

**Die Entwicklung des Wurzelkortex während der  
Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose wird durch den  
neuen GRAS-Transkriptionsfaktor MIG1 kontrolliert**

---

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte  
DISSERTATION

von M.Sc. Carolin Heck  
aus Karlsruhe

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem M. Klopper

Referent: Prof. Dr. Natalia Requena

Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Prüfungsdatum: 21. Oktober 2016





## Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit in selbständiger Weise und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach aus anderen Werken entstammen, wurden durch Angabe der jeweiligen Quelle kenntlich gemacht. Die elektronische Version dieser Arbeit stimmt mit der gedruckten überein, zusätzlich wurden alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) elektronisch am Institut für Botanik, Abteilung Molekulare Phytopathologie archiviert. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 27.11.2014, habe ich beachtet.

Rheinstetten, den 25. Oktober 2016

---

Carolin Heck

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2012 bis August 2016 in der Abteilung für Molekulare Phytopathologie des Botanischen Instituts am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Natalia Requena durchgeführt.

Tag der Abgabe der Arbeit: 5. September 2016

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

**Heck C., Kuhn H., Heidt S., Walter S., Rieger N. und Requena N. (2016).** Symbiotic fungi control plant root cortex development through the novel GRAS transcription factor MIG1. *Curr Biol* **26** (20), 2770-2778.

## Zusammenfassung

In natürlicher Umgebung des Bodens finden zahlreiche Interaktionen zwischen dem Wurzelsystem einer Pflanze und dem vorliegenden Mikrobiom statt. Eine weit verbreitete und mit 450 Millionen Jahren sehr alte Interaktion stellt die mutualistische Arbuskuläre Mykorrhiza (AM)-Symbiose dar. Von dieser evolutionär erfolgreichen Symbiose profitieren beide Partner dank des reziproken Austauschs von mineralischen Nährstoffen gegen Kohlenhydrate. Eine fein abgestimmte Kommunikation ist für die Etablierung und Erhaltung dieser intimen Assoziation notwendig. Die Akkomodation des AM-Pilzes führt dabei zu einer enormen Umprogrammierung der pflanzlichen Transkription, welche in einer umfangreichen Umstrukturierung pflanzlicher Entwicklungsprogramme resultiert. Diese transkriptionelle Anpassung wird durch die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren (TFs) realisiert. Etliche GRAS-Proteine konnten bereits mit der AM-Symbiose in Verbindung gebracht werden. Maßgeblich sind DELLA-Proteine, Repressoren der Gibberellin (GA)-Antwort, welche eine tragende Rolle in der Arbuskelentwicklung spielen, wodurch eine Verknüpfung der AM-Symbiose und dem GA-Signalweg deutlich wird.

In dieser Arbeit wurden durch Transkriptionsanalysen drei AM-assoziierte GRAS-Proteine in *Medicago truncatula* identifiziert, welche einer neuen Klade der GRAS-Proteine zugeordnet wurden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die funktionelle Charakterisierung von MIG1, das eine hohe Promotoraktivität in Arbuskel-enthaltenden Zellen aufwies. Eine Herunterregulation des *MIG1*-Transkriptes durch RNA Interferenz (RNAi) führte zu einer erhöhten Zahl deformierter unreifer Arbuskeln. Überdies resultierte eine Überexpression von *MIG1* in einer Verdickung der Wurzeln, welche auf eine vermehrte Anzahl an Kortextschichten und radial vergrößerten Kortextzellen zurückgeführt wurde. Dieser Phänotyp wurde durch Blockierung des GA-Signalweges mimikriert. Eine direkte Verbindung der MIG1- und DELLA1-Funktion während der AM-Symbiose wurde durch Protein-Protein Interaktionsanalysen und die Komplementierung des missgebildet Arbuskelphänotyps in *MIG1*-RNAi Wurzeln durch simultane Expression des GA-insensitiven  $\Delta 18DELLA1$  unterstützt. Zusammenfassend wurde ein funktionelles Modell entwickelt, in dem MIG1 DELLA1 als Koaktivator zu bisher unbekanntem Zielgenen rekrutiert, um radiales Zellwachstum während der AM-Symbiose zu fördern.

In dieser Arbeit konnte das GRAS-Protein MIG1, als neue Komponente der pflanzlichen Transkriptionsmaschinerie identifiziert werden und ihm gemeinsam mit DELLA1 eine Funktion im radialen Wachstum kolonisierter Kortextzellen während der AM-Symbiose zugewiesen werden. Die Wechselwirkung mit dem GA-Signalweg zeigt dabei auf, dass AM-Pilze für eine erfolgreiche Akkomodation im Wurzelgewebe die pflanzliche Entwicklungsmaschinerie modifizieren.



## Abstract

There are numerous interactions between the plant root system and the microbiome in the natural habitat of the soil. A widespread and with 450 million years ancient interaction is the mutualistic arbuscular mycorrhiza (AM)-symbiosis. The evolutionarily successful symbiosis represents a tremendous advantage for both partners thanks to the reciprocal exchange of mineral nutrients versus carbohydrates. A well-orchestrated communication is necessary for the establishment and maintenance of this intimate association. The accommodation of the AM-fungus imposes an enormous reprogramming of the plant transcription, resulting in a major reorganization of the plant developmental program. This transcriptional adaptation is accomplished with the activation of specific transcription factors. Several GRAS proteins have been connected with AM-symbiosis, most significantly the DELLA proteins, repressors of the gibberellin (GA) response, that are key players in arbuscule formation, thus connecting AM-symbiosis with GA signaling.

In this study transcriptional analyses led to the identification of three AM-associated GRAS proteins from *Medicago truncatula*, belonging to a novel clade of GRAS proteins. The investigations focused on the functional characterization of MIG1, showing high promoter activity in arbuscule-containing cells. Downregulation of the *MIG1*-transcript via RNA interference (RNAi) revealed a higher number of deformed, immature arbuscules. Furthermore, overexpression of *MIG1* resulted in a thickening of the roots, ascribed to a higher number of cortical cell layers as well as thicker cortex cells, a phenotype that could be mimicked by blocking the GA-pathway. A direct link between the functions of MIG1 and DELLA1 during AM-symbiosis was supported by protein-protein interaction analyses and the complementation of the malformed arbuscule phenotype in MIG1-RNAi roots by simultaneous expression of the GA-insensitive  $\Delta 18DELLA$  gene. In summary it is proposed that MIG1 recruits DELLA1 as a coactivator to yet unknown target genes, to promote radial cell growth during AM-symbiosis.

In this study the GRAS protein MIG1 could be identified as a new component of the plant transcriptional machinery and together with DELLA1 both could be assigned a function in radial growth of colonized cortical cells during mycorrhiza symbiosis. The interdependency with the GA pathway highlights how AM-fungi modify the plant developmental program for their successful accommodation in the root tissue.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Erklärung</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>III</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose .....	2
1.2 Die GRAS-Proteinfamilie – Regulatoren pflanzlicher Entwicklung.....	12
1.3 Gibberelline – Phytohormone involviert in Wachstumsprozesse .....	18
1.4 Zielsetzung .....	25
<b>2 Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
2.1 Identifizierung neuer GRAS-Proteine in der AM-Symbiose .....	27
2.2 Die duplizierten MIGs – Mykorrhiza Induzierte GRAS-Proteine.....	29
2.3 Bioinformatische Analyse – eine neue Gruppe der GRAS-Proteine .....	34
2.4 MIG1 besitzt Transaktivierungsaktivität in seinem N-Terminus .....	41
2.5 Der <i>MIG1</i> -Promotor ist in <i>R. irregularis</i> -kolonisierten Zellen aktiv .....	42
2.6 MIG1 spielt eine Rolle in der Arbuskelentwicklung.....	46
2.7 Die AM-Symbiose interferiert mit der GA-Homöostase.....	54
2.8 GA beeinflusst nicht direkt die Abundanz von MIG1.....	56
2.9 Eine Überexpression von <i>MIG1</i> interferiert mit der GA-Homöostase.....	58
2.10 GA-Verfügbarkeit wirkt sich auf den Phänotyp von <i>M. truncatula</i> aus .....	60
2.11 MIG1 moduliert die Entwicklung des Wurzelkortex.....	64
2.12 MIG1 lokalisiert im Zellkern und im Cytoplasma.....	73
2.13 MIG1 bildet Dimere mit AM-assoziierten GRAS-Proteinen.....	75
2.14 MIG1 OE hat keine Auswirkung auf die Mykorrhizierungseffizienz.....	80
2.15 MIG1 determiniert die Zellgröße während der AM-Symbiose .....	82
2.16 $\Delta 18DELLA1$ komplementiert den MIG1-RNAi Arbuskelphänotyp.....	84
<b>3 Diskussion</b> .....	<b>87</b>
3.1 Die MIGs, GRAS-TFs in der AM-Symbiose.....	87
3.2 MIG1, ein Transkriptionsfaktor in der AM-Symbiose .....	90
3.3 MIG1 reguliert die kortikale Zellexpansion über den GA-Signalweg .....	97
3.4 Schlussfolgerung und Ausblick .....	110

---

<b>4 Material</b> .....	<b>113</b>
4.1 Organismen.....	113
4.2 Verwendete Plasmide und Konstrukte.....	114
4.3 Gennummern und Oligonukleotide .....	119
4.4 Chemikalien .....	124
4.5 Lösungen und Puffer .....	125
4.6 Kulturmedien .....	128
4.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	130
<b>5 Methoden</b> .....	<b>133</b>
5.1 Molekularbiologische Methoden .....	133
5.2 Mikrobiologische Transformationssysteme .....	140
5.3 Arbeiten mit Pflanzen und Mykorrhizierung .....	142
5.4 Biochemische Methoden .....	151
5.5 Färbungen und Mikroskopie .....	153
5.6 <i>In silico</i> Analyse.....	155
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>158</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>178</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>181</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>183</b>





## Abkürzungsverzeichnis

<b>AD</b>	Aktivierungsdomäne	<b>nm</b>	nicht mykorrhiziert
<b>AM</b>	Arbuskuläre Mykorrhiza	<b>NSP</b>	Nodulation Signaling Pathway
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>OE</b>	<i>overexpression</i> - Überexpression
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>Ox</b>	Oxidase
<b>C-Terminus</b>	Carboxy-Terminus	<b>P1BS</b>	PHR1 Bindestelle
<b>CaMV</b>	Blumenkohlmosaikvirus	<b>P35S</b>	35S-Promotor
<b>CCamK</b>	Calcium- und Calmodulin-abhängige Kinase	<b>PAC</b>	Paclobutrazol
<b>Ct</b>	<i>threshold cycle</i> ; Schwellenwert	<b>PAM</b>	Periarbuskuläre Membran
<b>d</b>	<i>days</i> – Tage	<b>PPA</b>	Präpenetrations Apparat
<b>DBD</b>	DNA-Bindedomäne	<b>PT4</b>	Phosphattransporter 4
<b>DIP</b>	<i>DELLA Interacting Protein</i>	<b>PUBI3</b>	Ubiquitin 3-Promotor
<b>DMI</b>	<i>Does Not Make Infections</i>	<b>Pubq10</b>	Ubiquitin10-Promotor
<b>dpi</b>	<i>days post inoculation</i> – Tage nach Inokulation	<b>RAD1</b>	<i>Required for Arbuscule Development 1</i>
<b>DsRed</b>	<i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i>	<b>RAM1</b>	<i>Reduced Arbuscular Mycorrhiza 1</i>
<b>eGFP</b>	<i>enhanced GFP</i>	<b>RGA</b>	<i>Repressor of GA</i>
<b>EtOH</b>	Ethanol	<b>RNAi</b>	RNA Interferenz
<b>EV</b>	<i>empty vector</i> - Leervektor	<b>rpm</b>	Rotationen pro Minute
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanat	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>GA</b>	Gibberellin A	<b>SCL</b>	SCARECROW-like
<b>GA3</b>	<i>Gibberellic Acid</i> ; Gibberellinsäure	<b>SCR</b>	SCARECROW
<b>GAI</b>	<i>GA INSENSITIVE</i>	<b>SD</b>	<i>standard deviation</i> - Standardabweichung
<b>GAL4</b>	$\beta$ -Galactosidase 4	<b>SE</b>	Sporenextrakt
<b>GFP</b>	Grün Fluoreszierendes Protein	<b>SL</b>	Strigolakton
<b>GoF</b>	<i>gain of function</i>	<b>SLR</b>	<i>SLENDER</i>
<b>GRAS</b>	GAI, RGA, SCR	<b>TA</b>	Transaktivierung
<b>GUS</b>	$\beta$ -Glukuronidase	<b>TEF1a</b>	Translations-Elongationsfaktor 1 alpha
<b>IDR</b>	<i>intrinsically disordered region</i> - intrinsisch ungeordneter Bereich	<b>TF</b>	Transkriptionsfaktor
<b>kb</b>	Kilobasen	<b>Tm</b>	Schmelztemperatur
<b>LCOs</b>	Lipochitooligosaccharide	<b>ÜN</b>	über Nacht
<b>LoF</b>	<i>loss of function</i>	<b>UTR</b>	untranslatierte Region
<b>MIG</b>	<i>Mycorrhiza Induced GRAS</i>	<b>w</b>	Wochen
<b>MtGEA</b>	<i>Medicago truncatula gene expression Atlas</i>	<b>WGA</b>	<i>wheat germ agglutinin</i> . Weizenkeimagglutinin
<b>myc</b>	<i>mycorrhized</i> - mykorrhiziert	<b>wpi</b>	<i>weeks post inoculation</i> - Wochen nach Inokulation
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	<b>WT</b>	Wildtyp
<b>N-Terminus</b>	Amino-Terminus	<b>Y2H</b>	Yeast Two Hybrid



## 1 Einleitung

Eine sessile Lebensweise stellt Pflanzen vor besondere Herausforderungen. So müssen sie einen Weg finden ihre Entwicklung sowohl auf abiotische Umwelteinflüsse wie Trockenheit, Nährstoffknappheit im Boden oder unterschiedliche Lichtverhältnisse, als auch auf biotische Interaktoren, wie Insekten oder Mikroben abstimmen. Pflanzen ist es demnach möglich äußere Einflüsse in ihr Entwicklungsprogramm zu integrieren und darauf umgehend adäquat zu reagieren. Jedoch sind sie damit nicht vollkommen auf sich selbst gestellt: Die Ausbildung enger Lebensgemeinschaften zwischen Pflanzen und Mikroorganismen können ihnen helfen sich gesund und widerstandsfähig zu entwickeln sowie ihren Versorgungsstatus aufrechtzuerhalten. Vor allem im Boden kommen Pflanzen über ihr Wurzelsystem in Kontakt mit zahlreichen Mikroben, welche das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze beeinflussen können. Dementsprechend erscheint die Erforschung des Wurzelmikrobioms vor allem durch neue globale Techniken von großem Interesse (Bai *et al.*, 2015; Tkacz & Poole, 2015).

Eine sehr weit verbreitete Interaktion zwischen Pflanzenwurzeln und Pilzen stellt die Mykorrhiza-Symbiose (griech. *mycos* – Pilz; *rhiza* – Wurzel) dar. Eine solche mutualistische Interaktion, das heißt sowohl für die Pflanze, als auch für den Pilz von Vorteil, wird mit 90 % von der Mehrheit aller Landpflanzen eingegangen (Smith & Read, 2008). Ein großer Vorteil der Mykorrhiza-Symbiose besteht im bidirektionalen Nährstoffaustausch zwischen den Partnern. So vergrößert der Pilz durch sein Hyphengeflecht die Fläche der Nährstoffaufnahme im Boden und liefert vor allem Phosphat und Stickstoff an die Pflanze (Jin *et al.*, 2005; Finlay, 2008; Richardson *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Eigenschaft werden Mykorrhizapilze bereits heute als Biodünger eingesetzt (Miransari, 2011). Im Gegenzug erhält der Pilz Photoassimilate in Form von Zucker von der Pflanze (Bago *et al.*, 2000; Nehls *et al.*, 2007).

Aufgrund der unterschiedlichen Anatomie der Mykorrhiza-Interaktion wird zwischen Ekto- und Endomykorrhiza unterschieden. Bei der Ektomykorrhiza handelt es sich um eine Symbiose zwischen Pilzen aus den Basidiomyceten oder Ascomyceten und höheren Pflanzen, wobei die Pilzhyphen die Wurzelspitzen umhüllen und ein sogenanntes Hartigsches Netz zwischen den epidermalen Zellen ausbilden. Eine wesentlich intimere Interaktion stellt dagegen die Endomykorrhiza dar, bei der die pilzlichen Hyphen Wurzelzellen penetrieren und sich in den lebenden Pflanzenzellen weiter entwickeln. Dabei wird zwischen Orchide, Ericoide und Arbuskuläre Endomykorrhiza unterschieden (Bonfante & Genre, 2010).

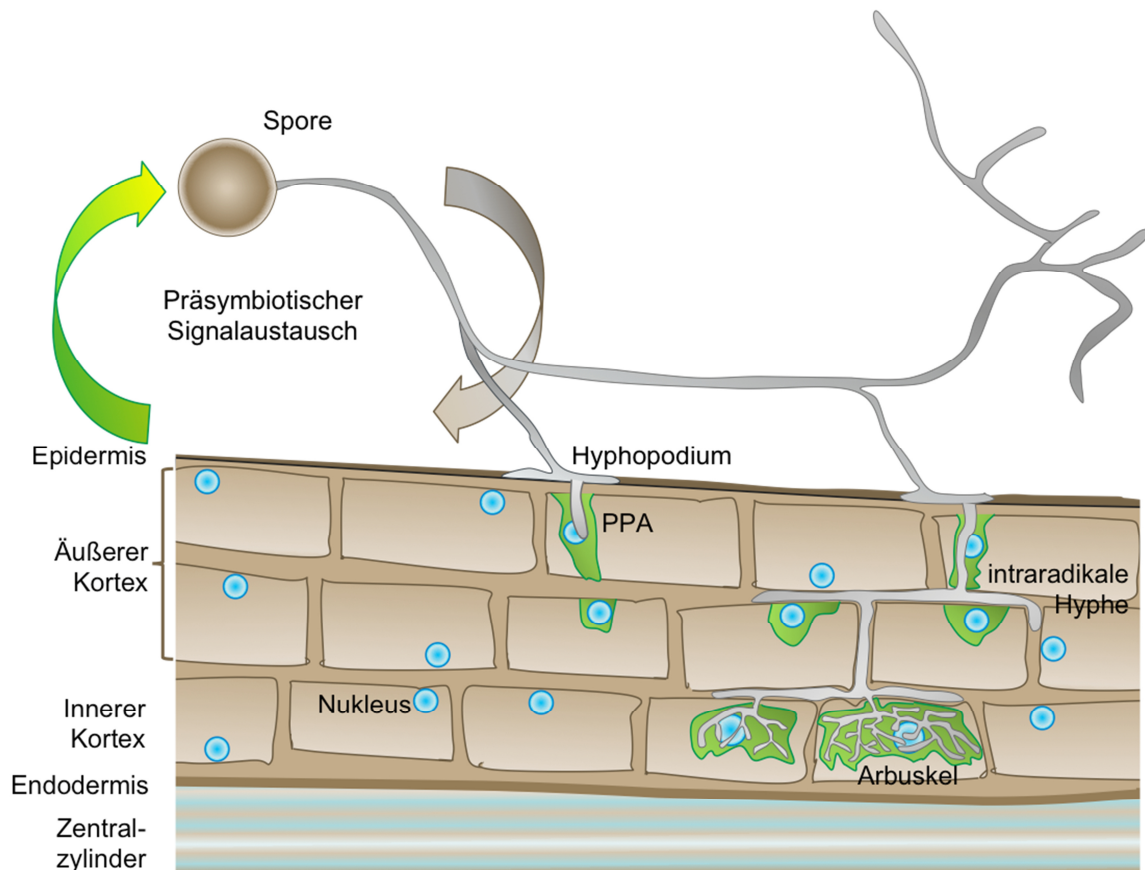
## 1.1 Die Arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose

Die am weitesten verbreitete Symbiose zwischen Pilz und Pflanze stellt mit 80 % der Landpflanzen die Arbuskuläre Mykorrhiza- (AM-) Symbiose dar (Fitter, 2005; Smith & Read, 2008). Diese Interaktion wird zwischen Pilzen des Phylums Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) und einem extrem breiten Spektrum an Wirtspflanzen gebildet, darunter auch zahlreiche Nutzpflanzen, wie Reis, Mais oder Kartoffel (Read *et al.*, 2000; Bouwmeester *et al.*, 2007; Zuccaro *et al.*, 2014). Fossile Funde konnten belegen, dass diese Form der Lebensgemeinschaft bereits vor 450 Millionen Jahren auftrat (Remy *et al.*, 1994; Redecker *et al.*, 2000; Brundrett, 2002). Sowohl die weite Verbreitung, als auch das hohe Alter dieser Assoziation lassen die Vermutung aufkommen, dass eine Koevolution von Pflanze und Pilz die Eroberung des Landes als Lebensraum für Pflanzen begünstigt hat (Pirozynski & Malloch, 1975; Simon *et al.*, 1993; Wang & Qiu, 2006; Bonfante & Genre, 2008; Delaux *et al.*, 2015; Field *et al.*, 2015). Neben der bereits erwähnten gesteigerten Nährstoffzufuhr mit den anorganischen Substanzen Phosphat und Stickstoff, wird auch Schwefel, Kupfer, Eisen oder Zink durch das extraradikale Myzel des Pilzes zur Pflanze mobilisiert (Jin *et al.*, 2005; Finlay, 2008; Gahan & Schmalenberger, 2014; Tamayo *et al.*, 2014). Weitere Vorteile einer AM-Symbiose für die Pflanze zeigen sich in einer verbesserten Wasserversorgung, einer erhöhten Resistenz gegenüber Salz- und Schwermetallstress sowie Pathogenen (*priming*), einer gesteigerten Fitness und letztendlich eine erhöhte Produktivität der Pflanze (Augé, 2001; Jacquot-Plumey *et al.*, 2003; Colditz *et al.*, 2005; Gohre & Paszkowski, 2006; Liu *et al.*, 2007a; Smith & Read, 2008; Jung *et al.*, 2012; Schouteden *et al.*, 2015). AM-Pilze stellen obligat biotrophe Lebewesen dar, da sie auf die Versorgung mit Kohlenhydraten von ihrer Wirtspflanze angewiesen sind um ihren Lebenszyklus zu vervollständigen. Sie können dabei bis zu 20 % der gesamten photosynthetischen Produkte der Pflanze aufnehmen (Jakobsen & Rosendahl, 1990). Werner & Kiers (2015) postulieren eine aktive Selektion beider Mykorrhiza-Partner unter anderem aufgrund Vorkommen und Fluktuation der Ressourcen und Effizienz des Nährstoffaustausches. Letztendlich wird so eine mutualistische Lebensgemeinschaft aufrechterhalten, welche beiden AM-Partnern Vorteile bringt.

### 1.1.1 Die Kolonisierung der Pflanzenwurzel in der AM-Symbiose

Die AM-Symbiose beginnt mit der sogenannten präsymbiotischen Phase in welcher ein Signalaustausch zwischen Pilz und Pflanze stattfindet (Parniske, 2008). Diese Erkennung stimuliert das Wachstum beider Symbiosepartner und führt folglich zu einem Zusammenreffen dieser an der Wurzeloberfläche (Raudaskoski & Kothe, 2015). Bei physischem Kontakt zwischen Pilzhyphe und Wirtspflanze, formt der Pilz eine geschwollene, verzweigte Struktur an der Wurzeloberfläche, das Hyphopodium. Dieser Kontakt löst eine Reaktion

der Pflanze aus, welche eine subzelluläre Struktur, den sogenannten Präpenetrations Apparat (PPA), in Epidermiszellen bildet (Genre *et al.*, 2005). Dieser wird als Kanal beschrieben, welcher die intrazellulären Hyphen durch die Wurzelzellen geleitet. Die Pilzhyphe penetriert nun die Epidermiszelle und wächst durch diese Zelle hindurch (Genre *et al.*, 2005). Die Integrität der Pflanzenzelle wird dabei nicht gestört, da zum einen die pflanzliche Plasmamembran invaginiert wird und zudem die perifungale Membran als Barriere fungiert (Bonfante, 2001). Letztendlich gelangt der Pilz durch intraradikales Wachstum bis in den inneren Kortex der Wurzel, wo er stark verzweigte Strukturen in den Kortexzellen bildet, die namensgebenden Arbuskeln (lat. *arbusculum* – Bäumchen). Auch diese werden durch PPA-ähnliche Strukturen begleitet, zudem konnte eine Vergrößerung des Nukleus beobachtet werden, was auf eine verstärkte Transkription hinweisen könnte (Genre *et al.*, 2008). Je nach Kombination von AM-Pilz und Wirtspflanze kann das



**Abbildung 1.1 Kolonisierungsverlauf der Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose (Arum-Typ).** Im Boden keimt eine Spore des AM-Pilzes aus. In der präsymbiotischen Phase kommt es zu einem Signalaustausch zwischen AM-Pilz und Wirtspflanze. Bei physischem Kontakt bildet der Pilz ein Hyphopodium aus, welches eine Migration des pflanzlichen Nukleus (blau) in Gang setzt. Die Bildung des Präpenetrations Apparats (PPA) (grün) zeichnet sich durch eine tubuläre Struktur aus Cytoplasma und Komponenten der Sekretionsmaschinerie aus. Dieser geleitet den Pilz durch die Zelle. Das intrazelluläre Wachstum findet durch Invagination der Plasmamembran und der Bildung einer perifungalen Membran statt. Charakteristisch für den Arum-Typ ist ein intrazelluläres Wachstum bis in den inneren Kortex. In Zellen des inneren Kortex werden Arbuskeln gebildet, stark verzweigte Hyphen mit einer extrem vergrößerten Oberfläche zum Nährstoffaustausch. Arbuskeln werden durch eine PPA-ähnliche Struktur begleitet und sind durch die periarbuskuläre Membran (PAM) vom pflanzlichen Cytoplasma getrennt.

intradikale Wachstum morphologisch als Arum- oder Paris-Typ beschrieben werden (Bonfante & Genre, 2008). Der Arum-Typ zeichnet sich durch ein interzelluläres Wachstum der Hyphen aus, welches in der Bildung eines Arbuskels endet (z. B. *Medicago truncatula* mit *Rhizophagus irregularis*). Für den Paris-Typ ist ein intrazelluläres Wachstum von Zelle zu Zelle sowie interkalare spiralförmige Hyphen (*coils*) und Arbuskeln charakteristisch (z. B. *Daucus carota* mit *R. irregularis*) (Genre *et al.*, 2008). Arbuskeln werden von der pflanzlichen periarbuskulären Membran (PAM) umgeben. Aufgrund ihrer extrem vergrößerten Oberfläche werden sie als Hauptort des Nährstoffaustausches beschrieben. Extraradikales Myzel, welches sich weit im Boden außerhalb der Wurzel verbreitet, dient zur Nährstoffaufnahme. Abbildung 1.1 zeigt den Verlauf einer Kolonisierung des Arum-Typs.

### 1.1.2 Molekulare Kommunikation in der AM-Symbiose

Auf molekularer Ebene läuft ein fein abgestimmter Dialog der Symbiosepartner ab, welcher die Aufgabe übernimmt diese auf den engen Kontakt während der AM-Symbiose vorzubereiten. In der Präsymbiotischen Phase sind pflanzliche Wurzelexsudate von Bedeutung, welche die Genexpression, die Keimung, die physiologische und mitochondriale Aktivität und die Verzweigung von AM-Pilzen stimulieren (Buee *et al.*, 2000; Tamasloukht *et al.*, 2003; Breuninger & Requena, 2004; Besserer *et al.*, 2006; Requena *et al.*, 2007; Besserer *et al.*, 2008; Besserer *et al.*, 2009). Die hierfür verantwortlichen diffusiblen Signale wurden als Strigolaktone (SLs) identifiziert (Akiyama *et al.*, 2005). SLs sind aus dem Carotenoid-Stoffwechsel abgeleitete Phytohormone mit zahlreichen Funktionen während der Sprossentwicklung (Al-Babili & Bouwmeester, 2015). Durch eine gesteigerte pilzliche Aktivität wird die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens der Symbiosepartner erhöht. So konnte eine reduzierte Infektion in *Pisum sativum ccd8*-Mutanten (*carotenoid cleavage dioxygenase 8*) festgestellt werden, welche in der SL-Biosynthese beeinträchtigt sind (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). Ein ähnlicher Phänotyp betreffend der AM-Kolonisation konnte in *Petunia hybrida* Mutanten festgestellt werden, welche eine Mutation des SL-Exporters PDR1 (*Pleiotropic Drug Resistance 1*) tragen und somit eine abnormale Verteilung der SLs aufweisen (Kretzschmar *et al.*, 2012). Weitere pflanzliche Signale stellen Cutin und aliphatische Monomere dar, welche positiv auf eine Infektion durch den AM-Pilz wirken. Eine Mutation in *RAM2* (*Reduced Arbuscular Mycorrhiza 2*), codierend für eine Glycerol-3-Phosphat-Acyl-Transferase, welche in der Cutin-Biosynthese fungiert, führt zu einer verminderten Hyphopodienbildung des AM-Pilzes (Gobbato *et al.*, 2012). *ram2*-Mutanten zeigen allerdings auch eine verminderte Kolonisierung durch die Pathogene *Phytophthora palmivora* und *Aphanomyces euteiches*, Cutinmonomere scheinen demnach ein generelles Signal in der Pflanzen-Mikroben Interaktion darzustellen und sind nicht spezifisch für die Ausbildung der AM-Symbiose (Wang *et al.*, 2012; Gobbato *et al.*, 2013).

Hinweise auf die Existenz diffusibler Signale von Seiten des Pilzes wurden bereits früh durch anatomische und transkriptionelle Änderungen in der Pflanze nach Behandlung mit pilzlichen Exsudaten bzw. räumlich getrennter Kultivierung der Symbiosepartner mit Hilfe einer durchlässigen Membran gesammelt. So konnten Kosuta *et al.* (2003) sowie Kuhn *et al.* (2010) differentielle Genexpression durch unbekannte pilzliche Signale beobachten. Zudem wurde mit einer verstärkten Bildung von Seitenwurzeln eine Veränderung der pflanzlichen Entwicklung durch diffusible pilzliche Signale beschrieben (Olah *et al.*, 2005). In Leguminosen kann man viele Parallelen zwischen dem genetischen Programm der AM-Symbiose und der Knöllchensymbiose mit stickstoffreduzierenden Bakterien, den Rhizobien, finden (Oldroyd, 2013). Die mit etwa 65 Millionen Jahren wesentlich jüngere Knöllchensymbiose, hat Komponenten des symbiotischen Programms der Arbuskulären Mykorrhiza rekrutiert, um eine erfolgreiche Symbiose mit ihren Wirtspflanzen eingehen zu können (Lum & Hirsch, 2003; Manchanda & Garg, 2007). Aufgrund der einfachen genetischen Manipulation von Rhizobien, konnten bereits vor langer Zeit sogenannte Nod-Faktoren als Schlüsselkomponenten des Signalaustausches identifiziert werden, welche den Infektionsverlauf und die Wurzelknöllchen-Organogenese in der Wirtswurzel steuern (Lerouge *et al.*, 1990; Lopez-Lara *et al.*, 1995; Denarie *et al.*, 1996; D'Haese & Holsters, 2002). Aufgrund der Annahme, dass putative Myk-Faktoren strukturelle Ähnlichkeit zu Nod-Faktoren aufweisen könnten, identifizierten Maillet *et al.* (2011) Lipochitooligosaccharide (LCOs), sogenannte Myc-LCOs, welche vom AM-Pilz *R. irregularis* sezerniert werden und auf die AM-Symbiose stimulierend wirken. Myc-LCOs bestehen aus einem Mix aus tetra- und pentamerischen LCOs, welche sulfatiert vorliegen können und eine N-acetylierte Fettsäure als Seitenkette aufweisen. Neben der Stimulierung des Wurzelwachstums und -verzweigung, führte eine Behandlung mit Myc-LCOs zu einer gesteigerten Infektionsrate und Wurzelkolonisierung in der AM-Symbiose (Maillet *et al.*, 2011). Zusätzlich konnten von Genre *et al.* (2013) kurzkettige Chitin Oligomere in pilzlichen Exsudaten identifiziert werden. Die Konzentration dieser wesentlich simpleren Moleküle (CO4 und CO5) wird durch Strigolaktone induziert, welche letztendlich AM-assoziierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in pflanzlichen Zellen auslösen (Genre *et al.*, 2013). Diese Chitin-basierten Moleküle scheinen jedoch nicht die einzigen Signale zu sein, die von der Wirtspflanze erkannt werden. Gutjahr *et al.* (2015) berichten von einem bisher nicht identifizierten Signalmolekül, welches über den Karrikin-Rezeptor Komplex mit DWARF14like und DWARF3 erkannt wird. Mutanten in diesem Signalweg besitzen einen sehr prägnanten AM-Phänotyp bei dem keine Hyphopodien ausgebildet werden (Gutjahr *et al.*, 2015). Ob das Signal pilzlichen Ursprungs ist oder eventuell durch den AM-Pilz induziert wird und einen pflanzlichen Ursprung besitzt, konnte anhand der bisherigen Ergebnisse nicht beantwortet werden.



### 1.1.3 Der gemeinsame SYM-Signalweg

Leguminosen, wie *M. truncatula* und *Lotus japonicus*, haben die Möglichkeit eine mutualistische Symbiose sowohl mit AM-Pilzen, als auch mit Rhizobien in Wurzelknöllchen einzugehen. Diese beiden Mikroben-Interaktionen weisen Parallelen in Morphologie, Signalaustausch und Signaltransduktion auf. So besitzen beide Symbiosen ähnlich aufgebaute Signalmoleküle, die Nod- bzw. Myk-LCOs (Maillet *et al.*, 2011). Des Weiteren erinnert der PPA in der AM-Symbiose anhand seines Aufbaus und seiner Funktion an den Infektionsschlauch der Wurzelknöllchensymbiose, welcher Rhizobien in das Wurzelinnere führt (van Brussel *et al.*, 1992; Genre *et al.*, 2005; Fournier *et al.*, 2008). Auf molekularer Ebene konnte mittlerweile eine große Zahl an pflanzlichen Genen identifiziert werden, die in beiden Interaktionen eine Rolle spielen. Eine Hypothese besagt, dass diese zentralen Proteine in einem linear angeordneten Signalweg fungieren, der letztendlich zur Ausbildung der jeweiligen Symbiose führt. Dieser Signalweg wird als Gemeinsamer Symbiose Signalweg (*common symbiosis signaling pathway* – CSSP) bezeichnet. Der CSSP beinhaltet die Signaltransduktion über Rezeptoren in das Zellinnere mit Hilfe gemeinsamer Proteine bis hin in den Nukleus. Im Zellkern spaltet sich der CSSP in charakteristische  $Ca^{2+}$ -Oszillationsmuster auf, welche letztendlich zur spezifischen Genexpression der Pflanzenzelle führt und somit die Akkomodation des jeweiligen Interaktionspartners gewährleistet. Einige dieser Proteine wurden durch Mutantanalysen entdeckt und als essentiell für die Ausbildung beider Symbiosen beschrieben (Catoira *et al.*, 2000; Kistner *et al.*, 2005).

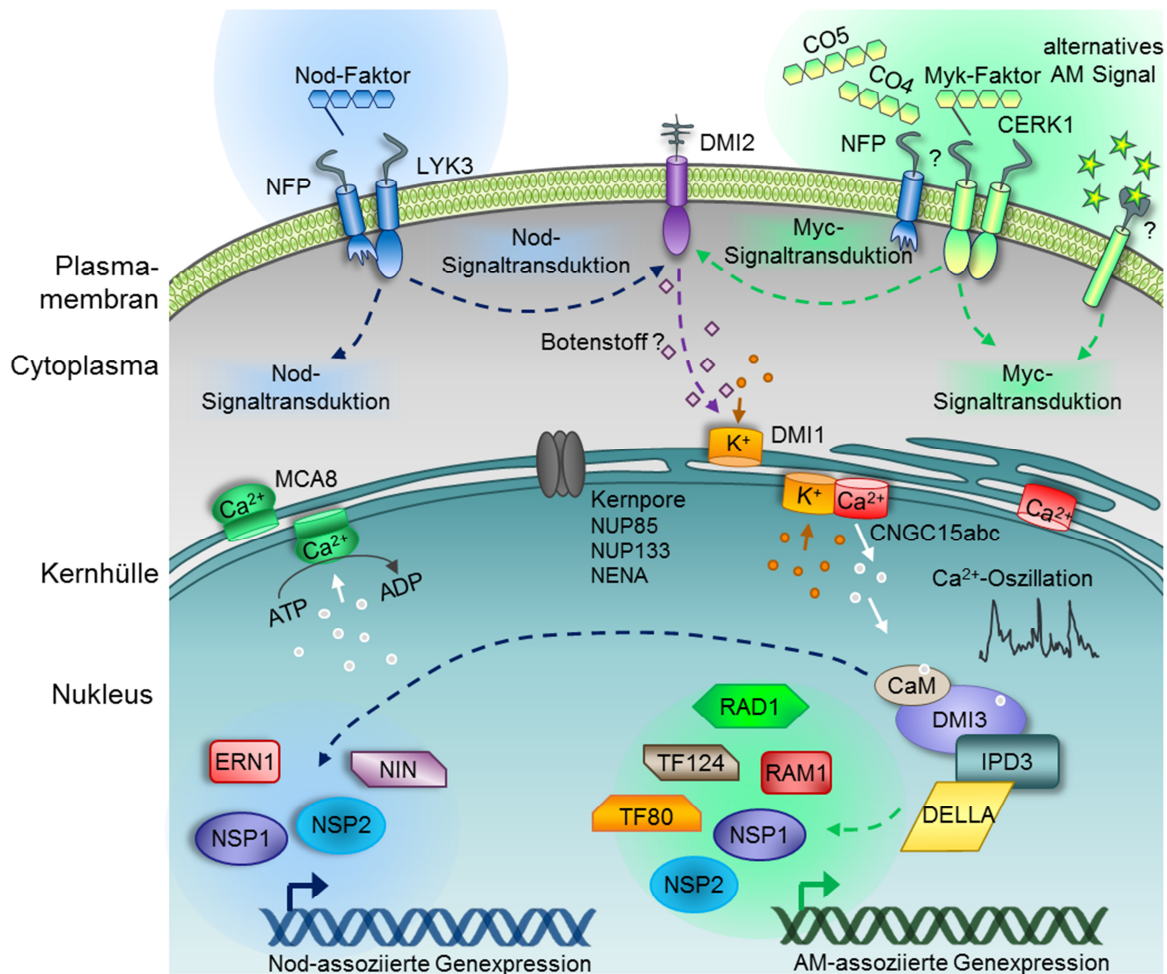
Signalmoleküle der Mikroben werden durch membranständige Rezeptoren, sogenannten LysM-Rezeptor-ähnlichen Kinasen, perzipiert und in das Zellinnere weitergeleitet. Bei der Rhizobien-Symbiose konnten in *M. truncatula* MtNFP (Nod-Factor Perception) und MtLYK3 (LysM domain Receptor-like Kinase 3) bzw. in *L. japonicus* LjNFR5 (Nod-Factor Receptor 5) und LjNFR1 als funktionelle dimere Rezeptorkomplexe zur Nod-Faktor Erkennung identifiziert werden (Amor *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006). Interessanterweise werden auch die strukturell ähnlichen Myc-LCOs der AM-Pilze durch MtNFP perzipiert und eine große Zahl an transkriptionellen Änderungen in der frühen Phase der Symbiose wird durch diese Erkennung vermittelt (Maillet *et al.*, 2011; Czaja *et al.*, 2012; Hohnjec *et al.*, 2015). Allerdings weisen *nfp*-Mutanten keinen AM-Phänotyp während der Kolonisierung auf (Amor *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu zeigen Mutanten der Rezeptoren MtLYK3 und LjNFR1 sowie dem Chitin-bindenden CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1), welches aus der Pathogenitätsabwehr bekannt ist, eine verminderte Kolonisierung, womit ihnen eine Rolle in der AM-Symbiose zugesprochen wurde (Miyata *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a). Da bisher noch keine LCO-Rezeptormutante zu einer Blockierung der AM-



Symbiose führte, lässt sich spekulieren ob es entweder eine Redundanz zwischen den Rezeptormolekülen gibt oder aber die Myc-LCO-Signaltransduktion eine präsymbiotische Kommunikation darstellt, die nicht essentiell für die Ausbildung der AM-Symbiose ist (Hohnjec *et al.*, 2015). In der Wurzelknöllchensymbiose bildet MtNFP mit MtLYK3 Dimere, bei der Pathogenitätserkennung bildet CERK1 mit CeBIP funktionelle Dimere, dementsprechend lässt sich vermuten, dass auch in der AM-Symbiose eine Dimerisierung mit einem bisher unbekanntem Rezeptormolekül zur Signalweiterleitung führt (Oldroyd, 2013). Durch direkte Affinitätsstudien konnte beispielsweise einem weiteren Rezeptor, MtLYR3 (LYK-related 3), eine Affinität zu Nod- und Myk-LCOs nachgewiesen werden (Fliegmann *et al.*, 2013). MtLYR3 interagiert mit MtLYK3 und diese Dimerisierung wird negativ durch LCOs beeinflusst, wodurch ein Mechanismus postuliert wurde, welcher eine Dimerisierung zwischen LYK3 und NFP unter nicht-symbiotischen Bedingungen verhindert (Fliegmann *et al.*, 2016).

Intrazellulär besitzen LysM-Rezeptor-ähnliche Kinasen gewöhnlich eine Kinasedomäne, welche für die Signalweiterleitung via Phosphorylierung verantwortlich ist. Das Signal wird sowohl bei der Knöllchen- als auch bei der AM-Symbiose auf das Membranprotein MtDMI2 (Does Not Make Infection 2) / LjSYMRK (Symbiosis Receptor-like Kinase) übertragen, welches eine funktionelle Rezeptor-ähnliche Kinase darstellt (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Yoshida & Parniske, 2005). Im Modell der linearen Signaltransduktion des CSSPs wird das Signal durch einen bisher unbekanntem Botenstoff von DMI2 zum Nukleus geleitet. Für drei putative Kernporen-Komponenten (LjNENA, LjNUP185 und LjNUP133) konnte in *L. japonicus* eine essentielle Funktion für nachfolgende Signalweiterleitung gezeigt werden (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2010). Durch Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum über die drei Zyklische-Nukleotid gesteuerten Ionenkanäle CNGC15a, b und c kommt es folglich im Nukleoplasma zu einer charakteristischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation, die sich zwischen AM- und Wurzelknöllchensymbiose unterscheidet (Capoen *et al.*, 2011; Charpentier *et al.*, 2016). Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal kommt durch das Zusammenspiel verschiedener Kanäle, welche in der Kernmembran lokalisieren zustande. MtDMI1 bzw. LjCastor und LjPollux dienen als  $\text{K}^+$ -Kanal, welche die Ladungsverhältnisse durch den raschen  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom ausgleichen indem sie  $\text{K}^+$ -Ionen in die Kernhülle pumpen (Ane *et al.*, 2004). Als Pendant für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation im Nukleus wurde der ATP-abhängige SERCA-Typ Ionen-Kanal MCA8 identifiziert, welcher am Ende jeden Ausschlags für die Wiederaufnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Kernhülle verantwortlich ist (Capoen *et al.*, 2011). Das Oszillationsmuster besitzt bei Rhizobien und AM-Pilzen unterschiedliche Amplitudenhöhen und Frequenzen, sodass davon ausgegangen wird, dass anhand dieses Unterschieds eine Spezifität für die weitere Signaltransduktion vermittelt werden könnte.

Im Nukleus wird das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch die Calcium- und Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Proteinkinase MtDMI3 / LjCCaMK decodiert (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2013). Eine *Gain of Function* (GoF) Mutation konnte zeigen, dass eine Aktivierung der CCaMK hinreichend ist um symbiotische Prozesse, wie die Bildung des PPAs oder die spontane Organogenese von Wurzelknöllchen auszulösen (Gleason *et al.*, 2006; Tirichine *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse implizieren die Idee,



**Abbildung 1.2 Der Gemeinsame Symbiose Signalweg der AM- und Wurzelknöllchensymbiose in *M. truncatula*.** Signalmoleküle der mikrobiellen Symbiosepartner werden durch membranständige Rezeptoren erkannt und lösen eine Signaltransduktion aus, welche letztendlich zur spezifischen Genexpression für die jeweilige Symbiose führt. Spezifische Wege der AM-Symbiose sind in grün, Wege der Knöllchensymbiose (Nod) in blau dargestellt. Bei der Knöllchensymbiose werden Nod-Faktoren durch die LysM-RLKs NFP und LYK3 perzipiert. Bei der AM-Symbiose spielen NFP, LYK3 und CERK1 eine Rolle bei der Signalerkennung. AM-spezifische Rezeptoren für Myk-Faktoren und Chitinoligomere (CO4/5) konnten bisher nicht identifiziert werden. Das Signal beider Symbiosen wird über DMI2 weiterverarbeitet. Bisher unbekannte Botenstoffe leiten das Symbiosesignal weiter in die Zelle bis hin zur Kernhülle. Auch den Kernporenproteinen NUP85, NUP133 und NENA konnte eine Rolle in beiden Symbiosen zugeordnet werden. Anschließend kommt es über die zyklische-Nukleotid gesteuerten Ionenkanäle CNGC15a-c zu einem Ausstrom an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Nukleoplasma. Dieser Ionenstrom wird durch die Kanalproteine DMI1 und MCA8 kompensiert. Je nach Symbiosepartner kommt es zu einer charakteristischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation im Nukleus. Dieses Signal wird durch die Calcium- und Calmodulin-abhängigen Proteinkinase DMI3 entschlüsselt, wodurch es zu einer Phosphorylierung des Interaktionspartners IPD3 kommt. IPD3 wiederum vermittelt eine spezifische Genexpression, welche zu der Etablierung der jeweiligen Symbiose führt. Diese fein abgestimmte Antwort wird durch die Bildung spezifischer Transkriptionsfaktor-Komplexe induziert.

dass die einzige Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation-auslösenden Signaltransduktion, die Aktivierung der CCaMK darstellt. Die Funktionsweise von MtDMI3 / LjCCaMK liegt wahrscheinlich in der Phosphorylierung seines Interaktionspartners MtIPD3 (Interaction Protein of DMI3) / LjCyclops (Messinese *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2011; Ovchinnikova *et al.*, 2011). Die Phosphorylierung dieses Kernproteins gipfelt letztendlich in der Regulation einer spezifischen Genexpression, die zur Etablierung der jeweiligen Symbiose führt (Oldroyd, 2013; Singh *et al.*, 2014). Eine schematische Darstellung des Signaltransduktionsweg in der Etablierung der AM- und Wurzelknöllchensymbiose ist in Abbildung 1.2 zu finden.

Der CSSP stellt eine vereinfachte Signaltransduktion dar, in dessen Verlauf bis dato einige Lücken vorhanden sind. In der Tat konnte bisher noch keine direkte Verbindung zwischen dem membranständigen Rezeptorkomplex und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation im Kern identifiziert werden. Dementsprechend wären neben einer linearen Signaltransduktion, wie es der CSSP postuliert, auch komplexere Signalwege denkbar, welche zu einer Etablierung der jeweiligen Symbiose führen. Eine Spezifität für den jeweiligen Symbionten könnte neben der Decodierung des charakteristischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals auch durch multiple parallele Signaltransduktionswege vermittelt werden, die unabhängig des CSSPs vorliegen und durch bisher unbekannte AM-Signale aktiviert werden (Bonfante & Requena, 2011). Hinweise darauf konnten durch Mutanten gesammelt werden, welche trotz fehlender CSSP-Komponenten eine Reaktion auf AM-Signale zeigen (Kosuta *et al.*, 2003; Olah *et al.*, 2005; Gutjahr *et al.*, 2009; Kuhn *et al.*, 2010). Da Rhizobien präferentiell durch eine Kolonisierung von Wurzelhaaren infizieren, AM-Pilze dagegen von Atrichoblasten, wäre auch eine zellspezifische Expression von Proteinen denkbar. Letztendlich würden spezifische Proteinkomplexe ausgebildet werden, je nach infizierter Zelle des Symbiosepartners (Charpentier & Oldroyd, 2013; Genre & Russo, 2016).

Die bisherigen Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass der CSSP zu einer Akkomodation des Symbiosepartners in den Epidermis- und Kortezellen führt. So konnte in *L. japonicus* die Initiation des PPAs durch eine *gain of function* (GoF) Mutante der CCaMK beobachtet werden, wodurch die Signalweiterleitung des CSSP mit der Bildung des PPAs verknüpft werden konnte (Takeda *et al.*, 2012). Für die Arbuskelentwicklung scheinen allerdings weitere Signalwege von Bedeutung zu sein, da einige Mutanten im CSSP zwar einen Defekt in der Kolonisation, aber dennoch vereinzelt reife Arbuskeln in Kortezellen aufweisen (Wegel *et al.*, 1998; Demchenko *et al.*, 2004; Kistner *et al.*, 2005; Groth *et al.*, 2010).

#### 1.1.4 Die Arbuskelentwicklung

Die Intention der AM-Symbiose ist der mutualistische Nährstoffaustausch der Symbiosepartner. Dieser Aufgabe widmen sich die Arbuskeln, welche durch eine starke dichotome

Verzweigung der Hyphen in Zellen des inneren Wurzelkortex und der Invagination der pflanzlichen Plasmamembran hervorgehen (Parniske, 2004). Eine interessante Besonderheit ist, dass es sich bei Arbuskeln um transiente Strukturen handelt und diese innerhalb einer Zelle nicht während der kompletten Interaktion erhalten bleiben. Je nach Wirtspflanze besitzen Arbuskeln eine unterschiedliche Lebensspanne von wenigen Tagen, welche sich durch die Entwicklung der reifen Arbuskel und ihrer anschließenden Degeneration auszeichnet (Alexander *et al.*, 1989). In der Modellpflanze *M. truncatula* handelt es sich um eine Zeitspanne von etwa acht Tagen (Javot *et al.*, 2007). Dementsprechend beherbergt eine Wurzel immer unterschiedliche Stadien von Arbuskeln nebeneinander und ist kontinuierlich damit beschäftigt die Formation neuer Arbuskeln zu ermöglichen.

Die symbiotische Grenzfläche, welche für den Austausch von Nährstoffen und Signalen überwunden werden muss, besteht aus den beiden Plasmamembranen sowie den Zellwänden beider Symbiosepartner. Für eine erfolgreiche Kolonisierung des AM-Pilzes ist eine lokale Auflockerung der pflanzlichen Zellwand erforderlich (Rich *et al.*, 2014). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der *in situ* Immunofärbung konnte die Existenz Zellwand-ähnlicher Substanzen im Zwischenkompartiment nachgewiesen werden (Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1983; Balestrini *et al.*, 2005). Der periarbuskuläre Raum, enthält molekular gesehen hauptsächlich Zellwandbestandteile pflanzlichen Ursprungs. Diese liegen nicht assembliert vor, es handelt sich um lose Polymere, wie Cellulose, Hemicellulose und Pectin, wodurch eine amorphe Struktur entsteht, welche dem Pilz eine intrazelluläre Proliferation ermöglicht (Gianinazzi-Pearson, 1996; Balestrini *et al.*, 2005; Balestrini & Bonfante, 2014). Da im Genom des AM-Pilzes *R. irregularis* ein stark vermindertes Repertoire an Zellwand-lytischer und -modifizierender Enzyme zu finden ist, scheint die Wirtspflanze selbst bei der Disassemblierung ihrer Zellwand zu partizipieren (Tisserant *et al.*, 2013).

Die biotrophe Lebensweise in der AM-Symbiose wird über die gesamte Kolonisation durch die PAM des Wirtes, welche die pilzlichen Arbuskeln umschließt, bewahrt (Balestrini & Bonfante, 2014). Neben einer enormen Oberflächenvergrößerung, ermöglicht diese spezialisierte symbiotische Grenzfläche, einen effizienten Nährstoffaustausch aufgrund ihrer besonderen Zusammensetzung (Cox & Sanders, 1974; Parniske, 2008). Die Bildung der symbiotischen Grenzfläche bei der Arbuskelentwicklung bedeutet für die Pflanzenzelle eine enorm gesteigerte *de novo* Synthese an Membranmaterial sowie von speziellen Membranproteinen, welche dem Signal- und Nährstoffaustausch in der AM-Symbiose dienen. Man unterscheidet hierbei zwischen dem Stamm (engl. *trunk*) und den feinen Verzweigungen der Arbuskeln. Zu den spezifischen AM-Proteinen zählt beispielsweise der Phosphattransporter MtPT4, welcher ausschließlich in der PAM der feinen Arbuskel-

verzweigungen lokalisiert und seiner Funktion, der symbiotischen Phosphataufnahme, ausschließlich in der AM-Symbiose nachgeht (Harrison *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel ist BCP1 (blue copper binding-like protein 1), welches ausschließlich am Arbuskelstamm lokalisiert, dessen Funktion aber bisher noch nicht aufgeschlüsselt werden konnte (Hohnjec *et al.*, 2005; Pumplin & Harrison, 2009).

Der Einbau von neuem Membranmaterial sowie die spezifische Proteinzusammensetzung der PAM wird über die Fusion von Vesikeln aus dem sekretorischen Weg reguliert (Bapaume & Reinhardt, 2012). Mittlerweile konnte spezifischen Komponenten des Exozytoseweges, welche eine AM-typische Expression und/oder Lokalisation aufweisen, eine Funktion in der AM-Symbiose zugeschrieben werden. So scheinen die SNARE-Proteine MtSYP132a, MtVAMP721d/e sowie LjVTI12, welche Vesikelfusionen mit einer Zielmembran vermitteln, essentiell für die Arbuskelentwicklung zu sein (Ivanov *et al.*, 2012; Lota *et al.*, 2013; Huisman *et al.*, 2016). EXO70I, ein Bestandteil des Exozytstkomplexes, lokalisiert an den feinen Arbuskelzweigen und scheint ebenfalls eine Funktion in der Arbuskelentwicklung einzunehmen (Zhang *et al.*, 2015b). Die *Petunia hybrida* Mutante *pam1* (*penetration and arbuscule morphogenesis 1*) sowie die Herunterregulation der Expression von *MtVapyrin*, einem EXO70I-interagierenden Protein, weisen ebenso Defekte in der Arbuskelentwicklung auf (Reddy *et al.*, 2007; Pumplin *et al.*, 2010). Aufgrund ihrer Proteinstruktur und Lokalisation wird beiden Proteinen innerhalb der AM-Symbiose eine Funktion im Vesikeltransport zugeschrieben. Pumplin *et al.* (2012) konnte durch Promotor *swapping* zeigen, dass während der Arbuskelbildung eine transiente Umorientierung des Vesikeltransports in Richtung der PAM stattfindet. So bestimmt die zeitliche Koordinierung der Proteinexpression von beispielsweise MtPT4, dass dieses in der PAM lokalisiert und nicht in der pflanzlichen Plasmamembran. Neuere Ergebnisse im Zusammenhang mit den vSNAREs MtSYP132a und b zeigen allerdings, dass es neben der Determination durch die zeitliche Regulation der Expression auch eine posttranskriptionelle Regulation der subzellulären Lokalisation geben muss (Huisman *et al.*, 2016). Letztendlich bestimmt ein Zusammenspiel verschiedener Regulationsebenen die komplexe Zusammensetzung der symbiotischen Grenzfläche.

### 1.1.5 Transkriptionelle Änderungen in der Arbuskelentwicklung

Eine der Regulationsebenen, welche die Bildung von Arbuskeln initiieren, stellt mit Sicherheit die Transkription dar. Vergleichende Transkriptomanalysen zwischen nicht-mykorrhizierten und mykorrhizierten Wurzeln zeigen eine enorme Umprogrammierung der pflanzlichen Transkriptionsmaschinerie im Laufe der AM-Symbiose (Liu *et al.*, 2003; Hohnjec *et al.*, 2005). Aufgrund der nicht-synchronisierten Natur der Arbuskelentwicklung, zeigen solche Studien die Gesamtheit aller veränderter Genexpressionen der Wurzelzellen, die sich in unterschiedlichen Stadien der Mykorrhizierung befinden. Dabei können

teilweise transkriptionelle Änderungen, die nur in bestimmten Zellen zu finden sind, übersehen werden. Inzwischen wurde die sogenannte Laser Capture Microdissection (LCM) zur Identifizierung von transkriptionellen Änderungen in bestimmten Zelltypen in der AM-Symbiose angewandt (Gomez *et al.*, 2009; Hogeckamp *et al.*, 2011; Gaude *et al.*, 2012a; Hogeckamp & Küster, 2013). Hierbei wird die Transkription spezifisch in Arbuskel-enthaltenden Kortezellen analysiert und mit anderen Stadien der AM-Symbiose, wie intraradikale Hyphen, und Kortezellen ohne Kolonisierung verglichen. Mit dieser räumlich aufgegliederten Analyse der Genexpression ist es möglich, Expressionsmuster von AM-Genen zu erstellen und jene zu identifizieren, welche möglicherweise in der Arbuskelentwicklung oder -erhaltung eine Funktion einnehmen. Eine funktionelle Klassifizierung der induzierten Gene in Arbuskel-enthaltenden Zellen zeigte vor allem Änderungen in Genen, welche Transportprozesse und den Lipidmetabolismus vermitteln (Gomez *et al.*, 2009; Gaude *et al.*, 2012a; Gaude *et al.*, 2012b; Gaude *et al.*, 2015). Eine weitere große Gruppe stellen Transkriptionsregulatoren dar, welche für die Umstrukturierung der pflanzlichen Zelle während der Akkommodation des AM-Pilzes und letztendlich für die Arbuskelentwicklung verantwortlich sind (Gomez *et al.*, 2009; Gaude *et al.*, 2012a; Hogeckamp & Küster, 2013). Mittlerweile konnte durch zellspezifische globale Transkriptomanalysen eine beachtliche Zahl sogenannter GRAS-Transkriptionsregulatoren identifiziert werden, welche eine Induktion ihrer Genexpression in arbuskulierten Zellen aufweisen (Gomez *et al.*, 2009; Hogeckamp *et al.*, 2011; Gaude *et al.*, 2012a; Xue *et al.*, 2015). Somit scheinen GRAS-Proteine nicht nur eine wichtige Rolle in der allgemeinen Entwicklung der Pflanze einzunehmen, sie spielen auch eine essentielle Rolle in der AM-Symbiose.

### 1.2 Die GRAS-Proteinfamilie – Regulatoren pflanzlicher Entwicklung

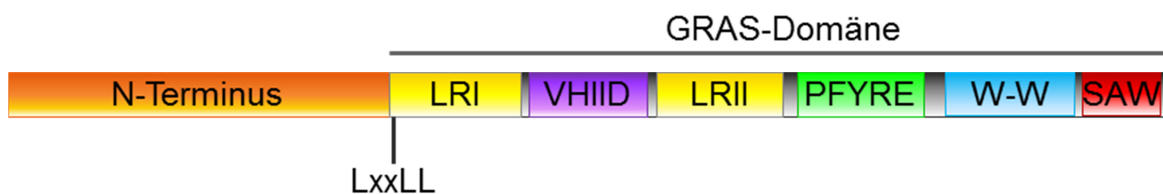
GRAS-Proteine stellen eine weit verbreitete Familie an Transkriptionsregulatoren im Pflanzenreich dar und sind aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen als Integratoren unterschiedlichster Entwicklungs- und Umwelteinflüsse für die Adaption pflanzlichen Wachstums verantwortlich (Tian *et al.*, 2004; Hirsch & Oldroyd, 2009). Namensgebend sind die ersten drei identifizierten Familienmitglieder GAI (*Gibberellin A Insensitive*), RGA (*Repressor of GA1*) und SCR (*SCARECROW*) (Di Lorenzo *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998).

#### 1.2.1 Phylogenie und Struktur der GRAS-Proteinfamilie

GRAS-Proteine weisen zueinander eine hohe Sequenzhomologie in ihrem C-terminalen Bereich auf, welcher als GRAS-Domäne bezeichnet wird. (Bolle, 2004). Diese Domäne besitzt charakteristische Motive, welche mehr oder weniger konservierte Aminosäurebereiche in einer bestimmten Reihenfolge aufweisen (Abb. 1.3). Zu Beginn der GRAS-Domäne



findet man häufig eine konservierte LxxLL Sequenz, an diese sich ein VHIID-Motiv anschließt, welches von zwei Leucin-reichen Bereichen umschlossen wird (Pysh *et al.*, 1999). Für diese Sequenzbereiche wurde bereits mehrfach gezeigt, dass sie eine Rolle bei Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen spielen (Gao *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; de Lucas *et al.*, 2008; Hirsch *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2010). Des Weiteren sind das PFYRE-Motiv, der Sequenzbereich W-W sowie am Ende der GRAS-Domäne das SAW-Motiv nennenswert (Pysh *et al.*, 1999; Bolle, 2015). Die hohe Konservierung der GRAS-Domäne deutet darauf hin, dass über den C-terminalen Bereich der Wirkungsmechanismus der Transkriptionsregulation von GRAS-Proteinen gesteuert wird. Der N-Terminus von GRAS-Proteinen kann dagegen sehr variabel sein und definiert meist die verschiedenen Unterfamilien (Bolle, 2004). Diese Variabilität spiegelt sich in den unterschiedlichen Funktionen von GRAS-Proteinen wider und legt nahe, dass der N-Terminus für die Spezifität der Regulation verantwortlich sein könnte (Tian *et al.*, 2004). Sun *et al.* (2012) postuliert einen intrinsisch ungeordneten Charakter der N-Termini. IDRs (*Intrinsically Disordered Regions*) ermöglichen es einem Protein viele verschiedene Interaktionspartner zu binden und ihre Faltung an diese spezifisch anzupassen (Uversky, 2010). Diese Eigenschaft würde GRAS-Proteine als Knotenpunkte (*hub proteins*) von Signalweiterleitungen qualifizieren, wodurch ihr funktioneller Polymorphismus erklärt werden könnte (Sun *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.3 Typischer Domänenbau von GRAS-Proteinen.** Der N-terminus von GRAS-Proteinen ist variabel und definiert die Unterfamilien. Konservierte Motive und Aminosäureabfolgen in der C-terminalen GRAS-Domäne sind u. a. LxxLL, LRI (Leucin-reich), VHIID, LR II, PFYRE, W-W und SAW. Diese Motive können, müssen aber nicht immer vorliegen (nach Bolle, 2015).

GRAS-Proteine kommen in allen höheren Pflanzen sowie auch in niederen, wie *Sellaginella moellendorffii* und *Physcomitrella patens*, vor (Yasumura *et al.*, 2007; Engstrom, 2011), nicht jedoch im Reich der Pilze oder Tiere. Ursprünglich wurde eine putative SH2 (*SCR-homology 2*)-ähnliche Domäne in GRAS-Proteinen entdeckt und eine Ähnlichkeit zu STAT Proteinen (*Signal Transducer and Activators of Transcription*) aus Metazoen postuliert (Peng *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2000). STATs werden durch extrazelluläre Faktoren, wie Cytokine, über die Phosphorylierung von Tyrosinresten aktiviert, wodurch eine Dimerisierung über die SH2-Domäne zustande kommt. Letztendlich werden so Umwelteinflüsse in die Signaltransduktion integriert und Zellwachstum sowie Proliferation reguliert (O’Shea *et al.*, 2015). Ein Jahrzehnt später gelang es Zhang *et al.* (2012) jedoch

durch verbesserte bioinformatische Sequenz- und Phylogenieanalysen GRAS-Proteine den Rossmann-gfalteten Methyltransferasen zuzuordnen. Diese Superfamilie stammt ursprünglich aus Bakterien, wo sie als S-Adenosylmethionin- (SAM-) abhängige Methyltransferasen fungieren, indem sie niedermolekulare Verbindungen methylieren. GRAS-Proteine in Pflanzen haben ihre SAM-Bindestelle und damit auch ihre Methyltransferaseaktivität verloren, weisen aber konservierte Aminosäurereste für die Substratbindung auf. Dies deutet darauf hin, dass pflanzliche GRAS-Proteine vermutlich niedermolekulare Substanzen binden könnten, wodurch ihr komplexer Regulationsmechanismus mit einer zusätzlichen Ebene erweitert werden würde (Zhang *et al.*, 2012). Diese *in silico* Strukturanalyse inklusive der Rossmann-Faltung konnte kürzlich durch die Kristallisation des GRAS-Proteins OsSCL7 (Scarecrow-like 7) aus *Oryzae sativa* bestätigt werden. Darüber hinaus konnte durch eine Dimerisierung von OsSCL7 eine Furchenbildung beobachtet werden, welche wahrscheinlich die Bindung an doppelsträngige DNA ermöglicht und somit eine transkriptionelle Regulation durch GRAS-Proteine wahrscheinlich macht (Li *et al.*, 2016).

Wie bereits erwähnt sind GRAS-Proteine in zahlreiche Entwicklungsprozesse involviert. Da überrascht es nicht, dass oft funktionale Verbindungen mit der Homöostase von Phytohormonen identifiziert werden konnten. Funktionell charakterisierte Proteine stammen aus den 10 Kladen LISCL, SILS, PhHAM, AtSCR, AtSHR, AtSCL3, DELLA, SCL4/7, OsDLT und MtRAM1, welche jeweils nach ihrem ersten Vertreter benannt sind. Strukturelle Homologe innerhalb einer Klade können auch, müssen aber nicht unbedingt, funktionelle Homologe sein.

### 1.2.2 GRAS-Proteine – Regulatoren der AM-Symbiose

In der AM-Symbiose konnten einigen Vertretern der GRAS-Familie eine Rolle in der Signaltransduktion nachgewiesen werden. GRAS-Proteine scheinen demnach eine wichtige Familie an Transkriptionsregulatoren darzustellen, welche für die enorme Umprogrammierung der Pflanzenzelle während der Etablierung und der Aufrechterhaltung der AM-Symbiose mitverantwortlich sind (Oldroyd, 2013). Im Folgenden werden alle aktuell identifizierten symbiotischen GRAS-Proteine und ihre Funktionen erläutert:

#### **NSP1 und NSP2 (Nodulation Signaling Pathway)**

NSP1 und NSP2 galten lange Zeit als spezifische GRAS-TFs in der Wurzelknöllchensymbiose. Bereits im Jahr 2000 wurde beschrieben, dass Mutationen von *NSP1*, welches in die PhHAM-Klade clustert, zu Defekten in der Wurzelknöllchensymbiose führt (Catoira *et al.*, 2000). Kurz darauf wurden Mutanten mit einem vergleichbaren Phänotyp charakterisiert und die Effekte auf Mutationen in *NSP2* zurückgeführt (Oldroyd & Long, 2003; Kaló *et al.*, 2005). Zu den pleiotropischen Effekten der Mutationen beider Gene zählt eine ver-



ringerte Reaktion auf Nod-Faktoren, welche sich in einer verringerten Expression von *MtENOD11* (Early Nodulin 11) und einer ausbleibenden Zellteilung der Kortezellen zeigte. NSP1 und NSP2 sind demnach notwendige Komponenten der Knöllchen-Morphogenese. Ein Phänotyp in der AM-Symbiose wurde damals nicht berichtet, folglich wurden NSP1 und NSP2 spezifisch der Signaltransduktion in der Wurzelknöllchensymbiose zugeordnet (Catoira *et al.*, 2000; Oldroyd & Long, 2003; Kaló *et al.*, 2005). Weitere Analysen zeigten eine funktionelle Konservierung beider GRAS-Proteine in *L. japonicus* und *O. sativa* (Heckmann *et al.*, 2006; Yokota *et al.*, 2010). Beide Proteine sind essentiell für Nod-Faktor induzierte transkriptionelle Änderungen (Kaló *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005). NSP1 und NSP2 können sowohl Homo- als auch Heterodimere miteinander bilden, darüber hinaus wurde gezeigt, dass NSP1 in Anwesenheit von NSP2 direkt an DNA, genauer an *ENOD*-Promotoren bindet (Hirsch *et al.*, 2009). Die Funktion des GRAS-Proteinpaars konnte durch Transkriptomanalysen auf die Regulation der SL-Biosynthese erweitert werden, welche auch in Nichtleguminosen wie Reis konserviert vorliegt und somit eine Wurzelknöllchensymbiose-unabhängige Funktion darstellt (Liu *et al.*, 2011).

Reevaluationen der *nsp*-Mutanten im Hinblick auf ihren Phänotyp in der AM-Symbiose deckten schließlich auf, dass beide Proteine eine quantitative Rolle in der pilzlichen Kolonisierung einnehmen, aber keinen direkten Effekt auf die Arbuskelentwicklung haben (Liu *et al.*, 2011; Maillet *et al.*, 2011; Delaux *et al.*, 2013; Takeda *et al.*, 2013). Dieses Ergebnis kann möglicherweise auf die defiziente SL-Biosynthese in den *nsp*-Mutanten zurückgeführt werden (Liu *et al.*, 2011), da die typische Wachstumsstimulierung von AM-Pilzen durch sekretierte SLs ausbleibt (Akiyama *et al.*, 2005). Zudem wurde durch vergleichende Transkriptomanalysen und Wurzelverzweigungsassays behandelter WT- und Mutantpflanzen gezeigt, dass neben der Nod- auch die Myk-LCO-Signaltransduktion teilweise von NSP1 und NSP2 abhängig ist (Maillet *et al.*, 2011; Camps *et al.*, 2015; Hohnjec *et al.*, 2015). Die GRAS-Proteine NSP1 und NSP2 wurden in den letzten Jahren intensiv studiert und konnten als essentiell in der Wurzelknöllchensymbiose und als Positivregulatoren der AM-Symbiose eingestuft werden.

### **RAM1 (Reduced Arbuscular Mycorrhiza 1)**

Auch auf RAM1 wurde man durch seinen symbiotischen Mutantenphänotyp in *M. truncatula* aufmerksam. So zeigten *ram1*-Mutanten laut Gobbato *et al.* (2012) keine Auffälligkeiten in der Knöllchensymbiose, aber bei einer Kolonisierung mit *Glomus hoi* oder *R. irregularis* Defekte in der Hyphopodienbildung. Dies wurde durch die direkte transkriptionelle Regulation von *RAM2* erklärt, welches, wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, in der Cutin-Biosynthese involviert ist (Gobbato *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Untersuchungen eines weiteren *ram1*-Allels *ram1-2* deckte einen Phänotyp in der Arbuskelentwicklung auf (Gobbato *et al.*, 2013). Zudem konnte eine Interaktion zwischen RAM1

und NSP2 beobachtet werden (Gobbato *et al.*, 2012). Folglich wurde RAM1 im AM-Signalweg parallel zu NSP1 eingeordnet und eine duale Rolle in der AM-Symbiose postuliert: früh, in der Hyphopodienbildung, und spät in der Arbuskelentwicklung (Gobbato *et al.*, 2012; Gobbato *et al.*, 2013). Die Untersuchung eines weiteren Mutantenallels in *M. truncatula*, *ram1-3*, parallel zu *ram1-1*, legt für RAM1 spezifisch eine Funktion in der Arbuskelverzweigung nahe, eine Auswirkung auf die Hyphopodienbildung konnte in dieser Studie hingegen nicht festgestellt werden (Park *et al.*, 2015). Eine konservierte Rolle von RAM1 in der Arbuskelentwicklung konnte durch Mutantanalysen auch in *L. japonicus* und *P. hybrida* bestätigt werden (Rich *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015; Pimprikar *et al.*, 2016).

Eine ausbleibende Induktion zahlreicher AM-Markergene in *ram1*-Mutanten lassen die Vermutung aufkommen, dass RAM1 ein zentraler Transkriptionsregulator der AM-Symbiose darstellt und direkt an der Expression dieser Gene beteiligt ist (Park *et al.*, 2015; Rich *et al.*, 2015; Pimprikar *et al.*, 2016). Darüber hinaus wurde durch eine Überexpression von *RAM1* in *M. truncatula* eine direkte Regulation von *RAM2* (Gobbato *et al.*, 2012), dem ABC-Transporter *STR* (*Stunted Arbuscule*) (Zhang *et al.*, 2010) und *EXO70I* (Zhang *et al.*, 2015b) gezeigt (Park *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse und die direkte Bindung von CYCLOPS an den *RAM1*-Promotor positionieren RAM1 unter dem Dimer CCaMK-CYCLOPS im CSSP (Pimprikar *et al.*, 2016). Die Tatsache, dass RAM1 den Arbuskelphänotyp von *cyclops* retten kann, nicht jedoch *ccamk*, deutet auf die komplexe Transkriptionsregulation während der AM-Symbiose hin und legt nahe, dass RAM1 ein wichtiger Knotenpunkt in der AM-Symbiose darstellt, es jedoch weitere RAM1-unabhängige Signalwege gibt (Pimprikar *et al.*, 2016). Dies wird zusätzlich deutlich, da RAM1 mit zwei weiteren GRAS-Proteinen interagieren kann, von denen TF80, nicht jedoch TF124, eine RAM1-abhängige Induktion während der AM-Symbiose erfährt (Park *et al.*, 2015)

### **RAD1 (Required for Arbuscule Development 1)**

LjRAD1 konnte von Xue *et al.* (2015) in einem Screening für AM-induzierte Transkriptionsfaktoren in *L. japonicus* identifiziert werden. Der Mutantenphänotyp von *rad1-1*, *rad1-2* und *rad1-3* deckte einen Defekt in der Arbuskelentwicklung auf, der sich in einer reduzierten Zahl und Größe dieser widerspiegelte. Ähnlich wie bei *ram1*, konnte auch in mykorrhizierten *rad1*-Mutanten eine reduzierte Expression von *STR*, *RAM2* und *PT4* gemessen werden. RAD1 formt Heterodimere mit den symbiotischen GRAS-TFs NSP2 und RAM1. Letztendlich wurde ein Modell vorgeschlagen, indem spezifische AM-induzierbare Gene durch die Bildung spezifischer Heterokomplexe, wie RAD1-RAM1 und RAD1-NSP2 reguliert werden (Xue *et al.*, 2015). Untersuchungen des RAD1-Homologs in *M. truncatula* von Park *et al.* (2015) bestätigten die Interaktion mit RAM1 und einen AM-Phänotyp, wenn

auch lediglich von einer verringerten Kolonisierung, die mit einer verringerten Markerexpression einhergeht, nicht aber von einem Defekt in der Arbuskelentwicklung berichtet wurde. Die Expression von *RAD1* kann durch RAM1 induziert werden, wobei auch in mykorrhizierten *ram1*-Mutanten eine geringe Induktion von *RAD1* beobachtet werden konnte, was auf einen parallelen RAM1-unabhängigen Regulationsweg hindeuten könnte (Park *et al.*, 2015).

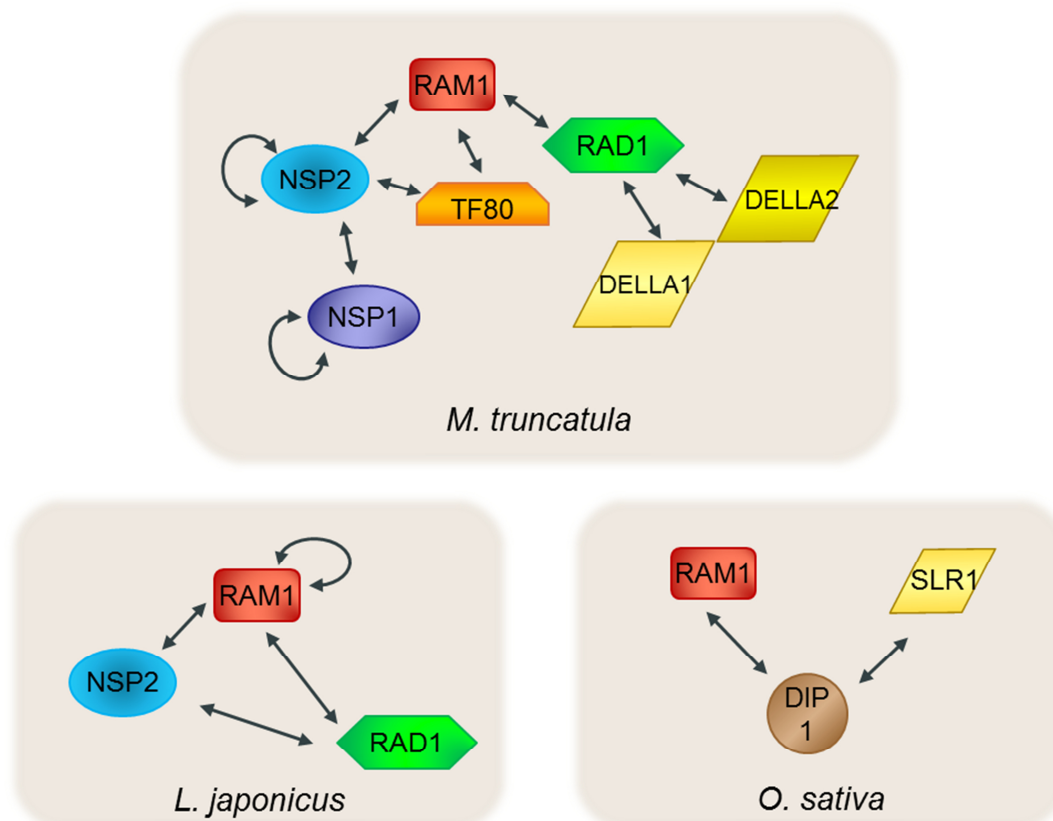
## DELLA

Erst seit 2013 wurde näher erörtert welche Rolle DELLA-Proteine in der AM-Symbiose spielen. So wurde von einer reduzierten Kolonisierung und einer verringerten Zahl an Arbuskeln in der *Pisum sativum* Doppelmutante *la/cry* berichtet (Foo *et al.*, 2013). In *M. truncatula* konnten von Floss *et al.* (2013) ähnliche Effekte beobachtet werden, woraufhin die Untersuchungen der DELLA-Proteine als Positivregulatoren der AM-Symbiose ausgeweitet wurden. *M. truncatula* besitzt wie *P. sativum* zwei kanonische DELLA-Proteine MtDELLA1 und MtDELLA2. In einem Screening mit einer RNA-Interferenz (RNAi)-Bibliothek konnten bei Herunterregulation der *DELLA*-Gene Defekte in der AM-Symbiose beobachtet werden. Die Doppelmutante *della1/della2* zeigt zwar eine normale Kolonisierung mit intraradikalen Hyphen, die Entwicklung von Arbuskeln ist jedoch je nach Nährstoff Konditionen drastisch reduziert oder komplett blockiert. Durch Überexpression eines dominanten DELLA-Proteins konnten die Kolonisierungsphänotypen von *Mtipd3* und *Ljyclops* gerettet werden, wodurch DELLA im CSSP unter diesen Komponenten platziert werden konnte. Die Autoren postulieren für DELLA-Proteine eine koordinierende Rolle zwischen Nährstoffstatus, pflanzlichem Wachstum und AM-Symbiose, um die Arbuskelentwicklung zu steuern (Floss *et al.*, 2013). Eine ektopische Überexpression des dominanten DELLA-Proteins  $\Delta 18DELLA1$  in *M. truncatula* führt zu einer Induktion der Genexpression der GRAS-Proteine *RAM1*, *RAD1*, *NSP1* und *NSP2* und der AM-assoziierten Gene *RAM2*, *EXO70I*, *STR*, *BCP1*, *SCP1*, *KPI106*, *SbtM1b* und *Vapyrin* (Park *et al.*, 2015; Floss *et al.*, 2016). Bei *RAD1*, *RAM2*, *STR* und *EXO70I* konnte diese Expression auf die DELLA-abhängige Induktion von *RAM1* zurückgeführt werden (Park *et al.*, 2015). Auf Proteinebene konnte eine Interaktion zwischen MtDELLA1/2 und MtRAD1 nachgewiesen werden (Floss *et al.*, 2016). Auch in *L. japonicus* wurden DELLA-Proteine im Hinblick auf ihre Rolle in der AM-Symbiose untersucht. Wie in *M. truncatula* induziert LjDELLA1 die Expression von *LjRAM1* und folglich weitere AM-Gene (Takeda *et al.*, 2015; Pimprikar *et al.*, 2016). Zudem konnte durch Pimprikar *et al.* (2016) die Bildung des Komplexes CCamK-CYCLOPS-DELLA1 gezeigt werden, welcher über CYCLOPS an den *RAM1*-Promotor bindet und direkt dessen Expression aktiviert. Die Autoren postulieren, dass DELLA während der AM-Symbiose durch CYCLOPS stabilisiert wird und daraufhin spezifisch AM-Gene aktiviert werden. In Reis findet man nur ein einziges DELLA-Protein,

SLENDER1 (SLR1), eine Überexpression von *SLR1* führte zu einer verstärkten Kolonisierung und folgerichtig findet man eine stark reduzierte Kolonisierung und Arbuskelbildung in der *slr1*-Mutante (Yu *et al.*, 2014).

#### DIP1 (DELLA Interaction Protein 1)

Yu *et al.* (2014) identifizierten DIP1 in *Oryza sativa* als Interaktionspartner des DELLA-Proteins SLR1 in einem Hefe Zwei-Hybrid (yeast two-hybrid – Y2H) Screening. Die Expression von *DIP1* wird während der AM-Symbiose induziert und eine Herunterregulierung seiner Expression resultierte in einer verringerten Mykorrhizierung. Zudem konnte eine Interaktion zwischen OsDIP1 und OsRAM1 beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass DIP1 ein weiteres GRAS-Protein mit einer Rolle in der AM-Symbiose darstellt und dass diese unweigerlich mit der Regulierung des GA-Signalweges verbunden ist (Yu *et al.*, 2014).



**Abbildung 1.4 Interaktionen zwischen GRAS-Proteinen in der AM-Symbiose.** Dargestellt sind bisher identifizierte Hetero- und Homodimerbildungen in *M. truncatula*, *L. japonicus* und *O. sativa* zwischen symbiotischen GRAS-Proteinen. MtNSP1-MtNSP1, MtNSP2-MtNSP2, MtNSP1-MtNSP2 (Hirsch *et al.*, 2009), MtRAM1-MtNSP2 (Gobbato *et al.*, 2012), MtRAM1-MtRAD1, MtRAM1-MtTF80, MtTF80-MtNSP2 (Park *et al.*, 2015), MtRAD1-MtDELLA1, MtRAD1-MtDELLA2 (Floss *et al.*, 2016), LjRAM1-LjRAM1, LjNSP2-LjRAM1, LjRAD1-LjNSP2, LjRAD1-LjRAM1 (Xue *et al.*, 2015), OsRAM1-OsDIP1, OsDIP1-OsSLR1 (Yu *et al.*, 2014).

### 1.3 Gibberelline – Phytohormone involviert in Wachstumsprozesse

Die massive Ertragssteigerung von Nutzpflanzen wie Weizen, Reis und Mais in der „grünen Revolution“ der 50er und 60er Jahre konnte durch die Einkreuzung ertragreicher

Sorten sowie hoher Mengen an Dünger und Pestiziden erreicht werden. Die Sprossachsen waren häufig zu schwach um die schweren Körner der ertragreichen Sorten zu stützen, wodurch zusätzlich Zwerg- bzw. Halbzwergsorten eingekreuzt wurden, welche eine kurze starke Sprossachse besitzen und unter der Last der Rispen und Ähren nicht mehr umknickten (Hedden, 2003). Später konnten die für den Zwergenwuchs verantwortlichen Allele *Rht-B1b* und *Rht-D1b* im Weizenkultivar Norin 10, *d8* in Mais sowie *sd1* in Reis, Komponenten des Gibberellinhaushaltes bzw. -signalweges zugeordnet werden (Robertson *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1999; Monna *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2002; Spielmeier *et al.*, 2002).

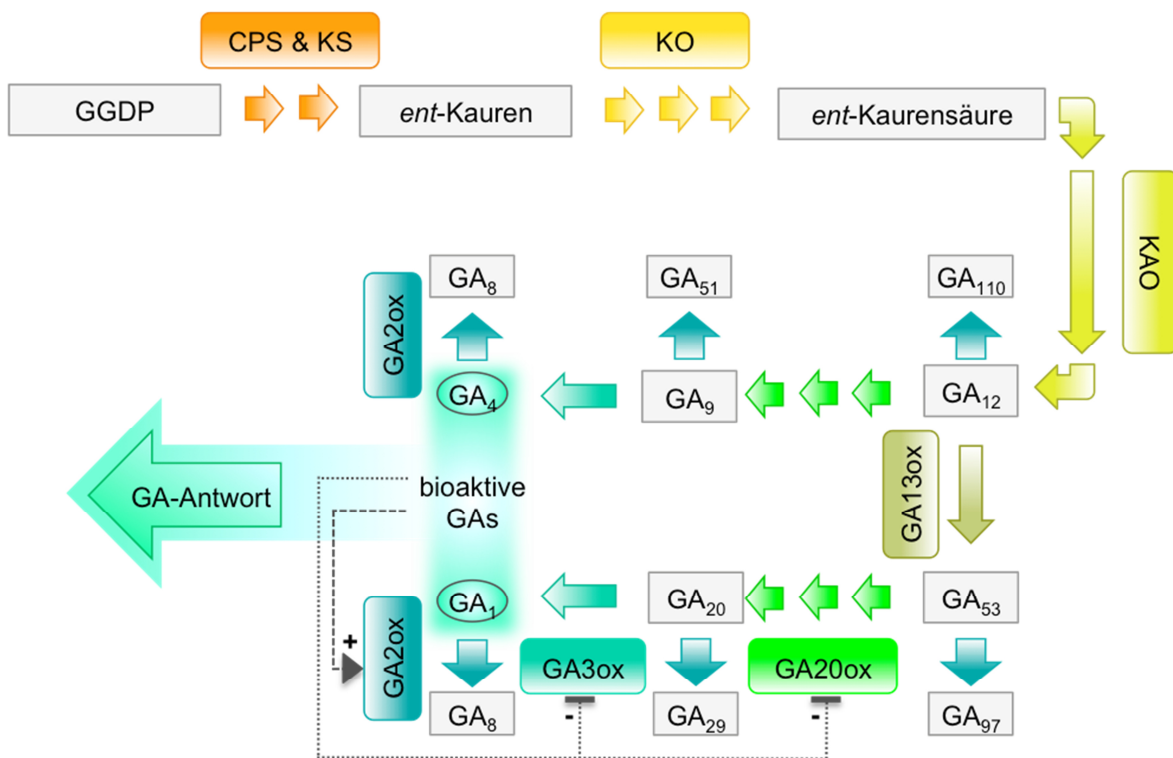
Die Gibberellinforschung begann bereits im 19. Jahrhundert in Japan wo die *bakanae*-Krankheit (jap. verrückte Keimlinge), durch exzessiv verlängerte Sprossachsen und Unfruchtbarkeit von Reispflanzen zu großen Ernteverlusten führte (Hori, 1898). Für diese Krankheitssymptome konnte eine Infektion mit dem Pilz *Fusarium fujikuroi* (Teleomorphe: *Gibberella fujikuroi*) verantwortlich gemacht werden (Sawada, 1912) und später konnte die aktive Verbindung Gibberelinsäure GA<sub>3</sub> aus dem Pilz isoliert werden (Yabuta, 1935; Curtis & Cross, 1954). 1958 wurde GA<sub>1</sub> aus der Feuerbohne *Phaseolus coccineus* extrahiert, wodurch bewiesen werden konnte, dass Gibberelline auch pflanzliche endogene Wachstumsfaktoren darstellen (MacMillan & Suter, 1958).

### 1.3.1 Gibberellin-Synthese und ihre Rückkopplungsmechanismen

Gibberelline sind tetrazyklische Diterpenoide und werden aus der Terpenoidbiosynthese abgeleitet. Die Synthese findet in höheren Pflanzen hauptsächlich in aktiv wachsenden Organen (Smith *et al.*, 1992) über den Methylerythritol-Phosphat-Weg (MEP-Weg) statt, aus welchem auch andere Isoprenoide wie Strigolaktone und Carotenoide stammen (Kasahara *et al.*, 2002). In Proplastiden wird aus *trans*-Geranylgeranyl-Diphosphat (GGDP) in einer zweistufigen Zyklisierung über *ent*-Copalyl-Diphosphat (CDP) ein C<sub>20</sub>-Grundgerüst, das flüchtige *ent*-Kauren (Otsuka *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2004). Verantwortlich hierfür in höheren Pflanzen sind die Enzyme *ent*-Copalyl-Diphosphat Synthase und *ent*-Kauren Synthase (Koornneef & van der Veen, 1980; Sun & Kamiya, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2004). Die Konversion zu Gibberellinen findet durch mehrere Oxidationsschritte am Endoplasmatischen Retikulum mit Hilfe membranassoziierten Cytochrom P450 Mono-Oxygenasen und löslichen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (ODDs) statt (Hedden, 1997; Helliwell *et al.*, 2001a; Helliwell *et al.*, 2001b; Morrone *et al.*, 2010). GA<sub>12</sub> wird als Vorläufer aller pflanzlichen GAs angesehen und letztendlich im Cytosol durch verschiedene ODDs, GA<sub>20</sub>- und GA<sub>3</sub>-Oxidasen (GA<sub>20</sub>ox und GA<sub>3</sub>ox), in sukzessiven Oxidationsschritten zu den bioaktiven GA<sub>1</sub> und GA<sub>4</sub> modifiziert (Lange, 1994; Phillips *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995; Hedden, 1997; Williams *et al.*, 1998; Hedden & Thomas, 2012). Durch eine mögliche Hydroxylierung von GA<sub>12</sub> zu GA<sub>53</sub>,

katalysiert durch eine GA13-Oxidase, spaltet sich die GA-Biosynthese in den 13-Hydroxylierungs- und den Nicht-13-Hydroxylierungs-Weg auf (Magome *et al.*, 2013). Für die fein abgestimmte Regulation des GA-Gehalts in der Pflanze zählt neben der Aktivierung ebenso die Deaktivierung von Gibberellinen. Eine mögliche Inaktivierung wird durch die Epoxidierung der Vorläufer oder aktiven GAs vermittelt (Zhu *et al.*, 2006). Zudem führt eine  $\beta$ -Hydroxylierung durch GA2-Oxidasen zur Konvertierung aktiver GAs in biologisch inaktive Verbindungen (Thomas *et al.*, 1999).

Zur Homöostase der Gibberelline zählen zudem Rückkopplungsmechanismen. Der Gehalt an physiologisch aktivem Gibberellin kontrolliert so die Transkription von Oxidasen. Anabole Oxidasen (GA20ox und GA3ox) unterliegen dabei häufig einer negativen, katabole (GA2ox) einer positiven Rückkopplung (Phillips *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995; Cowling *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999). Eine Zusammenfassung der GA-Biosynthese und ihrer Rückkopplungsmechanismen in der GA-Homöostase ist in Abb. 1.5 dargestellt.



**Abbildung 1.5 GA-Biosynthese und ihre Rückkopplungsmechanismen.** Ausgangsstoff der GA-Synthese stellt das Terpen Geranyl-Geranyl-Diphosphat (GGDP) dar, welches mit Hilfe der ent-Coplyl-Diphosphatsynthase (CPS) und der Kaurensynthase zu *ent*-Kauren umgeändert wird. Die *ent*-Kauren-Oxidase (KO) und *ent*-Kaurensäure-Oxidase sind verantwortlich für die Konversion zu GA<sub>12</sub>, dem Vorläufer aller Gibberelline. Eine Hydroxylierung am C13 durch eine GA13-Oxidase (GA13ox) kann GA<sub>12</sub> zu GA<sub>53</sub> umwandeln. In beiden Fällen sind anabole GA20- und GA3-Oxidasen in sukzessiven Oxidationsschritten verantwortlich für die Synthese bioaktiver GAs (GA<sub>1</sub> und GA<sub>4</sub>). Anabole Oxidasen unterliegen oft negativen Rückkopplungsmechanismen. Katabole Oxidasen (GA2ox) werden transkriptionell oft durch positive Rückkopplungsmechanismen reguliert und sind für die Inaktivierung von GA-Vorläufern und bioaktiven GAs zuständig. Biologisch inaktive GAs sind in grau, aktive in grün dargestellt.

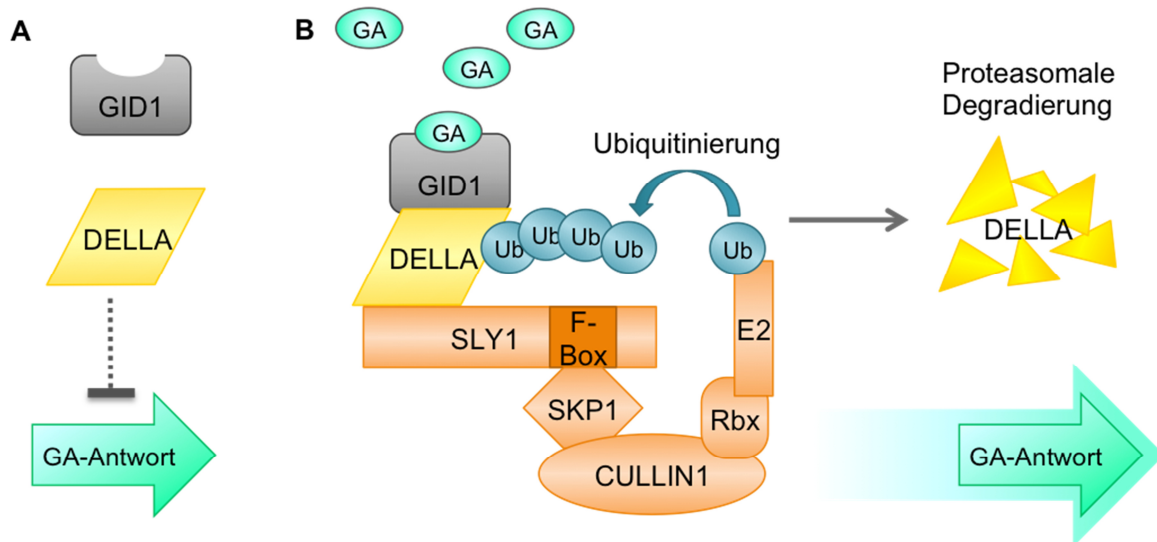
### 1.3.2 DELLA-Proteine – Inhibitoren der GA-Antwort

Bereits 1957 wurde für Gibberelline als Wirkmechanismus die Inhibierung eines endogenen Wachstumrepressors vorgeschlagen, wobei Harberd *et al.* (1998) diese ursprüngliche Idee von Brian (1957) aufgriffen und anhand der Analyse bereits veröffentlichter Mutantenstudien festigten. In der Tat konnte diese reprimierende Funktion durch Identifizierung der Mutationen in Zwergpflanzen den DELLA-Proteinen zugewiesen werden. So besitzt die *gai* Mutante in *A. thaliana* eine Deletion von 17 Aminosäuren im N-terminus, und stellt hierdurch ein DELLA-Protein mit GoF Mutation dar, welche eine Resistenz gegenüber der GA-vermittelten Degradierung aufweist, wodurch eine kontinuierliche Wachstumsrepression stattfindet (Peng *et al.*, 1997). Die GA-abhängige Degradierung von RGA, aus der gleichen Proteinfamilie, und dessen Stabilisierung durch eine ähnliche Deletion wie in *gai-GoF* bestätigte die Vermutung, dass die GA-Antwort durch Inhibierung dieser endogenen Repressoren zustande kommt (Dill *et al.*, 2001; Silverstone *et al.*, 2001). DELLA-Proteine stellen eine Unterfamilie der GRAS-Proteine dar und zeichnen sich durch die konservierten Motive DELLA und VHYNP im N-Terminus aus (Wen & Chang, 2002). Diese Motive sind essentiell für ihre GA-abhängige Degradierung, die Funktion als Wachstumsrepressor liegt dagegen im C-terminalen Bereich (Dill *et al.*, 2001). Hierdurch wird auch erklärt, dass GoF Mutationen von DELLA-Proteinen zu einer Repression der GA-Antwort und demnach zu Zwergenwuchs führen, dagegen eine *Loss of Function* (LoF) Mutation in einer konstitutiven GA-Signaltransduktion und damit in einem induziertem Wachstumsphänotyp (*slender*) resultiert (Ikeda *et al.*, 2002).

SLY1 (SLEEPY1) aus *A. thaliana* und GID2 (GA-Insensitive Dwarf 2) aus *O. sativa* sind Positivregulatoren der GA-Antwort und stellen beide F-Box Untereinheiten einer SCF E3 Ubiquitin Ligase dar, wodurch der Mechanismus der Ubiquitinierung für die GA-abhängige Degradierung der DELLA-Proteine in Frage kam (McGinnis *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003). Die Entdeckung des GA-Rezeptors OsGID1 (GA-Insensitive Dwarf 1) und seine Affinität zu ausschließlich biologisch aktiven GAs sowie seine GA-abhängige Interaktion mit dem DELLA-Protein OsSLR1 bestätigten diese Vermutung (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Die strukturelle Ähnlichkeit zu Hormon-sensitiven Lipasen wurde durch die Kristallstruktur des GA-GID1-Komplexes in *O. sativa* aufgelöst (Shimada *et al.*, 2008). Murase *et al.* (2008) konnten zudem durch die Kristallisation des ternären Komplexes eines bioaktiven GAs, dem GA-Rezeptor GID1a und der N-terminalen Domäne des DELLA-Proteins GAI aus *A. thaliana* ein strukturelles Modell für die hormonelle Signaltransduktion etablieren. Die Bindung des GAs führt zu einer Konformationsänderung des GA-Rezeptors, wodurch eine Interaktion mit dem DELLA-Protein über dessen DELLA- und VHYNP-Motive ermöglicht wird (Murase *et al.*, 2008). Diese Interaktion führt zur Bindung zwischen dem DELLA-Protein und dem F-Box-Protein SLY1, wodurch die Polyubiquitinierung und



anschließende Degradierung durch das 26S Proteasom vermittelt wird (Fu *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Letztendlich wird durch die Degradierung der DELLA-Proteine die GA-Antwort dereprimiert und folglich angeschaltet (Abb. 1.6).



**Abbildung 1.6 Modell der GA-GID1-vermittelten DELLA-Degradierung im GA-Signalweg. (A)** Ohne GA reprimieren stabile DELLA-Proteine die GA-Antwort auf Transkriptionsebene. **(B)** Bioaktives GA wird durch den GA-Rezeptor GID1 gebunden, wodurch eine Bindung der DELLA-Domäne ermöglicht wird. Der ternäre GA-GID1-DELLA-Komplex wird durch den SCF-Komplex erkannt und führt zur Polyubiquitinierung des DELLA-Proteins. Markierte DELLA-Proteine werden durch das 26S Proteasom degradiert. Die GA-regulierten Gene werden exprimiert und vermitteln die GA-Antwort. (nach Hauvermale *et al.*, 2012)

### 1.3.3 Die physiologische Wirkung von Gibberellinen

Mit Hilfe der DELLA-Proteine, seinen zahlreichen Interaktoren und dementsprechend auch zahlreichen Zielgenen wird die Entwicklung und das Wachstum der Pflanze durch die Präsenz endogener Gibberelline reguliert (Schwechheimer, 2012). Dabei werden sowohl externe Umwelteinflüsse, wie Licht, Temperatur, Salzstress oder biotischer Stress (Achard *et al.*, 2006; Achard *et al.*, 2007; de Lucas *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008; Stavang *et al.*, 2009) als auch endogene Signale in Form von Phytohormonen wie Jasmonat, Ethylen, Auxin, Brassinosteroide, Strigolaktone, Cytokinine und ABA integriert (Daviere & Achard, 2016). Die physiologische Auswirkung von Gibberellinen auf die Entwicklung von Pflanzen konnte anhand exogener Behandlung mit biologisch aktiven GA-Verbindungen und GA-Inhibitoren, teilweise in Kombination mit Mutanten, welche GA-insensitiv (GoF) oder GA-defizient sind (LoF), untersucht werden.

Gibberelline sind verantwortlich für diverse Effekte in der pflanzlichen Entwicklung, so konnte ein fördernder Einfluss von GAs auf die Hypokotyl-, Internodienelongation, Samenkeimung, Blütenentwicklung, Blattexpansion und Fruchtreifung beobachtet werden (Brian, 1959; Harberd *et al.*, 1998). Die prominenteste Wirkung in Pflanzen stellt die Elongation des Sprosses dar. Diese wird durch Internodienwachstum in Form von Zell-



elongation in Folge einer Relaxierung der Zellwand aber auch durch Zellproliferation vermittelt (Taylor & Cosgrove, 1989; Gupta & Chakrabarty, 2013). Auch die Expansion von Blättern ist sowohl auf eine Elongation, als auch auf eine Proliferation der Zellen zurückzuführen (Brian, 1954; Nelissen *et al.*, 2012). Zudem sind GAs notwendig für die Keimung von Samen in Abhängigkeit der herrschenden Licht-, Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse (Koornneef & van der Veen, 1980; Ogawa *et al.*, 2003). Auf das Wurzelwachstum wirkt GA auf den ersten Blick inhibierend, wodurch dem Phytohormon GA die Regulation des Spross-zu-Wurzel-Verhältnisses zugeordnet wurde (Stowe & Yamaki, 1957).

#### 1.3.4 Gibberelline in der Wurzelentwicklung und die verantwortlichen Mechanismen

Tanimoto verfasste zum Thema Gibberelline in der Wurzelentwicklung umfassende Studien, in denen er zeigen konnte, dass GAs auch für das Wurzelwachstum unverzichtbar sind (Tanimoto, 1988). Als Unterschied zur GA-Perzeption im Spross wird in der Wurzel allerdings eine wesentlich geringere Menge an aktiven GAs benötigt, um eine Elongation beobachten zu können (Tanimoto, 1994). Möglicherweise wird das Spross-zu-Wurzel-Verhältnis in Pflanzen über das endogene Niveau an GAs und/oder die unterschiedliche Sensitivität von Spross und Wurzel gegenüber der herrschenden GA-Konzentration determiniert (Tanimoto, 2012).

Auch auf molekularer Ebene wurde die Verbindung der Gibberelline zur Wurzelentwicklung untersucht. Durch Gewebe-spezifische Expression von *gai-GoF* konnten Ubeda-Tomás *et al.* (2008) der Endodermis eine kritische Rolle bei dem GA-abhängigen Wurzelwachstum zuordnen. In diesem Sinne wird die GA-abhängige Elongation der gesamten Wurzel als Organ in der Endodermis gesteuert, aber nur eine synchrone GA-Signaltransduktion in allen Gewebeschichten führt zu einem koordinierten Wurzelwachstum mit normaler Morphologie (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). Desweiteren konnte die beiden GRAS-Proteinen SHR und SCR für die radiale Strukturierung des Wurzelgewebes in *A. thaliana* verantwortlich gemacht werden (Cui & Benfey, 2009). Beide sind essentiell für die asymmetrische Zellteilung, aus der Endodermis und Kortex hervorgehen (Benfey *et al.*, 1993; Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000). SCR übernimmt mit der Negativregulation der Mittelkortex-Bildung eine weitere Rolle in der Wurzelreifung. Auch GA gilt als Negativregulator dieses Vorgangs, da beispielsweise GA-defiziente Bedingungen zu einer verfrühten Mittelkortexbildung führen (Paquette & Benfey, 2005). Der GA-Signalweg wird dabei durch ein weiteres GRAS-Protein, SCL3, spezifisch in der Endodermis integriert, dies gewährleistet eine Koordination von longitudinaler Zellelongation und -teilung (Heo *et al.*, 2011). SCL3 wirkt als Postivregulator der GA-Antwort, indem es die DELLA-Funktion abschwächt und bei der Mittelkortexbildung kooperativ mit SCR-SHR fungiert (Heo *et al.*, 2011). Letztendlich zeigt die gegensätzliche Funktion von SCL3 und

DELLA-Proteinen in der GA-Signaltransduktion, obwohl SCL3 ein direktes Zielgen von DELLA ist und eine Interaktion beider Proteine gezeigt werden konnte, die komplexe Regulation der GA-Antwort auf Transkript- und Proteinebene (Zhang *et al.*, 2011). Neben der Zellelongation und zeitlichen Regulierung der Mittelkortexbildung nimmt das Phytohormon Gibberellin auch eine fördernde Rolle bei der Zellproliferation in der Wurzel ein, konsistent hiermit reduzieren DELLA-Proteine die Größe des Wurzelmeristems (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### 1.3.5 Gibberelline als Negativregulatoren der Arbuskelentwicklung

In der Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose spielt Gibberellin eher eine negative Rolle. So führt eine exogene Behandlung mit GA zu einer verminderten bzw. völlig ausbleibenden Arbuskelentwicklung. Dieses Phänomen konnte in unterschiedlichen Pflanzen beobachtet werden: In *P. sativum* (El Ghachtouli *et al.*, 1996), den Leguminosen *M. truncatula* (Floss *et al.*, 2013) und *L. japonicus* (Takeda *et al.*, 2015) sowie in *Solanum lycopersicum* (Martin-Rodriguez *et al.*, 2015). Je nach verwendeter Konzentration an GA<sub>3</sub> findet man eine spezifische Unterdrückung der Arbuskelentwicklung, bei höheren Konzentrationen zusätzlich eine verringerte Kolonisierungsrate des AM-Pilzes (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Eine Unterdrückung des GA-Signalweges durch Behandlung mit GA-Biosynthese-Inhibitoren wirkten sich in Tomate positiv auf die Mykorrhizierung und Arbuskelentwicklung aus (Martin-Rodriguez *et al.*, 2015).

Kontroverserweise konnte in einer Transkriptomanalyse mit angereichertem Material inokulierter *M. truncatula* Wurzeln, welche sich im frühen AM-Stadium der Hyphopodien- und PPA-Bildung befanden, eine Induktion von Genen festgestellt werden, welche in der GA-Biosynthese fungieren (Ortu *et al.*, 2012). Auch in reiferen AM-Stadien zeigten Transkriptomanalysen in *S. lycopersicum*, *M. truncatula* und *L. japonicus* eine klare Induktion des GA-Metabolismus durch vermehrte Expression von anabolen GA-Biosynthesegenen, wobei auch immer eine Induktion von katabolen GA2-Oxidasen festgestellt werden konnte (Garcia-Garrido *et al.*, 2010; Floss *et al.*, 2013; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015). Die veränderte Genexpression mykorrhizierter Wurzeln deutete auf eine verstärkte GA-Synthese hin, welche durch Messung des endogenen GA-Levels bestätigt werden konnte, allerdings wurde auch ein vermehrtes Vorkommen von GA-Abbauprodukten quantifiziert (Shaul-Keinan *et al.*, 2002; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015).

Gibberelline scheinen in der AM-Symbiose durch ihre Biosynthese und Rückkopplungsmechanismen fein reguliert zu sein. Auf die Morphogenese von Arbuskeln haben Gibberelline einen negativen Einfluss, was auch durch die Schlüsselrolle der DELLA-Proteine in der Arbuskelentwicklung deutlich wird. Diese Antagonisten der GA-Antwort gelten als Positivregulatoren der AM-Symbiose (vgl. Abschnitt 1.2.2 GRAS-Proteine –

Regulatoren der AM-Symbiose: DELLA). Da Gibberelline zudem grundlegende Entwicklungsprozesse in der Pflanze steuern, ist vermutlich besonders während der AM-Symbiose eine strenge Regulation der GA-Homöostase erforderlich.

## 1.4 Zielsetzung

Bei der Kolonisierung im Zuge der AM-Symbiose kommt es zu einer Akkomodation des AM-Pilzes, welche durch eine massive Umstrukturierung der Wirtspflanze realisiert wird. Diese Aufgabe wird durch die transkriptionelle Umprogrammierung der Wirtspflanze mit Hilfe spezifischer Aktivierung pflanzlicher Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Besonders markant ist die große Zahl an GRAS-Proteinen, welche zur Etablierung der AM-Symbiose beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist es neue GRAS-Proteine in *M. truncatula* zu identifizieren und potenzielle AM-assoziierte Proteine hinsichtlich ihrer biologischen Rolle in der Symbiose zu charakterisieren. Neben Transkriptionsstudien *via* qPCR-Analyse und Promotorreporter, sollen Änderungen der Transkriptmenge Aufschluss über eine Funktion während der AM-Symbiose liefern. Hierzu wird die Transkriptmenge des ausgesuchten GRAS-TFs durch Herunterregulierung per RNAi bzw. Überexpression abgeändert und die resultierenden Wurzeln hinsichtlich ihrer Kolonisierung bzw. Morphologie untersucht. Um den Wirkmechanismus des GRAS-Proteins zu adressieren, sind zum einen *in silico* Analysen bezüglich der phylogenetischen Beziehung und konservierten Proteinstrukturen geplant und zum anderen Methoden, die eine Funktionsweise als TF stützen können. Da bereits zahlreiche Interaktionen innerhalb der Familie der GRAS-Proteine gezeigt werden konnten, sind Interaktionsstudien mit anderen AM-assoziierten Familienmitgliedern geplant.

Neben der transkriptionellen Umprogrammierung konnten auch Änderungen des GA-Metabolismus während der AM-Symbiose beobachtet werden. In dieser Arbeit soll zusätzlich die Rolle des Phytohormons Gibberellin in der Entwicklung der Modellpflanze *M. truncatula* und der Symbiose mit dem AM-Pilz *R. irregularis* thematisiert werden. Hierzu werden exogene Behandlungen mit GA<sub>3</sub> oder PAC durchgeführt. Überdies werden Mutanten im GA-Signalweg hinsichtlich ihrer Morphologie und Wurzelentwicklung analysiert.

Untersuchungen im Zuge dieser Arbeit sollen dazu beitragen die biologische Rolle der GRAS-Proteine in der AM-Symbiose und die Verbindung zum GA-Signalweg weiter aufzuschlüsseln.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Identifizierung neuer GRAS-Proteine in der AM-Symbiose

Während der Etablierung der Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose kommt es zu einem Signalaustausch zwischen den Symbiosepartnern, welcher unter anderem der Umprogrammierung und Reorganisation der Pflanze dient, um diese auf die Kolonisierung vorzubereiten. Dies zeigt sich in der massiv veränderten Regulation der Transkription in der gesamten Wurzel und letztendlich in den arbuskulierten Zellen (Liu *et al.*, 2003; Hohnjec *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2009; Kuhn *et al.*, 2010; Hogeckamp *et al.*, 2011; Gaude *et al.*, 2012a; Hogeckamp & Küster, 2013). Obwohl in der Vergangenheit viele Transkriptionsfaktoren in der AM-Symbiose identifiziert werden konnten, ist noch nicht vollkommen aufgeklärt wie letztendlich diese Änderungen hervorgerufen werden. Eine große Familie an Transkriptionsregulatoren, die eine Rolle in der AM-Symbiose spielen, ist die GRAS-Proteinfamilie. Sieben GRAS-TFs konnten bisher eine explizite Rolle in der AM-Symbiose mit *M. truncatula* als Wirtspflanze zugeschrieben werden: RAM1 (Gobbato *et al.*, 2012), NSP1 (Delaux *et al.*, 2013), NSP2 (Maillet *et al.*, 2011), den DELLA-Proteinen DELLA1 und DELLA2 (Floss *et al.*, 2013), DIP1 (Yu *et al.*, 2014) und RAD1 (Park *et al.*, 2015). Aufgrund der großen Zahl an annotierten GRAS-TFs in *M. truncatula* von 75 putativen Proteinen (Song *et al.*, 2014), kann man vermuten, dass noch weitere GRAS-Proteine eine Funktion in der AM-Symbiose übernehmen könnten.

Zur Identifikation neuer GRAS-Proteine in *M. truncatula* wurde eine *in silico* BLASTp-Suche mit den Suchsequenzen RAM1, NSP1 und NSP2 durchgeführt. Identische Sequenzen wurden manuell herausgefiltert. Mit RAM1 als Suchsequenz konnten 78 GRAS-Sequenzen identifiziert werden, mit NSP1 48 und mit NSP2 77 Proteinsequenzen (Anhang 1). Da diese Zahlen die Zahl von 75 Proteinen in *M. truncatula* teilweise übersteigen, kann davon ausgegangen werden, dass einige Einträge auf dasselbe Gen zurückzuführen sind. Tabelle 2.1 zeigt eine Auswahl der gefundenen GRAS-Proteine und ihre jeweilige Identität zu RAM1, NSP1 und NSP2. Diese Auswahl beinhaltet publizierte AM-assoziierte GRAS-TFs sowie Gene, welche laut ihres Expressionsmusters im *M. truncatula* Expressionsatlas (MtGEA) während der AM-Symbiose verstärkt exprimiert werden.

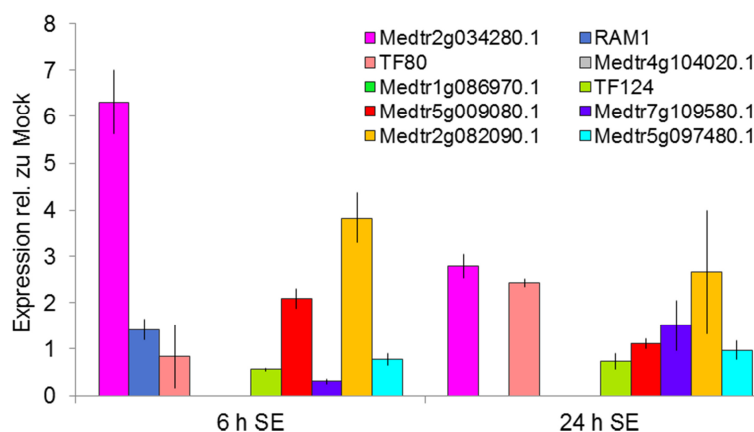
Eine Regulationsebene für die Aktivierung von Proteinen in einem speziellen Entwicklungsstadium stellt die Transkriptionsebene dar. Um festzustellen ob die identifizierten GRAS-Gene eine Rolle in der Etablierung der AM-Symbiose einnehmen könnten, wurde getestet ob diese Gene durch Inkubation mit Sporenextrakt (SE) des AM-Pilzes *R. irregularis* eine verstärkte Transkription erfahren. Hierzu wurden Sporen aus Halbplatten mit

**Tabelle 2.1 Ausgewählte Proteine des BLASTp mit RAM1, NSP1 und NSP2 als Suchsequenz.** In der Tabelle sind v. l. n. r. die Gennummer bzw. der Name, die Identität zur jeweiligen Suchsequenz (RAM1, NSP1 und NSP2) in %, eine Angabe, ob dieses Gen in den SE-Assay inkludiert wurde und falls vorhanden eine Referenz angegeben.

#	Name	Identität [%] zu			SE-Assay	Referenz
		RAM1	NSP1	NSP2		
1	DELLA1	40,594	24,121	32,048	nein	Floss <i>et al.</i> (2013)
2	Medtr1g069725.1	35,128	24,324	30,858	nein	
3	Medtr1g086970.1	28,535			ja	
4	Medtr2g082090.1	34,592	25,313	32,071	ja	
5	Medtr2g089100.1	28,261	25,728	28,571	nein	
6	Medtr5g009080.1	43,624	25,269	28,992	ja	
7	Medtr5g097480.1	35,798	25,373	29,177	ja	
8	Medtr7g109580.1	29,723		26,341	ja	
9	Medtr2g034280.1	29,703		26,768	ja	Diese Arbeit
10	Medtr2g034260.1	30,296	20,631	27,250	ja	Diese Arbeit
11	Medtr2g034250.1	31,514		26,700	ja	Diese Arbeit
12	NSP1	23,399	100		nein	Smit <i>et al.</i> (2005)
13	NSP2	37,101		100	nein	Catoira <i>et al.</i> (2000); Kaló <i>et al.</i> (2005)
14	RAD1	41,604		30,958	ja	Park <i>et al.</i> (2015)
15	RAM1	100	23,301	35,731	ja	Gobbato <i>et al.</i> (2012)
16	TF124	40,863	22,169	31,685	ja	Park <i>et al.</i> (2015)
17	TF80	30,140	22,727	24,374	ja	Park <i>et al.</i> (2015)

*R. irregularis* kolonisierten *Daucus carota*-Wurzeln isoliert, gemörsert und in dH<sub>2</sub>O gelöst. *M. truncatula* Pflänzchen wurden anschließend mit diesem SE inkubiert und nach zwei verschiedenen Inkubationszeiten geerntet (6 h und 24 h). Die Expression spezifischer Gene wurde per qPCR in den Wurzeln ermittelt. Eine Induktion wurde bei einer mindestens 2-fachen Transkriptmenge gegenüber der Mock-Behandlung angenommen.

Vier der getesteten Gene zeigten eine spezifische Induktion ihrer Transkriptmenge innerhalb des SE-Assays (*Medtr2g034280.1*, *Medtr3g022830.1*, *Medtr5g009080.1* und *Medtr2g082090.1*; Abb. 2.1). Die Analyse von 6 h inkubierten Pflänzchen zeigte eine sechsfache Induktion der Genexpression von *Medtr2g034280.1*. Eine zweifache Induktion wurde von *Medtr5g009080.1* und eine vierfache von *Medtr2g082090.1* beobachtet.

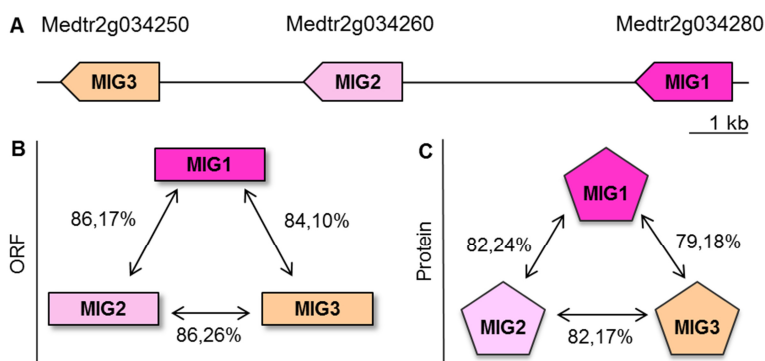


**Abbildung 2.1 Expressionsanalyse verschiedener GRAS-Gene nach Behandlung mit Sporenextrakt.** Wurzeln von vier 10 d alten Wildtyp *M. truncatula* Pflänzchen wurden 6 h bzw. 24 h mit Mock- oder SE-Lösung inkubiert. Die Expression ausgewählter GRAS-Gene wurde durch qPCR analysiert und auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Dargestellt ist die Expression rel. zur Mock-Behandlung. (Fehlerbalken entsprechen SD).

Eine 24-stündige Behandlung mit SE bewirkte eine abgeschwächte Induktion von *Medtr2g034280.1* und *Medtr2g082090.1* auf etwa 2,5-fach verglichen zur Mock-Kontrolle. *Medtr009080.1* zeigte keine Induktion nach 24 h. Das Gen *TF80* zeigte ausschließlich nach 24 h eine erhöhte Transkriptmenge. *Medtr2g034280.1* zeigte die stärkste Induktion bei beiden getesteten Zeitpunkten, weshalb dieses Gen für detailliertere Untersuchungen ausgewählt wurde.

## 2.2 Die duplizierten MIGs – Mykorrhiza Induzierte GRAS-Proteine

Eine genauere Untersuchung der genomischen Umgebung von *Medtr2g034280* deckte zwei Genduplikation auf, welche in Tandemorientierung auf Chromosom 2 lokalisieren (Abb. 2.2 A). Eine Expressionsanalyse dieser Gene mit Hilfe des *M. truncatula Gene Expression Atlas* (MtGEA) zeigte für alle drei Gene *in silico* eine Induktion während der AM-Symbiose. Dementsprechend wurden diese Gene Mykorrhiza Induzierte GRAS (*Mykorrhiza Induced GRAS*; *MIG1*, *MIG2* und *MIG3*) genannt. Die MIGs weisen eine sehr hohe Homologie sowohl auf Nukleotidebene im ORF, als auch auf Aminosäureebene (AS-Ebene) in der Proteinsequenz untereinander auf (Abb. 2.2 B und C). Auf Nukleotidebene liegt ihre Identität bei durchschnittlich 85,51 %, auf Proteinebene bei 81,2 %. Das in der Mitte gelegene Gen *MIG2* weist dabei die stärkste Homologie zu den beiden anderen auf. Die außen lokalisierten Gene *MIG1* und *MIG3* besitzen im Vergleich dazu eine leicht abgeschwächte Homologie zueinander.



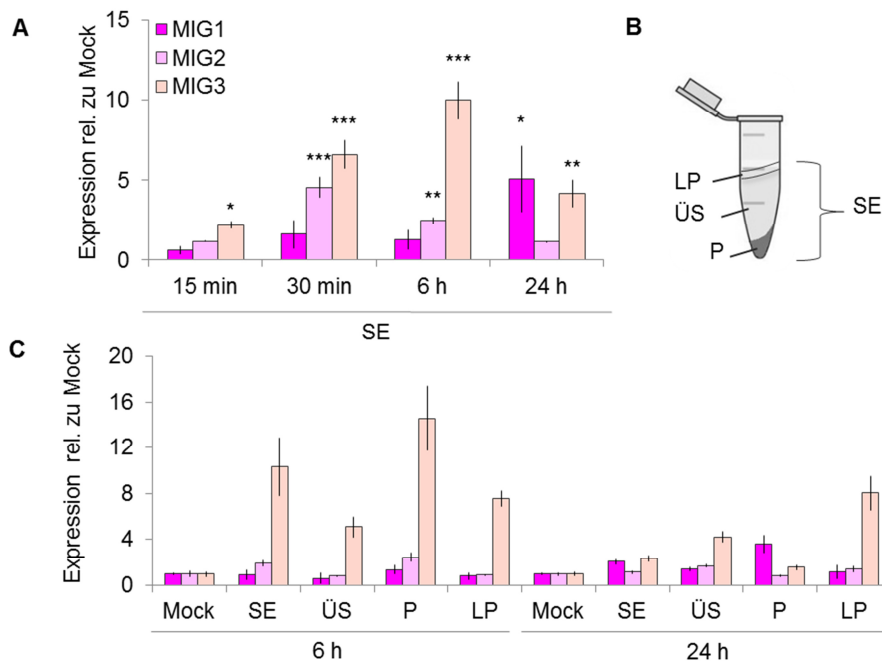
**Abbildung 2.2 Orientierung und Homologie der Genduplikationen *MIG1*, *MIG2* und *MIG3*.** (A) Die drei *MIGs* lokalisieren in Tandemorientierung auf Chromosom 2. Darstellung mit Maßstab. Auf Nukleotidebene haben die *MIGs* in ihren ORFs eine Identität zueinander von durchschnittlich 85,51 % (B), auf AS-Ebene durchschnittlich 81,2 % (C).

Aufgrund der hohen Homologie der *MIG*-Gene untereinander wurden mit den verwendeten qPCR-Primern bei der Expressionsanalyse des SE-Assays wahrscheinlich alle drei Genduplikationen amplifiziert (Abb. 2.1). Für eine Wiederholung der Transkriptquantifizierung wurden neue Primer entworfen, welche im weniger homologen Bereich des 3'-UTRs binden und dadurch eine höhere Spezifität bei der qPCR aufweisen. Es wurden zusätzlich zwei frühere Zeitpunkte der SE-Behandlung bei der Transkriptquantifizierung eingeschlossen (15 min und 30 min). Alle drei *MIG*-Gene zeigten eine Induktion ihrer Expression durch SE-Behandlung (Abb. 2.3 A). Dabei waren allerdings Unterschiede in



Ausprägung und Zeitpunkt festzustellen. Während *MIG1* eine 5-fache Induktion spezifisch nach 24 h aufwies, zeigte *MIG2* bereits einen Anstieg nach 30 min Behandlung, welche sich nach 6 h etwa halbierte. *MIG3* lag dagegen bei allen getesteten Zeitpunkten induziert vor, mit einem Maximum von zehnfach nach 6 h SE-Behandlung.

Eine Fraktionierung des SEs durch Zentrifugation teilte diesen in lipidische Phase (LP), wässriger Überstand (ÜS) und unlösliches Pellet (P) auf (Abb. 2.3 B). Eine Behandlung von *M. truncatula* Pflänzchen mit den Fraktionen sowie dem ursprünglichen SE und einer Kontrolle (Mock) mit den zwei Zeitpunkten 6 h und 24 h resultierte darin, dass alle drei *MIG*-Gene am stärksten durch die Pellet-Fraktion induziert wurden (Abb. 2.3 C).

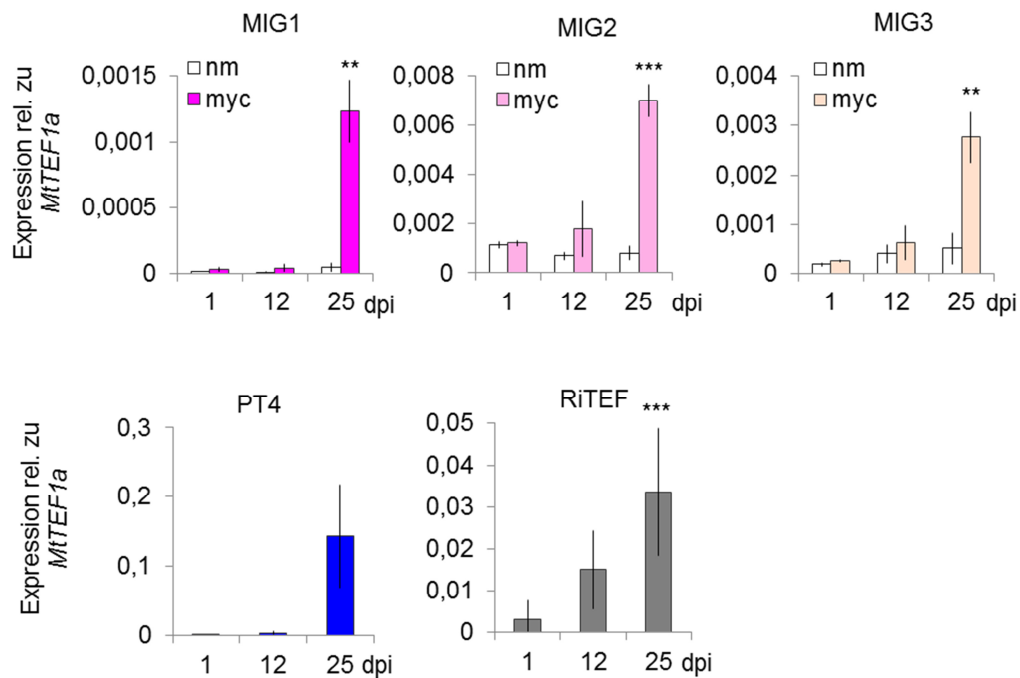


**Abbildung 2.3 Expression von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* nach Behandlung mit SE.** Die Wurzeln von vier 10 d alten *M. truncatula* Pflanzen wurden 15 min, 30 min, 6 h und 24 h mit SE oder Mock bzw. 6 h und 24 h mit SE-Fractionen behandelt. Expression der Gene *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* wurden per qPCR ermittelt und zum Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. **(A)** Expression in SE-behandelten Proben. Alle drei *MIG*-Gene zeigten eine Induktion. n = 3. **(B)** Schematische Darstellung der Fraktionierung des SEs (Überstand = ÜS, Pellet = P, Lipidphase = LP). **(C)** Expression in Proben inkubiert mit den SE-Fractionen. Alle *MIG*-Gene hatten die stärkste Resonanz bei Behandlung mit der Pellet-Fraktion. n = 2. (Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

Nachdem eine Induktion der *MIG*-Gene durch SE-Behandlung festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese Gene auch in der natürlichen Umgebung einer etablierten AM-Symbiose eine Induktion erfahren. Hierfür wurde die Expression in mykorrhizierten Wurzelproben von Wildtyp *M. truncatula* Pflanzen gemessen. Diese stammten aus einer Mykorrhizierung im Halbplattensystem mit dem AM-Pilz *R. irregularis* und wurden 1, 12 und 25 d nach Inokulation (*days post inoculation* – dpi) geerntet (Kuhn, 2011; S. 41/57). Um die Basisexpression der Gene feststellen zu können wurden zudem nicht mykorrhizierte Kontrollwurzeln analysiert. In der Tat konnte eine starke Induktion von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* nach 25 d Mykorrhizierung festgestellt werden (Abb. 2.4). Interessanterweise



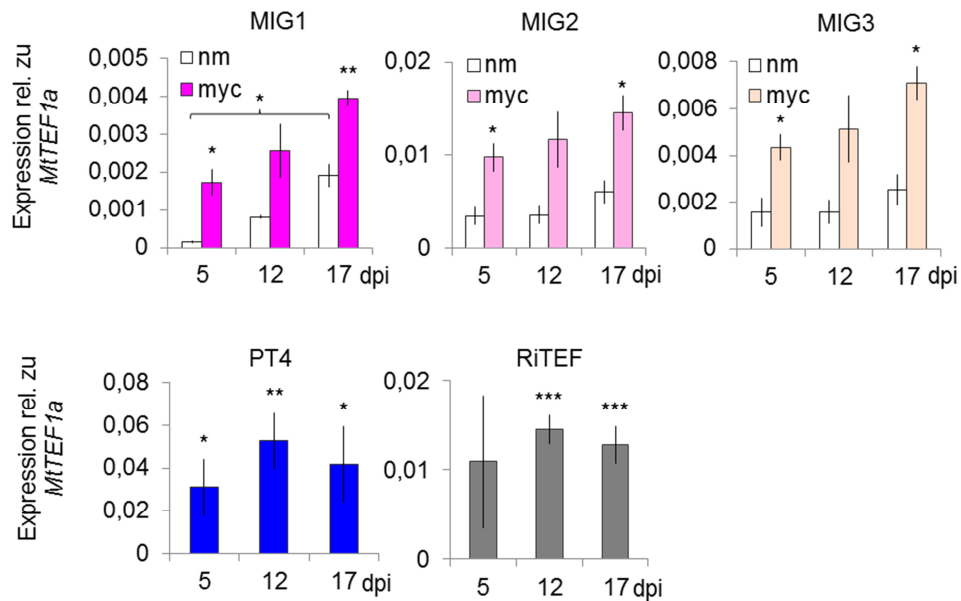
zeigte sich darüber hinaus, dass *MIG1* im Gegensatz zu *MIG2* und *MIG3* unter Bedingungen ohne Mykorrhizierung eine sehr schwache Basisexpression besitzt, welche im Bereich des 1/100.000-fachen des Haushaltsgens *MtTEF1a* lag. Der Mykorrhizierungsgrad der verwendeten Wurzeln wurde durch Quantifizierung des symbiotischen Phosphattransporters *MtPT4*, welches ausschließlich in Arbuskel-enhaltenden Zellen exprimiert wird (Harrison *et al.*, 2002) und dem pilzlichen Haushaltsgen *RiTEF* analysiert. Die Expression beider Markergene sowie der *MIG*-Gene stieg parallel zur fortschreitenden Mykorrhizierung an.



**Abbildung 2.4 Expression in mykorrhizierten WT *M. truncatula*.** Dargestellt ist die Expression von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* sowie dem Mykorrhiza-Markergen *PT4* und dem pilzlichen Markergen *RiTEF* in *M. truncatula* Wildtyp Pflanzen. Die Pflanzen wurden 1, 12 oder 25 d mit (myc = mykorrhiziert) oder ohne *R. irregularis* (nm = nicht mykorrhiziert) in Flüssigmedium im Halbplattensystem inokuliert (Kuhn, 2011; S. 41/57). Sowohl *PT4* und *RiTEF*, als auch die *MIG*-Gene zeigten einen Anstieg der Expression parallel zur Mykorrhizierung. (n = 3, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

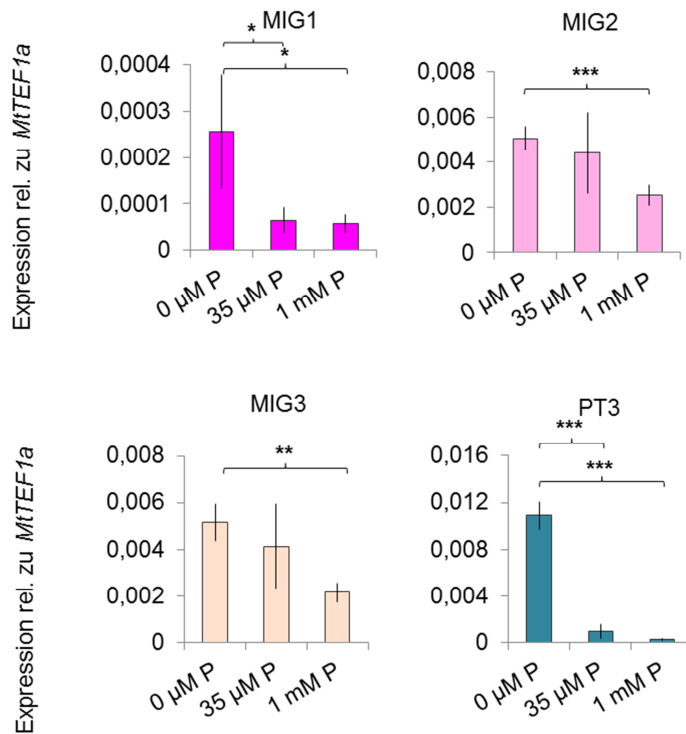
Das Modellsystem der AM-Symbiose ermöglicht es auch Wurzelkulturen ohne Spross zu mykorrhizieren. Deshalb wurde zusätzlich dieses System verwendet, um eine weitere Quantifizierung der *MIG*-Gene während der Mykorrhizierung zu erhalten (Abb. 2.5). Wurzelkulturen von *M. truncatula* wurden hierzu im Halbplattensystem mit *R. irregularis* mykorrhiziert und nach 5, 12 und 17 dpi geerntet (Hirsch, 2013; S. 29). Anhand der Expression der Markergene *PT4* (Harrison *et al.*, 2002) und *RiTEF* wird deutlich, dass die Mykorrhizierung von Wurzelkulturen im Halbplattensystem effektiver und wesentlich schneller erfolgte, als die Kolonisierung von ganzen Pflanzen (Abb. 2.4). Auch in diesem System lässt sich ein Anstieg der Transkriptmenge von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* parallel zum Verlauf der Mykorrhizierung feststellen. Auffällig ist auch der signifikante Anstieg von

*MIG1*-Transkript in den unmykorrhizierten Proben zwischen 5 und 17 dpi. Das verwendete M-Medium zur Mykorrhizierung enthielt eine verringerte Konzentration an Phosphat (17,5  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) gegenüber dem Kultivierungsmedium (35  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), um die Interaktion zwischen Pilz und Pflanze zu stimulieren. Dementsprechend könnte es sich bei dieser Induktion um eine Antwort auf den Phosphatmangel handeln. In Übereinstimmung hiermit konnte *in silico* eine Induktion von *MIG1* durch Phosphatmangel (Vergleich 2 mM Phosphat mit 20  $\mu\text{M}$  Phosphat) festgestellt werden (MtGEA).



**Abbildung 2.5 Expression in mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzelkulturen.** Dargestellt ist die Expression von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* sowie dem Mykorrhiza-Markergen *PT4* und dem pilzlichen Markergen *RiTEF* in *M. truncatula* Wurzelkulturen. Die Wurzeln wurden 5, 12 oder 17 d mit (myc = mykorrhiziert) oder ohne *R. irregularis* (nm = nicht mykorrhiziert) im Halbplattensystem inokuliert (Hirsch, 2013; S. 29). Sowohl *PT4* und *RiTEF*, als auch die *MIG*-Gene zeigten einen Anstieg der Expression im Laufe der Mykorrhizierung. (n = 3, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz zwischen nm und myc bzw. zwischen Zeitpunkten verwendet; \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

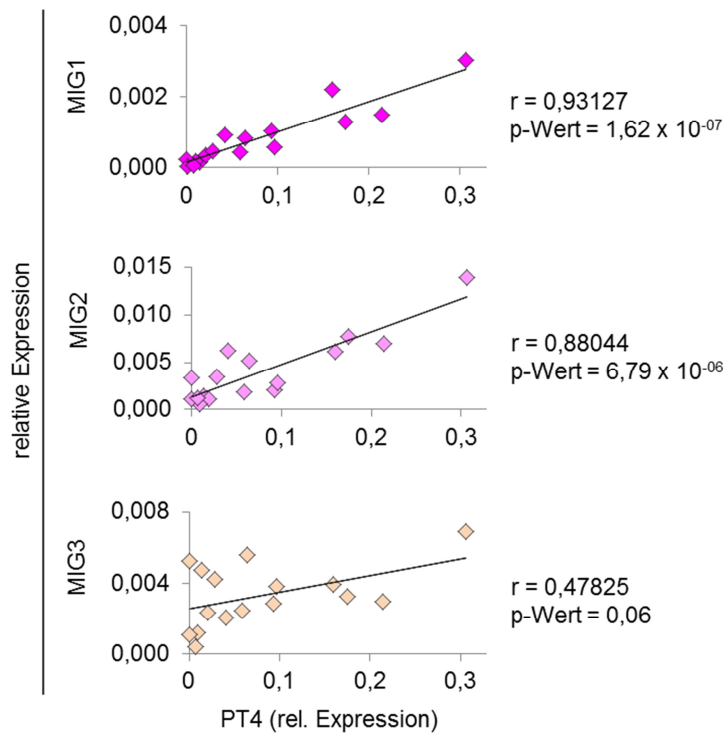
Um die Hypothese zu testen, dass *MIG1* durch Phosphatmangel induziert wird, wurde ein Experiment mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen durchgeführt. Hierfür wurden Wurzelkulturen, die ursprünglich auf Festmedium mit 35  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  als Phosphatquelle angewachsen waren, für 48 h in Flüssigmedium ohne Phosphatquelle (0  $\mu\text{M}$  P), mit 35  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  oder 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  inkubiert. Die Quantifizierung der *MIG*-Expressionen bestätigte, dass *MIG1* durch Phosphatmangel induziert wird (Abb. 2.6). Dies wird vor allem dadurch deutlich, dass sein Expressionsmuster mit dem des Markergens *PT3* (Liu *et al.*, 2008) übereinstimmte. *PT3* ist ein *low-affinity* Phosphattransporter, dessen Expression bei hoher Phosphatverfügbarkeit reduziert vorliegt (Liu *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu *MIG2* und *MIG3* lag bei *MIG1* sowie bei *PT3* eine signifikante Induktion zwischen 35  $\mu\text{M}$  und 0  $\mu\text{M}$  P vor. Bei *MIG2* und *MIG3* konnte nur bei dem größten Unterschied von 1 mM zu 0  $\mu\text{M}$  P eine signifikante Änderung festgestellt werden.



**Abbildung 2.6 Expression der MIG-Gene in Phosphat-behandelten Wurzelkulturen.** *M. truncatula* Wurzelkulturen wurden 48 h in Flüssigmedium mit einer Phosphatkonzentration von 0  $\mu$ M, 35  $\mu$ M oder 1 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) inkubiert. *MIG1* hatte ein vergleichbares Expressionsmuster wie das durch Phosphatmangel induzierbare Phosphattransportergen *PT3* (Liu *et al.*, 2008). (n = 4, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet; \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

Eine Expressionsanalyse mykorrhizierter Wurzeln, spiegelt immer die Gesamtheit aller Zellen der Wurzel und lässt keine Aussage über die räumliche Aufteilung der Expression zu. Um einen Hinweis zu erlangen, ob die *MIGs* während der AM-Symbiose vermehrt in Arbuskel-enthaltenden Zellen exprimiert werden, wurde ihre Expression aus verschiedenen mykorrhizierten Wurzelproben gegen die jeweilige *PT4*-Expression aufgetragen und die Korrelation anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten  $r$  ausgewertet (Abb. 2.7). *MIG1* zeigte eine klare positive Korrelation zu *PT4*. Auch die Expression von *MIG2* korrelierte positiv mit der von *PT4*, wobei  $r$  hier einen geringeren Wert aufwies als bei der Kombination *MIG1-PT4*. Für *MIG3* konnte dagegen keine Korrelation mit *PT4* festgestellt werden.

Die erhöhte Expression der *MIG*-Gene während der AM-Symbiose weist auf eine generelle Funktion der *MIGs* während der Kolonisierung des AM-Pilzes hin. Durch die Phosphatmangel-assoziierte Induktion der *MIG1*-Expression, ist es möglich, dass *MIG1* sogar bereits vor dem eigentlichen Kontakt für eine Vorbereitung der Pflanze auf potenzielle Interaktionspartner verantwortlich ist, um eine effiziente Ausbildung der AM-Symbiose zu gewährleisten. Die positive Korrelation der Expression von *MIG1* und *MIG2* mit dem Arbuskel-assoziierten *PT4*, deutet darauf hin, dass beide Gene im Gegensatz zu *MIG3* während der AM-Symbiose vor allem in Arbuskel-enthaltenden Zellen transkribiert werden.



**Abbildung 2.7 Korrelationsanalyse der Expression der MIG-Gene und dem Arbuskelmarker PT4.** Die Expression der MIGs sowie PT4 wurde *via* qPCR in mykorrhizierten Wurzeln (WT, *composite* Pflanzen und Wurzelkulturen) ermittelt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Die Werte der MIGs wurden in einem Streudiagramm inklusive einer linearen Regressionsgeraden gegen PT4 aufgetragen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient *r* und der zugehörige Signifikanzwert *p* zeigen eine positive Korrelation zwischen der Expression von MIG1 und PT4 sowie MIG2 und PT4 an, nicht jedoch zwischen MIG3 und PT4. *n* = 16.

### 2.3 Bioinformatische Analyse – eine neue Gruppe der GRAS-Proteine

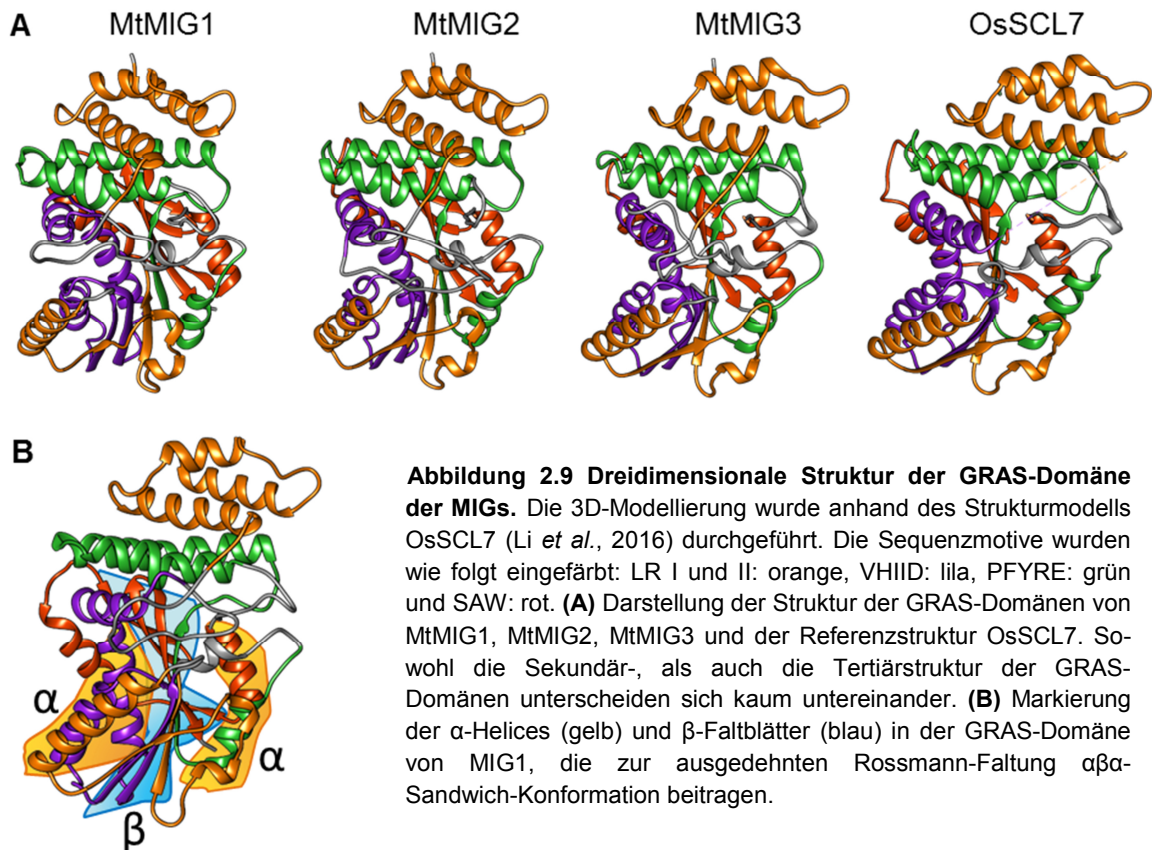
Der Domänenbau und die Proteinstruktur geben oftmals einen Hinweis auf die biologische Funktion eines Proteins. GRAS-Proteine besitzen eine konservierte GRAS-Domäne im C-Terminus, welche eine bestimmte Anordnung verschiedener Motive aufweist (Abb. 1.3). Diese typischen GRAS-Motive und konservierte AS nach Pysh *et al.* (1999) und Bolle (2015) finden sich auch in MIG1, MIG2 und MIG3 (Abb. 2.8).



**Abbildung 2.8 Motive in den GRAS-Domänen der MIG-Proteine.** Die Proteinsequenzen von MIG1, MIG2 und MIG3 wurden mit Clustal Omega aligniert. Bekannte Motive und konservierte AS der GRAS-Domäne wurden nach Pysh *et al.* (1999) und Bolle (2015) markiert. LR (Leucin-reich) I und II: orange, VHII: lila, PFYRE: grün, W-W: blau und SAW: rot.

Zu Beginn der GRAS-Domäne befinden sich die Leucin-reichen Bereiche I und II, welche durch die VHIID-Domäne unterbrochen werden. Neben dem PFYRE- ist außerdem das am Ende der Sequenz lokalisierte W-W- und SAW-Motiv zu erwähnen. Folglich besitzen die Proteine MIG1, MIG2 und MIG3 den typischen Aufbau einer GRAS-Domäne.

Anhand des kürzlich kristallisierten GRAS-Proteins OsSCL7 (Li *et al.*, 2016) wurde in Zusammenarbeit mit Sven Heidt jeweils eine dreidimensionale Struktur aus der GRAS-Domäne der MIGs modelliert. Ein direkter Vergleich der MIGs untereinander und mit OsSCL7 zeigte, dass die bekannten Motive innerhalb der GRAS-Domäne die gleiche dreidimensionale Anordnung aufweisen, die GRAS-Domäne demnach in den MIGs hoch konserviert vorliegt (Abb 2.9 A). Des Weiteren konnte die ausgedehnte Rossmann-Faltung  $\alpha\beta$ -Sandwich-Konformation identifiziert werden (Abb. 2.9 B), eine strukturelle Supersekundärstruktur welche auch in bakteriellen Methyltransferasen vorkommt (Zhang *et al.*, 2012).



Neben funktionellen Domänen können auch orthologe oder verwandte Proteine Aufschluss über die Proteinfunktion geben. Daher wurde die phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung der MIG-Proteine zu anderen GRAS-Proteinen untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Alignment mit allen Proteinsequenzen der GRAS-Familien aus *Arabidopsis thaliana*, *M. truncatula*, *O. sativa* und *S. lycopersicum* generiert und anschließend die Verwandtschaftsbeziehungen in einem phylogenetischen Baum dargestellt (Abb.



2.10). Die GRAS-Proteine wurden in die 13 bereits bekannten Unterfamilien HAM, Os19, LS, SCL4/7, PAT1, SHR, SCL9, SCL3, SCR, Os4, RAM1, DELLA und DLT eingeteilt (Bolle, 2015). MIG1 clustert in eine neue Gruppe von GRAS-Proteinen, welche bisher noch nicht funktionell charakterisiert wurden. Lediglich die Existenz dieses Clusters wurde bei den genomweiten Analysen der GRAS-Familien in *Populus trichocarpa* und *S. lycopersicum* erwähnt (Liu & Widmer, 2014; Huang *et al.*, 2015). Folglich wurde dieses Cluster nach dem ersten charakterisierten Protein „MIG1“ benannt.



**Abbildung 2.10 Phylogenetische Analyse der GRAS-Proteinfamilie.** Der phylogenetische Baum wurde mit einem AS-Alignment von allen GRAS-Proteinen aus den Pflanzenarten *A. thaliana*, *M. truncatula*, *S. lycopersicum* und *O. sativa* generiert. Symbiotische GRAS-Proteine wurden durch einen grünen Punkt markiert. Mykorrhiza induzierte Gene wurden mit einem pinken Punkt, Gene, die in dieser Arbeit in den SE-Assay eingeschlossen wurden mit einem blauen Punkt markiert. Das Alignment der Proteinsequenzen wurde mit Clustal W durchgeführt. Der phylogenetische Baum wurde mit der Neighbour-Joining Methode mit der Software MEGA7, einem Bootstrap von 1000 (jeweiliger Wert wird an jedem Knoten angezeigt) und einer paarweisen Lückendeletion generiert. MIG1 gruppiert in einen neuen Ast, welcher keine Orthologe aus *A. thaliana* oder *O. sativa* beinhaltet. (Diese Abbildung wurde in besserer Auflösung als Anhang 2 digital angefügt.)

Um einen detaillierteren Überblick der MIG1-Klade zu erlangen, wurde die phylogenetische Analyse erweitert, indem zusätzliche Sequenzen aus weiteren Pflanzenarten hinzugefügt wurden. Gegenüber dem konservierten C-Terminus besitzen GRAS-Proteine einen variablen N-Terminus, welcher die jeweiligen Unterfamilien definiert (Bolle, 2004). Dementsprechend wurden weitere Sequenzen anhand von BLASTp-Analysen mit der N-terminalen MIG1-Sequenz als Suchsequenz identifiziert. Die Evaluation der Daten zeigt,

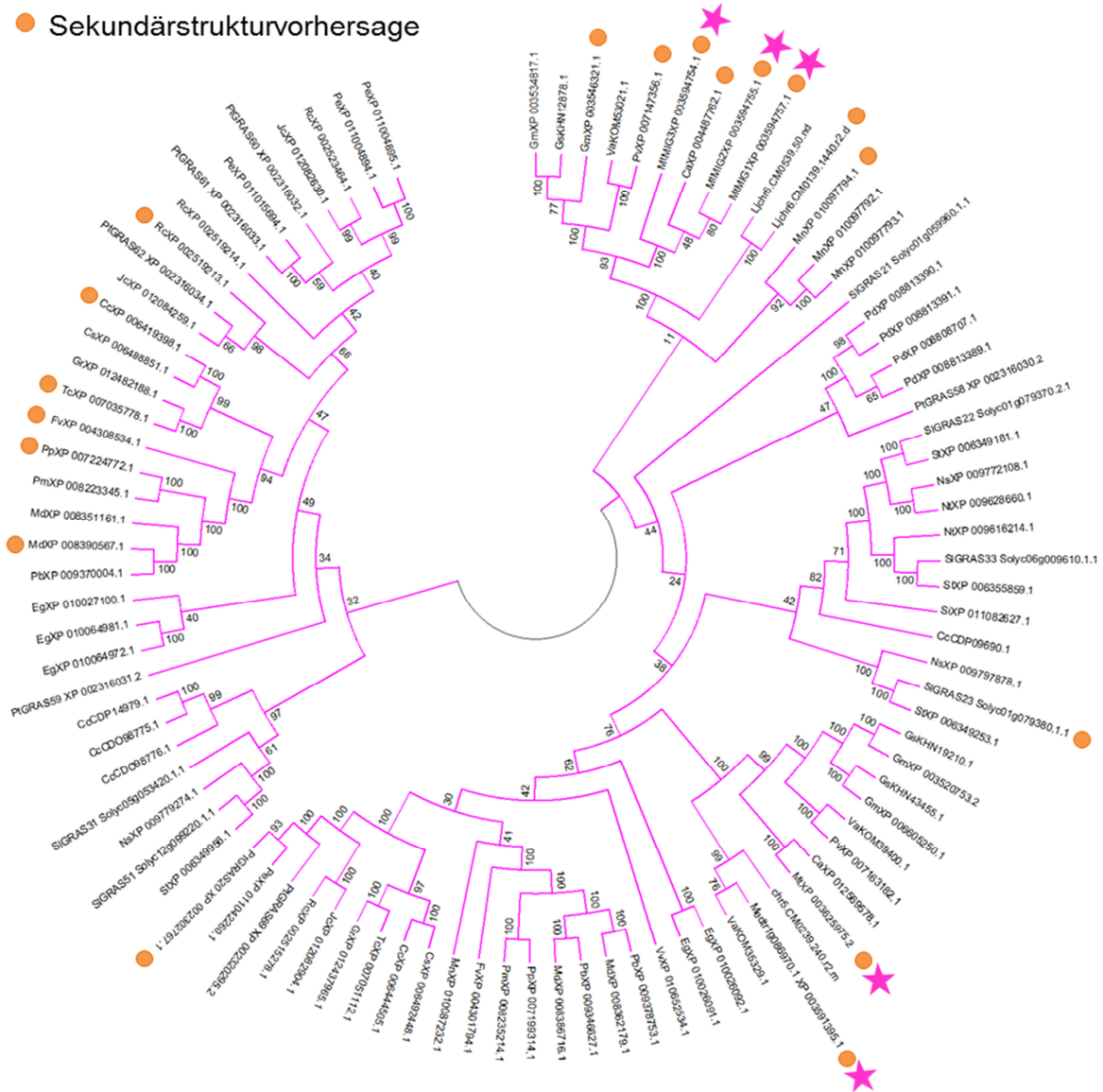
**Tabelle 2.2 Zusammenfassung der BLASTp Analyse mit dem MIG1-N-Terminus als Suchsequenz.** Per BLASTp wurden mit dem N-terminus von MIG1 als Suchsequenz Proteinsequenzen in anderen Pflanzenarten identifiziert. Redundante Sequenzen wurden manuell herausgefiltert. V. I. n. r.: Abkürzung und Name der Pflanzenart, Anzahl an identifizierten Proteinen zugehörig zur MIG1-Klade (Absenz durch - gekennzeichnet), Anzahl an Sequenzen inkludiert in der phylogenetischen Analyse der MIG1-Klade (Abb. 2.11) und der Sekundärstrukturvorhersage (oranjer Punkt), AM-Wirtspflanze (+) bzw. Nichtwirtspflanze (-) und falls vorhanden eine Referenz.

Abk.	Pflanzenart	Anzahl Sequenzen		Sekundärstrukturvorhersage	AM-Wirt	Referenz
		NCBI	Abb. 2.11			
Al	<i>Arabidopsis lyrata</i>	-	-		-	
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-		-	
Br	<i>Brassica rapa</i>	-	-		-	
Ca	<i>Cicer arietinum</i>	2	1	●	+	
Cc	<i>Citrus clementina</i>	2	2	●	+	
Cc	<i>Coffea canephora</i>	4	4		+	
Cr	<i>Capsella rubella</i>	-	-		-	
Cs	<i>Citrus sinensis</i>	2	2		+	
Eg	<i>Eucalyptus grandis</i>	5	5		+	
Fv	<i>Fragaria vesca</i>	2	2	●	+	
Gm	<i>Glycine max</i>	4	4	●	+	
Gr	<i>Gossypium raimondii</i>	2	2		+	
Gs	<i>Glycine soja</i>	4	3		+	
Jc	<i>Jatropha curcas</i>	4	3		+	
La	<i>Lupinus angustifolius</i>	-	-		-	
Lj	<i>Lotus japonicus</i>	3	3	●	+	Xue et al. (2015)
Mn	<i>Morus notabilis</i>	4	4	●	+	
Md	<i>Malus domestica</i>	7	4	●	+	
Mt	<i>Medicago truncatula</i>	5	5	●	+	
Ns	<i>Nicotiana sylvestris</i>	3	3		+	
Nt	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	2	2		+	
Os	<i>Oryzae sativa</i>	-	-		+	
Pb	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	3	3		+	
Pd	<i>Phoenix dactylifera</i>	5	4		+	
Pe	<i>Populus euphratica</i>	4	4		+	
Pm	<i>Prunus mume</i>	3	2		+	
Pp	<i>Prunus persica</i>	3	2	●	+	
Pt	<i>Populus trichocarpa</i>	8	7	●	+	Liu & Widmer (2014)
Pv	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3	2	●	+	
Rc	<i>Ricinus communis</i>	4	4	●	+	
Si	<i>Sesamum indicum</i>	1	1		+	
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>	6	6	●	+	Huang et al. (2015)
St	<i>Solanum tuberosum</i>	4	4		+	
Tc	<i>Theobroma cacao</i>	2	2	●	+	
Th	<i>Thellungiella halophila</i>	-	-		-	
Va	<i>Vigna angularis</i>	3	3		+	
Vv	<i>Vitis vinifera</i>	1	1		+	
Zm	<i>Zea mays</i>	-	-		+	

dass Proteine des MIG1-Clusters in weiten Teilen des Pflanzenreichs verbreitet sind und in vielen Pflanzen sogar mehrfach auftreten (Tabelle 2.2 und Abb. 2.11). Hierbei wird deutlich, dass die meisten Pflanzen, wie auch *M. truncatula* mehrere Proteinsequenzen in diesem Cluster besitzen, was möglicherweise auf Genduplikationen zurückzuführen ist. Erwähnenswert ist, dass sowohl alle fünf Gene aus *M. truncatula* (*Medtr7g109580*, *Medtr1g086970* (Hogekamp *et al.*, 2011), *MtMIG1*, *MtMIG2*, *MtMIG3* (Abb. 2.4 und 2.5)),

★ *M. truncatula*

- Sekundärstrukturvorhersage



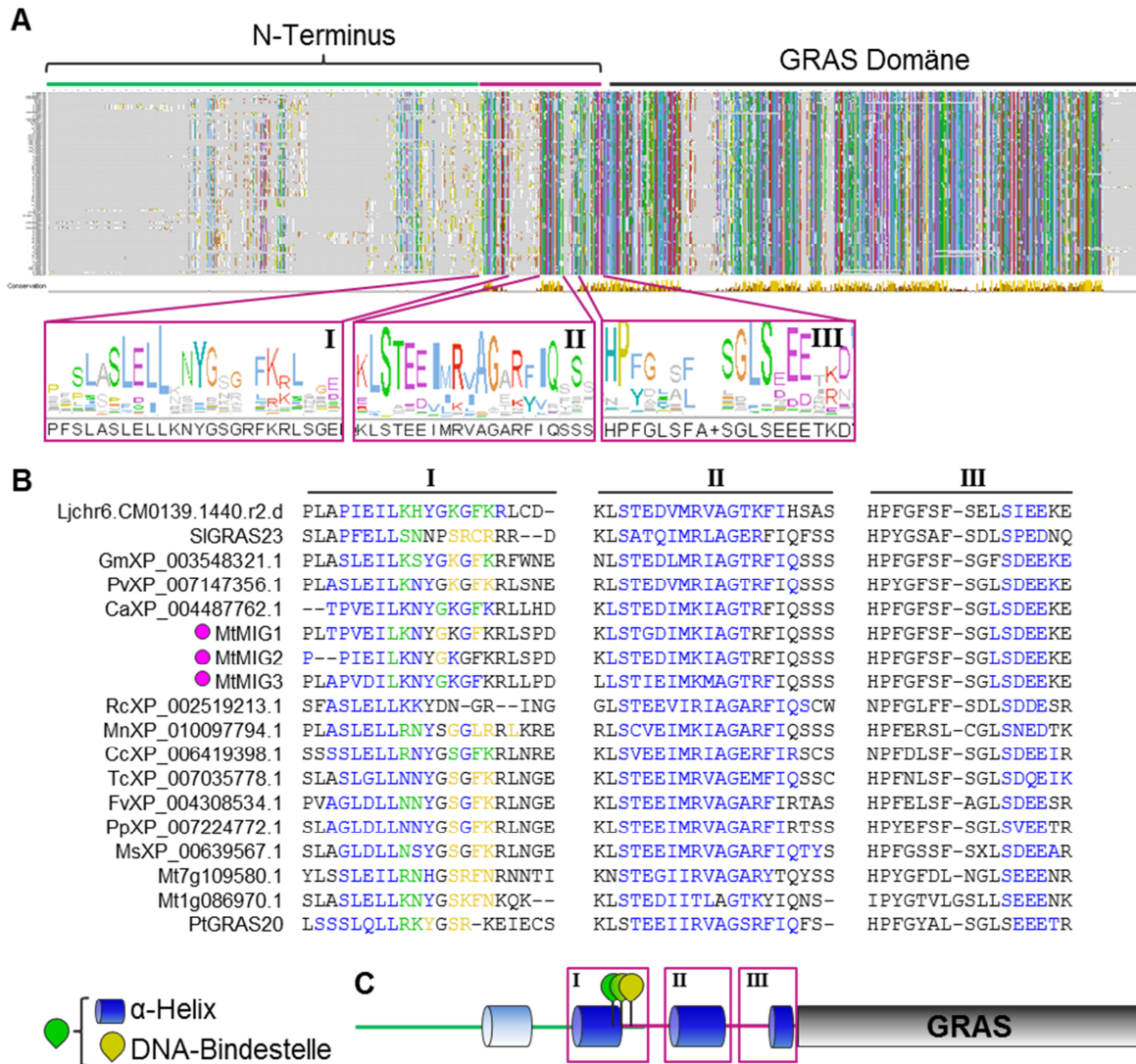
**Abbildung 2.11 Phylogenetische Analyse des MIG1-Astes.** Der phylogenetische Baum wurde mit Hilfe eines Aminosäure-Alignments von GRAS-Proteinen aus unterschiedlichen Pflanzenarten generiert. Die Sequenzen wurden durch eine Datenbanksuche mit BLASTp und dem N-terminus von MIG1 als Eingabesequenz erhalten. Redundante Sequenzen wurden manuell herausgefiltert. Zudem wurden publizierte Sequenzen von *L. japonicus* (Xue *et al.*, 2015), *P. trichorcarpa* (Liu & Widmer, 2014) und *S. lysopersicum* (Huang *et al.*, 2015), welche zu diesen Ast zugeordnet werden konnten, inkludiert. Das Alignment der Proteinsequenzen wurde mit Clustal W durchgeführt. Der phylogenetische Baum wurde mit der Neighbour-Joining Methode mit der Software MEGA7, einem Bootstrap von 1000 (jeweiliger Wert wird an jedem Knoten angezeigt) und einer paarweisen Lückendeletion generiert. Sequenzen von *M. truncatula* sind mit einem pinken Stern markiert. Proteinsequenzen, welche für die Sekundärstrukturvorhersage verwendet wurden sind mit einem orangenen Punkt markiert.



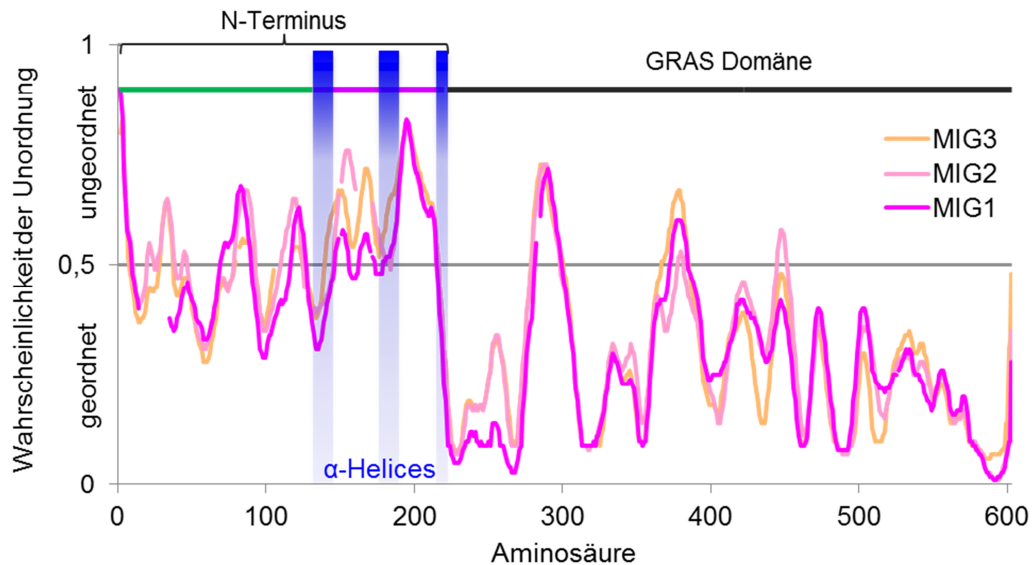
als auch alle Gene aus *L. japonicus* (Xue *et al.*, 2015) während der AM-Symbiose verstärkt exprimiert werden. Interessanterweise konnten in der NCBI-Datenbank keine Orthologe in der Familie der Nichtwirtspflanzen Brassicaceae gefunden werden. Auch in *Lupinus angustifolius*, eine der wenigen Leguminoseae, welche nicht in der Lage ist eine AM-Symbiose einzugehen, wurde keine Proteinsequenz innerhalb des MIG1-Astes identifiziert. Diese Analyse liefert Hinweise darauf, dass Proteine des MIG1-Astes generell eine Rolle in der AM-Symbiose einnehmen könnten. In monokotyledonen Pflanzen konnte ausschließlich in der Palme *Phoenix dactylifera* MIG1-verwandte Proteine identifiziert werden.

Die Proteinsequenzen der MIG1-Klade besitzen alle einen charakteristischen N-Terminus, welcher keine bekannten Domänen aufweist. Eine genauere Betrachtung des Alignments der MIG1-verwandten Sequenzen deckte allerdings die Existenz dreier hochkonservierter AS-Bereiche am Ende des N-Terminus auf (Abb. 2.12 A). Für eine bioinformatische Sekundärstrukturvorhersage wurden N-Termini von 18 verschiedenen Proteinen aus unterschiedlichen Pflanzen ausgewählt (markiert in Tab 2.2 und Abb. 2.11). Die *in silico* Analyse zeigte, dass jede der hochkonservierten Sequenzbereiche einer putativen  $\alpha$ -Helix zugeordnet werden konnte (Abb. 2.12 B; in Zusammenarbeit mit Sven Heidt). Des Weiteren konnte in jeder untersuchten Sequenz eine vierte  $\alpha$ -Helix vor den drei anderen vorhergesagt werden, jedoch lag die Lokalisation dieser weniger konserviert vor. Auffällig war zudem, dass in 17 der 18 analysierten Sequenzen putative DNA-Bindestellen im ersten hochkonservierten AS-Bereich vorhergesagt werden konnten. Die konservierte Sequenz, putative Sekundärstruktur und Existenz von DNA-Bindestellen deuten auf eine gemeinsame Funktionsweise der Proteine der MIG1-Klade als Transkriptionsregulatoren hin (Abb. 2.12 C). Die Tatsache, dass orthologe Proteine der MIG1-Klade in Pflanzenarten, welche keine AM-Symbiose ausbilden, fehlen, könnte dafür sprechen, dass es sich nicht nur um strukturelle, sondern auch funktionelle Orthologe handelt, welche eine spezifische Funktion in der AM-Symbiose ausüben.

GRAS-Proteine weisen N-terminal häufig intrinsisch ungeordnete Sequenzbereiche auf, wodurch ihr funktioneller Polymorphismus erklärt werden kann (Sun *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Auch die MIGs weisen diese typische Charakteristik in ihrem N-Terminus auf, der C-Terminus liegt dagegen überwiegend geordnet vor (Abb. 2.13). Interessanterweise liegen die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices (Abb. 2.12) am Ende des N-Terminus jeweils zwischen vorhergesagten intrinsisch ungeordneten Bereichen, wodurch beide *in silico* Struktur-Analysen miteinander vereinbar sind. Diese intrinsische Unordnung des N-Terminus weist darauf hin, dass MIG-Proteine ihre Faltung an unterschiedliche Interaktionspartner, durch molekulare Erkennung dieser, anpassen können und somit wahrscheinlich mehrere Bindungspartner besitzen.



**Abbildung 2.12** *In silico* Analyse der Proteinsequenzen des MIG1-Astes. **(A)** AS-Alignment der 100 engsten Verwandten des MIG1 N-Terminus. Das Alignment wurde mit Clustal Omega konstruiert und in Jalview bearbeitet. Der Farbcode entspricht den Voreinstellungen von ClustalX. Drei hoch konservierte AS-Bereiche wurden am Ende des N-Terminus hervorgehoben (pink, I, II, III). **(B, C)** *In silico* Vorhersage der N-terminalen Sekundärstruktur des MIG1-Astes. Die Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Sven Heidt durchgeführt und enthielt 18 zufällig gewählte Proteinsequenzen aus unterschiedlichen Pflanzenarten (MIG1, MIG2 und MIG3: pinke Punkte). Alle Proteine weisen vier putative  $\alpha$ -Helices (blau) auf, drei davon innerhalb der hoch konservierten Region (I, II, III). Die vierte (hellblau) ist schwächer konserviert und lokalisiert vor den drei anderen (Sequenz nicht angezeigt). Für alle Proteine wurden innerhalb des ersten konservierten AS-Bereiches (I) zwischen zwei und vier DNA-Bindestellen (gelb oder grün, falls innerhalb der  $\alpha$ -Helix) vorhergesagt. Eine Ausnahme stellt RcXP\_002519213.1 dar. Schematische Darstellung der vorhergesagten Sekundärstruktur des N-Terminus der MIG1-gruppierenden Proteine **(C)**.



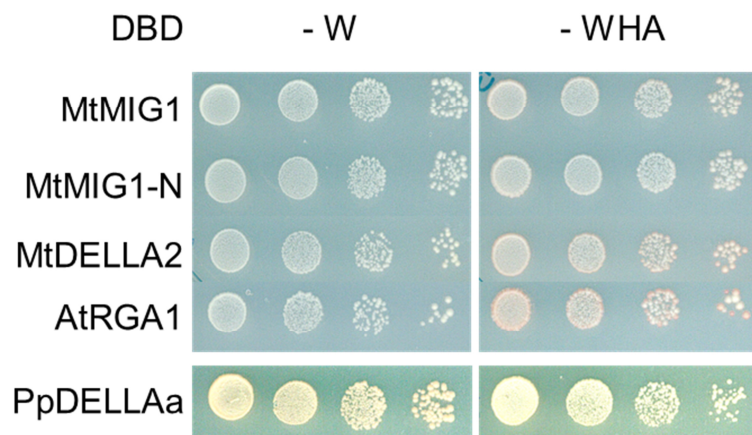
**Abbildung 2.13 Vorhersage der intrinsischen Unordnung der MIGs.** Aminosäure-Alignment der drei MIGs wurde mit Clustal Omega konstruiert und in Jalview bearbeitet. Die intrinsische Unordnung wurde für alle drei Proteine unabhängig voneinander vorhergesagt (PrDOS) und gegen die jeweilige Aminosäure gebロットet. Lücken in der Darstellung entsprechen den Lücken des Alignments. Der Schwellenwert für einen ungeordneten Aminosäurebereich liegt bei 0,5. Vor allem der N-Terminus der MIGs besitzt intrinsisch ungeordnete Bereiche. Die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices (blau) liegen zwischen diesen, in geordneten Sequenzbereichen.

## 2.4 MIG1 besitzt Transaktivierungsaktivität in seinem N-Terminus

Die Vorhersage der DNA-Bindestellen im N-Terminus von MIG1 (Abb. 2.12) unterstützt die Hypothese, dass GRAS-Proteine als transkriptionelle Regulatoren agieren. In der Tat konnte für viele GRAS-Proteine, wie OsSLR1, LISCL und den symbiotischen GRAS-Proteinen NSP1 und NSP2, eine Transaktivierungs- (TA-) Aktivität nachgewiesen werden (Ogawa *et al.*, 2000; Morohashi *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2009). Systematische Untersuchungen in Pflanzen verschiedener Phyla zeigten, dass selbst das ursprüngliche DELLA-Ortholog PpDELLAa aus dem Bryophyten *Physcomitrella patens* eine N-Terminale TA-Aktivität besitzt und als Wachstumsrepressor in höheren Pflanzen agieren kann (Yasumura *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 2012). Demnach erlangte zumindest die Unterfamilie der DELLA-Proteine bereits vor Speziation der vaskulären Pflanzen ihre TA-Aktivität.

Um zu untersuchen, ob auch MIG1 die Fähigkeit besitzt generell Gentranskription zu aktivieren, wurden Fusionskonstrukte mit der GAL4-DNA-Bindedomäne konstruiert und in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 transformiert (in Zusammenarbeit mit Nina Rieger). Eine vorhandene TA-Aktivität ermöglicht eine Expression der Reportergene und somit ein Wachstum der Hefe auf Selektionsmedium. Als Positivkontrollen wurden die DELLA-Proteine AtRGA und das ursprüngliche PpDELLAa verwendet, für die bereits eine TA-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Yasumura *et al.*, 2007). Zudem wurde MtDELLA2 in diesem Experiment inkludiert. Alle getesteten GRAS-Proteine hatten die Fähigkeit eine Transkription in Hefe zu aktivieren (Abb. 2.14). Auch eine Transformation mit der verkürz-

ten Version von MtMIG1, welche nur dessen N-Terminus beinhaltet, resultierte in einem Wachstum der Hefe auf Selektionsmedium. Nach diesem Ergebnis besitzt MIG1 TA-Aktivität, welche im N-terminalen Bereich lokalisiert zu sein scheint. Zusammen mit den vorhergesagten DNA-Bindestellen wäre es MIG1 demnach prinzipiell möglich an Promotorsequenzen von spezifischen Genen zu binden und deren Transkription während der AM-Symbiose zu regulieren.



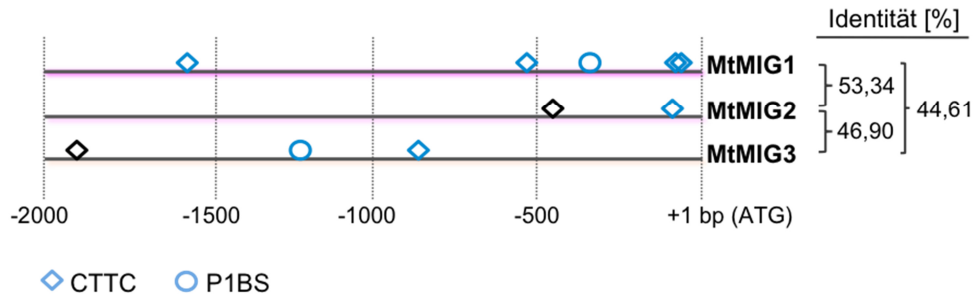
**Abbildung 2.14** Transaktivierungstest in *S. cerevisiae*. *TRP1* wurde als Transformationsmarker, *HIS3* und *ADE2* als Reportergene verwendet. MtMIG1, MtDELLA2, AtRGA1 und PpDELLAa wurden an die GAL4-DNA-Bindedomäne (DBD) fusioniert. Zusätzlich wurde eine verkürzte N-terminale Version von MtMIG1 getestet (108 AS; MtMIG1-N). Alle getesteten GRAS-Proteine zeigten eine TA-Aktivität in Hefe. (Nina Rieger)

### 2.5 Der *MIG1*-Promotor ist in *R. irregularis*-kolonisierten Zellen aktiv

Für die spezifische Expression von Genen während einem bestimmten Entwicklungsstadium wie beispielsweise der Wurzelkolonisierung durch AM-Pilze, sind *cis*-regulatorische Elemente in den Promotoren von Bedeutung an welche Transkriptionsfaktoren binden können. Das CTTC-Motiv wurde bereits 2004 als putatives *cis*-regulatorisches Element in der AM-Symbiose identifiziert und als hinreichend für eine Arbuskel-assoziierte Expression erklärt (Karandashov *et al.*, 2004; Lota *et al.*, 2013). Das Motiv besitzt die Kernsequenz TCTTG TTC, wird jedoch auch leicht abgewandelt in einer großen Zahl AM-induzierter Gene gefunden. Eine weitere Eigenschaft des CTTC-Motivs ist die häufige Lokalisierung in Nähe des Startcodons und die mögliche kooperierende Funktionsweise mit dem Phosphatmangel-assoziierten Motiv P1BS (PHR1 Bindestelle) (Lota *et al.*, 2013). Das P1BS-Motiv mit der palindromischen Sequenz G<sub>n</sub>ATAT<sub>n</sub>C konnte bereits in den Promotoren vieler AM-assoziiierter Gene identifiziert werden, findet sich aber generell in assoziiert mit Genen der allgemeine Phosphathomöostase der Pflanze (Rubio *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2011; Sobkowiak *et al.*, 2012).

Um einen genaueren Einblick über die Genregulation von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* zu erlangen wurde nach der Präsenz der AM-assoziierten Motive CTTC und P1BS in den Promotoren gesucht. Als Promotorsequenz wurden 2 kb vor dem Startcodon ATG definiert. Auch in ihrer Promotorsequenz besitzen die duplizierten Sequenzen *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* mit etwa 50 % eine sehr hohe Identität untereinander. Dennoch findet man

deutliche Unterschiede in der Anordnung und Anzahl der *cis*-regulatorischen Elemente in den Promotoren der *MIG*-Gene (Abb. 2.15 und Tab. 2.3). Während *MIG1* vier CTTC-ähnliche Motive besitzt, von denen zwei nahe am ATG lokalisieren, besitzen *MIG2* und *MIG3* jeweils nur zwei CTTC-ähnliche Sequenzbereiche. Nur bei *MIG2* findet sich eines davon auch in der Nähe des ATGs. *MIG1* besitzt zudem ein P1BS-Element an Position -326 bp. Von *MIG2* und *MIG3* besitzt lediglich *MIG3* eine P1BS-Sequenz, jedoch befindet sich diese nicht in der Nähe des Startcodons.



**Abbildung 2.15 In silico Promotoranalyse von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3*.** Die 2 kb-Region vor dem jeweiligen ATG von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* wurde auf AM-assoziierte Motive untersucht. Das AM-induzierbare *cis*-regulatorische Element CTTC mit einem Basenaustausch verglichen zum Konsensus ist durch eine Raute repräsentiert (Lota *et al.*, 2013). Zudem ist das Phosphatmangel-induzierte Element P1BS gezeigt (Kreis) (Rubio *et al.*, 2001). Motive, welche auf dem + Strang vorkommen, sind blau, Motive auf dem – Strang schwarz dargestellt. Die prozentuale Identität auf Nukleotidebene der Promotorbereiche untereinander ist links angegeben.

**Tabelle 2.3 Sequenz und Lokalisation der Promotormotive von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3*.** Die Tabelle stellt die exakten Sequenzen und Lokalisierung der identifizierten Motive in den jeweiligen Promotorbereichen dar. Motive, welche auf dem + Strang vorkommen, sind blau, Motive auf dem – Strang schwarz dargestellt.

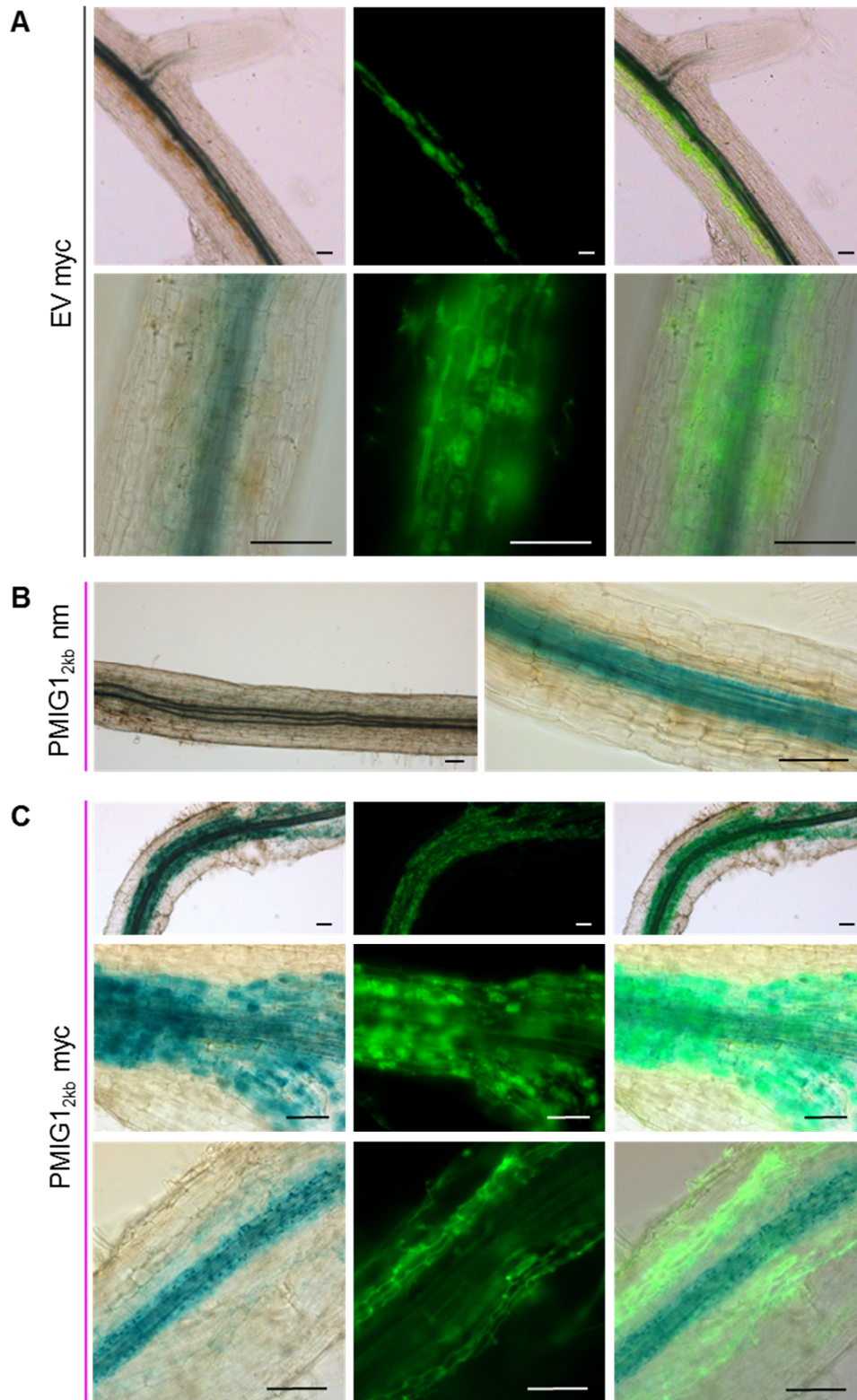
Motiv Konsensus	CTTC TCTTGTC	P1BS GnATATnC
<b>MIG1</b>	-80 TCTTGTTa -89 TCTTGTTa -532 TCTTcTTC -1674 TCTTGgTC	-362 GaATATaC
<b>MIG2</b>	-92 TCTTGTTa -467 TCTTGTTt	
<b>MIG3</b>	-871 TCTgGTTC -1908 TCTTGaTC	-1222 GgATATgC

Die bioinformatische Untersuchung der *MIG*-Promotorsequenzen bestätigte die bisherigen Expressionsstudien, in denen gezeigt wurde, dass *MIG1* eine spezifische AM-Expression besitzt, welche positiv mit *PT4* korrelierte, wohingegen *MIG2* und *MIG3* eine höhere Basisexpression besitzen (Abb. 2.4, 2.5 und 2.7). Überdies bekräftigt das Vorkommen einer P1BS-Sequenz im Promotor von *MIG1* dessen Phosphat-regulierte Expression (Abb. 2.6). Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass *MIG1* von den drei Duplikationen am ehesten eine spezifische Funktion in der AM-Symbiose ausüben könnte. Folglich haben sich die weiteren Untersuchungen vor allem auf *MIG1* fokussiert.

In Abschnitt 2.1 konnte mit Hilfe der qPCR-Methode eine spezifische Expression von *MIG1* während der Mykorrhizierung festgestellt werden. Hierbei wurde allerdings das Wurzelgewebe als Ganzes analysiert, wodurch keine Rückschlüsse auf das räumliche Expressionsmuster von *MIG1* möglich sind. Aus diesem Grund wurden Promotorreporter-Assays durchgeführt, welche einen Einblick erlauben, in welchem Gewebe und welchen Zellen eine Expression von *MIG1* stattfindet. Der Promotor von *MIG1* (PMIG1<sub>2kb</sub>) wurde dem Reportergen  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) vorangestellt. Als Kontrolle wurde der Leervektor (*empty vector* - EV), ohne Promotor, verwendet. In diesem Versuch wurden *M. truncatula composite* Pflanzen, welche mit dem jeweiligen Konstrukt transformiert waren, verwendet. *Composite* Pflanzen bestehen aus Wurzeln, welche mittels *Agrobacterium rhizogenes* transformiert wurden und einem untransformierten Spross. Diese wurden mykorrhiziert und 5 wpi geerntet. Anschließend wurde die Expression von *GUS* durch Färbung der Wurzeln visualisiert. Eine Gegenfärbung mit WGA-FITC diente zum Anfärben pilzlicher Strukturen. Mykorrhizierte Kontrollwurzeln weisen deutlich intraradikale Hyphen und Arbuskeln im FITC-Kanal auf (Abb. 2.16 A). Im Hellfeld erkannte man lediglich eine schwache Blaufärbung, welche ausschließlich im Zentralzylinder zu finden war. PMIG1<sub>2kb</sub>-*GUS* Wurzeln, welche keinen pilzlichen Kontakt hatten (nicht mykorrhiziert - nm), besaßen eine vergleichbare *GUS*-Färbung wie mykorrhizierte und nicht mykorrhizierte EV-Wurzeln, beschränkt auf den Zentralzylinder (Abb. 2.16 B). Eine Mykorrhizierung der Wurzeln zeigte dagegen eine spezifische Aktivierung des *MIG1*-Promotors in arbuskulierten Zellen (Abb. 2.16 C). Deutlich wurde dies daran, dass die Signale des WGA-FITC und der *GUS*-Färbung kolokalisierten. Im untersten Bild ist eine kolonisierte Wurzel gezeigt in der keine Arbuskeln, sondern nur intraradikale Hyphen vorhanden waren. Hier konnte eine blaue Färbung des Zentralzylinders sowie, zwar eine schwache, aber dennoch erkennbare *GUS*-Färbung in Assoziation mit den pilzlichen Hyphen beobachtet werden.

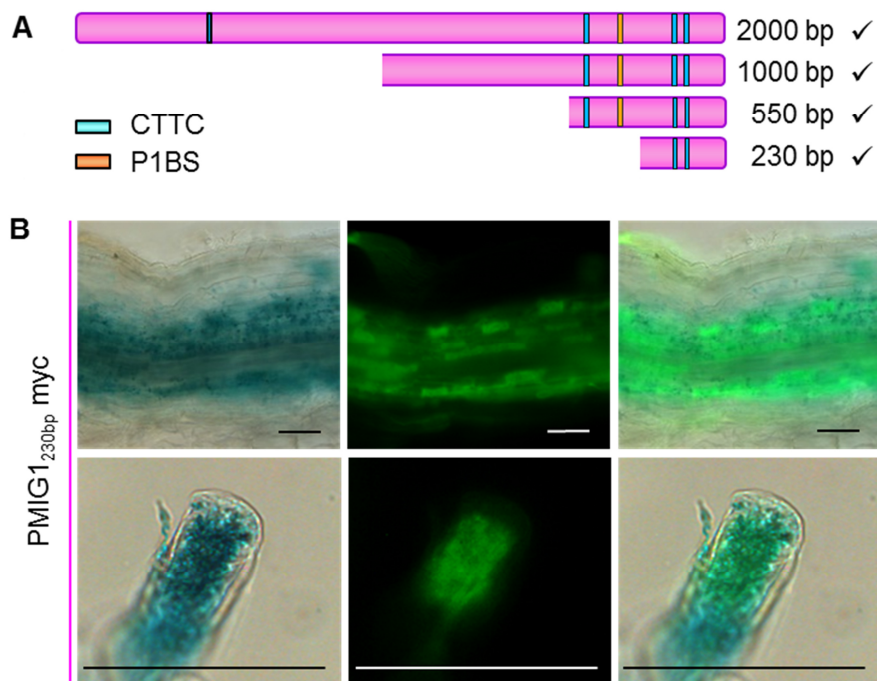
Da eine Färbung des Zentralzylinders sowohl in Wurzeln mit dem Konstrukt PMIG1<sub>2kb</sub>-*GUS*, als auch in EV-Wurzeln zu finden war, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um eine unspezifische Hintergrundfärbung. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Promotor von *MIG1* in kortikalen Zellen aktiviert wird, welche in nahem Kontakt zu dem AM-Pilz stehen. Die stärkste Aktivierung ließ sich in Zellen finden, welche Arbuskeln enthielten.





**Abbildung 2.16 Expressionsanalyse von *MIG1* mit Hilfe eines Promotorreporters.** *Composite* Pflanzen wurden ohne (nm = nicht mykorrhiziert) oder mit *R. irregularis* (myc = mykorrhiziert) inkubiert und 5 wpi geerntet. Die Promotor-Aktivität wurde durch eine GUS-Färbung sichtbar gemacht. Eine Gegenfärbung mit WGA-FITC diente zum Anfärben pilzlicher Strukturen. **(A)** In mykorrhizierten EV-Wurzeln lassen sich deutlich durch WGA-FITC gefärbte intraradikale Hyphen sowie Arbuskeln erkennen (Mitte). Eine schwache GUS-Färbung zeigt sich ausschließlich im Zentralzylinder (links; Überlagerung: rechts). **(B)**  $PMIG1_{2kb}$  (2 kb vor dem ATG) wurden vor das GUS-Reportergen kloniert. Ohne Mykorrhizierung (nm) zeigt  $PMIG1_{2kb}$  eine schwache Färbung im Zentralzylinder. **(C)** Eine Mykorrhizierung der  $PMIG1_{2kb}$  Pflanzen resultiert in einer starken Aktivierung des Promotors in arbuskulierten Zellen sowie einer schwachen Aktivität in Assoziation mit intraradikalen Hyphen. Links: Hellfeld; Mitte: WGA-FITC; rechts: Überlagerung. (Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu$ m).

Um den regulatorischen Promotorbereich, verantwortlich für diese AM-spezifische Expression, einzuengen, wurden sukzessiv verkürzte Promotorversionen von *MIG1* vor das GUS-Reportergen fusioniert (Abb. 2.17 A). Mykorrhizierungen von *composite* Pflanzen, welche mit den Konstrukten 1 kb, 550 bp oder 230 bp transformiert waren, zeigten eine spezifische Aktivierung des Promotors in arbuskulierten Zellen (Abb. 2.17 B; exemplarisch ist PMIG1<sub>230bp</sub> dargestellt). Dementsprechend ist der 230 bp-Bereich vor dem ATG ausreichend für eine spezifische Aktivität in Arbuskel-enthaltenden Zellen, das P1BS-Element ist dagegen nicht notwendig für eine AM-assoziierte Expression von *MIG1*.



**Abbildung 2.17 Expressionsanalyse von verkürzten *MIG1*-Promotorsequenzen.** (A) Schematische Darstellung der sukzessiven Verkürzung des *MIG1*-Promotors. Der Promotor wurde von 2000 bp auf 1000 bp, 550 bp und 230 bp vor dem ATG verkürzt. Detektierte GUS-Aktivität in Arbuskel-enthaltenden Zellen ist rechts mit einem Haken angezeigt (CTTC = blau, P1BS = orange). (B) *Composite* Pflanzen wurden mit PMIG1<sub>230bp</sub> transformiert und mykorrhiziert. Die Promotor-Aktivität wurde durch eine GUS-Färbung sichtbar gemacht (links, Hellfeld). Eine Gegenfärbung mit WGA-FITC diente zum Anfärben pilzlicher Strukturen (Mitte; Überlagerung: rechts). Eine verkürzte Version des Promotors von 230 bp ist ausreichend um eine spezifische Expression in arbuskulierten Zellen hervorzurufen. (Maßstabsbalken entsprechen 100 µm).

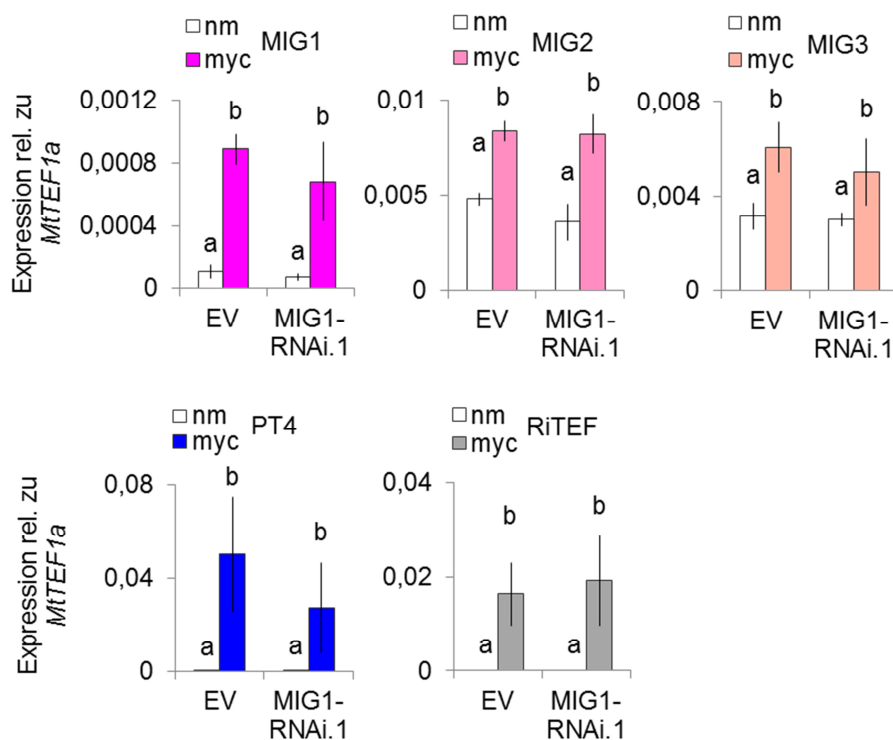
### 2.6 *MIG1* spielt eine Rolle in der Arbuskelentwicklung

Die bisherigen Ergebnisse betreffend der *MIG1*-Expression deuten auf eine Funktion des Proteins in der AM-Symbiose hin. Für die GRAS-Proteine DELLA1, DELLA2, RAM1 und RAD1 wurde bereits gezeigt, dass sie in der Entwicklung von Arbuskeln involviert sind (Gobbato *et al.*, 2012; Floss *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015; Rich *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015).

In der Datenbank für *M. truncatula* Insertionsmutanten konnte keine Linie mit einer Tnt1-Insertion in *MIG1* identifiziert werden (<http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>). Dem-

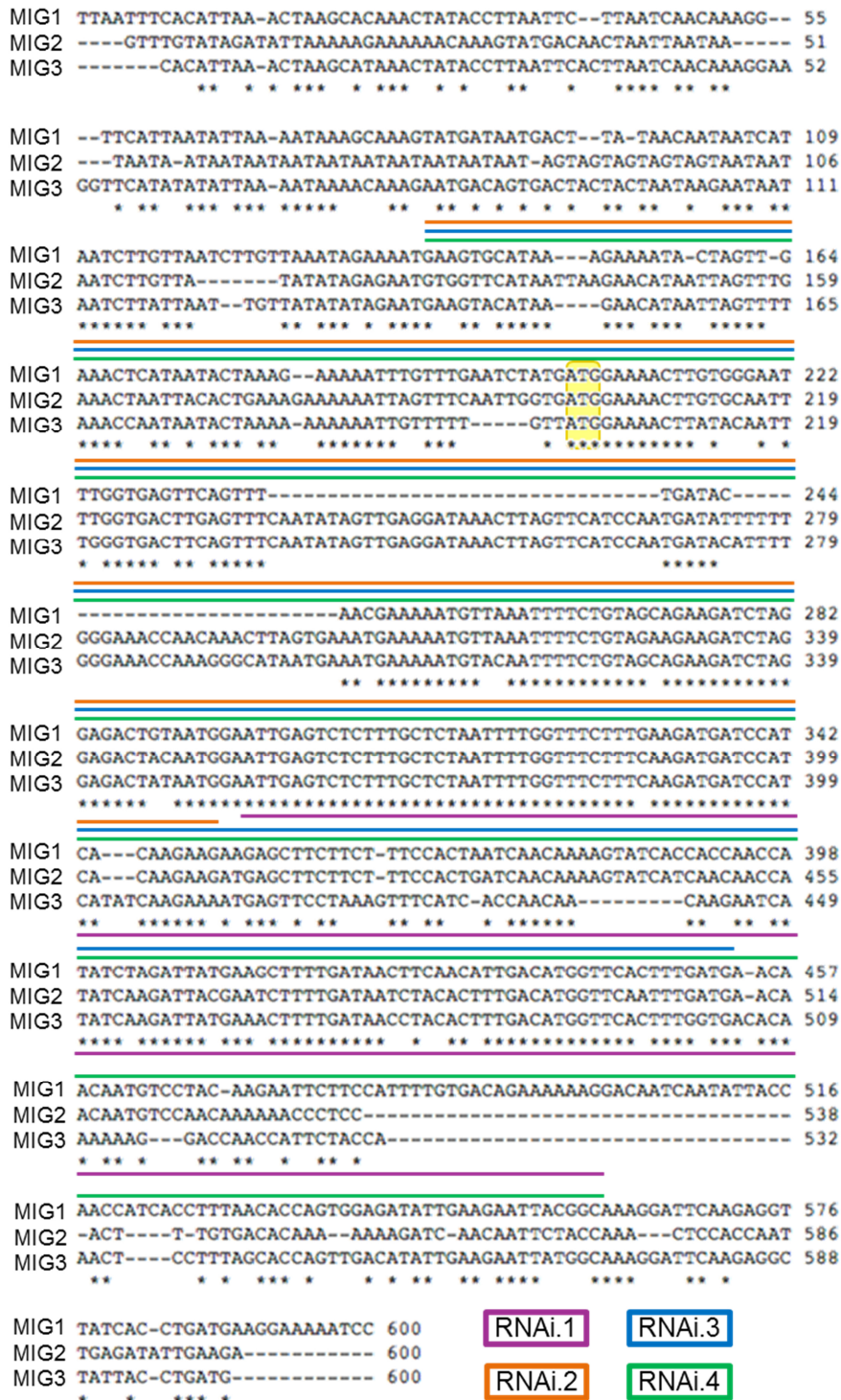


nach wurde in unterschiedlichen Ansätzen versucht eine Herunterregulation des *MIG1*-Transkripts *via* RNA Interferenz (RNAi) zu erreichen. Im ersten Konstrukt wurde eine Sequenz von 207 bp verwendet, welche sich im vorderen Bereich des ORFs von *MIG1* befand. Als Promotor wurde der konstitutiv exprimierende 35S-Promotor verwendet. Das resultierende Konstrukt P35S-MIG1-RNAi.1 wurde in *M. truncatula* Wurzeln transformiert. Da *MIG1* eine sehr schwache Basisexpression besitzt, wurden die Wurzelkulturen mykorrhiziert (8 dpi) und anschließend die Expression von *MIG1* quantifiziert (Abb. 2.18). Das *MIG1*-Transkript lag in den mykorrhizierten EV-Linien wie erwartet induziert vor, zeigte allerdings weder in den mykorrhizierten, noch in den unmykorrhizierten Proben eine signifikante Änderung seiner Expression durch das RNAi-Konstrukt P35S-MIG1-RNAi.1. Aufgrund der hohen Homologie zwischen *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* ist es möglich, dass das RNAi-Konstrukt zu einer Herunterregulierung der Duplikationen führte. Die Quantifizierung zeigte, dass *MIG2* und *MIG3* wie *MIG1* eine erhöhte Expression durch die Mykorrhizierung, aber keine Änderung ihrer Expression in MIG1-RNAi.1 zeigten. Als Marker für die Mykorrhizierungseffizienz wurden *PT4* (Harrison *et al.*, 2002) und *RiTEF* quantifiziert. Durch das Konstrukt P35S-MIG1-RNAi.1 konnte demnach keine Herunterregulation von *MIG1* erreicht werden.



**Abbildung 2.18 Expressionsanalyse in Wurzelkulturen mit dem Konstrukt P35S-MIG1-RNAi.1.** Wurzelkulturen transformiert mit EV oder MIG1-RNAi.1 wurden mit (myc) oder ohne (nm = nicht mykorrhiziert) *R. irregularis* inkubiert und 8 dpi geerntet. Die Expressionslevel von *MIG1*, *MIG2*, *MIG3*, dem Mykorrhizamarke *PT4* und dem pilzlichen Markergen *RiTEF* wurden per qPCR ermittelt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Es konnte keine Herunterregulation von *MIG1* festgestellt werden. Auch *MIG2* und *MIG3* zeigten keine veränderte Expression im Vergleich zu den EV Linien. ( $n \geq 3$ , Fehlerbalken entsprechen SD. Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert  $< 0,05$ ).

Aufgrund dessen wurden nacheinander RNAi-Konstrukte kloniert, die komplementär zu unterschiedlichen Sequenzbereichen waren (Abb. 2.19). Dabei wurde die Sequenz verlängert und auf den 5'-UTR von *MIG1* ausgeweitet.



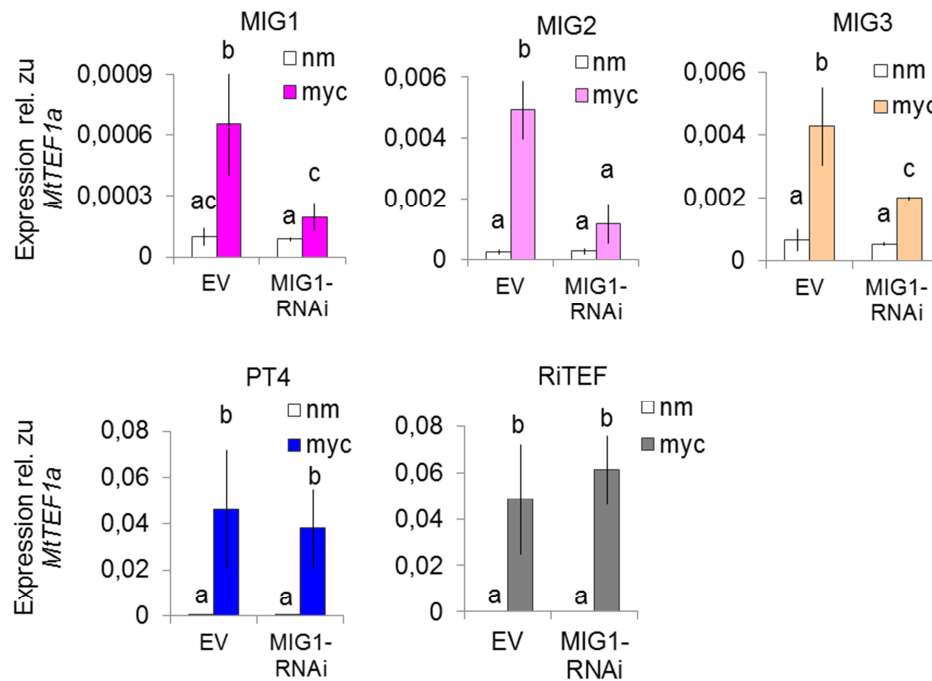
**Abbildung 2.19** Verwendete RNAi-Konstrukte zur Herunterregulation des *MIG1*-Transkripts. Abgebildet ist ein Alignment, welches mit Hilfe von Clustal Omega erstellt wurde und 600 bp der Nukleotidsequenz von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* darstellt. Die ausgewählte Sequenz umschließt das Startcodon ATG (gelb). Übereinstimmende Basen in allen drei Sequenzen wurden durch einen Stern unterhalb der Sequenz markiert. Die Sequenzabschnitte, welche zur Herstellung von *Haarnadel*-Strukturen verwendet wurden, sind mit farbigen Linien jeweils über der Sequenz gekennzeichnet. RNAi.1 207 bp (lila), RNAi.2 213 bp (orange), RNAi.3 315 bp (blau) und RNAi.4 422 bp (grün).

In Kombination mit dem 35S-Promotor konnte jedoch in keinem der Versuche eine effiziente Herunterregulation von *MIG1* erreicht werden, auch nicht bei der Verwendung von *composite* Pflanzen anstatt Wurzelkulturen (Tab. 2.4). Pumplin *et al.* (2012) berichten von einer Reduktion der 35S-Promotoraktivität in Arbuskel-enthaltenden Zellen. Da *MIG1* ausschließlich in eben solchen Zellen exprimiert wird, könnten RNAi-Konstrukte in Kombination mit dem 35S-Promotor ungeeignet sein, um die Expression von *MIG1* gezielt herunterzuregulieren. Folglich wurden alternative Promotoren für die Expression der RNAi-Konstrukte verwendet. Zum einen wurde die Expression durch den konstitutiven Promotor von *AtUBI3* (*Ubiquitin3*) verwendet und zum anderen der Promotor des AM-Markergens *MtPT4*, welches in Arbuskel-enthaltenden Zellen aktiviert wird (Devers *et al.*, 2013). In der Tat konnte mit Hilfe dieser Promotoren eine Reduktion des *MIG1*-Transkriptes erreicht werden.

**Tabelle 2.4 Übersicht der durchgeführten MIG1-RNAi Versuche.** Aufgeführt sind die verwendeten Konstrukte (Promotor und RNAi-Sequenz, vgl. Abb. 2.20), das Mykorrhizierungssystem, die Inokulationszeit, ein Verweis auf eine zugehörige Abbildung und ob eine Herunterregulierung von *MIG1* erreicht wurde.

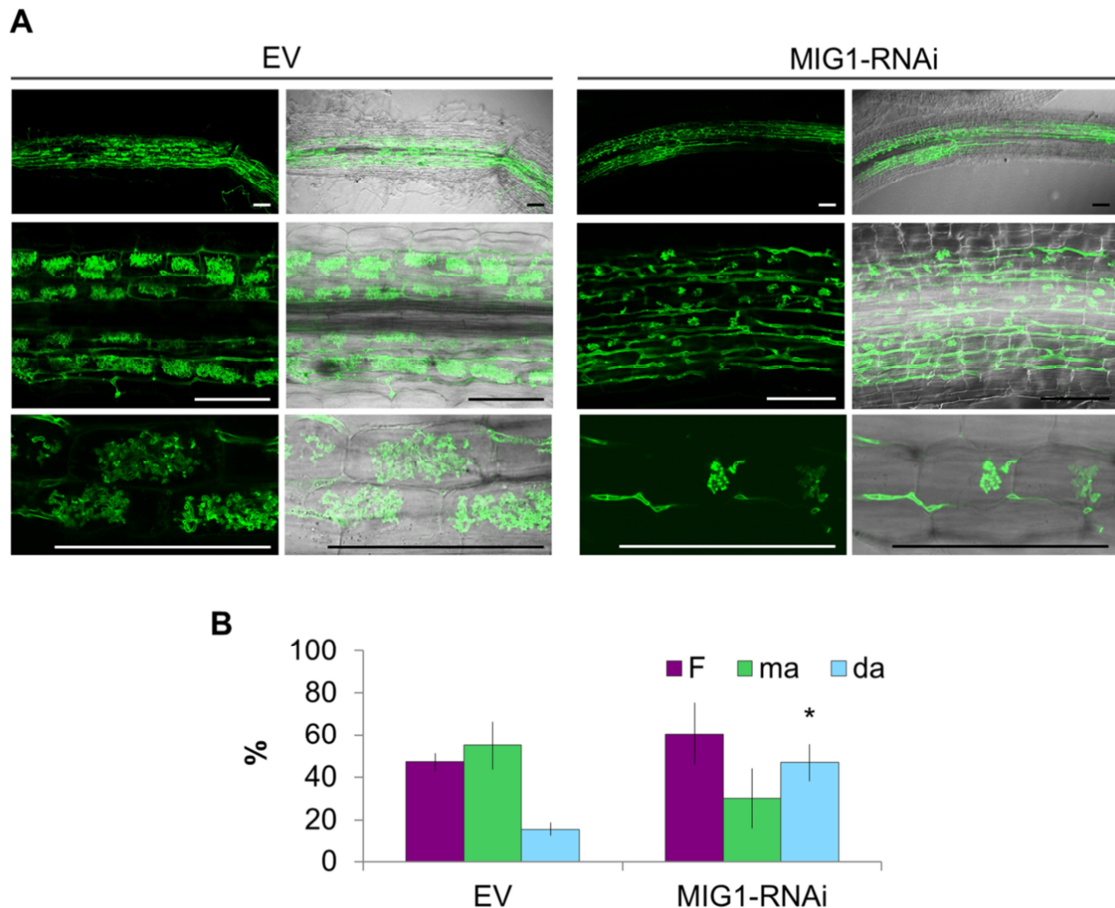
Promotor	RNAi-Konstrukt	Mykorrhizierungssystem	Inokulationszeit	Abbildung	Herunterregulation von <i>MIG1</i>
P35S	RNAi.1	Wurzelkultur	8 dpi	2.19	nein
P35S	RNAi.2	Wurzelkultur	11 dpi		nein
P35S	RNAi.3	<i>composites</i>	5 wpi		nein
P35S	RNAi.4	<i>composites</i>	5 wpi		nein
PA <i>tUBI3</i>	RNAi.3	<i>composites</i>	5 wpi	2.20	ja
PM <i>tPT4</i>	RNAi.3	<i>composites</i>	5 wpi	2.22	ja
PM <i>tPT4</i>	RNAi.4	<i>composites</i>	5 wpi		ja

In Wurzeln, welche mit dem Konstrukt PA*tUBI3*-*MIG1*-RNAi.3 transformiert und mykorrhiziert waren, konnte eine Herunterregulation der *MIG1*-Expression von 70 % erreicht werden (Abb. 2.20). Die Transkriptmenge ist dabei so niedrig, dass kein signifikanter Unterschied zu EV-Proben, welche nicht mykorrhiziert wurden, vorlag. Auch die Duplikationen *MIG2* und *MIG3* erfuhren eine signifikante Reduktion ihrer Expressionen (*MIG2*: 76 %; *MIG3*: 54 %). Das Arbuskelmarkergen *PT4* zeigte eine leicht verminderte Expression in den RNAi-Linien, welche allerdings nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu konnte eine schwache Induktion der *RiTEF*-Expression gemessen werden, dieser Unterschied war aber ebenfalls nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 2.20 Herunterregulation von *MIG1* in *composite* Pflanzen durch das Konstrukt *PA*tUBI3-*MIG1*-RNAi.3.** *Composite* Pflanzen transformiert mit EV oder *MIG1*-RNAi.3 wurden mit (myc) oder ohne (nm = nicht mykorrhiziert) *R. irregularis* inkubiert und 5 wpi geerntet. Die Expressionslevel von *MIG1*, *MIG2*, *MIG3*, dem Mykorrhizamarker *PT4* und dem pilzlichen Markergen *RiTEF* wurden per qPCR ermittelt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Die Herunterregulation von *MIG1* konnte verifiziert werden. Auch *MIG2* und *MIG3* haben ein vermindertes Expressionsniveau in den *MIG1*-RNAi Linien. *PT4* zeigt eine schwache Reduktion, *RiTEF* dagegen eine leicht höhere Expression in den *MIG1*-RNAi Linien. (n ≥ 3, Fehlerbalken entsprechen SD. Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit p-Wert < 0,05).

Eine phänotypische Evaluation der kolonisierten *PA*tUBI3-*MIG1*-RNAi.3 Wurzeln wurde mit Hilfe einer WGA-FITC-Färbung pilzlicher Strukturen durchgeführt. In den RNAi-Linien konnte ein Defekt in der Arbuskelreifung festgestellt werden (Abb. 2.21). So wurde in diesen Linien verglichen mit EV-Wurzeln eine verringerte Zahl reifer Arbuskeln (ma % - *mature arbuscules*) festgestellt, im Vergleich dazu konnte eine signifikant erhöhte Zahl deformierter und weniger stark ausgebildeter Arbuskeln (da %) ermittelt werden (Abb. 2.21 B). Eine Quantifizierung der Mykorrhizierungsfrequenz (F %) und damit die Kolonisierung durch den AM-Pilz wiesen dagegen keinen Unterschied zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln auf.

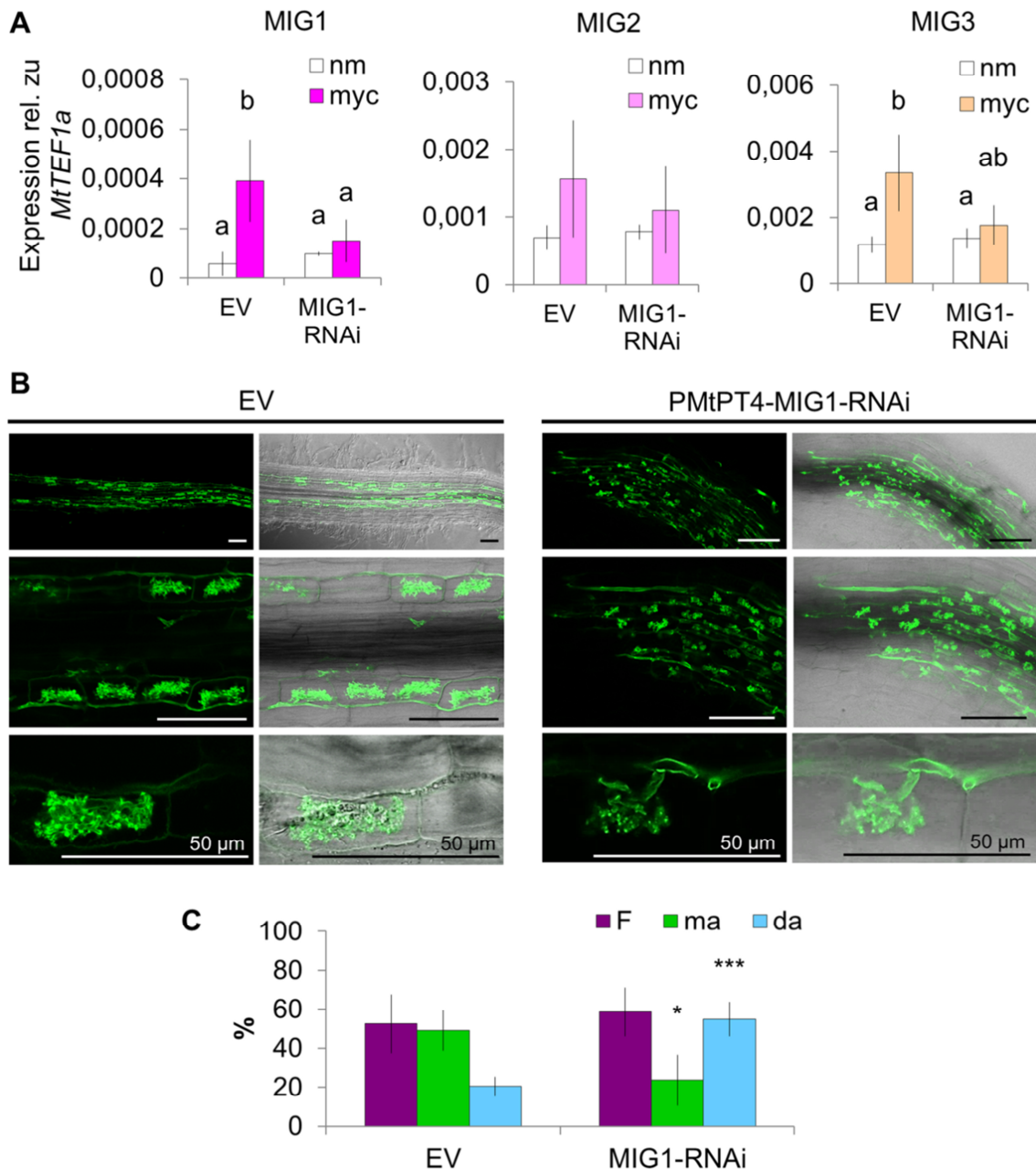


**Abbildung 2.21 Phänotypische Evaluation und Quantifizierung der Mykorrhizierung in PATUBI3-MIG1-RNAi.3 composite Pflanzen.** Composite Pflanzen transformiert mit EV oder MIG1-RNAi.3 wurden mit (myc) oder ohne (nm = nicht mykorrhiziert) *R. irregularis* inkubiert und 5 wpi geerntet. **(A)** Visualisierung repräsentativer pilzlicher Strukturen in EV (links) und PATUBI3-MIG1-RNAi Wurzeln (rechts) nach Färbung mit WGA-FITC. Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung der Mykorrhizierung nach Trouvelot *et al.* (1986). Die Frequenz der Kolonisierung (F%) ist in beiden Linien vergleichbar. Die Anzahl an reifen Arbuskeln (ma % = *mature arbuscules*) ist in den RNAi-Linien vermindert, wohingegen die Anzahl an unreifen, deformierten Arbuskeln (da %) erhöht ist. Analyzierte Wurzelfragmente: 224 (EV); 284 (MIG1-RNAi). ( $n \geq 3$ , Fehlerbalken entsprechen SD. Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet; \*p-Wert < 0,05).

Um diesen Phänotyp zu verifizieren wurde ein zweites Konstrukt, PMtPT4-RNAi.3-MIG1, auf seine Auswirkung in der Mykorrhizierung untersucht. Mit Hilfe des Arbuskel-spezifischen Promotors von *PT4* wurde eine signifikante Herunterregulierung des *MIG1*-Transkriptes von 62 % erreicht (Abb. 2.22 A). Auch durch dieses Konstrukt wurde die Expression der Duplikationen *MIG2* und *MIG3* beeinflusst. Im Vergleich zum vorherigen Ergebnis wurde hierbei allerdings eine wesentlich schwächere Reduktion von 29 % (*MIG2*) bzw. 47 % (*MIG3*) quantifiziert, wobei in beiden Fällen keine Signifikanz festgestellt werden konnte. Eine visuelle Quantifizierung der Mykorrhizierung konnte die vorherigen Ergebnisse bestätigen (Abb. 2.22 B und C). Obwohl die Frequenz der Mykorrhizierung vergleichbar war, konnte in PMtPT4-MIG1-RNAi Wurzeln eine signifikant verringerte Anzahl reifer Arbuskeln und überdies eine signifikante Zunahme an kleinen deformierten Arbuskeln gemessen werden. Entsprechend dieser Ergebnisse konnte der

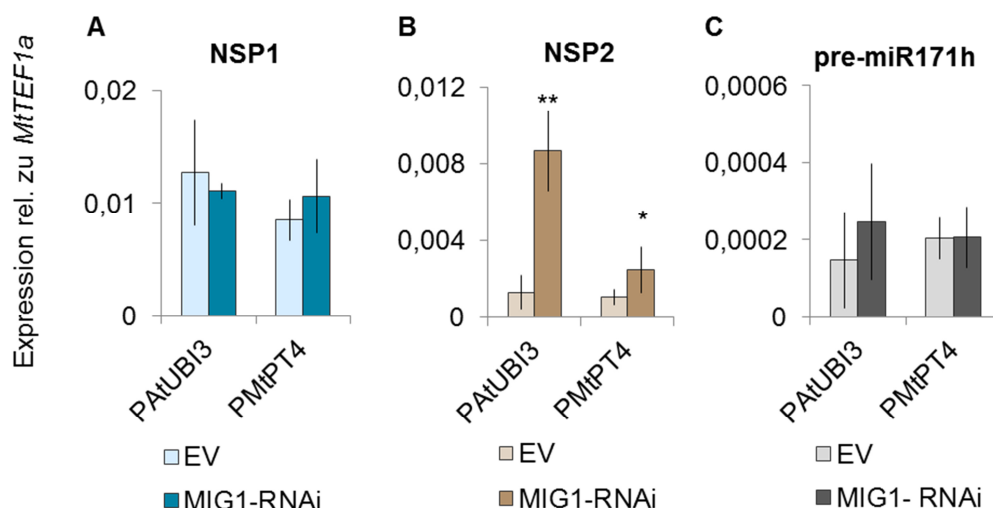


Reduktion des *MIG1*-Transkriptes in zwei unabhängigen Untersuchungen ein Phänotyp in der Arbuskelentwicklung zugeschrieben werden.



**Abbildung 2.22 Herunterregulation von *MIG1* in *composite* Pflanzen durch das Konstrukt PMtPT4-MIG1-RNAi.3.** *Composite* Pflanzen transformiert mit EV oder MIG1-RNAi.3 wurden mit (myc) oder ohne (nm = nicht mykorrhiziert) *R. irregularis* inkubiert und 5 wpi geerntet. **(A)** Die Expressionslevel von *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* wurden per qPCR ermittelt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Die Herunterregulation von *MIG1* konnte verifiziert werden. *MIG2* und *MIG3* haben ein nur leicht vermindertes Expressionsniveau in den MIG1-RNAi Linien. **(B)** Visualisierung repräsentativer pilzlicher Strukturen in EV (links) und PMtPT4-MIG1-RNAi Wurzeln (rechts) nach Färbung mit WGA-FITC. Maßstabsbalken entsprechen wenn nicht anders angegeben 100  $\mu$ m. **(C)** Quantifizierung der Mykorrhizierung nach Trouvelot *et al.* (1986). Die Frequenz der Kolonisierung (F%) ist in beiden Linien vergleichbar. Die Anzahl an reifen Arbuskeln (ma % = *mature arbuscules*) ist in den RNAi-Linien signifikant vermindert, wohingegen die Anzahl an unreifen, deformierten Arbuskeln (da %) signifikant erhöht ist. Analytierte Wurzelfragmente: 349 (EV); 178 (MIG1-RNAi). (n  $\geq$  3, Fehlerbalken entsprechen SD. Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet; unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert < 0,05; \*p-Wert < 0,05; \*\*\*p-Wert < 0,001).

Ein Phänotyp in der Arbuskelentwicklung geht oft mit einer veränderten Expression von AM-Genen einher. So konnte in *ram1*-Mutanten neben einer gestörten Arbuskelverzweigung auch eine Reduktion von AM-asoziierten Genen, wie *RAD1* (Park *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015), *STR* (Zhang *et al.*, 2010), *EXO70I* (Zhang *et al.*, 2015b), *Vapyrin* (Pumplin *et al.*, 2010), *PT4* (Harrison *et al.*, 2002), *AMT2;4* und *AMT2;5* (Breuillin-Sessoms *et al.*, 2015) beobachtet werden (Park *et al.*, 2015). Um zu testen, ob auch eine *MIG1*-Herunterregulation zur Reduktion von Genexpressionen während der AM-Symbiose führt, wurden bekannte Markergene in mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln quantifiziert. Interessanterweise konnte keine Expressionsänderung von Arbuskel-assoziierten Genen, wie den GRAS-Proteinen *RAM1*, *RAD1*, *DELLA1* oder *DELLA2* festgestellt werden. Auch Gene, die eine Funktion im PAM-Aufbau inne haben, wie *EXO70I*, *STR* oder *Vapyrin* sowie Gene die den Nährstoff-Transport während der AM-Symbiose vermitteln, wie *AMT2;4*, *AMT2;5* und *PT4* zeigten keine signifikanten Expressionsänderungen in *MIG1*-RNAi-Wurzeln. Überraschenderweise konnte aber eine starke Induktion des GRAS-Gens *NSP2*, nicht aber seines funktionellen Pendantes *NSP1* beobachtet werden (Abb. 2.23 A und B). Die Verfügbarkeit des *NSP2*-Transkripts wird durch die Mikro-RNA *miR171h* reguliert (Devers *et al.*, 2011). Um zu überprüfen, ob die Induktion von *NSP2* durch eine Reduktion von *miR171h* hervorgerufen wird, wurde dessen Vorstufe (*precursor*), die *pre-miR171h* gemessen. Diese zeigt jedoch keine Veränderung ihrer Abundanz in *MIG1*-RNAi-Linien (Abb. 2.23 C). *MIG1* kann demnach als Negativregulator von *NSP2* bezeichnet werden, wobei diese Transkriptionsregulation unabhängig von *miR171h* zu sein scheint.

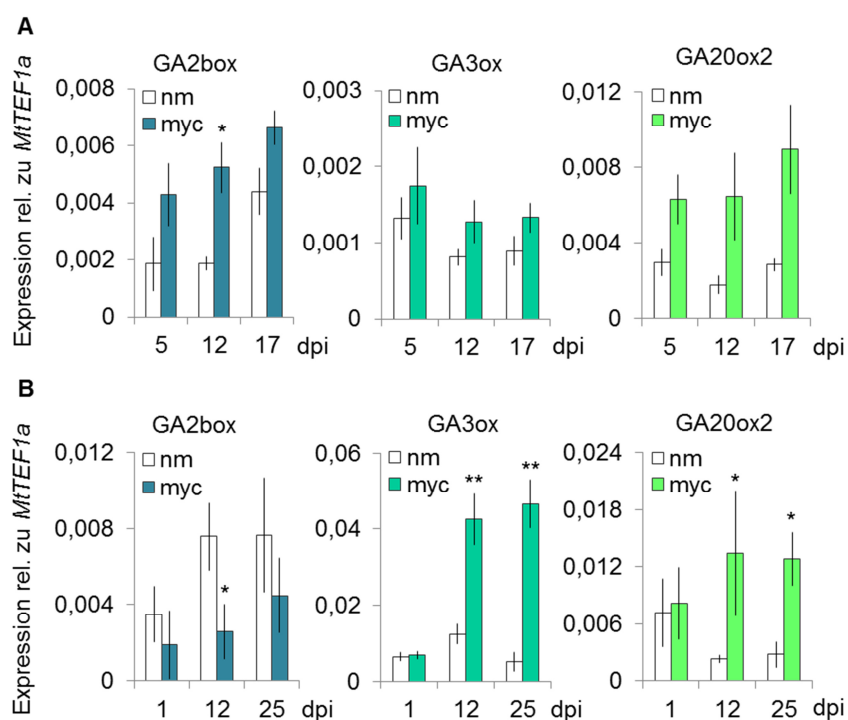


**Abbildung 2.23 MIG1-RNAi Wurzeln zeigen eine spezifische Induktion der Expression des GRAS-Gens NSP2.** Composite Pflanzen transformiert mit EV oder MIG1-RNAi.3 wurden mit *R. irregularis* inkubiert und 5 wpi geerntet. Das Expressionslevel von NSP1 (A), NSP2 (B) und der Vorstufe der NSP2-regulierenden Mikro-RNA *miR171h* (*pre-miR171h*) (C) wurden per qPCR ermittelt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Die Herunterregulierung von *MIG1* führt zu einer Induktion der *NSP2*-Expression, die nicht durch Regulation der Mikro-RNA *miR171h* hervorgerufen wird. (Fehlerbalken entsprechen SD.  $n \geq 3$ . Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01).

## 2.7 Die AM-Symbiose interferiert mit der GA-Homöostase

Die bisherigen Parallelen zu DELLA-Proteinen, wie die nahe Verwandtschaftsbeziehung (2.3), die vorhandene TA-Aktivität (2.4) und Ähnlichkeit des Arbuskelphänotyps von MIG1-RNAi (2.6) und der DELLA-Doppelmutanten *della1/della2* (Floss *et al.*, 2013) lassen die Vermutung aufkommen, dass MIG1 eine ähnliche Funktion wie DELLAs ausüben könnte. DELLA-Proteine sind in der Regulation der GA-Antwort involviert. In der AM-Symbiose wurde Gibberellin eine negative Rolle in der Arbuskelentwicklung zugeschrieben (El Ghachtouli *et al.*, 1996; Floss *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015). Allerdings konnte ein Anstieg der GA-Synthese im Laufe der Mykorrhizierung festgestellt werden (Garcia-Garrido *et al.*, 2010; Ortu *et al.*, 2012; Floss *et al.*, 2013; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015), welcher mit einer Zunahme des GA-Gehaltes korrelierte (Shaul-Keinan *et al.*, 2002; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015). Diese kontroversen Ergebnisse lassen die Hypothese aufkommen, dass für eine erfolgreiche Ausbildung der AM-Symbiose eine fein-regulierte GA-Homöostase notwendig zu sein scheint.

Um einen Einblick in diese Regulation zu erhalten, wurden die Transkripte verschiedener GA-Oxidasen während der Mykorrhizierung quantifiziert. Diese qPCR-Analyse wurde sowohl in mykorrhizierten WT *M. truncatula* Pflanzen, als auch in mykorrhizierten Wurzelkulturen durchgeführt (Abb. 2.24). In Wurzeln von mykorrhizierten Wildtyp Pflanzen



**Abbildung 2.24** Expression von GA-Oxidasen in mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln. Dargestellt ist die Expression von *GA2box*, *GA3ox* und *GA20ox2* in mykorrhizierten Wildtyp Pflanzen (A) und Wurzelkulturen (B). Die Wurzeln wurden mit (= myc) oder ohne *R. irregularis* (nm = nicht mykorrhiziert) inokuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. (n = 3, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz zwischen nm und myc verwendet. \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01).

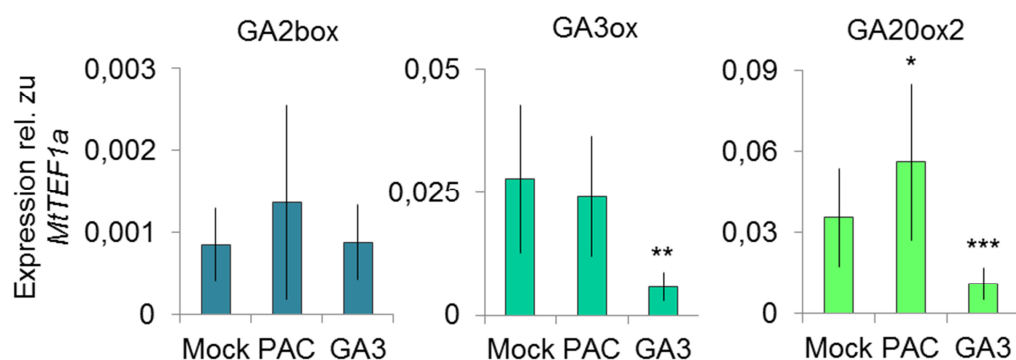


konnte eine signifikante Induktion der *GA2box*-Transkriptmenge, einer katabolen Oxidase, nachgewiesen werden, die anabolen Oxidasen *GA3ox* und *GA20ox2* zeigten nur einen leichten Anstieg im Vergleich zu den unmykorrhizierten Proben, welcher aber nicht signifikant vorlag (Abb. 2.24 A). In mykorrhizierten Wurzelkulturen zeigte sich ein anderes Bild: die Expression der katabolen Oxidase *GA2box* war im Gegensatz zu den ganzen Pflanzen signifikant reduziert, die anabolen Oxidasen erfuhren eine signifikante Induktion ihrer Expression (Abb. 2.24 B).

Zur Homöostase der Gibberelline zählen zahlreiche Rückkopplungsmechanismen. Der Gehalt an physiologisch aktivem Gibberellin kontrolliert so die eigene Synthese. Anabole Oxidasen (*GA20ox2* und *GA3ox*) unterliegen dabei meist einer negativen, katabole Oxidasen (*GA2ox*) einer positiven Rückkopplung (Abb. 1.5) (Phillips *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995).

Um zu prüfen, ob auch die untersuchten Oxidasen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, einem Rückkopplungsmechanismus unterliegen, wurde die Transkriptmenge von *GA2box*, *GA3ox* und *GA20ox2* in Wurzeln behandelter *M. truncatula* Pflanzen quantifiziert. Abbildung 2.25 zeigt die Transkriptmengen der Oxidasen nach exogener Behandlung mit dem aktiven Gibberellin  $GA_3$  oder dem GA-Synthese Inhibitor Paclobutrazol (PAC). Die katabole Oxidase *GA2box* wurde im Vergleich zur Mock-Behandlung in diesem Versuch nicht differentiell transkribiert. Die Expression von *GA3ox* wurde durch  $GA_3$  reduziert. Auch die Expression der Oxidase *GA20ox2* wurde durch  $GA_3$  gehemmt. Eine Verminderung der endogenen GA-Konzentration durch PAC hatte dagegen einen Anstieg des *GA20ox2*-Transkriptes zur Folge.

Die anabolen Oxidasen *GA3ox* und *GA20ox2* unterlagen unter diesen Versuchsbedingungen einer negativen Rückkopplung durch aktives GA.



**Abbildung 2.25 Expression von GA-Oxidasen nach Behandlung mit  $GA_3$  oder PAC.** Wildtyp *M. truncatula* Pflanzen wurden 15 d auf modifiziertem Fahraeus-Medium supplementiert mit 1  $\mu$ M PAC, 1  $\mu$ M  $GA_3$  oder Mock-Lösung (0,001 % EtOH) inkubiert. Die Expression der GA-Oxidasen *GA2box*, *GA3ox* und *GA20ox2* wurde in den Wurzeln per qPCR analysiert und mit dem Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. *GA3ox* und *GA20ox2* zeigten eine Reduktion ihrer Expression durch  $GA_3$ -Behandlung. (n = 3, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz zur Mock-Kontrolle verwendet. \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

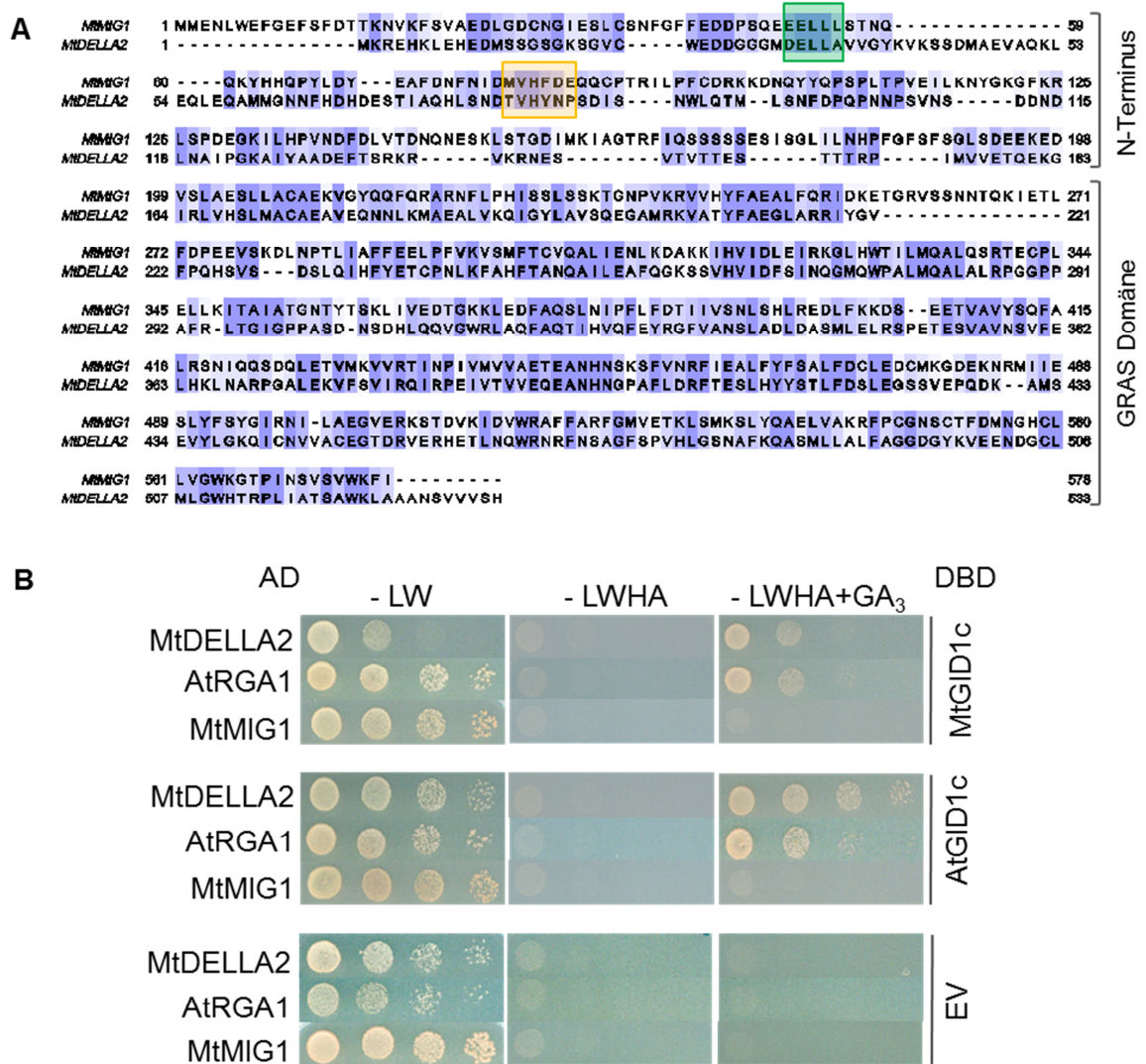
Die aufgezeigten Rückkopplungsmechanismen der anabolen Oxidasen weisen auf eine komplexe Regulation der GA-Homöostase hin. Martin-Rodriguez *et al.* (2015) konnten in Tomate zeigen, dass ein Anstieg anaboler Oxidasen während der AM-Symbiose, welcher auch in mykorrhizierten *M. truncatula* zu sehen ist (Abb. 2.24), direkt mit einem Anstieg des GA-Gehaltes korrelierte.

### 2.8 GA beeinflusst nicht direkt die Abundanz von MIG1

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass es während der AM-Symbiose zu einer fein abgestimmten Restrukturierung des GA-Haushaltes kommt. Im Folgenden wurde der Fragestellung nachgegangen, ob MIG1 wie auch seine verwandten DELLA-Proteine durch das Hormon Gibberellin reguliert sein könnte.

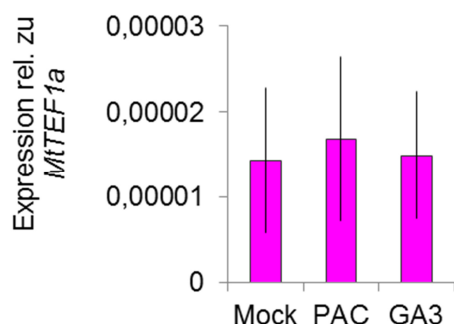
Die charakteristische und namensgebende DELLA-Domäne im N-terminus der DELLA-Proteine ist für eine GA-vermittelte Interaktion mit dem GA-Rezeptor *GID1* verantwortlich (Murase *et al.*, 2008). Daraufhin werden DELLA-Proteine ubiquitiniert und schließlich degradiert (Abb. 1.6) (Hauvermale *et al.*, 2012). DELLA-Proteine der Lycophyten *Selaginella kraussiana* und *S. moellendorffii* stellen Zwischenschritte der Evolution dar und sind in der Lage eine Interaktion mit GA-Rezeptoren einzugehen, obwohl sie modifizierte DELLA Domänen besitzen (Sk: DEHLA; Sm: DSMLA) (Hirano *et al.*, 2007; Yasumura *et al.*, 2007).

Ein Alignment der Proteinsequenz von MtMIG1 und MtDELLA2 deckte auch in MIG1 ein DELLA-ähnliches Motiv auf (EELLL; Abb. 2.26 A). Um zu testen, ob es MtMIG1 möglich ist durch dieses DELLA-ähnliche Motiv mit *GID1*-Rezeptoren zu interagieren, wurde eine Y2H Analyse durchgeführt. Während MtDELLA2 und AtRGA innerhalb und zwischen den Arten eine Interaktion mit den Rezeptoren MtGID1c und AtGID1c eingingen, konnte MtMIG1 mit keinem der getesteten *GID1*-Proteine interagieren (Abb. 2.26 B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass MtMIG1, im Gegensatz zu DELLA-Proteinen, auf Proteinebene wahrscheinlich nicht durch GA-induzierte Proteolyse reguliert wird.



**Abbildung 2.26 Interaktionsanalyse von MIG1 und dem GA-Rezeptor GID1c im Y2H System. (A)** Alignment der Proteinsequenzen von MtMIG1 und MtDELLA2 mit Clustal Omega. Die AS sind entsprechend dem Farbcode Blosum62 in Jalview eingefärbt. Das Alignment zeigt ein DELLA-ähnliches Motiv (grün) und ein verändertes TVHYNP-Motiv (orange) in MIG1 auf. **(B)** Interaktionsanalyse von MIG1 und GID1c in *S. cerevisiae*. *TRP1* und *LEU2* wurden als Transformationsmarker, *HIS3* und *ADE2* als Reportergene verwendet. MtMIG1, MtDELLA2 und AtRGA1 wurden in den pGADT7-Vektor (AD) integriert. Die GA-Rezeptoren MtGID1c und AtGID1c wurden als Köder innerhalb und zwischen den Arten verwendet und in den pGBKT7-Vektor (DBD) integriert. Als Kontrolle wurde der Leervektor (EV) verwendet. Das Selektionsmedium wurde mit GA<sub>3</sub> supplementiert, um eine Interaktion zwischen Rezeptor und GRAS-Protein zu stimulieren. MtDELLA2 und AtRGA1 interagieren mit beiden getesteten Rezeptoren. MtMIG1 zeigt dagegen keine Interaktion mit den GA-Rezeptoren in Hefe.

Im weiteren Verlauf wurde getestet, ob MIG1, wie beispielsweise OsSLR1, eine Regulation auf Transkriptionsebene durch den GA-Haushalt erfährt (Ogawa *et al.*, 2000; OsGAI = OsSLR1). Um einen Einfluss des GA-Haushaltes auf die Transkriptmenge von *MIG1* zu untersuchen, wurden *M. truncatula* Pflanzen exogen mit GA<sub>3</sub> oder dem GA-Synthese Inhibitor PAC behandelt und die Expression per qPCR in den Wurzeln quantifiziert. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte keine Regulation von *MIG1* durch Applikation von GA<sub>3</sub> oder PAC beobachtet werden (Abb. 2.27).

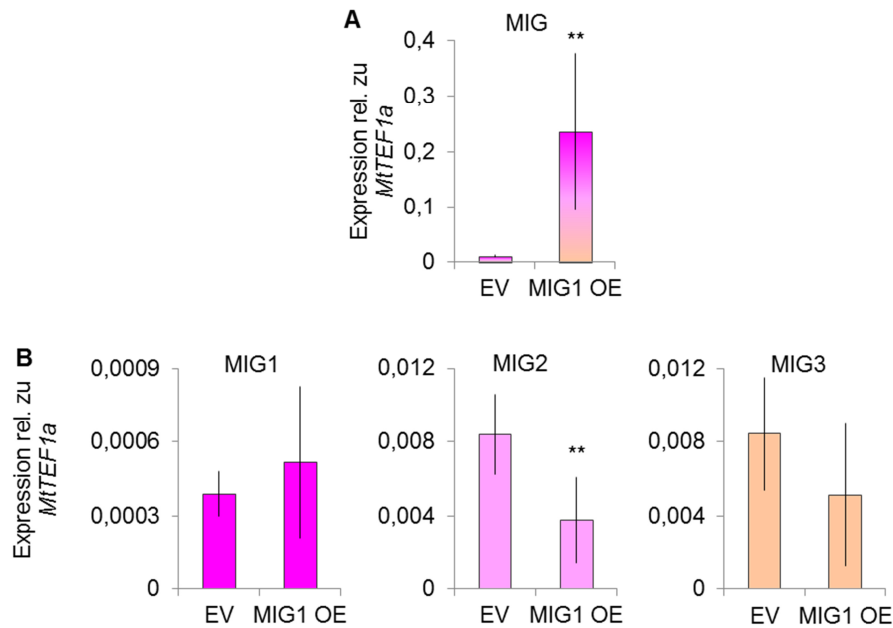


**Abbildung 2.27 Expression von *MIG1* nach Behandlung mit  $GA_3$  oder PAC.** Wildtyp *M. truncatula* Pflanzen wurden 15 d auf modifiziertem Fahraeus-Medium supplementiert mit 1  $\mu$ M PAC, 1  $\mu$ M  $GA_3$  oder Mock-Lösung (0,001 % EtOH) inkubiert. Die Expression von *MIG1* wurde in den Wurzeln per qPCR analysiert und mit dem Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. *MIG1* zeigt keine Regulation seiner Transkriptmenge durch den GA-Haushalt. (n = 3, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet).

Weder durch eine Bindung an den GA-Rezeptor auf Proteinebene, noch auf Transkriptebene konnte eine Regulation von *MIG1* durch den GA-Haushalt nachgewiesen werden.

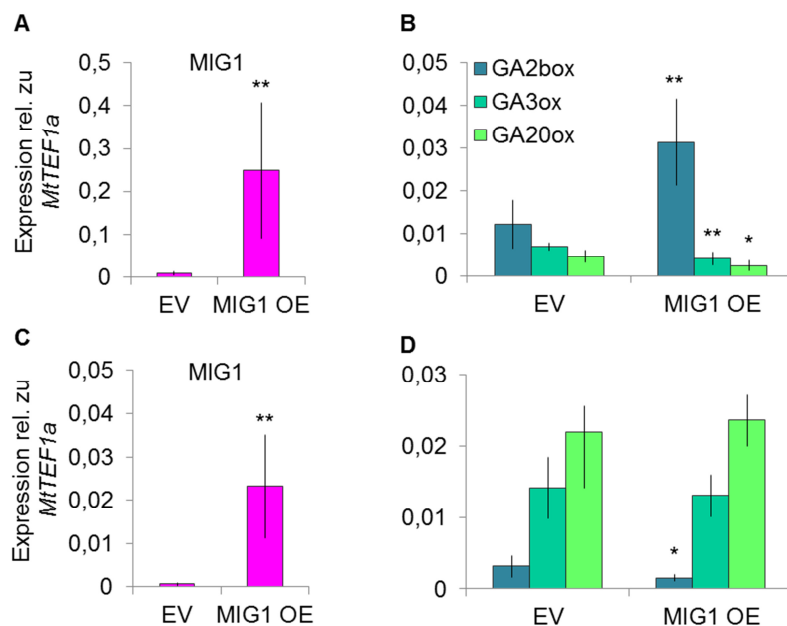
### 2.9 Eine Überexpression von *MIG1* interferiert mit der GA-Homöostase

Es konnte im vorherigen Abschnitt keine Regulation von *MIG1* durch den GA-Haushalt nachgewiesen werden. Umgekehrt könnte aber *MIG1* eine Funktion bei der Regulation der GA-Homöostase inne haben, so wie es für die DELLA-ähnlichen Proteine OsSLRL1 und OsSLRL2 nachgewiesen werden konnte (Itoh *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007b). Um diese Hypothese zu testen, wurde *MIG1* in *M. truncatula* Wurzeln mit Hilfe des CaMV 35S-Promotors konstitutiv überexprimiert (*over expression* – OE). Im ersten Schritt sollte diese Überexpression von *MIG1* verifiziert werden. Da das verwendete Konstrukt lediglich den ORF von *MIG1* beinhaltet, konnten die spezifischen qPCR-Primer, welche im 3'-UTR binden, nicht verwendet werden. Diese erfassen nur das endogene *MIG1*-Transkript. Deshalb wurden für die Validierung der Überexpression qPCR-Primer verwendet, welche im ORF binden (*MIG1ORF*-qPCR F und R). Aufgrund der hohen Identität zu *MIG2* und *MIG3* amplifizieren diese Primer wahrscheinlich eine Transkript-Mischung der drei Duplikationen. Eine Quantifizierung zeigte einen deutlichen Anstieg der Transkriptmenge von über 2000 % im Vergleich zu Kontroll-Wurzeln (Abb. 2.28 A). Zusätzlich wurden die endogenen Transkripte der *MIG*-Gene durch spezifische Primer im 3'-UTR gemessen (Abb. 2.28 B). Während *MIG1* und *MIG3* keine signifikanten Änderungen ihrer Expression zeigten, war die Transkriptmenge von *MIG2* in den *MIG1* OE Wurzeln leicht reduziert. Die Ergebnisse verifizieren eine Überexpression des *MIG1*-Transkriptes in den transformierten *MIG1* OE Wurzeln.



**Abbildung 2.28 Expression der MIG-Gene in MIG1 OE Wurzelkulturen.** Wurzelkulturen wurden mit EV oder MIG1 OE transformiert und über mehrere Generationen kultiviert. **(A)** Die Überexpression von *MIG1* wurde durch Primer nachgewiesen welche im ORF binden. Aufgrund der hohen Homologie zu *MIG2* und *MIG3* entsprach die gemessene Expression (*MIG*) einer Mischung aus *MIG1*, *MIG2* und *MIG3*. **(B)** Die Expression der endogenen Transkripte wurde mit spezifischen Primern, im jeweiligen 3'-UTR, gemessen. *MIG1* und *MIG3* zeigten keine signifikanten Änderungen. *MIG2* zeigte eine leichte Herunterregulation durch *MIG1* OE. (n = 4, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet; \*\*p-Wert < 0,01).

Um eine mögliche Rolle von *MIG1* bei der Regulation des GA-Haushaltes aufzudecken, wurde die Expression von GA-Oxidasen in *MIG1* OE Wurzeln quantifiziert. Eine Überexpression von *MIG1* konnte sowohl in Wurzelkulturen (Abb. 2.29 A), als auch in *composite* Pflanzen (Abb. 2.29 C) erreicht werden. Interessanterweise führt eine Überexpression von *MIG1* tatsächlich zu einer Deregulation der Transkriptmenge der



**Abbildung 2.29 Expression der GA-Oxidasen in MIG1 OE Wurzeln.** *M. truncatula* Wurzeln wurden mit EV oder *MIG1* OE transformiert und die Überexpression von *MIG1* validiert (**A**: Wurzelkulturen; **C**: *composite* Pflanzen). Die Expression von den GA-Oxidasen *GA2ox*, *GA3ox* und *GA20ox2* wurde in Wurzelkulturen (**B**) und Wurzeln von *composite* Pflanzen (**D**) per qPCR analysiert und mit dem Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. (n = 4, Fehlerbalken entsprechen SD; Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet; \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01).

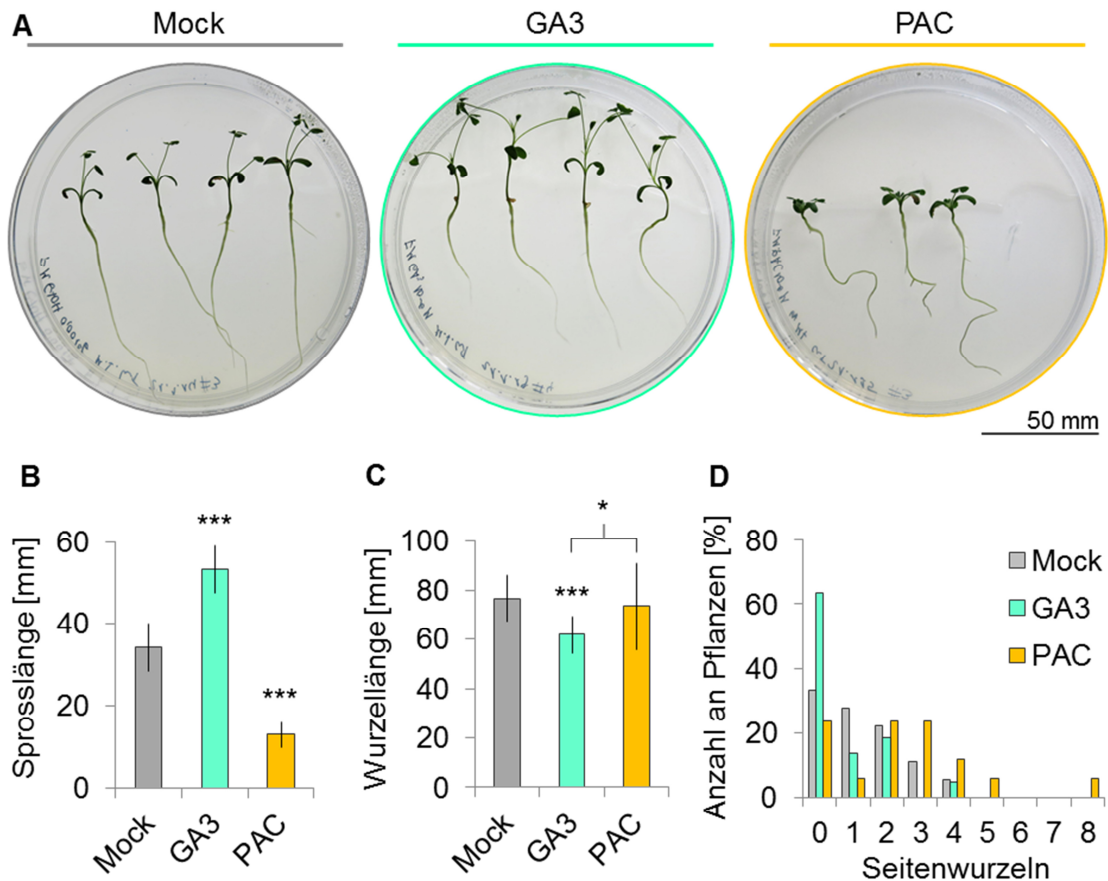


getesteten GA-Oxidasen *GA2box*, *GA3ox* und *GA20ox2* (Abb. 2.29). In Wurzelkulturen wurde eine erhöhte Expression der katabolen Oxidase *GA2box*, und eine verringerte Expression der anabolen GA-Oxidasen *GA3ox* und *GA20ox2* gemessen. Im Gegensatz dazu konnte in *composite* Pflanzen lediglich eine verringerte Expression von *GA2box* festgestellt werden. Nach diesem Ergebnis scheint eine Überexpression von *MIG1* mit dem GA-Haushalt zu interferieren.

### **2.10 GA-Verfügbarkeit wirkt sich auf den Phänotyp von *M. truncatula* aus**

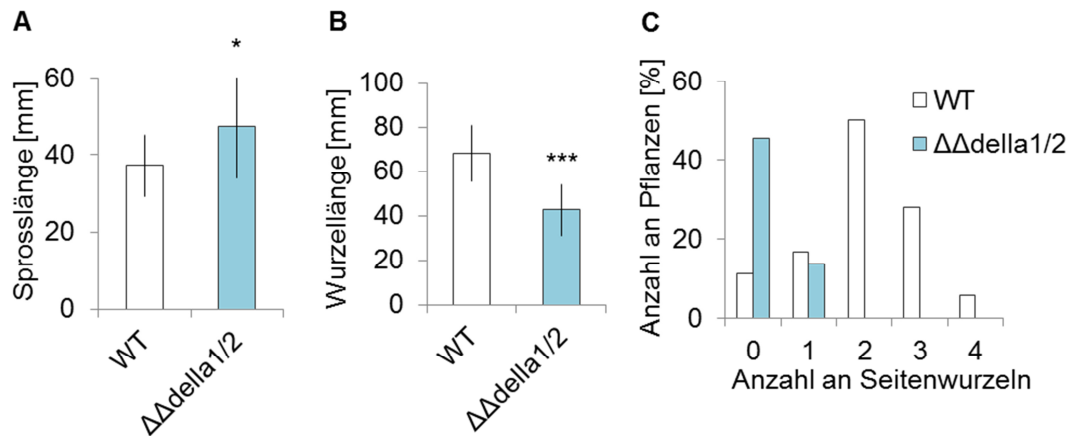
Das Phytohormon GA ist unter anderem mitverantwortlich für Wachstumsprozesse in Pflanzenzellen, wie beispielsweise die Elongation des Sprosses (Brian, 1959; Gupta & Chakrabarty, 2013). Die meisten Veröffentlichungen konzentrieren sich allerdings auf die Untersuchungen der GA-Effekte in Bezug auf oberirdische Pflanzenteile, da vor allem diese von ökonomischer Bedeutung sind. Zudem wurden viele Untersuchungen in der GA-Forschung in der Nichtwirtspflanze *A. thaliana* und den Monokotyledonen Reis und Mais durchgeführt, unter anderem da von diesen Pflanzen große Mutantensammlungen verfügbar sind.

In *M. truncatula* wurden bisher noch keine Versuche in dieser Richtung veröffentlicht. Folglich wurden die Auswirkungen eines veränderten GA-Gehaltes auf die makroskopische Morphologie von *M. truncatula* analysiert. Hierfür wurden zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen wurden *M. truncatula*-Keimlinge auf Platten mit den Additiven Mock,  $GA_3$  oder PAC direkt nach ihrer Keimung kultiviert und nach 15 d evaluiert (Abb. 2.30 A). Die Zugabe von exogenem  $GA_3$  erzielte eine deutliche Verlängerung des Sprosses, wohingegen die Inhibition der GA-Synthese durch PAC gedrungene Sprosse zur Folge hatte (Abb. 2.30 B). Auffällig war, dass in Wurzeln ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden konnte (Abb. 2.30 C).  $GA_3$  führte zu einer signifikanten Reduktion der Wurzellänge. Der GA-Inhibitor PAC hatte unter diesen Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Länge der Wurzeln. Auch bei der Anzahl der gebildeten Seitenwurzeln zeigte sich eine Auswirkung der verfügbaren GA-Konzentration (Abb. 2.30 D). Während Mock-behandelte Pflanzen nach 15 d zwischen 0 und 4 Seitenwurzeln ausgebildet hatten, konnte man unter den  $GA_3$ -behandelten Pflanzen mehr Wurzeln ohne Seitenwurzeln beobachten. In PAC-behandelten Pflanzen verschob sich die Zahl der Seitenwurzeln zu einer höheren Anzahl. Generell konnte man bei genauer Betrachtung der Wurzeln mit bloßem Auge feststellen, dass eine erhöhte GA-Verfügbarkeit zu dünneren Wurzeln führte, wohingegen GA-Verarmung dickere Wurzeln zufolge hatte.



**Abbildung 2.30 Makroskopische Morphologie von 15 d GA<sub>3</sub>- bzw. PAC-behandelten *M. truncatula*.** (A) *M. truncatula* Keimlinge wurden auf FM-Schrägagar, supplementiert mit 1  $\mu$ M GA<sub>3</sub>, 1  $\mu$ M PAC oder Mock (0,001 % EtOH), inkubiert. Nach 15 d wurde die makroskopische Morphologie der Pflanzen hinsichtlich der Sprosslänge (B), der Wurzellänge (C) und der Anzahl der Seitenwurzeln (D) statistisch ausgewertet. (n = 24, Experiment wurde zweimal wiederholt. Welch-Test wurde zur Berechnung der Signifikanz angewandt. Fehlerbalken entsprechen SD. \*p-Wert < 0,05; \*\*\*p-Wert < 0,001).

Eine Behandlung mit GA<sub>3</sub> zeigt sich molekular in der Degradation von DELLA-Proteinen, was zu einer Derepression der GA-Antwort führt (Hauvermale *et al.*, 2012). Um zu überprüfen ob die beobachteten Effekte in den GA-behandelten *M. truncatula* Pflanzen auf diese Derepression zurückzuführen sind, wurde die Morphologie der Doppelmutante  $\Delta\Delta$ della1/2, welche eine konstitutiv aktive GA-Antwort aufweist (Floss *et al.*, 2013), makroskopisch untersucht.  $\Delta\Delta$ della1/2-Pflanzen und segregierte WT-Pflanzen wurden 15 d auf Medium ohne Additive angezogen und anschließend geerntet. Neben einem verlängerten Spross konnte eine verkürzte Wurzel und eine reduzierte Zahl an Seitenwurzeln in  $\Delta\Delta$ della1/2-Pflanzen beobachtet werden (Abb. 2.31). Die Doppelmutante besaß demnach eine vergleichbare Morphologie wie Pflanzen welche mit GA<sub>3</sub> behandelt wurden (Abb. 2.30).

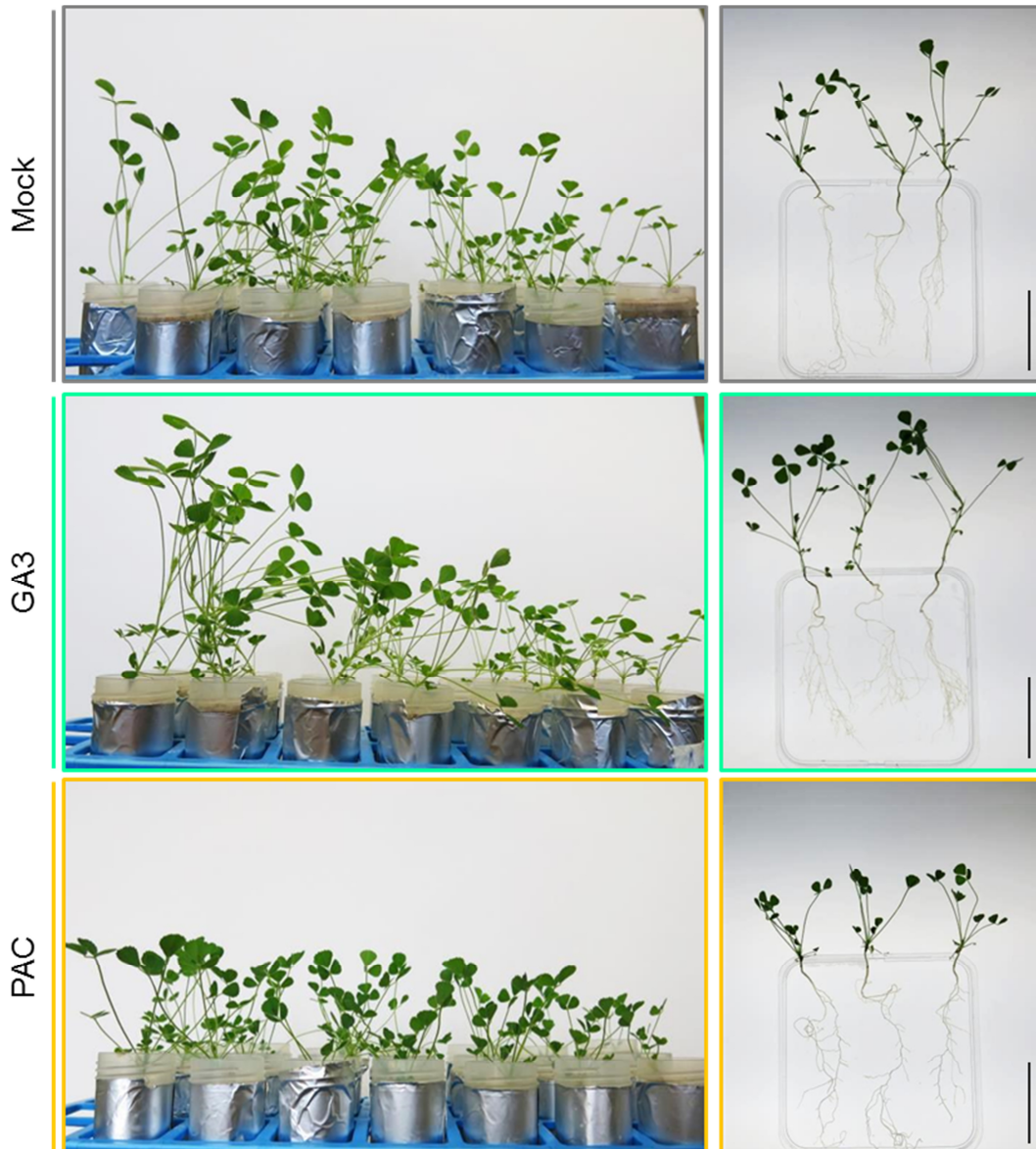


**Abbildung 2.31 Makroskopische Morphologie von 15 d alten WT *M. truncatula* und *della1/2*-Doppelmutanten.** *M. truncatula* Keimlinge wurden auf FM-Schrägagar inkubiert. Nach 15 d wurde die makroskopische Morphologie der Pflanzen hinsichtlich der Sprosslänge (A), der Wurzellänge (B) und der Anzahl der Seitenwurzeln (C) statistisch ausgewertet.  $n \geq 11$ . (Fehlerbalken entsprechen SD. Welch-Test wurde zur Berechnung der Signifikanz angewandt. \*p-Wert < 0,05; \*\*\*p-Wert < 0,001).

Bei einem zweiten Versuchsansatz wurden die Pflanzen erst zu einem späteren Zeitpunkt den Supplementen GA<sub>3</sub> bzw. PAC ausgesetzt. Die WT-Pflanzen wurden nach 4 w Kultivierung auf Platten ohne Additive eingetopft und anschließend 5 w mit Nährlösung und entsprechender Supplementierung (Mock, GA<sub>3</sub> oder PAC) gegossen. Der Phänotyp der 9 w alten Pflanzen ließ nach der Ernte einen ähnlichen GA-Effekt erkennen, wie unter den ersten Versuchsbedingungen (Abb. 2.32).

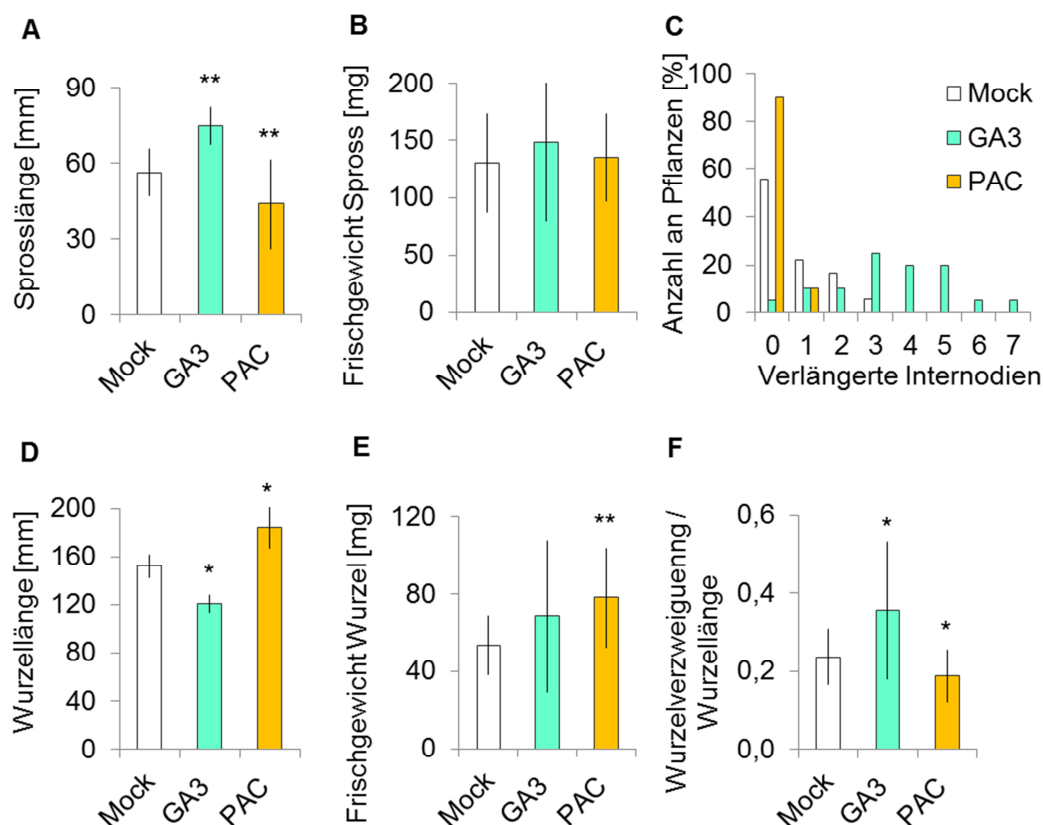
Phänotypisch zeigte sich bei einer GA<sub>3</sub>-Behandlung ein verlängerter Spross, was auf die erhöhte Anzahl verlängerter Internodien zurückgeführt werden konnte (Abb. 2.33 A, C). Eine Inhibition der GA-Synthese wirkte sich negativ auf die Länge des Sprosses aus, welcher nur selten verlängerte Internodien aufwies. Aufgrund des vorangeschrittenen Alters hatten die Pflanzen generell ein wesentlich stärker ausgebildetes Wurzelsystem mit vielen Verzweigungen unterschiedlicher Ordnungen. Erhöhte GA-Verfügbarkeit führte zu einer signifikanten Wachstumsreduktion der Hauptwurzeln wohingegen durch PAC-Behandlung eine signifikante Verlängerung der Hauptwurzel festzuhalten war. Eine GA<sub>3</sub>-Behandlung hatte außerdem dünnere Wurzeln zur Folge, welche heller erschienen (Abb. 2.32). PAC-behandelte Pflanzen besitzen dagegen dickere Wurzeln, welche im Durchlicht dunkler erschienen. Aufgrund der hohen Anzahl an Wurzelverzweigungen wurde die Anzahl aller Wurzelverzweigungen pro cm Hauptwurzellänge evaluiert (Abb. 2.33 F). Hierbei konnte man einen Anstieg der Verzweigungen durch erhöhte GA-Verfügbarkeit und folglich eine verringerte Zahl an Verzweigungen durch GA-Inhibition beobachten. Beachtenswert ist außerdem, dass eine Elongation des Sprosses nicht mit einem Anstieg des Sprossgewichtes einherging, da es sich bei verlängerten immer auch um dünnere Sprosse handelte (Abb. 2.33 B). Das Wurzelgewicht der GA<sub>3</sub>-behandelten Pflanzen war nicht verringert, die verkürzte Hauptwurzel konnte im Hinblick auf das Gewicht





**Abbildung 2.32 Makroskopische Morphologie von 5 w GA<sub>3</sub>- bzw. PAC-behandelten *M. truncatula*.** (A) 4 w alte *M. truncatula* Pflanzen wurden in Töpfe eingepflanzt und 5 w mit Nährlösung, supplementiert mit 1  $\mu$ M GA<sub>3</sub>, 1  $\mu$ M PAC oder Mock (0,001 % EtOH), gegossen. Nach 5 w wurden die Pflanzen im Topf fotografiert (links) und geerntet. Jeweils drei Pflanzen pro Behandlung sind exemplarisch abgebildet (rechts). n = 20. Maßstabsbalken entsprechen 50 mm.

wahrscheinlich durch die höhere Zahl an Seitenwurzeln ausgeglichen werden (Abb. 2.32 E). Eine PAC-Behandlung zeigte sich dagegen sowohl in verlängerten, als auch in dickeren Wurzeln, wodurch der Anstieg des Frischgewichtes erklärt werden kann.

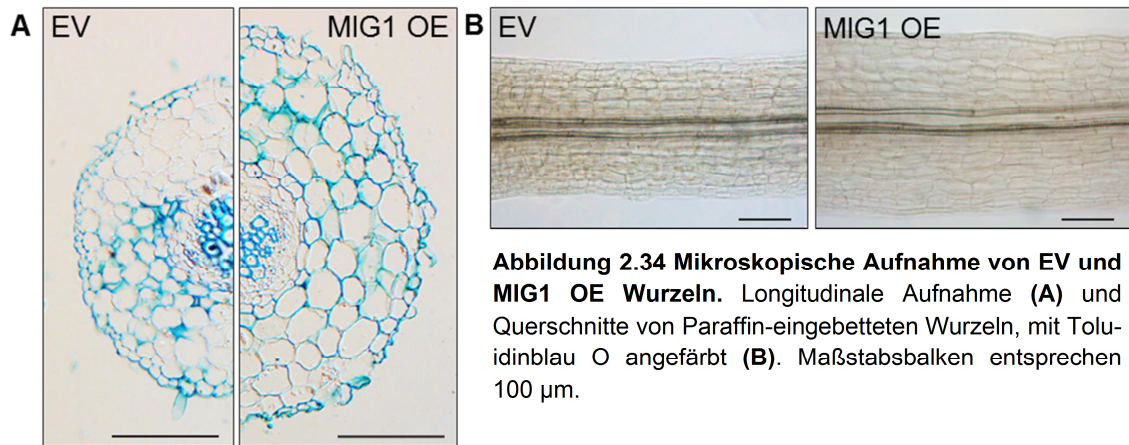


**Abbildung 2.33 Statistische Auswertung der makroskopischen Morphologie von 5 w GA<sub>3</sub>- bzw. PAC-behandelten *M. truncatula*.** 4 w alte *M. truncatula* Pflanzen wurden in Töpfe eingepflanzt und 5 w mit Nährlösung, supplementiert mit 1 µM GA<sub>3</sub>, 1 µM PAC oder Mock (0,001 % EtOH), gegossen. Nach 5 w wurden die Pflanzen geerntet und die makroskopische Morphologie der Pflanzen statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Sprosslänge (A), das Frischgewicht der Sprosse (B), die Anzahl der verlängerten Internodien pro Pflanze (C), die Länge der Hauptwurzel (D), das Frischgewicht der Wurzeln (E) und die Anzahl aller Wurzelverzweigungen pro cm Hauptwurzellänge (F). (n = 20. Fehlerbalken entsprechen SD. Welch-Test wurde zur Berechnung der Signifikanz angewandt. \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01).

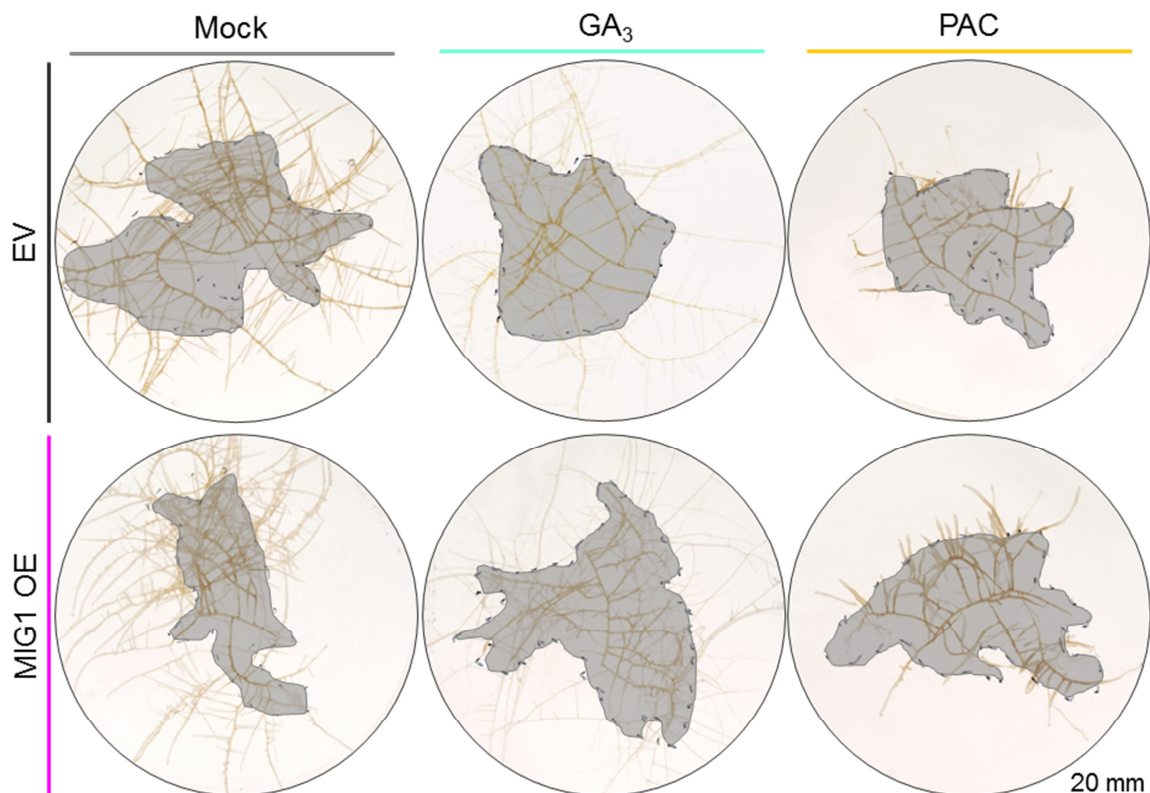
Unter beiden Versuchsbedingungen konnte GA<sub>3</sub> ein positiver Effekt auf die Elongation des *M. truncatula* Sprosses zugeschrieben werden. Im Hinblick auf das Wurzelwachstum konnte ein vermindertes Längenwachstum durch GA<sub>3</sub>-Applikation beobachtet werden. Zudem äußerste sich eine erhöhte GA-Verfügbarkeit in dünneren Organen, dies war sowohl bei Sprossen, als auch bei Wurzeln der Fall.

## 2.11 MIG1 moduliert die Entwicklung des Wurzelkortex

Um eine funktionelle Charakterisierung von MIG1 zu adressieren, wurden MIG1 OE Wurzeln mikroskopisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Überexpression von *MIG1* einen Phänotyp in der Wurzelmorphologie zur Folge hat. Sowohl in longitudinalen Aufnahmen der Wurzeln, als auch im Querschnitt ist deutlich zu erkennen, dass MIG1 OE Wurzeln dicker sind als vergleichbare Kontroll-Wurzeln (Abb. 2.34).



Durch den vergrößerten Wurzeldurchmesser erinnern MIG1 OE Wurzeln an GA-verarmte Wurzeln, welche mit PAC behandelt wurden (Vergleich Abschnitt 2.10; Tanimoto et al., 2012). Um zu analysieren, ob der Phänotyp von MIG1 OE Wurzeln mit dem GA-Haushalt in Zusammenhang steht, wurden EV- und MIG1 OE-Wurzelkulturen mit den Additiven Mock, GA<sub>3</sub> oder PAC kultiviert und nach 15 d geerntet (Abb. 2.35).

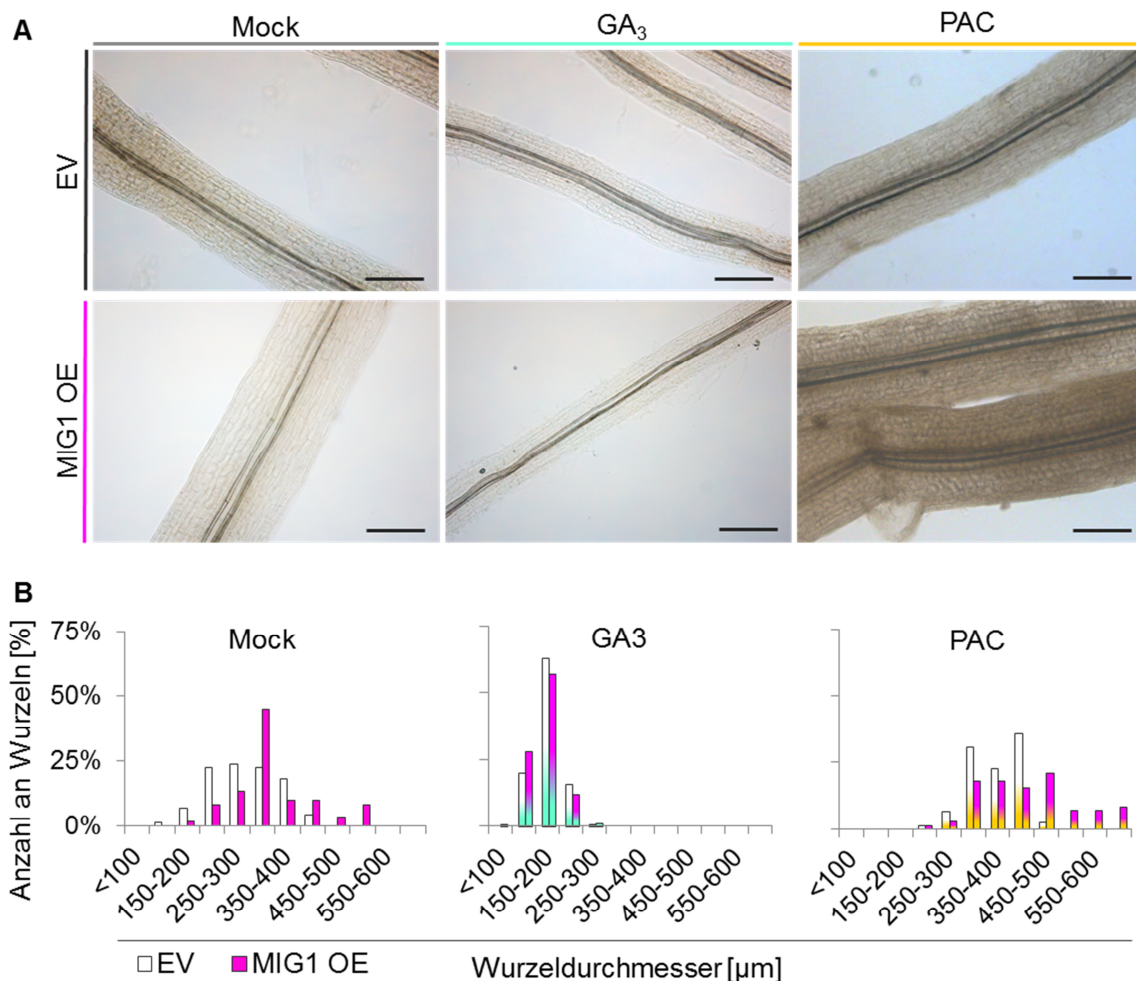


**Abbildung 2.35** Inkubation von EV und MIG1 OE Wurzelkulturen auf Mock-, GA<sub>3</sub> oder PAC-supplementiertem Medium. Wurzelkulturen transformiert mit EV (oben) oder MIG1 OE (unten) wurden jeweils 15 d auf M Medium mit den Additiven Mock (0,001 % EtOH; links), GA<sub>3</sub> (1 µM; Mitte) oder PAC (1 µM; rechts) inkubiert. In grau eingefärbt ist der Wurzelbereich, welcher zum Umsetzen verwendet wurde. Wurzeln außerhalb des grauen Bereichs entsprechen demnach frisch angewachsenen Wurzeln innerhalb der 15 d Inkubation.



Unter Mock-Bedingungen konnte ein normales Wachstum beobachtet werden, das sich zwischen EV und MIG1 OE makroskopisch nicht unterscheiden ließ. Eine GA<sub>3</sub>-Behandlung führte in beiden Wurzelkulturen gleichermaßen zur Bildung wesentlich dünnerer Wurzeln, eine GA-Verarmung durch PAC-Zugabe resultierte dagegen in sehr langsam wachsenden, dickeren Wurzeln. Hervorzuheben ist die unterschiedliche Wirkung von exogener GA<sub>3</sub>-Behandlung auf das Wurzelwachstum von ganzen Pflanzen mit Spross (Abschnitt 2.10) und Wurzelkulturen. Während 1 µM GA<sub>3</sub> bei den Wurzeln ganzer Pflanzen zu einer Reduktion des Längenwachstums führte, förderte diese Konzentration das Wachstum von *hairy roots*.

Da unter makroskopischer Beobachtung keine Unterschiede zwischen EV und MIG1 OE Wurzeln festzustellen waren, wurde die Wurzelmorphologie in einer mikroskopischen Analyse untersucht (Abb. 2.36 A). Eine Quantifizierung bestätigte den Eindruck, der

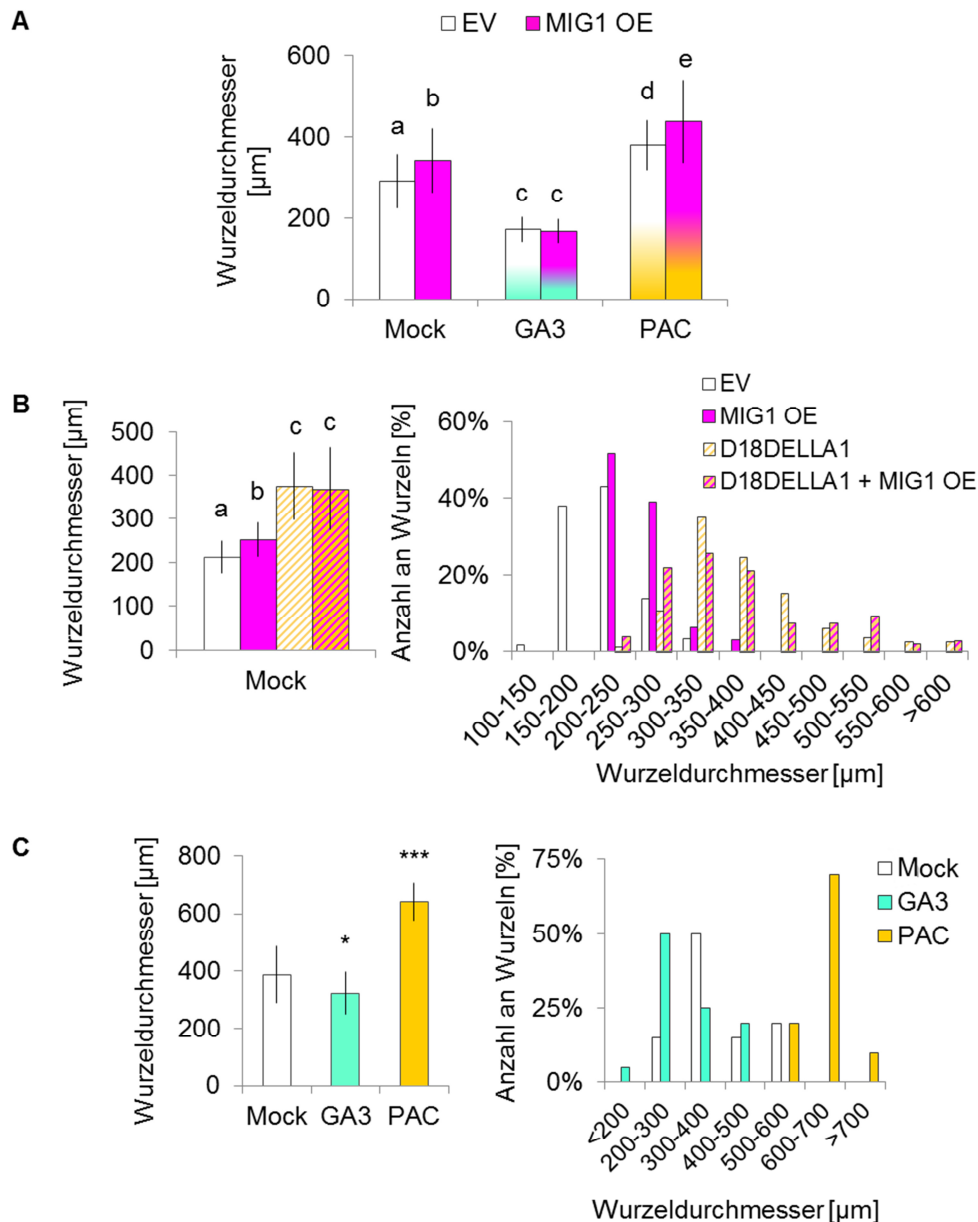


**Abbildung 2.36** Wurzelradius von EV und MIG1 OE Wurzelkulturen inkubiert auf Mock-, GA<sub>3</sub> oder PAC-supplementiertem Medium. Wurzelkulturen transformiert mit EV oder MIG1 OE wurden nach 15 d Inkubation auf Medium mit den Additiven Mock, (0,001 % EtOH), GA<sub>3</sub> (1 µM) oder PAC (1 µM) mikroskopisch analysiert. **(A)** Mikroskopische Aufnahme von EV (oben) und MIG1 OE (unten) inkubiert auf Mock (links), GA<sub>3</sub> (Mitte) oder PAC (rechts) supplementiertem Medium. Maßstabsbalken entsprechen 200 µm. **(B)** Statistische Auswertung des Wurzelradius der verschiedenen behandelten Wurzelkulturen in Darstellung eines Histogramms. Ausgewertet wurden drei biologische Replikate (Transformationslinien) mit n (Wurzeln) ≥ 90.

bereits ohne optische Hilfsmittel entstanden war, dass GA-Applikation dünnere Wurzeln verursacht und im Gegensatz dazu dickere Wurzeln durch PAC-Behandlung gebildet werden (Abb. 2.36 B und Abb. 2.37 A). Zudem konnte der fördernde Effekt auf den Wurzeldurchmesser durch MIG1 OE statistisch belegt werden (Abb. 2.36 B, 2.37 A, B). Auffällig war, dass während in Mock- oder PAC-behandelten Proben in MIG1 OE im Vergleich zu Kontrollwurzeln jeweils eine Steigerung des Wurzeldurchmessers gemessen wurde, konnte eine GA<sub>3</sub>-Behandlung den Effekt von MIG1 OE vollkommen aufheben und resultierte in dünneren Wurzeln (Abb. 2.36 B und Abb. 2.37A).

Der zuvor beobachtete additive Effekt von MIG1 OE und dem GA-Biosynthese Inhibitor PAC auf den Wurzeldurchmesser kann durch zwei unterschiedliche Überlegungen erklärt werden: zum einen könnte ein additiver Effekt darauf zurückzuführen sein, dass MIG1 und PAC in zwei parallelen Signalwegen fungieren, MIG1 seine fördernde Wirkung auf den Wurzeldurchmesser also unabhängig des GA-Signalweges ausübt. Eine andere Erklärung wäre, dass die verwendete PAC-Konzentration, die von den Wurzeln aufgenommen wurde, nicht ausreichend war um die GA-Synthese komplett zu blockieren. Demnach wäre es möglich, dass MIG1 und PAC in einem gemeinsamen Signalweg fungieren, um das Dickenwachstum der Wurzeln zu fördern. Um unterscheiden zu können welcher diese beiden Hypothesen zutrifft, wurde eine genetische Blockierung der GA-Antwort gewählt. Hierfür wurden die 18 AS der DELLA-Domäne von MtDELLA1 deletiert, wodurch das entstandene  $\Delta 18DELLA1$  insensitiv gegenüber der GA-abhängigen Degradierung wird (Floss *et al.*, 2013). Eine ektopische Expression von  $\Delta 18DELLA1$  unter dem 35S-Promotor führt demnach zu einer Blockierung der GA-Antwort, trotz funktioneller GA-Biosynthese innerhalb der Pflanze. Der Durchmesser von  $\Delta 18DELLA1$ -exprimierenden Wurzeln war im Vergleich zu EV-Linien größer und phänotypisierte demnach PAC-behandelte Wurzeln (Abb 2.37 B). Eine simultane Expression von  $\Delta 18DELLA1$  und *MIG1* ( $\Delta 18DELLA1$  + MIG1 OE) führte zu keinem additiven Effekt, sondern zu einem vergleichbaren Durchmesser wie  $\Delta 18DELLA1$  alleine. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich die zweite Hypothese favorisieren und MIG1 kann mit DELLA1 in einem gemeinsamen Signalweg positioniert werden.

Diese Versuche wurden in *composite* Pflanzen durchgeführt, wodurch die Effekte von MIG1 OE in Wurzelkulturen in einem zweiten Expressionssystem bestätigt wurden. Als Kontrolle wurden zusätzlich WT Pflanzen analysiert, welche unter vergleichbaren Bedingungen wie die Wurzelkulturen kultiviert wurden (15 d auf Mock-, GA<sub>3</sub>- oder PAC-supplementiertem Medium; Abschnitt 2.10). Diese Wurzeln zeigten den gleichen Phänotyp durch exogene Behandlung mit GA<sub>3</sub> bzw. PAC auf den Wurzeldurchmesser wie die untersuchten Wurzelkulturen (Abb. 2.37 D).



**Abbildung 2.37 Analyse des Wurzelradius von MIG1 OE und Kontroll-Wurzeln. (A)** Wurzelradius von EV und MIG1 OE transformierten Wurzelkulturen nach 15 d Inkubation auf Mock-, GA<sub>3</sub>- oder PAC-supplementiertem Medium. Ausgewertet wurden drei biologische Replikate (Transformationslinien) mit n (Wurzeln) ≥ 90. **(B)** Wurzelradius von EV, MIG1 OE, dem nicht-degradierbaren DELLA1 (Δ18DELLA1) und Δ18DELLA1 in Kombination mit MIG1 OE (Δ18DELLA1 + MIG1 OE) transformierten *composite* Pflanzen ohne Behandlung (Mock). n (Wurzeln) ≥ 58. **(C)** Wurzelradius von WT *M. truncatula* Pflanzen nach 15 d Inkubation auf Mock-, GA<sub>3</sub>- oder PAC-supplementiertem Medium. n (Wurzeln) ≥ 20. (Fehlerbalken entsprechen SD. Mann-Whitney U Test wurde zur Berechnung der Signifikanz angewandt, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert < 0,05 an. \*p-Wert < 0,05; \*\*\*p-Wert < 0,001).

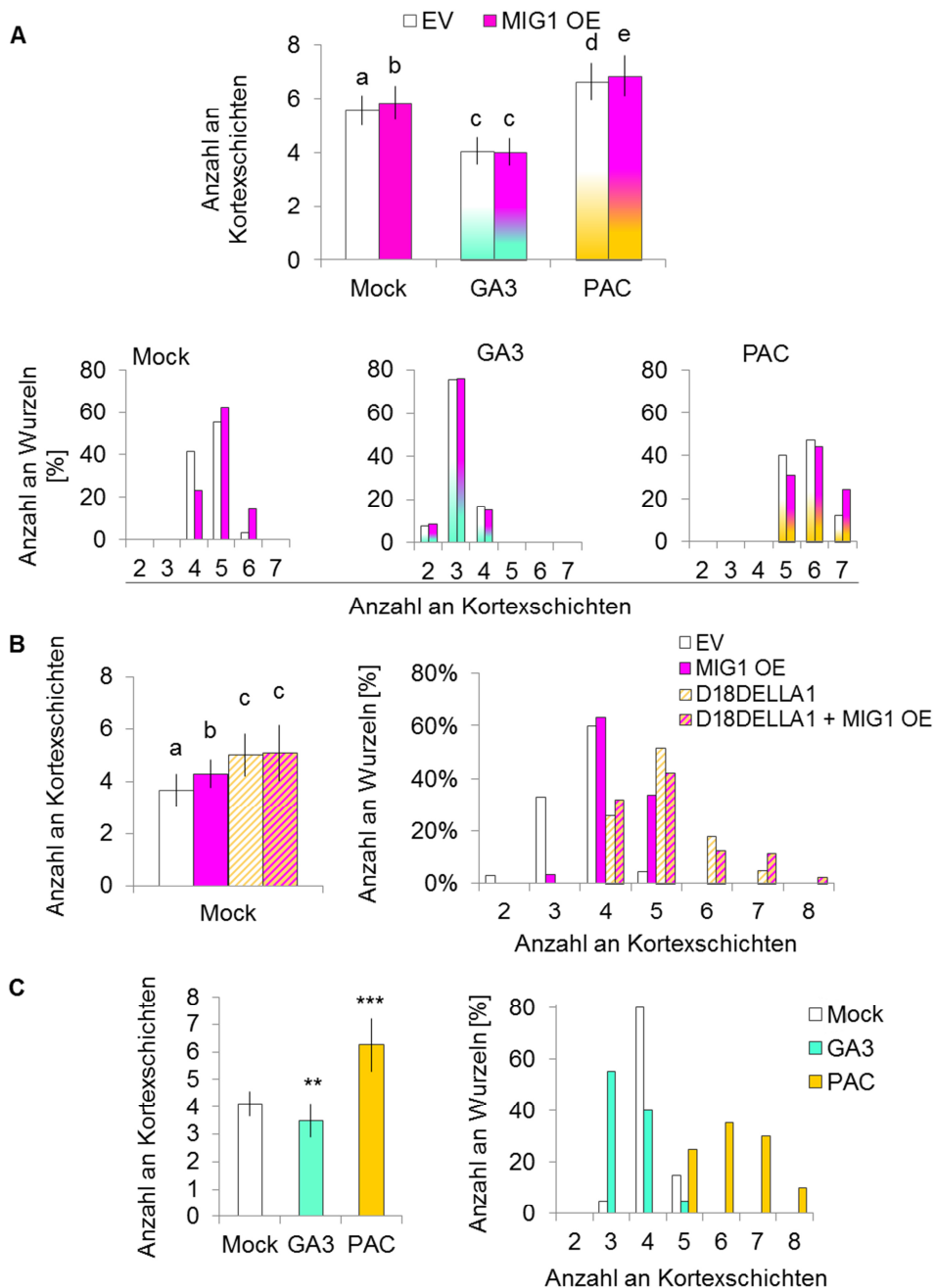
Hinsichtlich des Wurzelradius erscheinen die Ergebnisse in den unterschiedlichen Systemen WT-Pflanzen, *composite* Pflanzen mit Spross bzw. Wurzelkulturen ohne Spross konsistent zu sein, höhere GA-Verfügbarkeit resultierte in dünneren Wurzeln, eine GA-Verarmung bzw. -Blockierung dagegen in dickeren Wurzeln.

Ein vergrößerter Wurzelradius könnte durch eine erhöhte Anzahl an kortikalen

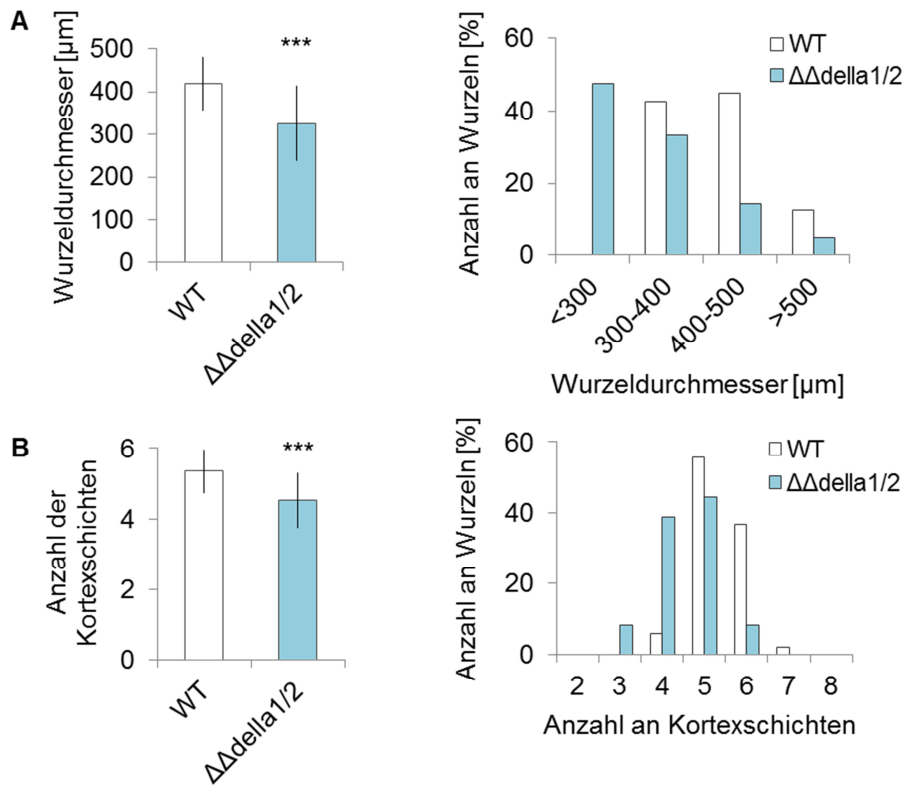


Zellschichten zustande kommen. Demnach wurde die Anzahl der Kortexschichten in den unterschiedlichen Wurzelproben evaluiert (Abb. 2.38). Die Anzahl der Kortexschichten spiegelte die Breite der jeweiligen Wurzeln wider. In MIG1 OE Wurzeln konnte eine leichte Zunahme der kortikalen Zellschichten festgestellt werden (Abb. 2.38 A, B). Auch eine Blockierung der GA-Antwort durch PAC oder  $\Delta 18DELLA1$  hatte in allen Wurzelsystemen eine Proliferation der Kortexzellen in radialer Richtung zur Folge (Abb. 2.38). Eine Proliferation der Kortexschichten durch den GA-Syntheseinhibitor PAC wurde bereits in feinen Seitenwurzeln von Reis berichtet (Fiorilli *et al.*, 2015). Die kombinatorische Behandlung PAC und MIG1 OE sowie die simultane Expression von  $\Delta 18DELLA1$  und MIG1 OE zeigten das gleiche Ergebnis wie bei der Evaluierung des Wurzeldurchmessers: MIG1 OE hatte einen additiven Effekt zur PAC-Behandlung, bei einer kompletten Blockierung der GA-Antwort durch eine Expression von  $\Delta 18DELLA1$  konnte jedoch kein additiver Effekt beobachtet werden (Abb. 2.38 A, B). Durch eine  $GA_3$ -Behandlung wurde dagegen in Wurzelkulturen und WT Wurzeln eine verringerte Zahl an Kortexzellen in radialer Ausrichtung beobachtet.  $GA_3$  supprimierte den Phänotyp von MIG1 OE, sodass kein Unterschied der Kortexschichten zwischen  $GA_3$ -behandelten EV und MIG1 OE Wurzeln festzustellen war. Solch eine Wirkung von Gibberellin wurde bereits in *A. thaliana* bei der Wurzelreifung beschrieben. GA verzögerte hierbei die Bildung des Mittelkortex, einer zusätzlichen Zellschicht zwischen Kortex und Endodermis, wohingegen PAC eine verfrühte Proliferation auslöste (Paquette & Benfey, 2005).

Als zusätzliche Kontrolle wurden diese Parameter auch in der Doppelmutante  $\Delta\Delta della1/2$  quantifiziert. Diese Mutante besitzt eine konstitutive GA-Antwort und wies konsistent hiermit im Vergleich zu Kontrollwurzeln dünnere Wurzeln mit einer geringeren Anzahl an Kortexschichten auf (Abb. 2.39).

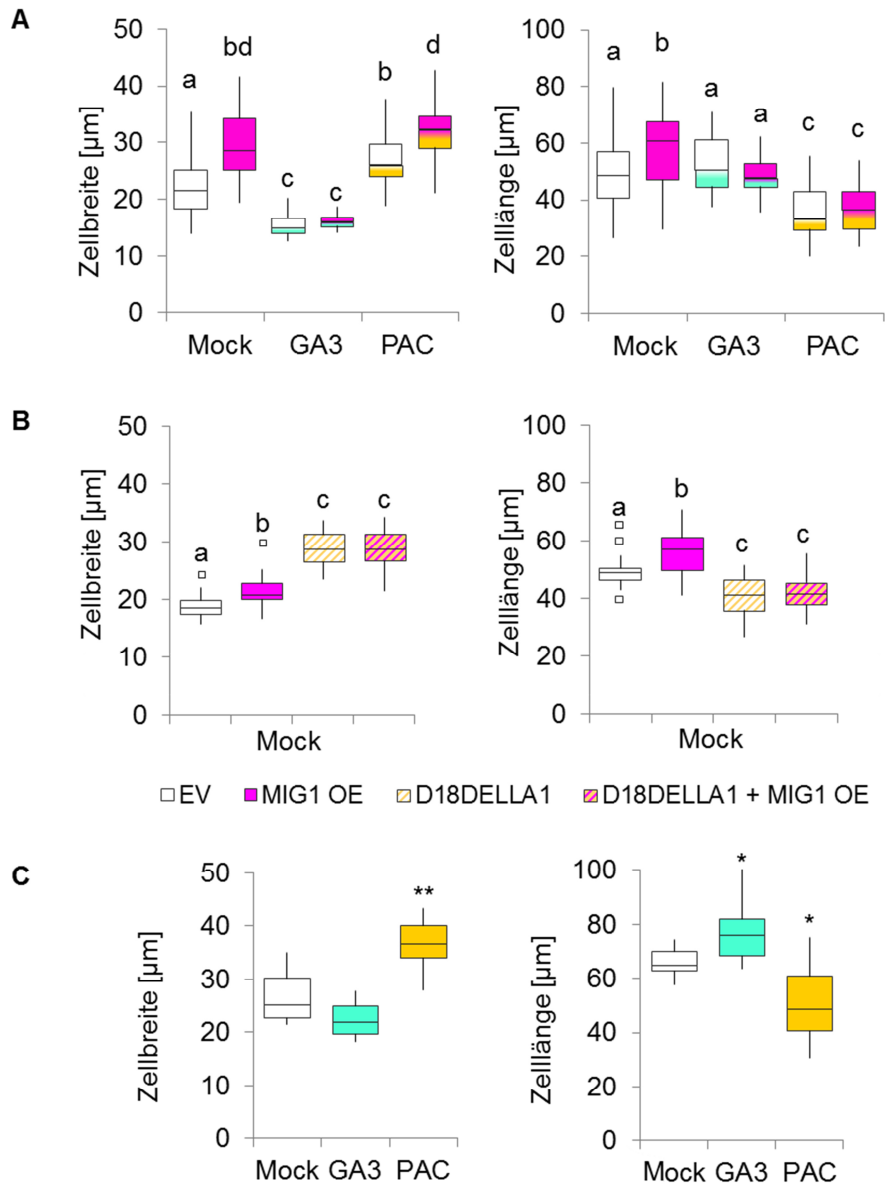


**Abbildung 2.38 Analyse der Anzahl der Kortexschichten von MIG1 OE und Kontroll-Wurzeln. (A)** Kortexschichten von EV und MIG1 OE transformierten Wurzelkulturen nach 15 d Inkubation auf Mock-, GA<sub>3</sub>- oder PAC-supplementiertem Medium. Ausgewertet wurden drei biologische Replikate (Transformationslinien) mit n (Wurzeln) ≥ 90. **(B)** Kortexschichten von EV, MIG1 OE, dem nicht-degradierbaren DELLA1 (Δ18DELLA1) und Δ18DELLA1 in Kombination mit MIG1 OE (Δ18DELLA1 + MIG1 OE) transformierten *composite* Pflanzen ohne Behandlung (Mock). n (Wurzeln) ≥ 58. **(C)** Kortexschichten von WT *M. truncatula* Pflanzen nach 15 d Inkubation auf Mock-, GA<sub>3</sub>- oder PAC-supplementiertem Medium. n (Wurzeln) ≥ 20. (Fehlerbalken entsprechen SD. Mann-Whitney U Test wurde zur Berechnung der Signifikanz angewandt, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert < 0,05 an. \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).



**Abbildung 2.39 Analyse des Durchmessers und Anzahl der Kortexschichten von  $\Delta\Delta$ della1/2 und Kontroll-Wurzeln.** Die Pflanzen wurden auf Medium ohne Additive (Mock) kultiviert und nach 15 d geerntet. Der Wurzelradius (A) sowie die Anzahl der Kortexschichten (B) wurden quantifiziert. (n (Wurzeln)  $\geq$  36. Fehlerbalken entsprechen SD. Mann-Whitney U Test wurde zur Berechnung der Signifikanz angewandt, \*\*\*p-Wert < 0,001).

Eine Überexpression von *MIG1* hatte interessanterweise nicht nur eine Auswirkung auf die Anzahl, sondern auch auf die Größe der Kortexzellen. Die Breite der Kortexzellen zeigte das gleiche Muster wie bereits die gemessenen Wurzelradien und die Anzahl der Kortexzellen. So konnte durch  $GA_3$  eine verringerte kortikale Zellbreite und durch Blockierung der  $GA$ -Antwort eine Zunahme der Breite festgestellt werden (Abb. 2.40). Auch eine Überexpression von *MIG1* und / oder  $\Delta 18DELLA1$  führte zu breiteren Zellen in radialer Ausrichtung (Abb. 2.40 A, B). Eine  $GA_3$ -Behandlung führte zu schmalere Kortexzellen und reversionierte den *MIG1* OE Phänotyp in Bezug auf die Zellbreite komplett. Interessanterweise wurde im Hinblick auf die Zelllänge eine Elongation durch *MIG1* OE beobachtet und nicht etwa verkürzte Zellen wie es bei PAC-behandelten oder  $\Delta 18DELLA1$ -exprimierenden Wurzeln der Fall war (Abb. 2.40). Eine  $GA_3$ -Behandlung führte zu keiner signifikanten Auswirkung auf die Zelllänge in Wurzelkulturen (Abb. 2.40 A). In WT Pflanzen konnte eine leichte Verlängerung der Zellen durch  $GA_3$  festgestellt werden (Abb. 2.40 C).  $GA$ -Verarmung durch PAC führte im Gegensatz zu *MIG1* OE sowohl in Wurzelkultur, als auch in WT Pflanzen zu kürzeren Zellen in longitudinaler Richtung. Bei der Zelllänge wurde der fördernde Effekt von *MIG1* OE sowohl durch  $GA_3$ , als auch durch eine PAC-Behandlung maskiert (Abb. 2.40).



**Abbildung 2.40 Analyse der kortikalen Zellbreite und -länge von MIG1 OE und Kontroll-Wurzeln. (A)** Kortikale Zellbreite und -länge von EV und MIG1 OE transformierten Wurzelkulturen nach 15 d Inkubation auf Mock-, GA<sub>3</sub>- oder PAC-supplementiertem Medium. Ausgewertet wurden drei biologische Replikate (Transformationslinien) mit n (Wurzeln) ≥ 90 und n (Zellen) ≥ 560. **(B)** Kortikale Zellbreite und -länge von EV, MIG1 OE, dem nicht-degradierbaren DELLA1 (Δ18DELLA1) und Δ18DELLA1 in Kombination mit MIG1 OE (Δ18DELLA1 + MIG1 OE) transformierten *composite* Pflanzen ohne Behandlung (Mock). n (Wurzel) ≥ 58 und n (Zellen) ≥ 268. **(C)** Kortikale Zellbreite und -länge von WT *M. truncatula* Pflanzen nach 15 d Inkubation auf Mock-, GA<sub>3</sub>- oder PAC-supplementiertem Medium. n (Wurzeln) ≥ 20 und n (Zellen) ≥ 360. (Box-Whisker Plot zeigt erstes, zweites und drittes Quartil, Maximal- und Minimalwert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstand und Ausreißer außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstand (Quadrate). Mann-Whitney U Test wurde zur Berechnung der Signifikanz angewandt, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert < 0,05 an. \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

Insgesamt traten durch eine mikroskopische Untersuchung der Wurzeln zwei Beobachtungen besonders hervor: Zum einen führte eine Überexpression von *MIG1* zu breiteren Wurzeln, welche sich auf eine gesteigerte Proliferation und Expansion von Kortexzellen in radialer Richtung zurückführen ließ. Dieser Phänotyp konnte gänzlich durch eine GA<sub>3</sub>-Behandlung aufgehoben werden. Die simultane Expression von MIG1 OE und dem nicht-

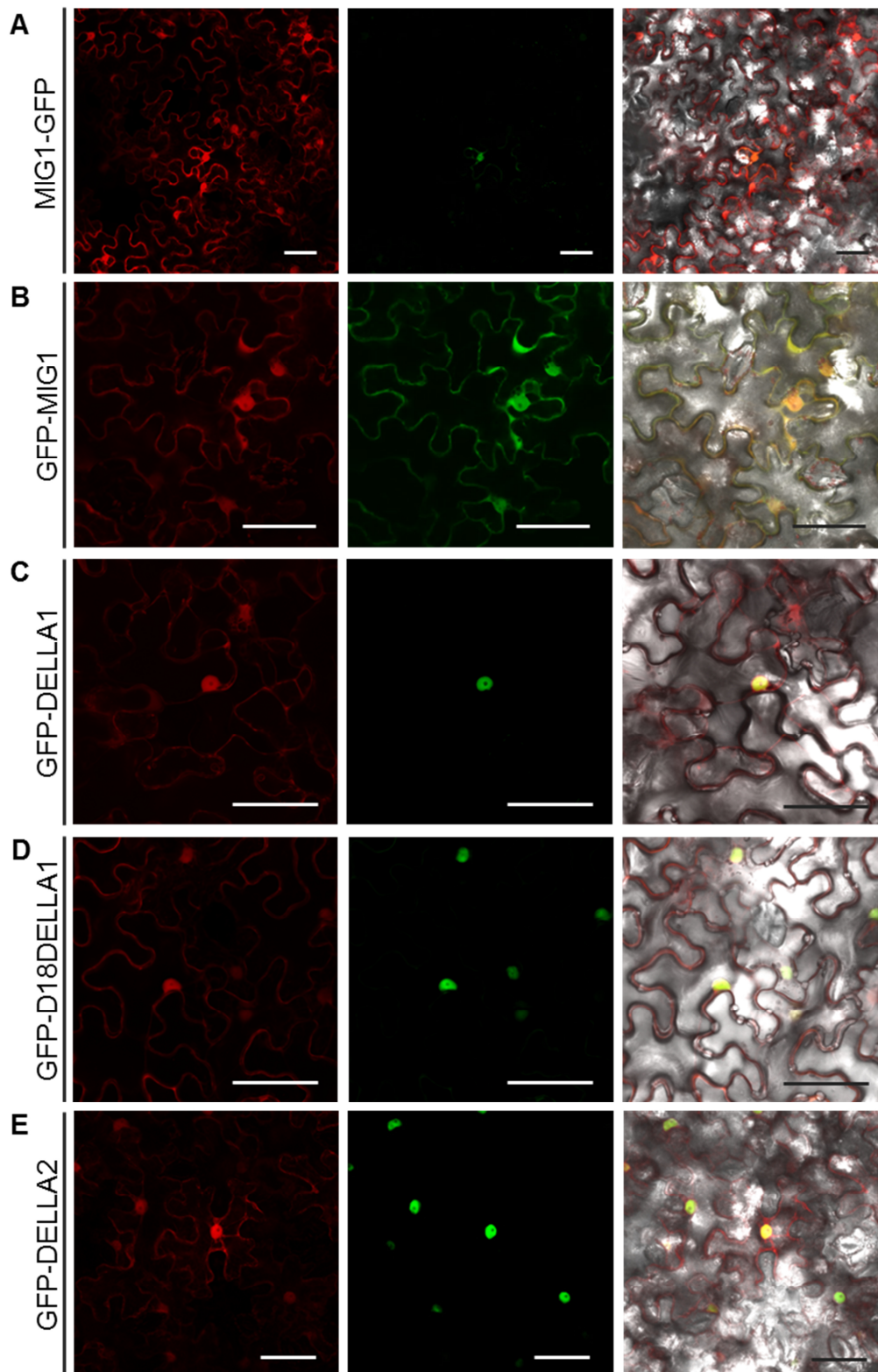
degradierbaren  $\Delta 18\text{DELLA1}$  deckte auf, dass beide Proteine in einem Signalweg fungieren. MIG1 scheint demnach in der Kortextentwicklung während der AM-Symbiose involviert zu sein, wobei es wie DELLA-Proteine im GA-Signalweg einzuordnen ist. Zum anderen konnte den DELLA-Proteinen eine duale Rolle zugewiesen werden. Bisher konzentrierten sich Untersuchungen der DELLA-Proteine auf das longitudinale Wachstum der Zellen und der Wurzel als Organ, wobei sie eine negative Rolle einnehmen (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). Interessanterweise wurde bisher in der Literatur lediglich von DELLA-Proteinen als Positivregulatoren der radialen Proliferation in der Wurzel bei der Bildung neuer Kortexschichten berichtet (Paquette & Benfey, 2005). Die offensichtlich positive Wirkung von DELLA-Proteinen auf die radiale Expansion von Kortexzellen, wie sie hier durch die ektopische Expression von  $\Delta 18\text{DELLA1}$  beobachtet wurde (Abb. 2.40 B), wurde bisher noch nicht adressiert.

## 2.12 MIG1 lokalisiert im Zellkern und im Cytoplasma

Um die Funktionweise von MIG1 weiter aufzuklären, wurde eine subzelluläre Lokalisation durchgeführt. Hierfür wurde MIG1 mit GFP fusioniert und heterolog in *Nicotiana benthamiana* Blättern exprimiert. Das Konstrukt besitzt zudem konstitutiv exprimiertes freies *DsRED*, welches aufgrund seiner kleinen Größe in Cytoplasma und Zellkern lokalisiert.

Eine C-terminale Fusion von GFP an MIG1 (MIG1-GFP) resultierte 3 d nach Infiltration in nur sehr seltenen schwachen Signalen in einzelnen Zellen (Abb. 2.46 A). Hierbei war ein schwaches GFP-Signal im Cytoplasma und im Nukleus zu beobachten. Anhand der zahlreichen *DsRED* Signale konnte von einer guten Transformationsrate ausgegangen werden. Möglicherweise verhindert eine C-terminale GFP-Fusion die richtige Faltung von MIG1. Um diese Hypothese zu testen wurde eine N-terminale Fusion von GFP an MIG1 (GFP-MIG1) konstruiert und infiltrierte Blätter mikroskopiert. GFP-MIG1 zeigte bereits nach 2 d intensive Signale in allen transformierten Zellen (Abb. 2.46 B). Subzellulär war auch hier eine Lokalisation in Cytoplasma und Zellkern zu beobachten. Dies wurde auch anhand der vollständigen Überlagerung mit dem *DsRED*-Signal deutlich.

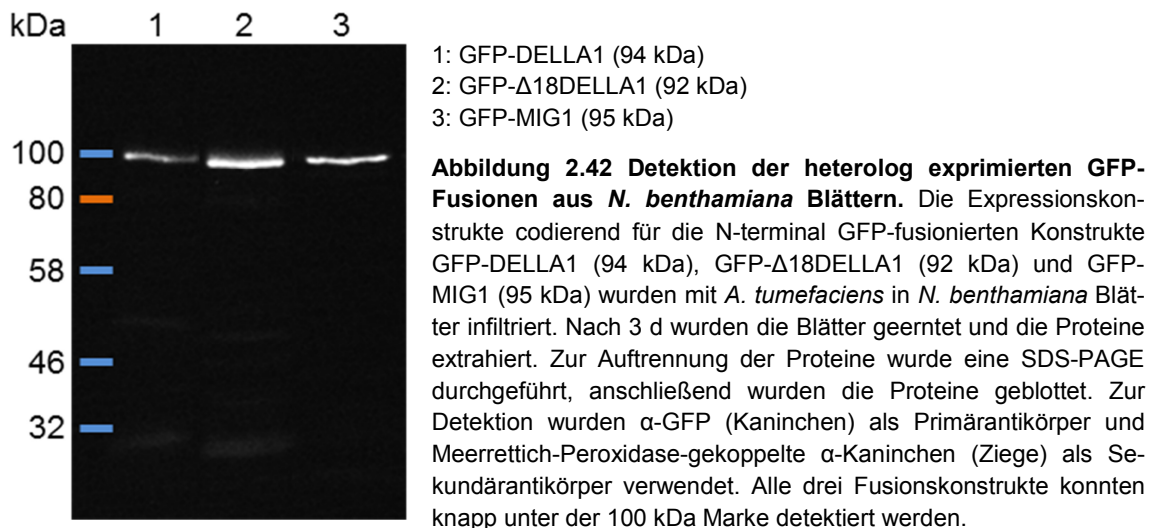
Zusätzlich wurde die Lokalisation der DELLA-Proteine DELLA1 und DELLA2 aus *M. truncatula* mit einer N-terminalen GFP-Fusion durchgeführt. Beide DELLA-Proteine zeigten ausschließlich im Zellkern GFP-Signale (Abb. 2.46 C, E). Auch das stabile DELLA-Protein  $\Delta 18\text{DELLA1}$ , welches nicht durch GA degradiert wird, konnte ausschließlich im Zellkern beobachtet werden (Abb. 2.46 D).



**Abbildung 2.41 Subzelluläre Lokalisation von MIG1 in *N. benthamiana*.** Fusionskonstrukte von MIG1, DELLA1,  $\Delta 18$ DELLA1 bzw. DELLA2 und GFP wurden mit *A. tumefaciens* einzeln in *N. benthamiana* Blätter infiltriert. Nach 2 und 3 d wurden die Signale mit dem Konfokalmikroskop ausgewertet. Das Konstrukt enthält ein konstitutiv exprimiertes DsRED1, welches frei vorliegt und somit in Cytoplasma und Zellkern lokalisiert. **(A)** Eine C-terminale Fusion von GFP an MIG1 (MIG1-GFP) zeigte erst nach 3 d vereinzelte, schwache Signale im Cytoplasma und Zellkern. **(B)** Eine N-terminale Fusion von GFP an MIG1 (GFP-MIG1) resultiert bereits nach 2 d in starke und frequente Signale in Cytoplasma und Zellkern. Bei den Fusionskonstrukten aus einem N-terminalen GFP und DELLA1 **(C)**, dem stabilen  $\Delta 18$ DELLA1 **(D)** oder DELLA2 **(E)** konnte man jeweils nach 2 d starke Signale im Zellkern beobachten. (v.l.n.r.: DsRED, GFP; Überlagerung mit Hellfeld; Maßstabsbalken entsprechen 50  $\mu$ m.)



Freies GFP würde wie freies DsRED in Cytoplasma und Zellkern lokalisieren. Die Signale von MIG1 könnten demnach auch auf eine Abspaltung des GFPs zurückzuführen sein. Um zu überprüfen ob die MIG1-Fusion mit GFP in den Blättern intakt vorlag, wurde ein Western Blot mit dem Proteinextrakt aus infiltrierten Blättern durchgeführt. Dabei konnte durch Detektion von GFP eine eindeutige GFP-MIG1 Bande bei etwa 100 kDa detektiert werden. Als Kontrolle wurden zusätzlich die Fusionskonstrukte GFP-DELLA1 und GFP- $\Delta$ 18DELLA1 analysiert. In allen drei Proben konnten Banden in Höhe des jeweiligen Fusionsproteins detektiert werden. Kleinere Abbauprodukte oder freies GFP (26 kDa) konnten nur sehr schwach beobachtet werden. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die beobachtete Lokalisierung von MIG1 in Cytoplasma und Zellkern tatsächlich auf GFP-MIG1 zurückzuführen ist. Eine Lokalisation von MIG1 im Zellkern unterstützt erneut die Hypothese, dass MIG1 als Transkriptionsregulator fungiert.

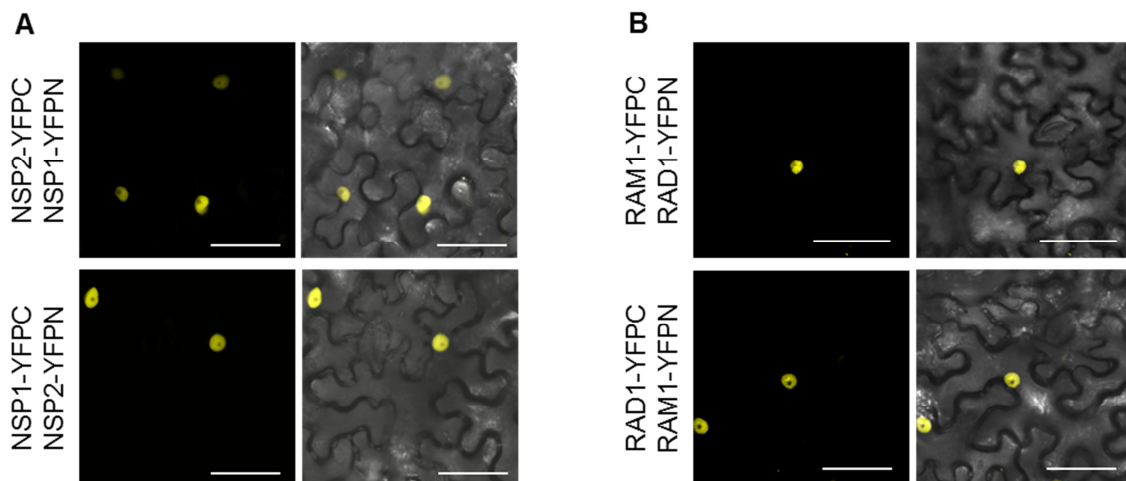


## 2.13 MIG1 bildet Dimere mit AM-assoziierten GRAS-Proteinen

Um Herauszufinden welcher Mechanismus dem GA-regulierten Phänotyp von MIG1 zugrunde liegt, wurden direkte Interaktionstests durchgeführt. GRAS-Proteine sind bekannt dafür Komplexe zu bilden, welche ihre Funktionalität determinieren (Bolle, 2015). Bei der Strukturaufklärung von OsSCL7 durch Kristallisation konnte eine Homodimerisierung beobachtet werden, die höchstwahrscheinlich durch die Bildung einer spezifischen Furche zur Bindung an doppelsträngige DNA befähigt (Li *et al.*, 2016). Für verschiedene GRAS-Proteine der AM-Symbiose konnte bereits gezeigt werden, dass sie Dimere innerhalb ihrer Proteinfamilie formen. So konnte beispielsweise eine Interaktion zwischen NSP1 und NSP2 validiert werden (Hirsch *et al.*, 2009). Überdies wurde gezeigt, dass die Heterodimerisierung NSP1-NSP2 notwendig ist, um eine transkriptionelle Aktivierung des Zielgens *MtENOD11* zu erlangen. Auch die GRAS-Proteine RAM1 und RAD1 interagieren unterei-

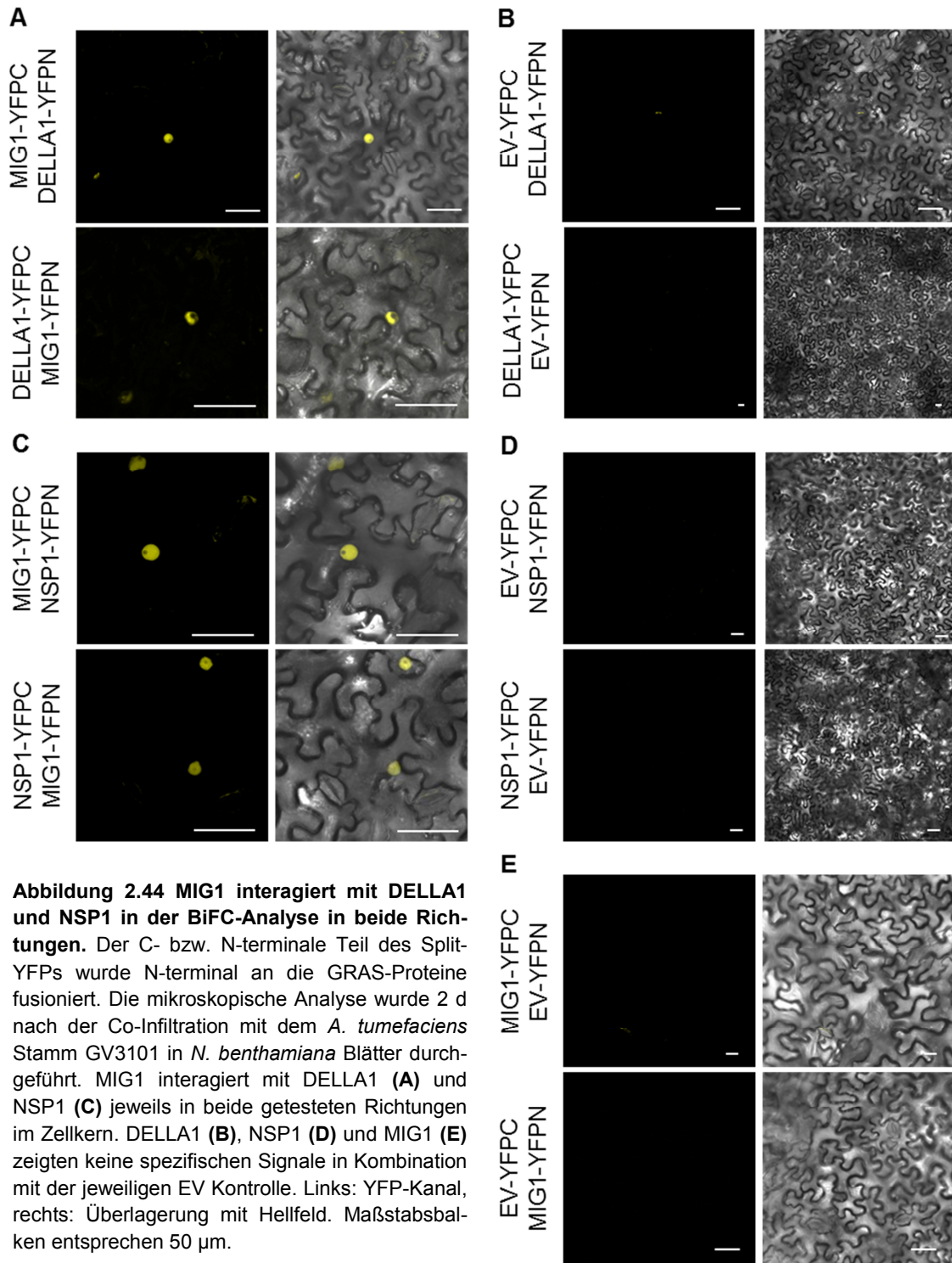
einander sowie jeweils mit NSP2 (Gobbato *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015). Um zu untersuchen, ob auch MIG1 mit einem der AM-assoziierten GRAS-Proteine aus *M. truncatula*, wie beispielsweise den DELLA-Proteinen, interagieren kann, wurden Interaktionsstudien in *N. benthamiana* mit der Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) durchgeführt. Die zu testenden Proteine wurden jeweils N-terminal an eine Hälfte des YFPs fusioniert. Ein gelbes Fluoreszenzsignal zeigte nach Koinfiltration zweier zu testender Proteinfusionen demnach eine positive Interaktion an. Die Kombinationen wurden immer in beide Richtungen getestet.

Zur Kontrolle wurden bereits publizierte Interaktionen untersucht, hierdurch konnte auch die Expression der klonierten Konstrukte bestätigt werden. Positive Interaktionen konnten unter anderem zwischen NSP1 und NSP2 (Hirsch *et al.*, 2009) bzw. RAM1 und RAD1 (Park *et al.*, 2015) im Zellkern von *N. benthamiana* Epidermiszellen beobachtet werden (Abb. 2.41).

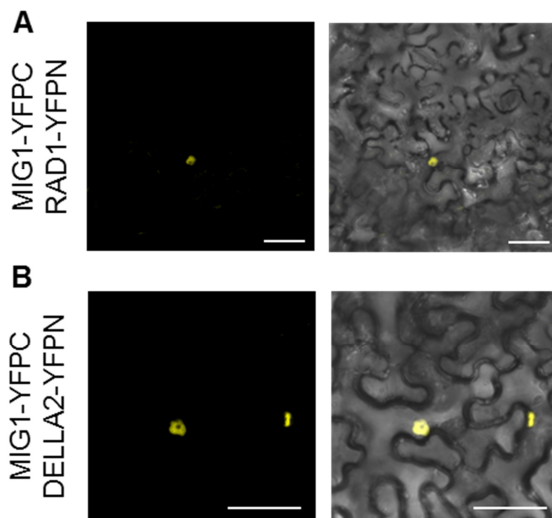


**Abbildung 2.43** **Verwendete Positivkontrollen in der BiFC-Analyse.** Der C-terminale bzw. N-terminale Teil des Split-YFPs wurde N-terminal an die GRAS-Proteine fusioniert. Die mikroskopische Analyse wurde 2 d nach der Co-Infiltration mit dem *A. tumefaciens* Stamm GV3101 in *N. benthamiana* Blätter durchgeführt. **(A)** NSP1 und NSP2 interagieren miteinander im Zellkern in beide Richtungen. **(B)** RAM1 und RAD1 interagieren miteinander im Zellkern in beide Richtungen. Links: YFP-Kanal, rechts: Überlagerung mit Hellfeld. Maßstabsbalken entsprechen 50 µm.

Nach der Validierung der Methode wurde MIG1 in Kombination mit unterschiedlichen GRAS-Proteinen getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass MIG1 mit DELLA1 (Abb. 2.42 A) und mit NSP1 (Abb. 2.42 C) in beide getesteten Richtungen eine Interaktion im Zellkern eingehen kann. Bei der Koinfiltration der Proteine mit dem korrespondierenden EV konnte keine spezifische Fluoreszenz aufgenommen werden (Abb. 2.42 B, D, E).

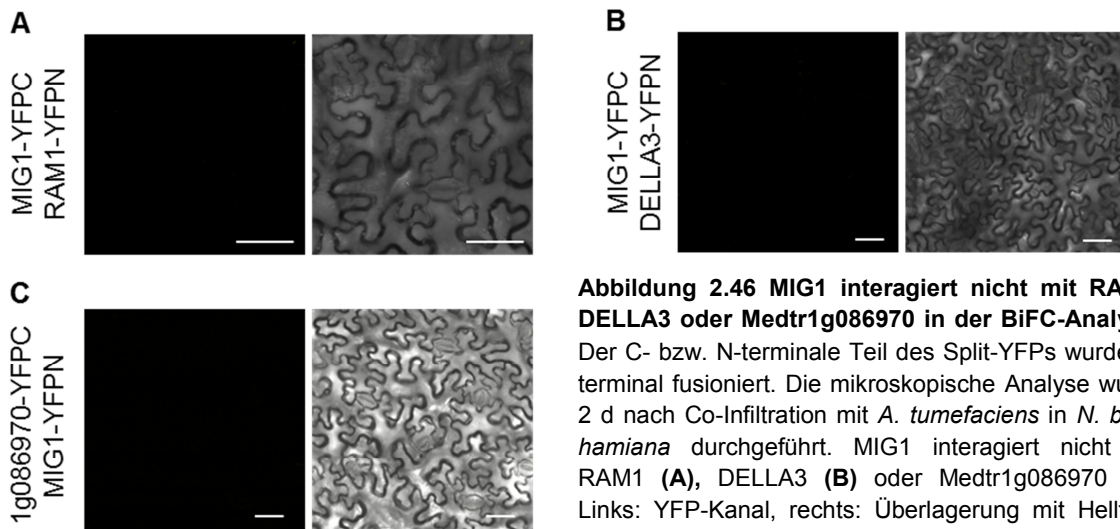


Auch für die Proteine RAD1 und DELLA2 wurde eine Interaktion mit MIG1 beobachtet, allerdings nur falls MIG1 an den C-terminalen Teil von YFP fusioniert vorlag (Abb. 2.43). Diese Interaktionen konnten durch Versuche in die andere Richtung nicht bestätigt werden.



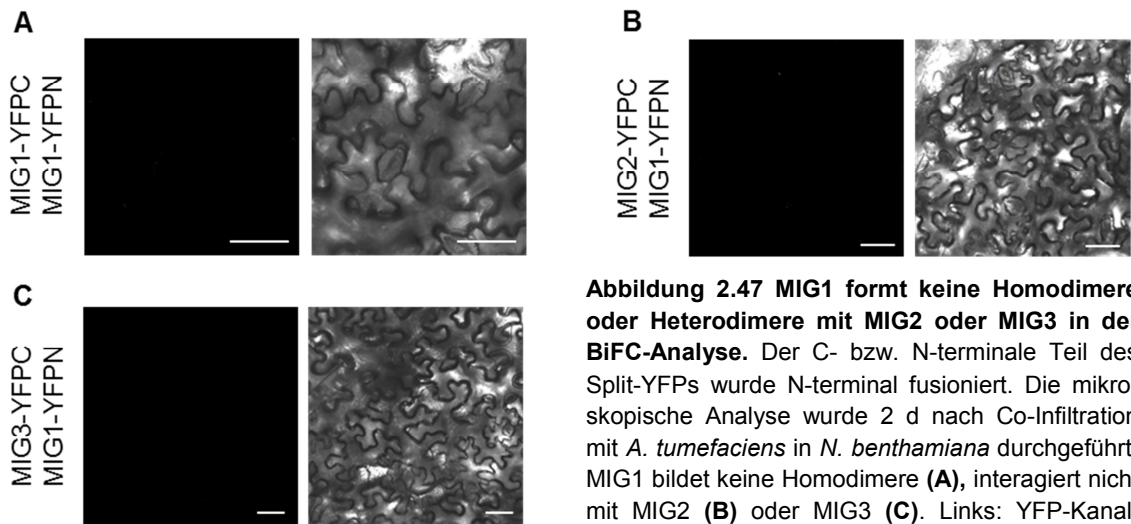
**Abbildung 2.45** MIG1 interagiert mit RAD1 und DELLA2 in der BiFC-Analyse in nur eine Richtung. Der C-terminale bzw. N-terminale Teil des Split-YFPs wurde N-terminal an die GRAS-Proteine fusioniert. Die mikroskopische Analyse wurde 2 d nach der Co-Infiltration mit dem *A. tumefaciens* Stamm GV3101 in *N. benthamiana* Blätter durchgeführt. MIG1 interagiert mit RAD1 (A) und DELLA2 (B) jeweils in eine der getesteten Richtungen im Zellkern. Links: YFP-Kanal, rechts: Überlagerung mit Hellfeld. Maßstabsbalken entsprechen 50 µm.

Keine Interaktion wurde dagegen zwischen MIG1 und den GRAS-Proteinen RAM1, DELLA3 und dem während der AM-symbiose induzierten GRAS-Protein Medtr1g086970 festgestellt (Abb. 2.44). Es wurden jeweils beide Richtungen auf eine Interaktion untersucht, dargestellt ist repräsentativ nur eine Richtung.



**Abbildung 2.46** MIG1 interagiert nicht mit RAM1, DELLA3 oder Medtr1g086970 in der BiFC-Analyse. Der C- bzw. N-terminale Teil des Split-YFPs wurde N-terminal fusioniert. Die mikroskopische Analyse wurde 2 d nach Co-Infiltration mit *A. tumefaciens* in *N. benthamiana* durchgeführt. MIG1 interagiert nicht mit RAM1 (A), DELLA3 (B) oder Medtr1g086970 (C). Links: YFP-Kanal, rechts: Überlagerung mit Hellfeld. Maßstabsbalken entsprechen 50 µm.

Als nächstes wurden Interaktionstests innerhalb der MIG1-Unterfamilie durchgeführt. MIG1 ging dabei keine Interaktion mit seinen Duplikationen MIG2 und MIG3 ein und bildete auch keine Homodimere im BiFC-Assay (Abb. 2.45).



**Abbildung 2.47** MIG1 formt keine Homodimere oder Heterodimere mit MIG2 oder MIG3 in der BiFC-Analyse. Der C- bzw. N-terminale Teil des Split-YFPs wurde N-terminal fusioniert. Die mikroskopische Analyse wurde 2 d nach Co-Infiltration mit *A. tumefaciens* in *N. benthamiana* durchgeführt. MIG1 bildet keine Homodimere (A), interagiert nicht mit MIG2 (B) oder MIG3 (C). Links: YFP-Kanal, rechts: Überlagerung mit Hellfeld. Maßstabsbalken entsprechen 50 µm.

Tabelle 2.5 fasst alle durchgeführten BiFC-Experimente zusammen. Als zusätzliche Positivkontrolle zu NSP1-NSP2 und RAD1-RAM1 (Abb. 2.39) wurde die Interaktion RAD1-NSP2 sowie NSP1-NSP1 evaluiert (Hirsch *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015). Für RAM1 aus *M. truncatula* konnte im Gegensatz zum Ortholog aus *L. japonicus* (Xue *et al.*, 2015) keine Bildung von Homodimeren nachgewiesen werden.

**Tabelle 2.5 Zusammenfassung der Interaktionsanalyse via BiFC in *N. benthamiana*.** Der C-terminale (YFPC) bzw. N-terminale Teil des Split-YFPs (YFPN) wurde N-terminal an die GRAS-Proteine fusioniert. Die mikroskopische Analyse wurde 2 d nach der Co-Infiltration mit dem *A. tumefaciens* Stamm GV3101 in *N. benthamiana* Blättern durchgeführt. Die Ergebnisse aller getesteten Kombinationen sind aufgeführt. Grün: Interaktion in beide getesteten Richtungen; gelb: Interaktion nur in eine der getesteten Richtungen (+), mit der Kombination der anderen Richtung keine Bestätigung dieser Interaktion (-); rot: in beide Richtungen keine Interaktion.

		YFPC										
BiFC		MIG1	MIG2	MIG3	RAD1	Medtr1g086970	DELLA1	DELLA2	DELLA3	RAM1	NSP1	NSP2
YFPN	MIG1				-							
	MIG2											
	MIG3				-		+					
	RAD1	+		+								
	Medtr1g086970											
	DELLA1				-							
	DELLA2	+										
	DELLA3											
	RAM1											
	NSP1				+							
	NSP2											

Zusammenfassend konnte für MIG1 eine Interaktion mit DELLA1 und NSP1 in beide Richtungen beobachtet werden. Mit den GRAS-Proteinen RAD1 und DELLA2 konnte nur für eine Richtung eine Interaktion mit MIG1 gezeigt werden. Für die Duplikation MIG2 konnte eine Interaktion mit DELLA1 und DELLA2 festgestellt werden. MIG3 interagiert in den BiFC-Versuchen dagegen nur mit DELLA2 in beide Richtungen. In ausschließlich eine Richtung interagiert MIG3 mit RAD1, DELLA1 und NSP1.



Diese Ergebnisse zeigen, dass MIG1 unterschiedliche Interaktionen mit GRAS-Proteinen eingehen kann. Die unterschiedlichen Dimere könnten schließlich zur zeitlich und räumlich getakteten Regulation spezifischer Gene während der AM-Symbiose, beispielsweise bei der Arbuskelentwicklung, dienen. Überdies wurde durch die Interaktion zwischen MIG1 und DELLA1 eine erneute Verbindung zu dem GA-Signalweg aufgedeckt.

### 2.14 MIG1 OE hat keine Auswirkung auf die Mykorrhizierungseffizienz

Unter natürlichen Bedingungen wird *MIG1* in *M. truncatula* nur sehr schwach exprimiert. Eine starke Expression von *MIG1* konnte ausschließlich während der Mykorrhizierung nachgewiesen werden (Abschnitt 2.2). Eine Überexpression imitiert demnach im Bezug auf die *MIG1*-Transkriptmenge eine Mykorrhizierung, ohne tatsächliche Kolonisierung eines AM-Pilzes.

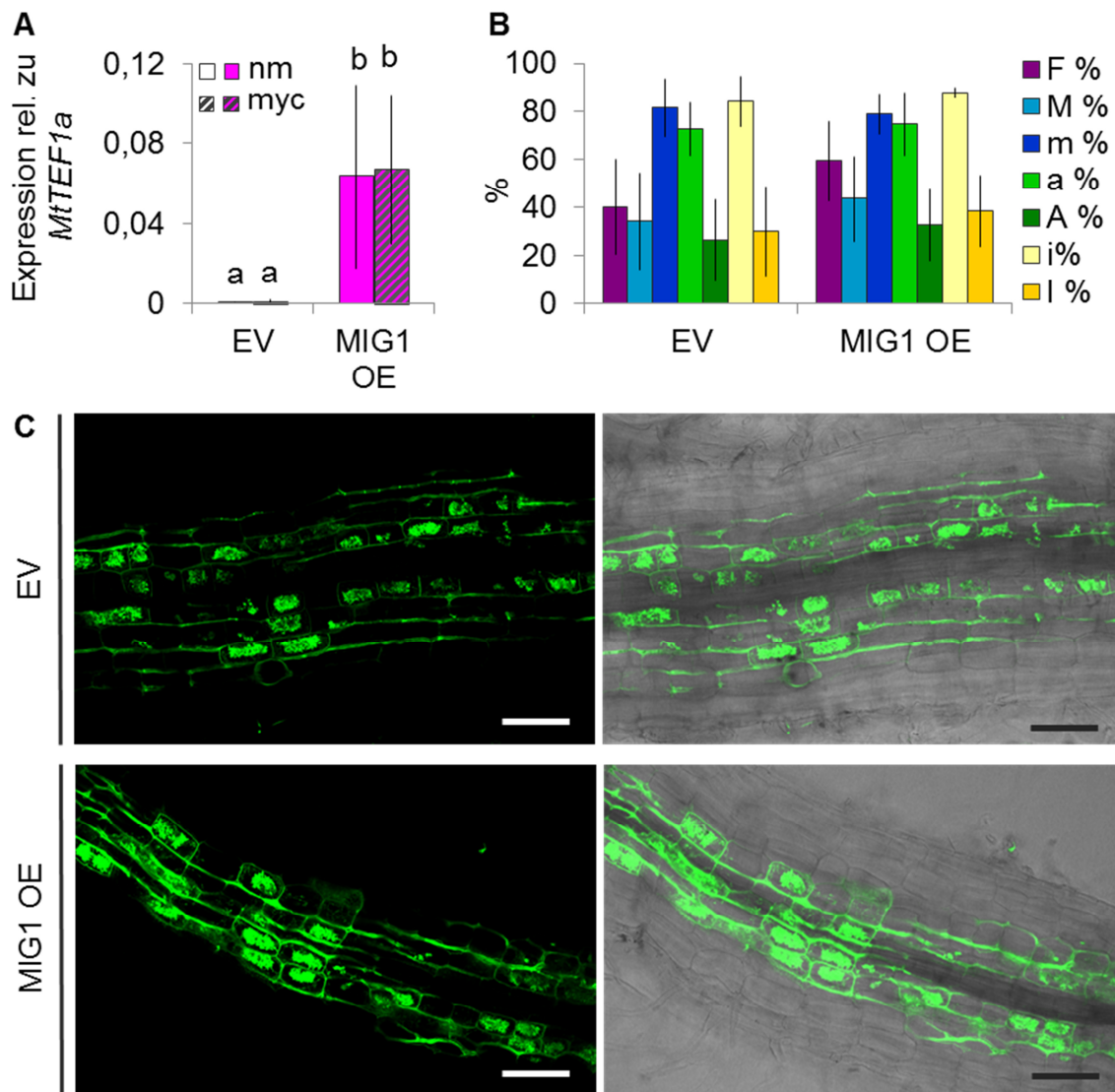
Um zu analysieren, ob sich eine Überexpression von *MIG1* auf die Mykorrhizierungseffizienz auswirkt, wurden EV bzw. *MIG1* OE *composite* Pflanzen mykorrhiziert. Eine Überexpression von *MIG1* konnte per qPCR bestätigt werden (Abb. 2.48 A). Bei einer Quantifizierung der Mykorrhizierung konnte in keinem der adressierten Parameter ein Unterschied zwischen EV und *MIG1* OE festgestellt werden (Abb. 2.48 B). Die Abundanz an Arbuskeln und intrazellulären Hyphen ist in beiden Linien (EV und *MIG1* OE) demnach vergleichbar ausgeprägt.

Eine Überexpression von  $\Delta 18DELLA1$  in *M. truncatula* bzw. seinem Pendant  $\Delta 17DELLA1$  in *L. japonicus* induzierte die Expression spezifischer AM-Markergene ohne Inokulation mit einem AM-Pilz, sodass DELLA1 für die Expression dieser Gene während der AM-Symbiose verantwortlich gemacht werden konnte (Park *et al.*, 2015; Floss *et al.*, 2016; Pimprikar *et al.*, 2016). Beispielsweise induziert DELLA1 die Expression von RAM1, welches wiederum für die Expression weiterer AM-Gene verantwortlich ist (Park *et al.*, 2015). Um zu testen ob auch *MIG1* in dieser Transkriptionskaskade eine Rolle spielt, wurde die Expression von AM-Markergenen in *MIG1* OE Wurzeln gemessen. Hierbei konnte keine differenzielle Expression beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass *MIG1* und RAM1 in unterschiedlichen Signalwegen fungieren. Darüber hinaus wurde die Expression zudem in mykorrhizierten EV und *MIG1* OE Wurzeln quantifiziert. Hierbei konnte überraschenderweise eine leichte Reduktion von *RAM1* sowie von den DELLA1/RAM1-Zielgenen *RAD1*, *SCP1*, *Vapyrin* und *EXO70I* beobachtet werden (Abb. 2.49). Bei *EXO70I*, welches eine signifikante Reduktion seiner Genexpression erfuhr, handelt es sich um eine Komponente des AM-zugehörigen Exozyst-Komplexes, welcher für die Bildung der PAM verantwortlich ist (Zhang *et al.*, 2015b).

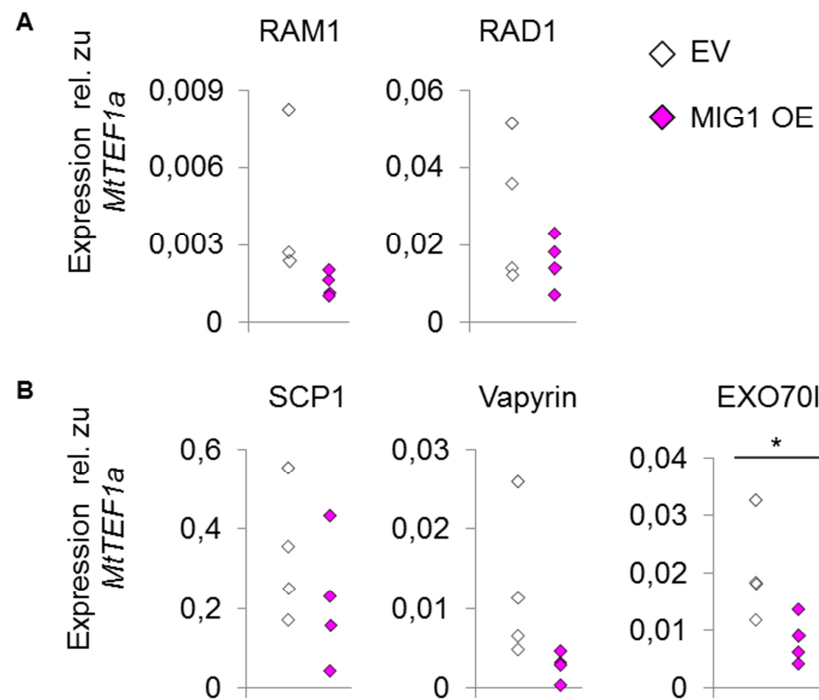
*MIG1* könnte diesen Ergebnissen zufolge möglicherweise mit der RAM1-Signalkaskade



um DELLA1 konkurrieren und bisher noch unbekannte Gene während der AM-Symbiose regulieren.



**Abbildung 2.48 Quantifizierung der Mykorrhizierung in MIG1 OE composite Pflanzen.** Composite Pflanzen transformiert mit EV oder MIG1 OE wurden mit (myc) oder ohne (nm = nicht mykorrhiziert) *R. irregularis* inkubiert und 5 wpi geerntet. **(A)** Expressionsanalyse von *MIG* per qPCR. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert.  $n \geq 4$ . (Fehlerbalken entsprechen SD. Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem  $p$ -Wert  $< 0,05$ .) **(B)** Quantifizierung der Mykorrhizierung nach Trouvelot *et al.* (1986). Folgende Parameter wurden analysiert: Die Frequenz der Kolonisierung (F %), die Intensität der Mykorrhizierung im gesamten Wurzelsystem (M %) bzw. in den Wurzelfragmenten (m %), Abundanz der Arbuskeln und intraradikalen Hyphen im Wurzelsystem (A % und l %) bzw. in mykorrhizierten Bereichen (a % und i %). Die Mykorrhizierungseffizienz zeigte keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Linien. Analyzierte Wurzelfragmente: 319 (EV); 136 (MIG1 OE). (Fehlerbalken entsprechen SD.  $n \geq 3$ . Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet.) **(C)** Visualisierung repräsentativer pilzlicher Strukturen in EV (oben) und MIG1 OE Linien (unten) nach Färbung mit WGA-FITC. Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

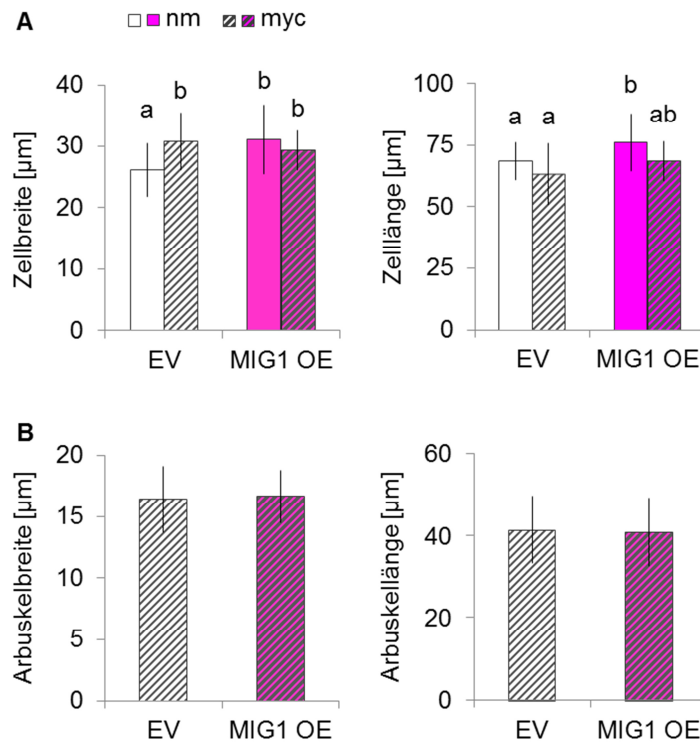


**Abbildung 2.49** MIG1 OE führte zu einer verminderten Expression von DELLA1/RAM1-Zielgenen während der AM-Symbiose. EV und MIG1 OE *composite* Pflanzen wurden mit *R. irregularis* inokuliert und 5 wpi geerntet. Die Expression verschiedener AM-Markergene welche durch DELLA1 und RAM1 induziert werden, wurde per qPCR in den mykorrhizierten Wurzeln gemessen und auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Die GRAS TFs *RAM1* und *RAD1* (A) sowie die in der Arbuskelentwicklung involvierten Gene *SCP1*, *Vapyrin* und *EXO70I* (B) zeigen eine tendenzielle verminderte Expression in MIG1 OE Wurzeln. (Daten zeigen Einzelwerte von vier biologischen Replikaten. Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, \*p-Wert < 0,05).

## 2.15 MIG1 determiniert die Zellgröße während der AM-Symbiose

In Abschnitt 2.11 konnte in MIG1 OE Wurzeln eine modifizierte Zellgröße gegenüber Kontroll-Wurzeln festgestellt werden. Um die biologische Relevanz diesen Phänotyps zu analysieren, wurden die Kortezellen von mykorrhizierten EV und MIG1 OE *composite* Pflanzen sowie nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen vermessen und statistisch ausgewertet (Abb. 2.50 A). In der Tat konnte eine Zunahme der Zellbreite arbuskulierter gegenüber nicht mykorrhizierten Kortezellen festgestellt werden. In MIG1 OE Wurzeln konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden: unmykorrhizierte MIG1 OE Zellen waren breiter als EV-Zellen. Arbuskulierte MIG1 OE Kortezellen zeigten in ihrer radialen Ausdehnung keine signifikante Zunahme verglichen zu nicht mykorrhizierten MIG1 OE Zellen oder zu mykorrhizierten EV-Zellen. Bei der Evaluierung der Zelllänge konnte im Gegensatz zur Zellbreite kein Unterschied zwischen Arbuskel-enthaltenden Zellen und Kortezellen von nicht mykorrhizierten Kontrollwurzeln festgestellt werden. Eine Überexpression von MIG1 äußerte sich in signifikant längeren Zellen, wie bereits zuvor quantifiziert (Abschnitt 2.11). Diese Signifikanz ging durch eine Mykorrhizierung verloren, bei der MIG1 OE Kortezellen keinen Unterschied zu EV-Zellen aufzeigten.

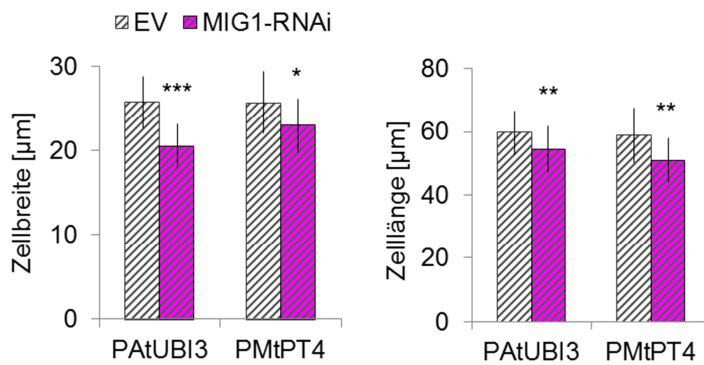
Um zu testen, ob eine Vergrößerung der Zelle durch MIG1 OE auch eine Ausdehnung der gebildeten Arbuskel als Konsequenz hat, wurden diese in den mykorrhizierten EV- und MIG1 OE Wurzeln ausgemessen. Weder in der Arbuskelbreite noch in der -länge war eine Modifizierung durch eine Überexpression von *MIG1* vorhanden (Abb. 2.50 B). Die Arbuskeln hatten demnach die gleiche Größe in EV und MIG1 OE Wurzeln.



**Abbildung 2.50 Analyse der Zell- und Arbuskel-morphologie mykorrhizierter MIG1 OE und EV Wurzeln.** EV und MIG1 OE transformierte *composite* Pflanzen wurden 5 wpi mit (myc = mykorrhiziert) oder ohne (nm = nicht mykorrhiziert) *R. irregularis* geerntet. **(A)** Statistische Analyse der Zellbreite und -länge von Kortexzellen. n (Wurzeln)  $\geq 12$  und n (Zellen)  $\geq 197$ . **(B)** Statistische Analyse der Arbuskelbreite und -länge in mykorrhizierten EV und MIG1 OE Wurzeln. n (Wurzel)  $\geq 14$  und n (Zellen)  $\geq 197$ . (Fehlerbalken entsprechen SD. Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert  $< 0,05$ ).

Nach diesen Ergebnissen scheint der Phänotyp der MIG1 OE Wurzeln betreffend der radialen kortikalen Zellexpansion tatsächlich von biologischer Relevanz zu sein. Hierfür sprechen auch Berichte ähnlicher Arbuskel-assoziierten morphometrischen Veränderungen in *Prunus cerasifera* und *Cucumis sativus* (Berta *et al.*, 1995; Balestrini *et al.*, 2005). Die Vergrößerung von Kortexzellen, scheint demnach typisch für Zellen zu sein, welche Arbuskeln beherbergen.

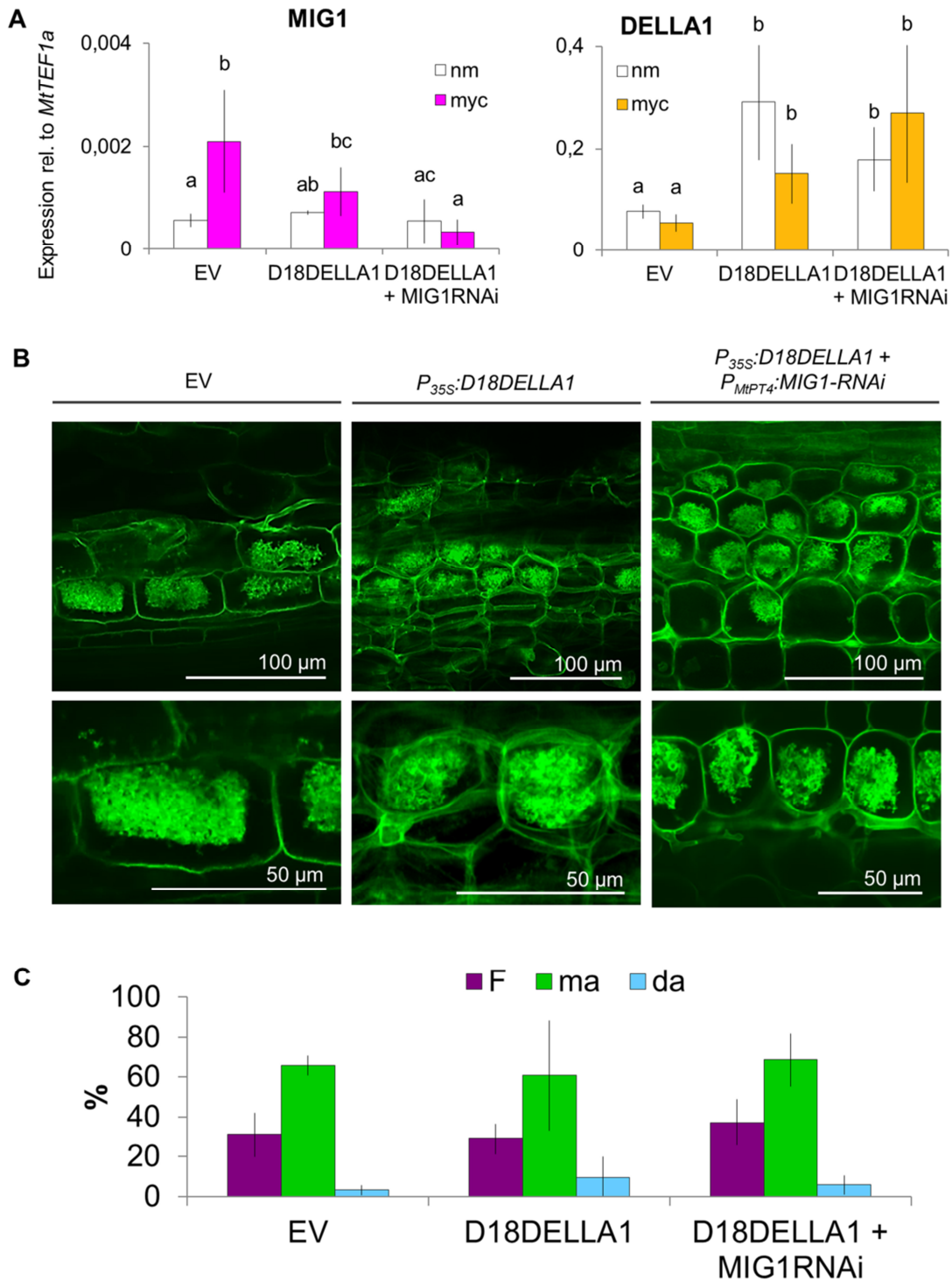
Um diese Überlegung zu bestätigen, wurde zusätzlich die arbuskulierten Kortexzellen der mykorrhizierten MIG1-RNAi-Linien vermessen (Vergleich Abschnitt 2.6). In der Tat wurde sowohl eine verringerte Zellbreite, als auch eine reduzierte Zelllänge in MIG1-RNAi-Wurzeln beobachtet (Abb. 2.51). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MIG1 vor oder während der Arbuskelbildung zur Vergrößerung der entsprechenden Kortexzellen beiträgt. Solch eine Vergrößerung findet nicht statt, wenn *MIG1* herunterreguliert wird, was möglicherweise zur Störung der Arbuskelbildung führen könnte, welche in MIG1-RNAi-Linien beobachtet wurde (Abschnitt 2.6).



**Abbildung 2.51 Analyse der Zellmorphologie mykorrhizierter MIG1-RNAi und EV-Wurzeln.** EV und MIG1-RNAi (PATUBI3 und PMtPT4) transformierte *composite* Pflanzen wurden 5 wpi mit *R. irregularis* geerntet. Statistische Analyse der Zellbreite und -länge von arbuskulierten Kortexzellen. n (Wurzeln)  $\geq 16$  und n (Zellen)  $\geq 53$ . (Fehlerbalken entsprechen SD. Mann-Whitney U Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, \*p-Wert < 0,05; \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

## 2.16 $\Delta 18DELLA1$ komplementiert den MIG1-RNAi Arbuskelphänotyp

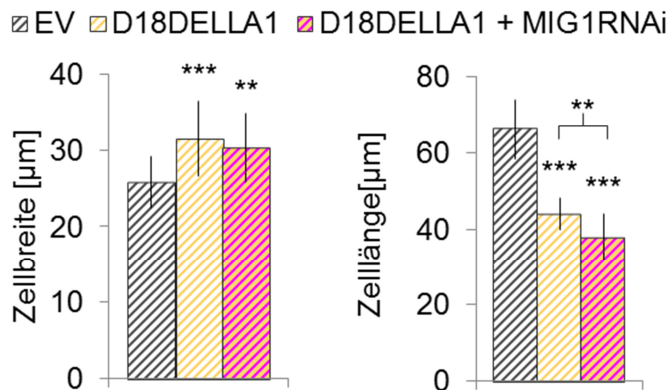
Die simultane Expression von MIG1 OE und  $\Delta 18DELLA1$  konnte aufzeigen, dass MIG1 und DELLA1 in einem gemeinsamen Signalweg die radiale Expansion von Kortexzellen regulieren (Abschnitt 2.11). Überdies wurde eine Korrelation zwischen Arbuskelbildung und radialer Zellexpansion beobachtet (Abschnitt 2.15). Diese Ergebnisse führen zur Hypothese, dass MIG1 zusammen mit DELLA1 in der AM-Symbiose die radiale Expansion kolonisierter Kortexzellen kontrolliert, wodurch die Bildung reifer Arbuskeln ermöglicht wird. Um diese Hypothese zu stützen, wurde im Folgenden analysiert, ob eine Überexpression des GA-insensitiven  $\Delta 18DELLA1$  den MIG1-RNAi Phänotyp in der Arbuskelentwicklung (Abschnitt 2.6) retten kann (Abb. 2.52). Hierfür wurde eine Expressionskassette konstruiert, welche eine Herunterregulation von *MIG1* unter dem *PT4*-Promotor und eine simultane Überexpression des GA-insensitiven  $\Delta 18DELLA1$  ermöglichte. Transformierte *composite* Pflanzen wurden mit *R. irregularis* inokuliert und die Mykorrhizierungseffizienz nach 5 wpi ausgewertet. Als Kontrolle wurden zusätzlich Wurzeln mit  $\Delta 18DELLA1$ -Überexpression aber ohne MIG1-RNAi analysiert. Die Herunterregulation von *MIG1* und verstärkte Expression von *DELLA1* wurde durch Expressionsanalysen *via* qPCR validiert (Abb. 2.52 A). Eine Quantifizierung der Mykorrhizierungseffizienz legte dar, dass eine Stabilisierung von DELLA1 tatsächlich den AM-Phänotyp deformierter Arbuskeln in MIG1-RNAi Wurzeln komplementieren kann (Abb. 2.52 B, C). Weder die Mykorrhizierungseffizienz, noch die Abundanz reifer oder deformierter Arbuskeln unterschieden sich in Wurzeln transformiert mit EV,  $\Delta 18DELLA1$  oder  $\Delta 18DELLA1$  + MIG1-RNAi (Abb. 2.52 C).



**Abbildung 2.52** Das nicht-degradierbare DELLA-Protein  $\Delta 18DELLA1$  komplementiert den Arbuskelphänotyp in MIG1-RNAi Wurzeln. Composite Pflanzen transformiert mit EV,  $\Delta 18DELLA1$  oder  $\Delta 18DELLA1$  zusammen mit PMPT4-MIG1-RNAi ( $\Delta 18DELLA1$  + MIG1-RNAi) wurden mit (myc) oder ohne (nm = nicht mykorrhiziert) *R. irregularis* inkubiert und 5 wpi geerntet. **(A)** Die Expressionslevel von *MIG1* und *DELLA1* wurden per qPCR ermittelt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *MtTEF1a* normalisiert. Die Herunterregulierung von *MIG1* durch MIG1-RNAi sowie die Überexpression von *DELLA1* in  $\Delta 18DELLA1$  konnte validiert werden. **(B)** Visualisierung repräsentativer pilzlicher Strukturen in EV (links),  $\Delta 18DELLA1$  (Mitte) und  $\Delta 18DELLA1$  + MIG1-RNAi Linien (rechts) nach Färbung mit WGA-FITC. **(C)** Quantifizierung der Mykorrhizierung nach Trouvelot *et al.* (1986). Die Frequenz der Kolonisierung (F%), die Anzahl an reifen Arbuskeln (ma% = mature arbuscule) und unreifen, deformierten Arbuskeln (da%) unterschieden sich nicht in den unterschiedlichen Linien. Analytierte Wurzelfragmente: 268 (EV); 202 ( $\Delta 18DELLA1$ ); 670 ( $\Delta 18DELLA1$  + MIG1-RNAi). (Fehlerbalken entsprechen SD.  $n \geq 3$ . Zweistichproben-t-Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert  $< 0,05$ ).



Eine Vermessung der Arbuskel-enhaltenden Zellen zeigte darüber hinaus, dass durch eine Überexpression von  $\Delta 18DELLA1$  eine Zunahme der Zellbreite resultierte, auch bei zusätzlicher Herunterregulation von *MIG1* (Abb. 2.53). Wie erwartet, konnte durch  $\Delta 18DELLA1$  eine Verkürzung der Zelllänge beobachtet werden. Interessanterweise wurde diese Verkürzung im MIG1-RNAi Hintergrund noch weiter verstärkt.



**Abbildung 2.53 Analyse der Zellmorphologie durch  $\Delta 18DELLA1$  geretteter MIG1-RNAi- und Kontroll-Wurzeln.** EV,  $\Delta 18DELLA1$  und  $\Delta 18DELLA1$  + MIG1-RNAi (PMtPT4) transformierte *composite* Pflanzen wurden 5 wpi mit *R. irregularis* geerntet. Statistische Analyse der Zellbreite und -länge von arbuskulierten Kortexzellen. n (Wurzeln)  $\geq 15$  und n (Zellen)  $\geq 89$ . (Fehlerbalken entsprechen SD. Mann-Whitney U Test wurde zur Kalkulation der Signifikanz verwendet, \*\*p-Wert < 0,01; \*\*\*p-Wert < 0,001).

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass die Expression von  $\Delta 18DELLA1$  den MIG1-RNAi Phänotyp rettet. Da dies sowohl auf den Arbuskelphänotyp, als auch auf die kortikale Zellbreite zutrifft, lässt sich spekulieren ob hier ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte.



## 3 Diskussion

### 3.1 Die MIGs, GRAS-TFs in der AM-Symbiose

Das Duett der beiden Symbiosepartner Pflanze und AM-Pilz beginnt mit einem abgestimmten Signalaustausch, welcher zur Erkennung und Vorbereitung der Partner führt (Parniske, 2008). Dieser präsymbiotische Signalaustausch wird zumindest teilweise über den CSSP vermittelt und führt zu einer enormen Umstrukturierung der Transkription (Hohnjec et al., 2015). Mittlerweile konnten mehrere GRAS-Proteine als zentrale Regulatoren der AM-Symbiose identifiziert werden (Maillet *et al.*, 2011; Gobbato *et al.*, 2012; Delaux *et al.*, 2013; Floss *et al.*, 2013; Takeda *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2015). Da GRAS-Proteine eine wesentliche Rolle in der pflanzlichen Entwicklung, unter anderem in der morphologischen Entwicklung der Wurzel spielen, sind sie von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die AM-Symbiose. Um neue Komponenten der AM-assoziierten transkriptionellen Regulation zu identifizieren, wurde ein Screening für GRAS-Gene aus *M. truncatula* durchgeführt, deren Genexpression durch Extrakt aus *R. irregularis* Sporen induziert werden konnte. Eine Veränderung der Expression durch SE-Behandlung lässt sich als eine Antwort seitens der Pflanze auf pilzliche Signale deuten. Die Reaktion findet in Form einer Umprogrammierung der pflanzlichen Transkriptionsmaschinerie statt, obwohl kein direkter physischer Kontakt mit dem Pilz und keine Kolonisierung vorhanden waren. In diesem Screening konnten drei bisher unbekannte Gene, die *MIGs*, identifiziert werden.

#### 3.1.1 Expressionsanalyse der *MIGs*

Die *MIGs* werden durch pilzliche Signale induziert. Eine Auftrennung des SEs zeigte, dass möglicherweise die Pelletfraktion spezifische Moleküle besitzt, die als Signale für die *MIG*-Expression dienen. Für eine frühe Induktion der *MIGs* spricht auch die Induktion von *MIG1* und *MIG2* in den Expressionsdaten von Ortu *et al.* (2012), in denen frühe Infektionseignisse, im Stadium der Hyphopodienbildung, untersucht wurden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass der verwendete artifizielle SE-Assay ein späteres Stadium widerspiegelt, in dem der Pilz die Wurzel bereits kolonisiert hat. Diese Interpretation wird durch die starke Expression der *MIGs* in späteren Phasen der AM anhand einer Expressionsanalyse in mykorrhiziertem Gewebe bzw. die Arbuskel-assoziierte Expression in veröffentlichten Transkriptomanalysen (Gaude *et al.*, 2012a; Hogeckamp & Küster, 2013) unterstützt. Generell deutet eine verstärkte Expression der *MIGs* während der AM-Symbiose auf eine Funktion dieser in der Etablierung oder Erhaltung der Symbiose hin.

### 3.1.2 Phylogenetische Analyse der MIGs

Eine phylogenetische Analyse der gesamten GRAS-Proteinfamilie deckte auf, dass die MIGs zu einer bisher funktionell nicht charakterisierten Klade eingeordnet werden, welche sich durch den konservierten N-Terminus definiert. Interessanterweise konnten nur Orthologe in AM-Wirtspflanzen, nicht jedoch in den Nichtwirtspflanzen *Capsella rubella*, *Thellungiella halophila*, *Brassica rapa*, *Arabidopsis lyrata* oder *A. thaliana*, welche alle der Familie der Brassicaceae angehören, gefunden werden. Dieses evolutionäre Muster ist typisch für Gene die in der AM-Symbiose involviert sind und kann auf einen sekundären Verlust symbiotischer Gene in Nichtwirtspflanzen zurückgeführt werden (Delaux *et al.*, 2014). Zudem wird ein solches Muster häufig zur Identifizierung neuer AM-Gene verwendet, da davon ausgegangen wird, dass in AM-Pflanzen evolutionär konservierte Gene womöglich eine Funktion in der AM-Symbiose einnehmen (Delaux *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2015; Bravo *et al.*, 2016). Hierfür spricht zudem die transkriptionelle Induktion der MIG1-Unterfamilie zugehörigen Gene aus *M. truncatula* (diese Arbeit) und *L. japonicus* (Xue *et al.*, 2015) während der AM-Symbiose. Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch Gene aus anderen Pflanzenarten eine AM-assoziierte Expression aufweisen. Dieser GRAS-Zweig wurde bisher in *S. lycopersium* und *P. trichocarpa* erwähnt, allerdings konnte in nur wenigen der getesteten Konditionen eine Expression festgestellt werden, womöglich da symbiotische Konditionen nicht in Betracht gezogen wurden (Liu & Widmer, 2014; Huang *et al.*, 2015).

### 3.1.3 Liegt eine genetische Redundanz der MIGs vor?

Bei der phylogenetischen Analyse wird deutlich, dass es sich bei *MIG1*, *MIG2* und *MIG3* um Genduplikationen handelt, welche auf Nukleotid und Proteinebene eine sehr hohe Identität zueinander aufweisen. Aufgrund dieser Ähnlichkeit stellt sich die Frage, ob es sich um redundante Proteine handeln könnte, die alle die gleiche Funktion ausüben. Die Retention von duplizierten Genen lässt sich entweder auf eine genetische Redundanz (Dean *et al.*, 2008), oder auf einen funktionellen Neugewinn zurückführen. Letzterer kann eine Neo-Funktionalisierung oder eine Unter-Funktionalisierung, bei dem beide Duplikationen gemeinsam die originale ancestrale Funktion übernehmen, bedeuten (Lynch & Conery, 2000). Anhand der vorhergesagten Sekundär- und Tertiärstrukturen lassen sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den MIGs entdecken. Die phylogenetischen Analyse zeigte dagegen klar, dass *MIG1* und *MIG2* näher miteinander verwandt sind, als jeweils mit *MIG3*. *MIG3* hat sich evolutionär demnach früher abgespalten, als *MIG1* und *MIG2* voneinander. Dies zeigt sich auch in der Expressionsanalyse: Während alle drei *MIGs* durch eine Mykorrhizierung induziert werden, konnte nur für *MIG1* und *MIG2* eine Korrelation mit der *PT4*-Expression und damit eine Korrelation mit der Menge gebildeter Arbuskeln demonstriert werden. Auch eine frühe Induktion während der Hyphopodienbil-

ung konnte nur für *MIG1* und *MIG2*, nicht aber für *MIG3*, festgestellt werden (Ortu *et al.*, 2012). Im Hinblick auf die Identität der Nukleotidsequenzen der putativen Promotorbereiche zeigt sich abermals, dass *MIG1* und *MIG2* ähnlicher zueinander sind als zu *MIG3*. Ein CTTC-ähnliches Motiv in der Nähe des ATGs weisen nur *MIG1* und *MIG2* auf. In Einklang hiermit konnte für *MIG1* eine starke Promotoraktivität in Arbuskel-enthaltenden Zellen beobachtet werden. Es wäre sehr interessant zu wissen, in welchen Wurzelzellen die Promotoraktivität von *MIG2* und *MIG3* in mykorrhiziertem Gewebe vorzufinden sind. Diese Ergebnisse sprechen für eine spezifische Funktion von *MIG1* und *MIG2* in der AM-Symbiose. *MIG3* ist zwar auch während der AM-Symbiose induziert, könnte aber aufgrund seiner hohen Basalexpression zusätzlich auch eine nichtsymbiotische Funktion ausüben.

Die Regulation der *MIG1*-Expression kann unter anderem durch seine Phosphatmangel-assoziierte Expression von *MIG2* und *MIG3* separiert werden, welche erneut auf eine AM-spezifische Funktion *MIG1* schließen lässt. Außerdem besitzt auch *MIG2*, wie *MIG3*, eine hohe Basalexpression, welche für eine zusätzliche Funktion unter nichtsymbiotischen Bedingungen spricht.

Aufgrund der hohen Homologie wurden beim Einsatz eines RNAi-Konstruktes alle drei Gene herunterreguliert. Da bei beiden erfolgreichen Versuchen die gleiche Sequenz für die Haarnadel-Struktur (RNAi.3) verwendet wurde, lag der einzige Unterschied dieser RNAi-Experimente am jeweils verwendeten Promotor. Der Promotor von *MtPT4*, welcher in Arbuskel-enthaltende Zellen aktiv ist, scheint eine spezifischere Reduktion des *MIG1*-Transkripts zu ermöglichen als der ubiquitäre *AtUBI3*-Promotor. Auch dieses Ergebnis spricht dafür, dass *MIG1*, im Gegensatz zu *MIG2* und *MIG3*, hauptsächlich in Arbuskel-enthaltenden Zellen exprimiert wird.

Eine Herunterregulation von *MIG1* führte zu einem Phänotyp in der Arbuskelbildung, welcher augenscheinlich nicht durch die verbleibende Expression von *MIG2* und *MIG3* komplementiert werden konnte. Entweder die leichte Reduktion der *MIG2*- und *MIG3*-Transkripte war bereits ausreichend um ihre Funktion einzuschränken, oder aber *MIG2* und *MIG3* sind nicht in der Lage eine Reduktion von *MIG1* funktionell auszugleichen. Möglicherweise kommt es zu keiner Komplementation, da *MIG2* und/oder *MIG3* nicht in den gleichen Zellen exprimiert werden wie *MIG1*. In diesem Falle wäre eine funktionelle Redundanz denkbar, welche aber aufgrund der regulierten zeitlichen und zellspezifischen Expression von *MIG1* keine genetische Redundanz darstellt. Hierfür spricht auch die Reduktion der Expression von *MIG2* in *MIG1* OE Wurzeln. Falls *MIG1* ubiquitär exprimiert wird, wie es durch den 35S-Promotor der Fall ist, kann *MIG1* möglicherweise die Funktion von *MIG2* übernehmen, was zu einer reduzierten *MIG2*-Expression führt.

Um aufzuklären ob zwischen den MIGs eine funktionelle Redundanz vorliegt, könnte eine

kombinatorische Expression des MIG1-RNAi-Konstruktes und einer ubiquitären bzw. Arbuskel-assoziierten Überexpression von *MIG2/3* helfen.

Die durchgeführten direkten Interaktionstests in dieser Arbeit zeigten sowohl Parallelen in der Dimerbildung, als auch Unterschiede zwischen den MIGs auf. Möglicherweise gibt es aber bisher nicht getestete Komplexpartner, die mit allen drei MIGs gleichermaßen interagieren können.

Wenn man alle gesammelten Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht zieht, ist es unwahrscheinlich, dass zwischen MIG1 und MIG3 eine funktionelle Redundanz vorliegt, sowohl ihre Sequenz, als auch ihr Expressionsmuster weisen Unterschiede auf, welche auf eine divergente Entwicklung zurückzuführen ist. MIG1 und MIG2, welche näher miteinander verwandt sind, weisen viele Gemeinsamkeiten auf. Die strenge transkriptionelle Regulation von *MIG1* schließt eine vollkommene Redundanz allerdings weitestgehend aus. MIG1 scheint demnach eine Neo-Funktionalisierung darzustellen, welche sich zugunsten der AM-Symbiose entwickelt haben könnte und ihre Funktion räumlich-zeitlich reguliert spezifisch in Arbuskel-enthaltenden Zellen ausübt.

## 3.2 MIG1, ein Transkriptionsfaktor in der AM-Symbiose

Aufgrund der Tatsache, dass *MIG1* im Gegensatz zu *MIG2* und *MIG3* eine spezifische transkriptionelle Regulation während der AM-Symbiose aufweist, wurde sich in dieser Arbeit auf die funktionelle Charakterisierung von MIG1 konzentriert.

### 3.2.1 MIG1 übt seine Funktion in Arbuskel-enthaltenden Zellen aus

Ein Promotorreporter von *MIG1* deckte eine sehr starke Promotoraktivität in Arbuskel-enthaltenden Zellen auf und zeigte zudem eine schwache Aktivität in Kortezellen, welche in Kontakt mit intraradikalen Hyphen standen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass MIG1 eine Funktion in der Akkommodation des AM-Pilzes ausüben könnte. Die sukzessive Verkürzung des Promotors offenbarte, dass ein 230 bp-Fragment vor dem ATG ausreichend war, um eine spezifische Expression des Reportergens in Arbuskel-enthaltenden Zellen zu erlangen. Generell weist eine starke Aktivität des *MIG1*-Promotors in Arbuskel-enthaltenden Zellen auf eine Funktion in diesen Zellen hin.

Um diese Hypothese zu testen wurde versucht die Transkriptmenge von *MIG1* durch unterschiedliche RNAi-Konstrukte herunterzuregulieren. Die Verwendung des 35S-Promotors führte zu keiner erfolgreichen Verringerung des *MIG1*-Transkripts. Dies könnte an einer reduzierten Aktivität des 35S-Promotors in Arbuskel-enthaltenden Zellen liegen, wie es von der verwandten Wurzelknöllchensymbiose bekannt ist, in der eine drastische Abschwächung der Aktivität des 35S-Promotors in Knöllchen von *M. truncatula* beobachtet wurde (Auriac & Timmers, 2007). Auch in der AM-Symbiose konnten Hinweise

gesammelt werden, dass die Expressionsstärke des 35S-Promotors in AM-kolonisierten Kortezellen stark verringert zu sein scheint (Pumplin *et al.*, 2012). Aufgrund dessen wurden zwei weitere Promotoren verwendet, um eine Expression der RNAi-Konstrukte zu gewährleisten. Der ubiquitäre *AtUBI3*-Promotor führte zu einer signifikanten Reduktion von *MIG1* sowie von seinen Homologen *MIG2* und *MIG3* in mykorrhizierten Wurzeln. Eine Reduktion in der Expression der *MIGs* äußerte sich im Hinblick auf die Mykorrhizierung in einer verringerten Zahl reifer Arbuskeln, wohingegen die Zahl an unreifen, deformierten Arbuskeln angestiegen war. Um zu untersuchen, ob dieser Arbuskelphänotyp auf *MIG1* zurückzuführen war, wurden weitere, unabhängige RNAi-Experimente durchgeführt bei welchen der Arbuskel-spezifischen Promotor von *MtPT4* verwendet wurde. Unter diesem Promotor wurden zwei RNAi-Konstrukte (RNAi.3 und RNAi.4) exprimiert, die beide eine erfolgreiche Reduktion des *MIG1*-Transkriptes zeigten. Mit *PMtPT4* wurden die Transkripte von *MIG2* und *MIG3* im Vergleich zu *PAtUBI3* weniger beeinflusst, sodass die Aussage getroffen werden kann, dass RNAi-Konstrukte mit *PMtPT4* wesentlich spezifischer *MIG1* treffen, als seine Homologe. Der Arbuskelphänotyp konnte in diesen RNAi-Experimenten bestätigt werden. Eine Reduktion von *MIG1* wirkt sich demnach negativ auf die Arbuskelbildung aus.

Bei RNAi-Experimenten bleibt trotz Reduktion immer eine verbleibende Transkriptmenge übrig. Ein *knock out*, wie beispielsweise durch eine *Tnt1*-Insertion oder gezielt mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems (Stella & Montoya, 2016) könnte einen wesentlich stärkeren Phänotyp in der AM-Symbiose zur Folge haben und würde eine gezielte funktionale Charakterisierung von *MIG1* ohne transkriptioneller Reduktion von *MIG2* und *MIG3* ermöglichen. Da es für *MIG1* aber keine verfügbare *Tnt1*-Insertionsmutante gibt und CRISPR/Cas bis dato in *M. truncatula* noch nicht etabliert wurde, bleibt dies vorerst eine Spekulation.

### 3.2.2 Hinweise für eine Funktion als Transkriptionsfaktor

GRAS-Proteine gelten generell als transkriptionelle Regulatoren. Allerdings konnte bisher nur für einen Teil der Proteine eine direkte DNA-Bindung und Transaktivierungsaktivität gezeigt werden, weswegen man sich bis heute nicht einig ist, ob der Funktionsmechanismus als TFs auf alle GRAS-Proteine zutrifft (Bolle, 2004).

Die typische subzelluläre Lokalisation von TFs stellt der Zellkern dar. Eine solche Lokalisation im Nukleus konnte bereits für viele GRAS-Proteine beobachtet werden, darunter für die DELLA-Proteine *AtRGA* (Silverstone *et al.*, 1998), *AtRGL1* (Wen & Chang, 2002) und *OsSLR1* (Itoh *et al.*, 2002). Auch GRAS-Proteine anderer Unterfamilien besitzen eine nukleare Lokalisation wie beispielsweise *LISCL* (Morohashi *et al.*, 2003), *NSP1* (Smit *et al.*, 2005), *AtSCL3* (Heo *et al.*, 2011) und *LjRAD1* (Xue *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu konnte für *AtSHR* eine Lokalisation im Nukleus und Cytoplasma beobachtet werden, was

mit seiner Fähigkeit verknüpft ist von Zelle zu Zelle zu wandern (Nakajima *et al.*, 2001). Seine gewebespezifische und nukleare Lokalisation wird durch seinen Interaktionspartner AtSCR bestimmt, wodurch die radiale Musterbildung reguliert wird (Gallagher *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2014). NSP2 findet man unter nicht-symbiotischen Bedingungen im ER um den Kern, erst eine Perzeption der symbiotischen Nod-Faktoren führt zu einer Relokalisation in den Nukleus (Kaló *et al.*, 2005). Eine Ausnahme bildet AtPAT1, eine Komponente der PhytochromA-Signalkaskade, da es bisher ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert werden konnte (Bolle *et al.*, 2000). Womöglich findet eine Migration von AtPAT1 in den Kern unter bisher unbekanntem physiologischen Konditionen statt. Eine heterologe Expression von GFP-MIG1 in *N. benthamiana* deckte eine subzelluläre Lokalisation im Cytoplasma und im Zellkern auf. Eine Immunodetektion zeigte, dass das Fusionskonstrukt intakt vorlag, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das GFP-Signal tatsächlich auf die Lokalisation von MIG1 zurückgeht. Da es sich um eine starke Expression mit Hilfe des 35S-Promotors handelte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter nativen Bedingungen der AM-Symbiose eine wesentlich geringere Expression vorzufinden ist und MIG1 in diesem Fall ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass MIG1, wie NSP2 durch symbiotische Stimuli oder AtSHR durch spezifische Interaktionspartner erst unter bestimmten Bedingungen eine Relokalisation in den Zellkern erfährt. Beiden DELLA-Proteinen aus *M. trunactula*, DELLA1 und DELLA2, konnte in dieser Arbeit eine Lokalisation im Zellkern zugewiesen werden.

Ein zweites Charakteristikum von TFs stellt die Effektordomäne dar, welche die Frequenz der transkriptionellen Initiation der jeweiligen Zielgene bestimmt und entweder stimulierend oder inhibierend auf deren Expression wirkt (van Tol & van der Zaal, 2014). Im Hinblick auf GRAS-Proteine konnte einigen eine stimulierende Transaktivierungs (TA)-Aktivität zugeschrieben werden. So besitzen LISCL (Morohashi *et al.*, 2003) und die symbiotischen GRAS-Proteine NSP1 und NSP2 (Hirsch *et al.*, 2009) TA-Aktivität, welche vor allem dem jeweiligen N-Terminus zugewiesen werden konnte. DELLA-Proteine, welche als Repressoren der GA-Antwort gelten, weisen überraschenderweise auch eine TA-Aktivität auf. Für OsSLR1 konnte gezeigt werden, dass dieses Charakteristikum notwendig ist um seine Funktion als Wachstumsrepressor auszuführen (Ogawa *et al.*, 2000; Hirano *et al.*, 2012). DELLA-Proteine scheinen demnach zumindest teilweise ihre Funktion als stimulierende Transkriptionsfaktoren auszuüben und nicht, wie zum Teil angenommen, als Expressions-Repressoren oder sogar gänzlich unabhängig ihrer TA-Aktivität. Systematische Untersuchungen in Pflanzen verschiedener Phyla zeigten, dass selbst das ursprüngliche DELLA-Ortholog PpDELLAa aus dem Bryophyten *Physcomitrella patens* eine N-Terminale TA-Aktivität besitzt und als Wachstumsrepressor in höheren Pflanzen agieren kann (Yasumura *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 2012). Demnach erlangte



zumindest die Unterfamilie der DELLA-Proteine bereits vor Speziation der vaskulären Pflanzen ihre TA-Aktivität. Auch für MIG1 und DELLA2 aus *M. truncatula* konnte in dieser Arbeit eine TA-Aktivität in Hefe nachgewiesen werden. Für MIG1 konnte zudem gezeigt werden, dass sein N-Terminus ausreichend ist, um die Genexpression der Reportergene zu stimulieren.

Ein weiteres Merkmal von TFs ist die Bindung an DNA. Für einzelne GRAS-Proteine konnte eine direkte Bindung an den Promotor ihres Zielgens demonstriert werden. So bindet NSP1 in Anwesenheit von NSP2 an den *ENOD11*-Promotor und stimuliert dessen Expression während der Wurzelknöllchensymbiose (Hirsch *et al.*, 2009). Das Heterodimer SCR-SHR bindet in *A. thaliana* an den *SCR*-Promotor wodurch in einer positiven Rückkopplungsschleife eine vermehrte *SCR*-Expression eingeleitet wird (Cui *et al.*, 2007). Ähnlich interagiert SCR-SHR auch direkt mit dem *SCL3*-Promotor (Cui *et al.*, 2007). Auch DELLA-Proteinen konnten eine Assoziation mit Promotoren von Zielgenen nachgewiesen werden, deren Transkription daraufhin stimuliert werden (Zentella *et al.*, 2007). Da DELLA-Proteine keine eigene DNA-Bindedomäne besitzen, gingen Yoshida *et al.* (2014) davon aus, dass *Scaffold*-Proteine die Bindung der DELLAs an DNA vermitteln. Tatsächlich konnten Proteine der IDD (Interdeterminate Domain) Familie identifiziert werden, welche diese Aufgabe übernehmen und beispielsweise die Interaktion von AtRGA mit dem *AtSCL3*-Promotor ermöglichen (Yoshida *et al.*, 2014). Im konservierten N-Terminus von MIG1 sowie seinen Homologen wurden *in silico* putative DNA-Bindestellen identifiziert, was eine direkte DNA-Bindung von MIG1 an seine Zielgene plausibel erscheinen lässt. Da direkte Zielgene von MIG1 noch nicht bekannt sind, müsste man an solch eine Fragestellung versuchstechnisch durch eine globale Analyse, wie CHIP-Seq, herangehen. Ein weiterer Hinweis für eine direkte DNA-Bindung von MIG1 ist die Vorhersage der Tertiärstruktur seines C-Terminus. Die Vorhersage wurde anhand der OsSCL7-Kristallstruktur vorgenommen. OsSCL7 bildet ein Homodimer, welches eine putative Furche für die Interaktion mit doppelsträngiger DNA besitzt (Li *et al.*, 2016). MIG1 bildet laut der durchgeführten BiFC-Analyse keine Homodimere. Aufgrund seiner konservierten GRAS-Domäne, welche die Tertiärstruktur von OsSCL7 widerspiegelt, kann es aber durchaus sein, dass MIG1 nach Bildung eines Heterodimers eine ähnliche Furche für die DNA-Bindung ausbildet.

Zusammenfassend ist es sehr wahrscheinlich, dass MIG1 eine Funktion als stimulierenden Transkriptionsfaktor ausübt. Aufgrund seines zeitlichen und räumlichen AM-spezifischen Expressionsmusters, lässt sich vermuten, dass MIG1 als Transkriptionsfaktor in der AM-Symbiose fungiert.

### 3.2.3 GRAS-Dimere in der AM-Symbiose

Aufgrund ihrer besonderen Struktur werden GRAS-Proteine als Schlüsselproteine bezeichnet, welche in zahlreichen Entwicklungsprozessen involviert sind. Es handelt sich dabei generell um strukturell instabile Proteine mit einem hohen Instabilitäts-Index (Song *et al.*, 2014). Neben einer in Sequenz und Struktur konservierten C-terminalen GRAS-Domäne, besitzen GRAS-Proteine einen variablen N-Terminus, der sich durch intrinsisch ungeordnete Bereiche (IDRs – *intrinsically disordered regions*) auszeichnet (Sun *et al.*, 2012). Diese besitzen keine determinierte Sekundär- oder Tertiärstruktur, sondern falten sich je nach Interaktionspartner unterschiedlich (Uversky, 2010). Intrinsisch ungeordnete Proteine oder Sequenzbereiche vermitteln entsprechend ihrer Interaktionspartner eine Konformationsänderung, welche sich durch hohe Spezifität und geringe Affinität auszeichnet (Sun *et al.*, 2012). So konnte beispielsweise für den N-Terminus von DELLA-Proteinen ein intrinsisch ungeordneter Charakter vorhergesagt werden, dessen Konformationsänderung durch die Bindung an den aktivierten Rezeptorkomplex GID1-GA induziert wird (Sun *et al.*, 2010). Überdies erlauben IDRs eine schnelle Dissoziation dieser Interaktionen, welche für eine schnelle Reaktion seitens der Pflanze von Vorteil ist (Dunker *et al.*, 2002). Eine hohe Bindeplastizität aufgrund von IDRs ermöglicht es dem Organismus schnell auf unterschiedliche externe und interne Stimuli zu reagieren. Eine Strukturvorhersage deckte auch in MIG1, MIG2 und MIG3 solche strukturell ungeordneten Bereiche in ihrem N-Terminus auf. Interessanterweise liegen zwischen diesen Sequenzen putative  $\alpha$ -Helices, welche für die gesamte MIG-Unterfamilie konserviert vorliegen. Diese besondere Anordnung von abwechselnd strukturell geordneten und ungeordneten Bereichen könnte es den MIGs ermöglichen ihre spezifischen Bindepartner zu erkennen.

Die Kristallisation von OsSCL7 konnte aufklären, dass eine Dimerisierung zu einer Furchenbildung führt, welche zur Bindung an doppelsträngige DNA befähigt (Li *et al.*, 2016). Da diese Bindung durch den konservierten GRAS-Terminus vermittelt wird, ist es wahrscheinlich, dass es sich dabei um einen generellen Mechanismus der GRAS-Proteine handelt. In einem direkten BiFC-Assay konnte eine Interaktion zwischen MIG1 und NSP1 bzw. DELLA1 beobachtet werden (Abb. 3.1 A). Da für NSP1 bereits gezeigt werden konnte, dass es eine Rolle in der AM-Symbiose besitzt (Delaux *et al.*, 2013; Takeda *et al.*, 2013; Camps *et al.*, 2015; Hohnjec *et al.*, 2015), stützt diese Interaktion die Hypothese, dass auch MIG1 wichtig für die AM-Symbiose ist. Möglicherweise agieren NSP1 und MIG1 gemeinsam als Transkriptionsfaktorkomplex um spezifische Gene während der Symbiose zu regulieren (Abb. 3.1 B). Eine Interaktion mit DELLA1 positioniert MIG1 in den GA-Signalweg. Den DELLA-Proteinen konnte bereits eine Schlüsselrolle in der Arbuskelmorphogenese zugeschrieben werden, da zahlreiche transkriptionelle Änderungen AM-assoziiierter Gene durch DELLA vermittelt werden (Floss *et al.*, 2013; Park *et al.*,

2015; Floss *et al.*, 2016; Pimprikar *et al.*, 2016). Unter anderem induziert ein stabilisiertes DELLA-Protein die Expression der in der Arbuskelentwicklung involvierten GRAS-Gene *RAM1* und *RAD1* (Park *et al.*, 2015).

Die große Anzahl AM-assoziiierter GRAS-Proteine und ihre Interaktionen untereinander lassen darauf schließen, dass während der AM-Symbiose eine feinregulierte Komplexbildung zur Steuerung der Transkription verantwortlich ist. Dabei können in ein und derselben Zelle unterschiedliche Dimere mit individuellen Aufgaben gebildet werden. *In vivo* wird diese Komplexbildung durch verschiedene Faktoren beeinflusst:

1. Die räumliche Regulation der Genexpression gibt die Präsenz der GRAS-Proteine in bestimmten Zellen vor. Eine *MIG1*-Expression in Arbuskel-enthaltenden Zellen wurde sowohl durch Promotorreporterstudien, Korrelationsanalyse mit dem Arbuskel-spezifischen Phosphattransporter *PT4* sowie durch veröffentlichte Microarray-Daten mit LCM Proben (Gaude *et al.*, 2012a; Hoge Kamp & Küster, 2013) unterstützt. Daneben konnte eine schwache Aktivität des *MIG1*-Promotors in Zellen beobachtet werden, die durch Hyphen des AM-Pilzes kolonisiert waren. *RAM1* (Gobbato *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015; Pimprikar *et al.*, 2016), *RAD1* (Xue *et al.*, 2015) und *NSP1* (Takeda *et al.*, 2013) zeigen neben einer Expression in Arbuskel-enthaltenden Zellen auch eine vergleichbare Promotoraktivität in kolonisierten Bereichen, welche intraradikale Hyphen aufweisen. Zusätzlich zur Promotoraktivität kann die Transkriptmenge auch durch endogene Mikro-RNAs reguliert werden (Devers *et al.*, 2011). Das ist beispielsweise bei *NSP2* der Fall (Devers *et al.*, 2011), bei dem man sich bisher noch uneinig ist, ob es generell eine Induktion (Hofferek *et al.*, 2014) oder Reduktion (Laressergues *et al.*, 2012) seiner Transkriptmenge während der AM-Symbiose erfährt. Klar ist, dass das *NSP2*-Transkript fein reguliert wird und manchmal, aber nicht immer auch in Arbuskel-enthaltenden Zellen vorzufinden ist (Hofferek *et al.*, 2014).

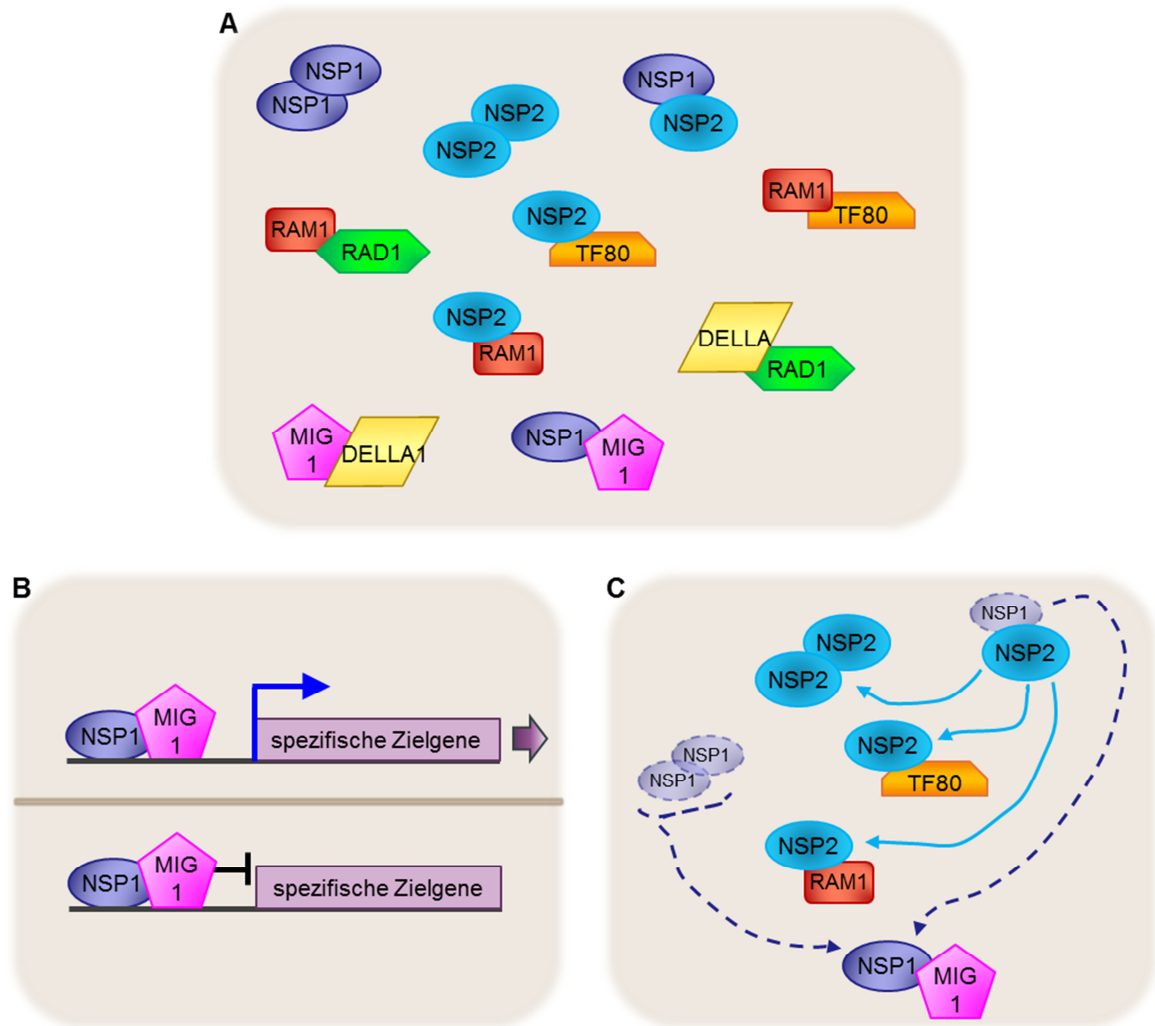
2. Neben der Transkriptionsebene wird die Präsenz eines Proteins in bestimmten Zellen auch auf Proteinebene durch Migration oder Stabilisierung reguliert. DELLA1 wird beispielsweise während der AM-Symbiose nicht auf Transkriptionsebene reguliert und seine Promotoraktivität konnte während der AM-Symbiose lediglich im Zentralzylinder und der Endodermis beobachtet werden (Floss *et al.*, 2013). Die Erkenntnis, dass DELLA für die Expression von *RAM1* im Wurzelkortex verantwortlich und für die Arbuskelbildung notwendig ist (Park *et al.*, 2015), wird dadurch unterstützt, dass GFP-DELLA1 *in vivo* teilweise in Zellen des inneren Kortex lokalisiert (Floss *et al.*, 2013). Dementsprechend ist es möglich, dass DELLA-Proteine eine Zell-zu-Zell-Wanderung durchführen, um an den Ort ihrer Funktion zu gelangen, wie es auch für SHR-Proteine demonstriert wurde (Nakajima *et al.*, 2001). Die Abundanz an DELLA-Proteinen wird zusätzlich über die GA-Verfügbarkeit reguliert, welches die Degradation der DELLA-Proteine vermittelt und somit

deren Stabilität beeinflusst (Silverstone *et al.*, 2001).

3. Auch die zeitliche Regulation der Genexpression beeinflusst ob sich Interaktionspartner *in vivo* begegnen. *MIG1* wird begleitend mit der Fortschreitung der AM-Symbiose exprimiert, was wahrscheinlich auf die zunehmende Zahl an Arbuskeln zurückzuführen ist. Beide Interaktionspartner, *NSP1* und *DELLA1*, besitzen eine stetige Basalexpression, sodass davon ausgegangen werden kann, dass beide Proteine auch gleichzeitig mit *MIG1* während der AM-Symbiose exprimiert werden. Transkripte von *RAM1* und *RAD1* können dagegen ausschließlich während der AM-Symbiose detektiert werden. Die nicht-synchronisierte Natur der AM-Symbiose in einem Wurzelsystem erschwert es unterschiedliche Expressionsanalysen miteinander zu vergleichen, welche zudem oft mit unterschiedlichem Inokulum kolonisiert wurden. Um eine genaue Aufschlüsselung der Expression aller GRAS-Gene zu erreichen, wäre es demnach hilfreich alle Gene in den gleichen AM-kolonisierten Wurzelproben unterschiedlicher Zeitpunkte zu quantifizieren. Eine Detektion auf Zellebene mit Hilfe der LCM-Technik würde zusätzlich Aufschluss bieten. Generell sollte man zudem beachten, dass Transkripte unterschiedliche Halbwertszeiten besitzen und nicht unbedingt direkt auf die Proteinabundanz abgebildet werden können.

4. Da zu einem bestimmten Zeitpunkt und einem bestimmten Ort sicherlich mehr als nur zwei Interaktionspartner vorzufinden sind, wird die Dimerbildung zusätzlich durch Konkurrenz der GRAS-Proteine untereinander reguliert. Diese wird durch Abundanz der jeweiligen Proteine, der Affinität zum jeweiligen Bindungspartner und der Interaktionskinetik beeinflusst. Solch ein Konkurrenzmechanismus wurde bereits für *RAM1* und *NSP1* beobachtet, welche beide mit *NSP2* interagieren können (Gobbato *et al.*, 2012).

Gebildete Dimere können direkt nachgeschaltete Genexpressionen stimulieren oder inhibieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Dimere zu Stande kommen um einen der Partner daran zu hindern eine Bindung mit einem weiteren Interaktionspartner einzugehen. So wäre es beispielsweise auch denkbar, dass die Interaktion *MIG1-NSP1* während der Arbuskelbildung *NSP1* daran hindert einen Komplex mit *NSP2* einzugehen. *NSP2* würden daraufhin frei vorliegen und wäre in der Lage spezifisch mit Bindungspartnern wie *RAM1* (Gobbato *et al.*, 2012) oder *TF80* (Park *et al.*, 2015) zu interagieren und in deren Transkriptionskaskaden zu agieren (Abb. 3.1 C).



**Abbildung 3.1 Dimerbildung AM-assoziierten GRAS-Proteine und mögliche Funktionsweise des Dimers MIG1-NSP1.** (A) Bisher identifizierte Hetero- und Homodimerbildungen von GRAS-Proteinen in *M. truncatula* erweitert durch in dieser Arbeit zum ersten Mal beobachtete Interaktionen MIG1-DELLA1 und MIG1-NSP1. (B) Mögliche direkte Funktionsweisen der MIG1-NSP1 Interaktion, bei der das gebildete Dimer stimulierende oder inhibierend auf die Expression von spezifischen Zielgenen wirkt. (C) Mögliche indirekte Funktionsweise von MIG1-NSP1, bei der die Interaktion als Rekrutierung von NSP1 fungiert (gestrichelte Linie), wodurch beispielsweise NSP2 frei wird, um andere Interaktionen beispielsweise mit RAM1 oder TF80 einzugehen (durchgezogene Linie).

### 3.3 MIG1 reguliert die kortikale Zellexpansion über den GA-Signalweg

Eine Überexpression von *MIG1* in *M. truncatula* Wurzeln führte zur Beobachtung von dickeren Wurzeln, welche sowohl eine vermehrte Zahl an kortikalen Zellschichten, als auch größere Zellen aufwiesen. Dieser Phänotyp erinnerte stark an GA-verarmte Wurzeln in anderen Pflanzenspezies: In *P. sativum*, *Lactuca sativa* und *Camellia sinensis* berichtete Tanimoto von verdickten Wurzeldurchmessern durch Behandlung mit Inhibitoren der GA-Synthese, welche er auf die radiale Expansion der Kortezellen zurückführte (Tanimoto, 1987, 1994, 2012). In *O. sativa* wurde nach Behandlung mit PAC eine Proliferation kortikaler Zellschichten beobachtet (Fiorilli *et al.*, 2015). Ähnlich wurde auch in der *P. sativum*

GA-Synthese Mutanten *na-1* von dickeren Wurzeln aufgrund der Vermehrung kortikaler Zellschichten berichtet (Foo *et al.*, 2013).

#### 3.3.1 Die GA-Antwort in *M. truncatula*

Da es bisher keine veröffentlichten Daten über die Entwicklung von *M. truncatula* unter unterschiedlichen GA-Verfügbarkeiten gibt, wurden in dieser Arbeit Experimente in diese Richtung durchgeführt. Die Behandlung von WT Pflanzen mit exogenem GA<sub>3</sub> äußerte sich in verlängerten Internodien im Spross, aber kürzere Wurzeln. Auch eine Phänotypisierung der Doppelmutanten *della1/della2*, was molekular mit einer GA-Behandlung vergleichbar ist, zeigte diesen Wachstumsphänotyp. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Ergebnissen: Gibberellin fungiert demnach im Spross generell als positiver Wachstumsregulator (Phinney, 1956). In der Wurzel ist die Wirkung dagegen dosisabhängig. Appliziertes GA führt beispielsweise in *P. sativum* zu keiner Elongation der Wurzel, außer diese Wurzeln wurden mit GA-Synthese Inhibitoren vorbehandelt (Tanimoto, 1988). Der native GA-Gehalt ist demnach ausreichend für eine maximale Elongation der WT Wurzeln (Yaxley *et al.*, 2001). Diese Aussage gilt dagegen nicht für den Spross, was die Hypothese von Tanimoto (2012) unterstützt, dass Wurzeln im Vergleich zum Spross sensitiver gegenüber GA sind. Dementsprechend benötigen Wurzeln eine wesentlich geringere Menge an GA um zu wachsen, als in dieser Arbeit verwendet. Eine höhere GA-Konzentration, welche einen Effekt im Spross auslöst, wirkt jedoch inhibierend auf das Wurzelwachstum (Tanimoto, 1994). Die GA-Homöostase scheint zwischen Spross und Wurzel unterschiedlich fein reguliert zu sein, was ein angepasstes Verhältnis zwischen diesen beiden Organen ermöglicht.

Interessanterweise konnte diese Inhibition des Wurzelwachstums durch hohe Mengen an GA nur in WT Pflanzen beobachtet werden, nicht jedoch in *hairy roots*, welche keinen Spross besitzen. Diese zeigten bei einer vergleichbaren Behandlung längere und dünnere Wurzeln als Mock-behandelte Wurzelkulturen. Dieses Phänomen könnte zum einen auf den fehlenden Spross zurückzuführen sein. Möglicherweise führt eine fehlende Kommunikation zwischen Wurzel und Spross zu einer gestörten GA-Wahrnehmung. Eine andere Erklärung wäre, dass *hairy roots* wegen ihrer veränderten Auxin-Homöostase aufgrund des transformierten Ri-Plasmids insensitiver gegenüber GA im Vergleich zu WT Wurzeln sind. In diesem Sinne wurde gezeigt, dass das Phytohormon Auxin für GA-abhängiges Wurzelwachstum benötigt wird (Fu & Harberd, 2003).

Auf Zellebene wurde durch exogene GA-Behandlung keine oder nur eine geringe longitudinale Elongation der Zellen in *M. truncatula* festgestellt. Da aber trotz verkürzter Wurzel keine verkürzten Zellen beobachtet wurden, sondern sogar leicht verlängerte Zellen, kann davon ausgegangen werden, dass eine zu hohe GA-Konzentration das Wurzelwachstum aufgrund einer verringerten Zellteilung inhibiert und nicht auf Ebene der Zellelongation. In



der Tat konnte Gibberellin in *A. thaliana* neben der Zellelongation auch eine positive Rolle in der longitudinalen Zellproliferation zugeschrieben werden (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

Zudem resultierte eine GA-Behandlung von *M. truncatula* in eine Verringerung der kortikalen Zellschichten. Diese Beobachtung kann mit der Bildung des Mittelkortex in *A. thaliana* verglichen werden, welche durch Zugabe von GA<sub>3</sub> eine Verzögerung erfährt, demnach weniger Zellschichten aufweist als unter Mock-Bedingungen (Paquette & Benfey, 2005).

Eine GA-Verarmung, welche durch eine Behandlung mit dem GA-Biosyntheseinhibitor PAC hervorgerufen wurde, resultierte in einem entsprechend gegensätzlichen Phänotyp in *M. truncatula*. In WT Pflanzen konnte man verkürzte Sprosse und verlängerte Wurzeln beobachten. Die Behandlung mit PAC führte demnach nicht zu einer kompletten Blockierung der GA-Synthese, da für das beobachtete Wurzelwachstum eine geringe GA-Abundanz vorhanden sein muss (Tanimoto, 1988; Yaxley *et al.*, 2001; Fu & Harberd, 2003).

*Hairy roots* zeigten auch bei der PAC-Behandlung einen Unterschied zu WT-Wurzeln, da sie im Vergleich zu Mock-behandelten Wurzelkulturen ein vermindertes Wachstum aufwiesen. PAC wird über das Xylem in den Spross transportiert und akkumuliert schließlich in Blättern (Wang *et al.*, 1986). In WT Pflanzen könnte demnach der Transport des PACs aus der Wurzel in den Spross in einer schwachen GA-Biosynthese in den Wurzeln resultieren, welche ausreichend für das beobachtete Wurzelwachstum wäre. In Wurzelkulturen verbliebe PAC dagegen in den Wurzeln und verhindere deren Elongation. Wie bereits erwähnt könnte auch eine veränderte GA-Sensitivität und Auxin-Homöostase aufgrund des Ri-Plasmids (Moore *et al.*, 1979) eine Erklärung sein.

Daneben führte eine Inhibition der GA-Synthese zu dickeren Wurzeln, welche auf die größere Anzahl an kortikalen Zellschichten und die radiale Expansion der Kortexzellen zurückzuführen war. Dieser Phänotyp zeigte sich sowohl in behandelten WT Pflanzen, als auch in Wurzelkulturen und konnte bereits in anderen Pflanzen, wie *P. sativum* oder *O. sativa* beobachtet werden (Tanimoto, 2012; Fiorilli *et al.*, 2015). Interessanterweise besitzen die meisten Pflanzenarten, wie auch *M. truncatula*, bereits von Anfang an mehrere Kortexschichten (Evert & Esau, 2006), die Modellpflanze *A. thaliana* besitzt dagegen in jungen Wurzeln nur eine einzige Kortexschicht (Dolan *et al.*, 1993), welche später durch eine zweite Schicht, den Mittelkortex, erweitert wird (Pauluzzi *et al.*, 2012). Möglicherweise findet sich mechanistisch ein Zusammenhang zwischen der Bildung des Mittelkortex in *A. thaliana*, welche durch ein komplexes Zusammenspiel der GRAS-Proteine SCR, SHR und SCL3 und dem GA-Signalweg vermittelt wird (Choi & Lim, 2016), und der multiplen Kortexschichten in anderen Pflanzenspezies (Paquette & Benfey, 2005). Bekannt ist, dass die Proteinabundanz von SHR in bestimmten Zellschichten,

kontrolliert durch seinen Interaktionspartner SCR, für die Anzahl der Kortexschichten verantwortlich ist (Wu *et al.*, 2014), wie diese Regulation in unterschiedlichen Pflanzenspezies zu der jeweiligen Zahl an Kortexschichten führt, wird Inhalt zukünftiger Untersuchungen sein.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass *M. truncatula* eine vergleichbare Reaktion auf unterschiedliche GA-Verfügbarkeit zeigt, wie es für andere Pflanzen demonstriert wurde.

#### 3.3.2 DELLA als Positivregulator der radialen Zellexpansion

Da eine GA-Behandlung molekular in einer Degradierung der DELLA-Proteine resultiert und umgekehrt eine PAC-Behandlung zu einer Stabilisierung dieser führt, wurde sich mit der Phänotypisierung von DELLA-Mutanten beschäftigt. Eine Deletion der DELLA-Domäne von MtDELLA1 führt zu einer Insensitivität des resultierenden  $\Delta 18$ DELLA1 gegenüber GA (Floss *et al.*, 2013). Diese Deletion ist der Mutanten *gai-1* aus *A. thaliana* nachempfunden (Peng *et al.*, 1997). Die ektopische Expression von  $\Delta 18$ DELLA1 in *M. truncatula* Wurzeln resultierte in einem vergleichbaren Phänotyp wie eine Behandlung mit PAC. Da PAC zu einer Hemmung der Kaurenoxidase in der GA-Biosynthese führt (Dalziel & Lawrence, 1984), findet eine dosisabhängige GA-Inhibition statt.  $\Delta 18$ DELLA1 wirkt dagegen im Signalweg nach der GA-Biosynthese und führt zu einer vollkommenen Blockierung der GA-Antwort.

Interessanterweise wurde DELLA-Proteinen bisher lediglich die Regulation der longitudinalen Elongation zugeschrieben. Dabei reprimieren sie die Wurzelelongation durch eine verminderte longitudinale Zellelongation (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008) und Zellproliferation (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009), da sie den GA-Signalweg antagonisieren. DELLA-Proteine sind demnach bekannt als Negativregulatoren des longitudinalen Zell- und Organwachstums. In dieser Arbeit konnte den DELLA-Proteinen eine zweite Aufgabe zugeschrieben werden. Die Expression von  $\Delta 18$ DELLA1 führte nicht nur zu verkürzten Zellen in longitudinaler Richtung, sondern auch zu einer Expansion der Kortexzellen in radialer Richtung. Außerdem konnte eine Proliferation der kortikalen Zellschichten festgestellt werden. Wie bereits erwähnt resultiert eine PAC-Behandlung von Wurzeln in einem vergleichbaren Phänotyp, diese Beobachtung kann nun also durch die Stabilisierung der DELLA-Proteine aufgrund des verminderten GA-Gehaltes erklärt werden. Eine Hypothese besagt, dass anisotropes Zellwachstum durch die Organisation kortikaler Mikrotubuli reguliert wird, welche wiederum die Anordnung der Zellulose Mikrofibrillen determinieren (Baskin, 2001; Foster *et al.*, 2003; Baskin, 2005). Der positive Effekt von GA auf die Zellelongation konnte in zahlreichen Studien mit dieser Reorganisation verknüpft werden (Shibaoka, 1974; Mita & Katsumi, 1986; Kaneta *et al.*, 1993; Duckett & Lloyd, 1994; Lloyd *et al.*, 1996). Locascio *et al.* (2013) gelang es eine direkte Verbindung

zwischen DELLA-Proteinen und dem Prefoldin-Komplex, welcher für die Tubulinbildung verantwortlich ist (Hartl & Hayer-Hartl, 2002), aufzuzeigen. Dieser Mechanismus geht damit einher, dass eine longitudinal wachsende Zelle in radialer Richtung schmaler wird bzw. umgekehrt, dass eine kurze Zelle in longitudinaler Richtung eine Expansion in radialer Richtung erfahren würde. Dass dies nicht immer der Fall sein muss, zeigte die GA-Behandlung von *M. truncatula* Wurzelkulturen, in der keine longitudinale Zellelongation beobachtet wurde, wohl aber eine verminderte Zellbreite. Dieses Ergebnis unterstützt die Aussage, dass longitudinales und radiales Zellwachstum unabhängig voneinander stattfinden kann und entkoppelt es von der Anordnung kortikaler Mikrotubuli. In diesem Sinne wurden Experimente durchgeführt, welche gegen eine direkte GA-vermittelte Reorganisation kortikaler Mikrotubuli sprechen (Wenzel *et al.*, 2000; Sauret-Gueto *et al.*, 2012). DELLA-Proteine übernehmen in der Wurzelentwicklung demzufolge mehrere Aufgaben: Neben der gut untersuchten Repression der longitudinalen Wurzelelongation durch inhibierte Zellelongation und -teilung, sind DELLA-Proteine Positivregulatoren der radialen Wurzelexpansion, welche sie durch die Förderung der radialen Zellexpansion und -teilung regulieren.

#### 3.3.3 Lokale Regulation der GA-Verfügbarkeit während der AM-Symbiose

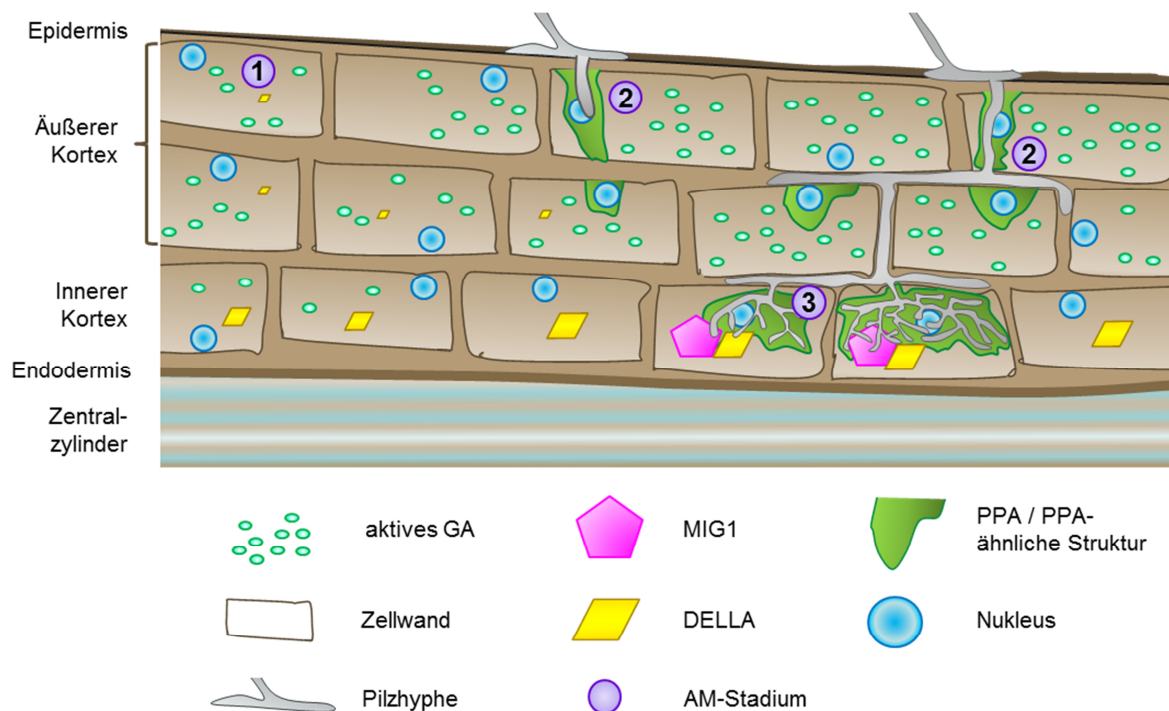
Eine verstärkte GA-Antwort führt zu einer Inhibition der Arbuskelbildung und wirkt somit der Bildung einer funktionellen AM-Symbiose entgegen. Dies konnte durch exogene GA-Behandlungen, als auch durch die Phänotypisierung von DELLA-Mutanten unterschiedlicher Pflanzenarten beobachtet werden (El Ghachtouli *et al.*, 1996; Floss *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015). So ist es nicht verwunderlich, dass die Ausbildung der AM-Symbiose mit einer Umstrukturierung der GA-Homöostase einhergeht. In dieser Arbeit konnte eine Induktion anaboler und eine Reduktion kataboler Oxidasen in mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzelkulturen beobachtet werden. In inokulierten WT Pflanzen konnte zwar auch eine verstärkte Expression der anabolen Oxidasen gemessen werden, allerdings lag in diesem Fall keine Signifikanz vor. Die katabole Oxidase GA2box zeigte im Gegensatz zu den analysierten Wurzelkulturen eine Induktion ihrer Expression. Diese Unterschiede könnten, wie auch beim Wurzelwachstum, auf den fehlenden Spross oder die integrierten Ri-T-DNA in Wurzelkulturen zurückzuführen sein. Da die Mykorrhizierung in ganzen Pflanzen und Wurzelkulturen nicht mit der gleichen Effizienz voranschreitet, könnten die beobachteten Unterschiede in der Expression der GA-Oxidasen möglicherweise an den unterschiedlichen Stadien der Mykorrhizierung liegen. Zahlreiche Studien berichten in unterschiedlichen Spezies im Mittel von einer verstärkten Expression anaboler GA-Oxidasen bzw. einer abgeschwächten Expression kataboler Oxidasen in mykorrhizierten Wurzeln (Shaul-Keinan *et al.*, 2002; Guether *et al.*, 2009; Garcia-Garrido *et al.*, 2010; Ortu *et al.*, 2012; Floss *et al.*, 2013;

Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015). Generell konnte ein Anstieg des GA-Gehaltes in mykorrhizierten Wurzeln beobachtet werden (Shaul-Keinan *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2015), wobei die veränderte Transkriptmenge der GA-Oxidasen direkt mit ihren synthetisierten GA-Komponenten korrelierte (Martin-Rodriguez *et al.*, 2015). Die Regulation während der AM-Symbiose kann demnach als Induktion der GA-Biosynthese interpretiert werden und nicht etwa als Herunterregulation, wie es durch eine negative Rückkopplung erklärt werden könnte. Genauer gesagt wird der 13-Hydroxy-Biosyntheseweg gegenüber dem Nicht-13-Hydroxy-Biosyntheseweg während der AM-Symbiose bevorzugt, wodurch eine erhöhte Menge an biologisch aktivem GA<sub>1</sub> verfügbar wird (Shaul-Keinan *et al.*, 2002; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015). Mykorrhizierte Wurzeln weisen demnach generell eine erhöhte Abundanz bioaktiver GAs auf. Dies scheint auf den ersten Blick kontrovers zu der Erkenntnis, dass GA inhibierend auf die Ausbildung von Arbuskeln wirkt. Bedenkt man, dass in allen Studien mykorrhizierte Wurzeln als ein gesamtes System analysiert wurden, wäre durchaus eine lokale zellspezifische Regulation der GA-Biosynthese denkbar. Je nach Verhältnis von arbuskulierter gegenüber nicht-arbuskulierter Kortezellen könnte demnach netto eine Induktion, Reduktion oder keine Regulation einer bestimmten Oxidase im gesamten Wurzelsystem quantifiziert werden. In diesem Sinne deuten histochemische Visualisierungen der Promotoraktivität sowie Inokulierung in einem *Split-Root-System* darauf hin, dass expressionelle Änderungen der GA-Oxidasen lokal um pilzliche Strukturen begrenzt sind (Martin-Rodriguez *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015). Promotoraktivitäten anaboler GA-Oxidasen in *L. japonicus* konnte um intraradikale Hyphen lokalisiert werden, die katabole Oxidase GA2ox zeigte dagegen eine starke Promotoraktivität in Arbuskel-enthaltenden Zellen (Takeda *et al.*, 2015). Für eine zellspezifische GA-Regulation spricht auch, dass mikrodisektierte Arbuskel-enthaltende Zellen (Gaude *et al.*, 2012a; Hoge Kamp & Küster, 2013) eine verminderte Expression der in dieser Arbeit analysierten GA20ox2 aufzeigen, was ein gegensätzliches Bild zur gemessenen Expression in mykorrhizierten ganzen Wurzeln darstellt.

Eine funktionelle AM-Symbiose benötigt einen fein regulierten GA-Metabolismus in den unterschiedlichen Stadien der AM-Symbiose. Dies wird durch die Erkenntnis gestützt, dass im frühen Stadium der Hyphopodienbildung eine CSSP-unabhängige Regulation der GA-regulierten Gene berichtet wurde (Ortu *et al.*, 2012), bei der Arbuskelbildung in einem späteren Stadium berichten Takeda *et al.* (2015) dagegen eine CCamK-abhängige und demnach auch CSSP-abhängige Regulation der GA-Oxidasen. Zudem wurde neben dem negativen Effekt von GA auf die Arbuskelbildung ein positiver Effekt auf die Verzweigung intraradikaler Hyphen postuliert (Takeda *et al.*, 2015).

Letztendlich lässt sich zusammenfassen, dass mit einer Etablierung der AM-Symbiose eine fein regulierte Modifizierung des GA-Haushalts einhergeht. Dabei scheinen der Kon-

takt mit dem AM-Pilz sowie das Stadium der Mykorrhizierung eine regulierende Rolle zu spielen. In kortikalen Zellen, in denen die Bildung eines Arbuskel bevorsteht, kommt es womöglich zu einer Reduktion des endogenen GA-Gehaltes (Abb. 3.2). Dadurch könnte eine Stabilisierung der DELLA-Proteine gewährleistet werden, welche wiederum essentiell für die bei der Arbuskelbildung und -erhaltung eingeleitete Transkriptionskaskade ist (Park *et al.*, 2015; Floss *et al.*, 2016; Pimprikar *et al.*, 2016). Durch die erhöhte GA-Verfügbarkeit um intraradikale Hyphen außerhalb des inneren Kortex könnte die Abundanz der DELLA-Proteine gering gehalten werden, um eine Arbuskel-assoziierte Signalkaskade zu vermeiden. Dies würde eine gewebespezifische Regulation der GA-Biosynthese implizieren, da Arbuskeln ausschließlich in Zellen des inneren Kortex gebildet werden. Um ein genaues Bild der Verteilung bioaktiver GAs in mykorrhizierten Wurzeln zu erhalten, wäre ein immunozytologischer Ansatz in fixiertem mykorrhiziertem Gewebe denkbar (Hause *et al.*, 2013). Diese Methodik wurde bereits erfolgreich für die zellspezifische *in situ* Visualisierung von Jasmonaten (Mielke *et al.*, 2011) und Abszisin-säure (Weier *et al.*, 2014) eingesetzt.



**Abbildung 3.2 Putative GA-Verfügbarkeit während der AM-Kolonisierung.** (1) In nicht-kolonisierten Bereichen besitzen die Zellen eine gewisse endogene GA-Konzentration, welche relativ hoch ist. Dadurch kommt es zu einer weitestgehenden Destabilisierung der DELLA-Proteine. (2) In frühen Stadien der AM-Symbiose, wie der Hyphopodienbildung und um intraradikale Hyphen in den äußeren Zellschichten der Epidermis und des äußeren Kortex wird die GA-Biosynthese induziert. Aufgrund der erhöhten GA-Konzentration gegenüber nicht-mykorrhizierten Bereichen findet eine komplette Degradierung der DELLA-Proteine statt. Die GA-Verfügbarkeit stimuliert die Hyphenverzweigung des AM-Pilzes. (3) Im inneren Kortex herrscht eine geringe GA-Konzentration und folglich eine erhöhte DELLA-Abundanz. In Zellen in denen Arbuskel gebildet werden/wurden ist die endogene GA-Verfügbarkeit am geringsten was eine Stabilisierung der DELLA-Proteine gewährleistet. Eventuell trägt MIG1 zur modifizierten GA-Homöostase in Arbuskel-enthaltenden Zellen bei.

### 3.3.4 MIG1 interferiert mit der GA-Homöostase

Eine Überexpression von MIG1 (MIG1 OE) resultierte in einer modifizierten Expression dreier GA-Oxidasen, die auch während der AM-Symbiose eine differentielle Regulation erfuhren. Vergleicht man das Expressionsmuster der GA-Oxidasen während der Mykorrhizierung mit dem der nicht-kolonisierten MIG1 OE Wurzeln, lässt sich eine gegensätzliche Regulation erkennen. Das heißt in Wurzelkulturen ohne Spross resultiert eine MIG1 OE in einer Induktion der katabolen Oxidase *GA2box* und in einer Repression der anabolen Oxidasen *GA3ox* und *GA20ox2*. Dies entspricht exakt der entgegengesetzten Regulation der Oxidasen in mykorrhizierten Wurzelkulturen. In Pflanzen mit Spross wirkt sich eine MIG1 OE in einer verminderten Expression von *GA2box* aus, mykorrhizierte WT Pflanzen wiesen dagegen eine Induktion dieser Oxidase auf. Die anabolen Oxidasen zeigten unter beiden Bedingungen keine signifikante Regulation. Diese gegensätzliche Regulation könnte darauf zurückzuführen sein, dass MIG1 mit der GA-Homöostase in Arbuskel-enthaltenden Zellen interferiert. MIG1 OE Wurzeln spiegeln demnach die Situation in diesen Zellen und nicht die Situation in mykorrhizierten Wurzeln als Ganzes wider. MIG1 scheint nach diesen Ergebnissen einen modifizierenden Einfluss auf den GA-Haushalt zu haben.

Allerdings wurde in dieser Arbeit mit den drei GA-Oxidasen nur eine kleine Auswahl an Genen der GA-Biosynthese analysiert. Für zusätzliche GA-Oxidasen oder vorangestellte Enzyme, wie beispielsweise Kaurensynthasen oder -oxidasen konnte ebenso eine transkriptionelle Regulation während der AM-Symbiose detektiert werden (Ortu *et al.*, 2012; Floss *et al.*, 2013; Martin-Rodriguez *et al.*, 2015), sodass nicht auszuschließen ist, dass auch diese in MIG1 OE Wurzeln differentiiell reguliert sein könnten. Folglich wäre eine globale Transkriptomanalyse sinnvoll, um ein vollständiges Bild der transkriptionellen Regulation des GA-Metabolismus durch MIG1 zu erhalten.

Umgekehrt konnte jedoch keine Regulation von MIG1 durch GA beobachtet werden, weder auf Transkript-, noch auf Proteinebene. So wurden keine Unterschiede in der Genexpression von *MIG1* zwischen mit Mock, GA<sub>3</sub> oder PAC behandelten Pflanzen gemessen. Da MIG1 im Y2H-System keine Interaktion mit dem Rezeptorkomplex GID1-GA aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteinstabilität von MIG1 aufgrund seiner fehlenden DELLA-Domäne nicht durch GA-vermittelte Degradierung reguliert wird. Ist solch eine Verbindung mit dem GA-Signalweg außerhalb der DELLA-Familie überhaupt plausibel? Tatsächlich konnten bereits zahlreiche Studien zeigen, dass Proteine der DELLA-Unterfamilie nicht die einzigen GRAS-Proteine sind, die mit dem GA-Signalweg verknüpft werden können. Bemerkenswert ist, dass sich alle Unterfamilien, die in den GA-Signalweg involviert sind, phylogenetisch unmittelbar in der Nähe der MIG1-Klade anordnen. So zeigen die DELLA-ähnlichen Gene *OsSLRL1* (*SLENDER-like 1*) und *OsSLRL2* in



Reis eine GA-abhängige Induktion ihrer Expression (Itoh *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007b). Eine Überexpression beider Gene führte jeweils zu Phänotypen, die an GoF DELLA-Mutanten erinnerten, dementsprechend besitzen SLRL1 und SLRL2 wie DELLA-Proteine eine reprimierende Wirkung gegenüber der GA-Antwort. Mechanistisch wurde dieser negative Effekt durch eine reduzierte GA-Biosynthese erklärt. Dabei interpretierten Itoh *et al.* (2005) und Liu *et al.* (2007b) eine erhöhte Expression anaboler Oxidasen aufgrund der vorherrschenden negativen Rückkopplungsmechanismen als eine Verminderung der endogenen GA-Konzentration. Gegen diese Interpretation sprechen allerdings die Ergebnisse von Martin-Rodriguez *et al.* (2015), die durch eine parallele Messung der Oxidasen-Expression und der Abundanz der synthetisierten GAs in Tomate eine positive Korrelation zwischen Transkriptmenge und dem jeweiligen Syntheseprodukt zeigten. Gerade aufgrund der herrschenden Rückkopplungsmechanismen ist eine definitive Aussage anhand der Expressionsanalyse von Enzymen des GA-Biosynthesewegs nicht möglich, ohne eine Messung des endogenen GA-Gehaltes durchgeführt zu haben. Ein weiteres GRAS-Protein, AtSCL3, integriert den GA-Signalweg bei der Elongation von Wurzelzellen und gilt als Positivregulator in der GA-Homöostase (Heo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Dabei kann erneut eine Rückkopplung aufgezeigt werden, da die Expression von AtSCL3 negativ durch GA reguliert wird (Zhang *et al.*, 2011). Genauer gesagt induziert das DELLA-Protein AtRGA durch direktes Binden an den AtSCL3-Promotor dessen Expression (Zentella *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Li *et al.* (2010) berichten mit OsDLT/OsD62 von einem weiteren GRAS-Protein mit einer Rolle im GA-Metabolismus. Die *d62*-Mutante besitzt eine verringerte Konzentration an endogenem GA<sub>1</sub> und demnach einen GA-defizienten Phänotyp, interessanterweise konnte aber eine erhöhte Expression GA-biosynthetischer Gene quantifiziert werden (Li *et al.*, 2010). Allerdings sollte man beachten, dass D62 auch eine Rolle im Brassinosteroid-Signalweg zugeschrieben wurde, welcher möglicherweise mit dem GA-Signalweg interferiert (Tong *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

DELLA-Proteine werden nicht nur auf Proteinebene negativ durch GA reguliert und wirken als Antagonisten der GA-Antwort, sondern partizipieren zudem im Netzwerk der Rückkopplung, indem sie die GA-Synthese positiv regulieren. Auch DELLA-Proteine haben also einen Einfluss auf die Regulation der GA-Homöostase. So induziert eine Expression des GA-insensitiven AtΔ17RGA die Expression der anabolen Oxidasen AtGA20ox2 und AtGA3ox1 sowie der GA-Rezeptoren AtGID1a und AtGID1b (Zentella *et al.*, 2007). Diese Beispiele machen die komplexe Regulation des GA-Signalweges deutlich, wobei jedes einzelne Protein mehrere Regulationsebenen aufweist: es kann selbst auf Transkriptebe-  
ne oder Proteinebene durch GA reguliert sein, es kann einen positiven oder negativen Effekt auf nachgeschaltete Komponenten und somit auf die GA-Antwort haben und bei vorherrschenden positiven oder negativen Rückkopplungsmechanismen mitwirken.

MIG1 scheint zwar selbst keine Regulation über den GA-Weg zu erfahren, jedoch beeinflusst es die Expression GA-biosynthetischer Oxidasen. Diese veränderte Expression könnte direkt durch MIG1 hervorgerufen werden. Eine andere Erklärung wäre eine indirekte Wirkung von MIG1 über seinen Interaktionspartner DELLA1. So könnte eine MIG1 Überexpression zu einer Störung der von DELLA1-vermittelten Rückkopplungsmechanismen führen.

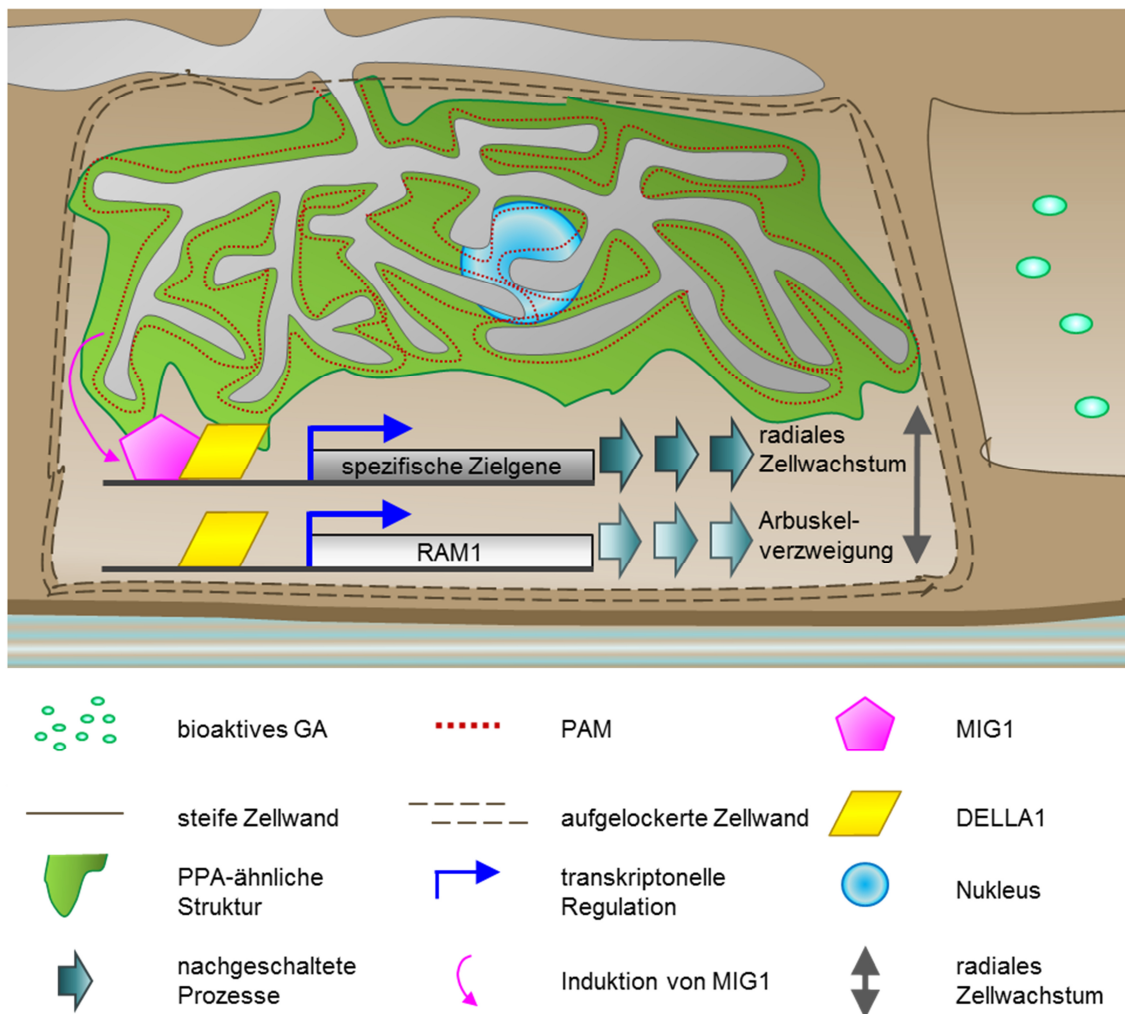
#### 3.3.5 Putatives Model der MIG1-vermittelten radialen Zellexpansion in der AM-Symbiose

Phänotypisch wirkt sich eine Überexpression von MIG1 auf die Entwicklung des Wurzelkortex aus. So weisen MIG1 OE Wurzeln einen breiteren Durchmesser auf, welcher wiederum durch eine leicht erhöhte Zahl kortikaler Zellschichten, als auch durch radial expandierte Zellen erreicht wird. Diese Merkmale können durch eine verminderte GA-Verfügbarkeit durch exogene PAC-Behandlung phänokopiert werden. Eine kombinatorische Überexpression von *MIG1* und Behandlung mit PAC deckte einen additiven Effekt hinsichtlich der radialen Wurzelentwicklung auf. Dieser additive Effekt könnte zum einen bedeuten, dass MIG1 in einem parallelen GA-unabhängigen Signalweg einzuordnen ist, oder aber dass der Effekt dosisabhängig ist und erst gemeinsam eine komplette Blockierung des GA-Signalweges erzielt wurde. Eine komplette Blockierung des GA-Signalweges mit Hilfe einer Überexpression des stabilen DELLA-Proteins  $\Delta 18\text{DELLA1}$  in Kombination mit MIG1 OE zeigte dagegen keinen additiven Effekt. Hierdurch konnten genetische Hinweise gesammelt werden, die MIG1 im GA-Signalweg positionieren. Der additive PAC-Phänotyp kann demnach darauf zurückgeführt werden, dass die verwendete Konzentration keine komplette Blockierung der GA-Synthese bewirkte. Mit einer höheren PAC-Konzentration würde man demnach einen vergleichbaren Effekt zu dem genetischen Ansatz mit  $\Delta 18\text{DELLA1}$  erwarten. Ein weiterer Hinweis, für die Einordnung von MIG1 im GA-Signalweg bietet die direkte Interaktion von MIG1 und DELLA1 in der BiFC-Analyse. Überdies führte eine Überexpression von  $\Delta 18\text{DELLA1}$  zu einer Komplementation des Arbuskelphänotyps von MIG1-RNAi Wurzeln. Das bedeutet auch, dass eine große Menge an stabilem DELLA1 die Funktion von MIG1 übernehmen kann. Eine Insensitivität gegenüber der GA-vermittelten Degradation von  $\Delta 18\text{DELLA1}$  ist allerdings hoch artifiziell. Unter natürlichen Bedingungen könnte MIG1 durch Rekrutierung von DELLA1 zu spezifischen Promotorbereichen sicherstellen, dass dieses auch unter AM-Konditionen seiner Aufgaben der radialen Zellexpansion nachkommt. Solch eine morphometrische Veränderung der Zelle scheint biologisch tatsächlich relevant zu sein, denn Arbuskel-enthaltende Zellen wiesen gegenüber nicht-kolonisierten Kortezellen von *M. truncatula* eine Zunahme ihrer Zellbreite auf. Während der AM-Symbiose scheinen DELLA-Proteine in Kortezellen also nicht nur die Aufgabe zu haben die Arbuskelmorphogenese durch transkriptionelle Regu-

lation von RAM1 und RAD1 zu steuern (Park *et al.*, 2015; Floss *et al.*, 2016; Pimprikar *et al.*, 2016), sondern auch mit Hilfe von MIG1 eine radiale Expansion der Zelle zu gewährleisten. Diese duale Funktion verlangt in Kortezellen eine feine Regulation, wodurch die Funktionen aufeinander abgestimmt werden können. Eine Überexpression von MIG1 führte demnach zu einem veränderten Gleichgewicht, das sich bei der Mykorrhizierung in einer verminderten Expression von Genen der DELLA1-RAM1 Transkriptionskaskade zeigte.

Mechanistisch weisen die vorliegenden Ergebnisse auf folgendes funktionelles Model hin (Abb. 3.3): Bei einer Kolonisierung durch den AM-Pilz kommt es zu einer Induktion der Expression von *MIG1* in inneren Kortezellen, in welchen Arbuskeln gebildet werden sollen. In diesen Zellen führt eine Reduzierung des GA-Metabolismus und/oder ein spezifischer Stabilisator, wie es für die CSSP-Komponenten LjCCamK-LjCyclops postuliert wurde (Pimprikar *et al.*, 2016), zu einer Stabilisierung der DELLA-Proteine. DELLA-Proteine übernehmen in diesen Zellen eine duale Rolle: Sie regulieren zum einen die Expression Arbuskel-assoziiierter Gene, wie RAM1 oder RAD1, welche die Arbuskelverzweigung regeln, zum anderen steuern sie zusammen mit MIG1 die radiale Zellexpansion. MIG1 dient dabei als Rekrutierer von DELLA1 zu spezifischen Promotoren. MIG1-DELLA1 stimulieren anschließend als Dimer die Expression von Genen, welche die radiale Zellexpansion vermitteln. In diesem Sinne könnte die Aufhebung jeglicher Effekte von MIG1 OE durch exogene Behandlung mit GA<sub>3</sub> erklärt werden, da dessen Interaktionspartner DELLA1 schlichtweg degradiert wurde und nicht mehr vorhanden war. Durch die Rekrutierungsfunktion von MIG1 könnte auch die longitudinale Zellelongation in MIG1 OE Wurzeln erklärt werden. Diese Elongation findet nicht in Arbuskel-enthaltenden Zellen von Kontrollwurzeln statt, scheint also in *M. truncatula* biologisch nicht relevant zu sein. Durch die verstärkte Rekrutierung von DELLA1 durch eine Überexpression von MIG1 könnte DELLA1 von seiner Repressortätigkeit der longitudinalen Zellexpansion abgezogen werden, wodurch als Nebeneffekt eine Aktivierung des longitudinalen Zellwachstums resultieren könnte. Die Zielgene von MIG1-DELLA1 müssen nicht unbedingt AM-spezifisch sein, sondern könnten generell auch unter nicht-symbiotischen Bedingungen eine radiale Expansion durch DELLA1 vermitteln. Welche Gene das sind, ist bisher noch unbekannt. Das Zellwachstum wird bei Pflanzen durch die Festigkeit der Zellwand determiniert (Cosgrove, 2016). Denkbar wären demnach sogenannte Expansine, die eine nichtenzymatische Auflockerung der Zellwand bewirken (Cosgrove, 2000). Eine Induktion spezifischer Expansine während der AM-Symbiose und ihre Relokalisierung zu Zellwänden, die mit pilzlichen Strukturen in Kontakt stehen, konnten bereits beobachtet werden (Liu *et al.*, 2003; Weidmann *et al.*, 2004; Balestrini *et al.*, 2005; Siciliano *et al.*, 2007; Dermatsev *et al.*, 2010; Wisniewska & Golinowski, 2011; Balestrini & Bonfante, 2014).

Unter natürlichen Mykorrhizierungsbedingungen könnte die Expression spezifischer Expansine durch MIG1 induziert werden und für die Auflockerung der Zellwände kolonisierter Zellen mitverantwortlich sein. Zusätzlich könnten weitere Zellwand-modifizierende Komponenten, wie die beiden AM-induzierten lytischen Enzyme Cel1 (Cellulase1), eine Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase, und XTH1, eine Xyloglukanendotransglukosylase/Hydrolase, zur Regulation beitragen (Liu *et al.*, 2003; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2005). Ein anderer Ansatzpunkt könnte die Vergrößerung der Plasmamembran darstellen. So könnten MIG1-DELLA1 eine Vergrößerung der Zelle durch eine verstärkte Membransynthese vermitteln. Nicht auszuschließen ist, dass dieser Vorgang auch bei der PAM-Synthese während der Arbuskelbildung partizipiert. Die determinierte Richtung der Expansion könnte entweder durch spezifisch lokalisierte Komponenten der Exozytosemaschinerie oder durch die zeitliche Regulation der Exozytose gewährleistet werden wie es Pumplin *et al.* (2012) im Zusammenhang mit PAM-lokalisierten Transportern postulieren.



**Abbildung 3.3 Modell zur MIG1-vermittelten radialen Zellexpansion.** Während der Kolonisierung mit einem AM-Pilz wird die Expression von *MIG1* im inneren Kortex durch pilzliche Signale induziert. *MIG1* rekrutiert *DELLA1* zu den Promotoren spezifischer Zielgene, welche eine radiale Zellexpansion vermitteln. Die duale Funktion von *DELLA1* beinhaltet zusätzlich die Regulation der Arbuskelverzweigung, welche unter anderem durch die Expression von *RAM1* gesteuert wird.

### 3.3.6 Ist die Zellgröße kritisch für die Arbuskelentwicklung?

In dieser Arbeit konnte in *M. truncatula* eine radiale Zellexpansion in Arbuskel-enthaltenden Kortezellen gemessen werden. Auch in der Pflanze *Cucumis sativus* konnte bereits durch morphometrische Analyse arbuskulierter Zellen eine Vergrößerung dieser gegenüber nicht kolonisierter Zellen festgestellt werden (Balestrini *et al.*, 2005). In *Prunus cerasifera* wurde ebenso eine veränderte Wurzelmorphologie durch Mykorrhizierung mit *R. irregularis* beobachtet, wobei der verbreiterte Wurzeldurchmesser der mykorrhizierten Wurzeln auf eine veränderte Zellgröße und eine erhöhte Zellzahl zurückgeführt wurden (Berta *et al.*, 1995). Eine Vergrößerung kolonisierter Kortezellen scheint demnach ein verbreitetes Charakteristikum Arbuskel-enthaltender Zellen darzustellen. Eine Überexpression von MIG1 führte zu einer Vergrößerung der Kortezellen in Abwesenheit einer Kolonisierung mit einem AM-Pilz. Eine Mykorrhizierung von MIG1 OE Wurzeln zeigte keinen additiven Effekt hinsichtlich der Zellbreite, was dafür spricht, dass während der AM-Symbiose MIG1 für die induzierte radiale Zellexpansion verantwortlich ist. Die Arbuskelgröße wird durch eine Überexpression von *MIG1* jedoch nicht beeinflusst. Die radiale Zellexpansion scheint also direkt eine Rolle für die Arbuskel-enthaltende Zelle zu spielen. Bei der Arbuskelentwicklung wird ein Großteil des Zellvolumens durch den AM-Pilz eingenommen (Bonfante & Genre, 2010), womöglich benötigt die Kortezelle zusätzlichen Raum für ihre intrazellulären Strukturen. Eine Herunterregulation von *MIG1* resultiert in einem Phänotyp in der Arbuskelmorphogenese, der sich durch eine vermehrte Zahl an kleinen deformierten Arbuskeln und einer verringerten Zahl reifer Arbuskeln auszeichnete. MIG1 scheint also wichtig für die Arbuskelentwicklung zu sein. Doch besteht zwischen der beobachteten radialen Zellexpansion durch MIG1 und der Arbuskelentwicklung ein kausaler Zusammenhang? Hierfür spricht zum einen, dass deformierte Arbuskeln in kolonisierten MIG1-RNAi Wurzeln von kleineren Zellen beherbergt wurden, als reife Arbuskeln in Kontrollwurzeln. Zudem wurde der MIG1-RNAi Phänotyp in der Arbuskelentwicklung durch eine Überexpression von  $\Delta 18DELLA1$  gerettet. Für DELLA1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es neben anderen Funktionen eine radiale Zellexpansion in Kortezellen vermittelt. Auch durch  $\Delta 18DELLA1$  komplementierte Arbuskel-enthaltende Kortezellen weisen im Vergleich zu EV Wurzeln eine vergrößerte Zellbreite auf. Die erfolgreiche Komplementation der MIG1-RNAi Wurzeln durch  $\Delta 18DELLA1$  deutet darauf hin, dass tatsächlich eine radiale Zellexpansion verantwortlich für die Arbuskelentwicklung ist. Wäre der Arbuskel-Phänotyp auf eine andere Funktion von MIG1 zurückzuführen, die unabhängig von der radialen Zellexpansion wäre, müsste man davon ausgehen, dass auch diese Funktion durch  $\Delta 18DELLA1$  übernommen werden könnte. Eine zweite Wirkung von MIG1, die negative Regulation von *NSP2*, kann davon ausgeschlossen werden, da DELLA1 kein

Negativregulator, sondern ein Positivregulator der *NSP2*-Expression darstellt (Floss *et al.*, 2016). Weitere bisher unbekannte Funktionen von *MIG1* können zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die morphologische Veränderung in Arbuskel-enthaltenden Zellen, genauer die radiale Zellexpansion, durch *MIG1* in Zusammenarbeit mit *DELLA1* vermittelt wird. Zusätzlich konnten Anhaltspunkte gesammelt werden, die einen kausalen Zusammenhang zwischen der radialen Zellexpansion und der Arbuskelmorphogenese plausibel erscheinen lässt.

### 3.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Etablierung der AM-Symbiose geht unweigerlich mit einer Umprogrammierung der pflanzlichen Transkription einher, welche eine Modifizierung der pflanzlichen Entwicklung hervorruft und letztendlich in der Akkommodation des AM-Pilzes gipfelt. In dieser Arbeit konnte eine neue Komponente der AM-assoziierten Transkriptionsmaschinerie identifiziert und charakterisiert werden. *MIG1* gehört zur Familie der GRAS-Transkriptionsregulatoren und wird spezifisch während der AM-Symbiose in Zellen exprimiert, welche in engen Kontakt mit dem kolonisierenden Pilz stehen. Als biologische Funktion konnte *MIG1* die radiale Expansion der Wurzel und der kortikalen Zellen zugeschrieben werden, welche mit der Ausbildung einer funktionellen AM-Symbiose einhergeht. Diese Aufgabe ist eng mit dem GA-Signalweg der Pflanze verbunden, da unter anderem eine mechanistische Verknüpfung mit *DELLA1*, einem Repressor der GA-Antwort, gezeigt werden konnte. Zudem konnte den *DELLA*-Proteinen neben ihrer gut untersuchten Rolle in der Unterdrückung des longitudinalen Zell- und Wurzelwachstums eine promovierende Rolle in der radialen Expansion der Zellen und Wurzel zugeteilt werden.

Zukünftig wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob die Rolle von *MIG1* auch im Kontext anderer Pflanzen konserviert vorliegt. Zum einen könnten *MIG1*-Homologe funktionell charakterisiert werden oder aber *MIG1* heterolog in anderen Spezies wie der AM-Pflanze *S. tuberosum* oder der Nichtwirtspflanze *A. thaliana* exprimiert werden. Protokolle zur Volltransformation dieser Pflanzen sind in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert. Dies würde es ermöglichen zu untersuchen, ob *MIG1* einen vergleichbaren Phänotyp auslöst und vor allem wie der Spross auf eine *MIG1*-Expression reagiert. Da *A. thaliana* kein eigenes *MIG1*-Homolog besitzt, adressiere dieser Ansatz zudem die Frage, ob andere Komponenten des *MIG1*-Funktionsmechanismus, wie Interaktionspartner oder Zielgene, generell konserviert vorliegen.

Attraktiv scheint auch die funktionelle Charakterisierung der beiden Duplikationen *MIG2* und *MIG3* während der AM-Symbiose. So würden Promotoranalysen sowie Überexpres-



sionen dieser Gene Aufschluss über ihre Abundanz und Funktion in der AM-Symbiose bieten.

Besonders reizvoll wäre die Identifizierung der *MIG1*-Zielgene. So wäre eine globale Transkriptomanalyse *MIG1*-exprimierender Wurzeln denkbar. Da es sich bei den Zielgenen möglicherweise um dieselben Gene handelt, welche auch bei der radialen Expansion durch *DELLA1* reguliert werden, könnten  $\Delta 18DELLA1$ -exprimierende Wurzeln als zusätzliche Kontrolle dienen. Anschließend könnte eine direkte Assoziation von *MIG1* an Promotoren regulierter Gene durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)-Experimente mit gekoppelter qPCR-Analyse überprüft werden.



## 4 Material

### 4.1 Organismen

#### 4.1.1 *Escherichia coli*

*E. coli* Stämme wurden in LB-Flüssigkultur oder auf LB-Agarplatten bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Den Medien wurden zur Selektion der enthaltenen Plasmide die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

Tabelle 4.1 Verwendete *E. coli* Stämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Eigenschaften	Herkunft
<b>XL1-Blue</b>	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB acIqZΔM15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	Tet <sup>R</sup> (25 mg/l); Geeignet für Blau-Weiß-Selektion	Stratagene
<b>MACH1™ T1R</b>	F- ΦF80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK-, mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA	Keine Antibiotikaresistenz; Geeignet für Blau-Weiß-Selektion	Invitrogen
<b>DB3.1</b>	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1	Sm <sup>R</sup> (50 mg/l); Mutation im Gyrasegen (gyrA462) verleiht Resistenz gegenüber Selbstmordgen <i>ccdB</i> , welches in Gateway Expressionsvektoren exprimiert wird	Invitrogen

#### 4.1.2 *Agrobacterium rhizogenes* & *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobakterien wurden bei 220 rpm in bzw. auf LB Medium bei 28 °C unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika kultiviert.

Tabelle 4.2 Verwendete Agrobakterien Stämme.

Agrobakterien Stamm	Genotyp	Eigenschaften	Herkunft
<b><i>A. rhizogenes</i> ARqua1</b>	WT; Ri-Plasmid: Agropine-type pRiA4b (pA4-type); bio-type II (Keane <i>et al.</i> , 1970)	Sm <sup>R</sup> (600 mg/l); Derivat des WT Stammes R1000 vom WT Stamm A4T (Moore <i>et al.</i> , 1979); induziert Wachstum von Wurzeln	Quandt <i>et al.</i> (1993)
<b><i>A. tumefaciens</i> GV3101 pMP90</b>	WT (C58); Ti-Plasmid: pMP90 (pTiC58ΔT-DNA)	Gm <sup>R</sup> auf Ti-plasmid (40 mg/l); Rif <sup>R</sup> in Genom (100 mg/l)	Koncz & Schell (1986)

#### 4.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Der *S. cerevisiae* Stamm AH109 wurde für das GAL4-basierte Hefe-Zwei-Hybrid System verwendet. Untransformierte Stämme wurden in 2x YPDA Medium bei 30 °C und 220 rpm kultiviert. Transformierte Stämme wurden in SD Medium ohne entsprechende Aminosäuren zur Selektion kultiviert. Der Stamm AH109 besitzt die Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1*, welche unter der Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors stehen.

Genotyp (AH109): MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ, MEL1.

Herkunft: Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit (Clontech)

### 4.1.4 *Rhizophagus irregularis*

*R. irregularis* wurde in monaxenischer Kultur zusammen mit Ri-transformierten *Daucus carota* Wurzeln auf M Medium kultiviert (Bécard & Fortin, 1988).

- DAOM 181602 (Schenck & Smith, 1982); WT

### 4.1.5 *Medicago truncatula*

*M. truncatula* Pflanzen wurden auf Schrägagarplatten mit FM Medium oder in Töpfen mit einem Gemisch aus Sand und Kies (4:1) bei 25 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h/ 8 h kultiviert. *M. truncatula* Wurzelkulturen wurden auf M Medium bei 27 °C in Dunkelheit kultiviert (Bécard & Fortin, 1988).

- Jemalong A 17 (Perkiss Seeds, Australia); WT

- R108 Doppelmutante della1/della2 ( $\Delta\Delta$ della1/2) (Floss *et al.*, 2013): Tnt1 Transposon Insertionslinien von *MtDELLA1* (NF5155) und *MtDELLA2* (NF4302) (Tadege *et al.*, 2008) wurden miteinander gekreuzt und die Doppelmutante  $\Delta\Delta$ della1/2 generiert.

- R108 segregierter WT aus  $\Delta\Delta$ della1/2 (Floss *et al.*, 2013)

### 4.1.6 *Daucus carota*

Mykorrhizierte *D. carota* Wurzeln wurden auf M Medium bei 27 °C in Dunkelheit kultiviert (Bécard & Fortin, 1988).

### 4.1.7 *Nicotiana benthamiana*

*N. benthamiana* wurde als heterologes System für die Expression von Proteinen aus *M. truncatula* verwendet. *N. benthamiana* wurde in Erde bei 22 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h/ 8 h aufgezogen. Etwa 50 Samen wurden in einem Topf ausgesät, nach etwa 2 w befanden sich die Pflanzen im Vierblatt-Stadium und wurden pikiert. Nach erneuten 2 – 3 w konnten die Pflanzen zur Infiltration verwendet werden.

## 4.2 Verwendete Plasmide und Konstrukte

### 4.2.1 Plasmide

- pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>: Vektor zur TA-abhängigen Klonierung von PCR-Fragmenten mit 3'A-Überhängen. Vektor besitzt eine Kanamycin- und Ampicillinresistenz und ist aufgrund des enthaltenen lacZ-Gens innerhalb der Klonierungsstelle für die Blau-Weiß-Selektion geeignet. Quelle: (Invitrogen)

- **pENTR™/D-TOPO®**: Vektor zur direktionalen TOPO-Klonierung von PCR-Fragmenten mit stumpfen Enden und 5'CACC-Sequenz. Vektor besitzt eine Kanamycinresistenz und ist aufgrund der enthaltenen attL-Sequenz für die Gateway-Klonierung geeignet. Quelle: (Invitrogen)
- **pCR™8/GW/TOPO®**: Vektor zur TA-abhängigen Klonierung von PCR-Fragmenten mit 3'A-Überhängen. Vektor besitzt eine Spectinomycinresistenz und ist aufgrund der enthaltenen attL-Sequenz für die Gateway-Klonierung geeignet. Quelle: Invitrogen
- **2xP35S-pKGW-RR (OE)**: Binärer Gateway Destinationsvektor zur Agrobakterienvermittelten Transformation von Pflanzen. Der CaMV 2x35S Promotor wurde über AatII integriert und dient zur Überexpression *in planta* (2xP35S::attR1:CmR-ccdB::attR2). Zur Selektion positiv transformierter Pflanzen oder Wurzeln besitzt dieser Vektor eine DsRED-Kassette (PUBq10::DsRed1::NosT) und eine Kanamycinresistenz. In Bakterien besitzt dieser Vektor eine Chloramphenicol- und Spectinomycinresistenz. Quelle: pKGW,0 (Karimi *et al.*, 2002), modifiziert mit DsRed-Kassette und 2xP35s (Limpens *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2010).
- **pCGFP-RR (Lokalisation)**: Binärer Gateway Destinationsvektor zur Agrobakterienvermittelten Transformation von Pflanzen. Vektor besitzt ein CaMV 35S Promotor zur Überexpression *in planta* und ein C-terminales eGFP-Fusionskonstrukt (P35S::attR1::CmR-ccdB::attR2::eGFP::T35S). Zur Selektion positiv transformierter Wurzeln besitzt dieser Vektor eine DsRED-Kassette (PUBq10::DsRed1::NosT) und eine Kanamycinresistenz. In Bakterien besitzt dieser Vektor eine Chloramphenicol- und Spectinomycinresistenz. Quelle: pK7FWG2,0 (Karimi *et al.*, 2002), modifiziert mit DsRed-Kassette (Limpens *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2010).
- **pNGFP-RR (Lokalisation)**: Binärer Gateway Destinationsvektor zur Agrobakterienvermittelten Transformation von Pflanzen. Vektor besitzt ein CaMV 35S Promotor zur Überexpression *in planta* und ein N-terminales eGFP-Fusionskonstrukt (P35S::eGFP::attR1::CmR-ccdB::attR2::T35S). Zur Selektion positiv transformierter Wurzeln besitzt dieser Vektor eine DsRED-Kassette (PUBq10::DsRed1::NosT) und eine Kanamycinresistenz. In Bakterien besitzt dieser Vektor eine Chloramphenicol- und Spectinomycinresistenz. Quelle: pK7WGF2,0 (Karimi *et al.*, 2002), modifiziert mit DsRed-Kassette (Limpens *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2010).
- **pK7GWIWG2D(II) (RNAi)**: Binärer Gateway Destinationsvektor zur Agrobakterienvermittelten Transformation von Pflanzen. Der RNAi-Vektor besitzt einen 35S Promotor zur Expression von *hairpin* RNAs zum Herunterregulieren von Genen (P35S::attR1::ccdB::attR2::Intron::CmR::Intron::attR2::ccdB::attR1::T35S). Zur Selektion

tion positiv transformierter Wurzeln besitzt dieser Vektor eine eGFP-Kassette (P35S::eGFP::T35S) und eine Kanamycinresistenz. In Bakterien besitzt dieser Vektor eine Chloramphenicol- und Spectinomycinresistenz. Quelle: (Karimi *et al.*, 2002)

- **RNAi-PAtUBI3-DsRED (RNAi):** Vektor zur Agrobakterien-vermittelten Transformation in Pflanzen. Der RNAi-Vektor besitzt einen *A. thaliana* Ubiquitin3 Promotor zur Expression von *hairpin* RNAs zum Herunterregulieren von Genen. Das Integrationskonstrukt wird in *sense*- und *antisense*-Richtung kloniert (PAtUBI3::RNAisense::Intron::RNAiantisense). Zur Selektion positiv transformierter Wurzeln besitzt der Vektor eine DsRED-Kassette (PUBq10::DsRED::T35S). In Bakterien besitzt dieser Vektor eine Kanamycinresistenz. Quelle: Prof. Dr. Franziska Krajinski, Pflanzen-Mikroben-Interaktionen, MPI, Potsdam-Golm (Devers *et al.*, 2013)
- **RNAi-PMtPT4-DsRED (RNAi):** Vektor zur Agrobakterien-vermittelten Transformation in Pflanzen. Der RNAi-Vektor besitzt einen *M. truncatula* PT4 Promotor zur Expression von *hairpin* RNAs zum Herunterregulieren von Genen. Das Integrationskonstrukt wird in *sense*- und *antisense*-Richtung kloniert (PMtPT4::RNAisense::Intron::RNAiantisense). Zur Selektion positiv transformierter Wurzeln besitzt der Vektor eine DsRED-Kassette (PUBq10::DsRED::T35S). In Bakterien besitzt dieser Vektor eine Kanamycinresistenz. Quelle: Prof. Dr. Franziska Krajinski, Pflanzen-Mikroben-Interaktionen, MPI, Potsdam-Golm (Devers *et al.*, 2013)
- **pPGFPGUS-RR (Promotorreporter):** Binärer Gateway Destinationsvektor zur Agrobakterien-vermittelten Transformation in Pflanzen. Promotorreporter mit eGFP und GUS als Reporter gen (attR1::CmR-ccdB::attR2::eGFP::GUS). Zur Selektion positiv transformierter Wurzeln besitzt dieser Vektor eine DsRED-Kassette (PUBq10::DsRed1::NosT) und eine Kanamycinresistenz. In Bakterien besitzt dieser Vektor eine Spectinomycinresistenz. Quelle: pKGWFS7 (Karimi *et al.*, 2002), modifiziert mit DsRed-Kassette (Limpens *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2010).
- **pGBKT7 (Y2H & Transaktivierung):** Expressionsvektor zur Untersuchung von Proteininteraktionen und Transaktivierungsaktivität in Hefe. Eine N-terminale Fusion der GAL4 DNA-Bindedomäne (BD) inklusive einer SV40 NLS und eines c-Myc-Tags an das Zielprotein steht unter der Kontrolle des *ADH1* Promotors (PADH1::SV40-NLS::GAL4-DNA-BD::PT7::cMyc::MCS::TADH1). Zur Selektion besitzt dieser Vektor eine Kanamycinresistenz in Bakterien und den Auxotrophiemarker Tryptophan (TRP1) in Hefe. Quelle: Clontech.
- **pGADT7-Rec (Y2H):** Expressionsvektor zur Untersuchung von Proteininteraktionen in Hefe. Eine N-terminale Fusion der GAL4 DNA-Aktivierungsdomäne (AD) inklusive ei-



ner SV40 NLS und eines HA-Tags an das Zielprotein steht unter der Kontrolle des *ADH1* Promotors (PADH1::SV40-NLS::GAL4-AD::PT7::HA::MCS::TADH1). Zur Selektion besitzt dieser Vektor eine Ampicillinresistenz in Bakterien und den Auxotrophiemarker Leucin (LEU2) in Hefe. Quelle: Clontech.

- **P35S-pSPYNE-GW (BiFC):** Binärer Gateway Destinationsvektor für die BiFC *in planta*. Vektor enthält den konstitutiv exprimierten CaMV Promotor P35S, die N-terminale Hälfte von YFP als N-terminale Fusion zum integrierten Gen und ein c-Myc-Tag (P35S::YFP-N::c-myc::attR1::CmR-ccdB::attR2::NosT). Zur Selektion in Bakterien dient eine Kanamycinresistenz. Quelle: Thomas Lahaye, Arbeitsgruppe Klaus Harter, Tübingen (Walter *et al.*, 2004)
- **P35S-pSPYCE-GW (BiFC):** Binärer Gateway Destinationsvektor für die BiFC *in planta*. Vektor enthält den konstitutiv exprimierten CaMV Promotor P35S, die C-terminale Hälfte von YFP als N-terminale Fusion zum integrierten Gen und ein HA-Tag (P35S::YFP-C::HA::attR1::CmR-ccdB::attR2::NosT). Zur Selektion in Bakterien dient eine Kanamycinresistenz. Quelle: Thomas Lahaye, Arbeitsgruppe Klaus Harter, Tübingen (Walter *et al.*, 2004)

#### 4.2.2 Verwendete Konstrukte

In Tab. 4.3 sind die in dieser Arbeit klonierten Konstrukte aufgeführt. Tab. 4.4 beinhaltet verwendete Konstrukte aus externer Quelle.

**Tabelle 4.3 In dieser Arbeit klonierte Konstrukte.**

	Name und Klonierungsweise	Primer	Verwendung & Eigenschaften
Lokalisation	MtMIG1_pCGFP-RR ORF aus cDNA ohne Stopcodon, GW	#1593 #1832	Lokalisation <i>in planta</i> , C-terminales GFP
	MtDELLA2_pCGFP-RR ORF aus cDNA ohne Stopcodon, GW	#1799 #1803	Lokalisation <i>in planta</i> , C-terminales GFP
	MtMIG1_pNGFP-RR ORF aus cDNA mit Stopcodon, GW	#1593 #1595	Lokalisation <i>in planta</i> , N-terminales GFP
	MtDELLA2_pNGFP-RR ORF aus cDNA mit Stopcodon, GW	#1799 #1955	Lokalisation <i>in planta</i> , N-terminales GFP
	MtDELLA1_pNGFP-RR ORF aus cDNA mit Stopcodon, GW	#2367 #2368	Lokalisation <i>in planta</i> , N-terminales GFP
	MtΔ18DELLA1_pNGFP-RR ORF aus cDNA mit Stopcodon, Deletion von DELLA-Motiv (Δ18), GW	#2367 #2368 #2765 #2766	Lokalisation <i>in planta</i> , N-terminales GFP
OE	MtMIG1OE_2xP35S-pKGW-RR ORF aus cDNA, GW	#1595 #1593	Überexpression via 2xP35S <i>in planta</i>
	MtΔ18DELLA1_pCGFP-RR ORF aus cDNA mit Stopcodon, Deletion von DELLA-Motiv (Δ18), GW	#2367 #2368 #2765 #2766	Überexpression von dominantem Δ18DELLA1 via P35S und Überexpression von MIG1 via 2xP35S <i>in planta</i>
	MtΔ18DELLA1_pCGFP+2xP35S-MIG1 Integration von 2xP35s-MIG1 ORF aus MtMIG1OE_2xP35S-pKGW-RR in MtΔ18DELLA1_pCGFP-RR, über XhoI	#1807 #1798	Überexpression von dominantem Δ18DELLA1 via P35S und Überexpression von MIG1 via 2xP35S <i>in planta</i>

#### 4 Material - 4.2 Verwendete Plasmide und Konstrukte

	Name und Klonierungsweise	Primer	Verwendung & Eigenschaften
RNAi-vermittelte Herunterregulierung	MtMIG1_RNAi.1_pK7GWIWG2D(II) RNAi.1 aus cDNA, GW	#1714 #1707	Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in planta</i> via P35S und Konstrukt RNAi.1
	MtMIG1_RNAi.2_pK7GWIWG2D(II) RNAi.2 aus cDNA, GW	#1953 #1954	Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in planta</i> via P35S und Konstrukt RNAi.2
	MtMIG1_RNAi.3_pK7GWIWG2D(II) RNAi.3 aus cDNA, GW	#1953 #2163	Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in planta</i> via P35S und Konstrukt RNAi.3
	MtMIG1_RNAi.4_pK7GWIWG2D(II) RNAi.4 aus cDNA, GW	#1953 #1707	Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in planta</i> via P35S und Konstrukt RNAi.4
	MtMIG1_RNAi.3_RNAi-PAtUbq3-DsRED RNAi.3 aus cDNA, RNAi.3sense über BamHI und XmaI, RNAi.3antisense über MluI und BspEI	#2377 #2378 #2380 #2381	Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in plant</i> via AtPUBq3 Konstrukt RNAi.3
	MtMIG1_RNAi.3_RNAi-PMtPT4-DsRED RNAi.3 aus cDNA, RNAi.3sense über BamHI und XmaI, RNAi.3antisense über MluI und BspEI	#2377 #2378 #2380 #2381	Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in planta</i> via MtPPT4 und Konstrukt RNAi.3
	MtMIG1_RNAi.4_RNAi-PMtPT4-DsRED RNAi.4 aus cDNA, RNAi.4sense über BamHI und XmaI, RNAi.4antisense über MluI und BspEI	#2377 #2379 #2380 #2382	Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in planta</i> via MtPPT4 und Konstrukt RNAi.4
	MtΔ18DELLA1_pCGFP+PMtPT4-MIG1_RNAi.3 Integration von PMtPT4-MIG1_RNAi.3 aus MtMIG1_RNAi.3_RNAi-PMtPT4-DsRED in MtΔ18DELLA1_pCGFP-RR, über XhoI	#2843 #2844	Überexpression von dominantem Δ18DELLA1 via P35S und Herunterregulierung von MtMIG1 <i>in planta</i> via MtPPT4 und Konstrukt RNAi.3
Y2H & Transaktivierungsassay	AtGID1c_pGADT7-Rec ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1756 #1757	Y2H, AD-Fusion
	MtGID1c_pGBKT7 ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1784	Y2H, DBD-Fusion
	MtGID1c_pGADT7-Rec ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1785	Y2H, AD-Fusion
	AtRGA_pGBKT7 ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1755 #1754	Y2H, DBD-Fusion
	MtMIG1_pGBKT7 ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1758	Y2H, DBD-Fusion
	MtMIG1_pGADT7-Rec ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1759	Y2H & Transaktivierungsassay, AD-Fusion
	MtMIG1-N_pGBKT7 N-Terminus aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1758	Y2H, 324 bp, DBD-Fusion
	MtMIG1-N_pGADT7-Rec N-Terminus aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1765	Y2H & Transaktivierungsassay, 324 bp, AD-Fusion
	MtDELLA2_pGBKT7 ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1763	Y2H, DBD-Fusion
	MtDELLA2_pGADT7-Rec ORF aus cDNA, über NdeI und BamHI	#1764	Y2H & Transaktivierungsassay, AD-Fusion
Promotorreporter	PMIG1_2kb_pPGFPGUS-RR Promotor aus gDNA, GW	#1713 #1705	Promotorreporter MIG1_2kb mit 1937bp -ATG
	PMIG1_1kb_pPGFPGUS-RR Promotor aus gDNA, GW	#2162 #1705	Promotorreporter MIG1_2kb mit 992bp -ATG
	PMIG1_550bp_pPGFPGUS-RR Promotor aus gDNA, GW	#2161 #1705	Promotorreporter MIG1_2kb mit 550bp -ATG
	PMIG1_250bp_pPGFPGUS-RR Promotor aus gDNA, GW	#2160 #1705	Promotorreporter MIG1_2kb mit 230bp -ATG
	Name und Klonierungsweise	Primer	Verwendung & Eigenschaften
ns stu	MIG1_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2421 #1595	BiFC, N-terminales YFP-N

	Name und Klonierungsweise	Primer	Verwendung & Eigenschaften
	MIG1_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW		BiFC, N-terminales YFP-C
	MIG2_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2360	BiFC, N-terminales YFP-N
	MIG2_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2361	BiFC, N-terminales YFP-C
	MIG3_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2362	BiFC, N-terminales YFP-N
	MIG3_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2363	BiFC, N-terminales YFP-C
	DELLA1_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2367	BiFC, N-terminales YFP-N
	DELLA1_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2368	BiFC, N-terminales YFP-C
	DELLA2_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2422	BiFC, N-terminales YFP-N
	DELLA2_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#1955	BiFC, N-terminales YFP-C
	DELLA3_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2369	BiFC, N-terminales YFP-N
	DELLA3_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2370	BiFC, N-terminales YFP-C
	MtRAD1_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2364	BiFC, N-terminales YFP-N
	MtRAD1_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2365	BiFC, N-terminales YFP-C
	Medtr1g086970_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2366	BiFC, N-terminales YFP-N
	Medtr1g086970_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#1383	BiFC, N-terminales YFP-C
	NSP1_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2373	BiFC, N-terminales YFP-N
	NSP1_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2374	BiFC, N-terminales YFP-C
	NSP2_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2375	BiFC, N-terminales YFP-N
	NSP2_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2376	BiFC, N-terminales YFP-C
	RAM1_P35S-pSPYNE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2371	BiFC, N-terminales YFP-N
	RAM1_P35S-pSPYCE-GW ORF aus cDNA, über pCR8, GW	#2372	BiFC, N-terminales YFP-C

Tabelle 4.4 Konstrukte aus externer Quelle.

	Name	Quelle	Verwendung & Eigenschaften
Y2H & TA- Assay	AtGID1c_pGBKT7	Yasumura <i>et al.</i> (2007)	Y2H, DBD-Fusion
	AtRGA_pGADT7-Rec	Yasumura <i>et al.</i> (2007)	Y2H & Transaktivierungsassay, AD-Fusion
	PpDELLAa_pGADT7-Rec	Yasumura <i>et al.</i> (2007)	Y2H & Transaktivierungsassay, AD-Fusion

### 4.3 Gennummern und Oligonukleotide

Spezifische Oligonukleotide sowie ihre Schmelztemperatur wurden von der Firma Euro-

fins Genomics (<https://www.eurofinsgenomics.eu>) bezogen. Bei Oligonukleotiden mit Überhängen wurde die Temperatur ohne und mit Überhang angegeben. Überhänge wie Restriktionsschnittstellen und „CACC“ wurden mit Kleinbuchstaben in der Sequenz markiert.

Tabelle 4.5 Verwendete Oligonukleotide.

#	Name	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> [°C]
<b>Analytische Oligonukleotide</b>			
1406	eGFP CACC F1	cac cAT GGT GAG CAA GGG CGA	63,7
1405	eGFP R1	GTT ACA AGT ACA GCT CGT CCA TG	60,6
2395	fadIntron F	CTC TCT TGA ATC GTT ACC AC	55,3
2396	fadIntron R	CTA AGG TTG AAT GTA AGG AG	53,2
1100	NosTerm R	ATA ATC ATC GCA AGA CCG GCA AC	60,6
2144	KanR-RNAi R	CTG AGT GGC TCC TTC AAC	56,0
2143	P35s_RNAi F	GAA GAC GTT CCA ACC ACG	56,0
2145	RB-revers	CCA ATA TAT CCT GTC AAA CAC TG	57,1
1023	RNAi_intron F	ATT ATA CTC TAG AGG TGA TAT TAG	54,2
1022	RNAi_intron R	ATC ATT TCC ATG AGG TTG CTT CTG	59,3
2175	PMtMIG1 1500bp F	GAT AGC GAA CAT ATG ATA CTC TG	57,1
2818	MtDELLA1 689bp F	GAA TCT GAA ACT TGC AGA AGC	55,9
<b>Klonierung von BiFC-Konstrukten</b>			
2367	MtDELLA1 ORF F	ATG AAG AGA GAA CAC CAA GAA AGT	57,6
2368	MtDELLA1 ORF R	TCA CTT GGA CTC ATT TTG TGG AAG	59,3
2422	MtDELLA2 ORF F	ATG AAG AGA GAG CAT AAG CTT G	56,5
1955	MtDELLA2 ORF R	TCA GTG CGA AAC CAC CAC TGA G	62,1
2369	MtDELLA3 ORF F	ATG GAA ATA GTT TCA GAT TCT TCT TC	56,9
2370	MtDELLA3 ORF R	TCA ACA ATC AAA ACG CAG TGT TTC	57,6
2364	MtRAD1 ORF F	ATG TCA CCT GCA CTT TAT GCT A	56,5
2365	MtRAD1 ORF R	TCA GCA TTT CCA GCA AGA AAC TG	58,9
2366	Mt1g086970 ORF F	ATG ATT CCT CCA ATG TTA AGA TTC	55,9
1383	Mt1g086970 ORF R	CTC AAA GAA ACT TCC AAG CTG	55,9
2421	MtMIG1 ORF F	ATG ATG GAA AAC TTG TGG GAA TTT G	58,8
1595	MtMIG1 ORF R	TCA AAT GAA TTT CCA AAC AGA AAC AGA G	59,3
2360	MtMIG2 ORF F	ATG GAA AAC TTG TGC AAT TTT GGT G	58,1
2361	MtMIG2 ORF R	TCA AAT GAA TTT CCA AAC AGA AAC AGA G	59,3
2362	MtMIG3 ORF F	ATG GAA AAC TTA TAC AAT TTG GGT G	56,4
2363	MtMIG3 ORF R	TCA GAT GAA TTT CCA AAC AGA AAC	55,9
2373	MtNSP1 ORF F	ATG ACT ATG GAA CCA AAT CCA AC	57,1
2374	MtNSP1 ORF R	CTA CTC TGG TTG TTT ATC CAG T	56,5
2375	MtNSP2 ORF F	ATG GAT TTG ATG GAC ATG GAT G	56,5
2376	MtNSP2 ORF R	CTA TAA ATC AGA ATC TGA AGA AGA AC	56,9
2371	MtRAM1 ORF F	ATG ATC AAT TCA CTT TGT GGA AGC TC	60,1
2372	MtRAM1 ORF R	TCA GCA TCG CCA TGC AGA AG	59,4
<b>Klonierung &amp; Konstruktion von Plasmiden</b>			
1992	DsRED_Apal R	atg ggc ccC CCG ATC TAG TAA C	64,0
1993	DsRED_Apal F	atg ggc ccT TCT ACA TTC TGA GCC TC	66,4
1994	SpecR-SphI F	atg cat gcG GCA CGA ACC CAG TG	66,0
1995	SpecR-SphI R	atg cat gcC TGA CGC TCA GTG GAA C	66,3
<b>Klonierung von RNAi-Konstrukten</b>			
1714	MtMIG1 RNAi.1 CACC F	cac cGA GCT TCT TCT TTC CAC TAA TC	56,5 / 63,2
1707	MtMIG1 RNAi.1 R	GCC GTA ATT CTT CAA TAT CTC C	56,5
1953	MtMIG1 RNAi.2 CACC F	cac cGA AGT GCA TAA AGA AAA TAC TAG	62,7 / 56,9

#	Name	Sequenz 5' → 3'	Tm [°C]
1954	MtMIG1 RNAi.2 R	CTT CTT GTG ATG GAT CAT CTT C	56,5
2163	MtMIG1 RNAi.3 R	CAT CAA AGT GAA CCA TGT CAA TG	57,1
2379	MtMIG1 RNAi.4_XmaI R	acc cgg gCC GTA ATT CTT CAA TAT CTC	65,0
2382	MtMIG1 RNAi.4_BspEI R	ata tcc gga GCC GTA ATT CTT CAA TAT CTC	64,0
2377	MtMIG1 RNAi_BamHI F	att gga tcc GAA GTG CAT AAA GAA AAT ACT AG	63,1
2378	MtMIG1 RNAi.3_XmaI R	acc cgg gCA TCA AAG TGA ACC ATG TCA	66,5
2380	MtMIG1 RNAi_MluI F	aat acg cgt GAA GTG CAT AAA GAA AAT ACT AG	63,1
2381	MtMIG1 RNAi.3_BspEI R	taa tcc gga CAT CAA AGT GAA CCA TGT CA	63,9
2843	PPT4-MIG1RNAi XhoI F	atc tcg agG ACT CGA TCC ACA ACA AAG	65,0
2844	PPT4-MIG1RNAi XhoI R	atc tcg agG GAC AAT CAG TAA ATT GAA CG	63,9
<b>Klonierung von Überexpressionskonstrukten</b>			
1593	MtMIG1 ORF F	cac cAT GAT GGA AAA CTT GTG GGA ATT TGG	65,4
1595	MtMIG1 ORF R	TCA AAT GAA TTT CCA AAC AGA AAC AGA G	59,3
2773	MtDELLA1 ORF F	cac cAT GAA GAG AGA ACA CCA AGA AAG T	63,7
2368	MtDELLA1 ORF R	TCA CTT GGA CTC ATT TTG TGG AAG	59,3
1807	P35S-MIG1OE XhoI F	atc tcg agG GTC AAC ATG GTG GAG C	55,2 / 66,3
1798	P35S-MIG1OE XhoI R	cgc tcg agT CAA ATG AAT TTC CAA ACA GAA ACA	54,8 / 65,8
<b>Klonierung von Promotorreporter</b>			
1713	PMtMIG1 CACC 2000bp F	cac cCT GAT CAT ATC TTG TAG CTC ATC	57,1 / 63,4
2160	PMtMIG1 CACC 230bp F	cac cTC TAC TGG ACG GAT TTA CG	54,5/62,4
2161	PMtMIG1 CACC 550bp F	cac cTC GAC TCT AGT TAG GGT ATC	55,2/62,7
2162	PMtMIG1 CACC 1000bp F	cac cGA TGT GGT TCG TAA TTT GAT GA	54,7/61,6
2158	PMtMIG1 R	AGA TTC AAA CAA ATT TTT CTT TAG TAT TAT G	56,3
<b>Klonierung von Lokalisationskonstrukten</b>			
2773	MtDELLA1 ORF F	cac cAT GAA GAG AGA ACA CCA AGA AAG T	63,7
2368	MtDELLA1 ORF R	TCA CTT GGA CTC ATT TTG TGG AAG	59,3
1799	MtDELLA2 ORF F	cac cAT GAA GAG AGA GCA TAA GCT TG	56,0 / 63,2
1955	MtDELLA2 ORF R	TCA GTG CGA AAC CAC CAC TGA G	62,1
1593	MtMIG1 ORF F	cac cAT GAT GGA AAA CTT GTG GGA ATT TGG	65,4
1595	MtMIG1 ORF R	TCA AAT GAA TTT CCA AAC AGA AAC AGA G	59,3
1832	MtMIG1 noStop R	AAT GAA TTT CCA AAC AGA AAC AGA G	56,4
<b>qPCR Oligonukleotide</b>			
1676	MtTEF-qPCR F3	TAC TCT TGG AGT GAA GCA GAT G	58,4
1675	MtTEF-qPCR R2	GTC AAG AGC CTC AAG GAG AG	59,4
1680	Mt2g082090-qPCR F	GAC AAG GGA CAT GCT TGA TA	55,3
1681	Mt2g082090-qPCR R	CCT GTT GAA GAA AGG TGT TG	55,3
1682	MtTF80-qPCR F	CTG CTT GGA ATC TAC TGT TAC	55,9
1683	MtTF80-qPCR R	GTG GTC TGT CAC TCC AAC	56,0
1684	Mt5g009080-qPCR F	TAA TGG TTC GAC TCT GAT GG	55,3
1685	Mt5g009080-qPCR R	CAA ACA GCA TCT TCT CAA CC	55,3
1686	Mt5g097480-qPCR F	GTT CAA CTG CAT AAC CTT GC	55,3
1687	Mt5g097480-qPCR R	CCC TAT GAT TCT GAG TGC TG	57,3
1690	Mt7g109580-qPCR F	ATT GTT GCG TCA GAA GGT AG	55,3
1691	Mt7g109580-qPCR R	AAC ACT TCC CAT TCT TTT CCA C	56,5
1677	MtTF124-qPCR F	TCA GCT TCT TTA CCA AAC CAC	55,9
1678	MtTF124-qPCR R	TGC TTC CTC TAC ATG CAA ATT C	56,5
2776	MtDELLA2-qPCR F	AGC CTG AGA CAA GAG ACC	56,0
2777	MtDELLA2-qPCR R	ACC ACC AGC AGC AAG CTA	56,0
1779	MtRAD1-qPCR F	GAG GAG GAG AAT GAG TAG G	56,7
1778	MtRAD1-qPCR R	CAC AAG CTA CTA ATA TAG GGT C	56,5
1776	Mt1g086970-qPCR F	GGT TAG GAA TGT GAA GAT TGA TG	57,1
1777	Mt1g086970-qPCR R	CCC TAA TAT GAT CAA ACA ACC C	56,5

#### 4 Material - 4.3 Gennummern und Oligonukleotide

#	Name	Sequenz 5' → 3'	Tm [°C]
2330	MtMIG1-qPCR F	GGA GTT GAA AGA AAG AGT ACA G	56,5
2331	MtMIG1-qPCR R	GCA CCT TGT CCT TTA AAG TTA TA	55,3
2317	MtMIG2_3-qPCR F	CAT TGT CTT CTT GTT GGA TGG A	56,5
2319	MtMIG2-qPCR R	ACA CCA ACT AAC CAC ACA T	52,4
2318	MtMIG3-qPCR R	GTA ATT ATA CTA ATA AGA ACC ATG GA	55,3
1322	MtMIG1ORF-qPCR F	TTT GGC TGA AGG AGT TGA AAG	55,9
1323	MtMIG1ORF-qPCR R	TCC ATC CAA CAA GAA GAC AAT	56,5
1781	MtGA20ox2-qPCR F	GGG CAG TGG TAA ACA GC	55,2
1780	MtGA20ox2-qPCR R	CTA ACT CCC TCT TGT CTT TTC	55,9
1324	MtGA2box-qPCR F	CAA AGA GTT CAC GTG GTT GG	57,3
1325	MtGA2box-qPCR R	GAA AGG CCA AAT ATC ATG TGC	55,9
2040	MtGA3ox-qPCR F	ACC CAA ATG CTT CAA ATT AAT AG	55,9
2041	MtGA3ox-qPCR R	TCA CAG TGT TTG GCA TAA TCT	55,3
1963	MtPT3-qPCR F	TGG GAC TGT GGG CAT TG	55,2
1962	MtPT3-qPCR R	CAG GCC ACA TCA CAC AAC	56,0
502	MtPT4-qPCR F	GTG CGT TCG GGA TAC AAT ACT	57,9 / 59,0
503	MtPT4-qPCR R	GAG CCC TGT CAT TTG GTG TT	57,3 / 60,0
1718	MtRAM1-qPCR F	ACC GTT AAC CGT CTC CAC	56,0
1719	MtRAM1-qPCR R	CTC TAC CTT AGC CCT TGG	56,0
2890	MtSCP1-qPCR F	GTT CAC CGT CGA ATT AAT GG	55,3
2891	MtSCP1-qPCR R	AAC ACT CTC ACA ACA ATA GAC TA	55,3
2899	MtVapyrin-qPCR F	AGA GAT AAC ATA TCA TCC TCC AC	57,1
2900	MtVapyrin-qPCR R	TCT TGG TAG TGA ACC AAT CAC	55,9
2903	MtEXO70I-qPCR F	AGC AGT GGC AGA AGA ATC AG	57,3
2904	MtEXO70I-qPCR R	CCA AGC AAC CCT TGC AAC	56,0
2954	MtDELLA1ORF-qPCR F	CGA ACT CGA CCG GGT TG	57,6
2955	MtDELLA1ORF-qPCR R	CTA GAC CGC CAT TGA GTC AA	57,3
2960	premiR171h-qPCR F	CAA TTT CAG ACG AGC CGA ATC	57,9
2961	premiR171h-qPCR R	GAG CAG AAA CAA CAC CAC TCC	59,8
2760	MtNSP2-qPCR R	GTT TAG CTA GTA TAG ATT AGC AC	55,3
2761	MtNSP2-qPCR F	GTG AAG AGG AGA GAA GGT C	56,7
613	RiTEF-qPCR F	TGT TGC TTT CGT CCC AAT ATC	55,9
614	RiTEF-qPCR R	GGT TTA TCG GTA GGT CGA G	56,7
800	DsRED-qPCR F	CGT CAT CAA GGA GTT CAT GC	57,3
801	DsRED-qPCR R	ACA CCT TGG ACG CGT ACT G	58,8
802	eGFP-qPCR F	GTA AAC GGC CAC AAG TTC AG	57,3
803	eGFP-qPCR R	CGT CCT TGA AGA AGA TGG TG	57,3
860	GUS-qPCR F	ACC GAT ACC ATC AGC GAT CT	57,3
861	GUS-qPCR R	CAT ATC CAG CCA TGC ACA CT	57,3
<b>Klonierung von Y2H Plasmiden</b>			
1756	AtGID1c_Ndel F	cgc ata tgA TGG CTG AAG TGA AGA AG	54,5/65,0
1757	AtGID1c_BamHI R	atg gat ccT CAT TGG ATT CTG CGT TTA	55,9/65,3
1784	MtGID1c_Ndel_F	gcg cat atg ATG AAG GAG ATC ATC ACC	54,0/65,4
1785	MtGID1c_BamHI_R	atg gat ccT CAG TAC GCC GCC GTC	56,9/67,8
1755	AtRGA_Ndel F	ggc ata tgA TGA TGG AAA CTT GTG GGA	54,7/64,0
1754	AtRGA_BamHI R	cag gat ccT CAA ATG ATT TCC AAA CAG	54,2/64,4
1758	MtMIG1_Ndel F	gac tat gAT GAA GAG GAG CAT AAG CTT	56,5/63,9
1759	MtMIG1_BamHI R1	gga tcc GTG TGC AAT TGC AAA TAT GC	55,9/65,0
1765	MtMIG1_BamHI R2	gga tcc TGA TGG TTG TAA TAT TGA TTG	55,9/65,0
1763	MtDELLA2_Ndel F	cgc ata tgA TGG CTG AAG TGA AGA AG	55,9/64,0
1764	MtDELLA2_BamHI R1	gga tcc GTG TGC AAT GTG CAA ATA TGC	55,9/65,0
1766	MtDELLA2_BamHI R2	gga tcc GGT GTC GTT TGA AAG ATG TTG	55,9/65,0



#	Name	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> [°C]
<b>Einfügen von Mutationen</b>			
2765	5'P-MtD18DELLA1 F	5'P-GAT GTA GCT CAA AAG CTT GAA C	56,5
2766	5'P-MtD18DELLA1 R	5'P-TCC ACC ACC GTT GGT TTC	56,0

**Tabelle 4.6 Liste verwendeter Gene in dieser Arbeit.** Aufgelistet sind v.l.n.r. der Genname, die Gennummer, ID des MtGEAs, Annotationsnummer von NCBI sowie eine Referenz, falls das Gen bereits publiziert wurde.

	Name	Gennummer	ID MtGEA	NCBI	Referenz
<i>M. truncatula</i>	<b>MIG1</b>	MTR_2g034280	Mtr.26270.1.S1_s_at	XP_003594757.1	diese Arbeit
	<b>MIG2</b>	MTR_2g034260	Mtr.18636.1.S1_at	XP_003594755.1	diese Arbeit
	<b>MIG3</b>	MTR_2g034250	Mtr.50733.1.S1_at	XP_003594754.1	diese Arbeit
	-	MTR_7g109580	Mtr.1484.1.S1_at	XP_003625975.1	
	-	MTR_1g086970	Mtr.24642.1.S1_at	XP_003591395.1	
	<b>RAM1</b>	MTR_7g027190	-	XP_003622095.1	Gobbato <i>et al.</i> (2012)
	<b>RAD1</b>	MTR_4g104020	Mtr.36004.1.S1_at	XP_003608883.1	Park <i>et al.</i> (2015)
	<b>TF80</b>	MTR_3g022830	Mtr.7264.1.S1_at	XP_003598874.1	Park <i>et al.</i> (2015)
	<b>TF124</b>	MTR_8g442410	-	XP_013445133.1	Park <i>et al.</i> (2015)
	-	MTR_5g009080	-	XP_003610972.1	
	-	MTR_2g082090	Mtr.37641.1.S1_at	XP_003596568.1	
	-	MTR_5g097480	Mtr.11928.1.S1_at Mtr.13249.1.S1_at	XP_003617966.1	
	<b>NSP1</b>	MTR_8g020840	Mtr.6956.1.S1_at Mtr.39863.1.S1_at	AJ972473.1	Smit <i>et al.</i> (2005)
	<b>NSP2</b>	MTR_3g072710	Mtr.44789.1.S1_at	AJ832138.1	Catoira <i>et al.</i> (2000); Kaló <i>et al.</i> (2005)
	<b>DELLA1</b>	MTR_3g065980	Mtr.37355.1.S1_at	XP_013460591.1	Floss <i>et al.</i> (2013)
	<b>DELLA2</b>	-	Mtr.10469.1.S1_at	ACJ83347.1 AFK49468.1	Floss <i>et al.</i> (2013)
	<b>DELLA3</b>	-	Mtr.11244.1.S1_at Mtr.41731.1.S1_at	-	Floss <i>et al.</i> (2013)
	<b>TEF1a</b>	MTR_6g021800	Mtr.42414.1.S1_at	XP_003618775.2	Wulf <i>et al.</i> (2003)
	<b>PT3</b>	MTR_1g043200	Mtr.15323.1.S1_at Mtr.15323.1.S1_s_at	EF016358.1	Liu <i>et al.</i> (2008)
	<b>PT4</b>	MTR_1g028600	Mtr.43062.1.S1_at	XM_013610927.1	Harrison <i>et al.</i> (2002)
	<b>GID1c</b>	MTR_1g082210	Mtr.41292.1.S1_at Mtr.32636.1.S1_at	XM_003590995.2	
	<b>GA2box</b>	MTR_2g019370	Mtr.32124.1.S1_at Mtr.42500.1.S1_at	XP_003593922.1	
	<b>GA3ox</b>	MTR_2g102570	Mtr.13370.1.S1_at	XP_003597810.1	
	<b>GA20ox2</b>	MTR_1g102070	Mtr.24203.1.S1_at Mtr.6537.1.S1_s_at	XP_003592363.2	
	<b>VAPYRIN</b>	MTR_6g027840	Mtr.39050.1.S1_at Mtr.42828.1.S1_at	GQ_423209	Pumplin <i>et al.</i> (2010)
	<b>SCP1</b>	MTR_3g079590	Mtr.40285.1.S1_at	XP_003601336.1	Liu <i>et al.</i> (2003); Rech <i>et al.</i> (2013)
	<b>STR</b>	MTR_8g107450	-	XP_003631132.1	Zhang <i>et al.</i> (2010)
	<b>EXO70I</b>	MTR_1g017910	Mtr.15548.1.S1_at	XP_003589054.1	Zhang <i>et al.</i> (2015b)
<b>miR171h</b>	-	Mt3.5: Mt3:31,405,065... 31,404,255	-	Devers <i>et al.</i> (2011)	
<i>At</i>	<b>AtRGA</b>	At2g01570	-	BT010467.1	Silverstone <i>et al.</i> (1998)
	<b>AtGID1c</b>	At5g27320	-	NC_003076.8	Nakajima <i>et al.</i> (2006)
	<b>RiTEF</b>	-	-	DQ282611.1	

## 4.4 Chemikalien

Alle anorganischen Chemikalien und nicht explizit aufgeführte Reagenzien wurden über die folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

### 4.4.1 Organische Chemikalien

**Tabelle 4.7 Verwendete organische Chemikalien.**

Bezeichnung	Hersteller: Katalognummer
2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.: N3200L
Acetosyringon	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: D134406
Agar-Agar (Kobe I pulv.)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe 5210.2
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe: 15510-27
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen: A3678
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: K029.1
Anti-GFP N-terminal AK (Kaninchen)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen: G1544
Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase AK (Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen: A0545
Augmentin (Amoxicillin Clavulansäure)	HIKMA Pharmaceuticals, London, UK
Bromphenolblau Natriumsalz	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg: 15375.01
Color Protein Standard Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.: P7712
Protease Inhibitor Cocktail: cOmplete™ Mini	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen: 04693159001
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: K028.2
dNTPs (peqGOLD dNTP Set 4x25 µmol)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen: 20-2010
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 8043.2
Entellan® neu	Merck, Darmstadt: 1.07961.0100
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 2218.2
GA <sub>3</sub> , Gibberellinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: G7645
Hefeextrakt pulv. F. d. Bakteriologie	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 2363.2
Hefe-Stickstoff-Basis (ohne AS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: HP26.1
Heringssperma-Carrier DNA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kanamycin Monophosphat	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL: K0126
Myo-Inositol	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen: 5125
Nikotinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: N-4126
Nitrozellulosemembran PROTRAN 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel
PAC, Paclbutrazol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: 46046
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt: 1.04005.1000
Paraplast® Plus	McCormick scientific, Niederlande: 502004
Pelikan Tinte 4001, schwarz	Pelikan Vertriebsgesell. mbH & Co. KG., Hannover
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 6367.1
Phytigel (Gellam gum)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: P-8169
Polyethylenglycol 3350	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: P-3640
Pyridoxin-HCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 4360.2
RNaseOUT	Thermo Fisher Scientific, USA: 10154652
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 3029.1
SDS/Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 4360.2
Spectinomycin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL: S0188.0005
Streptomycin Sulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: S-6501
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: T9281
Toluidinblau O	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: C.I.52040
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 8952.2
Tween®20	AppliChem GmbH, Darmstadt: A1389.0500
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 4227.3
X-GlcA Natriumsalz	Apollo Scientific Ltd, Bredbury, GB: BIMB1121
WGA-FITC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: L4895

#### 4.4.2 Enzyme

Folgende Enzyme sind nicht Bestandteil eines Kits und wurden für diese Arbeit verwendet.

**Tabelle 4.8 Verwendete Enzyme.**

Enzym	Hersteller: Katalognummer
Dnase I (Amplification Grade)	Thermo Fisher Scientific, USA: 10694233
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus	Eurogentec GmbH, Köln: RT-SY2X-06+WOUFL
Pfu DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas, Burlington, Kanada: EP0502
Phusion™HF DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.: F-530L
Proteinase K	Invitrogen GmbH, Karlsruhe: AM2546, 2548
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M. Fermentas, Burlington, Kanada Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Rnase H	Fermentas, Burlington, Kanada
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.: M0371
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, USA: 10328062
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Madison, USA: M1801

#### 4.4.3 Kits

**Tabelle 4.9 Verwendete Kits.**

Kit	Hersteller: Katalognummer
Gateway®LR Clonase®II enzyme mix	Thermo Fisher Scientific, USA: 10134992
pENTR™/D-TOPO®Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, USA: 10246952
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Corp., Freiburg: D4001
innPREP Plant RNA Kit	Analytik Jena AG, Jena: 845-KS-2060250
pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, USA: 10532893
TOPO TA Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, USA: 11543147

### 4.5 Lösungen und Puffer

#### • DEPC- H<sub>2</sub>O

1 ml/l Diethylpyrocarbonat wurde in ddH<sub>2</sub>O über Nacht durch Rühren gelöst und anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

#### • RNase „Killer“ Solution

0,1 M NaOH und 2 mM EDTA wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst.

#### • 6 x Ladepuffer Xylencyanol

Für die Auftrennung von kleinen Fragmenten im Agarosegel. 30 % (v/v) Glycerin und 0,25 % (w/v) Xylencyanol wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

#### • 6 x Ladepuffer Bromphenolblau

Für die Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren. 30 % (v/v) Glycerin und 0,25 % (w/v) Bromphenolblau wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

#### • 10x TAE-Puffer (pH 8,5)

48,8 g/l Tris Base, 11,42 ml/l Essigsäure, 7,44 g/l Na<sub>2</sub>EDTA 2 H<sub>2</sub>O. Verwendung 0,5x.

• **10x TE-Puffer (pH 8)**

0,1 M Tris-Puffer pH 8 und 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8. Der Puffer wurde autoklaviert, bei RT gelagert und in 1x Konzentration verwendet.

• **Antibiotika-Stammlösungen (1000x)**

Antibiotika wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst, anschließend steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 4.10 Verwendete Antibiotika.**

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Verwendete Endkonzentration [µg/ml]
Ampicilin	100	100
Augmentin	200	200/400
Cefotaxim	500	500
Gentamycin	40	40
Kanamycin	50	50
Rifampicin	100	100
Spectinomycin	100	100
Streptomycin	600	100/600
Tetracyclin	25	25

• **TB-Puffer**

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen. Für 500 ml TB-Puffer wurden 10mM (1,512 g) PIPES, 250 mM (9,32 g) KCl, pH 6,7 (KOH), auf 465 ml auffüllen. Nach dem Autoklavieren wurde 55mM MnCl<sub>2</sub> (27,5 ml eines 1 M Stock) und 15 mM CaCl<sub>2</sub> (7,5 ml eines 1 M Stock) steril zugegeben.

**Tabelle 4.11 Lösungen für die Minipräparation von Plasmiden.**

Lösungen Minipräparation	Zusammensetzung
Lösung I	50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Lösung II	0.2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	1.5 M KAc pH 4.8

• **Zitronensäurepuffer**

Zur Sporenisolierung aus M Medium. 17 ml 0,1 M Zitronensäure und 83 ml 0,1 M Natriumcitrat mit dH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt. pH 6,0 (NaOH).

**Tabelle 4.12 Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus Sporen und Wurzeln.**

Lösungen gDNA Isolation	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	0,1 M Tris HCL pH 7,5 0,05 M EDTA 1 % SDS 0,5 M NaCl
KAc-Lösung	3 M KAc 11,5 % (v/v) Eisessig

• **IPTG-Stammlösung (2000x)**

Für die Blau-Weiß-Selektion. 1,2 mg/ml (5 mM) IPTG, sterilfiltriert. Lagerung bei -20 °C.

• **X-Gal-Stammlösung (2000x)**

Für die Blau-Weiß-Selektion. 40 mg/ml X-GlcA (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) in DMF (Dimethylformamid). Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C.

**Tabelle 4.13 Lösungen zur Transformation von *S. cerevisiae*.**

Lösungen Transformation <i>S. cerevisiae</i>	Zusammensetzung
10x LiAc	1 M LiAc, pH 7,5
Heringssperma-Carrier DNA	2 mg/ml in 1x TE ÜN bei 4 °C rühren Aliquots bei -20 °C aufbewahren
PEG 4000	PEG 50 % (w/v)

• **Infiltrationslösung**

Für die Infiltration von *N. benthamiana* mit *A. tumefaciens*. 10 ml/l 1 M MES-KOH (pH 5,6), 10 ml/l 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 ml/l 150 mM Acetosyringon (in DMSO).

• **Proteinextraktionspuffer**

Für die Proteinextraktion aus *N. benthamiana* Blätter. 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 10 mM DTT, 1x PIC, 1 mM PMSF, 0,2 % Nonident P40.

**Tabelle 4.14 Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot.**

SDS-PAGE & Western Blot	Zusammensetzung	Anweisungen
4x SDS-Ladepuffer	200 mM Tris-HCl pH 6,8 8 % SDS 0,4 % Bromphenolblau 40 % Glycerol 400 mM DTT	DTT frisch zugeben
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS	pH 8,7 von 10 x SDS-Laufpuffer verdünnen
5 % Sammelgel	3,4 ml dH <sub>2</sub> O 0,83 ml 30 % Acrylamid Mischung 0,63 ml 1 M Tris pH 6,8 50 $\mu$ l 10 % SDS 50 $\mu$ l 10 % APS 5 $\mu$ l TEMED	Angaben für 5 ml. Pro Gel wurden 1,5 ml angesetzt. Kamm wurde sofort nach dem gießen gesteckt
8 % Trenngel	9,3 ml dH <sub>2</sub> O 5,3 ml 30 % Acrylamid Mischung 5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 200 $\mu$ l 10 % SDS 200 $\mu$ l 10 % APS 20 $\mu$ l TEMED	Angaben für 20 ml. Pro Gel wurden 4 ml angesetzt. Gel wurde nach dem Gießen sofort mit Isopropanol überschichtet
Coomassie Färbelösung	0,25 g Coomassie 100 ml EtOH 100 ml dH <sub>2</sub> O 25 ml Essigsäure	lichtgeschützt bei RT lagern
Coomassie Entfärbelösung	100 ml EtOH 100 ml dH <sub>2</sub> O 25 ml Essigsäure	
1x Blotting Puffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 20 % MeOH	pH 8,7 von 10 x SDS-Laufpuffer verdünnen und 20 % MeOH zugeben

SDS-PAGE & Western Blot	Zusammensetzung	Anweisungen
<b>Ponceau S Färbelösung</b>	0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure	lichtgeschützt bei 4 °C lagern bis zu 10 x verwendbar
<b>1x PBS</b>	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,14 M NaCl 0,27 mM KCl	pH 7,3 von 10 x PBS verdünnen
<b>1x PBST</b>	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,14 M NaCl 0,27 mM KCl 0,05 % (v/v) Tween20	pH 7,3 von 10 x PBS verdünnen und 0,05 % (v/v) Tween20 zugeben
<b>Chemilumineszenz Detektionslösung</b>	1 ml Lösung A (0,25 mg/ml Luminol 0,1 M Tris-HCl pH 6,8)	lichtgeschützt bei 4 °C lagern
	100 µl Lösung B (1,1 mg/ml p-Hydroxy Cu marsäure in DMSO) 0,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	lichtgeschützt bei RT lagern

Tabelle 4.15 Lösungen zur Herstellung von Wurzelquerschnitten.

Wurzelquerschnitte	Zusammensetzung	Anweisungen
<b>Fixierungslösung</b>	4 % Paraformaldehyd 3 mM EGTA 50 mM PIPES	Lösung frisch ansetzen, zum Lösen auf 70 °C erwärmen, pH 6,8
<b>Waschlösung</b>	50 mM PIPES	zum Lösen etwas erwärmen, pH 6
<b>Eiweißglycerin</b>	1:1 Eiweiß:Glycerin	Eiweiß durch Watte filtrieren, Glycerin zugeben, Lagerung bei -20 °C
<b>Färbelösung Toluidinblau O</b>	0,1 % (w/v) Toluidinblau O 2,5 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Filtrieren Lagerung bei 4 °C

Tabelle 4.16 Lösungen zur GUS-Färbung.

Lösungen GUS-Färbung	Zusammensetzung
<b>Waschpuffer</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,0 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
<b>Fixierungspuffer</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,0 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,37 % Formaldehyd
<b>X-GlcA Stocklösung</b>	0,1 M X-GlcA in DMF
<b>Färbelösung</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,0 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 1 mM X-GlcA

## 4.6 Kulturmedien

Alle beschriebenen Medien wurden in dH<sub>2</sub>O angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Für die Herstellung von Festmedien wurde, falls nicht abweichend beschrieben, 1,5 % (w/v) Agar-Agar verwendet. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe von Antibiotika oder anderer Supplemente nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55 °C.

### • SOB Medium (*super optimal broth*)

Zur Anzucht von *E. coli* für die Herstellung chem. kompetenter Zellen. 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,5 (mit NaOH). Nach dem Autoklavieren sterile Zugabe von 20 mM Mg<sup>2+</sup> (2 M Stock = 1 M MgSO<sub>4</sub> und 1 M MgCl<sub>2</sub>).



• **SOC Medium (*super optimal broth, carbon*)**

Zur Transformation von Bakterien. SOB Medium (s. o.) mit zusätzlich 20 mM Glucose nach dem Autoklavieren.

• **LB Medium (*lysogeny broth*)**

Zur Kultivierung von *E. coli*. 1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, pH 7.0.

• **SD Medium**

Zur Kultivierung und Selektion transformierter *S. cerevisiae*. 6,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (ohne Aminosäuren), 100 ml/l 10x LWHA-Dropout Lösung, 10 ml/l entsprechender 100x Aminosäure Lösung (L, W, H, A), pH 5,8. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 2 % (w/v) Glucose. Festmedium: 2 % (w/v) Agar.

• **YPDA Medium**

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* zur Transformation. 20 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 0,003 % (w/v) Adenin-hemisulfat, pH 6,5. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 2 % (w/v) Glucose. Festmedium: 2 % (w/v) Agar.

• **H<sub>2</sub>O-Agar**

Zur Kältestratifikation und Keimung von *M. truncatula* Samen. 0,8% (w/v) Agar-Agar.

• **Minimal (M) Medium (Bécard & Fortin, 1988)**

Zur Kultivierung von *M. truncatula* und *D. carota* Wurzelkulturen.

Tabelle 4.17 Zusammensetzung von M Medium.

Substanz	Stocklösung	Endkonzentration		Volumen/l
		Molarität	mg/l	
<b>Makronährstoffe 40x:</b>				
KNO <sub>3</sub>	3,2 g/l	0,79 mM	80 mg/l	25 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	29,24 g/l	3 mM	731 mg/l	
KCl	2,6 g/l	0,87 mM	65 mg/l	
<b>Phosphatquelle 10x:</b>				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	48 mg/l	35 µM	4,8 mg/l	100 ml
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	115,2 g/l	1,22 mM	288 mg/l	2,5 ml
Na-FeEDTA	3,2 g/l	21,7 µM	8 mg/l	2,5 ml
<b>Mikronährstoffe 1000x:</b>				
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	6 g/l	30,3 µM	6 mg/l	1 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5 g/l	24 µM	1,5 mg/l	
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,65 g/l	9,2 µM	2,65 mg/l	
<b>Weitere Mikronährstoffe 10.000x:</b>				
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,0024 g/100ml	0,01 µM	0,0024 mg/l	100 µl
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,13 g/100ml	0,5 µM	0,13 mg/l	
<b>Vitamine 100x:</b>				
Glycin	0,3 g/l	40 µM	3 mg/l	10 ml
Myo-Inositol	5 g/l	277 µM	50 mg/l	
Nikotinsäure	50 mg/l	4 µM	0,5 mg/l	
Pyridoxin · HCl	10 mg/l	0,5 µM	0,1 mg/l	
Thiamin · HCl	10 mg/l	0,3 µM	0,1 mg/l	

Der pH wurde auf 5,5 eingestellt. Für die *in vitro* Kultur von Wurzeln wurden 10 g/l D-Saccharose zugegeben. Festmedium: 0,3 % (w/v) Phytigel.

• **Modifiziertes Fåhraeus Medium (FM) (Fåhraeus, 1957)**

Zur Kultivierung und Transformation von *M. truncatula* Keimlingen auf Schrägagar.

**Tabelle 4.18 Zusammensetzung von modifiziertem Fåhraeus Medium.**

	Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen/l
<b>Makro-nährstoffe</b>	CaCl <sub>2</sub>	0,9 M	0,9 mM	1 ml
	MgSO <sub>4</sub>	0,5 M	0,5 mM	1 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 M	0,7 mM	1 ml
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 M	0,8 mM	2 ml
	Fe-Citrat	20 mM	20 µM	1 ml
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 M	0,5 mM	0,5 ml
<b>Mikro-nährstoffe</b>	MnCl <sub>2</sub>	1 mg/ml	100 µg/l	100 µl
	CuSO <sub>4</sub>	1 mg/ml	100 µg/l	100 µl
	ZnCl <sub>2</sub>	1 mg/ml	100 µg/l	100 µl
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mg/ml	100 µg/l	100 µl
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1 mg/ml	100 µg/l	100 µl

Der pH wurde mit HCl auf 6,5 eingestellt und 0,9% (w/v) Agar-Agar hinzugegeben.

• **Long Ashton Nährlösung (Hewitt, 1966)**

Zur Kultivierung von *M. truncatula* Wildtyp und *composite* Pflanzen in Töpfen.

**Tabelle 4.19 Zusammensetzung von Long Ashton Nährlösung.**

Substanz	Stocklösung	Endkonzentration		Volumen/l	
		Molarität	1x	0,5x	1x
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	750 mM	1,5 mM	750 µM	2 ml	1 ml
NaNO <sub>3</sub>	4 M	8 mM	4 mM	2 ml	1 ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 mM	4 mM	2 mM	8 ml	4 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2 M	4 mM	2 mM	2 ml	1 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	333 mM	666 mM	333 µM (20µM)	2 ml	1 ml (60µl)
Na-FeEDTA	40 mM	50 µM	25 µM	1,25 ml	625 µl
<b>Mikronährstoffe 10.000x:</b>					
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	100 mM	10 µM	5 µM		
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	10 mM	1 µM	500 nM		
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10 mM	1 µM	500 nM	100 µl	50 µl
NaCl	1 M	100 µM	50 µM		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 mM	50 µM	25 µM		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	5 mM	500 nM	250 nM		

## 4.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Nicht aufgeführtes Verbrauchsmaterial wurde über die Firmen Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), A. Hartenstein (Würzburg), Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern) und Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht) bezogen.

**Tabelle 4.20 Verbrauchsmaterialien.**

Material	Name	Hersteller: Katalognummer
Cellophan	Alba Einmach-Haut	Gehring & Neiweiser GmbH & CoKG, Bielefeld
Elektroporationsküvetten	Elektroporationsküvette, 2 mm, grüner Deckel	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf: 748020
96-well Platten	Semi-Skirted 96 Well PCR Plate	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen: 82-0900-A
Küvetten	Halb-Mikro Küvetten, Polysterol	Sarstedt, Nümbrecht: 67.746

Material	Name	Hersteller: Katalognummer
Spritzen	Einmalspritzen Injekt <sup>®</sup> , mit Luer-Anschluss, 2 ml	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe: 0056.1
Pikierschalen	Manna Pikierschalen, ohne Loch	Adolf Burger GmbH, Renningen-Malmsheim
Töpfe	Vierkant-Container (9 x 9 x 9,5 cm)	Adolf Burger GmbH, Renningen-Malmsheim

Tabelle 4.21 Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Chemilumineszenzdetektion	CHEMI-SMART-5100	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
DNA-Elektrophorese	i-Mupid Mupid <sup>®</sup> -exU	Cosmobio Co., Tokio, Japan Advance Co. LTD, Japan
Geldokumentation	Quantum mit Epi-UV	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heizblöcke	Thermomixer 5436 Test Tube Thermostat Model TCR100 Techne DR1-Block DB.2A	Eppendorf, Hamburg Roth, Karlsruhe Kleinfeld, Gehrden
Inkubatoren und Schüttler	Heraeus-Brutschrank Baureihe 6000 HAT Infors Kleinschüttler KS 250 Brutschrank BB80 Brutschrank ICP500 Pflanzenwachstums-Schrank Binder KBW 400 Pflanzenwachstums-Schrank BrightBoy <sup>®</sup>	Kendro, Langenselbold Infors AG, Schweiz IKA Werke GmbH CoKG, Staufen Memmert, Schwabach Memmert, Schwabach New Brunswick Scientific GmbH, Nürtlingen CLF Plant Climatics GmbH, Wertingen
Mikroskope und Kameras	Axio Imager. Z1 mit AxioCam MRm und AxioCam ICc3 SteREO Lumar.V12 mit Axio-CamHRc Leica TSP SP5 mit Leica DFC295 Nikon D3200	Zeiss, Göttingen Zeiss, Göttingen Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Nikon, Japan
Photometer	Eppendorf Bio Photometer ND-100 Spectrophotometer	Eppendorf, Hamburg NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Protein-Elektrophorese	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories, München
Schwingmühle	MM 200	Retsch, Haan
Sterilbank	Kojair KH Open LAF Silver Line	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Thermocycler	Biometra Tpersonal Thermocycler Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen
Waagen	Elektrische Laborwaage 440-47N Analysewaage Satorius reserch	Kern und Sohn GmbH, Balingen Satorius GmbH, Göttingen
Western Blot	Mini Trans-Blot Modul	BioRad Laboratories, München
Real-Time Cyclus	iCycler MyIQ, Single Color	BioRad Laboratories, München
Zentrifugen	Tischzentrifuge Spectrafuge 24D Kühlzentrifuge Universal 320R Kühlzentrifuge Hermie Z 233 MK-2 Kühlzentrifuge Beckman J2-21 VR-1 Speed Vaq – Vakuumzentrifuge mit CT 60e Kühlfalle und Bauknecht Vakuumpumpe	Labnet International, Inc., Edison, USA Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Hermie ortechnik GmbH, Wehingen Beckman Coulter, Krefeld Heto Lab Equipment, Dänemark MAGV GmbH, Rabenau



## 5 Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um *in vitro* spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren wurde die Methode der PCR angewandt. Die PCR-Reaktionen wurden gewöhnlich in einem Volumen von 25 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt.

- Taq Polymerase

Für Standardreaktionen wurde die Taq Polymerase von *Thermus aquaticus* verwendet. Hierzu wurden bei einem 25 µl Ansatz 0,5 – 1 µl DNA als *template* (1 ng gDNA oder cDNA, bzw. eine 1:100 Verdünnung von Plasmid DNA), 2 µl dNTPs (2,5 mM), jeweils 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol), 2,5 µl 10x Taq Puffer, 1 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) und 0,25 - 0,5 µl Taq Polymerase hinzugegeben. Bei analytischen PCRs wurde jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle inkludiert.

Tabelle 5.1 Verwendetes Standard PCR-Programm für die Taq-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Primerhybridisierung	T <sub>m</sub> °C	30 sec	30 – 40 x
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	12 °C		

- Phusion HF DNA Polymerase

Falls das PCR-Produkt für eine Klonierungsreaktion eingesetzt werden sollte, wurde die Phusion HF (High Fidelity) DNA Polymerase zur Amplifikation verwendet, da diese eine Korrekturlese-Funktion besitzt. Hierzu wurden bei einem 25 µl Ansatz 0,5 – 1 µl DNA, 2 µl dNTPs (2,5 mM), jeweils 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol), 5 µl 5x HF-Puffer (inkl. 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>, NEB, England) und 0,25 – 0,5 µl Phusion HF DNA Polymerase eingesetzt.

Tabelle 5.2 Verwendetes Standard PCR-Programm für die Phusion-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	30 sec	
Primerhybridisierung	T <sub>m</sub> + 3 °C	30 sec	30 – 40 x
Elongation	72 °C	15 – 30 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C		

### 5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Um PCR-Produkte aufzureinigen, die Qualität von Nukleinsäure-Präparationen zu bestimmen sowie zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden DNA bzw. RNA in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Prozentigkeit des Agarosegels wurde an die erwartete Fragmentgröße angepasst (0,8 – 2% (w/v)). Die Agarose (Peqlab, Deutschland) wurde in 0,5x TAE Puffer durch aufkochen gelöst. Die Proben wurden vor dem Laden mit 6x Ladepuffer versetzt. Als Größenmarker dienten 5 µl der 2log DNA Ladder (NEB, England). Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,5x TAE Puffer bei 50 – 135 V. Zur Detektion der Nukleinsäure-Banden wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die Nukleinsäuren mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.

### 5.1.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um einzelne DNA-Banden aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde zum einen die Freeze & Squeeze Methode angewandt. Hierbei wird die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und bei -20 °C eingefroren. Das gefrorene Gelstück wird zwischen Parafilm mit den Fingerspitzen erwärmt und die Flüssigkeit herausgequetscht.

Als weitere Methode wurde das Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery von ZYMO RESEARCH nach Herstellerangaben verwendet.

### 5.1.4 Fällung von DNA

Für die Aufreinigung oder Aufkonzentrierung von DNA, wurde diese durch EtOH-Präzipitation gefällt. Hierzu wurde die DNA mit dH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt, 10 µl 3 M NaAc pH 4,8 hinzu pipettiert und 250 µl eiskaltes 100 % EtOH hinzugegeben. Anschließend wurde die DNA bei -80 °C 30 min präzipitiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 13.200 rpm wurde das DNA-Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 13.2000 rpm wurde die DNA an der Luft getrocknet und anschließend gelöst.

### 5.1.5 Klonierung von PCR-Fragmenten in pCR2.1/TOPO oder pCR8/GW/TOPO

Um PCR-Fragmente in die Plasmide pCR2.1/TOPO oder pCR8/GW/TOPO zu klonieren, werden 3' A-Überhänge, wie es die Taq-Polymerase erzeugt, benötigt. Bei PCR-Produkten mit stumpfen Enden wurden durch die Zugabe von 0,25 µl Taq-Polymerase und einer Inkubation von 10 min bei 72 °C 3' A-Überhänge erzeugt. Die Klonierung von PCR-Produkten mit 3' A-Überhängen erfolgte wie im Handbuch des TOPO T/A Cloning® Kit PCR (Invitrogen, USA) beschrieben. Abweichend davon wurden jeweils nur 0,5 µl Vektor für eine Reaktion eingesetzt und die Inkubationszeit auf 30 min verlängert. Anschließend wurden 3 µl des Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Lagerung bei -20 °C.



### 5.1.6 Direktionales Klonieren von PCR-Fragmenten in pENTR/D-TOPO

Die Reaktion wurde wie in den Anweisungen des Herstellers beschrieben mit PCR-Fragmenten mit stumpfen Enden und der Sequenz CACC am 5'-Ende angesetzt. In einen 6 µl Klonierungsansatz wurden 4,5 µl eines PCR-Ansatzes oder eines aufgereinigten DNA-Fragments mit 1 µl Salzlösung und 0,5 µl des pENTR/D-TOPO Vektors vermischt und bei 25 °C 30 min inkubiert. Anschließend wurden 3 µl des Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Lagerung bei -20 °C.

### 5.1.7 Deletion einer spezifischen Nukleotidsequenz

Um ein dominantes, nicht durch GA degradierbares, DELLA-Protein zu konstruieren, wurde die DELLA-Domäne aus MtDELLA1 nach Floss *et al.* (2013) deletiert. Hierfür wurde eine inverse PCR mit Primern durchgeführt, welche eine 5'-Phosphorylierung als Modifikation besaßen. Als template diente das Plasmid MtDELLA1-pENTR™/D-TOPO®, welches komplett amplifiziert wurde, wobei die 54 bp lange Nukleotidsequenz, codierend für die 18 Aminosäuren MDELLAALGYKVRSSDMA, ausgespart wurde. Die PCR wurde mit der Pfu DNA-Polymerase in einem 50µl-Ansatz durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl Plasmid (100ng/µl), 6 µl dNTPs (2,5 mM), jeweils 2 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol), 5 µl 10x Pfu-Puffer mit MgSO<sub>4</sub>, 5 µl 10x BSA und 2 µl Pfu DNA-Polymerase eingesetzt. Das verwendete PCR-Programm wurde wie folgt gewählt: 95 °C 1 min, 95 °C 30 sec, 56 °C 30 sec, 68 °C 4 min 40sec, 68 °C 10 min. Es wurden 30 Zyklen der mittleren drei Schritte durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt direkt mit dem Restriktionsenzym DpnI, welches ausschließlich in methylierten Nukleotidsequenzen und somit im eingesetzten template schneidet, verdaut. Hierzu wurden dem PCR-Ansatz 1 µl DpnI hinzugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Ligation der aufgereinigten 10 µl linearen Produkts wurden 1 µl T4 DNA Ligase und 10x T4-Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation ÜN bei 16 °C wurde das Plasmid direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

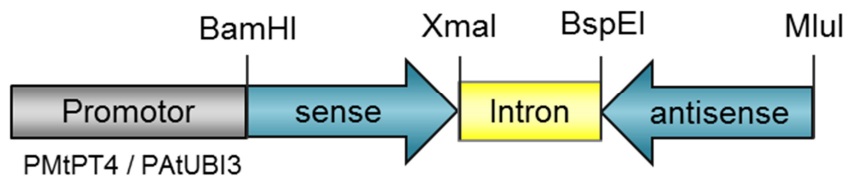
### 5.1.8 Konstruktion von Expressionsvektoren mit dem Gateway® System

Die Konstruktion der Vektoren zur Überexpression in *M. truncatula*, Promotorreporter, BiFC-Analysen, Lokalisierung und zur Herunterregulierung durch RNAi mit dem 35S Promotor wurde mit dem Gateway® Klonierungssystem durchgeführt. Die Zielsequenz wurde mit der Phusion Polymerase amplifiziert und in einen Eingangsvektor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung mit den Primern M13 (-21) und T7 verifiziert (Eurofins Genomics, Ebersberg). Um die Zielsequenz in den Destinationsvektor einzubringen, wurde eine LR Rekombination mit dem Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix durchgeführt. Hierfür wurden 100 ng Eingangsvektor mit 300 ng des gewünschten Expressionsvektors versetzt und mit TE-Puffer auf 4 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1 µl LR-Clonase Enzym Mix II wurde die Reaktion bei RT für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurde 1 µl

Proteinase K hinzugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. 3 µl des LR-Ansatzes wurden in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Nicht verwendete LR-Reaktion wurde bei -20 °C gelagert.

### 5.1.9 Konstruktion von Expressionsvektoren über Restriktionsschnittstellen

Zur Klonierung der RNAi-Konstrukte PATUBI3-MIG1RNAi.3/4 und PMtPT4-MIG1RNAi.3 wurden die RNAi-Konstrukte MIG1-RNAi.3 bzw. MIG1-RNAi.4 jeweils direktional in zwei aufeinander folgenden Klonierungsschritten in *sense*- und *antisense*-Richtung in die RNAi-Leervektoren (Devers *et al.*, 2013) eingefügt. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme BamHI und XmaI (*sense*) bzw. BspEI und MluI verwendet (*antisense*) (Abb. 5.1). Das entstehende Transkript formt in der Zelle durch das dazwischen liegende Intron eine *hairpin*-Struktur und kann nach Prozessierung an die Zielsequenz binden, was theoretisch zu einer Herunterregulation des Zieltranskripts führt.



**Abbildung 5.1** Klonierung der RNAi-Konstrukte MIG1RNAi.3 und MIG1RNAi.4 in die Vektoren RNAi-PATUBI3-DsRED und RNAi-PMtPT4-DsRED. Das RNAi-sense-Konstrukt wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XmaI eingefügt, das antisense-Konstrukt über BspEI und MluI.

Für Interaktions- und Transaktivierungsstudien in Hefe wurden die ORFs der entsprechenden Gene über die Restriktionsenzyme NdeI und BamHI in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7-Rec (Clontech) integriert. Für die Analyse des N-Terminus von *MtMIG1* wurde das Konstrukt *MtMIG1-N* kloniert, welches 324 bp ab dem Startcodon und somit den ersten 108 AS entsprach.

Eine simultane Expression zweier Konstrukte *in planta* wurde durch die Integration beider Expressionskassetten in einen binären Vektor erzielt: Für die Überexpression von *MtΔ18DELLA1* in Kombination mit einer Überexpression von *MtMIG1* wurde die Expressionskassette 2xP35S-MIG1 aus MtMIG1OE\_2xP35S-pKGW-RR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle XhoI in MtΔ18DELLA1\_pCGFP-RR integriert. Für die Überexpression von *MtΔ18DELLA1* in Kombination mit einer Herunterregulierung von *MtMIG1* wurde die Expressionskassette PMtPT4-MIG1RNAi.3 inklusive Terminator aus MtMIG1\_RNAi.3\_RNAi-PMtPT4-DsRED amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle XhoI in MtΔ18DELLA1\_pCGFP-RR integriert.

### 5.1.10 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (Minipräparation)

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden 3 ml mit entsprechenden

Antibiotika versetztes LB Medium mit einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 2 ml der *E. coli* Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für eine Minute bei 13.000 rpm und RT pelletiert. Zur Pufferung wurde das Zellpellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß über ein Metallgitter gezogen. Anschließend wurden 200 µl Lösung II hinzugefügt, die Suspension vorsichtig invertiert, sodass die Zellen bei einer 5 minütigen Inkubation lysiert wurden. Die Lyse wurde durch Zugabe von 200 µl Lösung III und vorsichtigem Invertieren gestoppt. Die Inkubation für das Ausfällen der Proteine und Zelltrümmer wurde 15 min auf Eis durchgeführt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm, wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 600 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Die Lösungen wurden durch Invertieren vermischt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde anschließend durch einen 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen und erneut 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach einer Trocknung bei 68 °C wurde die Plasmid-DNA für 5 min bei 68 °C in 50 µl 1x TE-Puffer gelöst. Zur Überprüfung der Minipräparation wurden 4 µl auf ein 1 % Agarosegel geladen.

#### 5.1.11 Restriktionsverdau von DNA

Für die Überprüfung von isolierten Plasmiden wurde ein Restriktionsverdau mit passenden Restriktionsenzymen durchgeführt. Dies wurde in der Regel in einem Ansatz von 10 µl durchgeführt. Hierzu wurden standardmäßig 1 µl des entsprechenden 10x Puffers, 0,2 µl des Restriktionsenzym und 6 µl der zu verdauenden Minipräparation gemischt. Der Reaktionsansatz wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und in der Regel 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### 5.1.12 Kolonie-PCR zur Identifizierung positiv transformierter Agrobakterien

Zur Selektion von erfolgreich transformierten Agrobakterien wurden Einzelkolonien in LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 28 °C und 220 rpm kultiviert. 100 µl der Kultur wurden in ein 0,2 µl Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in 20 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Durch diesen Schritt wurde die Zellsuspension 5x aufkonzentriert. Durch 10 min Erhitzen bei 95 °C wurden die Zellen anschließend aufgeschlossen. Die Suspension wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der entstandene Überstand diente als *template* in einer Standard-PCR mit Taq-Polymerase. Diese wurde mit spezifischen Primern für das klonierte Konstrukt und das verwendete Plasmid durchgeführt, sodass das Amplikon über die Grenze von Plasmid und Insert gebildet wurde. 1 µl DMSO wurde als PCR-Additiv eingesetzt.

### 5.1.13 Isolation von genomischer DNA

Für die Gewinnung von gDNA aus Sporen von *R. irregularis* oder aus pflanzlichem Material wie Wurzeln von *M. truncatula* wurden diese mit flüssigem Stickstoff, Mörser und Pistill homogenisiert. Zur Extraktion wurden 750 µl Extraktionspuffer hinzugegeben und die gevortexte Suspension 30 min bei 68 °C inkubiert. Anschließend wurden 375 µl KAc-Lösung hinzupipettiert, die Suspension durch Invertieren gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und mit 800 µl Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Nach einem Waschschrift mit 500 µl 70 % EtOH und einer erneuten Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm, wurde das Pellet bei RT getrocknet. Die gDNA wurde in 50 µl 1x TE-Puffer aufgenommen. Um eventuell vorhandene RNA zu entfernen, wurde ein RNase-Verdau mit 1 µl DNase-freie RNase für 1h bei 37 °C durchgeführt. Zur Überprüfung der gDNA wurden 2 µl auf ein 0,8 % Agarosegel geladen. Die gDNA wurde bei 4 °C gelagert.

### 5.1.14 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA fand mit Hilfe des innuPREP Plant RNA Kit nach Anweisungen des Herstellers statt. Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Material wie Wurzeln von *M. truncatula* wurde eine Homogenisierung in 450 µl Lysis Lösung RL mit zwei Metallkugeln (5 mm) in der Schwingmühle MM200 (5 min bei 1/25s) in 2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Anschließend wurden die Metallkugeln entfernt und nach Protokoll gearbeitet. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem dH<sub>2</sub>O eluiert, und 0,3 µl RNase Out (Invitrogen) zum Schutz der RNA hinzu pipettiert. Zur Überprüfung der RNA-Isolation wurden jeweils 2 µl auf ein 1 % Agarosegel geladen. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 5.1.15 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA und RNA Proben erfolgte mit jeweils 2 µl Probenmaterial durch spektrophotometrische Messung der Absorption bei 230, 260 und 280 nm mit dem NanoDrop-100 Spektrophotometer. Der spezifische Multiplikationsfaktor liegt für doppelsträngige DNA bei 50, für RNA bei 40. Verunreinigungen der Nukleinsäuren durch Proteine werden durch den Absorptionsquotienten 260/280 dargestellt. Andere organische Stoffe, wie Phenole werden durch den Absorptionsquotient von 260/230 sichtbar. Reine DNA sollte einen 260/280-Quotienten von 1,8 besitzen, reine RNA einen Quotienten von 2. Der 260/230-Quotient sollte über 1,8 liegen.

### 5.1.16 Erststrang cDNA-Synthese

Es wurde auf Eis gearbeitet. Zu Beginn der cDNA-Synthese wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg RNA mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O auf 8 µl aufgefüllt. Es wurde 1 µl 10x DNase Reaktionspuffer und 1 µl DNase I hinzupipettiert und für 15 min bei RT

inkubiert. Der vollständige Verdau der genomischen DNA in den RNA-Proben wurde durch eine Test-PCR auf das *M. truncatula* Haushaltsgen *MtTEF1a* (Wulf *et al.*, 2003) überprüft. Hierzu wurden 0,5 µl der RNA-Lösung als *template* eingesetzt. Bei einem vollständigen Abbau der DNA konnte kein Amplikon in der Test-PCR amplifiziert werden. Anschließend wurde der DNase-Verdau abgestoppt und mit der cDNA-Synthese begonnen. Hierfür wurde 1 µl EDTA (25 mM) und 1 µl RNase-freies dH<sub>2</sub>O hinzupipettiert und 10 min bei 65 °C inkubiert. Weiterhin wurde 1 µl Oligo(dt)-Primer (10 µM) und 1 µl dNTPs (10 mM) hinzugegeben. Die Reaktion wurde 5 min bei 42 °C inkubiert um eine Anlagerung der Primer an die PolyA-Schwänze der mRNA zu gewährleisten. Die Erststrangsynthese wurde durch die Zugabe von 4 µl 5x First Strand Buffer, 1 µl DTT (100 mM), 1 µl RNase Out und 1 µl SuperScript II™ Reverse Transkriptase eingeleitet. Die Synthese fand für 1 h bei 42 °C statt und wurde für 10 min bei 70 °C abgestoppt. Eine erneute Test-PCR auf das Haushaltsgen wurde zur Überprüfung der Qualität der synthetisierten cDNA durchgeführt.

### 5.1.17 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Für die Expressionsanalyse von Genen wurde die Methode der quantitativen Real Time PCR angewandt. Hierzu wurde der iCycler MyIQ zusammen mit dem 2x MESA GREEN qPCR MasterMix Plus und einer Primerkonzentration von 0,2 pmol/µl in 15 µl Ansätzen verwendet. Als *template* wurde eine 1:5 Verdünnung der cDNA eingesetzt. Für jede Probe wurden drei technische Replikate analysiert. Je Primerpaar wurde eine Negativkontrolle ohne *template* mitgeführt. Die Primerpaare wurden mit einer Anlagerungstemperatur von 56 °C synthetisiert. Das inkludierte Fluorescein im Mastermix diente als passive Referenz, hierbei wurde der dynamische *well factor* direkt von der jeweiligen experimentellen Platte ermittelt. Im Anschluss an die qPCR wurde eine Analyse der Schmelzkurve durchgeführt um unspezifische Produkte und Primerdimere zu visualisieren. Die Analyse wurde in der Regel mit drei biologischen Replikaten angesetzt.

**Tabelle 5.3 Verwendetes Protokoll für die qPCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Primerhybridisierung	56 °C	20 sec	40 x
Elongation	72 °C	30 sec	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	55 °C	1 min	
Schmelzkurvenanalyse	55 - 95 °C	10 sec / 0,5 °C	81 x

Für die Kalkulation der relativen Expression wurden die Ct-Werte (*threshold cycle*) der entsprechenden Zielgene gegen die Ct-Werte des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens normalisiert: Relative Expression  $RE_x = 2^{Ct(\text{Haushaltsgen}) - Ct(\text{Zielgen } x)}$

Die Standardabweichung der Relativen Expression wurde wie folgt berechnet:

Standardabweichung  $\sigma_x = \sqrt{(\sigma_{Zielgen})^2 + (\sigma_{Haushaltsgen})^2} * \ln(2) * RE_x$

Die Induktion wurde mit der vergleichenden Ct-Wert-Methode berechnet (Livak & Schmittgen, 2001): Induktion =  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{\Delta Ct_{Gen I} - \Delta Ct_{Gen II}}$ , wobei  $\Delta Ct_{Gen} = Ct_{Gen} - Ct_{Haushaltsgen}$ . Eine biologische Relevanz wurde ab einem mindestens zweifachen Wechsel der Induktion erreicht.

## 5.2 Mikrobiologische Transformationssysteme

### 5.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Eine Vorkultur wurde mit 50 ml LB Medium, entsprechendem Antibiotikazusatz und einer Einzelkolonie des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die 500 ml Hauptkultur wurde mit SOB Medium ohne Antibiotika mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 bei 22 °C schüttelnd inkubiert. Die folgenden Schritte wurden auf Eis und steril durchgeführt. Nachdem die Zellsuspension auf Eis 10 min abgekühlt wurde, konnte man diese in vorgekühlte 250 ml Zentrifugenbecher überführen und 10 min bei 2.500 rpm und 4 °C pelletieren. Das Zellpellet wurde in insgesamt 200 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis gekühlt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen erneut 10 min bei 2.500 rpm und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml TB-Puffer und 700 µl DMSO resuspendiert und im Anschluss daran in 100 µl Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### 5.2.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurde ein 100 µl Aliquot der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, 2 µl des gewünschten Plasmids hinzupipettiert und durch Rühren vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Die Zellen wurden 1 min auf Eis abgekühlt, anschließend wurden 500µl SOC Medium (RT) hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C 1 h schüttelnd inkubiert. Die Zellsuspension wurde kurz abzentrifugiert, das Pellet in einem Rest Medium resuspendiert und alle Zellen auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C über Kopf inkubiert.

### 5.2.3 Herstellung elektrokompetenter *A. rhizogenes* und *A. tumefaciens* Zellen

Eine Vorkultur wurde mit 50 ml LB Medium, entsprechendem Antibiotikazusatz und einer Einzelkolonie des gewünschten Agrobakterien Stamms angeimpft und über Nacht bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Eine 500 ml Hauptkultur wurde mit LB Medium ohne Antibiotika mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 angesetzt. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Die folgenden Schritte wurden auf Eis und steril durchgeführt.



Nachdem die Zellsuspension auf Eis 15 min abgekühlt wurde, wurde diese in vorgekühlte 250 ml Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 2.500 rpm und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 250 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut 10 min bei 2.500 rpm und 4 °C pelletiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert und bei 4 °C und 2.500 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde das Zellpellet in 3 ml 10 % Glycerol aufgenommen und Aliquote von jeweils 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 5.2.4 Transformation elektrokompetenter *A. rhizogenes* und *A. tumefaciens* Zellen

Für die Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der elektrokompetenten Agrobakterien auf Eis aufgetaut. Die Elektroporationsküvette (4 mm Spaltbreite) wurde zuvor wie folgt von DNA-Resten gereinigt: 0,1 M NaOH bei RT inkubieren bis Bläschen zu sehen waren. Nach einem Waschschrift mit dH<sub>2</sub>O 10 min mit 70 % EtOH inkubieren und erneut mit dH<sub>2</sub>O waschen. Nachdem die Elektroporationsküvette bei RT getrocknet wurde, konnte sie auf Eis vorgekühlt werden. Zu den aufgetauten Zellen wurden 5 µl Plasmid (Minipräparation) pipettiert und durch Rühren vermischt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Küvette überführt. Die Elektroporation fand bei einem Widerstand von 200 Ω, einer elektrischen Kapazität von 25 µF und einer Spannung von 2 kV für etwa 5 ms statt. Im Anschluss wurden 500 µl SOC Medium hinzugegeben und die Zellsuspension für 2 h bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. 100 µl der Suspension wurden auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und 2 d bei 27 °C inkubiert.

#### 5.2.5 Herstellung von bakteriellen Glycerolstocks

Für die Aufbewahrung von transformierten Bakterien wurde eine ÜN-Kultur angeimpft. Von dieser Kultur, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindet, wurden 750 µl mit 375 µl 20 % (v/v) Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

#### 5.2.6 Transformation von *S. cerevisiae*

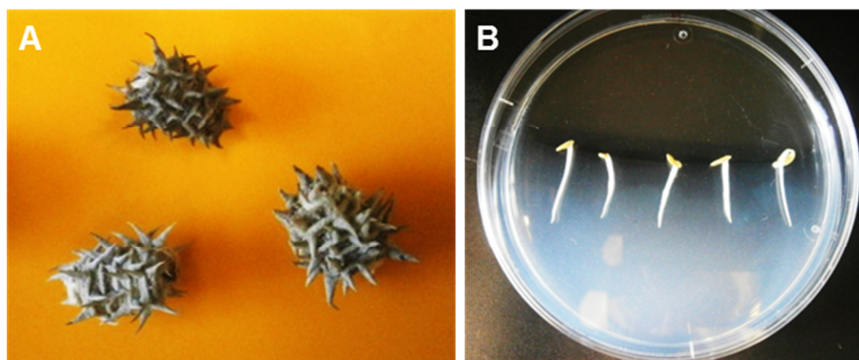
Für die Untersuchung von Proteininteraktionen und Transaktivierungsaktivität von Proteinen wurde der *S. cerevisiae* Stamm AH109 mit den entsprechenden Konstrukten durch die LiAc-basierte Methode transformiert. Hierfür wurde eine 300 ml Hauptkultur mit einer frischen Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugation bei 1.000 g pelletiert und in 1,5 ml frischer 1x TE / 1x LiAc Lösung resuspendiert, um sie für die DNA-Aufnahme kompetent zu machen. Je Transformationsansatz wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,1 mg aufgekochter Heringssperma-Carrier-DNA, 0,1 µg der zu transformierenden Plasmide und 100 µl der kompetenten Hefezellen gegeben. Anschließend wurde der Ansatz kurz gevortext und 600 µl frisch hergestellte PEG/ LiAc-Lösung hinzugefügt. Nach erneutem vortexen wurde der Transformationsansatz 30 min bei 30 °C und 220 rpm inkubiert.

Anschließend wurden 70 µl DMSO hinzugefügt und ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 15 min durchgeführt. Nach einer Kühlung von 1 – 2 min auf Eis wurden die Zellen 5 s bei 13.000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Bei Einzeltransformationen wurden 500 µl 1x TE zugefügt und je 100 µl, unverdünnt und 1:10 verdünnt auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert. Für Cotransformationen wurden die Hefezellen in 200 µl 1x TE resuspendiert und 100 µl unverdünnt auf SD-LW ausplattiert. Die Selektionsplatten wurden 3-4 d bei 30°C inkubiert, bis Kolonien einer Größe von 2-3 mm gewachsen waren.

### 5.3 Arbeiten mit Pflanzen und Mykorrhizierung

#### 5.3.1 Oberflächensterilisation und Keimung von *M. truncatula* Samen

Um *M. truncatula* Samen zu isolieren, wurden die Hülsen mit einem Mixer zerkleinert und die Samen anschließend herausgelesen (Abb. 5.2 A). Zur Oberflächensterilisation und zum vorzeitigen Brechen der Dormanz wurden diese etwa 15 min mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt bis sich schwarze Punkte auf den Samen gebildet hatten. Die Behandlung wurde abgebrochen, indem die Schwefelsäure durch mehrmaliges Waschen mit sterilem dH<sub>2</sub>O entfernt wurde. Die Samen wurden nun zur Kältestratifikation und Quellung auf H<sub>2</sub>O-Agar Platten gelegt und über Nacht bei 4 °C über Kopf gelagert. Anschließend wurden die Samen zum Keimen einen Tag in Dunkelheit bei 27 °C inkubiert (Abb. 5.2 B).

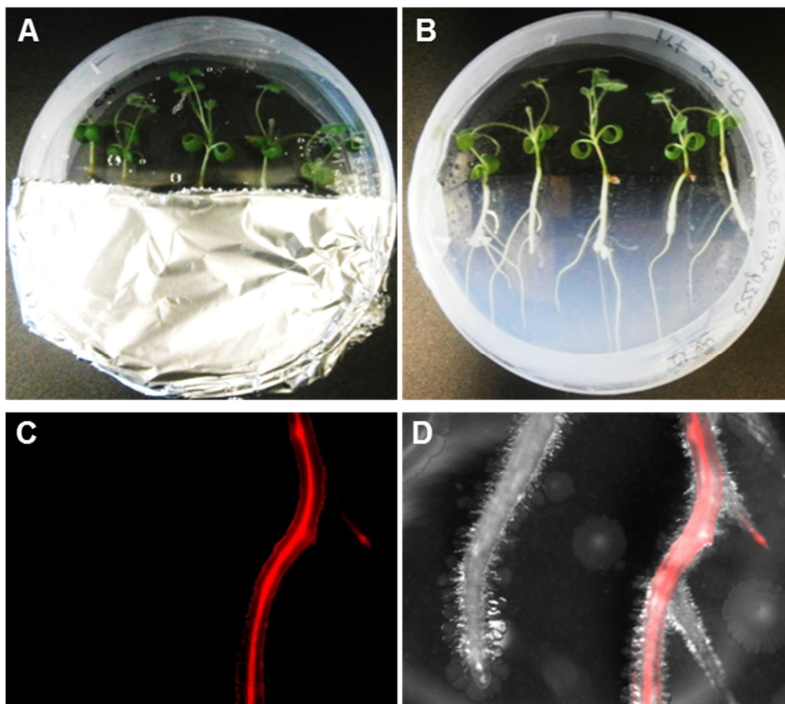


**Abb. 5.2 *M. truncatula* Samen und Keimlinge.** (A) In den getrockneten Hülsenfrüchten befinden sich die Samen von *M. truncatula*. (B) Keimlinge auf Schrägagarplatten.

#### 5.3.2 Transformation von *M. truncatula* Wurzeln mittels *A. rhizogenes*

Die Transformation von *M. truncatula* Wurzeln erfolgte durch den *A. rhizogenes* Stamm ARqua1 (Quandt *et al.*, 1993). Dieser beinhaltet das gewünschte binäre Plasmid und wurde 2 d vor der Wurzeltransformation auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 27 °C inkubiert. Die Transformation der Wurzel wurde nach Boisson-Dernier *et al.* (2001) durchgeführt. Hierzu wurde den *M. truncatula* Keimlingen 1 - 3 mm von der Wurzelspitze abgetrennt und diese künstliche Wunde anschließend über den Agrobakterienrasen gestrichen. Jeweils fünf Keimlinge wurden auf eine Schrägagar-

platte (FM) platziert. Der Wurzelbereich wurde durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt (Abb. 5.3 A). Die transformierten *M. truncatula* Keimlinge wurden für eine Woche bei 21 °C mit einem 16 h Licht und 8 h Dunkelheit Zyklus in einem 45° Winkel inkubiert. Ab der zweiten Woche wurden die Platten in einem 90° Winkel und bei 25 °C mit dem gleichen Licht-Dunkelheit-Rhythmus inkubiert. Nach 4 - 5 w wurden die Pflanzen unter dem Binokular visuell auf transformierte Wurzeln überprüft. Hierzu diente die transformierte DsRED-Kassette, welche einen konstitutiven Promotor besitzt und demnach positive Transformanden mit einer deutlich sichtbaren roten Fluoreszenz markiert (Abb. 5.3 C, D).



**Abbildung 5.3 Transformierte *M. truncatula* Pflanzen.** (A, B) Vier Wochen alte transformierte *M. truncatula* Pflanzen auf FM-Schrägagarplatte mit (A) und ohne Alufolie (B). (C, D) Selektion transformierter Wurzeln auf Basis der konstitutiv exprimierten DsRED-Kassette. Transformierte Wurzeln fluoreszieren nach Anregung mit gelb-grünem Licht (rechts), untransformierte Wurzeln zeigen keine Fluoreszenz (links). (C) DsRED-Kanal; (D) Überlagerung mit Hellfeld.

### 5.3.3 Kultivierung und Mykorrhizierung von *composite* Pflanzen

Um *composite* (zusammengesetzte) Pflanzen herzustellen, welche einen untransformierten Spross und Ri-transformierte Wurzeln (*hairy roots*) besitzen, wurden die nicht-transformierten Wurzeln abgeschnitten. Jeweils zwei Pflänzchen wurden anschließend auf Schrägagarplatten (FM) und 400 µg/ml Augmentin gesetzt und eine Woche bei 25 °C inkubiert (Tag/Nacht-Rhythmus 16 h/ 8 h). Als Kultivierungsgefäß dienten 50 ml Röhrchen, welche vier Löcher am Boden besitzen. Diese wurden mit Alufolie ummantelt, mit sterilen Steinchen, als auch einer sterilen Mischung aus Sand und Kies im Verhältnis 4:1 befüllt. Jeweils ein Pflänzchen wurde in ein Gefäß eingepflanzt und bei 25 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h/ 8 h inkubiert. Um die Pflänzchen vor Austrocknung zu schützen wurde eine durchsichtige Folie um die Pflänzchen gespannt, welche nach oben geöffnet war. Die Pflänzchen wurden 2x pro Woche mit 5 ml 0,5x Long Ashton Nährlösung (Hewitt, 1966) und dH<sub>2</sub>O nach Bedarf gegossen.

Für eine Mykorrhizierung wurde dem Substrat zu Beginn mit *R. irregularis* kolonisierte *D. carota* Wurzeln beigemischt. Für eine gesteigerte Mykorrhizierungseffizienz wurden diese Pflänzchen mit 0,5x Long Ashton Lösung gegossen, welche eine verringerte Menge Phosphat enthielt (20  $\mu\text{M}$ ). Kontrollpflanzen, welche nicht mykorrhiziert wurden, wurden mit der gleichen Nährlösung gegossen. Die Gesamtheit aller transformierten Wurzeln einer Pflanze wurde einzeln als Probe geerntet.

### 5.3.4 Explantation und *in vitro* Kultur transformierter *M. truncatula* Wurzeln

Um Wurzeln über Generationen steril zu kultivieren, wurden diese explantiert und *in vitro* auf M Medium kultiviert. Die Wurzeln wurden steril mit einem Skalpell abgetrennt und auf M+S Medium mit 400 mg/l Augmentin (zur Entfernung der Agrobakterien) bei 27 °C und Dunkelheit kultiviert. Die Antibiotikakonzentration wurde nach und nach verringert, bis die Wurzeln schließlich ohne Antibiotika kultiviert werden konnten. Die Wurzeln wurden jeweils nach 6 – 8 w auf neues Medium umgesetzt (Abb. 5.4 A).

### 5.3.5 *In vitro* Kultur Ri-transformierter *D. carota* Wurzeln

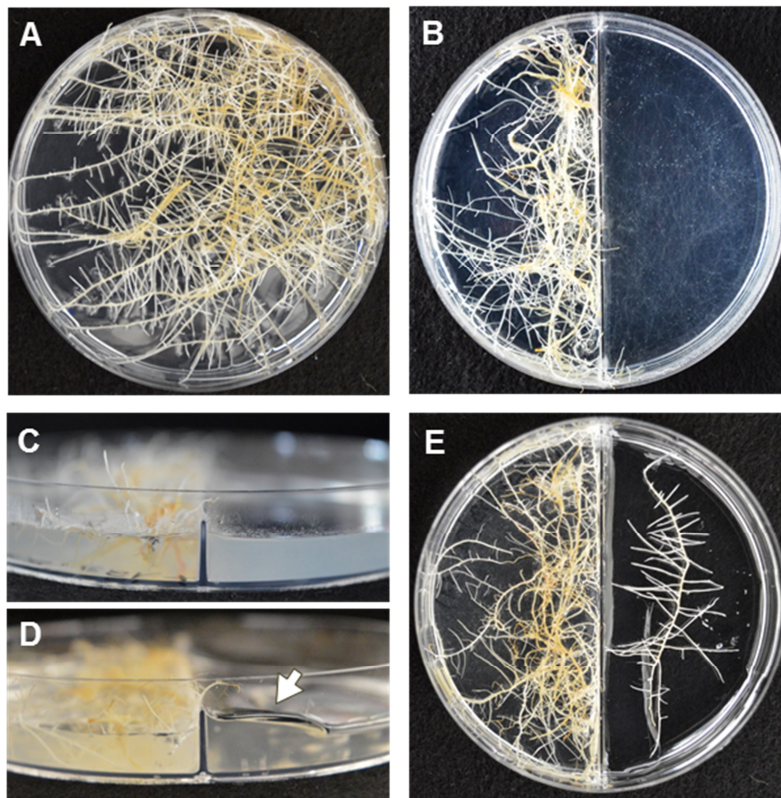
Um *R. irregularis* als monaxenische Kultur mit *D. carota* als Wirtspflanze zu kultivieren, wurden Ri-transformierte *D. carota* Wurzeln auf M+S Medium bei 27 °C im Dunkeln kultiviert. Diese wurden nach 8 w auf frisches M+S Medium gesetzt.

### 5.3.6 Mykorrhizierung von *M. truncatula* Wurzelkulturen

Für die Kolonisierung von Ri-transformierten *M. truncatula* Wurzelkulturen mit *R. irregularis* wurde ein bikompartimentales Petrischalensystem verwendet (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Eine Seite enthielt M Medium mit Saccharose (+S), die andere Seite M Medium ohne Saccharose (-S). Auf die M+S Medium Seite wurden entlang der Trennwand Ri-transformierte und mit *R. irregularis* kolonisierte *D. carota* Wurzeln gelegt. Die Petrischale wurde dann mit Parafilm versiegelt und für etwa 8 w bei 27 °C im Dunkeln inkubiert (Abb. 5.4 B, C). Die Saccharose des M Mediums diente den Karottenwurzeln als Kohlenstoffquelle. Die fehlende Saccharose auf der M-S Seite verhinderte das Wurzelwachstum in diesem Kompartiment weitestgehend. Die *R. irregularis* Hyphen, die ihren Kohlenstoff von den Karottenwurzeln beziehen, breiteten sich unabhängig von der Saccharoseverteilung auf beiden Halbplattenseiten aus. Sobald auf der M-S Seite der Petrischale genügend Pilzhyphen vorhanden waren, eigneten sich die Petrischalen zur Mykorrhizierung von *M. truncatula* Wurzeln. Das M-S Medium wurde aus der Halbseite der Petrischale entfernt. Anschließend wurde diese Seite zur Hälfte mit M+S- $\frac{1}{2}$ P Medium aufgefüllt, welches in seiner Phosphatkonzentration nur die Hälfte von normalem M+S Medium entsprach (17,5  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Auf diese Mediumsschicht wurde ein steriles halbkreisförmiges Stück Cellophan aufgelegt. Auf die Folie wurde eine dünne Schicht und zur Trennwand hin eine Schwelle aus halbhosphathaltigem M+S Medium gegossen (Abb. 5.4 D). Diese Schwelle



diente den Pilzhyphen dazu einfacher auf diese Seite der Petrischale zu wachsen. Die Platten wurden bei 27 °C in Dunkelheit inkubiert. Sobald einige Hyphen das neu gegossene Medium bewachsen hatten, dies dauerte etwa 7 d, wurden Ri-transformierte *M. truncatula* Wurzeln in dieses Kompartiment gelegt (Abb 5.4 E).



**Abbildung 5.4 Kultivierung und Mykorrhizierung von *M. truncatula* Wurzelkulturen.** (A) *M. truncatula* Wurzelkultur nach 4 w Kultivierung auf M Medium. (B, C) Zur Mykorrhizierung wurden *D. carota* Wurzelkulturen, kolonisiert mit *R. irregularis*, in einem bi-kompartimentalen Plattensystem kultiviert (links). Der AM-Pilz kolonisiert das Kompartiment ohne Zucker, (feines Hyphennetzwerk rechts). (D) Zur Mykorrhizierung wurde das M-S durch neues M+S-1/2P Medium ersetzt, eine Schwellenlinie (Pfeil) erleichtert dem Pilz eine erneute Kolonisierung dieser Seite. (E) Zur Mykorrhizierung wurde die gewünschte Wurzel auf die frische Seite (rechts) gelegt.

Das Cellophan diente dazu, den Raum einzuengen, in dem sich die *M. truncatula* Wurzeln befanden und in den die Pilzhyphen hineinwuchsen, sodass die Mykorrhizierungseffizienz erhöht wurde. Der Phosphatmangel sollte eine Symbiose stimulieren. Neben Linien, welche mit dem jeweiligen Leervektor transformiert waren, wurden auch nicht mykorrhizierte Wurzeln als Kontrollen verwendet. Diese sollten Änderungen anzeigen, welche durch das phosphatarmer Medium hervorgerufen werden konnten. Dazu wurden Wurzeln der gleichen Linien im gleichen Zeitraum auf Vollplatten mit halbphosphathaltigem M+S Medium kultiviert und gemeinsam mit den mykorrhizierten Proben geerntet. Die Petrischalen wurden bei 27 °C im Dunkeln inkubiert.

### 5.3.7 Quantifizierung des Mykorrhizierungsgrades

Die Quantifizierung der pilzlichen Kolonisierung wurde mit dem Programm MycoCalc (Trouvelot *et al.*, 1986) durchgeführt. Hierfür wurden die folgenden Parameter verwendet: F% (Frequenz = Dichte der Mykorrhizierung im Wurzelsystem), M% (Intensität der Mykorrhizierung im Wurzelsystem), m% (Intensität der Mykorrhizierung in den Wurzelfragmenten), A% (Abundanz der Arbuskeln im Wurzelsystem), a% (Abundanz der Arbuskeln in mykorrhizierten Wurzelfragmenten), I% (Abundanz der intraradikalen

Hyphen im Wurzelsystem) und  $i\%$  (Abundanz der intraradikalen Hyphen in mykorrhizierten Wurzelfragmenten). Bei der Quantifizierung der Arbuskelabundanz wurde zwischen reifen Arbuskeln (mature arbuscules =  $ma\%$ ) und unreifen, deformierten Arbuskeln (distorted arbuscules =  $da\%$ ) in mykorrhizierten Wurzelfragmenten unterschieden. (<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalcprg/download.html>).

### 5.3.8 Isolierung von *R. irregularis* Sporen

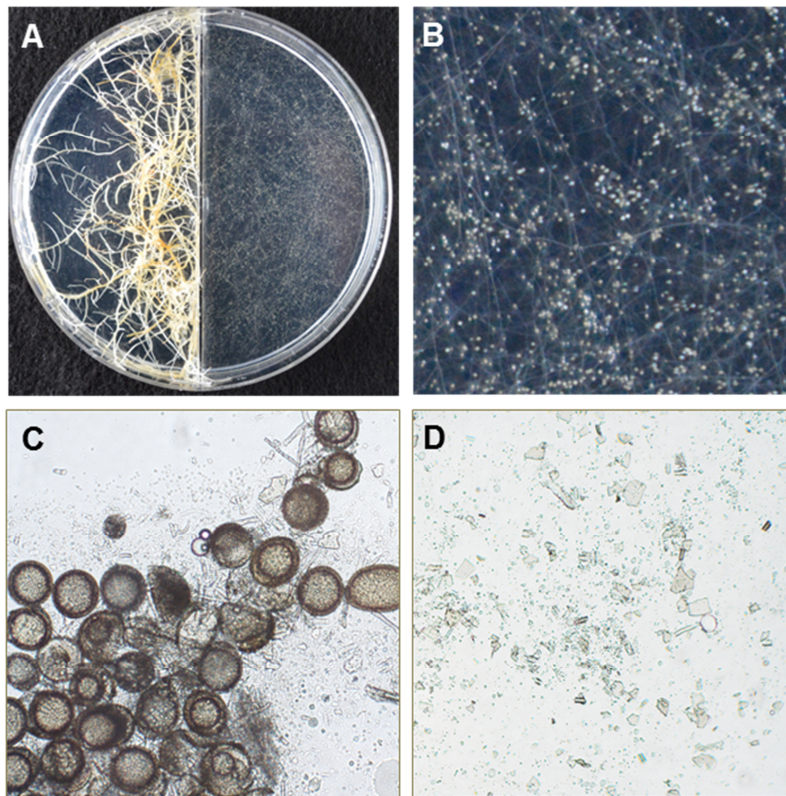
Die Sporen wurden aus den Hyphenkompartimenten des Bikompartimentsystems isoliert (Abb. 5.5 A, B). Hierfür wurden die Kompartimente gesammelt und bei 4 °C gelagert. Aus dem Festmedium wurden mit Pinzetten vorhandene Wurzeln entfernt. Anschließend wurde das Phytigel in dem dreifachen Volumen Zitronensäurepuffer durch mehrstündiges Rühren bei RT gelöst. Die Sporen wurden mit einem Siebsystem mit kleiner werdender Maschenweite (1 mm, 125 µm und 40 µm) und Leitungswasser isoliert, anschließend auf Filterpapier getrocknet und als 400 mg Aliquote in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 5.3.9 Herstellung eines *R. irregularis* Sporenextraktes

400 mg Aliquote isolierter Sporen wurden mit Hilfe der Schwingmühle und flüssigem Stickstoff mit einer Frequenz von 30/s 5x 1 min gemahlen (Abb. 5.5 C, D). Für eine Behandlung von *M. truncatula* Pflänzchen wurde die Sporensuspension mit  $dH_2O$  auf 2 ml aufgefüllt und durch Vortexen gemischt. Die entstandene Suspension wurde als Sporenextrakt (SE) bezeichnet.

Um eine Auftrennung des SEs zu erreichen wurde dieser bei 4 °C und 13.000 rpm 3 min zentrifugiert. Die entstehenden Phasen (obere Phase, Überstand und Pellet) wurden getrennt gesammelt. Bis zur Behandlung wurden die Extrakte bei -20 °C gelagert.





**Abbildung 5.5 Isolierung und Herstellung von *R. irregularis* Sporenextrakt.** (A) Halbplatte stark bewachsen mit *R. irregularis* assoziiert mit einer *D. carota* Wurzelkultur. (B) Eine Nahaufnahme zeigt die gebildeten Sporen, welche sich in dem wurzelfreien Kompartiment gebildet haben. (C) Mikroskopische Aufnahme der isolierten Sporen. (D) Mikroskopische Aufnahme des gemahlenden Sporenextraktes.

### 5.3.10 Behandlungen von *M. truncatula*

- **Behandlung von *M. truncatula* Pflanzen auf Platte**

Um das Wachstumsverhalten von jungen *M. truncatula* WT Pflanzen unter Einfluss von GA<sub>3</sub> und dem GA-Inhibitor PAC zu analysieren, wurden diese als Keimlinge auf große Schrägagarplatten mit modifiziertem Fåhræus Medium gesetzt. Das Medium enthielt 10<sup>-6</sup> M GA<sub>3</sub>, 10<sup>-6</sup> M PAC bzw. 0,001 % EtOH (Mock). Pro Behandlung wurden 20 Pflanzen analysiert, hierfür wurden je 5 Platten mit jeweils 4 Pflanzen besetzt. Die Pflanzen wurden bei 25 °C inkubiert (Tag-Nacht-Rhythmus 16 h/ 8 h). Das Wachstum der Pflanzen wurde fotografisch dokumentiert. Nach 15 d wurden die Pflanzen geerntet und die Spross- und Wurzellänge gemessen sowie die Anzahl der Seitenwurzeln vermerkt. Die Wurzeln wurden außerdem für die morphometrische Analyse der Kortezellen am Mikroskop verwendet.

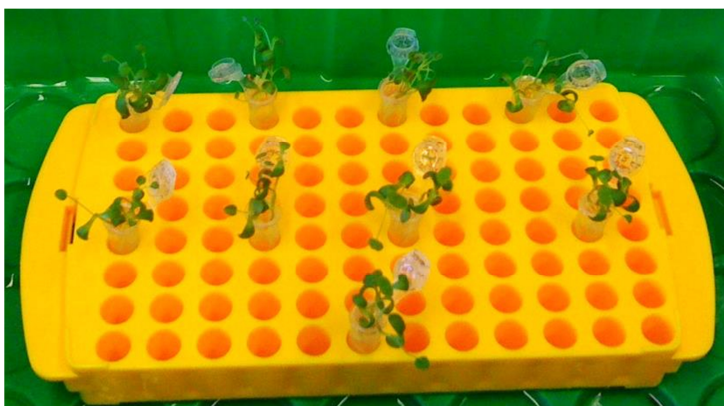
- **Behandlung von *M. truncatula* Wildtyp Pflanzen im Topf**

Um das Wachstumsverhalten von adulten *M. truncatula* Wildtyp Pflanzen unter Einfluss von GA<sub>3</sub> und dem GA-Inhibitor PAC zu analysieren, wurden diese 4 w lang auf Fåhræus-Schrägagarplatten bei 25 °C angezogen (Tag-Nacht-Rhythmus 16 h/ 8 h). Anschließend wurden die Pflanzen in 50 ml Kultivierungsgefäße, welche vier Löcher am Boden besitzen eingepflanzt. Die Gefäße wurden mit Alufolie ummantelt und mit sterilen Steinchen, als auch einer sterilen Mischung aus Sand und Kies im Verhältnis 4:1 befüllt. Jeweils ein Pflänzchen wurde in ein Gefäß eingepflanzt und bei 25 °C und einem Tag-Nacht-

Rhythmus von 16 h/ 8 h inkubiert. Um die Pflänzchen vor Austrocknung zu schützen wurde eine durchsichtige Folie um die Pflänzchen gespannt, welche nach oben geöffnet war. Je Behandlung wurden 20 Pflanzen analysiert. Die Pflänzchen wurden 2x pro Woche mit je 5 ml 0,5x Long Ashton Nährlösung (Hewitt, 1966), welche mit der jeweiligen Substanz supplementiert war, gegossen ( $10^{-6}$  M GA<sub>3</sub>,  $10^{-6}$  M PAC bzw. 0,001% EtOH (Mock)). Zudem wurde dH<sub>2</sub>O nach Bedarf gegossen. Das Wachstum der Pflanzen wurde im Topf fotografisch dokumentiert. Nach 5 w wurden die Pflanzen geerntet. Nachdem das Substrat von den Wurzeln abgewaschen wurde, konnten die Pflanzen in einer Schale mit Wasser fotografiert werden. Für die statistische Wachstumsanalyse wurde die Sprosslänge gemessen, die Anzahl der Sprosstriebe gezählt sowie die Längen und Anzahl der Internodien vermerkt. Desweiteren wurde die Wurzellänge gemessen und die primären sowie sekundären Seitenwurzeln gezählt. Zudem wurde das Gewicht des Sprosses und der Wurzel ermittelt.

- **Behandlungen von *M. truncatula* Pflänzchen in Flüssigmedium**

Um zu untersuchen wie sich die Expression spezifischer Gene durch eine bestimmte exogene Behandlung verändert, wurden 10 d alte Pflänzchen in Flüssigmedium behandelt. Zur Vorbereitung der Behandlung wurden *M. truncatula* Wildtyp Keimlinge auf modifizierte Fähræus-Schrägagarplatten gesetzt und bei 25 °C mit einem 16 h Licht und 8 h Dunkelheit Zyklus inkubiert. Der Wurzelbereich wurde durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Nach 10 d konnte die eigentliche Behandlung durchgeführt werden. Hierfür wurden in der Regel jeweils vier *M. truncatula* Pflänzchen in 2 ml Reaktionsgefäßen platziert und mit 2 ml der gewünschten Substanz inkubiert (Abb. 5.6).



**Abbildung 5.6** Behandlung von *M. truncatula* Pflänzchen. Jeweils 4 10 d alte *M. truncatula* Pflänzchen wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß platziert und mit der gewünschten Substanz inkubiert. Die Behandlung fand in kleinen Treibhäusern statt.

Für die Inkubation wurden die Pflänzchen in kleine Treibhäusern gestellt, welche für ausreichende Feuchtigkeit mit dH<sub>2</sub>O besprüht wurden. Die Behandlung fand bei 25 °C im Pflanzeninkubator mit einem Zyklus von 16 h Licht ( $62,5 \mu\text{E}/\text{sm}^2$ ) und 8 h Dunkelheit statt. Bei einer Inkubation von 15 min, 30 min oder 6 h, wurden die Pflanzen konstant in Licht gehalten. Nach der Behandlung wurden die Wurzeln abgeschnitten, kurz abgetrocknet

und bis zur RNA-Extraktion bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Behandlung mit SE wurden jeweils 250 µl des SEs oder der jeweiligen Phase mit 1750 µl M Medium (M-S 20 µM ) vermischt. Zur Inkubation mit Hormonen und anderen Substanzen, wurden diese gelöst und in gewünschter Konzentration dem Medium zugesetzt. Zur jeder Behandlung wurden Mock-Kontrollen mitgeführt.

### 5.3.11 Behandlung von *M. truncatula* Wurzelkulturen

- **GA<sub>3</sub>- und PAC-Behandlung**

Um die Auswirkung einer exogenen Behandlung mit GA<sub>3</sub> oder PAC auf *M. truncatula* Wurzelkulturen zu untersuchen, wurden diese auf M+S Medium angezogen. Nach etwa 2 w wurden die frisch angewachsenen Wurzeln auf neues Medium umgesetzt, welches mit 10<sup>-6</sup> M GA<sub>3</sub>, 10<sup>-6</sup> M PAC bzw. Mock (0,001 % EtOH) supplementiert wurde. Es wurden jeweils drei Insertionslinien des Leervektors und MIG1 OE verwendet. Je Behandlung und Insertionslinie wurden drei Replikate angesetzt.

- **Phosphatbehandlung**

Um zu testen ob die Expression von Genen durch Phosphat beeinflusst wird, wurden Wurzelkulturen mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen behandelt. Hierzu wurden Wurzeln auf Platten mit M+S Medium angezogen, diese Platten hatten die übliche Phosphatkonzentration von 35 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Nach etwa 4 w wurde die Behandlung in 1x M+S Flüssigmedium durchgeführt. Hierfür wurden je 70 ml Medium inklusive 1 % Saccharose mit 0 M, 35 µM oder 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> versetzt. Die Behandlung fand in Erlenmeyerkolben bei 27 °C in Dunkelheit und 90 rpm statt. Nach 48 h wurden die Wurzeln geerntet, indem sie kurz auf Filterpapier getrocknet und anschließend bei -80 °C aufbewahrt wurden.

### 5.3.12 Infiltration von *N. benthamiana*

Um Proteine heterolog und transient in *N. benthamiana* zu exprimieren wurden etwa 5 w alte Pflanzen durch eine Infiltrationsmethode mit *A. tumefaciens* GV3101 transformiert.

Die Bakterien wurden frisch auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Am Tag vor der Infiltration wurden die *A. tumefaciens* Stämme mit den gewünschten Plasmiden in LB Medium inokuliert und bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Zusätzlich wurde der *A. tumefaciens* Stamm K5A018, welcher das Plasmid p19 enthält angeimpft (Voinnet *et al.*, 2003). Das p19 Protein aus dem *tomato bushy stunt virus* wirkt als Suppressor von pflanzlichem *gene silencing* und verbessert so die Expression der gewünschten Gene. Sobald die Zellen die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten (OD<sub>600</sub> 0,4 – 0,8), wurden diese geerntet. Dazu wurde die Kultur in 50 ml Röhren überführt und 15 min bei 4.000 rpm und RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in Infiltrationslösung aufgenommen und so eine OD<sub>600</sub> von 0,5 (Lokalisation), 0,8 (BiFC) oder 1 (Expressionstest) eingestellt. Die Zellen wurden für 2 – 3 h bei RT inkubiert und an-

schließlich im Verhältnis 1:1 (Lokalisation, Expressionstest) bzw. 1:1:1 (BiFC) gemischt. Die Tabakpflanzen wurden in der Zwischenzeit gut gewässert um die Stomataöffnung zu gewährleisten und die zu infiltrierenden Blätter markiert. Für die Infiltration wurde eine 2 ml Spritze ohne Nadel verwendet. Die Bakteriensuspension wurde mit leichtem Druck in die Unterseite von 3 Blättern pro Pflanze infiltriert. Die Pflanzen wurden anschließend für eine effiziente Transformation bei 22 °C inkubiert. Nach 2 - 3 d konnten die Blätter unter dem Mikroskop analysiert bzw. geerntet werden.

### 5.3.13 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Um die Interaktion von Proteinen zu testen wurde die Methode der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation angewandt. Die zu testenden Proteine wurden N-terminal mit dem N-terminalen (N-YFP) bzw. C-terminalen Teil des YFPs (C-YFP) fusioniert. Die Infiltration von *N. benthamiana* Blättern wurde wie in 5.3.12 beschrieben durchgeführt. Für jede zu testende Kombination wurden pro Durchgang drei Blätter einer Pflanze infiltriert. Jede Kombination wurde mindestens zweimal wiederholt und jeweils in beide Richtungen getestet. Nach 48 – 60 h Inkubation bei 22 °C wurden je Blatt drei Ausschnitte mit Hilfe des Konfokalmikroskop ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde unter anderem AtbZip63 verwendet welches Homodimere bildet (Walter *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden aus der Literatur bekannte Interaktionen zwischen den zu testenden GRAS-Proteinen als Kontrollen verwendet (Tabelle 5.4). Als Negativkontrolle wurden die Proteine mit dem jeweiligen Leervektor infiltriert.

**Tabelle 5.4 Auflistung der Kontrollen für die BiFC.**

N-YFP Fusion	C-YFP Fusion	Referenz
<b>Positivkontrollen</b>		
AtbZIP63	AtbZIP63	Walter <i>et al.</i> (2004)
MtRAM1	MtRAD1	Xue <i>et al.</i> (2015) (Lj)
MtRAD1	MtRAM1	Park <i>et al.</i> (2015) (Mt)
MtNSP2	MtRAD1	
MtRAD1	MtNSP2	Xue <i>et al.</i> (2015) (Lj)
MtRAM1	MtRAM1	
MtNSP1	MtNSP1	
MtNSP2	MtNSP2	Hirsch <i>et al.</i> (2009)
MtNSP1	MtNSP2	
MtNSP2	MtNSP1	
MtRAM1	MtNSP2	Gobbato <i>et al.</i> (2012)
MtNSP2	MtRAM1	
<b>Negativkontrollen</b>		
EV	X	
X	EV	-



## 5.4 Biochemische Methoden

### 5.4.1 Proteinextraktion aus *N. benthamiana* Blättern

Zur Überprüfung der heterologen Expression von GFP-fusionierten Proteinen in *N. benthamiana* Blättern, wurden diese 3 d nach Infiltration geerntet. Hierzu wurden jeweils vier Blattscheiben mit einem 15 ml-Falkon ausgestanzt und in einem 2 ml- Gefäß sofort in Stickstoff eingefroren. Die Proteine wurden durch 30 s Mörsern des gefrorenen Blattmaterials mit einem Pistill und anschließender Zugabe von 500 µl Proteinextraktionspuffer extrahiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 4 °C und 13.200 rpm 10 min zentrifugiert um Zelltrümmer von den gelösten Proteinen im Überstand zu trennen. Der Überstand wurde mit der geeigneten Menge 4x SDS-Ladepuffer gemischt, 10 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend einer Immunodetektion unterzogen.

### 5.4.2 SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Dabei wurden Proteinextrakte mit 1x SDS-Laufpuffer versetzt und bei 95 °C 10 min aufgeköcht und anschließend in ein SDS-Gel geladen. Pro Tasche (1 mm Dicke) wurden 25 µl Probe bzw. 6 µl Color Protein Standard (NEB) geladen. Bei Fusionsproteinen mit einer Größe von etwa 90 kDa wurde ein 5 % Sammelgel und ein 8 % Trenngel verwendet. Als Laufpuffer wurde der 1x SDS-Laufpuffer verwendet. Die Proteine wurden bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte bei 60 V und anschließend bei 120 V aufgetrennt. Zur Überprüfung der Proteinextraktion wurde ein Gel für 30 min schwenkend in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel 1 h - ÜN in Entfärbelösung entfärbt, bis der Hintergrund durchsichtig erschien.

SDS-Gele wurden auf Nitrocellulose Membran in 1x Blotting Puffer bei konstanten 100 V (350 mA) mit Kühlung bei RT geblottet. Die Übertragung der Proteine wurde anschließend durch eine Ponceau S Färbung überprüft. Hierfür wurde die Membran 2 x in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Ponceau S Färbelösung für 20 min schwenkend inkubiert. Nun wurde der Hintergrund mit dH<sub>2</sub>O entfärbt und die Proteine erschienen als rote Bänder auf der Membran. Ein kurzes Schwenken in 0,1 M NaOH entfärbte die Membran, nach erneutem Waschen in dH<sub>2</sub>O konnte die Immunodetektion begonnen werden.

Die freien Bindestellen auf der Membran wurden in 1x PBST mit 10 % (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei RT blockiert. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBST für 5 min wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert. Hierfür wurde Anti-GFP Antikörper (Kaninchen) in 1x PBST mit 5 % (w/v) Magermilchpulver 1:4000 verdünnt und die Membran ÜN schwenkend bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x 10 min in PBST gewaschen. Der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper Anti-Kaninchen (Ziege) wurde in 1x PBST mit 5 % Magermilch für 1 h bei RT auf die Membran gegeben. Nach

erneutem dreimaligen waschen für je 10 min mit 1x PBST konnten die Signale auf der Membran detektiert werden. Hierfür wurde die Chemilumineszenzlösung auf die Membran pipettiert, diese in Klarsichtfolie eingepackt und im Dunkeln 2 min inkubiert. Anschließend konnte die Membran im digitalen Chemilumineszenz-Detektor angeschaut werden.

### 5.4.3 Hefe-Zwei-Hybrid (Y2H) System

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Hefe-Zwei-Hybrid System verwendet (Fields und Song, 1989). Diese Methode basiert auf dem Prinzip des Transkriptionsfaktors GAL4 aus der Hefe *S. cerevisiae*, welcher sich in die DNA-Bindedomäne (DBD) und Aktivierungsdomäne (AD) untergliedert. Die Fusion dieser Domänen an die zu testenden Zielgene und deren Cotransformation in den Hefestamm AH109 ermöglicht es eine Interaktion dieser Proteine durch die Aktivierung von Reporter genen sichtbar zu machen. Die interagierenden Proteine bringen die beiden GAL4-Domänen in räumliche Nähe zueinander. Das so funktionsfähige GAL4-Protein ist fähig Reporter gene, wie die Auxotrophiemarker *ADE2* (Adenin-Synthese), *HIS3* (Histidin-Synthese) und die Farbreaktion-auslösenden Gene *lacZ* ( $\beta$ -Galactosidase) und *MEL1* ( $\alpha$ -Galactosidase) zu aktivieren. Ein Wachstum der Hefezellen auf Selektionsmedium zeigt demnach ob eine Interaktion der Proteine stattfindet.

Direkte Interaktionstests wurden durch Cotransformation der zu testenden Konstrukte in den Hefestamm AH109 durchgeführt. Transformierte Kolonien wurden zuerst auf SD-LW Platten und anschließend auf SD-LWHA Selektionsplatten inkubiert. Um die Stärke einer Proteininteraktion zu untersuchen wurden Spotting-Tests durchgeführt. Hierfür wurden die transformierten Hefekolonien (5.2.6) jeweils in 500  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O resuspendiert und 10  $\mu$ l der Zellsuspension unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 auf SD/LW und SD/LWHA Platten aufgetropft. Die Platten wurden bei 30 °C für 3-5 d inkubiert.

Für die Untersuchung der GA-Rezeptoren wurde dem Selektionsmedium 0,1 mM GA<sub>3</sub> (Stocklösung 0,1 M in EtOH) zugefügt, um eine mögliche Interaktion zu stimulieren.

### 5.4.4 Transaktivierungstest in Hefe

Für die Untersuchung einer möglichen Transaktivierungsaktivität von Proteinen wurde das zu untersuchende Protein an die GAL4 DNA-Bindedomäne gekoppelt. Bei einer vorhandenen TA, findet eine Aktivierung der Reporter gene statt, obwohl die GAL4 Aktivierungsdomäne nicht vorhanden ist. Dementsprechend findet ein Wachstum auf Selektionsmedium SD-WHA statt. Um die Stärke der Transaktivierungsaktivität zu untersuchen wurden Spotting-Tests durchgeführt. Hierfür wurde die transformierten Hefekolonien (siehe 5.2.6) wie bei Interaktionstests in 500  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O resuspendiert und 10  $\mu$ l der Zellsuspension unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 auf SD/W und SD/WHA Platten aufgetropft. Die Platten wurden bei 30°C für 3-5 d inkubiert.



## 5.5 Färbungen und Mikroskopie

### 5.5.1 GUS-Färbung

Um die Promotoraktivität von spezifischen Genen zu analysieren, wurden die Promotoren vor das  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) codierende Reporter gen kloniert. Die Expression des GUS-Gens kann durch die sogenannte GUS-Färbung sichtbar gemacht werden. GUS spaltet Glucuroniside hydrolytisch. Bei der Färbemethode verwendet man das Natriumsalz X-GlcA (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure) als Substrat, welches in die farblose Glucuronsäure und Chloro-Bromindigo gespalten wird. Die Oxidation von diesem führt zur Dimerisierung und Präzipitation des blauen, unlöslichen Dichloro-Dibromindigo. Für die Färbung von *M. truncatula* Wurzeln wurden diese 30 min in Fixierungspuffer inkubiert. Anschließend wurden diese dreimal mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen und dann in der Färbelösung ÜN bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wurzeln dreimal mit Waschpuffer gewaschen und in 50 % EtOH gelagert. Um pilzliche Strukturen anzufärben kann eine Gegenfärbung mit WGA-FITC durchgeführt werden.

### 5.5.2 FITC-WGA Färbung

Die FITC-WGA Färbung dient dem Anfärben von pilzlichen Strukturen sowohl außerhalb als auch innerhalb des Pflanzengewebes (abgewandelt nach Meyberg, 1988). Das Lektin WGA bindet dabei spezifisch an Chitin, das gekoppelte Flouorchrom FITC dient der Visualisierung der Pilzstrukturen. FITC besitzt sein Anregungsmaximum bei 492 nm und emittiert maximal bei 520 nm. Mykorrhizierte Wurzeln von *M. truncatula* wurden zur Klärung mit 10 % (w/v) KOH für 30 - 60 min bei 80 °C behandelt. Falls nötig wurde die KOH-Lösung gewechselt. Anschließend wurden die Wurzeln dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Wurzeln wurden für 5 min in 1 % HCl angesäuert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1x PBS wurden die Wurzeln mit der Färbelösung bedeckt. Die Färbelösung bestand aus 0,02 % Tween20 und 10  $\mu\text{g/ml}$  FITC-WGA in 1x PBS. Nach einer Inkubation in Dunkelheit über Nacht bei 4 °C, wurden die Wurzeln vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Zur Mikroskopie wurden die Wurzeln in 1x PBS auf Objektträger platziert. Gefärbte Wurzeln wurden bei 4 °C in 1x PBS und Dunkelheit aufbewahrt.

### 5.5.3 Tinte- Essig Färbung

Die Tinte-Essig Färbung (Vierheilig *et al.*, 1998) dient dem Anfärben von pilzlichen Strukturen sowohl außerhalb als auch innerhalb des Pflanzengewebes. Mykorrhizierte Wurzeln von *M. truncatula* wurden zur Klärung mit 10% (w/v) KOH für 30 – 60 min bei 80 °C behandelt. Falls nötig wurde die KOH-Lösung gewechselt. Wenn die Wurzeln durchsichtig waren, wurden sie mehrmals mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen. Die Färbung fand für 3 min mit 5 % (w/v) Tinte (Pelikan, Brillant Schwarz,) in Haushaltseessig statt. Für die Entfärbung der

pflanzlichen Strukturen wurden die Wurzeln in 10 % Essig und unter leichtem Schwenken ÜN inkubiert. Für die Auswertung des Mykorrhizierungsgrades wurden die Wurzeln in 100 % Glycerol auf Objektträgern plaziert und mit durchsichtigem Nagellack versiegelt.

### 5.5.4 Herstellungen von Wurzelquerschnitten und Toluidinblau O-Färbung

Für die Herstellung von Wurzelquerschnitten wurden diese nach Lützelschwab fixiert und nach dem Wasserentzug in Paraplast eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem mechanischen Mikrotom angefertigt, mit Toluidinblau O gefärbt und mit Entellan® Dauerpräparate hergestellt.

Die Wurzeln wurden in Fixierlösung in 5 mm lange Segmente geschnitten und direkt in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Fixierlösung gelegt. Dünne Wurzelsegmente wurden 30 min, dickere bis zu 1 h inkubiert. Die Fixierlösung wurde mit Waschlösung 3x jeweils für 10 min ausgewaschen. Um die Wurzeln zu entwässern wurde eine EtOH-Reihe durchgeführt. Jeder Schritt wurde 30 min inkubiert, die folgenden Konzentrationen wurden verwendet: 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 % und 100 % EtOH. Für die Einbettung in Paraffin wurden die Wurzeln zunächst ÜN in 100 % Xylol bei RT inkubiert. Das Xylol wurde 2x gewechselt und jeweils für 4 h inkubiert. Für die Einbettung in Paraplast® wurde das Xylol schrittweise durch verflüssigtes Paraffin (auf 70 °C erhitzt) ersetzt. Hierzu wurde eine 1:1 Xylol:Paraffin Mischung hergestellt und ein Teil des Xylols in den 2 ml Reaktionsgefäßen ersetzt. Diese Mischung wurde 1 d bei 70 °C inkubiert. Die Lösung wurde durch eine 1:2 Xylol:Paraffin Mischung ausgetauscht und ÜN bei 70 °C inkubiert. Nun wurde erneut ein Teil der Lösung durch Paraffin ersetzt, damit das restliche Xylol verdampfen konnte, wurde ÜN bei 70 °C mit offenem Deckel inkubiert. Das Paraffin wurde nun durch reines Paraffin ersetzt. Die Einbettung in Silikonkautschukförmchen wurde mit Paraffin vorgenommen und ÜN bei RT getrocknet. Die eingebetteten Proben konnten bei 4 °C aufbewahrt werden.

Um Querschnitte der Wurzeln anzufertigen wurde ein mechanisches Mikrotom mit einem C-Stahlmesser von Jung verwendet. Die Paraffinblöckchen wurden auf Holzblöckchen montiert und getrimmt. Als Schnittbreite wurden 10 µm gewählt, Die Schnitte wurden auf handwarme Objektträger, welche dünn mit Eiweißglycerin und einem Tropfen dH<sub>2</sub>O beschichtet waren, gelegt. Nach dem die Objektträger ÜN getrocknet waren konnte die Entparaffinierung stattfinden. Hierzu wurden die Objektträger jeweils 5 min bei RT nacheinander in Glasküvetten mit den folgenden Lösungen getaucht: Xylol, Xylol, Isopropanol, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 50 % EtOH, 30 % EtOH, dH<sub>2</sub>O, Toluidinblau O-Färbelösung (Inkubation für 30 min), dH<sub>2</sub>O, Isopropanol, Xylol, Xylol. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Querschnitte mit Entellan® versiegelt und ÜN getrocknet.

### 5.5.5 Mikroskopie

Ungefärbte Wurzeln von *M. truncatula* sowie Wurzeln welche mittels Tinte-Essig-Methode gefärbt waren, wurden mit einem Axio Imager Z1 Mikroskop (Zeiss) oder mit einem Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop im Hellfeldkanal oder im DIC-Kanal analysiert.

Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 durchgeführt.

WGA-FITC gefärbte Wurzeln wurden bei 488 nm mit Hilfe eines Argon Lasers angeregt, die Emission wurde von 505 - 520 nm aufgenommen.

Für die Analyse von heterolog exprimiertem eGFP als Fusionskonstrukt in infiltrierten *N. benthamiana* Blättern wurden die epidermalen Zellen mit einer Wellenlänge von 488 nm (Argon Laser) angeregt, die Emission wurde von 505 – 520 nm aufgenommen. Freies DsRED wurde mit 554 nm angeregt (Argon Laser), die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 610 – 650 nm aufgezeichnet. Bei der Kombination eGFP und DsRED wurde aufgrund der Überlagerung der Spektren eine sequentielle Aufnahme vorgenommen.

Für BiFC Analysen wurde durch einen Argon Laser bei einer Wellenlänge von 514 nm angeregt. Die Emission wurde von 530 – 605 nm aufgenommen.

Es wurden Objektive der Vergrößerung 5x, 10x, 20x und 63x (mit Wasser) verwendet.

### 5.5.6 Morphometrische Analyse von Wurzeln

Für die morphometrische Analyse von Wurzeldurchmessern sowie Zellbreite und –länge wurden mikroskopische Aufnahmen von zufälligen Ausschnitten gemacht. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein Abstand zu Wurzelspitzen und Seitenwurzeln besteht. Messungen wurden mit dem Softwareprogramm Fiji durchgeführt. Die Parameter wurden mit dem Mann-Whitney U Test auf signifikante Unterschiede getestet.

## 5.6 In silico Analyse

### 5.6.1 Statistische Tests

Zur Überprüfung von statistischer Signifikanz wurde der Zweistichproben-t-Test durchgeführt (Quantifizierung der Mykorrhizierung, Expressionsniveaus per qPCR). Bei Stichprobenumfängen, welche keine Normalverteilung aufweisen, wurde der Mann-Whitney U Test angewandt (Morphometrische Analyse der Wurzeln und Zellen). Die Größe des Stichprobenumfangs (unabhängige biologische Replikate) wird mit n angezeigt. Statistische Signifikanz wurde bei einer Verwerfung der Null-Hypothese angenommen. Das Signifikanzniveau wurde in der Regel mit Sternchen dargestellt (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). Bei komplexeren Vergleichen mehrerer Stichprobenumfänge wurde die Signifikanz mit Kennbuchstaben dargestellt. Gruppen mit unterschiedlichen Kennbuchstaben (a, b,...) unterscheiden sich auf dem 5 %-Niveau.

### 5.6.2 Verwendete Software und *in silico* Analyse

Die Identifikation von homologen Proteinen und Suche nach Sequenzen erfolgte durch das NCBI BLAST Werkzeug (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Alignments wurden mit Jalview (<http://www.jalview.org/download.html>) oder direkt unter Verwendung des Clustal Omega Web Service (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011) bzw. des in MEGA 7 integrierten Clustal W erstellt.

Phylogenetische Analysen wurden im Anschluss eines Alignments mit Hilfe der MEGA6/7 Software (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura *et al.*, 2013) mit dem Neighbour-Joinin-Algorithmus, einem Bootstrap von 1000 und paarweiser Lückendeletion durchgeführt.

Zur Identifikation konservierter Domänen wurden Motif-Scan ([http://myhits.isbsib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isbsib.ch/cgi-bin/motif_scan)), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) und Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequenceBlock>) eingesetzt.

*M. truncatula* Sequenzen wurden in der *M. truncatula* Hapmap (<http://www.medicagohapmap.org/>), im DFCI Medicago Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) und im *M. truncatula* Genomprojekt des JCV Instituts (<http://jcv.org/medicago>) identifiziert und ihre Expression im *Medicago gene expression atlas* (MtGEA; <http://mtgea.noble.org>) (Benedito *et al.*, 2008) überprüft.

Sequenzen von *A. thaliana*, *S. lycopersicum* (Huang *et al.*, 2015) und *O. sativa* wurden aus den Datenbanken <https://www.arabidopsis.org>, <https://solgenomics.net> bzw. <http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml> bezogen.

Für die Bearbeitung von Sequenzen wurde die Software ApE (A plasmid Editor; <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) verwendet.

Chemilumineszenz bei der Immunodetektion wurde mit Hilfe der Chemi-Capt Software (Peqlab) analysiert.

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit den Softwareprogrammen LAS AF 2.7.3.9723 (Leica) und Zen 2.1 Blue Edition (Zeiss) durchgeführt. Für die Bearbeitung von Mikroskopiebildern sowie morphometrische Vermessungen von Wurzeln und Zellen diente die Software Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>).

qPCR-Analysen wurden mit der Bio Rad iQ5 Software Version 2.0 ausgewertet.

Die Vorhersage von Sekundärstrukturen des N-Terminus der MIG1-verwandten Proteine wurde mit Hilfe der folgenden 11 Webservern ausgewertet:

ProteinPredict (<https://www.predictprotein.org/>), Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), PSSpred (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/PSSpred/>), SABLE (<http://sable.cchmc.org/>), SCRATCH (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), Frag1D (<http://frag1d.bioshu.se/pred/>), Genesilico (<http://iimcb.genesilico.pl/>), APSSP2 (<http://www.imtech.res.in/raghava/apssp2/>), 1D (<http://bio-mine.ece.ualberta.ca/1D/1D.html>), YASPIN (<http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>).

Eine Helixstruktur wurde für eine bestimmte Aminosäure angenommen, falls mindestens 6 Vorhersagen übereinstimmten (> 50 %). Die Vorhersage von DNA-Bindestellen wurde mit PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) durchgeführt.

Die Vorhersage von intrinsisch ungeordneten Sequenzbereichen wurde mit PrDOS (Protein Disorder Prediction System; <http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>) mit einer falsch-positiven Rate von 0,5 % durchgeführt. Als Schwellenwert wurde der Wert 0,5 verwendet.

3D-Modellierungen der GRAS-Domäne von MIG1, MIG2 und MIG3 wurde anhand der atomaren Koordinaten und Strukturaktoren von OsSCL7 (Protein Datenbank RCSB, Eintrag 5HYZ) (Li *et al.*, 2016) und dem Programm USCF Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>) (Pettersen *et al.*, 2004) durchgeführt.

## 6 Literaturverzeichnis

**Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. und Harberd, N.P. (2006).** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311** (5757), 91-94.

**Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T. und Genschik, P. (2009).** Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Curr Biol* **19** (14), 1188-1193.

**Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X. und Harberd, N.P. (2007).** DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143** (3), 1163-1172.

**Akiyama, K., Matsuzaki, K. und Hayashi, H. (2005).** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435** (7043), 824-827.

**Al-Babili, S. und Bouwmeester, H.J. (2015).** Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu Rev Plant Biol* **66** 161-186.

**Alexander, T., Toth, R., Meier, R. und Weber, H.C. (1989).** Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to vesicular–arbuscular mycorrhizae in grasses. *Can J Bot* **67** (8), 2505-2513.

**Amor, B.B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D., Long, S.R., Denarie, J. und 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** (4), 495-506.

**Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E., Ajax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kaló, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Denarie, J. und Cook, D.R. (2004).** *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303** (5662), 1364-1367.

**Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gherardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Denarie, J., Rouge, P. und Gough, C. (2006).** The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* **142** (1), 265-279.

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

**Auriac, M.C. und Timmers, A.C. (2007).** Nodulation studies in the model legume *Medicago truncatula*: advantages of using the constitutive EF1 $\alpha$  promoter and limitations in detecting fluorescent reporter proteins in nodule tissues. *Mol Plant Microbe Interact* **20** (9), 1040-1047.

**Bago, B., Pfeffer, P.E. und Shachar-Hill, Y. (2000).** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol* **124** (3), 949-957.

**Bai, Y., Muller, D.B., Srinivas, G., Garrido-Oter, R., Potthoff, E., Rott, M., Dombrowski, N., Munch, P.C., Spaepen, S., Remus-Emsermann, M., Huttel, B., McHardy, A.C., Vorholt, J.A. und Schulze-Lefert, P. (2015).** Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature* **528** (7582), 364-369.

**Balestrini, R. und Bonfante, P. (2014).** Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism. *Front Plant Sci* **5** 237.

**Balestrini, R., Cosgrove, D.J. und Bonfante, P. (2005).** Differential location of alpha-expansin proteins during the accommodation of root cells to an arbuscular mycorrhizal fungus. *Planta* **220** (6), 889-899.

**Bapaume, L. und Reinhardt, D. (2012).** How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Front Plant Sci* **3** 223.

**Baskin, T.I. (2001).** On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* **215** (1-4), 150-171.

**Baskin, T.I. (2005).** Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21** 203-



222.

**Bécard, G. und Fortin, J.A. (1988).** Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* **108** 211-218.

**Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P.X., Tang, Y. und Udvardi, M.K. (2008).** A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **55** (3), 504-513.

**Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T. und Aeschbacher, R.A. (1993).** Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119** (1), 57-70.

**Berta, G., Trotta, A., Fusconi, A., Hooker, J.E., Munro, M., Atkinson, D., Giovannetti, M., Morini, S., Fortuna, P., Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V. und Gianinazzi, S. (1995).** Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiol* **15** (5), 281-293.

**Besserer, A., Becard, G., Jauneau, A., Roux, C. und Sejalón-Delmas, N. (2008).** GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiol* **148** (1), 402-413.

**Besserer, A., Becard, G., Roux, C. und Sejalón-Delmas, N. (2009).** Role of mitochondria in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to strigolactones. *Plant Signal Behav* **4** (1), 75-77.

**Besserer, A., Puech-Pages, V., Kiefer, P., Gomez-Roldán, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Becard, G. und Sejalón-Delmas, N. (2006).** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *Plos Biol* **4** (7), e226.

**Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C. und Barker, D.G. (2001).** *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* **14** (6), 695-700.

**Bolle, C. (2004).** The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218** (5), 683-692.

**Bolle, C. (2015).** Structure and evolution of plant GRAS family proteins. In *Plant transcription factors: evolutionary, structural and functional aspects*, D.H. Gonzalez, ed. (Academic Press), pp. 153-161.

**Bolle, C., Koncz, C. und Chua, N.H. (2000).** PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* **14** (10), 1269-1278.

**Bonfante, P. (2001).** At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton (Berlin: Springer).

**Bonfante, P. und Genre, A. (2008).** Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends Plant Sci* **13** (9), 492-498.

**Bonfante, P. und Genre, A. (2010).** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* **1** 48.

**Bonfante, P. und Requena, N. (2011).** Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **14** (4), 451-457.

**Bouwmeester, H.J., Roux, C., Lopez-Raez, J.A. und Becard, G. (2007).** Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci* **12** (5), 224-230.

**Bravo, A., York, T., Pumplin, N., Mueller, L.A. und Harrison, M.J. (2016).** Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nat Plants* **2** 15208.

**Breullin-Sessoms, F., Floss, D.S., Gomez, S.K., Pumplin, N., Ding, Y., Levesque-Tremblay, V., Noar, R.D., Daniels, D.A., Bravo, A., Eaglesham, J.B., Benedito, V.A., Udvardi, M.K. und Harrison, M.J. (2015).** Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 mutants is dependent on the Ammonium Transporter 2 family protein AMT2;3. *Plant Cell* **27** (4), 1352-1366.

**Breuninger, M. und Requena, N. (2004).** Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genet Biol* **41** (8), 794-804.

- Brian, P.W. (1954).** The plant-growth-promoting properties of gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*. *J Sci Food Agric* **5** 602-612.
- Brian, P.W. (1957).** The effects of some microbial metabolic products on plant growth. *Symp Soc Exp Biol* **11** 166-182.
- Brian, P.W. (1959).** Effects of gibberellins on plant growth and development. *Biol Rev Camb Philos Soc* **34** (1), 37-77.
- Brundrett, M.C. (2002).** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* **154** (2), 275-304.
- Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R. und Becard, G. (2000).** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol Plant Microbe Interact* **13** (6), 693-698.
- Camps, C., Jardinaud, M.F., Rengel, D., Carrere, S., Herve, C., Debelle, F., Gamas, P., Bensmihen, S. und Gough, C. (2015).** Combined genetic and transcriptomic analysis reveals three major signalling pathways activated by Myc-LCOs in *Medicago truncatula*. *New Phytol* **208** (1), 224-240.
- Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J.A., Morris, R.J., Ane, J.M. und Oldroyd, G.E. (2011).** Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (34), 14348-14353.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. und Denarie, J. (2000).** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12** (9), 1647-1666.
- Charpentier, M. und Oldroyd, G.E. (2013).** Nuclear calcium signaling in plants. *Plant Physiol* **163** (2), 496-503.
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T.V., Radhakrishnan, G.V., Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Very, A.A., Sanders, D., Morris, R.J. und Oldroyd, G.E. (2016).** Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* **352** (6289), 1102-1105.
- Chen, A., Gu, M., Sun, S., Zhu, L., Hong, S. und Xu, G. (2011).** Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and P1BS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species. *New Phytol* **189** (4), 1157-1169.
- Choi, J.W. und Lim, J. (2016).** Control of Asymmetric Cell Divisions during Root Ground Tissue Maturation. *Mol Cells* **39** (7), 524-529.
- Colditz, F., Braun, H.P., Jacquet, C., Niehaus, K. und Krajinski, F. (2005).** Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches*-tolerance of *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol* **59** (3), 387-406.
- Cosgrove, D.J. (2000).** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407** (6802), 321-326.
- Cosgrove, D.J. (2016).** Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *J Exp Bot* **67** (2), 463-476.
- Cowling, R.J., Kamiya, Y., Seto, H. und Harberd, N.P. (1998).** Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in Arabidopsis. *Plant Physiol* **117** (4), 1195-1203.
- Cox, G. und Sanders, F.E. (1974).** Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol* **73** 901-912.
- Cui, H. und Benfey, P.N. (2009).** Cortex proliferation: simple phenotype, complex regulatory mechanisms. *Plant Signal Behav* **4** (6), 551-553.
- Cui, H., Levesque, M.P., Vernoux, T., Jung, J.W., Paquette, A.J., Gallagher, K.L., Wang, J.Y., Blilou, I., Scheres, B. und Benfey, P.N. (2007).** An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* **316** (5823), 421-425.
- Curtis, P.J. und Cross, B.E. (1954).** Gibberellic Acid - a new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem Ind Lond* **35** 1066.
- Czaja, L.F., Hogekamp, C., Lamm, P., Maillet, F., Martinez, E.A., Samain, E., Denarie, J., Küster, H. und Hohnjec, N. (2012).** Transcriptional responses toward diffusible signals from

- symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by arbuscular mycorrhizal fungal lipochitooligosaccharides. *Plant Physiol* **159** (4), 1671-1685.
- D'Haese, W. und Holsters, M. (2002).** Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12** (6), 79R-105R.
- Dalziel, J. und Lawrence, D.K. (1984).** Biochemical and biological effects of kaurene oxidase inhibitors, such as paclobutrazol. In Biochemical aspects of synthetic and naturally occurring plant growth regulators, R. Menhenett, and D.K. Lawrence, eds., pp. 43-57.
- Daviere, J.M. und Achard, P. (2016).** A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals. *Mol Plant* **9** (1), 10-20.
- de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E. und Prat, S. (2008).** A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451** (7177), 480-484.
- Dean, E.J., Davis, J.C., Davis, R.W. und Petrov, D.A. (2008).** Pervasive and persistent redundancy among duplicated genes in yeast. *PLoS Genet* **4** (7), e1000113.
- Delaux, P.M., Becard, G. und Combier, J.P. (2013).** NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytol* **199** (1), 59-65.
- Delaux, P.M., Radhakrishnan, G.V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J.D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C.J., Sederoff, H.W., Stevenson, D.W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M.R., Dunand, C., Morris, R.J., Roux, C., Wong, G.K., Oldroyd, G.E. und Ane, J.M. (2015).** Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112** (43), 13390-13395.
- Delaux, P.M., Varala, K., Edger, P.P., Coruzzi, G.M., Pires, J.C. und Ane, J.M. (2014).** Comparative phylogenomics uncovers the impact of symbiotic associations on host genome evolution. *PLoS Genet* **10** (7), e1004487.
- Demchenko, K., Winzer, T., Stougaard, J., Parniske, M. und Pawlowski, K. (2004).** Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytol* **163** (2), 381-392.
- Denarie, J., Debelle, F. und Prome, J.C. (1996).** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65** 503-535.
- Dermatsev, V., Weingarten-Baror, C., Resnick, N., Gadkar, V., Wininger, S., Kolotilin, I., Mayzlish-Gati, E., Zilberstein, A., Koltai, H. und Kapulnik, Y. (2010).** Microarray analysis and functional tests suggest the involvement of expansins in the early stages of symbiosis of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on tomato (*Solanum lycopersicum*) *Mol Plant Pathol* **11** (1), 121-135.
- Devers, E.A., Branscheid, A., May, P. und Krajinski, F. (2011).** Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* **156** (4), 1990-2010.
- Devers, E.A., Teply, J., Reinert, A., Gaude, N. und Krajinski, F. (2013).** An endogenous artificial microRNA system for unraveling the function of root endosymbioses related genes in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* **13** 82.
- Di Lorenzo, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A. und Benfey, P.N. (1996).** The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* **86** (3), 423-433.
- Dill, A., Jung, H.S. und Sun, T.P. (2001).** The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (24), 14162-14167.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. und Scheres, B. (1993).** Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119** (1), 71-84.
- Duckett, C.M. und Lloyd, C.W. (1994).** Gibberellic acid-induced microtubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an  $\alpha$ -tubulin isotype. *Plant J* **5** 363-372.
- Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M. und Obradovic, Z. (2002).** Intrinsic

disorder and protein function. *Biochemistry* **41** (21), 6573-6582.

**El Ghachtouli, N., Martin-Tanguy, J., Paynot, M. und Gianinazzi, S. (1996).** First report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Lett* **385** (3), 189-192.

**Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P. und Kiss, G.B. (2002).** A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417** (6892), 962-966.

**Engstrom, E.M. (2011).** Phylogenetic analysis of GRAS proteins from moss, lycophyte and vascular plant lineages reveals that GRAS genes arose and underwent substantial diversification in the ancestral lineage common to bryophytes and vascular plants. *Plant Signal Behav* **6** (6), 850-854.

**Evert, R.F. und Esau, K. (2006).** Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their Structure, Function, and Development. 3rd edn. (New Jersey: John Wiley & Sons).

**Fåhræus, G. (1957).** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* **16** 374-381.

**Field, K.J., Pressel, S., Duckett, J.G., Rimington, W.R. und Bidartondo, M.I. (2015).** Symbiotic options for the conquest of land. *Trends Ecol Evol* **30** (8), 477-486.

**Finlay, R.D. (2008).** Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* **59** (5), 1115-1126.

**Fiorilli, V., Vallino, M., Biselli, C., Faccio, A., Bagnaresi, P. und Bonfante, P. (2015).** Host and non-host roots in rice: cellular and molecular approaches reveal differential responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Front Plant Sci* **6** 636.

**Fitter, A.H. (2005).** Darkness visible reflections on underground ecology. *J Ecol* **93** (2), 231-243.

**Fliegmann, J., Canova, S., Lachaud, C., Uhlenbroich, S., Gascioli, V., Pichereaux, C., Rossignol, M., Rosenberg, C., Cumener, M., Pitorre, D., Lefebvre, B., Gough, C., Samain, E., Fort, S., Driguez, H., Vauzeilles, B., Beau, J.M., Nurisso, A., Imbert, A., Cullimore, J. und Bono, J.J. (2013).** Lipo-chitooligosaccharidic symbiotic signals are recognized by LysM receptor-like kinase LYR3 in the legume *Medicago truncatula*. *ACS Chem Biol* **8** (9), 1900-1906.

**Fliegmann, J., Jauneau, A., Pichereaux, C., Rosenberg, C., Gascioli, V., Timmers, A.C., Burlet-Schiltz, O., Cullimore, J. und Bono, J.J. (2016).** LYR3, a high-affinity LCO-binding protein of *Medicago truncatula*, interacts with LYK3, a key symbiotic receptor. *FEBS Lett* **590** (10), 1477-1487.

**Floss, D.S., Levesque-Tremblay, V., Park, H.J. und Harrison, M.J. (2016).** DELLA proteins regulate expression of a subset of AM symbiosis-induced genes in *Medicago truncatula*. *Plant Signal Behav* **11** (4), e1162369.

**Floss, D.S., Levy, J.G., Levesque-Tremblay, V., Pumplun, N. und Harrison, M.J. (2013).** DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (51), E5025-5034.

**Foo, E., Ross, J.J., Jones, W.T. und Reid, J.B. (2013).** Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Ann Bot* **111** (5), 769-779.

**Foster, R., Mattsson, O. und Mundy, J. (2003).** Plants flex their skeletons. *Trends Plant Sci* **8** (5), 202-204.

**Fournier, J., Timmers, A.C., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M. und Barker, D.G. (2008).** Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiol* **148** (4), 1985-1995.

**Fu, X. und Harberd, N.P. (2003).** Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421** (6924), 740-743.

**Fu, X., Richards, D.E., Ait-Ali, T., Hynes, L.W., Ougham, H., Peng, J. und Harberd, N.P. (2002).** Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell* **14** (12), 3191-3200.

**Gahan, J. und Schmalenberger, A. (2014).** The role of bacteria and mycorrhiza in plant sulfur supply. *Front Plant Sci* **5** 723.

- Gallagher, K.L., Paquette, A.J., Nakajima, K. und Benfey, P.N. (2004).** Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Curr Biol* **14** (20), 1847-1851.
- Gao, M.J., Parkin, I., Lydiate, D. und Hannoufa, A. (2004).** An auxin-responsive SCARECROW-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. *Plant Mol Biol* **55** (3), 417-431.
- Garcia-Garrido, J.M., Morcillo, R.J., Rodriguez, J.A. und Bote, J.A.O. (2010).** Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. *Mol Plant Microbe Interact* **23** (5), 651-664.
- Gaude, N., Bortfeld, S., Duensing, N., Lohse, M. und Krajinski, F. (2012a).** Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *Plant J* **69** (3), 510-528.
- Gaude, N., Bortfeld, S., Erban, A., Kopka, J. und Krajinski, F. (2015).** Symbiosis dependent accumulation of primary metabolites in arbuscule-containing cells. *BMC Plant Biol* **15** 234.
- Gaude, N., Schulze, W.X., Franken, P. und Krajinski, F. (2012b).** Cell type-specific protein and transcription profiles implicate periarbuscular membrane synthesis as an important carbon sink in the mycorrhizal symbiosis. *Plant Signal Behav* **7** (4), 461-464.
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pages, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Becard, G., Bonfante, P. und Barker, D.G. (2013).** Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol* **198** (1), 190-202.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G. und 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*. *Plant Cell* **20** (5), 1407-1420.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. und Barker, D.G. (2005).** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17** (12), 3489-3499.
- Genre, A. und Russo, G. (2016).** Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions? *Front Plant Sci* **7** 96.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1996).** Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *Plant Cell* **8** (10), 1871-1883.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B.W. und Oldroyd, G.E. (2006).** Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441** (7097), 1149-1152.
- Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernie, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., Miller, J.B., Sun, J., Bano, S.A., Ratet, P., Mysore, K.S., Denarie, J., Schultze, M. und Oldroyd, G.E. (2012).** A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol* **22** (23), 2236-2241.
- Gobbato, E., Wang, E., Higgins, G., Bano, S.A., Henry, C., Schultze, M. und Oldroyd, G.E. (2013).** RAM1 and RAM2 function and expression during arbuscular mycorrhizal symbiosis and *Aphanomyces euteiches* colonization. *Plant Signal Behav* **8** (10).
- Gohre, V. und Paszkowski, U. (2006).** Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* **223** (6), 1115-1122.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pages, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letiche, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Becard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C. und Rochange, S.F. (2008).** Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455** (7210), 189-194.
- Gomez, S.K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E.B., Udvardi, M.K. und Harrison, M.J. (2009).** *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biol* **9** 10.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P. und Thomas, S.G. (2006).** Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18** (12), 3399-3414.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S.,**

- Kawaguchi, M., Wang, T.L. und Parniske, M. (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. *Plant Cell* **22** (7), 2509-2526.
- Guether, M., Balestrini, R., Hannah, M., He, J., Udvardi, M.K. und Bonfante, P. (2009).** Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytol* **182** (1), 200-212.
- Gupta, R. und Chakrabarty, S.K. (2013).** Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav* **8** (9).
- Gutjahr, C., Casieri, L. und Paszkowski, U. (2009).** Glomus intraradices induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytol* **182** (4), 829-837.
- Gutjahr, C., Gobbato, E., Choi, J., Riemann, M., Johnston, M.G., Summers, W., Carbonnel, S., Mansfield, C., Yang, S.Y., Nadal, M., Acosta, I., Takano, M., Jiao, W.B., Schneeberger, K., Kelly, K.A. und Paszkowski, U. (2015).** Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. *Science* **350** (6267), 1521-1524.
- Harberd, N.P., King, K.E., Carol, P., Cowling, R.J., Peng, J. und Richards, D.E. (1998).** Gibberellin: inhibitor of an inhibitor of...? *Bioessays* **20** (12), 1001-1008.
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R. und Liu, J. (2002).** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14** (10), 2413-2429.
- Hartl, F.U. und Hayer-Hartl, M. (2002).** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295** (5561), 1852-1858.
- Hause, B., Mielke, K. und Forner, S. (2013).** Cell-specific detection of jasmonates by means of an immunocytological approach. *Methods Mol Biol* **1011** 135-144.
- Hauvermale, A.L., Ariizumi, T. und Steber, C.M. (2012).** Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol* **160** (1), 83-92.
- Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnewell, S., Parniske, M., Wang, T.L. und Downie, J.A. (2006).** *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol* **142** (4), 1739-1750.
- Hedden, P. (1997).** The oxidases of gibberellin biosynthesis: their function and mechanism. *Physiol Plant* **101** 709-719.
- Hedden, P. (2003).** The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* **19** (1), 5-9.
- Hedden, P. und Thomas, S.G. (2012).** Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* **444** (1), 11-25.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T. und Benfey, P.N. (2000).** The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* **101** (5), 555-567.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S. und Peacock, W.J. (2001a).** The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (4), 2065-2070.
- Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J. und Dennis, E.S. (2001b).** A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J* **28** (2), 201-208.
- Heo, J.O., Chang, K.S., Kim, I.A., Lee, M.H., Lee, S.A., Song, S.K., Lee, M.M. und Lim, J. (2011).** Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator scarecrow-like 3 in the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (5), 2166-2171.
- Hewitt, E.J. (1966).** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition (London: Commonwealth Bureau).
- Hirano, K., Kouketu, E., Katoh, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M. und Matsuoka, M. (2012).** The suppressive function of the rice DELLA protein SLR1 is dependent on its transcriptional activation activity. *Plant J* **71** (3), 443-453.



- Hirano, K., Nakajima, M., Asano, K., Nishiyama, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Katoh, E., Xiang, H., Tanahashi, T., Hasebe, M., Banks, J.A., Ashikari, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M. und Matsuoka, M. (2007). The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **19** (10), 3058-3079.
- Hirsch, S. (2013). Elucidating the function of mycorrhizal-induced Kunitz protease inhibitors and characterization of their putative target proteases in *Medicago truncatula*. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie.
- Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A. und Oldroyd, G.E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21** (2), 545-557.
- Hirsch, S. und Oldroyd, G.E. (2009). GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signal Behav* **4** (8), 698-700.
- Hofferek, V., Mendrinna, A., Gaude, N., Krajinski, F. und Devers, E.A. (2014). MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* **14** 199.
- Hogekamp, C., Arndt, D., Pereira, P.A., Becker, J.D., Hohnjec, N. und Küster, H. (2011). Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiol* **157** (4), 2023-2043.
- Hogekamp, C. und Küster, H. (2013). A roadmap of cell-type specific gene expression during sequential stages of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *BMC Genomics* **14** 306.
- Hohnjec, N., Czaja-Hasse, L.F., Hogekamp, C. und Küster, H. (2015). Pre-announcement of symbiotic guests: transcriptional reprogramming by mycorrhizal lipochitooligosaccharides shows a strict co-dependency on the GRAS transcription factors NSP1 and RAM1. *BMC Genomics* **16** (1), 994.
- Hohnjec, N., Vieweg, M.F., Puhler, A., Becker, A. und Küster, H. (2005). Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* **137** (4), 1283-1301.
- Hori, S. (1898). Some observations on 'Bakanae' disease of the rice plant. *Mem Agric Res Sta (Tokyo)* **12** 110-119.
- Horvath, B., Yeun, L.H., Domonkos, A., Halasz, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., Miro, K., Hirsch, S., Sun, J., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Ane, J.M., Oldroyd, G.E. und Kaló, P. (2011). *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Mol Plant Microbe Interact* **24** (11), 1345-1358.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y. und Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* **19** (6), 884-894.
- Huang, W., Xian, Z., Kang, X., Tang, N. und Li, Z. (2015). Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in tomato. *BMC Plant Biol* **15** 209.
- Huisman, R., Hontelez, J., Mysore, K.S., Wen, J., Bisseling, T. und Limpens, E. (2016). A symbiosis-dedicated SYNTAXIN OF PLANTS 13II isoform controls the formation of a stable host-microbe interface in symbiosis. *New Phytol* **211** (4), 1338-1351.
- Ikeda, A., Sonoda, Y., Vernieri, P., Perata, P., Hirochika, H. und Yamaguchi, J. (2002). The slender rice mutant, with constitutively activated gibberellin signal transduction, has enhanced capacity for abscisic acid level. *Plant Cell Physiol* **43** (9), 974-979.
- Itoh, H., Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Kamiya, N., Hasegawa, Y., Ashikari, M. und Matsuoka, M. (2005). Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J* **44** (4), 669-679.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M. und Matsuoka, M. (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14** (1), 57-70.
- Ivanov, S., Fedorova, E.E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P. und Bisseling, T.

(2012). Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (21), 8316-8321.

**Jacquot-Plumey, E., Caussanel, J.P., Gianinazzi, S., Van Tuinen, D. und Gianinazzi-Pearson, V. (2003).** Heavy metals in sewage sludges contribute to their adverse effects on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Folia Geobot* **38** (2), 167-176.

**Jakobsen, I. und Rosendahl, L. (1990).** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol* **115** (1), 77-83.

**Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R. und Harrison, M.J. (2007).** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (5), 1720-1725.

**Jin, H., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Piotrowski, E., Lammers, P.J. und Shachar-Hill, Y. (2005).** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **168** (3), 687-696.

**Jung, S.C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J.A. und Pozo, M.J. (2012).** Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J Chem Ecol* **38** (6), 651-664.

**Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A. und Oldroyd, G.E. (2005).** Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308** (5729), 1786-1789.

**Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. und Stougaard, J. (2006).** A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2), 359-364.

**Kaneta, M., Kakimoto, T. und Shibaoka, H. (1993).** Actinomycin D inhibits the GA<sub>3</sub>-Induced elongation of azuki bean epicotyls and the reorientation of cortical microtubules. *Plant Cell Physiol* **34** 1125-1132.

**Karandashov, V., Nagy, R., Wegmuller, S., Amrhein, N. und Bucher, M. (2004).** Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (16), 6285-6290.

**Karimi, M., Inze, D. und Depicker, A. (2002).** GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7** (5), 193-195.

**Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y. und Yamaguchi, S. (2002).** Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277** (47), 45188-45194.

**Keane, P., Kerr, A. und New, P. (1970).** Crown gall of stone fruit II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust Jnl Of Bio Sci* **23** 585-596.

**Kistner, C., Winzer, T., Pitzschke, A., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Webb, K.J., Szczyglowski, K. und Parniske, M. (2005).** Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* **17** (8), 2217-2229.

**Koncz, C. und Schell, J. (1986).** The promoter of tl-dna gene 5 controls the tissuespecific expression of chimeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet* **204** (3), 383-396.

**Koornneef, M. und van der Veen, J.H. (1980).** Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heyneh. *Theor Appl Genet* **58** (6), 257-263.

**Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Denarie, J., Barker, D.G. und Becard, G. (2003).** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **131** (3), 952-962.

**Kretzschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, M., Bachelier, J.B., Reinhardt, D., Bours, R., Bouwmeester, H.J. und Martinoia, E. (2012).** A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483** (7389), 341-344.

**Kuhn, H. (2011).** Identification and characterization of *Medicago truncatula* marker genes for

recognition of fungal signals in the arbuscular mycorrhiza symbiosis. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie.

**Kuhn, H., Küster, H. und 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), 716-733.

**Lange, T. (1994).** Purification and partial amino-acid sequence of gibberellin 20-oxidase from *Cucurbita maxima* L. endosperm. *Planta* **195** (1), 108-115.

**Lauressergues, D., Delaux, P.M., Formey, D., Lelandais-Briere, C., Fort, S., Cottaz, S., Becard, G., Niebel, A., Roux, C. und Combier, J.P. (2012).** The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *Plant J* **72** (3), 512-522.

**Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J.C. und Denarie, J. (1990).** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344** (6268), 781-784.

**Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ane, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C. und Debelle, F. (2004).** A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303** (5662), 1361-1364.

**Li, S., Zhao, Y., Zhao, Z., Wu, X., Sun, L., Liu, Q. und Wu, Y. (2016).** Crystal structure of the GRAS domain of SCARECROW-LIKE7 in *Oryza sativa*. *Plant Cell* **28** (5), 1025-1034.

**Li, W., Wu, J., Weng, S., Zhang, Y., Zhang, D. und Shi, C. (2010).** Identification and characterization of dwarf 62, a loss-of-function mutation in DLT/OsGRAS-32 affecting gibberellin metabolism in rice. *Planta* **232** (6), 1383-1396.

**Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T. und Geurts, R. (2003).** LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302** (5645), 630-633.

**Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T. und Geurts, R. (2005).** Formation of organelle-like N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** 10375-10380.

**Liu, J., Blaylock, L.A., Endre, G., Cho, J., Town, C.D., VandenBosch, K.A. und Harrison, M.J. (2003).** Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **15** (9), 2106-2123.

**Liu, J., Versaw, W.K., Pumplin, N., Gomez, S.K., Blaylock, L.A. und Harrison, M.J. (2008).** Closely related members of the *Medicago truncatula* PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *J Biol Chem* **283** (36), 24673-24681.

**Liu, J.Y., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D. und Harrison, M.J. (2007a).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* **50** (3), 529-544.

**Liu, T., Gu, J.Y., Xu, C.J., Gao, Y. und An, C.C. (2007b).** Overproduction of OsSLRL2 alters the development of transgenic Arabidopsis plants. *Biochem Biophys Res Commun* **358** (4), 983-989.

**Liu, W., Kohlen, W., Lillo, A., Op den Camp, R., Ivanov, S., Hartog, M., Limpens, E., Jamil, M., Smaczniak, C., Kaufmann, K., Yang, W.C., Hooiveld, G.J., Charnikhova, T., Bouwmeester, H.J., Bisseling, T. und Geurts, R. (2011).** Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* **23** (10), 3853-3865.

**Liu, X. und Widmer, A. (2014).** Genome-wide comparative analysis of GRAS gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol* **32** 1129-1145.

**Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25** (4), 402-408.

**Lloyd, C.M., Shaw, P.J., Warn, R.M. und Yuan, M. (1996).** Gibberellic-acid-induced reorientation of cortical microtubules in living plant cells. *J Microsc* **181** 140-144.

- Locascio, A., Blazquez, M.A. und Alabadi, D. (2013).** Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Curr Biol* **23** (9), 804-809.
- Lopez-Lara, I.M., van den Berg, J.D., Thomas-Oates, J.E., Glushka, J., Lugtenberg, B.J. und Spaink, H.P. (1995).** Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Mol Microbiol* **15** (4), 627-638.
- Lota, F., Wegmuller, S., Buer, B., Sato, S., Brautigam, A., Hanf, B. und Bucher, M. (2013).** The cis-acting CTTC-P1BS module is indicative for gene function of LjVT112, a Qb-SNARE protein gene that is required for arbuscule formation in *Lotus japonicus*. *Plant J* **74** (2), 280-293.
- Lum, M.R. und Hirsch, A.M. (2003).** Roots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *J Plant Growth Regul* **21** (4), 368-382.
- Lynch, M. und Conery, J.S. (2000).** The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290** (5494), 1151-1155.
- MacMillan, J. und Suter, P.J. (1958).** The occurrence of gibberellin A<sub>1</sub> in higher plants - isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*). *Naturwissenschaften* **45** (2), 46.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. und Stougaard, J. (2003).** A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425** (6958), 637-640.
- Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., Katsumata, T., Kawaide, H., Kamiya, Y. und Yamaguchi, S. (2013).** CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (5), 1947-1952.
- Maillet, F., Poinot, V., Andre, O., Puech-Pages, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E.A., Driguez, H., Becard, G. und Denarie, J. (2011).** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469** (7328), 58-63.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., Blaylock, L. und Harrison, M.J. (2005).** Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, Mt-XTH1, from *Medicago truncatula* is induced systemically in mycorrhizal roots. *Gene* **345** (2), 191-197.
- Manchanda, G. und Garg, N. (2007).** Endomycorrhizal and rhizobial symbiosis: How much do they share? *J Plant Interact* **2** (2), 79-88.
- Martin-Rodriguez, J.A., Ocampo, J.A., Molinero-Rosales, N., Tarkowska, D., Ruiz-Rivero, O. und Garcia-Garrido, J.M. (2015).** Role of gibberellins during arbuscular mycorrhizal formation in tomato: new insights revealed by endogenous quantification and genetic analysis of their metabolism in mycorrhizal roots. *Physiol Plant* **154** (1), 66-81.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P. und Steber, C.M. (2003).** The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15** (5), 1120-1130.
- Messinese, E., Mun, J.H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rouge, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J.J., Cook, D.R. und Ane, J.M. (2007).** A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **20** (8), 912-921.
- Meyberg, M. (1988).** Selective staining of fungal hyphae in parasitic and symbiotic plant-fungus associations. *Histochemistry* **88** (2), 197-199.
- Mielke, K., Forner, S., Kramell, R., Conrad, U. und Hause, B. (2011).** Cell-specific visualization of jasmonates in wounded tomato and Arabidopsis leaves using jasmonate-specific antibodies. *New Phytol* **190** (4), 1069-1080.
- Miller, J.B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R.J. und Oldroyd, G.E. (2013).** Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *Plant Cell* **25** (12), 5053-5066.
- Miransari, M. (2011).** Soil microbes and plant fertilization. *Appl Microbiol Biotechnol* **92** (5), 875-885.
- Mita, K. und Katsumi, M. (1986).** Gibberellin control of microtubule arrangement in the mesocotyl

epidermal cells of the d5 mutant of *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol* **27** 651-659.

**Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E. und Long, S.R. (2004).** A  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (13), 4701-4705.

**Miyata, K., Kozaki, T., Kouzai, Y., Ozawa, K., Ishii, K., Asamizu, E., Okabe, Y., Umehara, Y., Miyamoto, A., Kobae, Y., Akiyama, K., Kaku, H., Nishizawa, Y., Shibuya, N. und Nakagawa, T. (2014).** The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol* **55** (11), 1864-1872.

**Monna, L., Kitazawa, N., Yoshino, R., Suzuki, J., Masuda, H., Maehara, Y., Tanji, M., Sato, M., Nasu, S. und Minobe, Y. (2002).** Positional cloning of rice semidwarfing gene, sd-1: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res* **9** (1), 11-17.

**Moore, L., Warren, G. und Strobel, G. (1979).** Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* **2** (617-626).

**Morohashi, K., Minami, M., Takase, H., Hotta, Y. und Hiratsuka, K. (2003).** Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *J Biol Chem* **278** (23), 20865-20873.

**Morrone, D., Chen, X., Coates, R.M. und Peters, R.J. (2010).** Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *Biochem J* **431** (3), 337-344.

**Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P. und Hakoshima, T. (2008).** Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456** (7221), 459-463.

**Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T. und Benfey, P.N. (2001).** Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413** (6853), 307-311.

**Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M. und Yamaguchi, I. (2006).** Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J* **46** (5), 880-889.

**Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P. und Jones, J.D. (2008).** DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18** (9), 650-655.

**Nehls, U., Grunze, N., Willmann, M., Reich, M. und Küster, H. (2007).** Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* **68** (1), 82-91.

**Nelissen, H., Rymen, B., Jikumaru, Y., Demuynck, K., Van Lijsebettens, M., Kamiya, Y., Inze, D. und Beemster, G.T. (2012).** A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol* **22** (13), 1183-1187.

**O'Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B. und Laurence, A. (2015).** The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* **66** 311-328.

**Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. und Yamaguchi, S. (2003).** Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* **15** (7), 1591-1604.

**Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M. und Sano, H. (2000).** Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* **245** (1), 21-29.

**Olah, B., Briere, C., Becard, G., Denarie, J. und 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. *Plant J* **44** (2), 195-207.

**Oldroyd, G.E. (2013).** Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11** (4), 252-263.

**Oldroyd, G.E. und Long, S.R. (2003).** Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod actor signaling. *Plant Physiol* **131** (3), 1027-1032.

- Ortu, G., Balestrini, R., Pereira, P.A., Becker, J.D., Küster, H. und Bonfante, P. (2012).** Plant genes related to gibberellin biosynthesis and signaling are differentially regulated during the early stages of AM fungal interactions. *Mol Plant* **5** (4), 951-954.
- Otsuka, M., Kenmoku, H., Ogawa, M., Okada, K., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Kamiya, Y., Toyomasu, T. und Yamaguchi, S. (2004).** Emission of ent-kaurene, a diterpenoid hydrocarbon precursor for gibberellins, into the headspace from plants. *Plant Cell Physiol* **45** (9), 1129-1138.
- Ovchinnikova, E., Journet, E.P., Chabaud, M., Cosson, V., Ratet, P., Duc, G., Fedorova, E., Liu, W., den Camp, R.O., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Borisov, A., Bisseling, T. und Limpens, E. (2011).** IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and Medicago Spp. *Mol Plant Microbe Interact* **24** (11), 1333-1344.
- Paquette, A.J. und Benfey, P.N. (2005).** Maturation of the ground tissue of the root is regulated by gibberellin and SCARECROW and requires SHORT-ROOT. *Plant Physiol* **138** (2), 636-640.
- Park, H.J., Floss, D.S., Levesque-Tremblay, V., Bravo, A. und Harrison, M.J. (2015).** Hyphal branching during arbuscule development requires Reduced Arbuscular Mycorrhiza1. *Plant Physiol* **169** (4), 2774-2788.
- Parniske, M. (2004).** Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **7** (4), 414-421.
- Parniske, M. (2008).** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6** (10), 763-775.
- Pauluzzi, G., Divol, F., Puig, J., Guiderdoni, E., Dievart, A. und Perin, C. (2012).** Surfing along the root ground tissue gene network. *Dev Biol* **365** (1), 14-22.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. und Harberd, N.P. (1997).** The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11** (23), 3194-3205.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D. und Harberd, N.P. (1999).** 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400** (6741), 256-261.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. und Ferrin, T.E. (2004).** UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25** (13), 1605-1612.
- Phillips, A.L., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E., Lange, T., Huttly, A.K., Gaskin, P., Graebe, J.E. und Hedden, P. (1995).** Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. *Plant Physiol* **108** (3), 1049-1057.
- Phinney, B.O. (1956).** Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to Gibberellic Acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **42** (4), 185-189.
- Pimprikar, P., Carbonnel, S., Paries, M., Katzer, K., Klingl, V., Bohmer, M.J., Karl, L., Floss, D.S., Harrison, M.J., Parniske, M. und Gutjahr, C. (2016).** A CCaMK-CYCLOPS-DELLA complex activates transcription of RAM1 to regulate arbuscule branching. *Curr Biol* **26** (8), 987-998.
- Pirozynski, K.A. und Malloch, D.W. (1975).** Origin of land plants - matter of mycotropism. *Biosystems* **6** (3), 153-164.
- Pumplin, N. und Harrison, M.J. (2009).** Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in Medicago truncatula roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* **151** (2), 809-819.
- Pumplin, N., Mondo, S.J., Topp, S., Starker, C.G., Gantt, J.S. und Harrison, M.J. (2010).** Medicago truncatula Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J* **61** (3), 482-494.
- Pumplin, N., Zhang, X., Noar, R.D. und 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), E665-672.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D. und Benfey, P.N. (1999).** The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* **18** (1), 111-119.



- Quandt, H.J., Pühler, A. und Broer, I. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **6** (6), 699-706.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. und Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425** (6958), 585-592.
- Raudaskoski, M. und Kothe, E. (2015). Novel findings on the role of signal exchange in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. *Mycorrhiza* **25** (4), 243-252.
- Read, D.J., Duckett, J.G., Francis, R., Ligron, R. und Russell, A. (2000). Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355** (1398), 815-830.
- Rech, S.S., Heidt, S. und Requena, N. (2013). A tandem Kunitz protease inhibitor (KPI106)-serine carboxypeptidase (SCP1) controls mycorrhiza establishment and arbuscule development in *Medicago truncatula*. *Plant J* **75** (5), 711-725.
- Reddy, D.M.R.S., Schorderet, M., Feller, U. und Reinhardt, D. (2007). A petunia mutant affected in intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant J* **51** (5), 739-750.
- Redecker, D., Kodner, R. und Graham, L.E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289** (5486), 1920-1921.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. und Kerp, H. (1994). 4-hundred-million-year-old vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (25), 11841-11843.
- Requena, N., Serrano, E., Ocon, A. und Breuninger, M. (2007). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* **68** (1), 33-40.
- Rich, M.K., Schorderet, M., Bapaume, L., Falquet, L., Morel, P., Vandebussche, M. und Reinhardt, D. (2015). The Petunia GRAS transcription factor ATA/RAM1 regulates symbiotic gene expression and fungal morphogenesis in arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* **168** (3), 788-797.
- Rich, M.K., Schorderet, M. und Reinhardt, D. (2014). The role of the cell wall compartment in mutualistic symbioses of plants. *Front Plant Sci* **5** 238.
- Richards, D.E., Peng, J. und Harberd, N.P. (2000). Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *Bioessays* **22** (6), 573-577.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M. und Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* **321** (1-2), 305-339.
- Robertson, M., Swain, S.M., Chandler, P.M. und Olszewski, N.E. (1998). Identification of a negative regulator of gibberellin action, HvSPY, in barley. *Plant Cell* **10** (6), 995-1007.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A. und Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15** (16), 2122-2133.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M. und Kawaguchi, M. (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19** (2), 610-624.
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G.K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M. und Matsuoka, M. (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* **134** (4), 1642-1653.
- Sasaki, A., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G.S., Kitano, H. und Matsuoka, M. (2002). Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416** (6882), 701-702.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M. und Matsuoka, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299** (5614), 1896-1898.

- Sauret-Gueto, S., Calder, G. und Harberd, N.P. (2012).** Transient gibberellin application promotes *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cell elongation without maintaining transverse orientation of microtubules on the outer tangential wall of epidermal cells. *Plant J* **69** (4), 628-639.
- Sawada, K. (1912).** Diseases of agricultural products in Japan. *Form Agric Rev* **63** 10-16.
- Scannerini, S. und Bonfante-Fasolo, P. (1983).** Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Can J Bot* **61** (3), 917-943.
- Schenck, N. und Smith, G. (1982).** Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia* **74** 77-92.
- Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B. und Vos, C.M. (2015).** Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic Nematodes: A review of the mechanisms involved. *Front Microbiol* **6** 1280.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. und Walker, C. (2001).** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* **105** 1413-1421.
- Schwechheimer, C. (2012).** Gibberellin signaling in plants - the extended version. *Front Plant Sci* **2** 107.
- Shaul-Keinan, O., Gadkar, V., Ginzberg, I., Grünzweig, J.M., Chet, I., Elad, Y., Wininger, S., Belaysov, E., Eshed, Y., Atzmon, N., Ben-Tal, Y. und Kapulnik, Y. (2002).** Hormone concentrations in tobacco roots change during arbuscular mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices*. *New Phytol* **154** (2), 501-507.
- Shibaoka, H. (1974).** Involvement of wall microtubules in gibberellin promotion and kinetin inhibition of stem elongation. *Plant Cell Physiol* **15** 255-263.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H. und Matsuoka, M. (2008).** Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456** (7221), 520-523.
- Siciliano, V., Genre, A., Balestrini, R., Cappellazzo, G., deWit, P.J. und Bonfante, P. (2007).** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiol* **144** (3), 1455-1466.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D. und Higgins, D.G. (2011).** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7** 539.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N. und Sun, T. (1998).** The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10** (2), 155-169.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y. und Sun, T.P. (2001).** Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13** (7), 1555-1566.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C. und Lalonde, M. (1993).** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363** (6424), 67-69.
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M. und Parniske, M. (2014).** CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* **15** (2), 139-152.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T. und Geurts, R. (2005).** NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308** (5729), 1789-1791.
- Smith, S.E. und Read, D. (2008).** Mycorrhizal symbiosis. Edition 3 (New York: Academic Press).
- Smith, V.A., Knatt, C.J., Gaskin, P. und Reid, J.B. (1992).** The distribution of gibberellins in vegetative tissues of *Pisum sativum* L.: I. Biological and biochemical consequences of the le mutation. *Plant Physiol* **99** (2), 368-371.
- Sobkowiak, L., Bielewicz, D., Malecka, E.M., Jakobsen, I., Albrechtsen, M., Szweykowska-Kulinska, Z. und Pacak, A. (2012).** The role of the P1BS element containing promoter-driven genes in Pi transport and homeostasis in plants. *Front Plant Sci* **3** 58.
- Song, X.M., Liu, T.K., Duan, W.K., Ma, Q.H., Ren, J., Wang, Z., Li, Y. und Hou, X.L. (2014).**

- Genome-wide analysis of the GRAS gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Genomics* **103** (1), 135-146.
- Spielmeier, W., Ellis, M.H. und Chandler, P.M. (2002).** Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (13), 9043-9048.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolome, J., Gomez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., Garcia-Martinez, J.L., Alabadi, D. und Blazquez, M.A. (2009).** Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J* **60** (4), 589-601.
- Stella, S. und Montoya, G. (2016).** The genome editing revolution: A CRISPR-Cas TALE off-target story. *Bioessays* **38** Suppl 1 S4-S13.
- Stowe, B.B. und Yamaki, T. (1957).** The history and physiological action of the gibberellins. *Annu Rev Plant Phys* **8** 181-216.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. und Parniske, M. (2002).** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417** (6892), 959-962.
- Sun, T.P. und Kamiya, Y. (1994).** The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6** (10), 1509-1518.
- Sun, X., Jones, W.T., Harvey, D., Edwards, P.J., Pascal, S.M., Kirk, C., Considine, T., Sheerin, D.J., Rakonjac, J., Oldfield, C.J., Xue, B., Dunker, A.K. und Uversky, V.N. (2010).** N-terminal domains of DELLA proteins are intrinsically unstructured in the absence of interaction with GID1/gibberellic acid receptors. *J Biol Chem* **285** (15), 11557-11571.
- Sun, X., Jones, W.T. und Rikkerink, E.H. (2012).** GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *Biochem J* **442** (1), 1-12.
- Sun, X., Xue, B., Jones, W.T., Rikkerink, E., Dunker, A.K. und Uversky, V.N. (2011).** A functionally required unfoldome from the plant kingdom: intrinsically disordered N-terminal domains of GRAS proteins are involved in molecular recognition during plant development. *Plant Mol Biol* **77** (3), 205-223.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P. und Mysore, K.S. (2008).** Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **54** (2), 335-347.
- Takeda, N., Handa, Y., Tsuzuki, S., Kojima, M., Sakakibara, H. und Kawaguchi, M. (2015).** Gibberellin regulates infection and colonization of host roots by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Signal Behav* **10** (6), e1028706.
- Takeda, N., Maekawa, T. und Hayashi, M. (2012).** Nuclear-localized and deregulated calcium- and calmodulin-dependent protein kinase activates rhizobial and mycorrhizal responses in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **24** (2), 810-822.
- Takeda, N., Tsuzuki, S., Suzaki, T., Parniske, M. und Kawaguchi, M. (2013).** CERBERUS and NSP1 of *Lotus japonicus* are common symbiosis genes that modulate arbuscular mycorrhiza development. *Plant Cell Physiol* **54** (10), 1711-1723.
- Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Becard, G. und Franken, P. (2003).** Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol* **131** (3), 1468-1478.
- Tamayo, E., Gomez-Gallego, T., Azcon-Aguilar, C. und Ferrol, N. (2014).** Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Front Plant Sci* **5** 547.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. und Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30** (12), 2725-2729.
- Tanimoto, E. (1987).** Gibberellin-dependent root elongation in *Lactuca sativa*: recovery from growth retardant-suppressed elongation with thickening by low concentration of GA<sub>3</sub>. *Plant Cell Physiol* **28** (6), 963-973.
- Tanimoto, E. (1988).** Gibberellin regulation of root growth with changes in galactose contents of the cell walls in *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiol* **29** (2), 269-280.

- Tanimoto, E. (1994).** Interaction of gibberellin A<sub>3</sub> and ancymidol in the growth and cell-wall extensibility of dwarf pea roots. *Plant Cell Physiol* **35** (7), 1019-1028.
- Tanimoto, E. (2012).** Tall or short? Slender or thick? A plant strategy for regulating elongation growth of roots by low concentrations of gibberellin. *Ann Bot* **110** (2), 373-381.
- Taylor, A. und Cosgrove, D.J. (1989).** Gibberellic Acid stimulation of cucumber hypocotyl elongation : effects on growth, turgor, osmotic pressure, and cell wall properties. *Plant Physiol* **90** (4), 1335-1340.
- Thomas, S.G., Phillips, A.L. und Hedden, P. (1999).** Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (8), 4698-4703.
- Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J. und Chen, M. (2004).** Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **54** (4), 519-532.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrechtsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S. und Stougaard, J. (2006).** Deregulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441** (7097), 1153-1156.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frei dit Frey, N., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L.B., Handa, Y., Herr, J.R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P.J., Masclaux, F.G., Murat, C., Morin, E., Ndikumana, S., Pagni, M., Petitpierre, D., Requena, N., Rosikiewicz, P., Riley, R., Saito, K., San Clemente, H., Shapiro, H., van Tuinen, D., Becard, G., Bonfante, P., Paszkowski, U., Shachar-Hill, Y.Y., Tuskan, G.A., Young, J.P., Sanders, I.R., Henrissat, B., Rensing, S.A., Grigoriev, I.V., Corradi, N., Roux, C. und Martin, F. (2013).** Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (50), 20117-20122.
- Tkacz, A. und Poole, P. (2015).** Role of root microbiota in plant productivity. *J Exp Bot* **66** (8), 2167-2175.
- Tong, H., Jin, Y., Liu, W., Li, F., Fang, J., Yin, Y., Qian, Q., Zhu, L. und Chu, C. (2009).** DWARF AND LOW-TILLERING, a new member of the GRAS family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice. *Plant J* **58** (5), 803-816.
- Trouvelot, A., Kough, J. und Gianinazzi-Pearson, V. (1986).** Estimation of VA mycorrhizal infection levels. Research for methods having a functional significance. In *Physiological and Genetic Aspects of Mycorrhizae*, G.-P. V., and S. Gianinazzi, eds. (Paris: INRA Press), pp. 217-221.
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J. und Bennett, M.J. (2009).** Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Curr Biol* **19** (14), 1194-1199.
- Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T., Hedden, P., Bhalerao, R. und Bennett, M.J. (2008).** Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* **10** (5), 625-628.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I. und Matsuoka, M. (2005).** GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437** (7059), 693-698.
- Uversky, V.N. (2010).** The mysterious unfoldome: structureless, underappreciated, yet vital part of any given proteome. *J Biomed Biotechnol* **2010** 568068.
- van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J. und Kijne, J.W. (1992).** Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium. *Science* **257** (5066), 70-72.
- van Tol, N. und van der Zaal, B.J. (2014).** Artificial transcription factor-mediated regulation of gene expression. *Plant Sci* **225** 58-67.
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U. und Piche, Y. (1998).** Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* **64** (12), 5004-5007.

- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. und 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** (5), 949-956.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. und Kudla, J. (2004).** Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40** (3), 428-438.
- Wang, B. und Qiu, Y.L. (2006).** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16** (5), 299-363.
- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J.F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S. und Oldroyd, G.E. (2012).** A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr Biol* **22** (23), 2242-2246.
- Wang, F., Zhu, D., Huang, X., Li, S., Gong, Y., Yao, Q., Fu, X., Fan, L.M. und Deng, X.W. (2009).** Biochemical insights on degradation of Arabidopsis DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *Plant Cell* **21** (8), 2378-2390.
- Wang, S.Y., Sun, T. und Faust, M. (1986).** Translocation of paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor, in apple seedlings. *Plant Physiol* **82** (1), 11-14.
- Wegel, E., Schauser, L., Sandal, N., Stougaard, J. und Parniske, M. (1998).** Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *Mol Plant Microbe Interact* **11** 933-963.
- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S. und Gianinazzi-Pearson, V. (2004).** Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **17** (12), 1385-1393.
- Weier, D., Thiel, J., Kohl, S., Tarkowska, D., Strnad, M., Schaarschmidt, S., Weschke, W., Weber, H. und Hause, B. (2014).** Gibberellin-to-abscisic acid balances govern development and differentiation of the nucellar projection of barley grains. *J Exp Bot* **65** (18), 5291-5304.
- Wen, C.K. und Chang, C. (2002).** Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14** (1), 87-100.
- Wenzel, C.L., Williamson, R.E. und Wasteneys, G.O. (2000).** Gibberellin-induced changes in growth anisotropy precede gibberellin-dependent changes in cortical microtubule orientation in developing epidermal cells of barley leaves. Kinematic and cytological studies on a gibberellin-responsive dwarf mutant, M489. *Plant Physiol* **124** (2), 813-822.
- Werner, G.D. und Kiers, E.T. (2015).** Partner selection in the mycorrhizal mutualism. *New Phytol* **205** (4), 1437-1442.
- Williams, J., Phillips, A.L., Gaskin, P. und Hedden, P. (1998).** Function and substrate specificity of the gibberellin 3beta-hydroxylase encoded by the Arabidopsis GA4 gene. *Plant Physiol* **117** (2), 559-563.
- Wisniewska, M. und Golinowski, W. (2011).** Immunolocalization of a-expansin protein (NtEXPA5) in tobacco roots in the presence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae* Nicol. & Gerd. *Acta Biol Cracov Ser Bot* **53** (2), 113-123.
- Wu, S., Lee, C.M., Hayashi, T., Price, S., Divol, F., Henry, S., Pauluzzi, G., Perin, C. und Gallagher, K.L. (2014).** A plausible mechanism, based upon Short-Root movement, for regulating the number of cortex cell layers in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (45), 16184-16189.
- Wulf, A., Manthey, K., Doll, J., Perlick, A.M., Linke, B., Bekel, T., Meyer, F., Franken, P., Küster, H. und Krajinski, F. (2003).** Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **16** (4), 306-314.
- Xu, Y.L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J., Gage, D.A. und Zeevaart, J.A. (1995).** The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (14), 6640-6644.
- Xue, L., Cui, H., Buer, B., Vijayakumar, V., Delaux, P.M., Junkermann, S. und Bucher, M. (2015).** Network of GRAS transcription factors involved in the control of arbuscule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **167** (3), 854-871.

- Yabuta, T. (1935).** Biochemistry of the 'bakanae' fungus of rice. *Agric Hort (Tokyo)* **10** 17-22.
- Yamaguchi, S., Saito, T., Abe, H., Yamane, H., Murofushi, N. und Kamiya, Y. (1996).** Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme ent-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). *Plant J* **10** (2), 203-213.
- Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M. und Parniske, M. (2008).** CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (51), 20540-20545.
- Yasumura, Y., Crumpton-Taylor, M., Fuentes, S. und Harberd, N.P. (2007).** Step-by-step acquisition of the gibberellin-DELLA growth-regulatory mechanism during land-plant evolution. *Curr Biol* **17** (14), 1225-1230.
- Yaxley, J.R., Ross, J.J., Sherriff, L.J. und Reid, J.B. (2001).** Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiol* **125** (2), 627-633.
- Yokota, K., Soyano, T., Kouchi, H. und Hayashi, M. (2010).** Function of GRAS proteins in root nodule symbiosis is retained in homologs of a non-legume, rice. *Plant Cell Physiol* **51** (9), 1436-1442.
- Yoshida, H., Hirano, K., Sato, T., Mitsuda, N., Nomoto, M., Maeo, K., Koketsu, E., Mitani, R., Kawamura, M., Ishiguro, S., Tada, Y., Ohme-Takagi, M., Matsuoka, M. und Ueguchi-Tanaka, M. (2014).** DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (21), 7861-7866.
- Yoshida, S. und Parniske, M. (2005).** Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **280** (10), 9203-9209.
- Yu, N., Luo, D., Zhang, X., Liu, J., Wang, W., Jin, Y., Dong, W., Liu, J., Liu, H., Yang, W., Zeng, L., Li, Q., He, Z., Oldroyd, G.E. und Wang, E. (2014).** A DELLA protein complex controls the arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. *Cell Res* **24** (1), 130-133.
- Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y. und Sun, T.P. (2007).** Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19** (10), 3037-3057.
- Zhang, D., Iyer, L.M. und Aravind, L. (2012).** Bacterial GRAS domain proteins throw new light on gibberellic acid response mechanisms. *Bioinformatics* **28** (19), 2407-2411.
- Zhang, Q., Blaylock, L.A. und Harrison, M.J. (2010).** Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **22** (5), 1483-1497.
- Zhang, X., Dong, W., Sun, J., Feng, F., Deng, Y., He, Z., Oldroyd, G.E. und Wang, E. (2015a).** The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *Plant J* **81** (2), 258-267.
- Zhang, X., Pumplun, N., Ivanov, S. und Harrison, M.J. (2015b).** EXO70I is required for development of a sub-domain of the periarbuscular membrane during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Biol* **25** (16), 2189-2195.
- Zhang, Z.L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. und Sun, T.P. (2011).** Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (5), 2160-2165.
- Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., Zhu, X., Mander, L.N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. und He, Z. (2006).** ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18** (2), 442-456.
- Zuccaro, A., Lahrman, U. und Langen, G. (2014).** Broad compatibility in fungal root symbioses. *Curr Opin Plant Biol* **20** 135-145.





## Abbildungsverzeichnis

1.1	Kolonisierungsverlauf der Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose (Arum-Typ).....	3
1.2	Der Gemeinsame Symbiose Signalweg der AM- und Wurzelknöllchensymbiose in <i>M. truncatula</i> .....	8
1.3	Typischer Domänenaufbau von GRAS-Proteinen.....	13
1.4	Interaktionen zwischen GRAS-Proteinen in der AM-Symbiose.....	19
1.5	GA-Biosynthese und ihre Rückkopplungsmechanismen.....	21
1.6	Modell der GA-GID1-vermittelten DELLA-Degradierung im GA-Signalweg.....	22
2.1	Expressionsanalyse verschiedener GRAS-Gene nach Behandlung mit Sporextrakt.....	28
2.2	Orientierung und Homologie der Genduplikationen <i>MIG1</i> , <i>MIG2</i> und <i>MIG3</i> .....	29
2.3	Expression von <i>MIG1</i> , <i>MIG2</i> und <i>MIG3</i> nach Behandlung mit SE.....	30
2.4	Expression in mykorrhizierten WT <i>M. truncatula</i> .....	31
2.5	Expression in mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> Wurzelkulturen.....	32
2.6	Expression der <i>MIG</i> -Gene in Phosphat-behandelten Wurzelkulturen.....	33
2.7	Korrelationsanalyse der Expression der <i>MIG</i> -Gene und dem Arbuskelmarker <i>PT4</i> ..	34
2.8	Motive in den GRAS-Domänen der <i>MIG</i> -Proteine.....	34
2.9	Dreidimensionale Struktur der GRAS-Domäne der <i>MIGs</i> .....	35
2.10	Phylogenetische Analyse der GRAS-Proteinfamilie.....	36
2.11	Phylogenetische Analyse des <i>MIG1</i> -Astes.....	38
2.12	<i>In silico</i> Analyse der Proteinsequenzen des <i>MIG1</i> -Astes.....	40
2.13	Vorhersage der intrinsischen Unordnung der <i>MIGs</i> .....	41
2.14	Transaktivierungstest in <i>S. cerevisiae</i> .....	42
2.15	<i>In silico</i> Promotoranalyse von <i>MIG1</i> , <i>MIG2</i> und <i>MIG3</i> .....	43
2.16	Expressionsanalyse von <i>MIG1</i> mit Hilfe eines Promotorreporters.....	45
2.17	Expressionsanalyse von verkürzten <i>MIG1</i> -Promotorsequenzen.....	46
2.18	Expressionsanalyse in Wurzelkulturen mit dem Konstrukt P35S- <i>MIG1</i> -RNAi.1.....	47
2.19	Verwendete RNAi-Konstrukte zur Herunterregulation des <i>MIG1</i> -Transkripts.....	48
2.20	Herunterregulation von <i>MIG1</i> in <i>composite</i> Pflanzen durch das Konstrukt PATUBI3- <i>MIG1</i> -RNAi.3.....	50
2.21	Phänotypische Evaluation und Quantifizierung der Mykorrhizierung in PATUBI3- <i>MIG1</i> -RNAi.3 <i>composite</i> Pflanzen.....	51
2.22	Herunterregulation von <i>MIG1</i> in <i>composite</i> Pflanzen durch das Konstrukt PMtPT4- <i>MIG1</i> -RNAi.3.....	52
2.23	<i>MIG1</i> -RNAi Wurzeln zeigen eine spezifische Induktion der Expression des GRAS-Gens <i>NSP2</i> .....	53

2.24	Expression von GA-Oxidasen in mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> Wurzeln.....	55
2.25	Expression von GA-Oxidasen nach Behandlung mit GA <sub>3</sub> oder PAC.....	56
2.26	Interaktionsanalyse von MIG1 und dem GA-Rezeptor GID1c im Y2H System.....	57
2.27	Expression von <i>MIG1</i> nach Behandlung mit GA <sub>3</sub> oder PAC.....	58
2.28	Expression der <i>MIG</i> -Gene in MIG1 OE Wurzelkulturen.....	59
2.29	Expression der GA-Oxidasen in MIG1 OE Wurzeln.....	59
2.30	Makroskopische Morphologie von 15 d GA <sub>3</sub> - bzw. PAC-behandelten <i>M. truncatula</i> .	61
2.31	Makroskopische Morphologie von 15 d alten WT <i>M. truncatula</i> und <i>della1/2</i> - Doppelmutanten.....	62
2.32	Makroskopische Morphologie von 5 w GA <sub>3</sub> - bzw. PAC-behandelten <i>M. truncatula</i> ...	63
2.33	Statistische Auswertung der makroskopischen Morphologie von 5 w GA <sub>3</sub> - bzw. PAC-behandelten <i>M. truncatula</i> .....	64
2.34	Mikroskopische Aufnahme von EV und MIG1 OE Wurzeln.....	65
2.35	Inkubation von EV und MIG1 OE Wurzelkulturen auf Mock-, GA <sub>3</sub> oder PAC- supplementiertem Medium.....	65
2.36	Wurzeldurchmesser von EV und MIG1 OE Wurzelkulturen inkubiert auf Mock-, GA <sub>3</sub> oder PAC-supplementiertem Medium.....	66
2.37	Analyse des Wurzeldurchmessers von MIG1 OE und Kontroll-Wurzeln.....	68
2.38	Analyse der Anzahl der Kortexschichten von MIG1 OE und Kontroll-Wurzeln.....	70
2.39	Analyse des Durchmessers und Anzahl der Kortexschichten von $\Delta\Delta$ <i>della1/2</i> und Kontroll-Wurzeln.....	71
2.40	Analyse der kortikalen Zellbreite und -länge von MIG1 OE und Kontroll-Wurzeln.....	72
2.41	Subzelluläre Lokalisation von MIG1 in <i>N. benthamiana</i> .....	74
2.42	Detektion der heterolog exprimierten GFP-Fusionen aus <i>N. benthamiana</i> Blättern..	75
2.43	Verwendete Positivkontrollen in der BiFC-Analyse.....	76
2.44	MIG1 interagiert mit DELLA1 und NSP1 in der BiFC-Analyse in beiden Richtungen	77
2.45	MIG1 interagiert mit RAD1 und DELLA2 in der BiFC-Analyse in nur eine Richtung..	78
2.46	MIG1 interagiert nicht mit RAM1, DELLA3 oder Medtr1g086970 in der BiFC- Analyse.....	78
2.47	MIG1 formt keine Homodimere oder Heterodimere mit MIG2 oder MIG3 in der BiFC-Analyse.....	79
2.48	Quantifizierung der Mykorrhizierung in MIG1 OE <i>composite</i> Pflanzen.....	81
2.49	MIG1 OE führte zu einer verminderten Expression von DELLA1/RAM1-Zielgenen während der AM-Symbiose.....	82
2.50	Analyse der Zell- und Arbuskel-morphologie mykorrhizierter MIG1 OE und EV Wurzeln.....	83
2.51	Analyse der Zellmorphologie mykorrhizierter MIG1-RNAi und EV-Wurzeln.....	84
2.52	Das nicht-degradierbare DELLA-Protein $\Delta$ 18DELLA1 komplementiert den Arbus- kelphänotyp in MIG1-RNAi Wurzeln.....	85
2.53	Analyse der Zellmorphologie durch $\Delta$ 18DELLA1 geretteter MIG1-RNAi- und Kon- troll-Wurzeln.....	86

3.1	Dimerbildung AM-assoziiierter GRAS-Proteine und mögliche Funktionsweise des Dimers MIG1-NSP1.....	97
3.2	Putative GA-Verfügbarkeit während der AM-Kolonisierung.....	103
3.3	Modell zur MIG1-vermittelten radialen Zellexpansion.....	108
5.1	Klonierung der RNAi-Konstrukte MIG1RNAi.3 und MIG1RNAi.4 in die Vektoren RNAi-PAtUBI3-DsRED und RNAi-PMtPT4-DsRED.....	134
5.2	<i>M. truncatula</i> Samen und Keimlinge.....	140
5.3.	Transformierte <i>M. truncatula</i> Pflanzen.....	141
5.4	Kultivierung und Mykorrhizierung von <i>M. truncatula</i> Wurzelkulturen.....	143
5.5	Isolierung und Herstellung von <i>R. irregularis</i> Sporenextrakt.....	144
5.6	Behandlung von <i>M. truncatula</i> Pflänzchen.....	146

## Tabellenverzeichnis

2.1	Ausgewählte Proteine des BLASTp mit RAM1, NSP1 und NSP2 als Suchsequenz.	28
2.2	Zusammenfassung der BLASTp Analyse mit dem MIG1-N-Terminus als Suchsequenz.....	37
2.3	Sequenz und Lokalisation der Promotormotive von <i>MIG1</i> , <i>MIG2</i> und <i>MIG3</i> .....	43
2.4	Übersicht der durchgeführten MIG1-RNAi Versuche.....	49
2.5	Zusammenfassung der Interaktionsanalyse <i>via</i> BiFC in <i>N. benthamiana</i> .....	79
4.1	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	112
4.2	Verwendete Agrobakterien Stämme.....	112
4.3	In dieser Arbeit klonierte Konstrukte.....	116
4.4	Konstrukte aus externer Quelle.....	118
4.5	Verwendete Oligonukleotide.....	119
4.6	Liste verwendeter Gene in dieser Arbeit.....	122
4.7	Verwendete organische Chemikalien.....	123
4.8	Verwendete Enzyme.....	124
4.9	Verwendete Kits.....	124
4.10	Verwendete Antibiotika.....	125
4.11	Lösungen für die Minipräparation von Plasmiden.....	125
4.12	Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus Sporen und Wurzeln.....	125
4.13	Lösungen zur Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	126
4.14	Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot.....	126
4.15	Lösungen zur Herstellung von Wurzelquerschnitten.....	127
4.16	Lösungen zur GUS-Färbung.....	127
4.17	Zusammensetzung von M Medium.....	128
4.18	Zusammensetzung von modifiziertem Fähræus Medium.....	129
4.19	Zusammensetzung von Long Ashton Nährlösung.....	129
4.20	Verbrauchsmaterialien.....	129
4.21	Verwendete Geräte.....	130
5.1	Verwendetes Standard PCR-Programm für die Taq-Polymerase.....	131
5.2	Verwendetes Standard PCR-Programm für die Phusion-Polymerase.....	131
5.3	Verwendetes Protokoll für die qPCR.....	137
5.4	Auflistung der Kontrollen für die BiFC.....	148





## Mein herzlicher Dank gilt...

...Prof. Dr. Natalia Requena, für die Möglichkeit mich in ihrer Arbeitsgruppe in diesem spannenden Thema einzubringen. Danke für die herzliche Betreuung, das Vertrauen und die Freiheit, meinen Forschergeist entwickeln zu können. Danke auch für die vielen Diskussionen, die mir geholfen haben den Fokus nicht zu verlieren.

...Prof. Dr. Jörg Kämper, für die Übernahme des Korreferats.

...Dr. Bruno Ebner (Institut für Stochastik), für die schnelle Hilfe bei statistischen Fragen.

...Dr. Gabriele Jürges (Botanisches Institut - Prof. Dr. Peter Nick) für ihre Hilfe, das Equipment und die geteilte Erfahrung bei dem Anfertigen von Wurzelquerschnitten.

...Dr. Sarah Reha (Botanisches Institut – Prof. Dr. Holger Puchta) für das Teilen ihrer Protokolle und die Unterstützung für die Generierung transgener Arabidopsis Pflanzen.

...Dipl.-Lebensmittelchem. Felix Urvat (IAB - Prof. Dr. Mirko Bunzel) für die aufwändige Zellwandanalyse und die geduldige Darstellung aller Ergebnisse.

...liebe Mycies, für die liebevolle und humorvolle Atmosphäre im Labor! Danke für die Hilfe bei jeglichen Belangen, eure offenen Ohren, hitzige Diskussionen und die schöne Zeit auch außerhalb der Arbeitsstunden! Sven Heidt für die Beantwortung technischer Fragen und besonders für die Hilfe bei der phylogenetischen und strukturellen Proteinanalyse. Stefanie Walter und Stephanie Heupel für ihre Hilfe bei Klonierungen in der eher stressigen Revisionszeit. Jasmin Manck-Götzenberger für ihre Mikroskopie-Kompetenz und das schnelle Korrekturlesen etlicher Seiten. Ein Dank geht auch an die früheren MycLab-Bewohner für die Etablierung und Hilfestellung bei zahlreichen Methoden. Nina Rieger für ihr geschicktes Händchen und investierte Zeit bei den Interaktions- und TA-Tests in Hefe.

...liebes Kompetenzlab, für die schöne Zeit in unserem gemeinsamen Labor. Danke für tägliche Diskussionen, witzige Auseinandersetzungen und abwechslungsreiche Zeit. Bei Stefanie Walter und Ruben Betz bedanke ich mich zudem für ihr Korrekturlesen.

...liebe Mittagspausenversüßer, die sich immer pünktlich um 12 Uhr für ein gemeinsames Mahl eingefunden haben. Danke für euren Humor und die Gabe meine Batterien für die nachmittägliche Laborarbeit aufzuladen!

...Nathalie Grün, für deine Zeit und Hilfe im Labor und einfach dafür, dass du da bist!

...den Fischers & Kämpers für die tolle Zusammenarbeit und die gemeinsamen Seminare. Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Jörg Kämper und Prof. Dr. Reinhard Fischer für ihre konstruktive Kritik und hilfreichen Anmerkungen.

...Markus für seine Unterstützung in allen Lebenslagen, seine Geduld und dafür, dass du an mich glaubst!

...Mama, Papa und Simone für euren Rückhalt und die beiden Sonnenscheine!

