-Rezeptoren, PP2Cs und Kinasen sowie die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu ABA und den jeweiligen Interaktionspartnern ermöglichen der Zelle mit spezifischen und fein regulierten Stressantworten zu reagieren.

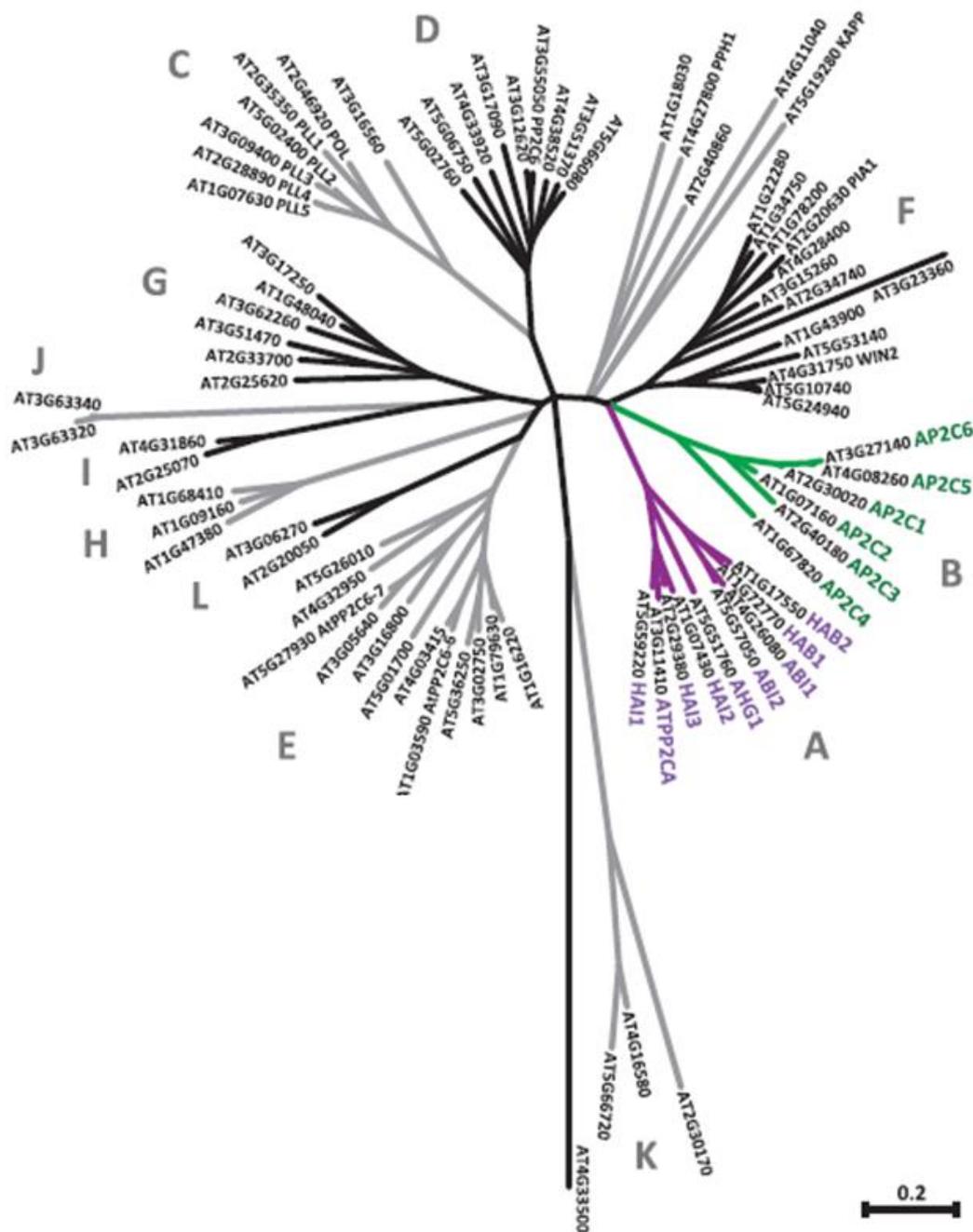


Abb. 1.5 Phylogenetischer Baum aller PP2Cs aus *Arabidopsis* nach Fuchs *et al.* 2012.
 Die PP2Cs lassen sich in die 12 Unterfamilien A-L unterteilen

Die PP2Cs der Gruppe B sind an der Regulation von MAP-Kinasen beteiligt. Vier Mitglieder (AP2C1-4) besitzen Kinase-Interaktions-Motive am N-Terminus des Proteins und wurden als MAPK Phosphatasen charakterisiert (Schweighofer *et al.*, 2007, Brock *et al.*, 2010, Umbrasaite *et al.*, 2010). AP2C1 inaktiviert die Stress-induzierten MAPKs MPK4 und MPK6 und ist an der Regulation des Jasmonat- und Ethylenlevels sowie in der Pflanzenabwehr beteiligt (Schweighofer *et al.*, 2007). Das Ortholog MP2C in *M. sativa* wurde ebenso als Interaktionspartner einer Stress-induzierten MAPK beschrieben (Meskiene *et al.*, 2003). *Arabidopsis* AP2C3 hingegen spielt in der Entwicklung der

Spaltöffnungen eine Rolle, die Substrate von AP2C3 sind allerdings mit denen von AP2C1 identisch, das heißt auch hier werden MPK4 und MPK6 (und zusätzlich MPK3) inaktiviert (Umbrasaite *et al.*, 2010). Da identische MAP Kinasen in unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sind, aber die Signalantworten dennoch spezifisch sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Spezifität durch die unterschiedlichen MAPK Phosphatasen erreicht wird. Dafür spricht auch das unterschiedliche Genexpressionsmuster der PP2Cs (Umbrasaite *et al.*, 2010).

Die PP2Cs POL (Poltergeist) und PLL1-5 (Poltergeist-like) bilden die Gruppe C. POL und PLL1 sind in ihrer Funktion redundant und kontrollieren die Bildung von Spross- und Wurzelmeristem (Song & Clark, 2005). PLL4 und PLL5 regulieren die Blattentwicklung, für PLL2 und PLL3 konnten noch keine Funktionen gefunden werden (Song & Clark, 2005). In Reis konnte ein orthologes Protein zu POL/PLL4-5 identifiziert werden: die PP2C XB15. Interessanterweise ist XB15 nicht in der Pflanzenentwicklung, sondern in der angeborenen Pflanzenimmunität beteiligt. XB15 dephosphoryliert die Rezeptor-ähnliche Kinase XA21 und reguliert so die XA21-vermittelte Pflanzenabwehr in negativem Sinne (Park *et al.*, 2008). Dies ist ein Beweis dafür, dass orthologe Proteine unterschiedliche Funktionen in den jeweiligen Organismen haben können.

Von 12 Mitgliedern der Gruppe E konnte bisher nur für PP2C6-6 eine Funktion beschrieben werden. Diese PP2C dephosphoryliert die Histon-Acetyltransferase GCN5, was die Acetylierung von spezifischen Lysinen in den H3 und H4 Histonen während der Licht-regulierten Genexpression verhindert. Auch hier agiert die PP2C als Negativregulator (Benhamed *et al.*, 2006).

Die Gruppe F ist mit 12 Mitgliedern die größte PP2C-Familie. Bisher sind aus dieser Gruppe zwei PP2Cs näher erforscht. Das Proteinlevel der Phosphatase PIA1 ist nach der Infiltration mit einem *Pseudomonas syringae*-Stamm, der den bakteriellen Typ III Effektor AvrRpm1 exprimiert, erhöht. Diese Induktion ist AvrRpm1 spezifisch, da AvrB, ein anderer Effektor von *P. syringae*, keinen Einfluss auf das Proteinlevel von PIA1 hat. *pia1* Mutanten sind resistenter gegenüber *P. syringae* (AvrRpm1), nicht aber gegenüber *P. syringae* (AvrB) (Widjaja *et al.*, 2010). Die genaue Funktion von PIA1 in der Pflanzenabwehr konnte aber bisher nicht ausreichend geklärt werden. Eine weitere PP2C, die ebenfalls eine Rolle in der Effektor-induzierten Abwehr spielt, ist WIN2. WIN2 interagiert *in vitro* mit dem Effektor HopW1-1 aus *P. syringae*. Eine Herunterregulierung von WIN2 durch RNA-Interferenz reduziert die HopW1-1-induzierte Pflanzenabwehr (Lee *et al.*, 2008).

Alle weiteren PP2C-Familien (D, G-L) wurden bisher nicht untersucht. Weiterhin existieren sechs PP2Cs, die keiner Familie zugeordnet werden können. Zwei dieser Phosphatasen sind in der Literatur beschrieben. KAPP interagiert mit verschiedenen RLKs und kontrolliert daher verschiedene Signalwege, die wiederum die Bildung von Meristem, die Zellteilung, die Pflanzenabwehr und/oder die Hormonantwort regulieren. Die Phosphatase PPH1/TAP38, die in der Thylakoidmembran lokalisiert und für die Dephosphorylierung von Proteinen des Lichtsammelkomplexes verantwortlich ist, konnte von zwei Arbeitsgruppen identifiziert werden (Pribil *et al.*, 2010, Shapiguzov *et al.*, 2010).

1.7 Ziel der Arbeit

Die symbiotische Rezeptor-ähnliche Kinase MtDMI2 spielt sowohl in der Symbiose mit Stickstoff-fixierenden Rhizobien als auch in der Symbiose mit AM-Pilzen eine bedeutende Rolle im Kolonisationsprozess. Wie diese Kinase Signale perzipiert und in die Pflanzenzelle weiterleitet, ist allerdings noch weitgehend unverstanden. Bisher konnten einige Interaktionspartner für die intrazelluläre Domäne von DMI2/SYMRK identifiziert werden, die alle einen Einfluss auf die Etablierung der Rhizobien-Symbiose haben. Allerdings wurde noch kein Interaktionspartner gefunden, der für die AM-Symbiose essentiell ist.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde ein Yeast-Two-Hybrid-Screen mit der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 gegen eine cDNA-Bibliothek aus mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln durchgeführt und es konnte eine Proteinphosphatase 2C als Interaktionspartner identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Interaktion weiter zu charakterisieren und ihre Bedeutung in der AM-Symbiose zu untersuchen. Die Interaktion soll zunächst mit weiteren Methoden verifiziert werden und die Spezifität durch den Einsatz weiterer Kinasen und Phosphatasen überprüft werden. Inaktivierung und Überexpression der Phosphatase in mykorrhizierten Wurzeln könnten dazu beitragen, die Funktion dieser Phosphatase zu verstehen. Ebenso soll untersucht werden, ob die Phosphatase die Kinaseaktivität von MtDMI2 reguliert und dadurch einen Einfluss auf die AM-Symbiose nimmt.

Die Charakterisierung der Interaktion von MtDMI2 und der Proteinphosphatase 2C kann dazu beitragen, die Funktion und Regulierung der Rezeptorkinase MtDMI2 und damit die Weiterleitung von AM-Signalen in die Pflanzenzelle besser zu verstehen. Ebenso können neue Erkenntnisse über die Substrate und die regulatorischen Funktionen von Proteinphosphatasen 2C gewonnen werden, über die bisher trotz ihrer starken Präsenz in pflanzlichen Genomen recht wenig bekannt ist.

2 Ergebnisse

2.1 Yeast-Two-Hybrid Analysen: Putative Interaktionspartner der Rezeptor-ähnlichen Kinase MtDMI2

Um potentielle Interaktionspartner der Rezeptor-ähnlichen Kinase MtDMI2 zu identifizieren, wurden Yeast-Two-Hybrid (Y2H) Analysen gegen eine cDNA-Bibliothek aus mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln durchgeführt. Voraussetzung hierfür ist eine Lokalisation des Bait-Proteins im Zellkern der Hefe. Da MtDMI2 eine Transmembrandomäne besitzt und in der Plasmamembran lokalisiert, wurden die extrazelluläre und intrazelluläre Domänen getrennt voneinander als Bait-Proteine in den Y2H-Analysen untersucht. Für die extrazelluläre Domäne wurden einige interagierende Proteine gefunden, diese konnten allerdings aufgrund ihrer Lokalisation im Zellinnern als Interaktionspartner ausgeschlossen werden. Ein einziger Kandidat, der eine Lokalisation in der Plasmamembran aufweist und daher als Interaktionspartner in Frage käme, war ein Ethylenrezeptor. Diese Interaktion konnte aber durch BiFC-Analysen *in planta* nicht bestätigt werden (Diplomarbeit Torsten Klug 2007, Diplomarbeit Nina Rieger 2008). Für die intrazelluläre Kinasedomäne jedoch konnten einige interessante putative Interaktionspartner isoliert werden (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 : Putative Interaktionspartner der intrazellulären Domäne von MtDMI2

Die blau gekennzeichneten Klone wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Klon Nr.	Annotation	Blastp JCVI (Mt3.5)	E-Wert
2	IMGA Medtr1g031650.1	ADP-Ribosylierungsfaktor, GTPase-aktivierendes Protein AGD12	4.4e-50
3		Kein Treffer	
5	IMGA Medtr6g026900.1	mRNA 3'-Ende prozessierendes Protein rna14	0
10	IMGA contig_16713_1.1	Proteinphosphatase 2C	0
12/32/55/57	IMGA Medtr7g009330.1	Porin in der äußeren Membran von Plastiden	0
13/36	IMGA Medtr6g021800.1	Elongationsfaktor 1-alpha	3.8e-62
14	IMGA Medtr4g108590.1	Coaktivator Transkription	8.4e-95
21	IMGA Medtr5g030430.1	BHLH (<i>basic helix-loop-helix</i>) Transkriptionsfaktor	2.9e-85
27	IMGA Medtr4g059630.1	Putatives Protein	1.6e-82
28	IMGA Medtr5g024880.1	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A Reduktase	0
31	IMGA Medtr2g101180.1	Coatomer Untereinheit delta-3	6.1e-115
40	IMGA Medtr2g011940.1	Transkriptionsrepressor VAL2 mit B3-Domäne	0
61	IMGA contig_51356_1.1	Poly(A) RNA Polymerase	8.2e-16

Alle Klone, bei denen eine Interaktion mit DMI2 denkbar schien (in der Tabelle blau unterlegt), wurden in weiteren Analysen mit dem Y2H-System in Hefe auf die Spezifität untersucht. Zunächst wurde getestet, ob die entsprechenden Proteine auch unspezifisch mit Lamin aus Hefe interagieren. Außerdem wurde getestet, ob die Proteine, die als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) vorliegen, auch mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne (DBD) alleine die Transkription der Reportergene anschalten können. Dazu wurden die isolierten Plasmide aus dem Y2H-Screen einzeln in den Hefestamm Y187 transformiert und mit AH109-Stämmen, die entweder die Intrazellulärdomäne der Rezeptorkinase (MtDMI2-ICD), Lamin oder den Leervektor pGBKT7 enthielten, gematet. Die diploiden Stämme wurden zur Selektion auf das Vorhandensein beider Plasmide auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan (SD-LW) ausplattiert. Anschließend wurde eine Kolonie auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Alanin (SD-LWHA) überführt, um die Interaktionsfähigkeit der Fusionsproteine zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Die drei putativen Transkriptionsfaktoren (Klon 14, 21, 40) sowie das Porin (Klon 12) interagierten nicht nur mit MtDMI2-ICD, sondern auch mit Lamin aus Hefe und dem leeren Bait-Vektor. Bei den Transkriptionsfaktoren wäre es denkbar, dass sie eine DNA-bindende Domäne besitzen und als Fusionsprotein mit der GAL4-Aktivierungsdomäne auch alleine die Transkription der Reportergene anschalten können und somit keine Interaktion mit einem GAL4-DBD-Fusionsprotein notwendig ist. Eine Interaktion konnte daher nur für die Proteinphosphatase (Klon 10) und das Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGR, Klon 28) bestätigt werden.

Tabelle 2.2 : Interaktionstest ausgewählter Klone aus dem Y2H-Screen mit dem Bait MtDMI2-ICD

Ausgewählte Klone wurden auf ihre Interaktionsfähigkeit mit MtDMI2, dem unspezifischen Hefeprotein Lamin (Lam) und der GAL4-DNA-bindenden-Domäne (DBD) alleine getestet. SD-LW Medium selektiert auf das Vorhandensein des Bait-und Prey-Plasmids, SD-LWHA auf die Aktivierung der Reportergene durch Proteininteraktion. + Kolonien sind gewachsen, - keine Kolonien auf der Platte

Klon	DBD-DMI2-ICD		DBD-Lam		DBD	
	-LW	-LWHA	-LW	-LWHA	-LW	-LWHA
10	+	+	+	-	+	-
12	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	-	+	-
40	+	+	+	+	+	+

Um die Stärke der Interaktion zu testen, wurden die obigen Klone mit Hilfe des α -Galaktosidase-Tests untersucht. Mit diesem Test kann anhand der Blaufärbung der Kolonien die Stärke der Proteininteraktion semi-quantitativ bestimmt werden (Abschnitt 4.8.2). Als Positivkontrolle wurde ein diploider Hefestamm von Clontech benutzt, der die beiden Plasmide pGADT7-RecT und pGBKT7-p53 enthält. RecT und p35 zeigen eine

starke Interaktion, was zu einer deutlichen Blaufärbung der Kolonie führt. Außerdem wurden die Klone auch auf eine unspezifische Interaktion mit dem Protein Lamin getestet.

DBD	AD	-LW	-LWHA
p53	RecT		
DMI2-ICD	Klon 10		
Lam	Klon 10		
DMI2-ICD	Klon 12		
Lam	Klon 12		
DMI2-ICD	Klon 14		
Lam	Klon 14		
DMI2-ICD	Klon 21		
Lam	Klon 21		
DMI2-ICD	Klon 28		
Lam	Klon 28		
DMI2-ICD	Klon 40		
Lam	Klon 40		

Abb. 2.1 α -Galaktosidase-Test ausgewählter Klone aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screen mit dem Bait MtDMI2-ICD

Getestet wurden die Stärke der Proteininteraktion zwischen den Klonen und MtDMI2-ICD sowie die unspezifische Interaktion, die die Klone mit dem Protein Lamin eingehen. SD-LW selektiert nur auf das Vorhandensein des Bait- und des Prey-Plasmids, SD-LWHA dagegen selektiert auf die Interaktion der Bait- und Prey-Proteine. Die Kombination p53 und RecT dient als Positivkontrolle (DBD: DNA-bindende Domäne; AD: Aktivierungsdomäne).

Wie man anhand der Abbildung erkennen kann, können alle Klone mit dem Bait MtDMI2-ICD interagieren, aber die Klone 12, 14, 21 und 40 zeigen zudem noch eine Interaktion mit dem Hefeprotein Lamin. Dies bestätigt die Ergebnisse des Matings. Anhand der Färbung der Kolonien lässt sich feststellen, dass die Interaktion der Klone 10, 12, 28 und 40 mit MtDMI2-ICD auf beiden Medien ähnlich stark ist wie die der Positivkontrolle. Eine Interaktion mit Lamin ist dagegen nicht vorhanden (Klon 10 und 28) oder im Falle von Klon 12 und 40 nur sehr schwach ausgebildet, was sich anhand der leichten Färbung der Kolonien erkennen lässt. Die Kolonien der diploiden Stämme Klon14/DMI2-ICD und Klon21/DMI2-ICD zeigen eine deutlich schwächere blaue Färbung im Vergleich zur Positivkontrolle, was auf eine schwache Interaktion hindeutet. Die unspezifische Interaktion mit Lamin ist bei diesen beiden Klonen ebenso vorhanden, allerdings ist diese schwächer als die Interaktion mit der intrazellulären Domäne von DMI2.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nur die Proteinphosphatase sowie das Enzym HMGR eine spezifische Interaktion mit der intrazellulären Domäne von MtDMI2 eingehen. HMGR wurde schon von Kevei und Kollegen (2007) als Interaktionspartner von MtDMI2 beschrieben. Dieses Enzym ist am Mevalonat-Syntheseweg und somit an der Synthese

vieler verschiedener Isoprenoide beteiligt, die in unterschiedlichen Formen auch Einfluss auf die Ausbildung von Rhizobien- und AM-Symbiose nehmen (siehe Abschnitt 1.4). Da die Interaktion zwischen MtDMI2 und HMGR schon publiziert war, wurde in dieser Arbeit die Proteinphosphatase zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

2.2 Bioinformatische Analysen der isolierten Proteinphosphatase 2C

Im Zuge des Y2H-Screens konnte zunächst nur der C-Terminus der Proteinphosphatase isoliert werden. Um die vollständige Sequenz zu erhalten wurden BLAST-Analysen in der Datenbank *Medicago truncatula Gene Index* durchgeführt. Die Protein-codierende Sequenz konnte so ermittelt werden (TC180625). Nach der vollständigen Sequenzierung und Publikation des *M. truncatula* Genoms im Jahre 2011 konnte auch das vollständige Gen identifiziert werden (contig_47270). Die genomische Sequenz besteht aus 3143 bp und enthält 4 potentielle Introns, wobei die codierende Sequenz 849 bp umfasst. Das Protein besitzt eine relativ kurze N-terminale Verlängerung und eine katalytische Domäne, die typisch für Proteinphosphatasen der Familie 2C ist. Diese beinhaltet eine Magnesium- bzw. Mangan-Bindestelle.

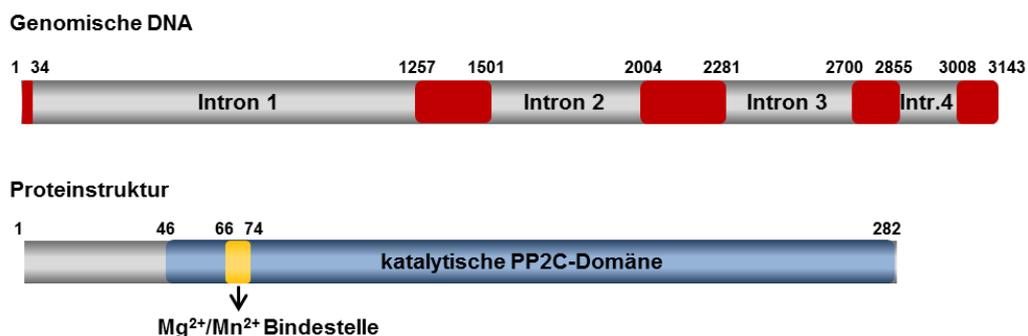


Abb. 2.2 Die Genom- und Proteinstruktur von MtPP2C2

Das Gen enthält 4 Introns (grau markiert) und 5 Exons (rot markiert). Die Nummern (in bp) entsprechen der Position der Exons in der genomischen Sequenz. Das Protein enthält eine katalytische PP2C-Domäne (blau) mit einer Mg²⁺/Mn²⁺-Bindestelle (gelb), die Positionen in der Aminosäuresequenz sind angegeben.

BLAST-Analysen haben weiterhin gezeigt, dass in *Lotus japonicus* ein orthologes Protein existiert, die Phosphatase LjPP2C2. In einem Artikel von Kapranov *et al.* (1999) wurde LjPP2C2 als homologes Protein zur Phosphatase LjNPP2C1 beschrieben. *LjNPP2C1* wurde aus einer *expressed sequence tag* (EST) cDNA-Bank isoliert, die aus unterschiedlich alten Wurzelknöllchen von *L. japonicus* gewonnen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen in Wurzelknöllchen signifikant hochreguliert wird, nicht aber die homologe Phosphatase *LjPP2C2*.

Aufgrund der Homologie der Phosphatasen aus *L. japonicus* und *M. truncatula* ist es denkbar, dass MtDMI2 nicht nur mit MtPP2C2 sondern auch mit MtNPP2C1 interagiert und diese Interaktion(en) für die AM-Symbiose von Bedeutung ist. Mit Hilfe einer BLAST-Analyse mit der Sequenz von LjNPP2C1 im *Medicago gene index* konnte das

entsprechende Ortholog in *M. truncatula* ermittelt werden. Allerdings war die Sequenz nicht vollständig, es fehlte der N-Terminus, welcher allerdings mittels 5'-RACE-PCR im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnte.

Ein Alignment der Phosphatasen aus *M. truncatula* und *L. japonicus* ist in Abbildung 2.3 zu sehen. Die jeweiligen orthologen Phosphatasen weisen eine große Homologie auf: 84% im Fall von MtPP2C2/LjPP2C2 und 70% bei MtNPP2C1/LjNPP2C1. Desweiteren sind die Proteine besonders in der C-terminalen katalytischen Domäne hoch konserviert.



Abb. 2.3 Alignment der Phosphatasen MtPP2C2 und MtNPP2C1 und der Orthologe aus *L. japonicus*
Das Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit ClustalW generiert. Die katalytische PP2C-Domäne ist gelb unterlegt, die Mg²⁺/Mn²⁺-Bindestelle mit einem roten Kasten und der Start der cDNA-Sequenz von MtPP2C2, die im Y2H-Screen isoliert wurde, mit einem grünen Pfeil markiert.

2.3 Die Expression von MtPP2C2 und MtNPP2C1 in mykorrhizierten Wurzeln

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Expression der Phosphatasen während der AM-Symbiose differentiell reguliert wird. Dazu wurden *M. truncatula* Pflanzen unterschiedlich lange mit *Rhizophagus irregularis* inokuliert (siehe Abschnitt 4.9.5). Die Wurzeln der Pflanzen wurden nach 1, 12 und 25 Tagen geerntet, die RNA isoliert und die Expression der Phosphatasen mittels qRT-PCR gemessen. Als Markergen für eine erfolgreiche Mykorrhizierung wurde *MtPT4* benutzt, welches für einen Phosphattransporter codiert. Dieses Gen wird ausschließlich in Zellen exprimiert, die Arbuskel enthalten (Harrison *et al.*, 2002). Insgesamt wurde das Experiment dreimal wiederholt.

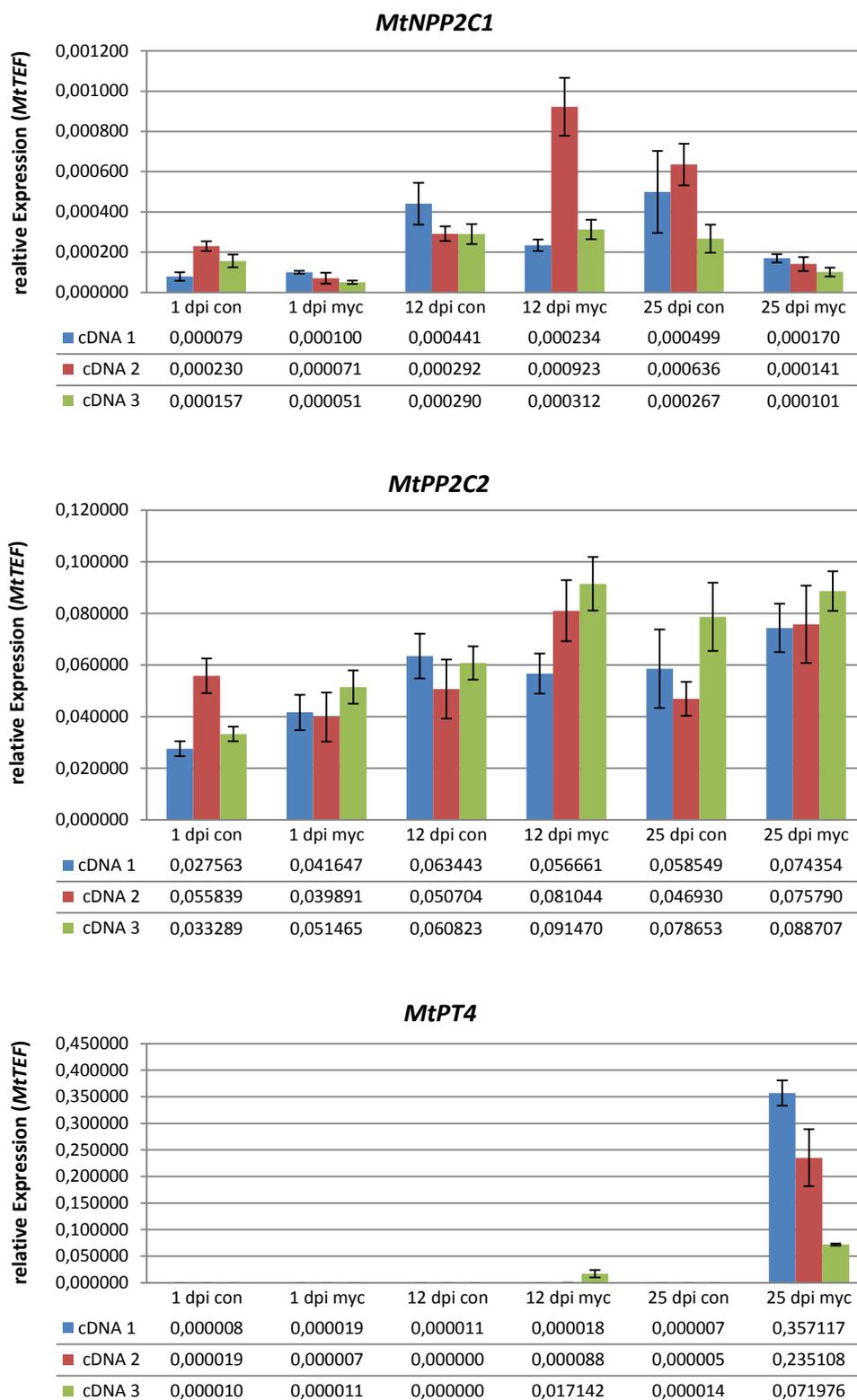


Abb. 2.4 Expression von *MtNPP2C1* und *MtPP2C2* in mykorrhizierten Wurzeln

Die Wurzeln von *M. truncatula* Pflanzen wurden für 1, 12 und 25 Tage in Flüssigmedium mit *R. irregularis* (myc) oder nur mit Medium (con) inkubiert. Gezeigt ist die relative Expression zum Haushaltsgen *MtTEF* von 3 biologischen Replikaten (cDNA 1-3). Die Expression von *MtPT4* wurde als Marker für das Vorhandensein von Arbuskeln verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

Voll mykorrhizierte Wurzeln mit funktionellen Arbuskel konnten anhand der Arbuskel-spezifische Expression von *MtPT4* hauptsächlich nach 25 Tagen Mykorrhizierung beobachtet werden. Die Expression der in Wurzelknöllchen induzierte Phosphatase *MtNPP2C1* war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle (25 dpi con) schwach reprimiert, während *MtPP2C2* keine signifikante Veränderung des Expressionslevels aufwies. Bei den beiden anderen Zeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied im Transkriptlevel beider Phosphatasen zwischen inokulierten und nicht-inokulierten Wurzeln festgestellt werden. Zwar konnte für *MtNPP2C1* eine Transkriptakkumulation nach 12 Tagen Mykorrhizierung gemessen werden. Da dies aber nur in einem der drei biologischen Replikate der Fall war, ist dies nicht repräsentativ. Im Durchschnitt war in jeder Wurzel die Transkriptmenge von *MtPP2C2* 100-mal höher als die von *MtNPP2C1*. Beide Phosphatasen scheinen jedoch keiner oder nur einer sehr geringen transkriptionellen Regulation während der AM-Symbiose zu unterliegen.

2.4 Verifizierung der Interaktion MtDMI2-ICD und MtPP2C2

2.4.1 Interaktionsstudien mit Hilfe des GAL4-Systems in Hefe

Im ursprünglichen Y2H-Screen konnte *MtPP2C2* als Interaktionspartner von *MtDMI2* gefunden werden, nicht aber die homologe Phosphatase *MtNPP2C1*. Um die Interaktion mit *MtPP2C2* näher zu charakterisieren und eine mögliche Interaktion mit *MtNPP2C1* zu untersuchen, wurden weitere Y2H-Tests durchgeführt. Dazu wurden *MtPP2C2* und *MtNPP2C1* aus cDNA amplifiziert und in die Y2H-Vektoren ligiert. Außerdem wurde der C-Terminus von *MtNPP2C1* separat kloniert. Weiterhin wurden die intrazellulären Domänen von 3 Rezeptor-ähnlichen Kinasen, die in ihrer Kinasedomäne eine große Homologie zu *MtDMI2* aufweisen, amplifiziert (TC102886 / Medtr2g075250, TC103254 / Medtr7g100630, TC108366 / Medtr2g103950). Diese Kinasen benutzten auch Kevei *et al.* (2007) um die Spezifität der Interaktion von *MtDMI2-ICD* mit dem Enzym HMGR zu untersuchen.

Die intrazellulären Domänen der Rezeptor-ähnlichen Kinasen wurden jeweils mit der DNA-bindenden Domäne (DBD) des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert (Vektor pGBKT7) und in den Hefestamm AH109 transformiert. Die Phosphatasen wurden jeweils in den Vektor pGADT7 kloniert und in den Hefestamm Y187 transformiert, dort werden sie als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) exprimiert. Nach erfolgreichem Mating wurden die erhaltenen diploiden Hefestämme auf SD-LW und SD-LWHA ausplattiert.

Wie anhand der Abbildung 2.5 zu erkennen ist, ist nur der Hefestamm auf dem Selektionsmedium SD-LWHA gewachsen, der die beiden Proteine *MtPP2C2-C* und *MtDMI2-ICD* exprimiert. Nur zwischen diesen beiden Proteinen findet daher eine Interaktion statt. Überraschenderweise kann *MtDMI2-ICD* nicht mit dem vollständigen *MtPP2C2* Protein interagieren. Auch eine Interaktion mit der homologen Phosphatase *MtNPP2C1* kann ausgeschlossen werden, sowohl die verkürzte Version als auch das

vollständige Proteine zeigten keinerlei Wachstum auf Selektionsplatten. Da der C-Terminus von MtPP2C2 nicht mit den hier getesteten Kinasen interagieren kann, kann davon ausgegangen werden, dass die Protein-Protein-Interaktion zwischen MtDMI2-ICD und MtPP2C2-C spezifisch ist. Diese Interaktion sollte daher in weiteren Untersuchungen mit anderen Methoden verifiziert werden. Die Phosphatase MtNPP2C1 wurde aufgrund des negativen Ergebnisses im Interaktionstest nicht weiter untersucht.

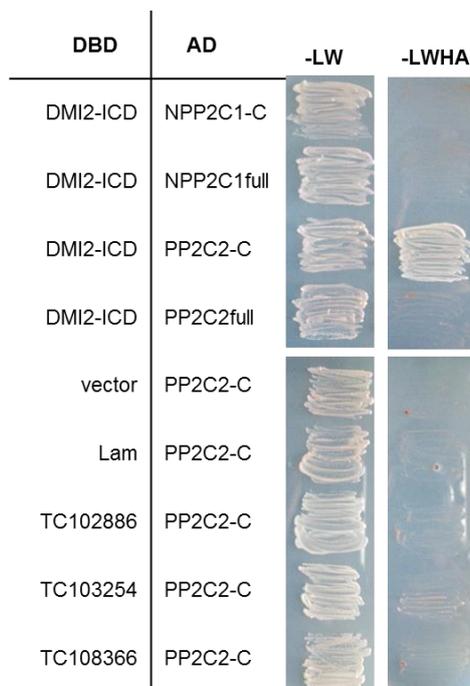


Abb. 2.5 Protein-Protein-Interaktionstest zwischen MtDMI2-ICD und den beiden Phosphatasen MtNPP2C1 und MtPP2C2 mit Hilfe des Y2H-Systems in Hefe.

DMI2-ICD sowie die Kinasedomänen der Rezeptor-ähnlichen Kinasen TC102886, TC103254 und TC108366 wurden durch Klonierung in den Vektor pGBKT7 mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne (DBD) fusioniert. Die Phosphatasen in voller Proteinlänge und als N-terminale verkürzte Varianten sind im Vektor pGADT7 an die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) gekoppelt. Die Anwesenheit des Bait- und Prey-Plasmids in den jeweiligen Hefestämmen wurde durch Wachstum auf SD-LW bestätigt. Eine erfolgreiche Interaktion, angezeigt durch Wachstum auf dem Selektionsmedium SD-LWHA, fand nur zwischen MtDMI2-ICD und PP2C2-C statt.

2.4.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation in *Nicotiana benthamiana*

Die bisherigen Ergebnisse zur Interaktion der Rezeptorkinase mit der Phosphatase wurden ausschließlich in Hefe generiert. Die Interaktion wurde daher auch *in planta* mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) weiter untersucht (Walter *et al.*, 2004). Die intrazelluläre Domäne von MtDMI2, sowie MtPP2C2 und MtPP2C2-C wurden unter dem 35S-Promotor als Fusionsproteine mit je einer Hälfte von YFP in *N. benthamiana* exprimiert. Als Negativkontrolle diente der C-Terminus des Ethylenrezeptors MtETR2 (817 bp), da dieser in vorangegangenen BiFC-Untersuchungen bereits als Interaktionspartner von MtDMI2 ausgeschlossen werden konnte (Diplomarbeit Nina Rieger). Die entsprechenden Vektoren wurden mit Hilfe von *A. tumefaciens* in die Blätter von Tabakpflanzen co-transformiert.

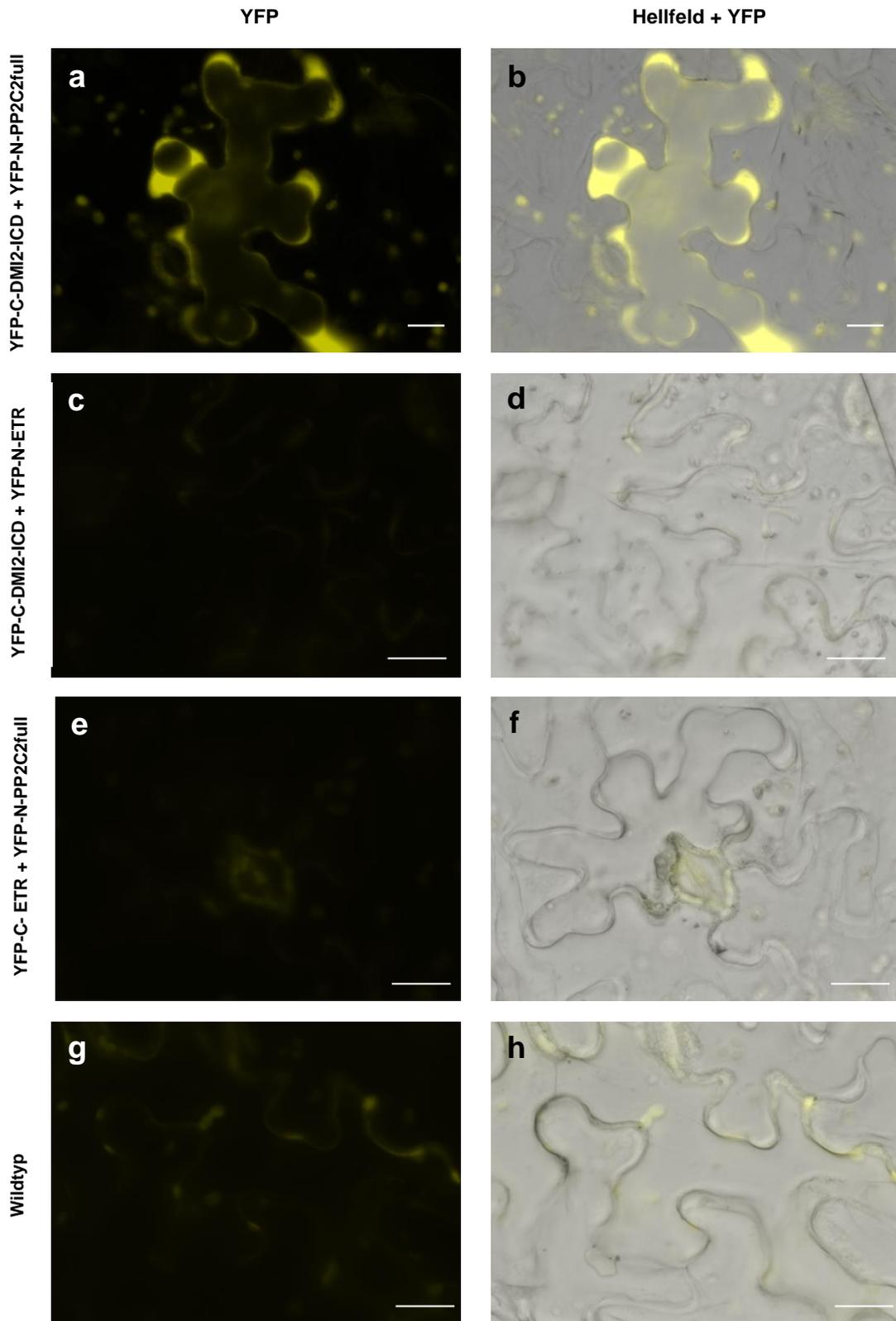


Abb. 2.6 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations-Analysen der Interaktion von MtDMI2-ICD und MtPP2C2full in *N. benthamiana* Blättern.

Die Proteine wurden als Fusionsproteine mit dem C-terminalen Part bzw. dem N-terminalen Part von YFP unter dem 35S Promotor exprimiert. Die transformierten Blätter wurden nach drei Tagen mit dem Epifluoreszenzmikroskop untersucht. In der linken Spalte sind Aufnahmen im YFP-Kanal zu sehen, rechts die Überlagerung von Hellfeld und YFP. Die Größenbalken entsprechen 20 μm . (a-b) MtDMI2-ICD und MtPP2C2full interagieren im Zytoplasma. In den Negativkontrollen (c-f) und im Wildtyp (g-h) konnte nur Autofluoreszenz detektiert werden.

Nach 3 Tagen wurden die Blätter mikroskopisch auf das Vorhandensein von einem YFP-Signal untersucht. Alle Fusionsproteine sollten im Cytoplasma lokalisieren. Bei einer erfolgreichen Protein-Protein-Interaktion wurde ein Fluoreszenzsignal im Cytoplasma erwartet. Eine Interaktion konnte sowohl für den C-terminalen Teil von MtPP2C2 (Daten nicht gezeigt) als auch für das komplette Protein gezeigt werden (siehe Abbildung 2.6). Hier erkennt man ein deutliches Fluoreszenzsignal im Cytoplasma der Zelle. In den Negativkontrollen und in Wildtyp Blättern konnte nur eine schwache Autofluoreszenz detektiert werden.

2.4.3 *In vitro* GST-Pull-down

In einem weiteren Ansatz wurde die Interaktion auf biochemischen Weg über einen Pull-down-Assay überprüft. Die entsprechenden Bait-Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem GST-Tag und die Prey-Proteine als 6xHis-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet, mechanisch aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamtproteinextrakt für die Pull-down Assays benutzt. Hierzu wurde der Gesamtproteinextrakt des GST-getaggen Bait-Proteins zunächst mit der Glutathion-Agarose über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Agarose abzentrifugiert, mehrmals mit Puffer gewaschen und mit dem His-getaggen Prey-Protein für 5 Stunden inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation und mehrmaligem Waschen wurde der Proteinkomplex durch Zugabe von freiem Glutathion von der Agarosematrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die jeweiligen Proteine wurden über einen Western Blot mit anti-GST- bzw. anti-His-Antikörpern detektiert.

Als Kontrolle wurde getestet, ob die His-getaggen Prey-Proteine auch an das GST-Protein alleine, also ohne fusioniertem Bait-Protein, binden können. Weiterhin wurde getestet, ob das His-gekoppelte Prey-Protein unspezifisch an die Matrix binden kann.

Alle Fusionsproteine konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden und lagen nach dem Zellaufschluss in der löslichen Fraktion vor. Die Gesamtproteinextrakte konnten daher ohne weitere Aufreinigungsschritte für den Pull-down-Assay benutzt werden. Sowohl der C-Terminus von MtPP2C2 als auch das vollständige MtPP2C2 Protein konnten zusammen mit GST-DMI2-ICD vom Glutathion-Agarose eluiert werden, das heißt beide Proteine interagieren *in vitro* mit der intrazellulären Domäne von MtDMI2. Da die Phosphatase nicht mit GST alleine eluiert werden konnte und auch nicht an die Matrix selbst gebunden hat, können unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden.

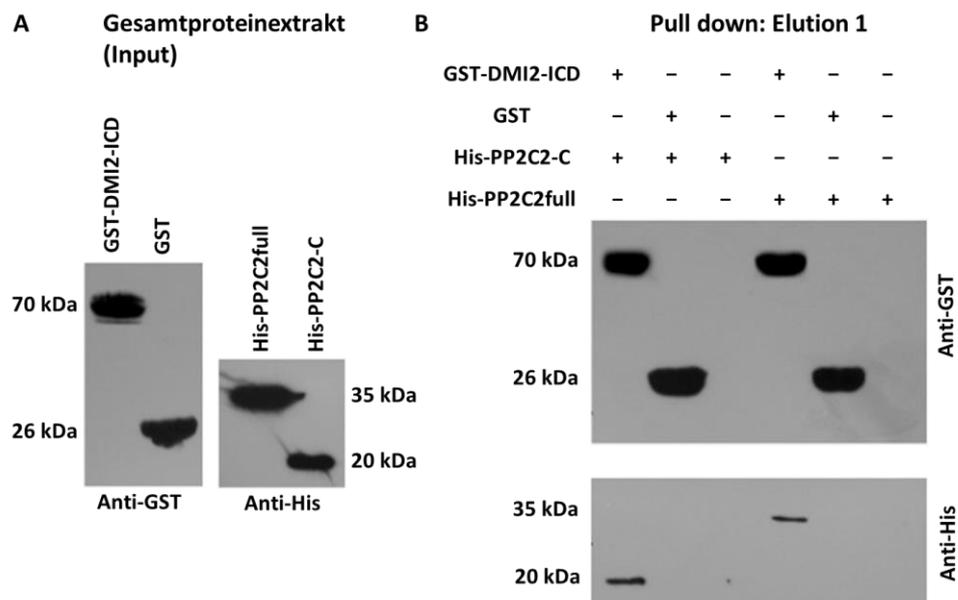


Abb. 2.7 *In vitro* GST-Pull-down von MtDMI2-ICD mit MtPP2C2.

A) Die Fusionsproteine GST-DMI2-ICD, His-PP2C2full, His-PP2C2-C sowie GST alleine wurden in *E. coli* exprimiert. Nach dem Zellaufschluss wurden 20 μ l der Gesamtproteinextrakte mittels SDS-Page aufgetrennt und die Expression der Fusionsproteine nach einem Western Blot mit anti-GST- bzw. anti-His-Antikörpern nachgewiesen. Der restliche Gesamtproteinextrakt wurde für den Pull-down verwendet. B) *In vitro* Pull-down: GST-DMI2-ICD oder GST alleine wurden mit Glutathion-Agarose über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte eine Inkubation für 5 h mit PP2C2-C oder PP2C2full. Die Proteinkomplexe wurden nach weiteren Waschschritten mit Glutathion von der Matrix eluiert. Die Elutionen wurden mittels SDS-Page aufgetrennt, die Proteine im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die getaggten Proteine anschließend mit anti-GST- bzw. anti-His-Antikörpern detektiert. Sowohl das PP2C2 Protein in seiner vollen Länge, als auch die N-terminal verkürzte Version (PP2C2-C) interagieren mit GST-DMI2-ICD, nicht aber mit GST alleine. Auch binden die Proteine nicht selbst an die Agarosematrix.

Die Ergebnisse der BiFC-Experimente in Tabak und des *in vitro* Pull-down-Assays bestätigen die Interaktion zwischen MtDMI2-ICD und der N-terminal verkürzten Variante von MtPP2C2. Zudem konnte im Gegensatz zum Y2H-System auch eine Interaktion mit der vollen Länge des MtPP2C2 Proteins beobachtet werden.

2.5 Die Juxtamembrandomäne von MtDMI2 ist für eine Interaktion mit MtPP2C2 ausreichend

Um zu analysieren, welche Teile der intrazellulären Domäne von MtDMI2 für die Interaktion mit MtPP2C2 von Bedeutung sind, wurden verschiedene verkürzte Versionen des Proteins auf ihre Interaktionsfähigkeit mit MtPP2C2-C mit Hilfe des Y2H-Systems in Hefe untersucht. Getestet wurden die Juxtamembrandomäne, die Kinasedomäne und der Carboxyterminus. Außerdem wurden eine Kombination aus Juxtamembran- und Kinasedomäne sowie eine Kombination aus dem C-terminalen Teil der Kinasedomäne, beginnend mit der Aktivierungsdomäne, und dem Carboxyterminus hergestellt. Alle Konstrukte wurden aus cDNA amplifiziert und in den Vektor pGBKT7 kloniert. Nach anschließender Cotransformation mit pGADT7-MtPP2C2-C in den Hefestamm AH109

wurden die erhaltenen Kolonien in verschiedenen Verdünnungen auf SD-LWHA ausgebracht, um auf die Interaktionsfähigkeit der beiden Fusionsproteine zu testen. Interessanterweise war die Juxtamembranregion alleine ausreichend für eine Interaktion mit dem C-Terminus der Proteinphosphatase. Die Interaktionsstärke, abgeschätzt anhand der Wachstumsfähigkeit auf SD-LWHA, war gleich der Interaktionsstärke mit der vollen intrazellulären Domäne. Auch die Kombination von Juxtamembrandomäne und vollständiger Kinasedomäne war fähig mit MtPP2C2 zu interagieren. Alle anderen getesteten Versionen zeigten kein Wachstum auf den Selektionsplatten.

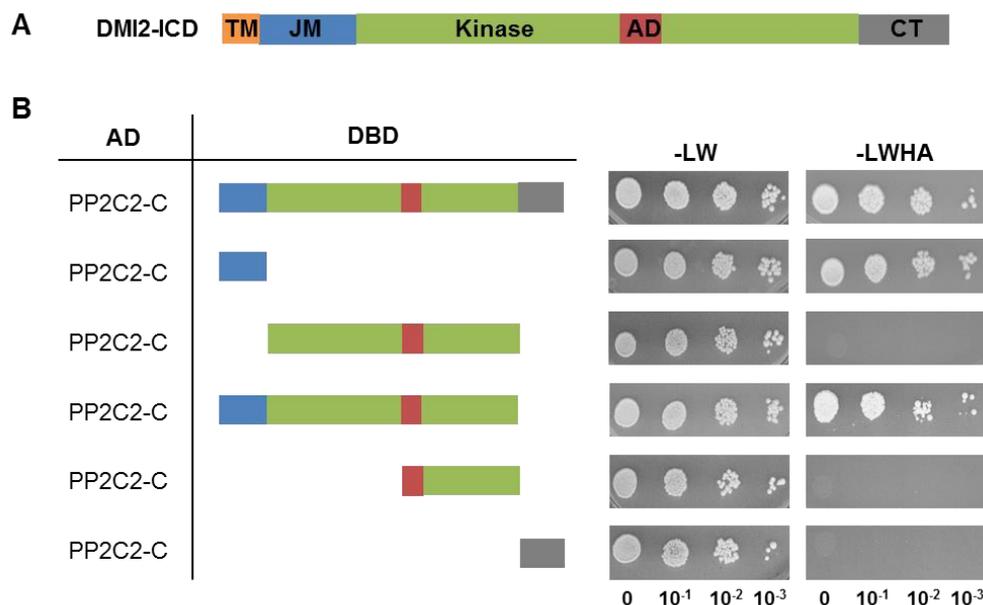


Abb. 2.8 Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen verschiedenen Varianten von MtDMI2-ICD und dem C-Terminus von MtPP2C2 mit Hilfe des Y2H-Systems in Hefe.

A) Schematische Skizze des intrazellulären Parts von MtDMI2 mit der Transmembrandomäne (TM) in orange, der Juxtamembrandomäne (JM) in blau, der Kinasedomäne mit Aktivierungsdomäne (AD, rot) in grün und dem Carboxyterminus (CT) in grau.

B) Verschiedene Teilstücke der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 wurden über Klonierung in den Vektor pGBKT7 mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne fusioniert, die Phosphatase MtPP2C2-C wurde in den Vektor pGADT7 kloniert und lag daher gekoppelt an der GAL4-Aktivierungsdomäne vor. Bait- und Prey-Plasmid wurden in den Stamm AH109 cotransformiert. Eine Kolonie wurde in dH₂O resuspendiert und unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungen auf SD-LW und SD-LWHA aufgetropft. Durch Wachstum auf SD-LW wurde eine erfolgreiche Transformation bestätigt. Auf SD -LWHA wachsen nur Hefestämme, bei denen Bait- und Prey-Protein interagieren. Die Juxtamembrandomäne konnte als Protein-Protein-Interaktionsdomäne von MtDMI2-ICD identifiziert werden.

2.6 Analyse von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignissen zwischen MtDMI2-ICD und MtPP2C2

Um weitere Hinweise auf eine biologische Relevanz der Interaktion von MtDMI2 und MtPP2C2 zu bekommen, wurde *in vitro* getestet, ob MtPP2C2 in der Lage ist die intrazelluläre Domäne von MtDMI2 zu dephosphorylieren oder ob die Phosphatase selbst ein Substrat von MtDMI2 ist und von der Kinase phosphoryliert wird. Für die orthologe Kinase LjSYMRK aus *Lotus japonicus* ist bekannt, dass die Intrazellulärdomäne *in vitro*

autophosphoryliert und eine starke Aktivität besitzt, um selbst unspezifische Substrate wie das Myelin-basische Protein, ein Protein der Myelinscheide von Nervenzellen, zu phosphorylieren (Yoshida & Parniske, 2005). Zunächst sollte getestet werden, ob dies auch für MtDMI2 zutrifft. Dazu wurde die Intrazellulärdomäne von MtDMI2 als Fusionsproteine mit 6xHis in *E. coli* exprimiert und über Nickelagarose aufgereinigt. Eine anschließende Entsalzung erfolgte über PD10-Säulen, von denen die Proteine mit 50 mM HEPES pH 7,4 in Fraktionen eluiert wurden. Die Expression und Aufreinigung von His-DMI2-ICD wurde mittels SDS-Page und Western Blot überprüft. Hier fällt auf, dass oberhalb der zu erwartenden Bande bei 47 kDa weitere Banden existieren, die sich nicht deutlich voneinander abgrenzen, sondern vielmehr als eine breite Bande erscheinen. Dieses Bandenmuster konnte auch mit dem His-Antikörper detektiert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Intrazellulärdomäne von MtDMI2 in *E. coli* phosphoryliert wird bzw. sich selbst phosphoryliert und die verschiedenen Banden unterschiedlich stark phosphorylierte Versionen des Fusionsproteins darstellen. Eine Autophosphorylierung in *E. coli* wurde zumindest für die orthologe Kinase LjSYMRK beschrieben (Yoshida & Parniske, 2005).

Die Phosphorylierungsexperimente wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Parniske von der LMU München durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen der His-getaggen Intrazellulärdomäne von MtDMI2 (Fraktion 4) wurden entweder alleine oder zusammen mit 10 µg des Myelin-Basischen-Proteins (MBP) für 30 min mit [γ - 32 P]ATP inkubiert. Die Reaktion fand in einem Kinasepuffer statt, der Mg^{2+} und Mn^{2+} Ionen enthält, die für die Aktivität der Kinase essentiell sind. Nach Abstoppen der Reaktion durch kurzes Erhitzen wurden die Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt, dieses mit Coomassie gefärbt, getrocknet und die Radioaktivität mit dem Phosphoimager detektiert. Mit beiden getesteten Konzentrationen von His-DMI2-ICD (5 µg und 1 µg) konnte sowohl eine Autophosphorylierung als auch eine Substratphosphorylierung von MBP beobachtet werden. Die Stärke der Phosphorylierung korrelierte hierbei mit der Konzentration von His-DMI2-ICD (Abbildung 2.9).

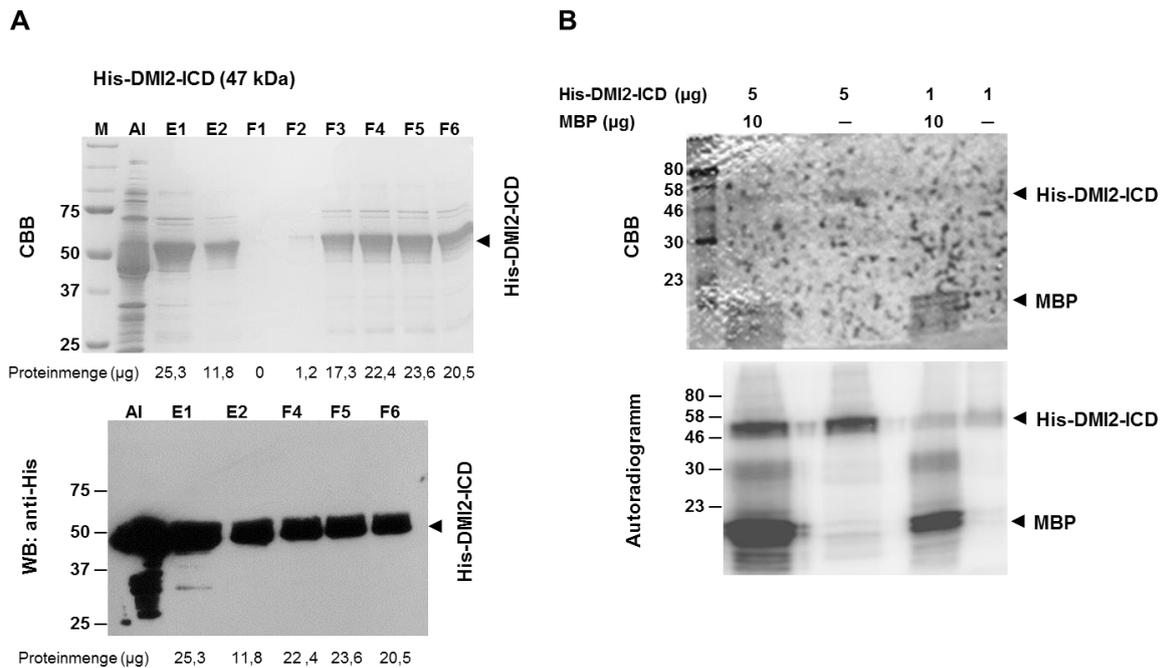


Abb. 2.9 Kinaseaktivität der intrazellulären Domäne von MtDMI2

A) Die His-getaggte Intrazellulärdomäne von MtDMI2 wurde in *E. coli* exprimiert und über Nickelagarose aufgereinigt. Die eluierten aufgereinigten Proteine (E1, E2) wurden zum Entsalzen auf eine PD10-Säule geladen und mit 50 mM HEPES in Fraktionen eluiert (F1-6). Die Expression und Aufreinigung von His-DMI2-ICD wurde mittels SDS-Page mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau Färbung (CBB) und Western Blot überprüft. Mit AI (after induction) ist eine Probe gekennzeichnet, die direkt vor der Zellernte entnommen wurde.

B) Die His-getaggte Intrazellulärdomäne (F4) wurde entweder alleine oder mit 10 µg MBP für 30 min mit [γ - 32 P]ATP in Anwesenheit von Mg^{2+} und Mn^{2+} inkubiert und anschließend auf ein SDS-Gel geladen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt (CBB), getrocknet und die Radioaktivität mit dem Phosphoimager detektiert. His-DMI2-ICD zeigte sowohl Auto- als auch Substratphosphorylierungsaktivität.

Mit dem Ergebnis einer erfolgreichen Autophosphorylierung konnte nun getestet werden, ob zwischen MtDMI2 und MtPP2C2 Transphosphorylierungen stattfinden können. Dazu wurde die Phosphatase als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und über Glutathion-Agarose aufgereinigt. Auch hier erfolgte ein Puffertausch über Säulen, so dass das GST-PP2C2 Protein schließlich in 50 mM HEPES vorlag. Expression sowie eine erfolgreiche Aufreinigung konnten über ein SDS-Gel und einen Western Blot bestätigt werden (Abbildung 2.10A). Zunächst wurde His-DMI2-ICD wie oben beschrieben mit [γ - 32 P]ATP autophosphoryliert, nach 30 min erfolgte die Zugabe von GST-PP2C2. Die Reaktion wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein SDS-Gel geladen. Nach Färben des Gels mit Coomassie wurde es getrocknet und radioaktiv markierte phosphorylierte Proteine mit dem Phosphoimager detektiert. Durch die Zugabe des Phosphatase-Inhibitors Natriumfluorid (NaF) in den Kontrollproben sollte festgestellt werden, ob eine mögliche Dephosphorylierung von DMI2 tatsächlich auf die Aktivität der Phosphatase zurückzuführen ist. Ebenso wurde getestet, ob NaF Auswirkungen auf die Autophosphorylierung von His-DMI2-ICD hat.

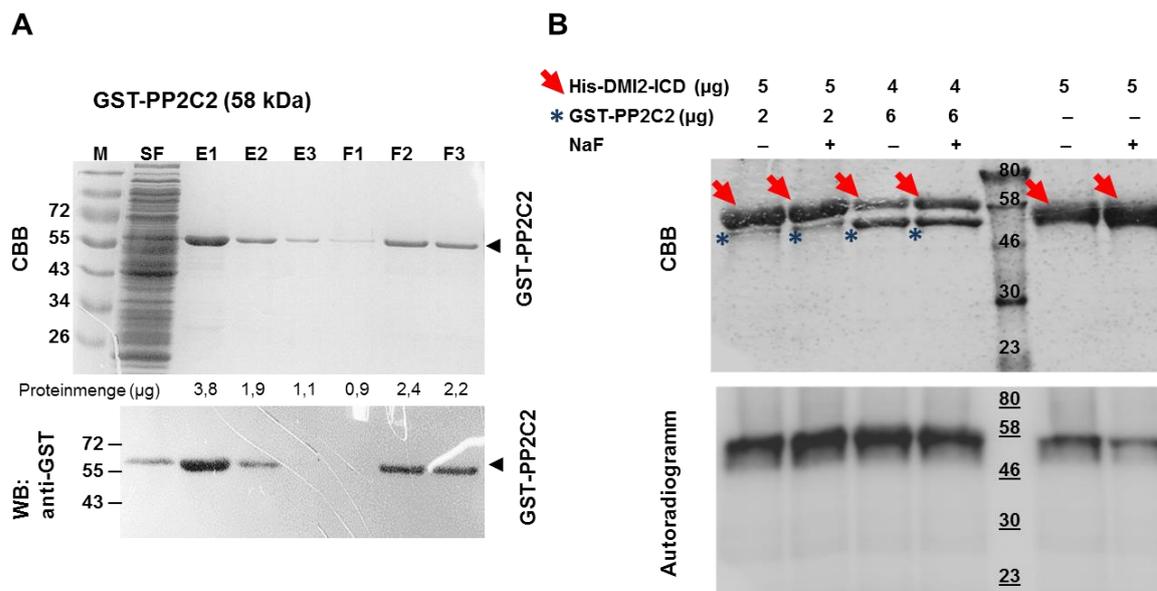


Abb. 2.10 Zwischen MtDMI2-ICD und MtPP2C2 konnte keine Transphosphorylierung detektiert werden

A) Die GST-getaggte Phosphatase MtPP2C2 wurde in *E. coli* exprimiert. Nach Aufschluss der Zellen und Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der Proteinüberstand (SF=soluble fraction) über Glutathion-Agarose aufgereinigt. Die eluierten aufgereinigten Proteine (E1, E2, E3) wurden zum Entsalzen auf eine PD10-Säule geladen und mit 50 mM HEPES in Fraktionen eluiert (F1-3). Die Expression und Aufreinigung von GST-PP2C2 wurde mittels SDS-Page mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau Färbung (CBB) und Western Blot (WB) überprüft.

B) Nach 30minütiger Autophosphorylierung von His-DMI2-ICD erfolgte die Zugabe von GST-PP2C2 (F2) in An- oder Abwesenheit des Phosphataseinhibitors Natriumfluorid (NaF, 20mM). Die Reaktion wurde für 10 min bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine über ein SDS-Gel. Nach Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) wurde es getrocknet und phosphorylierte Proteine mit dem Phosphoimager detektiert.

Betrachtet man zunächst das Coomassie-gefärbte SDS-Gel, so würde man aufgrund der zu erwartenden Proteingrößen annehmen, dass die obere Bande dem GST-PP2C2 Protein (58 kDa) zuzuordnen ist, während die untere Bande die His-getaggte Intrazellulärdomäne von MtDMI2 (47 kDa) widerspiegelt. Allerdings ist die Intensität der unteren Bande in Spur 1 und 2 deutlich von Spur 3 und 4 unterscheidbar und da die GST-getaggte Phosphatase in größeren Konzentrationsunterschieden eingesetzt wurde als His-DMI2-ICD, ist anzunehmen, dass die untere Bande doch dem GST-PP2C2 Protein entspricht. Ausgehend von dieser Annahme ist nur His-DMI2-ICD eindeutig phosphoryliert, während GST-PP2C2 keine eindeutige Radioaktivität aufweist. Es ist zwar ein schwaches Signal unterhalb der Bande von His-DMI2-ICD zu erkennen, dies ist aber auch bei den Kontrollen ohne GST-PP2C2 Protein vorhanden und daher eher auf verschieden stark phosphorylierte Versionen von His-DMI2-ICD zurückzuführen. Dies würde bedeuten, dass MtPP2C2 nicht von MtDMI2 phosphoryliert werden kann (Abbildung 2.10B).

Es besteht die Möglichkeit, dass die Phosphatase nur eine oder einige wenige Aminosäuren von MtDMI2 dephosphoryliert, dies aber aufgrund der zahlreichen putativen Phosphorylierungsstellen in der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 nicht zu einer sichtbaren Reduktion des Phosphorylierungslevels führt. Darum sollte die Intrazellulärdomäne in

kleinere Teilstücke unterteilt werden, um dadurch die mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen zu reduzieren. Da die Juxtamembrandomäne von MtDMI2 ausreichend für eine Interaktion mit MtPP2C2 ist, ist es denkbar, dass auch hier eine Dephosphorylierung des Proteins erfolgt. Die Interaktionsdomäne muss aber nicht zwangsläufig auch die Reaktionsdomäne sein. Daher wurden die Juxtamembrandomäne, die Kinasedomäne und der Carboxyterminus getrennt voneinander untersucht. Dabei entsprachen die ausgewählten Proteinbereiche denjenigen, die im Y2H-Screen verwendet wurden. Um eine Dephosphorylierung dieser DMI2-Varianten durch MtPP2C2 zu untersuchen, müssen diese zunächst phosphoryliert werden. Da eine Autophosphorylierung der Juxtamembrandomäne und des Carboxyterminus aufgrund einer fehlenden Kinasedomäne ausgeschlossen werden kann, müssen die Proteine zunächst von His-DMI2-ICD phosphoryliert werden. Die Kinasedomäne alleine war ebenso nicht fähig sich selbst zu phosphorylieren (Daten nicht gezeigt) und muss daher ebenso von His-DMI2-ICD phosphoryliert werden.

Zunächst wurden die DMI2-Konstrukte als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Nach Entsalzung über eine PD10-Säule und Elution der aufgereinigten Proteine mit 50 mM HEPES wurden die Proteine auf ein SDS-Gel geladen und nach einem Western Blot mit anti-GST-Antikörpern detektiert. Alle drei Fusionsproteine konnten erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden, allerdings wurden neben der zu erwartenden Banden der Fusionsproteine weitere kleinere Banden mit dem Antikörper detektiert (Abbildung 2.11A). Eine dieser Banden mit der Größe von ca. 26 kDa ist bei allen drei Fusionsproteinen zu sehen und entspricht der Größe des GST-Proteins, was auf eine teilweise Abspaltung des GST-Tags vom Fusionsprotein schließen lässt. Bei GST-DMI2-JM sind allerdings bis zu fünf Banden erkennbar, die alle sehr nahe beieinander liegen und im Western Blot teilweise nicht mehr unterscheidbar sind. Da die Banden alle kleiner sind als das Vollängenprotein repräsentieren diese Banden höchstwahrscheinlich Degradationsprodukte. GST-DMI2-Kin ist zwar ähnlich stark exprimiert wie die anderen beiden Fusionsproteine, wenn man die Proben miteinander vergleicht, die nach der Induktion und kurz vor der Zellernte (AI) entnommen wurden. Jedoch konnte nach der Aufreinigung deutlich weniger Proteine eluiert werden als bei den anderen Fusionsproteinen. Zudem lässt das Vorhandensein weiterer kleinerer Banden auf eine teilweise Degradation des Fusionsproteins schließen. Da aber alle Fusionsproteine auch als Vollängenprotein vorlagen, wurden sie benutzt, um eine mögliche Phosphorylierung durch His-DMI2-ICD zu testen.

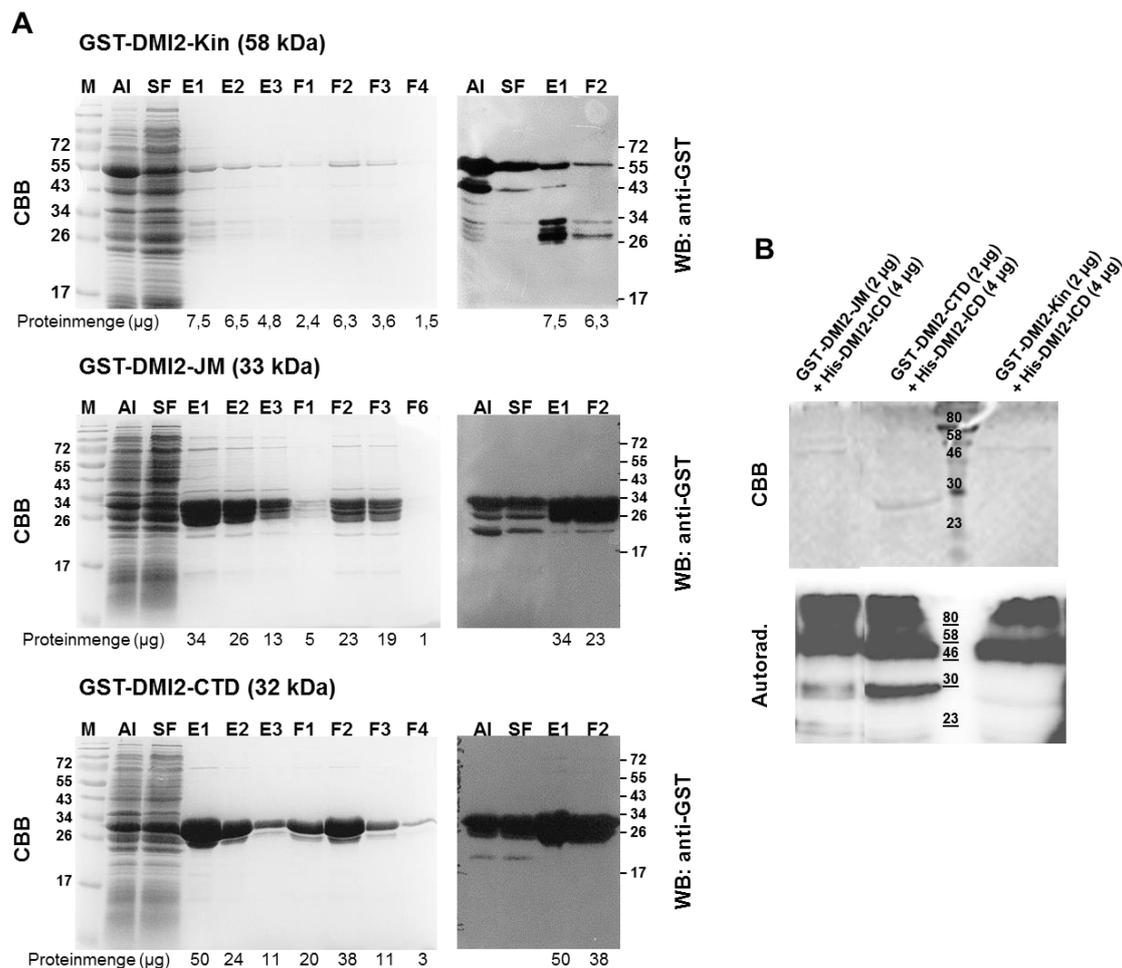


Abb. 2.11 Transphosphorylierung von verkürzten Varianten der Intrazellulärdomäne von MtDMI2

A) Die Kinasedomäne (Kin), die Juxtamembrandomäne (JM) und der Carboxyterminus (CTD) der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 wurden an GST fusioniert und in *E. coli* exprimiert. Nach Zellaufschluss und Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der lösliche Gesamtproteinextrakt (SF=soluble fraction) über Glutathion-Agarose aufgereinigt. Nach Elution (E1-3) der GST-Fusionsproteine wurden diese zum Entsalzen auf eine PD10-Säule geladen und mit 50 mM HEPES in mehreren Fraktionen (F) eluiert. Die Expression und Aufreinigung der Proteine wurde über eine SDS-Page mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau Färbung (CBB) und einem Western Blot (WB) überprüft. Mit AI (after induction) ist eine Probe gekennzeichnet, die direkt vor der Zellernte entnommen wurde.

B) GST-DMI2-JM (F2), GST-DMI2-CTD (F2) und GST-DMI2-Kin (F2) wurden für 30 min mit His-DMI2-ICD und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert und anschließend auf ein SDS-Gel geladen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt (CBB), getrocknet und die Radioaktivität mit dem Phosphoimager detektiert. Eine Transphosphorylierung konnte für GST-DMI2-CTD und GST-DMI2-JM beobachtet werden.

Dazu wurden die Proteine für 30 min mit 4 μg His-DMI2-ICD und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in Kinasepuffer inkubiert und anschließend mittels SDS-Page aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und phosphorylierte Proteine mit dem Phosphoimager detektiert. Offenbar wurde ein zu hochprozentiges Gel benutzt, so dass die Proteine teilweise im oberen Bereich des Gels akkumuliert sind, was man anhand eines starken radioaktiven Signals erkennen kann (Abbildung 2.11B). Dennoch konnte auch phosphoryliertes His-DMI2-ICD Protein in der zu erwartenden Größe detektiert werden. Eine Phosphorylierung konnte eindeutig für GST-DMI2-CTD beobachtet werden. GST-DMI2-JM zeigte ein schwaches radioaktives Signal, allerdings ist auch im Coomassie-Gel keine Bande zu erkennen, was für eine niedrigere Proteinkonzentration im Vergleich zu

GST-DMI2-CTD spricht, obwohl die eingesetzte Proteinmenge eigentlich identisch war. Die Bande von GST-Kin ist im Coomassie-Gel nicht zu erkennen. Im Autoradiogramm macht die geringe Größenauftrennung der Proteine aufgrund des hohen Acrylamid-Gehalts des Gels eine Unterscheidung zwischen der Bande von His-DMI2-ICD (47 kDa) und GST-DMI2-Kin (58 kDa) schwierig, weshalb keine Aussage über eine Phosphorylierung von GST-DMI2-Kin getroffen gemacht werden kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Intrazellulärdomäne von MtDMI2 eine *in vitro* Kinaseaktivität besitzt und auch in der Lage ist, verkürzte Varianten ihrer selbst zu phosphorylieren. Eine Phosphorylierung von MtPP2C2 durch die Kinase MtDMI2 konnte nicht beobachtet werden. Eine mögliche Dephosphorylierung der Kinase durch die Phosphatase konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden.

2.7 Funktion der Phosphatase MtPP2C2 in der AM-Symbiose

2.7.1 RNAi-vermittelte Inaktivierung von *MtPP2C2* hat keinen Einfluss auf die Mykorrhizierung

Während die Rezeptorkinase eine entscheidende Rolle bei der Kolonisierung der Pflanze spielt, ist für den Interaktionspartner MtPP2C2 noch völlig unklar welche Aufgabe er in der Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza übernimmt. Um die Funktion von MtPP2C2 in der AM-Symbiose zu charakterisieren, wurde zunächst versucht die Transkriptmenge durch RNAi herunter zu regulieren. Dazu wurde ein 246 bp Fragment, welches die Nukleotide von -20 bp bis +226 bp (bezüglich des ATG) beinhaltet, amplifiziert und in den RNAi-Vektor pK7GWIWG2DII in *sense* und *anti-sense* kloniert. Dieser Vektor wurde in *A. rhizogenes* transformiert, anschließend erfolgte die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *M. truncatula* Keimlingen. Erfolgreich transformierte Wurzeln zeigten keinerlei Veränderungen hinsichtlich Morphologie oder Wachstum. Fünf RNAi-Linien wurden auf die Expression von *MtPP2C2* mittels q-RT-PCR getestet. In allen getesteten RNAi Linien konnte eine Reduktion der Transkriptmenge um mindestens 90% erreicht werden.

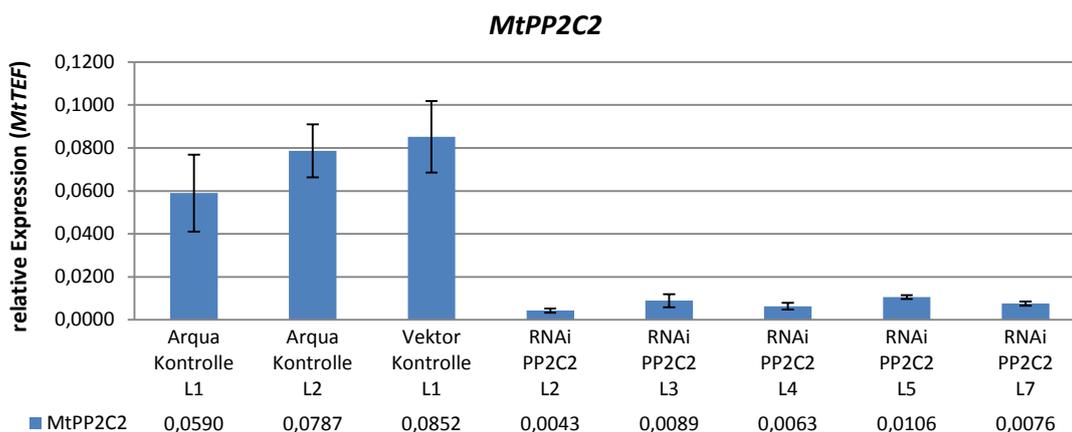


Abb. 2.12 RNAi-vermittelte Inaktivierung von *MtPP2C2*

Die RNAi-Linien zeigten im Vergleich zu den Kontrolllinien Arqua Kontrolle (mit *A. rhizogenes* ARqua1 transformierte Wurzeln) und der Vektorkontrolle (mit dem RNAi-Leervektor transformierte Wurzeln) eine Reduktion des mRNA Transkriptlevels um etwa 90%. Gezeigt ist die relative Expression zum Haushaltsgen *MtTEF*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

Bei drei RNAi-Linien wurde anschließend getestet, ob die Ausbildung der Symbiose mit dem AM-Pilz *R. irregularis* verändert ist. Dazu wurden die RNAi-Linien zusammen mit zwei Kontroll-Wurzellinien, die mit dem *A. rhizogenes* Wildtyp-Stamm ARqua1 transformiert wurden, sowie einer Wurzellinie, die mit einem den RNAi-Leervektor transformiert wurde, mykorrhiziert. Diese Wurzeln wurden im Zweikompartimentensystems (siehe Abschnitt 4.10.5) mit dem Pilz inokuliert, nach 3, 6 und 12 Tagen geerntet und das Myzel in der Wurzel mit Tinte gefärbt. Die Wurzeln wurden unter dem Mikroskop betrachtet und der Mykorrhizierungsgrad nach Trouvelot *et al.* (1986) bestimmt. Es wurde die Frequenz der Kolonisierung (F), die Intensität der Kolonisierung (M) und die Menge der Arbuskel (A), der intraradikalen Hyphen (I) und der Appressorien (Ap) in der Wurzel quantifiziert. Pro Wurzellinie und Zeitpunkt wurden drei Platten ausgewertet. Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 2.13 dargestellt, wobei die verschiedenen Parameter in Prozent angegeben sind.

Die MtPP2C2 RNAi-Linien zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit oder in der Intensität der Kolonisation im Vergleich zu den Kontrolllinien (Abbildung 2.13). Arbuskel, intraradikale Hyphen sowie Appressorien waren in allen Wurzellinien in vergleichbarer Zahl vorhanden. Auch konnten keine Unterschiede in der Arbuskelmorphologie beobachtet werden. Die Symbiose scheint daher durch die Inaktivierung der Phosphatase nicht beeinflusst zu sein.

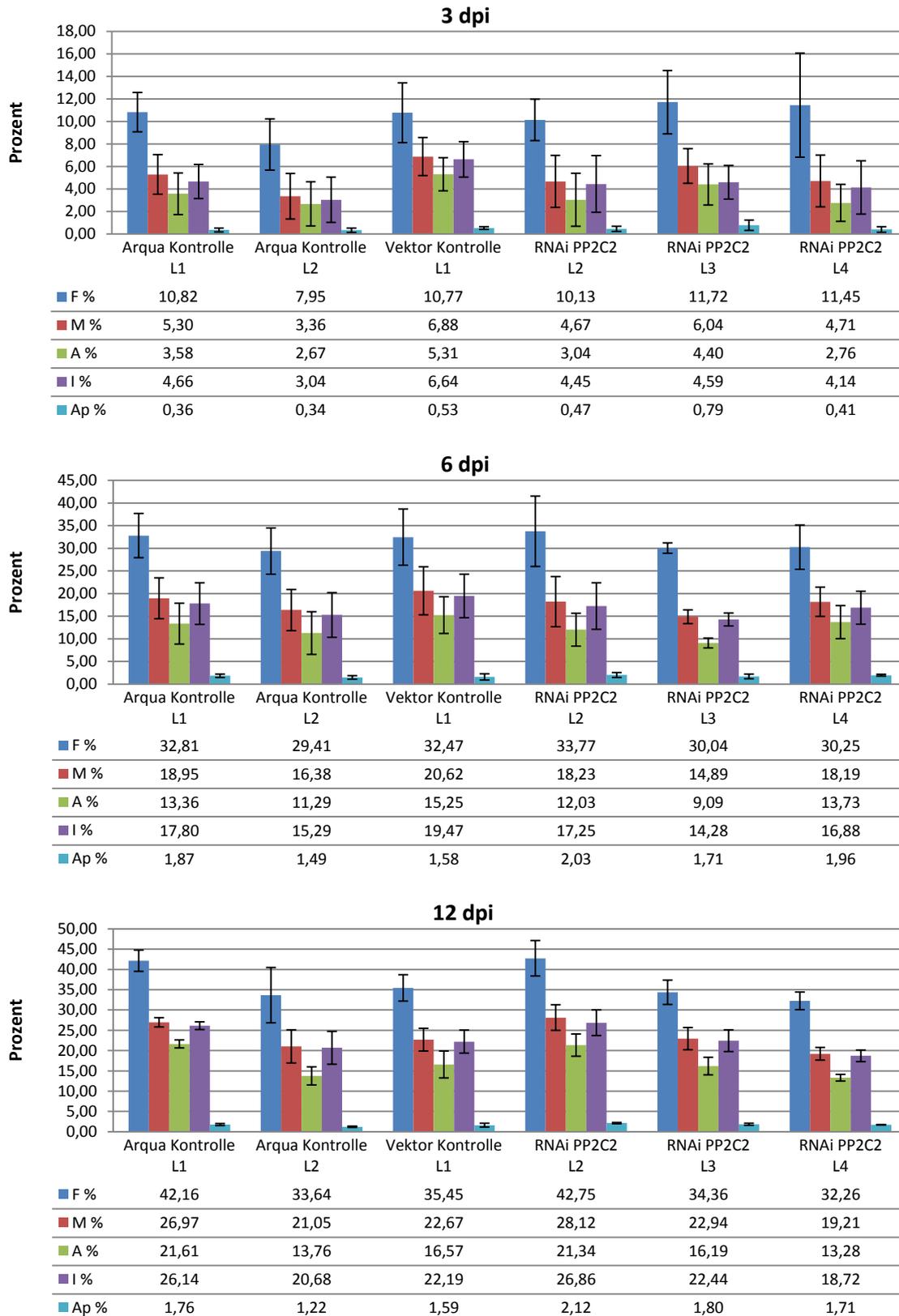


Abb. 2.13 Die Inaktivierung von *MtPP2C2* hat keinen Einfluss auf die AM-Symbiose

Quantifizierung der Mykorrhizierung der *MtPP2C2* RNAi-Linien, der Leervektor-Kontrolllinie und der Arqua-Kontrolllinien nach 3, 6 und 12 Tagen (dpi) Cokultivierung mit *R. irregularis*. Die Frequenz (F) und die Intensität (M) der Kolonisation sowie die Abundanz der Arbuskeln (A), intraradikalen Hyphen (I) und Appressorien (Ap) wurden bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier biologischer Replikate wieder.

Neben der visuellen Quantifizierung der Mykorrhizierung erfolgte für den letzten Zeitpunkt des Mykorrhizierungsexperiments zusätzlich eine Quantifizierung der Transkriptmenge der Mykorrhiza-spezifischen Gene *MtPT4* (siehe Abschnitt 2.3) und *MtTC107* mittels qRT-PCR. Die Bestimmung der relativen Pilzmenge wurde über die Quantifizierung des pilzlichen Haushaltsgens *RiTEF* durchgeführt. Die Expression von *MtTC107* wird schon in der frühen Phase der AM-Symbiose induziert und bleibt bis in die späten Phasen der Mykorrhizierung erhalten (Kuhn *et al.*, 2010). Für die Expressionsanalysen wurde ein Teil der geernteten Wurzeln für eine RNA-Isolierung benutzt. Jede RNA-Probe enthielt Wurzeln von drei verschiedenen Platten (drei biologischen Replikaten).

Auch die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse erbrachten keinen Hinweis auf eine veränderte Mykorrhizierung in den *MtPP2C2* RNAi-Linien (Abbildung 2.14). Es konnten zwar Unterschiede im Expressionslevel gemessen werden, diese Variationen sind aber unabhängig von der Art der Wurzellinie (Kontrollwurzel oder RNAi-Wurzel) und daher nicht auf die Inaktivierung von *MtPP2C2* zurückzuführen, sondern ergeben sich durch die unterschiedliche Menge Pilz in den Platten.

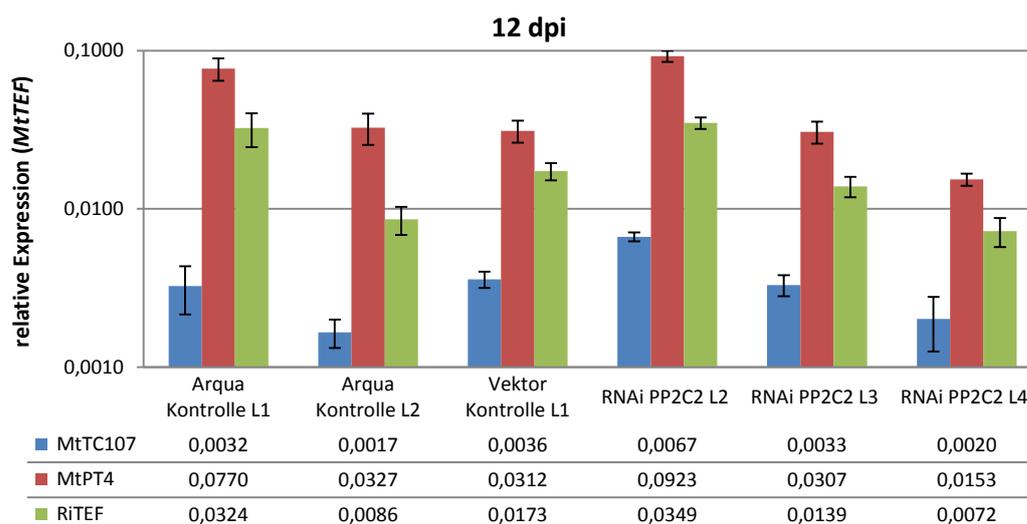


Abb. 2.14 Die Expression AM-spezifischer Gene ist nicht verändert in mykorrhizierten *MtPP2C2*-RNAi-Wurzellinien

Die Expression des AM-spezifischen Gens *MtTC107* und des Arbuskel-spezifischen Phosphatransporters *MtPT4* sowie die Menge des Pilzes (*RiTEF*) in mykorrhizierten Wurzeln (12 dpi) wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Die Herunterregulierung von *MtPP2C2* hat keinen Einfluss auf die Expression der pflanzlichen Markergene oder die Menge des Pilzes. Gezeigt ist die relative Expression zum Haushaltsgen *MtTEF*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

2.7.2 Die Überexpression von *MtPP2C2* beeinflusst die AM-Symbiose nicht

Da eine Herunterregulierung von *MtPP2C2* keinen erkennbaren Einfluss auf die Ausbildung der AM-Symbiose hat, wurde untersucht, ob eine Überexpression der Phosphatase zu einer veränderten Kolonisation führt. Dazu wurde die codierende Sequenz von *MtPP2C2* hinter den 35S-Promotor kloniert und der Vektor mit Hilfe der Agrobakterien-vermittelte Transformation in *M. truncatula* Wurzeln eingebracht. Die

erhaltenen transformierten Wurzeln wurden auf die Expression von *MtPP2C2* mittels qRT-PCR untersucht. Der Transkriptlevel von *MtPP2C2* war in zwei der drei Überexpressionslinien 2-fach erhöht im Vergleich zu den Kontrolllinien. In der dritten Linie wurde eine ähnliche Expression wie in den Kontrolllinien gemessen. Der 35S-Promotor führte also nur zu einer geringen Erhöhung der Transkriptmenge.

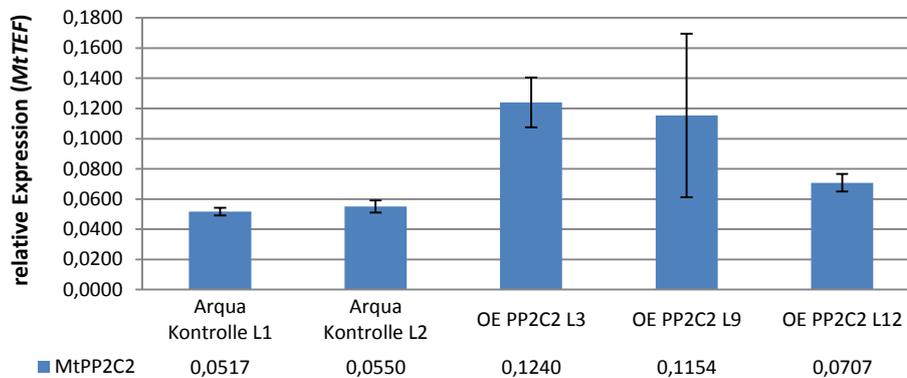


Abb. 2.15 Expression von *MtPP2C2* unter der Kontrolle des 35S-Promotors

Zwei von drei Überexpressionslinien (OE) zeigten im Vergleich zu den Kontrolllinien Arqua Kontrolle (mit *A. rhizogenes* ARqua1 transformierte Wurzeln) ein 2fach erhöhtes mRNA Transkriptlevel. Gezeigt ist die relative Expression zum Haushaltsgen *MtTEF*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

Trotz der geringen Expressionssteigerung durch den 35S-Promotor wurden die generierten Überexpressions-Linien für Mykorrhizierungsversuche benutzt. Wie in Abschnitt 4.10.5 beschrieben, wurden die Wurzellinien für 3, 6 und 12 Tage mit *R. irregularis* im Zweikompartmentensystem inkubiert und die Wurzeln anschließend mit Tinte gefärbt. Es folgte eine mikroskopische Quantifizierung der pilzlichen Kolonisation nach Trouvelot *et al.* (1986). Doch auch in den Überexpressionslinien konnte im Vergleich zu den Kontrolllinien (Arqua Kontrolle und Leervektor-Kontrolle) keine Veränderung in der Häufigkeit der Kolonisation oder in der Intensität der Mykorrhizierung festgestellt werden. Auch wurden keine morphologischen Auffälligkeiten der pilzlichen Strukturen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

2.8 Funktion der Phosphatasen *MtNPP2C1* und *MtPP2C2* in der Rhizobien-Symbiose

MtDMI2 ist neben der AM-Symbiose auch für die Etablierung der Rhizobien-Symbiose essentiell. Es ist daher denkbar, dass *MtPP2C2* als Interaktionspartner von *MtDMI2* nicht (nur) an einem Mykorrhiza-spezifischem Signalweg beteiligt ist sondern auch eine Rolle in der Ausbildung der Knöllchen-Symbiose spielt. Um dies zu testen, wurden RNAi- und Überexpressionslinien von *MtPP2C2* mit *Sinorhizobium meliloti* infiziert und die Ausbildung der für diese Symbiose charakteristischen Wurzelknöllchen quantifiziert. Da zur Ausbildung einer erfolgreichen Knöllchen-Symbiose der Spross der Pflanze benötigt wird, mussten zuvor sog. *composite plants* generiert werden (siehe Abschnitt 4.10.7). Diese bestehen aus einem nicht-transformierten Spross und transformierten Wurzeln.

M. truncatula Keimlinge wurde mit den entsprechenden Vektoren mit Hilfe von *A. rhizogenes* transformiert, nach Selektion der transformierten Wurzeln über Fluoreszenzmarker wurden die nicht-transformierten Wurzeln abgeschnitten und die transformierten Wurzeln am Spross belassen. Die so präparierten Pflänzchen wurden in ein Sand/Vermiculit-Gemisch gepflanzt und nach einer Regenerationszeit von 2 Wochen mit Rhizobien infiziert. Aufgrund der in der Literatur (Kapranov *et al.*, 1999) beschriebenen Induktion der Genexpression von *LjNPP2C21* in Wurzelknöllchen sollte das Ortholog *MtNPP2C1* ebenfalls auf eine Funktion in der Rhizobien-Symbiose untersucht werden. Es wurden daher *composite plants* mit RNAi und Überexpressionswurzeln hergestellt. Als Kontrolle dienten mit dem entsprechenden Leervektor transformierte Wurzeln. Pro Konstrukt wurden 15-20 Pflanzen verwendet. Zusätzlich wurden 10 Wildtyp-Pflanzen mit Rhizobien infiziert. Die Ernte der Pflanzen erfolgte nach 25 Tagen. Die transformierten Wurzeln wurden von den nicht-transformierten getrennt, gewogen und die Anzahl der Knöllchen unter dem Binokular gezählt. Anschließend wurde die Anzahl der Knöllchen pro 100 mg Wurzel bestimmt.

Um zuvor die Expression von *MtNPP2C1* in den RNAi- und Überexpressionslinien zu testen, wurden positiv transformierten Wurzeln von jeweils 3 Pflanzen für die Isolierung von RNA und anschließender qRT-PCR-Analysen benutzt.

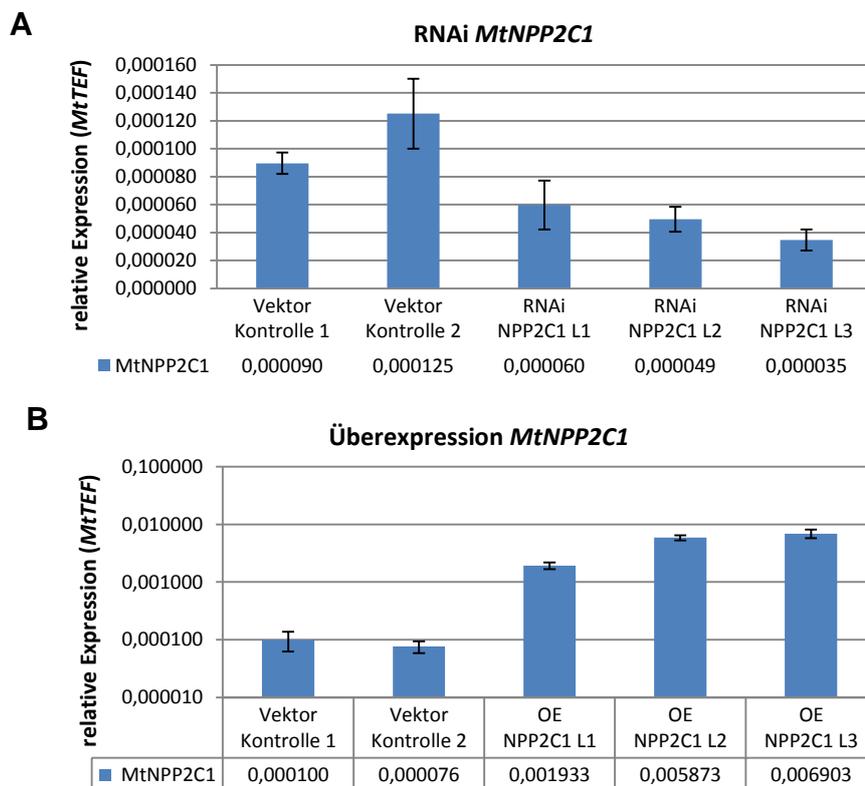


Abb. 2.16 RNAi-vermittelte Inaktivierung und Überexpression von *MtNPP2C1*

A) Die RNAi-Linien zeigten im Vergleich zur Vektorkontrolle (mit dem RNAi-Leervektor transformierte Wurzeln) eine Reduktion des mRNA Transkriptlevels von 50-65%.

B) Die Expression von *MtNPP2C1* unter der Kontrolle des 35S-Promotors bewirkte eine Erhöhung der Transkriptmenge um das 20 bis 70-fache im Vergleich zu den Kontrolllinien (mit dem Leervektor transformierte Wurzeln).

Gezeigt ist die relative Expression zum Haushaltsgen *MtTEF*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

In den RNAi-Linien konnte eine Reduktion der Transkriptmenge von 50-65% erreicht werden. Die Expression von *MtNPP2C1* unter dem 35S-Promotor ergab ein 20 bis 70-fach höheren Transkriptlevel im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Abbildung 2.16).

Die *composite plants* sind nach der Überführung von den Transformationsplatten in Töpfe mit Sand/Vermiculit-Gemisch generell schlechter gewachsen als die Wildtyp-Pflanzen. Durch das Abschneiden der nicht-transformierten Wurzeln war zusätzlich zu dem dadurch verursachten Stress nur noch wenig Wurzelmaterial übrig, weshalb auch einige Pflanze diese Prozedur nicht überlebten. Dennoch konnten Unterschiede zwischen den Pflanzenlinien beobachtet werden. So waren die Überexpressionslinien von *MtNPP2C1* im Schnitt robuster und hatten einen längeren Spross im Vergleich zu den Vektorkontrolllinien. Die RNAi-Pflanzen hingegen waren häufig verkümmert. Die Pflanzen, die gewachsen sind, waren kleiner und hatten weniger Wurzeln. Die RNAi- und Überexpressionspflanzen von *MtPP2C2* zeigten keinen signifikanten Unterschied im Aussehen und Wachstum im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abbildung 2.17A).

Bei den meisten *composite plants* sind neben den transformierten Wurzeln weitere nicht-transformierte gewachsen. Es konnte beobachtet werden, dass die nicht-transformierten Wurzeln bei allen Pflanzen besser noduliert waren als die transformierten Wurzeln (Abbildung 2.17B). Für die anschließende Auswertung wurden nur Pflanzen miteinbezogen, die mindestens 25% transformierte Wurzeln aufwiesen, die Wurzelmenge mindestens 50 mg betrug und der Spross mindestens 5 cm lang war. Somit sollten diejenigen Pflanzen ausgeschlossen werden, die aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes falsch negative Ergebnisse liefern würden. Dadurch war die Anzahl der biologischen Replikate gering, was die großen Standardabweichungen in Abbildung 5.17B erklärt und die Interpretation der Daten schwierig macht. Es gibt eine Tendenz, dass sowohl die Überexpression von *MtPP2C2* als auch die Überexpression von *MtNPP2C1* im Vergleich zur OE-Vektorkontrolle eine verstärkte Bildung von Wurzelknöllchen zur Folge hat und die jeweiligen RNAi-vermittelten Geninaktivierungen im Vergleich zur RNAi-Vektorkontrolle in einer reduzierten Anzahl an Wurzelknöllchen resultieren. Da der Stichprobenumfang allerdings sehr gering ist und die Variationen in der Anzahl an Wurzelknöllchen auch in Wurzeln, die mit demselben Konstrukt transformiert wurden, sehr hoch sind, sind diese Unterschiede nicht signifikant. Nur für die Überexpression von *MtPP2C2* konnte die gesteigerte Ausbildung von Wurzelknöllchen mit einer ausreichenden statistische Signifikanz (t-Test, $p=0,00017$) belegt werden. Allerdings wurden hier nur drei Pflanzen bewertet, von denen 2 Pflanzen ausschließlich transformierte Wurzeln und keine Wildtyp-Wurzeln besaßen. Da die Beobachtung gemacht wurde, dass *S. meliloti* bevorzugt Wildtyp-Wurzeln infiziert, könnte das Fehlen von Wildtypwurzeln zu einer verstärkten Infektion von transformierten Wurzeln führen und das Ergebnis somit verfälschen. Weiterhin fällt auf, dass sich die durchschnittliche Anzahl an Wurzelknöllchen an den OE-Vektorkontrollpflanzen und RNAi-Vektorkontrollpflanzen stark unterscheidet, was bedeuten würde, dass die transformierten Leervektoren alleine unterschiedliche Auswirkung auf die Rhizobien-Symbiose haben.

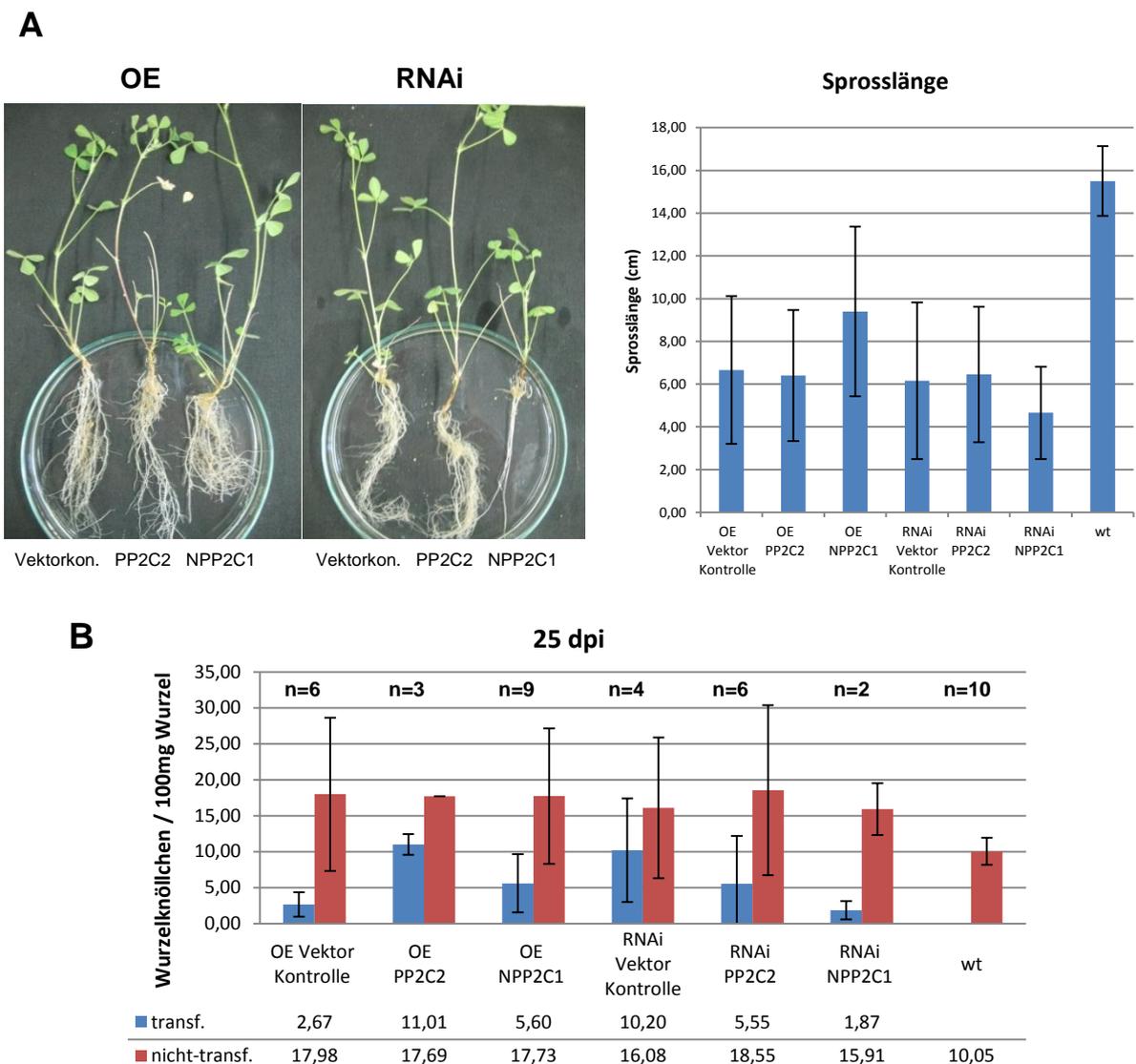


Abb. 2.17 Funktionelle Analysen von MtPP2C2 und MtNPP2C1 in der Rhizobien-Symbiose

Mit Hilfe von Agrobakterien-vermittelter Transformation von *M. truncatula* Keimlingen wurden Pflanzen mit transformierten Wurzeln hergestellt (*composite plants*), die anschließend für die Infektion mit Rhizobien benutzt wurden. Transformiert wurden RNAi- sowie Überexpressionskonstrukte von *MtPP2C2* und *MtNPP2C1*. Als Kontrolle dienten Pflanzen, deren Wurzeln mit den jeweiligen Leervektoren transformiert wurden.

A) *M. truncatula composite plants* 25 Tage nach der Inokulation mit *S. meliloti* RM2011. Die *MtNPP2C1* Überexpressionspflanzen waren im Durchschnitt größer, während die *MtNPP2C1*RNAi-Pflanzen ein reduziertes Wachstum aufwiesen im Vergleich zur Vektorkontrolle.

B) Quantifizierung der Wurzelknöllchen in transformierten und nicht-transformierten Wurzeln der *composite plants*. Während die nicht-transformierten Wurzeln bei allen Pflanzen eine ähnliche Anzahl an Wurzelknöllchen aufwiesen, konnten in den transformierten Wurzeln Unterschiede in Knöllchenanzahl in Abhängigkeit des transformierten Konstrukts beobachtet werden. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs (n) und der großen Standardabweichungen sind diese aber statistisch nicht signifikant.

Eine Funktion von *MtPP2C2* und *MtNPP2C1* in der Rhizobien-Symbiose kann nicht ausgeschlossen werden, allerdings müssen die Experimente mit einer größeren Anzahl an biologischen Replikaten wiederholt werden, um die Ergebnisse statistisch zu untermauern.

2.9 MtDMI2 interagiert mit weiteren Mitgliedern der PP2C-Familie

2.9.1 Phylogenetische Analysen der PP2C-Familie in *M. truncatula*

Eine physische Interaktion zwischen MtDMI2 und MtPP2C2 konnte zwar mit verschiedenen Methoden verifiziert werden, eine biologische Signifikanz dieser Interaktion konnte jedoch nicht bestätigt werden. Da in *Arabidopsis* die Familie der Proteinphosphatasen 2C 80 Mitglieder umfasst (Fuchs *et al.*, 2012), liegt die Vermutung nahe, dass in *M. truncatula* neben der schon beschriebenen homologen Phosphatase MtNPP2C1 weitere homologe PP2Cs existieren. Die nahezu vollständige Sequenzierung und Annotation des *M. truncatula* Genoms im Sommer 2011 ermöglichte nun genauere bioinformatische Analysen. Dazu wurden alle Proteinphosphatasen vom Typ 2C in den Genomdaten (Mtr. 3.5) identifiziert. Weitere PP2Cs konnten in noch nicht assemblierten Sequenzdaten gefunden werden. Diese Sequenzen waren teilweise unvollständig beziehungsweise überlappend, so dass hier, so fern dies möglich war, per Hand einzelne Teilstücke zu einer vollständigen Sequenz zusammengesetzt wurden. Insgesamt konnten so 89 mutmaßliche PP2Cs identifiziert werden. Mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen wurde dann ein Alignment mit Hilfe von ClustalW generiert und ein phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 2.18). Die Einteilung der Phosphatasen in verschiedene Gruppen beruht auf Sequenzhomologien zu den in *A. thaliana* identifizierten PP2Cs und deren Gruppierung in die Klassen A-F nach Fuchs *et al.* (2012).

Vergleicht man die Familie der PP2Cs von *M. truncatula* mit der von *A. thaliana*, lässt sich von fast jeder PP2C ein putatives Ortholog im jeweils anderen Organismus finden. Die Stärke der Homologie variiert zwischen den putativen Orthologen, manche PP2Cs sind stärker konserviert als andere. Zudem können manchen PP2Cs auch mehrere putative Orthologe in der jeweils anderen Pflanze zugeordnet werden. Dies ist zum Beispiel in Gruppe B der Fall, hier existieren in *Medicago* 2 Vertreter, während in *Arabidopsis* 6 PP2Cs zu finden sind. Die Gruppe D wiederum umfasst in *Medicago* 15 Mitglieder, in *Arabidopsis* nur 9. Die 6 zusätzlichen PP2Cs in *Medicago* können in einer Untergruppe zusammengeschlossen werden, zu der es keine direkten homologen Proteine in *Arabidopsis* gibt. Verwandt zu dieser Untergruppe sind die beiden PP2Cs Mt4g113480 und Mt4g113210, die keiner Gruppe angehören und für die auch in *A. thaliana* kein Ortholog gefunden werden kann. At4g11040 dagegen scheint eine PP2C zu sein, die nur in *Arabidopsis* vorkommt. Aufgrund der Tatsache, dass homologe PP2Cs von *Medicago* und *Arabidopsis* zusammen in dieselben Gruppen clustern und die Anzahl der Gruppenmitglieder bis auf wenige Ausnahmen sehr ähnlich ist, lässt auf einen hohen Grad der Konservierung der PP2C-Familie in höheren Pflanzen schließen.

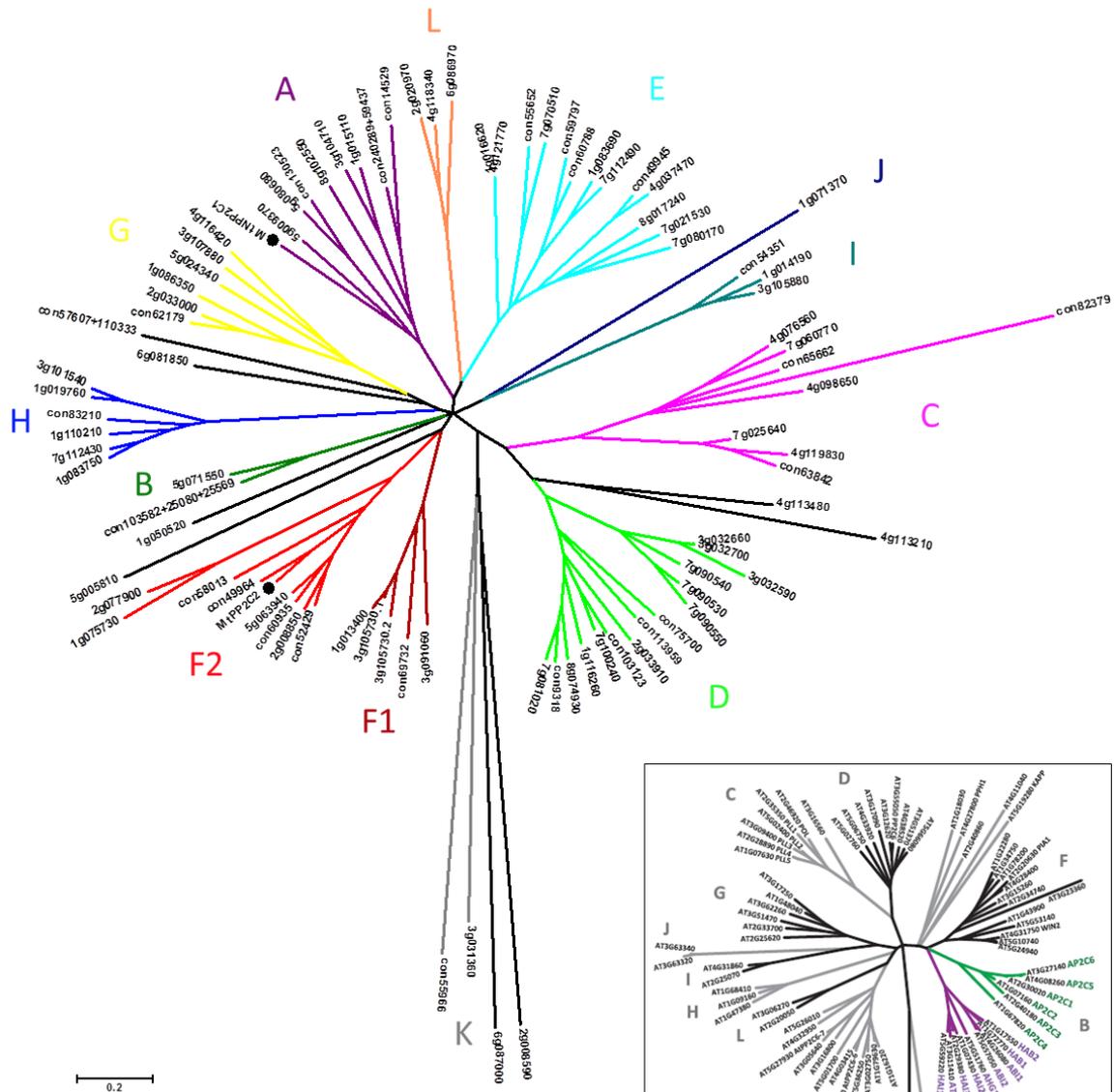


Abb. 2.18 Phylogenetischer Baum aller PP2Cs aus *M. truncatula*

A) Im Genom von *M. truncatula* wurden insgesamt 89 PP2Cs identifiziert und ein Proteinalignment mit Hilfe von ClustalW generiert. Der phylogenetische Baum wurde als ungewurzelter Baum mit der Neighbour-Joining-Methode und der Software MEGA5 erstellt. Statistische Bootstrap-Tests wurden mit 1000 Replikaten durchgeführt. Die Astlängen sind proportional zur phylogenetischen Distanz. Die Einteilung der PP2Cs in verschiedene Gruppen erfolgte aufgrund von Sequenzhomologien zu PP2Cs in *A. thaliana* und deren Gruppeneinteilung durch Fuchs et al. (2012).
 B) Phylogenetischer Baum aller PP2Cs aus *A. thaliana*, entnommen aus Fuchs et al. (2012).

Die als Interaktionspartner von MtDMI2 identifizierte Phosphatase MtPP2C2 clustert zusammen mit den PP2Cs der Gruppe F. Diese Gruppe hat die meisten Mitglieder und lässt sich in die Untergruppen F1 und F2 unterteilen, wobei MtPP2C2 der Untergruppe F2 angehört (Abbildung 2.19). Die am nächsten verwandte PP2C in *Medicago* konnte im contig49964 identifiziert werden. Diese PP2C besitzt im Vergleich zu MtPP2C2 eine N-terminale Verlängerung von 50 Aminosäuren. Der zu MtPP2C2 homologe Teil des Proteins ist zu 80% identisch. Ein orthologes Protein existiert auch in *A. thaliana* (At3g15260). Diese PP2C hat die gleiche Aminosäureanzahl wie MtPP2C2 und weist eine 74%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz auf. Die am nächsten verwandte

PP2C zu At3g15260 in *Arabidopsis* ist PIA1 (At2g206320) und ihr Homolog At4g28400. Die Expression von *PIA1* wird spezifisch durch den bakteriellen Effektor AvrRpm1 aus *Pseudomonas syringae* induziert. *pia1* Mutanten sind resistenter gegenüber *Pseudomonas*-Stämmen, die diesen Effektor exprimieren, nicht aber gegenüber Stämme, die den Effektor AvrB exprimieren (Widjaja *et al.*, 2010). Eine Rolle von PIA1 in der Pflanzenabwehr scheint daher wahrscheinlich. Was die genaue Funktion der Phosphatase ist, konnte aber noch nicht geklärt werden. In *M. truncatula* zeigt MtPP2C2 die größte Ähnlichkeit zu PIA1 (65% Homologie), allerdings ist die oben erwähnte At3g15260 noch näher mit MtPP2C2 verwandt. Weitere Vertreter der Gruppe F2 clustern zusammen in einer Untergruppe, eine Funktion konnte bisher für keine dieser PP2Cs beschrieben werden. In der Gruppe F1 befindet sich die PP2C WIN2 (At4g31750), die in *Arabidopsis* als Interaktionspartner von HOPW1-1, ein weiterer Effektor aus *P. syringae*, beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2008). Die Inaktivierung von *WIN2* durch RNAi Interferenz führt hier allerdings zu einer Reduzierung der HopW1-1-induzierten Resistenz der Pflanze. In *Medicago* gibt es zwei putative Orthologe zu WIN2: Mt3g105730 und Mt1g013400. Abgesehen von WIN2 ist für keine weitere PP2C der Gruppe F2 eine Funktion bekannt. Weitere Mitglieder der Gruppe F sind Mt1g075730 und Mt2g077900 (At3g23360), über die ebenso noch nichts publiziert ist. MtPP2C2 gehört demnach einer Gruppe von PP2Cs an, über die nur wenig bekannt ist, die aber zumindest im Vergleich mit *A. thaliana* sehr konserviert ist und dessen bisher beschriebenen Mitglieder eine Rolle in der Pflanzenabwehr spielen.

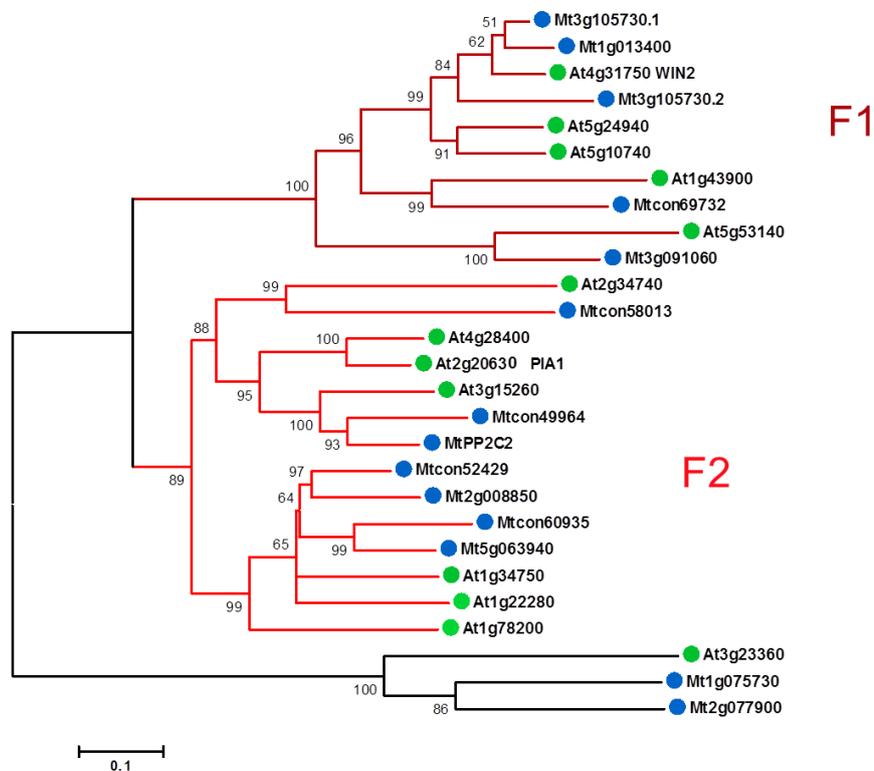


Abb. 2.19 Phylogenetischer Baum der PP2Cs aus Gruppe F von *M. truncatula* und *A. thaliana*

Das Dendrogramm wurde mit der Software MEGA 5.05 unter Benutzung der Neighbour-Joining-Methode und auf der Grundlage eines ClustalW-Alignments generiert. Statistische Bootstrap-Tests wurden mit 1000 Replikaten durchgeführt. Die Astlängen sind proportional zur phylogenetischen Distanz. *Arabidopsis* PP2Cs sind mit einem grünen, die *Medicago* PP2Cs mit einem blauen Punkt markiert.

Mtcon49964/1-333	1	MSFQAGKDNLR	TINNYCPPSSSSS	FIHHSQVKSTTF	LNFLFKPNQTT	HS	MA	52
MtPP2C2/1-282	1	-----	-----	-----	-----	-----	MT	2
Mtcon60935/1-282	1	-----	-----	-----	-----	-----	MD	2
Mt5g063940/1-282	1	-----	-----	-----	-----	-----	MD	2
Mtcon52429/1-278	1	-----	-----	-----	-----	-----	MD	2
Mt2g008850/1-281	1	-----	-----	-----	-----	-----	MD	2
Mt3g091060/1-315	1	-----	-----	-----	-----	-----	MMVD	TGSMSTRAG13
Mtcon49964/1-333	53	ARDILHKMKE	KVGFGLSD	PDSCGKGS	KMSKHI	THGFHLV	KGRSYHE	MEDYLV104
MtPP2C2/1-282	3	GKEILHKMKE	KV-LG	SPDSCGKGS	KMSKHV	THGFHLV	KGRSYH	AMEDYV53
Mtcon60935/1-282	3	RLCCFKSS	YSQLVAS	RPSSST	CKGKN-Y	EGSIKY	GFSLV	KGRANHP
Mt5g063940/1-282	3	KFCCLKSS	FSLVSTR	SSCST	GKGN-HE	GSIKY	GFSLV	KGRANHP
Mtcon52429/1-278	3	SLCCFSSS	Q----	GRSS	CNSGKGS	-SQSP	VKYGF	SLVKG
Mt2g008850/1-281	3	SLCCFNSS	RK-GV	GGRL	CGSGKGS	-LQCP	LKYGF	CLVE
Mt3g091060/1-315	14	PSVEDTVS	HKEDDS	ARSG	FVTCG	CKS-ED	ERLSC	GYSS
Mtcon49964/1-333	105	ARFKQIDNH	ELGLFAI	FDGH	ACHN	VPNYL	QSHL	FDN
MtPP2C2/1-282	54	AEFKHVDDN	ELGLFAI	FDGH	AGHT	VADY	LRSN	LFDN
Mtcon60935/1-282	54	AKFVQLQD	KELGLFAI	YDGH	LGD	RVPAY	LQKHL	FSN
Mt5g063940/1-282	54	ANFVQVQK	ELGLFAI	YDGH	LGD	QVPS	YLQKN	LFSN
Mtcon52429/1-278	49	AKIVHF	KGQELGLFAI	YDGH	LGD	SVPS	YLQKHL	FSN
Mt2g008850/1-281	53	AKIVQF	NGRELGLFAI	FDGH	S	GD	V	PAYLQKHL
Mt3g091060/1-315	64	IKTSTID	GRS	VCL	FGI	FDGH	CS	RAAE
Mtcon49964/1-333	157	EAYSITD	SSILE	KSGE-	LGRGG	STAV	TAIL	LDG
MtPP2C2/1-282	106	RAYKETD	STILE	KSGE-	L	GKGG	STAV	TAIL
Mtcon60935/1-282	106	KAYESTD	QAL	LSH	SSD-	L	HGG	STAV
Mt5g063940/1-282	106	KAYLNTD	QAL	LSH	SSD-	L	HGG	STAV
Mtcon52429/1-278	101	KAYESTD	QAL	L	TH	SPD-	L	HGG
Mt2g008850/1-281	105	EAYEATD	QAL	LSH	SPD-	L	HGG	STAV
Mt3g091060/1-315	116	ETYQQT	DAE	FL	NS	E	KDN	F
Mtcon49964/1-333	208	VAKQLS	VDHE	PTT--	E	HED	IKNR	GGF
MtPP2C2/1-282	157	VAIPLS	VDHE	PTT--	E	SND	IKNR	GGF
Mtcon60935/1-282	157	QAVQMT	IDHE	PNK--	NEA	AL	RLE	V
Mt5g063940/1-282	157	QAVQLT	TDHE	PNT--	E	RGI	IEN	K
Mtcon52429/1-278	152	VAVQMS	TDHE	PNT--	E	RGS	IEN	K
Mt2g008850/1-281	156	VAIQMS	IDHE	PNT--	E	RR	I	IEN
Mt3g091060/1-315	167	KAIALS	EDH	KPN	RS	D	ER	KR
Mtcon49964/1-333	258	KKHLSE	PYV	TV	KE	IS	E	DAE
MtPP2C2/1-282	207	KIHMTS	E	PH	V	T	V	K
Mtcon60935/1-282	207	KSHLRSD	P	D	V	Q	T	D
Mt5g063940/1-282	207	KSHLRSD	P	D	V	H	S	T
Mtcon52429/1-278	202	KTHLRSD	P	D	I	Q	A	D
Mt2g008850/1-281	206	KSHLRSD	P	D	V	K	P	D
Mt3g091060/1-315	217	KPFVVAE	P	E	I	Q	D	Q
Mtcon49964/1-333	310	KRLTE	E	A	V	N	R	K
MtPP2C2/1-282	259	KHLTE	E	A	L	N	R	R
Mtcon60935/1-282	259	KQLAAE	A	I	K	R	N	S
Mt5g063940/1-282	259	KQLTAE	A	E	A	L	K	R
Mtcon52429/1-278	254	KQLATE	A	E	A	L	N	R
Mt2g008850/1-281	258	KQLIAE	A	L	K	R	E	S
Mt3g091060/1-315	269	RKLTE	A	A	F	N	R	G

Abb. 2.20 Alignment der Proteinphosphatasen 2C, die mit MtDMI2 interagieren
 Das Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit ClustalW generiert. Mit den roten Sternen ist der Bereich des Proteins gekennzeichnet, der in den Protein-Protein-Interaktionsstudien mit der intrazellulären Domäne von MtDMI2 eingesetzt wurde.

2.9.2 MtDMI2-ICD interagiert mit weiteren PP2Cs der Gruppe F

Die Sequenzähnlichkeit der PP2Cs vor allem in der katalytischen C-terminalen Region (Abbildung 2.20) lässt vermuten, dass MtDMI2 auch mit anderen PP2Cs interagieren kann. Um dies zu testen, wurden alle MtPP2Cs der F2-Gruppe sowie einzelne Vertreter der F1-Gruppe auf ihre Interaktionsfähigkeit mit MtDMI2-ICD in Hefe untersucht. Da in Hefe nur der C-terminale Teil von MtPP2C2 mit der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 interagiert, wurden auch nur die C-Termini der Gruppe F Phosphatasen per PCR aus cDNA amplifiziert, in den Hefevektor pGADT7 kloniert und für Y2H-Analysen benutzt.

Die PP2C *Mt58013* konnte trotz Benutzung unterschiedlicher Primer und Templates (cDNA von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln) nicht amplifiziert werden. Allerdings wird auch in der Datenbank *Medicago Gene Expression Atlas* eine Expression ausschließlich im Samen postuliert. Eine Expression in Wurzeln und die Anwesenheit von *Mt58013* cDNA im verwendeten Wurzelmaterial ist daher unwahrscheinlich. Für die PP2C Mt3g105730 gibt es zwei annotierten Spleißvarianten, wobei die Variante 2 nicht per PCR amplifiziert werden konnte. Eventuell existiert die 2. Spleißvariante nicht oder sie wird zumindest nicht in Wurzeln exprimiert. Alle weiteren PP2Cs konnten erfolgreich aus Wurzel cDNA amplifiziert und kloniert werden.

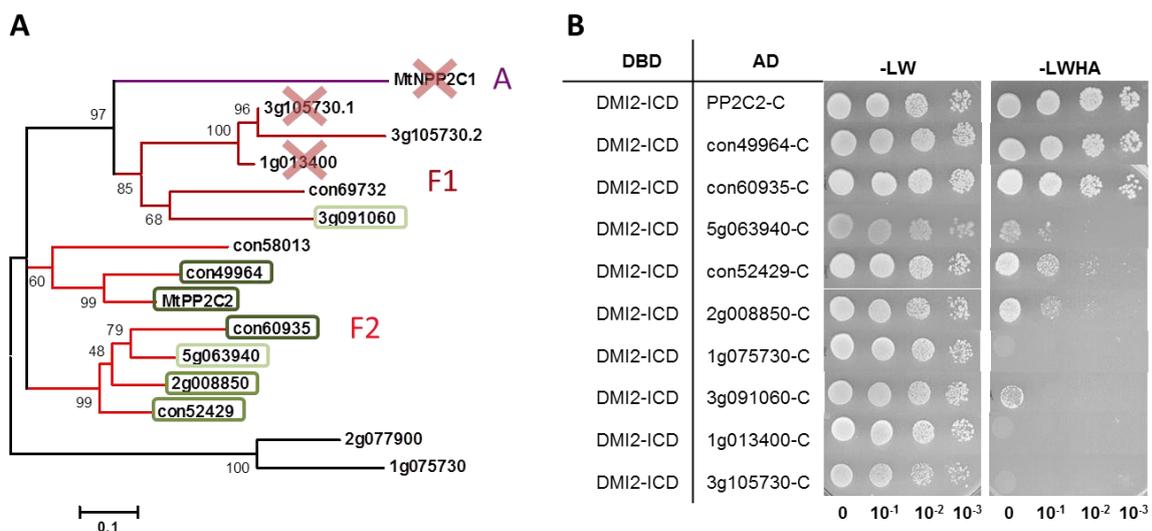


Abb. 2.21 Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen MtDMI2-ICD und dem C-Terminus verschiedener MtPP2Cs der Gruppe F mit Hilfe des Y2H-Systems.

A) Phylogenetischer Baum basierend auf einem Alignment der C-Termini der Gruppe F MtPP2Cs. Das Dendrogramm wurde mit MEGA 5.05 unter Verwendung des Neighbour-Joining-Algorithmus erstellt. Statistische Bootstrap-Tests wurden mit 1000 Replikaten durchgeführt. Die Astlängen sind proportional zur phylogenetischen Distanz. Die dunkelgrün markierten MtPP2Cs interagieren sehr stark mit MtDMI2-ICD, mit mittelgrün sind mittelstarke Interaktionen gekennzeichnet und hellgrün markierte MtPP2Cs interagieren nur sehr schwach. Mit einem roten Kreuz gekennzeichnete Phosphatasen zeigten keine Interaktion mit MtDMI2-ICD. Nicht markierte PP2Cs wurden nicht getestet. Die Interaktionsstärke wurde über das Hefewachstum (B) bestimmt.

B) MtDMI2 wurde über Klonierung in den Vektor pGBKT7 mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne fusioniert, die C-terminalen Parts der MtPP2Cs wurden in den Vektor pGADT7 kloniert und lagen daher gekoppelt an die GAL4-Aktivierungsdomäne vor. Bait- und Prey-Plasmid wurden in den Stamm AH109 cotransformiert. Eine Kolonie wurde in dH₂O resuspendiert und unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungen auf SD-LW und SD-LWHA aufgetropft. Durch Wachstum auf SD-LW wurde eine erfolgreiche Transformation bestätigt. Auf Selektionsmedium -LWHA wachsen nur Hefestämme, bei denen Bait- und Prey-Protein interagieren. 7 von 9 getesteten MtPP2Cs interagierten mit MtDMI2-ICD, die Interaktionsstärke variierte aber deutlich.

Nach einer Cotransformation des Bait- und Prey-Plasmids in den Hefestamm AH109 wurde eine der gewachsenen Kolonien gepickt, in dH₂O resuspendiert und auf SD-LW und SD-LWHA-Platten in verschiedenen Verdünnungen aufgetropft. Eine positive Interaktion wird durch Wachstum auf SD-LWHA angezeigt. Dies konnte bei 7 von 9 PP2Cs beobachtet werden, wobei die Interaktionsstärke deutlich variiert (Abbildung 2.21). Die Hefetransformanten mit Mt49964 oder Mt60935 als jeweiliges Prey-Protein zeigten ein sehr starkes Wachstum auf den Selektionsplatten, vergleichbar mit der Interaktionsstärke von MtPP2C2. Die Transformanten, die Mt52429 oder Mt2g008850 als Preyprotein exprimierten, wuchsen hingegen nur mittelmäßig auf SD-LWHA. Ein sehr schwaches Wachstum konnte bei Mt5g063940 und Mt3g091060 verzeichnet werden, während Mt1g075730, Mt1g013400 und Mt3g105730 überhaupt nicht auf Selektionsmedium gewachsen sind.

Die Intrazellulärdomäne von MtDMI2 kann *in vitro* mit weiteren Mitgliedern der PP2C-Familie interagieren, dennoch ist die Interaktionsfähigkeit auf die PP2Cs beschränkt, die eine große Homologie zu MtPP2C2 aufweisen. Weiterhin zeigten nur die beiden Phosphatasen Mt49964 und Mt60935 eine ähnlich starke Interaktion mit MtDMI2 wie MtPP2C2. Von einer gewissen Spezifität kann also ausgegangen werden. In weiteren Experimenten mit dem Y2H-System wurde getestet, ob MtDMI2-ICD mit den Vollängenproteinen von Mt49964 und Mt60935 interagieren kann (Daten nicht gezeigt). Dies war jedoch wie bei MtPP2C2 nicht der Fall.

2.9.3 Expression der mit MtDMI2-interagierenden MtPP2Cs während der AM-Symbiose

Um Hinweise darauf zu erhalten, welche der interagierenden MtPP2Cs eine Rolle in der AM-Symbiose spielen, wurde deren Genexpression in mykorrhizierten *hairy roots* gemessen. Dabei beschränkte man sich zunächst auf die MtPP2Cs der Gruppe F2. Dazu wurden zunächst *M. truncatula*-Wurzellinien mit dem *A. rhizogenes* Stamm ARqua1 transformiert, um axenisch wachsende *hairy roots* zu generieren. Im Zweikompartimentensystem wurden diese Wurzeln anschließend für 3, 5 und 11 Tage mykorrhiziert. Nach RNA-Isolierung wurde die Expression der MtPP2Cs mittels qRT-PCR quantitativ bestimmt.

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit von MtPP2C2 und Mt49964 kann nicht ausgeschlossen werden, dass in vorherigen Genexpressionsanalysen von MtPP2C2 die benutzten Primer MtPP2C2_qPCR_F / MtPP2C2_qPCR_R auch an die cDNA von Mt49964 binden konnten und somit die Expression von beiden PP2Cs gemessen wurde (siehe Alignment in Abbildung 6.1). Das amplifizierte Fragment würde in beiden Fällen eine Größe von 227 bp aufweisen, allerdings würden sich die Amplikons von MtPP2C2 und Mt49964 an 37 Positionen unterscheiden. Außerdem wäre der GC-Gehalt bei MtPP2C2 mit 45% um 2% höher als bei Mt49964, was zu unterschiedlichen Schmelztemperaturen führen sollte. Die Schmelzkurvenanalyse aller qRT-PCR-Daten ergab allerdings nur einen einzigen Peak, was dafür spricht, dass nur das spezifische Produkt MtPP2C2 amplifiziert wurde. Als Beispiel sind in Abbildung 2.22A die Schmelzkurven von unterschiedlichen cDNA-

Templates gezeigt. Dennoch wurden für weitere Analysen neue Primer benutzt. Sowohl für *MtPP2C2* als auch für *Mt49964* wurde der reverse Primer so gewählt, dass er in nichthomologen Bereichen im 3'UTR bindet und das Stoppcodon miteinschließt. Die Amplikonlänge für *MtPP2C2* beträgt 213 bp bei einem GC-Gehalt von 43%, das Amplikon von *Mt49964* ist 209 bp lang, der GC-Gehalt liegt bei 40%. Nach der qRT-PCR mit oben genannten Proben und anschließender Schmelzkurvenanalyse konnte für beide Amplikons jeweils ein spezifischer Peak detektiert werden (Abbildung 2.22B). Die ausgewählten Primer binden daher spezifisch.

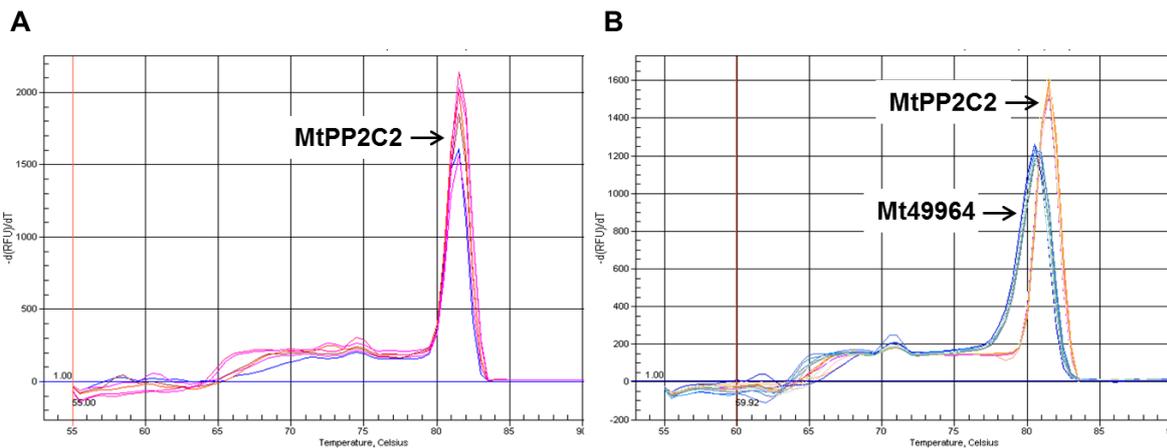


Abb. 2.22 Grafische Darstellung der Schmelzkurvenanalyse von qRT-PCR-amplifizierten Fragmenten von *MtPP2C2* und *Mt49964*

A) Schmelzkurvenanalyse von cDNA-Fragmenten, die mit dem Primerpaar *MtPP2C2_qPCR_F* / *MtPP2C2_qPCR_R* amplifiziert wurden. Die Schmelzkurven stammen von unterschiedlichen cDNA-Templates. Die Kurven zeigen jeweils nur ein Peak, es wurde spezifisch ein Fragment von *MtPP2C2* amplifiziert.

B) Schmelzkurvenanalyse von cDNA-Fragmenten, die mit dem Primerpaar *con49964_qPCR_F* / *con49964_qPCR_R* (blaue Kurven) bzw. mit dem Primerpaar *MtPP2C2_qPCR_F2* / *MtPP2C2_qPCR_R2* (gelb-orange Kurven) amplifiziert wurden. Die Schmelzkurven stammen von unterschiedlichen cDNA-Templates. Da jede Kurve nur einen einzigen für das Amplikon spezifischen Peak zeigt, binden die Primer ausschließlich an ihre Zielsequenz.

Bei der Analyse der Expressionsdaten fällt zunächst auf, dass alle getesteten *MtPP2Cs* in der Wurzellinie Arqua L1 eine erhöhte Expression nach 11 Tagen Mykorrhizierung im Vergleich zu den Kontrollwurzeln aufwiesen (Abbildung 2.23). Das war jedoch nicht der Fall in der Linie L2, obwohl dieser stärker mykorrhiziert war. Der Mykorrhizierungsgrad wurde bestimmt durch die Quantifizierung der vorhandenen Pilzmenge über die Expression des Haushaltsgens *RiTEF* und die Messung der Expression des AM-spezifischen Markergens *MtPT4*, welches nur in Arbuskel-enthaltenen Zellen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Expression der *MtPP2Cs* in Linie 1 ist also nicht auf eine stärkere Mykorrhizierung der Wurzeln zurückzuführen. Vergleicht man die Expressionlevels der *MtPP2Cs* untereinander, wird deutlich, dass *MtPP2C2* und *Mt49964* die höchste Transkriptmenge aufweisen, die Transkriptmengen von *Mt52429* und *Mt2g008850* sind etwa um das 3 bis 4-fache geringer, während *Mt60935* und *Mt5g063940* am schwächsten exprimiert sind. Für die Phosphatase *Mt60935* konnte eine signifikante Änderung der Transkriptmenge in den mykorrhizierten Wurzeln im Vergleich zu den Kontrollwurzeln beobachtet werden. Die Expression dieser Phosphatase war nach 3

Tagen Coinkubation mit dem Pilz um das 6-fache induziert. Nach 5 und 11 dpi war das mRNA-Transkriptlevel noch doppelt so hoch wie in den Kontrollwurzeln.

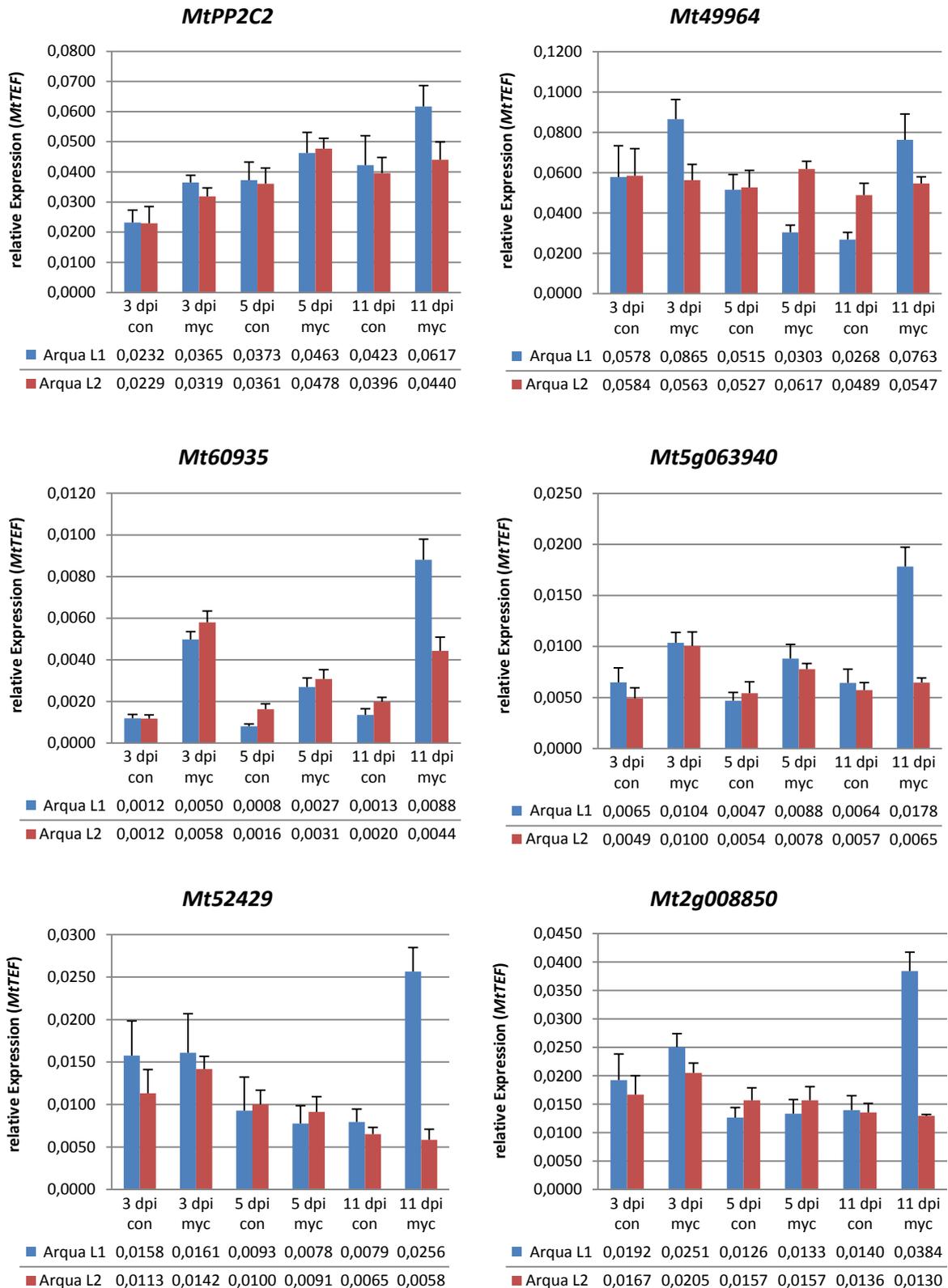


Abb. 2.23 Expression von MtDMI2-interagierenden Phosphatasen in mykorrhizierten Wurzeln

Mit *A. rhizogenes* ARqua1 transformierte *M. truncatula* Wurzeln wurden im Zweikompartimentensystem für 3, 5 und 11 Tage mit *R. irregularis* (myc) oder nur auf Medium (con) inkubiert. Gezeigt ist die relative Expression der Phosphatasen zum Haushaltsgen *MtTEF* in zwei Wurzellinien. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

Die Induktion der Expression von *Mt60935* nach 3 Tagen Coinkubation mit *R. irregularis* spricht für eine Funktion dieses Proteins während der frühen Phase der AM-Symbiose, die unter anderem durch einen intensiven Signalaustausch zwischen Pilz und Pflanze charakterisiert ist. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Expression von *Mt60935* durch pilzliche Signale, die auch in Abwesenheit der Pflanze konstitutiv produziert werden oder Bestandteile des Pilzes selbst sind, induziert wird. Dazu wurden Sporen von *R. irregularis* in der Phase der Dormanz isoliert, in flüssigem Stickstoff gemörsert und *M. truncatula* Keimlinge mit dem Sporenextrakt für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden drei Pflänzchen benutzt und deren Wurzeln nach der Ernte vereinigt. Anschließend wurde die RNA isoliert und die Expression von *Mt60935* und *Mt5g063940* mittels qRT-PCR gemessen. Sowohl nach 6-stündiger als auch nach 24-stündiger Inkubation der Medicago-Pflänzchen mit *R. irregularis* Sporenextrakt konnte eine 2 bis 3-fach höhere Transkriptmenge von *Mt60935* im Vergleich zu den Kontrollwurzeln beobachtet werden. *Mt5g063940* hingegen zeigte keine signifikante Änderung im Expressionslevel. Die Expression von *Mt60935* scheint also in geringem Maße durch konstitutiv vorhandene pilzliche Signale induziert zu werden, eine volle Induktion kann jedoch nur durch den Signalaustausch während der frühen Phase der AM-Symbiose erreicht werden.

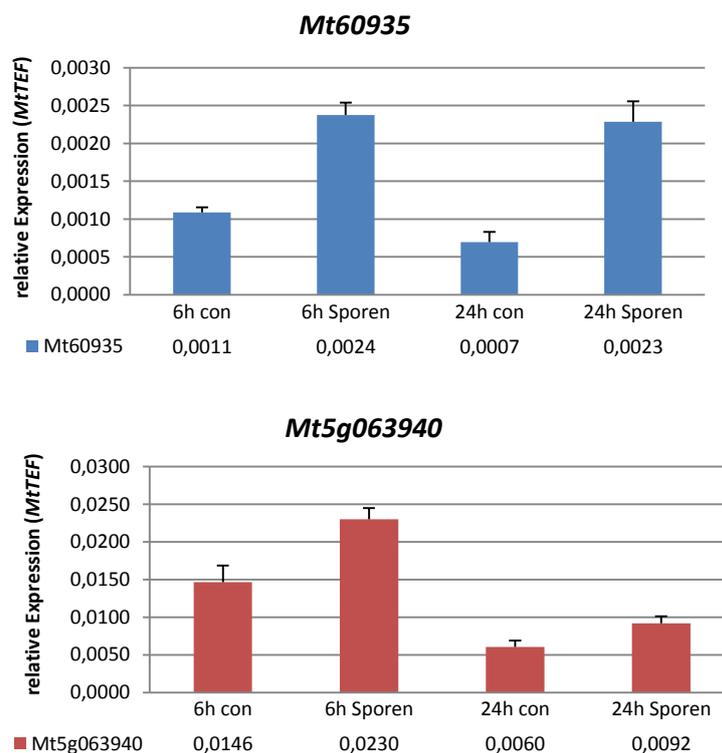


Abb. 2.24 Expression von *Mt60935* und *Mt5g063940* nach Inkubation mit Sporenextrakt von *R. irregularis*

M. truncatula Pflänzchen wurden für 6 und 24 Stunden mit gemörserten Sporen von *R. irregularis* oder nur mit Medium (con) inkubiert. RNA wurde aus den Wurzeln extrahiert und die Genexpression mittels qRT-PCR gemessen. Gezeigt ist die relative Expression der Phosphatasen zum Haushaltsgen *MtTEF*. Die Säulen repräsentieren drei biologische Replikate. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

2.9.4 Die RNAi-vermittelte Inaktivierung von *MtPP2C2* führt auch zu einer Reduktion des Transkriptlevels von *Mt49964*

Die große Sequenzähnlichkeit zwischen *MtPP2C2* und *Mt49964* lässt vermuten, dass das RNAi-Konstrukt, das für die Inaktivierung von *MtPP2C2* generiert wurde, auch Auswirkung auf die Transkriptmenge von *Mt49964* haben könnte. Darum wurde die Expression von *Mt49964* in *MtPP2C2* RNAi-Linien (Abschnitt 2.7.1) mittels qRT-PCR gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass auch die Transkriptmenge von *Mt49964* in den RNAi-Linien deutlich reduziert ist im Vergleich zu den Kontrolllinien. Die Effizienz der mRNA-Inaktivierung ist im Falle von *MtPP2C2* erwartungsgemäß höher als bei *Mt49964*, da die generierte *hairpin* dsRNA zur mRNA von *MtPP2C2* vollständig komplementär ist. Die daraus prozessierten siRNAs in Kombination mit dem RISC-Komplex binden mit einer höheren Affinität an die *MtPP2C2* mRNA als an die *Mt49964* mRNA.

Da die beiden PP2Cs eine hohe Homologie aufweisen und gleich stark mit MtDMI2 interagieren, erscheint eine redundante Funktion beider Proteine sehr wahrscheinlich. Die gleichzeitige Inaktivierung beider Gene mit einem RNAi-Konstrukt wäre daher sinnvoll. Das hier benutzte RNAi-Konstrukt liegt aber bereits in einem Bereich größter Homologie und ist daher sehr gut geeignet für die gleichzeitige Inaktivierung beider PP2Cs. Daher würde die Auswahl anderer RNAi-Konstrukte wahrscheinlich keine verbesserte Effizienz bezüglich der Reduzierung der Transkriptlevels beider PP2Cs zur Folge haben. Aus diesem Grund wurde davon abgesehen, weitere RNAi-Konstrukte zu testen.

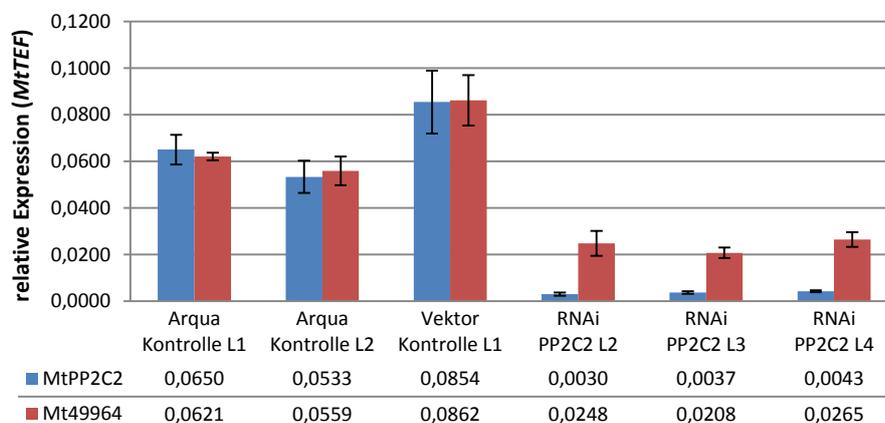


Abb. 2.25 Die RNAi-vermittelte Inaktivierung von *MtPP2C2* und *Mt49964*

Ein gegen *MtPP2C2* gerichtetes RNAi-Konstrukt (siehe Abschnitt 2.7.1) wurde in *M. truncatula* Wurzeln transformiert. Die RNAi-Linien zeigten im Vergleich zu den Kontrolllinien Arqua Kontrolle (mit *A. rhizogenes* ARqua1 transformierte Wurzeln) und der Vektorkontrolle (mit dem RNAi-Leervektor transformierte Wurzeln) nicht nur eine Reduktion des mRNA Transkriptlevels von *MtPP2C2* sondern auch eine Reduktion der Transkriptmenge von *Mt49964*. Gezeigt ist die relative Expression zum Haushaltsgen *MtTEF*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

2.9.5 RNAi-vermittelte Inaktivierung von *Mt60935* und *Mt5g063940*

Aufgrund der Tatsache, dass eine Herunterregulierung von MtPP2C2/Mt49964 keinen Einfluss auf die AM-Symbiose hat und weitere MtPP2Cs als Interaktionspartner von MtDMI2 identifiziert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass entweder die interagierenden MtPP2Cs in ihrer Funktion redundant sind und/oder nicht MtPP2C2 sondern eine der anderen MtPP2Cs der funktionelle Interaktionspartner von MtDMI2 ist. Durch die Genexpressionsanalyse der interagierenden MtPP2Cs konnte nur für *Mt60935* eine Regulierung der Transkriptmenge während der AM-Symbiose festgestellt werden. Weiterhin zeigte diese PP2C eine starke Interaktion mit MtDMI2. Daher scheint *Mt60935* ein vielversprechender Kandidat zu sein und wurde mittels RNAi inaktiviert. Als Zielsequenz wurden zwei verschiedene Sequenzabschnitte gewählt und daher zwei unterschiedliche RNAi-Konstrukte kloniert. Für das RNAi-1 Konstrukt wurde die Region -79 bp bis +184 bp (bezüglich des ATG) gewählt, diese Region weist die geringste Homologie zum paralogen Gen *Mt5g063940* auf. Das RNAi-2 Konstrukt umfasst die Region +657 bp bis +855 bp und liegt im konservierten C-terminalen Bereich, der die größtmögliche Homologie zu *Mt5g063940* besitzt. Das 2. Konstrukt sollte daher sowohl *Mt60935* als auch *Mt5g063940* treffen. Weiterhin wurde ein RNAi-Konstrukt kloniert, das spezifisch die Transkriptmenge von *Mt5g063940* herunterregulieren sollte und im Bereich von -27 bp bis +322 bp liegt. Die RNAi-Konstrukte wurden in *A. rhizogenes* transformiert, anschließend erfolgte die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *M. truncatula* Keimlingen. Erhaltene positiv transformierte Wurzeln wurden auf die Expression von *Mt60935* und *Mt5g063940* mittels qRT-PCR getestet.

Eine signifikante Abnahme der Transkriptmenge von *Mt60935* konnte durch das RNAi-1 Konstrukt, nicht jedoch durch das RNAi-2 Konstrukt, erreicht werden (Abbildung 2.26). Im Vergleich zur Vektorkontrolllinie L4 ist die Transkriptmenge in den *Mt60935* RNAi-1 Linien im Schnitt um ca. 80% reduziert. Das RNAi-Konstrukt, das *Mt5g063940* treffen sollte, bewirkte keine Änderung der Expression von *Mt60935*. Die Expression von *Mt5g063940* betreffend konnte in den *Mt5g063940* RNAi-Linien eine Abnahme beobachtet werden, diese betrug im Vergleich zu den Vektorkontrolllinien L2 und L3 etwa 70%, im Vergleich zur Vektorkontrolllinie L4 allerdings nur etwa 50%. In den *Mt60935* RNAi-1 und RNAi-2 Linien konnte keine Änderung der Transkriptmenge von *Mt5g063940* gemessen werden. Mit dem Konstrukt RNAi-2 60935, das eine Herunterregulierung beider Phosphatasen bewirken sollte, konnte weder für *Mt60935* noch für *Mt5g063940* eine signifikante Änderung der Transkriptmengen erreicht werden. Daher wurden diese Linien nicht für die darauffolgenden Mykorrhizierungsexperimente benutzt.

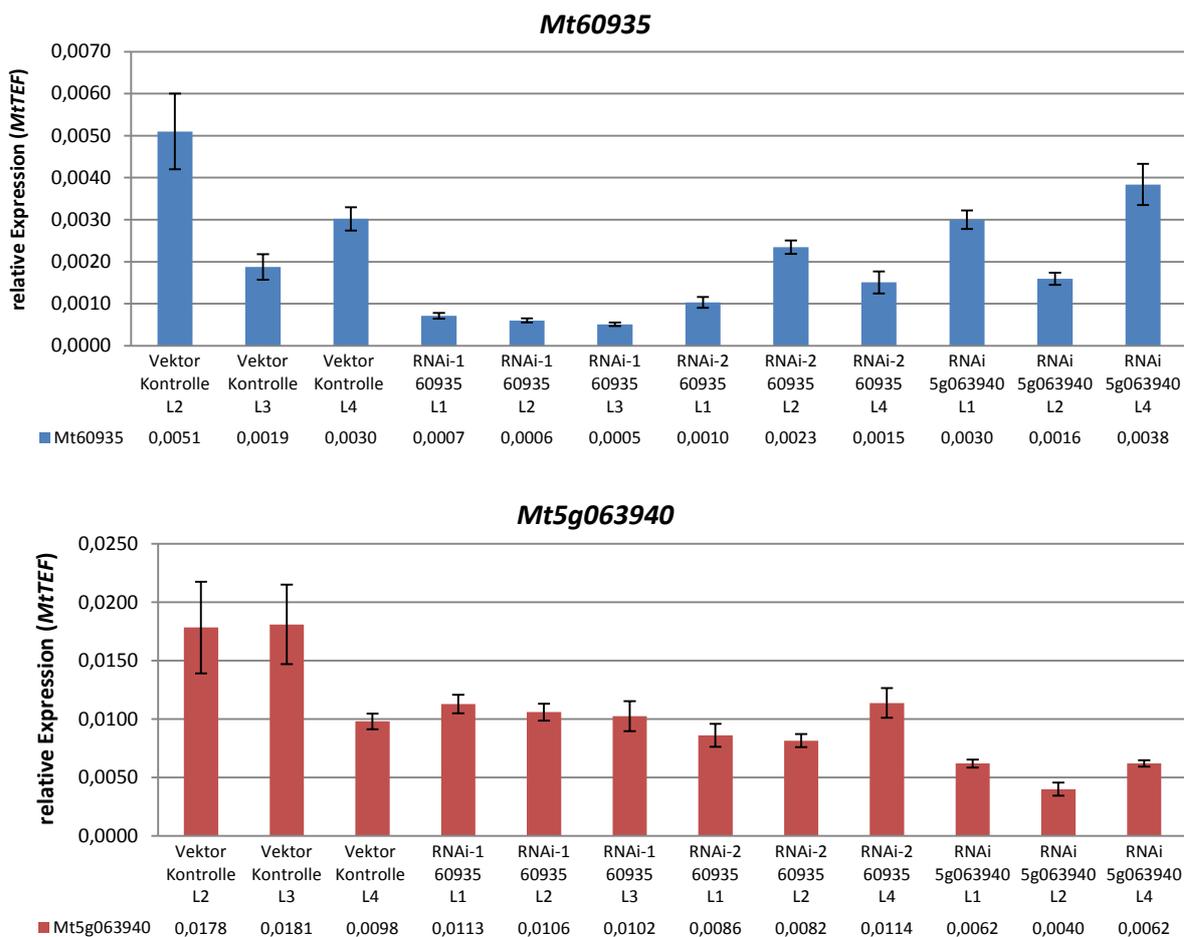


Abb. 2.26 RNAi-vermittelte Inaktivierung von *Mt60935* und *Mt5g063940*

Die *Mt60935* RNAi-1 Linien zeigten im Vergleich zu den Vektorkontrolllinien (mit dem RNAi-Leervektor transformierte Wurzeln) eine Reduktion des mRNA Transkriptlevels um etwa 80%. In *Mt5g063940* RNAi-Linien war die Transkriptmenge im Vergleich zu den Kontrolllinie L2 und L3 um etwa 70% reduziert, im Vergleich zur Kontrolllinie L4 um etwa 50%. Das Konstrukt RNAi-2 60935, das beide PP2Cs treffen sollte, bewirkte keine signifikante Änderung der Transkriptmenge. Gezeigt ist die relative Expression zum Haushaltsgen *MtTEF*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

Die *Mt60935* RNAi-1 Linien sowie die *Mt5g063940* RNAi-Linien wurden für anschließenden Mykorrhizierungsexperimente verwendet. Dazu wurden die RNAi-Linien zusammen mit drei Vektorkontrolllinien, die mit dem RNAi-Leervektor transformiert wurden, mit Hilfe des Zweikompartimentensystems (siehe Abschnitt 4.10.5) mit *R. irregularis* coinkubiert, die Wurzeln nach 3, 6 und 12 Tagen geerntet und mit Tinte gefärbt. Die Wurzeln wurden unter dem Mikroskop betrachtet und der Mykorrhizierungsgrad Trouvelot *et al.* (1986) bestimmt. Es wurde die Frequenz der Kolonisierung (F) im Wurzelsystem, die Intensität der Kolonisierung (m) in mykorrhizierten Wurzelfragmenten und die Menge der Arbuskeln (a), der intraradikalen Hyphen (i) und der Appressorien (ap) in den mykorrhizierten Wurzelfragmenten quantifiziert. Pro Wurzellinie und Zeitpunkt wurden drei Platten ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.27 dargestellt, wobei die verschiedenen Parameter in Prozent angegeben sind.

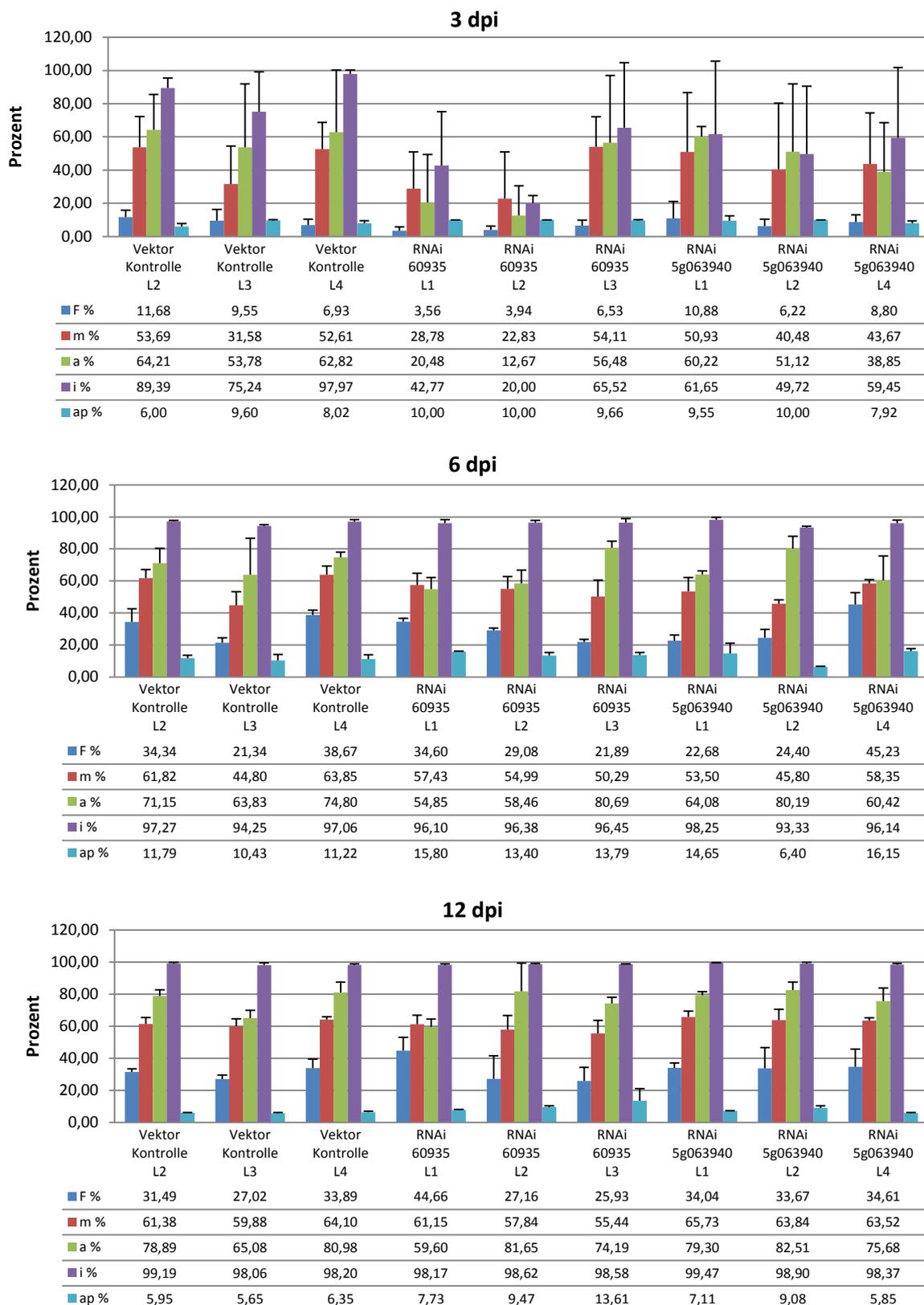


Abb. 2.27 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades von *Mt60935* und *Mt5g063940* RNAi-Linien

Quantifizierung der Mykorrhizierung der *Mt60935* und *Mt5g063940* RNAi-Linien sowie der Leervektor-Kontrolllinien nach 3, 6 und 12 Tagen (dpi) Kokultivierung mit *R. irregularis*. Die Frequenz (F) der Kolonisation im Wurzelsystem, die Intensität (m) der Kolonisation in den mykorrhizierten Wurzelfragmenten sowie die Abundanz der Arbuskeln (a), intraradikalen Hyphen (i) und Appressorien (ap) in den mykorrhizierten Wurzelfragmenten wurden bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier biologischer Replikate wieder.

Nach 3-tägiger Coinkubation konnte in den *Mt60935* RNAi-Linien L1 und L2 eine geringere Frequenz und Intensität der Mykorrhizierung im Vergleich zu den Kontrolllinien beobachtet werden. Die RNAi-Linie L3 hingegen zeigte keinen Unterschied zu den Kontrolllinien. Mikroskopische Analysen und die großen Standardabweichungen bei allen bewerteten Parametern und Wurzellinien lassen jedoch auf starke Unterschiede innerhalb der drei biologischen Replikate schließen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass trotz sorgsamer Auswahl der Mykorrhizierungsplatten auf jeder Platte eine unterschiedliche Menge an pilzlichem Myzel vorhanden ist und die Mykorrhizierung in diesem System daher nicht vollständig synchronisiert werden kann, was sich vor allem nach einer relativ kurzen Inkubationszeit von drei Tagen bemerkbar macht. Statistische Analysen mit Hilfe des Student'schen t-Test belegen jedoch ein Unterschied in der Frequenz (F%) der Mykorrhizierung zu einem Signifikanzwert von $p=0,046$. Dies ist ein erster Hinweis auf einen Einfluss von *Mt60935* auf die Häufigkeit der pilzlichen Kolonisation in der Wurzel. Der Unterschied in der Intensität der Mykorrhizierung innerhalb der kolonisierten Wurzel ist jedoch statistisch nicht signifikant. Nach 6- und 12-tägiger Mykorrhizierung konnte in keiner Wurzellinie signifikante Unterschiede in Frequenz und Intensität der pilzlichen Kolonisation sowie in der Menge der Arbuskeln, intraradikalen Hyphen und Appressorien festgestellt werden. Auch die Morphologie der pilzlichen Strukturen in den RNAi-Linien unterschied sich nicht zu den Kontrolllinien.

Die reduzierte Frequenz der pilzlichen Kolonisation in den *Mt60935* RNAi-Linien nach 3 dpi, nicht aber nach 6 und 12 dpi, spricht dafür, dass die Inaktivierung von *Mt60935* zu einer verzögerten Mykorrhizierung führt, die sich aber, sobald ein bestimmtes Mykorrhizierungslevel erreicht ist, nicht mehr bemerkbar macht. Diese Ergebnisse liefern daher erste Hinweise auf einen positiven Einfluss der Phosphatase *Mt60935* auf die AM-Symbiose. Dies muss allerdings durch weitere Experimente mit einer höheren Anzahl an biologischen Replikaten geprüft werden.

3 Diskussion

3.1 Die PP2C-Familie in *M. truncatula*

Die in dieser Arbeit charakterisierten Phosphatasen sind die ersten PP2Cs, die in *M. truncatula* beschrieben wurden. PP2Cs bilden die größte Gruppe von Proteinphosphatasen in Pflanzen und sind hauptsächlich in der Stressantwort und in der Pflanzenentwicklung beteiligt (Fuchs et al, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die PP2C-Familie in *M. truncatula* phylogenetisch analysiert und mit der PP2C-Familie aus *A. thaliana* verglichen (siehe Abschnitt 2.9.1). In *M. truncatula* konnten 89 PP2Cs identifiziert werden, in Reis 90 PP2Cs und in *Arabidopsis* existieren nur 80. Die höhere Anzahl an Proteinphosphatasen in *M. truncatula* und Reis korreliert mit den Genomgrößen (*M. truncatula*: 450-520 Mb, Reis: ~430 Mb). Im Vergleich zu *A. thaliana* (~135Mb) sind diese Genome etwa dreimal so groß. Die PP2Cs aus *Medicago* sind ebenso wie in *Arabidopsis* in verschiedene Gruppen unterteilt, die Aufteilung und die Anzahl der PP2Cs in den einzelnen Gruppen sind dabei sehr ähnlich. Die Topologie der phylogenetischen Bäume ist fast identisch (Abbildung 2.18).

Vergleicht man die PP2C-Sequenzen der beiden Pflanzen miteinander und erstellt einen phylogenetischen Baum wie es beispielhaft für die Gruppe F in Abbildung 2.19 gezeigt ist, fällt auf, dass jede Gruppe Phosphatasen von beiden Pflanzen enthält. Die *M. truncatula* und *A. thaliana* Gene aus einer Gruppe sind daher näher miteinander verwandt, als die PP2C Gene desselben Organismus aus verschiedenen Gruppen. Dies wurde auch im Vergleich der PP2Cs aus Reis und *Arabidopsis* beobachtet (Xue et al., 2008). Das bedeutet, dass ein bestimmtes Set an ancestralen Genen, das jede PP2C-Gruppe definiert, schon vor der evolutiven Divergenz von monokotylen und dikotylen Pflanzen existiert haben muss. Die PP2C-Familie mit ihren verschiedenen Untergruppen hat sich daher schon früh in der Evolution der Pflanzen gebildet. Die Anzahl der Untergruppen und Mitglieder hat sich aber im Laufe der Evolution gesteigert. So ist zum Beispiel die Gruppe B, die die MAPK Phosphatasen enthält, in einzelligen Grünalgen der Gattung *Chlamydomonas* und im Moos *Physcomitrella patens* nicht vorhanden, im Moosfarn *Selaginella moellendorffii* und in höheren Pflanzen existieren 3-6 Vertreter dieser Gruppe (Fuchs et al., 2012). Die fortschreitende Zunahme und Aufspaltung der PP2C Gene korreliert mit der Entwicklung der Vielzelligkeit in Pflanzen und der Anpassungsfähigkeit an ständig wechselnde Umweltbedingungen.

Die phylogenetischen Analysen der PP2C-Familie in *M. truncatula* ergaben eine hohe Zahl an paralogen Genen. Viele dieser Genpaare weisen einen hohen *bootstrap*-Wert (>90%) auf, was die Hypothese unterstützt, dass die Divergenz der PP2C-Gene auf Genduplikationen basiert. Analysen der chromosomalen Lokalisation der PP2Cs in Reis und *Arabidopsis* haben gezeigt, dass die Gene hauptsächlich durch Genomduplikationen und segmentalen Duplikationen und weniger durch Tandemduplikationen entstanden sind

(Xue *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010). Dies trifft wahrscheinlich auch auf *M. truncatula* zu, allerdings muss dies erst durch Analysen der PP2C-Loci im Genom untersucht werden.

3.2 Die PP2Cs der Gruppe F und ihre Expression in Pflanzen

MtPP2C2 ist eine Phosphatase der Gruppe F. In *Arabidopsis* konnten bisher zwei Mitgliedern aus dieser Gruppe eine Funktion zugeordnet werden: AtPIA1 und AtWIN2. Beide Phosphatasen spielen eine Rolle in der pflanzlichen Immunität gegenüber dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae*. AtPIA1 wurde durch biochemische Analysen als verstärkt exprimiertes Gen nach der Infektion mit einem *P. syringae* Stamm identifiziert, der den bakteriellen Effektor AvrRpm1 sezerniert (Widjaja *et al.*, 2010). AtWIN2 hingegen wurde in einem Y2H-Screen als Interaktionspartner des Effektors HopW1-1 aus *P. syringae* entdeckt (Lee *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass beide PP2Cs in der Pflanzenabwehr involviert sind, könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich diese PP2C-Gruppe im Zuge der Evolution auf eine Rolle in Pflanzen-Mikroben-Interaktionen spezialisiert hat.

Eine Korrelation zwischen der phylogenetischen Verwandtschaft und der Erhaltung von funktionellen Eigenschaften konnte bisher für die Gruppe A und B gezeigt werden. Während die PP2Cs der Gruppe A ausschließlich in ABA-induzierten Signalwegen eine Rolle spielen, sind die Mitglieder der Gruppe B für die Regulation von MAP Kinasen verantwortlich. Da dies sowohl auf die PP2Cs von *Arabidopsis* als auch auf Reis zutrifft, müssen sich die entsprechenden Gene aus gemeinsamen anzeustralen Genen entwickelt haben, deren Funktionsweisen im Laufe der Evolution erhalten geblieben sind (Xue *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2010, Fuchs *et al.*, 2012). Allerdings gibt es auch ein Beispiel, indem Phosphatasen der gleichen Gruppe unterschiedliche Funktionen übernommen haben. So regulieren POL und die verschiedenen POL-ähnlichen PP2Cs in *Arabidopsis* die Bildung von Meristemen und die Blattentwicklung (Song & Clark, 2005). Das Ortholog zu POL/PLL4-5 in Reis, die Phosphatase XB15, spielt hingegen eine Rolle in der Pflanzenimmunität (Park *et al.*, 2008).

In *M. truncatula* zeigt MtPP2C2 eine große Homologie zu AtPIA1. Allerdings existiert mit At3g15260 eine weitere PP2C in *Arabidopsis*, die eine noch größere Übereinstimmung mit MtPP2C2 aufweist und daher eher als orthologes Protein in Frage kommt (Abbildung 2.19). Interessant hierbei ist auch die Tatsache, dass At3g15260 eine größere Homologie zu MtPP2C2 als zu AtPIA1 aufweist. Dies spricht dafür, dass MtPP2C2 und seine Orthologe in höheren Pflanzen konserviert sind und die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass diese Proteine ähnliche Funktionen erfüllen. Da *Arabidopsis* keine Symbiose mit Mykorrhiza-Pilzen eingehen kann, liegt die Vermutung nahe, dass diese Phosphatase nicht ausschließlich eine Rolle in der AM-Symbiose spielt. Die Analyse von Expressionsdaten aus Microarray-Experimenten in *Arabidopsis* ergab, dass At3g15250 in allen Pflanzengewebe exprimiert wird und die Expression durch die Zugabe von ABA, nicht aber durch verschiedene Stressfaktoren wie Trockenheit, Salz, Kälte, Hitze, Ozon oder hohe Lichtintensitäten induziert wird (Xue *et al.*, 2008). Dies wurde aber nicht durch

weitere Experimente wie qRT-PCR-Analysen bestätigt. Expressionsanalysen von MtPP2C2, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten eine moderate Expression in Wurzeln, die sich im Laufe der AM-Symbiose nicht ändert (Abbildung 2.4 und 2.23). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Funktion von MtPP2C2 in der AM-Symbiose lag, wurde die Expression von *MtPP2C2* nicht in weiteren Geweben oder unter anderen Bedingungen untersucht. In der Datenbank des *Medicago truncatula Gene Expression Atlas* (MtGEA) findet man für *MtPP2C2* (Mtr.8586.1.S1_at) in allen Pflanzengeweben und unter verschiedenen abiotischen und biotischen Stressbedingungen ein ähnliches Expressionslevel. Auch während der Wurzelknöllchen-Symbiose und der AM-Symbiose ändert sich das Expressionslevel von *MtPP2C2* nicht signifikant. Deutlich induziert ist *MtPP2C2* dagegen in der Samenentwicklung, ein Prozess, der unter anderem auch unter der Kontrolle von ABA steht (Finkelstein *et al.*, 2002, Kanno *et al.*, 2010). Eine ABA-induzierte Expression wurde hier allerdings nicht getestet. Anhand der Expressionsdaten aus *Medicago* und *Arabidopsis* kann man schließen, dass *MtPP2C2* und das putative Ortholog *At3g15260* konstitutiv in allen Pflanzengeweben exprimiert sind und eventuell eine Rolle in der Samenentwicklung spielen. Dies zeigt, dass MtPP2C2 offenbar nicht ausschließlich in der Symbiose mit AM-Pilzen involviert ist. Für die Phosphatase KAPP aus *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass sie mit mehreren Rezeptor-ähnlichen Kinasen interagiert und verschiedene zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Pflanzenabwehr und Hormonantworten reguliert (Williams *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 1997; Gomez-Gomez *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2007). Eine Funktion von MtPP2C2 in mehreren Signalkaskaden ist daher nicht unwahrscheinlich.

Von *MtPP2C2* existiert ein paraloges Gen: *Mt49964*. Da von beiden Genen die Lokalisation im Genom aufgrund fehlender Assemblierung der entsprechenden Contigs nicht bekannt ist, kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, welche Art von Genduplikation stattgefunden hat. *Mt49964* hat im Vergleich zu *MtPP2C2* eine N-terminale Verlängerung von 50 Aminosäuren, ein entsprechendes Ortholog in *Arabidopsis* existiert nicht. Die in Abbildung 2.23 gemessene Expression in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln ergab keine signifikanten Unterschiede, das Expressionslevel ist ähnlich zu *MtPP2C2*. Allerdings zeigt *Mt49964* im Vergleich zu *MtPP2C2* ein anderes Expressionsmuster in den Daten von MtGEA (Mtr.37473.1.S1_at). Die Expression in Wurzeln ist hier generell ein wenig erhöht im Vergleich zu anderen Pflanzengeweben. Eine leicht verringerte Expression kann in symbiotischen Wurzelknöllchen und nach der Behandlung mit dem Pflanzenpathogen *Phymatotrichum sp.* beobachtet werden. Besonders auffällig ist aber die geringe Expression während der Samenentwicklung, die im Gegensatz zur Induktion von *MtPP2C2* in den gleichen Proben steht. Dies bedeutet, dass die Expression der beiden paralogenen Gene wahrscheinlich differenziell reguliert wird und die Proteine unterschiedliche Aufgaben in der Zelle erfüllen.

Eine mit Hilfe von qRT-PCR und der im *Medicago Gene Expression Atlas* hinterlegten Daten durchgeführte Expressionsanalyse einer weiteren Untergruppe der F Phosphatasen, die die Mitglieder Mt60935, Mt5g063940, Mt52429 und Mt2g008850

umfasst, zeigte Unterschiede im basalen Expressionslevel und im Expressionsmuster auf. Das Expressionsverhalten von *Mt52429* in unterschiedlichen Geweben bzw. unter verschiedenen Bedingungen ähnelt stark dem von *Mt49964*. Die Phosphatasen *Mt5g063940* und *Mt2g008850* weisen ebenso ein fast identisches Expressionsmuster auf, auch wenn die Transkriptmengen von *Mt5g063940* generell deutlich niedriger sind. Besonders interessant ist die Expression von *Mt60935*: eine Induktion der Expression erfolgt nicht nur im frühen Stadium der AM-Symbiose, sondern auch in der Rhizobien-Symbiose. Laut MtGEA (Mtr.12152.1.S1_at) wird die Phosphatase in allen getesteten Pflanzengeweben oder unter Stressbedingungen nur sehr schwach exprimiert. Die größte Transkriptmenge konnte in 10 Tage alten Wurzelknöllchen gemessen werden, die Expression war hier um das 45-fache induziert im Vergleich zu Kontrollwurzeln. Die mykorrhizierten Wurzeln zeigten in den Daten von MtGEA keine signifikante Änderung der *Mt60935* Expression. Allerdings liegen hier nur Daten von Wurzeln vor, die nach sechswöchiger Inkubation mit dem Pilz geerntet wurden und daher bereits voll mykorrhiziert sind. In dieser Arbeit konnte die stärkste Induktion der *Mt60935* Expression nach 3 Tagen Coinkubation mit dem Pilz gemessen werden (Abbildung 2.23). Zu diesem Zeitpunkt ist der Pilz nur an sehr wenigen Stellen in die Wurzel eingedrungen, hauptsächlich befinden sich die Hyphen auf der Wurzeloberfläche. In dieser Phase der Etablierung der Symbiose findet ein intensiver Signalaustausch statt, in dem auch der SYM-Signalweg mit MtDMI2 involviert ist (Bouwmeester *et al.*, 2007; Bonfante & Requena, 2011).

Interessant ist die Tatsache, dass sich die Expression von *Mt60935* auch durch einen Extrakt von *R. irregularis*-Sporen induzieren lässt (Abbildung 2.24). Da der Extrakt aus dormanten Sporen hergestellt wurde, die zuvor keinen pflanzlichen Signalen ausgesetzt waren, muss die Signalsubstanz, die zur Induktion von *Mt60935* führt, konstitutiv vorhanden sein. Eine solche Aktivierung konnte auch für das Gen *TC107197* beobachtet werden (Kuhn *et al.*, 2010; Kuhn, 2011). Das pilzliche Signal, was zur Induktion von *TC107197* führt, konnte bisher nicht identifiziert werden. Die volle Induktion der Expression von *Mt60935* kann nur durch die Anwesenheit pilzlicher Hyphen erreicht werden. Ob dafür dieselbe Substanz wie aus den ungekeimten Sporen verantwortlich ist, oder ob weitere pilzliche oder auch pflanzliche Signale benötigt werden, muss durch weitere Experimente untersucht werden. Wichtige Informationen nicht nur zur Expression des Gens, sondern auch zur Regulation der Interaktion mit MtDMI2, würden Genexpressionsanalysen von *Mt60935* in Mutanten des SYM-Signalwegs liefern. So wäre es interessant zu wissen, ob die erhöhte Expression in der frühen Phase der AM-Symbiose abhängig von Mitgliedern des SYM-Signalwegs ist oder nicht. Die Tatsache, dass *Mt60935* auch während der Wurzelknöllchen-Symbiose induziert wird und der SYM-Signalweg in beiden Symbiosen eine wichtige Rolle spielt, könnte ein Hinweis auf eine SYM-abhängige Induktion von *Mt60935* sein.

3.3 Die symbiotische Rezeptor-ähnliche Kinase MtDMI2 interagiert mit PP2Cs der Gruppe F

Im Zuge dieser Arbeit konnte in einem Y2H-Screen MtPP2C2, eine Proteinphosphatase 2C der Gruppe F, als Interaktionspartner der Intrazellulärdomäne der Rezeptorkinase MtDMI2 identifiziert werden. Weitere Protein-Protein-Interaktionsstudien mit der Y2H-Methode ergaben, dass sieben weitere PP2Cs der Gruppe F mit MtDMI2 interagieren können (Abbildung 2.21). Sechs dieser Phosphatasen bilden zusammen mit MtPP2C2 die Untergruppe F2, das heißt alle Mitglieder dieser Untergruppe können mit DMI2 interagieren. In der Gruppe F1 kann nur eine PP2C mit MtDMI2 interagieren und dies auch nur sehr schwach. Trotz der Interaktion mit mehreren Mitgliedern der Gruppe F, hat die Kinase MtDMI2 eine gewisse Präferenz zu bestimmten PP2Cs, was sich in unterschiedlichen Interaktionsstärken widerspiegelt. Es gibt die Tendenz, dass die Interaktion umso stärker ist, je näher die jeweilige Phosphatase mit MtPP2C2 verwandt ist. Eine ähnlich starke Interaktion wie mit MtPP2C2 konnte für die paraloge Phosphatase Mt49964 und für Mt60935 beobachtet werden. Erstaunlich ist, dass Mt5g063940, die paraloge Phosphatase zu Mt60935, nur eine ganz schwache Interaktion mit MtDMI2 zeigt, obwohl die beiden Phosphatasen sehr ähnlich sind. Analysen der Aminosäuresequenzen aller F2 Phosphatasen ergaben keinen Hinweis bezüglich eines konservierten Motivs oder einer Domäne, die nur den am stärksten interagierenden PP2Cs gemein ist.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Y2H-Analysen mit N-terminal verkürzten Varianten der Phosphatasen durchgeführt wurden. Aufgrund der stark konservierten Aminosäuresequenz insbesondere in diesem Bereich des Proteins, ist es nicht verwunderlich, dass DMI2 zumindest in Hefe mit mehreren Phosphatasen interagieren kann. Auch für andere Interaktionspartner dieser Kinase konnte eine Interaktion mit mehreren Mitgliedern der jeweiligen Proteinfamilie beobachtet werden. So interagiert MtDMI2 nicht nur mit dem Enzym HMGR1, sondern auch mit weiteren Isoformen der HMGR-Familie (Kevei *et al.*, 2007, diese Arbeit). LjSYMRK (das Ortholog zu DMI2 in *L. japonicus*) interagiert mit 4 Mitgliedern der SINA-Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen, obwohl nur SINA4 in die Degradation von LjSYMRK involviert ist (Den Harder *et al.*, 2012). Allerdings wurde nicht untersucht, ob all diese Interaktionen auch *in vivo* stattfinden.

Eine Interaktion von MtDMI2 mit dem Volllängenprotein von MtPP2C2 konnte zumindest in Hefe nicht beobachtet werden (Abbildung 2.5), weshalb auch für weitere Phosphatasen zunächst nur die N-terminal verkürzten Varianten getestet wurden. Weiterführende Analysen mit den Volllängenproteinen der am stärksten interagierenden Phosphatasen Mt49964 und Mt60935 ergaben ebenso keine positiven Interaktionen (Daten nicht gezeigt). Da mit BiFC-Analysen in *N. benthamiana* und in *in vitro* Pull-down-Analysen für MtPP2C gezeigt werden konnte, dass sowohl die N-terminal verkürzte Proteinvariante als auch das Protein in voller Länge mit MtDMI2 interagieren kann, kann ausgeschlossen werden, dass die mit dem Y2H-System identifizierten Interaktionen unspezifisch sind oder nur artifiziell in Hefe stattfinden (Abbildungen 2.6 und 2.7). Versuche, eine genomische Version von MtDMI2 als GFP-Fusion in Wurzeln von *M. truncatula* zu exprimieren und

damit eine Coimmunopräzipitation *in vivo* durchzuführen, waren bisher nicht erfolgreich (Nina Rieger, Birgit Pfeil, Cristina Albarrán, unpubliziert). Erst kürzlich wurden von Riely *et al.* (2013) stabil transformierte *M. truncatula*-Linien generiert, die eine genomische Version von MtDMI2 als Fusionskonstrukt mit Streptavidin und dem Hämagglutin-Epitop exprimieren. Unter Verwendung dieser Linie könnte man nun Wurzeln herstellen, die zusätzlich eine getaggte Version der jeweiligen Phosphatase exprimieren und so über eine Coimmunopräzipitation nachweisen, welche der in Hefe bestätigten Interaktionen tatsächlich *in vivo* stattfinden. Schwierigkeiten könnten sich allerdings durch eine mögliche Dynamik der Interaktionen ergeben. Da keine Kenntnisse darüber vorliegen, ob die Interaktionen *in vivo* nur in bestimmten Zellen und/oder nur temporär vorliegen, könnte eine Coimmunopräzipitation auch zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die Tatsache, dass MtPP2C2 und MtDMI2 in allen drei getesteten heterologen Systemen miteinander interagieren, ist ein Hinweis dafür, dass für die physische Interaktion keine weiteren Proteine oder Liganden notwendig sind. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne von MtDMI2, die eventuell an der Bindung von pilzlichen oder pflanzlichen Signalen beteiligt ist, nicht für eine *in vitro* Interaktion mit MtPP2C2 benötigt wird. Beides spricht dafür, dass zumindest die Interaktion zwischen MtPP2C2 und MtDMI2 auch *in vivo* unabhängig von einem pilzlichen oder pflanzlichen Signal stattfinden kann. Eine Regulation der Interaktion über die Genexpression und der daraus resultierenden An- oder Abwesenheit eines oder beider Interaktionspartner ist ebenso ein wichtiger Aspekt, der bei einer *in vivo* Analyse beachtet werden muss. *MtPP2C2* und sein Paralog *Mt49964* sind in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln konstitutiv exprimiert, eine Regulation der Interaktion mit MtDMI2 über die Genexpression ist daher unwahrscheinlich. Die basale Genexpression von *Mt60935* dagegen ist in nicht-mykorrhizierten Wurzeln niedrig, während der frühen Phase der AM-Symbiose aber induziert. Eine Regulation der Interaktion zwischen *Mt60935* und MtDMI2 über die transkriptionelle Aktivierung von *Mt60935* ist also durchaus denkbar. Weiterhin kann eine Regulation der Interaktion auch über posttranskriptionelle Mechanismen stattfinden.

Eine weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen MtDMI2 und MtPP2C2 in Hefe ergab, dass die Juxtamembrandomäne von MtDMI2 notwendig und ausreichend für eine Interaktion mit dem C-Terminus von MtPP2C2 ist (Abbildung 2.8). Das bedeutet, dass eine funktionelle Kinasedomäne und somit eine Autophosphorylierung von MtDMI2 keine Voraussetzung für eine *in vitro* Interaktion ist. Für die Rezeptorkinase XA21 aus Reis, die in der Pflanzenimmunität eine Rolle spielt, konnte gezeigt werden, dass sie im Y2H-System mit der PP2C XB15 interagiert und für diese Interaktion die Juxtamembrandomäne zwar essentiell, aber nicht ausreichend ist (Park *et al.*, 2008). Eine Interaktion kann hier nur stattfinden, wenn eine katalytisch aktive Kinase vorliegt. Die Tatsache, dass die Juxtamembrandomäne von MtDMI2 ausreichend für eine Interaktion mit MtPP2C2 ist, zeigt, diese Region auch im dephosphorylierten Zustand als Bindestelle für die Phosphatase dienen kann. Um die Aminosäuren zu identifizieren, die für die Bindung verantwortlich sind, könnte man die Interaktion mit verschiedenen kleineren Teilstücken der Juxtamembrandomäne testen und einzelne Aminosäuren mutieren.

Solche Analysen wären aus zwei Gründen auch auf Seiten der Phosphatase von Interesse. Erstens könnten so die Aminosäuren bestimmt werden, die essentiell für die Interaktion mit MtDMI2 sind. Zweitens, um festzustellen welcher Bereich des N-Terminus für den Verlust der Interaktion in Hefe verantwortlich ist.

Da MtDMI2 mit mehreren PP2Cs interagieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Phosphatasen möglicherweise mit weiteren Rezeptor-ähnlichen Kinasen (RLK) interagieren können. Dies wurde mit drei RLKs getestet, die eine große Homologie zu MtDMI2 haben. Es hat sich gezeigt, dass keine der drei Kinasedomänen mit MtPP2C2 interagiert (Abbildung 2.5). Neuere Untersuchungen, die im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefanie Walter (2012) gemacht wurden, ergaben, dass MtPP2C2 und Mt60935 als einzige Vertreter der Gruppe F2 mit der RLK MtLYR1 interagieren können. Während die Interaktion von MtLYR1 und MtPP2C2 ähnlich stark war wie die Interaktion zwischen MtDMI2 und MtPP2C2, ist die Interaktion zwischen MtLYR1 und Mt60935 nur sehr schwach ausgeprägt. Die Rezeptorkinase MtLYR1 ist ein Paralog des Nod-Faktor-Rezeptors und könnte für die Perzeption von pilzlichen Signalen (Myc-LCOs) verantwortlich sein (Gomez *et al.*, 2009). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Kinasedomänen von MtDMI2 mit MtLYR1 und mit den drei RLKs, die nicht mit MtPP2C2 interagieren, so ist deutlich zu erkennen, dass MtDMI2 die geringste Homologie zu MtLYR1 aufweist (Abbildung 3.1). Das ist deshalb überraschend weil MtPP2C2 eben mit diesen beiden RLKs interagiert, nicht aber mit den vermeintlich engeren Verwandten von MtDMI2.

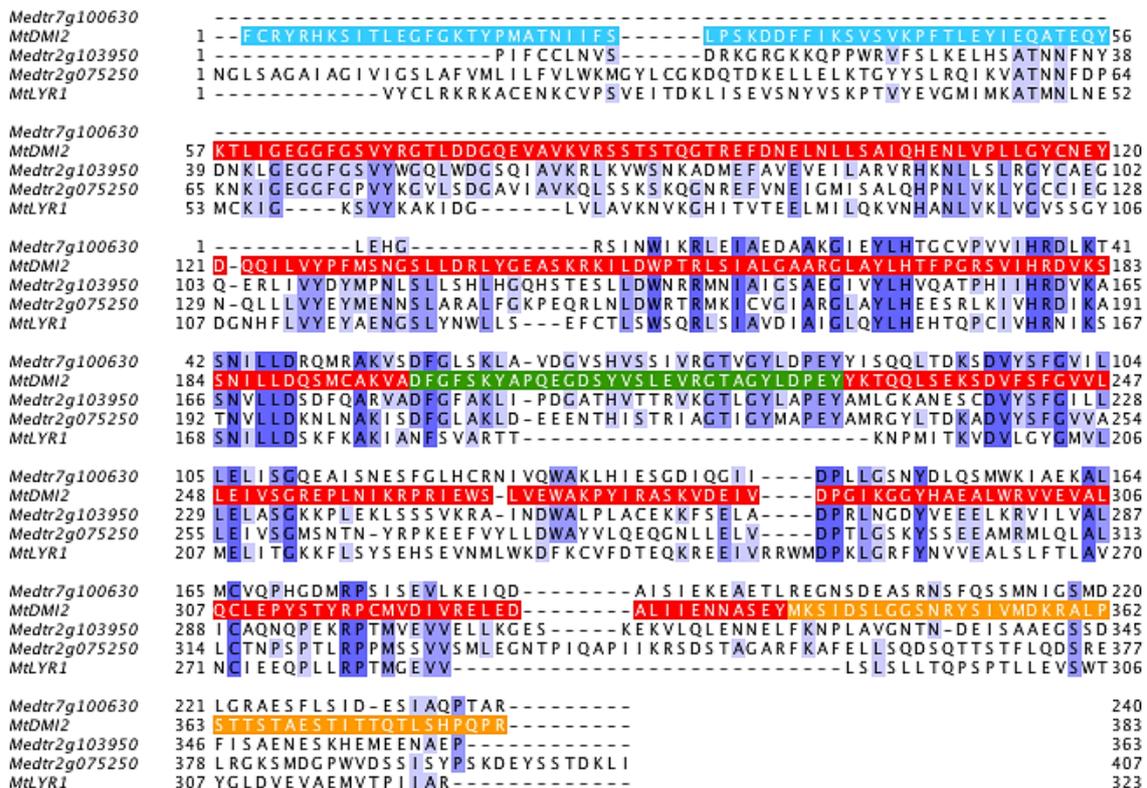


Abb. 3.1 Alignment der Intrazellulärdomänen der symbiotischen Kinasen MtDMI2 und MtLYR1 sowie dreier Kinasen, die sehr ähnlich zu MtDMI2 sind.

Das Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit ClustalW generiert. Die Juxtamembrandomäne ist türkis, die Kinasedomäne rot, die Aktivierungsdomäne grün und der Carboxyterminus gelb markiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Juxtamembrandomäne von MtDMI2 ausreichend ist für eine Interaktion mit der Phosphatase MtPP2C2 (Abbildung 2.8). Da ausschließlich Serin- oder Threoninreste als Substrate für Phosphatasen in Frage kommen, spielen diese möglicherweise auch für die Interaktion mit diesen eine Rolle. Tatsächlich gibt es einen Serinrest in der Juxtamembrandomäne, der nur in MtDMI2 und MtLYR1, nicht aber in den drei anderen RLKs vorkommt. Mit dem Ersetzen dieses Serinrestes durch eine unpolare Aminosäure könnte überprüft werden, ob dieser Rest für die Interaktion tatsächlich relevant ist. Allerdings konnte bislang noch nicht gezeigt werden, ob auch im Falle von MtLYR1 die Juxtamembrandomäne ausreichend für die Interaktion mit MtPP2C2 ist.

Warum MtDMI2 mit mehreren PP2Cs der Gruppe F interagieren kann, MtLYR1 aber nur mit MtPP2C2, ist schwierig zu beantworten. Da die Interaktionen aber ausschließlich *in vitro* mit der Y2H-Methode getestet wurden und bei dieser Methode beide Proteine überexprimiert in der gleichen Zelle vorliegen, ist es verwunderlich, dass trotz der starken Homologie der Phosphatasen die Kinase MtLYR1 nur mit MtPP2C2 interagieren kann. Hier hätte man zumindest eine Interaktion mit Mt49964, dem Paralogen zu MtPP2C2, erwartet, vor allem mit dem Hintergrundwissen, dass MtDMI2 mit allen Phosphatasen der Gruppe F2 interagieren kann. *In vivo* könnten unterschiedliche lokale und zeitliche Expressionen der hier getesteten Phosphatasen und Kinasen manche Interaktionen möglich machen und andere wiederum nicht. Mit Promotor-Reporterkonstrukten konnte eine Expression von MtDMI2 in Wurzelhaaren, in der Wurzelepidermis und, deutlich schwächer ausgeprägt, auch im Wurzelcortex nachgewiesen werden (Bersoult *et al.*, 2005). Für MtLYR1 sowie für die Phosphatasen gibt es noch keine Daten zu einer zellspezifischen Expression in Wurzeln. Sehr interessant ist die Interaktion zwischen MtLYR1 und MtPP2C2 im Hinblick auf eine mögliche Funktion von MtLYR1 als Rezeptor für Lipochitooligosaccharide, die nicht nur von AM-Pilzen, sondern auch von Rhizobien sezerniert werden. MtLYR1 wäre somit neben MtDMI2 die zweite symbiotischen Rezeptorkinase, die möglicherweise von MtPP2C2 reguliert werden könnte. Für den Nod-Faktor-Rezeptor MtNFP, ein Paralog von MtLYR1, konnte gezeigt werden, dass er zusammen mit MtDMI2 in Mikrodomänen in der Plasmamembran lokalisiert. Beide Rezeptoren interagieren mit dem plasmamembranlokalisierten Remorin SYMREM, was als Art Gerüst für die Bildung von Rezeptorkomplexen wirken könnte (Lefebvre *et al.*, 2010). Für MtLYR1 wurde noch keine Interaktion mit SYMREM untersucht, aber da die paraloge Rezeptorkinase MtNFP ein Interaktionspartner von SYMREM ist, ist eine Interaktion mit MtLYR1 wahrscheinlich. Die Interaktion von MtPP2C2 mit MtDMI2 und MtLYR1 könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch MtPP2C2 ein Teil dieses Rezeptorkomplexes ist und die Regulation der Kinaseaktivitäten übernimmt.

3.4 Ist MtDMI2 ein Substrat von MtPP2C2?

Obwohl eine Interaktion von MtDMI2 mit Mitgliedern der Gruppe F Phosphatasen nachgewiesen werden konnte, ist dies noch kein Beleg dafür, dass MtDMI2 auch ein Substrat der Phosphatasen ist und von diesen dephosphoryliert wird. Eine weitere

Möglichkeit wäre eine Phosphorylierung der Phosphatasen durch die Kinase. Um dies zu testen wurden *in vitro* Kinase-Phosphatase-Experimente durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6). Da zum damaligen Zeitpunkt nur die Interaktion mit MtPP2C2 bekannt war, wurde nur diese Phosphatase für die Versuche benutzt. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass MtDMI2 *in vitro* autophosphoryliert und auch fähig ist, andere Proteine zu phosphorylieren (Abbildung 2.9). Eine Phosphorylierung von MtPP2C2 durch MtDMI2 konnte allerdings nicht beobachtet werden (Abbildung 2.10). Ebenso ist die Phosphatase nicht fähig, eine sichtbare Reduzierung des Phosphorylierungslevels von MtDMI2 zu bewirken. Dies muss aber nicht bedeuten, dass keine Dephosphorylierung stattfindet. Da die Kinase eine starke Autophosphorylierungsaktivität besitzt, könnte es sein, dass dephosphorylierte Serin- und Threoninreste sofort wieder phosphoryliert werden. Der Einsatz eines Kinaseinhibitors und einer höheren Phosphatasekonzentration würden eventuell weitere Erkenntnisse liefern.

Eine andere Erklärung findet sich in der Literatur. In *in vitro* Phosphatase-Experimenten mit dem Volllängenprotein der PP2C POL aus *Arabidopsis* konnte keine Phosphataseaktivität nachgewiesen werden, wohingegen eine N-terminal verkürzte Variante durchaus fähig war ³²P-Casein zu dephosphorylieren (Yu *et al.*, 2003). Dies trifft auch auf die Phosphatase XB15 aus Reis (ein Homolog zu POL) zu (Park *et al.*, 2008). Auch wenn Park und Kollegen dies nicht kommentieren, so sind doch die Experimente zur Dephosphorylierung der Intrazellulärdomäne der Kinase XA21 ausschließlich mit einer N-terminal verkürzten Variante von XB15 dargestellt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass POL in der Zellmembran lokalisiert und diese Lokalisation für eine korrekte Funktion benötigt wird (Gagne & Clark, 2010). Das Fehlen der Membranlokalisierung von POL im *in vitro* Phosphatase-Assay, was auch zu einer nicht-korrekten Proteinfaltung führen könnte, resultiert daher vermutlich in einem Verlust der Phosphataseaktivität. Die katalytische Domäne alleine wird bei Expression in *E. coli* wahrscheinlich korrekt gefaltet und ist dann auch aktiv. Der N-Terminus übernimmt hier nicht nur die richtige Positionierung der Phosphatase in der Zelle sondern auch die Regulation der Phosphataseaktivität (Gagne & Clark, 2010). Eine regulatorische Funktion des N-Terminus könnte natürlich auch auf MtPP2C2 zutreffen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudien haben gezeigt, dass in Hefe nur eine N-terminal verkürzte Variante von MtPP2C2 mit MtDMI2 interagieren kann, während *in vitro* Pull-down-Analysen und *in planta* BiFC-Analysen zusätzlich eine Interaktion mit dem Volllängenprotein von MtPP2C2 bestätigen. Der N-Terminus von MtPP2C2 scheint also für eine physische Interaktion mit DMI2 nicht essentiell zu sein. Ob seine Anwesenheit sogar zum Verlust der Interaktion führt, konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden. Inwiefern der N-Terminus auch Einfluss auf die Phosphataseaktivität hat, könnte durch die Benutzung einer N-terminal verkürzten Variante von MtPP2C2 in *in vitro*-Phosphatase-Experimente untersucht werden.

Eine weitere Erklärung für eine ausbleibende Reduzierung des Phosphorylierungslevels der Kinase MtDMI2 nach Inkubation mit der Phosphatase MtPP2C2 ist folgende: MtPP2C2 kann nur eine oder wenige Serin- oder Threoninreste dephosphorylieren und

der daraus resultierende Unterschied im Phosphorylierungslevel von MtDMI2 liegt unter der Detektionsgrenze. Für die Phosphatase HAB1 aus *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass sie nur einen einzigen Serinrest in der Aktivierungsdomäne der Kinase SnRK2.6 dephosphoryliert und die Kinase so inaktiviert (Zhou *et al.*, 2012). Auch hier konnte keine Reduzierung des Phosphorylierungslevels der gesamten Kinase beobachtet werden. In der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 werden durch das Programm NetPhos2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) 25 mögliche Phosphorylierungsstellen vorhergesagt. Für das Ortholog von MtDMI2 in *L. japonicus* (LjSYMRK) konnten drei Phosphorylierungsstellen *in vitro* identifiziert werden, die für die Auto- und Transphosphorylierung verantwortlich sind: ein Serin- und ein Threoninrest in der Aktivierungsdomäne, sowie ein Threoninrest in der Juxtamembrandomäne (Yoshida & Parniske, 2005). Dies ist besonders unter dem Aspekt interessant, dass für die Phosphatase MtPP2C2 in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sie an die Juxtamembranregion der Kinase MtDMI2 bindet und dass der zur Regulation der Kinaseaktivität benötigte Threoninrest in der Juxtamembrandomäne von LjSYMRK in MtDMI2 konserviert ist. Eine Möglichkeit wäre daher, dass MtPP2C2 mit diesem Threoninrest interagiert, ihn dephosphoryliert und so die Kinaseaktivität unterbindet. Erste Experimente, um diese Hypothese zu testen, wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt. Es wurden verschiedene verkürzte Varianten der Intrazellulärdomäne von MtDMI2 in *E. coli* exprimiert um dadurch die möglichen Phosphorylierungsstellen pro Teilstück zu reduzieren und eine Dephosphorylierung detektierbar zu machen. Während die Expression und Aufreinigung von der Juxtamembrandomäne und dem Carboxyterminus erfolgreich war, konnte im Falle der Kinasedomäne nur eine sehr geringe Proteinausbeute erreicht werden. Um eine mögliche Dephosphorylierung dieser Teilstücke durch MtPP2C2 zu untersuchen, müssen diese erst durch die Intrazellulärdomäne von MtDMI2 transphosphoryliert werden. Dabei konnte eine klare Phosphorylierung für den Carboxyterminus, eine schwache Phosphorylierung der Juxtamembrandomäne und keine Phosphorylierung der Kinasedomäne detektiert werden (Abbildung 2.11), obwohl letzteres auf technische Schwierigkeiten zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 2.6). Die Unterschiede im Phosphorylierungsgrad des Carboxyterminus und der Juxtamembrandomäne kann durch eine unterschiedliche Proteinkonzentration, aber auch durch eine doppelt so hohe Anzahl an möglichen Phosphorylierungsstellen im Carboxyterminus im Vergleich zur Juxtamembrandomäne erklärt werden. Die Experimente wurden zu diesem Zeitpunkt nicht weitergeführt, da zwischenzeitlich neue Erkenntnisse über die Interaktion von MtDMI2 und weiteren Mitglieder der PP2C-Familie vorlagen, so dass diese Phosphatasen erst näher charakterisiert werden sollten. In weiterführenden Experimenten sollen nun auch die am stärksten mit MtDMI2 interagierenden Phosphatasen auf ihre Fähigkeit, MtDMI2 zu dephosphorylieren, getestet werden. Dies könnte auch zu neuen Erkenntnissen über die Substratspezifität der PP2C-Familie führen.

3.5 Funktionelle Analyse von MtPP2C2 und Mt60935

Ein besonderes Interesse lag bei dieser Arbeit in der Charakterisierung der Funktion der Phosphatasen während der Symbiose mit Mykorrhiza-Pilzen. Dazu wurde zunächst die im Y2H-Screen identifizierte MtPP2C2 weiter untersucht. Eine RNAi-vermittelte Inaktivierung und die Überexpression unter dem 35S-Promotor resultierten allerdings nicht in einer veränderten AM-Symbiose (Abbildung 2.13). Es konnten weder Unterschiede in der Frequenz, noch in der Intensität der Mykorrhizierung festgestellt werden. Morphologische Veränderungen in pilzlichen Strukturen oder eine veränderte Genexpression AM-spezifischer Markergene konnten ebenso nicht beobachtet werden. Die Expression von MtPP2C2 unter dem 35S-Promotor führte allerdings nur zu einer gering erhöhten Transkriptmenge im Vergleich zum nativen Promotor (Abbildung 2.14). Da das Gen konstitutiv exprimiert wird und das basale Expressionslevel schon hoch ist, ist fraglich, ob diese geringe Expressionssteigerung überhaupt einen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat. Vielversprechender war hier die Herunterregulierung der MtPP2C2 Transkriptmenge durch RNAi, die eine Reduktion des Transkriptlevels um über 90% zur Folge hatte. Warum hier dennoch keine veränderte Mykorrhizierung beobachtet werden konnte, kann mehrere Gründe haben. Die RNAi führte zwar zu einer signifikanten Reduktion der Transkriptmenge von *MtPP2C2*, aber die noch vorhandene Transkriptmenge könnte immer noch ausreichend für eine volle Funktion des resultierenden Proteins sein. Vergleicht man die basale Expression von *MtPP2C2* in den RNAi-Wurzeln mit der induzierten Expression von *Mt60935* in mykorrhizierten Wurzeln, so sind diese fast identisch (Abbildungen 2.12 und 2.23). Unter diesem Gesichtspunkt wäre der Einsatz von *Knock-out* oder *Loss-of-function* Mutanten sinnvoll. Ein anderer Grund könnte eine funktionelle Redundanz innerhalb der Gruppe F PP2Cs sein. Da gezeigt werden konnte, dass mehrere PP2Cs mit MtDMI2 interagieren können, ist es wahrscheinlich, dass beim Ausfall einer dieser Phosphatasen eine andere Phosphatase die Funktion übernimmt. Trifft dies zu, würde auch die Benutzung von Mutanten-Pflanzen nicht zwangsläufig zu einem Phänotyp führen. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass der Grad an ABA-Hypersensitivität durch die progressive Inaktivierung von PP2Cs der Gruppe A zunimmt (Saez *et al.*, 2006, Rubio *et al.*, 2009). Während Einzelmutanten entweder zu keiner oder nur zu einer geringen ABA-induzierten Hemmung der Samenkeimung oder des Pflanzenwachstums führten, hatten Doppel- und Dreifachmutanten einen weitaus stärkeren Phänotyp (Rubio *et al.*, 2009). Die Feinregulation der ABA-induzierten Signalwege in An- oder Abwesenheit von Stress scheint unter anderem durch eine Gruppe von Phosphatasen ermöglicht zu werden, die dieser Aufgabe durch die Kombination von Vielfältigkeit einerseits und funktioneller Redundanz andererseits gerecht wird. Da die Etablierung einer Pflanzen-Mikroben-Symbiose ebenso einer starken Regulation und Integration unterschiedlicher Signalwege unterliegt, wäre es also durchaus denkbar, dass mehrere Mitglieder einer PP2C-Familie daran beteiligt sind und diese auch redundant sind. Eine weitere Erklärung, warum eine MtPP2C2 Inaktivierung keinen Einfluss auf die AM-Symbiose hat, wäre, dass MtPP2C2 keine Funktion in der AM-Symbiose hat. So könnte das Protein nur aufgrund seiner hohen konstitutiven Expression in Wurzeln und seiner Ähnlichkeit zu weiteren Mitgliedern der

Gruppe F Phosphatasen als Interaktionspartner von MtDMI2 im Y2H-Screen gefischt worden sein. Tatsächlich könnte aber eine der anderen Gruppe F PP2Cs der wirkliche Interaktionspartner *in vivo* sein. Mit Genexpressionsanalysen weiterer Gruppe F Phosphatasen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Mt60935* in der frühen Phase der Mykorrhizierung induziert ist und wurde daher für weitere Analysen ausgewählt. Erste Ergebnisse von Mykorrhizierungsexperimenten mit *Mt60935* RNAi-Linien lieferten weitere Hinweise auf eine Funktion von *Mt60935* in der AM-Symbiose. Die Häufigkeit der pilzlichen Kolonisation im Wurzelsystem war in den *Mt60935* RNAi-Wurzeln im Vergleich zu den Kontrollwurzeln reduziert, nicht aber die Intensität der Mykorrhizierung (Abbildung 2.26). Dies konnte allerdings nur nach einer kurzen Inkubationszeit von 3 Tagen beobachtet werden, nach längeren Inkubationszeiten konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden. Dies bedeutet, dass *Mt60935* einen positiven Einfluss auf die Etablierung der Symbiose hat. Sobald der Pilz in die Wurzel eingedrungen ist, spielt dieses Protein entweder keine oder nur noch eine untergeordnete Rolle. Dies ist besonders im Hinblick auf die Interaktion mit MtDMI2 interessant. Eine Inaktivierung von MtDMI2 bewirkt zwar eine drastische Reduzierung der epidermalen Infektion, aber sobald der Pilz erfolgreich in den Wurzelcortex eingedrungen ist, läuft das nachfolgende symbiotische Programm normal ab (Morandi *et al.*, 2005). Die Hypothese, dass beide Proteine in einem gemeinsamen Signalweg agieren, wird durch den ähnlichen Phänotyp ihrer RNAi-vermittelten Geninaktivierungen noch bestärkt. Allerdings ist der Phänotyp der *Mt60935* Inaktivierung sehr viel schwächer ausgeprägt als bei MtDMI2 und muss auch noch durch weitere Experimente bestätigt werden. Mit Spannung werden auch die Ergebnisse einer konstitutiven Überexpression von *Mt60935* in mykorrhizierten Wurzeln erwartet. Sollte sich der positive Einfluss von *Mt60935* auf die AM-Symbiose bestätigen, wäre dies der erste Interaktionspartner von MtDMI2, für den eine Funktion in der AM-Symbiose nachgewiesen werden kann.

Da MtDMI2 Teil eines Signalweges ist, der sowohl in der Symbiose mit AM-Pilzen als auch in der Rhizobien-Symbiose von essentieller Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit auch die Funktion von MtPP2C2 in der Rhizobien-Symbiose untersucht. In die Untersuchungen miteinbezogen wurde auch die Phosphatase MtNPP2C1, deren Ortholog in *L. japonicus* in Wurzelknöllchen verstärkt exprimiert wird (Kapranov *et al.*, 1999). Es wurden sogenannte *composite plants* hergestellt, die aus einem untransformierten Spross und transformierten Wurzeln, die RNAi- und Überexpressions-Konstrukte der Phosphatasen exprimieren, bestehen. Da aber einige Pflanzen die Prozedur des Abschneidens nicht-transformierter Wurzeln nicht überstanden haben, war die Anzahl an biologischen Replikaten sehr gering und die Versuche lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse (Abbildung 2.17). Daher kann hier auch keine Aussage über eine mögliche Funktion der Phosphatasen in der Wurzelknöllchensymbiose gemacht werden. Die Tatsache, dass die RNAi-Pflanzen von MtNPP2C1 im Vergleich zu den Kontrollpflanzen kleiner waren und weniger Wurzeln hatten, während die Überexpressionspflanzen etwas größer waren als die Kontrollpflanzen, spricht allerdings für eine Funktion in allgemeinen physiologischen Prozessen in der Wurzel, wie zum Beispiel Wachstum, Wasserhaushalt oder Nährstoffaufnahme. Interessant hierbei ist, dass viele der RNAi-Pflanzen nach dem

Abschneiden der nicht-transformierten Wurzeln und dem Umtopfen in neue Gefäße nur noch schlecht oder gar nicht mehr gewachsen sind, was bedeuten würde, dass MtNPP2C1 essentiell für die Pflanze ist. Dass trotzdem manche Pflanzen gewachsen sind, könnte daran liegen, dass sich während der Kultivierung erneut nicht-transformierte Wurzeln gebildet haben. MtNPP2C1 gehört zur Gruppe A der PP2C-Phosphatasen. Alle Mitglieder dieser Gruppe sind in *Arabidopsis* in ABA-induzierten Signalwegen beteiligt und regulieren zahlreiche Prozesse in der Zelle. Die *Arabidopsis*-Mutante *abi1-2* ist zum Beispiel ebenso durch ein reduziertes Wurzelwachstum charakterisiert (Saez *et al.*, 2006). Eine Funktion von MtNPP2C1 ausschließlich in der Wurzelknöllchen-Symbiose ist daher auszuschließen. Da in dieser Arbeit keine Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von MtNPP2C1 in symbiotischen Signalwegen gefunden werden konnte, wurde diese Phosphatase nicht weiter untersucht.

3.6 Ein Modell der Funktion von Proteinphosphatasen in der AM-Symbiose

Auf der Basis der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse und deren Diskussion wird im Folgenden ein Modell einer möglichen Funktion der Proteinphosphatasen der Gruppe F in der AM-Symbiose vorgestellt. Dieses Modell ist natürlich spekulativ und muss erst durch weitere Experimente überprüft werden.

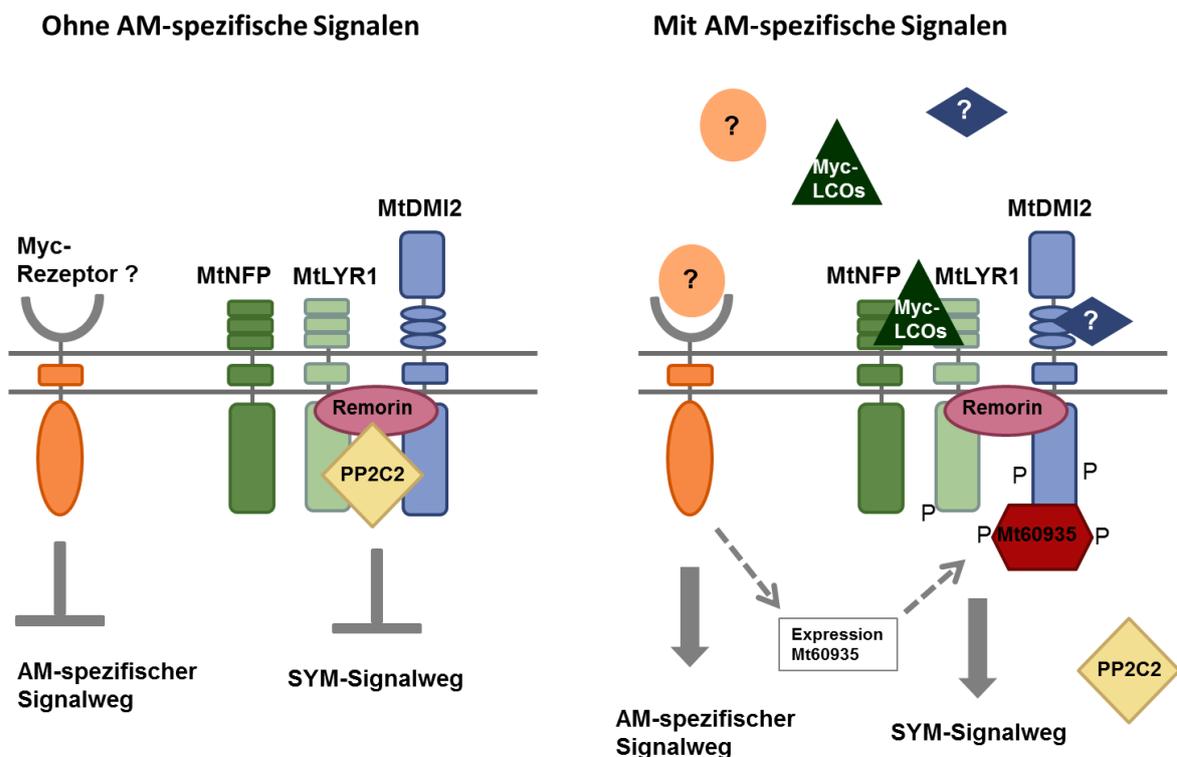


Abb. 3.2 Modell der Funktionen von MtPP2C2 und Mt60935 in der AM-Symbiose. Erläuterungen siehe Text.

In der pflanzlichen Plasmamembran sitzen verschiedene symbiotische Rezeptor-ähnliche Kinasen wie MtDMI2, MtLYK3, MtNFP und MtLYR1, die durch ein Gerüst aus Remorinproteinen in einer Art symbiotischen Mikrodomäne zusammengehalten werden (Lefebvre *et al.*, 2010). In Abwesenheit eines AM-Pilzes bindet die Phosphatase MtPP2C2 mit ihrer katalytischen Domäne an die Rezeptorkinasen MtDMI2 und MtLYR1 und hält diese durch eine konstante Dephosphorylierung in einem inaktiven Zustand. Nach der Bindung von pilzlichen Signalstoffen, wie zum Beispiel Myc-LCOs, an die extrazellulären Domänen der Rezeptorkinasen führen Konformationsänderungen in den Kinasedomänen zu einer Dissoziation der Phosphatase MtPP2C2 und damit zu einer Aktivierung der Kinasen, die nun über Auto- und Transphosphorylierungen nachfolgende Signalwege anschaltet. Die Phosphatase Mt60935 dagegen ist ein positiver Regulator der AM-Symbiose und dessen Expression wird durch die Anwesenheit des AM-Pilzes induziert. Ob diese Induktion DMI2-abhängig ist oder ob andere Signalwege involviert sind, ist noch nicht geklärt. Mt60935 bindet an die aktive Kinase MtDMI2, wird phosphoryliert und aktiviert so weitere Signalwege.

3.7 Fazit und Ausblick

Proteinphosphatasen sind in allen Organismen in einer großen Zahl vertreten und sind an dem wichtigen Prozess der reversiblen Proteinphosphorylierung beteiligt, der es der Zelle erlaubt seine Proteinaktivitäten zu regulieren. Die Familie der Proteinphosphatasen 2C bildet in Pflanzen die größte Gruppe der Phosphatasen. Überraschenderweise konnte bisher nur wenigen Vertretern eine Funktion zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Proteinphosphatasen 2C aus *M. truncatula* näher charakterisiert. Mit phylogenetischen Analysen der gesamten PP2C Familie und Vergleichen mit den PP2Cs aus *Arabidopsis* konnte festgestellt werden, dass diese Proteinfamilie stark konserviert ist und die Vielfalt der Mitglieder durch Genduplikationen einiger weniger „Urgene“ entstanden ist. Dies führte zur Bildung verschiedener Untergruppen, dessen Mitglieder wahrscheinlich ähnliche Funktionen erfüllen.

Einige Mitglieder einer Untergruppe dieser PP2Cs interagieren mit der symbiotischen Rezeptorkinase MtDMI2, die als Eingangstür für AM-Pilze und Rhizobien funktioniert und eine erfolgreiche symbiotische Interaktion überhaupt erst möglich macht. Die Inaktivierung einer dieser Phosphatasen, namentlich MtPP2C2, konnte zwar eine Rolle in der AM-Symbiose nicht bestätigen, dies ist aber eventuell auf eine funktionelle Redundanz innerhalb der Phosphatasen zurückzuführen. Für Mt60935, eine weitere mit MtDMI2-interagierende PP2C dieser Gruppe, konnte gezeigt werden, dass ihre Expression in der frühen Phase der AM-Symbiose induziert wird. Eine Inaktivierung dieser Phosphatase führt zu einer verzögerten pilzlichen Kolonisation, was für eine Funktion als positiver Regulator der AM-Symbiose spricht. Da im *Medicago Gene Expression Atlas* auch eine starke Transkriptakkumulation in Wurzelknöllchen zu finden ist, ist diese Phosphatase eventuell auch in der Regulation der Rhizobien-Symbiose beteiligt.

Die genaue Funktion der Phosphatasen muss durch weitere Experimente untersucht werden, die hier auch diskutiert wurden. Vor allem fehlen biochemische Nachweise für eine Dephosphorylierung von MtDMI2 im Falle einer Negativregulation durch die Phosphatase(n) bzw. der Nachweis einer Phosphorylierung der Phosphatase(n) durch MtDMI2, sollten diese Teil des SYM-Signaltransduktionweges sein und die AM-Symbiose positiv beeinflussen. Mit Spannung werden auch die Ergebnisse einer Überexpression von *Mt60935* auf den Einfluss in der Mykorrhizierung der Wurzeln und die Analyse der Funktion dieser Phosphatase in der Rhizobien-Symbiose erwartet.

4 Material und Methoden

4.1 Organismen

- ***Escherichia coli***

Die verwendeten *E. coli* Stämme werden alle unter Schütteln in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert.

Tabelle 4.1: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Eigenschaften
DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB ⁻ , mB ⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl5 Δleu mtl1	Streptomycinresistent (50 mg/l). Das CcdB-Toxin hemmt die Gyrase von <i>E. coli</i> . Die mutierte Gyrase (gyrA462) ermöglicht die Vermehrung von Plasmiden (mit Gateway-Kassette), die das <i>ccdB</i> -Gen enthalten.
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Streptomycinresistent (50 mg/l). Geeignet für blue / white Screening.
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> ΔM15 Tn10 (Tetr)]	Tetracyclinresistent (25 mg/l). Geeignet für blue / white screening.
Rosetta (DE3)pLys	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (CamR)	MERCK Cat. No. 70956, BL21-Derivat Chloramphenicolresistent (40 mg/l). Besonders geeignet für die Expression eukaryotischer Gene, wird für heterologe Proteinexpression benutzt.

- **Agrobakterien**

Agrobakterien werden unter Schütteln in TY- oder LB-Medium bei 28°C mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert.

Agrobacterium tumefaciens

GV3101/pMP90 Koncz and Schell, 1986

Ti-Helfer- Plasmid: pMP90 (pTiC58 ΔT-DNA), Gm^R

Genotyp: C58, Rif^R

Phänotyp: Nopalins+, Gentamycin-resistent (40 µg/ml), Rifampicin-resistent (100 µg/ml)

Eigenschaften: wird für die Transformation von *Nicotiana benthamiana* benutzt

Agrobacterium rhizogenes

ARqua1 Quandt, 1993

Ri Plasmid: pRiA4b (pA4-Typ) (250 kb)

Genotyp: wt, Sm^R

Phänotyp: Onc+, Sm^R, Biotyp II (Keane *et al.*, 1970)
 Eigenschaften: Streptomycinresistentes (600 mg/l) Derivat des Wildtyp Stammes R1000 (White *et al.*, 1985), Derivat des Stammes A4T (Moore *et al.*, 1979).

- ***Sinorhizobium meliloti***

Rhizobien werden unter Schütteln in TY- oder LB-Medium bei 28°C mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert.

Rm2011 J. Dénarié, INRA CNRS (Toulouse, Frankreich)
 Genotyp: wt, Sm^R, Plasmide pSymA (1.35 Mb) und pSymB (1.68 Mb)
 Phänotyp: prototroph, symbiontisch effektiv
 Eigenschaften: Streptomycinresistentes (300 mg/l) Derivat des Wildtyp-Stammes SU47

- ***Saccharomyces cerevisiae***

Beide Hefestämme stammen aus dem Clontech Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit und wurden für das GAL4-basierte Yeast-Two-Hybrid-System konstruiert. Untransformierte Stämme werden in YPDA-Medium bei 30°C kultiviert. Transformierte Stämme werden in SD-Medium kultiviert, dem die entsprechenden Aminosäuren zur Selektion auf die Auxotrophiemarker fehlen.

Tabelle 4.2: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp
AH109	MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 :: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 :: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1
Y187	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met ⁻ , gal80 Δ , URA3 :: GAL1UASGAL1TATA-lacZ, MEL1

Der Stamm AH109 trägt die Reportergenkonstrukte *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1*, während der Stamm Y187 nur das Reportergen *lacZ* enthält. Alle Reportergene stehen unter der Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors.

- ***Rhizophagus irregularis***

R. irregularis (früher *Glomus intraradices*) wird in monaxenischer Kultur zusammen mit Ri-transformierten *Daucus carota* Wurzeln auf M-Medium kultiviert (Bécard und Fortin, 1988) (siehe Abschnitt 4.10.4).

DAOM 181602 Schenck und Smith (1982), erstmals isoliert in Florida.
 Genotyp: wt

- ***Medicago truncatula***

Jemalong A 17 Kultivar aus Australien, Penmetsa & Cook, 1997
 Genotyp: wt

- ***Daucus carota***

Mykorrhizierte *D. carota* Wurzeln werden auf M-Medium bei 27°C im Dunkeln kultiviert (Bécard und Fortin, 1988) (siehe Abschnitt 4.10.4).

4.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Kits

Alle anorganischen und organischen Chemikalien wurden über die Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Tabelle 4.3: Besondere Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller: Katalognummer
40% Acrylamid / N, N'-Methylenbisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agarose Electrophoresis Grade	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammonium persulfat	Merck KGaA, Darmstadt
dNTPs	Fermentas, Burlington, Kanada
2 log DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Glutathion-Agarose (GST-Bind-Resin)	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)
Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)
Nitrozellulosemembran PROTRAN 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PD-10-Säulen	GE Healthcare
Phytigel (Gellam gum)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Polyethylenglycol 3.350	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RNaseOUT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween20	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Yeast nitrogen base without amino acids	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Tabelle 4.4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller	Verwendete Konzentration
anti-His	Primärantikörper, monoklonal, produziert in der Maus	GE Healthcare	1:3000 verdünnt
anti-GST	Primärantikörper, monoklonal, produziert in der Maus	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)	1:6000 verdünnt
anti-c-myc	Primärantikörper, monoklonal, produziert in der Maus	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	1:5000 verdünnt
anti-HA	Primärantikörper, monoklonal, produziert in der Maus	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	1:3000 verdünnt
anti-mouse-HRP	Sekundärantikörper, gekoppelt an die horse-radish-Peroxidase, produziert in der Ziege	Nicht bekannt	1:9000 verdünnt

Folgende Enzyme, die nicht Bestandteil eines verwendeten Kits sind, wurden in dieser Arbeit benutzt:

Tabelle 4.5: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarctic phosphatase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
DNase I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus	Eurogentec GmbH, Köln
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas, Burlington, Kanada
Proteinase K	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M. Fermentas, Burlington, Kanada
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.

Tabelle 4.6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
innuPREP Plant RNA Kit	Analytik Jena AG, Jena
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit (with pCR®2.1-TOPO® vector)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit (with pCR®8/GW/TOPO® vector)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France: 630445
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg

4.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4.7: Verwendete Antibiotika-Lösungen

Antibiotika wurden in dH₂O gelöst, steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Antibiotika	Hersteller	Stocklösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin Natriumsalz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	100	100
Augmentin (Amoclav® 2,2 g Trockensubstanz) (Aug)	Hexal AG, Holzkirchen	200	100 - 400
Chloramphenicol (Cm)	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL	40	40
Gentamycin Sulfat (Gen)	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL	40	40
Kanamycin Sulfat (Km)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	50	25 - 50
Spectinomycin Sulfat (Sp)	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL	100	100
Streptomycin Sulfat (Sm)	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL	600	600
Tetracyclin Hydrochlorid (Tet)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	25	25

- **DEPC- H₂O**

1 ml/l Diethylpyrocarbonat in H₂O bidest. über Nacht rühren und durch Autoklavieren inaktivieren.

- **Lösungen für die Plasmidpräparation aus *E. coli*:**

Lösung I	Lösung II	Lösung III
50 mM TrisHCl pH 7,5 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A	0,2 M NaOH 1 % SDS	75 ml Stocklösung + 175 ml dH ₂ O Stocklösung: 60 ml 5M KAc, 11,5 ml Essigsäure, 28,5 ml dH ₂ O

- **-LWHA Dropout Lösung (10x) für Hefe**

Bestandteil	Konzentration
L-Arginin HCl	200 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l
L-Lysin HCl	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l
L-Uracil	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l

- **L-Adenin Stammlösung (100x)**

2 g/l L-Adenin-Hemisulfat werden im entsprechenden Volumen H₂O dest. gelöst und autoklaviert. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

- **L-Histidin Stammlösung (100x)**

2 g/l L-Histidin HCl Monohydrat werden im entsprechenden Volumen H₂O dest. gelöst und autoklaviert. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

- **L-Leucin Stammlösung (100x)**

10 g/l L-Leucin werden im entsprechenden Volumen H₂O dest. gelöst und autoklaviert. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

- **L-Tryptophan Stammlösung (100x)**

2 g/l L-Tryptophan werden im entsprechenden Volumen H₂O dest. gelöst und autoklaviert. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

- **10x TAE-Puffer (pH 8,5)**

Zur Herstellung von 5 Litern werden 242 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris) sowie 37,2 g Na₂ EDTA·2H₂O in 4,5 l H₂O dest. eingewogen. Nach Zugabe von 57,1 ml konzentrierter Essigsäure wird mit H₂O dest. auf 5 Liter aufgefüllt. Der Puffer wird in 1x Konzentration verwendet.

• TE-Puffer (10x)

Zur Herstellung eines Liters werden 800 ml H₂O dest. mit 100 ml 1 M Tris-Puffer pH 8 und 20 ml 0.5 M Na₂EDTA pH 8 versetzt. Mit destilliertem Wasser wird auf 1 l aufgefüllt und steril autoklaviert. Der Puffer wird bei RT gelagert und in 1x Konzentration eingesetzt.

• X-α-gal-Stammlösung

Für die Supplementation von Medien für den α-Galaktosidasetest beim Yeast-Two-Hybrid-System. Für die X-α-gal Stammlösung wird X-α-gal in einer Konzentration von 20 mg/ml in Dimethylformamid gelöst und vor Licht geschützt bei -20°C gelagert.

• X-gal-Stammlösung

X-gal für die Supplementation von Medien zur Blau-Weiß-Selektion wird mit 40 mg/ml in Dimethylformamid angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

• IPTG-Stammlösung

Für die Supplementation von Medium zur Blau-Weiß-Selektion werden 50 µl der Stammlösung pro Platte ausplattiert. Für die Zubereitung von 10 ml Stammlösung werden 12 mg IPTG in 10 ml destilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

• SDS-PAGE und Western Blot

10x SDS- und Western Blot-Puffer

250 mM Tris
1,92 M Glycin
1% SDS

1x SDS-Laufpuffer 1 Liter

10x SDS- und Western Blot Puffer 100 ml
dH₂O 900 ml

1x Blotting Puffer (Western Blot) 1 Liter

10x SDS- und Western Blot Puffer 100 ml
Methanol 200 ml
dH₂O 700 ml

10x PBS pH 7,3

1,4 M NaCl
27 mM KCl
101 mM Na₂HPO₄
18 mM KH₂PO₄

1x PBST

10x PBS 100 ml
dH₂O 900 ml
Tween20 0,5 ml

4.4 Kulturmedien

Alle Medien werden in destilliertem H₂O angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Falls nicht anders beschrieben, wird für die Herstellung der entsprechenden Festmedien 1,5 % (w/v) Agar-Agar verwendet. Bei Bedarf erfolgt die Zugabe von Antibiotikastammlösungen nach erfolgtem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C.

• LB-Medium

Zur Kultur von *E. coli*.

10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.

• SOB-Medium

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen.

5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 0,584 g/l NaCl, 0,186 g/l KCl, pH 7.

• SOC-Medium

Zur Transformation von Bakterienzellen.

5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 0,584 g/l NaCl, 0,186 g/l KCl, 2,4 g/l MgSO₄. pH 7,5.

20 ml sterile 20% (w/v) Glucose-Lösung werden nach dem Autoklavieren zugegeben.

• TY-Medium

Zur Kultur von *Agrobacterium rhizogenes*.

5 g/l Trypton, 3 g/l Hefeextrakt, 0,9 g/l CaCl₂·2 H₂O. pH 6,8.

• AS-Medium

Zur Herstellung von *Agrobacterium tumefaciens* Suspensionen zur Transformation von *Nicotiana benthamiana*.

10 mM MES-KOH (pH 5,6), 10 mM MgCl₂, 150-225 µM Acetosyringon.

• YPDA-Medium

Zur Kultur von Hefe.

20 g/l Pepton, 10 g/l Hefextrakt, 0,003% Adenin, pH 6,5.

Nach dem Autoklavieren werden 2% (w/v) Glukose hinzugefügt. Für Agarplatten werden 20 g/l Agar eingewogen.

• SD-Medium

Selektionsmedium zur Kultur von Hefe.

Für einen Liter werden 6,7 g Yeast Nitrogen Base without amino acids, 100 ml 10x – LTHA Dropout Lösung und die entsprechenden Volumina der noch zuzusetzenden Aminosäure-Stammlösungen mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, der pH auf 5,8 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden 50 ml einer 40 % (w/v) Glukoselösung sterilfiltriert hinzugegeben. Für Agarplatten werden 20 g/l Agar eingewogen.

• H₂O-Agar

Zur Keimung von *M. truncatula* Samen.

0,8% (w/v) Agar in dH₂O

• M-Medium (Bécard und Fortin, 1988)

Zur Kultur von *Medicago truncatula* und *Daucus carota* Wurzeln.

Tabelle 4.8: M-Medium

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	pro l Medium
Makronährstoffe			
KNO ₃	3,2 g/l	80 mg/l	25 ml
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	29,24 g/l	731 mg/l	
KCl	2,6 g/l	65 mg/l	
KH ₂ PO ₄	48 mg/l	4,8 mg/l	100 ml
Ca(NO ₃) ₂	115,2 g/l	288 mg/l	2,5 ml
Na-FeEDTA	3,2 g/l	8 mg/l	2,5 ml
Mikronährstoffe			
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	6 g/l	6 mg/l	1 ml
H ₃ BO ₃	1,5 g/l	1,5 mg/l	
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,65 g/l	2,65 mg/l	
Weitere Mikronährstoffe			
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,0024 g/100 ml	0,0024 mg/l	100 µl
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,13 g/100 ml	0,13 mg/l	
Vitamine			
Glycin	0,3 g/l	3 mg/l	10 ml
Myo-Inositol	5 g/l	50 mg/l	
Nikotinsäure	50 mg/l	0,5 mg/l	
Piridoxin HCl	10 mg/l	0,1 mg/l	
Thiamin HCL	10 mg/l	0,1 mg/l	

Der pH wird auf 5,5 eingestellt. Für die *in vitro* Kultur von Wurzeln werden 10 g/l D-Saccharose zugegeben. Zur Herstellung des Festmediums wird 0,3 % (w/v) Phytigel verwendet.

• Modifiziertes Fähræus-Medium

zur Transformation von *M. truncatula* Wurzeln.

Tabelle 4.9: Modifiziertes Fähræus-Medium

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	pro l Medium
Makronährstoffe			
CaCl ₂	0.9 M	0.9 mM	1 ml
MgSO ₄	0.5 M	0.5 mM	1 ml
KH ₂ PO ₄	0.7 M	0.7 mM	1 ml
Na ₂ HPO ₄	0.4 M	0.8 mM	2 ml
Fe-Citrat	20 mM	20 µM	1 ml
NH ₄ NO ₃	1 M	0.5 mM	0,5 ml
Mikronährstoffe			
MnCl ₂	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
CuSO ₄	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
ZnCl ₂	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
H ₃ BO ₃	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
Na ₂ MoO ₄	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl

Der pH wird auf 7,5 eingestellt. Dem Medium werden 1,5% Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wird es als Schrägagar in Petrischalen gegossen.

4.5 Verwendete Plasmide

• pCR2.1/TOPO

Eigenschaften: Vektor zur TOPO-TA-Klonierung von PCR-Fragmenten mit 3' A-Überhängen.

Selektion: Blau-Weiß-Selektion, Ampicillinresistenz (100 mg/l), Kanamycinresistenz (50 mg/l)

Quelle: Invitrogen GmbH, Karlsruhe

• pCR8/GW/TOPO

Eigenschaften: Vektor zur TOPO-TA-Klonierung von PCR-Fragmenten mit 3' A-Überhängen. Entry-Vektor für die Gateway-Klonierung.

Selektion: Spectinomycinresistenz (100 mg/l)

Quelle: Invitrogen GmbH, Karlsruhe

• pENTR/D-TOPO

Eigenschaften: Vektor zur direktionalen TOPO-Klonierung von PCR-Fragmenten mit stumpfen Enden. Entry-Vektor für die Gateway-Klonierung.

Selektion: Kanamycinresistenz (50 mg/l)

Quelle: Invitrogen GmbH, Karlsruhe

• pGBKT7

Eigenschaften: Vektor für das Yeast-Two-Hybrid-System. Enthält die GAL4 DNA-Bindedomäne, nachgeschaltet ist eine MCS für die Klonierung der gewünschten cDNA. Die kodierenden Sequenzen des Fusionsproteins stehen unter der Kontrolle des ADH1 Promotors. Enthält den c-myc-Epitop-Tag.

Selektion: Kanamycinresistenz (50 mg/l) in *E. coli*, Auxotrophiemarker TRP1 in *S. cerevisiae*

Quelle: Takara Bio Europe/Clontech

• pGADT7-Rec

Eigenschaften: Vektor für das Yeast-Two-Hybrid-System. Enthält die GAL4 Aktivierungsdomäne, nachgeschaltet ist eine MCS für die Klonierung der gewünschten cDNA. Die kodierenden Sequenzen des Fusionsproteins stehen unter der Kontrolle des ADH1 Promotors. Enthält den HA-Epitop-Tag.

Selektion: Ampicillinresistenz (100 mg/l) in *E. coli*, Auxotrophiemarker LEU2 in *S. cerevisiae*

Quelle: Takara Bio Europe/Clontech

• pSPYNE-p35S-GW

Eigenschaften: Binärer Gateway Destination-Vektor für die BiFC *in planta*. Enthält die N-terminale Hälfte von YFP, den konstitutiv exprimierten CaMV Promotor p35S, eine Gateway-Kassette und den c-myc-Epitop-Tag:
p35S::attR1::CmR-ccdB::attR2::c-myc::YFP-N::NosT.

Selektion: Kanamycinresistenz in *E. coli* und Agrobakterien, Hygromycinresistenz *in planta*

Quelle: Thomas Lahaye, Arbeitsgruppe Klaus Harter, Tübingen

• pSPYCE-p35S-GW

Eigenschaften: Binärer Gateway Destination-Vektor für die BiFC *in planta*. Enthält die C-terminale Hälfte von YFP, den konstitutiv exprimierten CaMV Promotor p35S, eine Gateway-Kassette und den HA-Epitop-Tag:
p35S::attR1::CmR-ccdB::attR2::HA::YFP-C::NosT.

Selektion: KanamycinR in *E. coli* und Agrobakterien, Bastaresistenz *in planta*

Quelle: Thomas Lahaye, Arbeitsgruppe Klaus Harter, Tübingen

• pK7FWG2-RR

Eigenschaften: Binärer Gateway Destination-Vektor zur agrobakterienvermittelten Transformation von Pflanzen. Vektor zur C-Terminalen GFP-Fusion. Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten CaMV 35S-Promotors:

p35S::attR1::CmR-ccdB::attR2::eGFP::T35S.

DsRed1 unter Kontrolle des Ubiquitin10 Promotors aus Mais:

Pubq10::DsRed1::Tnos.

Vermehrung in *E. coli* DB3.1.

Selektion: Spectinomycinresistenz (50 mg/l) und Chloramphenicolresistenz (34 mg/l) in *E. coli* DB3.1

Quelle: Hannah Kuhn, Arbeitsgruppe Natalia Requena und Karimi *et al.*, 2002

• pK7GWIWG2DII (RNAi-Vektor)

Eigenschaften: Binärer Gateway Destination-Vektor zur agrobakterienvermittelten Transformation von Pflanzen. Vektor zur Expression der hairpin unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten CaMV 35S-Promotors:

p35S::attR1::CmR-ccdB::attR2::eGFP::T35S.

DsRed1 unter Kontrolle des Ubiquitin10 Promotors aus Mais:

Pubq10::DsRed1::Tnos.

Vermehrung in *E. coli* DB3.1.

Selektion: Spectinomycinresistenz (50 mg/l) und Chloramphenicolresistenz (34 mg/l) in *E. coli* DB3.1

Quelle: Karimi *et al.*, 2002

• pGEX-4T-1

Eigenschaften: Vektor für die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*
 tac-Promotor für chemisch induzierbare Expression
 Glutathione S-transferase als N-terminaler Proteintag
 MCS für Klonierung

Selektion: Ampicillinresistent (100 mg/l)

Quelle: Amersham Bioscience

• pET28a

Eigenschaften: Vektor für die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*
 T7-Promotor für chemisch induzierbare Expression
 6xHis als N- und C-terminaler Proteintag
 MCS für Klonierung

Selektion: Kanamycinresistent (50 mg/l)

Quelle: Novagen

4.6 Verwendete Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH bezogen.

Tabelle 4.10: Verwendete Primer

Restriktionsschnittstellen und die CACC-Sequenz für die Klonierung in pENTR/D-TOPO sind unterstrichen.

Name	Sequenz 5' -> 3'	Tm	Amplikongröße
Primer für <i>in planta</i> BiFC-Analysen (Klonierung in pCR8/GW/TOPO, Subklonierung in pSPYNE-p35S-GW bzw. pSPYCE-p35S-GW)			
ETR-BiFC-F2	<u>CACCATATGGTTGGGAATCTACTGGATTG</u>	65,3°C	817 bp
ETR-BiFC-R1	AAGATTTCCCTGCATCAGAATTCTTCTG	62,2°C	
MtPP2C2-BiFC-F	<u>CACCATGACCGGCAAAGAAATCC</u>	62,4°C	850 bp
MtPP2C2-BiFC-F1	<u>CACCATGGCCAATATCGGGGATT</u>	62,4°C	427 bp
MtPP2C2-BiFC-R	GTGAAACCTCACAAATGCAAGAG	61,3°C	427/850 bp
DMI2-ICD-BiFC-F	<u>CACCATGGAAGGATTTGGAAAGACC</u>	63,0°C	1120 bp
DMI2-ICD-BiFC-R	CGGTTGAGGGTGTGACAAGGTTT	62,4°C	
Primer für Y2H-Analysen (Klonierung in pCR2.1-TOPO, Subklonierung in pGBKT7 bzw. pGADT7-Rec)			
ICD_NcoI_for	<u>CCATGGGCCGTTATACACACAAGT</u>	64,6°C	1150 bp
ICD_EcoRI_rev	<u>GAATTCTATCTCGGTTGAGGGTGTG</u>	63,0°C	
NcoI_NPP2C1_F	<u>CCATGGTGAAGAACATGAAACGACACTC</u>	65,1°C	1157 bp
NcoI_NPP2C1_F1	<u>CCATGGGTAAAATGGATAGGGAGGTG</u>	64,8°C	596 bp
EcoRI_NPP2C1_R	<u>GAATTCTCAACTAGATTTTAATGTTCTCTTAG</u> GT	63,6°C	596/1157 bp
NdeI_MtPP2C2_F	<u>CATATGACCGGCAAAGAAATCCTCCA</u>	63,2°C	855 bp
NdeI_MtPP2C2-C_F	<u>CATATGGCCAATATCGGGGATTCT</u>	61,0°C	435 bp
BamHI_MtPP2C2_R	<u>GGATCCCAATCAGTGAACCTCACAAAC</u>	65,0°C	435/855 bp

NdeI_TC108366_F	<u>CATATGATGGCTTTTTGCCCAATTTTTTG</u>	61,0°C	1116 bp
Sall_TC108366_R	<u>GTCGACCATGGTTCTGCATTCTCTT</u>	63,0°C	
NcoI_TC102886_F	<u>CCATGGTTCCTTCAAATGGATTGTCTG</u>	63,4°C	937 bp
Sall_TC102886_R	<u>GTCGACCATGGCTCTTCTGAGGAGTA</u>	66,4°C	
NcoI_TC103254_F	<u>CCATGGTTTATGCCATTTTAGAGCAT</u>	60,1°C	727 bp
EcoRI_TC103254_R	<u>GAATTCGCAATGGATTCATCAATTGAAAG</u>	61,0°C	
DMI2-JM_EcoRI_R	<u>GAATTC</u> ACTGTTCTGTAGCCTGCTCT	63,4°C	163 bp (Forw-Primer ICD_NcoI_for)
DMI2-Kin_NcoI_F	<u>CCATGG</u> AAACTTTAATAGGTGAAGGA	60,1°C	823 bp
DMI2-Kin_EcoRI_R	<u>GAATTC</u> TAAATGAGAGCATCCTCCAAC	62,2°C	
DMI2-CTD_NcoI_F	<u>CCATGG</u> ACAATGCATCTGAATACATGA	61,9°C	127 bp (Rev-Primer: ICD_EcoRI_rev)
DMI2-AD_NcoI_F	<u>CCATGG</u> TGTGTGCTAAGGTTGCAGATT	65,0°C	577 bp (Rev-Primer: ICD_EcoRI_rev)
EcoRI_co49964_F	TTGGAATTCGATGGTCAGAAGTTAGTGGTAG	65,5°C	484 bp
BamHI_co49964_R	ACTGGATCCTAATGAGTCTTGTGAATTGTGAT	64,4°C	
EcoRI_co60935_F	ATAGAATTCGGAAGAAGACTATGGATAGCT	62,7°C	472 bp
BamHI_con60935_R	ACCGGATCCGTAAAAAAGATAATCATCTGAA	62,9°C	
EcoRI_60935fl_F	CAAGAATTCATCATGGATAGGCTATGCTGT	64,0°C	883 bp (Rev-Primer BamHI_con60935_R)
EcoRI_5g063940F	TTAGAATTCGGTCAAATGTTATGGACAGC	62,4°C	Amplikon: 471 bp
BamHI_5g063940_R	GTAGGATCCGTGTATCAATCATCACCTA	63,7°C	
EcoRI_5g0639f_F	GTGGAATTCGTCATGGATAAATTTTGTGT	61,3°C	882 bp (Rev-Primer BamHI_5g06394_R)
NdeI_con52429_F	CAACATATGAATCAGAACTATGGGTCGCCAAT	65,8°C	468 bp
EcoRI_co52429_R	ATAGAATTCCTTTTTTCATCCCTTCAAACG	62,7°C	
NdeI_2g008850_F	GAACATATGAATCAGAAATTATGGATTGCAAAC	62,0°C	478 bp
BamHI_2g008850R	TAAGGATCCAATGCAAGGACTTGTATAATCA	62,9°C	
NdeI_con58013_F	CGTCATATGGGAGTAAAGCTACTAGTTATAAAT G	64,7°C	473 bp
BamHI_co58013_R	TAAGGATCCATGCAGGAACATGTAAGCTAGA	65,5°C	
NdeI_1g013400_F	TTACATATGGTTGGTGACCGTTTGCTTGTT	64,0°C	501 bp
BamHI_1g013400R	TATGGATCCTTAGCCAGAGCTATTACGA	63,7°C	
NdeI_3g105730_F	<u>CATATGGTTGGTGATCGTTTGCTTGTT</u>	61,9°C	529 bp
BamHI_3g105730_R	<u>GGATCC</u> ATGCACAAACCCTCTAACTGT	65,0°C	
NdeI_3g091060_F	<u>CATATGGTTGATAACCGTCTTTATGTTGCT</u>	62,7°C	537 bp
BamHI_3g091060_R	<u>GGATCC</u> TTCGTGTGCTTTTCATTGTCTCT	65,3°C	
EcoRI_1g075730_F	AGAATTCATCAATGGAGAAAACTTGTAATAGC	62,0°C	399 bp
SmaI_1g075730_R	<u>CCCGGG</u> CTTCAGTCAAACGAATGATTAAG	66,8°C	

Primer für Proteinexpression in *E. coli* für *in vitro* Pull-down-Analysen und Phosphorylierungsversuche (Klonierung in pCR2.1-TOPO, Subklonierung in pET28a bzw. pGEX4T-1)

DMI2-ID-F-Sall	<u>GTCGAC</u> CCTGCCGTTATAGACACAAG	66,4°C	1165 bp
DMI2-ID-R-NotI	<u>GCGGCCG</u> CCTATCTCGGTTGAG	67,7°C	
DMI2-JM_EcoRI_R	<u>GAATTCT</u> ACTGTTCTGTAGCCTGCTCT	63,4°C	180 bp (Forw-Primer DMI2-ID-F-Sall)
DMI2-Kin_Sall_F	<u>GTCGAC</u> CCAAAACCTTTAATAGGTGAAGGA	67,8°C	844 bp
DMI2-Kin_EcoRI_R	<u>GAATTCT</u> TAAATGAGAGCATCCTCCAAC	62,2°C	
DMI2-CTD_Sall_F	<u>GTCGAC</u> CCAATGCATCTGAATACATGA	63,4°C	166 bp (Rev-Primer DMI2-ID-R-NotI)
DMI2-AD_Sall_F	<u>GTCGAC</u> CCTGTGTGCTAAGGTTGCAGATT	68,1°C	594 bp (Rev-Primer DMI2-ID-R-NotI)
PP2C2Y2H-F-Sall	<u>GTCGAC</u> CCATCGGGGATTCTCG	65,8°C	433 bp
PP2C2FL-F-Sall	<u>GTCGAC</u> CCACCGCAAAGAAATCC	66,1°C	862 bp
PP2C2-R-NotI	<u>GCGGCCG</u> CTCAGTGAAACCTCAC	67,8°C	433/862 bp

Primer für Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR

MtTEF-qPCR-F3	TACTCTTGGAGTGAAGCAGATG	58,4°C	241 bp
MtTEF-qPCR-R2	GTCAAGAGCCTCAAGGAGAG	59,4°C	
MtPT4-qPCR-F1	GTGCGTTCGGGATACAATACT	57,9°C	201 bp
MtPT4-qPCR-R1	GAGCCCTGTCATTTGGTGTT	57,3°C	
GiTEF_F1	TGTTGCTTTTCGCCCCAATATC	55,9°C	177 bp
GiTEF_R1	GGTTTATCGGTAGGTTCGAG	56,7°C	
TC107197-qPCR-F1	TGCTTTTTGAATAATTGTATGTGATG	55,3°C	106 bp
TC107197-qPCR-R1	TGCATAAGTTACCTTGTGAAATCC	57,6°C	
MtPP2C2_qPCR_F	AACTTTCCAGGGGATGTTCC	57,3°C	227 bp
MtPP2C2_qPCR_R	GCTGCAGACCGAGCATCT	58,2°C	
MtPP2C2_qPCR_F2	AAGATGATAGATGACGGTGGAGAG	61,0°C	213 bp
MtPP2C2_qPCR_R2	ACAATGTGAACTTCGCAATCAG	56,5°C	
MtNPP2C1-qPCR-F	CACCTCCCTATCCATTTTACC	57,9°C	281 bp
MtNPP2C1-qPCR-R	AACAACAGCGACCTCTATCG	57,3°C	
con49964_qPCR_F	GAGAAGATAAGTGAAGATGCAGAA	57,6°C	209 bp
con49964_qPCR_R	CTTGTGAATTGTGATCACTGAAGTT	58,1°C	
con60935_qPCR_F	GGACGTACAAACAACCTGATATAGA	57,6°C	230 bp
con60935_qPCR_R	ACACATGTTGTAAAAAGATAATCATC	55,9°C	
5g063940_qPCR_F	ATCAGACCCCGATGTACATAGTA	58,9°C	237 bp
5g063940_qPCR_R	GATTTGAAGTGATCAATCATCACCTA	58,9°C	
con52429_qPCR_F	TCAGTATGCTGATGTTAACCAAG	57,1°C	225 bp
con52429_qPCR_R	TGTATGTATGTTCCCTTTTTTCATC	55,9°C	
2g008850_qPCR_F	ATCCAGACGTAAAACCCGAC	57,3°C	233 bp
2g008850_qPCR_R	CAAATGCAAGGACTTGTATAATCAC	58,1°C	

Primer für RNAi und Überexpression
(Klonierung in pENTR/D-TOPO, Subklonierung in pK7GWIWG2DII bzw. pK7FWG2-RR)

MtPP2C2-RNAi-F	<u>CACCCTTCCGAACTCACAATG</u>	59,8°C	244 bp
MtPP2C2-RNAi-R	GACCTGCGTGACCATCAAAT	57,3°C	
MtPP2C2-BiFC-F	<u>CACCATGACCGCAAAGAAATCC</u>	62,4°C	862 bp (Überexpression)
XbaI_MtPP2C2_R	<u>TCTAGACAATCAGTGAAACCTCACAAC</u>	61,9°C	
MtNPP2C1-RNAi-F	<u>CACCGCATGCAAAAAACGAC</u>	57,3°C	210 bp
MtNPP2C1-RNAi-R	CGCATTCTCCGTTTTTCAGAT	55,3°C	
MtNPP2C1_OV_F	<u>CACCATGAAGAACATGAAACGACACTC</u>	63,4°C	1154 bp (Überexpression)
EcoRI_NPP2C1_R	<u>GAATTCTCAACTAGATTTTAATGTTCTCTTAG</u> GT	63,6°C	
RNAi_con69035_F	<u>CACCACCTTGATGACTTTCTA</u>	55,9°C	263 bp
RNAi_con69035_R	TATCTTGTAAGTGCACAACTTG	55,3°C	
RNAi_5g063940_F	<u>CACCTTGCTCAAGTCAACCCTTGT</u>	62,7°C	352 bp
RNAi_5g063940_R	TGCTTTTGAGATAGATGCAGCAG	58,9°C	
RNAi_609+5g06_F	<u>CACCTGATATAGATGTTGATATTGA</u>	56,4°C	204 bp
RNAi_609+5g06_R	AAGATAATCATCTGAATTTAACCAC	54,8°C	

4.7 Molekularbiologische Methoden

4.7.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum werden mit einer Kolonie von einer frisch ausgestrichenen *E. coli* Platte inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen werden 500 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit der Übernachtskultur beimpft und eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Die Kultur wird bei 20-25°C und 180 rpm inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hat. Die Zellen werden nun für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 3220 g pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 100 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 10 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 3220 g wird das Pellet in 10 ml eiskaltem TB-Puffer (+7% DMSO) aufgenommen. Die Zellen werden aliquotiert (100 µl), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation werden 100 µl selbst hergestellte chemisch kompetente Zellen (bzw. 50 µl gekaufte Zellen) auf Eis aufgetaut und mit der gewünschten Menge Plasmid vermischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt ein Hitzeschock für 60 Sekunden (selbst hergestellte Zellen) bzw. 30 Sekunden (gekaufte Zellen von Invitrogen) bei 42°C im Wasserbad. Anschließend werden 500 µl SOC-Medium zum Transformationsansatz gegeben und eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Danach werden die Zellen kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet im Restvolumen (ca. 50 µl) resuspendiert und auf LB-Medium-Platten mit der entsprechenden Konzentration an Antibiotika ausplattiert. Die Platte wird über Nacht bei 37° inkubiert.

4.7.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien

Für eine Vorkultur werden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin und 40 µg/ml Gentamycin mit einer Kolonie *Agrobacterium tumefaciens* GV1301/pMP90 beimpft und für 24 h bei 28°C geschüttelt. Hat die Kultur eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,1 erreicht, werden 4 ml der Vorkultur in 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin und 40 µg/ml Gentamycin überführt und bei 28°C unter Schütteln inkubiert bis die OD₆₀₀ ungefähr 0,5 beträgt. Anschließend werden die Zellen in ein sterilen 250 ml Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 50 ml eiskaltem NaCl (150 mM) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 5000 rpm werden die Zellen in 10 ml eiskaltem CaCl₂ (20 mM) aufgenommen, in 200 µl Aliquots aufgeteilt und nach Einfrieren in flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert.

Zunächst werden 200 µl Agrobakterienzellen für 1 bis 1,5 h auf Eis aufgetaut und anschließend mit 100 – 200 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 5 min bei 37°C und eine sofortige Zugabe von 800 µl LB-Medium. Die Zellen werden nun für 3 bis 4 h bei 28°C und 300 rpm inkubiert, bevor sie auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und dem entsprechenden Selektionsantibiotikum für das transformierte Plasmid ausplattiert werden. Die Platten werden 2-3 Tage bei 28°C inkubiert.

Transformiert man Agrobakterien für das BiFC-System in planta, wird jedes Konstrukt einzeln in ein Aliquot Agrobakterien transformiert. Für die anschließende Transformation von Tabakblättern werden Zellsuspensionen der transformierten Agrobakterien-Stämme hergestellt, miteinander gemischt und zusammen in Tabakblätter transformiert.

4.7.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Agrobakterien

Zu Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien werden zunächst 3 ml LB-Medium mit einer Konzentration von 600 mg/l Streptomycin mit einer Kolonie *Agrobacterium rhizogenes* des Stammes ARqua1 angeimpft. Nach Kultur über Nacht bei 28°C und Schütteln impft man 500 ml LB-Medium (600 mg/l Streptomycin) mit 2 ml der Übernachtskultur an und lässt die Zellen unter Schütteln bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 wachsen. Die Kultur wird nun 15 min auf Eis inkubiert und bei 4°C und 5000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 500 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert, um Mediumreste zu entfernen, und erneut bei 4°C und 5000 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 500 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm für 10 Minuten wird das verbleibende Pellet in 10 ml 10% Glycerin resuspendiert und ein letztes Mal bei 4°C und 5000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Letztendlich wird das Zellpellet in 3 ml 10% Glycerin resuspendiert und als Aliquots von je 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Auf Eis werden 50 µl elektrokompetente Agrobakterien aufgetaut und mit der entsprechenden Menge Plasmid vermischt. Der Ansatz wird in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Im Elektroporator wird bei 200 Ω und 25 µF für 5 msec eine Spannung von 2 kV angelegt. Sofort im Anschluss werden 500 µl SOC-Medium mit 600 mg/l Streptomycin zugegeben und die Zellen werden zwei Stunden bei 28°C und 220 rpm geschüttelt. Anschließend werden 50 -100 µl der Zellsuspension auf eine TY-Platte mit 600 mg/l Streptomycin und entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Ob die Agrobakterien das richtige Plasmid aufgenommen haben, wird mit Hilfe der Kolonie-PCR überprüft. Dazu werden 5 Kolonien mit sterilem Zahnstocher gepickt und je eine 3 ml Übernachtskultur damit angeimpft. Am nächsten Tag werden 25 µl der Übernachtskultur 10 min bei 95°C erhitzt um die Zellen aufzuschließen. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und 2 µl des Überstandes als Template für eine PCR mit den entsprechenden Primern eingesetzt.

4.7.4 Transformation von *Nicotiana benthamiana* Blättern mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die transiente Transformation von Tabakblättern erfolgt nach dem Protokoll von Voinnet *et al.* (2003) mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*. Zunächst wird eine Kolonie von frisch transformierten Agrobakterien gepickt und auf eine LB-Medium Platte mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und dem entsprechenden Selektionsantibiotikum für das transformierte Plasmid ausgestrichen. Die Platte wird für 1-2 Tage bei 28°C inkubiert. Mit Zellen dieser Platte werden dann 5 ml LB-Medium (s.o.) angeimpft und über Nacht bei 28°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wird mit 1 ml der Übernachtskultur 4 ml LB-Medium (s.o.) inokuliert und die Kultur für 2-4 h bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Dann werden die Zellen für 15 min bei 4000×g abzentrifugiert, in 1 ml AS-Medium resuspendiert und mit AS-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,7-0,8 verdünnt. Nun mischt man die unterschiedlichen Zellsuspensionen (2 Agrobakterienstämme, von denen jeder ein BiFC-Konstrukt enthält, und ein Agrobakterienstamm, der das p19 Plasmid trägt) im Verhältnis 1:1:1 und lässt die gemischte Suspension für 2-4 Stunden auf Eis stehen. Für die Transformation von *N. benthamiana* benutzt man 4-6 Wochen alte Pflanzen, die ein gesundes Aussehen haben und keine Läsionen an den Blättern zeigen. Die Pflanzen werden ca. 1 Stunde vor der Transformation gut gewässert. Die Transformation erfolgt durch Infiltration der gemischten Agrobakterienstämme in die Unterseite der Blätter. Dazu verwendet man eine 1 ml Spritze ohne Nadel, setzt diese direkt an die Unterseite der Blätter an, übt mit dem Zeigefinger auf der Oberseite des Blattes etwas Druck auf die Öffnung der Spritze aus und drückt die Suspension vorsichtig in die Interzellularräume der Pflanzenzellen. Pro Pflanze werden 2 Blätter infiltriert. Anschließend werden die Pflanzen bei Raumtemperatur stehen gelassen und nach 2-3 Tagen mikroskopisch untersucht.

4.7.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Minipräparation)

2 ml einer 3 ml Übernachtskultur werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch 3 minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm geerntet. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird in 200 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend werden die Zellen durch eine alkalische Lyse mit 200 µl Lösung II aufgeschlossen. Die Lyse wird durch Zugabe von 200 µl Lösung III und Mischen durch Invertieren gestoppt. Durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm werden die Zelltrümmer, Proteine und die genomische DNA pelletiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 600 µl Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm wird der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wird das DNA-Pellet bei 68°C für 5 min getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer pH 8 oder dH₂O aufgenommen. Zur besseren Lösung der DNA wird sie für 5-10 min bei 68°C erhitzt. Gelagert wird die isolierte Plasmid-DNA bei -20°C.

4.7.6 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Das Volumen eines Verdauansatzes kann variieren, je nachdem wieviel DNA verdaut werden soll. Als Standard werden 20 µl angesetzt. Dieser Ansatz enthält 2 µl 10xReaktionspuffer (passend zu dem jeweiligen Restriktionsenzym), 0,2 -1 µl Restriktionsenzym, die gewünschte Menge DNA und destilliertes Wasser. Die DNA wird dann bei der entsprechenden Temperatur für 1-5 Stunden verdaut.

4.7.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und anschließende Isolierung

Alle in dieser Arbeit benutzten Agarosegele wurden in 0,5 x TAE-Puffer angesetzt. Dieser Puffer diente auch als Laufpuffer für die Gelelektrophorese. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden bei Bedarf aus dem Agarosegel ausgeschnitten und isoliert mit Hilfe des Zymoclean-Gel-Recovery-Kit isoliert.

4.7.8 Fällung von DNA

Für die Fällung wird die DNA auf ein Volumen von 100 µl mit dH₂O aufgefüllt. Dann werden 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 250 µl >99% (v/v) Ethanol zugegeben und der Ansatz für 30 min bei -80°C inkubiert. Die nun gefällte DNA wird durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 13.000 rpm wird das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und im gewünschten Volumen DEPC-H₂O oder TE-Puffer pH 8 resuspendiert.

4.7.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der T4 DNA Ligase

Für den Ligationsansatz wurde ein Volumen von 10 oder 20 µl gewählt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug immer 3:1. Die eingesetzte Menge Vektor lag

zwischen 100 und 300 ng. Die einzusetzende Menge des zu klonierenden DNA-Fragments wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng (Vektor)} \times \text{kb Größe Insert}}{\text{kb Größe Vektor}} \times \text{molares Verhältnis von } \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng des Inserts}$$

Die gewünschten Mengen Vektor und Insert werden mit 10xT4 DNA Ligase Puffer und der entsprechenden Menge an dH₂O gemischt und zum Schluss 1 µl T4 DNA Ligase zugegeben. Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert und am nächsten Tag in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

4.7.10 Klonierung in pCR2.1-TOPO und pCR8/GW/TOPO

Die Klonierung von PCR Produkte mit 3'A-Überhängen erfolgte wie im Handbuch des TOPO T/A Cloning® Kit PCR (Invitrogen, USA) beschrieben. Allerdings wurden jeweils nur 0,5 µl Vektor für eine Reaktion eingesetzt und die Inkubationszeit auf 30 min verlängert. Bei *bluntend* PCR-Produkten wurden nach der eigentlichen PCR-Reaktion 3' A-Überhänge erzeugt. Hierzu wurden 0,25 µl Taq Polymerase dem Ansatz zugegeben und ein weiterer Elongationsschritt von 10 min bei 72°C durchgeführt.

4.7.11 Klonierung in pENTR/D-TOPO

Die Reaktion wurde wie in den Anweisungen des Herstellers beschrieben mit blunt-end PCR Fragmenten angesetzt. Es wurde anstelle von 1 µl des Vektors allerdings nur 0,5 µl eingesetzt und die Inkubationszeit wurde auf 30 min ausgeweitet.

4.7.12 Gateway-Klonierung

L/R Rekombinationen wurden mit dem Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgt in einem 10 µl Ansatz. Es werden 100-300 ng Entry-Klon zu 100-300 ng des Destination-Vektors gegeben und 2 µl 5 x LR Clonase Reaction Buffer zugegeben. Mit TE-Puffer pH 8 wird auf 8 µl aufgefüllt. Der LR Clonase Enzyme Mix wird auf Eis aufgetaut und zweimal kurz gevortext. Anschließend werden 2 µl in den Reaktionsansatz pipettiert. Dieser wird durch Vortexen gemischt, kurz abzentrifugiert und 4 h oder über Nacht bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wird 1 µl Proteinase K zugegeben, gevortext und 10 min bei 37°C inkubiert. 5 µl des Ansatzes werden für eine Transformation in *E. coli* verwendet.

4.7.13 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard PCR-Reaktionen wurden in einem Ansatz von 25 µl mit der Taq-DNA Polymerase von *Thermus aquaticus* durchgeführt. Eingesetzt wurden je 1 µl DNA (gDNA oder cDNA, bzw. eine 1:100 bis 1:1000 Verdünnung (1 – 10 ng/µl) von Plasmid DNA), 2 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl MgCl₂ (25 mM), je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 µM), 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl Polymerase sowie 16 µl DEPC-Wasser. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema im Tpersonal Thermocycler (Biometra, Deutschland). Die Annealingtemperatur (T_m) der Primer wurde entsprechend der Berechnungen von

Eurofins MWG Operon (Deutschland) festgesetzt. Bei PCR-Reaktionen mit unspezifischen Überhängen in den Primer Sequenzen wurden die ersten 5 Zyklen bei einer niedrigeren T_m vollzogen, um das Binden der Primer zu gewährleisten.

Bei Standard Anwendungen wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

5 min bei 94 °C

30 sec bei 94°C

30 sec bei der T_m der Primer

1 min je kb Länge bei 72°C

10 min bei 72°C

Die Schritte 2-4 wurden je nach Anwendung 25-35 mal wiederholt.

Für PCR-Produkte, die in Klonierungsreaktionen weiter verwendet werden sollten, wurden Polymerasen mit Korrekturlese-Funktion wie die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes OY, Finnland) oder die Pfu Polymerase (Fermentas, Kanada) entsprechend der Anweisungen der Hersteller eingesetzt.

4.7.14 RNA-Isolierung aus Pflanzenwurzeln

Für die Gewinnung der gesamten RNA aus Pflanzenproben wurde jeweils maximal 100g frisches Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder mit Mörser und Pistill oder mit der Schwingmühle MM200 und 5mm Stahlkügelchen aufgeschlossen. Die eigentliche Isolation der pflanzlichen RNA wurde mit dem innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena, Deutschland) entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach der Elution in 30 µl RNase-freiem dH₂O wurden 0,3 µl RNase Out (Invitrogen, USA) zum Schutz der RNA-Proben vor RNasen zugegeben.

4.7.15 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde maximal 1 µg RNA eingesetzt. Zunächst wurde die RNA mit DNaseI (Invitrogen, USA) behandelt, um eventuell vorhandene genomische DNA abzubauen. Dazu wurden 1 µl DNaseI und 1 µl 10x DNase-Puffer zu der RNA gegeben und das Volumen mit RNase-freiem dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 25°C inkubiert. Der vollständige Abbau der DNA in den RNA-Proben wurde anschließend durch eine Test-PCR auf die Haushaltsgene, die in der späteren qRT-PCR als Referenzgene eingesetzt wurden, überprüft. Dazu wurden 0,5 µl der DNase-verdauten RNA als Template eingesetzt und der Rest bei -80°C aufbewahrt.

Bei vollständigem Verdau aller DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben wurde die DNase-verdaute RNA wieder aufgetaut. Die DNase wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und 10-minütiger Inkubation bei 65°C inaktiviert. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 µl Oligo(dt)-Primer (Invitrogen, USA) und 1 µl 10 mM dNTPs die Erststrang-cDNA-Synthese durch das Binden der Primer bei 65°C für 5 min eingeleitet. Die eigentliche Synthese wurde durch das Zugeben von 1 µl SuperScriptII-Reverse-Transkriptase im Mastermix mit 1 µl RNaseOUT, 1 µl DTT (0,1 M) und 4 µl 5x Puffer (alles von Invitrogen, USA) bei 42°C für eine Stunde vollzogen und bei 70°C für 10 min beendet.

Eine Test-PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt, um eine erfolgreiche Synthese zu bestätigen.

4.7.16 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Genexpressionsanalysen wurden mit der Methode der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) angewendet. Die Reaktion erfolgte im iCycler MyIQ (Biorad, USA) unter Verwendung des MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Belgien) mit einer Primerkonzentration von 0,2 pmol/μl in 25 μl Ansätzen. Als Template wurden unterschiedliche Verdünnungen von Einzelstrang cDNA eingesetzt. Die Primer für die qRT-PCR wurden mit der Primer3 Software erstellt und auf optimale Annealing Temperaturen getestet. Die Parameter für den PCR-Lauf wurden nach folgendem Schema festgesetzt.

95°C für 3 min
95 °C für 30 sec
56 °C für 30 sec
72 °C für 30 sec
95 °C für 1 min
57 °C für 1 min
57-95 °C für 10 sec

Die Schritte 2-4 wurden für 40 Zyklen wiederholt.

Am Ende jeder qPCR wurde durch ein langsames Ansteigen der Blocktemperatur von 57-95°C eine Schmelzkurvenanalyse zum Test auf unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere durchgeführt.

Die qRT-PCR Reaktionen wurden routinemäßig in 3 biologischen sowie drei technischen Replikaten angesetzt. Als Haushaltsgen wurden für *M. truncatula* und *R. irregularis* der Elongationsfaktor-alpha-1 (TEF) gewählt.

Die Kalkulation der relativen Expression erfolgte durch Normalisierung der Ct-Werte (threshold cycle) der entsprechenden Zielgene gegen die Ct-Werte eines Haushaltsgens. Dabei wurde zunächst ein Mittelwert der Ct-Werte aus den drei technischen Replikaten gebildet.

relative Expression = $2^{\text{Ct Zielgen} - \text{Ct Haushaltsgen}}$

4.8 Das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H)

4.8.1 Allgemeines

Diese Methode ist seit mehreren Jahren etabliert und dient der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (Fields und Song, 1989). Hier soll nur kurz auf die Funktionsweise dieses Systems eingegangen werden. Grundlage dieser Methode ist der Transkriptionsaktivator GAL4 aus der Hefe *S. cerevisiae*. Dieser untergliedert sich in zwei Domänen: die DNA-bindende Domäne GAL4-BD, sowie die Transaktivierungsdomäne GAL4-AD. Diese wurden in unterschiedliche Vektoren kloniert und so mutiert, dass sie spontan nicht mehr aneinander binden können und somit die Expression ihrer Zielgene verhindert wird. Mit diesen Domänen werden jeweils die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Das Protein, für das Interaktionspartner gefunden werden sollen, bezeichnet man als Köder (Bait). Das Protein, das mit dem Bait interagieren soll, wird auch Beute (Prey) genannt. Werden beide Fusionsproteine in einer Zelle exprimiert, können die beiden Domänen von GAL4 nur dann interagieren, wenn die beiden an sie gekoppelten Proteine eine Interaktion eingehen. Die Interaktion kann anhand der Expression von GAL4-aktivierten Reportergenen wie *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1* erkannt werden. *ADE2* codiert für ein Enzym im Syntheseweg von Adenin, *HIS3* ist ein Enzym in der Histidin-Synthese. Bei *lacZ* handelt es sich um eine β -Galactosidase, *MEL1* codiert für eine α -Galactosidase. Die Aktivität der beiden letzten beider Enzyme kann durch eine Farbreaktion, bei welcher das farblose Substrat X- β -Gal bzw. X- α -Gal zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird, nachgewiesen werden.

4.8.2 Transformation in *S. cerevisiae*

Zum Animpfen der Vorkultur wurde eine Hefe-Kolonie von ca. 3 mm Durchmesser in 50 ml YPDA-Flüssigmedium in einem sterilen Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30°C und 220 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde mit der Übernachtskultur 300 ml YPDA angeimpft und dabei eine OD_{600} von 0,2-0,3 eingestellt. Die Hefekultur wurde bei 30°C und 220 rpm inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,4-0,6 erreicht war. Die Zellen wurden bei 1000xg für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in sterilem dH_2O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000xg für 5 Minuten, wurde das Zellpellet in 1,5 ml frisch hergestelltem 1xTE/1xLiAc aufgenommen. Für die jeweiligen Transformationsansätze wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen jeweils 50 μ l aufgekochte Hering-Test-Carrier-DNA (Stocklösung: 2 mg/ml) vorgelegt, zu welcher dann das entsprechende Volumen der Plasmide zugegeben wurde, so dass eine Plasmidkonzentration von ca. 1 μ g pro Ansatz vorlag. Schließlich wurden je Transformationsansatz 100 μ l der kompetenten Hefezellen dazu gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden 600 μ l frisch hergestellte PEG/LiAc-Lösung hinzugefügt, nochmals gevortext und für 30 Minuten bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden 70 μ l DMSO dazu gegeben und nach Invertieren folgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 15 Minuten. Die transformierten Hefezellen wurden dann 1-2 Minuten auf Eis gekühlt, 5 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei

Einzeltransformationen wurde das Pellet in 500 μ l 1xTE resuspendiert und je 100 μ l, unverdünnt und einer 1:10 Verdünnung auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert. Für die Co-Transformationen wurde das Pellet in 200 μ l 1xTE resuspendiert und 100 μ l unverdünnt auf SD-LW ausplattiert. Die Platten wurden dann 3-4 Tage bei 30°C inkubiert, bis Kolonien einer Größe von 2-3 mm gewachsen waren.

1xTE/1xLiAc (10 ml)	1 ml 10x TE
	1 ml 1M LiAc (10x)
	8 ml dH ₂ O
PEG/LiAc (10 ml)	8 ml 50 % Polyethylenglykol (PEG) 3350
	1 ml 10x TE
	1 ml 1M LiAc (10x)

4.8.3 Hefe-Mating

Eine 2-3 mm große Kolonie des Bait- und des Prey-Stammes werden in 1 ml 2xYPDA in einem sterilen 10 ml Kulturröhrchen resuspendiert und für 24 h bei 30°C und 50 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wird der Matingansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 2000xg zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml dH₂O resuspendiert und erneut für 1 min bei 2000xg zentrifugiert. Nun werden die Zellen in 1 ml dH₂O aufgenommen und zweimal 250 μ l auf SD/-LW und zweimal 250 μ l auf SD/-LWHA Platten ausplattiert und solange bei 30°C inkubiert bis Kolonien erscheinen.

4.8.4 Spotting-Test und α -Galaktosidasetest

Um Proteininteraktionsstärken zu untersuchen wird die entsprechende Hefekolonie in 500 μ l dH₂O resuspendiert und 10 μ l der Zellsuspension unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 auf SD/-LW und SD/-LWHA Platten mit jeweils 20 μ g/ml X- α -Gal aufgetropft. Die Platten sind bei einem α -Galaktosidasetest mit 20 μ g/ml X- α -Gal supplementiert. Die Platten werden anschließend bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

4.9 Biochemische Methoden

4.9.1 SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion

Zur Auftrennung von Proteinbanden in einer Acrylamidmatrix wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteingele wurden wie in der unten stehenden Tabelle angegeben hergestellt. Die Angaben entsprechen der Menge für ein Gel. Das Sammelgel hatte immer die gleiche Konzentration an Acrylamid, während die Acrylamid-Konzentrationen in den Trenngelen zwischen 10 und 15 % lag.

Tabelle 4.11: Zusammensetzung von Acrylamid-Gelen

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
dH ₂ O	2,4 ml	2,175 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 ml	-
Tris-HCl 1 M pH 6,8	-	375 µl
40% Acrylamid	1,25 ml	375 µl
SDS 10%	50 µl	30 µl
APS 10%	50 µl	30 µl.
TEMED	2,5 µl	3 µl

Die Gelelektrophorese von Proteingelen sowie der Western Blot wurden mit dem System Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-rad Laboratories, München) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei einer konstanten Spannung von 60 V, nach der Passage der Proteinbanden in das Trenngel wurde die Spannung auf 120-150 V erhöht. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran fand über Nacht bei 4°C und 30 V statt.

Als Größenstandard wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

SDS-Gele wurden entweder mit Coomassie gefärbt oder zum Blotten benutzt. Bei der Coomassie-Färbung wurden die Proteingele für 30 min in der Färbelösung inkubiert und danach mit Entfärbelösung oder dH₂O so lange entfärbt, bis kein Hintergrund mehr zu sehen war.

Beim Blotten wurden die Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um in einer anschließenden Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern das gewünschte Protein nachweisen zu können. Dazu wurden die Membran nach dem Übertrag der Proteinbanden zunächst mit in einer 10%igen Milchpulver-Lösung in 1x PBST für 1 h blockiert, anschließend erfolgte die Bindung des Primärantikörpers in einer 5%igen Milchpulver-Lösung in 1xPBST für 1-2 h. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBST für jeweils 5 min, wurde die Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert (5% Milchpulver in 1x PBST). Nach weiteren drei Waschsritten (s.o.) wurden die Proteinbanden durch Zugabe detektiert. Dazu wurden 1 ml der Lösung A (50 ml 0,1 M Tris HCl, pH 6,8, 12,5 mg Luminol) mit 100 µl der Lösung B (11 mg Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO) und 0,5 µl H₂O₂ gemischt und auf der Membran verteilt.

4.9.2 Proteinexpression in *E. coli* und anschließende Aufreinigung

In dieser Arbeit wurden pflanzliche Proteine als Fusionsproteine mit dem 6xHis-Tag (Vektor pET28a) oder dem GST-Tag (Vektor pGEX-4T-1) in *E.coli* exprimiert. Diese wurden dann für *in vitro* Pull-down-Analysen und *in vitro* Kinase-Phosphatase-Experimente eingesetzt. Für die Proteinexpression wurden die entsprechende Konstrukte in den *E. coli* Stamm Rosetta (DE3) pLys transformiert. Positive Kolonien wurden für eine Übernachtskultur gepickt und in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Am nächsten Tag wurde eine 200 bis 800 ml Hauptkultur mit Übernachtskultur

inokuliert und die OD_{600} auf 0,01 eingestellt. Die Bakterienkulturen wurden bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG für 5 h bei 30°C oder über Nacht bei 22°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5.000 rpm, 4°C, 10 min) geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Je nach Anwendung wurden die Zellpellets in einem bestimmten Puffer resuspendiert und die Zellen über den Homogenisator EmulsiFlex-C3 mechanisch aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 rpm, 4°C und 10 min lagen zwei Fraktionen vor: eine lösliche Proteinfraction (*soluble fraction*) als Überstand und unlösliche Proteine zusammen mit Zelltrümmern im Pellet (*insoluble fraction*). Der Überstand stellt den Gesamtproteinextrakt dar und wird ohne Aufreinigung als Rohextrakt für die Pull-down-Analysen eingestetzt.

Im Falle der *in vitro* Kinase-Phosphatase-Experimente müssen die Fusionsproteine anschließend über eine Matrix aufgereinigt werden. Dies wurde in Abhängigkeit des fusionierten Tags über eine Glutathion-Agarose (Novagen User Protocol TB235) oder eine Ni-NTA-Agarose nach Anweisungen der Hersteller erreicht. Da die Proteine nach der Aufreinigung und Elution von der Matrix in einem Puffer vorliegen, der keine Kinaseaktivität erlaubt, erfolgt ein Puffertausch über PD-10-Säulen (GE Healthcare). Hierbei werden die Fusionsproteine in 50 mM HEPES (pH 7,4) überführt.

4.9.3 *In vitro* Pull-down Analysen

In dieser Arbeit wurden aufgrund der höheren Spezifität der Glutathion-Agarose im Vergleich zur Ni-NTA-Agarose nur GST-Pull-down-Analysen durchgeführt. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen (Novagen User Protocol TB235). Abweichungen und eine Zusammenfassung der Methode werden in diesem Kapitel beschrieben.

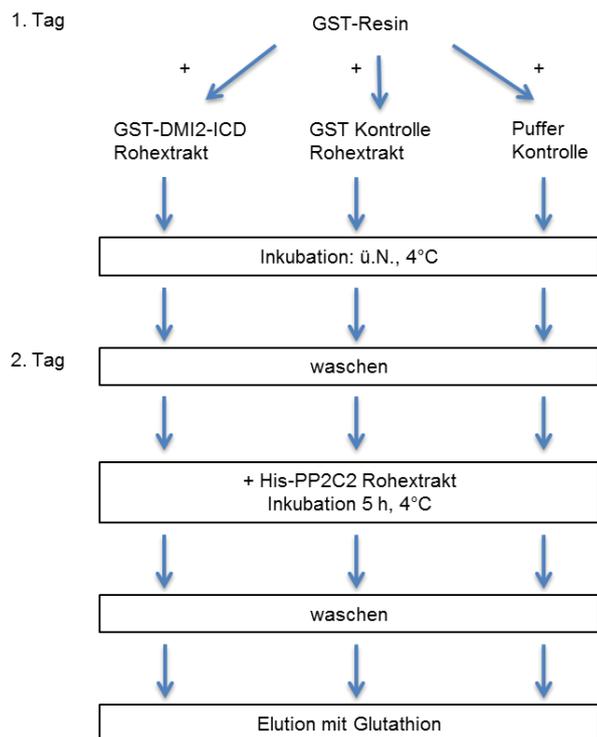


Abb. 4.1 Schema eines *in vitro* Pull-down-Assay

MtDMI2-ICD wurde mit GST fusioniert, während die Phosphatase MtPP2C2 mit einem 6xHis-Tag gekoppelt wurde. Nach einer erfolgreichen Proteinexpression in *E. coli*, wurden zunächst die Zellen, die das Prey-Protein in Form von GST-DMI2-ICD exprimiert haben, in GST-Waschpuffer (4 ml Puffer pro 100 ml des ursprünglichen Kulturvolumens) resuspendiert und wie oben beschrieben aufgeschlossen. Der so gewonnene Proteinrohextrakt wurde mit Glutathion-Agarose (300 µl Agarose pro 200 ml Kulturvolumen) über Nacht bei 4°C in einem Falcon rotierend inkubiert und am nächsten Tag abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Agarose mehrmals mit GST-Waschpuffer gewaschen. Währenddessen wurde der Proteinrohextrakt von His-PP2C2 vorbereitet und anschließend mit der gewaschenen Agarose für 5 h bei 4°C inkubiert. Es folgten wieder mehrere Waschschrte und schlussendlich wurde der Komplex von MtDMI2 und MtPP2C2 durch die Zugabe von Glutathion von der Agarose eluiert. Als Negativkontrollen wurde getestet, ob MtPP2C2 auch an den GST-Tag alleine oder an die Agarose selbst binden.

10x GST-Binde- und Waschpuffer pH 7,3

43 mM Na₂HPO₄
 14,7 mM KH₂PO₄
 1,37 M NaCl
 27 mM KCl

1x GST-Binde- und Waschpuffer (10 ml)

10x GST Binde- und Waschpuffer 1 ml
 0,1M PMSF in Isopropanol 200 µl
 dH₂O 8,8 ml

10x GST-Elutionspuffer pH 8.0	1x GST-Elutionspuffer (10 ml)	
500 mM Tris-HCl	10x GST-Elutionspuffer	1 ml
	10-20 mM Glutathion	0,046 g
	dH ₂ O	9 ml

4.9.4 In vitro Kinase-Phosphatase-Experimente

Transphosphorylierungsstudien wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Parniske von der LMU München gemacht. Eine exakte experimentelle Beschreibung findet sich in Yoshida & Parniske, 2005.

4.10 Kultivierung und Transformation von *M. truncatula*

4.10.1 Keimung von *Medicago truncatula* Samen

M. truncatula Samen werden in konzentrierter Schwefelsäure inkubiert um ihre Dormanz zu beenden und sie zu sterilisieren. Nach einiger Zeit bilden sich schwarze Punkte auf den Samen. Sind pro Samen durchschnittlich 5 dieser schwarzen Punkte zu sehen (nach 15 bis 30 Minuten), werden sie dreimal mit reichlich sterilem destilliertem Wasser gewaschen und auf Wasseragarplatten ausgebracht. Die Platten werden mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Samen zur Keimung in einen 27°C warmen und dunklen Inkubator überführt, wo sie in ca. 15 bis 20 Stunden ca. 1 cm lange Wurzeln ausbilden. Keimlinge mit dieser Wurzellänge eignen sich für die Transformation mittels *Agrobacterium rhizogenes*.

4.10.2 Transformation von *M. truncatula* Wurzeln mittels *Agrobacterium rhizogenes*

Die Transformation von *M. truncatula* Wurzeln mittels *Agrobacterium rhizogenes* wird unter sterilen Bedingungen nach einem abgewandelten Protokoll von Boisson-Dernier *et al.* (2001) durchgeführt. 50 µl einer *A. rhizogenes* Übernachtskultur werden auf eine TY-Platte mit 600 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Spectinomycin ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 28°C wird diese Platte für die Transformation von *Medicago* Wurzeln verwendet. Dazu werden 1 bis 3 mm der Wurzel von *Medicago* Keimlingen mit dem Skalpell abgeschnitten, der Keimling mit der abgeschnittenen Wurzelspitze über den Agrobakterienrasen gestreift und auf eine Platte mit modifiziertem Fahraus-Medium gelegt. Der Fahraus-Agar wurde als Schrägagar gegossen und der Keimling wird so in die Mitte der Platte gelegt, dass die Wurzel zur dickeren Agarhälfte zeigt. Das Fahraus-Medium ist zusätzlich mit 25 µg/ml Kanamycin supplementiert, so dass nur transformierte Wurzeln, die das binäre Plasmid mit der Kanamycinresistenzkassette aufgenommen haben, wachsen können. Die Platte wird mit Parafilm verschlossen und die untere Hälfte der Platte, dort wo die Wurzeln der Keimlinge liegen, mit Alufolie bedeckt um sie vor

Lichteinstrahlung zu schützen. Die Platten werden zunächst für eine Woche bei 21°C in einem 45° Winkel positioniert, bevor sie in vertikaler Position bei 25°C inkubiert werden. Nach 4 bis 5 Wochen werden die Pflanzen auf transformierte Wurzeln untersucht.

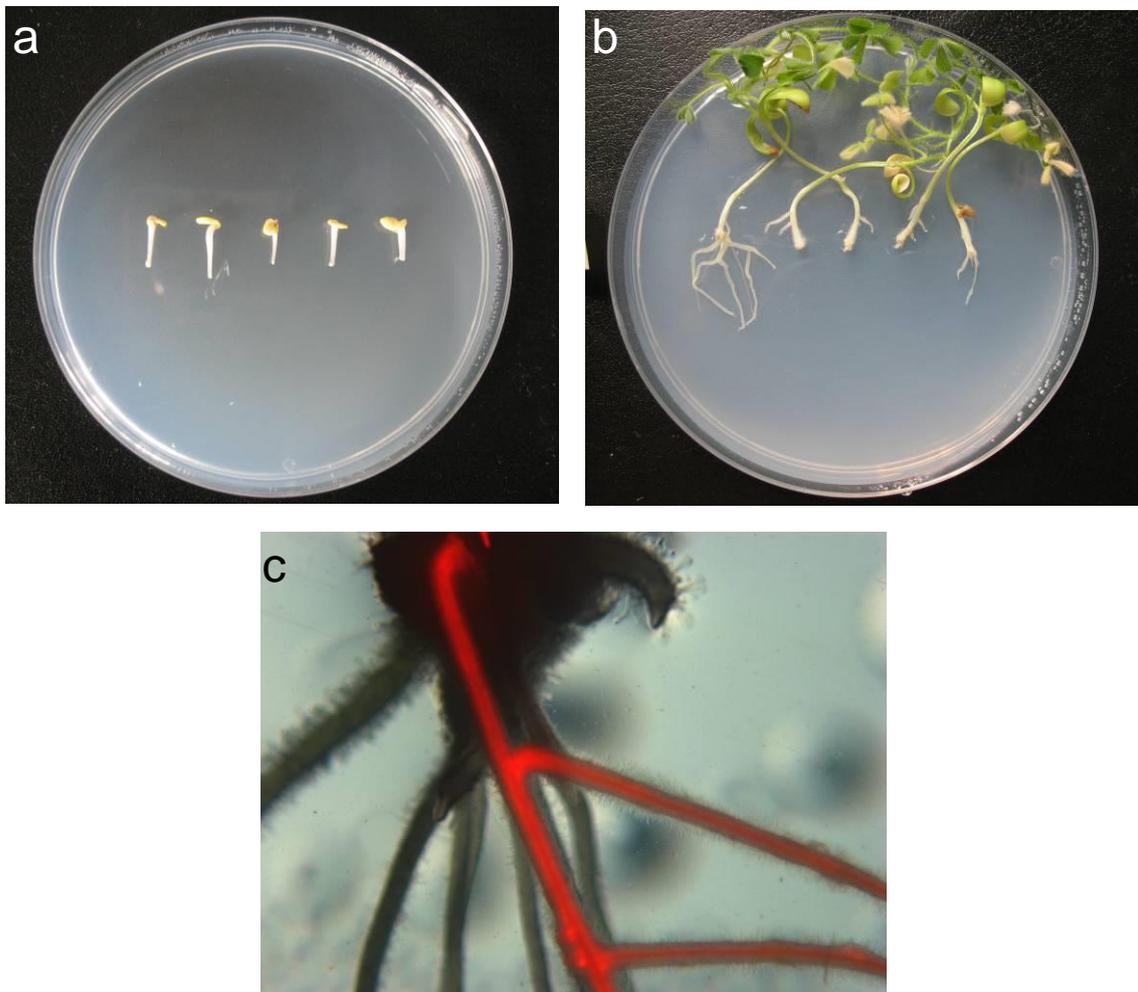


Abb.4.2: Transformation von *M. truncatula* Wurzeln mittels *A. rhizogenes*

- (a) Keimlinge mit abgeschnittener Wurzelspitze und anhaftenden Agrobakterien auf modifiziertem Fahraus-Schrägagar
- (b) Pflanzen nach 4-5 Wochen Wachstum. Die Wurzeln, die gewachsen sind, sind wahrscheinlich transformiert.
- (c) Rot fluoreszierende und damit transformierte Wurzel von *M. truncatula*

4.10.3 *In vitro* Kultur transformierter *Medicago truncatula* Wurzeln

Erfolgreich transformierte Wurzeln, auch *hairy roots* genannt, werden unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell von der restlichen Pflanze getrennt und auf M-Medium, das mit 10 g/l Saccharose angereichert ist, umgesetzt. Das M-Medium enthält zusätzlich für die Selektion von transformierten Wurzeln 25 µg/ml Kanamycin und zum Abtöten der Agrobakterien 400 µg/ml Augmentin. Ungefähr alle 4 Wochen werden die Wurzeln erneut auf frisches Medium umgesetzt und dabei die Augmentinkonzentration schrittweise von 400 µg/ml, auf 200 µg/ml und dann auf 100 µg/ml reduziert. Letztendlich können die Wurzeln antibiotikafrei auf M-Medium mit 10 g/l Saccharose kultiviert werden. Alle Inkubationen erfolgen im Dunkeln bei 27°C.

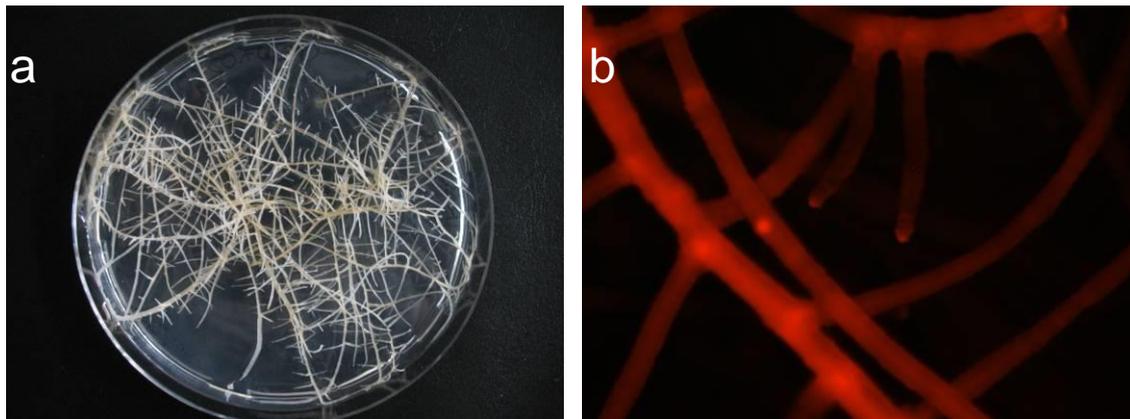


Abbildung 4.3: *In vitro* Kultur transgener Wurzeln (*hairy roots*)

(a) Wurzeln wachsen auf M+S-Medium. (b) Transgene Wurzeln, die DsRed exprimieren.

4.10.4 *In vitro* Kultur Ri-transformierter mykorrhizierter *Daucus carota* Wurzeln

Da Mykorrhizapilze bisher nicht in axenischer Kultur kultiviert werden können, sondern nur in monaxenischer Kultur mit Wurzeln überleben, erfolgt die Kultivierung von *Glomus intraradices* zusammen mit Ri-transformierten *Daucus carota* Wurzeln auf M-Medium mit 10 g/l Saccharose bei 27°C im Dunkeln. Alle 1 bis 3 Monate werden 1 bis 3 Wurzelstücke auf neue Platten umgesetzt und diese wieder einige Monate inkubiert.

4.10.5 Mykorrhizierung von Ri-transformierten Wurzeln und vollständigen Pflanzen im Zweikompartmentensystem

Die Mykorrhizierung Ri-transformierter *Medicago truncatula* Wurzeln erfolgte nach der Methode von Boisson-Dernier *et al.* (2001). Bei dieser Methode benutzt man ein Halbplattensystem: eine Hälfte der Petrischale dient der Kultivierung von *Glomus intraradices* in Kokultur mit *Daucus carota* Wurzeln, während auf die andere Hälfte der Platte transgene *M. truncatula* Wurzeln aufgebracht werden. Die Pilzhyphen von *G. intraradices* wachsen über die Plattengrenze hinweg und kolonisieren die *Medicago* Wurzeln.

Zunächst werden Halbplatten mit mykorrhizierten *D. carota* Wurzeln vorbereitet. Dazu wird eine Hälfte der Halbplatte mit M-Medium mit Saccharose (M+S) und die andere Plattenseite mit M-Medium ohne Saccharose (M-S) befüllt. Auf die M+S-Medium-Hälfte werden entlang der Plattengrenze Wurzelstückchen von mykorrhizierten *D. carota* Wurzeln gelegt und die Platten 2 Monate bei 27°C im Dunkeln inkubiert. Sind genügend Pilzhyphen auf der M-S Hälfte vorhanden, werden die Platten für die Mykorrhizierung von *M. truncatula* Wurzeln benutzt. Dazu wird das M-S-Medium entfernt und die Plattenhälfte mit M+S Medium, das nur die halbe Konzentration an Phosphat enthält, befüllt. Sobald das Medium fest ist, wird ein halbrundes Stück Cellophan, das zuvor dreimal in destilliertem Wasser aufgeköcht und anschließend autoklaviert wurde, aufgelegt. Anschließend wird eine Schwelle aus M+S Medium (halbe Konzentration an Phosphat) gegossen. So vorbereitete Platten werden erneut für 10 Tage bei 27°C im Dunkeln

inkubiert. Danach werden die zur Mykorrhizierung ausgewählten Wurzeln auf die M+S-Seite gelegt. Die Platten werden mit Parafilm verschlossen und bei 27°C im Dunkeln inkubiert.

Für die Mykorrhizierung von vollständigen Pflanzen wurde ebenso das Zweikompartimentensystem benutzt. Hier wurde eine Plattenhälfte mit 2x Flüssig-M-Medium ohne Saccharose aber mit 20 µM Phosphat befüllt und für 10 Tage bei 27°C inkubiert. Danach wurden 3-5 Setzlinge durch Öffnungen im Deckel der Petrischale gepflanzt, so dass die Wurzeln in die Flüssigkultur mit pilzlichem Myzel ragen. Die Pflanzen wurden bei 25°C und 16 h Belichtung am Tag inkubiert.

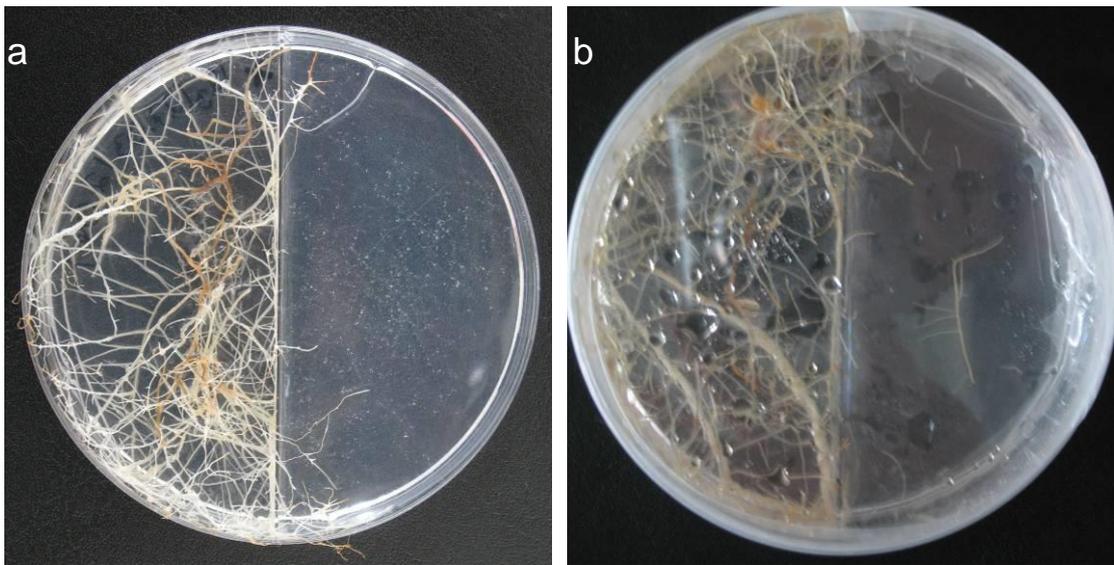


Abb. 4.4: System zur Mykorrhizierung Ri-transformierter *M. truncatula* Wurzeln

- (a) Kokultur von *D. carota* und *G. intraradices*. Deutlich zu erkennen sind die Hyphen und Sporen im rechten Kompartiment der Halbplatte.
- (b) Halbplatte zur Mykorrhizierung von *M. truncatula* Wurzeln. Im linken Kompartiment befinden sich die kolonisierten Karottenwurzeln, rechts befindet sich eine Wurzel von *Medicago*, eingebettet in Cellophan und Biofolie.

4.10.6 Quantifizierung der Mykorrhizierung

Um pilzliche Strukturen in der Wurzel sichtbar zu machen, müssen die Wurzeln zunächst mit Tinte gefärbt werden. Bei dieser Färbetechnik werden die Wurzeln erst mit 10% (v/v) KOH für 30 min bei 80°C geklärt und anschließend mit dH₂O gewaschen. Dann werden die Wurzeln in einer 5 % (v/v) Tinte-Essiglösung in handelsüblichem Haushaltsessig (z.B. Branntweinessig) mit 5 % Säure für 5 min bei Raumtemperatur gefärbt. Das Waschen und Entfärben der Wurzeln erfolgt in einer 10% (v/v) Essiglösung. Zur Entfärbung werden die Wurzeln für mehrere Stunden in der Essiglösung belassen und zur Aufbewahrung in 100% Glycerin auf einem Objektträger mit Deckglas eingebettet.

Die Quantifizierung des Level der pilzlichen Kolonisierung wurde, wie in Kuhn *et al.* (2010) beschrieben, mit dem Programm MycoCalc (Trouvelot *et al.*, 1986) durchgeführt unter Bestimmung folgender Parameter:

F%	Frequenz der Mykorrhizierung im Wurzelsystem
M%	Intensität der Mykorrhizierung im Wurzelsystem
m%	Intensität der Kolonisation in mykorrhizierten Wurzelfragmenten
A%	Abundanz der Arbuskeln im gesamten Wurzelsystem
a%	Abundanz der Arbuskeln in mykorrhizierten Wurzelfragmenten
l%	Abundanz der intraradikalen Hyphen im gesamten Wurzelsystem
i%	Abundanz der intraradikalen Hyphen in mykorrhizierten Wurzelfragmenten
App%	Abundanz der Appressorien im gesamten Wurzelsystem
app%	Abundanz der Appressorien in mykorrhizierten Wurzelfragmenten

(<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalcprg/download.html>).

4.10.7 Nodulierung von *composite plants*

Um transgene Wurzellinien auch in der Wurzelknöllchen-Symbiose untersuchen zu können, müssen sogenannte *composite plants* hergestellt werden. Diese bestehen aus einem nicht-transformierten Spross und Ri-transformierten Wurzeln. *M. truncatula* Keimlinge werden dabei wie in Abschnitt 4.9.2 beschrieben mit *A. rhizogenes* transformiert. Nach 4-6 Wochen werden die nicht-transformierten Wurzeln dieser Keimlinge abgeschnitten und die transformierten Wurzeln am Spross belassen. Die Pflänzchen werden nun einzeln in Gefäße, die ein Gemisch aus Sand und Vermiculit (1:1) enthalten überführt. Nach einer 2-wöchigen Regenerationszeit werden die Pflanzen mit *S. meliloti* RM2011 inokuliert. Dazu wurde eine 100 ml Rhizobien-Kultur 2 Tage bei 27°C und 180 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in dH₂O resuspendiert. Es wurde eine OD₆₀₀ von ca. 0,3 eingestellt und anschließend wurde jede Pflanze mit 8 ml der Rhizobien-Suspension gegossen. Nach 25 Tagen wurden die Pflanzen geerntet und die Sprosslänge, die Anzahl der Wurzelknöllchen an nicht-transformierten und transformierten Wurzeln sowie das Gewicht dieser Wurzeln bestimmt.

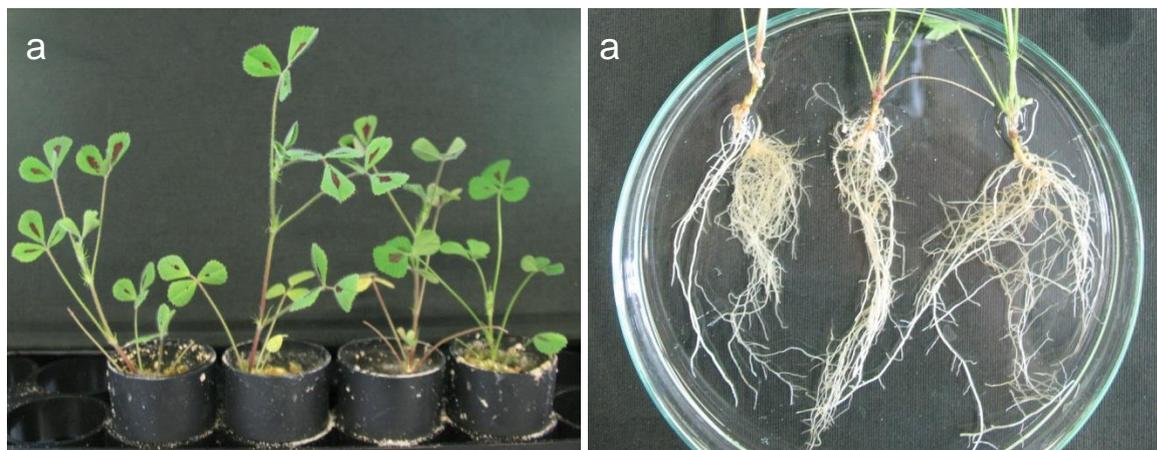


Abb. 4.5: *M. truncatula* Pflanzen 25 Tage nach Inokulierung mit *S. meliloti*

- a) Pflanzen wurden in einem Sand/Vermiculite-Gemisch angezogen
 b) Wurzeln nach der Ernte

5 Literaturverzeichnis

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699-711.

Ané, J. M., Kiss, G. B., Riely, B. K. et al. (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364-7.

Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., de Carvalho-Niebel, F. (2007) AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *The Plant Cell* 19: 2866-2885.

Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi, H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 434: 824-7.

Archambault, J., Pan, G., Dahmus, G.K., Cartier, M., Marshall, N., Zhang, S., Dahmus, M.E., Greenblatt, J. (1998) FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 273: 27593-27601.

Arrighi J.F., Barre A., Ben Amor B., Bersoult A., Soriano L.C., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E.P., Ghéardi M., Huguet T. et al. (2006) The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiology* 142: 265-279.

Augé, R.M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.

Bécard, G., Fortin, A. (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-8.

Bécard, G., Piché, Y. (1989) Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2320-2325.

Ben Amor, B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E.D., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D., Long, S.R., Dénarié, J., Gough, C. (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* 34: 495-506.

Benhamed, M., Bertrand, C., Servet, C., Zhou, D.X. (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell* 18:2893-2903.

Bersoult, A., Camut, S., Perhald, A., Kereszt, A., Kiss, G.B., Cullimore, J.V. (2005) Expression of the *Medicago truncatula* DMI2 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *MPMI* 18:869-876.

Blancaflor, E.B., Zhao, L., Harrison, M.J. (2001) Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma* 217: 154-165.

- Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M.J., Beullens, M. (2010)** The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35:365-371.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., Barker, D. G.. (2001)** Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*: MPMI 14: 695-700.
- Bonfante, P. und Perotto, S. (1995)** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol* 130: 3–21.
- Bonfante, P. & Reuena, N. (2011)** Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 14(4):451-7.
- Bouwmeester, H.J., Roux, C., Lopez-Raez, J.A., Bécard, G. (2007)** Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci* 12:224-230.
- Braun, DM., Stone, JM., Walker, JC. (1997)** Interaction of the maize and Arabidopsis kinase interaction domains with a subset of receptor-like protein kinases: implications for transmembrane signaling in plants. *Plant J* 12: 83-95.
- Brock, A.K., Willmann, R., Kolb, D., Grefen, L., Lajunen, H.M., Bethke, G., Lee J., Nürnberger, T., Gust, A:A: (2010)** The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. *Plant Physiol* 153: 1098-1111.
- Brundrett, M. (2002)** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275–304.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., Kuipers, O.P. (2008)** LysM, a widely distributed protein motif for binding to peptido(glycans). *Mol Microbiol* 68: 838-847.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, V., Journet, EP., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., Dénarié, J. (2000)** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12: 1647-65.
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B.J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., Barker, D.G., Bonfante, P. (2011)** Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytologist* 189: 347-355.
- Chen, T., Zhu, H., Ke, D., Cai, K., Wang, C., Gou, H., Hong, Z., Thang, Z. (2012)** A MAP kinase kinase interacts with SymRK and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell* 24(2): 823-38.
- Cohen, P.T. (1989)** The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual review of biochemistry* 58:453-508.
- Cohen, P.T. (1997)** Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends in biochemical sciences* 22(7):245-251.
- Cohen, P. (2000)** The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 12:596-601.
- Cohen, P. (2002a)** The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4:E127-30.

- Cohen, P.T. (2002)** Protein Phosphatase 1: targeted in many directions. *J Cell Sci* 115:241-256.
- Colditz, F., Braun, H.P., Jacquet, C., Niehaus, K., Krajinski, F. (2005)** Proteomic Profiling Unravels Insights into the Molecular Background Underlying Increased *Aphanomyces euteiches*-Tolerance of *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 59: 387-406.
- Cooper, K.M., Lösel, D.M. (1978)** Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 80: 143-151.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., Barford, D. (1996)** Crystal structure of the serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J* 15:6798-6809.
- Dénarié, J., Debellé, F., Promé, J.C. (1996)** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65: 503-535.
- Den Herder, G., Yoshida, S., Antolin-Llovera, M., Ried, M.K., Parniske, M. (2012)** Lotus japonicas E3 Ligase SEVEN IN ABSENTIA4 destabilizes the symbiosis receptor-like kinase SYMRK and negatively regulates rhizobial infection. *Plant Cell* 24(4):1691-707.
- Demchenko, K., Winzer, T., Stougaard, J., Parniske, M., Pawlowski, K. (2004)** Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytologist* 163: 381-392.
- D'Haese, W. und Holsters, M. (2002)** Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiol* 12: 79R-105R.
- Dickson, S., Smith, S.E. (2001)** Cross walls in arbuscular trunk hyphae form after loss of metabolic activity. *New Phytologist* 151: 735-742.
- Ding, Z., Wang, H., Liang, X., Morris, E.R., Gallazzi, F., Pandit, S., Skolnick, J., Walker, J.C., Van Doren, S.R. (2007)** Phosphoprotein and phosphopeptide interactions with the FHA domain from Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase. *Biochemistry* 46:2684-2696.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevel, Z., Mihacea, S., Kaló, P., Kiss, G. (2002)** A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962-66.
- Ehrhardt, D. W., Wais, R. & Long, S. R. (1996)** Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* 85: 673-81.
- Ezawa, T., Hayatsu, M., Saito, M. (2005)** A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant. *Mol Plant-Microb Interact* 18: 1046-53.
- Farkas, I., Dombrádi, V. Miskei, M., Szabados, L., Koncz C. (2007)** Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci* 12:169-176.
- Ferrol, N., Pozo, M.J., Antelo, M., Azcón-Aguilar, C. (2002)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1683-1687.
- Fester, T., Strack, D., Hause, B. (2001)** Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* 213: 864-868.

- Fields, S. und Song, O. (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., Rock, C.D. (2002)** Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14:S15-45.
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., Schweighofer, A. (2012)** Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J* doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x
- Gagne, J.M. & Clark, S.E. (2010)** The Arabidopsis stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *The Plant Cell* 22:729-743.
- Genre, A., Bonfante, P. (1997)** A mycorrhizal fungus changes microtubule orientation in tobacco root cells. *Protoplasma* 199: 30-38.
- Genre, A., Bonfante, P. (1998)** Actin versus tubulin configuration in arbuscule-containing cells from mycorrhizal tobacco roots. *New Phytologist* 140: 745-752.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., Barker, D.G. (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17: 3489-3499.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G., Bonfante, P. (2008)** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell Online* 20: 1407 -1420.
- Ghelis, T. (2011)** Signal processing by tyrosine phosphorylation in plants. *Plant Signal Behav* 6-7:942-951.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., Gianinazzi, S. (1990)** In vitro enhancement of spore germination and hyphal growth of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus by root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243–255.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S. (1996)** Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133: 45-57.
- Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Oufattole, M., Arango, M., Gianinazzi, S. (2000)** Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 211: 609-613.
- Gianinazzi, S., Plumey-Jacquot, E., Gianinazzi-Pearson, V., Leyval, C. (2005)** Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality and terrestrial ecotoxicology. In: Bloem J, Hopkins DW, Benedetti A, Edts. *Microbiological methods for assessing soil quality*. Wallingford: CABI, 248-256.
- Glenn, M., Chew, F., Williams, P. (1985)** Hyphal penetration of Brassica (Cruciferae) roots by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 99: 463–473.
- Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernié, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., Miller, J.B., Sun, J., Bano, S:A., Ratet, P., Mysore, K.S., Dénarié, J., Schultze, M., Oldroyd, G.E. (2012)** A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol* 22(23): 2236-41.

- Gomez, S.K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E.B., Udvardi, M.K., Harrison, M.J. (2009)** *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* 9: 10.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., Boller, T. (2001)** Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1155-1163.
- Green, N.E., Graham, S.O., Schenck, N.C. (1976)** The Influence of pH on the germination of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal spores. *Mycologia* 68: 929-934.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Dräxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L. et al. (2010)** NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *The Plant Cell* 22: 2509-2526.
- Guether, M., Neuhäuser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., Bonfante, P. (2009)** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* 150: 73-83.
- Gutjahr, C., Casieri, L., Paszkowski, U. (2009)** *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist* 182: 829-837.
- Harrison, M.J. (1999)** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 361-389.
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., Liu, J. (2002)** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell* 14: 2413-2429.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., Imaizumi-Anraku, H. (2010)** A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J* 63: 141-154.
- Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnewell, S., Parniske, M., Wang, T.L., Downie, J.A. (2006)** *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiology* 142: 1739-1750.
- Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., Requena, N. (2011)** A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungal *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23: 3812-23.
- Hirrel, M.C., Mehravaran, H., Gerdemann, J. (1978)** Vesicular-arbuscular mycorrhizae in the Chenopodiaceae and Cruciferae: Do they occur? *Can J Bot* 56: 2813-2817.
- Hogg, B.V., Cullimore, J.V., Ranjeva, R., Bono, J.J. (2006)** The *DMI1* and *DMI2* early symbiotic genes of *Medicago truncatula* are required for a high-affinity nodulation factor-binding site associated to a particular fraction of roots. *Plant Physiol* 140: 365-373.
- Hu, CD., Chinenov Y., Kerppola, TK. (2002)** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9(4): 789-98.
- Hunter, T. (2007)** The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* 28:730-738.

- Hunter, T. (2009)** Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* 21:140-6.
- Jacquot-Plumey, E., Caussanel, J.P., Gianinazzi, S., Van Tuinen, D., Gianinazzi-Pearson, V. (2003)** Heavy metals in sewage sludges contribute to their adverse effects on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Folia Geobotanica* 38: 167-176.
- Jakobsen, I., Rosendahl, S. (1990)** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol* 15: 77–83.
- Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., Harrison, M.J. (2007)** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1720-1725.
- Jin, H., Pfeffer, P., Douds, D., Piotrowski, E., Lammers, P., Shachar-Hill, Y. (2005)** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 168: 687-96.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A. et al. (2005)** Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308: 1786-9.
- Kanamori, N., Madsen L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M.H., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., et al. (2006)** A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 359 -364.
- Kanno, Y., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S.R., Kamiya, Y., Seo, M. (2010)** Comprehensive hormone profiling in developing seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiol* 51(12):1988-2001.
- Kapranov, P., Jensen, T.J., Poulsen, C., De Bruijn, F.J., Szczyglowski, K. (1999)** A protein phosphatase 2C gene, *LjNPCC2C1*, from *Lotus japonicus* induced during root nodule development. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1738-43.
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A. (2002)** Gateway vectors for Agrobacterium mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7(5): 193-5.
- Keane, P., Kerr, A., New, P. (1970)** Crown gall of stone fruit II. Identification and nomenclature of Agrobacterium isolates. *Aust. Jnl. Of Bio. Sci.* 23: 585-596.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., Gribskov, M. (2002)** The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* 129: 908-25.
- Kerk, D., Templeton, G. and Moorhead, G.B. (2008)** Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiol* 146:351-367
- Kevei, Z., Loughon, G., Mergaert, P., Horváth, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Endre, G., Kondorosi, E., Ané, J.M. (2007)** 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 19(12):3974-89.
- Kistner, C. & Parniske, M. (2002)** Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in plant science* 7: 511-8.

- Kistner, C., Winzer, T., Pitzschke, A. & other authors (2005)** Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *The Plant cell* 17: 2217-29.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D.G., Bécard, G. (2003)** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131: 952-962.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E. (2008)** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(28): 9823-8.
- Kosuta, S., Held, M., Hossain, M.S., Morieri, G., Macgillivray, A., Johansen, C., Antolin-Llovera, M., Parniske, M., Oldroyd, G.E., Downie, A.J., Karas, B., Szczyglowski, K. (2011)** *Lotus japonicus* *symRK-14* uncouples the cortical and epidermal symbiotic program. *Plant J* 67(5): 929-40.
- Krajinski, F., Hause, B., Gianinazzi-Pearson, V., Franken, P. (2002)** *Mtha1*, a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biology* 4: 754-761.
- Kretschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, S., Bachelier, J.B., Reinhardt, D., Bours, R., Bouwmeester, H.J., Martinoia, E. (2012)** A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483(7389): 341-4.
- Kuhn, H., Küster, H., Requena, N. (2010)** Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytol* 185(3):716-33.
- Kuhn, H. (2011)** Identification and characterization of *Medicago truncatula* marker genes for recognition of fungal signals in the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Dissertation, angefertigt am Karlsruhe Institut für Technologie*.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, M.W., Jelenska, J., Greenberg, J.T. (2008)** Arabidopsis proteins important for modulating defense responses to *Pseudomonas syringae* that secret HopW1-1. *Plant J* 54:452-465.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénarié, J. (1990)** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharid signal. *Nature* 344: 781-4.
- Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Hervé, C., Tóth, K., Bittencourt-Silvestre, Y., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., Murray, J.D., Udvardi, M.K., Raffaele, S., Mongrand, S., Cullimore, J., Gamas, P., Niebel, A., Ott, T. (2010)** A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *PNAS* 107: 2343-2348.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ané, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C., Debelle, F. (2004)** A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-64.

- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T., Geurts, R. (2003)** LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630-3.
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., Guerts, R. (2005)** Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *PNAS* 102(29): 10375-80.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., Harrison, M.J. (2007)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 50: 529-544.
- Lohse, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, Dieter., Fester, T. (2005)** Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 139: 329 -340.
- Luan, S. (2002)** Tyrosine phosphorylation in plant cell signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11567-9.
- Luan, S. (2003)** Protein phosphatase in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54: 63-92.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2003)** A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637-640.
- Maillet F., Poinso V., Andre O., Puech-Pages V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A. et al. (2011)** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469:58-63.
- Markmann, K., Giczey, G., Parniske, M. (2008)** Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biol* 6, e68.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J. (2001)** The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signaling pathway. *Plant J* 25: 295-303.
- Meskiene, I., Baudouin, E., Schweighofer, A., Liwosz, A., Jonak, C., Rodriguez, PL., Jelinek, H., Hirt, H. (2003)** Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 278: 18945-52.
- Messinese, E., Mun, J.H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J.-J., Cook, D.R. et al. (2007)** A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium and calmodulin dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *MPMI* 20: 912-921.
- Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kaló, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., Vandenbosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B., Oldroyd, G.E. (2007)** An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19(4): 1221-34.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., Long, S.R. (2004)** A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4701-5.

- Moore, L., Warren, G., Strobel, G. (1979)** Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2: 617-626.
- Moorhead, G.B., Trinkle-Mulcahy, L., Ulke-Lemée, A. (2007)** Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 234-244.
- Moorhead, G.B., De Wever, V., Templeton G., Kerk D. (2009)** Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J* 417: 401-409.
- Morandi, D., Prado, E., Sagan, M., Duc, G. (2005)** Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza* 15: 283-9.
- Mukherjee, A., Ané, J.M. (2011)** Germinating spore exudates from arbuscular mycorrhizal fungi: molecular and developmental responses in plants and their regulation by ethylene. *Mol Plant Microbe Interact* 24(2):260-70.
- Murakami, Y., Miwa, H., Imaizumi-Anraku, H., Kouchi, H., Downie, J.A., Kawaguchi, M., Kawasaki, S. (2007)** Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the GRAS family, required for NIN and ENOD40 gene expression in nodule initiation. *DNA Research* 13: 255 -265.
- Nakagami, H., Sugiyama, N., Mochida, K., Dausi, A., Yoshida, Y., Toyoda, T. et al (2010)** Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.* 153: 1161-74.
- Nair, M.G., Safir, G.R., Siqueira, J.O. (1991)** Isolation and identification of vesicular–arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl Environ Microbiol* 57: 434–9.
- Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P., Mariani, P. (2007)** A Diffusible Signal from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicits a Transient Cytosolic Calcium Elevation in Host Plant Cells. *Plant Physiology* 144: 673 -681.
- Ohnuma, T., Onaga, S., Murata, K., Taira, T., Katoh, E. (2008)** LysM domains from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A: A stability study and characterization of the chitin-binding site. *J Biol Chem* 283: 5178-5187.
- Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., Gough, C. (2005)** Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44: 195-207.
- Oldroyd, G.E., und Downie, J.A. (2008)** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59: 519-546.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E. A. et al (2010)** Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. signal* 3, ra3
- Op den Camp R., Streng A., De Mita S., Cao Q., Polone E., Liu W., Ammiraju J.S.S., Kudrna D., Wing R., Untergasser A. et al. (2011)** LysM-type mycorrhizal receptor recruited for *Rhizobium* symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* 331:909-912.

Park, C.J., Peng, Y., Chen, X., Dardick, C. Ruan, D., Bart, R., Canlas, P.E., Ronald, P.C. (2008) Rice XB15, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity. *PLoS Biol* 6:e231.

Penmetsa, R.V., Cook, D.R. (1997) A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 275: 527-530.

Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Bécard, G., Shacchar-Hill, Y. (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *New Phytol* 150: 543–553.

Pirozynski, K.A., Malloch, D.W. (1975) The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* 6:153-164.

Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R., Leister, D. (2010) Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol* 8:e1000288.

Pumplin, N., Zhang, X., Noar, R.D., Harrison, M.J. (2012) Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(11): E665-72.

Quandt, H.J. (1993) Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 699.

Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B. & other authors (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585-92.

Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., Grill, E. (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15:395-401.

Read, D.J., Duckett, J.G., Francis, R., Ligrone, R., Russel, A. (2000) Symbiotic fungal association in 'lower' land plants. *Philos Trans R Soc London* 355:815–830.

Redecker, D., Morton, J.B., Bruns, T.D. (2000) Ancestral lineages of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 276-284.

Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H. (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11841–43.

Requena, N., Breuninger, M., Franken, P., Ocón, A. (2003) Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* 132: 1540-1549.

Riely, B.K., Larrainzar, E., Haney, C.H., Mun, J.H., Gil-Quintana, E., González, E.M., Yu, H.J., Tricoli, D., Ehrhardt, D.W., Long, S.R., Cook, D.R. (2013) Development of tools for the biochemical characterization of the symbiotic receptor-like kinase DMI2. *Mol Plant Microbe Interact* 26(2):216-26.

Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Galle, A., Kim, T.H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I., Rodriguez, P.L. (2009) Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* 150(3):1345-55.

Rudrabhatla, P., Reddy, M.M., Rajasekharan, R. (2006) Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol Biol* 60:293-319.

- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R., Rodriguez, P.L. (2006)** Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* 141(4):1389-99.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y. et al. (2007)** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell* 19: 610-624.
- Santiago, J., Dupeux, F., Betz, K., Antoni, R., Gonzalez-Guzman M., Rodriguez, L., Márquez, J.A., Rodriguez, P.L. (2012)** Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs. *Plant Sci* 182:3-11.
- Scannerini, S., Bonfante-Fasolo, P. (1983)** Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Canadian Journal of Botany* 61: 917-943.
- Schenck, N.C., Smith, G.S. (1982)** Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia* 74: 77-92.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001)** A New Fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and Evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I. (2004)** Plant PP2C phosphatase: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* 9: 236-43.
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., Schwanninger, M., Kant, M., Schuurink R., Mauch, F. et al. (2007)** The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *Plant Cell* 19:2213-2224.
- Shah, K., Russinova, E., Gadella, TW., Willemsen, J., De Vries, SC. (2002)** The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes Dev* 16: 1707-20.
- Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Samol, I., Andres, C., Kessler, F., Rochaix, J.D., Vener, A.V., Goldschmidt-Clermont, M. (2010)** The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCI dephosphorylation and state transition in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4782-4787.
- Shaw, S. L. und Long, S. R. (2003)** Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant physiology* 131: 976-84.
- Sheen, J. (1998)** Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 975-80.
- Shiu, S. H. und Bleecker, A. B. (2001)** Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE* 2001: RE22.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C., Lalonde, M. (1993)** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67-69.
- Singh, A., Giri, J., Kapoor, S., Tyagi, A.K., Pandey, G.K. (2010)** Protein phosphatase complement in rice. *BMC Genomics* 11:435.

- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., Geurts, R. (2005)** NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308: 1789-91.
- Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling T. (2007)** *Medicago* LYK3, and entry receptor in rhizobial Nod factor signaling. *Plant Physiology*: 10.1104/pp.107.100945.
- Song, S.K. & Clark, S.E. (2005)** POL and related phosphatases are dosage-sensitive regulators of meristem and organ development in Arabidopsis. *Dev Biol* 285:272-284.
- Sprent, J.I. (2007)** Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* 174: 11-25.
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A. (2012)** Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506(2): 265-73.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Parniske, M. (2002)** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959–62.
- Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, A., Shirasu, K. et al. (2008)** Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Mol Syst Biol* 4:1-7.
- Tchieu, J.H., Fana, F., Fink, J.L., Harper, J., Nair, T.M., Niedner, R.H., Smith, D.W., Steube, K., Tam, T.M., Veretnik, S. et al (2003)** The PlantsP and PlantsT functional genomic databases. *Nucleic Acids Res* 31:342-344.
- Tonks, N. K. (2006)** Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:833-846
- Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi-Pearson, V. (1986)** Estimation of VA mycorrhizal infection levels. Research for methods having a functional significance. Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. Versailles: Service des Publications INRA, 223–232.
- Umbrasaite, J., Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Magyar, Z., Ayatollahi, Z., Unterwurzacher, V., Choopayak, C., Boniecka, J., Murray, J.A., Bogre, L. et al. (2010)** MAPK phosphatase AP2C3 induces ectopic proliferation of epidermal cells leading to stomata development in Arabidopsis. *PLoS One* 5:e15357.
- Umezawa, T., Fujita, M. Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006)** Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotechnol* 17:113-122.
- Vierheilig, H., Iseli, B., Alt, M. et al. (1996)** Resitance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant Soil* 183: 131–136.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. (2003)** An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949-56.
- Wang, B. und Qiu, Y. L. (2006)** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.

- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J.F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., Oldroyd, G.E. (2012)** A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr Biol* 22(23):2242-6.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter K., Kudla J. (2004)** Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40(3): 428-38.
- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. (2004)** Fungal Elicitation of Signal Transduction-Related Plant Genes Precedes Mycorrhiza Establishment and Requires the *dmi3* Gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1385-1393.
- White, F.F., Taylor, B.H., Huffman, G.A., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1985)** Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* 164: 33-44.
- Widjaja, I., Lassowskat, I., Bethke, G., Eschen-Lippold, L., Long, H.H., Naumann, K., Dangl, J.L., Scheel, D., Lee, J. (2010)** A protein phosphatase 2C, responsive to the bacterial effector AvrRpm1 but not to the AvrB effector, regulates defense responses in Arabidopsis. *Plant J* 61:249-258.
- Williams, R.W., Wilson, J.M., Meyerowitz, E.M. (1997)** A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the Arabidopsis CLAVATA1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10467-72.
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehltng, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C., Zhong, Y. (2008)** Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* 9:550.
- Yoshida, S. und Parniske, M. (2005)** Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 280: 9203-9.
- Young, J.P.W. (1992)** Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G. et al., eds) pp. 43-86, Chapman & Hall.
- Yu, L.P., Miller, A.K., Miller, S.E. (2003)** POLTERGEIST encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identity at Arabidopsis shoot and flower meristems. *Current Biology* 13:179-188.
- Yuan, S., Zhu, H., Gou, H., Fu, W., Liu, L., Chen, T., Ke, D., Kang, H., Xie, Q., Hong, Z., Zhang, Z. (2012)** A ubiquitin ligase of symbiosis receptor kinase involved in nodule organogenesis. *Plant Physiol* 160(1): 106-17.
- Zhou, X.E., Soon, F.F., Ng, L.M., Kovach, A., Suino-Powell, K.M., Li, J., Yong, E.L., Zhu, J.K., Xu, H.E., Melcher, K. (2012)** Catalytic mechanism and kinase interactions of ABA-signaling PP2C phosphatases. *Plant Signal Behav* 7(5):581-588.

6 Anhang

Mt52429/1-345	1	GGCTTTGTCTCAAAACATGCCAGGAGATGTTGCTAGAGTGAACGGGCAGCT	50
Mt2g008850/1-344	1	GGTTTTGTCTCAAAACCTTCCAGGAGATGTTGCAAGAGTGAATGGACAGCT	50
Mt60935/1-342	1	GGTTTTGTCTCCAACCTTGCCAGGTGATGTGCCAAGAGTAAATGGACAAT	50
Mt5g063940/1-346	1	GGTTTTGTCTCCAACATTTCCAGGCGATGTCCTAGAGTAAATGGACAAC	50
MtPP2C2/1-343	1	GGTTTTGTATCTAACTTTCCAGGGGATGTTCCACCGGTTGATGGACAGT	50
Mt49964/1-343	1	GGTTTTGTATCAAGATTTCCAGGGGACGTTCCACAGTGTGATGGACGGT	50
Mt52429/1-345	51	TGCAGTTTCTCGAGCATTGTGGAGACAAAAACCTCAAAAACACACTGAGAT	100
Mt2g008850/1-344	51	TGCAGTTGCTCGGGCATTGGAGACAGAAAACCTGAAGTCACACTTGCAT	100
Mt60935/1-342	51	GGCTGTTTCTCGCGCATTGTGGAGACAGGAGTCTCAAGTCACATTTGAGAT	100
Mt5g063940/1-346	51	GGCTGTTGCTCGTGCATTGTGGTGACAAGAGCCTAAAGTCTCATTTGCGAT	100
MtPP2C2/1-343	51	AGCAGTGTCAAGGGCATTGTGGTGACAAAAACCTAAAGATACACATGACT	100
Mt49964/1-343	51	GGCAGTGTTCGAGGGCATTGTGGTGACAAAAAGCTGAAGAACACTTGCAT	100
Mt52429/1-345	101	CCGATCCGTGACATTCAGTATGCTGATGTTAAACCAAGATACCTAGT	150
Mt2g008850/1-344	101	CTGATCCAGACGTAAAAACCCGACGATATCGACCAAGATACCGAGCTCT	150
Mt60935/1-342	101	CGGACCCGGACGTACAAAACAACCTGATATAGATGTTGATATTTGAAA	150
Mt5g063940/1-346	101	CAGACCCCGATGTACATAGTACTGATGTTAGATGTTGATATTTGACTT	150
MtPP2C2/1-343	101	CAGAACCCGATGTGACAGTAAAGATGATAGATGACGGTGGAGAGTTC	150
Mt49964/1-343	101	CAGAGCCATATGTGACAGTAGAGAAAGATAAGTGAAGATGCAGAA	150
Mt52429/1-345	151	ATACTTGTCTAGCGATGGTCTATGGAAGGTAATGGCGAATCAAGAAGCGT	200
Mt2g008850/1-344	151	ATACTTGTCTAGTGATGGTCTATGGAAGGTAATGGCAAAACAAGAGCAGT	200
Mt60935/1-342	151	ATCCTTGCAGTGTATGGAATTTGGAAGGTAATGGCTAATCAGGAAGCAGT	200
Mt5g063940/1-346	151	ATCCTTGCAGTGTATGGAATTTGGAAGGTAATGGCTAATCAAGAGCAGT	200
MtPP2C2/1-343	151	ATATTAGCCAGTGACGGGTTATGGAAGGTCATGTTCAAATCAAGAAGCAGT	200
Mt49964/1-343	151	ATATTAGCCAGTGATGGAATGTTGGAAGGTAATGTTCAAATCAAGAAGCAGT	200
Mt52429/1-345	201	TGATATTGCAAAAAAGATAAAGGATCCACAAAAGGCAGCTAAA	250
Mt2g008850/1-344	201	TGATATTGCATTGAAGATAAAGAGATCCACAAAAGGCAGCTAAA	250
Mt60935/1-342	201	GGATATTGCTAAAAAGATGAAAGATCCACATAAAGCAGCAAAA	250
Mt5g063940/1-346	201	TGATATTGCTAGAAAGGTGAAAGATCCACTGAAAAGCAGCTAAG	250
MtPP2C2/1-343	201	GGATGCAATCAAAGATATCAAAGATGCTGGTCTGCAGCAAAGCATCTTA	250
Mt49964/1-343	201	TGATTTGATCAAAGATATAAAGGATGCTGGTCTGTCAGCAAAGCGCTCA	250
Mt52429/1-345	251	CTACTGAGGCATTTGAACAGAGACAGTAAGGATGATATTTCTGCGTTGTA	300
Mt2g008850/1-344	251	TTGCAGAGGCATTTGAAAAGAGAGAGCAGGGATGACATTTCTGCA	300
Mt60935/1-342	251	CAGCTGAAGCAATAAAAAAGAAAACAGTAAAGATGATATATCTTGTG	300
Mt5g063940/1-346	251	CAGCTGAAGCATTAAAAAAGAGAAAGTAAAGATGATATATCTTGTG	300
MtPP2C2/1-343	251	CTGAAGAAGCGCTTAAACAGGAGGAGCTCAGATGACATCTCTGCA	300
Mt49964/1-343	251	CTGAAGAAGCAGTTAAACAGGAAAAGCAGCGACGATATCTCTGTCA	300
Mt52429/1-345	301	GTTCTGTTTCAAGGGATGAAAAAGGGAAACATACA-TACATAACATA-	345
Mt2g008850/1-344	301	GTTCTGTTTCAAGTGATATATACAAGTCT-CTTGCA-TTTGTTTGA	344
Mt60935/1-342	301	GTTAAATTCAGATGATATATCTTT----TTTACAACATGTTGCACAA-	342
Mt5g063940/1-346	301	GTTAGGTTTAGGTGATGATTGATACACTTCAAAATCAGGTTTCTTGA-	346
MtPP2C2/1-343	301	GTGAGGTTTCACTGATTTGCGAAG----TTCACATTTGATTTCTTGA	343
Mt49964/1-343	301	GTGAAACTTTCAGTGATTCACAATTT----CACAAAGACTCAATACTTTGA	343

Abb. 6.1 cDNA Alignment der PP2Cs, die mit Genexpressionsanalysen untersucht wurden

Das Alignment der cDNA-Sequenzen wurde mit ClustalW generiert. Mit hellgrau sind die forward-Primer und mit hellgrün die reverse-Primer, die für die qRT-Analysen benutzt wurden, gekennzeichnet. Das rot markierte Primerpaar wurde in vorherigen Genexpressionsanalysen zur Amplifikation von MtPP2C2 benutzt. Der rote Kasten markiert das Stoppcodon.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Nina Rieger, Dipl. Biol.
Adresse: Neureuter Hauptstr. 34a
76194 Karlsruhe
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Geburtstag: 14.04.1983
Geburtsort: Karlsruhe

AUSBILDUNG

Seit 08/2008 **Promotion** am Karlsruhe Institut für Technologie (KIT)
Institut für Botanik
Abteilung Molekulare Phytopathologie
11/2007 – 07/2008 **Diplomarbeit** am Karlsruhe Institut für Technologie (KIT)
Institut für Botanik
Abteilung Pilz-Pflanzen-Interaktionen
Thema: „Die Rezeptor-ähnliche Kinase DMI2 in
Medicago truncatula und ihre Interaktionspartner“
10/2002 – 10/2005 **Studium** an der Universität Karlsruhe
Fachrichtung: Biologie
Abschluss: Diplom-Biologin (1,4)
08/1993 – 06/2003 Schulzentrum, Karlsruhe-Neureut
Abschluss: Abitur (1,7)

PUBLIKATIONEN

2013 **Rieger N., Requena N.**, „A protein phosphatase 2C interacts with the symbiotic receptor DMI2 and regulates AM symbiosis in *Medicago truncatula*“, *in preparation*

Mein herzlicher Dank gilt...

Natalia Requena für die Betreuung, ihre Hilfe, wann immer ich sie gebraucht habe, ihren Optimismus, der mich immer wieder von neuem ermutigt hat und für viele neue Ideen. Muchas gracias!

Jörg Kämper für die Übernahme des Korreferates für diese Arbeit, die nette Nachbarschaft im Labor und die leckeren Grillgerichte im Sommer.

Prof. Dr. Martin Parniske für die Möglichkeit in seinem Labor Kinase-Assays durchführen zu können und Martina Ried für die freundliche Einweisung und tatkräftige Unterstützung.

den Mädels und Jungs der Mykorrhiza-Gruppe für die tolle Zusammenarbeit, die freundliche Atmosphäre im Labor und die vielen lustigen Momente.

der Kämper- und Fischer-Gruppe für den regen Austausch in Form von Seminaren, persönlichen Gesprächen und beim Feierabendbierchen im Stövchen.

meiner Familie für ihre Unterstützung, ihre Geduld und ihre Liebe.

meinem Freund Christian für seine tatkräftige Hilfe, seine vielen Aufmunterungsversuche und seine Liebe.