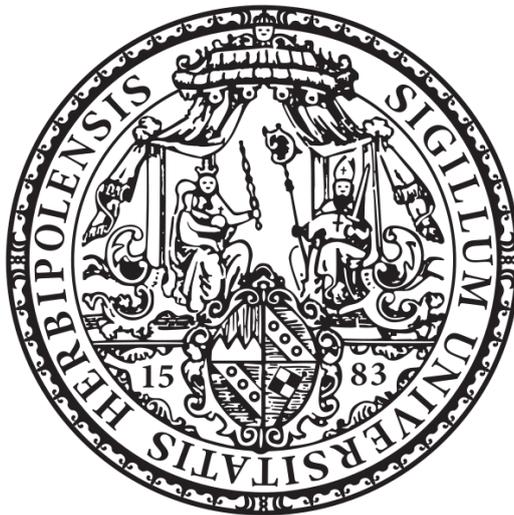


Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Genomweite Analyse der zellschichtspezifischen  
Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach  
Inokulation mit pathogenen und mutualistischen  
Mikroorganismen**



Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Christian Fröschel,  
aus Schweinfurt

Würzburg, 2016



Eingereicht am: 15.09.2016

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Rudel  
(Universität Würzburg)  
Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser  
(Universität Würzburg)  
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Angelika Mustroph  
(Universität Bayreuth)

Tag des Promotionskolloquiums: 30.11.2016

*„Walang mahirap na gawa ‘pag dinaan sa tiyaga.“*

„Nichts ist schwer zu bestehen, wenn Du es mit Ausdauer und Entschlossenheit verfolgst.“

Bedenke dabei:

*„Ang kaginhawaan ay nasa kasiyahan, at wala sa kasaganahan.“*

„Wohlbefinden steckt in Lebensfreude und nicht im Wohlstand.“

*- Meinen Freunden auf den Philippinen -*

## Vorwort

Ackerbau hat definitiv in jeder Kultur einen ganz besonderen Stellenwert, denn er bildet das Fundament der Ernährung, seitdem die Menschheit vor Jahrtausenden dauerhaft sesshaft wurde. Wahrscheinlich wird bis 2050 die Weltbevölkerung um mehr als 35%, also auf 9 Milliarden Menschen anwachsen und um alle ausreichend zu ernähren, wird sich der Anbau von Nutzpflanzen verdoppeln müssen (Foley, 2014). Der auf diese Art steigende Nahrungsmittelbedarf (Bodirsky *et al.*, 2015) könnte zur größten Herausforderung des 21. Jahrhunderts werden, weil schon heute mehr als 800 Millionen Menschen dauerhaft an Hunger und Unterernährung leiden (Scholthof, 2007). Stetig wird die Forschung im Pflanzenanbau intensiviert und die Landwirtschaft ausgedehnt. Groß angelegte Monokulturen können zwar recht wirtschaftlich bearbeitet werden, allerdings fördern diese die Ausbreitung von angepassten Pflanzenpathogenen sowie tierischen Pflanzenschädlingen (Cook und Weller, 2004), welche weltweit einen enormen Ernteverlust verursachen. Allein die Ausfälle, die auf phytopathogene Pilze zurückzuführen sind, werden mit 10% jährlich angegeben (Oerke, 2006; Lo Presti *et al.*, 2015). Es ist davon auszugehen, dass aufgrund des Klimawandels diese Verluste noch weiter zunehmen werden (Gregory *et al.*, 2009). In Anbetracht dieser Tatsachen ist es von besonderer Wichtigkeit, die hinter dem Befall steckenden Patho-Mechanismen aufzudecken, damit neue Mittel zur Schädlingsbekämpfung hergestellt, resistente Anbau-Sorten durch Präzisionszüchtung („*marker assisted selection*“, Collard und Mackill, 2008) erhalten oder resistente Sorten durch moderne Biotechnologien, wie dem sog. „*genetic engineering*“ (GE), generiert werden können (Ahmad *et al.*, 2012). Neue und aussichtsreiche Konzepte für die Landwirtschaft können entwickelt werden, wenn man mehr über das komplexe Pflanzenorgan „Wurzel“ in Erfahrung bringt, das lange in der Forschung vernachlässigt wurde, weil es nicht so leicht zugänglich ist, wie der Spross (Balmer und Mauch-Mani, 2013). Eine genaue Kenntnis über die Aufnahme von Stoffen aus dem Boden kann z.B. dazu beitragen, Ernteerträge zu steigern (Yu *et al.*, 2015). Außerdem wird ein erheblicher Teil der Ernteeinbußen durch phytopathogene Bodenorganismen verursacht (Cook und Weller, 2004). Bekanntlich stehen aber diesen Krankheitserregern wachstums- und gesundheitsfördernde mutualistische Bodenorganismen gegenüber und so gesehen ist die Pflanzenwurzel ganz zentral im Erdreich in einem facettenreichen Netzwerk mit den verschiedensten Interaktionspartnern eingebettet. Dieses gilt es in Zukunft besser verstehen zu können.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>12</b>
2.1 Die Zelltypen der Wurzel sind in Schichten organisiert	12
2.2 Die Antwort der Pflanzen auf Pathogenbefall	16
2.3 Antimikrobielle Sekundärmetaboliten und Reaktionen der Wurzel auf Mikroorganismen	21
2.4 Pilze und Oomyceten als Modell-Partner an der <i>Arabidopsis</i> -Wurzel	28
2.4.1 <i>Piriformospora indica</i> : ein mutualistischer Pilz	29
2.4.2 <i>Verticillium longisporum</i> : ein vaskuläres Wurzelpathogen	35
2.4.3 <i>Phytophthora parasitica</i> : ein pathogener Oomycet	40
2.5 Methoden zur Entschlüsselung der zellschichtspezifischen Genexpression und deren Bedeutung	46
2.6 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	51
<b>3. Material</b>	<b>52</b>
3.1 Organismen	52
3.1.1 <i>Piriformospora indica</i>	52
3.1.2 <i>Verticillium longisporum</i>	52
3.1.3 <i>Phytophthora parasitica</i>	52
3.1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
3.1.5 Bakterien	54
3.2 Nährmedien und Zusätze	55
3.2.1 Pilzmedien	55
3.2.2 Pflanzenmedien	55
3.2.3 Bakterienmedien	56
3.2.4 Medienzusätze	57
3.3 Oligonukleotide	57
3.3.1 Oligonukleotide für Klonierungen, Reverse Transkription und 3-Primer-PCR	57
3.3.2 Oligonukleotide für qRT-PCR	58

<b>3.4</b>	<b>Plasmide</b> .....	<b>60</b>
<b>3.5</b>	<b>Lösungen und Puffer</b> .....	<b>60</b>
<b>3.6</b>	<b>Größenstandards</b> .....	<b>64</b>
<b>3.7</b>	<b>Antikörper für Western-Blot</b> .....	<b>64</b>
<b>3.8</b>	<b>Enzyme</b> .....	<b>65</b>
<b>3.9</b>	<b>Software</b> .....	<b>65</b>
<b>3.10</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>66</b>
<b>3.11</b>	<b>Verbrauchsmittel</b> .....	<b>67</b>
<b>3.12</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>67</b>
<b>3.13</b>	<b>Kits</b> .....	<b>69</b>
<b>4.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Arbeiten mit Bakterien</b> .....	<b>70</b>
4.1.1	Anzucht von <i>P. syringae</i> und Infektion von Blättern.....	70
4.1.2	Bakterienkultur und –lagerung von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> ....	71
4.1.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	71
4.1.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> und Selektion.....	71
4.1.5	Herstellung chemisch kompetenter <i>A. tumefaciens</i> .....	72
4.1.6	Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> und Selektion.....	72
<b>4.2</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b> .....	<b>72</b>
4.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	72
4.2.2	Gateway®-Klonierung.....	73
4.2.3	Plasmid-Isolation (Mini-Präparation).....	74
4.2.4	DNA-Gelelektrophorese.....	74
4.2.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	75
4.2.6	Kolonie-PCR.....	75
4.2.7	Extraktion genomischer DNA.....	75
4.2.8	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	76
4.2.9	Restriktion von DNA.....	76
4.2.10	Sequenzierung von DNA.....	77
<b>4.3</b>	<b>Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA)</b> .....	<b>77</b>
4.3.1	Das RNase-freie Arbeiten.....	77
4.3.2	Extraktion von gesamt RNA für „Transkriptom“-Studien (Trizol-Protokoll).....	77
4.3.3	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	78
4.3.4	RNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA-Qualität.....	78
<b>4.4</b>	<b>Reverse Transkription (cDNA-Synthese)</b> .....	<b>79</b>

<b>4.5</b>	<b>quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)</b> .....	<b>79</b>
<b>4.6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>80</b>
4.6.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Pflanzenwurzeln .....	80
4.6.2	Western Blot Analysen .....	81
4.6.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	81
4.6.2.2	Proteintransfer auf PVDF-Membranen .....	81
4.6.2.3	Immunodetektion von FLAG-markierten Proteinen.....	81
<b>4.7</b>	<b>Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde und Transformation</b> .	<b>82</b>
4.7.1	Pflanzenanzucht auf Erde.....	82
4.7.2	Floral Dip Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	82
4.7.3	Identifizierung transgener Pflanzen durch BASTA <sup>®</sup> -Resistenz.....	83
4.7.4	Identifizierung transgener Pflanzen durch Kanamycin-Resistenz .	84
<b>4.8</b>	<b>Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> Samen</b> .....	<b>84</b>
<b>4.9</b>	<b>Infektionssysteme zur Untersuchung der Interaktion der Wurzel mit Mikroorganismen</b> .....	<b>85</b>
4.9.1	Kultivierung von Pilzen bzw. Oomyceten .....	85
4.9.2	Infektionen mit <i>Phytophthora</i> Zoosporen .....	85
4.9.3	Gewinnung von <i>Piriformospora</i> Chlamydosporen und deren Lagerung .....	86
4.9.4	Gewinnung von <i>Verticillium</i> Konidiosporen und deren Lagerung ..	86
4.9.5	Infektionslösungen mit <i>P. indica</i> bzw. <i>V. longisporum</i> .....	87
4.9.6	Infektionssystem in Erde.....	87
4.9.7	Steriles <i>in vitro</i> -Infektionssystem auf Petrischalen .....	89
4.9.8	Ernte der Wurzeln.....	90
<b>4.10</b>	<b>Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP): Methode und „Translatom“ Studien</b> .....	<b>91</b>
4.10.1	Zelltypspezifisch gestaltete Isolierung von mRNA mit Hilfe von FLAG-markierten Ribosomen .....	91
4.10.2	Extraktion von RNA aus den Ribosomen-mRNA-Komplexen im Eluat.....	95
4.10.3	Reverse Transkription von zellschichtspezifisch isolierter mRNA und Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR .....	97
4.10.4	Präparation einer cDNA-Bibliothek zur genomweiten Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung .....	97
<b>4.11</b>	<b>RNA-Sequenzierung</b> .....	<b>108</b>
<b>4.12</b>	<b>Arbeiten mit Fluoreszenzmikroskop und konfokalem Laser-Raster-Mikroskop (CLSM)</b> .....	<b>111</b>
<b>4.13</b>	<b>Allgemeine Berechnungen</b> .....	<b>111</b>
4.13.1	Bestimmung der Sporenkonzentration .....	111
4.13.2	Bestimmung der Länge der Primärwurzel .....	111

4.13.3	Berechnung der relativen Geninduktion ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode) .....	112
4.13.4	Berechnung der Transkriptmenge .....	112
4.13.5	Berechnung der relativen Blattfläche .....	112
4.13.6	Berechnung des relativen Frischgewichts .....	113
4.13.7	Berechnung der Pilz-DNA Menge .....	113
4.13.8	Berechnung der Standardabweichung (Statistik) .....	113
4.13.9	Student's <i>t</i> -Test (Statistik) .....	113
4.13.10	Benjamini Hochberg Prozedur (BH-Methode, Statistik) .....	113

## **5. Ergebnisse ..... 114**

### **5.1 Etablierung von Infektionssystemen zur Analyse der Interaktion zwischen Wurzel und Mikroorganismen..... 114**

5.1.1	System zur Infektion und Kultur in Erde: <i>V. longisporum</i> breitete sich nach Wurzel-Inokulation systemisch aus und rief Symptome hervor .....	114
5.1.3	Wachstum von <i>P. indica</i> und <i>V. longisporum</i> im sterilen <i>in-vitro</i> Infektionssystem.....	115
5.1.4	Wachstum von <i>P. parasitica</i> in einem sterilen Infektionssystem auf Agarplatten .....	117

### **5.2 Pathogen-induzierte transkriptionelle Reaktionen der gesamten Wurzel ..... 117**

### **5.3 Etablierung der TRAP-Methode zur Auflösung der zellschichtspezifischen Expression nach Befall der Wurzel durch Mikroorganismen..... 121**

5.3.1.	Beurteilung von Zelltypspezifität, Promotorstärke und versuchsbedingter Beeinträchtigung der <i>FLAG-RPL18</i> Expression .....	123
5.3.2	Immunopräzipitation von FLAG-markierten Ribosomen und Co-Immunopräzipitation von mRNA .....	126
5.3.3	Die über TRAP aufgereinigte mRNA ist allgemein ausreichend für eine Analyse mittels RNA-Sequenzierung .....	129
5.3.4	Nachweis zur Zelltypspezifität der durch TRAP aufgereinigten mRNA.....	130
5.3.5	Nach Inokulation mit Mikroorganismen zeigte das Translatom Unterschiede zum Transkriptom.....	131

### **5.4 Zellschichtspezifische Genexpression in der *Arabidopsis*-Wurzel während Interaktionen mit Bodenorganismen..... 132**

5.4.1	Auflösung der zelltypspezifischen Expression in der <i>Arabidopsis</i> -Wurzel nach Infektion mit <i>P. parasitica</i> .....	135
5.4.2	Auflösung der zelltypspezifischen Expression in der <i>Arabidopsis</i> -Wurzel nach Inokulation mit dem Mutualisten <i>P. indica</i> .....	146

5.4.3	Auflösung der zelltypspezifischen Expression in der <i>Arabidopsis</i> - Wurzel nach Infektion mit <i>V. longisporum</i> .....	153
<b>5.5</b>	<b>Validierung von Inf-TRAP-Seq Daten über eine Charakterisierung von Abwehrmechanismen gegen <i>V. longisporum</i></b> .....	<b>159</b>
5.5.1	Tryptophan-abhängige Sekundärmetaboliten mit antimikrobiellen Eigenschaften trugen zur Resistenz gegen <i>Verticillium</i> bei.....	159
5.5.2	Potentielle Regulatoren Tryptophan-abhängiger Sekundärmetaboliten verbesserten bei erhöhter Expression Pathogentoleranz	161
<b>5.6</b>	<b>Zellschichtspezifische Reaktionen der Wurzel auf Bodenorganismen im Vergleich</b> .....	<b>167</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>173</b>
6.1	Die Inf-TRAP-Seq Methodik ist ein geeignetes Verfahren zur Analyse zellschichtspezifischer Expression nach mikrobiellem Befall.....	173
6.2	Die Wurzelreaktion auf den Mutualisten <i>P. indica</i> unterscheidet sich von der auf Pathogene.....	182
6.3	Die Zellschichten der Wurzel zeigen spezifische expressionelle Antworten auf Mikroorganismen.....	187
6.3.1	Die Rhizodermis reagiert auf die Besiedlung mit <i>P. indica</i> besonders mit expressioneller Repression .....	187
6.3.2	Trp-abhängiger Sekundärmetabolismus als Beispiel für eine zelltypspezifische Lokalisation der Pathogenabwehr am Infektionsherd in den äußeren Schichten.....	188
6.3.3	Expressionell induzierte Gene in der Endodermis deuten auf eine Verstärkung der Barrieren gegen die mikrobielle Ausbreitung hin.....	194
6.3.4	Expressionelle Reaktionen im Zentralzylinder lassen einen Signalaustausch zwischen äußeren und inneren Wurzelzellschichten vermuten .....	196
6.4	Potential der Methode und Ausblick für zukünftige Studien.....	198
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>201</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>229</b>
8.1	Zellschichtspezifische Marker-Gentranskripte zur Überprüfung einer spezifischen Isolation der mRNA .....	229

8.2	Referenzgene zur Berechnung der RNA-Sequenzierungsdaten (Transkripte <sub>Gen</sub> / 1000 Referenzgentranskripte) .....	229
8.3	Erweiterung zum Inf-TRAP-Seq mit <i>P. parasitica</i> .....	230
8.4	Erweiterung zum Inf-TRAP-Seq mit <i>P. indica</i> .....	233
8.5	Erweiterung zum Inf-TRAP-Seq mit <i>V. longisporum</i> .....	233
8.6	eFP Atlas zur zellschichtspezifischen Expression der Gene <i>UBQ5</i> , <i>UBQ10</i> , <i>GAPDH</i> und <i>RHS12</i> in der Wurzel.....	235
8.7	Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die Klonierungen..	235
8.8	Klonierungsprotokoll der in dieser Arbeit generierten transgenen <i>Arabidopsis</i> -Linien: <i>pRHS12</i> , <i>DIN2 OE</i> und <i>amiERF#104/105</i> .....	238
8.9	Charakterisierung von „Loss-“ und „Gain-of-function“ transgenen Pflanzenlinien .....	242
8.9.1	Untersuchung der homozygoten <i>amiERF#104/105</i> Linie .....	242
8.9.2	Charakterisierung der <i>ERF#104</i> , <i>ERF#105</i> , <i>ERF#106</i> und <i>ERF#107</i> „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ <i>Arabidopsis</i> Linien.....	243
8.9.3	Weitere verwendete transgene Linien im Überblick .....	245
8.10	Zusatz zu den Experimenten im Infektionssystem auf Erde mit <i>V. longisporum</i> .....	247
8.11	Betrachtung von Co-Expressionen mit Atted II .....	248
8.12	ERF-Transkriptionsfaktoren und ihre Beteiligung an Stressantworten .....	249
8.13	Der stark Pathogen-induzierte Marker <i>DIN2</i> wird auch durch abiotischen Stress induziert .....	252
8.14	Eichgerade zur Bestimmung der <i>spike-in</i> Menge .....	254
8.15	Abkürzungsverzeichnis.....	256
8.16	Einheiten .....	258
8.17	Präfixe der Einheiten .....	259
8.18	Nukleotide .....	259
8.19	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGI-Codes (Accession numbers) .....	259
	<b>Danksagung .....</b>	<b>260</b>

<b>Bisherige Publikationen</b> .....	<b>263</b>
<b>Erklärung</b> .....	<b>265</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>267</b>

## Zusammenfassung

### „Genomweite Analyse der zellschichtspezifischen Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Inokulation mit pathogenen und mutualistischen Mikroorganismen“

Obwohl Pflanzenwurzeln mit einer Vielzahl von Pathogenen in Kontakt kommen, sind induzierbare Abwehrreaktionen der Wurzel bisher kaum beschrieben. Aufgrund der konzentrischen Zellschicht-Organisation der Wurzel wird angenommen, dass bei einer Immunantwort in jeder Zellschicht ein spezifisches genetisches Programm aktiviert wird. Eine Überprüfung dieser Hypothese war bisher wegen methodischen Limitierungen nicht möglich. Die zellschichtspezifische Expression Epitop-markierter ribosomaler Proteine erlaubt eine Affinitätsaufreinigung von Ribosomen und der assoziierten mRNA. Diese Methodik, als TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification) bezeichnet, ermöglicht die Analyse des Translatoms und wurde dahingehend optimiert, pflanzliche Antworten auf Befall durch bodenbürtige Mikroorganismen in Rhizodermis, Cortex, Endodermis sowie Zentralzylinder spezifisch zu lokalisieren. Die Genexpression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Inokulation mit drei Bodenorganismen mit unterschiedlichen Lebensweisen wurde vergleichend betrachtet: *Piriformospora indica* kann als mutualistischer Pilz pflanzliches Wachstum und Erträge positiv beeinflussen, wohingegen der vaskuläre Pilz *Verticillium longisporum* für erhebliche Verluste im Rapsanbau verantwortlich ist und der hemibiotrophe Oomycet *Phytophthora parasitica* ein breites Spektrum an Kulturpflanzen befällt und Ernten zerstört. Für die Interaktionsstudien zwischen *Arabidopsis* und den Mikroorganismen während ihrer biotrophen Lebensphase wurden sterile *in vitro*-Infektionssysteme etabliert und mittels TRAP und anschließender RNA-Sequenzierung eine zellschichtspezifische, genomweite Translatomanalyse durchgeführt (Inf-TRAP-Seq). Dabei zeigten sich massive Unterschiede in der differentiellen Genexpression zwischen den Zellschichten, was die Hypothese der zellschichtspezifischen Antworten unterstützt. Die Antworten nach Inokulation mit pathogenen bzw. mutualistischen Mikroorganismen unterschieden sich ebenfalls deutlich, was durch die ungleichen Lebensweisen begründbar ist. Durch die Inf-TRAP-Seq Methodik konnte z.B. im Zentralzylinder der Pathogen-infizierten Wurzeln eine expressionelle Repression von positiven Regulatoren des Zellzyklus nachgewiesen werden, dagegen in den mit *P. indica* besiedelten Wurzeln nicht. Dies korrelierte mit einer Pathogen-induzierten Inhibition des Wurzelwachstums, welche nicht nach Inokulation mit *P. indica* zu beobachten war. Obwohl keines der drei Mikroorganismen in der Lage ist, den Zentralzylinder direkt zu penetrieren, konnte hier

eine differentielle Genexpression detektiert werden. Demzufolge ist ein Signalaustausch zu postulieren, über den äußere und innere Zellschichten miteinander kommunizieren. In der Endodermis konnten Genexpressionsmuster identifiziert werden, die zu einer Verstärkung der Barriere-Funktionen dieser Zellschicht führen. So könnte etwa durch Lignifizierungsprozesse die Ausbreitung der Mikroorganismen begrenzt werden. Alle drei Mikroorganismen lösten besonders im Cortex die Induktion von Genen für die Biosynthese Trp-abhängiger, antimikrobieller Sekundärmetaboliten aus. Die biologische Relevanz dieser Verteilungen kann nun geklärt werden. Zusammenfassend konnten in dieser Dissertation erstmals die durch Mikroorganismen hervorgerufenen zellschichtspezifischen Antworten der pflanzlichen Wurzel aufgelöst werden. Vergleichende bioinformatische Analyse dieses umfangreichen Datensatzes ermöglicht nun, gezielt testbare Hypothesen zu generieren. Ein Verständnis der zellschichtspezifischen Abwehrmaßnahmen der Wurzel ist essentiell für die Entwicklung neuer Strategien zur Ertragssteigerung und zum Schutz von Nutzpflanzen gegen Pathogene in der Landwirtschaft.

## Summary

### **“Genome-wide analysis of cell-type specific expressed genes in the *Arabidopsis*-root after inoculation with pathogenic and mutualistic microorganisms”**

Although plant roots are surrounded by a plethora of microorganisms, their interactions are poorly characterized on a molecular level. Due to the concentric organization of the root cell-layers, it is anticipated that these layers contribute to pathogen defense by providing specific genetically defined programs, which build up barriers to restrict infection. Because of methodical limitations, this theory was not confirmed, yet. Immunoprecipitation of cell-layer specific expressed epitope-tagged ribosomes allows an isolation of ribosome/mRNA complexes that subsequently can be analyzed. This approach is called “Translating Ribosome Affinity Purification” (TRAP). It was optimized to identify cell-layer specific induced defenses and to be combined with a system to inoculate plant roots directly with soil-born microorganisms. Hence, this method enables molecular dissection of infected *Arabidopsis*-roots to unravel expression patterns found in rhizodermis, cortex, endodermis and central cylinder, respectively. Comparative studies were performed with three species of microorganisms having different life-styles: On the one hand the beneficial fungus *Piriformospora indica*, that can promote plant growth and crop yield and on the other hand two pathogens with the vascular fungus *Verticillium longisporum*, causing damage in oilseed rape production and the hemibiotrophic Oomycet *Phytophthora parasitica*, which causes plant damage on many crop plants. After performing TRAP with infected roots, the cell-type specific mRNA was analyzed via RNA-Sequencing resulting in a genome-wide impression of differentially expressed genes (Inf-TRAP-Seq). Massive differences occurred among the cell-layers approving the theory of cell-type specific immune responses. Moreover the defense responses varied according to inoculation with pathogenic or beneficial microorganisms probably due to their life-style. For example by using the newly established Inf-TRAP-Seq approach it was shown that positive regulators of cell proliferation were expressionally repressed in central cylinder of pathogen-infected roots but not in *P. indica* colonized roots. This correlates with the observation that root growth is suppressed after inoculation with pathogens but not after inoculation with *P. indica*. Although none of the three microorganisms is able to penetrate the central cylinder, differentially expressed genes were detected in this layer suggesting an exchange of signals to enable communication between inner and outer layers. Expression patterns were identified in the endodermis, that could lead to reinforcement of barrier functions of

this cell-layer for example by lignification-processes. By this means the propagation of the microorganisms is restricted. All three microorganisms elicited induction of genes involved in biosynthesis of Trp-derived secondary metabolites, especially in the cortex. Now the biological relevance of these distributions can be investigated additionally. Hence, within this thesis for the first time a cell-type specific resolution was obtained regarding defense responses in the *Arabidopsis*-root triggered by microorganisms. A huge dataset was generated. This can be analyzed extensively by bioinformatics and its applications to set up new hypotheses, which can be tested by further approaches. An understanding of cell-type defined root defense responses is essential to facilitate new strategies for protecting crop plants against pathogens and to increase crop yield in agriculture.

## 2. Einleitung

In der Evolution war die Entwicklung vom Einzeller zum Vielzeller sicherlich ein Quantensprung auf dem Weg zu höheren Lebensformen. Beginnend mit Prokaryoten, die zu einfachen eukaryotischen Zellen wurden, die sich anschließend gruppierten und organisierten, so dass aus vielen, vorher unabhängigen und einzelligen Individuen, ein neues und mehrzelliges Individuum entstehen konnte (Herron *et al.*, 2009). Mehrzeller entwickelten schließlich viele verschiedene Zelltypen, wobei jeder Typ bestimmte physiologische Aufgaben übernimmt, die unterschiedlicher kaum sein können, wie das folgende Beispiel aus dem Bereich der Landpflanzen verdeutlichen soll: Schließzellen passen den Gasaustausch im Blatt den äußeren Bedingungen an, während Wurzelhaarzellen Wasser aufnehmen. Das Entstehen von Zelltypen mit spezifischen Aufgaben ermöglichte im Vielzeller eine vorteilhafte Arbeitsteilung und genau dadurch konnten neue Funktionen entstehen, die in einer einzigen Zelle nicht möglich gewesen wären (Miller, 2010).

Natürlich sind die sessilen Pflanzen aufgrund wechselnder Umweltbedingungen ständig mit Stressfaktoren konfrontiert, wie etwa einem überschwemmten Boden nach heftigen Regenfällen, was eine Verminderung der Sauerstoffversorgung (Hypoxie) zur Folge hat und zusätzlich die Wahrscheinlichkeit erhöht, von einem Pathogen infiziert zu werden (Hsu *et al.*, 2013). Für den Umgang mit Stress haben alle Lebewesen im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um negative Folgen zu vermeiden oder zumindest zu verringern und besonders dafür war eine Spezialisierung in Zelltypen und ganze Gewebe wichtig. Sehr gut wird eine Aufteilung in klar abgrenzbare Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben erkennbar, wenn man die Pflanzenwurzel im Detail betrachtet.

### 2.1 Die Zelltypen der Wurzel sind in Schichten organisiert

Geht man nicht tief ins Detail, könnte man die Pflanzenwurzel nur als Wasser saugendes Organ definieren, das nebenbei das Gewächs fest im Grund verankert. Jedoch ist diese Struktur, die sich ihren Weg durch den Erdboden bahnt, um einiges vielseitiger und komplexer. Ähnlich wie sich das Sprosssystem für jeden ersichtlich oberirdisch verzweigt, bildet auch das Wurzelsystem ein ausgeprägtes Geflecht aus sogenannten Primär- und Seitenwurzeln, nur eben unterirdisch. Im Prinzip wird die Anlage der Primärwurzel bereits in der Embryonalentwicklung bestimmt, wohingegen Seitenwurzeln zwar anatomisch fast identisch aufgebaut sind, aber sekundären Ursprungs sind (van den Berg *et al.*, 1998).

Seitenwurzeln entspringen mehrfach endogen aus dem Kern der Ursprungswurzel (Malamy und Benfey, 1997). Logischerweise ist es bei ihrem Auswachsen unvermeidlich, dass sie die außen liegenden Zellen mechanisch beiseiteschieben.

Jede der im Folgenden betrachteten Wurzelzellschichten zeigt einen oder mehrere charakteristische Zelltypen, die ihre besonderen Eigenheiten durch ein individuelles Muster der Genexpression erhalten (Dolan *et al.*, 1994, van den Berg *et al.*, 1998). Wie in Abbildung 1 (Abb. 1) markiert, schließt im primären Zustand die kurzlebige Rhizodermis, bisweilen Epidermis genannt, die Wurzel nach außen hin ab (Dolan *et al.*, 1993). Dort findet man Zellen ohne Wurzelhaare, die als Atrichoblasten bezeichnet werden, und Wurzelhaarzellen, die sog. Trichoblasten. Anders als die Seitenwurzeln, die dem Wurzelkern entspringen, sind Wurzelhaare ein Teil der Rhizodermis, die als Zellauswüchse bis zu einige Millimeter weit in den Boden ragen und dadurch die Oberfläche erheblich vergrößern, um in ausreichendem Maß Wasser und Mineralien aufnehmen zu können (Dolan *et al.*, 2001, Jungk, 2001). Gehäuft treten sie in der nach ihnen benannten Wurzelhaarzone auf, die sich nach oben an die nur wenige Millimeter lange Elongationszone anschließt (Esau, 1965; Schiefelbein und Benfey, 1991). Alle Zellen nach der Elongationszone sind in ihrer Entwicklung älter und bereits fertig ausdifferenziert, weshalb man diesen Abschnitt Differenzierungszone nennt. Dort tritt die Seitenwurzelbildung auf (Malamy und Benfey, 1997).

Folgt man dem Weg des Wassers durch die Wurzel, lernt man währenddessen alle Schichten kennen. An die Rhizodermis schließt sich eine Lage aus dickeren Grundgewebszellen an, die als Cortex bezeichnet wird (Dolan *et al.*, 1993). Im primären Zustand der Wurzel erfolgt zunächst ein unselektiver Wasser- und Ionenfluss durch Rhizodermis und Cortex sowohl von Zelle zu Zelle (symplastisch) über Plasmodesmen als auch durch extrazelluläre kapillare Räume (apoplastisch). Der apoplastische Wassertransport wird abrupt an der nächsten Schicht, der Endodermis, durch undurchlässige hydrophobe Radialwände gestoppt, die den Casparischen Streifen formen (zur Übersicht siehe Grebe, 2011). Dieser Casparische Streifen in der Endodermis erzwingt für Wasser und Ionen eine rein symplastische Fortsetzung des Weges. Nur spezifisch über Translokatoren gelangen Ionen in die Zellen und damit weiter ins Innere. Diese selektive Durchtrittspforte verhindert, dass schädliche Stoffe, wie etwa Schwermetalle, über die Leitgewebe in der Pflanze verteilt werden (zur Übersicht siehe Grebe, 2011). Darüber hinaus stellen Lignin- und Suberineinlagerungen in den Zellwänden der Endodermis eine mechanische Barriere für eindringende Mikroorganismen dar (Franke

und Schreiber, 2007). Als einlagige Zellschicht grenzt die Endodermis direkt an den Zentralzylinder an und umgibt diesen komplett (Dolan *et al.*, 1993).

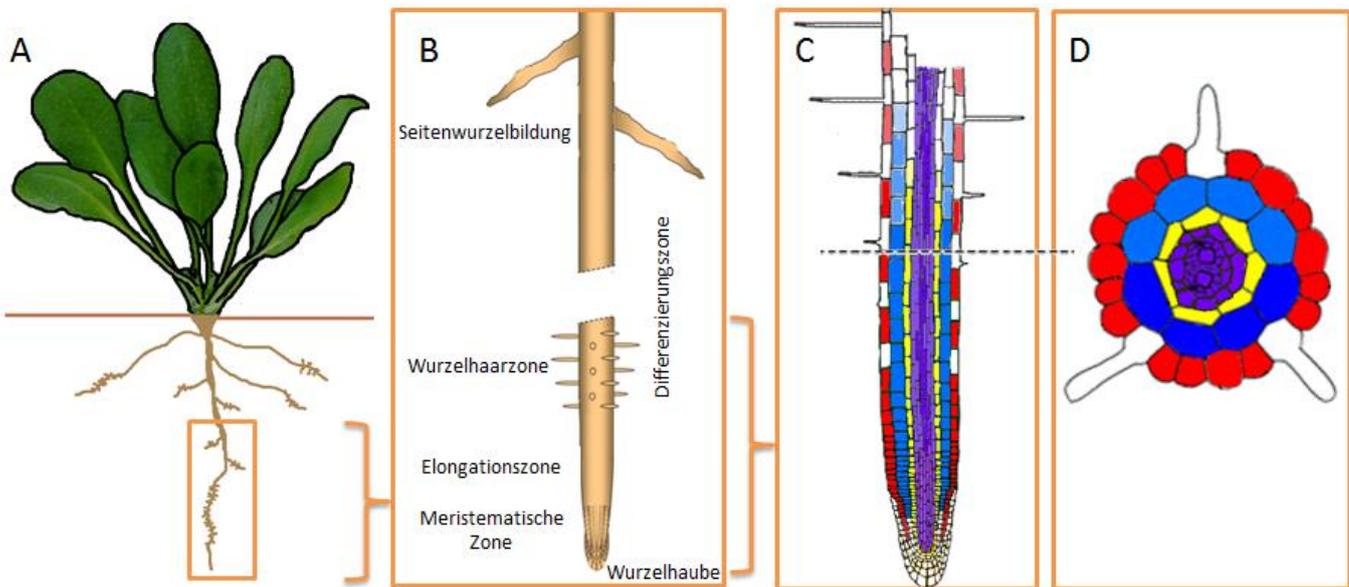


Abb. 1: Die Anatomie der dikotylen Wurzel.

A: Der Kormus der *Arabidopsis*-Pflanze mit oberirdischem Spross und dem verzweigten Wurzelsystem.

B: Genauere Betrachtung des primären Wurzelstranges. Die Wurzelzonen sind nach der klassischen Definition bezeichnet. Alle Zellen der Wurzel entspringen in der meristematischen Zone, nehmen in der Elongationszone an Volumen zu und reifen in der Differenzierungszone aus, während sich das Wurzelwachstum in Richtung der Schwerkraft fortsetzt.

C: Schematischer Längsschnitt durch ein Wurzel-Endstück im primären Zustand.

D: Schematischer Querschnitt durch eine Wurzel im primären Zustand.

Die Zellschichten sind farblich markiert: rot = Rhizodermis (Atrichoblasten), blau = Cortex; gelb = Endodermis; violett = Zentralzylinder (Abbildung verändert nach Muströph *et al.*, 2009).

Die für die Verteilung von Wasser und Nährstoffen nötigen Leitungsbahnen sind im Zentralzylinder untergebracht. Mit ihnen wird eine durchgehende und direkte Verbindung mit dem Spross hergestellt. Besonders aus diesem Grund muss nochmals die Wichtigkeit hervorgehoben werden, dass dieser Kern durch die Endodermis gut abgeriegelt wird, denn sobald Pathogene hier ankommen, ist es für sie ein Leichtes, sich über den gesamten Organismus zu verteilen. Zwei verschiedene Gewebe-Arten stellen die Leitungsbahnen auf. Eines dieser Leitgewebe, das sog. Xylem, ist für den Transport von Wasser und den darin gelösten Mineralsalzen zuständig (Sperry, 2003; McCulloh *et al.*, 2003). Seine Zellen sind verholzt und bilden hohle Röhren, in denen die Wurzel das Wasser sprossaufwärts pressen kann (Sperry, 2003). Zur Stabilisierung sind die Sekundärwände der Röhrenbildenden Zellen mit ring- und spiralförmigen Wandverdickungen versehen (Zhong und Ye, 2014), um den beim Wassertransport entstehenden Kräften, vor allem Unterdruck, standhalten zu können. Unter dem Mikroskop sind diese Wandverdickungen leicht zu erkennen und ein Charakteristikum der Xylemgefäße. Das andere Leitgewebe ist das sog. Phloem, dessen wichtigste Aufgabe der bidirektionale Transport der Assimilate der

Photosynthese und deren Verteilung ist (Lalonde, Wipf und Frommer, 2004). Xylem und Phloem verzweigen sich bis in die Spitzen der Seitenwurzeln, die immer mit der Primärwurzel verbunden bleiben. So entsteht ein eng verbundenes Wurzelgeflecht.

An der Spitze der Primär- und jeder Seitenwurzel befindet sich ein theoretisch unbegrenzt teilungsfähiges Gewebe, das apikale Wurzelmeristem. Hier ist ein Reservoir aus lediglich 4 bis 7 Stammzellen im Ruhezentrum lokalisiert (Scheres *et al.*, 1994, van den Berg *et al.*, 1998). Nach deren Teilung bleibt eine Tochterzelle als Stammzelle zurück, wohingegen die andere entweder in Richtung Wurzelhaube oder nach oben Richtung Elongationszone abgegeben wird (Scheres *et al.*, 1994). Jede abgegebene Zelle wird zur Initialzelle, aus der sich durch fortgesetzte inäquale Teilung alle Zellschichten ableiten (van den Berg *et al.*, 1998). Eine geordnete Musterbildung wird durch Hormone und regulatorische Transkriptionsfaktoren ermöglicht (van den Berg *et al.*, 1998, Sabatini *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2001). Bis zur vollständigen Ausdifferenzierung besitzen die Zellen eine nur dünne Zellwand mit wenig Cellulose. Deswegen bleiben sie dehnungsfähig und nehmen in der Elongationszone durch Aufnahme großer Mengen an Wasser in die Vakuole an Volumen zu, was letztendlich die Wurzel immer weiter nach vorne durch das Erdreich schiebt (Dolan und Davies, 2004). Das Wachstum der Hauptwurzel ist stets in Richtung des Gravitationsfeldes. Dabei ist es die Aufgabe der Wurzelhaube (Kalyptra) nicht nur das empfindliche Meristem beim Wachstum durch den Boden zu schützen, sondern auch die Richtung der Schwerkraft zu erkennen und das Wurzelwachstum daraufhin zu koordinieren (Darwin und Darwin, 1880; Baluška *et al.*, 2009).

Als Rhizosphäre bezeichnet man die direkte Umgebung der Wurzel, wo sie sich mit einem artenreichen Mikrobiom auseinandersetzen muss (Philippot *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2015). Wurzeln geben eine ganze Reihe von Exsudaten in den Boden ab, was Mikroorganismen selektiv anlockt (Bais *et al.*, 2006) und deshalb verwundert es auch nicht sonderlich, dass zahlreiche Interaktionen mit anderen Organismen über die Wurzel ablaufen. Diverse Symbiosen, unter ihnen die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) mit Pilzen oder die Knöllchenbildung mit Stickstoff fixierenden Bakterien (Rhizobien), sind bisher bekannt und untersucht (Matamoros *et al.*, 2003; Prell und Poole, 2006; Smith, 2008; Gutjahr und Parniske, 2013; Delaux *et al.*, 2013). Dadurch, dass jeder Partner der Symbiose präzise Aufgaben übernimmt, können beide Seiten profitieren. Neben solch hilfreichen Bündnissen tobt unter der Erde aber auch ein erbitterter Kampf gegen Pathogene. Dass Pflanzen bei Weitem nicht schutzlos der enormen Anzahl an phytopathogenen Pilzen, Bakterien oder Viren ausgeliefert sind und sie sich dank eines Immunsystems recht gut verteidigen, wird durch eine Zusammenstellung bisher erzielter Erkenntnisse sehr deutlich.

## 2.2 Die Antwort der Pflanzen auf Pathogenbefall

Im Laufe der Evolution entwickelten Pflanzen sowohl in Blättern als auch in Wurzeln ein komplexes Arsenal an Abwehr- und Resistenzmechanismen, mit denen sie sich gegen Krankheitserreger zur Wehr setzen können. Die erste Schutzschicht gegen eindringende Viren, Bakterien und Pilze in den Blättern ist die kompakte Epidermis mit ihrer aufliegenden hydrophoben Cuticula, welche sich aus den beiden Polymeren Cutin und Cutan sowie darin eingebetteten Wachsen zusammensetzt (Pollard, *et al.*, 2008). In den Wurzeln legen die Rhizodermis bzw. im sekundären Zustand die Exodermis eine äußere und die suberinisierte Endodermis eine innere Schutzschicht an (Franke und Schreiber, 2007). Zusätzlich werden als präformierte Verteidigung antibiotische Sekundärmetaboliten, sog. Phytoanticipine (z.B. Saponine, cyanogene Glykoside, Glucosinolate), in Zellwände oder Vakuolen eingelagert (VanEtten *et al.*, 1994). Allerdings sind diese konstitutiven Barrieren nicht unüberwindbar, denn mit Hilfe von lytischen Enzymen oder über Wunden und natürliche Öffnungen, wie Stomata, können sich Mikroorganismen Zugang ins Innere verschaffen (Melotto *et al.*, 2006; Melotto *et al.*, 2008). Ziel der heterotrophen Invasoren ist es, die organischen Ressourcen der autotrophen Pflanzen zu erschließen. Doch die Ausbreitung der Mikroorganismen schadet der Pflanze. Fast immer wird die Anwesenheit von Krankheitserregern rechtzeitig über ein raffiniertes Warnsystem festgestellt und Abwehrmaßnahmen können eingeleitet werden (Dangl und Jones, 2001; Ingle *et al.*, 2006). Dabei hat das Wahrnehmungsprinzip zur „Fremd-Erkennung“ bei pflanzlichen Organismen erstaunliche Parallelen zur tierischen Immunität (Nürnberger *et al.*, 2004; Clay *et al.*, 2009; Boller und Yang He, 2009). Anders als Tiere besitzen Pflanzen zwar kein auf Abwehr spezialisiertes Organsystem mit mobilen Abwehrzellen, jedoch trägt jede einzelne Pflanzenzelle selbst einen angeborenen Mechanismus in sich, mit dem Pathogene erkannt und Bekämpfungsmaßnahmen eingeleitet werden können (zur Übersicht siehe Ausubel, 2005). Man spricht in diesem Fall von einem zellinhärenten Immunsystem. Weil die Existenz eines Pflanzen-Immunsystems lange umstritten war, führte diese neue Erkenntnis zu einem Paradigmenwechsel in der Pflanzenpathologie (Boller und Yang He, 2009). In der Membran jeder Pflanzenzelle sind hochsensible Rezeptoren verankert, über die Erreger auf den Blättern oder im Umfeld der Wurzeln anhand typischer Oberflächenstrukturen bzw. Stoffwechselprodukte erkannt werden (Boller und Felix, 2009). Die wichtigsten Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen sind in Abb. 2 schematisch zusammengefasst. Mikrobielle Muster, die spezifisch an den entsprechenden pflanzlichen Rezeptor binden, werden unter dem

Sammelbegriff MAMPs (engl.: microbe-associated molecular patterns) oder weniger allgemein auch PAMPs (engl.: pathogen-associated molecular patterns) zusammengefasst (zur Übersicht siehe: Ausubel, 2005; Jones und Dangl, 2006; Ingle *et al.*, 2006). Häufig auftretende MAMPs sind Chitin und Ergosterol aus Pilzzellwänden, Lipopolysaccharide (LPS) aus Zellwänden gram-negativer Bakterien oder Flagellin, ein essentielles Grundpeptid des bakteriellen Fortbewegungsapparates, der sog. Geißel (Felix *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Ingle *et al.*, 2006; Chinchilla *et al.*, 2007; Millet *et al.*, 2010; Klemptner *et al.*, 2014). Wie man schon an der Aufzählung der Beispiele erahnen kann, handelt es sich bei MAMPs um evolutiv stark konservierte Moleküle, die nicht nur einer Art, sondern einer ganzen Gruppe von Mikroben eigen ist (Schwessinger und Zipfel, 2008). Abgesehen von den MAMPs können auch pflanzeigene Moleküle eine Abwehrreaktion induzieren, denn bei einem Invasionsversuch kommt es zum Herauslösen von pflanzlichen Zellbausteinen, was genauso ein Warnsignal darstellt. Bezeichnenderweise wurde dafür der Begriff DAMPs (engl.: damage-associated molecular patterns) eingeführt (Matzinger, 2007). DAMPs können unter anderem bei der enzymkatalysierten Lyse der Pflanzenzellwand freigesetzt werden. Sobald MAMPs oder DAMPs an die Außenseite der Cytoplasmamembran gelangen, werden sie von spezifischen „pathogen-recognition-receptors (PRRs) registriert (Shiu und Bleecker, 2001; Fritz-Laylin *et al.*, 2005). Diese sind transmembran und gehören zur Gruppe der LRR-Rezeptorkinasen (engl.: LRR = Leu-cin-rich-repeat)(Boller und Felix, 2009). Für die Chitinerkennung ist ein Rezeptor identifiziert worden, der als RLK CERK1 bezeichnet wird (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Nachdem der Rezeptor seinen Liganden gebunden hat, wird das Signal ins Zellinnere weitergeleitet und ein komplexer Mechanismus, der in der transkriptionellen Aktivierung von Genen oder in der Aktivierung von Enzymen endet, setzt sich in Gang (Scheel, 1998). Verschiedenartige MAMPs aktivieren meist sich überschneidende Reaktionen und münden in einer gemeinsamen Antwort (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2008). Die durch MAMPs induzierten Signaltransduktionswege schließen MAP-Kinase-Kaskaden (MAP = Mitogen-aktiviertes Protein),  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, NO-Signale, Protein-Protein-Interaktionen sowie die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren mit ein (Altenbach und Robatzek, 2007; Bittel und Robatzek, 2007). Aufgrund einer dadurch ausgelösten Basalresistenz (PTI, engl.: PAMP-triggered Immunity) sind, in Anbetracht der bedrohlichen Vielzahl von Mikroorganismen, Infektionen äußerst selten. Nur ein kleiner Teil angepasster Pathogene kann auch Pflanzen befallen (Jones und Dangl, 2006; Lipka *et al.*, 2008). Man spricht von einer Nicht-Wirts-Resistenz, wenn eine Pflanzenart eine Basalresistenz (PTI, Abb. 2 A) gegen einen Erregertyp besitzt und somit nicht zur Wirtspflanze wird

(Nürnberg und Lipka, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Resultate der angeborenen Immunantwort sind unter anderem eine Verstärkung der Zellwände und eine Einlagerung von Callose, was das Eindringen erschwert (Hückelhoven, 2007). Des Weiteren werden zur direkten Eliminierung der Invasoren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), PR-Proteine (engl.: *pathogenesis-related*) und antimikrobielle Sekundärmetaboliten synthetisiert (Altenbach und Robatzek, 2007). Die ROS haben hier wahrscheinlich eine direkte antibiotische Wirkung und spielen zusätzlich eine Rolle bei der oxidativen Quervernetzung der Zellwände zur Erhöhung der Stabilität (Lamb und Dixon, 1997). Bei den induzierten PR-Proteinen handelt es sich um eine ausgedehnte Gruppe von unspezifisch wirkenden Proteinen mit Chitinasen, Lipasen, RNasen, Proteinasen und Glucanasen als prominenteste Mitglieder (van Loon, 1985; Scheel, 1998). Um die präformierten antibiotischen Phytoanticipine von den aufgrund des Pathogenbefalls *de novo* produzierten antimikrobiellen Substanzen abzugrenzen, werden letztgenannte als Phytoalexine zusammengefasst (VanEtten *et al.*, 1994). Ein wichtiges Phytoalexin bei *Arabidopsis* ist Camalexin, auf das später näher eingegangen wird.

Durch die Entwicklung von Virulenzfaktoren ist es im Laufe der Zeit einigen Pathogenen möglich geworden, die Basalabwehr abzuschwächen. Das kann zum einen dadurch zustande kommen, dass sich Toleranzen gegenüber den pflanzlichen Gegenmaßnahmen entwickeln, z.B. durch den enzymatischen Abbau der toxischen Phytoalexine (Pedras und Ahiachonu, 2005). Zum anderen können in die Pflanzenzelle transferierte Effektor-Moleküle bestimmte Komponenten der Basalabwehr inhibieren und somit die Signaltransduktion zur Koordination der Abwehrmaßnahmen supprimieren (Dangl und Jones, 2001; Mackey *et al.*, 2002; Ingle *et al.*, 2006). Dann hat der angepasste Mikroorganismus die Fähigkeit erlangt, die Pflanze zu besiedeln, sei es als mutualistischer Partner oder als Krankheitsauslöser (Abb. 2 B). Zuweilen kann auch eine Veränderung der MAMPs dazu führen, dass sie nicht mehr an den pflanzlichen Rezeptor binden, wodurch die Mikroorganismen nicht mehr erkannt werden und Abwehrmaßnahmen ausbleiben (z.B. Latgé und Beauvais, 2014) (Abb. 2, D). Unter dem auf den suszeptiblen Wirtspflanzen lastenden Selektionsdruck prägte sich in der Co-Evolution mit den Pathogenen ein weiterer Resistenz-Mechanismus aus, der unter den Begriff der „Effektor-ausgelösten Immunität“ (ETI, engl.: *Effector triggered Immunity*; Abb. 2, C) fällt (Jones und Dangl, 2006). Laut der Gen-für-Gen-Hypothese enthält das Pflanzengenom in diesem Fall ein Resistenzgen, dessen Genprodukt (R-Protein) einen Effektor des Pathogenes erkennt (Flor, 1971; Dangl und Jones, 2001). Entweder kann die Erkennung durch eine direkte physikalische Interaktion der R-Proteine mit den Effektoren vermittelt werden (Dodds und

Rathjen, 2010) oder durch ein indirektes Erkennungsprinzip, das in zwei Modellen erklärt wird: In der „*Guard Hypothese*“ „überwacht“ das R-Protein das Ziel des Effektors und jede Modifikation an diesem Ziel durch den Effektor führt zur Aktivierung des R-Proteins, was wiederum die ETI auslöst (Dangl und Jones, 2001). Die „*Decoy Hypothese*“ beschreibt, dass das R-Protein das Ziel des Effektors nachahmt (z.B. in Strukturbereichen) und somit auch durch den Effektor modifiziert werden kann, wobei jede Modifikation am R-Protein zur ETI führt (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Sobald die ETI ausgelöst wurde, verstärken sich die Abwehrreaktionen (Jones und Dangl, 2006) und genau das ist überwiegend der Fall, denn im Zuge der Auseinandersetzung mit Pathogenen haben Pflanzen sehr viele Resistenzgene hervorgebracht.

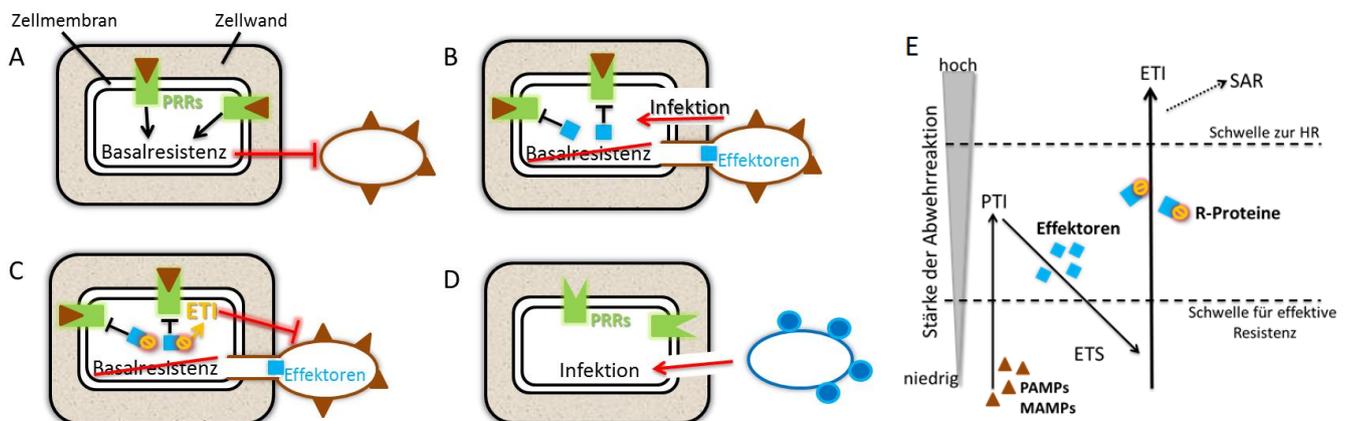


Abb. 2: **Verschiedene Mechanismen und Konsequenzen der Pflanze-Pathogen Interaktion.**

A-D zeigen jeweils eine Pflanzenzelle (abgerundetes Rechteck) und einen Mikroorganismus (oval).

- A: PAMP-triggered Immunity (PTI). Konservierte Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen (PAMPs, oder allgemein MAMPs, z.B. Chitin) werden durch transmembrane „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) erkannt. Daraufhin wird eine Basalresistenz in der Zelle induziert und das Pathogen wird eliminiert oder an der Penetration gehindert. Eine Infektion bleibt aus, die Pflanze erweist sich als resistent.
- B: Erfolgreich angepasste Mikroorganismen injizieren mittels eines Typ-III-Sekretionssystems Effektor-Moleküle in die Pflanzenzelle (blaue Quadrate). Diese blockieren die Signaltransduktionswege zur Basalresistenz. Nicht angepasste Pflanzen besitzen kein Resistenzgen, um die Effektoren zu erkennen und somit bleibt eine Abwehrreaktion aus. Eine Infektion bzw. Besiedlung mit dem Fremdorganismus ist die Folge. Die Pflanze ist suszeptibel (Effector-triggered Susceptibility, ETS).
- C: Effector-triggered Immunity (ETI). Die von den Mikroorganismen injizierten Effektoren (blaue Vierecke) können zwar die Signaltransduktionswege zur Basalresistenz inhibieren, werden aber in resistenten Pflanzen von speziellen Resistenzgen-Produkten (R-Proteine, orange) erkannt. Es kann die „Effektor-ausgelöste Immunreaktion“ (ETI) eingeleitet werden. Eine starke und anhaltende Pflanzenabwehr, die oft mit einer hypersensitiven Reaktion (HR) einhergeht, ist die Folge.
- D: In seltenen Fällen können veränderte Oberflächenstrukturen der Mikroorganismen von den pflanzlichen PRRs nicht mehr erkannt werden, die basale Immunreaktion bleibt aus und es kommt zur Infektion bzw. Besiedlung durch den Fremdorganismus. Die Pflanze ist suszeptibel.
- E: Das Schema zeigt das Zick-Zack Modell verändert nach Jones und Dangl (2006). Die Phasen PTI, ETS und ETI sind oben erläutert. Die ETI ist eine stärkere Reaktion als die PTI und überschreitet häufig die Schwelle zur Induktion der HR. Die HR wiederum kann dazu führen, dass systemische Abwehrreaktionen eingeleitet werden (SAR).

Normalerweise sind Effektoren für die Kolonisierung des Wirtes essentiell und nur in solchen Wirtsspezies bzw. -rassen, die ein komplementäres Resistenzgen tragen, lösen

sie als „spezifische Elicitoren“ die ETI aus, was im sog. Zick-Zack Modell anschaulich dargestellt ist (Abb. 2 E; Jones und Dangl, 2006). Freigesetzte radikale Sauerstoffspezies rufen in einer hypersensitiven Reaktion (HR) einen lokal begrenzten programmierten Zelltod hervor. Der Infektionsherd wird vom restlichen Gewebe abgeschottet (Lamb und Dixon, 1997; Heath, 2000; Gechev *et al.*, 2006), indem die gezielte Tötung von Pflanzenzellen in unmittelbarer Umgebung der heterotrophen Pathogenen diesen die Nahrungsgrundlage entzieht, wobei der Verlust an Gewebe vergleichsweise gering und der vorteilhafte Effekt größer ist. Häufig wird die HR davon begleitet, dass in nicht-infizierten Nachbarzellen vorbeugend Resistenzmechanismen angeschaltet werden, wodurch einer systemischen Ausbreitung des Erregers entgegengewirkt wird. Der lokale Zelltod am Infektionsherd erzeugt oft ein systemisches Signal, das in entferntem Gewebe Abwehrreaktionen hervorruft. Man spricht bei diesem Vorgang von der systemisch erworbenen Resistenz, kurz SAR (engl.: systemic acquired resistance). Von großer Bedeutung als Alarmsignal bei der Ausprägung der SAR ist Salizylsäure (Durrant und Dong, 2004). Dieses Molekül wird am Ort der Infektion freigesetzt, ein mobiles Signal verteilt sich über weite Teile der Pflanze und kann überall dort, wo es hinkommt, Abwehrreaktionen induzieren (Durrant und Dong, 2004). Des Weiteren wird auch der Ablauf der anderen Immunreaktionen durch ein Zusammenspiel von Pflanzenhormonen koordiniert. Am besten untersucht sind hierbei die Rollen von Ethylen (ET), Jasmonsäure (JA) und Salizylsäure (SA) (zur Übersicht siehe Yang *et al.*, 2015). Mit ihrer Wirkung beeinflussen Hormone die Genexpression erheblich.

Als Primärproduzenten sind Pflanzen stets ein lohnendes Ziel für heterotrophe Organismen, aber erst wenn ein Mikroorganismus in der Lage ist, sämtliche Abwehrstrategien zu überstehen, kann er sich in der Pflanze ausbreiten und sie als Nährstoffquelle erschließen. Dabei kategorisiert man die Wechselbeziehung zum Wirt mit den Adjektiven nekrotroph, hemibiotroph und biotroph (Glazebrook, 2005; Zuccaro *et al.*, 2011). Biotrophe Mikroorganismen, wie der echte Mehltau *Blumeria graminis* (van Esse *et al.*, 2008) oder *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Slusarenko und Schlaich, 2003) sind darauf angewiesen, dass die Pflanze während der Besiedlung am Leben bleibt. Sie bilden eine enge Verbindung zur Wirtspflanze aus und können über einen langen Zeitraum dem Wirt Nährstoffe entziehen (Eichmann und Hückelhoven, 2008). Nur solange wie das Wirtsgewebe einen vitalen und aktiven Metabolismus besitzt, profitieren biotrophe Pilze, zu denen sowohl mutualistische als auch pathogene Arten gehören, und deshalb versuchen sie einen ausgedehnten Schaden am Pflanzengewebe zu vermeiden (Zuccaro *et al.*, 2011). Ganz anders verhalten sich nekrotrophe Pathogene, denn sie töten durch

Toxin-Sekretion aktiv pflanzliches Gewebe ab, um saprophytisch vom abgestorbenen organischen Material zu leben (van Kan, 2006). Nur wenn das Gewebe ausreichend zerstört ist, können sie von den Nährstoffen der toten Zellen profitieren (Ferrari *et al.*, 2007, Zuccaro *et al.*, 2011). Beispielorganismen dieser Kategorie sind die Pilze *Sclerotinia sclerotiorum* und *Botrytis cinerea*. Wie der Name bereits andeutet, bilden hemibiotrophe Organismen wie *Pseudomonas syringae* (Xin und He, 2013) eine Zwischenkategorie und eine zweifelsfreie Zuordnung ist hier häufig schwierig, da die Bestimmung der Grenzen schwer ist. Laut Definition sind hemibiotrophe Organismen zu Beginn ihres Lebenszyklus auf lebende Pflanzenzellen angewiesen, um einen Nutzen ziehen zu können. Doch sie töten den Wirt nur zunächst nicht, weil später eine Umschaltung in eine nekrotrophe Lebensweise erfolgt und dementsprechend schaden sie dann der Pflanze (Zuccaro *et al.*, 2011).

Charakteristisch für eine Infektion mit einem biotrophen Pathogen ist, dass hauptsächlich der SA-Signalweg aktiviert wird, dagegen JA- und ET-Signalwege unterdrückt werden. Bei der Attacke eines nekrotrophen Pathogenes werden hauptsächlich JA- und ET-Signalwege aktiviert und der SA-Signalweg wird unterdrückt (Glazebrook 2005).

Die meisten der hier aufgeführten allgemeinen Erkenntnisse über das pflanzliche Immunsystem leiten sich aus Forschungen am oberirdischen Pflanzenkörper ab. Zahlreiche Hinweise lassen aber den Schluss zu, dass die Abwehrmechanismen in Blättern und Wurzeln sehr verschieden ablaufen (Hermanns *et al.*, 2003; Jansen *et al.*, 2006). Was ist über Wurzelreaktionen bekannt?

## 2.3 Antimikrobielle Sekundärmetaboliten und Reaktionen der Wurzel auf Mikroorganismen

Obwohl sich die Wurzel das Ökosystem Boden mit einer Fülle von Mikroorganismen teilt, sind die Wechselwirkungen mit bodenbürtigen Krankheitserregern bisher nur spärlich untersucht (Okubara und Paulitz, 2005; Kidd *et al.*, 2009; Millet *et al.*, 2010; Balmer und Mauch-Mani, 2013). Verglichen mit dem Spross befinden sich die Wurzeln wohl in einer erhöhten Verteidigungsstufe, denn sie antworten transkriptionell schneller auf Pathogene und haben einen höheren Grundspiegel an Flavonoiden, welche unter anderem antimikrobielle Eigenschaften haben, was aus Studien an Mais (*Zea mays*), der mit dem Pilz *C. graminicola* infiziert war, hervorgeht (Balmer *et al.*, 2013). Flavonoide zählen zu den sekundären Metaboliten, bei denen bekannt ist, dass sie von der Wurzel in den Boden

abgegeben werden und dort auf eine Reihe von Symbionten sowie Pathogenen Einfluss nehmen (zur Übersicht siehe Weston und Mathesius, 2013). Grundsätzlich gehen sekundäre Pflanzenstoffe aus dem Primärstoffwechsel (Grundstoffwechsel) hervor, wobei ihre Produktion auf spezialisierte Zelltypen beschränkt und ihre Gegenwart für das Überleben der Pflanze nicht essentiell ist. Derartige Moleküle sind schon lange dafür bekannt, dass sie eine tragende Rolle bei der Anpassung der Pflanze an ihre Umwelt spielen (Bourgaud *et al.*, 2001) und Einiges deutet darauf hin, dass gerade die von der Wurzel sekretierten Sekundärstoffe, weitere Beispiele sind phenolische Substanzen oder Zimtsäure (*trans*-3-Phenylacrylsäure), eine zentrale Rolle in der Verteidigung der Wurzel spielen (Lanoue *et al.*, 2010). Gut untersucht ist auch die antimikrobielle Eigenschaft des Indol-Alkaloids Camalexin (3-thiazol-2'-yl-indole). Millet *et al.* (2010) konnten zeigen, dass das MAMP Flagellin sowohl die Produktion von Camalexin als auch dessen Ausscheidung aus der Wurzel stimuliert. *In vitro* inhibiert dieses Phytoalexin das Wachstum des bodenbürtigen Pilzes *Verticillium longisporum* (Iven *et al.*, 2012) und ebenso in physiologischen Konzentrationen das Wachstum des Oomyceten *Phytophthora brassicae* (Schlaeppli *et al.*, 2010). Viele weitere Pathogene lösen durch ihre Anwesenheit die lokale *de novo* Synthese von Camalexin aus, denn die niedermolekulare Substanz wirkt unspezifisch antimikrobiell (Glawischnig, 2007). Vor allem bei der Abwehr von nekrotrophen Pilzen ist seine Funktion gut belegt (Thomma *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2007; Sellam *et al.*, 2007).

Betrachtet man die Reaktionen der *Arabidopsis*-Wurzel auf genetischer Ebene während der Infektion mit *V. longisporum*, erkennt man, dass während der frühen Phase der Infektion besonders solche Gene induziert werden, deren Genprodukte eben in die Synthese sekundärer Pflanzenstoffe einfließen (Iven, 2009; Iven *et al.*, 2012). Transkriptionell induziert werden durch *Verticillium* beispielsweise Gene für Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP) und für UGT-Glycosyltransferasen (Werck-Reichhart *et al.*, 2002; Gachon *et al.*, 2005, Iven, 2009). Zwischen zwei und zehn Tagen nach Inokulation mit Pilzsporen kommt es zu einer deutlichen Akkumulation von Camalexin in der Wurzel (Iven *et al.*, 2012). Ausgangsstoff für die Synthese ist die Aminosäure Tryptophan (Trp). Die beiden Isoenzyme CYP79B2 und CYP79B3 (Cytochrom-P450-Monooxygenasen) katalysieren den ersten Schritt (Glawischnig, 2004). Aus dem Pool an Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) leiten sich neben Camalexin auch Indol-Glucosinolate (IGs) und teilweise das Pflanzenhormon Auxin (IAA) ab (Vorwerk *et al.*, 2001; Grubb und Abel, 2006). Abb. 3 gibt dazu einen anschaulichen Überblick.

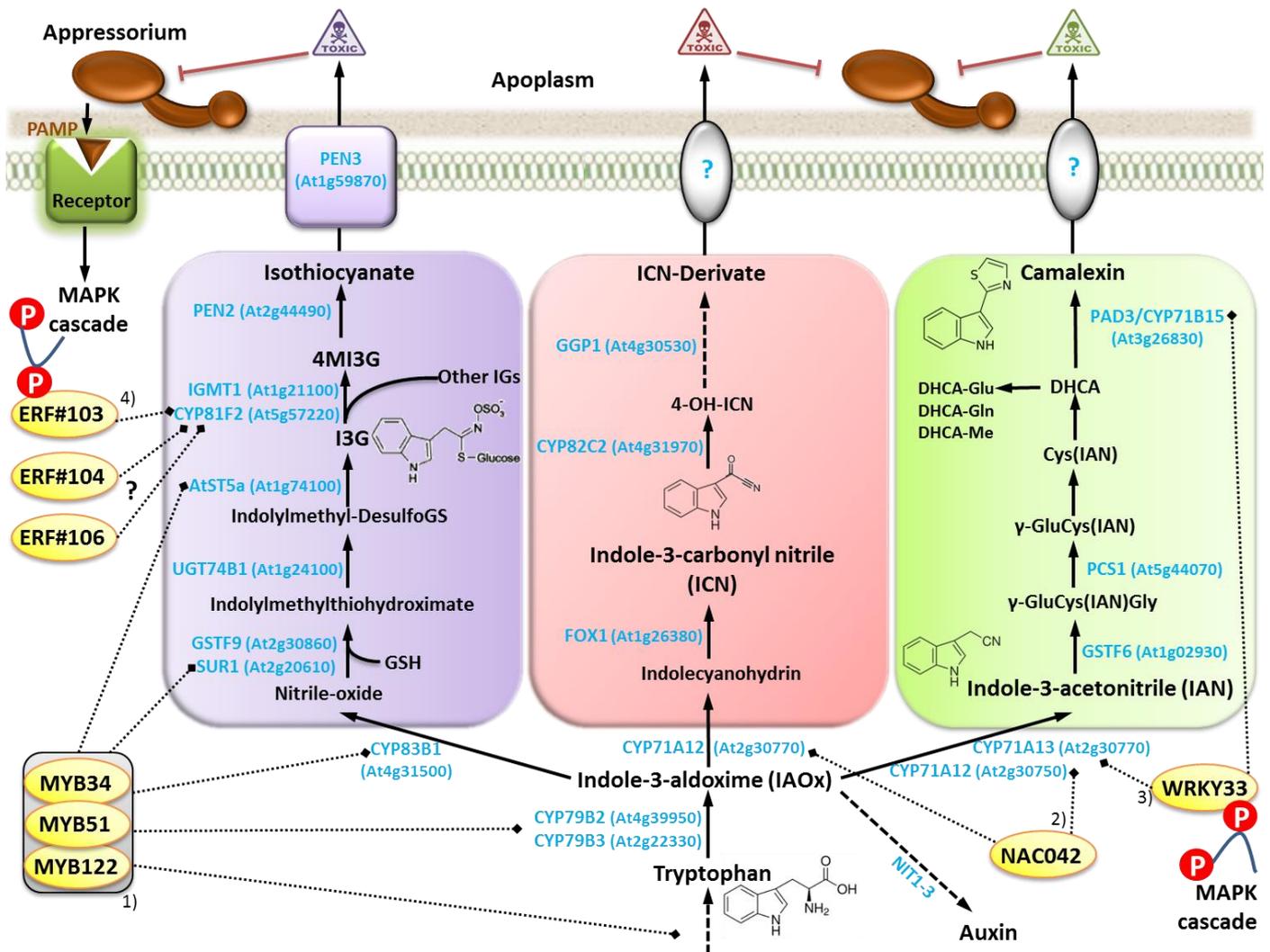


Abb. 3: **Tryptophan-abhängige Biosynthesewege führen zu Indol-Glucosinolaten, ICN (Indol-3-carbonyl-Nitril)-Derivaten und Camalexin.**

Das Schema zeigt die Biosynthese von IGs (violett), ICN-Derivaten (rot) und Camalexin (grün) in *Arabidopsis*. Pilze werden im Apoplasten anhand von PAMPs an den Rezeptoren erkannt, im Zellinneren wird das Signal zunächst über eine MAPK-Kaskade weitergeleitet und TF werden phosphoryliert. In der Folge werden wichtige Gene der Trp-abhängigen Biosynthesewege aktiviert. Alle drei Verbindungsklassen wirken antimikrobiell und gehen aus einem Pool von Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) an einem Knotenpunkt zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus hervor. Teilweise entsteht auch Auxin (IAA) über mehrere Schritte aus dem IAOx-Pool. Die wichtigsten Enzyme (blau) und Intermediate (schwarz) sind benannt. Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP) sind vielfach an Umwandelungsschritten beteiligt. Indol-3-ylmethylglucosinolat (I3G) ist das Ausgangsmolekül für eine Reihe von Indol-Glucosinolaten. Einige regulatorische TF sind im Schema eingetragen (gelb). Die davon abgehenden gepunkteten Linien deuten eine Aktivierung der Genexpression an, für die jeweils eine entsprechende Referenz angegeben ist: 1) Frerigmann und Gigolashvili, 2014; 2) Saga *et al.*, 2012; 3) Qiu *et al.*, 2008; 4) Xu *et al.*, 2016.

Die *cyp79b2/cyp79b3* Doppelmutante zeigte sich in Experimenten deutlich anfälliger gegenüber *P. brassicae* und *V. longisporum* (Schlaeppli *et al.*, 2010; Iven *et al.*, 2012). Ähnlich dazu ist auch die Kolonisation durch *Piriformospora indica* in der *cyp79b2/cyp79b3* Doppelmutante stärker ausgeprägt als im Wildtyp (Nongbri *et al.*, 2012) und weil die *cyp79b2/cyp79b3* Doppelmutante keine zusätzlichen Defekte in klassischen Abwehrwegen zeigt (z.B. ist die HR vergleichbar mit der vom Wildtyp), kann davon ausgegangen werden,

dass die jeweils beobachtete erhöhte Suszeptibilität dieser Doppelmutante wohl nur durch das Ausschalten der Sekundärmetaboliten, die Trp als Ausgangsstoff haben, verursacht wird (Schlaeppli *et al.*, 2010). Zusammengenommen wird somit den in Abb. 3 gezeigten Biosynthesewegen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pilzen und pilzähnlichen Mikroorganismen bescheinigt. Nicht nur die Gene, die für Schlüsselenzyme der Camalexin-Synthese codieren, wie etwa *CYP79B2*, werden bei einer *V. longisporum*-Infektion in der Wurzel verstärkt exprimiert, sondern auch Gene, die für Enzyme des Biosynthesewegs von Trp codieren (Iven, 2009). Das benötigte Substrat wird also gleichzeitig mit dem Verbrauch nachgeliefert.

In den Array-Experimenten von Iven *et al.* (2012) konnten ferner Geninduktionen festgestellt werden, die zu einem veränderten Indol-Glucosinolat-Spiegel führen. Dabei ist Indol-3-ylmethylglucosinolat (I3G) das Ausgangsmolekül für eine Reihe von Indol-Glucosinolaten. Zwar werden Gene, die für die I3G-Synthese benötigt werden, nicht durch *Verticillium* elicitiert, aber wahrscheinlich sind die Enzyme konstitutiv vorhanden (Iven, 2009; Bednarek *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu werden jene Gene während der Infektion verstärkt exprimiert, deren Genprodukte das I3G in andere antimikrobielle Substanzen umorganisieren. Beispielsweise wurde bei der Cytochrom-P450-Monooxygenase *CYP81F2* eine starke transkriptionelle Induktion in der Wurzel festgestellt (Iven, 2009). Das Enzym katalysiert eine der Umwandlungen von I3G und ist für die Herstellung von 4MI3G nötig (4-methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat), denn in der *cyp81f2* Mutante sind nur sehr geringe Spuren an 4MI3G vorhanden (Bednarek *et al.*, 2009; Iven *et al.*, 2012). Schwefelhaltige Glucosinolate oder Senfölglycoside sind charakteristische Sekundärmetaboliten der *Brassicaceae*, einschließlich *Arabidopsis* (Halkier und Gershenzon, 2006) und in erster Linie bekannt als präformierte Abwehrstoffe gegen Insektenfraß (Rask *et al.*, 2000; Grubb und Abel, 2006). Vor wenigen Jahren konnte aber gezeigt werden, dass sie auch effektiv gegen Pilze und Oomyceten wirken (Sellam *et al.*, 2007; Clay *et al.*, 2009; Bednarek *et al.*, 2009; Schlaeppli *et al.*, 2010) und dass ihre Gegenwart in der Rhizosphäre einen direkten Einfluss auf das Mikrobiom in der Umgebung der Wurzel hat (Rumberger und Marschner, 2003; Bressan *et al.*, 2009). Zur Abwehr von Mikroorganismen wird durch eine verstärkte Enzym-Präsenz die Umwandlungsreaktion von I3G in ein potentiell Abwehr-Produkt gefördert (Bednarek *et al.*, 2009). Mehr *CYP81F2* beispielsweise führt zu mehr 4MI3G. In aller Regel wird die finale Freisetzung der biologisch aktiven Komponenten aus den Glucosinolaten durch Enzyme katalysiert, die als Myrosinasen bezeichnet werden (Luethy und Matile, 1984; EC 3.2.1.147). Myrosinasen sind  $\beta$ -Glucosidasen, die Zuckerreste von nicht-toxischen

Glucosinolaten abspalten und dabei bioaktive und toxische Aglykone freisetzen (Bones und Rossiter, 1996; Rask *et al.*, 2000). Myrosinasen werden räumlich getrennt von IGs in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle gelagert und erst wenn die Zelle mechanisch zerstört wird, z.B. durch Insekten oder invasive Pilze, kommen Enzym und Substrat in Kontakt und setzen das toxische Produkt frei (Luethy und Matile, 1984). In Blättern katalysiert das Myrosinase-ähnliche Enzym PEN2 die Spaltung von 4MI3G, so dass fungizide Produkte frei werden, wobei noch nicht näher charakterisierte Produkte aus 4MI3G eine wichtige Rolle während der Pilz-Penetration der äußeren Zellschichten zu spielen scheinen (Lipka *et al.*, 2005; Bednarek *et al.*, 2009; Bednarek *et al.*, 2012). *PEN3* codiert für einen ABC-Transporter, der in der Plasmamembran lokalisiert ist. Ein aktuelles Modell beschreibt, dass PEN2 in unmittelbarer Nachbarschaft zu PEN3 eine aktive Komponente freisetzt, wahrscheinlich Isothiocyanat, die dann von PEN3 in den Apoplasten sekretiert wird, um dort das Wachstum von Pilzen einzuschränken (Stein *et al.*, 2006; Bednarek *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2014). Interessanterweise wurde in einer Transkriptom-Studie festgestellt, dass *PEN2* in Wurzeln, die mit *Verticillium* infiziert sind, nur recht schwach transkriptionell aktiviert wird, dagegen aber ein *PEN2*-ähnliches Gen, als *PEL1* (*PEN2-LIKE1*) bezeichnet, äußerst stark (Iven *et al.*, 2012). Beide Enzyme gehören zur großen Glycosid Hydrolase Protein Familie 1 und sind sehr homolog (Xu *et al.*, 2004) und so könnte PEL1 in der Wurzel 4MI3G umsetzen. Ein weiterer Verwandter und Vertreter dieser Protein Familie ist PYK10, das in der Wurzel essentiell ist, damit eine Interaktion mit mutualistischen Pilzen, wie etwa *Piriformospora indica*, zustande kommen kann (Sherameti *et al.*, 2008a). Durch zahlreiche biotische Stimuli wird außerdem die transkriptionelle Induktion von *DIN2* (*DARK INDUCIBLE 2*) in der Wurzel ausgelöst. Dieses Gen codiert für eine putative  $\beta$ -Glucosidase und gehört ebenfalls zur Glycosid Hydrolase Familie 1 (Xu *et al.*, 2004). Obwohl über Funktion und Substrat des entsprechenden Enzyms bisher nichts bekannt ist, kann das Gen als starker Marker angesehen werden, der bei Pathogen-Befall transkriptionell induziert wird (Iven, 2009; Fröschel, 2011). Ob DIN2 hinsichtlich der Verwandtschaft mit den eben beschriebenen PEN2, PEL1 und PYK10 auch eine Myrosinase-ähnlich Aktivität besitzt, ist noch rein spekulativ.

Weiterhin stimulieren Bodenorganismen die Expression von Chitinasen, Peroxidasen, Glutathion-S-Transferasen, PR-Proteinen sowie von Transkriptionsfaktoren (TF) in der Wurzel. TF sind Proteine, die bei der Initiation der Transkription eine entscheidende Rolle spielen (Yanagisawa, 1998). Aufgrund einer veränderten Präsenz von TF wird eine geordnete Neuprogrammierung des Expressionsprofils ermöglicht. Unter den Pathogen-

induzierten TF in der Wurzel sind häufig Vertreter mehrerer Familien: MYB-, Zink-Finger-, WRKY-, NAC- und ERF-Transkriptionsfaktoren (Iven, 2009; Clay *et al.*, 2009, Saga *et al.*, 2012; Nongbri *et al.*, 2012). Viele biotische Stressfaktoren induzieren die Expression von *MYB51*, einem wichtigen Steuerelement in der Synthese von Sekundärmetaboliten. Der TF *MYB51* reguliert einige Gene, deren Genprodukte für die IGs Biosynthese in *Arabidopsis* wichtig sind (Gigolashvili *et al.*, 2007). Für zwei weitere Vertreter aus der MYB-Familie, nämlich *MYB34* und *MYB122*, wurde gezeigt, dass sie ebenso an der transkriptionellen Regulierung von IGs beteiligt sind (Gigolashvili *et al.*, 2009). Das Trio aus *MYB34*, *MYB51*, und *MYB122* agiert gemeinsam, um die Biosynthese von I3G in Spross und Wurzel zu kontrollieren, wobei wahrscheinlich *MYB51* im Blatt die Hauptrolle spielt, *MYB34* dagegen in der Wurzel und *MYB122* stets eine assistierende Aufgabe besitzt (Frerigmann und Gigolashvili, 2014). Somit eignet sich die Dreifachmutante *myb34/myb51/myb122* hervorragend, um die Folgen eines stark reduzierten IGs Spiegelgels in der gesamten Pflanze zu untersuchen (Frerigmann und Gigolashvili, 2014). Neben einigen Elementen abwärts von IAOx, regulieren *MYB34* *MYB51* *MYB122* wohl auch die beiden Schlüsselgene des Biosynthesewegs, *CYP79B2* und *CYP79B3*, da diese in der Dreifachmutante *myb34/myb51/myb122* transkriptionell äußerst stark herunter reguliert sind (Frerigmann und Gigolashvili, 2014).

Im Camalexin-Zweig der Trp-abhängigen Biosynthesewege werden *CYP71A12* und *CYP71A13* sehr stark transkriptionell durch eine Infektion mit *V. longisporum* induziert und ebenso *NAC42* (Iven, 2009; Iven *et al.*, 2012). Für den TF *NAC42* wurde eine Beteiligung an der Aktivierung der abwärts von IAOx gelegenen Gene *CYP71A12* und *CYP71A13* angegeben (Saga *et al.*, 2012). Außerdem ist für die Produktion von Camalexin während Pathogenbefall *WRKY33* nötig (Qiu *et al.*, 2008). Die Verlustmutanten *wrky33* zeigen eine signifikante Reduktion der Camalexin-Produktion (Mao *et al.*, 2011). Dieser TF bindet als Regulator an den Promotor von *PAD3* (anderer Name: *CYP71B15*) und aktiviert anschließend die Expression des letzten Enzyms bei der Umwandlung zu Camalexin (Qiu *et al.*, 2008).

Insbesondere konnte auch für TF der ERF-Familie (engl.: ethylene-responsive element binding factors) mehrfach eine Beteiligung an verschiedenen Abwehrreaktionen festgestellt werden (Gutterson und Reuber, 2004; McGrath *et al.*, 2005; Libault *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2015). Z.B. verbessert die Überexpression von *ERF1* und *ERF2* die Toleranz gegen den bodenbürtigen Pilz *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo und Molina, 2004; McGrath *et al.*, 2005). In einer umfassenden Computer-Auswertung wurden 122 ERF-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und in zehn

phylogenetische Untergruppen eingeteilt (Nakano *et al.*, 2006). Bei der Durchmusterung von ERF-Überexpressionslinien (*AfTORF-EX* Kollektion, Weiste *et al.*, 2007) konnten von Iven (2009) in *Arabidopsis* vier ERF (*ERF#60*, *ERF#096*, *ERF#105* und *ERF#106*) als Resistenz-vermittelnd eingestuft werden, weil ihre Überexpression die systemische Propagation von *Verticillium longisporum* eindämmte. Drei dieser Transkriptionsfaktoren sind phylogenetisch verwandt und gehören der Untergruppe IX an. Für viele Mitglieder dieser Untergruppe konnte bereits eine allgemeine Funktion bei biotischem Stress nachgewiesen werden (Fischer und Dröge-Laser 2004; Berrocal-Lobo und Molina 2004; Oñate-Sánchez *et al.*, 2007; Catinot *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016). *ERF#104* ist phylogenetisch sehr nahe mit *ERF#105* verwandt (Nakano *et al.*, 2006). Für *ERF#104* ist eine Beteiligung an der pflanzlichen Basalresistenz gut belegt (Bethke *et al.*, 2009).

Mutualistische Organismen in der Rhizosphäre lösen zunächst, ähnlich wie Pathogene, über MAMPs eine allgemeine Abwehrreaktion in der Pflanze aus. Einige wachstumsfördernde Rhizobakterien sind aber nach einer Weile in der Lage, in der Wirtspflanze eine systemische Immunität gegen ein breites Spektrum an Blattpathogenen auszulösen - ein Phänomen, das als induzierte systemische Resistenz (ISR; engl.: *induced systemic resistance*) beschrieben ist und stark vom Wurzel-spezifischen TF MYB72 abhängt (Van der Ent *et al.*, 2008; Segarra *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2014).

Wie bereits von Millet *et al.* (2010) betont, könnte *Arabidopsis* je nach Art des eintreffenden MAMPs die Abwehr auf ganz lokal begrenzte Bereiche der Wurzel beschränken, um Energie und Ressourcen zu sparen. Demnach würden individuelle MAMPs genau dort eine Reaktion auslösen, wo die Wurzel am stärksten suszeptibel gegenüber dem jeweiligen Mikroorganismus ist, wie etwa die Rhizodermis in der Elongationszone, wo die Zellwände noch nicht stark ausgeprägt sind (Millet *et al.*, 2010). Benutzen verschiedene Zelltypen der Wurzel wirklich verschiedene Abwehrmaßnahmen und wenn ja, wo liegen welche Schwerpunkte? Wie unterscheiden sich Reaktionen auf mutualistische und pathogene Mikroorganismen in der Wurzel und im Besonderen in den einzelnen Zellschichten? Genau das sind die Leitfragen, denen in dieser Dissertation nachgegangen werden soll. Mit Hilfe von drei Modell-Bodenorganismen mit sehr unterschiedlichen Lebens- und Interaktionsstilen wurden Experimente angefertigt, um die Antworten in der *Arabidopsis*-Wurzel detailliert analysieren und miteinander vergleichen zu können.

## 2.4 Pilze und Oomyceten als Modell-Partner an der *Arabidopsis*-Wurzel

Seit Jahrzehnten ist die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) aus der Familie der *Brassicaceae* der bedeutendste Modellorganismus in der botanischen Forschung (Laibach, 1943). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass sie die erste Pflanze war, deren Genom vollständig sequenziert wurde (*Arabidopsis* Genome Initiative, AGI 2000). Sowohl eine kurze Generationszeit als auch ein geringes Platzbedürfnis sind ideal für die Anzucht im Labor und eine große Anzahl der Erkenntnisse, die aus der Untersuchung an *Arabidopsis* gewonnen wurden, sind repräsentativ für viele Arten höherer Pflanzen. Aus diesen Gründen wurde *Arabidopsis* als Studienmodell für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Zahlreichen Pilzarten sind sehr eng mit Pflanzen assoziiert und kolonisieren diese regelrecht, wobei die unterschiedlichsten Interaktions- und Lebensstile auftreten können von nützlich bis schnell tödlich (Lo Presti *et al.*, 2015). Ganz egal welchen Lebensstil der Pilz besitzt, ob parasitär oder mutualistisch, dem „Angriff“ des Pilzes steht stets die „Verteidigung“ der Pflanze gegenüber und jede erfolgreiche Kolonisierung kann erst durch die Sekretion hunderter Effektor-Moleküle, die die Wirtsabwehr supprimieren und generell die Physiologie der Pflanze modulieren, gestartet werden (Lo Presti *et al.*, 2015).

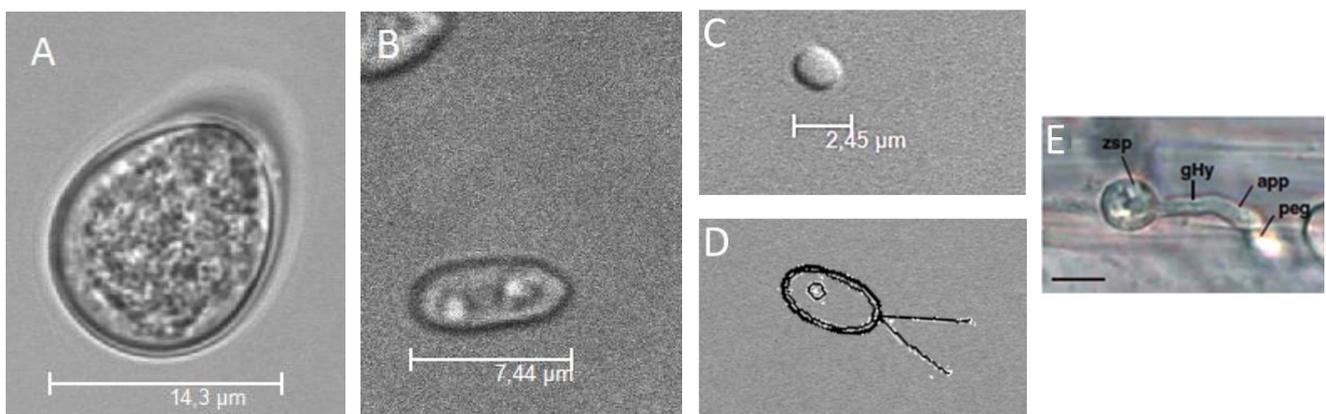


Abb. 4: **Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Sporentypen (CLSM-Aufnahmen).**

- Die Chlamyospore von *Piriformospora indica* in Birnenform. Aufgrund dieser Form (lateinisch: Pirum = Birne) hat der Pilz seinen Gattungsnamen erhalten.
- Die Konidiospore von *Verticillium longisporum* ist charakteristisch lang gezogen. Daher leitet sich der Namensteil „*longisporum*“ ab. Zwei Lipidtropfen sind an den Polen ersichtlich.
- Zoosporen von *Phytophthora parasitica* ohne Zellwand. Der Name stammt von der radikalen Eigenschaft als Pflanzenzerstörer (griechisch: *phytón*, „Pflanze“; *phthorá*, „Zerstörung“). Geißeln mit der Einstellung des Mikroskops nicht erkennbar.
- Schemazeichnung der zweifach begeißelten Zoosporen von *Phytophthora parasitica*.
- Ausgekeimte Zoospore von *Phytophthora parasitica*: Zoospore (zsp), Keimungshyphe (gHy), Appressorium (app) und Penetrationszapfen (peg) sind markiert (aus Attard *et al.*, 2010).

### 2.4.1 *Piriformospora indica*: ein mutualistischer Pilz

Mutualistische Interaktionen von Landpflanzen sind mit den unterschiedlichsten taxonomischen Gruppen von Pilzen zu finden. Zu den mutualistischen gehört *Piriformospora indica*, ein Pilz aus der Abteilung der Ständerpilze (*Basidiomycota*). Als Endophyt lebt er zumindest teilweise im Inneren des Pflanzenkörpers und besiedelt die Wurzel mit Hyphen, wobei ein inter- und intrazelluläres Wachstum auftritt (Sherameti *et al.*, 2008a). *P. indica* bildet birnenförmige Sporen (vgl. Abb. 4, A), die sich sowohl auf der Oberfläche als auch im Inneren der Wurzel ansammeln (Sherameti *et al.*, 2008a). Während der mutualistischen Interaktion mit *P. Indica* wird für die Wirtspflanze die Aufnahme von Nährstoffen über die Wurzel gesteigert, die Toleranz bei biotischen sowie abiotischen Stressen verbessert sich und darüber hinaus wird das allgemeine Pflanzenwachstum deutlich sichtbar gefördert (Varma *et al.*, 1999; Oelmüller *et al.*, 2004; Sherameti *et al.*, 2005; Waller *et al.*, 2005; Baltruschat *et al.*, 2008, Sherameti *et al.*, 2008a und b). Im Gegenzug bekommt der Pilz Kohlenhydrate und andere organische Metaboliten von der Pflanze (Zuccaro *et al.*, 2014). Ursprünglich wurde *P. indica* Ende der 90er Jahre im Boden der Thar Wüste in Indien entdeckt und isoliert, wo dieser Pilz mit an Trockenheit angepassten Pflanzen assoziiert ist (Verma *et al.*, 1998, Varma *et al.*, 1999). Dennoch zeigt sich ein überaus breites Wirtspflanzenspektrum, das sowohl Mono- als auch Dikotyledonen beinhaltet und etwa Bäume, Nutzpflanzen und sogar Mose einschließt (Varma *et al.*, 1999; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005; Barazani *et al.*, 2005; Sherameti *et al.*, 2008a). Somit ist *P. indica* ein klassischer Generalist (Lahrman und Zuccaro, 2012). Zwar ist die Familie der *Brassicaceae* nicht als Wirt geeignet, um eine mutualistische Ecto- oder arbuskuläre Mykorrhiza zu untersuchen, aber *Brassicaceae* können sehr gut mit *P. indica* interagieren (Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurde *Arabidopsis* bereits oft als Modellpartner für die Wechselbeziehung mit *P. indica* verwendet (z.B. in Oelmüller *et al.*, 2004; Sherameti *et al.*, 2008a und b, Venus *et al.*, 2013). Viele Studien wurden an monokotyledoner Gerste (*Hordeum vulgare*) vorgenommen, die zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) zählt und eine wichtige Nutzpflanze in Europa ist (z.B. Waller *et al.*, 2005, Zuccaro *et al.*, 2011; Hilbert *et al.*, 2012). Sicher besteht ein großes Potential, dass *P. indica* in der Landwirtschaft eine positive Anwendung findet, denn unter anderem konnte bei Gerste ein signifikanter Anstieg des Kornertrags unter Freilandbedingungen verzeichnet werden, wenn die Keimlinge mit dem Pilz behandelt waren (Waller *et al.* 2005). Bedingt durch die Kolonisierung mit *P. indica* stieg sowohl die Biomasse des Sprosses als auch die der Wurzeln erheblich an

(Waller *et al.*, 2005). An Gerste startet die Besiedlung mit der Keimung der sog. Chlamydosporen auf der Wurzeloberfläche und setzt sich in einem extrazellulären Wachstum in den ersten 1 bis 2 Tagen fort (Felle *et al.*, 2009), wobei sich die Penetration des Wirtsgewebes anfangs ausschließlich auf den Apoplasten und die Interzellularen beschränkt (Deshmukh *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2007). Vereinzelt beginnen sich nach 2 bis 3 Tagen die ersten interzellulären Hyphen netzartig zu verzweigen und um Rhizodermiszellen zu wachsen. Nach und nach werden auch Zellen des Cortex penetriert und eine Woche nach Auskeimen der Sporen sind bereits große Areale der Wurzel durch inter- und ab diesem Zeitpunkt auch intrazelluläre Hyphen kolonialisiert (Felle *et al.*, 2009).

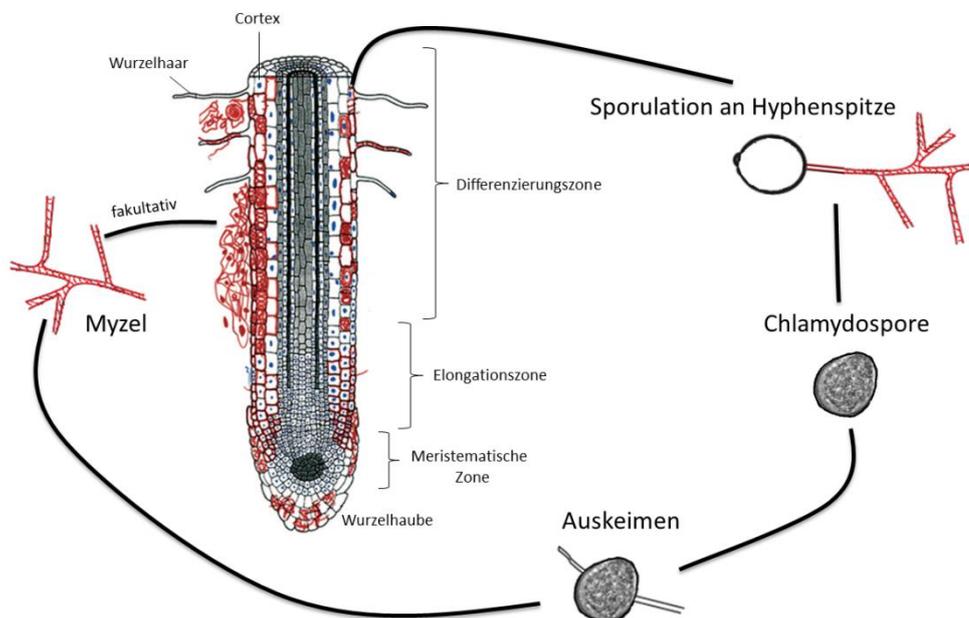


Abb. 5: **Lebenszyklus von *Piriformospora indica*.**

An Hyphenspitzen werden auf asexuellem Weg farblose Chlamydosporen gebildet. Deren Entwicklung beginnt mit einem dünnwandigen Vesikel. Reife Sporen haben eine dicke Zellwand und werden in die Umgebung entlassen. Im Boden keimen die Sporen aus. Der wachsende Pilz kann ohne Wirt autark im Boden leben. Als fakultativer Endophyt können allerdings die Hyphen (rot markiert) unter geeigneten Bedingungen auch äußere Zellschichten der Wurzel (beschränkt auf Rhizodermis und Cortex) inter- sowie intrazellulär besiedeln und eine Symbiose etablieren, wobei die Differenzierungszone für die Penetration bevorzugt wird. Die Wurzelspitze wird sehr vereinzelt von wenigen Hyphen und dann nur interzellulär penetriert. Spezielle Strukturen für ein langes Überdauern schlechter Bedingungen gibt es bei *P. indica* nicht, doch die Chlamydosporen selbst sind längere Zeit keimungs- und lagerungsfähig. Eine sexuelle Art der Vermehrung ist bei *P. indica* nicht bekannt. Über eine Fusion von Hyphen zweier Kreuzungstyp-kompatibler Individuen wird als Form der rekombinanten Vermehrung spekuliert (modifiziert nach Deshmukh *et al.*, 2006).

Dort, wo der Pilz die Zellwand überwindet und intrazellulär einwächst, zeigen sich an den Hyphen Einschnürungen und weil sich die intrazellulären Hyphen stetig weiter ausbreiten, wird bald der gesamte Protoplast umschlossen, der dadurch logischerweise ein wenig von seinem Volumen einbüßen muss und schrumpft (Deshmukh *et al.*, 2006). Die intrazellulären Hyphen werden anfangs immer von der Plasmamembran der lebenden

Wirtszelle umgeben (Zuccaro *et al.*, 2014), doch später (>7 dpi, Lahrmann und Zuccaro, 2012) liegen die Hyphen zunehmend in toten oder sterbenden Zellen. In diese werden verschiedene hydrolytische Enzyme ausgeschüttet, wodurch pflanzliche Proteine und Zellwände abgebaut werden (Deshmukh *et al.*, 2006; Zuccaro *et al.*, 2011; Qiang *et al.*, 2012; Lahrmann *et al.*, 2013). Ab etwa 7 bis 10 Tagen kann massenhafte Sporulation beobachtet werden und die Propagation des Pilzes steigt rapide an (Deshmukh *et al.*, 2006; Felle *et al.*, 2009). An den Wurzelhaaren, als lange Auswüchse der Zellen, tritt eine vermehrte Invasion auf (Schäfer *et al.*, 2007) und da die Differenzierungszone bei der Besiedlung gegenüber der Elongations- und Meristematischen Zone bevorzugt wird, scheint der Pilz Gewebe „älterer“ Entwicklungsstadien gegenüber den „jüngeren“ zu favorisieren (Deshmukh *et al.*, 2006). Über Plasmodesmata, die in der Differenzierungszone fertig ausgebildet sind, könnte sich das Myzel in weitere Nachbarzellen leicht ausbreiten (Deshmukh *et al.* 2006). Allerdings erreichen die Hyphen niemals den Zentralzylinder (Schäfer *et al.*, 2007) und sind auch im Spross nicht nachweisbar. Die Besiedlung bleibt stets auf die äußeren Schichten der Wurzel beschränkt (Deshmukh *et al.*, 2006; Waller *et al.*, 2008). Auch im Boden außerhalb der Wurzel wächst das Myzel weiter fort.

Bemerkenswerterweise wird die Wurzel besiedelt, ohne Gewebenekrosen oder starke Gewebebeeinträchtigungen auszulösen und das, obwohl die Besiedlung und Proliferation teilweise vom programmierten Zelltod abhängig ist (Deshmukh *et al.*, 2006). Wenn man einen Inhibitor des programmierten Zelltods, BAX Inhibitor 1, in Gerste überexprimiert, breitet sich der Pilz viel schlechter aus als im Wildtyp (Hückelhoven, 2004; Deshmukh *et al.*, 2006). Oft tritt lokal begrenzt der programmierte Zelltod als Antwort und Anpassung der Pflanze an äußere Stimuli auf. Als wichtiges Beispiel sei hier die schützende Funktion der hypersensitiven Antwort (HR) genannt, die eine systemische Ausbreitung von Pathogenen einschränken kann und durch eine starke Induktion von Abwehrgenen charakterisiert ist (Heath, 2000; Hoeberichts und Woltering, 2003). Interessanterweise kann man den bei der *P. indica* Kolonisierung auftretenden Programmierten Zelltod nicht wirklich mit der charakteristischen Abwehr gegen Mikroorganismen vergleichen, da Marker der Pathogen-induzierten HR, wie etwa *PR1*, *PR5* und *1,3-β-Glucanase*, schwach und nur transient am Anfang der Interaktion vermehrt vorliegen (Deshmukh und Kogel, 2007;), wohingegen z.B. der nekrotrophe Pilz *Fusarium graminearum* eine starke und dauerhafte Induktion dieser Marker verursacht (Deshmukh und Kogel, 2007; Pedrotti *et al.*, 2013). Außerdem wurde niemals eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), ein prägnantes Kennzeichen der HR, in *P. indica* besiedelten Wurzeln nachgewiesen (Schäfer *et al.*,

2007). Ganz im Gegensatz dazu konnte mehrfach eine ROS Anreicherung bei anderen Symbiosen wie der AM (Salzer *et al.*, 1999; Fester und Hause, 2005) oder bei der Vergesellschaftung von Knöllchenbakterien (Rhizobien) und Leguminosen (Matamoros *et al.*, 2003) nachgewiesen werden, wodurch die Pflanze die Ausbreitung des Symbionten kontrollieren kann (Fester und Hause, 2005). Diese Tatsachen und Unterschiede weisen auf einen ganz neuen Typ mutualistischer Interaktion hin (Deshmukh *et al.*, 2006) und bei all der Betrachtung entsteht die spannende Frage für diese und zukünftige Arbeiten: Wie und wo kann *P. indica* die Wurzel manipulieren, ohne eine ausgedehnte Abwehr zu provozieren, obwohl die Kolonialisierung invasiv und vom Programmierten Zelltod abhängig ist?

Eine anfängliche Induktion von Abwehrgenen in der Pflanze kann der Pilz nach einiger Zeit erfolgreich supprimieren, was durchaus von einer intakten Jasmonsäure-Signalübertragung abhängig ist (Jacobs *et al.*, 2011). Trotzdem muss auf der anderen Seite die Pflanze gewisse Kontrollmechanismen behalten können, denn einem unkontrollierten und übertriebenen Wachstum des Pilzes muss entgegengewirkt werden, da ansonsten der Wirt zu sehr ausgeschöpft und geschwächt werden würde. Ein passendes Abwehrbeispiel für diese Auseinandersetzung bietet etwa PYK10, das in der *Arabidopsis*-Wurzel die am häufigsten vorkommende  $\beta$ -Glucosidase ist (Sherameti *et al.*, 2008a). Außerdem hat PYK10 eine Myrosinase-ähnliche Funktion und ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Nitz *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2004). Damit *P. indica* das Wachstum seines Wirtes nachhaltig fördern kann, ist das Vorhandensein von PYK10 sehr wichtig, weil das Enzym hilft, die Propagation der Pilzhyphen zu beschränken (Sherameti *et al.*, 2008a), wahrscheinlich über eine Freisetzung toxischer Substanzen. Mutanten mit verminderter PYK10 Proteinmenge zeigen eine stärkere Besiedlung als der Wildtyp. Gleichzeitig ist der fördernde Effekt nicht mehr vorhanden (Sherameti *et al.*, 2008a). Es ist anzunehmen, dass sich während der Interaktion ein bestimmtes Maß an Pilzhyphen einstellt, denn eine zu hohe Dichte ruft intensivierete Abwehrreaktionen hervor und eine zu geringe Dichte hat einen suboptimalen Stoff- und Informationsaustausch zwischen den Partnern zur Folge (Sherameti *et al.*, 2008a).

Obwohl die Assoziierung der Pflanze mit *P. indica* im Detail sehr anders ist, als eine AM-Symbiose (Schäfer *et al.*, 2007), werden sowohl beim endophytisch lebenden *P. indica* als auch bei der AM die Hyphen von lebenden Wurzelzellen der äußeren Schichten aufgenommen (Banhara *et al.*, 2015). Pilze der AM sind obligat auf eine Symbiose angewiesen und formen über stark verzweigte Hyphen-Strukturen eine ausgedehnte Grenzfläche in den lebenden Wurzelzellen, die sog. Arbuskeln, die von der

Plasmamembran der Wirtszellen umschlossen sind (Zuccaro *et al.* 2014). Genau an diesen bemerkenswerten und lang bestehenden Grenzflächen werden Phosphat (P)- und Stickstoff (N)-Verbindungen aktiv über den Pilz in die Pflanze transferiert und andersherum einfache Kohlenhydrate von der Pflanze in den Pilz (Bonfante und Requena, 2011; Harrison, 2012; Gutjahr und Parniske, 2013). Seitens der Pflanze wird die AM sehr streng durch ein Programm kontrolliert, an dem mehrere Symbiose Gene (sogenannte „plant common symbiose genes“, CSGs) beteiligt sind (Banhara *et al.*, 2015). Weil aber bei der Familie der *Brassicaceae* dieses spezifische Set an Symbiose Genen (CSGs) fehlt, haben sie die Fähigkeit verloren, eine AM zu etablieren (Delaux *et al.*, 2014). Jedoch ist die *P. indica* Kolonisierung unabhängig von den bekannten CSGs oder deren Homologen und dieser Pilz nützt für seinen Lebensstil ganz andere Komponenten des Wirtes aus (Banhara *et al.*, 2015). Die Nicht-Mykorrhiza Endophyten bilden eine ganz eigene Klasse und über zugrunde liegende Mechanismen einer solchen Vergesellschaftung ist im Detail nicht viel bekannt (Zuccaro *et al.*, 2014). Neueste Studien legen nahe, dass auch sie in der Lage sind, eine biotrophe und ausgedehnte Grenzfläche zum Stoffaustausch auszubilden, wobei die Pilzhyphen von der Wirtszellmembran umhüllt bleiben (Jacobs *et al.*, 2011; Lahrman *et al.*, 2013; Zuccaro *et al.*, 2014). Allerdings ist *P. indica* nicht wie die AM Pilze obligat auf eine Symbiose angewiesen, sondern er lebt auch ohne Assoziierung mit einem Wirt recht gut im Boden (Lahrman und Zuccaro, 2012). Warum also *P. indica* überhaupt eine Vergesellschaftung mit Landpflanzen eingeht und welche Bedeutung für ihn ein Stoffaustausch mit dem Wirt hat, bleibt bis heute ein Rätsel (Zuccaro *et al.*, 2014). Eventuell kann *P. indica* auf diese Weise seine saprophytischen Möglichkeiten im Erdreich zusätzlich ausweiten (Lahrman und Zuccaro, 2012). Als nützlicher Effekt für die Pflanze wurde von mehreren Autoren ein Stoffaustausch belegt, wie zum Beispiel, dass ein Phosphattransporter von *P. indica* den P-Transport in die Pflanze hinein arrangiert (Yadav *et al.*, 2010).

Gerade deswegen, weil *P. indica* sowohl tote als auch lebende Zellen des Cortex besiedelt, zeigt sich eine zweiphasige Lebensweise: biotrophes Wachstum am Beginn, gefolgt von einer essentiellen Zelltod assoziierten Phase (Zuccaro *et al.*, 2011). In dieser zweiten Phase kann *P. indica* organische Nährstoffe gewinnen, indem er tote Zellen saprotroph abbaut (Zuccaro *et al.*, 2011). Zusammen mit dieser Erkenntnis konnte eine ausführlich Betrachtung des *P. indica* Genoms, das seit 2011 vollständig sequenziert ist, bei Zuccaro *et al.* (2011) zu der Schlussfolgerung führen, dass dieser Pilz saprotrophe und biotrophe Eigenschaften vereint und somit eventuell ein fehlendes Bindeglied (engl.: Missing Link) darstellen könnte, wenn aus saprotrophen Pilzen zunächst die Endophyten

mit einer Assoziierung zu Pflanzen hervorgingen, die nach und nach eine biotrophe Lebensweise entwickelten, aus der dann erst diverse komplexe Mykorrhiza-Systeme der *Basidiomycota* entstanden. Somit könnte diese basale Form der Pflanze-Endophyt Symbiose mit markanten saprotrophen Eigenschaften des Pilzes eine tiefer greifendere Rolle in der Evolution und bei der Ausbreitung der Landpflanzen gespielt haben, als bisher angenommen (Lahrman und Zuccaro, 2012). Es werden bereits Genom-Sequenzierungen an mit *P. indica* verwandten Arten durchgeführt und diese könnten bald neue Details über diesen besonderen Abschnitt der Evolution ans Licht bringen.

Verschiedene Änderungen des Transkriptionsprofils in der Wurzel begleiten das Zustandekommen der Symbiose. Unter anderem werden Gene für den Hormonhaushalt reguliert, wie etwa für Auxin-, Ethylen- und Abscisinsäure-Metabolismus während der biotrophen Anfangsphase und Gibberellinsäure- gemeinsam mit Brassinosteroid-Metabolismus in der Zelltod assoziierten Phase (Schäfer *et al.*, 2009; Lahrman und Zuccaro, 2012). Einige Studien konnten zeigen, dass Gerste-Mutanten, bei denen Gibberellinsäure- und Ethylen-Signalvorgänge vermindert sind, schlechter von *P. indica* besiedelt werden (Schäfer *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2011; Khatabi *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnten Hilbert *et al.* (2012) zeigen, dass *P. indica* selbst freie Indol-3-essigsäure (IAA) herstellen kann, welche eine bioaktive Form des Pflanzenhormons Auxin darstellt. Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, dass IAA am Zustandekommen der biotrophen Phase beteiligt ist, denn gibt man IAA exogen zur Pflanze hinzu, stimuliert dies bereits die Propagation des Pilzes in der Gerste Wurzel und so könnte IAA einen Kompatibilitätsfaktor darstellen, um den pflanzlichen Metabolismus im Sinne des Pilzes zu manipulieren (Hilbert *et al.*, 2012).

Es konnte sogar gezeigt werden, dass der Endophyt eine effiziente Biokontrolle gegen vaskuläre pathogene Pilze, um die es im Anschluss geht, sein kann: Die Assoziierung von *P. indica* mit der Pflanze schützt den Wirt vor drastischer Schädigung durch *Fusarium* ssp. (Waller *et al.*, 2005) und die Ausbreitung von *Verticillium dahliae* im Wirt ist stark gehemmt, wenn gleichzeitig *P. indica* anwesend ist (Sun *et al.*, 2014). Welche Mechanismen sind am zu Stande kommen der erhöhten Pathogen-Toleranz beteiligt? Mittels einer Rasterung durch die einzelnen Zellschichten der Wurzel könnten molekulargenetische Effekte detailliert entschlüsselt werden und das würde helfen, die beteiligten Komponenten besser identifizieren zu können. Ebenso ist der direkte Vergleich der Wurzelreaktion auf ein mutualistisches Angebot und eine Pathogen Attacke hilfreich.

## 2.4.2 *Verticillium longisporum*: ein vaskuläres Wurzelpathogen

Während *P. indica* im Laufe der Infektion nie den Zentralzylinder mit den Leitgefäßen erreicht (Deshmukh *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2007), ist das bei bodenbürtigen vaskulären Pilzen, wie etwa phytopathogenen Vertretern der Gattungen *Verticillium* und *Fusarium* ganz anders, denn diese kolonisieren bei geeigneten Wirtspflanzen gezielt das Xylemgewebe im Zentralzylinder der Wurzel und wandern anschließend darin stromaufwärts, um die gesamte Pflanze zu befallen (Pegg und Brady, 2002; Eynck *et al.*, 2007). Eine Besonderheit dieser Organismen ist, dass ihre Besiedlung strikt auf die Xylemgefäße beschränkt ist (Zeise und von Tiedemann, 2002) und weil sie dort sehr gut von außen abgeschottet sind, ist eine Bekämpfung mit Fungiziden kaum möglich (Fradin und Thomma, 2006; Rygulla *et al.*, 2007). Zwar dient das Xylem hauptsächlich dem akropetalen Wasser- und Ionentransport, dennoch finden sich im Xylemsaft auch Spuren von Zuckern und Aminosäuren, welche sich die Pilze als Nährstoffquelle zu Nutze machen können (Van Alfen, 1989; Iwai *et al.*, 2003; Buhtz *et al.*, 2004). Aufgrund ihrer Lebensweise lösen sie ein Krankheitsbild aus, das als Tracheomykose (gefäßparasitäre Pilzkrankheit) bezeichnet wird. Die Infektion beginnt an der Wurzel und erst wenn die Pilzhyphen im Sprosssystem angelangt sind, wird das schwere Krankheitsbild ausgelöst (Berrocal-Lobo und Molina, 2008; Eynck *et al.*, 2009). Typische Symptome sind neben einer massiven Welke Sprossstauchung, vorzeitige Abreife, Gelbwerden der Blätter, Nekrosen und eine Braunfärbung des Leitgewebes (Beckman, 1987). Über kurz oder lang führt die Welke zum Absterben der Wirtspflanze. Dabei sind die Ursachen der Welke vielfältig: Zum einen verstopft das sich immer weiter ausbreitende Myzel zunehmend die Wasserleitungsbahnen und beeinträchtigt den Wassertransport (Rygulla *et al.*, 2007) zum anderen sondern einige Pilze, wie etwa manche *Fusarium*-Arten, Toxine ab, die das Welken verstärken (Berrocal-Lobo und Molina, 2008). Ein weiterer Grund ist, dass die Pflanze während der Abwehrreaktion Callose und Gele in das Xylem absondert sowie vermehrt Suberin in die Tracheen einlagert (Beckman, 1987). Folglich wird zwar die Ausbreitung des Pilzes innerhalb der Pflanze eingedämmt, aber der verringerte Durchmesser der Leitbahnen beeinflusst die Wassertransportfähigkeit zusätzlich negativ (Pegg und Brady 2002).

Phylogenetisch gehört die Gattung *Verticillium* der Abteilung der Schlauchpilze (*Ascomycota*) an, zu der auch beispielsweise *Saccharomyces* gerechnet wird. Genauer kann *Verticillium* der Untergruppe der filamentösen *Ascomycota* zugeordnet werden (Hibbett *et al.*, 2007). Die Vermehrung erfolgt bei diesen Pilzen durch asexuell gebildete

Sporen (Konidien) oder rein vegetativ (Dörfelt, 1989). Konidien (oder Konidiosporen) entstehen an den Enden von Pilzhypen (Abb. 6A) durch einfache Mitose und dienen in erster Linie der vegetativen Vermehrung, können aber auch gleichzeitig als Dauerstadien zur Überbrückung ungünstiger Bedingungen genutzt werden.

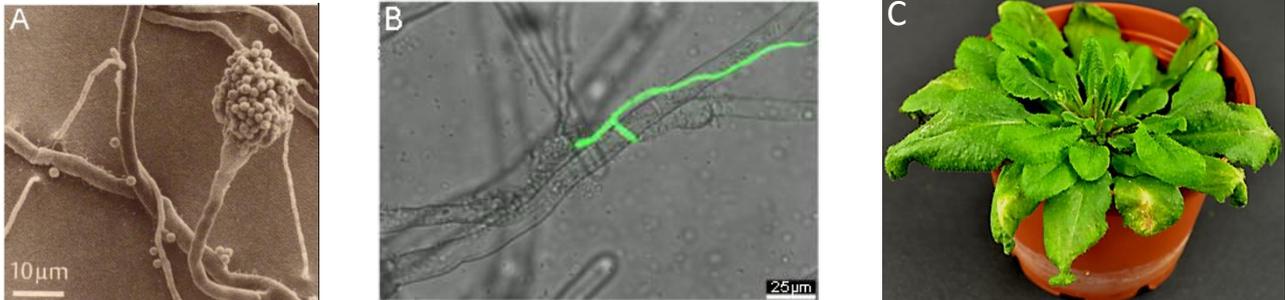


Abb. 6: **Konidiosporen, Hyphen und Krankheitssymptome an der Wirtspflanze.**

- A: Konidienträger des Ascomyceten *Aspergillus nidulans* (Gießkannenschimmel) als Beispiel für Konidien. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Originalaufnahme von G. Wanner).
- B: CLSM-Aufnahme einer GFP (Grünfluoreszierendes Protein)-exprimierenden Hyphe von *Verticillium longisporum*, die entlang eines Wurzelhaares wächst.
- C: Auswirkungen eines Befalls mit *Verticillium longisporum* an *A. thaliana* 25 dpi (trotz geeigneter Wasserversorgung welken die Blätter und verfärben sich stellenweise gelb)

Innerhalb der Gattung *Verticillium* treten mehrere phytopathogene Pilze auf, die weltweit in gemäßigten und subtropischen Klimazonen verbreitet sind (Pegg und Brady, 2002; Fradin und Thomma, 2006). Unter ihnen ist *Verticillium dahliae* die aggressivste Art mit einem sehr breiten Wirtspflanzenspektrum, wie z.B. Tomate, Minze, Kopfsalat, Baumwolle oder Erdbeere (Domsch *et al.*, 1980; Schnathorst 1981; Pegg 1984, Subbarao *et al.*, 1995, Bhat und Subbarao 1999). *V. longisporum* ist so nahe mit *V. dahliae* verwandt, dass man ihn anfangs als Unterart *V. dahliae* var. *longisporum* klassifizierte (Stark, 1961). Nach detaillierten morphologischen, physiologischen und molekularen Untersuchungen wurde jedoch später vorgeschlagen, *V. longisporum* als eigene Art einzuführen (Karapapa *et al.*, 1997; Karapapa und Typas, 2001). Während *V. dahliae* für die recht schwer verlaufende *Verticillium*-Welke verantwortlich ist, ist *V. longisporum* der mildere Erreger der sog. „krankhaften Abreife“ an Raps (Karapapa *et al.*, 1997). Das Wirtspflanzenspektrum dieses Pathogenes ist sehr klein und auf die Pflanzen-Familie der *Brassicaceae* begrenzt, wo vor allem landwirtschaftliche Verluste bei monokulturellem Anbau von Raps (*Brassica napus*) entstehen (Zeise und von Tiedemann, 2002; Johansson *et al.*, 2006a). Wegen ihres hohen Ölgehalts erfährt diese Nutzpflanze eine zunehmende wirtschaftliche Bedeutung als Komponente von sowohl Biokraftstoff als auch von gesundem Speiseöl (Rygulla *et al.*, 2007) und simultan wird der *Verticillium*-Befall zu einem wachsenden Problem, da es regelmäßig zu signifikanten Ernteverlusten in Deutschland, Frankreich und Nord-Europa kommt (Johansson *et al.*, 2006a; Dunker *et al.*, 2006). Über viele Jahre hinweg verweilt

*V. longisporum* höchst infektiös im Boden, indem er widerstandsfähige Überdauerungsformen, sog. Mikrosklerotien, bildet. Bei diesen Überdauerungsorganen handelt es sich um Aggregate aus dickwandigen, stark melanisierten und langlebigen Hyphen (Gordee und Porter, 1985; Klimes und Dobinson, 2006). Diese sind schwer zu bekämpfen und wenn ein Feld mit dem Pilz befallen war, reichert sich das Inokulum im Boden an. Nur eine weitgestellte Fruchtfolge kann den Befall dann noch einigermaßen eindämmen (Pegg und Brady, 2002). Gewisse Exsudate der Wirtspflanzen induzieren das Auskeimen der Mikrosklerotien und die Hyphen wachsen an die Wurzel heran (Eynck *et al.*, 2007). Mittlerweile weiß man recht gut, dass einige von der Wurzel in den Boden abgegebene Stoffe eine entscheidende Rolle beim Zustandekommen von Interaktionen im Allgemeinen spielen (Bais *et al.*, 2006). Eine neue Studie z.B. hat gezeigt, dass Monoterpene, die mittels der Monoterpensynthasen TPS23/27 produziert werden, sowohl die Keimung von *V. longisporum* als auch die anschließende Invasion stimulieren, denn *Arabidopsis*-Pflanzen mit mehr TPS23/27 sind susceptibler gegenüber diesem Pathogen und 1,8-Cineol, das Hauptprodukt von TPS23/27, bringt die Konidiosporen zum Auskeimen (Roos *et al.*, 2014). Zusammengenommen deutet das darauf hin, dass TPS23/27 ein wichtiger Suszeptibilitätsfaktor dieser Interaktion ist (Roos *et al.*, 2014). Obwohl das flüchtige 1,8-Cineol, auch als Eucalyptol bekannt, antimikrobielle Eigenschaften besitzt und in sehr hohen Konzentrationen gegen *V. longisporum* wirkt, fördert die natürlich vorhandene Dosis in der Rhizosphäre das Keimen des Pilzes (Roos *et al.*, 2014). Bereits 24 Stunden nach Inokulation einer Rapspflanze mit Konidiosporen umgeben Hyphen netzartig die Wurzelhaare, an denen entlang sie bis zur Rhizodermis wachsen, um schließlich mit der Penetration beginnen zu können (Eynck *et al.*, 2007) (Abb. 6B). Die Ruhephase (Fradin und Thomma, 2006) wird beendet und der Infektionszyklus beginnt (Abb. 7). Um die Zellwand der Rhizodermiszellen abzubauen sekretieren einige phytopathogene Pilze lytische Enzyme (Beliën *et al.*, 2006) und durch die anschließende Erzeugung eines Turgordrucks dringen sie in das aufgeschlossene Pflanzengewebe vor. Andere Pilze oder Mikroorganismen dagegen sind für eine Penetration darauf angewiesen, dass das Pflanzengewebe verletzt oder geschwächt ist. So auch *V. longisporum*, der über Wunden oder wahrscheinlich auch meristematische Gewebe, bei denen Zellwände und Endodermis noch nicht kräftig ausgeprägt sind, eindringt (Bishop und Cooper, 1983; Pegg und Brady, 2002). Da Seitenwurzeln unterhalb der Endodermis entspringen, schieben sie die Zellen der Wurzelrinde beiseite, um an die Oberfläche zu gelangen (van den Berg *et al.*, 1998). Die dabei entstehenden Achseln sind ebenfalls Orte, wo dem Pilz ein Eindringen möglich wird (Pegg und Brady, 2002).

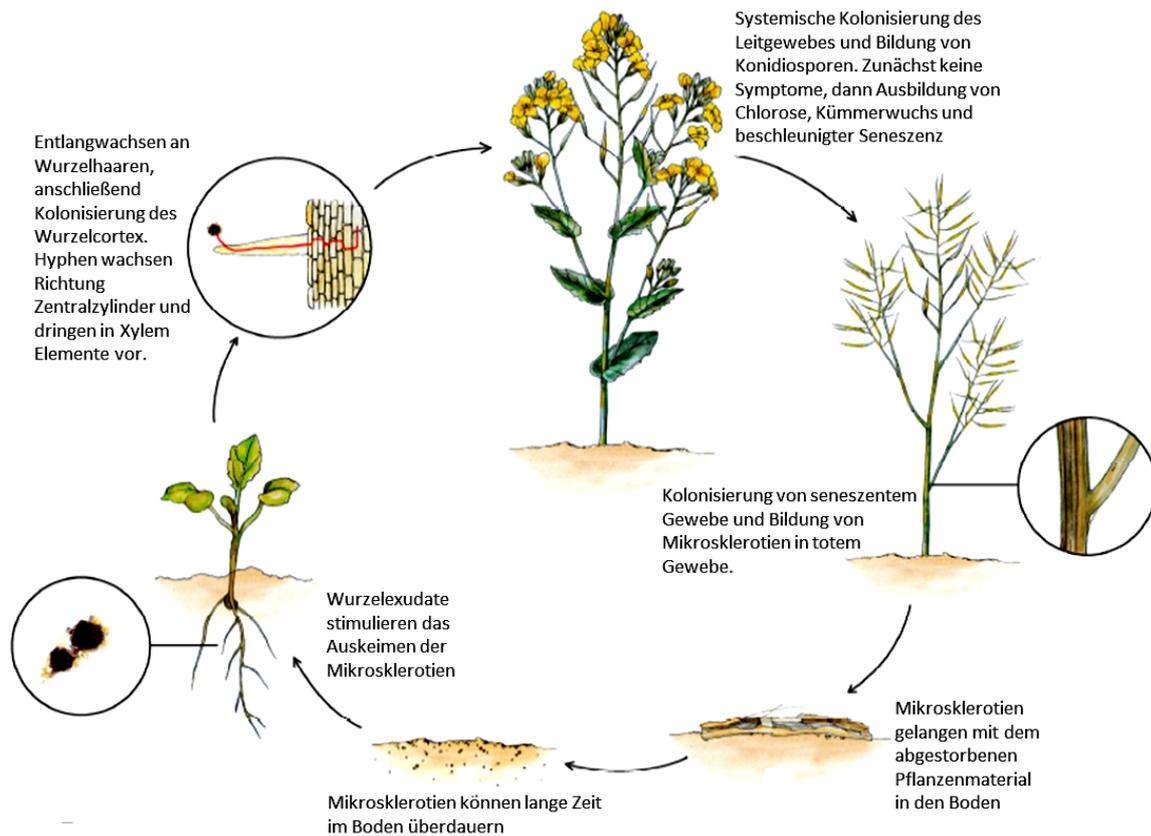


Abb. 7: Infektionszyklus von *Verticillium longisporum* an Raps.

Nachdem Hyphen die Wurzeloberfläche erreicht haben, startet zunächst die Penetration des Cortex. Später werden Xylemgefäße besiedelt. Wenn an der Pflanze deutliche Chlorosen sichtbar werden, startet der Pilz die nekrotrophe Phase. Die Bildung von Konidiosporen erfolgt asexuell. Sie verteilen sich im Organismus und keimen neu aus, was die systemische Ausbreitung beschleunigt. Konidiosporen besitzen auch das Potential eine neue Wirtspflanze zu befallen. Verändert nach Depotter *et al.*, 2015.

Nach der Penetration wächst das Myzel inter- und intrazellulär durch den Cortex sowie durch Schwachstellen in der Endodermis-Barriere bis in den Zentralzylinder hinein (Eynck *et al.*, 2007; Eynck *et al.*, 2009). Dort angelangt, breiten sich die Hyphen in einzelnen Xylemgefäßen aus (Beckman, 1987). Es beginnt die parasitische und biotrophe Phase, in der der Pilz heterotroph von den Nährstoffen der Pflanze lebt (Fradin und Thomma, 2006). Im Xylemsaft findet neben dem eigentlichen Hyphenwachstum auch eine Bildung von Konidiosporen statt, welche leicht über den Transpirationssog verteilt werden können, so dass es zu einer raschen systemischen Ausbreitung des Pilzes kommt (Beckman, 1987; Pegg und Brady, 2002). Ab diesem Zeitpunkt treten die typischen Krankheitssymptome an der Pflanze auf. Allerdings findet das Wachstum von *V. longisporum* im Spross-Xylem bei weitem nicht in allen Gefäßen statt, sondern ist auf einzelne Gefäße beschränkt, was erklären könnte, warum die Welkesymptome bei einer *V. longisporum*-Infektion nicht so gravierend sind wie bei *V. dahliae* und es lediglich zu Chlorosen, Wachstumsdepression und einer krankhaften vorzeitigen Abreife kommt (Eynck *et al.*, 2007). Außerdem kann *V. longisporum* in *Arabidopsis* sowie in Raps die Bildung neuen Xylems induzieren,

wodurch mehr Wasserleitgewebe in infizierten Pflanzen vorhanden ist (Reusche *et al.*, 2012; Depotter *et al.*, 2015).

Man kann *Verticillium longisporum* als Vertreter der hemibiotrophen Organismen bezeichnen, denn solange der Pilz im Leitgewebe wächst und organische Substanzen aus dem Xylemsaft bezieht, ernährt er sich biotroph. Im fortgeschrittenen Stadium wird die Seneszenz beschleunigt und je mehr abgestorbenes Sprossgewebe vorhanden ist, desto stärker ernährt sich der Pilz saprophytisch und ändert seine Lebensweise (Fradin und Thomma, 2006). Erst in dieser zweiten Phase kann er seinen Lebenszyklus mit der Bildung von Mikrosklerotien im sterbenden Spross vollenden (Berlanger und Powelson, 2000; Fradin und Thomma, 2006; Eynck *et al.*, 2007). Der Infektionskreislauf schließt sich, sobald diese mit dem toten Pflanzenmaterial auf den Boden fallen. Dort können sie mehr als 10 Jahre in der Ruhephase verbringen (Wilhelm, 1955), bis eine neue potentielle Wirtspflanze auskeimt. Raps ist ein bevorzugter Wirt von *V. longisporum*. Diese Pilz-Art ist in der Natur obligat pathogen, denn außer dem Auskeimen der Mikrosklerotien findet kein Wachstum außerhalb einer Pflanze statt (Pegg und Brady, 2002). Die Resistenz der Pflanze kann sich beispielsweise so gestalten, dass zwar der Wurzelcortex penetriert wird, der Pilz aber nicht in die Stele vordringt, weshalb auch die Krankheitssymptome nicht ausgelöst werden (Talboys, 1972; Eynck *et al.*, 2007). Zu diesem Zweck kann der Zentralzylinder durch eine stärker suberinisierte Endodermis, sekundäre Zellwandverdickungen und Ligninablagerungen abgeriegelt werden (Griffiths, 1971; Talboys, 1972; Fradin und Thomma, 2006). Ferner kann die Synthese antimikrobieller Stoffe den Pilz an seiner vaskulären Ausbreitung hindern (Bell, 1969; Daayf *et al.*, 1997). Besonders für die frühe Phase der Interaktion konnte an *Arabidopsis* gezeigt werden, dass Sekundärmetaboliten, die aus Trp hervorgehen, als aktive und fungizide Komponenten in der Abwehr gegen vaskuläre Pilze wirken (Iven *et al.*, 2012). Als Beispiele seien an dieser Stelle nochmals kurz Camalexin und Indol-Glucosinolate erwähnt, deren Synthese in der Wurzel durch die Infektion induziert wird (Iven *et al.*, 2012) und die später in der Diskussion eine wichtige Rolle spielen werden. Daneben kann es aber ebenso sein, dass sich die Resistenz der Pflanze erst ausprägt, wenn das Myzel schon das Xylem erreicht hat. Dann wird der Pilz in einer schnellen Abwehrreaktion in der Wurzel isoliert, während er sich in suszeptiblen Pflanzen ungehindert ausbreiten kann (Talboys, 1972; Heinz *et al.*, 1998). Die Eindämmung in der Wurzel erfolgt durch Absonderung von Verschlussmaterialien in die Leitgefäße (Benhamou, 1995). Mitunter konnten auch Substanzen identifiziert werden, deren Bildung zur Eliminierung von *Verticillium ssp.* beiträgt. Spezielle Chitinasen, Glucanasen und Phytoalexine verhelfen zu einer

verbesserten Toleranz (Bell, 1969; Benhamou, 1995; Daayf *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2002; Cooper und Williams, 2004; Floerl *et al.*, 2008). Wenn die Xylem Elemente im Spross schon kolonialisieren sind, spielen verschiedene lösliche Phenylpropanoide, wie Coniferylalkohol und Coniferin, eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung, indem sie direkt das Pilzwachstum inhibieren können, was *in vitro* gezeigt wurde (König *et al.*, 2014). Die Menge dieser Phenylpropanoide ist in *Arabidopsis* mehrere Tage nach der Inokulation im Spross deutlich erhöht und die Expression von Genen, deren Genprodukte am Phenylpropanoid-Syntheseweg beteiligt sind, ebenfalls (König *et al.*, 2014). Anders als in der Wurzel wurden im oberirdischen Teil nur Spuren an Indol-Glucosinolaten oder Camalexin gefunden (König *et al.*, 2014). Wahrscheinlich ist das darauf zurückzuführen, dass der Pilz in der Wurzel äußerst invasiv vorgehen muss, und er dementsprechend stark bekämpft wird, wohingegen er kaum noch versuchen wird, lebendes Gewebe zu befallen, sobald das Xylem erreicht ist, wo er „versteckt“ ist (König *et al.*, 2014). Erst wenn der Wirt zunehmend abstirbt, wächst der Pilz in das tote Gewebe ein.

Damit sich *Verticillium* generell in der Pflanze weiter ausbreiten kann, ist die Wirkung des gasförmigen Phytohormons Ethylen nötig, denn es wird während der Infektion vermehrt freigesetzt und *Arabidopsis* Mutanten, die insensitiv für Ethylen sind (*ein2-1*, *ein4-1* und *ein6-1*), sind toleranter gegenüber *Verticillium*, genauso wie die Mutante im Ethylen Rezeptor *etr1-1* (Veronese *et al.*, 2003; Tjamos *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2006b).

Da *Arabidopsis* ein Mitglied der *Brassicaceae* ist, kommt sie auch als Wirtspflanze von *V. longisporum* in Frage. Diese Annahme wird durch Arbeiten von Veronese *et al.* (2003) bekräftigt, bei denen gezeigt werden konnte, dass *A. thaliana* unter Laborbedingungen bei einer Infektion Krankheitssymptome entwickelt. Inzwischen konnten einige Mutationen in Signaltransduktionswegen identifiziert werden, bei denen die Ausprägung des Pathophänotyps verändert war (Iven, 2009).

### **2.4.3 *Phytophthora parasitica*: ein pathogener Oomycet**

Vertreter der Gattung *Phytophthora* gehören zwar nicht zu den echten Pilzen, können aber als pilz-ähnliche Organismen aus dem Taxon der Ei- oder Algenpilze (*Oomycota*) bezeichnet werden. Obwohl Oomyceten lange als Pilze betrachtet wurden, weil sie heterotroph leben und ein filamentöses Myzel ausbilden, weiß man heute anhand von molekularen und morphologischen Kriterien, dass sie mit Braun- und Kieselalgen verwandt sind (Gunderson *et al.*, 1987; Barr, 1992; Baldauf *et al.*, 2000; Lamour und Kamoun, 2009;

Thines, 2014). Fossilienfunde belegen, dass einige Oomyceten vor etwa 300-350 Millionen Jahren bereits an Landpflanzen aufgetaucht sind (Krings *et al.*, 2011). Ihr Myzel setzt sich aus nicht unterteilten Hyphen zusammen, die mehrere diploide Kerne enthalten und das macht einen großen Unterschied zum Myzel der echten filamentösen Pilze (Brasier und Sansome, 1975; Erwin und Ribeiro, 1996). Außerdem besteht die Zellwand der Oomyceten sowohl aus  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glucanen als auch aus Cellulose (ein  $\beta$ -1,4-Glucan), wohingegen die Substanz Chitin (ebenfalls ein  $\beta$ -1,4-Glucan, aber mit zusätzlichen Acetamidgruppen), der Hauptbestandteil der Zellwand bei echten Pilzen, äußerst sporadisch bei Oomyceten auftritt (Bartinicki-Garcia und Wang, 1983). Somit wird auch verständlich, dass Fungizide, die sich gegen Chitin richten, bei Oomyceten nicht effektiv sind (Attard *et al.*, 2008). Viele phytopathogene Oomyceten richten große Schäden an Kulturpflanzen an. Eine der verheerendsten Ereignisse findet man im Jahr 1845: Das Pathogen *Phytophthora infestans* löste die Große Hungersnot in Irland aus, indem es durch Kraut- und Knollenfäule die Kartoffel Monokulturen enorm zerstörte und zusammen mit politischen sowie religiösen Umständen führte dies zu einem drastischen Rückgang der irischen Bevölkerung (O'Grada, 1999; Scholthof, 2007). Noch dazu lieferten der Anbau von nur wenigen Sorten und die genetische Verarmung der Pflanzen die besten Voraussetzungen für die Ausbreitung des Erregers (Börner, 2009). Allein dieses Beispiel lässt erahnen, dass der Name *Phytophthora*, was übersetzt so viel wie Pflanzenzerstörer bedeutet, nicht von ungefähr kommt. Nicht nur in der Vergangenheit haben *Phytophthora* spp. Ernteeinbußen verursacht, sondern noch immer stellen sie ein großes Problem in der Landwirtschaft dar (Erwin und Ribeiro, 1996; Stokstad, 2006), unter anderem weil bislang kaum effektive Pestizide auf dem Markt existieren, um durch Oomyceten bedingten Pflanzenkrankheiten entgegenzuwirken (Attard *et al.*, 2014). Allein mehr als 85 Spezies der Gattung *Phytophthora* verursachen jährlich Ernteverluste von schätzungsweise 5 Milliarden US-Dollar (Stokstad, 2006; Attard *et al.*, 2011). Eine Reihe von Wissenschaftlern stellte eine Rangliste mit den zehn bedeutendsten pflanzenpathogenen Oomyceten zusammen (Kamoun *et al.*, 2015). Unangefochten auf Platz eins landete *Phytophthora infestans*. Auf Platz acht liegt das verwandte Pathogen *Phytophthora parasitica* (Kamoun *et al.*, 2015) und dementsprechend wird auch hier eine starke agrarökonomische Wichtigkeit deutlich. Bei *P. parasitica* handelt es sich um ein bodenbürtiges und filamentöses Pathogen mit einem sehr breiten Wirtspflanzenspektrum aus etwa 60 Pflanzenfamilien, das Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) wie Kartoffeln und Tomaten sowie weitere Kulturpflanzen und sogar Früchte tragende Bäume beinhaltet (Erwin und Ribeiro, 1996; Cline *et al.*, 2008). Immerhin ist die Kartoffel in der weltweiten

Nahrungsproduktion nach Mais, Reis und Weizen die viert wichtigste Anbaupflanze (Scholthof, 2007) und Ernteauffälle können dramatische Folgen haben. Allgemeine Krankheitssymptome sind das Schwarzwerden des Stängels an der Basis des Pflanzenkörpers und eine schnelle Nekrotisierung des Wurzelgewebes (Meng *et al.*, 2014). Zur Untersuchung der speziellen Wechselbeziehung von Oomyceten mit Pflanzen wird *Phytophthora parasitica* immer mehr als Modellorganismus eingesetzt, denn viele Erkenntnisse sind repräsentativ für die Mehrheit seiner verwandten Arten (Attard *et al.*, 2008; Kroon *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2014). Unter anderem wird *A. thaliana* befallen. Diese Interaktion wurde als kompatibel identifiziert und schon mehrmals erfolgreich für Studien verwendet (z.B. in Attard *et al.*, 2008 und 2011). Wie alle *Phytophthora* Arten ist auch *P. parasitica* ein hemibiotrophes Pathogen (Attard *et al.*, 2011).

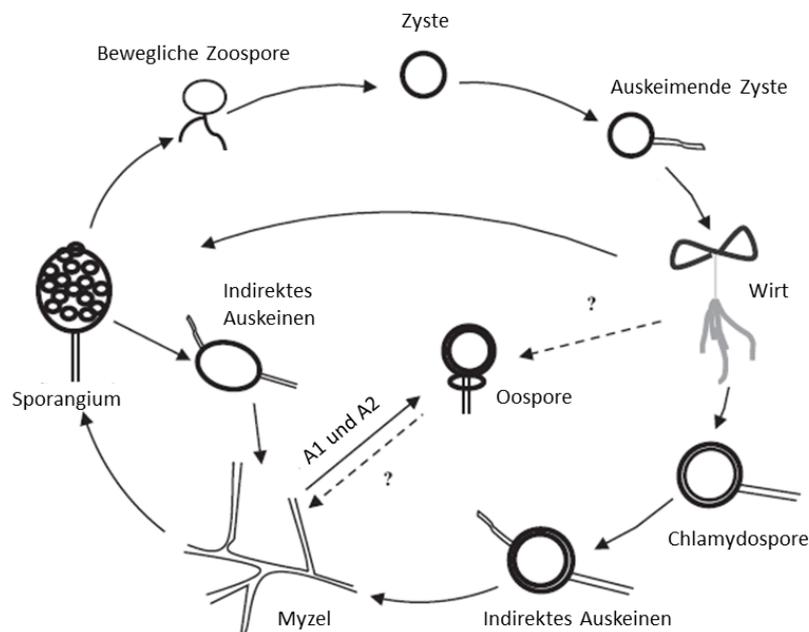


Abb. 8: **Lebenszyklus von *Phytophthora parasitica*.**

Die Hyphen der Oomyceten sind nicht septiert, pilzliche Hyphen dagegen schon (Meng *et al.*, 2014). Der typische Lebenszyklus hat sowohl asexuelle als auch sexuelle Phasen. Asexuell werden Sporangien, Zoosporen und Chlamydosporen gebildet. Am stärksten infektiös, um die Pflanzenkrankheit auszulösen, sind wohl die Zoosporen. Diese werden bei günstigen äußeren Bedingungen in Zoosporangien hergestellt und besitzen keine Zellwand. Durch Flagellen sind sie sehr beweglich und können schwimmen. Chlamydosporen sind von einer dicken Zellwand umgeben und entstehen meist an der Spitze von Hyphen bei schlechten äußeren Bedingungen und sie können viele Jahre im Boden überdauern. *P. parasitica* ist heterothallisch, d.h. sexuelle Vorgänge finden ausschließlich zwischen genetisch verschiedenen Myzelien bzw. deren Geschlechtszellen statt. Für die sexuelle Bildung von Oosporen (= Zygoten) werden A1 und A2 Paarungstypen benötigt (Ko *et al.*, 1981). Sexuelle Reproduktion ist wichtig, um genetische Varianz zu gewinnen. (Abbildung verändert nach Meng *et al.*, 2014)

Begeißelte, einzellige Zoosporen der *Phytophthora* spp. (Abb. 4C) schwimmen aktiv durch den feuchten Boden zur Wurzel hin, von der sie durch Exsudate angezogen werden und treten anschließend sofort in den Infektionszyklus ein, wobei Elongations- und

Differenzierungszonen der Wurzel bevorzugt werden (Tyler, 2002; Attard *et al.*, 2008; Attard *et al.*, 2011). Spritzwasser kann zwar bei Regen die Zoosporen zufällig auf die Blätter schleudern, wo sie dann an Wunden auskeimen und eindringen (Galiana *et al.*, 2005), aber es handelt sich *de facto* um ein klassisches Wurzelpathogen. Für Sporen der Oomyceten wurde gezeigt, dass sie ein Protein sekretieren, PcVsv1, das Charakteristika von tierischen Adhäsinen besitzt und normalerweise nicht in Pflanzen oder echten Pilzen zu finden ist (Robold und Hardham, 2005). Zusammen mit anderen Oberflächen-Bindeproteinen ist PcVsv1 wahrscheinlich noch vor der eigentlichen Infektion für die Adhäsion am Wirt verantwortlich (Gornhardt *et al.*, 2000; Panabieres *et al.*, 2005). Haftende Sporen locken weitere Zoosporen an und diese Art Kettenreaktion ist eine gute Strategie, die Infektionswahrscheinlichkeit rasant zu erhöhen (Tyler, 2002; Attard *et al.*, 2008). Es bildet sich ein dichter Biofilm an der Pflanzenoberfläche (Galiana *et al.*, 2008). Nach kurzer Zeit formt sich ein Keimschlauch aus jeder Spore und meistens wird die Penetration der Rhizodermis durch das Ausbilden von spezialisierten Penetrationsstrukturen, den sog. Appressorien, eingeleitet (Tyler, 2007; Kebdani *et al.*, 2010). Diese bilden sich an der Penetrationsstelle, indem die Spitze des Keimschlauches anschwillt und eine runde Zelle gebildet wird (Abb. 4 D), die nun das weitere Wachstum dirigiert (Kebdani *et al.*, 2010). Weil ein Septum das Appressorium vom restlichen Filament trennt, wird deutlich, dass sich diese Struktur definitiv von einer normalen Hyphe unterscheidet (Krämer *et al.*, 1997; Kebdani *et al.*, 2010). Viele Gene des Oomyceten codieren für hydrolytische Enzyme, die pflanzliche Zellwände auflösen können, wodurch der Durchbruch der Barriere erleichtert wird (Panabieres *et al.*, 2005; Le Berre *et al.*, 2007; Kebdani *et al.*, 2010). Der Turgordruck in den Appressorien steigt und Filamente werden vorwärts gedrückt. Schneller Erfolg zeigt sich, denn bereits 2,5 Stunden nach Infektionsbeginn sind Hyphen zwischen Rhizodermiszellen von *Arabidopsis* zu finden (Attard *et al.*, 2010). Knollenförmige Hyphen dringen interzellulär weiter in die Wurzel vor (Benhamou und Côté, 1992; Widmer *et al.*, 1998; Le Berre *et al.*, 2008). Während Pflanzenzellen zunächst am Leben bleiben, etabliert sich eine relativ kurze biotrophe Phase. 6 Stunden nach Inokulation ist durch invasive Ausbreitung des Oomyceten der Cortex besiedelt (Attard *et al.*, 2010). Die eingedrungenen Hyphen nutzen wahrscheinlich Plasmamembran  $H^+$ -ATPasen, um einen elektrochemischen Gradienten zu erzeugen, der den Fluss von Stoffen aus der Pflanzenzellen in das Cytoplasma des Oomyceten hinein begünstigt (Shan *et al.*, 2006). Die Expression entsprechender Gene für Plasmamembran  $H^+$ -ATPasen wurde ebenso in keimenden Sporen endoparasitärer echter Pilze beobachtet (Struck *et al.*, 1996). Innerhalb der ersten zehn Stunden nach Infektionsbeginn startet bei

Hyphen, die den Cortex besiedeln, die Ausbildung spezieller Ernährungsstrukturen, sog. Haustorien-ähnlicher Strukturen, wo der Stoffaustausch während des biotrophen Wachstums stattfindet (Attard *et al.*, 2010). Anhand von Färbeversuchen wurde beobachtet, dass sich Haustorien-ähnliche Strukturen innerhalb der lebenden Wirtszelle binnen der ersten 24 Stunden formen (Attard *et al.*, 2010) und diese Strukturen erfüllen die Kriterien echter Haustorien (Bushnell, 1972), die zuvor nur bei Pilzen bekannt waren. Daten von Attard *et al.* (2014) weisen darauf hin, dass *P. parasitica* Aminosäuren als Kohlenstoffquelle von der Pflanze aufnehmen könnte, sobald die Penetration beginnt. Cortex und Endodermis werden in wenigen Stunden durchquert und wenn der Zentralzylinder erreicht wird, wachsen Hyphen entlang des Zentralzylinders nach oben, ohne in diesen einzudringen (Attard *et al.*, 2010). Etwa 30 Stunden nach Inokulation beginnen die ersten Ereignisse, die in die nekrotrophe Phase überleiten, wobei die besiedelten Wurzelbereiche nach zwei Tagen noch am Leben und am dritten Tag abgestorben sind, d.h. der Zelltod wird in infizierten Wurzeln also zwischen dem zweiten und dritten Tag induziert (Attard *et al.*, 2010). Ab dem fünften Tag erfolgt eine Sporulation auf der Wurzeloberfläche. Nach etwas mehr als einer Woche ist auch der Spross stark besiedelt und zu diesem Zeitpunkt zeigt *Arabidopsis* erste Welke Symptome. Die Hyphen wachsen interzellulär in der Blatlamina und sporulieren nach zehn Tagen auf der Blattoberfläche (Attard *et al.*, 2010), indem Fortpflanzungshyphen über die Spaltöffnungen in die Luft ragen und terminal Zoosporangien abschnüren (Börner, 2009). Morphologisch gesehen, sind Zoosporangien gleichermaßen Konidien, die mit dem Wind verbreitet werden können und in Kontakt mit Wasser Zoosporen entlassen. Unter günstigen Bedingungen werden diese Strukturen asexuell in großer Zahl gebildet und schnell verbreitet (Börner, 2009). Die sehr beweglichen Zoosporen befallen einen neuen Wirt und der Kreislauf schließt sich.

Sofort nachdem der Kontakt mit *Phytophthora* zustande gekommen ist, werden in der *Arabidopsis* Wurzel Abwehrreaktionen eingeleitet (Attard *et al.*, 2010). Dabei werden einige charakteristische Oberflächenmoleküle des Pathogenes (PAMPs) von der Pflanze erkannt, was einen Alarm aktiviert. Elicitoren, wie das toxische Protein ParA1 (Kamoun *et al.*, 1993), können wahrscheinlich auch als PAMPs auftreten (Meng *et al.*, 2014). Des weiteren erkennen z.B. Zellen von *A. thaliana* eine Zellwandkomponente von *P. parasitica*, das CBEL (cellulose-binding, elicitor, and lectin activity), was zügig eine HR (hypersensitive response) auslöst (Gaulin *et al.*, 2002; Gaulin *et al.*, 2006), womit die Ausbreitung des Pathogenes eingedämmt werden soll. *PR1* als Marker der SA-induzierten Antwort, wird 2,5 hpi transkriptionell stark induziert, allerdings ist diese Induktion nur

transient und schwächt schnell ab (Attard *et al.*, 2010). Auch bei *P. indica* ist nur eine transiente *PR1* Induktion zu beobachten (Deshmukh und Kogel, 2007; Pedrotti *et al.*, 2013). Sind beide Organismen auf irgendeine Art in der Lage, die Immunabwehr zu supprimieren? Um erfolgreich einen Wirt besiedeln zu können, egal ob mutualistisch oder parasitisch, ist es immer nötig, konstitutive Barrieren zu überwinden, Immunantworten zu reprimieren oder komplett zu vermeiden und Wirtszellen für eigene Zwecke zu manipulieren. Einige Berichte fassen die Unterdrückung von Immunantworten durch pathogene Bakterien, Pilze und Oomyceten gut und umfangreich zusammen (z.B. Birch *et al.*, 2009; Ellis *et al.*, 2009; Hein *et al.*, 2009; Mansfield, 2009; Hok *et al.*, 2010). Für den Stoffaustausch stehen die Haustorien in sehr engem Kontakt mit der Wirtszelle und sind wahrscheinlich die zentralen Strukturen, wo die Manipulation des Wirtes während des biotrophen Wachstums stattfindet (Birch *et al.*, 2009; Hok *et al.*, 2010). Lokal muss natürlich die Pflanzenzellwand abgebaut werden, damit ein Haustorium ausgebildet werden kann, das Zugang zu den Ressourcen der Pflanzenzelle haben soll. Doch eine Beschädigung der Zellwand löst Alarm aus, was eine Abwehrreaktion zu Folge hat (Hématy *et al.*, 2009). Deshalb muss das Pathogen während dem Anlegen der Haustorien den Zellwandabbau am Wirt minimieren und verhindern, dass der Schaden bemerkt wird. Eine gute Strategie des Pathogenes ist es, wenn es sich die eigenen Enzyme der Wirtszelle, die sowieso die Zellwand modellieren, zu Nutze machen kann, denn dann kommt die Wahrnehmung, dass ein fremd bedingter Schaden entsteht, gar nicht erst zustande (Hok *et al.*, 2010). Beispielsweise wurden *pmr* (*POWDERY MILDEW RESISTANT*) *Arabidopsis* Mutanten identifiziert, die resistenter als der Wildtyp gegenüber dem biotrophen echten Mehltaupilz (*Golovinomyces cichoracearum*) waren. *PMR6* codiert für eine Pektat-Lyase und die korrespondierende Verlustmutante ist resistenter (Vogel und Somerville 2000; Vogel *et al.* 2002, 2004). *PMR6* könnte vom Mehltaupilz rekrutiert werden, um eine für den Stoffaustausch störende Akkumulation von Pektin in den Raum zwischen Haustorium und der pflanzlichen Plasmamembran zu unterbinden (Vogel *et al.*, 2004). Der Verlust von *PMR6* in der Mutante verschlechtert für den Pilz den Zugang zu Nährstoffen, was eine geringere Propagation des Pilzes in der Pflanze zur Folge hat (Vogel *et al.*, 2002).

Da bei *P. parasitica*-Infektionen sowohl mehrere SA- als auch JA-regulierte Antworten nur transient sind, vermuteten Attard *et al.* (2010), dass diese Signalwege, die wichtig sind für koordinative Verteidigungsmaßnahmen, nach einer anfänglichen Induktion recht schnell wieder unterdrückt werden könnten. Ein solcher Rückgang in der Expression der hormonregulierten Gene, könnte die Manipulation der Wirtsabwehr durch pathogene

Effektoren reflektieren (Schornack *et al.*, 2009). Man geht davon aus, dass biotrophe und hemibiotrophe Pilze bzw. Oomyceten hunderte von Effektoren herstellen (de Wit *et al.*, 2009) und dass die Feinabstimmung bei der *Phytophthora*-Infektion geregelt wird durch sekretierte Effektor Proteine, die ein N-terminales RXLR-dEER Motif haben, mit dem die Translokation in die Pflanzenzelle hinein ermöglicht wird (Rehmany *et al.*, 2005; Whisson *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). Eingeschleuste RXLR Proteine könnten bei der Hemmung der Pflanzenabwehr oder der Modifikation der Wirtszellen eine entscheidende Rolle spielen (Kebdani *et al.*, 2010). Mindestens zwei RXLR Proteine werden von Haustorien in das Cytoplasma der Pflanzenzelle überführt, wo sie den Zelltod der Wirtszellen während der biotrophen Phase der Infektion verhindern, also die Zelle manipulieren (Bos *et al.*, 2006, Kebdani *et al.*, 2010). Ziemlich sicher sind die Appressorien ebenfalls an der Manipulation der Wirtszellen beteiligt (Attard *et al.*, 2014), denn die Expression entsprechender Gene für RXLR Proteine ist in diesen Strukturen besonders stark (Kebdani *et al.*, 2010). Darüber hinaus exprimieren Appressorien eine Reihe von Genen, die für Proteine codieren, welche zum Schutz gegen ROS eingesetzt werden können oder die als Transporter toxische Pflanzenstoffe wieder aus der Hyphe hinaus schleusen können (Kebdani *et al.*, 2010). Aus dem facettenreichen Waffenarsenal sind dies nur ein paar Beispiele, die die Verteidigung der Pflanze reduzieren und es Mikroorganismen möglich machen, am Ende als Sieger vom Platz zu gehen. Allerdings wissen wir noch zu wenig darüber, wie filamentöse biotrophe, hemibiotrophe bzw. mutualistische Bodenorganismen die Pflanze manipulieren können und viele der Annahmen sind noch nicht ausreichend validiert (Hok *et al.*, 2010). Wie wird die Pflanzenabwehr in den einzelnen Zellschichten induziert bzw. ausgeschaltet? Unter anderem könnten mit Hilfe der im nächsten Kapitel erläuterten Methode Antworten auf diese Fragen erhalten werden.

## **2.5 Methoden zur Entschlüsselung der zellschichtspezifischen Genexpression und deren Bedeutung**

Damit eine Zelle einen Phänotyp ausprägen kann, muss die genetische Information umgesetzt werden. Dabei kann die Genexpression dank verschiedener Mechanismen reguliert werden. Weil sich dadurch die Genexpression in Zellen unterschiedlich gestalten kann, erhält jeder Zelltyp sein individuelles Erscheinungsbild. Bei der Wurzel wurden bereits die verschiedenen Zelltypen vorgestellt und eine Phloem-Zelle sieht nun mal komplett anders aus als ein Trichoblast mit einem Wurzelhaar. Aber die differentielle Genexpression ist nicht nur bei der Ausprägung des Phänotyps zu beobachten, denn auch

bezüglich der Antwort auf ein Stresssignal kann bei verschiedenen Zellpopulationen ein unterschiedliches Muster der Expression vorliegen. Hierfür kann die Zelle mit TFs und anderen Komponenten entweder eine Aktivierung oder Repression von Promotoren bewirken und auf diese Weise die Transkriptionshäufigkeit eines Gens steuern. Nach der Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor erfolgt die Transkription in die sog. messenger RNA (mRNA), die anschließend modifiziert und aus dem Zellkern ins Zytoplasma überführt wird (zur Übersicht siehe Clancy und Brown, 2008). Wenn man nun die gesamt vorhandenen mRNA-Spezies quantifiziert, kann man Daten über die Expression erhalten. Man spricht dann von einer Transkriptomanalyse.

Um für zelltypspezifische Untersuchungen homogene Zellgruppen zu gewinnen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen können in einer lasergestützten Mikrodissektion unter dem Mikroskop morphologisch gleiche Zellen mit einem Laser direkt aus dem Gewebe herausgeschnitten werden (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Kerk *et al.*, 2003) und zum anderen kann man mittels einer Durchflusszytometrie gleichartige Zellen aus einer Suspension von Zellen bzw. Protoplasten isolieren (Göhde, 1968; Zhang *et al.*, 2008). Bei der letztgenannten Methode nutzt man einen Sortierer, das FACS (engl.: fluorescence activated cell sorting). Dabei fließen Protoplasten, die aus Pflanzenmaterial gewonnen wurden, an einem Detektor vorbei und dieser sortiert zelltypspezifisch Fluoreszenzmarkierte Protoplasten der Zielzellen in ein Gefäß (Galbraith *et al.*, 1984; Birnbaum *et al.*, 2003; Birnbaum *et al.*, 2005; Brady *et al.*, 2007; Dinneny *et al.*, 2008). Aus den separierten Zellen beider Methoden lässt sich das Transkriptom ermitteln. Jedoch spiegelt das Transkriptom kein exaktes Muster der Genexpression wieder, weil nicht jede mRNA auch zwangsläufig in ein Protein übersetzt werden muss. Viele Belege existieren, dass letztendlich nur ein Teil der mRNA im Zytoplasma translatiert wird (Bailey-Serres *et al.*, 1999; Kawaguchi und Bailey-Serres, 2005; Branco-Price *et al.*, 2008). Im Zuge einer posttranskriptionellen Modifikation kann die mRNA beispielsweise mit Proteinen assoziiert werden, die eine Degradation oder Speicherung des Moleküls vermitteln (Parker und Sheth, 2007; Proud, 2007; van Hoof und Wagner, 2011). Ferner kann ein kurzes RNA-Fragment an ein komplementäres Gegenstück einer mRNA binden und die Translation unterbinden, was als RNA-Interferenz bekannt ist (Fire *et al.*, 1998; Balagopal und Parker, 2009). Es existieren noch weitere Mechanismen, die nach der Transkription die Genexpression steuern und obwohl also der reine Anstieg der mRNA nicht unbedingt mit einem Anstieg des codierten Proteins, der eigentlich biologisch aktiven Komponente des Gens, korreliert, wurde die Information aus Transkriptomanalysen allgemein verwendet, um Genkandidaten zu ermitteln, die eine Rolle während der Interaktion mit anderen

Organismen spielen und dabei wurden post-transkriptionelle Ereignisse komplett außer Acht gelassen (Reynoso *et al.*, 2013a). Einer der wichtigsten Regulierungspunkte, wo entschieden wird, ob eine mRNA translatiert wird oder nicht, ist die Rekrutierung der Ribosomen während der Initiationsphase (Bailey-Serres, 1999). Am Startcodon der mRNA lagern sich dazu eine große und eine kleine ribosomale Untereinheit zusammen und formen ein funktionsfähiges Ribosom, wobei sich die mRNA zwischen diesen beiden Einheiten befindet (zur Übersicht siehe Clancy und Brown, 2008). Jede ribosomale Untereinheit setzt sich aus ribosomaler RNA (rRNA) und Proteinen zusammen (Ban *et al.*, 2000; Clancy und Brown, 2008). Etliche Umwelteinflüsse führen zu einer Anpassung der Translation und somit zu einer adäquaten Abstimmung der Genexpression (zur Übersicht siehe Bailey-Serres *et al.*, 2009). Nach der Initiation beginnt das Ribosom mit der Proteinsynthese gemäß der auf der mRNA gespeicherten Mitteilung, wobei meistens mehrere Ribosomen gleichzeitig hintereinander an einem mRNA-Molekül angeordnet sind, so dass eine perlenkettenartige Struktur entsteht, die man Polysom nennt (Zanetti *et al.*, 2005). Quantifiziert man nur jene mRNA, die gerade aktiv am Polysom umgesetzt wird, bestimmt man das „Translatom“, was eine viel stärkere Aussagekraft über die Expression hat, als das Transkriptom (Mustroph *et al.*, 2009; Heiman *et al.*, 2014). Aus diesem Grund wurde für die hier angefertigten Studien auf eine von Zanetti *et al.* (2005) entwickelte Methode zurückgegriffen, mit der sich das „Translatom“ ermitteln lässt. Ribosomen wurden eigens mit einem Antigen versehen und können samt anhaftender mRNA isoliert werden. Man bezeichnet eine solche Isolation translatierender Ribosomen mittels Affinitäts-Aufreinigung abgekürzt als TRAP (engl.: Translating Ribosome Affinity Purification). Zanetti *et al.* (2005) fusionierten ein Protein der großen Untereinheit, das RPL18 (ribosomales Protein L18), am N-Terminus mit einer kurzen, als Epitop fungierenden Peptidsequenz (FLAG). RPL18 wurde ausgewählt, weil sich in der Struktur des Ribosoms sein N-Terminus an der Oberfläche befindet und das angehängte FLAG somit für Antikörper während der TRAP leicht zugänglich ist (Abb. 9). Neben seiner Lokalisation am äußersten Rand der Untereinheit ist das aus lediglich acht Aminosäuren bestehende FLAG-Peptid sehr klein, weshalb es für die Zusammenlagerung und die katalytische Funktion des Ribosoms keine Behinderung darstellt (Zanetti *et al.*, 2005). Zwischen RPL18 und FLAG wurde ein Abstandshalter („linker“) aus mehreren ungeladenen Glycin-Aminosäuren eingefügt, um die Flexibilität des Epitops zu erhöhen und eine Krümmung nach außen zu erleichtern. Anti-FLAG Antikörper bilden in einer Suspension aus Zellbestandteilen spezifisch mit den Epitop-markierten Ribosomen Komplexe. Durch die Kopplung der Antikörper an Festkörper („beads“), die z.B. magnetisch sein können, ist eine Separation

der Komplexe möglich. Während der Überstand verworfen werden kann, bleiben die „beads“ mit den anhaftenden Polysomen im Versuchsansatz zurück.

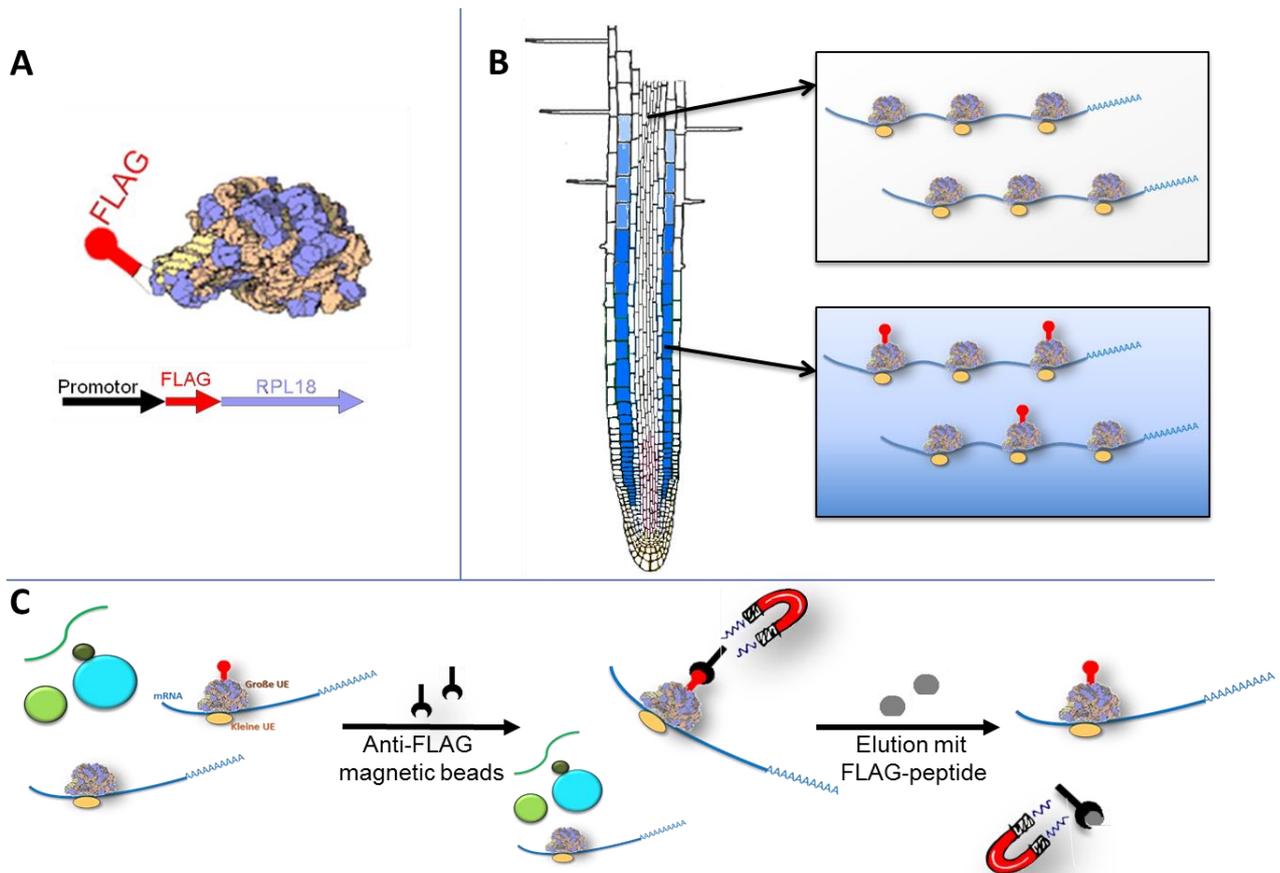


Abb. 9: **Mittels TRAP-Methodik lassen sich FLAG-markierte Ribosom-mRNA-Komplexe isolieren.**

A: Die große 60S Untereinheit eines eukaryotischen Ribosoms ist schematisch dargestellt (Quelle: RCSB Protein Data Bank). Sie besteht aus Protein (violett) und rRNA (gelb, zartrosa). Es wurde ein *Promotor:FLAG-RPL18* Konstrukt generiert (Zanetti *et al.*, 2005), so dass nach Expression das FLAG-Epitop an das RPL18 fusioniert ist. Im Schema ist die ungefähre Lokalisation des FLAG-tags (rot) an der Untereinheit markiert. Durch das Einsetzen eines zellschichtspezifischen Promotors treten FLAG-markierte Ribosomen ausschließlich in der Zellschicht des Interesses auf.

B: Durch das Verwenden zellschichtspezifischer Promotoren ist die Expression des *FLAG-RPL18* auf eine Zellschicht begrenzt (Mustroph *et al.*, 2009). Beispiel: in der *Promotor<sub>PEP</sub>:FLAG-RPL18* Linie liegen FLAG-Ribosomen im Cortex (blau) vor. Nur diese werden spezifisch durch das TRAP-Verfahren extrahiert. Im restlichen Gewebe (weiß, grau) sind keine markierten Polysomen vorhanden, sondern nur normal exprimierte. Diese werden nicht isoliert.

C: Grundzüge der TRAP-Technik: In einer Gewebesuspension sind neben den markierten Ribosomen auch alle anderen Zellbestandteile (grün, türkis) und unmarkierte Ribosomen vorhanden. Anti-FLAG Antikörper sind an magnetische Festkörper („beads“) gekoppelt und binden spezifisch an das FLAG-Epitop. Während die Antikörper gebundenen Ribosom-mRNA-Komplexe im Reaktionsgefäß zurückgehalten werden, kann der Überstand mit allen anderen Zellbestandteilen verworfen werden. In einer anschließenden Elution mit FLAG-Peptiden werden die Polysomen von den Antikörpern getrennt. Die „beads“ werden verworfen und zurück bleiben die aufgereinigten Polysomen. Mit der dadurch isolierten mRNA lässt sich das „Translatom“ untersuchen.

Im letzten Schritt müssen die Polysomen wieder von den Antikörpern getrennt werden, was durch eine Elution mittels FLAG-Peptiden geschieht, die die FLAG-markierten Ribosomen allmählich von der Antikörperbindungsstelle ablösen. Im Überstand befinden sich nun die aufgereinigten Polysomen mit der anhaftenden mRNA. Genau das ist ein

Ausschnitt jener mRNA, die tatsächlich zu diesem Zeitpunkt translatiert wurde. Allerdings finden sich in der durch TRAP aufgereinigten RNA noch weitere RNA-Spezies: den mit Abstand größten Teil macht rRNA aus und in Spuren wird transfer RNA (tRNA), die mit Ribosomen assoziiert war, isoliert (Heiman *et al.*, 2014). Aus dem RNA Gemisch muss anschließend die mRNA extrahiert werden und erst diese reine mRNA kann über verschiedene Methoden wie *quantitative Real-Time-PCR* (qRT-PCR) oder RNA-Sequenzierung analysiert werden.

Um die beschriebene Affinitäts-Aufreinigung zellschichtspezifisch zu gestalten, wurde die DNA-Sequenz des *FLAG-RPL18*-Konstruktes unter die Kontrolle zellschichtspezifischer Promotoren gestellt (Mustroph *et al.*, 2009). Somit wird im Idealfall das *FLAG-RPL18* nur in einer Zellpopulation exprimiert und mit Hilfe der TRAP lässt sich spezifisch deren Translatom innerhalb eines komplexen Gewebes bestimmen. Dieses Verfahren ermöglichte bereits die Anfertigung eines umfangreichen Translatom-Atlas (*The Arabidopsis Translatome Atlas*) über spezifische Genexpressionen innerhalb der Zellschichten unter Kontrollbedingungen sowie während der Stressantwort auf Hypoxie (Mustroph *et al.*, 2009; Mustroph und Bailey-Serres, 2010). Seitdem sind die Daten öffentlich abrufbar über die eFP (*electronic Fluorescent Pictograph*) Plattform (efp.ucr.edu/) (Winter *et al.*, 2007) und bieten eine neue und hilfreiche Möglichkeit, zellschichtspezifische Prozesse zu studieren (Mustroph und Bailey-Serres, 2010).

Doch nicht nur in der Pflanzenforschung wurden die TRAP Methode oder ähnliche Aufreinigungen erfolgreich angewandt. Studien und Publikationen über derartige Untersuchungen zelltypspezifischer Genexpression liegen auch über andere Modellorganismen wie *Drosophila* (Thomas *et al.*, 2012), *Xenopus* (Watson *et al.*, 2012), Zebrafisch (Tryon *et al.*, 2013) und Maus (Heiman *et al.*, 2008, Heiman *et al.*, 2014) vor. Hier erkennt man ein klares Interesse der Forschung an zelltypspezifisch aufgelösten Expressionsprofilen, denn jede Information, die nicht auf alle Zellen gleich zutrifft, sondern nur in einem einzelnen Zelltyp vorhanden ist, geht bei Betrachtung eines Organs als Ganzes verloren, weil mehr oder weniger die individuellen Reaktionen der einzelnen Zelltypen gemittelt werden (Heiman *et al.*, 2014). Da die RNA-Sequenzierung, ähnlich der altgedienten Microarrays, ein simultanes Auswerten der mRNA aller Gene des Genoms erlaubt, kann über die Kombination aus TRAP und RNA-Sequenzierung (TRAP-Seq) ein genomweites und zelltypspezifisches Profil über das „Translatom“ aufgestellt werden (Reynoso *et al.*, 2015). Bisher ist kaum etwas zu zelltypspezifischen Expressionsprofilen in der Pflanzenwurzel während Interaktion mit Mikroorganismen bekannt. Genau mit dieser Thematik beschäftigen sich die folgenden Kapitel ausführlich.

## 2.6 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Im Zentrum dieser Dissertation steht die Etablierung einer Routine-Arbeitsmethode, als „Translatomics“ bezeichnet, mit der Änderungen der Genexpression in der Pflanzenwurzel nach Infektion mit Mikroorganismus in definierten Zellschichten verfolgt werden können. Das ist wichtig, um z.B. solchen Fragen nachgehen zu können, inwiefern sich die differentiellen Genexpressionen in Rhizodermis, Cortex, Endodermis oder Zentralzylinder unterscheiden. Vielleicht zeigen äußere und innere Zellschichten ein ganz anderes oder zeitlich versetztes Abwehrverhalten. Als bodenbürtige Modellorganismen sollen an der *Arabidopsis thaliana* Wurzel die Pilze *Piriformospora indica* und *Verticillium longisporum* (VI) sowie der Oomycet *Phytophthora parasitica* eingesetzt werden. Zunächst sollen geeignete Infektionssysteme gefunden und optimiert werden, innerhalb derer man biotrophe Phasen der Interaktionen störungsfrei untersuchen kann. Indem Pflanzenlinien inokuliert werden, die zellschichtspezifisch Epitop-markierte Ribosomen exprimieren, soll eine Affinitäts-Aufreinigung (TRAP) der gerade translatierten mRNA aus einzelnen Wurzelzellschichten möglich werden. Basierend auf diesem Fundament wird das TRAP-Verfahren verfeinert, damit sich das zelltypspezifische „Translatom“ von infizierten und nicht-infizierten Wurzeln isolieren lässt. Durch den direkten Vergleich beider Zustände mittels RNA-Sequenzierung (Seq), soll ein genomweiter Überblick der differentiellen Genexpression gewonnen werden, die durch Mikroorganismen bedingt ist. Aus früheren Studien von Iven (2009, 2012) ist bekannt, dass Gene, deren Genprodukte am Tryptophan (Trp) abhängigen Biosyntheseweg antimikrobieller Sekundärmetaboliten beteiligt sind, transkriptionell stark durch eine VI Infektion induziert werden. Diese und andere Induktionen sollen in jeder Wurzelzellschicht einzeln betrachtet werden, um resistenzvermittelnde Mechanismen aufdecken zu können. Ein Vergleich der VI-bedingten Änderungen mit denen, die durch die anderen Modellorganismen ausgelöst werden, soll möglich werden. Besonders soll dabei der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich die expressionellen Reaktionen der Wurzelzellschichten auf Pathogene und Mutualisten unterscheiden. Über ein TRAP-Seq Verfahren sollen umfangreiche Datensätze generiert werden, aus denen sich testbare Hypothesen bezüglich der Abwehrreaktionen der Zellschichten ableiten lassen. Exemplarisch sollen einige der Hypothesen ausgewählt werden, die zum einen das in der Methodik steckende Potential veranschaulichen und die zum anderen mittels weiterführender Versuche verifiziert werden können. Das soll über die Verwendung geeigneter *Promotor:Reporter*gen Pflanzenlinien und mittels „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Ansätze erfolgen, die für Pathogen-induzierte Gene eine Rolle in der Immunantwort belegen können.

## 3. Material

### 3.1 Organismen

#### 3.1.1 *Piriformospora indica*

Isolat	Eigenschaften	Referenz
<i>P. indica</i>	Isolat aus Thar Wüste/Indien	PD Dr. Frank Waller (Universität Würzburg); DSM 11827

#### 3.1.2 *Verticillium longisporum*

Isolat	Eigenschaften	Referenz
<i>Verticillium longisporum</i> 43 (VI43)	Isolat aus Mecklenburg/Deutschland	Zeise und von Tiedemann, 2002
eGFP-VI43	eGFP-Reporterstamm von VI43	Eynck <i>et al.</i> , 2007

#### 3.1.3 *Phytophthora parasitica*

Isolat	Eigenschaften	Referenz
<i>Phytophthora parasitica</i> INRA-310	Isolat aus Australien	Dr. Agnès Attard (INRA/CNRS/Université Nice Sophia Antipolis, Frankreich)

#### 3.1.4 *Arabidopsis thaliana*

Zelltyp	Promotor
Beinahe konstitutiv	Cauliflower mosaic virus 35S ( <i>p35S</i> )
Endodermis, Ruhezentrum	<i>SCARECROW</i> ( <i>pSCR</i> )
Zentralzylinder	<i>SHORTROOT</i> ( <i>pSHR</i> )
Zentralzylinder	<i>WOODENLEG</i> ( <i>pWOL</i> )
Cortex, Elongations- und Differenzierungszone	Plastid Endopeptidase ( <i>pPEP</i> )
Rhizodermis	<i>GLABRA2</i> ( <i>pGL2</i> )

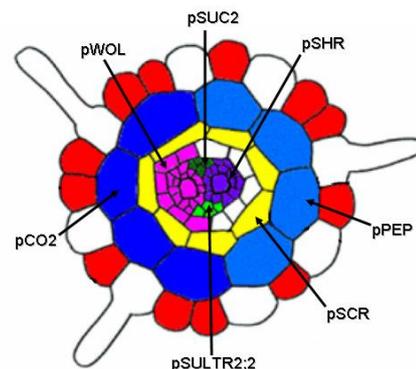


Abb. 10: Zusammenstellung der verwendeten *Promotor:FLAG-RPL18 Arabidopsis* Linien.

Links: Auflistung der Zelltypen/Zellschichten in der Wurzel und den zugehörigen zelltypspezifischen Promotoren, die für die Expression des *FLAG-RPL18* ausgesucht wurden. Die Linien wurden nach den verwendeten Promotoren benannt. Rechts: Schematischer Querschnitt der Wurzel. Die Zellpopulationen und deren zelltypspezifische Promotoren sind gekennzeichnet. Das *Promotor:FLAG-RPL18* Konstrukt mit dem Promotor *pGL2* (*GLABRA2*), der spezifisch für die Atrichoblasten der Rhizodermis (rot in der Abbildung gekennzeichnet) ausgewählt wurde, zeigte neben der Expression in den Zielzellen auch eine geringe Expression in Phloem Geleitzellen.

Freundlicherweise wurden uns von Frau Prof. Dr. Angelika Mustroph (Universität Bayreuth) *Arabidopsis Promotor:FLAG-RPL18* Linien für die zelltypspezifischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Mustroph *et al.*, 2009): Die transgenen Linien besitzen einen *A. thaliana* Ökotyp (Col-0) Hintergrund. Linien mit den Konstrukten *Promotor:FLAG-RPL18* werden im Weiteren nach den Promotoren bezeichnet: *p35S*, *pSCR*, *pSHR*, *pWOL*, *pPEP* und *pGL2*.

Zusammen mit dem FLAG-tag besitzen diese Pflanzen auch ein His<sub>6</sub>-tag. Deshalb tritt zuweilen auch die Abkürzung HF-tag (His<sub>6</sub>-FLAG-tag) auf. Da aber das His<sub>6</sub>-tag nicht gut geeignet ist, um das markierte RPL18 in einer TRAP zu isolieren (A. Mustroph, persönliche Mitteilung), kommt im Text überwiegend die Bezeichnung FLAG-tag vor.

Weiterhin wurden folgende Pflanzenlinien verwendet:

Ökotyp/Mutante	Eigenschaften	Referenz
Wt (Col-0)	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp vom Ökotyp <i>Columbia</i>	N1092, Kultursorte
<i>cyp79b2/b3</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygot, Mutationen in <i>CYP79B2</i> und <i>CYP79B3</i> , so dass IAOx Synthese nach Tryptophan unterbrochen ist	Zhao <i>et al.</i> , 2002
<i>cyp71a12/a13/a18</i>	Dreifach Verlustmutante mit stark reduzierter Menge an Camalexin	AG Glawischnig, Technische Universität München, unveröffentlicht
<i>DIN2 OE #1</i>	Von <i>DIN2_OE #2</i> unabhängige Linie, Hintergrund Col-0, homozygot, 35S CaMV Promotor, konstitutive Überexpression der <i>DIN2</i> CDS, N-terminaler 3X HA-tag	Diese Dissertation
<i>DIN2 OE #2</i>	Von <i>DIN2_OE #1</i> unabhängige Linie, Hintergrund Col-0, homozygot, 35S CaMV Promotor, konstitutive Überexpression der <i>DIN2</i> CDS, N-terminaler 3X HA-tag	Diese Dissertation
<i>din2-4</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygot, mehrfache T-DNA Insertion in Promotorregion von <i>DIN2</i>	SALK_029737, Charakterisierung in Vollmer, 2015
<i>myb34/51/122</i>	Die Dreifachmutante ist in der Synthese von IAOx limitiert	Frerigmann und Gigolashvili, 2014
<i>NAC042 OE</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygote pE-HA-NAC042 Überexpressionslinie	Iven, 2009
<i>nac042</i>	Homozygote T-DNA Insertionslinie	SALK_036474 (N536474)
<i>Promotor<sub>PAD3</sub>:PAD3-GFP</i>	Reporterlinie; PAD3-GFP Fusion (driven by the endogenous promoter)	AG Glawischnig, Technische Universität München, unveröffentlicht
<i>Promotor<sub>UmamiT29</sub>:UMAMIT29-GFP</i>	Reporterlinie; UmamiT29-GFP Fusion (driven by the endogenous promoter)	Müller B. <i>et al.</i> , 2015
<i>Promotor<sub>SGP2</sub>:GFP</i>	Reporterlinie; GFP an Promoter von <i>SGP2</i> (At3g21700) fusioniert	Mustroph, unveröffentlicht
<i>Promotor:HF-GFP-RPL18</i>	Reporterlinien zum Nachweis der zelltypspezifischen Aktivität der Promotoren	Mustroph <i>et al.</i> , 2009

<i>Promotor</i> <sub>CYP81F2</sub> : <i>CYP81F2-RFP</i>	Reporterlinie; CYP81F2-RFP Fusion (driven by the endogenous promoter)	Fuchs <i>et al.</i> , 2016
<i>pRHS12</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, Promotor von <i>RHS12</i> fusioniert mit FLAG-RPL18, Wurzelhaarspezifische Linie	Diese Dissertation
<i>ERF#104 OE</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygote Überexpressionslinie aus <i>AfTORF-EX</i> Screen	Iven, 2009
<i>ERF#105 OE</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygote Überexpressionslinie aus <i>AfTORF-EX</i> Screen	Iven, 2009
<i>ERF#106 OE</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygote Überexpressionslinie aus <i>AfTORF-EX</i> Screen	Iven, 2009
<i>ERF#107 OE</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygote Überexpressionslinie aus <i>AfTORF-EX</i> Screen	Iven, 2009
<i>ERF96-RNAi</i>	Homozygot, RNAinterference <i>ERF96</i> -silenced <i>Arabidopsis</i>	Catinot <i>et al.</i> , 2015
<i>erf#104 I</i>	Homozygote T-DNA Insertionslinie, Verlustmutante	SALK_024275 (N524275) NASC (Stock Centre)
<i>erf#104 II</i>	Homozygote T-DNA Insertionslinie, Verlustmutante	SALK_057720 (N557720) NASC (Stock Centre)
<i>erf#105</i>	Homozygote T-DNA Insertionslinie, Verlustmutante	GK-680C11 (N363884) NASC (Stock Centre)
<i>amiERF#104/105</i>	„Gene-silencing“: hinter 35S CaMV Promotor wird konstitutiv artificial microRNA (ami) exprimiert. Diese reprimiert gleichzeitig die Expression von <i>ERF#104</i> und <i>ERF#105</i>	Diese Dissertation
<i>erf#106</i>	Homozygote T-DNA Insertionslinie, Verlustmutante	SALK_097771, NASC (Stock Centre)
<i>erf#107</i>	Homozygote T-DNA Insertionslinie, Verlustmutante	SALK_015182, NASC (Stock Centre)
<i>erf#106/107</i>	Doppelmutante (Kreuzung aus SALK_097771 und SALK_015182)	Walper <i>et al.</i> , 2016
<i>XVE-ERF#106</i>	β-Estradiol induzierbare Überexpression von <i>ERF#106</i>	Walper <i>et al.</i> , 2016

### 3.1.5 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK, Gm <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup> , für Pflanzentransformation	Koncz und Schell 1986
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1	Rif <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , für Pflanzentransformation	Deblaere <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> DH5α	recA1 relA1 thi-1 ΔlacU 169 φ80 (lacZΔM15) hsdR17(rk-mk+); für Klonierungen	Hanahan 1983
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC 3000	Hemibiotrophes Phytopathogen, Rif <sup>r</sup>	Whalen <i>et al.</i> , 1991

## 3.2 Nährmedien und Zusätze

### 3.2.1 Pilzmedien

*P. indica* wurde auf sog. Complex Medium (CM), einem modifizierten Aspergillus Medium mit Agar (15 g/l) angezogen (Zusammensetzung siehe Pham *et al.*, 2004).

Die flüssigen Pilzmedien für *V. longisporum* wurden nach Herstellerangaben (PDB 24,0 g/l, autoklavieren bzw. CDB 40 g/l, autoklavieren) angesetzt. Um bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurden sie mit 500 mg/l Cefotaxim versetzt. Für festes PDB wurden 24,0 g/l PDB mit 10 g/l Agar gemischt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 60°C erfolgten eine Zugabe von 500 mg/l Cefotaxim und ein Eingießen in Petrischalen.

*P. parasitica* wurde auf Malz-Agar angezogen, der nach Herstellerangaben (50 g/l) angesetzt wurde.

Medium	Abkürzung	Hersteller bzw. Referenz
Complex Medium	CM	Pham <i>et al.</i> , 2004
Potato Dextrose Broth	PDB	Sigma-Aldrich Co.
Czapek Dox Broth	CDB	Duchefa Biochemie B.V
Malt Extract Agar	Malz-Agar	OXOID Ltd.

### 3.2.2 Pflanzenmedien

#### 3.2.2.1 Pflanzenerde (Kultursubstrat)

Für das Wachstum der Pflanzen auf Erde (Kultursubstrat), wurde folgendes Kultursubstrat verwendet:

Medium	Bezeichnung laut Hersteller	Hersteller und Ort
Erde	Substrat 1 (Art.-Nr. 4370)	Klasmann-Deilmann GmbH, 49741 Geeste (Deutschland)

#### Warendeklaration

Ausgangstoffe:	95 % Hochmoortorf (H <sub>2</sub> -H <sub>5</sub> und H <sub>6</sub> -H <sub>8</sub> ), Kalkdünger
pH Wert:	5,5 (CaCl <sub>2</sub> )
Salzgehalt:	1 g/Liter (KCl)
Stickstoff (N):	140 mg/Liter
Phosphat (P):	100 mg/Liter
Kalium (K <sub>2</sub> O):	180 mg/Liter
Magnesium (Mg):	100 mg/Liter
Schwefel (S):	120 mg/Liter

Geeignet für Pflanzen mit geringem bis mittlerem Nährstoffbedarf.  
Bei langer Lagerung vor der Anwendung ggf. Nährstoffgehalte überprüfen.

### 3.2.2.2 Agarfestmedien

Zwei verschiedene Typen von MS-Platten:

#### 1x MS-Medium mit Kohlenhydratquelle:

0.43% (w/v) MS-Salze (Murashige und Skoog, 1962), 8 g/l Gelrite (Carl Roth GmbH & Co. KG), 12 g/l Saccharose, mit H<sub>2</sub>O ultra pure herstellen, pH 5,8. Autoklavieren. Anschließend unter der Sterilbank in Petrischalen gießen und nach dem Aushärten im Kühlschrank aufbewahren.

#### ¼ MS-Medium:

1,5 g/l MS-Salze (Murashige und Skoog, 1962), 8 g/l Gelrite (Carl Roth GmbH und Co. KG), mit H<sub>2</sub>O ultra pure auf 1 l auffüllen, einstellen des pH-Wertes auf pH 5,8 mit KOH. Autoklavieren. Anschließend unter der Sterilbank in Petrischalen gießen und nach dem Aushärten im Kühlschrank aufbewahren.

### 3.2.2.3 Kanamycin-Selektionsmedium

Kanamycin-Selektion zur Identifizierung der positiv transformierten Pflanzen mit dem *Promotor:FLAG-RPL18* Konstrukt (zelltypspezifische Linien):

4,4 g/l MS-Salze (Murashige und Skoog, 1962), 10 g/l Phyto Agar (Duchefa Biochemie B.V), 10 g/l Saccharose, mit H<sub>2</sub>O ultra pure auf 1 l auffüllen, einstellen des pH-Wertes auf pH 5,8 mit KOH. Autoklavieren. Nach Abkühlen (auf ca. 60°C) 50 mg/l Kanamycin zugeben und unter der Sterilbank in Petrischalen gießen. Nach dem Aushärten im Kühlschrank aufbewahren.

### 3.2.3 Bakterienmedien

#### LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l NaCl  
Mit H<sub>2</sub>O ultra pure herstellen  
pH 7,4 mit NaOH einstellen. Autoklavieren.

#### YEB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/l Beefextrakt  
2 g/l Hefe-Extrakt  
5 g/l Pepton  
5 g/l Saccharose  
2 mM MgSO<sub>4</sub>  
Mit H<sub>2</sub>O ultra pure herstellen  
Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 mit NaOH. Autoklavieren.

#### DYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

16 g/l Pepton  
10 g/l Hefeextrakt  
5 g/l NaCl  
Mit H<sub>2</sub>O ultra pure herstellen  
pH-Wert Einstellung nicht nötig. Autoklavieren.

### 3.2.4 Medienzusätze

#### 3.2.4.1 Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicillin (Amp)	100 mg/l	100 mg/ml H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol (Chl)	25 mg/l	25 mg/ml Ethanol abs.
Cefotaxim (Cefo)	500 mg/l	250 mg/ml H <sub>2</sub> O
Gentamicin (Gm)	25 mg/l	25 mg/ml H <sub>2</sub> O
Kanamycin (Kan)	50 mg/l	50 mg/ml H <sub>2</sub> O
Rifampicin (Rif)	50 mg/l	10 mg/ml H <sub>2</sub> O (2 Tropfen HCl)
Spectinomycin (Spec)	100 mg/l	50 mg/ml H <sub>2</sub> O

#### 3.2.4.2 Agar

Festmedien für Bakterien enthielten zusätzlich 12 g/l Kobe-Agar (Carl Roth GmbH & Co. KG). Der Agar wurde nach dem Einstellen des pH-Wertes aber vor dem Autoklavieren zugegeben.

### 3.3 Oligonukleotide

Die Schmelztemperatur von Primern kann prinzipiell mit Hilfe folgender Formel (Bolton und McCarthy, 1962) berechnet werden:

$$T_m [^\circ \text{C}] = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{GC}) - 650/n$$

Wobei  $T_m$  = Schmelztemperatur,  $n$  = Anzahl der Basen

#### 3.3.1 Oligonukleotide für Klonierungen, Reverse Transkription und 3-Primer-PCR

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Verwendungszweck
DIN2_CDS for (mit Erkennungssequenzen für Gateway)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCTAAGGGATCGTGGTTC	<i>DIN2</i> OE Klonierung
DIN2_CDS rev (mit Erkennungssequenzen für Gateway)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAATAAAATGAAGATGGG	<i>DIN2</i> OE Klonierung
DIN2_CDS_Seq for	TCTTCATTTTATTGA	<i>DIN2</i> CDS Sequenzierung
DIN2_CDS_Seq rev	ATGGCTAAGGGATCG	<i>DIN2</i> CDS Sequenzierung
DIN2_Seq	GACCCTGAAAAACCTCGTTTCAAACCTG	<i>DIN2</i> CDS Sequenzierung
SeqL-1	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Sequenzierung (pDONR <sup>TM</sup> 201)
SeqL-2	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	Sequenzierung (pDONR <sup>TM</sup> 201)
ProAt3g10710 for (mit Erkennungssequenzen für Gateway)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAGGGTCAAGAAGTTGTAC	<i>pRHS12</i> Klonierung
ProAt3g10710 rev (mit Erkennungssequenzen für Gateway)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTATCCCCGGTCCCTCTTTTC	<i>pRHS12</i> Klonierung

ProRHS12_Seq for	CCACAAATCATAAACATAACATC	<i>pRHS12</i> Sequenzierung
ERF 104-105 I	gaTCCCATCCAACCTTGACGGCGGtctctct	amiRNA Design
ERF 104-105 II	gaCCGCCGTCAAGTTGGATGGGAtcaaag a	amiRNA Design
ERF 104-105 III	gaCCACCGTCAAGTTCGATGGGTtcacagg	amiRNA Design
ERF 104-105 IV	gaACCCATCGAACCTTGACGGTGGtctacat	amiRNA Design
Primer A (mit Erkennungssequenzen für Gateway)	GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGG CTCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	amiRNA Design
Primer B (mit Erkennungssequenzen für Gateway)	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCGCGGATAACAATTCACACAGGAAA CAG	amiRNA Design
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Reverse Transkription
Random nonamer	NNNNNNNNN	Reverse Transkription
o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	3-Primer-PCR
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	3-Primer-PCR
LB2	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCA ATACA	3-Primer-PCR
erf#104 ko I for	GCTCCGATTTACTTTTTCTG	3-Primer-PCR
erf#104 ko I rev	AAGAAAGTCCGATTCCTCGTC	3-Primer-PCR
erf#104 ko II for	ATGTTGTCTCCCTTATCCGC	3-Primer-PCR
erf#104 ko II rev	AAGGAAAAGACGAGAGGACG	3-Primer-PCR
erf#105 ko for	CATACACATTCGTGCATCCAC	3-Primer-PCR
erf#105 ko rev	TTCCAGTTTGACCCTCTGAAG	3-Primer-PCR
erf#106 ko for	AGTGCCGTTGAGAATCAAATG	3-Primer-PCR
erf#106 ko rev	GCAACTTGCAAGCACACTAAAC	3-Primer-PCR
erf#106 ko for	CAGCTTAGGATTCGAACCATG	3-Primer-PCR
erf#106 ko rev	GAAAACGCAGAAGTTCCATTG	3-Primer-PCR

### 3.3.2 Oligonukleotide für qRT-PCR

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'
ACT8_for	GGTTTTCCCCAGTGTGTTG
ACT8_rev	CTCCATGTCATCCCAGTTGC
UBQ5-1	GACGCTTCATCTCGTCC
UBQ5-2	GTAACGTTAGGTGAGTCCA
UBQ10-for	CACACTCCACTTGGTCTTGCGT
UBQ10-rev	TGGTCTTCCGGTGAGAGTCTTCA
GAPDH for	ACCACTGTCCACTCTATCACTGC
GAPDH rev	TGAGGGATGGCAACACTTTCCC
FLAG-tag for	TAAGGGAGGTGGTGGAGGAGG
RPL18 rev	CGGTAAAGCTTGACAGTAAGC
OLG70 for	CAGCGAAACGCGATATGTAG
OLG70 rev	GGCTTGTAGGGGGTTTAGA
PiTef for	TCGTCGCTGTCAACAAGATG
PiTef rev	ACCGTCTTGGGGTTGTATCC
bZIP11 for	GGAGCAGAGGAAACGTAAACGGAT

bZIP11 rev	CCTGAGCCGTTAGATCGTCTAGGA
CBP60g for	AAGAAGAATTGTCCGAGAGGAG
CBP60g rev	GGCGAGTTTATGAAGCACAG
CDKA1 for	ATCCGTCGGTGTGCTAGTCT
CDKA1 rev	TCTCAACTTTCTCGTACTGATCCA
CYP71A12 for	TGTGGTGTGGTCCCTATG
CYP71A12 rev	TTGTTTCGTGAGCAGAATTGAGA
CYP79B2_5	GAGACGACGCCGTATATATTTTATG
CYP79B2_3	GGAGACACAATTCAAGTGTCCCAA
CYP81F2_5	GAAGATGTTGACATGACAGAG
CYP81F2_3	TGCTTAAACCGGTAACCTTC
CYP82C2 for	TCCAATTACTAGCATTAAATCTACCTG
CYP82C2 rev	TGTAAGGGTTGATGGTGAAGTCT
DIN2_5	CCAATCGAGGAGAGATGAGG
DIN2_3	ACTACATGTCCAACCATAAGGA
DIN2 for	TCGGCATAGTTTTCTGATGA
DIN2 rev	TTCACTTGTTGCACCTTCGT
ERF#096 left	ATGAGAGGCCAAGCAGCAATCC
ERF#096 right	ATGGCGGTGGAAGAAGAGACAC
ERF #104 left	AACAGGCCCTAGAACCATCACC
ERF #104 right	ATTCGGTAAGGGCGGTTTACGC
ERF #105 for	TCTAAGCCAACGCAAACCACCTC
ERF #105 rev	TTCTCTTGAACCACCGGTGCAG
erf#105qPCR ko for	GTTGGAAGGGGTTTTGGGACGGAGCAGACAG
erf#105qPCR ko rev	GAGAGTTGAGCATCAATGAATTCGAAGTCTCCC
ERF#106 for	AAGTGGGAAGGGGAATCATCA
ERF#106 rev	AGTCTCATATGTTGATGACGATGAA
ERF#107 for	TTTGCAGCAGAGATTGAGAGA
ERF#107 rev	AAAAGTGCCTAACCAAATCCTG
FOX1 for	ATGCCATCTTACCGTCGAT
FOX1 rev	CCTCGTGTTTTTCGTGTATGAC
GFP-Spike_for	ACCTGTTCCCTGGCCAACAATT
GFP-Spike_rev	TCCCTCAGGCATGGCGCTCT
MYB51 for	ACCAACCTCGAATCTTCTCTG
MYB51 rev	TTTCAACACAAGACTCCTCCA
NAC042 for	TCTCCAGCTCAACAAGCAGAGG
NAC042 rev	CGGTTTGGTGGTAAGATGGTTGGG
NIT4_5	ATGCAACAAGAAACGTCTCACA
NIT4_3	TAGCGTGGCGGGAGTATCG
PAD3 for	CACCACTGATCATCTCAAAGGA
PAD3 rev	CGGTCATTCCCATAGTGTT
PR-1 for	CTATGCTCGGAGCTACG
PR-1 rev	CACCTCACTTTGGCACA
PEP for	AGAGACGAGTTTAGGAAGCAGGTG

PEP rev	CACGTGTCAAACGCTCCCAATG
SHR for	AGGGTTTGCTTCGAGTCATGGG
SHR rev	TGCACGCTCTAGCATCAACCTC
UMAMIT29 for	CACTTGTCTCATGTCAGTCTTCGC
UMAMIT29 rev	ACATCGCTTGTCCCCTATTCCAG
WRKY22 for	ATCTCCGACGACCACTATTG
WRKY22 rev	TCATCGCTAACCACCGTATC
WRKY33 for	CTTCCAATTGTTTCAGTCCCTCTC
WRKY33 rev	CTGTGGTTGGAGAAGCTAGAACG

### 3.4 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGATA:HF-RPL18	Gateway <sup>®</sup> -Zielvektor, Cm <sup>r</sup> , attR1, attR2, ccdB, Km <sup>r</sup> (Pflanzen-Selektion), FLAG-RPL18, enhancer $\Omega$	Mustroph <i>et al.</i> , 2009
pDONR <sup>TM</sup> 201	pUC ori, Km <sup>r</sup> , attP1, attP2, Cm <sup>r</sup> , ccdB	Invitrogen, 2001
pB2GW7-HA	Gateway <sup>®</sup> -Zielvektor, Spec <sup>r</sup> , attR1, attR2, ccdB, p35S, Bar (Pflanzen-Selektion)	Karimi <i>et al.</i> , 2002; Dr. Corinna Thurow (Uni Göttingen)
pRS300	Template für <i>Arabidopsis</i> amiRNA Design; insert name: miR319a; Amp <sup>r</sup>	Addgene

### 3.5 Lösungen und Puffer

Soweit es nicht anders beschrieben ist, wurden alle Lösungen und Puffer mit ultra pure H<sub>2</sub>O angesetzt und anschließend autoklaviert (15 min, 2 bar, 121° C).

#### CTAB (DNA-Extraktion):

2 % CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

100 mM Tris-HCl pH 8,0

20 mM EDTA pH 8,0

1,4 M NaCl

Vor Gebrauch 2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzufügen

#### DEPC-H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonat-Wasser, zur Inaktivierung von RNasen):

(Anmerkung: Durch DEPC werden Histidinreste in Proteinen modifiziert, was zur Hemmung von RNasen und DNasen führt. Beim Autoklavieren zerfällt DEPC zu CO<sub>2</sub> und Ethanol. Das behandelte Wasser ist frei von RNasen.)

1 l H<sub>2</sub>O

1 ml DEPC (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Ü.N. (Über Nacht) kräftig rühren, Flaschendeckel nicht komplett zudrehen.

Autoklavieren (Flaschenöffnung nur mit Alufolie verschließen, nicht mit Schraubdeckel (Gasentwicklung!))

#### Detergentien-Mix:

20 % Brij-35 (w/v)

20 % Triton X-100 (v/v)

20 % Nonidet P-40 (oder 20% Igepal CA-630) (v/v)

20 % Tween-20 (v/v)

20 % DEPC-H<sub>2</sub>O (v/v)

**10 % DOC (Desoxycholsäure) Stocklösung:**

1 g Desoxycholsäure in 10 ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen

**0.4 M DTT (Dithiothreitol) Stocklösung:**

0,130 mg in 2 ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen, evtl. steril filtrieren

**Elutionspuffer (EB) (für TRAP):**

200 mM Tris-HCl, pH 9,0

200 mM KCl

25 mM EGTA, pH 8,0

38 mM MgCl<sub>2</sub>

2 mM DTT

1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl)

75 µg/ml Cycloheximid

50 µg/ml Chloramphenicol

**Fällungspuffer (RNA-Extraktion):**

1,2 M NaCl

0,8 M tri-Natrium-Citrat

**Färbelösung für Proteine auf Nitrocellulosemembranen:**

0,02 % Ponceau S

3 % Trichloressigsäure (v/v)

**Grundstock (TRAP):**

200 mM Tris-HCl, pH 9,0

200 mM KCl

25 mM EGTA, pH 8,0

38 mM MgCl<sub>2</sub>

**Harnstoffextraktionspuffer:**

4 M Harnstoff

16,6 % Glycerin (100 %) (v/v)

5 % β-Mercaptoethanol (v/v)

5 % SDS (w/v)

Ein paar Krümel Bromphenolblau

**Laufpuffer 1x (SDS-PAGE):**

25 mM Tris

190 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

**Ladepuffer für Agarosegele (OX):**

10 ml TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

10 ml Glycerin (87 %)

0,2 % Bromphenolblau

0,2 % Orange G

0,2 % Xylencyanol

**10x MEN-Puffer (RNA-Gel):**

200 mM MOPS  
 50 mM Natriumacetat  
 10 mM EDTA  
 pH 7,0 mit NaOH einstellen

**Micronutrient stock solution:**

50 mM KCl  
 10 mM  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
 1,5 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
 2 mM  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
 0,075 mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

**MgCl<sub>2</sub>-Lösung (10 mM):**

10 mM  $\text{MgCl}_2$   
 Mit ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$  ansetzen, autoklavieren

**¼ MS<sub>flüssig</sub>:**

0,55 g MS-Salze in 500 ml ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$ , autoklavieren

**100 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid):**

87 mg PMSF in 3,5 ml Isopropanol aufnehmen und lösen,  
 auf 5 ml mit Isopropanol auffüllen und bei  $-20^\circ\text{C}$  kühlen

**Polysome Extraction Buffer (PEB) (für TRAP):**

200 mM Tris-HCl, pH 9,0  
 200 mM KCl  
 25 mM EGTA, pH 8,0  
 38 mM  $\text{MgCl}_2$   
 1% Detergentien-Mix (siehe unter Detergentien-Mix) (v/v)  
 1% PTE (Polyoxyethylen-10-tridecylether) (v/v)  
 1% DOC (Desoxycholsäure) (w/v)  
 4 mM DTT (Dithiothreitol)  
 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl)  
 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cycloheximid  
 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chloramphenicol

**20 % PTE (Polyoxyethylene-10-tridecylether) Stocklösung:**

1 g Polyoxyethylene-10-tridecylether in 5 ml DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  lösen

**RNA-Probenpuffer (2,5 x):**

20 % MEN  
 8 % Glycerin  
 56,7 % Formamid  
 5 % Formaldehyd  
 0,001 % Bromphenolblau  
 0,1 % Ethidiumbromid  
 4 mM EDTA pH 7,5

**Sammelgel (SDS-PAGE):**

0,83 ml 30 % Acrylamid /BIS-Mix (19:1)  
0,63 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8  
0,05 ml 10 % SDS  
0,05 ml 10 % APS  
0,005 ml TEMED  
3,4 ml H<sub>2</sub>O

**TAE (20x):**

0,8 M Tris  
2,3 % (v/v) Essigsäure  
20 mM EDTA

**TBS (Western):**

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
pH 7,6 mit HCl

**TBST (Western):**

TBS  
0,1 % Tween20

**Trenngel 12 % (SDS-PAGE):**

8 ml 30 % Acrylamid/BIS-Mix (19:1)  
5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8  
0,2 ml 10 % SDS  
0,2 ml 10 % APS  
0,008 ml TEMED  
6,6 ml H<sub>2</sub>O

**Transferpuffer (Western):**

192 mM Glycin  
25 mM Tris  
20 % (v/v) Methanol  
0,01 % (w/v) SDS

**Trizolpuffer (RNA-Extraktion):**

380 ml/l Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer gesättigt  
0,8 M Guanidiniumthiocyanat  
0,4 M Ammoniumthiocyanat  
33,4 ml/l Na-Acetat (3 M pH 5,2 mit Essigsäure)  
5 % Glycerin

**Wash Buffer *Beads* (WBB) (für TRAP):**

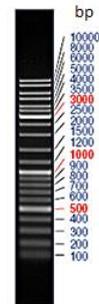
50 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
Mit DEPC-H<sub>2</sub>O herstellen  
pH 7,4 einstellen und autoklavieren

**Wash Buffer #2 (WB2) (für TRAP):**

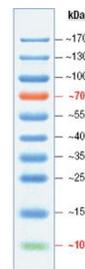
200 mM Tris-HCl, pH 9,0  
 200 mM KCl  
 25 mM EGTA, pH 8,0  
 38 mM MgCl<sub>2</sub>  
 4 mM DTT  
 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl)  
 75 µg/ml Cycloheximid  
 50 µg/ml Chloramphenicol

**3.6 Größenstandards****3.6.1 DNA-Größenstandard**

Als Fragmentlängenstandard wurde bei der Gelelektrophorese der Generuler™ DNA Ladder Mix (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) verwendet.

**3.6.2 Protein-Größenstandard**

Als Größenstandard bei SDS-Gelen wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) verwendet.

**3.7 Antikörper für Western-Blot**

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Hersteller
αFLAG	FLAG-Epitoptag	polyklonal aus Maus	1:1000	Sigma-Aldrich Co.
αmouse	Maus Immunoglobulin	polyklonal aus Schaf, Peroxidase gekoppelt	1:5000	GE Healthcare Company
αHA	HA-tag	aus Kaninchen	1:4000	Abcam plc.

### 3.8 Enzyme

Enzym	Hersteller
BIOTAQ™ DNA-Polymerase (qRT-PCR)	Bioline Ltd.
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Inc.
DreamTaq™ DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc.
BP-Clonase™ II Reaction Mix	Invitrogen™
LR-Clonase™ II Reaction Mix	Invitrogen™
Proteinase K	Invitrogen™
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Restriktionsenzyme (alle verwendeten)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Inc.
RNasin®	Promega Corporation
Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc.
NEBNext® T4 DNA-Ligase	NEW ENGLAND BioLabs® Inc.
T7 RNA-Polymerase	Jena Bioscience GmbH

### 3.9 Software

- Erstellen der Dissertationsschrift: Office 2010 und Office XP von Microsoft® (USA)
- qRT-PCR Messungen: CFX Manager™ Software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- Analyse öffentlicher Expressionsdaten: Genevestigator, ETH Zürich (Schweiz)
- Klonierungen: Geneious R6 (6.1.6), © 2005-2013 Biomatters Limited (Neuseeland)
- Software zum amiRNA-Design: WMD3 (Web MicroRNA Designer Version 3.1, © Copyright 2005-2009 Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Deutschland. Projektleiter: Detlef Weigel. Internetseite mit Stand Mai 2016: <http://wmd3.weigelworld.org>)
- ATTED-II Version 6.0 Co-expressions-Datenbank-Programm (<http://atted.jp/>), Dr. Takeshi Obayashi (Tohoku University, Japan)
- BlattFlaeche Bildanalyseprogramm 1.0.4.6 (Datinf GmbH, Tübingen, Deutschland)
- Leica Bilddarstellung mit CLSM: LAS AF Lite V2.6 (© 2016 Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Messen der Wurzellänge: ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA)
- NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers V1.6 (© 2009 Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
- Experion Software, Version 3.20 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- RNA-Seq Alignment v1.0.0 App (BaseSpace Plattform von Illumina; USA)
- Statistische Auswertung bioinformatischer Daten: R Version 3.0.2 © 2013 R Foundation (Free Software Environment mit Sitz in Wien, Österreich)
- Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R studio®: *edgeR* package, Bioconductor version: Release (3.3). Differential expression analysis of RNA-seq expression profiles. Der statistische Algorithmus *edgeR* ist als Paket für das Statistik Programm R studio® erhältlich. Damit können *Reads* aus zwei unterschiedlichen Behandlungsarten verglichen und signifikante Unterschiede herausgelesen werden. Auf diese Weise lassen sich genomweit differentiell exprimierte Gene (DEG) identifizieren.
- Gene\_Ontology: DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang *et al.*, 2009)
- Venn-Diagramme erstellt über: [bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/)
- *Arabidopsis* eFP Browser; [bar.utoronto.ca](http://bar.utoronto.ca) (University of Toronto, Kanada. Siehe: Winter *et al.*, 2007; Brady *et al.*, 2007)

### 3.10 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VE-100	Systec GmbH
Automatische Pipetten	pipetman Classic™	Gilson, Inc.
Beleuchtungsapparatur (Fotographie)	Reprostar	CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG (Schweiz)
CLSM	Leica TCS SP5 II Konvokalmikroskop	Leica Microsystems GmbH
Dark-Box	Eigenbau	Werkstatt der Universität Göttingen
Digitalkamera	D3100 18-55 VR	Nikon Corporation (Japan)
elektrische Pipette	Eppendorf Xplorer 15-300µl	Eppendorf (Deutschland)
Eismaschine	Frimont MF 26	SCOTSMAN ICE srl
Experion™	Automated Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 35	Zeiss AG
Gefriertruhe -20°C	Verschieden	Privileg und Bosch
Gefriertruhe -80°C	-85°C Ultra low freezer	New Brunswick Scientific Co., Inc.
Geldokumentationsanlage	Gel iX Imager	Intas Science Imaging GmbH
Gelelektrophoresekammern	Eigenbau	Werkstatt der Universität Würzburg
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf AG (Deutschland)
Inkubationsschrank 37°C	WB 120	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH
Intelli-Mixer	Überkopfschüttler	ELMI (Lettland)
Klimakammer		York International GmbH
Klimaschrank I	Percival	Percival Scientific, Inc.
Klimaschrank II	Wachstumsschrank	BINDER GmbH
Kühlschränke	Verschieden	Liebherr und Bosch
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG (Deutschland)
Lichtmikroskop	BIOMED	Leitz GmbH
Magnetständer, 0,2ml tubes	DynaMag™ - PCR	Invitrogen™
Magnetständer, groß	DYNAL®	Invitrogen™
Magnetrührer	RET basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Mikrowelle	KOR-63D7BL	Daewoo Corporation
Mikrozentrifuge	Galaxy Ministar	VWR International GmbH
NanoDrop™	NanoDrop™ 2000c	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Spektralphotometer		
PCR-Maschine/ThermoCycler	TPersonal	Biometra GmbH
pH-Meter	inoLab Oxi Level 2	WTW GmbH
RealTime PCR-Gerät	C1000™ ThermalCycler CFX96 Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Eigenbau	Werkstatt der Universität Bielefeld
Standzentrifuge, groß	Rotina 420R	Hettich GmbH & Co.KG
Sterilbank	Envircor	Ceag Schirp Reinraumtechnik AG
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417C	Eppendorf AG (Deutschland)
Vortex-Mixer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.
Waage	KERN EW 1500-2M	KERN & SOHN GmbH
Zählkammer	Thoma (0,0025 mm <sup>2</sup> )	Marienfeld GmbH & Co. KG

### 3.11 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Alufolie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Autoklavierbeutel	Sarstedt AG & Co.
Fließpapier (0,4 mm)	Whatman
Glasware	Schott AG, Brand GmbH & Co. KG
PVDF-Membran (Immun-Blot <sup>®</sup> )	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
Kunststoff-Einwegmaterial (Reaktionsgefäße, Spitzen für Pipetten, Küvetten, Schraubdeckelgefäße etc.)	Sarstedt AG & Co., Eppendorf AG, Greiner Bio One International GmbH
Leukopor <sup>®</sup>	BSNmedical GmbH
Mira cloth	Millipore (Merck KGaA)
Papierfilter	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Papiertücher	Plock GmbH
Petrischalen (Ø 92 mm)	Sarstedt AG & Co.
Pflanzentöpfe (Ø 7 cm, TO7D)	Pöppelmann GmbH & Co. KG
Röntgenfilme	Kodak
Schikanekolben	Schott AG
Spatel, T-Form	VWR International GmbH
Vogelsand (Pet Bistro 2,5 kg)	Müller Handels AG (Drogeriemarkt)
96 Well Platten (für qRT-PCR)	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
50 ml Zentrifugenröhrchen (High Speed)	Herolab GmbH

### 3.12 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biometra
Ampicillin	AGS
AMPure XP <i>Beads</i>	Beckman Coulter, Inc.
Brij-35	AppliChem GmbH
BASTA <sup>®</sup>	AgrEvo
Cefotaxim	Duchefa Biochemie B.V
Chloramphenicol	Duchefa Biochemie B.V
Chloroform	Merck KGaA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Co.
Czapek Dox Broth	Sigma-Aldrich Co.
Desoxycholsäure (DOC)	Carl Roth GmbH & Co. KG
DNA Stain G (Gelstain)	SERVA Electrophoresis GmbH
dNTPs	MBI Fermentas
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG
EDTA 25 mM (DNase I-Verdau)	Fermentas
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	AppliChem GmbH
EGTA ultrapure (Ethylendioxy-bis- (ethylenitrilo)-tetraessigsäure)	AppliChem GmbH
Ethanol, absolut	Merck KGaA
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG

3X FLAG <sup>®</sup> PEPTIDE	Sigma-Aldrich Co.
ANTI-FLAG <sup>®</sup> M2 Magnetic beads	Sigma-Aldrich Co.
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG
Gelrite <sup>®</sup> Gelbildner	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin (87%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydroxidlösung (KOH) 50%	Carl Roth GmbH & Co. KG
D-Luciferin Kalium Salz	Synchem
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Milchpulver	Milupa Nutricia GmbH
Murashige & Skoog (MS)-Salze	Duchefa Biochemie B.V
Natriumhypochlorit	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Neudomück <sup>®</sup>	Progema <sup>®</sup> , Neudorff GmbH KG
Nonidet P-40 (oder Igepal CA-630)	AppliChem (Sigma)
$\beta$ -Östradiol ( $\beta$ -Estradiol)	Sigma-Aldrich Co.
Potato Dextrose Broth	Sigma-Aldrich Co.
Phenol	AppliChem GmbH
Phyto Agar	Duchefa Biochemie B.V
PMSF(Phenylmethylsulfonyl)	AppliChem GmbH
Polyoxyethylene-10-tridecylether (PTE)	Sigma-Aldrich Co.
Ponceau rot	Sigma-Aldrich Co.
Rifampicin	Duchefa Biochemie B.V
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak
Röntgenfilm-Fixierer	Kodak
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (HCl) 31-33%	Hedinger GmbH & Co. KG
Silwet L-77	Lehle Seeds Company
SYBR <sup>®</sup> Green (für qPCR)	Lonza
1X TE-Puffer pH 8,0 (BioUltra)	Sigma-Aldrich Co.
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween-20	Sigma-Aldrich Co.

Nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, Carl Roth GmbH & Co. KG oder Sigma-Aldrich Co. bezogen.

### 3.13 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
NEBNext <sup>®</sup> Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490)	NEW ENGLAND <i>BioLabs<sup>®</sup> Inc.</i>
NEBNext <sup>®</sup> Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) (#E7600)	NEW ENGLAND <i>BioLabs<sup>®</sup> Inc.</i>
NEBNext <sup>®</sup> Ultra <sup>™</sup> RNA Library Prep Kit for Illumina <sup>®</sup> (#E7530)	NEW ENGLAND <i>BioLabs<sup>®</sup> Inc.</i>
Experion <sup>™</sup> DNA 1K Reagents and Supplies Kit (#7007164)	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
Experion <sup>™</sup> DNA Chips (#7007163)	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
Enhanced Chemiluminescence Plus Kit (ECL <sup>™</sup> )	GE Healthcare Company
NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
RNeasy <sup>®</sup> Micro Kit	Qiagen N.V.
T7 RNA Polymerase Kit ( <i>in vitro</i> Transcription)	Jena Bioscience GmbH

## 4. Methoden

### 4.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 4.1.1 Anzucht von *P. syringae* und Infektion von Blättern

- Bakterien vom Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 wurden in 50 ml flüssigem LB-Medium (mit 50 mg/l Rifampicin) angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. 20 ml der Übernachtskultur wurden in 500 ml flüssiges LB-Medium (mit 50 mg/l Rifampicin) überführt und bei 28°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von ~0,2 erreichte. Dann wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Je Ansatz wurden 100 ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung (10 mM) zugegeben und die Bakterien durch Schwenken gelöst (Waschschritt). Zentrifugation für 5 min bei 4500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und etwas MgCl<sub>2</sub>-Lösung (10 mM) dazu gegeben. Bakterien wurden durch Schwenken gelöst. Mit MgCl<sub>2</sub>-Lösung wurde die OD<sub>600</sub> auf 1 eingestellt (OD<sub>600</sub> 1 = 5x10<sup>8</sup> Zellen/ml). 0,04 % Silwet dazu.
- Diese Bakteriensuspension wurde für die Inokulation verwendet. Mittels einer Sprühflasche sind Ober- und Unterseite der Blätter jeweils dreimal mit Bakterienlösung besprüht worden. Auf gleiche Art wurden die Kontrollpflanzen mit MgCl<sub>2</sub>-Lösung (0,04 % Silwet) behandelt. Vor dem Besprühen wurden die Pflanzen im Dunkeln komplett unter Wasser gesetzt, um den Effekt des Flutens auf die Pflanzen und den Infektionsverlauf untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurde eine abgedunkelte Kunststoffbox mit Wasser befüllt. Darin wurden die Pflanzen 2,25 h lang unter Wasser gehalten und dann aus dem Wasser genommen und 20 min an der Luft getrocknet (ggf. wurden die Blätter leicht mit einem Papiertuch abgetupft).
- Nach der Inokulation wurden die Pflanzen mit einer durchsichtigen Haube abgedeckt und im Klimaschrank (12 h Licht, 12 h Dunkelheit; 22°C) untergebracht. Nach 3 h wurden mit einem Skalpell Blätter von verschiedenen Pflanzen abgeschnitten. Die Oberfläche der Blätter wurde mit 70 % Ethanol für 25 sec sterilisiert. Ethanol wurde mit sterilem Wasser abgespült. Mit einer Stanze (D = 0,5 mm) wurden Blattscheiben ausgestanzt. Je vier ausgestochene Blattscheiben unterschiedlicher Blätter wurden zu einer Probe vereinigt. Drei Replikate pro Pflanzenlinie und Behandlung wurden angefertigt. Die ausgestanzten Blattscheiben wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung (10 mM) bei 200 Hz für 90 sec mit einem Tissue-Lyser gemörsert. 10 µl einer Verdünnungsreihe der Verdünnungsstufen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup> wurden auf festem LB-Medium (mit Rif) ausplattiert und für 2-3 d bei 28°C inkubiert. Kolonie bildende Einheiten (CFU) wurden ausgezählt. Dieser CFU-Wert wurde als 3 hpi (hours post inoculation) bzw. 0 d angegeben.
- Die 3 dpi (days post inoculation) Proben wurden auf die gleiche Weise gesammelt. Eine Verdünnungsreihe von 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-7</sup> wurde angefertigt. Jeweils 15 µl wurden

auf festem LB-Medium (mit Rif) ausplattiert. Nach 2-3 d Inkubation bei 28°C wurde der CFU-Wert bestimmt.

#### 4.1.2 Bakterienkultur und –lagerung von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte über Nacht bei 37°C auf Platten mit LB-Festmedium oder im LB-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989). Die Bakterien in LB-Flüssigmedien wurden auf dem Schüttler inkubiert.

*Agrobacterium tumefaciens* wurde zwei Tage lang bei 28°C entweder auf YEB-Fest- oder in YEB-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989) angezogen. Die Bakterien im YEB-Flüssigmedium wurden auf dem Schüttler inkubiert.

Die Medien enthielten Antibiotika, um das Wachstum von Resistenzgen-tragenden Bakterien unter Selektionsdruck zu gewährleisten. Die auf den Platten gewachsenen Bakterien konnten bei 4°C mittelfristig gelagert werden. Für eine längere Lagerung mussten Gefrierkulturen angelegt werden. Dafür wurden über Nacht in LB-Flüssigmedium gewachsene Bakterienkulturen auf eine Glycerin-Endkonzentration von 25 % gebracht und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die anschließende Lagerung der Glycerin-Stocks erfolgte bei -80°C.

#### 4.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Nach einer modifizierten Methode von Inoue *et al.* (1990) wurden Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  zur Aufnahme von DNA kompetent gemacht. Das allgemeine Protokoll dazu lautet:

- 0,8 ml einer Übernachtskultur in 40 ml LB-Medium überimpfen
- Kultivierung bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ~0,5
- Je 10 ml der Kultur in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- 5 min, 6000x g, 4°C abzentrifugieren
- Pellet in 5 ml von 50 mM CaCl<sub>2</sub> (4°C) resuspendieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 5 min, 6000x g, 4°C abzentrifugieren
- Zellen in 2 ml von 50 mM CaCl<sub>2</sub> (4°C) und 0,4 ml 87% Glycerin aufnehmen
- Aliquotieren (je 200  $\mu$ l) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen
- In flüssigem N<sub>2</sub> schockgefrieren

Aufbewahrung bis zur Verwendung bei -80°C.

#### 4.1.4 Transformation kompetenter *E. coli* und Selektion

Weil die *E. coli*-Zellen (DH5 $\alpha$ ) kompetent gemacht wurden, waren sie in der Lage, DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Durch die nachfolgende Methode wurden *E. coli*-Zellen mit Plasmiden transformiert (Hanahan, 1983):

- Die kompetenten Zellen auf Eis auftauen
- Zugabe der Plasmid-DNA (200–300 ng)
- Inkubation für 30 min bis mehrere Stunden auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen)

- Hitzeschockbehandlung: 1 min bei 42°C (Aufnahme der DNA)
- Zugabe von 0,8 ml LB-Medium
- Regeneration der Zellen bei 37°C für 30-45 min auf dem Schüttler
- Transformationsansatz auf festem LB-Selektionsmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattieren

#### 4.1.5 Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens*

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden *Agrobakterien* des Stammes GV3101 bzw. C58C1 verwendet. 200 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Ü.N. Kultur angeimpft. Nach einer Inkubation bei 28°C bis zur log-Phase der Zellen (ca. nach 16 h erreicht mit OD<sub>600</sub> 0,5 - 0,8) wurde die *Agrobakterien*-Flüssigkultur abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, RT) und dreimal durch Resuspendieren in sterilem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) und erneutes Abzentrifugieren gewaschen. Das Pellet wurde in 20 ml LB-Medium aufgenommen und in 200 µl Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Anschließend Langzeit-Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 4.1.6 Transformation kompetenter *A. tumefaciens* und Selektion

Kompetente *Agrobakterien* wurden auf Eis aufgetaut, 1 µl Plasmid DNA wurde hinzugefügt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 5 min in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und anschließend für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch diese Behandlung wurde die Aufnahme freier DNA aus dem Medium in die Zelle ermöglicht. Pro Reaktionsgefäß wurde 1 ml YEB-Medium dazu gegeben. Es folgte eine Regeneration der Bakterien bei 28°C unter Schütteln für 4 Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien auf festem LB-Selektionsmedium ausplattiert, steril verschlossen und für 2 Tage bei 28°C kultiviert.

Der verwendete *Agrobakterien*-Stamm GV3101 war gegen Rifampicin und Gentamycin resistent. Das Selektionsmedium enthielt drei Antibiotika: Rifampicin und Gentamycin wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch andere Mikroorganismen hinzugefügt und ein drittes Antibiotikum zur Selektion der Transformanten, je nach Resistenz, die auf dem Plasmid codiert war (für Details siehe 3.4).

## 4.2 Molekulargenetische Methoden

### 4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Allgemein dient die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) der *in vitro* Vervielfältigung von DNA. Zuerst wurde das Prinzip von Mullis und Faloona (1987) beschrieben und ist heute aus der Molekularbiologie nicht mehr wegzudenken. Jede PCR beruht auf der Eigenschaft einer hitzebeständigen DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA zu einem Doppelstrang zu vervollständigen. Als Startpunkt braucht die DNA-Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngige DNA. Unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer (Oligonukleotide) als Startpunkte der Synthese können spezifische Sequenzen eines DNA-Templates amplifiziert werden.

Die PCR erfolgt in drei Schritten: 1. Die als Matrize dienende Template-DNA wird zunächst durch Hitze denaturiert (94–96°C). Es entstehen Einzelstränge. 2. Hybridisierung

(Annealing) der Primer mit den Einzelsträngen bei ca. 55–65°C (Primer-abhängig).  
 3. Kettenverlängerung (Elongation) zum Doppelstrang mit Hilfe freier dNTPs bei 68–72°C.  
 Durch die zyklische Wiederholung der Schritte (30-35 Zyklen) wurde das Zielfragment exponentiell angereichert. Die Temperaturen und die Dauer der einzelnen Schritte mussten auf die Primer (vgl. 3.3) und die verwendete DNA-Polymerase (siehe Herstellerangaben) abgestimmt werden. Standard Reaktionsansatz:

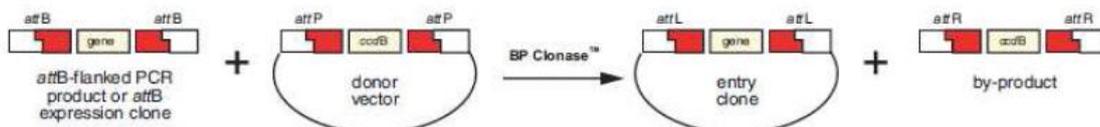
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer (enthält MgCl<sub>2</sub>)
- 0,25 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl Primer forward (10 µM)
- 1 µl Primer reverse (10 µM)
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 80-400 ng DNA-Template (z.B. genomische DNA oder Plasmid)
- Auf 25 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen

#### 4.2.2 Gateway®-Klonierung

Es handelt sich bei der Gateway®-Klonierung um eine sehr effiziente Klonierungsstrategie, die von der Firma *Thermo Fisher Scientific, Inc.* (ehemals von *Invitrogen AG*) vertrieben wird. Innerhalb kurzer Zeit kann man bis zu 99 % positive Rekombinationsereignisse erhalten. In der vorliegenden Dissertation wurde diese Technik angewandt, um das Ziel DNA-Segment zu amplifizieren und in einen Zielvektor (= Expressionsvektor) zu integrieren.

Bei Gateway-Klonierungen werden DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert (Gateway® Technology – The Gateway Manual). Das System basiert auf dem Prinzip der lokusspezifischen Integration des Genoms des Phagen Lambda in das *E. coli* Genom. Um für die Rekombination verfügbar zu sein, müssen Erkennungssequenzen an das einzufügende DNA-Segment angefügt werden. Dazu amplifiziert man in einer PCR das gewünschte DNA-Stück mit Primern, die an den 5'-Enden die Erkennungssequenzen enthalten. Zwei Reaktionen werden bei Gateway-Klonierungen hintereinander durchgeführt: Das PCR-Produkt (Ziel DNA-Sequenz) kann in der BP-Reaktion in einen Eingangs-Vektor rekombiniert werden, da es an den Enden die Erkennungssequenzen trägt. Mit Hilfe der anschließenden LR-Reaktion kann die Ziel DNA-Sequenz aus dem Vektor der BP-Reaktion in verschiedene Expressionsvektoren transferiert werden.

Die **BP-Reaktion** diente dazu, den DNA-Abschnitt zwischen den *attB*-sites in einen Donor-Vektor mit *attP*-sites zu transferieren. Dabei entstand ein Eingangsplasmid mit *attL*-sites (vgl. Gateway® Technology – The Gateway Manual).



Durch ein allgemeines Protokoll konnten die PCR-Produkte in den Vektor pDONR™201 inseriert werden:

- 50-150 ng *attB*-PCR-Produkt in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- 150 ng Donor-Vektor (pDONR™201) zugeben
- Mit H<sub>2</sub>O auf 8 µl auffüllen
- 2 µl BP Clonase Enzym Mix (enthält bereits den Puffer) zugeben
- Ü.N. bei 25°C inkubieren
- Proteinase K hinzufügen, bei 30°C für 10 min inkubieren

- Proteinase K bei 65°C für 5 min deaktivieren
- Den kompletten Ansatz in 200 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (DH5α) transformieren.

Da pDONR<sup>TM</sup>201 ein Kanamycin-Resistenzgen besitzt, erfolgte die Selektion der Transformanten auf festem LB-Medium mit Kanamycin.

Mit der **LR-Reaktion** sollte die DNA zwischen den *attL*-sites des Eingangs-Vektors in einen Zielvektor mit *attR*-sites transferiert werden.



Je nach benötigter Verwendung wurden die Ziel DNA-Sequenzen in einen der Zielvektoren überführt: pB2GW7-HA oder pGATA:HF-RPL18 (Details siehe Anhang).

- 200 ng Eingangs-Vektor (pDONR<sup>TM</sup>201\_DNA-Sequenz) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- 200 ng Zielvektor zugeben
- Mit H<sub>2</sub>O auf 8 µl auffüllen
- 2 µl LR Clonase Enzym Mix (enthält bereits den Puffer) zugeben
- Ü.N. bei 25°C inkubieren
- Proteinase K hinzufügen, bei 30°C für 10 min inkubieren
- Proteinase K bei 65°C für 5 min deaktivieren
- Den kompletten Ansatz in 200 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (DH5α) transformieren

Transformanten wurden auf festem LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum (zur Übersicht der Resistenzen siehe 3.4) selektiert.

Aus positiven Transformanten wurden Plasmide isoliert und nach *A. tumefaciens* transformiert.

### 4.2.3 Plasmid-Isolation (Mini-Präparation)

Zur Isolierung kleiner Mengen reiner Plasmid-DNA aus Bakterien konnte das NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) verwendet werden. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### 4.2.4 DNA-Gelelektrophorese

In einer Agarosegelelektrophorese (McDonell *et al.*, 1977; Southern, 1979) können DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. DNA ist aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Im elektrischen Feld bewegt sie sich somit zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit ist umso größer, je kleiner die DNA-Moleküle sind, da der Laufwiderstand im Gel mit der Fragmentgröße zunimmt. In den Versuchen diente Agarose als Gelmatrix. Die Trennqualität war abhängig von der Agarosekonzentration, da sie die Porengröße beeinflusste. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke wurde in horizontalen Agarosegelen (10 cm x 7 cm x 0,3 cm, 16 Taschen) mit 1x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Für DNA-Moleküle im Größenbereich von 300 bp bis 10 kb wurden Gele mit einer Konzentration von 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE benutzt, für Fragmente < 300 bp eher 2 %ige Gele. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde dem Gel vor dem Aushärten sog. Gelstain (SERVA DNA Stain G) zugesetzt. Dieses

soll im Gegensatz zum früher verwendeten Ethidiumbromid ungiftig sein. Nach Zugabe des Ladepuffers zum DNA-Ansatz erfolgte die Auftrennung der DNA im elektrischen Feld bei 130 V für 30-40 Minuten. Der Bandenverlauf konnte schließlich mit Hilfe von UV-Licht in der Geldokumentationsanlage visualisiert werden.

#### 4.2.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Achtung: bei den 2 %igen Gelen musste die doppelte Menge an NT-Puffer eingesetzt werden.

#### 4.2.6 Kolonie-PCR

Um potenziell positive Klone in einer PCR zu verifizieren, konnten die Plasmide mit Hilfe einer schnellen Lyse durch Kochen freigesetzt werden. Allgemeines Protokoll:

- Kolonie mit steriler Pipettenspitze picken und an den Boden eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes abreiben
  - 100 µl H<sub>2</sub>O dazu geben
  - Den restlichen Teil der an der Pipettenspitze befindlichen Zellen in ein Schüttelröhrchen mit LB Medium (mit geeignetem Antibiotikum versetzt) überimpfen (Positiv getestete Klone können so weiter kultiviert werden)
  - 10 Minuten bei 95°C (Zellen lysieren, DNAsen denaturieren), dann kühlen
  - Entsprechenden Mastermix für PCR zugeben
- Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Σ 25 µl)
- 2,5 µl 10x Puffer
  - 0,5 µl dNTPs (je 10 mM)
  - 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
  - 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
  - 1 µl Primer for\* (10 µM)
  - 1 µl Primer rev\* (10 µM)
  - 19,2 µl H<sub>2</sub>O
- PCR Programm (auf Primer abstimmen) starten
    - 5 min 95°C
    - 30 sec 95°C
    - 30 sec 55°C
    - 1 min 72°C
    - 10 min 72°C
- } 30 Zyklen
- Dann bei 4°C kühl halten

\* Die jeweils verwendeten Primer sind im Anhang (Kapitel 8.8) angegeben.

#### 4.2.7 Extraktion genomischer DNA

Um genomische DNA für PCR- und qRT-PCR-Anwendungen aus *Arabidopsis* zu isolieren, wurde die Extraktion unter Verwendung eines CTAB-Extraktionspuffers (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) durchgeführt (Doyle und Doyle, 1987). Auf die gleiche Weise wurde Pilz-DNA aus infiziertem Pflanzenmaterial gewonnen. Die Methode basiert auf dem Prinzip

der Phasentrennung: Durch Zugabe von Chloroform erreicht man, dass sich die DNA besser in der wässrigen Phase (hydrophile Phase) löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile in der hydrophoben Chloroform-Phase verbleiben.

- Ca. 100 mg Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff homogenisieren
- 400 µl CTAB dazugeben
- Inkubation für 15 Minuten bei 65°C
- 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben und gut vermischen
- 5 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugieren
- Obere wässrige Phase in neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Gleiches Volumen an eiskaltem Isopropanol zugeben und sechsmal invertieren
- 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abkippen und verwerfen
- Pellet mit 300 µl 70% Ethanol (frisch angesetzt) waschen
- 5 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand vorsichtig mit der Pipette abnehmen und verwerfen
- Pellet für 30 Sekunden bei 65°C mit offenem Deckel trocknen
- Pellet in 50-100 µl Wasser resuspendieren
- Konzentration messen

#### 4.2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Photometrische Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit Hilfe des NanoDrop™ 2000c von *Thermo Fisher Scientific, Inc.*: Reines Wasser (1,5 µl) als Referenz verwenden und die NanoDrop™ Software auf das Messen von DNA einstellen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde von jeder Probe 1,5 µl auf die Detektionsfläche pipettiert und gemessen. Dabei wurde die Absorption von Licht durch wässrige Lösungen von DNA bei 260 nm bestimmt. Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren zu ermitteln wurde auch die Absorption von Proteinen bei 280 nm gemessen. Der Quotient der beiden Werte  $OD_{260}/OD_{280}$  stellt immer ein Maß für den Reinheitsgrad dar. Der Reinheitsgrad sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

#### 4.2.9 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen (Desoxyribonukleasen) vom Typ II sind Enzyme, die doppelsträngige DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen spalten (Smith und Wilcox, 1970). Je nach Enzym entstehen dabei überstehende („sticky“) oder glatte („blunt“) Enden. Die für die verschiedenen Restriktionsenzyme optimalen Reaktionsbedingungen können mit dem Puffersystem der Firma *Thermo Fisher Scientific, Inc.* eingestellt werden. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in „units“ (u) angegeben, wobei mit 1 u die Menge an Enzym definiert ist, die 1 µg λ-DNA (48,5kb) innerhalb von einer Stunde unter optimalen Bedingungen vollständig spaltet. Die DNA wird in der Regel in einer Endkonzentration von 0,1 µg/µl mit 2 u Enzym/µg DNA für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch DNA-Gelelektrophorese kann der Erfolg der Spaltung überprüft werden und evtl. gewünschte DNA-Fragmente können isoliert werden.

## 4.2.10 Sequenzierung von DNA

Um die durch PCR entstandenen und in die Vektoren eingefügten Inserts in ihrer Richtigkeit zu überprüfen, wurden während der Klonierung Sequenzierungen in Auftrag gegeben. Sie wurde von der Firma LGC Genomics GmbH, Abteilung Berlin, nach der von Sanger entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt (Sanger, 1977): Hier befindet sich in einer PCR zur Amplifikation der DNA nur ein Primertyp. Neben den vier Desoxynukleotiden befinden sich auch vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide zur Termination der Polymerisation in dem Ansatz. Es entstehen durch die Amplifikation unterschiedlich große und markierte Fragmente, die mit Hilfe eines Analysegerätes in einer Kapillarmatrix der Größe nach aufgetrennt und detektiert werden können. Daraus lässt sich die Nukleotidsequenz in der untersuchten DNA ermitteln. Die Ansätze wurden für das Sequenzieren vorbereitet (10 µg Plasmid-DNA, 4 µl Primer, Gesamtvolumen 14 µl) und der Service Ready2 Run wurde gewählt.

## 4.3 Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA)

### 4.3.1 Das RNase-freie Arbeiten

Ab dem Ernten der Wurzel war während des gesamten Vorgangs unbedingt auf RNase-freies Arbeiten zu achten. Um die RNA im Laufe der Arbeitsprozedur möglichst intakt zu halten, waren folgende Maßnahmen, neben dem obligatorischen Tragen von Handschuhen, zu treffen:

Alle Flüssigkeiten und Puffer wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O oder einem anderen RNase-freien Wasser hergestellt. Außerdem wurden alle Gebrauchsmittel (etwa Skalpell, Pinzette, Mörser und Pistill) vor ihrem Einsatz gründlich mit DEPC-Wasser gespült. Darüber hinaus war das Wurzelmaterial unmittelbar nach der Ernte (gegebenenfalls portionsweise) in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Die zusätzliche Gabe eines RNase-Inhibitors konnte in Betracht gezogen werden.

### 4.3.2 Extraktion von gesamt RNA für „Transkriptom“-Studien (Trizol-Protokoll)

Gesamt-RNA für „Transkriptom“ Untersuchungen wurde aus homogenisiertem Pflanzenmaterial nach dem TRIZOL Protokoll (Chomczynski und Mackey, 1995) extrahiert: In einem Phenol/Chloroform Gemisch löste sich die RNA besser in der hydrophilen, wässrigen Phase wohingegen sich andere Bestandteile, wie etwa denaturierte Proteine, besser in der hydrophoben Chloroform-Phase lösten. Auf diese Weise konnten die Komponenten gut voneinander getrennt werden (Chomczynski und Sacchi, 1987). Vor der TRIZOL-Zugabe musste das Pflanzenmaterial allerdings gefroren bleiben, damit kein RNA-Abbau durch RNasen stattfand. Erst im Trizolpuffer durfte das Material auftauen, denn die beiden enthaltenen Thiocyanat-Salze (Guanidiniumthiocyanat und Ammoniumthiocyanat) inhibierten RNasen und verhinderten eine Degradation der RNA.

- 100-150 mg gefrorenes Pflanzenmaterial (in flüssigem N<sub>2</sub> gemörsert) in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen und 1,2 ml Trizolpuffer zugeben

- Zum Freisetzen der RNA aus dem Pflanzengewebe das Reaktionsgefäß auf einem Vortex-Schüttler fixieren und für 5 min gut schütteln
- 300 µl Chloroform hinzugeben und 30 sec gut schütteln
- 30-60 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren: In diesem Schritt wird die Chloroformphase (unten) von der RNA-enhaltenden wässrigen Trizolphase (Überstand) getrennt. Zwischen den Phasen bildet sich eine feste Trennschicht.
- Überstand (ca. 1 ml) in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführen
- 420 µl kalten Fällungspuffer und 420 µl kaltes Isopropanol zugeben
- Invertieren und 2 min bei RT inkubieren (Fällung)
- 15-30 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen, Pellet kurz trocknen lassen
- Pellet in 250 µl 70% EtOH resuspendieren (Waschschritt)
- 10-20 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren
- Einige Minuten bei RT trocknen lassen
- Schließlich wird die RNA in 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst (Inkubation 20 min bei RT) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 4.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Photometrische Bestimmung der Konzentration der isolierten Ribonukleinsäure (RNA) mit Hilfe des NanoDrop™ 2000c von *Thermo Fisher Scientific, Inc.*: Reines Wasser (1,5 µl) als Referenz verwenden und die NanoDrop™ Software auf das Messen von RNA einstellen. Von jeder Probe wurden 1,5 µl auf die Detektionsfläche pipettiert und gemessen. Dabei wurde die Absorption von Licht durch wässrige Lösungen von RNA bei 260 nm bestimmt. Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren zu ermitteln wurde auch die Absorption von Proteinen bei 280 nm gemessen. Der Quotient der beiden Werte OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> stellt immer ein Maß für den Reinheitsgrad dar. Der Reinheitsgrad sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

### 4.3.4 RNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA-Qualität

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde die RNA elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt. Die Größenauftrennung von RNA-Molekülen musste unter denaturierenden Bedingungen stattfinden, da sonst die Sekundärstrukturen das Laufverhalten beeinflusst hätten. Die Elektrophorese fand deshalb in einem Agarosegel mit Formaldehyd statt:

- 1,5 g Agarose in 100 ml H<sub>2</sub>O aufkochen (in Mikrowelle)
- 12,5 ml H<sub>2</sub>O zum Kühlen hinzugeben
- Unter Rühren auf ca. 60°C abkühlen lassen (handwarm)
- 15 ml 10x MEN-Puffer und 22,5 ml 37% Formaldehyd hinzufügen
- Gel in die Kammer gießen, Kämme hineinstecken und Aushärten lassen

Als Laufpuffer diente 1x MEN-Puffer. Dieser wurde in der Kammer so angeschichtet, dass kein Puffer über das Gel floß, um eine bessere Auftrennung zu erzielen.

Je 1,5 µg der RNA-Proben wurden mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und mit je 10 µl RNA-Probenpuffer (enthält Ethidiumbromid) versetzt. Danach erfolgte eine Denaturierung der Proben bei 65°C für 10 min. Bis zum Auftragen wurden die Proben auf

Eis gelagert. Je 30 µl wurden in die Proben-Taschen gegeben. Dann wurden die Taschen soweit mit 1x MEN-Puffer aufgefüllt, bis sie voll waren. Auftrennung bei 200 V, 500 mA und 13 Watt für etwa 90 min.

#### 4.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Vor der eigentlichen Synthese der cDNA (complementary DNA) mittels reverser Transkription wurden eventuell vorhandene DNA-Kontaminationen durch einen DNase-Verdau eliminiert. Dazu wurde bei den Experimenten mit Gesamt-RNA für „Transkriptom“-Analysen 1 µg RNA als Template eingesetzt und in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (PCR tube) gegeben. Es wurden 1 µl DNase I und 1 µl 10x DNase I-Puffer hinzugefügt. Dann wurde mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt.

Alle Reaktionsansätze wurden für 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase I durch Zugabe von 1 µl EDTA und 10 min Behandlung bei 65°C deaktiviert. Allgemein wird bei der reversen Transkription die Fähigkeit der reversen Transkriptase ausgenutzt, Primer, die an die RNA gebunden haben, in 3'-Richtung zu verlängern und zwar als DNA-Einzelstrang. Man verwendet dazu einen Mix aus Oligo dT Primern und random nonamer-Primern. Die Oligo dT Primer lagern sich spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA Moleküle an, während die random nonamer Primer, je nach Sequenz, an die verschiedensten Stellen der mRNA Moleküle binden. Diese Reaktion schreibt alle mRNA Moleküle in cDNA um.

Für diese Reaktion wurden in die Ansätze aus dem DNase-Verdau 0,2 µl Oligo dT (100 mM) und 1 µl random nonamer Primer (200 mM) hinein pipettiert. Im Thermocycler wurde für 10 min auf 70°C erhitzt. Anschließend wurden 2 µl dNTPs (je 10 mM), 4 µl RevertAid™ H<sup>-</sup> M-MuLV Reverse Transkriptase-Puffer und 0,25 µl RevertAid™ H<sup>-</sup> Reverse-Transkriptase zugegeben. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler für 70 min bei 42°C durchgeführt. Danach wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen. Die cDNA wurde anschließend auf 4°C gekühlt. Die cDNA der Gesamt-RNA Extrakte wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und dann als Template für die qRT-PCR eingesetzt. Für eine längere Lagerung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

#### 4.5 quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Vor dem Durchführen einer qRT-PCR-Analyse (quantitative Echtzeit-PCR) musste man die RNA isolieren und in cDNA umschreiben (siehe vorher). Das Prinzip der qRT-PCR beruhte auf der Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure einer gewöhnlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wobei die PCR simultan dazu genutzt wurde, den DNA-Gehalt einer Probe zu bestimmen. Generell ist die quantitative Real-Time-PCR eine extrem sensitive Methode, so dass mit ihr eine Amplifikation sehr geringer DNA-Mengen und eine gleichzeitige Quantifizierung durch fluoreszierende Farbstoffe in Echtzeit möglich sind. Während der qRT-PCR wurde die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen. Als Fluorophor wurde SYBR® Green eingesetzt. Dabei handelte es sich um einen Farbstoff, der in doppelsträngige, nicht aber in einzelsträngige DNA interkalieren kann. Durch das Einlagern in die Doppelhelix änderte sich das Absorptions- / Emissionsspektrum und damit die Fluoreszenzeigenschaft. Die Zunahme der Fluoreszenz während der PCR repräsentierte also eine steigende Menge an DNA durch die Amplifikation, wodurch Rückschlüsse auf die ursprüngliche DNA-Menge gezogen werden konnten: Je mehr

Template zu Beginn der Reaktion vorhanden war, desto weniger Zyklen wurden benötigt, um ein signifikant über dem Hintergrund liegendes Fluoreszenzsignal zu erhalten (Gibson *et al.*, 1996). Dieser Punkt ist als CT-Wert definiert und liegt immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation.

Pro Reaktion wurden eingesetzt:

- 17,65 µl H<sub>2</sub>O
  - 2,5 µl 10x NH<sub>4</sub> Reaktions-Puffer
  - 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
  - 0,25 µl dNTPs (je 10 mM)
  - 0,625 µl Primer for (10 µM)
  - 0,625 µl Primer rev (10 µM)
  - 0,25 µl SYBR<sup>®</sup> Green
  - 0,1 µl DNA-Polymerase (BIOTaq DNA-Polymerase, 5 U/µl)
- 23 µl Master Mix in jede benötigte Vertiefung der 96 Well Platte geben
  - 2 µl cDNA (1:10 Verdünnung) zum Master Mix geben
  - kurz zentrifugieren (ca. 1000 rpm, 30 sec)
  - PCR-Programm (abgestimmt auf Primer) starten (insgesamt 40 Zyklen):

1	95,0 C for 1:00
2	95,0 C for 0:15
3	56,0 C for 0:20
4	72,0 C for 0:20
	+ Plate Read
5	GOTO 2 . 39 more times
6	95,0 C for 0:10
7	Melt Curve 70,0 to 95,0 C, increment 0,5 C, for 0:05 + Plate Read
	END

Da man anhand des SYBR<sup>®</sup> Green-Signals nicht zwischen unterschiedlichen doppelsträngigen DNA-Abschnitten unterscheiden konnte, war es wichtig, als Qualitätskontrolle eine Schmelzkurve zu erstellen. Dafür wurde am Ende der PCR die Temperatur langsam in 0,5°C-Schritten erhöht. Am Schmelzpunkt trennten sich die Doppelstränge, das interkalierende Fluorophor wurde entlassen und verlor dadurch seine Eigenschaft zur Fluoreszenz. Dies wurde gemessen. Alle PCR-Produkte eines spezifischen Primerpaares sollten die gleiche Schmelztemperatur haben. Waren in der Schmelzkurve mehrere Maxima zu erkennen, konnte das verschiedene Gründe haben, wie z.B. unspezifische Amplifikation, Formation von Primerdimeren oder Kontaminationen. Nur wenn ein Maximum pro verwendetem Primerpaar registriert wurde, also wenn wirklich spezifisch nur ein cDNA-Fragment amplifiziert wurde, wurde das Ergebnis ausgewertet. Es wurden je Probe 3 technische Replikate angefertigt und die relativen Induktionswerte wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) berechnet (siehe 4.13.3).

## 4.6 Proteinbiochemische Methoden

### 4.6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Pflanzenwurzeln

Mit 3x Harnstoffextraktionspuffer wurden aus dem Pflanzenmaterial Proteine isoliert. Allgemeines Protokoll:

- Wurzelgewebe unter flüssigem Stickstoff aufmörsern

- 50-200<sup>\*)</sup> mg des Pulvers im gefrorenen Zustand in ein Reaktionsgefäß einwiegen
- 150 µl 3x Harnstoffextraktionspuffer dazugeben und gut mischen
- Bei 80°C für 10 min im Thermomixer inkubieren
- 10 min bei RT und 13000 rpm zentrifugieren, um Zelltrümmer und DNA abzutrennen
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Die Proteinextrakte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern
- Vor Auftragung in der SDS-PAGE 5 min bei 65°C inkubieren
- Die Proben können nun direkt auf das Gel aufgetragen werden

<sup>\*)</sup> Präzisere Angaben bzw. Abweichungen vom allgemeinen Protokoll:

Bei den Versuchen mit der Linie *p35S* wurden jeweils 40 µl der Flüssigkeitsproben in 150 µl 3x Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen.

## 4.6.2 Western Blot Analysen

### 4.6.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zum Nachweis der mit dem FLAG-Epitop markierten ribosomalen Proteine L18 (FLAG-RPL18) mussten die Proben zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Dazu diente eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse.

Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) verwendet. Nach dem Beladen der Taschen des Gels mit je 40 µl Proteinextrakt aus denaturierten Harnstoffextrakten erfolgte der Lauf bis zum Ende des Sammelgels für 20-30 min bei 90 V. Der anschließende Lauf durch das Trenngel erfolgte für ca. 2 h bei 130 V.

### 4.6.2.2 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Nachdem die Proteine der Größe nach aufgetrennt waren, mussten diese im nächsten Schritt auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,45 µm) übertragen werden, um sie mit dem entsprechenden Antikörper detektieren zu können. Es wurde die „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Kyhse-Anderson, 1984) angewandt.

Der Elektrotransfer erfolgte für eine Stunde bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Filterfläche (= 125 mA bei einem großen Gel).

### 4.6.2.3 Immunodetektion von FLAG-markierten Proteinen

Es handelt sich hier um eine Nachweismethode, bei der die auf der Membran immobilisierten Proteine zuerst mit einem Primärantikörper immunodetektiert werden (in diesem Fall war es αFLAG). Der zweite Antikörper ist mit einer Peroxidase gekoppelt und bindet an den Primärantikörper. Die Peroxidase-Aktivität kann mit dem ECL-Substratmix nachgewiesen werden. Um das FLAG-RPL18 auf der PVDF-Membran zu detektieren, wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 1 Stunde Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST (Absättigen freier Stellen auf der Membran = Blocken )
- Zweimal 5 min in 1x TBST-Puffer waschen

- Über Nacht mit 1 % Milchpulver in TBST und Primärantikörper Anti-FLAG (*Sigma-Aldrich Co.*, Kat.-Nr.: A8592) inkubieren. Den Antikörper mit einer Konzentration von 2 µg/ml einsetzen.
- Die Membran viermal 5 min in 1x TBST mit 1 % Milchpulver waschen (zum Entfernen von nicht und unspezifisch gebundenem Antikörper)
- 2 Stunden oder länger in TBST mit 1 % Milchpulver mit dem Sekundärantikörper ( $\alpha$ mouse, 1:5000) inkubieren
- Fünfmal 5 Minuten Waschen mit 1x TBST (entfernt nicht- oder unspezifisch-gebundenen zweiten Antikörper)

Der Nachweis der Peroxidase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des ECL™ Kits der Firma GE Healthcare. Da der Antikörper an eine Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt war, wurde das Luminol von dieser oxidiert. Dabei entstand Chemilumineszenz, die mittels eines Röntgenfilms detektiert werden konnte.

- Den ECL-Substratmix frisch aus Lösung A und Lösung B herstellen
- Die Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine Klarsichtfolie legen und mit dem Substratmix betröpfeln. 5 min inkubieren
- Überschüssigen Substratmix entfernen
- Eine zweite Klarsichtfolie luftblasenfrei auflegen

Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak) in einer Dunkelkassette. Der Film wurde für 1-5 min entwickelt, kurz gewässert und 3 min lang fixiert.

Am Ende wurde die Membran mit Ponceau rot (*Sigma-Aldrich Co.*) gefärbt, damit man sehen konnte, ob die Spuren auch gleichmäßig mit Proteinextrakt beladen wurden.

## 4.7 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde und Transformation

### 4.7.1 Pflanzenanzucht auf Erde

Vor der Aussaat wurde die Erde für 30 min bei 90°C gedämpft, um Pilze und Pilzsporen abzutöten. Anschließend wurde die Erde mit einer Neudomück®-Lösung (Neudorff, siehe Herstellerangaben) zur Bekämpfung von Mückenlarven behandelt. Es wurden mit Chlorgas oberflächensterilisierte Samen ausgelegt und 2 – 4 d im Dunkeln bei 4°C stratifiziert, um eine gleichmäßigere und bessere Keimung zu erreichen. Zur Keimung wurden die Samen in eine Klimakammer mit 22°C und einer Luftfeuchte von 60 % gestellt und unter Langtag-Bedingungen kultiviert (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit).

### 4.7.2 Floral Dip Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Der *Agrobakterien*-vermittelte Gentransfer ist ein klassischer Weg zur Transformation von Pflanzen. *Agrobacterium tumefaciens* hat die Fähigkeit, einen durch zwei Border-Sequenzen definierten Abschnitt des sog. Ti-Plasmids in eine Pflanzenzelle zu transportieren und dort an einer zufälligen Stelle ins Genom einzufügen (Herrera-Estrella *et al.*, 1992). Den übertragenen DNA-Abschnitt bezeichnet man als T-DNA. Das Ti-Plasmid wurde für die gezielte Integration von Genen in das pflanzliche Genom modifiziert. Die benötigten Ziel-DNA-Sequenzen lassen sich mit molekularbiologischen Methoden

zwischen die Border-Sequenzen, also auf die T-DNA, einbauen. Die für den Transfer notwendigen Funktionen sind auf einem zweiten Plasmid (Helferplasmid) codiert. Durch dieses binäre Vektorsystem lassen sich Pflanzen mittels *A. tumefaciens* effizient transformieren.

Für die *Agrobakterien* vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde eine einfache Methode entwickelt (Clough und Bent, 1998): Durch das Abschneiden der ersten Blütenstände lässt sich die Bildung mehrerer sekundärer Blütenstände anregen, was die Transformationsrate erhöhen kann. Die Blütenstände werden in ein Medium mit den transformierten *Agrobakterien* und einem Benetzungsmittel getaucht. Dabei wird die T-DNA in sich entwickelnde Eizellen transferiert (Bent, 2000). Aus diesen Zellen entstehen nach der Befruchtung heterozygote transgene Samen.

Als Ausgangsmaterial wurden in dieser Dissertation Wildtyp Pflanzen des Ökotyps Col-0 verwendet. Die Vorgehensweise im Detail:

- *Arabidopsis* Pflanzen wurden unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht) auf Erde in Töpfen angezogen. Die ersten Blütenknospen wurden entfernt (4-6 d vor der Transformation), damit junge Blütenknospen austreiben.
- Es wurde über Nacht bei 28°C unter Schütteln aus einer Kolonie der Selektionsplatte eine 5 ml (YEB-Medium) *Agrobakterien*-Vorkultur angezogen. Durch Zugabe geeigneter Antibiotika wurden Kontaminationen verhindert und auf die Anwesenheit des Ti-Plasmids und Helferplasmids selektioniert.
- 400 ml YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft. Diese Hauptkultur wurde ebenfalls über Nacht bei 28°C unter Schütteln kultiviert.
- Die Kultur sollte bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~2,0 gewachsen sein. Dann wurden die *Agrobakterien* 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert.
- Bakterien wurden in einer frisch angesetzten 5 %igen (w/v) Saccharose-Lösung mit 0,02 % Silwet (v/v) resuspendiert. Einstellung der Bakteriendichte auf OD<sub>600</sub> ~0,8.
- 500 ml Bakteriensuspension wurden in ein Becherglas gegeben und Pflanzen mit den Blütenständen kopfüber für einige Zeit (ca. 20-30 Sekunden) tief in die *Agrobakterien*-Lösung getaucht (= Floral Dip) (Anmerkung: Lösung dabei gut schwenken).
- Anschließend wurden die Pflanzen wieder unter Langtag-Bedingungen gehalten und zunächst 1 - 2 Tage mit einer transparenten Haube abgedeckt.

Bis zur Samenreife (3 - 4 Wochen) wurde weiterkultiviert. Dann wurden die Blütenstände getrocknet. Die trockenen Schötchen wurden vorsichtig in den Fingern zerrieben, um sie aufzubrechen. Durch Sieben wurden die Samen grob von den übrigen Pflanzenteilen getrennt. Im trockenen Zustand konnten die Samen in einem Reaktionsgefäß gelagert werden (im Dunkeln, 4°C oder RT).

In dieser Arbeit wurde entweder der BASTA<sup>®</sup>-Resistenz-Marker (bar-Gen) oder eine Kanamycin-Resistenz für die Selektion von Transformanten verwendet.

#### 4.7.3 Identifizierung transgener Pflanzen durch BASTA<sup>®</sup>-Resistenz

Zunächst wurden die Samen wie üblich auf Erde ausgesät und zum Keimen unter LT-Bedingungen gebracht. Sobald die Pflanzen 2-4 vegetative Blätter gebildet hatten, wurden sie mit 1 mM BASTA<sup>®</sup>, 0,02% Silwet (Benetzungsmittel) besprüht. BASTA<sup>®</sup> bzw. Phosphinothricin (auch Glufosinat = L-Homoanalin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure) wirkt als Struktur analogon von L-Glutamat und inhibiert die Glutaminsynthetase. Dadurch können die Pflanzen nach Behandlung mit BASTA<sup>®</sup> das Glutamat nicht mehr in Glutamin umwandeln. Es häuft sich Ammonium (NH<sup>4+</sup>) zu einer letalen Konzentration in der Pflanze

an, was zusammen mit dem Glutaminmangel zum raschen Absterben der behandelten Pflanzen führt. Transformierte Pflanzen, die als Resistenzmarker das BASTA-Resistenzgen (bar-Gen) trugen, waren unempfindlich gegenüber Phosphinothricin (White *et al.*, 1990). Um auszuschließen, dass Wildtyp Pflanzen überlebten, wurden die Pflanzen alle 2 Tage mit BASTA® besprüht (insgesamt dreimal). Nach der Behandlung waren die nicht resistenten Pflanzen abgestorben, die Transformanten dagegen überlebten.

Durch PCR wurde nochmals bestätigt, dass die ausgewählten Transformanten das gewünschte Konstrukt enthielten. Die selektierten Transformanten waren zunächst heterozygot. In den nachfolgenden Generationen mussten, ebenfalls durch BASTA®-Selektion, homozygote Pflanzen identifiziert werden.

#### 4.7.4 Identifizierung transgener Pflanzen durch Kanamycin-Resistenz

Auf jeder Platte mit Kanamycin-Selektionsmedium (siehe 3.2.2.3) wurden 50 oberflächensterilisierte Samen mit einer sterilen Pipettenspitze unter der Sterilbank ausgelegt. Die Samen sollten nicht zu dicht nebeneinander liegen, da sonst die Kanamycin-Selektion weniger effektiv ausfallen würde. Nach dem Verschließen der Platten mit Leukopor® wurden sie für 2 d bei 4°C stratifiziert und anschließend unter definierten Bedingungen (12 h Licht / 12 h Dunkelheit) in einem Klimaschrank zum Keimen gebracht. 7 d alte Keimlinge konnten selektiert werden. Transformanten erkannte man als grüne Keimlinge mit langen Wurzeln, während Wildtyp Pflanzen gelb waren und nur kurze Wurzeln besaßen. Je nach Transformationseffizienz erhielt man meist eine resistente Pflanze pro Platte. Die positiven Transformanten wurden auf Erde überführt und in einem Klimaschrank unter definierten Bedingungen (12 h Licht / 12 h Dunkelheit) bis zur Samenreife kultiviert. Durch PCR wurde bestätigt, dass die ausgewählten Transformanten das gewünschte Konstrukt enthielten. Die selektierten Transformanten waren zunächst heterozygot. In den nachfolgenden Generationen mussten, ebenfalls durch Kanamycin-Selektion, homozygote Pflanzen identifiziert werden.

### 4.8 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis* Samen

Um Kontaminationen zu vermeiden, mussten für das sterile *in vitro*-Infektionssystem die *Arabidopsis* Samen vor dem Auslegen sterilisiert werden. Dies wurde durch Sterilisation der Samenoberfläche mit Chlorgas erreicht:

- Samen in 2 ml Reaktionsgefäße füllen (Schichthöhe höchstens 0,5 cm)
- Becherglas mit etwa 100 ml 12 %iger Natriumhypochloritlösung in einen Exsikkator unter Abzug stellen
- Reaktionsgefäße geöffnet in einen Kunststoffständer in den Exsikkator auf das Becherglas stellen
- 5 ml HCl (31-33 %) zu der Hypochloritlösung geben und den Exsikkator schnell dicht verschließen. Es entsteht eine Chlorgasatmosphäre im Innern.
- Nach 3-4 h den Exsikkator öffnen
- Reaktionsgefäße kurz (15 min) mit geöffnetem Deckel unter der Sterilbank ausdampfen lassen
- Unter der Sterilbank die sterilisierten Samen auf den vorbereiteten MS-Platten verteilen

Achtung: Samen sind nach der Behandlung mit Chlorgas nicht mehr allzu lange lagerbar, denn sie verlieren zunehmend an Keimfähigkeit.

## 4.9 Infektionssysteme zur Untersuchung der Interaktion der Wurzel mit Mikroorganismen

### 4.9.1 Kultivierung von Pilzen bzw. *Oomyceten*

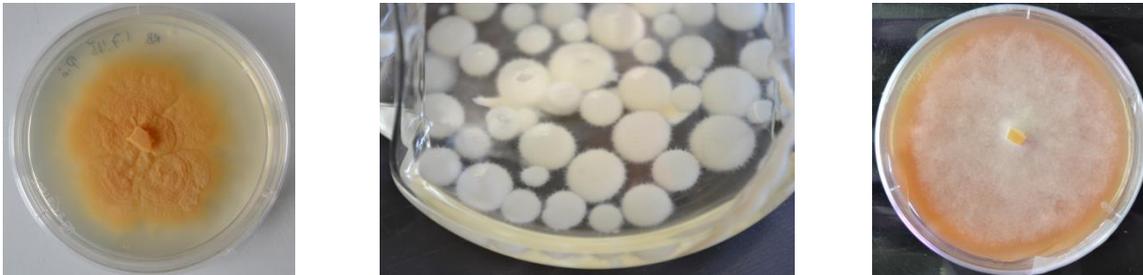


Abb. 11: Kultivierung der Mikroorganismen.

Links: Myzel von *P. indica* auf Platte mit Complex Medium; Mitte: Myzelbällchen von *V. longisporum* in PDB-Flüssigmedium; Rechts: Myzel von *P. parasitica* auf Platte mit Malz-Agar.

### 4.9.2 Infektionen mit *Phytophthora* Zoosporen

Die Infektionen an der *A. thaliana* Wurzel mit *P. parasitica* wurden von unserem erfahrenen Co-Operationspartner Dr. Agnès Attard (Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR-Institut Sophia Agrobiotech) in Frankreich angefertigt. Unser Co-Operationspartner verwendete ein sehr ähnliches Plattensystem wie das *in vitro*-Infektionssystem von Iven (beschrieben im Abschnitt 4.9.7).

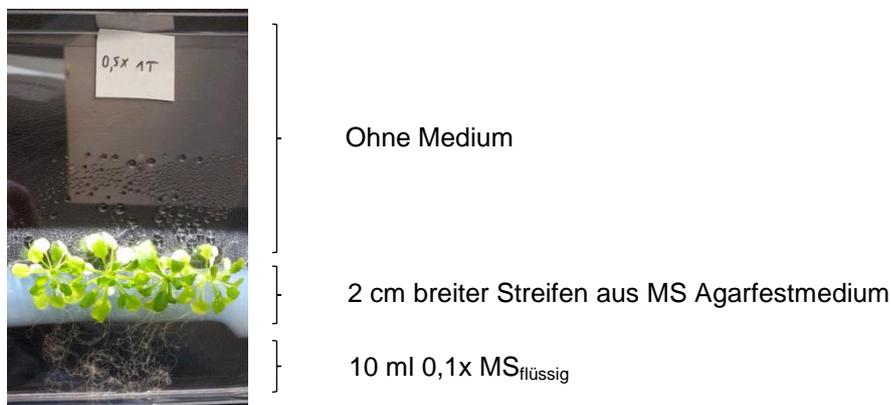


Abb. 12: Das sterile *in vitro*-Infektionssystem für Experimente mit *P. parasitica*.

Vertikal-Kultur von *A. thaliana* in dem Kultursystem von Agnès Attard. Die Pflanzen wuchsen auf einem Streifen aus MS Agarfestmedium. Während die Sprosssteile der Pflanzen in einen vom Medium freigeschnittenen Bereich (Ohne Medium) hineinragten, befanden sich die Wurzeln in einem mit flüssigem 0,1x MS Medium gefüllten Bereich. Die Infektionslösung wurde in das flüssige 0,1x MS Medium gegeben.

Zunächst wurden die Samen auf 1x MS Agarfestmedium (20 g/l Agar) mit 1 % Saccharose ausgelegt. Zwei Wochen alte Keimlingen wurden danach auf quadratische Petrischalen so umgesetzt, wie es in Abbildung 12 dargestellt ist. Jede Petrischale enthielt 15-20 Keimlinge. Der Bereich, wo die Wurzeln waren, wurde mit einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Sporen/ml inokuliert. In vertikaler Ausrichtung wurde dieses Kultursystem mit den Pflanzen für vier Wochen bei 25°C inkubiert. Die weiteren Analysen wurden in unserem Labor durchgeführt.

### 4.9.3 Gewinnung von *Piriformospora* Chlamydosporen und deren Lagerung

*P. indica* Myzel wurde auf Agar-Festmedium (Complex Medium, CM) in Petrischalen bei 25°C für mehrere Wochen im Dunkeln angezogen. Für die Kultivierung wurden mit einem sterilen Skalpell unter der Sterilbank Scheiben mit Myzel aus dem Agar ausgeschnitten und diese Scheiben wurden ins Zentrum einer frischen Platte mit CM gelegt, so dass sich das Myzel von dort aus wieder ausbreiten konnte. Alle paar Wochen wurde der Pilz auf diese Weise auf neue Platten überführt und wenn man darauf achtete, dass keine Kontaminationen auf den Platten auftraten, konnte der Pilz lange gelagert werden.

Bei Bedarf konnten Sporen von den CM Platten geerntet werden. Die Ernte wurde unter der Sterilbank mit sterilem Werkzeug und Material durchgeführt. Etwa 10 ml steriles Wasser wurde auf die Oberfläche des CMs in die Petrischale gegeben und mit einem Spatel (T-Form) wurde über das Myzel gerieben. Dabei lösten sich die Sporen. Durch eine Lage Miracloth filterte man die 10 ml Überstand anschließend in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß hinein, um grobe Stücke des Mediums etc. zu entfernen. Dann gab man erneut 10 ml Wasser in die Petrischale, rieb mit dem Spatel und filterte durch Miracloth in das 50 ml Schraubdeckelgefäß, um weitere Sporen aus dem Myzel zu waschen. Für 10 min wurde das Schraubdeckelgefäß mit den Sporen bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sporenpellet durch leichtes Schwenken in der Hand in 20 ml Wasser gelöst. Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, um noch letzte Spuren von Glucose aus dem CM in der Sporenlösung zu beseitigen, da es sonst zu Bakterienwachstum kommen kann. Das Sporenpellet wurde in 10 ml  $\frac{1}{4}$  MS<sub>flüssig</sub> gelöst. Die Konzentration der Sporenlösung wurde mit der Zählkammer bestimmt und mit  $\frac{1}{4}$  MS<sub>flüssig</sub> auf die benötigte Endkonzentration ( $5 \times 10^5$  Sporen/ml) eingestellt.

### 4.9.4 Gewinnung von *Verticillium* Konidiosporen und deren Lagerung

Vor Gebrauch wurden alle benötigten Utensilien (Kolben, Stopfen, Pipettenspitzen, Papierfilter, Glastrichter, Leitungswasser und 50% Glycerin) im Autoklaven bei 121°C sterilisiert und ebenso die Flüssigmedien (PDB und CDB). Zusätzlich wurden die Flüssigmedien mit Cefotaxim versetzt, damit Kontaminationen mit anderen Mikroorganismen vorgebeugt werden konnte. Die verwendeten *Verticillium*-Stämme ihrerseits hatten eine Resistenz gegen Cefotaxim. Während der Sporenernte arbeitete man stets unter der Sterilbank.

Zur Herstellung von Konidiosporen musste zuerst *Verticillium*-Myzel in Flüssigkultur angezogen werden. Dazu impfte man in einem 500 ml Schikanekolben 150 ml PDB-Medium (mit 500 mg/ml Cefotaxim) mit 100  $\mu$ l einer *Verticillium*-Gefrierstock Sporensuspension (ca.  $1 \times 10^7$  Sporen/ml) an. Zehn Tage lang wurde der Pilz im PDB-Medium bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Box auf einem Schütteltisch kultiviert. Im Laufe dieser Zeit formten sich, bedingt durch das Schütteln, weiße Bällchen aus Myzel im Medium. Danach zog man das PDB-Medium vorsichtig mit einer sterilen Einweg-Pipette ab, so dass die Myzelbällchen im Kolben verblieben. Um nun die Bildung von Konidiosporen zu induzieren, wurden 100 ml CDB-Medium (mit 500 mg/ml Cefotaxim) auf die Myzelbällchen gegeben. Es folgte eine Inkubation für fünf Tage bei Schütteln im Dunkeln. Danach war das Medium durch die Bildung der Konidiosporen grau-weißlich eingetrübt. Die entstandene Sporensuspension konnte mit Hilfe eines sterilen Glastrichters und eines keimfreien Papierfilters (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) vom Myzel getrennt werden. Die Sporen wurden in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß aufgefangen. Anschließend

erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm und 18°C. Nach einmaligem Waschen des Sporenpellets durch Resuspension in 50 ml autoklaviertem H<sub>2</sub>O und erneuter Zentrifugation, wurde das Sporenpellet zunächst in 15-30 ml  $\frac{1}{4}$  MS<sub>flüssig</sub> gelöst. Die Sporenkonzentration wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer ermittelt und mit  $\frac{1}{4}$  MS<sub>flüssig</sub> auf die benötigte Endkonzentration eingestellt.

Für das Anlegen von Gefrierstocks wurden geerntete Sporen 1:1 mit 50% Glycerin gemischt (Glycerin-Endkonzentration von 25%) und auf eine Endkonzentration zwischen  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^8$  Sporen/ml eingestellt. In 1 ml Aliquots wurden die Gefrierstocks zunächst auf 4°C gebracht und dann bei -20°C langsam eingefroren. Zur längeren Verwahrung konnten Gefrierstocks schließlich bei -80°C eingelagert werden. Diese Gefrierstocks sollten nicht für Versuche verwendet werden, sondern nur, um neue und frische *Verticillium*-Kulturen für Experimente anlegen zu können. **Anmerkung:** Durch die Lagerung in Gefrierstocks verlieren die Sporen zunehmend an Vitalität und keimen mit der Zeit immer schlechter aus. Um Experimente unabhängig von der Gefrierdauer reproduzierbar zu machen, immer frisch geerntete Sporen für die Infektions-Experimente (auf Erde oder Platten) einsetzen.

#### 4.9.5 Infektionslösungen mit *P. indica* bzw. *V. longisporum*

Für das sterile *in vitro*-Infektionssystem auf festem  $\frac{1}{4}$  MS-Medium: Die Infektionslösung wurde stets mit frisch geernteten Sporen von *P. indica* bzw. *V. longisporum* angesetzt. Mit  $\frac{1}{4}$  MS<sub>flüssig</sub> wurden folgende Konzentrationen eingestellt: bei *P. indica*  $5 \times 10^5$  Sporen/ml; bei *V. longisporum*  $4 \times 10^5$  Sporen/ml. Zur Infektion wurden 500  $\mu$ l Infektionslösung in jeden Kanal (Abb. 14) pipettiert. Zu den Kontrollpflanzen (nicht infiziert) wurde eine *mock*-Lösung aus 500  $\mu$ l  $\frac{1}{4}$  MS<sub>flüssig</sub> gegeben. Für das Infektionssystem auf Erde: Die Infektionslösung wurde stets mit frisch geernteten Sporen von *P. indica* bzw. *V. longisporum* angesetzt. Mit  $\frac{1}{4}$  MS-Flüssigmedium wurden folgende Konzentrationen eingestellt: bei *P. indica*  $5 \times 10^5$  Sporen/ml; bei *V. longisporum*  $2 \times 10^6$  Sporen/ml.

#### 4.9.6 Infektionssystem in Erde

##### 4.9.6.1 Anzucht der Pflanzen auf einem Gemisch aus Sand/Erde

Voraussetzung für das spätere Auswaschen und Reinigen der Wurzeln von Erde war die Anzucht der Pflanzen in einem Sand/Erd-Gemisch. 1,8 Liter Vogelsand (Müller Handels AG) und 5,4 Liter Pflanzenerde (Volumenverhältnis also 1:3) wurden in einem Autoklavierbeutel gemischt. 500 ml Leitungswasser wurden hinzugegeben und gut vermengt, bis eine homogene Verteilung erreicht war. Das Gemisch wurde bei 90°C im Autoklaven gedämpft und nach Abkühlen auf Pflanzentöpfe verteilt, wobei darauf zu achten war, dass das Gemisch locker in die Töpfe gegeben wurde und nicht komprimierte (erleichterte später das Reinigen der Wurzeln). Vorsichtig wurden die Töpfe großzügig bewässert, ohne das Gemisch dabei zu verdichten. Anschließend wurde die Erde mit einer Neudomück®-Lösung (Neudorff, siehe Herstellerangaben) zur Bekämpfung von Mückenlarven behandelt. In jeden Topf wurden drei bis vier *Arabidopsis*-Samen ausgelegt. Anschließend wurde für 2 d im Dunkeln bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht erfolgte unter LT-Bedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) in einer York-Klimakammer bei 60 % Luftfeuchte und 22°C.

### 4.9.6.2 Wurzel-Dip Inokulation

Zur Infektion mit *P. indica* und *V. longisporum* wurde eine „Wurzel-Dip“ Inokulation angewendet (verändert nach Iven, 2009). Dazu wurden 21 Tage alte *A. thaliana*-Keimlinge vorsichtig aus dem Sand/Erde Gemisch ausgetopft und die Wurzeln gründlich mit Leitungswasser gewaschen (Tipp: Inhalt der Pflanzentöpfe auf einen Arbeitstisch kippen und vorsichtig die Keimlinge an ihren Rosetten herausziehen, ohne die Wurzeln stark zu beschädigen; danach Wurzeln in ein Gefäß mit Wasser tauchen und die restliche Erde ablösen). Die Pflanzen wurden mit den gereinigten Wurzeln in eine mit Wasser gefüllte Petrischale gehängt, so dass der Sprosstteil der Pflanzen nicht in Kontakt mit der Flüssigkeit stand. Sobald alle für die Inokulation vorgesehenen Linien in dieser Weise vorbereitet waren, wurde das Wasser mit einer Pipette abgezogen und durch etwa 40 ml Sporensuspension (vgl. 4.9.5) pro Petrischale ersetzt. Für 60 min wurde inkubiert. Die *mock*-Kontrollen wurden entsprechend behandelt, nur dass sie in Leitungswasser, statt in Sporensuspension inkubiert wurden.

Nach der Inokulation wurden die Pflanzen in frische Kulturerde (vorher bei 90°C gedämpft; ohne Sand) eingesetzt. Dazu bohrte man nach dem Befüllen der Töpfe mit Erde und nach dem Bewässern ein Loch in die Erde (ca. 1 cm Durchmesser) und setzte die Wurzeln der Pflanzen dort ein. Ganz vorsichtig und ohne Andrücken wurde das Loch locker mit Erde aufgefüllt (wurde die Erde um die Wurzeln beim Eintopfen zu sehr verdichtet, entwickelten die Pflanzen Stresssymptome, was sich nach ein paar Tagen in der violetten Verfärbung der Blätter zeigte). Die Kultivierung erfolgte bei 12/12 Bedingungen (12 h Licht / 12 h Dunkelheit) in einem Klimaschrank mit einer Luftfeuchte von 60 % und 22°C. In den ersten Tagen wurde darauf geachtet, dass die Erde gut feucht war, damit die Pflanzen wieder anwachsen. 21 dpi wurden die Symptome quantifiziert.

Der Co-Infektionsversuch mit *P. indica* und *V. longisporum*: Die Wurzeln von 21 d alten Keimlingen (Wt) wurden über Wurzel-Dip Inokulation mit *P. indica* infiziert bzw. mit einer *mock*-Lösung behandelt und anschließend in ein Erde-Sand-Substrat eingesetzt. 10 Tage nach dieser ersten Inokulation wurden die Wurzeln von dem Erde-Sand-Substrat befreit. Erneut über eine Wurzel-Dip Behandlung wurde sowohl die Kontrollgruppe (- *P. indica*) als auch die mit *P. indica* vorbehandelte Gruppe (+ *P. indica*) mit *VI43* inokuliert. 21 Tage nach dieser Zweitinfektion wurde die *VI43* Pilz-DNA in den Blattrosetten bestimmt.

### 4.9.6.3 Bestimmung der Blattfläche

Die Blattrosetten der Pflanzen wurden mit einer handelsüblichen Digital Kamera (Nikon D3100) in einer Beleuchtungsapparatur (CAMAG) fotografiert. Anschließend erfolgte die Messung der Blattfläche mit dem Programm „BlattFlaeche“ (Bildanalyseprogramm der Datinf GmbH, Tübingen). Die Einstellungen wurden stets so gewählt, dass lediglich die grüne Blattfläche bestimmt werden konnte (vgl. Abb. 13). Der Durchmesser der Kulturtopfe diente als interner Standard für die Normalisierung der Blattfläche.



Abb. 13: Messen der Blattfläche mit Hilfe der Software BlattFlaeche.

Einstellungen im Programm BlattFlaeche wurden so gewählt, dass nur die grüne Blattfläche gemessen wurde (links: Originalbild; rechts: Analysenbild zeigt lediglich die grüne Blattfläche).

#### 4.9.6.4 Bestimmung des Frischgewichts

Alle Stängel und Wurzeln wurden mit einem Skalpell abgeschnitten, um nur das Gewicht der Rosetten zu bestimmen. Fünf Rosetten von unterschiedlichen Pflanzen wurden zu einer Probe vereinigt und miteinander verwogen. Je Replikat wurden eine Kontrollprobe (*mock*) und eine Probe mit infiziertem Pflanzenmaterial (+) angefertigt und miteinander verglichen. Die Anzahl der ausgewerteten biologischen Replikate ist bei jedem Experiment angegeben (n).

#### 4.9.6.5 Bestimmung der Pilz-DNA

Die infizierten Proben (pro Probe fünf Rosetten von unterschiedlichen Pflanzen) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend zu einem feinen Pulver zerrieben. 100-150 mg des Pulvers wurden verwendet, um daraus DNA nach dem Protokoll unter 4.2.7 zu isolieren. Etwa 80 ng der isolierten DNA, die sich sowohl aus pflanzlicher als auch aus pilzlicher DNA zusammensetzte, wurden in eine qRT-PCR eingesetzt. Mit Hilfe von OLG70 Primern (Eynck *et al.*, 2009) konnte man die Menge an Pilz-DNA in den einzelnen Proben bestimmen. Als Referenz zum Abgleichen diente pflanzliches ACT8 (Iven *et al.*, 2012).

#### 4.9.6.5 Stängelsterilisations-Versuch

Durch sog. Stängelsterilisations-Versuche lässt sich die systemische Propagation von *Verticillium* im *Arabidopsis*-Pflanzenkörper analysieren. 28 Tage nach der Inokulation (Kultivierung unter 12/12 Bedingungen) schnitt man dazu die ersten 2 cm der Basis der primären Infloreszenzstängel mit einem Skalpell ab und tauchte diese für fünf Minuten in 70 %igen Ethanol (Sterilisation der Stängeloberfläche). Danach wurden die Segmente mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und auf festem PDB-Medium (mit 500 mg/l Cefotaxim) ausgelegt. Nach dem Verschließen der Petrischalen mit Leukopor<sup>®</sup> erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach etwa 5 d wuchs bei Stängelsegmenten von Pflanzen, welche systemisch von *Verticillium* befallen waren, Pilzmyzel aus.

#### 4.9.7 Steriles *in vitro*-Infektionssystem auf Petrischalen

Für die Anzucht von *A. thaliana* unter sterilen Bedingungen wurde auf ein von Tim Iven in seiner Dissertation (2009) etabliertes *in vitro*-Kultursystem zurückgegriffen. Dazu wurden Petrischalen (92 mm Durchmesser) mit zuckerfreiem ¼-konzentriertem MS-Festmedium gegossen. Nach dem Aushärten wurde das obere Drittel des Festmediums mit einem Skalpell entfernt und ein etwa 0,5 cm breiter Kanal ins untere Drittel geschnitten, wie es in Abb.14 gezeigt ist. Das Schneiden wurde unter der Sterilbank ausgeführt. Es war darauf zu achten, das Skalpell zuvor mit 70 % Ethanol zu desinfizieren, damit später keine Kontaminationen auftreten konnten. **Anmerkung:** Es empfiehlt sich, die Platten mit Festmedium erst unmittelbar vor Gebrauch aus den Kühlschränken zu nehmen und zu schneiden solange das Medium kühl ist, sonst rutscht der Agar und der Infektionskanal wird nicht aufrechterhalten. Oberflächensterilisierte Samen wurden anschließend auf der glatten Schnittebene im oberen Drittel ausgelegt und zwar so, dass sie Kontakt zu Festmedium und Plexiglasscheibe hatten (> 100 Samen pro Platte). Danach wurden die Petrischalen mit Leukopor<sup>®</sup>-Klebeband verschlossen. Dieser Verschluss erlaubte einen

Gasaustausch und verhinderte gleichzeitig eine Kontamination der Platten mit Mikroorganismen von außen. Zur Stratifikation wurden die Samen für 2-3 Tage bei 4°C im Dunkeln gelagert, bevor sie unter Langtag-Bedingungen und bei 22°C (im Percival-Klimaschrank) zum Keimen gebracht wurden. Wenn die Wurzeln den Kanal durchwachsen hatten, wurden sie gezielt mit 500 µl Infektionslösung (vgl. 4.9.5) im Kanal inokuliert.

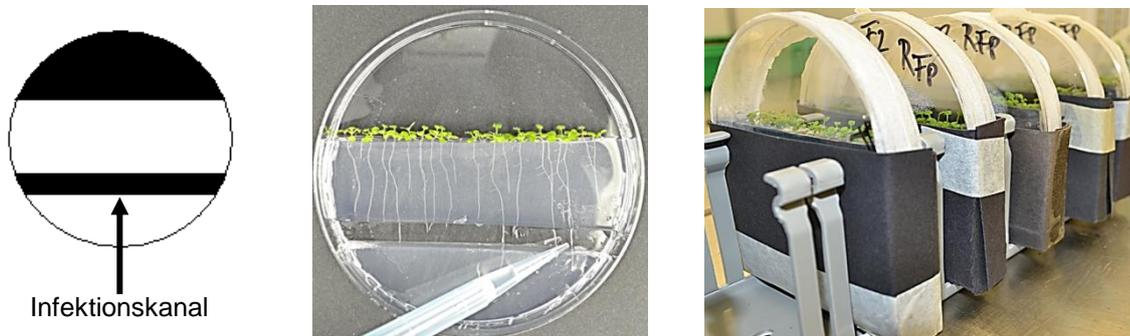


Abb. 14: **Das sterile *in vitro*-Infektionssystem.**

Links: Schematische Darstellung einer Kulturplatte. Die vom Medium freigeschnittenen Bereiche sind schwarz dargestellt. Mitte: Hinzufügen der Infektionslösung in den Kanal. Rechts: Vertikal-Kultur von *A. thaliana* in dem Kultursystem. Die schwarzen Tonpapierhüllen schützten die Wurzeln vor UV-Strahlung und ermöglichten dem Pilz ein Wachstum in Dunkelheit.

Nach der Inokulation verschloß man die Platten wieder mit Leukopor<sup>®</sup>-Klebeband und kultivierte vertikal in einem Ständer unter Langtag-Bedingungen bei 22°C weiter. Um die Wurzeln vor UV-Strahlung zu schützen, wurde der Wurzelbereich nach der Inokulation mit schwarzen Tonpapierhüllen abgedeckt. Darüber hinaus wuchsen Wurzel und vor allem Pilz besser im Dunkeln. Die nicht-infizierten Kontrollpflanzen wurden mit einer *mock*-Lösung aus 500 µl  $\frac{1}{4}$  MS<sub>flüssig</sub> behandelt.

#### 4.9.8 Ernte der Wurzeln

In erster Linie war darauf zu achten, dass das Ernten der Wurzeln zügig geschah, damit pflanzeneigene RNasen keine Zeit hatten, aktiv zu sein, denn RNA ist allgemein sehr anfällig für den Abbau.

Mit einem Skalpell, das mit DEPC-Wasser gereinigt worden war, wurden die Wurzeln direkt am Übergang zum Spross abgetrennt. Für das vorsichtige Auszupfen aus dem Agarmedium wurde eine feine Pinzette verwendet. Der an den Wurzeln haftende Agar wurde mit einem Papiertuch gründlich abgetupft. Nachdem eine Petrischale abgeerntet war, wurde das Pflanzenmaterial sofort in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren, noch vor dem Ernten der nächsten Platte. So wurden portionsweise alle Platten abgeerntet und hinterher entsprechend vereinigt. Das Material wurde in Alufolie verpackt. Bis zum Zerreiben mit Mörser und Pistill konnte es bei Bedarf bei -80°C gelagert werden. Vom Homogenisat wurde das Gewicht bestimmt.

## 4.10 Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP): Methode und „Translatom“ Studien

### 4.10.1 Zelltypspezifisch gestaltete Isolierung von mRNA mit Hilfe von FLAG-markierten Ribosomen

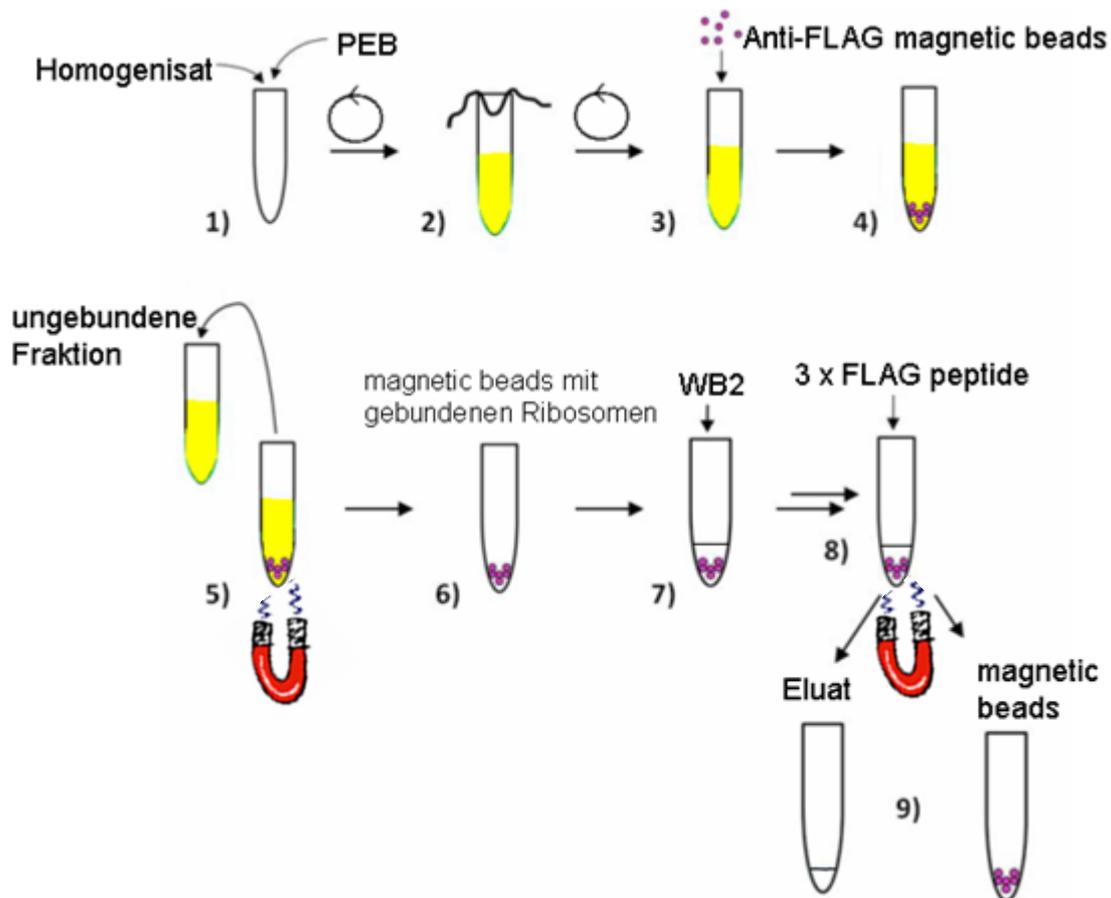


Abb. 15: Veranschaulichung der TRAP Methode zur Isolation von FLAG-markierten Ribosom-mRNA-Komplexen.

Das pulverisierte Pflanzenmaterial wird in PEB (Polysome Extraction Buffer) aufgenommen (1). Durch Zentrifugations- und Filtrationsschritte können grobe Zellbestandteile entfernt werden (2). (3) Die Anti-FLAG gekoppelten „magnetic beads“ werden mit WBB gewaschen und dann hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation für 3 Stunden unter leichter Rotation (4). Nach dieser Inkubation wird der Überstand abgenommen und kann als ungebundene Fraktion zur Qualitätskontrolle aufbewahrt (5) oder verworfen werden. Im Reaktionsgefäß bleiben die „magnetic beads“ mit den gebundenen Polysomen zurück (6), zu denen Waschpuffer (WB2) gegeben wird (7). Nach mehreren Waschschritten startet die Elution mit der Zugabe der 3X FLAG Peptide (8). Mit der Zeit verdrängen die 3X FLAG Peptide die FLAG-markierten Ribosomen von den Antikörperbindungsstellen, so dass schließlich die aufgereinigten Polysomen im Überstand abgenommen und die „magnetic beads“ verworfen werden können. Aus dem Eluat wird die RNA extrahiert (vgl. Abschnitt 4.10.2).

Als Grundlage für die Aufreinigung der FLAG-markierten Polysomen diente das Protokoll von Zanetti *et al.* (2005). In mehreren Bereichen wurde das Protokoll abgewandelt und den Ansprüchen dieser Arbeit angepasst.

**Vorbemerkung I:** Man kann entweder reines Blatt- bzw. Wurzelmaterial bearbeiten oder gesamte Keimlinge, je nachdem welche transgenen *FLAG-RPL18* Linien verwendet

werden. Es ist jedoch dringend zu empfehlen, mindestens 1,5 g Ausgangsmaterial zu verwenden, um eine ausreichende Menge an mRNA für eine anschließende qRT-PCR Analyse oder für eine RNA-Sequenzierung zu erhalten.

**Vorbemerkung II:** Um 1,5 g reines Wurzelmaterial von den zuvor beschriebenen Infektions-Platten zu erhalten, sind je Probe etwa 30 Platten nötig.

**Vorbemerkung III:** Es ist strikt darauf zu achten, dass die gesamte Prozedur unter Kühlung (auf Eis) stattfindet, da sonst endogene RNasen aus dem Pflanzenmaterial die RNA schnell degradieren würden. Auch alle Puffer vorkühlen.

**Vorbemerkung IV:** Alle Spitzen und sonstiges Einweg-Verbrauchsmaterial müssen absolut sauber sein von RNasen.

**Vorbemerkung V:** Alle Lösungen mit DEPC-H<sub>2</sub>O oder einem anderen RNase-freien Wasser ansetzen. 20 % PTE am Tag zuvor herstellen und bei 4°C lagern. Chloramphenicol (50 mg/ml) und Cycloheximid (50 mg/ml) mit reinen, unvergällten Ethanol ansetzen und bei -20°C lagern (Stocklösung ca. 3-4 Monate haltbar). 0,4 M DTT in DEPC-H<sub>2</sub>O und 100 mM PMSF in Isopropanol immer frisch herstellen und sofort für die Zubereitung des PEBs verwenden, da diese Substanzen im Lösemittel eine geringe Halbwertszeit haben. Auch 10 % DOC in DEPC-H<sub>2</sub>O immer frisch ansetzen, da es recht schnell eine schleimige Ausfällung bildet. 3X FLAG Peptide in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) lösen und in Aliquots bei -20°C lagern.

**Lösungen, die schon im Voraus vorbereitet und bei RT einige Tage gelagert werden können:**

Grundstock (pH 8,5-8,8):

200 mM Tris-HCl, pH 9,0  
 200 mM KCl  
 25 mM EGTA, pH 8,0  
 38 mM MgCl<sub>2</sub>  
 Mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf Endvolumen auffüllen, autoklavieren (500 ml sind für etwa 20 Präparationen ausreichend)

Detergentien-Mix:

20 % Brij-35 (w/v, z.B. 10 g)  
 20 % Triton X-100 (v/v, z.B. 10 ml)  
 20 % Non-Idet P-40 (v/v, z.B. 10 ml)  
 20 % Tween-20 (v/v, z.B. 10 ml)  
 20 % DEPC-H<sub>2</sub>O (v/v, z.B. auf 50 ml auffüllen)

**Puffer, die unbedingt erst am Tag der TRAP fertig angesetzt werden sollten:**

Polysomen Extraktionspuffer (PEB) (pH 8,5-8,8):

39,0 ml Grundstock  
 5,0 ml DOC (von 10 % Stocklösung)  
 2,5 ml PTE (von 20 % Stocklösung)  
 2,5 ml Detergentien-Mix (Tipp: mit 10 ml Pipette pipettieren, da sehr zähflüssig)  
 500 µl DTT (von 0,4 M Stocklösung, frisch angesetzt)  
 500 µl PMSF (von 100 mM Stocklösung, frisch angesetzt)  
 50 µl Chloramphenicol (von 50 mg/ml Stocklösung)  
 75 µl Cycloheximid (von 50 mg/ml Stocklösung)  
 Optional: 5 µl RNasin<sup>®</sup> als RNase-Inhibitor dazu  
 Vortexen und auf Eis kühlen

Wash Buffer *Beads* (WBB):

50 mM Tris-HCl  
 150 mM NaCl  
 Mit DEPC-H<sub>2</sub>O herstellen; pH 7,4 einstellen; auf Eis kühlen

Wash Buffer #2 (WB2) (pH 8,5-8,8):

49 ml Grundstock  
 500 µl DTT (von 0,4 M Stocklösung, frisch angesetzt)  
 500 µl PMSF (von 100 mM Stocklösung, frisch angesetzt)  
 50 µl Chloramphenicol (von 50 mg/ml Stocklösung)  
 75 µl Cycloheximid (von 50 mg/ml Stocklösung)  
 Vortexen und auf Eis kühlen

Elutionspuffer (EB) (pH 8,5-8,8):

49 ml Grundstock  
 200 µl DTT (von 0,4 M Stocklösung, frisch angesetzt)  
 500 µl PMSF (von 100 mM Stocklösung, frisch angesetzt)  
 50 µl Chloramphenicol (von 50 mg/ml Stocklösung)  
 75 µl Cycloheximid (von 50 mg/ml Stocklösung)  
 Optional: 5 µl RNasin<sup>®</sup> als RNase-Inhibitor dazu  
 Vortexen und auf Eis kühlen

**Extraktion der FLAG-markierten Ribosomen bzw. Polysomen**

1. Alle benötigten Mörser und Pistille sollten ordentlich mit DEPC Wasser gereinigt werden, damit keine Verunreinigungen mit RNasen verschleppt werden, was den Ausgang des Versuches erheblich beeinträchtigen könnte.
2. Das bei -80°C weggefrorene Pflanzenmaterial wird in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff überführt und das Material wird in vorgekühlten Mörsern mechanisch so lange zerrieben, bis ein feines Pulver entstanden ist.

**Fakultative Qualitätskontrolle:** Etwa 80 mg des Pflanzenmaterials zur gesamt RNA-Extraktion beiseite nehmen und auf Induktion von Markergenen testen.

3. Das Pulver wird sofort in 15 ml Schraubdeckelgefäße, die in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurden, überführt. Die Gefäße werden verschlossen und im flüssigen Stickstoff zwischengelagert.
4. Mit Hilfe der Skalierung auf den Schraubdeckelgefäßen wird das ungefähre Volumen des Pulvers abgeschätzt. Dann wird das doppelte Volumen an eiskaltem und frisch hergestelltem Extraktionspuffer PEB in einem Ultrazentrifugenröhrchen, das zuvor mit DEPC Wasser gereinigt wurde, vorgelegt. Die Ultrazentrifugenröhrchen mit dem PEB werden auf Eis gekühlt.
5. Das Pflanzen-Pulver wird in den vorgelegten Puffer gegeben. Mit Hilfe einer 10 ml Pipette wird das Pulver mit PEB gut vermischt (mehrmals auf und ab pipettieren). Bildung von Schaum so gut es geht vermeiden.

6. Die Proben werden für 15 Minuten auf Eis inkubiert (= Lyse).
7. Es folgt eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 16000x g und 4°C.
8. Anschließend wird der Zellextrakt von den pelletierten Zelltrümmern gereinigt, indem durch 2 Lagen Miracloth gefiltert wird. Dabei wird der geklärte Zellextrakt in einem neuen Ultrazentrifugenröhrchen gesammelt.
9. Es wird für 10 Minuten bei 16000x g und 4°C zentrifugiert.
10. Während dieser Zeit werden die mit Anti-FLAG-Antikörpern gekoppelten „*magnetic beads*“ (Sigma-Aldrich Co.) mit WBB gewaschen. Hierzu werden die in einem Fläschchen enthaltenen „*magnetic beads*“ zunächst durch leichtes Schwenken resuspendiert. Dann wird für jede Probe ein frisches 15 ml Schraubdeckelgefäß vorbereitet und mit 300 µl der resuspendierten „*magnetic beads*“ befüllt (am besten hier mit einer abgeschnittenen 1000 µl Pipettenspitze arbeiten). 2 ml WBB hinzugeben und durch Schwenken des Gefäßes gründlich waschen. Indem die Lösung an einen Magneten gehalten wird, trennt sich der Überstand von den „*magnetic beads*“. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Ein zweiter Waschschritt wird entsprechend dem ersten angeschlossen. Der Überstand wird entfernt.
11. Wenn das Zentrifugieren aus Schritt 9.) beendet ist, wird der Zellextrakt direkt in das Schraubdeckelgefäß mit den gewaschenen „*magnetic beads*“ gegeben, ohne das kleine Pellet am Boden des Ultrazentrifugationsröhrchens mit zu überführen.
12. Während einer 3-stündigen Inkubation der Mischung aus Zellextrakt und „*magnetic beads*“ auf dem Intelli-Mixer (Programm 99, 2 rpm, 4°C) binden die FLAG-markierten Polysomenkomplexe an die Anti-FLAG gekoppelten „*magnetic beads*“.
13. Etwa 30 Minuten vor Ende der Inkubation wird WB2 frisch angesetzt und auf Eis gekühlt.
14. Nach der Inkubation von Schritt 12.) werden die Schraubdeckelgefäße mit den Proben für 5 Minuten auf Eis gestellt. Indem die Lösung an einen Magneten gehalten wird, trennt sich der Überstand vollständig von den „*magnetic beads*“.
15. Der Überstand wird schrittweise mit einer 1000 µl Pipette entfernt. Es muss darauf geachtet werden, dass keine „*magnetic beads*“ abgesaugt werden.

**Fakultative Qualitätskontrolle:** 1 ml des PEB Überstandes aufheben, RNA extrahieren und A.) Mit RNA-Gelelektrophorese testen, ob RNA intakt ist und B.) in qRT-PCR mit HF-Primern testen, ob im Überstand noch mRNA des FLAG-RPL18 nachzuweisen ist. C.) Ist FLAG-RPL18 über Western im Überstand nachweisbar?
16. Es werden jeweils 2 ml PEB hinzugefügt. Mit Hilfe einer abgeschnittenen 1000 µl Pipettenspitze werden die Polysomen gebundenen „*magnetic beads*“ vorsichtig in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf dem Intelli-Mixer werden die Proben für 6 Minuten gewaschen (Programm 99, 2 rpm, 4°C). Danach werden die Reaktionsgefäße in einen Magnet-Ständer gesteckt, so dass die „*magnetic beads*“ an der Gefäßwand anhaften. Der Überstand kann nun leicht abgenommen und verworfen werden.

17. Analog zum zuvor beschriebenen Prozedere folgen 4-5 weitere Waschschr tte mit 2 ml WB2. Zwischen jedem Waschschr tt werden die Proben auf dem Intelli-Mixer für 6 Minuten gewaschen, damit die Proben gründlich von unspezifisch anhaftenden RNAs gereinigt werden. Nach dem letzten Waschschr tt darauf achten, dass evtl. mit einer kleineren Pipette sämtliche Reste des Waschpuffers entfernt werden. Auf diese Weise werden mögliche Verunreinigungen minimiert.

**Anmerkung:** Diese Waschschr tte sind nötig und gründlich durchzuführen, um mRNA-Kontaminationen durch unspezifische Anlagerungen zu minimieren.

**Fakultative Qualitätskontrolle:** OD<sub>280</sub> messen nach dem letzten Waschschr tt. Unterschied WB2 (Referenz) und Wasch berstand sollte < 0,05 betragen.

18. Nach dem letzten Waschschr tt werden auf die „*magnetic beads*“ 250 µl gekühlter und frisch angesetzter Elutionspuffer gegeben. Zum Eluieren der Polysomen-mRNA-Komplexe werden 20 µl 3X FLAG Peptide (Stockkonzentration mit 5 µg/µl) in die 250 µl Puffer pipettiert. Die Proben werden für 45 Minuten auf dem Intelli-Mixer (Programm C1, 10 rpm, 4°C) inkubiert.

19. Um die gesamte Flüssigkeit aus dem Deckel der Gefäße zu bekommen, wird kurz anzentrifugiert (2 Sekunden). Dann werden die Gefäße in den Magnetständer gesteckt. Der Überstand (270 µl), der die Ribosomen-mRNA Komplexe enthält, wird abgenommen und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. **Achtung:** Für eine optimale Ausbeute an RNA im nächsten Schritt muss darauf geachtet werden, dass keine Spuren von „*magnetic beads*“  berf hrt werden, die den Filter der Aufreinigungssäulen verstopfen würden. Es empfiehlt sich, die in das Reaktionsgefäß überführten Proben erneut in den Magnetständer zu stecken und den Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß zu transferieren. (Evtl. 18. und 19. wiederholen und Eluate vereinen)

20. Bei Bedarf kann das Material nun bei -20°C weggefroren werden. Es ist jedoch besser, sofort mit der Aufreinigung der RNA fortzufahren.



## 4.10.2 Extraktion von RNA aus den Ribosomen-mRNA-Komplexen im Eluat

### Extraktion der RNA mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Micro Kits

**Anmerkung:** Im Abschnitt 4.10.1 wurden die FLAG-markierten Polysomen-mRNA-Komplexe durch Affinitätsaufreinigung isoliert. In diesem Abschnitt wird aus dem Eluat zum einen ribosomale RNA (rRNA) und zum anderen mRNA isoliert, wobei die rRNA den weitaus gr o eren Anteil ausmacht. Auch Spuren von tRNA können noch an den Ribosomen-mRNA-Komplexen haften.

Die Gebrauchsanleitung des RNeasy<sup>®</sup> Micro Kits (von Qiagen) wurde leicht verändert und den Erfordernissen angepasst.

**Vorbemerkung:** Zügig arbeiten. Alle Reaktionen bei RT durchführen (einige Puffer enthalten Guanidinsalze, die bei < RT auskristallisieren können). Die im Kit enthaltenen RNA-bindenden Säulen (pink) auf RT kommen lassen.

- A. Zu den 270 µl Eluat aus 4.10.1 werden 835 µl RLT Puffer und 1 % β-Mercaptoethanol gegeben. Für 30-60 Sekunden gründlich vortexen.
- B. Inkubation bei RT für 2-3 min, damit die Ribonucleoproteine dissoziieren können.
- C. Zugabe von 750 µl 96 % Ethanol (unvergällt). Invertieren der Gefäße.
- D. Je 700 µl der Lösung werden auf die im Kit enthaltenen RNA-bindenden Säulen (pink) gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wird für 15 Sekunden bei 15000x g (RT) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dies wird wiederholt, bis schließlich der gesamte Ansatz die Säule passiert hat.

**Fakultative Qualitätskontrolle:** Aufheben des Durchflusses, Proteine isolieren und in einer Western-Blot Analyse das FLAG-RPL18 nachweisen.

- E. Zum Reinigen der gebundenen RNA werden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und mittels kurzer Zentrifugation (15 Sekunden, 15000x g, RT) durch die Säulenmatrix gespült.
- F. Für einen weiteren Waschschrift werden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 15000x g (RT) zentrifugiert.
- G. Dann gibt man 500 µl 80 % Ethanol (frisch angesetzt mit RNase freiem Wasser) auf die Säule. Dieses Mal wird für 2 min bei 15000x g (RT) zentrifugiert. Um letzte Ethanol Rückstände zu entfernen wird die Säule in ein neues, im Kit enthaltenes 2 ml Auffangröhrchen gesetzt und mit offenem Deckel für 3-5 min bei 17000x g (RT) zentrifugiert (für eine optimale RNA-Elution sollte die Membran frei von Ethanol sein).
- H. Zum Eluieren der RNA wird die Säule in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß positioniert und 15 µl RNase freies Wasser (auf 45°C vorgewärmt) werden ins Zentrum der Säulenmatrix gegeben. Nach 7 min Inkubation wird die RNA durch Zentrifugation (1 min, 17000x g, RT) von der Säule gewonnen.
- I. Mit je 1 µl Probe wird die RNA Konzentration am NanoDrop™ gemessen. Die Konzentration sollte > 12,5 ng/µl betragen. Liegt sie darunter, so kann es sein, dass das Hintergrundrauschen die zelltypspezifische Aufreinigung überlagert, d.h. dass man mehr unspezifische als spezifische Aufreinigung erhalten hat.
- J.  Bis zur weiteren Verwendung kann die RNA bei -20°C weggefroren werden.

### Analyse der isolierten mRNA

Spezifische mRNAs können über mehrere Methoden quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die mRNA entweder über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer qRT-PCR analysiert oder es wurde eine cDNA-Bibliothek angefertigt für eine sogenannte RNA-Sequenzierung (engl.: RNA-Sequencing). Im Ergebnisteil ist die jeweils verwendete Methode angegeben.

### 4.10.3 Reverse Transkription von zellschichtspezifisch isolierter mRNA und Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR

Ein DNase-Verdau wird hier nicht benötigt, da es nahezu auszuschließen ist, dass in den Proben pflanzliche DNA verschleppt wurde. Um den Anteil eines mRNA Typs zu quantifizieren, wird die mRNA folgendermaßen in cDNA umgeschrieben:

1. Zu den 14 µl Eluat (aus 4.10.2) werden hinzugegeben:
  - 1,8 µl RNase freies Wasser
  - 2,0 µl EDTA
  - 0,3 µl Oligo dT Primer
  - 1,5 µl random nonamer Primer.
2. Inkubation für 10 Minuten bei 70°C.
3. Hinzufügen von:
  - 6 µl RevertAid™ H- M-MuLV Reverse Transkriptase-Puffer
  - 3 µl dNTPs (je 10mM)
  - 0,325 µl RevertAid™ H- Reverse-Transkriptase
4. Die Reaktion wird in einem Thermocycler durchgeführt. Es wird für 70 Minuten bei 42°C inkubiert. Abschließend wird das Enzym bei 70°C für 10 Minuten inaktiviert und die Reaktion gestoppt.
5. Die cDNA kann entweder sofort für eine qRT-PCR eingesetzt oder bei -20°C zwischengelagert werden.
6. Von den nun insgesamt 30 µl cDNA je Probe werden in der qRT-PCR unverdünnt 4 µl pro Ansatz verwendet (Ausnahme bei der Linie *p35S*, denn hier sind 2 µl pro Ansatz ausreichend). Somit ist eine Probe für lediglich 7 Ansätze ausreichend. Die Auswahl der zu untersuchenden Transkripte sollte deshalb mit Bedacht erfolgen. Die qRT-PCR wird wie im Protokoll unter 4.5 beschrieben durchgeführt.

### 4.10.4 Präparation einer cDNA-Bibliothek zur genomweiten Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung

Folgende drei Kits von NEW ENGLAND *BioLabs*® *Inc.* werden für das Protokoll benötigt:

- NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490)
- NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (#E7530)
- NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) (#E7600)

Als Grundlage für die Prozedur wurde die Gebrauchsanleitung des Kits NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® verwendet. Allerdings wurde diese Anleitung stark

modifiziert. Deshalb soll an dieser Stelle nicht nur auf die Anleitung des Kits verwiesen, sondern ein ausführliches Protokoll aufgelistet werden.

**Anmerkung I:** Aufgrund der zahlreichen Waschschriffe ist es empfehlenswert, nicht mehr als 12 Proben zeitgleich zu bearbeiten. 12 Proben lassen sich noch gut handhaben, nimmt man mehr, besteht nicht nur das Risiko von Verwechslungen, sondern die erste Probe würde zu lange stehen bleiben, bis die letzte bearbeitet wurde.

**Anmerkung II:** Der Hersteller nennt eine Ausgangsmenge von 10 ng – 1 µg gesamt RNA für ausreichend. Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt, sollte allerdings von mindestens 80 ng gesamt RNA ausgegangen werden.

### **A. Die Trennung der mRNA von rRNA / tRNA und Fragmentierung**

Nach der Isolation der durch die TRAP-Methode aufgereinigten RNA aus 4.10.2 muss nun zuerst die mRNA von rRNA und tRNA getrennt werden. Dies erfolgt mit den Komponenten aus NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490).

**Vorbereitung:** gefrorene RNA auf Eis auftauen lassen.

- 1.) In je ein Nuklease freies 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß werden 20 µl NEBNext Oligo d(T)<sub>25</sub> gegeben.
- 2.) Zu den *beads* werden jeweils 100 µl RNA Binding Buffer (2X) (4°C) gegeben. Das gesamte Volumen wird 6-mal auf und ab pipettiert, um die *beads* gründlich zu waschen.
- 3.) Bei RT werden die Reaktionsgefäße für 2 min in einen Magnetständer (für 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße geeignet) gesteckt.
- 4.) Der komplette Überstand wird abgenommen und verworfen. Es ist darauf zu achten, dass die *beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.
- 5.) Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
- 6.) Die Schritte 2-5 werden einmal wiederholt, so dass insgesamt zweimal gewaschen wird.
- 7.) Die *beads* werden in 50 µl RNA Binding Buffer (2X) resuspendiert.
- 8.) Zu den 14 µl RNA aus 4.10.2 werden 36 µl RNase freies Wasser gegeben, um das Volumen auf 50 µl aufzufüllen. Anschließend gibt man diese 50 µl zu den resuspendierten *beads* aus 7.)
- 9.) Die Reaktionsgefäße werden in einen Thermocycler gestellt und der Deckel wird verschlossen. Die Proben werden für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf 4°C gehalten, um die RNA zu denaturieren (zu linearen Einzelsträngen) und das Binden der poly-A mRNA an die *beads* zu erleichtern.
- 10.) (●pink) NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X) und (●pink) NEBNext Random Primers langsam auftauen lassen.

- 11.) Sobald die Temperatur im Thermocycler 4°C erreicht hat, werden die Reaktionsgefäße aus der Maschine genommen.
- 12.) Es wird bei RT für 10 min inkubiert, damit die mRNA an die *beads* binden kann. Während der Inkubationszeit wird vorsichtig jede Probe 6-mal auf und ab pipettiert, um zu mischen.
- 13.) In der Zwischenzeit kann folgender Mix hergestellt werden:  
 In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wird ein Mastermix angesetzt. Je Probe sind nötig:
  - 8 µl (●pink) NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X)
  - 2 µl (●pink) NEBNext Random Primers
  - 10 µl Wasser (Nuklease frei)
  - Σ 20 µl
 Die Mischung wird auf Eis zwischengelagert.
- 14.) Bei RT werden die Reaktionsgefäße für 2 min in einen Magnetständer gesteckt. Dabei wird die Poly-A mRNA, die an den *beads* haftet, vom Rest getrennt.
- 15.) Der komplette Überstand wird abgenommen und verworfen. Es ist darauf zu achten, dass die *beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.
- 16.) Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
- 17.) Es folgt ein Waschschrift, damit die ungebundene RNA entfernt wird. Dafür werden 190 µl Waschpuffer hinzugefügt und das gesamte Volumen wird zweimal auf und ab pipettiert und gut gemischt.
- 18.) Bei RT werden die Reaktionsgefäße für 2 min in einen Magnetständer gesteckt.
- 19.) Der komplette Überstand wird abgenommen und verworfen. Es ist darauf zu achten, dass die *beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.
- 20.) Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
- 21.) Die Schritte 17-20 werden einmal wiederholt, so dass insgesamt zweimal gewaschen wurde.
- 22.) 50 µl Tris Buffer werden in jede Probe gegeben. Vorsichtig wird das gesamte Volumen 6-mal auf und ab pipettiert, um gründlich zu mischen.
- 23.) Danach werden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und der Deckel wird verschlossen. Für 2 min werden die Proben auf 80°C erhitzt und anschließend auf 25°C gehalten. Durch diese Behandlung wird die Poly-A mRNA von den *beads* eluiert.
- 24.) Haben die Proben im Thermocycler 25°C erreicht, werden sie aus der Maschine genommen.
- 25.) 50 µl RNA Binding Buffer (2X) werden zu jeder Probe gegeben. Dadurch bindet die Poly-A mRNA wieder an die *beads* (mit diesem Schritt werden Verunreinigungen, die

durch unspezifische Bindungen entstehen können, reduziert). Vorsichtig wird das gesamte Volumen 4-mal auf und ab pipettiert, um gründlich zu mischen.

- 26.) Inkubation für 10 min bei RT. Während der Inkubationszeit wird vorsichtig jede Probe 6-mal auf und ab pipettiert, um zu mischen.
- 27.) Bei RT werden die Reaktionsgefäße für 2 min in einen Magnetständer gesteckt.
- 28.) Der komplette Überstand wird abgenommen und verworfen. Es ist darauf zu achten, dass die *beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.
- 29.) Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
- 30.) Es folgt ein Waschschrift. Dafür werden 190 µl Wash Buffer hinzugefügt und das gesamte Volumen wird viermal auf und ab pipettiert und gut gemischt.
- 31.) Bei RT werden die Reaktionsgefäße für 2 min in einen Magnetständer gesteckt.
- 32.) Der komplette Überstand wird abgenommen und verworfen. Es ist darauf zu achten, dass die *beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.

**Wichtig:** Der Überstand muss sehr gut entfernt werden, damit die Fragmentierung der mRNA im nächsten Schritt erfolgreich verläuft. Nachdem der Überstand grob abgenommen wurde, ganz kurz in einer Mikrozentrifuge anzentrifugieren, dann die Reaktionsgefäße zurück in den Magnetständer und mit einer 10 µl Pipettenspitze den restlichen Tris Buffer vollständig entfernen. Es ist darauf zu achten, dass die *beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden. Danach kurz antrocknen lassen (ca. 1 min).

- 33.) Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
- 34.) **Anmerkung:** durch den folgenden Schritt entstehen **200 nt RNA** Fragmente. Wenn eine andere Länge gewünscht ist, muss die Reaktionszeit angepasst werden. Siehe dazu die Gebrauchsanleitung des Kits.

Die mRNA wird eluiert durch Zugabe von je 17 µl des Gemisches (2X) aus First Strand Synthesis Reaction Buffers und Random Primern (2X), das in Schritt 13.) vorbereitet wurde. Zweimal auf und ab pipettieren. Für 15 min (oder ein bisschen verlängern auf 16 min) wird bei 94°C im Thermocycler inkubiert. Danach werden die Reaktionsgefäße sofort in den Magnetständer gesteckt.

- 35.) Die eluierte mRNA wird gesammelt, indem 15 µl des Überstandes in ein frisches Nuklease freies PCR-Reaktionsgefäß überführt werden.
- 36.) Die Reaktionsgefäße werden auf Eis gelagert. Direkt mit der cDNA Synthese fortfahren.

## **B. Die Einzelstrang cDNA Synthese (First Strand cDNA Synthesis)**

- 37.) Es wird ein Mix vorbereitet. Je Probe werden benötigt:

0,5  $\mu\text{l}$  (●pink) Murine RNase Inhibitor  
 1,0  $\mu\text{l}$  (●pink) ProtoScript II Reverse Transcriptase  
3,5  $\mu\text{l}$  Nuklease freies Wasser  
 $\Sigma$  5  $\mu\text{l}$

Zu den 15  $\mu\text{l}$  aufgereinigter mRNA werden je 5  $\mu\text{l}$  des Synthese Mixes gegeben ( $\Sigma_{\text{total}}$  20  $\mu\text{l}$ ).

- 38.) Indem die Reaktionsgefäße 25-mal mit den Fingern geschnippt werden, werden die Proben vorsichtig gemischt. In einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugieren und die Reaktionsgefäße in den Thermocycler stellen.
- 39.) Die Proben werden folgendermaßen inkubiert:
- 10 min bei 25°C
  - 55 min bei 42°C
  - 15 min bei 70°C
  - Auf 4°C kühlen
- 40.) Sofort mit der Doppelstrang cDNA Synthese fortfahren.

### **C. Die Doppelstrang cDNA Synthese (Second Strand cDNA Synthesis)**

- 41.) **Vorbemerkung:** Den (●orange) Second strand Synthesis Buffer (10X) gut auftauen lassen und weiße Kristalle auflösen lassen.

In jede Probe (20  $\mu\text{l}$ ) werden folgende Komponenten direkt hinzugegeben (ohne vorher einen Master-Mix herzustellen):

48  $\mu\text{l}$  Nuklease freies Wasser  
 8  $\mu\text{l}$  (●orange) Second strand Synthesis Buffer (10X)  
4  $\mu\text{l}$  (●orange) Second strand Synthesis Enzyme Mix  
 $\Sigma$  80  $\mu\text{l}$

- 42.) Alle Ansätze werden durch 4-mal auf und ab pipettieren vorsichtig gemischt.
- 43.) Im Thermocycler werden die Proben für 65 min bei 16°C inkubiert, wobei die Temperatur des Deckels  $\leq$  40°C betragen sollte.
- 44.) Die Agencourt AMPure XP *Beads* (Beckman Coulter) auf Raumtemperatur kommen lassen.

### **D. Aufreinigung der Doppelstrang cDNA mittels 1,8X Agencourt AMPure XP *Beads* (Beckman Coulter)**

- 45.) Die am Boden abgesetzten AMPure XP *Beads* werden durch gründliches Schwenken des Fläschchens resuspendiert.

- 46.) 144 µl (1,8X) der resuspendierten AMPure XP *Beads* werden zu den 80 µl Ansätzen gegeben. Auf einem Vortex-Mixer gut mischen.
- 47.) Inkubation für 6 min bei RT.
- 48.) Herstellen von 80 % Ethanol (aus Nuklease freiem Wasser und reinem Ethanol)
- 49.) In einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit unten im Reaktionsgefäß zu sammeln. Anschließend werden die Reaktionsgefäße in den Magnetständer gestellt. Die *beads* trennen sich vom Überstand ab. Erst wenn die Lösung klar ist (nach ca. 10 min) kann der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen werden. Es ist darauf zu achten, dass die *Beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.
- 50.) 190 µl frisch präparierter 80 % Ethanol wird in jedes Reaktionsgefäß gegeben, während diese im Magnetständer verbleiben. Für 30 sec bei RT inkubieren und vorsichtig den Ethanol wieder entfernen.
- 51.) Der Schritt 50.) wird einmal wiederholt, so dass insgesamt zweimal gewaschen wurde.
- 52.) Nachdem der Überstand nach dem zweiten Waschen abgenommen wurde, wird mit einer 10 µl Pipettenspitze der restliche Ethanol vom Boden der Reaktionsgefäße entfernt.
- 53.) An der Luft werden die *Beads* für 5-7 min bei RT getrocknet, während die Reaktionsgefäße im Magnetständer bleiben mit geöffnetem Deckel.
- 54.) Die doppelsträngige DNA wird nun durch Zugabe von 58 µl Nuklease freiem 0,1X TE-Puffer (aus: 1X Tris-EDTA buffer Solution pH 8,0 „BioUltra“ von *Sigma-Aldrich Co.*) eluiert. Es wird 6-mal auf und ab pipettiert und anschließend nochmal auf dem Vortex-Mixer kurz gemischt. In einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugieren, 2 min inkubieren und die Reaktionsgefäße in den Magnetständer stecken bis die Lösung klar wird.
- 55.) 55,5 µl des Überstandes werden in ein neues 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß überführt.



**Anmerkung:** Bei Bedarf können an diesem Punkt im Protokoll die Proben bei -20°C zwischengelagert werden.

### **E. Reparation der cDNA Endstücke (End Repair/dA-tail of cDNA Library)**

- 56.) **Vorbemerkung:** Den (●green) NEBNext End Repair Reaction Buffer (10X) gut auftauen lassen und weiße Kristalle auflösen lassen.  
Zu jedem Ansatz der gereinigten doppelsträngigen cDNA (55,5 µl) werden gegeben:

$$\begin{array}{r}
 6,5 \mu\text{l} \text{ (●green) NEBNext End Repair Reaction Buffer (10X)} \\
 \underline{3,0 \mu\text{l} \text{ (●green) NEBNext End Prep Enzyme Mix}} \\
 \Sigma 65 \mu\text{l}
 \end{array}$$

Indem die Reaktionsgefäße 25-mal mit den Fingern geschnippt werden, werden die Proben vorsichtig gemischt. Es folgt 3-mal auf und ab pipettieren. In einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugieren und die Reaktionsgefäße in den Thermocycler stellen.

57.) Im Thermocycler werden die Proben folgendermaßen inkubiert (Deckel 75°C):

30 min bei 20 °C  
 30 min bei 65°C  
 Auf 4°C kühlen

58.) Sofort mit der Adapter Ligation fortfahren.

## **F. Adapter Ligation (Adaptor Ligation)**

59.) Der (●red) NEBNext Adaptor for Illumina (15 µM) muss auf 1,5 µM durch eine zehnfach Verdünnung (1:9) mit sterilem Wasser gebracht werden. Diese Verdünnung ist immer frisch anzusetzen.

60.) Keinen Mastermix ansetzen, um Adapter-Dimer Bildung zu vermeiden. Zu jeder dA-tailed cDNA (65 µl) werden folgende Komponenten gefügt:

2,5 µl Nuklease freies Wasser  
 15,0 µl (●red) Blunt/TA Ligase Master Mix (langsam pipettieren)  
 1,0 µl Adapter Verdünnung aus Schritt 59.)  
 Σ 83,5 µl

61.) Das gesamte Volumen wird 3-mal auf und ab pipettiert und gut gemischt.

62.) Inkubation für 15 min bei 20°C im Thermocycler. Deckelheizung aus.

63.) Zu jedem Ansatz werden 3 µl (●red) USER Enzyme pipettiert.

64.) Indem die Reaktionsgefäße 50-mal mit den Fingern geschnippt werden, werden die Proben vorsichtig gemischt. Danach Inkubation für 25 min bei 37°C im Thermocycler (Deckel 40°C).

65.) Die Agencourt AMPure XP *Beads* (Beckman Coulter) auf Raumtemperatur kommen lassen.

## **G. Aufreinigung der Ligationsreaktion mittels Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter)**

66.) Zu jedem Ligationsansatz (86,5 µl) werden 13,5 µl Nuklease freies Wasser gegeben, damit ein Volumen von 100 µl erreicht wird.

67.) **Anmerkung:** X bezieht sich nun auf das 100 µl Volumen vom Schritt davor. Die am Boden abgesetzten AMPure XP *Beads* werden durch gründliches Schwenken des

Fläschchens resuspendiert. Es werden jeweils 100 µl (1X) der resuspendierten AMPure XP *Beads* hinzugefügt. Auf dem Vortex-Mixer wird kurz gemischt.

- 68.) Inkubation für 6 min bei RT. Dabei bindet die cDNA an die *Beads*
- 69.) Herstellen von 80 % Ethanol (aus Nuklease freiem Wasser und reinem Ethanol).
- 70.) In einer Mikrozentrifuge kurz an zentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit unten im Reaktionsgefäß zu sammeln. Anschließend werden die Reaktionsgefäße in den Magnetständer gestellt. Die *Beads* trennen sich vom Überstand ab. Erst wenn die Lösung klar ist (nach ca. 10 min) kann der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen werden. Es ist darauf zu achten, dass die *Beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.
- 71.) 190 µl frisch präparierter 80 % Ethanol wird in jedes Reaktionsgefäß gegeben, während diese im Magnetständer bleiben. Für 30 sec bei RT inkubieren und vorsichtig den Ethanol wieder entfernen.
- 72.) Der Schritt 71.) wird einmal wiederholt, so dass insgesamt zweimal gewaschen wurde.
- 73.) Nachdem der Überstand nach dem zweiten Waschen abgenommen wurde, wird mit einer 10 µl Pipettenspitze der restliche Ethanol vom Boden der Reaktionsgefäße entfernt.
- 74.) An der Luft werden die *Beads* für 5 min bei RT getrocknet, während die Reaktionsgefäße im Magnetständer bleiben mit geöffnetem Deckel (nicht länger trocknen, da dies zu einer verringerten DNA-Elution führen kann).
- 75.) Die cDNA wird nun durch Zugabe von 50 µl Nuklease freiem 0,1X TE-Puffer eluiert. Es wird 4-mal auf und ab pipettiert und anschließend nochmal auf dem Vortex Mixer kurz gemischt. In einer Mikrozentrifuge kurz an zentrifugieren, 2 min inkubieren und dann die Reaktionsgefäße in den Magnetständer stecken, bis die Lösung klar wird.
- 76.) Die gesamten 50 µl des Überstandes werden in ein neues 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß überführt. Die *Beads* werden verworfen.
- 77.) Zu den 50 µl gibt man nun 50 µl (1X) der resuspendierten AMPure XP *Beads*. Auf dem Vortex-Mixer wird kurz gemischt.
- 78.) Inkubation für 6 min bei RT. Dabei bindet die cDNA an die neuen *Beads*.
- 79.) Herstellen von 80 % Ethanol (aus Nuklease freiem Wasser und reinem Ethanol).
- 80.) In einer Mikrozentrifuge kurz an zentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit unten im Reaktionsgefäß zu sammeln. Anschließend werden die Reaktionsgefäße in den Magnetständer gestellt. Die *Beads* trennen sich vom Überstand ab. Erst wenn die Lösung klar ist (nach ca. 10 min) kann der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen werden. Es ist darauf zu achten, dass die *Beads* nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.

- 81.) Den High-Fidelity PCR Master Mix 2X (●blue) für Abschnitt H. auf Eis stellen und auftauen lassen. Später nach dem Auftauen durch Invertieren vorsichtig mischen.
- 82.) 190 µl frisch präparierter 80 % Ethanol wird in jedes Reaktionsgefäß gegeben, während diese im Magnetständer verbleiben. Für 30 sec bei RT inkubieren und vorsichtig den Ethanol wieder entfernen.
- 83.) Der Schritt 82.) wird einmal wiederholt, so dass insgesamt zweimal gewaschen wurde.
- 84.) Nachdem der Überstand nach dem zweiten Waschen abgenommen wurde, wird mit einer 10 µl Pipettenspitze der restliche Ethanol vom Boden der Reaktionsgefäße entfernt.
- 85.) An der Luft werden die *Beads* für 5 min bei RT getrocknet, während die Reaktionsgefäße im Magnetständer bleiben mit geöffnetem Deckel (nicht länger).
- 86.) Die cDNA wird nun durch Zugabe von 21 µl Nuklease freiem 0,1X TE-Puffer von den *Beads* eluiert. Es wird 4-mal auf und ab pipettiert und anschließend nochmal auf dem Vortex-Mixer kurz gemischt. In einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugieren, 2 min inkubieren und die Reaktionsgefäße in den Magnetständer stecken, bis die Lösung klar wird (ca. 10 min).
- 87.) 20 µl des Überstandes werden in ein neues 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß überführt.

**Anmerkung:** Es ist bei diesem Schritt sehr wichtig, dass keine *Beads* überführt werden. Spuren der *Beads* können bereits die Aktivität der Polymerase des folgenden PCR Schrittes beeinträchtigen.

**Tip:** Sollte man sich nicht sicher sein, dass die transferierten 20 µl frei von *Beads* sind, können die Proben erneut in den Magnetständer gestellt werden und der Schritt 87.) kann ein weiteres Mal durchgeführt werden.

## H. Vervielfältigung der Bibliothek durch PCR (PCR Library Enrichment)

88.) Zu jeder Probe (20 µl cDNA) werden folgende Komponenten direkt gegeben:

25,0 µl (●blue) NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix, 2X  
 2,5 µl (10 µM) NEBNext **i5X** Index Primer  
 2,5 µl (10 µM) NEBNext **i7X** Index Primer  
 Σ 50 µl

Vorsichtig durch dreimal auf und ab pipettieren mischen.

**Anmerkung:** NEBNext Index Primer sind gut für die Multiplex Probenaufbereitung geeignet, um eine RNA-Sequenzierung auf der Illumina Plattform durchzuführen. Es dürfen je Probe in der PCR nur **ein** i5X und **ein** i7X Primer kombiniert werden. Die Kombination kann frei gewählt werden. X bezieht sich hier auf die unterschiedlichen Primer im Kit, die vom Hersteller nummeriert sind (i501 bis i508 bzw. i701 bis i712).

89.) PCR-Programm (Deckel 100°C):

Zyklusbeschreibung	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	1
Denaturierung	98°C	10 sec	12-15*
Annealing/Extension	65°C	75 sec	
Terminale Extension	65°C	5 min	1
Kühle Lagerung	4°C	∞	

\* Die Zahl der PCR Zyklen muss entsprechend der RNA Ausgangsmenge (gemessen in 4.10.2) angepasst werden. **Empfehlung:**  $c_{\text{gesamt}} \geq 17 \text{ ng}/\mu\text{l}$  13 Zyklen,  $c_{\text{gesamt}} 15\text{-}17 \text{ ng}/\mu\text{l}$  14 Zyklen,  $c_{\text{gesamt}} \leq 15 \text{ ng}/\mu\text{l}$  15 Zyklen. Mehr als 15 Zyklen sind nicht empfehlenswert.

Es ist wichtig, dass die PCR Zyklen limitiert werden, um eine Überamplifikation zu vermeiden. Sollte es zu einer Überamplifikation gekommen sein, werden auf dem DNA 1K Chip (nächstes Kapitel) größere Produkte (> 500 bp) detektiert.

### I. Aufreinigung der PCR Produkte mittels Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter)

90.) **Anmerkung:** X bezieht sich nun auf das 50  $\mu\text{l}$  Volumen aus dem PCR Schritt. Die am Boden abgesetzten AMPure XP Beads werden durch gründliches Schwenken des Fläschchens resuspendiert.

Zu den PCR Ansätzen (~50  $\mu\text{l}$ ) werden 45  $\mu\text{l}$  (0,9X) der resuspendierten AMPure XP Beads gegeben. Sehr gut auf dem Vortex-Mixer mischen.

91.) Inkubation für 6 min bei RT.

92.) Herstellen von 80 % Ethanol (aus Nuklease freiem Wasser und reinem Ethanol).

93.) In einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit unten im Reaktionsgefäß zu sammeln. Anschließend werden die Reaktionsgefäße in den Magnetständer gestellt. Die Beads trennen sich vom Überstand ab. Erst wenn die Lösung klar ist (nach 5-10 min) kann der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen werden. Es ist darauf zu achten, dass die Beads nicht aufgewühlt und nicht abgesaugt werden.

94.) 190  $\mu\text{l}$  frisch präparierter 80 % Ethanol wird in jedes Reaktionsgefäß gegeben, während diese im Magnetständer verbleiben. Für 30 sec bei RT inkubieren und vorsichtig den Ethanol wieder entfernen.

95.) Der Schritt 94.) wird einmal wiederholt, so dass insgesamt zweimal gewaschen wurde.

96.) Nachdem der Überstand nach dem zweiten Waschen abgenommen wurde, wird mit einer 10  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze der restliche Ethanol vom Boden der Reaktionsgefäße entfernt.

97.) An der Luft werden die Beads für 5 min bei RT getrocknet, während die Reaktionsgefäße im Magnetständer bleiben mit geöffnetem Deckel (nicht länger).

- 98.) Die DNA wird nun durch Zugabe von 21 µl Nuklease freiem 0,1X TE-Puffer eluiert. Es wird 4-mal auf und ab pipettiert und anschließend nochmal auf dem Vortex-Mixer kurz gemischt. In einer Mikrozentrifuge kurz an zentrifugieren, 2 min inkubieren und dann die Reaktionsgefäße in den Magnetständer stecken bis die Lösung klar wird.
- 99.) 20 µl des Überstandes werden in ein sauberes PCR Reaktionsgefäß überführt. Dabei handelt es sich um die für die Sequenzierung benötigten Bibliotheken. Die Qualität der Bibliotheken wird vor der Sequenzierung auf dem Experion™ Messgerät bestimmt und die Proben werden äquimolar eingestellt.



**Anmerkung:** Bei Bedarf können die Proben ein paar Tage bis Wochen bei -20°C gelagert werden.

## J. Konzentrationsmessung und Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliothek

Qualität und Konzentrationen der cDNA-Bibliotheken müssen bestimmt werden. Nur so kann man beurteilen, ob die Proben vergleichbar sind und von jeder Bibliothek eine äquimolare Menge für die Sequenzierung verwenden. Die Messung kann mit dem Experion™ DNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) durchgeführt werden. Folgende Utensilien müssen für die Messung bestellt werden:

Experion™ DNA 1K Reagents Kit (#7007164)  
 Experion™ DNA Chips (#7007163)

Die exakte Anleitung kann dem Beipackzettel aus dem Kit entnommen werden. Die für die Versuche dieser Arbeit vorgenommenen Änderungen sind blau unterlegt, beim Rest wurde entsprechend des Beipackzettels vorgegangen.

- 1.) Äquilibrierung der Reagenzien
- 2.) Gelfärbelösung (GS) vorbereiten
- 3.) Primern des Chips
- 4.) Beladen des Chips mit den Proben und dem Marker  
 Hier wurde folgende Änderung vorgenommen:

- Vorbereitung der Proben und des Markers: 5,5 µl *loading buffer* in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorlegen. 1,1 µl Marker in eines der vorbereiteten Reaktionsgefäße pipettieren und die anderen mit je 1,1 µl Probe befüllen. Auf dem Vortex-Mixer mischen und anschließend mittels kurzer Zentrifugation die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes auffangen. **Anmerkung:** Niemals den DNA 1K Chip zuerst beladen und dann den gesamten Chip vortexen.
- 9 µl GS in die drei vorgesehenen übrigen Wells pipettieren
- In die Wells 1-11 können 6 µl der vorbereiteten Proben und in Well L können 6 µl des vorbereiteten Markers gegeben werden.

- 5.) Die DNA 1K Analyse kann gestartet werden
- 6.) Reinigung der Elektroden

Im Idealfall sollte sich die Größenverteilung der Bibliotheken so verhalten, wie in Abb. 16 zu sehen ist, mit einem Maximum bei 200-300 bp (ergibt sich aus ca. 200 bp Fragment

+ 50 bp Adapter). Die Konzentration wird bestimmt, indem die Fläche unter dem Peak „Bibliothek“ bestimmt wird (Flächenberechnung mit Integralen).

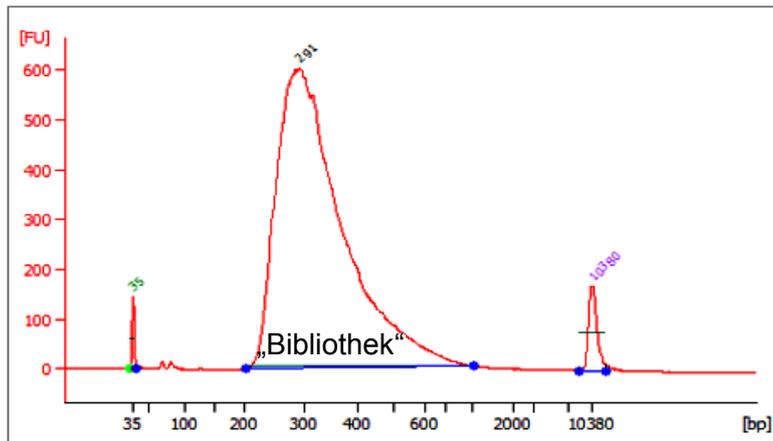


Abb. 16: **Beispiel für die Größenverteilung der cDNA-Bibliothek.**  
(Quelle: manual NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> RNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup>)

**(Tipp:** Falls die Konzentration einer Probe äußerst gering sein sollte, kann man Wasser aus dem Reaktionsgefäß mit Hilfe eines schonenden „Concentrator“ Systems (z.B. SpeedVac<sup>™</sup>) verdampfen, um eine höher konzentrierte cDNA-Bibliothek zu erhalten. Dieses Verfahren sollte aber eher eine Ausnahme darstellen und nicht die Regel.)

Für die RNA-Sequenzierung werden äquimolare Mengen der Proben verwendet (alle Proben z.B. auf 50 nM einstellen, dann gleiche Volumina von den Proben abnehmen und in einem Reaktionsgefäß zusammenmischen).

## 4.11 RNA-Sequenzierung

Durch unseren Co-Operationspartner Dr. Elmar Wolf wurde die RNA Sequenzierung am Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg vorgenommen. Dort wurde die Sequenziertechnik von Illumina<sup>®</sup> verwendet. *Illumina, Inc.* ist ein weltweit vertretener Hersteller von Geräten für biologische Analysen mit Sitz in den USA.

Während man mit den früheren Verfahren (der ersten Generation) lediglich ein einzelnes DNA-Fragment sequenzieren konnte und dann das nächste usw., ermöglicht die sog. Sequenzierung der nächsten Generation, kurz NGS (engl.: Next Generation Sequencing), eine parallele Sequenzierung von Millionen Fragmenten in einem gleichzeitigen Verfahren, (Illumina, Introduction Handbuch). Prinzipiell gliedert sich der Arbeitsfluss für das RNA-Sequenzieren nach dem Illumina<sup>®</sup> Konzept in vier Abschnitte:

### A. Die cDNA-Bibliothek (Library)

Die Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde durch zufällige Fragmentierung der isolierten mRNA gestartet (Hitze bedingte Fragmentierung bei 94°C). Anschließend wurden die mRNA-Fragmente in doppelsträngige cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. An die Enden (3' sowie 5') wurden spezielle Adapter ligiert. Die mit Adaptern versehenen cDNA Stücke wurden in einer PCR amplifiziert, die Bibliothek war fertig (vgl. 4.10.4).

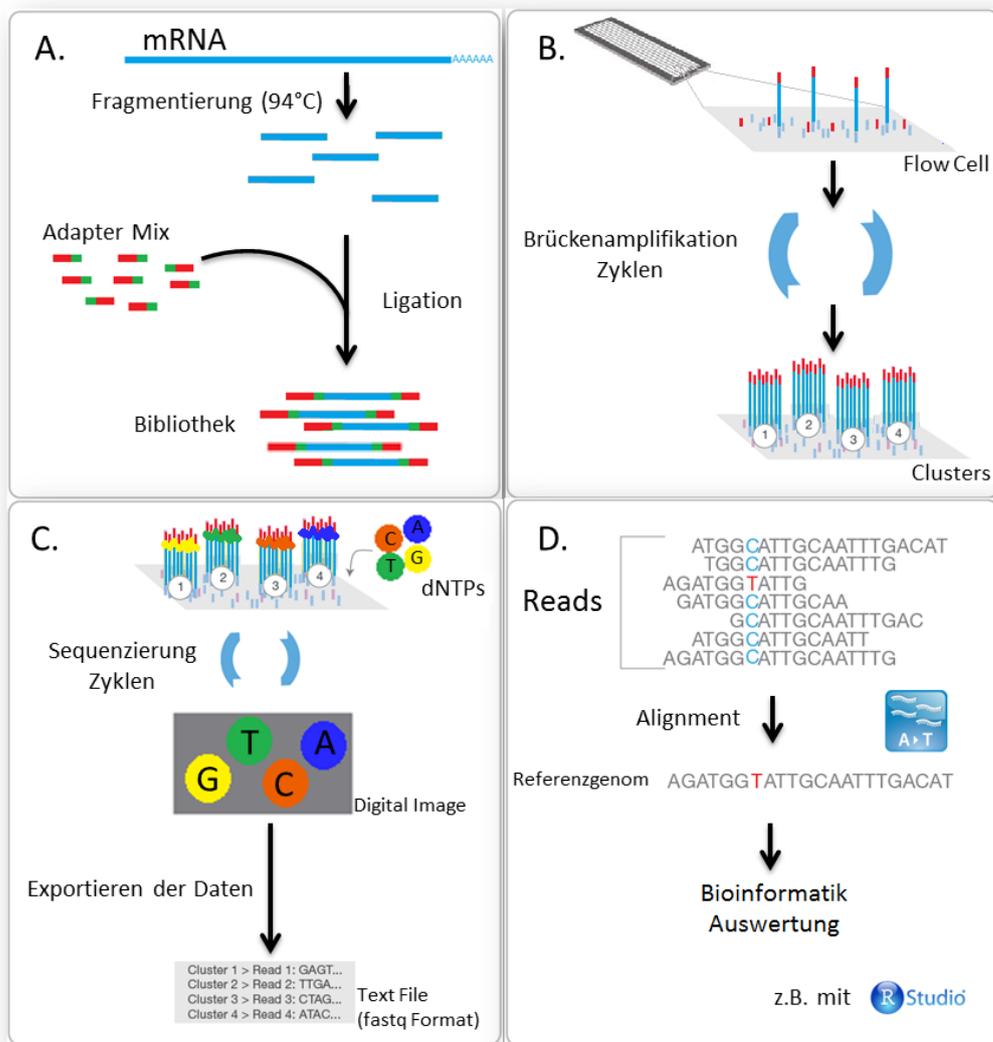


Abb. 17: **Arbeitsfluss beim NGS (Next Generation Sequencing) mittels Illumina®**

- A. Herstellen der Bibliothek: mRNA wird durch Hitzebehandlung fragmentiert. Die RNA Fragmente werden in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und Adapter werden an die Fragmente ligiert. Die sog. Bibliothek entsteht.
- B. Die Bibliothek wird auf eine Flow Cell geladen. Dabei hybridisieren die Fragment über ihre Adapter an die Oligonukleotide auf der Oberfläche des Chips. Durch Brückenamplifikation entsteht aus jedem gebundenen Fragment ein Cluster aus etwa 1000 klonalen Kopien.
- C. Mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotide (dNTPs) werden hinzugefügt und die erste Base wird an jedem Cluster eingebaut. Die Stränge der Cluster dienen als Template. Die Flow Cell wird angeregt und die Emission von jedem Cluster detektiert, wobei jede Nukleotid Art einen anderen Farbstoff hat, so dass anhand des emittierten Lichts die jeweils eingebaute Base identifiziert werden kann. Dann folgen Einbau und Identifizierung der nächsten Base usw. bis zum Zyklus n. Das Verfahren bezeichnet man als Sequenzieren-beim-Synthetisieren.
- D. Die Daten enthalten viele Millionen gelesene Sequenzen (*Reads*), die zunächst mit einem Referenzgenom abgeglichen werden müssen (Alignment). Das kann z.B. auf der Internet Plattform „BaseSpace“ von Illumina erfolgen. Danach kann mit einer Vielzahl von Programmen eine bioinformatische Auswertung erfolgen (z.B. mit „R studio“).

## B. Cluster Erzeugung (Cluster Generation)

Dazu wurde die Bibliothek auf einen speziellen Chip (engl.: Flow Cell) geladen. Dieser war mit einem Rasen aus oberflächengebundenen Oligonukleotiden ausgestattet, die komplementär zu den verwendeten Adaptoren waren. Folglich haftete sich jedes Fragment an ein Oligonukleotid fest und durch Brückenamplifikation (engl.: Bridge Amplification) wurde von jedem Fragment ein klonales Cluster erzeugt. Das gesamte Cluster bestand

aus ungefähr 1000 klonalen Kopien und wurde für die Sequenzierung benötigt, denn es verstärkte das Signal beim nächsten Schritt.

### C. Ablauf der Sequenzierung

Mittels einer Technik, die als Sequenzieren-beim-Synthetisieren (SBS; engl.: Sequencing-by-Synthesis) bezeichnet wird, werden die Fragmente der Bibliothek auf dem Durchfluss-Chip (Flow Cell) gelesen. SBS detektiert einzelne Basen, sobald sie in die DNA-Template Stränge eingebaut werden. Jede der vier dNTP Arten ist mit einem anderen Farbstoff ausgestattet und bei jedem Zyklus wird eine dNTP Art eingebaut. Dabei fluoresziert das gesamte Cluster und das freigesetzte Licht wird registriert. Millionen von Clustern werden parallel gelesen. Das Ergebnis ist also eine Base-für-Base Sequenzierung aller Cluster auf dem Durchfluss-Chip. Die Anzahl der Zyklen bestimmt die Länge der *Reads*. Gespeichert werden die Daten im fastq Format.

Es wurde eine paired-end Sequenzierung durchgeführt. Diese beinhaltete ein Lesen der cDNA von beiden Seiten, also ein 2. Lesen der Cluster. Vorwärts (forward) und rückwärts (reverse) gelesene Sequenzen wurden miteinander abgeglichen. Dadurch wurden die Ergebnisse noch genauer. Auf eine Flow Cell konnten viele Proben geladen werden. Anhand der verwendeten Index Primer während der PCR-Amplifikation (vgl. Seite 105) konnten die *Reads* wieder den einzelnen Proben zugeordnet werden.

### D. Auswertung der Daten

Die gelesenen und identifizierten Sequenzen werden immer im ersten Schritt auf ein Referenzgenom abgeglichen (Alignment). Für die weitere Auswertung stehen eine Vielzahl bioinformatischer Programme zur Verfügung und viele verschiedene Wege zur Auswertung können gewählt werden.

Hier wurde für das Alignment von der Internet-Plattform „BaseSpace“ (von Illumina; <https://basespace.illumina.com>) die kostenlose Anwendung „RNA-Seq Alignment v1.0.0“ verwendet. Diese Anwendung (App) führte folgende Funktionen aus:

- Read mapping mit TopHat2 / Bowtie2 (Kim *et al.*, 2013) oder STAR aligner
- FPKM Bewertung von Referenzgenen und Transkripten mit Cufflinks 2 und Sammlung neuer Transkripte mit Cufflinks 2 (Trapnell *et al.*, 2010)
- Variant calling (SNVs und Indels) mit dem Isaac Variant caller (Raczy *et al.*, 2013)
- Wenn angebracht: TopHat-Fusion (Kim und Salzberg, 2011)

Als Referenzgenom wurde folgende Einstellung verwendet: *Arabidopsis thaliana* Ensembl TAIR10 (Ensembl gene annotation).

Aus den fastq Datensätzen entstanden dabei Datensätze im bam Format. Diese wurden mit dem Programm „R studio“<sup>®</sup> statistisch ausgewertet. Infizierte Proben wurden auf die Kontrolle (mock) relativiert. Nach Einführen eines Normalisierungsfaktors wurden Listen zusammengestellt, die auf verschiedenen Signifikanz-Niveaus basierten. Dazu wurde nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur die False Discovery Rate (FDR) bestimmt (Benjamini und Hochberg, 1995). Die FDR ist in den jeweiligen Abbildungen im Ergebnis teil immer angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen mock und den infizierten Proben wurden ausfindig gemacht. Ebenfalls mit „R studio“<sup>®</sup> wurden „smear plots“ erstellt.

## 4.12 Arbeiten mit Fluoreszenzmikroskop und konfokalem Laser-Raster-Mikroskop (CLSM)

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Sie beruht auf dem Effekt der Fluoreszenz, bei der fluoreszierende Stoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und dadurch Licht einer anderen Wellenlänge abstrahlen. Das Präparat absorbiert das meiste Anregungslicht und das Emissionslicht wird in das Objektiv zurückgeworfen. Dieses Fluoreszenzlicht wird unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Eine erweiterte Anwendung der klassischen Fluoreszenzmikroskopie ist die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM). Durch den Einsatz einer Lochblende gelangt bei der CLSM nur ein sehr geringer Anteil des Fluoreszenzlichtes in das Mikroskop, wodurch man Hintergrundsignale besser ausblenden kann. Bei mehrschichtigen Objekten kann durch verschiedene Ebenen gescannt werden. Durch Überlagerung der Einzelbilder können damit sogar 3D-Bilder erstellt werden. Um die Lokalisation fluoreszierender Strukturen im Präparat zu ermöglichen, können Durchlicht- und Fluoreszenzlichtbilder überlagert werden.

In dieser Arbeit wurde das Fluoreszenzlicht des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aufgenommen, das nach einer Anregung mit 450-490 nm abgestrahlt wurde. Beide Mikroskope wurden nach dem Handbuch des Herstellers bedient.

## 4.13 Allgemeine Berechnungen

### 4.13.1 Bestimmung der Sporenkonzentration

Unter dem Lichtmikroskop wurde die Anzahl der Konidiosporen mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Sporen innerhalb von drei Gruppenquadraten wurden gezählt und die Anzahl wurde gemittelt. Beispiel:

1. Quadrat: 233 Sporen

2. Quadrat: 279 Sporen

3. Quadrat: 264 Sporen

Mittelwert: 259 Sporen (arithmetisches Mittel)

Jedes Gruppenquadrat besitzt ein Volumen von 0,004  $\mu\text{l}$ . Somit betrug im gegebenen Beispiel die Sporenzahl in einem Mikroliter:  $(1 \mu\text{l} / 0,004 \mu\text{l}) \times 259 \text{ Sporen} = 64750 \text{ Sporen}$ . Die Konzentration eines Gefrierstocks sollte eine Konzentration zwischen  $2 \times 10^7$  und  $2 \times 10^8$  Sporen/ml besitzen. Für jedes Aliquot sollten 500  $\mu\text{l}$  der Sporensuspension mit 500  $\mu\text{l}$  Glycerol (50 %) gemischt werden. Im Beispiel errechnet sich also eine finale Konzentration von  $3,24 \times 10^7$  Sporen/ml. Solche Gefrierstocks konnten bei  $-80^\circ\text{C}$  über längere Zeit gelagert werden.

### 4.13.2 Bestimmung der Länge der Primärwurzel

Alle Versuche zum Bestimmen der Wurzellänge wurden im sterilen *in vitro*-Infektionssystem, das unter 4.9.7 beschrieben ist, durchgeführt (ausnahmsweise auch die Infektion mit *P. parasitica*, wobei die Konzentration der *P. parasitica* Zoosporen niedriger als üblich, d.h.  $< 2,5 \times 10^6$  Sporen/ml, gewählt wurde, damit die Pflanzen mehrere Tage

überleben konnten). 9-11 Tage alte Keimlinge wurden entweder mit *P. indica* oder einem der Pathogene *V. longisporum* bzw. *P. parasitica* infiziert. An den Folgetagen wurden Fotos mit einer handelsüblichen Digitalkamera aufgenommen. Am Zeitpunkt 0 hpi wurde die Stelle, wo sich die Wurzelspitze befand, mit einem wasserfesten Stift an der Petrischale markiert und ab dort wurde der Zuwachs der Primärwurzel mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (<http://imagej.net>) gemessen. Die Handhabung des Programms und die Berechnung erfolgte nach dem Protokoll von Corrales *et al.* (2014).

#### 4.13.3 Berechnung der relativen Geninduktion ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode)

Angewendet für die Auswertung von qRT-PCR Daten. Nach Livak und Schmittgen, 2001: Dazu wurde zunächst vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens der CT-Wert des Referenzgens abgezogen =  $\Delta CT$  (relative Expressionsstärke). Vom  $\Delta CT$  der Behandlungs-Probe (z.B. infiziert) wurde der  $\Delta CT$  der Referenzbedingung (z.B. der *mock*-inokulierten Pflanzen) abgezogen =  $\Delta\Delta CT$ . Dieser Wert wurde in die Gleichung  $2^{-\Delta\Delta CT}$  eingesetzt, da theoretisch nach jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA-Menge erfolgte. Wenn mehrere technische Replikate (meist 3 je Probe) vorhanden waren, wurde aus den zusammengehörenden CT-Werten der Mittelwert (arithmetisches Mittel) gebildet und dieser in die beschriebene Berechnung eingesetzt.

Auf diese Art wurde die relative Expressionsstärke der Kontrolle auf 1 gesetzt. Von ausgewählten Genen konnte somit die Transkriptmenge in der infizierten Probe als Vielfaches der *mock*-Kontrolle dargestellt werden, also die relative Geninduktion gegenüber *mock* (y-Achse). Zum Erstellen der Graphiken wurde das Programm Excel (Microsoft®) verwendet. Zur Berechnung der relativen Geninduktion wurde das *UBIQUITIN5*-Gen (*UBQ5*) als Referenzgen ausgewählt. *UBQ5* ist Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit cytosolischer Ribosomen (Carroll *et al.*, 2008) und wird häufig als endogenes Haushaltsgen eingesetzt. Haushaltsgene sollten unabhängig von Zelltyp, Zellstadium oder Umwelteinflüssen exprimiert werden.

#### 4.13.4 Berechnung der Transkriptmenge

Um einen Wert für die Menge der Transkripte eines Gens aus den Datensätzen der Sequenzierungen darstellen zu können, wurde folgende Formel aufgestellt:

$$T = \frac{R_{Gi} * 1000}{\Sigma R_7}$$

Wobei: T = Transkriptmenge,  $R_{Gi}$  = *Reads* des Gens von Interesse,  $\Sigma R_7$  = Summe der *Reads* von sieben Referenzgenen; Bei mehreren biologischen Replikaten wurde für jedes Replikat T errechnet und anschließend der Mittelwert  $\bar{T}$  (arithmetisches Mittel) gebildet.

Aus  $\bar{T}$  konnte die relative Geninduktion berechnet werden, indem folgender Quotient gebildet wurde:  $\bar{T}_{\text{infiziert}} / \bar{T}_{\text{mock}}$ . Details siehe Anhang.

#### 4.13.5 Berechnung der relativen Blattfläche

Nachdem von jeder Pflanze die grüne Blattfläche einzeln bestimmt wurde (siehe 4.9.6.3), wurden von zusammengehörenden Gruppen die Mittelwerte (arithmetische Mittel) gebildet. Ebenso wurde die Standardabweichung errechnet (n = Anzahl der Pflanzen pro Gruppe). Pro Pflanzenlinie wurde eine infizierte Gruppe (+) und eine Kontrollgruppe (*mock*) für die Berechnungen herangezogen. Folgender Quotient wurde gebildet:  $\text{Blattfläche}_{\text{infiziert}} / \text{Blattfläche}_{\text{mock}}$ . In den Graphiken ist der Mittelwert der infizierten Proben

relativ zu dem der Kontrollproben dargestellt. Es wurde das Programm Excel (Microsoft®) verwendet.

#### 4.13.6 Berechnung des relativen Frischgewichts

Das Frischgewicht der Blattrosetten wurde sofort nach der Ernte bestimmt. Jede Probe bestand aus fünf Rosetten unterschiedlicher Pflanzen. Pro biologischem Replikat wurde eine infizierte Probe (+) und eine Kontrollprobe (*mock*) für die Berechnung herangezogen. Folgender Quotient wurde gebildet:  $\text{Gewicht}_{\text{infiziert}} / \text{Gewicht}_{\text{mock}}$ . Aus mehreren biologischen Replikaten wurden der Mittelwert (arithmetisches Mittel) und die daraus resultierende Standardabweichung bestimmt. In den Graphiken ist der Mittelwert der infizierten Proben relativ zu dem der Kontrollproben dargestellt worden. Zur Darstellung wurde das Programm Excel (Microsoft®) verwendet.

#### 4.13.7 Berechnung der Pilz-DNA Menge

Nach der Extraktion der DNA gemäß dem Protokoll 4.2.7, wurde eine qRT-PCR mit den *V. longisporum* spezifischen Primern OLG70 for und OLG70 rev durchgeführt. Anhand der CT-Werte konnte die relative Menge der Pilz-DNA (gemeint von *V. longisporum*) nach der  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode berechnet werden. Zur Quantifizierung der Menge genomischer DNA der Pflanze wurde hier auf *ACT8* normiert.

#### 4.13.8 Berechnung der Standardabweichung (Statistik)

Als ein Maß für die Streuung von Werten bezüglich ihres Mittelwerts (Durchschnitt) wurde die Standardabweichung bestimmt. Dabei implizieren niedrige Fehlerbalken der Standardabweichung in den Graphen eine gute Repräsentativität des Mittelwertes, hohe wiederum eine schlechte. Für die Berechnungen wurde das Programm Excel (Microsoft®) verwendet. Die Grundformel lautete: „STABW(Wert1;Wert2;...)“. Das Programm berechnete die Standardabweichung mit Hilfe der „n-1“ Methode.  $\left( \sqrt{\frac{\sum(x-x)^2}{(n-1)}} \right)$ , wobei  $x$  der Stichprobenmittelwert „MITTELWERT(Wert1;Wert2;...)“ und  $n$  der Stichprobenumfang ist.

#### 4.13.9 Student's t-Test (Statistik)

Es wurde das Programm Excel (Microsoft®) verwendet. Die Grundformel lautet: „TTEST(Matrix1;Matrix2;Seiten;Typ)“. Als „Matrix1“ wird der erste Datensatz bezeichnet, „Matrix2“ bezeichnet den zweiten Datensatz. „Seiten“ bestimmt die Anzahl der Endflächen (1 = „einseitige Verteilung“; 2 = „zweiseitige Verteilung“). „Typ“ betrifft die Art des Tests (1 = „Gepaart“; 2 = „Zwei Stichproben, gleicher Varianz“; 3 = „Zwei Stichproben, ungleicher Varianz“). Für die Auswertungen wurde eine zweiseitige Verteilung und (sofern die Standardabweichungen der einzelnen Mittelwerte ein ähnliches Niveau hatten) „Zwei Stichproben, gleicher Varianz“ eingestellt.

#### 4.13.10 Benjamini Hochberg Prozedur (BH-Methode, Statistik)

Die Berechnung gilt für unabhängige Teststatistiken und wurde mit R studio® durchgeführt (PValue,method="BH"). Sie diente der Ermittlung der sog. False Discovery Rate (FDR). Dabei galt das klassische FDR-Theorem von Benjamini und Hochberg (1995).

## 5. Ergebnisse

Zuerst musste ein geeignetes System gefunden werden, in dem gezielt die Wurzeln mit Sporen inokuliert werden konnten. Eine Optimierung der TRAP-Methodik und deren Kombination mit dem Infektionssystem machte es möglich, die molekulargenetischen Reaktionen einer einzelnen Wurzelzellschicht auf verschiedene Mikroorganismen zu definieren.

### 5.1 Etablierung von Infektionssystemen zur Analyse der Interaktion zwischen Wurzel und Mikroorganismen

Prinzipiell standen zwei denkbare Infektionssysteme zur Auswahl: eines auf Erde und ein auf Agarmedium basierendes. Eine großangelegte Kultur in reiner Hydroponik wurde von vorneherein nicht in Erwägung gezogen, weil dort der direkte Kontakt der Mikroorganismen zur Wurzel eingeschränkt ist. Außerdem wurde von Iven (2009) eine hydroponische Kultur für die Infektionsversuche mit *V. longisporum* (pathogener Stamm VI43) ausgeschlossen, da ohne Zucker im Medium das Pflanzenwachstum eingeschränkt und mit Zucker das Pilzwachstum zu stark war.

#### 5.1.1 System zur Infektion und Kultur in Erde: *V. longisporum* breitete sich nach Wurzel-Inokulation systemisch aus und rief Symptome hervor

Pflanzenwurzeln wurden durch Inkubation in einer Infektionslösung inokuliert und anschließend in Erde eingesetzt („Wurzel-Dip“-Inokulation). Durch den Prozess der Inokulationsmethode wurde Wurzelgewebe verletzt. Daraufhin wuchs der Pilz in das Wurzel-Leitgewebe ein und kolonisierte von dort ausgehend auch oberirdische Pflanzenteile. Mit Hilfe eines mit eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) markierten VI43 Stammes (eGFP-VI43; Eynck *et al.*, 2007) konnte die systemische Ausbreitung visualisiert werden. Abb. 18 zeigt, dass bereits die Pilz-Sporen fluoreszierten. Später im Infektionsverlauf war das eGFP konstitutiv in allen Pilzhypen exprimiert. Im Versuch wurden 28 dpi (days post inoculation) untere Bereiche der Infloreszenzstängel präpariert, oberflächensterilisiert und auf Agarmedium platziert. Nach vier Tagen war Pilzmyzel aus den Stängelabschnitten herausgewachsen. Da dieses Pilzmyzel unter dem

Fluoreszenzmikroskop fluoreszierte, hatte sich *VI43* systemisch in der *Arabidopsis*-Pflanze ausgebreitet (Abb. 18). Im Vergleich mit der Kontrolle (*mock* Behandlung) waren an den infizierten Pflanzen folgende Symptome zu beobachten: reduzierte Stängellänge, kleinere Blatt-Rosetten, geringeres Frischgewicht, welke Blätter und früher auftretende Seneszenz (u.a. am Gelbwerden der Blätter zu erkennen). Diese Beobachtungen stimmen mit Aussagen von Reusche (2011) überein, wo von ersten chlorotischen Blättern zwischen 14 dpi und 21 dpi die Rede ist. In diesem Zeitraum induziert der Pilz die vorzeitige Seneszenz.

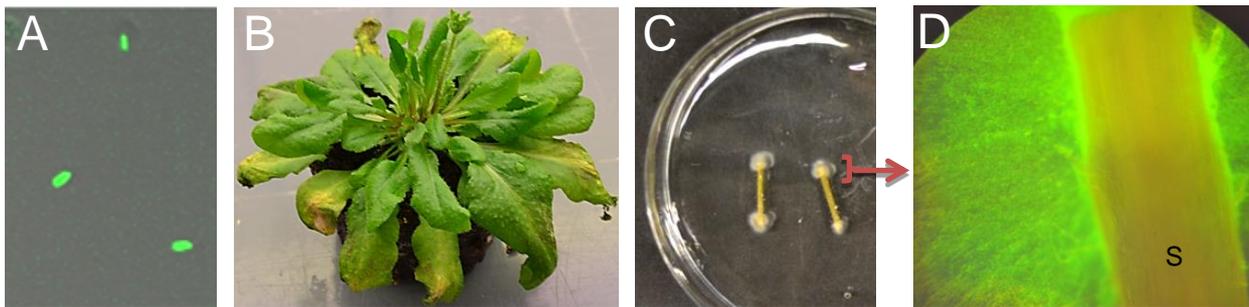


Abb. 18: Der eGFP-markierte *VI43* Stamm breitete sich systemisch aus und rief Symptome hervor.

- A: Die Sporen von eGFP-*VI43* fluoreszierten grün (CLSM-Aufnahme).  
 B: Infizierte Pflanze mit typischen Symptomen 28 dpi: Sprossstauung, verfrühte Seneszenz und welke Blätter.  
 C: Oberflächensterile Stängelsegmente auf Agarmedium: das Myzel wuchs aus dem Inneren der Segmente (Xylem) heraus.  
 D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme: Das heraus gewachsene Myzel in (C) fluoreszierte grün. S = Ende des Stängelsegments.

Dieses Infektionssystem auf Erde eignet sich auf der einen Seite gut, um Krankheitssymptome einer *V. longisporum* Infektion zu bewerten. Auf der anderen Seite können hier nur semi-sterile Bedingungen eingehalten werden. Damit man den Einfluss anderer Mikroorganismen komplett ausschließen und störungsfrei die Interaktion zwischen dem zu untersuchenden Bodenorganismus und der Wurzel verfolgen kann, ist ein steriles *in vitro*-Infektionssystem nötig.

### 5.1.3 Wachstum von *P. indica* und *V. longisporum* im sterilen *in-vitro* Infektionssystem

Zwei Bedingungen sollte das Infektionssystem erfüllen: erstens waren nach außen hin sterile Bedingungen erforderlich und zweitens sollten Wurzeln in großen Mengen und unkompliziert, d.h. ohne störende Erdanhaftungen und aufwendige Reinigungsprozesse, separat vom Spross gesammelt werden können. Das Infektionssystem von Iven (2009)

wurde getestet, ob es sich bezüglich dieser Vorgaben eignete. Die Pflanzen wurden hier in Petrischalen auf Agarmedium mit  $\frac{1}{4}$  konzentrierten Murashige und Skoog Salzen ( $\frac{1}{4}$  MS-Platten) kultiviert (Aufbau siehe 4.9.7). Obwohl das System steril verschlossen war, war Gasaustausch möglich, damit weiterhin Photosynthese betrieben werden konnte. Ein Kanal wurde in das Agarmedium geschnitten noch bevor die Samen ausgelegt wurden. Nach dem Auskeimen der Samen wuchsen die Wurzeln durch das Medium und sobald sie durch den Infektionskanal gewachsen waren, wurden dort Pilzsporen hineingegeben. 11 Tage alte *Arabidopsis* Wildtyp-Keimlinge wurden mit Konidien von eGFP-*VI43* inokuliert. 6 dpi wurde der Fortschritt des Pilzwachstums betrachtet (Abb. 19). Es wurden Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (engl.: convocal laser scanning microscope, CLSM) gemacht, wobei hier keine weiteren Färbetechniken zum Einsatz kamen. Über die Zeit war gut zu verfolgen, wie die Hyphen an den Wurzelhaaren entlang zur Wurzeloberfläche wuchsen und sich dort ausbreiteten.

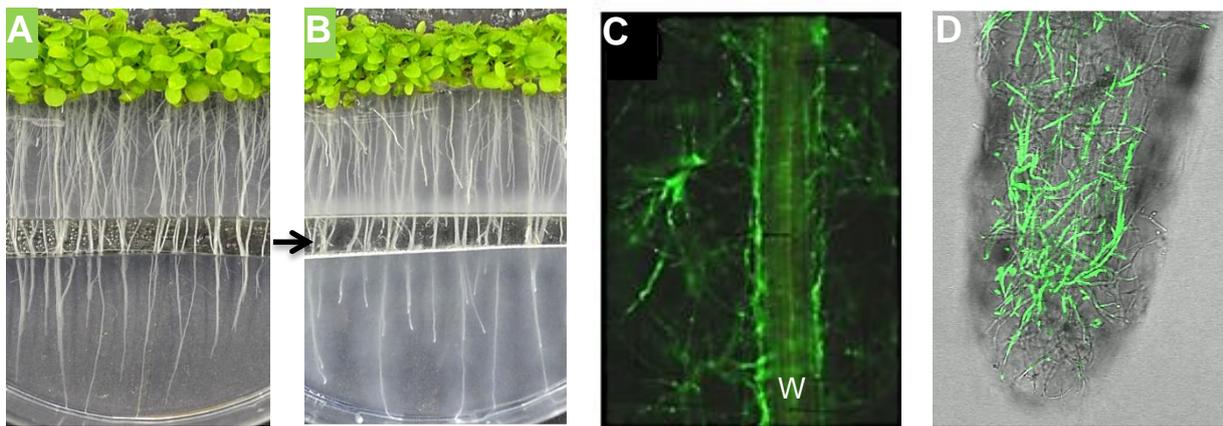


Abb. 19: *V. longisporum* wuchs gut in einem sterilen *in vitro*-Infektionssystem und bildete ein sichtbares Netz aus pilzlichen Hyphen um die Wurzeln.

Nach Applikation der Sporen (eGFP-markierter *VI43* Stamm) in den dafür vorgesehenen Infektionskanal (Pfeil) keimten die Sporen und das Myzel breitete sich im Agar-Festmedium sowie an den Wurzeln entlang aus. Gezeigt ist hier stellvertretend die Behandlung mit *V. longisporum*. Mit *P. indica* verhielt es sich sehr ähnlich. A: mock; B: +*VI43*, 6 dpi; C: Hyphen von eGFP-*VI43* unter dem Fluoreszenzmikroskop, 6 dpi. Der Pilz (grün fluoreszierend) wuchs im Agar und um die Wurzeln (W). D: Fluoreszierendes Hyphennetz um die Wurzelspitze, 6 dpi (CLSM-Aufnahme).

Schon 3 dpi konnte man das Myzel mit bloßem Auge im Agar erkennen. Weil das Schneiden des Infektionskanals in das Festmedium vor dem Auslegen und Auskeimen der Samen stattfand, entstanden bei der Sporen-Applikation keine Verletzungen an den Wurzeln. Im Fall von unverletzten Wurzeln war weder 3 dpi noch 6 dpi ein Wachstum von Hyphen innerhalb der Xylemgefäße erkennbar.

Ebenso war das beschriebene Infektionssystem auf Agarmedium geeignet, um die Interaktion der Wurzel mit *P. indica* zu untersuchen, weil sich dieser Pilz im Agar-

Festmedium und um die Wurzeln ausbreitete und sein Wachstum sehr vergleichbar mit dem von *V. longisporum* war (nicht in Abbildung dargestellt). Generell tritt bei intakten Wirtswurzeln auch bei *P. indica* kein Wachstum der Hyphen innerhalb der Wurzel auf (siehe Deshmukh *et al.*, 2006).

#### **5.1.4 Wachstum von *P. parasitica* in einem sterilen Infektionssystem auf Agarplatten**

Da unser Co-Operationspartner Agnès Attard (Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR-Institut Sophia Agrobiotech, Frankreich) bereits eine langjährige Erfahrung mit dem Modellsystem *P. parasitica* / *A. thaliana* hat, wurden die Infektions-Versuche mit dem Oomyceten in einem anderen, aber vergleichbaren sterilen System durchgeführt (Aufbau siehe 4.9.2). Innerhalb einer steril verschlossenen Petrischale befanden sich die Wurzeln in einem Flüssigmedium und wurden durch einen schmalen Streifen Agar-Festmedium räumlich vom Spross getrennt. Die Applikation der Zoosporen erfolgte in das Flüssigmedium. Dort waren die begeißelten Sporen frei beweglich und schwammen gezielt zu den Wurzeln. Sobald die Wurzeloberfläche erreicht war, keimten die Sporen und bildeten Filamente aus. Das war der Beginn der Infektion. Mit bloßem Auge war das Wachstum des Oomyceten nicht zu sehen, weil die Wurzeln zu frühen Zeitpunkten, d.h. < 10 hpi (hours post inoculation), geerntet wurden. Für die anschließenden Analysen konnten die Wurzeln unkompliziert gesammelt werden.

## **5.2 Pathogen-induzierte transkriptionelle Reaktionen der gesamten Wurzel**

Nach der Bestätigung, dass die drei Bodenorgansimen in den *in vitro*-Infektionssystemen wachsen und sich ausbreiten können, war der nächste Schritt die Untersuchung der differentiellen Genexpression in der Wurzel als gesamtes Organ. Transkriptionelle Induktionen ausgewählter Markergene repräsentierten recht gut die Infektionsverläufe.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde in *quantitativen Real-Time-PCR* (qRT-PCR) Analysen die relative Geninduktion gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle (mock) bestimmt. Anhand solcher Daten wurde für nachfolgende Analysen nach geeigneten

Zeitpunkten mit einer ausreichenden transkriptionellen Reaktion gesucht. Mehrere Gene wurden als Marker für differentielle Expression ausgewählt:

- I. Repräsentative Cytochrom-P450-Monooxygenasen (*CYP79B2*, *CYP71A12*, *CYP81F2*, *FOX1*) als Markergene des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus, der bei der Abwehr von *V. longisporum* und anderer Bodenorganismen, wie etwa *P. indica* und *Phytophthora brassicae* eine Rolle spielt (Schlaepfi *et al.*, 2010; Iven *et al.*, 2012; Nongbri *et al.*, 2012).
- II. Pathogen-induzierte TF, die zum Teil Trp-abhängige Synthesewege regulieren (*NAC042*, *MYB51*, *WRKY33*; siehe Einleitung) oder als allgemeine Abwehrmarker bekannt sind (*WRKY22*; Marker der PTI, Wan *et al.*, 2008).
- III. Die Pathogen-induzierte putative Glycosyl-Hydrolase *DIN2* (Iven *et al.*, 2012).
- IV. *CBP60g* als Marker für eine allgemeine Antwort auf Pathogene (SA-Antwort; Wang *et al.*, 2009).

Speziell die Phasen der Interaktionen sollten untersucht werden, in denen sich die drei verwendeten Mikroorganismen in ihrer biotrophen Lebensweise befanden. Generell ist *P. indica* in den ersten 7-10 dpi in einer Phase biotrophen Wachstums, danach entwickelt sich mehr und mehr eine Zelltod assoziierte Phase (Deshmukh *et al.*, 2006). Mindestens bis 7 dpi lebt *V. longisporum* ausschließlich biotroph, denn zu diesem Zeitpunkt hat der Pilz den Spross noch nicht erreicht und erst bei Eintritt der verfrühten Seneszenz im Spross kann sich der Pilz vom absterbenden Pflanzenmaterial saprotroph ernähren und ändert seine Lebensweise (Reusche, 2011). Dagegen befindet sich das extremere Pathogen *P. parasitica* nur ein paar Stunden nach der Inokulation in der biotrophen Phase (< 24 hpi) (Attard *et al.*, 2010).

### **Zeitreihenexperiment mit *P. parasitica***

Zur Analyse des veränderten Expressionsmusters ausgewählter Gene im gesamten Wurzelgewebe dienten die Zeitpunkte 2,5 hpi, 6 hpi, 10 hpi.

Alle untersuchten Markergene wurden sehr stark durch die Infektion mit *P. parasitica* induziert (Abb. 20). Das lässt für eine genomweite Analyse viele differentiell exprimierte Gene erwarten. Um sicher in der biotrophen des Pathogens bleiben zu können, wurde der Zeitpunkt 2,5 hpi für die zellschichtspezifische Analyse gewählt.

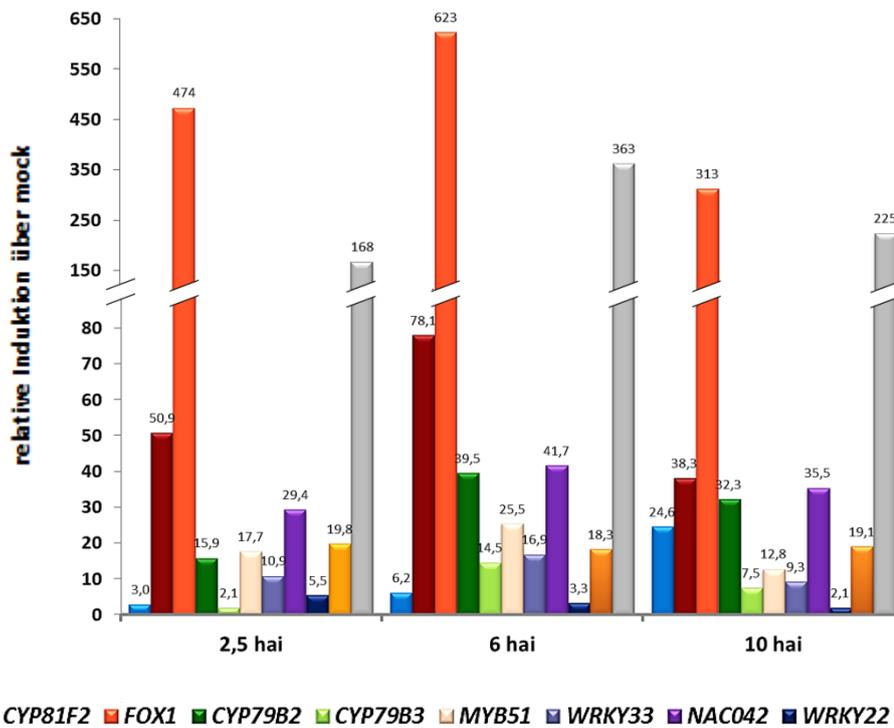


Abb. 20: **Die Infektion mit *P. parasitica* führte zu schnellen und starken Induktionen ausgewählter Markergene.**

Pflanzen wurden mit lebenden *P. parasitica* Sporen inokuliert. Mit Wurzelmaterial wurden qRT-PCR Analysen angefertigt, um in einer Zeitreihe (2,5 hpi – 10 hpi) die relative Induktion ausgewählter Markergene (siehe Text) über der mock-Referenz darstellen zu können. Die Berechnung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (Livak und Schmittgen, 2001). *UBQ5* wurde als Referenzgen verwendet.

### **Zeitreihenexperimente mit *V. longisporum* und *P. indica***

Zur Analyse des veränderten Expressionsmusters ausgewählter Gene im gesamten Wurzelgewebe dienen die Zeitpunkte 1 hpi, 5 hpi, 3 dpi und 6 dpi (Abb. 21).

Es wurde nach Zeitpunkten gesucht, an denen die Reaktion nicht ausschließlich auf eine allgemein MAMP-angefasste Antwort zurückgeht, sondern nach Möglichkeit spezifisch auf den jeweiligen Interaktionspartner. Dafür wurden die Pflanzen zum einen mit lebenden und zum anderen mit durch Hitze (121°C) abgetöteten Sporen inokuliert und mit einer *mock* behandelten Kontrolle verglichen. Die nach Applikation der abgetöteten Sporen ausgelösten Reaktionen in der Wurzel waren auf allgemeine MAMPs zurückzuführen. Eine Reaktion auf „lebende Sporen“ war im Versuch mit *V. longisporum* schon ab 1 dpi definierbar, da zu diesem Zeitpunkt die Induktion der Markergene in der Gruppe „lebende Sporen“ sehr viel stärker war als in der Gruppe „abgetötete Sporen“. Die Zeitpunkte 3 dpi und 6 dpi wurden für die zellschichtspezifische Analyse gewählt, weil hier eine rege transkriptionelle Aktivität vermutet wurde und diese zellschichtspezifisch aufzulösen, könnte interessante Neuigkeiten hervorbringen. Allerdings war der 3 dpi Zeitpunkt aus technischen Gründen nicht auswertbar.

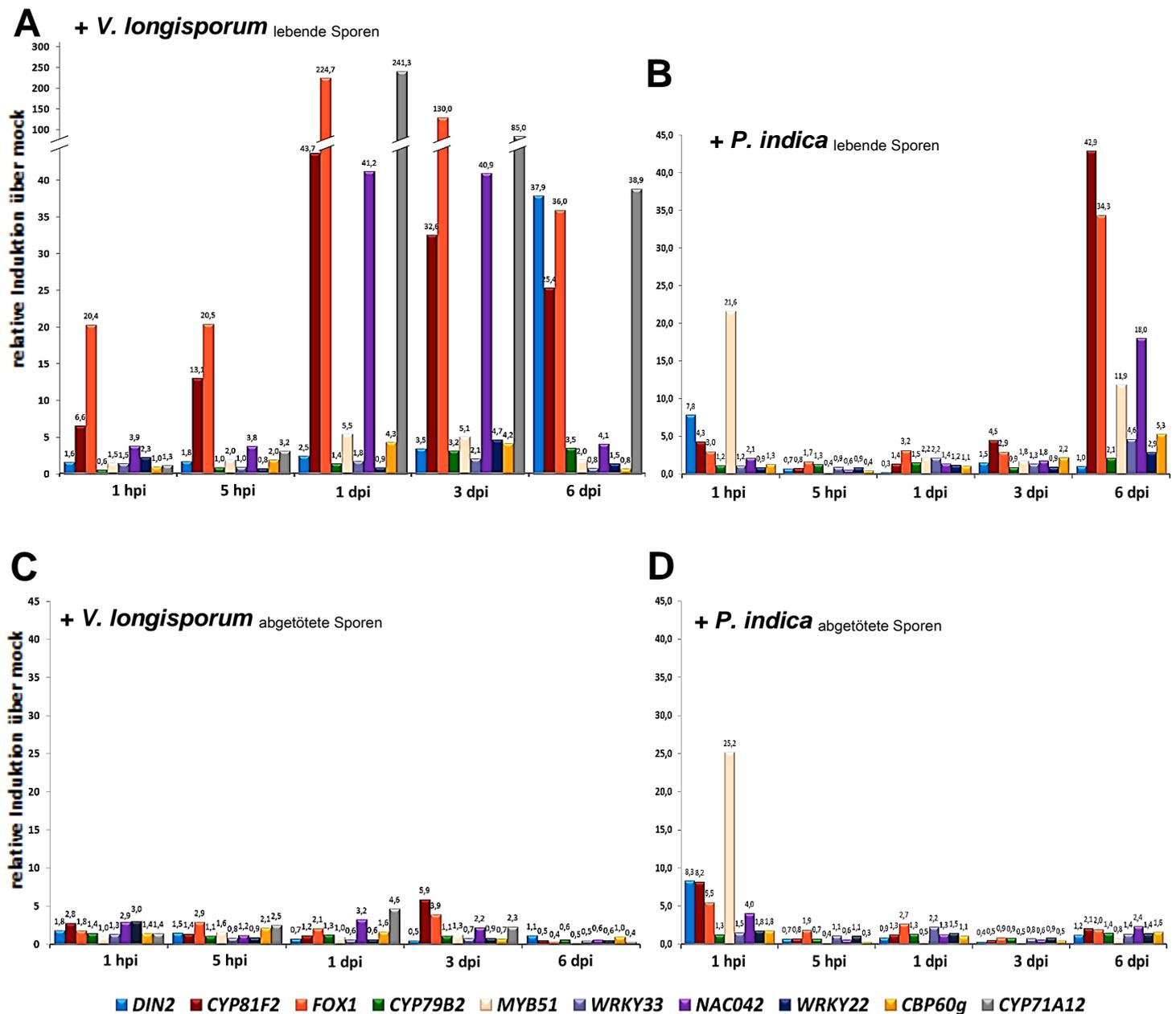


Abb. 21: **Durch *V. longisporum* und *P. indica* bedingte Geninduktionen traten zu Beginn auch nach Behandlung mit abgetöteten Sporen auf, später jedoch nur noch beim lebenden Pilz.**

Es wurden Pflanzen im sterilen *in vitro*-Infektionssystem mit lebenden *VI43* Sporen (A), abgetöteten *VI43* Sporen (C), lebenden *P. indica* Sporen (B) oder abgetöteten *P. indica* Sporen (D) inokuliert. Als Kontrolle wurden Pflanzen mit einer *mock*-Lösung behandelt. Mit Wurzelmaterial wurden qRT-PCR Analysen angefertigt, um in einer Zeitreihe (1 hpi – 6 dpi) die relative Induktion ausgewählter Markergene (siehe Text) über der *mock*-Referenz darstellen zu können. Die Berechnung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). *UBQ5* wurde als Referenzgen verwendet.

Im Versuch mit *P. indica* waren die Antworten ab 3 dpi mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den lebenden Pilz zurückzuführen, da in der Versuchsgruppe „abgetötete Sporen“ die Expression der Markergene nahezu auf *mock*-Niveau war, wohingegen in der Gruppe „lebende Sporen“ transkriptionelle Induktionen vorhanden waren. 6 dpi waren die Geninduktionen bei „lebende Sporen“ noch stärker. Anhand dieser Daten wurde der

Zeitpunkt 3 dpi ausgewählt für die erste zellschichtspezifische Analyse. Genauso gut wäre der Zeitpunkt 6 dpi geeignet für zukünftige Studien.

Somit war bestätigt, dass alle drei Mikroorganismen im Infektionssystem eine transkriptionelle Reaktion in der Wurzel auslösen können.

### 5.3 Etablierung der TRAP-Methode zur Auflösung der zellschichtspezifischen Expression nach Befall der Wurzel durch Mikroorganismen

Es wurden *Arabidopsis* Linien verwendet, in denen ein „Epitop-tag“ (FLAG) an das ribosomale Proteine L18 (RPL18) fusioniert war (Zanetti *et al.*, 2005). Eine zellschichtspezifische Expression des Fusionsproduktes wurde ermöglicht, indem das *FLAG-RPL18* Konstrukt unter die Kontrolle verschiedener zellcharakteristischer Promotoren gestellt wurde (Mustroph *et al.*, 2009). Auf diese Weise konnten Polysomen spezifisch aus einer Schicht von transgenen *Promotor:FLAG-RPL18* Linien isoliert werden und darüber hinaus die an ihnen haftende mRNA. Der Einfachheit halber wurden die mit FLAG-RPL18 transformierten Linien im Folgenden mit *p* für Promotor und anschließend dem zelltypspezifischen Gen des Promotors abgekürzt. Beispielsweise wurde *pSCR* geschrieben, anstatt Linie mit dem Konstrukt *Promotor<sub>SCR</sub>:FLAG-RPL18*. Gemäß dieser Abkürzung waren die verwendeten Linien:

Tab. 1: Zusammenstellung der verwendeten *Arabidopsis Promotor:FLAG-RPL18* Linien.

Linie	Ursprung des Promotors	charakteristische Zellpopulation	Referenz
<i>p35S</i>	35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV)	konstitutiv in nahezu allen Schichten	Mustroph <i>et al.</i> , 2009
<i>pGL2</i>	<i>GLABRA 2</i>	Rhizodermis	Mustroph <i>et al.</i> , 2009
<i>pPEP</i>	<i>ENDOPEPTIDASE</i>	Cortex	Mustroph <i>et al.</i> , 2009
<i>pSCR</i>	<i>SCARECROW</i>	Endodermis	Mustroph <i>et al.</i> , 2009
<i>pSHR</i>	<i>SHORTROOT</i>	Zentralzylinder	Mustroph <i>et al.</i> , 2009
<i>pRHS12</i>	<i>ROOT HAIR SPECIFIC 12</i>	Wurzelhaare	Diese Arbeit

Um künftig auch eine zellschichtspezifische Analyse von Wurzelhaarzellen zu ermöglichen, wurde eine *Arabidopsis* Linie mit spezifischer Expression des *FLAG-RPL18* in den Wurzelhaarzellen angefertigt (*pRHS12*; Anhang Abschnitt 8.8). Allerdings wurde diese Linie noch nicht ausreichend getestet.

Die TRAP-Methodik wurde dahingehend optimiert, dass mRNA aus mit Mikroorganismen inokulierten Wurzeln in ausreichender Qualität und Quantität erhalten werden kann, um eine RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) anzuschließen.

Folgende Veränderungen wurden am Protokoll von Zanetti *et al.* (2005) vorgenommen:

1. Die Konzentration von Cycloheximid wurde von 50 µg/ml auf 75 µg/ml erhöht (Ziel: Stabilisierung der Polysomen-Struktur während der Aufreinigung).
2. Die Konzentration von MgCl<sub>2</sub> wurde von 35 mM auf 38 mM erhöht (Ziel: zusätzliche Stabilisierung der Polysomen-Struktur während der Aufreinigung).
3. Die Inkubationszeit mit Anti-FLAG gekoppelten *beads* wurde von 2 h auf über 3 h verlängert (Ziel: vermehrte Antigen-Antikörper Bindung).
4. Die Konzentration von DTT (Dithiothreitol) wurde in den Puffern gesenkt (im PEB von 5 mM auf 4 mM und im Elutionspuffer von 5 mM auf 2 mM), da DTT den eingesetzten Anti-FLAG gekoppelten *beads* sowie dem FLAG-Peptid schaden kann laut Herstellerangaben (*Sigma-Aldrich Co.*) (Anmerkung: eine gewisse Menge DTT muss hinzugegeben werden, um ribosomale Proteine in ihrer funktionalen Form zu konservieren. Andererseits kann es die Faltung weiterer Proteine zerstören).
5. Anstatt Anti-FLAG *agarose beads* wurden Anti-FLAG *magnetic beads* verwendet (Die Isolation der *beads* ist aus technischen Gründen einfacher und zügiger bei magnetischer Separation als bei Separation durch Zentrifugation).
6. Es wurde ein zusätzlicher 6. Waschschrift in den Reinigungsprozess eingeführt (Hintergrundrauschen entsteht durch unspezifisch gebundene mRNA, d.h. mRNA, die nicht an FLAG-markierte Polysomen gebunden ist. In den ersten Vorversuchen mit TRAP wurde ein starkes Hintergrundrauschen beobachtet, da auch aus dem Wt messbar RNA isoliert werden konnte. Durch den zusätzlichen Waschschrift reduzierte sich das Hintergrundrauschen).

Im Zuge der Etablierung wurde festgestellt, dass das Hinzufügen eines RNase-Inhibitors nicht zwingend nötig ist, um die durch TRAP aufgereinigte mRNA in guter Qualität zu erhalten. Stattdessen ist es wichtiger, darauf zu achten, dass alle Puffer mit RNase-freiem Wasser angesetzt werden und dass auf RNase-freies Arbeiten während der TRAP geachtet wird. Die Intaktheit der RNA für die anschließenden Analysen sollte zwischendurch in Qualitätskontrollen überprüft werden (vgl. Empfehlungen im Protokoll 4.10).

### 5.3.1. Beurteilung von Zelltypspezifität, Promotorstärke und versuchsbedingter Beeinträchtigung der *FLAG-RPL18* Expression

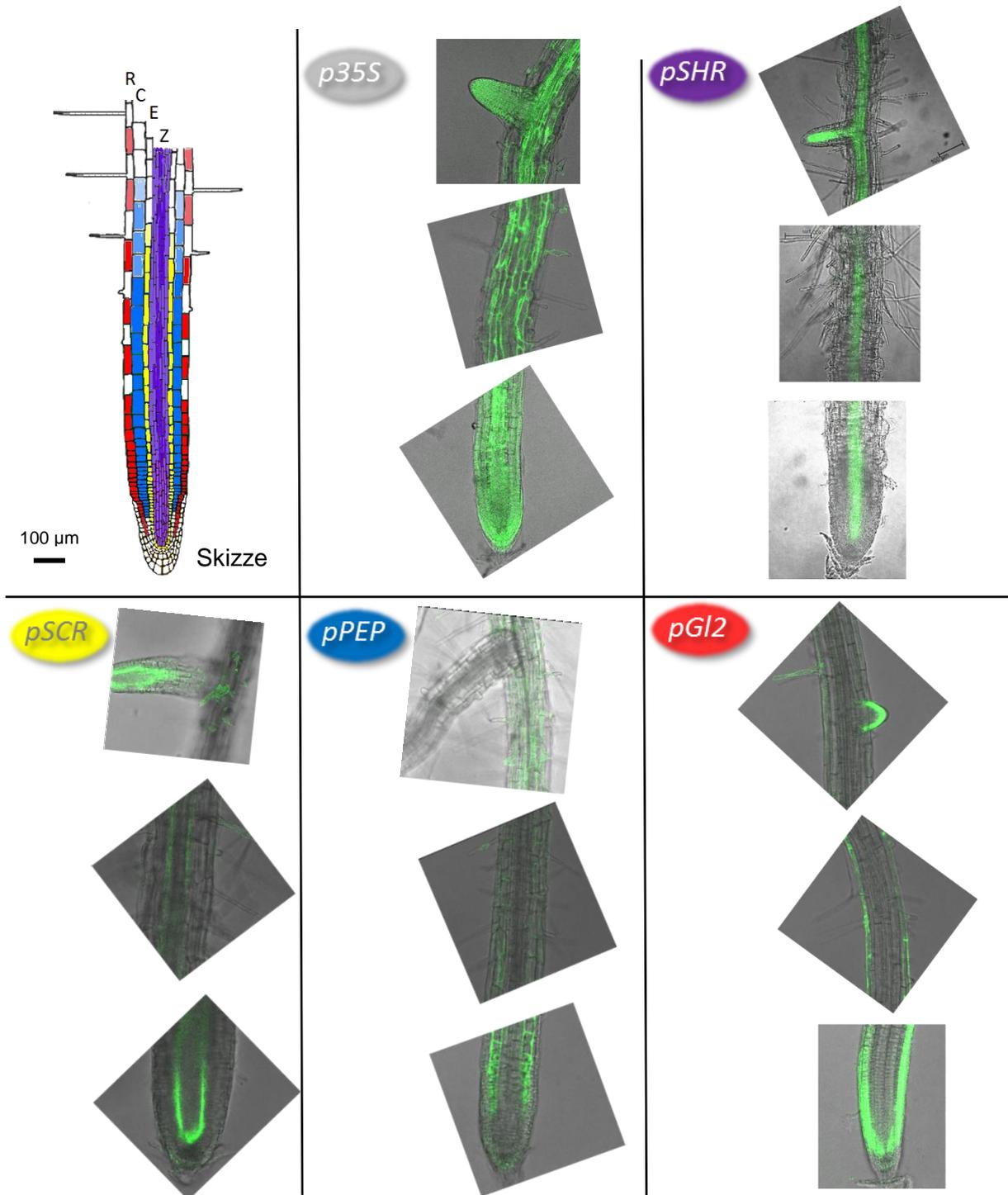


Abb. 22: Lokalisation der Promotoraktivität mittels *Promotor:FLAG-GFP-RPL18* Linien.

Gezeigt sind CLSM Aufnahmen von Wurzeln transgener *FLAG-GFP-RPL18* Reporterlinien unter der Kontrolle zelltypspezifischer Promotoren. Während das *p35S*-abhängige GFP-Signal überall in der Wurzel nachweisbar war, war das GFP-Signal in *pSHR* auf den Zentralzylinder, in *pSCR* auf die Endodermis, in *pPEP* auf den Cortex und in *pGL2* auf die Rhizodermis beschränkt. Vor allem an den Wurzelspitzen war eine Zelltypspezifität deutlich erkennbar. Die GFP-Signalstärke nahm bei den meisten Linien mit dem Wurzelverlauf nach oben hin ab.

Zunächst sollte mit Hilfe von *Promotor:FLAG-GFP-RPL18* Reporterlinien (Mustroph *et al.*, 2009) eine Lokalisation der Promotoraktivitäten erfolgen. Das GFP-Fluoreszenzsignal bestätigte eine lokal begrenzte Aktivität der verwendeten Promotoren in den transgenen Linien, denn die GFP-Fluoreszenz war in den verschiedenen Linien stets auf eine Zellschicht der Wurzel begrenzt: in *pSHR* auf den Zentralzylinder, in *pSCR* auf die Endodermis, in *pPEP* auf den Cortex und in *pGL2* auf die Rhizodermis (Abb. 22). Jedoch konnten zwischen den verwendeten Promotoren nicht nur Unterschiede in der zelltypspezifischen Aktivität beobachtet werden, sondern es ließ sich auch feststellen, dass die Aktivität der Promotoren teils von der Zonierung der Wurzel, d.h. vom Entwicklungszustand der Zellen, abhängig war: In den Wurzelspitzen von sowohl Primär- als auch Seitenwurzeln war das GFP-Signal stets am stärksten ausgeprägt. Dagegen wurde das Signal mit dem Wurzelverlauf nach oben, d.h. mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Zellen, schwächer. Als Kontrolle wurde die Linie *p35S* mit einem nahezu in allen Zelltypen konstitutiven und starken Promotor verwendet. Das GFP-Signal war bei dieser Linie in der gesamten Wurzel vorhanden, unabhängig vom Entwicklungsstand der Zellen.

Die Expression des *FLAG-RPL18* war über qRT-PCR nachweisbar, indem ein Primerpaar verwendet wurde, bei dem der eine Primer in der Sequenz des *FLAG-tag* und der andere Primer in der Sequenz des *RPL18* gebunden hat (Abb. 23 A). Die Transkriptmenge des *FLAG-RPL18*, die in der *p35S* Linie vorhanden war, wurde als 100% definiert, d.h. das ist die maximal mögliche Expression. Dementsprechend wurde die Transkriptmenge des *FLAG-RPL18*, die in den zellschichtspezifischen Linien vorhanden war, darauf relativiert. *FLAG-RPL18*-Transkripte waren je nach Linie unterschiedlich stark vertreten. Insgesamt war dies nicht nur durch Promotorstärke und Entwicklungsstadium bedingt, sondern auch durch die Anzahl Zellen, in denen die Expressionsdomäne aktiv war. Beim Vergleich der beiden Zentralzylinder-spezifischen Linien *pSHR* und *pWOL* war zwar die *FLAG-RPL18* Expression in der *pWOL*-Linie stärker, dennoch ist für die Untersuchung dieser Zellschicht die *pSHR*-Linie vorzuziehen, da der Promotor des Gens *WOL* wahrscheinlich nicht exakt Zentralzylinder-spezifisch ist (A. Mustroph, persönliche Mitteilung).

Zusätzlich wurde überprüft, inwiefern die Anwesenheit der Mikroorganismen die zelltypspezifische Expression des *FLAG-RPL18* in den verwendeten transgenen *Arabidopsis*-Linien beeinträchtigte (Abb. 23 B-D).

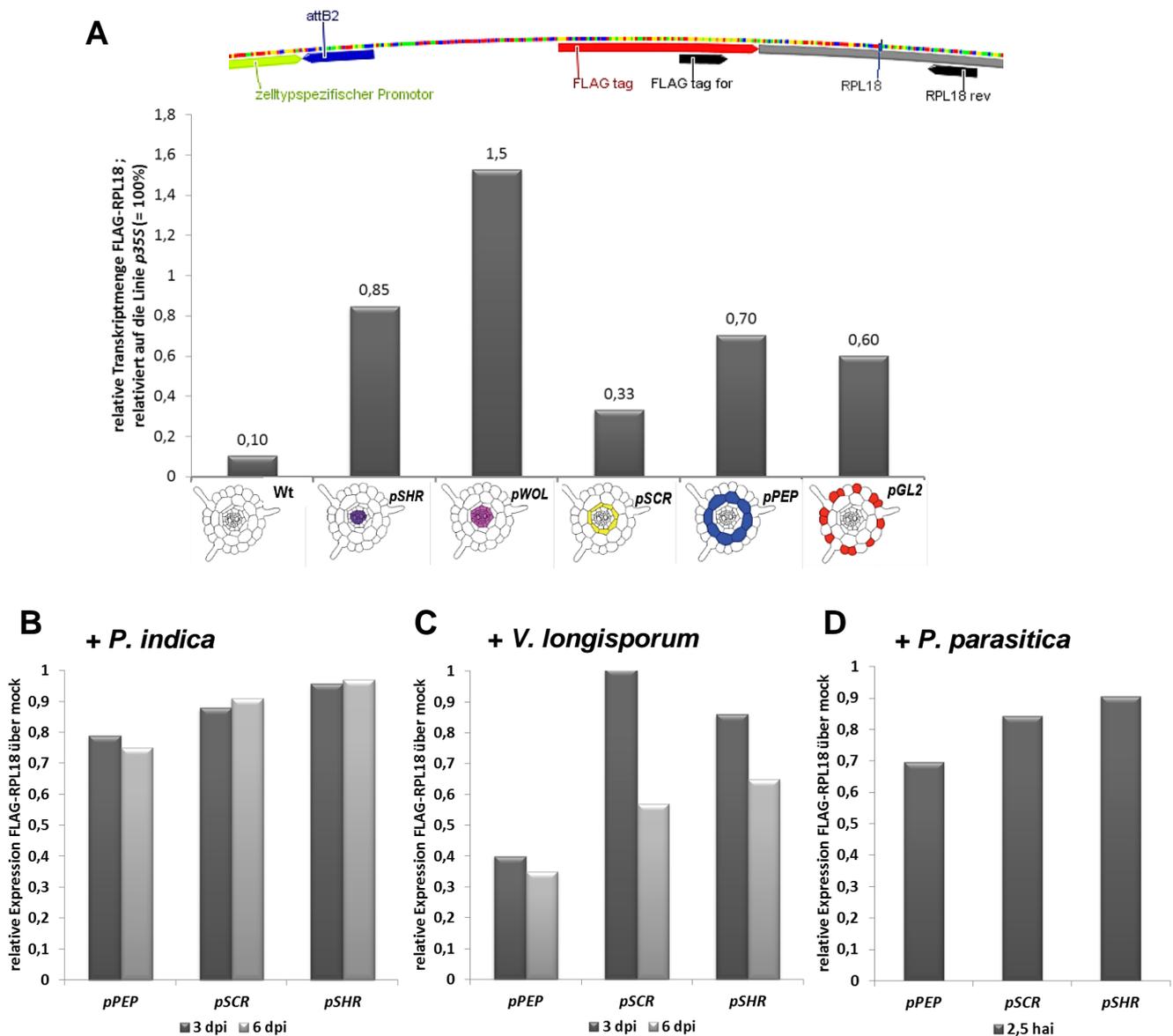


Abb. 23: Die Expression von *FLAG-RPL18* ist durch die Aktivität der zelltypspezifischen Promotoren bedingt und kann nach Inokulation mit Mikroorganismen verändert sein.

- A: In einer qRT-PCR mit den Primern FLAG-tag for (bindet auf der cDNA in der Sequenz des *FLAG-tag* Bereiches) und RPL18 rev (bindet auf der cDNA in der Sequenz des *RPL18*-Bereiches) wurde die Transkriptmenge des *FLAG-RPL18* in den transgenen Linien *p35S*, *pSHR*, *pWOL*, *pSCR*, *pPEP* sowie *pGL2* bestimmt. Als Kontrolle wurde der Wt eingesetzt (= Hintergrundrauschen). Die in der Linie *p35S* festgestellte Transkriptmenge wurde auf 100% gesetzt. Alle anderen Linien sind darauf relativierend dargestellt.
- B – D: Gesamt-RNA wurde isoliert aus Wurzeln, die mit den Mikroorganismen *P. indica* (B), *V. longisporum* (C) oder *P. parasitica* (D) inokuliert waren. Als Kontrolle dienten jeweils nicht-inokulierte Wurzeln (mock). Nachdem die RNA in cDNA umgeschrieben war, wurde in einer qRT-PCR mit den Primern FLAG-tag for und RPL18 rev die Expression von *FLAG-RPL18* in den zelltypspezifischen Linien *pPEP*, *pSCR* und *pSHR* zu verschiedenen Zeitpunkten (3 dpi, 6 dpi bzw. 2,5 hpi) bestimmt. Die *FLAG-RPL18* Expression der inokulierten Gruppe wurde auf die mock-Referenz (= 1) normiert.

Durch äußere Bedingungen kann es zu einer Beeinträchtigung der *FLAG-RPL18* Expression kommen. Beispielsweise konnte Pathogenbefall zu einer verminderten Aktivität der zelltypspezifischen Promotoren führen, wodurch weniger Transkripte des Transgens *FLAG-RPL18* zur Verfügung standen. Am deutlichsten machte sich dies in der Cortex-

spezifischen Linie *pPEP* bemerkbar, wahrscheinlich weil der Cortex in engstem Kontakt zu den Mikroorganismen stand. Dies musste bei der Dateninterpretation beachtet werden.

### 5.3.2 Immunopräzipitation von FLAG-markierten Ribosomen und Co-Immunopräzipitation von mRNA

Das ribosomale Protein L18, kurz RPL18, ist neben rRNA ein Bestandteil der großen 60S Untereinheit eukaryotischer Ribosomen. 187 Aminosäuren formen dieses Protein, das eine Molekülmasse von 20,926 kDa aufweist (The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) Database, 2016). Aus lediglich 8 Aminosäuren baut sich die an das RPL18 fusionierte FLAG-Sequenz auf (Hopp *et al.*, 1988; Einhauer und Jungbaur, 2001). Sie besitzt eine Molekülmasse von 1,012 kDa (Terpe, 2003). Dementsprechend ergibt sich für das Fusionsprodukt FLAG-RPL18 eine theoretische Gesamtmolekülmasse von etwa 22 kDa. In einem Versuch wurde Wurzelmaterial von Wt und *p35S* in einer TRAP aufgearbeitet. Währenddessen wurden von verschiedenen Zwischenstufen der Prozedur Proteinextrakte angefertigt und in eine Western-Blot Analyse eingesetzt (Abb. 24).

- I. In den Wurzel-Proteinextrakten aus der PEB (Polysome Extraction Buffer)-Suspension (vor der TRAP) konnte bei der Linie *p35S* das FLAG-RPL18 im Western-Blot detektiert werden, nicht aber beim Wt.
- II. Die Zentrifugationen und die Filtration durch das Miracloth-Filter reinigten die Probe von groben Zelltrümmern (Zellwände usw.). Der entsprechende Durchfluss (Filtrat) der *p35S* Probe enthielt FLAG-markiertes RPL18. Das Filtrat wurde weiterverarbeitet.
- III. Nach der Inkubation mit Anti-FLAG gekoppelten „*magnetic beads*“ haftete das FLAG-RPL18 an den Antikörpern, die von einem Magneten im Reaktionsgefäß gehalten wurden. Im Überstand (ungebundene Fraktion) befand sich alles, was nicht an den „*magnetic beads*“ gebunden war. In dieser Fraktion wurde kaum FLAG-RPL18 nachgewiesen. Der Anteil in dieser Fraktion ist darauf zurückzuführen, dass in der *p35S* Linie sehr viel FLAG-markiertes Protein vorlag und die eingesetzte Menge an Anti-FLAG gekoppelten *beads* nicht ausreichend war, um restlos alles FLAG-RPL18 der Probe zu binden. Bei den wesentlich schwächeren Linien mit den zelltypspezifischen Promotoren war nichts in der ungebundenen Fraktion nachweisbar, da die Antikörperbindestellen nicht alle belegt waren.
- IV. Am Ende der TRAP lag das präzipitierte FLAG-RPL18 vor (Eluat). Es konnte ein sehr starkes Signal bei der Probe der *p35S* Linie im Western-Blot registriert werden, nicht aber beim Wt.

Die Entscheidung, die *p35S* Linie für diesen Versuch zu nehmen, wurde getroffen, weil in dieser Linie genügend FLAG-RPL18 vorhanden war, um seine Aufreinigung während der TRAP anschaulich im Western-Blot darstellen zu können.

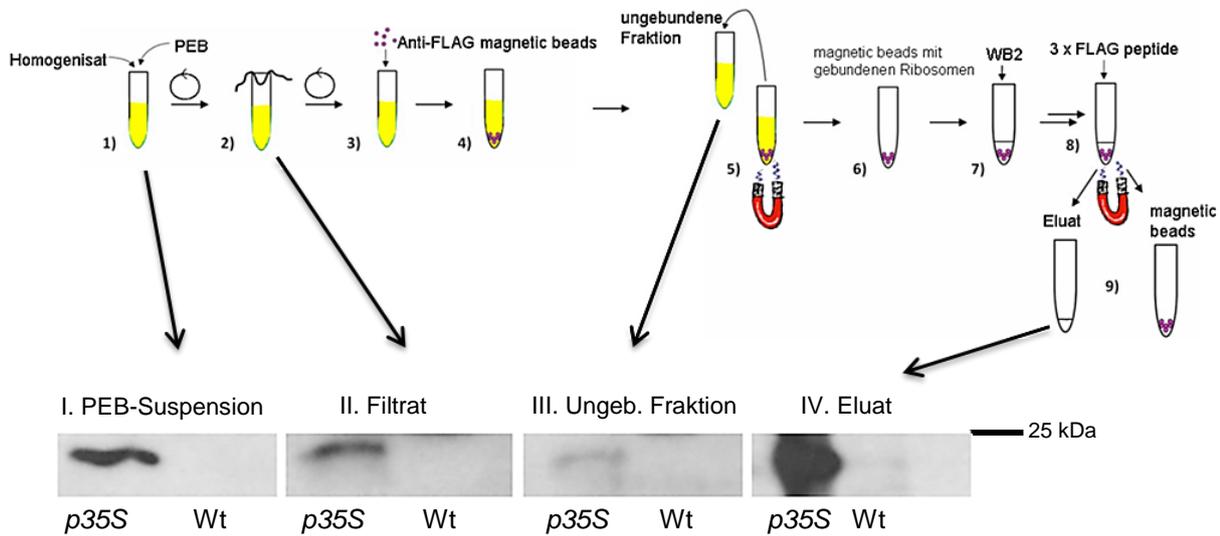


Abb. 24: **Präzipitation des des FLAG-markierten ribosomalen Proteins L18 durch die TRAP.**

Es wurde eine TRAP mit Wurzelmaterial von *p35S*- und *Wt*-Pflanzen durchgeführt. Währenddessen wurden jeweils 40  $\mu$ l von verschiedenen Zwischenstationen entnommen, daraus Proteinextrakte angefertigt und in eine Western-Blot Analyse eingesetzt. I. PEB-Suspension = Zellysate zu Beginn der Prozedur; II. Filtrat = Lösung nach Reinigung von groben Zelltrümmern; III. Ungebundene Fraktion = Überstand, der nicht an Anti-FLAG *magnetic beads* haftet; IV. Eluat = Ergebnis der Prozedur, also präzipitiertes FLAG-RPL18 Protein. Zur Detektion des FLAG-RPL18 wurden  $\alpha$ FLAG Antikörper verwendet. Die Laufhöhe des 25 kDa Markerproteins ist durch den Balken am rechten Rand gekennzeichnet (Exposition 5 min).

Das detektierte starke Signal in der Eluat-Probe der Linie *p35S* bestätigte eindeutig die Aufreinigung des Proteins mittels TRAP. Zuvor wurde das FLAG-markierte RPL18 bereits in den anderen transgenen *Arabidopsis*-Linien durch Western-Blot Analysen nachgewiesen, allerdings mit wesentlich schwächerem Signal (u.a. Fröschel, 2011).

Zusammen mit den FLAG-RPL18 markierten Ribosomen wurde die assoziierte mRNA co-immunopräzipitiert, was folgende Ergebnisse veranschaulichen:

Exemplarisch wurde mRNA mittels TRAP aus den Linien *pPEP* und *pSHR* isoliert. Auch hier wurde der *Wt* als Kontrolle verwendet (= Hintergrundrauschen). Die isolierten Transkripte wurden für die Gene *UBQ5*, *UBQ10* und *GAPDH* in einer qRT-PCR quantifiziert. Vor allem anhand von *UBQ10* war deutlich zu sehen, dass wesentlich mehr Transkripte aus *pPEP* bzw. *pSHR* isoliert wurden als aus dem *Wt*. Zusammen mit der Lokalisation der Promotoraktivitäten lässt sich sagen, dass es durch die Prozedur zur Anreicherung der mRNA eines einzelnen Typs von Zellen kommen kann unter Verwendung der transgenen Linien. Jedoch war die Verteilung der Gentranskripte in den Zellschichten nicht gleichmäßig. Aus dem Cortex konnte z.B. mehr mRNA von *GAPDH* isoliert werden als aus dem Zentralzylinder, aber weniger mRNA von *UBQ5*. Eine Analyse mit dem *Arabidopsis eFP Browser* (Winter *et al.*, 2007) kommt zu einer ähnlichen Aussage, dass z.B. mehr *GAPDH* Transkripte im Cortex vorhanden sind als im Zentralzylinder (vgl. Abb. S10), wobei jene Daten über FACS (engl.: fluorescence activated cell sorting) und anschließendem Microarray gewonnen wurden.

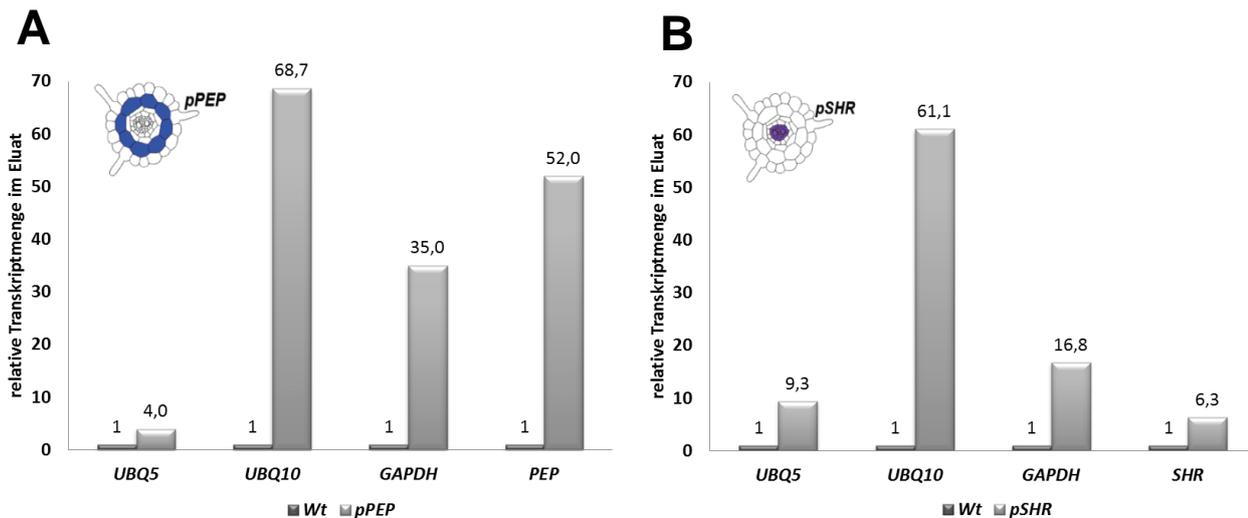


Abb. 25: **Nachweis isolierter mRNA aus den Linien *pPEP* und *pSHR*.**

Mit Wurzelmaterial von Wt, *pPEP* und *pSHR* wurde eine TRAP durchgeführt. Quantifizierung der isolierten mRNA in einer qRT-PCR Analyse. Bestimmung der Transkriptmenge der Gene *UBQ5*, *UBQ10* und *GAPDH*. Darüber hinaus wurde in der Linie *pPEP* die Transkriptmenge des zelltypspezifischen Gens *PEP* und in der Linie *pSHR* die Transkriptmenge des zelltypspezifischen Gens *SHR* bestimmt. Die Transkriptmengen in der Wt Probe wurden jeweils auf 1 gesetzt (= Hintergrundrauschen).

*Nicht mit FLAG-markierten Ribosomen assoziierte mRNA wurde nur in Spuren isoliert*

Für eine Qualitätskontrolle des TRAP-Verfahrens wurde *spike-in* RNA mit der Sequenz von GFP genutzt (Details siehe Anhang 8.14). Da GFP nicht endogen in den Pflanzen vorkommt, ist dies ein guter Marker, den man von außen den Proben hinzufügen und anschließend ohne Einflussnahme der endogenen pflanzlichen mRNA detektieren kann.

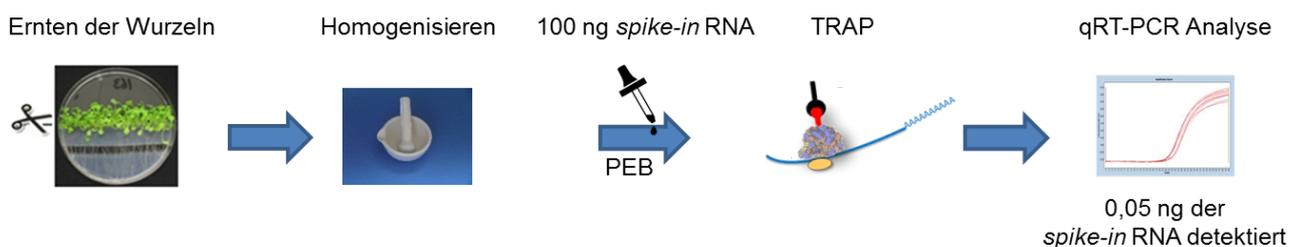


Abb. 26: **Vor der TRAP hinzugefügte *spike-in* RNA wurde durch die TRAP nur in Spuren aufgereinigt.**

Wurzelmaterial wurde geerntet, im Mörser homogenisiert und dann in Extraktionspuffer (PEB) aufgenommen. In diese Suspension wurden 100 ng einer *spike-in* RNA gegeben. Anschließend wurden FLAG-markierte Ribosomen über TRAP isoliert. Da die *spike-in* RNA exogen appliziert wurde, war sie nicht mit Ribosomen assoziiert. Im Eluat (nach der TRAP) konnten nur 0,05 ng der *spike-in* RNA nachgewiesen werden, d.h. 0,05 % der ursprünglich hinzugefügten Masse.

Außerdem ist es ein geeigneter Indikator zum Nachweis von Kontaminationen, da *spike-in* RNA nicht an FLAG-markierte Ribosomen gebunden ist und dementsprechend durch die Prozedur nicht aufgereinigt werden dürfte. 100 ng *spike-in* RNA wurde zum Extraktionspuffer (PEB) hinzu gegeben. Danach wurde die TRAP durchgeführt. Die daraus

gewonnene RNA wurde komplett in cDNA umgeschrieben und in eine qRT-PCR eingesetzt. Mit Hilfe einer Eichgeraden (Abb. S36) konnten Rückschlüsse auf die Menge an *spike-in* RNA im Eluat gezogen werden. Es wurden im Eluat nach der TRAP etwa 0,05 ng *spike-in* RNA detektiert. Das entsprach einer Kontaminationsrate durch freie RNA, die nicht an FLAG-markierten Ribosomen gebunden ist, von  $\ll 1$  %. Die TRAP-Methode ist also in dieser Hinsicht sehr rein und der größte Teil der mRNA, die in den Versuchen extrahiert wurde, war mit FLAG-RPL18 assoziiert.

Aus empirischer Erfahrung ist es empfehlenswert, mindestens 1,5 g Wurzelmaterial pro Probe in die TRAP einzusetzen, denn je mehr mRNA spezifisch isoliert werden kann, desto geringer ist im Verhältnis dazu die Menge unspezifisch isolierter mRNA (Hintergrundrauschen).

### 5.3.3 Die über TRAP aufgereinigte mRNA ist allgemein ausreichend für eine Analyse mittels RNA-Sequenzierung

Experiment-Design: Der Hersteller des NEBNext Kits (Library Preparation) gibt an, dass sich bereits aus 10 ng gesamt RNA eine Bibliothek für eine anschließende RNA-Sequenzierung herstellen lässt. Dies sollte in einem Versuch getestet werden. Von einem gesamt RNA-Extrakt des Wt wurden 15 ng, 80 ng, 100 ng bzw. 150 ng RNA eingesetzt, um damit eine cDNA-Bibliothek mit dem NEBNext-Kit herzustellen.

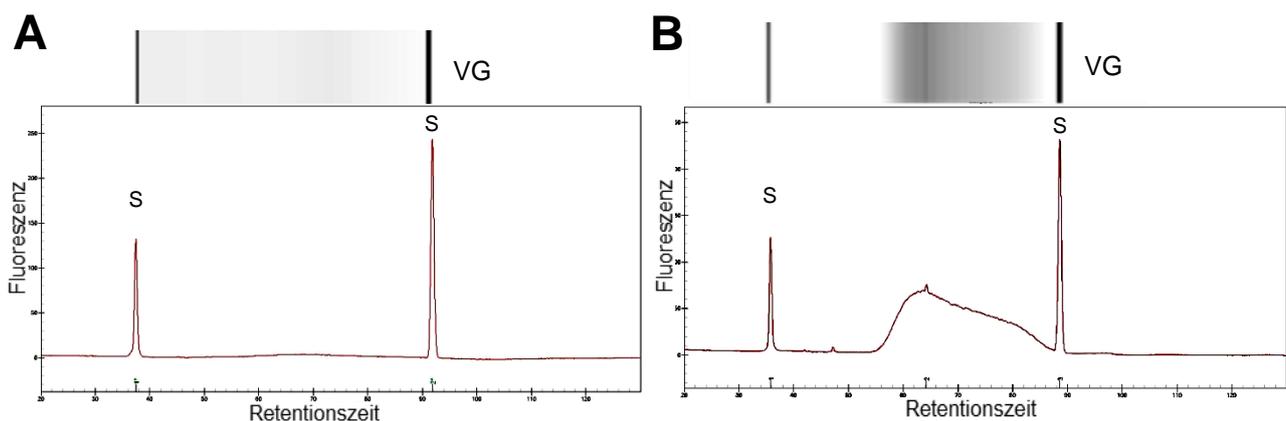


Abb. 27: **Qualitätsvergleich der aus 15 ng und 80 ng RNA hergestellten cDNA-Bibliotheken.**

Aus 15 ng bzw. 80 ng RNA-Ausgangsmaterial wurden Bibliotheken für eine RNA-Sequenzierung erstellt. Die Qualität der fertigen Bibliotheken wurde mittels DNA-Analyse (Experion™ Messgerät) bestimmt. S = Signal der enthaltenen Standards. VG = Virtuelles Gel. Graphische Darstellung: Fluoreszenz über Retentionszeit (gibt die Größenverteilung der Fragmente in der Bibliothek wieder).

A. Kein detektierbares Signal nach Anfertigung der cDNA-Bibliothek mit 15 ng RNA-Ausgangsmaterial.

B. Anfertigung der cDNA-Bibliothek mit 80 ng RNA-Ausgangsmaterial: Die Kurve zwischen den Standards deutet an, dass genügend cDNA in ausreichender Qualität vorhanden war.

Mittels DNA-Analyse (Experion™ DNA 1K Analysis) wurde die Qualität der fertigen cDNA-Bibliotheken kontrolliert (Abb. 27). Es empfiehlt sich demnach, mindestens 80 ng für die Generierung der cDNA-Bibliothek einzusetzen, da sonst die Qualität zu gering ist.

Weil bei 1,5 g Wurzelmaterial nach der TRAP mehr als 100 ng RNA vorhanden sind, kann mit dem Kit problemlos eine Bibliothek erstellt werden. Einige Optimierungen wurden an der Gebrauchsanleitung des Herstellers vorgenommen. Mit dem optimierten Protokoll (vgl. 4.10.4) ist ein TRAP-Seq (TRAP kombiniert mit RNA-Sequenzierung) leicht möglich.

### 5.3.4 Nachweis zur Zelltypspezifität der durch TRAP aufgereinigten mRNA

Zur Bestätigung, dass die isolierte mRNA auch tatsächlich aus einem Zelltyp stammte, wurden nach einem TRAP-Seq die absoluten „Reads“ (ein sequenziertes Fragment einer mRNA Spezies wird als „Read“ bezeichnet), die den Genen *OBP2* bzw. *SGP2* zugeordnet werden konnten, in den Zellschichten verglichen.

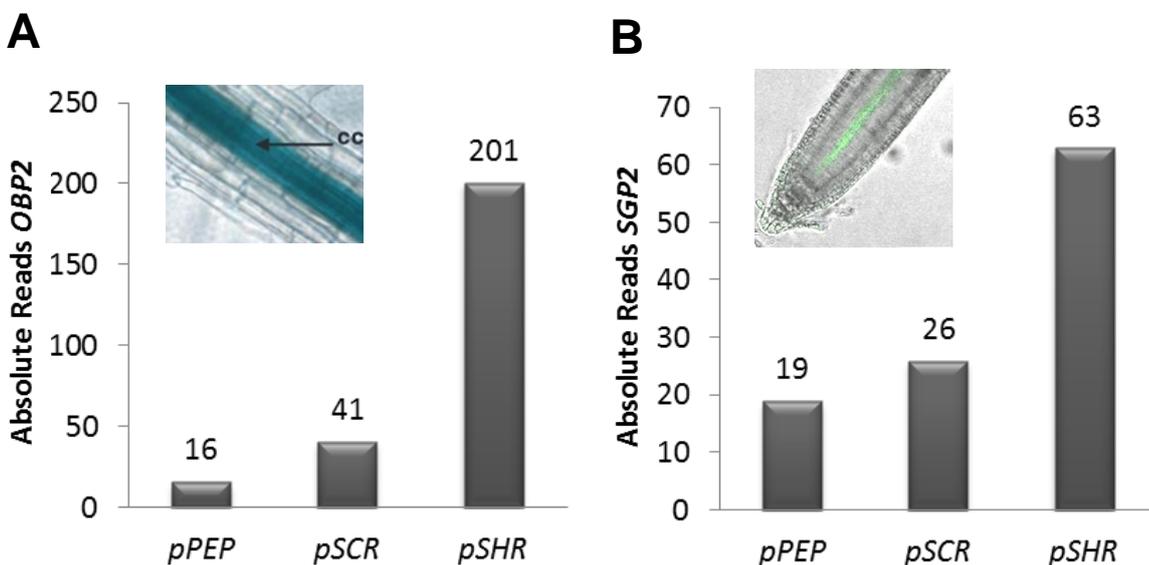


Abb. 28: Die primär im Zentralzylinder auftretende Expression von *OBP2* und *SGP2*.

Aus Wurzelmaterial der Linien *pPEP*, *pSCR* sowie *pSHR* wurde mittels TRAP zelltypspezifische mRNA isoliert. Dargestellt sind die absoluten „Reads“ aus einer anschließenden RNA-Sequenzierung.

A. Absolute „Reads“ des Gens *OBP2* (AT1G07640). Kleines Bild: Mit der *promOBP2:GUS* Reporterlinie wurde visualisierend dargestellt, dass der Promotor von *OBP2* im Zentralzylinder (CC) aktiv ist. Gezeigt ist ein Wurzelsegment nach GUS-Färbung (Abbildung aus: Skirycz *et al.*, 2006).

B. Absolute „Reads“ des Gens *SGP2* (AT3G21700). Kleines Bild: Mit der *promSGP2:GFP* Reporterlinie wurde visualisierend dargestellt, dass der Promotor von *SGP2* im Zentralzylinder aktiv ist. Gezeigt ist die Wurzelspitze mit dem stärksten GFP-Signal im Zentralzylinder (CLSM-Aufnahme).

Die meisten „Reads“ von sowohl *OBP2* als auch *SGP2* waren in der Probe der Zentralzylinder-spezifischen Linie *pSHR* vorhanden. Zusätzlich konnte mit Reporterlinien die stärkste Aktivität beider Gene im Zentralzylinder der Wurzel lokalisiert werden, denn die Linie *promSGP2:GFP* hatte das stärkste Fluoreszenzsignal im Zentralzylinder und Skiryecz *et al.* (2006) beobachteten die stärkste GUS Färbung in der *promOBP2:GUS* Reporterlinie ebenfalls dort.

### 5.3.5 Nach Inokulation mit Mikroorganismen zeigte das Translatom Unterschiede zum Transkriptom

Der nahezu konstitutive 35S-Promotor sorgt für eine sehr starke *FLAG-RPL18* Expression in den Wurzeln der *p35S* Pflanzen (vgl. Abb. 22). Theoretisch kann man aus den *p35S* Pflanzen über TRAP selektiv alle mRNA-Moleküle aus der Wurzel isolieren, die mit Ribosomen assoziiert sind, also sich gerade in der Translationsphase befinden.

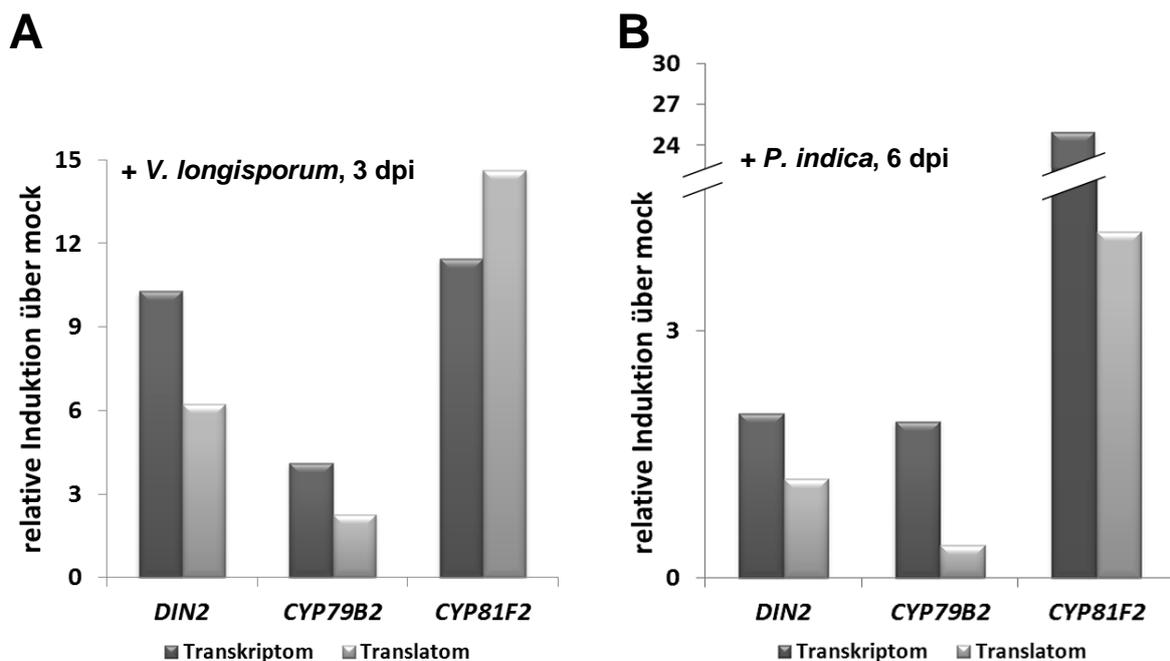


Abb. 29: **Vergleich von Induktionswerten in Translatom und Transkriptom.**

Vergleich der Induktionswerte über mock-Referenz für *DIN2*, *CYP79B2* und *CYP81F2* zu den Zeitpunkten 3 dpi mit *V. longisporum* (A) und 6 dpi mit *P. indica* (B). Ermittelt in qRT-PCR Analysen. Translatom = Mittels TRAP isolierte mRNA aus *p35S* Pflanzenwurzeln (beinhaltet alle mRNA, die mit FLAG-markierten Ribosomen assoziiert war). Transkriptom = gesamt RNA-Extrakt aus *p35S* Pflanzenwurzeln (beinhaltet alle RNA, unabhängig vom Translationsstatus). Die Berechnung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). *UBQ5* wurde als Referenzgen verwendet.

In einem Versuch wurden *p35S* Pflanzen mit *V. longisporum* infiziert. 3 dpi wurde mRNA aus Wurzeln isoliert und zwar zum einen über TRAP (Translatom) und zum anderen über einen gesamt RNA-Extrakt (Transkriptom). Dasselbe wurde in einem anderen Versuch

6 dpi mit *P. indica* durchgeführt. Mittels qRT-PCR wurden die relativen Induktionswerte für drei Gene über der mock-Referenz im Translatom und Transkriptom bestimmt (Abb. 29). Bei *DIN2*, *CYP79B2* und *CYP81F2* waren die Induktionswerte, die man anhand des Translatoms ermitteln konnte, stets anders als die aus dem Transkriptom. Im Versuch mit *P. indica* waren die Induktionswerte von *DIN2*, *CYP79B2* sowie *CYP81F2* im Translatom geringer als im Transkriptom. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei *DIN2* sowie *CYP79B2* im Versuch mit *V. longisporum* gemacht. Dagegen war 3 dpi mit *V. longisporum* ein leicht höherer Induktionswert bei *CYP81F2* in der Translatom Probe ermittelt worden.

Ergebnisse, die man aus dem Translatom erhält, stimmen also nicht unbedingt mit denen überein, die man aus dem Transkriptom ableiten kann (vgl. auch Reynoso *et al.*, 2013b). Das liegt vor allem daran, dass bei Transkriptom-basierten Methoden nicht unterschieden werden kann zwischen mRNA, die gerade aktiv translatiert wird und mRNA, die inaktiviert vorliegt (zur Übersicht siehe Bailey-Serres *et al.*, 2009).

## 5.4 Zellschichtspezifische Genexpression in der *Arabidopsis*-Wurzel während Interaktionen mit Bodenorganismen

### *Kontrolle der erfolgreichen Inokulation über Induktion von Markergenen*

Finanziell ist das TRAP-Seq ein teures Verfahren und Vortests sind unbedingt zu empfehlen. Damit kann sichergestellt werden, dass differentielle Genexpressionen vorhanden sind.

Vom Wurzelmaterial jeder Probe wurde ein Teil abgenommen, der zunächst für eine Untersuchung an der gesamten Wurzel, d.h. ohne Unterscheidung der Zellschichten, verwendet wurde. Der Rest der Proben wurde zwischengelagert. Abb. 30 zeigt relative Induktionen von Markergenen bezogen auf die Kontrolle (mock) in der gesamten Wurzel. 6 dpi mit *V. longisporum* lagen *DIN2*, *CYP81F2* sowie *NIT4* induziert vor. *NIT4* codiert für eine Nitrilase (genauer:  $\beta$ -Cyano-L-alanine Hydratase/Nitrilase) und wurde in den Microarray-Experimenten von Iven (2009) als stark *VI43*-induziert charakterisiert. Darum ist *NIT4* ein geeigneter Indikator, dessen Induktion auf eine erfolgreiche *V. longisporum* Infektion hinweist. 3 dpi mit *P. indica* lagen *MYB51*, *CBP60g* sowie *CYP81F2* induziert vor. 2,5 hpi mit *P. parasitica* waren die Gene *DIN2*, *CYP81F2* sowie *MYB51* induziert.

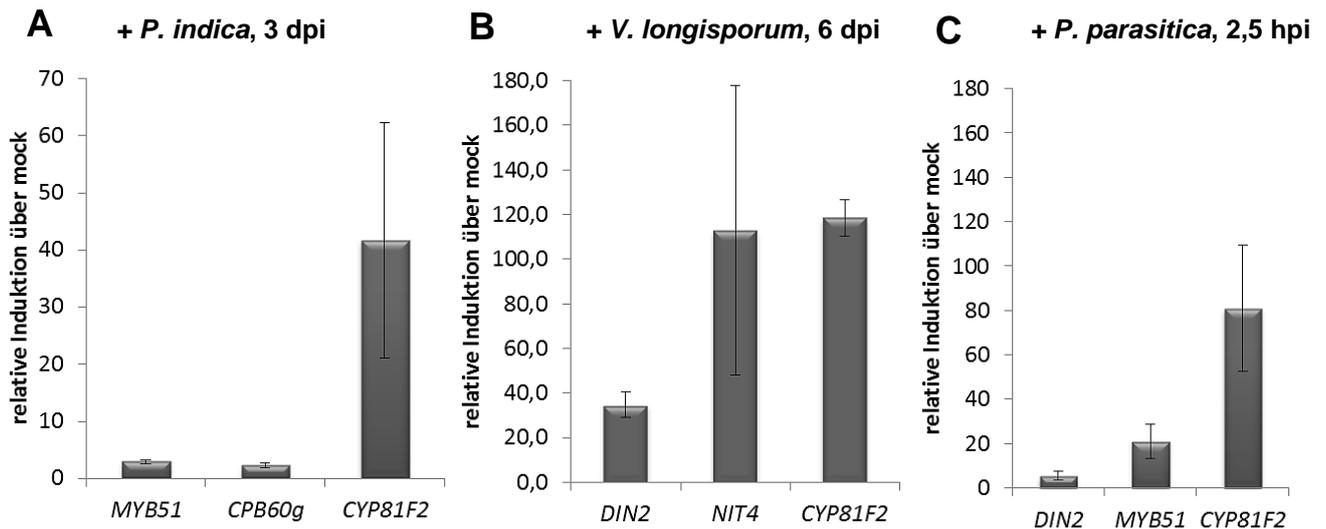


Abb. 30: **Kontrolle der erfolgreichen Inokulation durch Analyse induzierter Markergene.**

qRT-PCR Analyse zur Induktion von angegebenen Markergenen in der Wurzel nach Inokulation mit *P. indica* (A), *V. longisporum* (B) sowie *P. parasitica* (C). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus je 3 biologischen Replikaten. Berechnung der relativen Induktionswerte über die Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak und Schmittgen, 2001). *UBQ5* wurde als Referenzgen verwendet.

Nachdem anhand der Induktion der Markergene festgestellt worden war, dass in jedem Versuch eine erfolgreiche Interaktion zustande kam, konnte jeweils der restliche Teil der Proben für die methodische Weiterverarbeitung mittels TRAP-Seq verwendet werden.

#### Erklärung des Prinzips zur Verrechnung und Darstellung der nachfolgenden Daten

Die etablierte und evaluierte TRAP-Seq-Methode konnte nun angewendet werden, um Untersuchungen der differentiellen Genexpression in jeder der vier Haupt-Zellschichten der Wurzel im primären Zustand (Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder) vorzunehmen. Um der Frage nachgehen zu können, wie jede Zellschicht für sich betrachtet auf einen Bodenorganismus reagiert, wurde die TRAP-Seq Methode mit den etablierten sterilen *in vitro*-Infektionssystemen kombiniert, was fortan als Infektions-TRAP-Seq (Inf-TRAP-Seq) bezeichnet wird.

Bevor jedoch ins Detail gegangen wird, soll anhand eines Beispiels erklärt werden, wie die Werte für die Abbildungen dieses Kapitels errechnet wurden:

Die Daten der RNA-Sequenzierung enthalten viele Millionen „Reads“. Durch den Abgleich auf ein Referenzgenom wird bioinformatisch jedes einzelne „Read“ einem Gen zugeordnet. Sieben Gene, die nicht signifikant durch die Infektion beeinflusst wurden, wurden als Referenzgene ausgewählt (siehe Anhang 8.2). Aus den absoluten „Reads“ der

sieben Referenzgene wurde die Summe gebildet ( $\Sigma$ ). Anschließend wurde für jedes zu untersuchende Gen folgender Quotient gebildet:

$$(\text{absolute Reads}_{\text{Gen}} / \Sigma \text{ absolute Reads}_{\text{Referenzgene}}) * 1000.$$

Um die Verständlichkeit zu erleichtern, wurde der Quotient definiert als: Transkriptmenge<sub>Gen</sub> pro 1000 Referenzgentranskripte. Anhand des Wertes wurde auch die relative Induktion der zu untersuchenden Gene errechnet (Vergleich infiziert / mock-Kontrollbehandlung). Jede Graphik enthält zwei Skalen (links: relative Induktion bezogen auf die mock-Behandlung; rechts: Transkriptmenge<sub>Gen</sub> / 1000 Referenzgentranskripte).

Als Beispiel dient Abb. 31 für das Gen *bZIP11*. Die meisten Transkripte des Gens waren in Rhizodermis und Zentralzylinder vorhanden, wohingegen im Cortex wesentlich weniger Transkripte detektiert worden waren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Weiste *et al.* (accepted) mit *Promotor<sub>bZIP11</sub>:bZIP11-GFP* Reporterlinien eine deutliche Expression in Rhizodermis, Endodermis und Zentralzylinder zeigen, dagegen war im Cortex keine Reporteraktivität detektierbar.

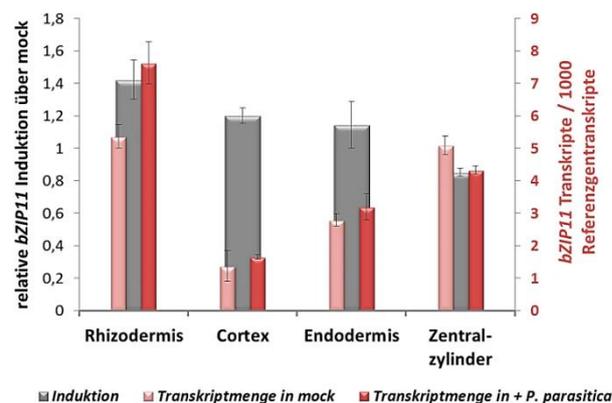


Abb. 31: Exemplarische Erläuterung zur Darstellung der RNA-Seq Daten am Beispiel von *bZIP11*.

Zur Erklärung wurde das Gen *bZIP11* während der Behandlung mit *P. parasitica* (2,5 hpi) ausgewählt. Nach dem Inf-TRAP-Seq können die transkriptionellen Veränderungen der Genexpression für die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder getrennt betrachtet werden. Über die linke Achse und die grauen Balken wird die Stärke der differentiellen Genexpression angegeben (relative Induktion über mock-Referenz). Über die rechte Achse und die roten Balken erfährt man etwas darüber, wie viele Transkripte des zu untersuchenden Gens in den mock behandelten Proben (helles Rot) und den infizierten Proben (dunkles Rot) vorlagen. Demnach waren im nicht-infizierten Zustand die meisten *bZIP11* Transkripte (Transkripte in mock) in Zentralzylinder und Rhizodermis vorhanden. Durch die Infektion änderte sich in allen Zellschichten die Menge an Transkripten kaum (Transkriptmenge in + *P. parasitica*). Als Parameter der Veränderung zwischen infiziert und mock wurde die Induktion errechnet. Werte über 1 bedeuten induziert, Werte kleiner 1 bedeuten reprimiert. Im Text findet sich die Beschreibung zur Berechnung der Werte. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 2).

Anhand von empirischen Daten wurden Markergene identifiziert, deren Transkript-Anreicherung charakteristisch ist für eine Zellschicht (Abb. S1; in Zusammenarbeit mit A. Mustroph). Ein erfolgreiches TRAP-Verfahren wurde angezeigt, wenn die Transkripte

dieser Markergene in der entsprechenden Schicht die höchst angereicherten waren und dagegen in den Proben der anderen Schichten kaum vertreten waren.

### 5.4.1 Auflösung der zelltypspezifischen Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Infektion mit *P. parasitica*

Mit *P. parasitica* wurde ein Oomycet verwendet, der der Pflanze sehr heftig und schnell Schaden zufügt. Konfrontiert mit dieser Lebensweise des Pathogens findet in der Wurzel eine starke differentielle Genexpression statt, was bereits in den Versuchen an der gesamten Wurzel ersichtlich war. Somit eignete sich die Infektion mit *P. parasitica* gut, um die Darstellung der zellschichtspezifischen Reaktionen zu beginnen.

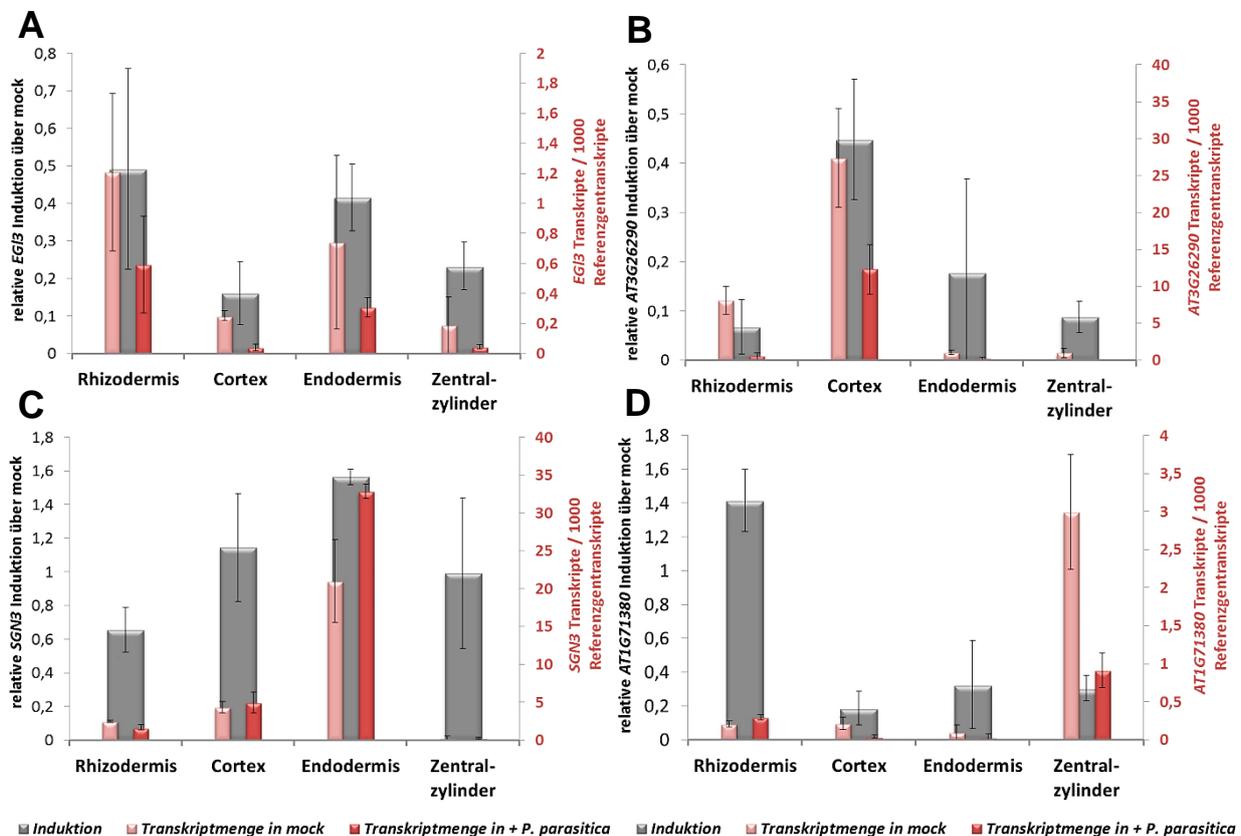


Abb. 32: Im Inf-TRAP-Seq Experiment mit *P. parasitica* wurden für jede Zellschicht Marker-Transkripte spezifisch aufgereinigt.

Für jede Zellschicht wurden spezifische Markergene ausgewählt. Anhand ihrer mRNA konnte bestätigt werden, dass über die TRAP zelltypspezifische mRNA isoliert worden ist. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 2).

A: *EGL3* (*ENHANCER OF GLABRA 3*) als Markergen für die Rhizodermis.

B: *AT3G26290* (*CYP71B26*) als Markergen für den Cortex.

C: *SGN3* (*GSO1*) als Markergen für die Endodermis. (Induktion in der Endodermis mit  $p\text{Adjust} > 0,05$ )

D: *AT1G71380* (*CEL3*) als Markergen für den Zentralzylinder.

Die Analyse von Markergen-Transkripten bestätigte eine zellschichtspezifische mRNA-Aufreinigung, wie aus Abb. 32 und Abb. S2 hervorgeht.

### 5.4.1.2 Eine massive expressionelle Reaktion zeigte sich in allen Zellschichten der *P. parasitica* infizierten Wurzel

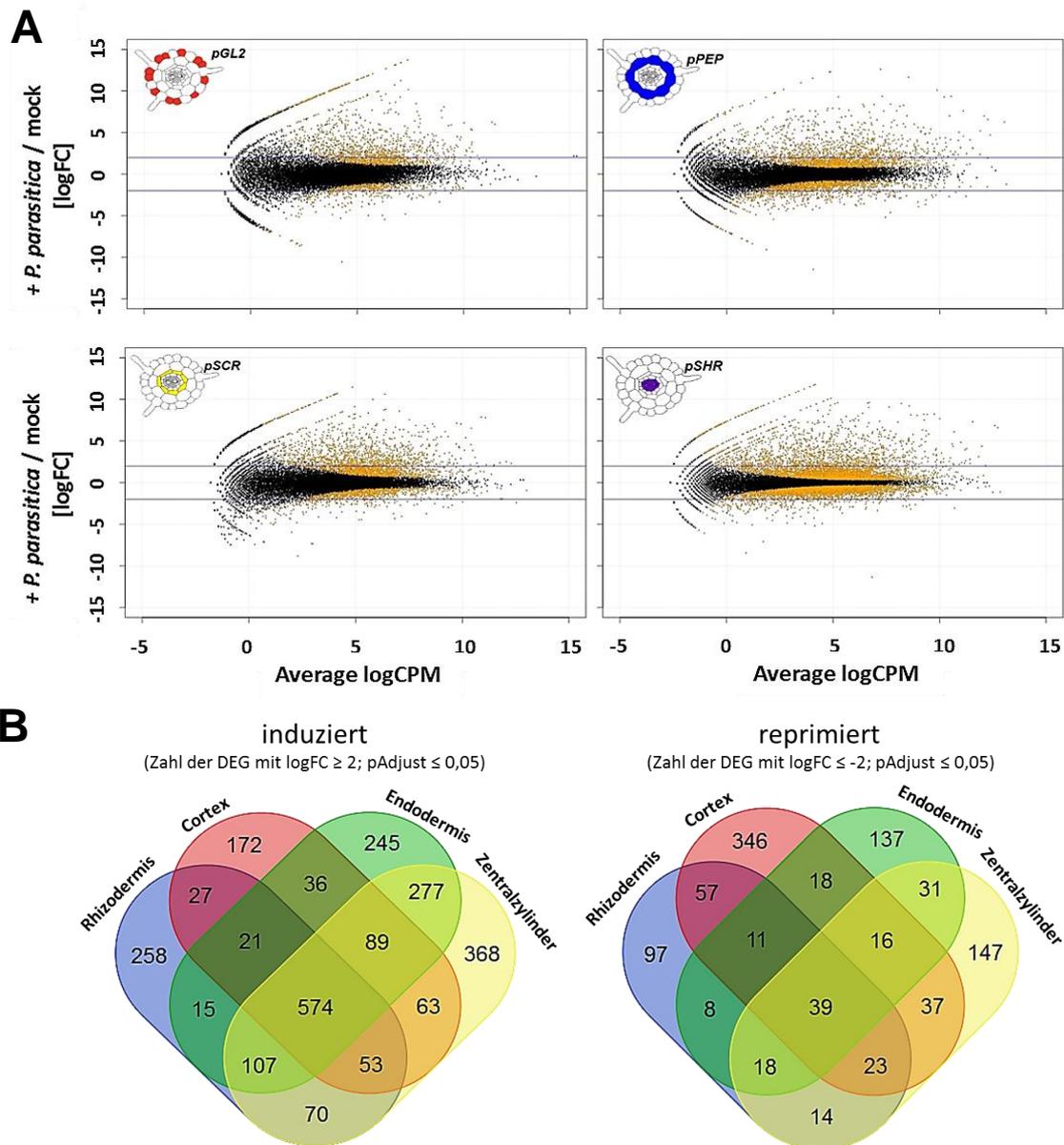


Abb. 33: **Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression in *smear plots* und Venn-Diagrammen; 2,5 hpi mit *P. Parasitica*.**

A: Der Bioconductor *edgeR smear plot* zeigt signifikant differentiell exprimierte Gene (orange) mit einem  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$  (BH-Methode). Bei schwarz markierten Genen liegt keine differentielle Genexpression vor. Das Ergebnis ist für jede der verwendeten zelltypspezifischen Linien (*pGL2*, *pPEP*, *pSCR*, *pSHR*) einzeln abgebildet. Die differentiell exprimierten Gene während der *P. parasitica* Infektion sind als  $\logFC$  (Fold Change) über mock angegeben.  $\logFC$  Werte  $> 0$  entsprechen einer Induktion,  $\logFC$  Werte  $< 0$  einer Repression. Die beiden horizontalen Linien markieren einen  $\logFC = 2$  bzw.  $\logFC = -2$ . Auf der x-Achse ist der Average logCPM (Counts per Million) als Parameter für die absolute Expressionsstärke angegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm R studio<sup>®</sup> gestaltet (<plotSmear>).

B: Für die Erstellung der Venn-Diagramme wurden differentiell exprimierte Gene mit  $\logFC \geq 2$  (induziert) bzw.  $\logFC \leq -2$  (reprimiert) ausgewählt. Die Zellschichten sind farblich markiert: blau = Rhizodermis, rot = Cortex, grün = Endodermis, gelb = Zentralzylinder. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Zellschichten: In Schnittmengen ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene angegeben, die in zwei oder mehr Zellschichten gefunden wurden. Die Anzahl an Genen, die spezifisch in einer Zellschicht induziert bzw. reprimiert wurden, ist in der Menge zu finden, die sich mit keiner anderen schneidet.

Differentiell exprimierte Gene (DEG) wurden genomweit mit *edgeR* ausgewertet. Es wurden *smear plots* angefertigt (Abb. 33 A), anhand derer man die Menge an differentiell exprimierten Genen übersichtlich darstellen konnte. Während alle schwarzen Punkte eine durch die Behandlung unveränderte Genexpression symbolisieren, stehen farbig markierte Punkte für DEG. Demzufolge führte die Infektion mit *P. parasitica* zu einer starken expressionellen Reaktion in allen Zellschichten.

Alle differentiell exprimierten Gene in den Zellschichten mit  $p\text{Adjust} \leq 0,05$  (BH Methode) und  $\log\text{FC} \geq 2$  bzw.  $\log\text{FC} \leq -2$  wurden in Venn-Diagrammen zusammengefasst (Abb. 33 B). Auf diese Weise wurden expressionelle Reaktionen der Wurzelzellschichten miteinander verglichen. Die Anzahl der Gene, deren Expression in zwei oder mehr Zellschichten verändert war, ist in Schnittmengen gekennzeichnet. Entsprechend war die Anzahl an DEG in der Fläche, die sich mit keiner anderen schneidet, zelltypspezifisch verändert. Neben 574 Genen, die in allen vier Zellschichten induziert wurden, gab es zahlreiche Gene, die spezifisch in einer Zellschicht induziert wurden: 258 spezifisch in Rhizodermis, 172 spezifisch in Cortex, 245 spezifisch in Endodermis und 368 spezifisch in Zentralzylinder. Bei den reprimierten Genen gab es sogar nur eine Überlappung von 39 Genen in allen vier Zellschichten und viel mehr spezifische Reaktionen. Bereits aus dieser Übersicht geht klar hervor, dass jede Zellschicht individuelle Besonderheiten während der Abwehr des Pathogens *P. parasitica* besitzt.

#### **5.4.1.3 Zellschichtspezifische Unterschiede in der Expression von Genen des Tryptophan-abhängigen Sekundärmetabolismus**

Bei der Untersuchung der Wurzel als „gesamtes“ Organ wurde bereits festgestellt, dass die für die Synthese von Trp-abhängigen Sekundärmetaboliten benötigten Gene transkriptionell induziert wurden als Reaktion auf *P. parasitica*. Als Beispiel für zellschichtspezifische Unterschiede expressioneller Reaktionen auf Bodenorganismen wurde nun die Induktion dieser Gene detailliert aufgelöst.

*Die Expression von CYP79B2 wurde vor allem in äußeren Schichten aktiviert, die von CYP79B3 dagegen vor allem im Zentralzylinder*

Dieses Ergebnis lässt eine differentielle Beteiligung der beiden Isoenzyme an der Umwandlung von Trp zu IAOx vermuten.

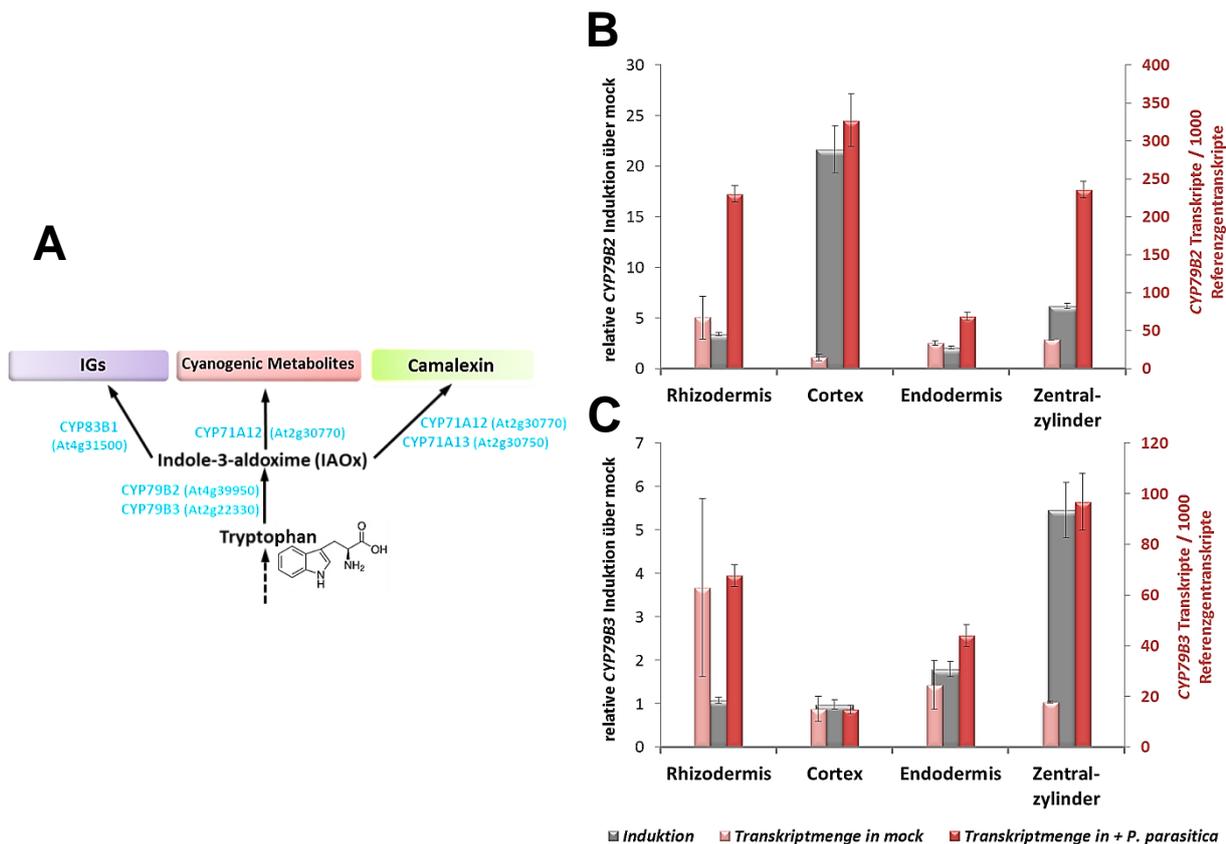


Abb. 34: **Zellschichtspezifische Induktion von *CYP79B2* und *CYP79B3*.**

Das Schema (A) zeigt den Platz der beiden Isoenzyme *CYP79B2* und *CYP79B3* in der Biosynthese Trp-abhängiger Sekundärmetaboliten. Die expressionellen Veränderungen der entsprechenden Gene sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) angegeben (B, C). Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 2). Induktionswerte: pAdjust ≤ 0,05 (BH-Methode).

*Die Expression von Genen der Biosynthese von ICN-Derivaten wurde verstärkt in den äußeren Zellschichten induziert*

ICN-Derivate (evtl. cyanogen) sind Sekundärmetaboliten mit einer Beteiligung an der Pathogenabwehr (Rajniak *et al.*, 2015). Gene des zugrunde liegenden Biosyntheseweges wurden in Abb. 35 eingeordnet. Unter mock-Bedingungen lagen in allen Zellschichten fast keine Transkripte der drei Gene *CYP71A12*, *FOX1* und *CYP82C2* vor. Durch die Infektion mit *P. parasitica* wurden die drei Gene sehr stark induziert, wobei die meisten mRNA-Moleküle dieser Gene in den äußeren Schichten (Rhizodermis und Cortex) vorhanden waren. Die Verteilung der *GGP1* Transkripte über die Zellschichten war relativ gleichmäßig (Abb. S3).

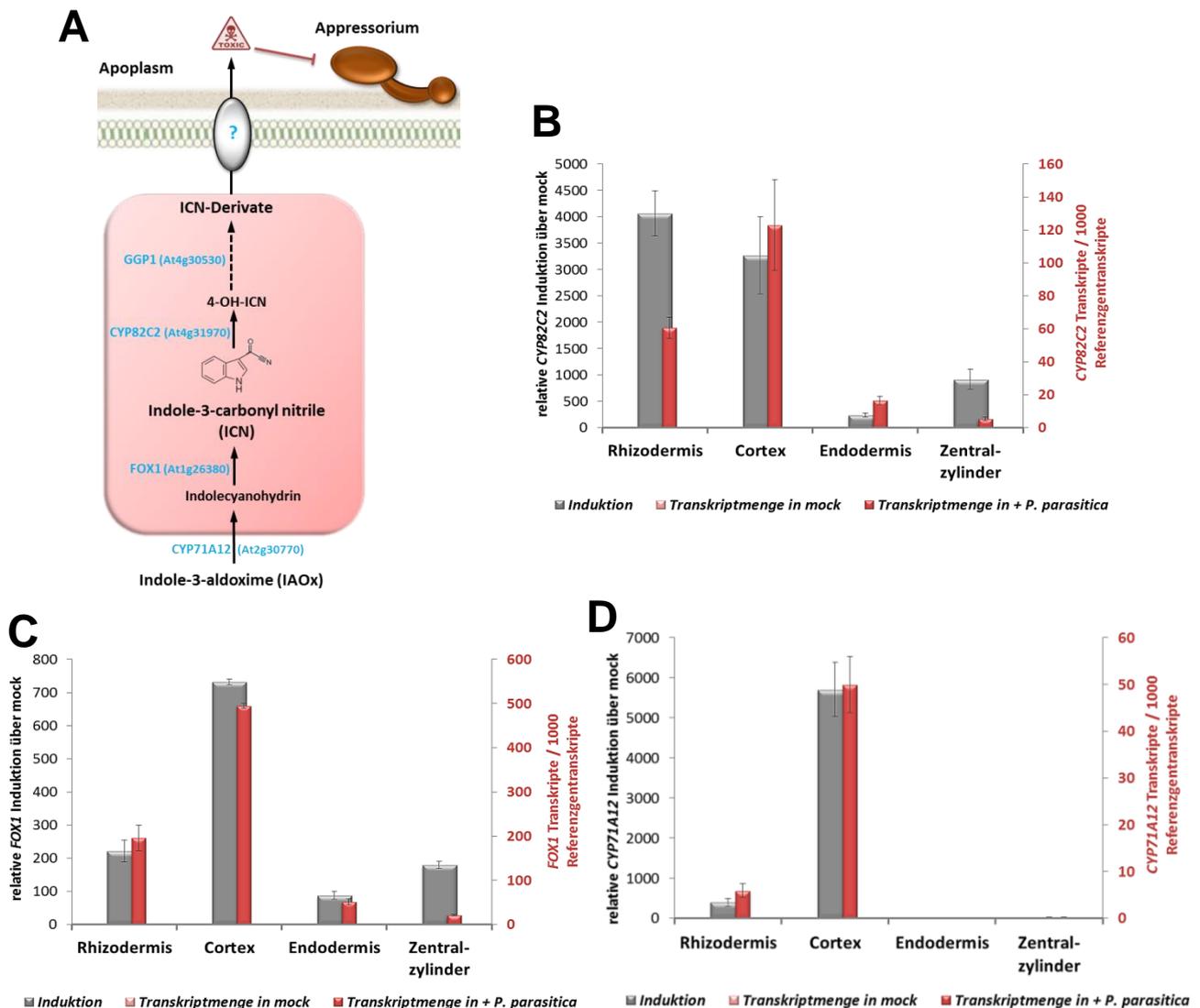


Abb. 35: **Induktion von Genen der Biosynthese von ICN-Derivaten im zelltypspezifischen Vergleich.** Das Schema (A) zeigt den Biosyntheseweg, der zu ICN-Derivaten führt, mit katalytischen Enzymen (blau). Die expressionellen Veränderungen dafür codierender Gene sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) angegeben (B, C, D). Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 2$ ). Induktionswerte für Rhizodermis und Cortex:  $p\text{Adjust} \leq 0,05$  (BH-Methode).

*Gene der Camalexin-Biosynthese wurden bevorzugt in den äußeren Zellschichten exprimiert*

Camalexin ist in *Arabidopsis* ein sehr wichtiges Phytoalexin (Glawischnig, 2007). Die Transkripte der meisten Genen, die für die Camalexin-Biosynthese wichtig sind, waren während der Infektion überwiegend in den äußeren Zellschichten vorhanden, wie Abb. 36 mit ein paar Beispielen darstellt (*CYP71A12* wurde bereits in Abb. 35 vorgestellt). Bei *WRKY33* war dieselbe Tendenz festzustellen (Abb. S3).

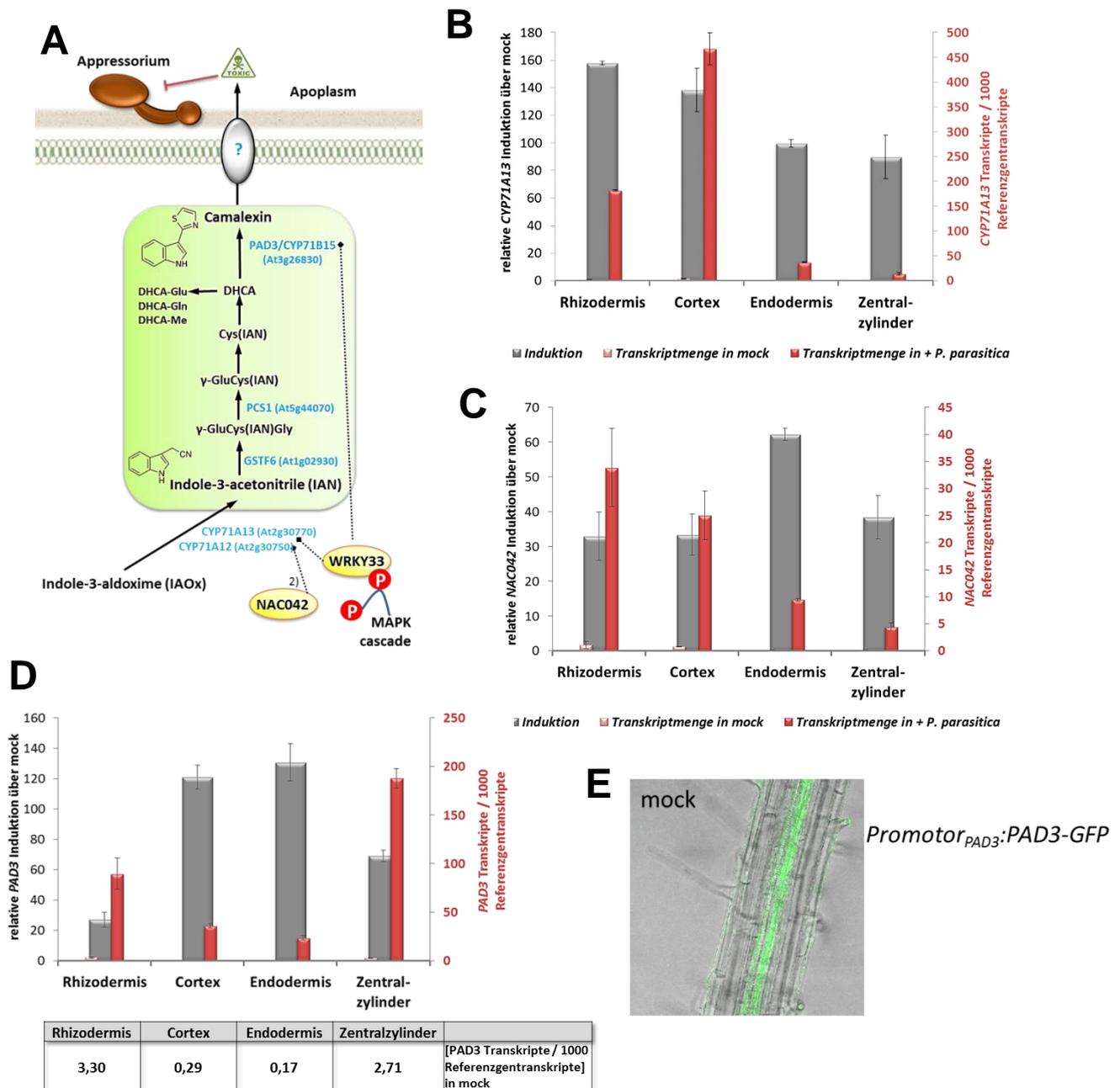


Abb. 36: Induktion von Genen der Camalexin-Biosynthese im zelltypspezifischen Vergleich.

Das Schema (A) zeigt den Camalexin-Biosyntheseweg mit katalytischen Enzymen (blau). Die expressionellen Veränderungen einiger dafür codierender Gene sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) angegeben (B, C, D). Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 2$ ). Induktionswerte:  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$  (BH-Methode). (E) zeigt ein Wurzelsegment der Reporterlinie  $\text{Promotor}_{\text{PAD3}}:\text{PAD3-GFP}$  unter mock-Bedingungen bei GFP-Fluoreszenzanregung (CLSM).

Eine Ausnahme stellte *PAD3* dar. Wie man mittels der Reporterlinie  $\text{Promotor}_{\text{PAD3}}:\text{PAD3-GFP}$  erkennen konnte, war unter mock-Bedingungen ein starkes GFP-Signal im Zentralzylinder und dementsprechend war dort das meiste *PAD3* vorhanden (Abb. 36 E). Auch nach dem Inf-TRAP-Seq wurden unter mock-Bedingungen im Zentralzylinder mehr Transkripte gefunden, als in den anderen Zellschichten (Anmerkung: Da man aufgrund der Skalierung von Abb. 36 D die Balken der Transkriptmenge der mock-Behandlung kaum

erkennen kann, wurde eine Tabelle mit den Werten unter die Graphik eingebaut). Das ist eine Bestätigung, dass nicht nur die Inf-TRAP-Seq Methode, sondern auch die aufgestellte Formel zur Berechnung der Transkriptmenge prinzipiell funktioniert.

*Gene mit einer Beteiligung am Ende der IGs-Biosynthese wurden verstärkt in den äußeren Zellschichten exprimiert*

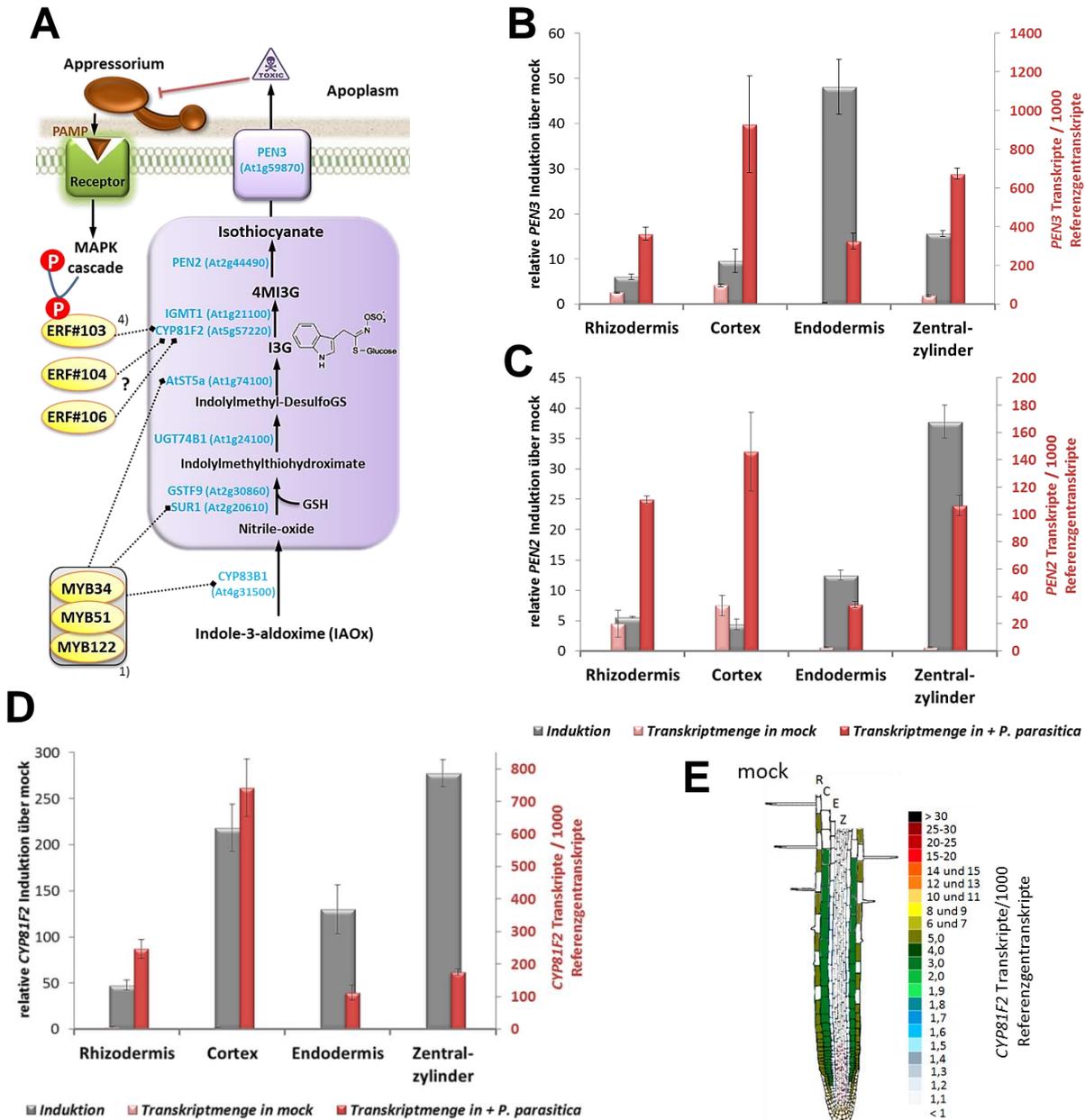


Abb. 37: Induktion von Genen der IGs-Biosynthese im zellspezifischen Vergleich.

Das Schema (A) zeigt den IGs-Biosyntheseweg mit katalytischen Enzymen (blau). Die expressionellen Veränderungen einiger dafür codierender Gene sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica* Infektion) angegeben (B, C, D). Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 2$ ). Induktionswerte:  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$  (BH-Methode). Abb. (E) stellt eine andere Art der Darstellung vor: Die Werte der *CYP81F2* Transkripte / 1000 Referenzgentranskripte wurden anhand einer Skala in Farben unterteilt. In einer Wurzelsskizze konnten diese Farben in die entsprechenden Zellschichten eingetragen werden. *CYP81F2* Transkripte lagen bereits in der mock-behandelten Wurzel überwiegend in den äußeren Schichten vor.

IGs besitzen eine Funktion in der pflanzlichen Immunität (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Am IGs-Biosyntheseweg fiel besonders auf, dass Gene, die am Ende der Biosynthese stehen, die stärkste basale Expression in den äußeren Schichten hatten (z.B. *CYP81F2*, *PEN2*, *PEN3*), d.h. bereits ohne Pathogenkontakt liegen in Rhizodermis und Cortex viele Transkripte vor und so könnten auch die Genprodukte dort präformiert vorhanden sein. Aufgrund des Pathogenkontakts wurden diese Gene in allen Schichten induziert, wobei immer noch die meisten Transkripte in den äußeren Schichten vorhanden waren. Dagegen waren die Transkripte der Gene, die am Anfang des IGs Biosyntheseweges involviert sind (z.B. *CYP83B1*, *GSTF9*, *UGT74B1*), sowohl unter mock-Bedingungen als auch während der Infektion relativ gleichmäßig über die Zellschichten verteilt (Abb. S3).

Bei Betrachtung von Abb. 37 fällt außerdem auf, dass in der Endodermis während der Infektion häufig weniger Transkripte der Gene des IGs Metabolismus vorhanden waren als in den anderen Zellschichten. Könnte dies darauf hindeuten, dass in der Endodermis stattdessen andere Verteidigungsmechanismen aktiver sind?

#### **5.4.1.4 In der Endodermis wurden Gene induziert, die die Barrierefunktion verstärken könnten**

Casparische Streifen werden durch ein Lignin-Polymer gebildet, das als feine und zu einem Ring geschlossene Bande in die antikline Zellwand der Endodermiszellen eingelagert wird, wodurch sich der interzelluläre Raum abdichtet (Naseer *et al.*, 2012). Erst vor kurzem wurde der TF MYB36 als essentiell bei der Bildung des Casparischen Streifens charakterisiert (Kamiya *et al.*, 2015). MYB36 ist ein direkter und positiver Regulator der Gene *CASP1* (*CASPARIAN STRIP DOMAIN PROTEIN 1*), *PER64*, und *ESB1*, die für die lokale Polymerisierung des Lignins an der Zellwand der Endodermiszellen verantwortlich sind (Kamiya *et al.*, 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass mit Abstand die meisten Transkripte von *MYB36* aus der Endodermis isoliert wurden und dass *MYB36* zum Zeitpunkt 2,5 hpi mit *P. parasitica* in der Endodermis induziert war (Abb. 38 A/B). Der Schwerpunkt der Transkripte der Gene *CASP1*, *PER64*, und *ESB1* lag zwar auch in der Endodermis, aber induziert wurden diese Gene 2,5 hpi noch nicht (Abb. S4).

Interessanterweise wurden auch andere Gene in der Endodermis induziert, die am Aufbau des Casparischen Streifens mitwirken. *SGN3* (andere Bezeichnung: *GSO1*) codiert für eine Rezeptor-ähnliche Kinase, die für die Lokalisierung der CASPs nötig ist, wobei die CASPs wiederum wichtige Komponenten der Endodermis-Differenzierung sind (Pfister *et al.*, 2014). *SGN3* wurde durch die Infektionsbehandlung zwar selbst nicht signifikant stark induziert (Abb. 32 C), aber das homologe Gen *GSO2* (Abb. 38 C).

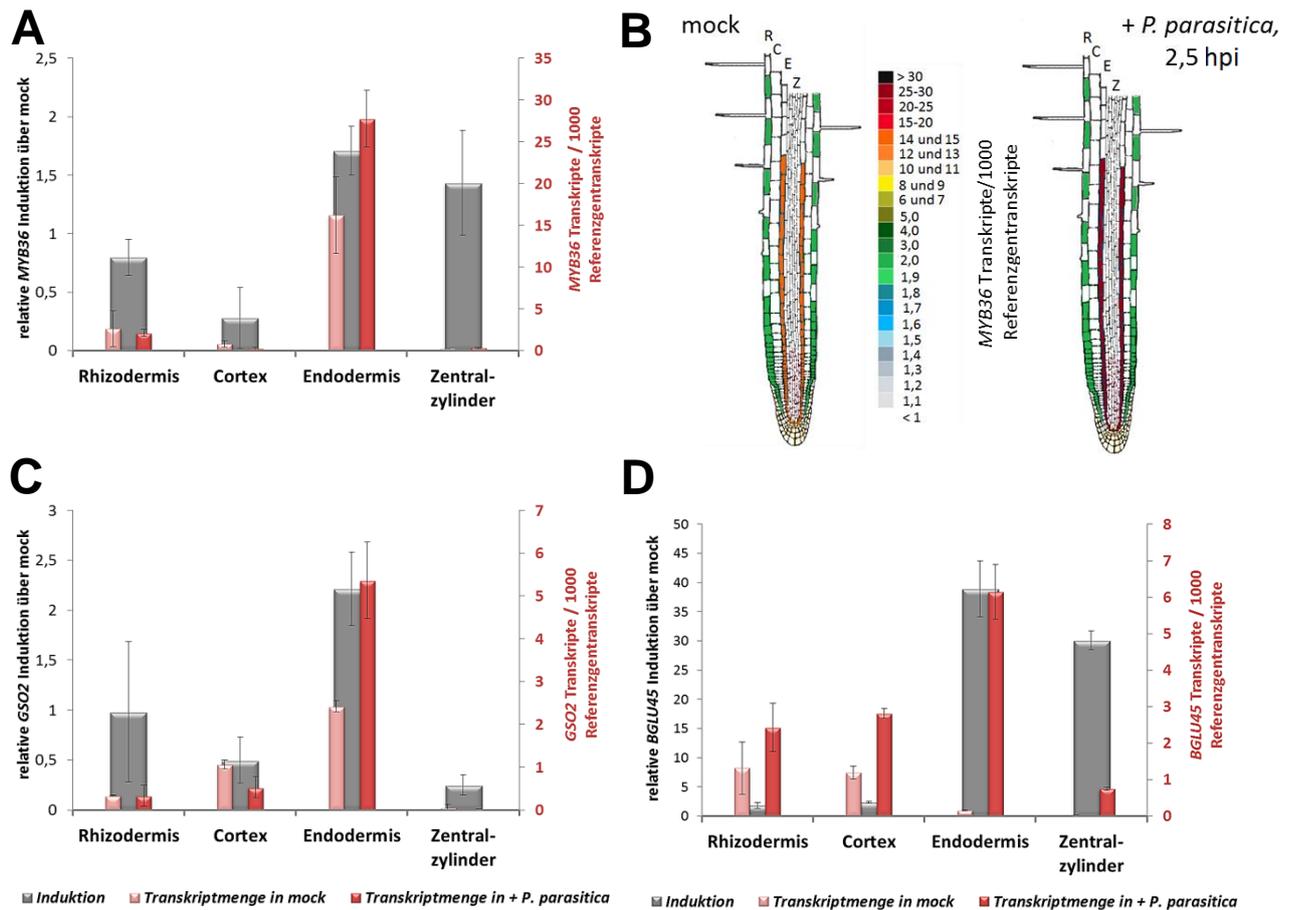


Abb. 38: **Induktion von Genen der Organisation des Casparischen Streifens sowie der Lignin-Synthese im zelltypspezifischen Vergleich.**

Die expressionellen Veränderungen der Gene *MYB36*, *GSO2* und *BGLU45* sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) angegeben (A, C, D). Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 2$ ). Induktionswerte in der Endodermis mit  $p\text{Adjust} \leq 0,05$  (BH-Methode). Abbildungsteil (B) ist eine andere Art der Darstellung von (A), die dem Leser schnell den Sachverhalt darstellen soll: Die Werte der *MYB36* Transkripte / 1000 Referenzgentranskripte wurden anhand einer Skala in Farben unterteilt. In einer Wurzelskizze wurden diese Farben in die entsprechenden Zellschichten eingetragen. Durch die Abbildung beider Zustände (*mock* und + *P. parasitica*, 2,5 hpi) nebeneinander fällt anhand des Farbwechsels in der Endodermis von hell- zu dunkelrot sofort auf, dass *MYB36* während der Infektion in der Endodermis induziert wurde, nicht aber in den anderen Schichten.

Lignin ist eine komplexe und drei-dimensionale Struktur, die durch oxidative Polymerisierung dreier Monolignole (p-Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapyl-Alkohol) in der Zellwand erzeugt wird (zur Übersicht siehe Zhong und Ye, 2014). Monolignol-Glucoside

sind eine vorgefertigte Speicherform dieser Moleküle und eine Beteiligung von Monoglucosidasen am Lignifizierungsprozess wird vermutet (Boerjan *et al.*, 2003; Chapelle *et al.*, 2012). In der Pflanze können die beiden  $\beta$ -Glucosidasen BGLU45 und BGLU46 Coniferin deglucosylieren (Xu *et al.*, 2004; Chapelle *et al.*, 2012). *BGLU46* war 2,5 hpi mit *P. parasitica* in allen Zellschichten induziert, wobei die Induktion in der Endodermis am stärksten war (Abb. S4). Ebenso war die Induktion von *BGLU45* in der Endodermis am stärksten und auch die meisten Transkripte von *BGLU45* wurden zum Zeitpunkt 2,5 hpi in der Endodermis detektiert (Abb. 38).

Darüber hinaus waren auffällig viele Gene spezifisch in der Endodermis induziert, die für R-Proteine der NBS-LRR (engl.: nucleotide-binding site - Leucine-rich repeat) Klasse codieren (Abb. 39). Dabei handelt es sich um die Hauptklasse der R-Proteine, die involviert ist in der Erkennung von Bakterien, Viren, Pilzen, Oomyceten, Nematoden und Insekten (zur Übersicht Takken und Tameling, 2009). Aktivierte R-Proteine schalten die Pathogenabwehr an, was oft im Zelltod der infizierten Zellen endet. NBS-LRR R-Proteine wurden in zwei Untergruppen eingeteilt, je nachdem ob am N-Terminus eine „coiled-coil“ (CC) Domäne oder eine Domäne mit Ähnlichkeit zum Toll IL-1 Rezeptor (TIR) sitzt (zur Übersicht siehe Takken und Tameling, 2009).

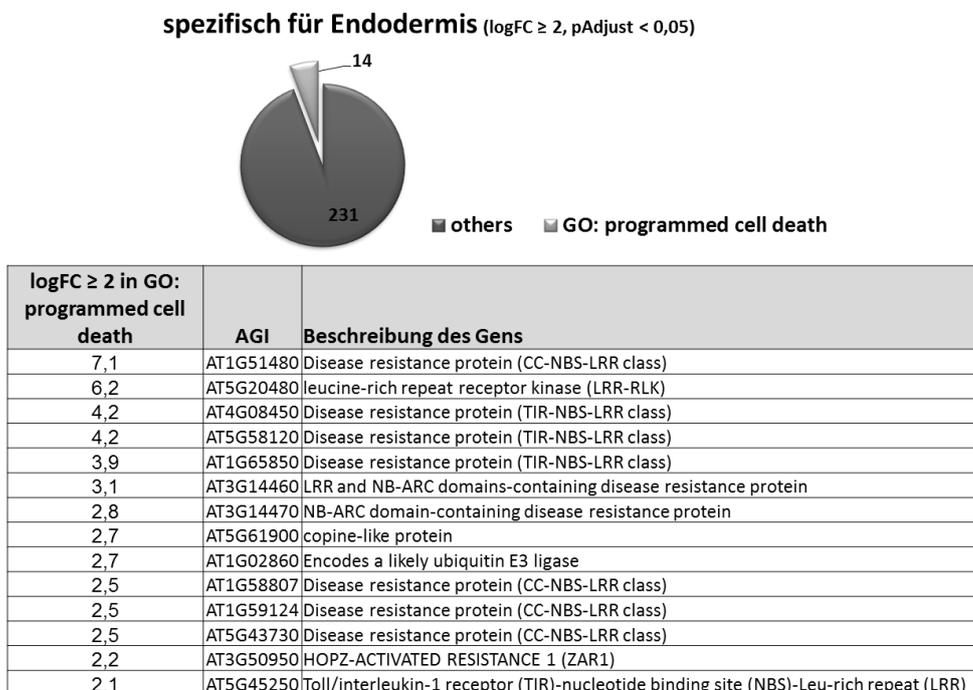


Abb. 39: **Induktion von Genen, die für NBS-LRR Proteine codieren, in der Endodermis.**

Übersicht der Gene, die unter der GO (Gene Ontology) Annotation „Programmierter Zelltod“ geführt werden und die spezifisch in der Endodermis induziert wurden ( $\log_{FC} \geq 2$ ;  $p_{Adjust} < 0,05$  (BH-Methode); 2,5 hpi mit *P. parasitica*). Auffällig viele Gene für NBS-LRR waren darunter zu finden.

### 5.4.1.5 Im Zentralzylinder wurden Regulatorgene des Zellzyklus reprimiert

*CDKA1* (AT3G48750) codiert für ein Protein, das zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen gehört. *CDKA1* ist in meristematischem Gewebe positiv an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Nowack *et al.*, 2012), d.h. je weniger aktives *CDKA1* vorhanden ist, desto gehemmt ist die Zellteilung.

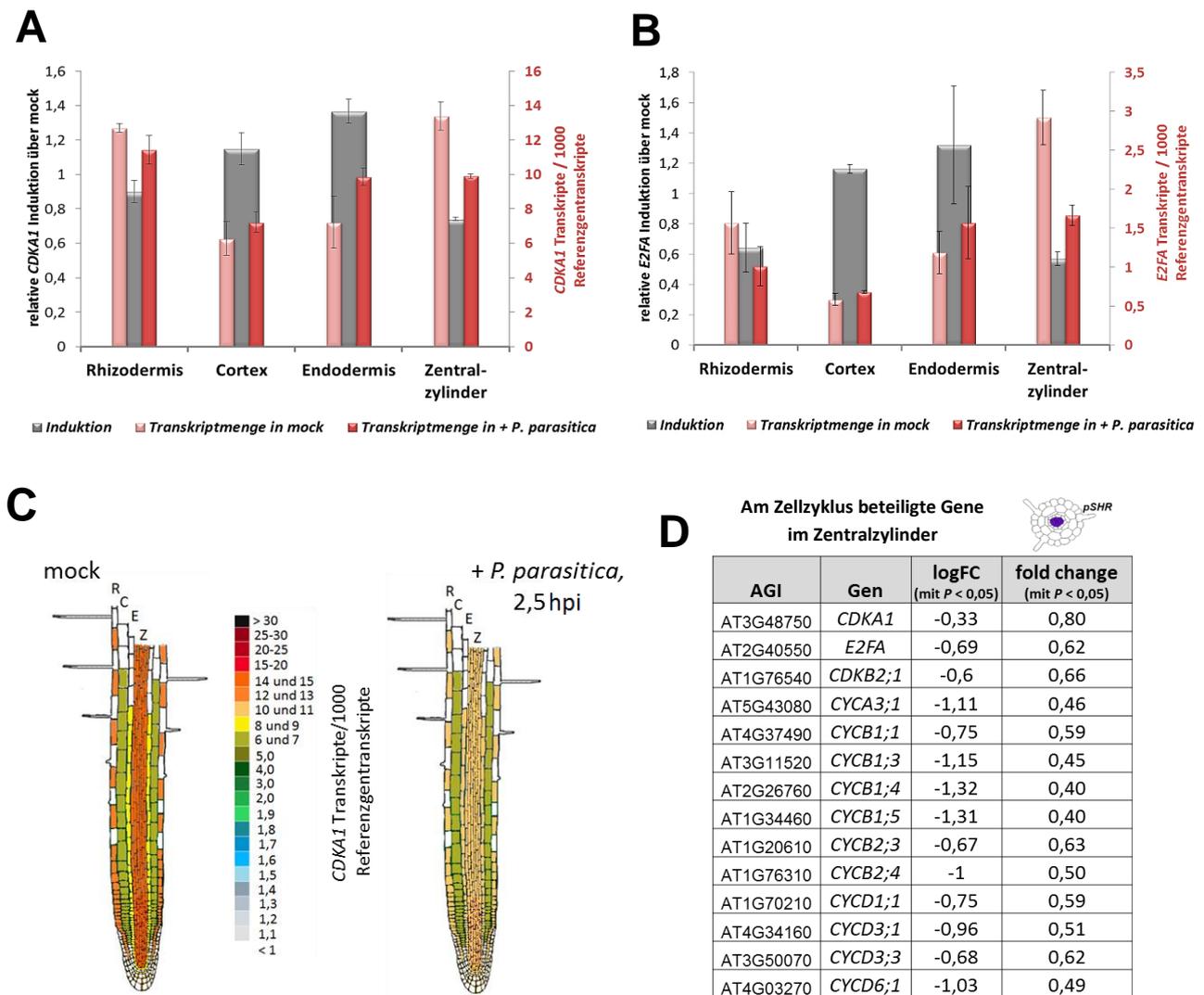


Abb. 40: **Differenzielle Genexpression von Genen mit einer Bedeutung im Zellzyklus.**

Die transkriptionellen Veränderungen von *CDKA1* (A) und *E2FA* (B) sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) dargestellt. Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 2$ ). Induktionswerte für Zentralzylinder mit  $p\text{Adjust} \leq 0,05$  (BH-Methode). (C) stellt eine andere Art der Darstellung vor: Die Werte der *CDKA1* Transkripte / 1000 Referenzgentranskripte wurden anhand einer Skala in Farben unterteilt. In einer Wurzelskizze wurden diese Farben in die entsprechenden Zellschichten eingetragen. Durch die Abbildung beider Zustände (mock und + *P. parasitica*, 2,5 hpi) nebeneinander fällt anhand des Farbwechsels im Zentralzylinder von einem dunklen zu einem helleren Orange-Farbtönen sofort auf, dass *CDKA1* während der Infektion im Zentralzylinder reprimiert wurde, nicht aber in den anderen Schichten. Abbildungsteil (D) zeigt eine Liste mit Genen, die eine Beteiligung am Zellzyklus haben und deren differentielle Genexpression im Zentralzylinder.

Im Inf-TRAP-Seq konnte eine signifikante Repression der *CDKA1*-Expression auf den Zentralzylinder beschränkt lokalisiert werden (Abb. 40 A, C, D). Andere Gene mit einer Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus wurden ebenfalls im Zentralzylinder expressionell stark reprimiert (Abb. 40 B, D): Etwa das Gen *E2FA* (AT2G36010), das für einen TF codiert. Der TF E2FA stimuliert die Zell-Proliferation, indem er wahrscheinlich auf einer indirekten Art einen Zustand der Dedifferenzierung in den Zellen aufrechterhält (Magyar *et al.*, 2012).

### 5.4.2 Auflösung der zelltypspezifischen Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Inokulation mit dem Mutualisten *P. indica*

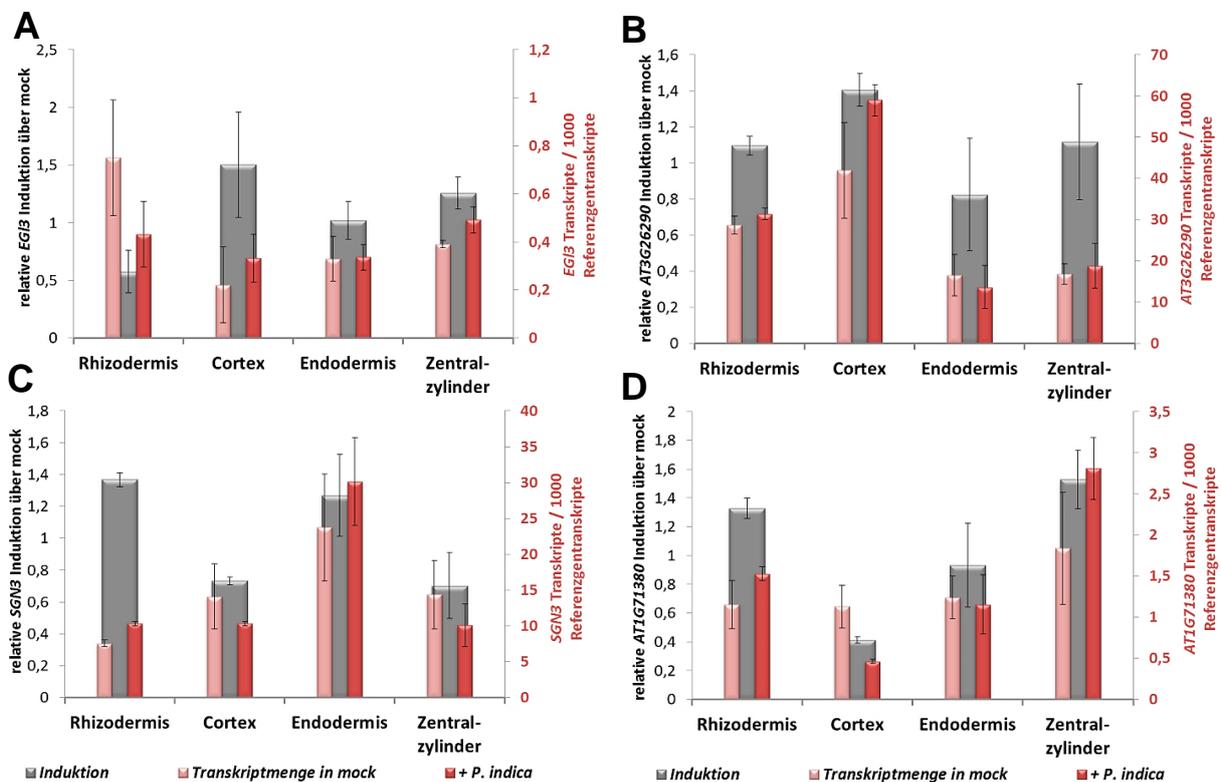


Abb. 41: Im Inf-TRAP-Seq Experiment mit *P. indica* wurden für jede Zellschicht Marker-Transkripte spezifisch angereichert.

Für jede Zellschicht wurden spezifische Markergene ausgewählt. Anhand ihrer mRNA konnte bestätigt werden, dass über das TRAP-Verfahren zellschichtspezifische mRNA angereichert worden ist. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3).

A: *EGL3* (*ENHANCER OF GLABRA3*) als Markergen für die Rhizodermis.

B: *AT3G26290* (*CYP71B26*) als Markergen für den Cortex.

C: *SGN3* (*GSO1*) als Markergen für die Endodermis.

D: *AT1G71380* (*CEL3*) als Markergen für den Zentralzylinder.

Mit *P. indica* wurde ein Pilz verwendet, der mutualistisch mit der Wirtspflanze interagiert. Es wurde für die Analyse ein recht früher Zeitpunkt (3 dpi) der Interaktion gewählt, da sich hier zu Beginn die Symbiose erst etabliert und sich die beiden Interaktionspartner unter anderem mit Änderungen im Genexpressionsprofil aufeinander einstellen. Neben Abwehrreaktionen, die auch bei Pathogeninfektionen auftreten, könnten auch erste Symbiose-bedingte Änderungen vorhanden sein. Bereits aus den Versuchen an der gesamten Wurzel ist hervorgegangen, dass 3 dpi leichte Veränderungen in der Genexpression vorkamen.

Die Analyse von Markergen-Transkripten bestätigte eine zellschichtspezifische mRNA-Anreicherung, wie aus Abb. 41 und Abb. S6 hervorgeht. Obwohl die Aufreinigung nicht absolut war, konnten trotzdem zellschichtspezifische Charakteristika detektiert werden, wie das nächste Kapitel zeigt.

#### **5.4.2.1 Eine differentielle Genexpression war fast ausschließlich auf Rhizodermis und Cortex begrenzt**

Mit *edgeR* wurden *smear plots* angefertigt (Abb. 42), anhand derer man die Menge an differentiiell exprimierten Genen übersichtlich darstellen konnte. 3 dpi mit *P. indica* war eine transkriptionelle Reaktion in Rhizodermis und Cortex lokalisierbar. In der Endodermis wurden lediglich 4 DEG gefunden und im Zentralzylinder 10 DEG.

Alle differentiiell exprimierten Gene der Zellschichten mit  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$  (BH Methode) und  $\log_{\text{FC}} \geq 1$  bzw.  $\log_{\text{FC}} \leq -1$  wurden für die Darstellung in Venn-Diagrammen herangezogen. Nur ein DEG wurde in allen vier Zellschichten induziert vorgefunden. Dabei handelte es sich um *FOX1*. Auch die Überlappung zwischen Rhizodermis und Cortex war mit 2 DEG induziert und 1 DEG reprimiert sehr gering. Rhizodermis und Cortex reagierten also auf *P. indica* in sehr unterschiedlicher Weise.

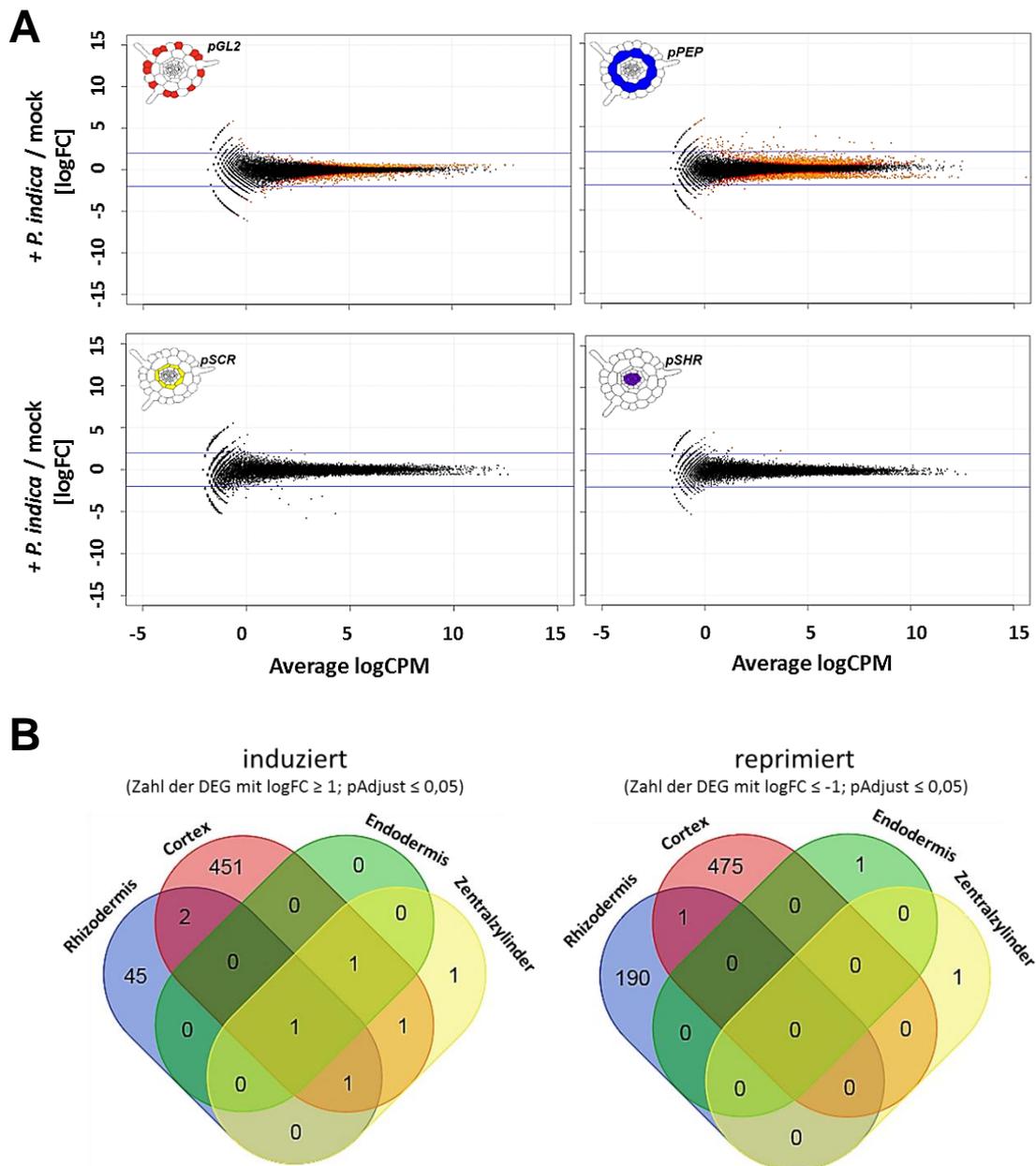


Abb. 42: **Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression in smear plots und Venn-Diagrammen; 3 dpi mit *P. indica*.**

A: Der Bioconductor *edgeR* smear plot zeigt signifikant differentiell exprimierte Gene (orange) mit einem  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$  (BH-Methode). Bei schwarz markierten Genen liegt keine differentielle Genexpression vor. Das Ergebnis ist für jede der verwendeten zelltypspezifischen Linien (*pGL2*, *pPEP*, *pSCR*, *pSHR*) einzeln abgebildet. Die differentiell exprimierten Gene während der *P. parasitica* Infektion sind als logFC (Fold Change) über mock angegeben. logFC Werte  $> 0$  entsprechen einer Induktion, logFC Werte  $< 0$  einer Repression. Die beiden horizontalen Linien markieren einen logFC = 2 bzw. logFC = -2. Auf der x-Achse ist der Average logCPM (Counts per Million) als Parameter für die absolute Expressionsstärke angegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm R studio<sup>®</sup> gestaltet (<plotSmear>).

B: Für die Erstellung der Venn-Diagramme wurden differentiell exprimierte Gene mit  $\log_{2}FC \geq 1$  (induziert) bzw.  $\log_{2}FC \leq -1$  (reprimiert) ausgewählt. Die Zellschichten sind farblich markiert: blau = Rhizodermis, rot = Cortex, grün = Endodermis, gelb = Zentralzylinder. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Zellschichten: In Schnittmengen ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene angegeben, die in zwei oder mehr Zellschichten gefunden wurden. Die Anzahl an Genen, die spezifisch in einer Zellschicht induziert bzw. reprimiert wurden, ist in der Menge zu finden, die sich mit keiner anderen schneidet.

### 5.4.2.2 Die Induktion der Oxidoreduktase FOX1 als gemeinsames Merkmal aller Zellschichten

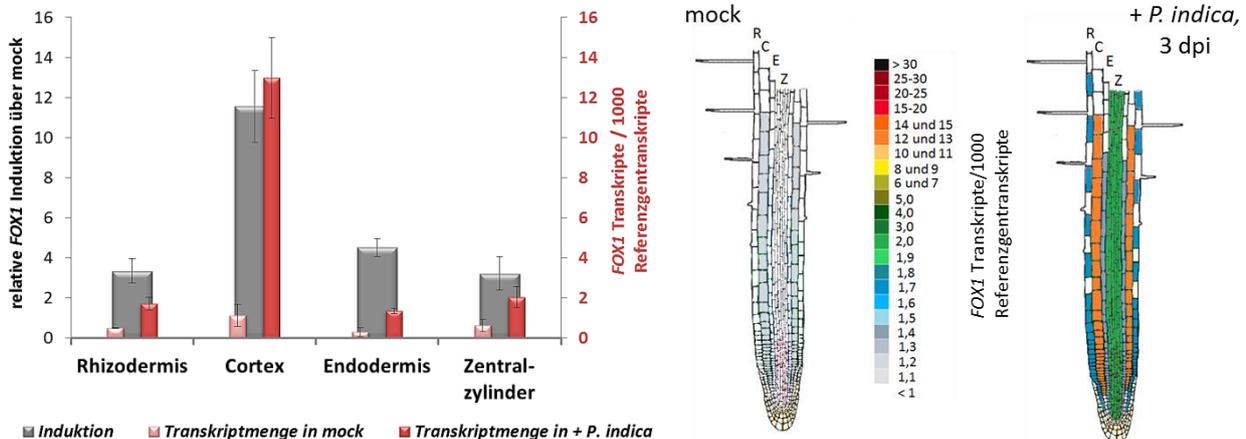


Abb. 43: Induktion von *FOX1* im zellschichtspezifischen Vergleich.

*FOX1* ist als Oxidoreduktase am Biosyntheseweg beteiligt, der zu ICN-Derivaten führt. Die expressionellen Veränderungen des entsprechenden Gens sind für den Zeitpunkt 3 dpi (+ *P. indica*) angegeben. Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). Induktionswerte: pAdjust ≤ 0,05 (BH-Methode).

Die Genexpression von *FOX1* wurde in allen Zellschichten stimuliert, am stärksten allerdings im Cortex (Abb. 43).

### 5.4.2.3 Die Interaktion mit *P. indica* beeinflusste das Expressionsprofil im Zentralzylinder kaum

Aus Abb. 42 geht hervor, dass nur ein Gen spezifisch im Zentralzylinder induziert wurde. Dabei handelte es sich um *UMAMIT29* (*USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTER 29*). In *Arabidopsis* transportiert die Familie der Transporter UMAMIT unter anderem Aminosäuren. Ebenso wurde nur ein Gen spezifisch im Zentralzylinder reprimiert, nämlich AT1G75960 (AMP-dependent synthetase and ligase family protein). Über die Funktion beider Gene ist nicht viel bekannt. Abb. 44 zeigt die zellschichtspezifische Analyse der Expression.

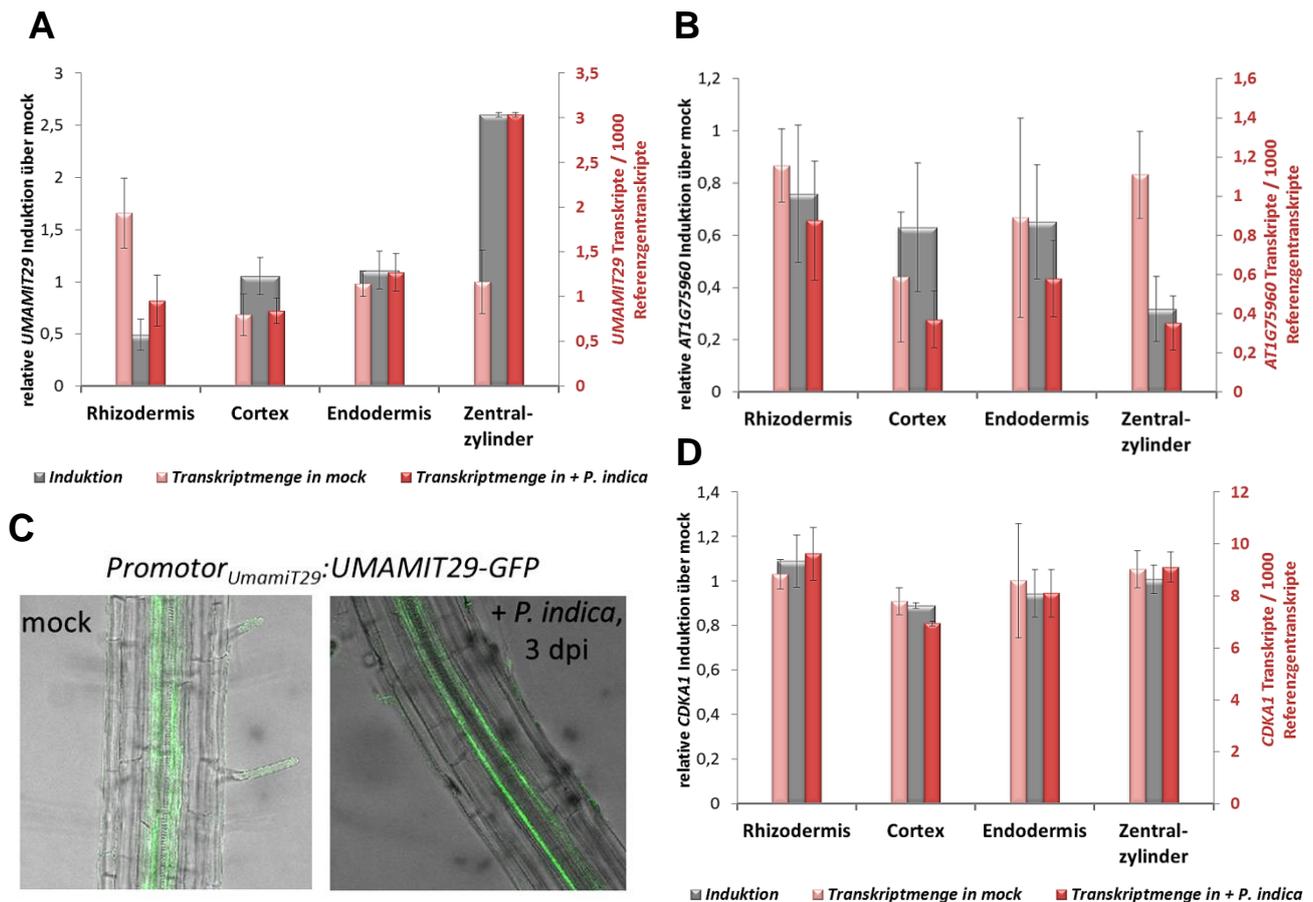


Abb. 44: **UMAMIT29** und **AT1G75960** waren zwei für den Zentralzylinder spezifische DEGs, andere Genexpressionen, wie die von **CDKA1**, waren nicht beeinträchtigt.

Die expressionellen Veränderungen der Gene *UMAMIT29*, *AT1G75960* und *CDKA1* sind für den Zeitpunkt 3 dpi (+ *P. indica*) angegeben (A, B, D). Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet. Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 3$ ). Induktionswerte im Zentralzylinder in A und B mit  $p\text{Adjust} \leq 0,05$  (BH-Methode). *UMAMIT29* ist ein Transporter für Aminosäuren. Das codierende Gen wurde während der Interaktion mit *P. indica* im Zentralzylinder induziert (A). Ein Wurzelsegment der Reporterlinie Promotor<sub>UmamiT29</sub>:*UMAMIT29*-GFP wurde 3 dpi mit *P. indica* unter Fluoreszenzlicht untersucht (C), wobei die nicht-inokulierte Kontrolle (mock) daneben abgebildet ist (CLSM Aufnahmen).

#### 5.4.2.4 Mit Pathogenabwehr oder Systemic Acquired Resistance assoziierte Gene wurden überwiegend im Cortex induziert

Eine expressionelle Induktion der Gene *CYP81F2*, *CYP71A13* und *NAC042* - als Beispielkomponenten des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus - war bei *P. indica* besiedelten Wurzeln vor allem im Cortex aufgetreten (Abb. 45). Viele weitere, mit Pathogenabwehr assoziierte Gene wurden während der Interaktion mit *P. indica* ebenfalls spezifisch im Cortex induziert, beispielsweise *CBP60g* als Marker für eine allgemeine Antwort auf Pathogene (SA-Antwort; Wang *et al.*, 2009).

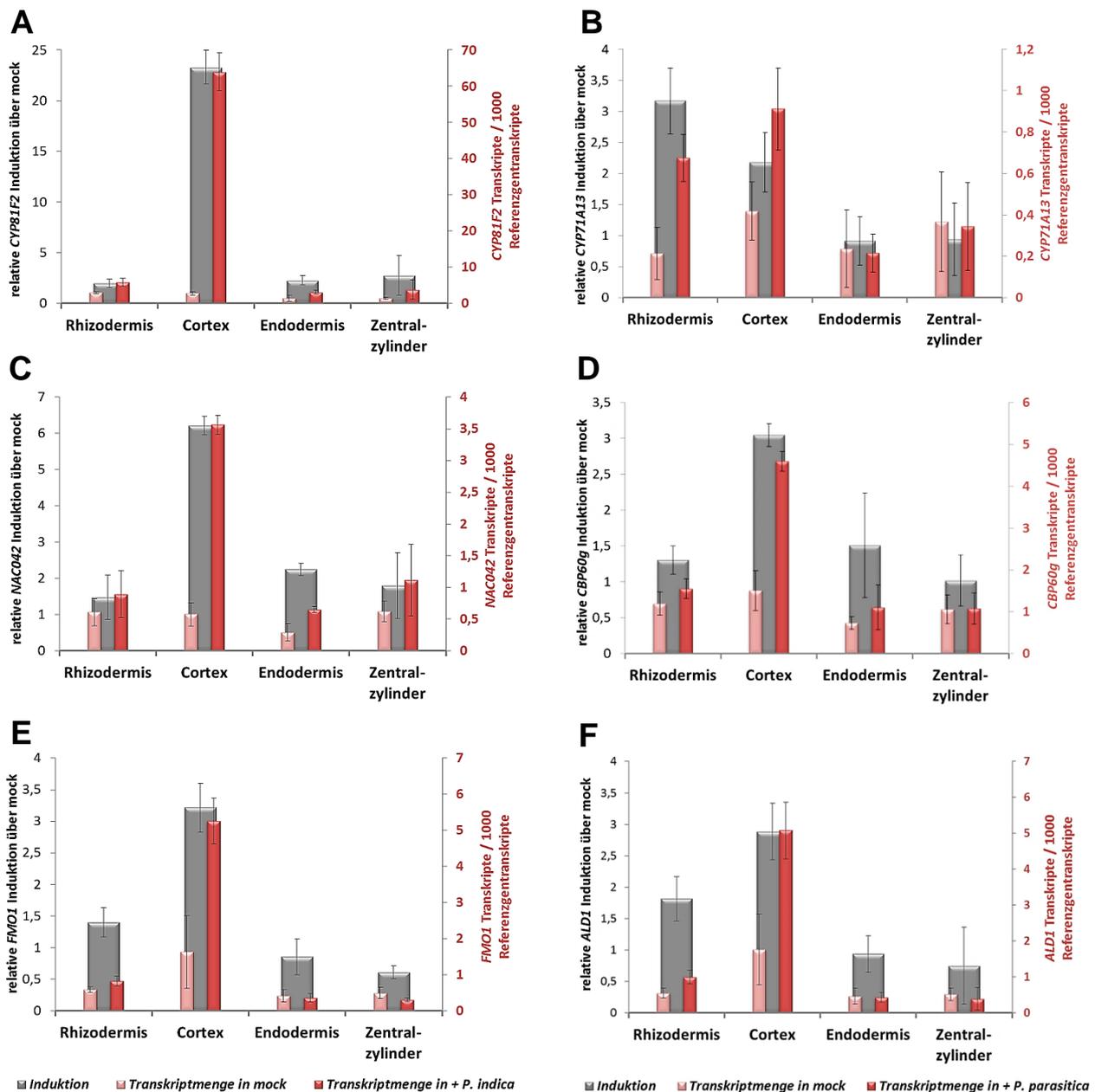


Abb. 45: Expressionelle Induktion von Genen der Pathogenabwehr und der SAR.

Die expressionellen Veränderungen der Gene *CYP81F2*, *CYP71A13*, *NAC042*, *CBP60g*, *FOM1* und *ALD1* sind für den Zeitpunkt 3 dpi (+ *P. indica*) angegeben. Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). Alle Induktionswerte im Cortex mit  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$  (BH-Methode).

Nach einem ersten Kontakt mit Mikroorganismen, der lokal begrenzt ist, tritt meist wenig später in der gesamten Pflanze eine Resistenzreaktion auf, die als *Systemic Acquired Resistance* bezeichnet wird (Durrant und Dong, 2004). Dieser Mechanismus verleiht der Pflanze auch in Geweben, die weit entfernt vom Infektionsherd liegen, eine breite Resistenz gegen folgende Infektionen oder die Ausbreitung der Mikroorganismen. *ALD1* (*AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1*) und *FMO1* (*FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE1*) sind für die erfolgreiche Ausbildung der SAR nötig (Návarová et

al., 2012). Sowohl *FMO1* als auch *ALD1* waren 3 dpi mit *P. indica* im Cortex expressionell induziert (Abb. 45). Zusammengenommen könnten die Reaktionen im Cortex dazu beitragen, der Wirtspflanze eine systemische Resistenz gegen Folgeinfektionen zu verleihen. Diese Annahme wurde im nächsten Abschnitt getestet.

#### *Eine Vorbehandlung mit P. indica erhöhte signifikant die Resistenz gegen V. longisporum*

Kürzlich wurde publiziert, dass eine Vorbehandlung von *Arabidopsis*-Pflanzen mit dem mutualistisch lebenden Endophyten *P. indica* die Entwicklung einer *V. dahliae* Infektion bremsen kann (Sun *et al.*, 2014). Demnach kann *P. indica* als effektive Biokontrolle dazu beitragen, *Arabidopsis* und andere Arten gegen einige Infektionen zu schützen. In diesem Versuch wurde getestet, ob auch der Infektionsverlauf des sehr nah verwandten *V. longisporum* durch die Präsenz von *P. indica* eingeschränkt werden kann. Dazu wurden die Wurzeln von Wt-Pflanzen mit *P. indica* inokuliert bzw. mit einer mock-Kontrolle behandelt. 10 Tage nach dieser ersten Inokulation wurde sowohl die Kontrollgruppe (- *P. indica*) als auch die mit *P. indica* vorbehandelte Gruppe (+ *P. indica*) mit *VI43* inokuliert. 21 Tage nach dieser Zweitinfektion wurde signifikant weniger *VI43*-DNA in den Blattrosetten der mit *P. indica* Co-behandelten Pflanzen festgestellt (Abb. 46), d.h. das Pathogen breitete sich hier schlechter aus. Auf irgendeine Art und Weise trägt also die *P. indica* Besiedlung dazu bei, Immunantworten der Wirtspflanze zu verstärken.

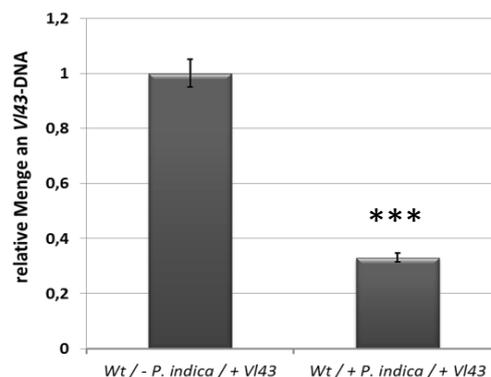


Abb. 46: **Durch die Interaktion mit *P. indica* war die Toleranz der Wirtspflanze gegen *VI43* verbessert.**

Pflanzen des Wt wurden entweder mit *P. indica* (+ *P. indica*) inokuliert oder mit einer mock-Lösung behandelt (- *P. indica*). 10 Tage nach dieser Vorbehandlung wurden alle Pflanzen mit *V. longisporum* infiziert. 21 dpi wurde die Menge der *VI43*-DNA in den Blattrosetten über qRT-PCR ermittelt. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3; \*\*\* Student's *t*-test,  $P \leq 0,001$ ).

Womöglich hat sich in den 10 Tagen während der Interaktion mit *P. indica* etwas in der Wurzel verändert, was anschließend die Infektion für *V. longisporum* erschwerte. Ein SAR-Effekt, der 3 dpi mit *P. indica* im Wurzel-Cortex ausgelöst wurde, könnte daran beteiligt gewesen sein.

### 5.4.3 Auflösung der zelltypspezifischen Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Infektion mit *V. longisporum*

Mit *V. longisporum* wurde ein Pilz verwendet, der langsamer der Pflanze ernsthaften Schaden zufügt als *P. parasitica*. Deshalb war mit 6 dpi ein wesentlich späterer Zeitpunkt für die Analysen wählbar. Bereits bei den Untersuchungen an der gesamten Wurzel war eine starke differentielle Genexpression während der Infektion erkennbar. Im nachstehenden Versuch fehlte aus technischen Gründen die Untersuchung der Rhizodermis. Die Analyse von Markergen-Transkripten bestätigte eine zellschichtspezifische mRNA-Aufreinigung, wie aus Abb. 47 und Abb. S7 hervorgeht. Allerdings wurden diese Marker stark durch die Infektion beeinflusst und waren deshalb für den Nachweis in den inokulierten Proben nur bedingt aussagekräftig.

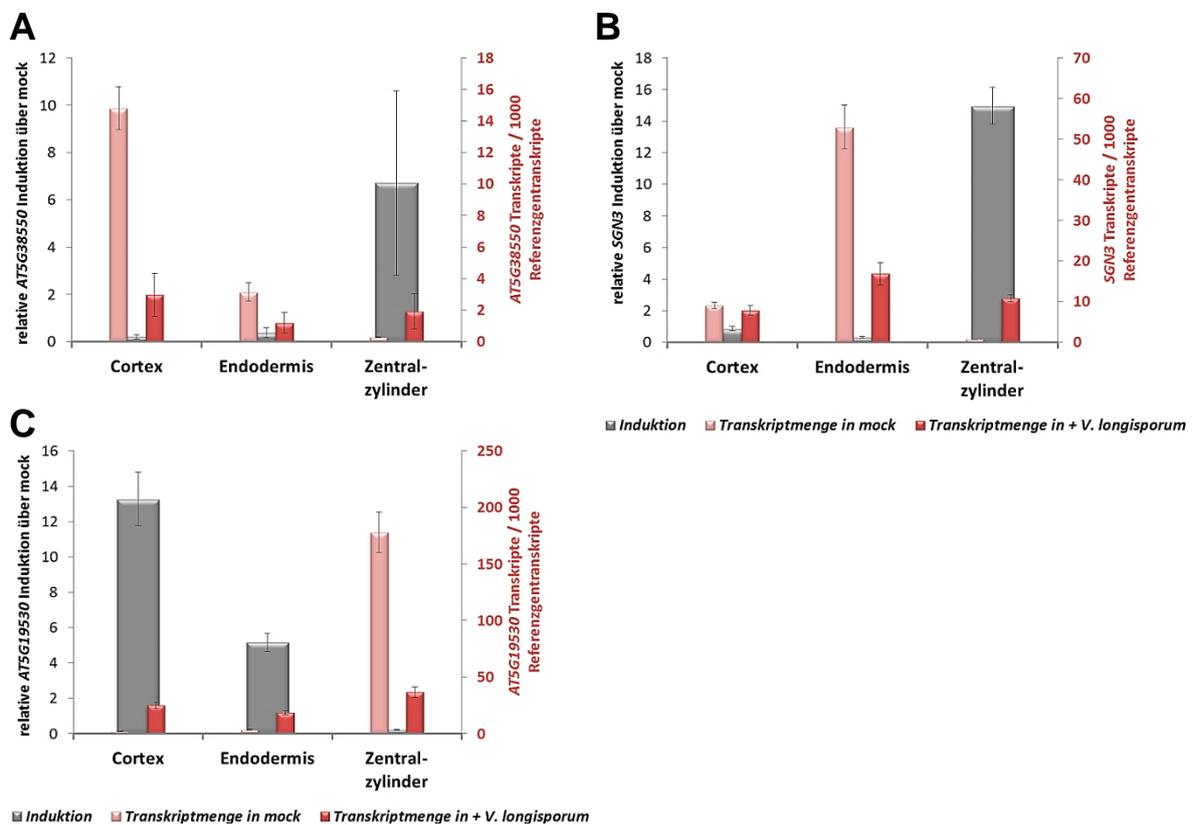


Abb. 47: Im Inf-TRAP-Seq Experiment mit *V. longisporum* wurden für jede Zellschicht Marker-Transkripte spezifisch aufgereinigt.

Für jede Zellschicht wurden spezifische Markergene ausgewählt. Anhand ihrer mRNA konnte bestätigt werden, dass über die TRAP zellschichtspezifische mRNA isoliert worden ist. Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 3$ ).

A: AT5G38550 (Mannose-binding lectin superfamily protein) als Markergen für den Cortex.

B: *SGN3* (*GSO1*) als Markergen für die Endodermis.

C: AT5G19530 (*ACL5*) als Markergen für den Zentralzylinder.

### 5.4.3.1 Eine massive expressionelle Reaktion zeigte sich in allen Zellschichten der *V. longisporum* infizierten Wurzel

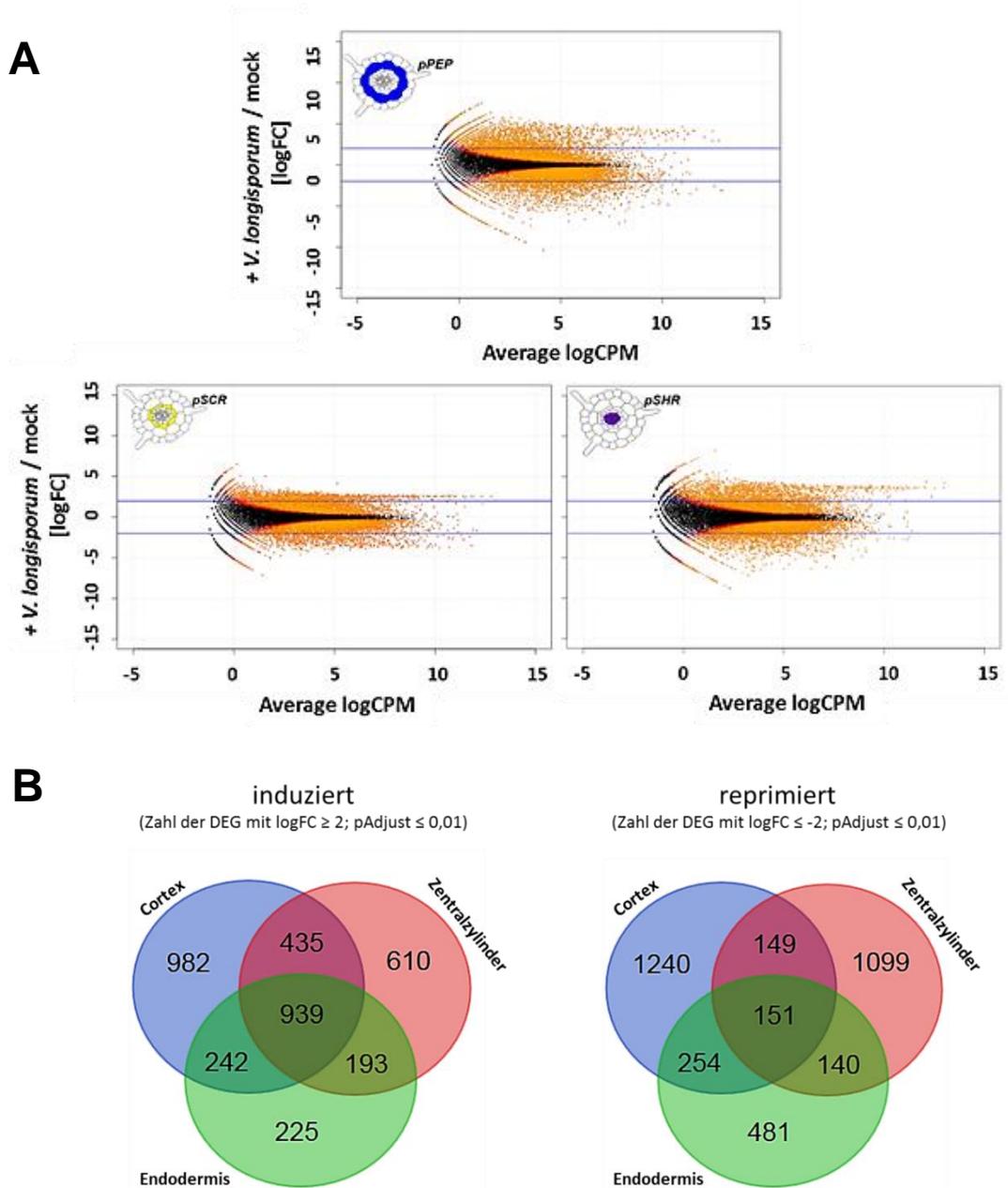


Abb. 48: **Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression in smear plots und Venn-Diagrammen; 6 dpi mit *V. longisporum*.**

A: Der Bioconductor *edgeR* smear plot zeigt signifikant differentiell exprimierte Gene (orange) mit einem  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,01$  (BH-Methode). Bei schwarz markierten Genen liegt keine differentielle Genexpression vor. Das Ergebnis ist für jede der verwendeten zelltypspezifischen Linien (*pPEP*, *pSCR*, *pSHR*) einzeln abgebildet. Die differentiell exprimierte Gene während der *P. parasitica* Infektion sind als  $\log_{2}FC$  (Fold Change) über mock angegeben.  $\log_{2}FC$  Werte  $> 0$  entsprechen einer Induktion,  $\log_{2}FC$  Werte  $< 0$  einer Repression. Die beiden horizontalen Linien markieren einen  $\log_{2}FC = 2$  bzw.  $\log_{2}FC = -2$ . Auf der x-Achse ist der Average logCPM (Counts per Million) als Parameter für die absolute Expressionsstärke angegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm R studio<sup>®</sup> gestaltet (<plotSmear>).

B: Für die Erstellung der Venn-Diagramme wurden differentiell exprimierte Gene mit  $\log_{2}FC \geq 2$  (induziert) bzw.  $\log_{2}FC \leq -2$  (reprimiert) ausgewählt. Die Zellschichten sind farblich markiert: blau = Cortex, grün = Endodermis, rot = Zentralzylinder. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Zellschichten: In Schnittmengen ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene angegeben, die in zwei oder mehr Zellschichten gefunden wurden. Die Anzahl an Genen, die spezifisch in einer Zellschicht induziert bzw. reprimiert wurden, ist in der Menge zu finden, die sich mit keiner anderen schneidet.

Mit *edgeR* wurden *smear plots* angefertigt (Abb. 48). Im Versuch mit *V. longisporum* kam es 6 dpi zu einer massiven expressionellen Reaktion in den drei untersuchten Zellschichten Cortex, Endodermis und Zentralzylinder.

Alle differentiell exprimierte Gene der Zellschichten mit  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,01$  (BH Methode) und  $\log_{2}FC \geq 2$  bzw.  $\log_{2}FC \leq -2$  wurden für die Darstellung in Venn-Diagrammen herangezogen (Abb. 48). Neben 939 Genen, die in allen drei Zellschichten induziert wurden, befanden sich zahlreiche Gene, die spezifisch in einer Zellschicht induziert wurden: 982 spezifisch für Cortex, 225 spezifisch für Endodermis und 610 spezifisch für Zentralzylinder. Bei den reprimierten Genen waren sogar viel mehr spezifische DEG vorhanden und nur eine Überlappung von 151 Genen in allen drei Zellschichten.

#### 5.4.3.2 Obwohl *Verticillium* nicht bis zum Zentralzylinder vordrang, fand dort eine Regulation der Expression statt

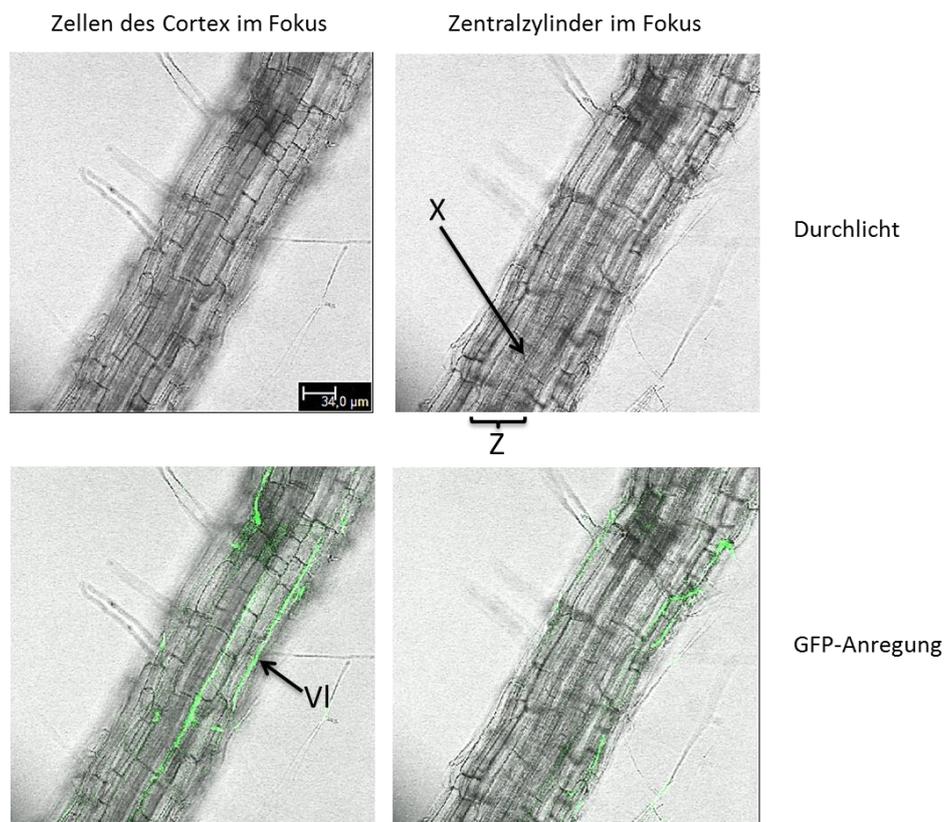


Abb. 49: Mit eGFP-*VI43* infizierte Wurzelsegmente, 6 dpi.

Wurzeln des Wt wurden im sterilen *in vitro*-Infektionssystem mit dem eGFP-markierten *V. longisporum* Stamm (eGFP-*VI43*) inokuliert. Die Wurzeln wurden beim Inokulationsprozess nicht verletzt. Betrachtung einzelner Wurzelsegmente 6 dpi unter dem CLSM. Gezeigt ist die Aufnahme eines Wurzelsegments in zwei verschiedenen Fokus-Ebenen: links lag der Cortex im Fokus, rechts der Zentralzylinder. Jeweils wurden eine Durchlicht-Aufnahme (oben) und eine Aufnahme unter GFP-Anregung aufgenommen. X markiert ein Xylemgefäß, das als Röhre zu erkennen war. Die scharfe Einstellung von X bestätigte, dass der Zentralzylinder im Fokus lag. Z gibt die abgeschätzte Ausdehnung des Zentralzylinders an. Mit VI ist eine fluoreszierende Hyphe gekennzeichnet. Der Maßstab gibt eine Länge von 34 µm an.

Untersuchungen mit eGFP-*VI43* zeigten, dass die Pilzhypen zwar den Cortex besiedelten, nicht aber den Zentralzylinder, denn während die Hyphen fluoreszierten solange die Zellen des Cortex im Fokus standen (Abb. 49 links unten), trat bei Veränderung des Fokus zum Zentralzylinder keine GFP-Fluoreszenz im Zentralzylinder auf (Abb. 49 rechts unten; Anmerkung: Das GFP Signal im Bild rechts unten ist auf Hyphen zurückzuführen, die sich im Cortex befanden). Andere Beobachtungen lassen ebenfalls vermuten, dass *VI43* zwar in den Cortex unverwundeter *Arabidopsis*-Wurzeln einwachsen kann (Iven, 2009), wohingegen der Zentralzylinder nie penetriert wird.

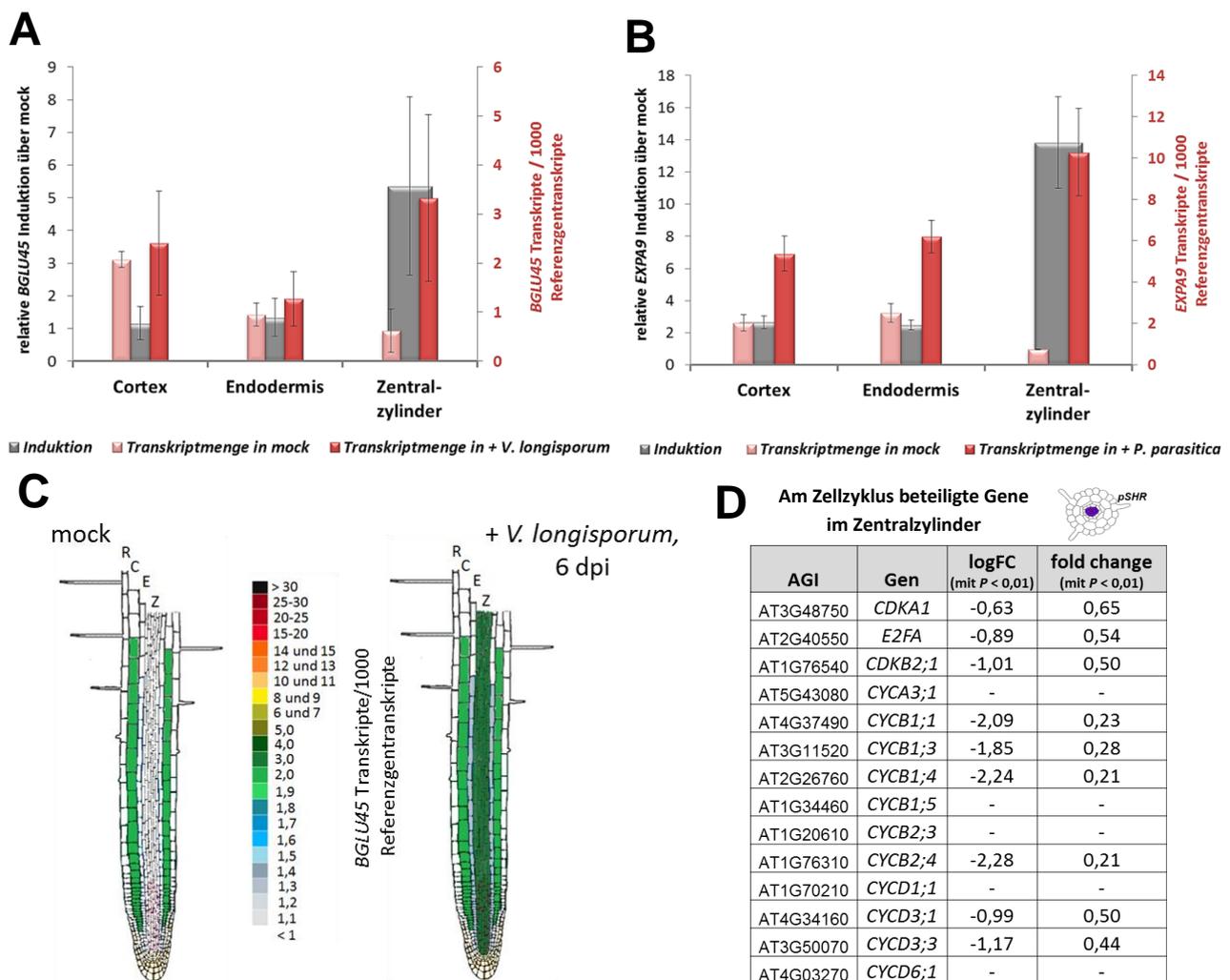


Abb. 50: **Differentielle Genexpression von *BGLU45*, *EXPA9* und am Zellzyklus beteiligter Gene.**

Die expressionellen Veränderungen von *BGLU45* und *EXPA9* sind für den Zeitpunkt 6 dpi (*V. longisporum*) angegeben (A, B). Die Wurzelzellschichten Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 3$ ). Induktionswerte im Zentralzylinder mit  $p\text{Adjust} \leq 0,05$  (BH-Methode). (C) stellt eine andere Art der Darstellung vor: Die Werte der *BGLU45* Transkripte / 1000 Referenzgenstranskripte wurden anhand einer Skala in Farben unterteilt. In einer Wurzelsskizze konnten diese Farben in die entsprechenden Zellschichten eingetragen werden. Durch die Abbildung beider Zustände (mock und + *V. longisporum*, 6 dpi) nebeneinander fällt anhand des Farbwechsels im Zentralzylinder von weiß zu grün sofort auf, dass *BGLU45* während der Infektion im Zentralzylinder expressionell induziert wurde. Abbildungsteil (D) zeigt die differentielle Genexpression von Genen, die eine Beteiligung am Zellzyklus haben, im Zentralzylinder (Unbeeinträchtigte Genexpressionen sind mit - gekennzeichnet).

Obwohl also *V. longisporum* zum Zeitpunkt 6 dpi den Zentralzylinder nicht direkt penetrierte, waren dort viele DEG zu finden. Abb. 50 gibt ein paar Beispiele. Zum Zeitpunkt 6 dpi war *BGLU45* im Zentralzylinder stärker induziert als in Cortex oder Endodermis. Ebenso lagen in der infizierten Probe die meisten Transkripte des Gens im Zentralzylinder vor. Eine putative Beteiligung von *BGLU45* an der Lignifizierung wurde bereits im Versuch mit *P. parasitica* angesprochen.

Expansine sind eine Gruppe extrazellulärer Proteine, die direkt die mechanischen Eigenschaften der pflanzlichen Zellwand modifizieren können, indem sie diese auflockern für eine anschließende Turgordruck-vermittelte Zellstreckung und andere Entwicklungsprozesse, bei denen eine Modifikation der Zellwand nötig ist (Zur Übersicht siehe Cosgrove 2000, Cosgrove, 2015). Das Gen *EXPA9*, das für eines der Expansine codiert, wurde 6 dpi mit *V. longisporum* stark und spezifisch im Zentralzylinder induziert (Abb. 50 B) und ähnlich verhielt es sich mit *EXPA11* (Daten nicht gezeigt). Die Induktion dieser Expansine im Zentralzylinder könnte auf eine Modifikation der Zellwand in dieser Schicht während der Infektion hinweisen.

Ebenso war auffällig, dass im Zentralzylinder die Expression von Genen reprimiert war, die den Zellzyklus fördern, wie etwa *CDKA1* und *E2FA* (Abb. 50 D). Diese Beobachtungen wurden ebenfalls bei der Infektion mit *P. parasitica* (2,5 hpi) gemacht.

#### **5.4.3.3 Gene des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus wurden in allen Zellschichten induziert**

In der mock-Probe waren, wie auch schon bei dem Versuch mit *P. parasitica* beobachtet, mehr *CYP79B2*-Transkripte im Zentralzylinder als im Cortex. *CYP79B2* wurde so induziert, dass 6 dpi mit *V. longisporum* in allen Zellschichten vergleichbar viele Transkripte des Gens vorhanden waren. Ähnlich verhielt es sich bei vielen anderen Genen des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus (Abb. 51, Abb. S8). Fast alle Gene des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus wurden durch *V. longisporum* induziert. Anhand der Transkriptmengen in den infizierten Proben kann man sagen, dass für die meisten Gene des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus keine eindeutigen zelltypspezifischen Schwerpunkte festzustellen waren zum Zeitpunkt 6 dpi. Nur *CYP71A12* hatte 6 dpi einen Schwerpunkt an Transkripten im Cortex, allerdings mit einem großen Fehlerbalken.

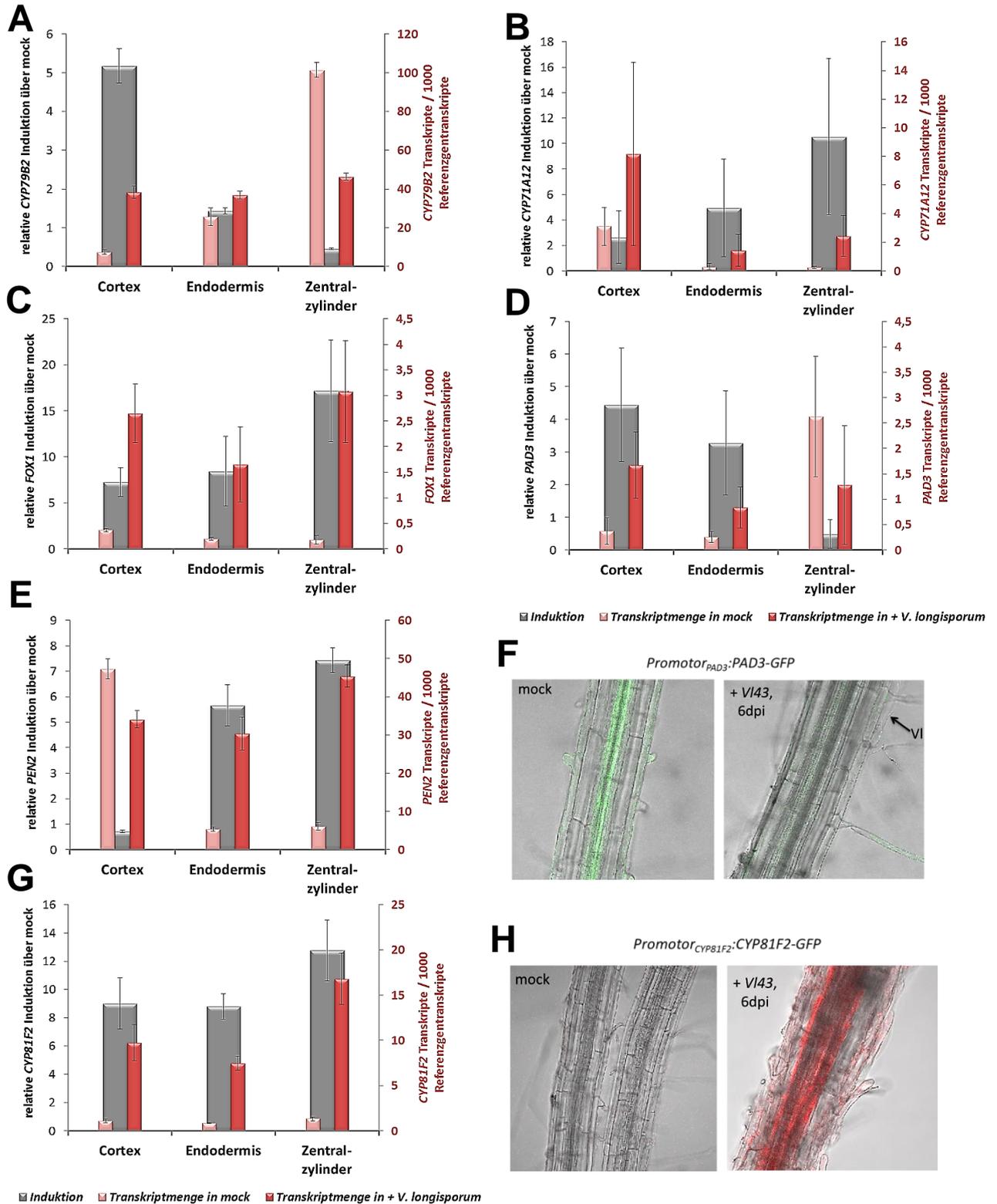


Abb. 51: Induktion von Genen des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus.

Die expressionellen Veränderungen einiger Gene, die für den Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus wichtig sind, sind für den Zeitpunkt 6 dpi (+ *V. longisporum*) angegeben (A, B, C, D, E, G). Die Wurzelzellschichten Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken ( $n = 3$ ). Bei (F) und (H) handelt es sich um CLSM-Aufnahmen unter Fluoreszenzlicht. Von der Reporterlinie Promotor<sub>PAD3</sub>:PAD3-GFP wurde ein Wurzelsegment 6 dpi (+ VI43) unter GFP anregendem Licht untersucht (F). Der Pfeil deutet auf eine Pilzhyphe. Ein Wurzelsegment der Reporterlinie Promotor<sub>CYP81F2</sub>:CYP81F2-RFP wurde 6 dpi (+ VI43) unter RFP anregendem Licht untersucht (H). Zu jeder CLSM-Aufnahme ist eine nicht-infizierte Kontrolle (mock) unter entsprechender Fluoreszenzanregung gezeigt, wobei in (H) zwei nebeneinanderliegende Wurzelsegmente zu sehen sind.

*CYP81F2* wurde so induziert, dass 6 dpi die meisten Transkripte im Zentralzylinder vorhanden waren. Auch die CLSM-Aufnahme mit der Reporterlinie *Promotor<sub>CYP81F2</sub>:CYP81F2-RFP* zeigte 6 dpi mit *V. longisporum* das stärkste RFP-Signal im Kern der Wurzel, wohingegen kein Fluoreszenz Signal in der mock-Kontrolle detektierbar war.

In einem unabhängigen Versuch konnte nach Isolation der zellschichtspezifischen mRNA aus *pPEP* und *pSHR* mittels TRAP in einer qRT-PCR verifiziert werden, dass *CYP79B2* am stärksten im Cortex und *CYP81F2* am stärksten im Zentralzylinder induziert wurde während der Infektion mit *V. longisporum* (Abb. S9).

Von *PAD3* lagen in der mock-Kontrolle die meisten Transkripte im Zentralzylinder vor (Abb. 51 D) und auch in der Reporterlinie *Promotor<sub>PAD3</sub>:PAD3-GFP* war in der mock-Kontrolle das stärkste GFP-Signal im Zentralzylinder (Abb. 51 F). Allerdings ging die Fluoreszenz im Zentralzylinder 6 dpi mit *V. longisporum* sehr stark zurück. Auch dies steht in Übereinstimmung mit der Messung im Inf-TRAP-Seq, denn in der infizierten Probe wurde *PAD3* expressionell im Zentralzylinder reprimiert. Wenn sich dadurch auch die Proteinmenge verringert habe sollte, ist das schwächere GFP-Signal in der infizierten Reporterpflanze erklärbar.

## 5.5 Validierung von Inf-TRAP-Seq Daten über eine Charakterisierung von Abwehrmechanismen gegen *V. longisporum*

Experimentell wurde analysiert, ob Gene, deren Expression während der Infektion mit den Pathogenen *P. parasitica* und *V. longisporum* in der Wurzel induziert war, bei der Abwehr pathogener Bodenorganismen von Bedeutung sind. Das anfangs beschriebene Infektionssystem auf Erde wurde verwendet, um verschiedene *Arabidopsis* Linien in „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Ansätzen mit dem Modellerreger *V. longisporum*, stellvertretend für pathogene Pilze, zu infizieren. Die Menge an pilzlicher DNA in den Blattrosetten wurde jeweils quantitativ erfasst.

### 5.5.1 Tryptophan-abhängige Sekundärmetaboliten mit antimikrobiellen Eigenschaften trugen zur Resistenz gegen *Verticillium* bei

Die *cyp79b2/cyp79b3* Doppelmutante, bei der kaum IAOx - eine Vorstufe zu Camalexin, ICN-Derivaten und IGs - vorhanden ist, war wesentlich susceptibler gegenüber *Vl43* als der Wt, was die größere Menge an Pilz-DNA innerhalb der Pflanzen belegte (Abb. 52).

Der Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolismus spielt also bei der Verteidigung gegen diesen Pilz eine Rolle. Aber welche abwärts des IAOx gelegene Biosynthesewege sind nun im Detail dafür wichtig?

Bei der Dreifachmutante *cyp71a12/a13/a18* kommt der Biosyntheseweg, der zu Camalexin führt, zum Erliegen. Dennoch war die Suszeptibilität zweier unabhängiger *cyp71a12/a13/a18* Mutanten im Vergleich zum Wt nicht signifikant verändert (Abb. 52). Einer der TF, die die Biosynthese von Camalexin fördernd beeinflussen, ist NAC042 (Saga *et al.*, 2012). Eine Charakterisierung der verwendeten Verlustmutante *nac042* und der Überexpressionslinie *NAC042 OE* ist im Anhang zu finden (Abb. S24). In Infektionsversuchen verhielt sich *nac042* wie der Wt, wohingegen *NAC042 OE* ein höheres relatives Frischgewicht und signifikant weniger Pilz-DNA in sich hatte als der Wt (Abb. 52, Abb. S25). Auf den Biosyntheseweg, der zu IGs führt, haben die drei TF MYB34, MYB51 und MYB122 einen fördernden Einfluss. Während *MYB51* durch die *VI43*-Infektion in allen Schichten induziert wurde, wurde *MYB34* expressionell reprimiert (Abb. S8). In der Dreifachmutante *myb34/51/122* konnte sich *VI43* signifikant besser ausbreiten als im Wt, was die größere Menge an Pilz-DNA in den Pflanzen belegt (Abb. 52).

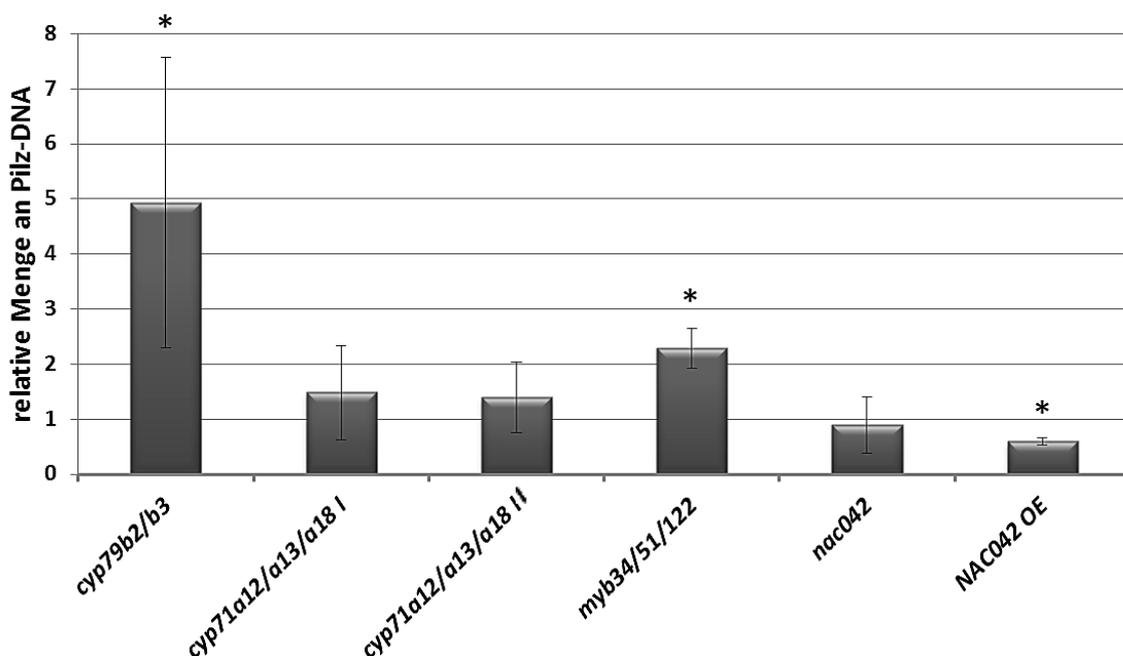


Abb. 52: **Der Trp-abhängige Sekundärmetabolismus und sein Einfluss auf *V. longisporum*.**

„Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Linien wurden mit *V. longisporum* infiziert. 21 dpi wurde die Menge an Pilz-DNA in den Blattrosetten über qRT-PCR ermittelt. Die Menge an Pilz-DNA in den Linien *cyp79b2/b3*, *cyp71a12/a13/a18 I*, *cyp71a12/a13/a18 II*, *myb34/51/122*, *nac042* und *NAC042 OE* wurde relativierend zur Menge an Pilz-DNA im Wt (= 1) dargestellt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte aus jeweils 3 biologischen Replikaten. Standardabweichung als Fehlerbalken (\* Student's *t*-test,  $P \leq 0,05$ ; wobei Wt Bezugsgruppe ist). In diesem Versuch wurde das relative Frischgewicht 21 dpi ebenfalls bestimmt (vgl. S25).

## 5.5.2 Potentielle Regulatoren Tryptophan-abhängiger Sekundärmetaboliten verbesserten bei erhöhter Expression Pathogentoleranz

Anhand des Pathophänotyps der *myb34/51/122*-Triple Mutante wurde die Vermutung aufgestellt, dass IGs bei der Abwehr von *V. longisporum* wichtig sein könnten. Dies musste mit weiteren Mutanten überprüft werden, weil das Trio aus MYB34/51/122 auch die Expression von *CYP79B2* bzw. *CYP79B3* reguliert (Frerigmann und Gigolashvili, 2014). Deshalb kann die erhöhte Suszeptibilität von *myb34/51/122* möglicherweise nicht nur auf den verminderten IGs Spiegel zurückzuführen sein, sondern auch darauf, dass der komplette Trp-abhängige Sekundärmetabolismus negativ beeinträchtigt ist.

### *ERF#106* als potentieller Regulator von *CYP81F2*

Vor kurzem publizierten Xu *et al.*, (2016), dass ein Mitglied der ERF-Familie, namentlich *ERF#103*, beteiligt ist an der Steuerung der Expression von *CYP81F2*, dessen Genprodukt einen der letzten Umwandlungsschritte bei der Synthese von antimikrobiellen IGs katalysiert (Bednarek *et al.*, 2009; Bednarek, 2012). In dieser Dissertation wurden Überexpressionslinien des nah verwandten *ERF#106* in qRT-PCR Studien untersucht.

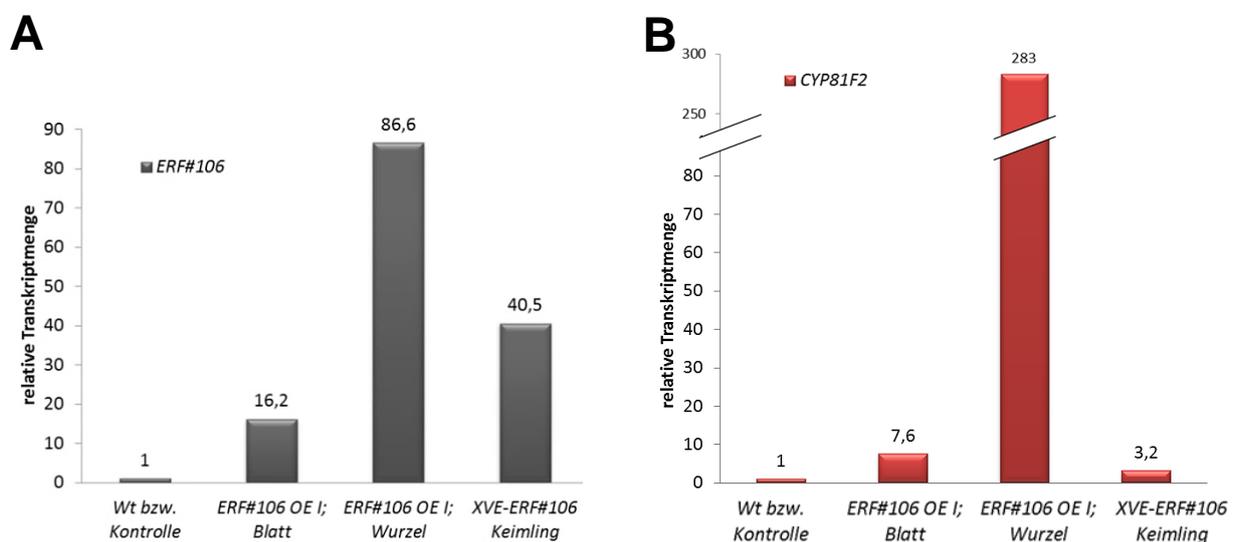


Abb. 53: Eine Überexpression von *ERF#106* führte zu mehr *CYP81F2*-Transkripten.

In qRT-PCR Analysen wurden die Transkriptmengen der Gene *ERF#106* (A) bzw. *CYP81F2* (B) ermittelt. Die Transkriptmenge des Wt wurde auf 1 gesetzt, die anderen Proben (Blatt- oder Wurzelmaterial des konstitutiven Überexprimierers *ERF#106 OE I*) wurden diesbezüglich relativierend dargestellt. Die Linie *XVE-ERF#106* hat einen Östradiol-induzierbaren *ERF#106* Promotor. Diese Pflanzen wurden mit dem Hormon  $\beta$ -Östradiol (10  $\mu$ M) behandelt, um die Überexpression von *ERF#106* zu aktivieren. 5 h nach Behandlungsbeginn wurden komplette Keimlinge untersucht. Als Kontrolle dienen *XVE-ERF#106* Pflanzen, die nicht mit  $\beta$ -Östradiol behandelt worden waren. Die Transkriptmenge dieser Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die der  $\beta$ -Östradiol behandelten Gruppe darauf normiert. Eine verstärkte Präsenz von *ERF#106*-Transkripten führte in allen Proben zu mehr *CYP81F2*-Transkripten im Vergleich zum Wt bzw. zur Kontrolle.

Besonders in der Wurzel waren im Vergleich zum Wt im *ERF#106 OE* mehr Transkripte von sowohl *ERF#106* als auch *CYP81F2* vorhanden (Abb. 53). Zur Bestätigung wurde die Pflanzenlinie *XVE-ERF#106* verwendet. An einem  $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Promotor ist die Sequenz von *ERF#106* fusioniert. Nach Applikation des Signalstoffs  $\beta$ -Östradiol (engl.:  $\beta$ -Estradiol) wird der Promotor aktiviert, was zu einer starken zusätzlichen Expression von *ERF#106* führt. *XVE-ERF#106* wurde entweder mit  $\beta$ -Östradiol oder einer Kontroll-Lösung behandelt. In einer qRT-PCR Analyse wurden die Transkriptmengen von *ERF#106* und *CYP81F2* ermittelt. Die in *XVE-ERF#106* induzierte Überexpression von *ERF#106* resultierte ebenfalls in mehr *CYP81F2*-Transkripten. Grundsätzlich kommt also der TF *ERF#106* als einer der Regulatoren des IGs Biosyntheseweges in Frage. Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, inwieweit diesem und nah verwandten ERF-Transkriptionsfaktoren eine Beteiligung an Pathogenabwehrmechanismen zugesprochen werden kann.

*Durch Überschwemmung bedingte Hypoxie induzierte transient die Expression von ERF#106 und führte zu einer erhöhten Pathogenresistenz*

Eine der Möglichkeiten, wie man die Expression von *ERF#106* in der Pflanze steigern kann, ist eine Behandlung mit dem abiotischen Stress Hypoxie. Nach einer 2,25-stündigen Inkubation der Pflanzen unter Wasser im Dunkeln (= Überschwemmen) wurde eine signifikante Induktion der Gene *ERF#106*, *ERF#107* und *WRKY22* sowohl in der Wurzel als auch im Blatt gefunden (Abb. 54; Abb. S32). 3 h nach dem Ende des Überschwemmens gingen - zumindest im Blatt - die Induktionen wieder zurück und erreichten nahezu den Wert der Kontrolle.

In einem anderen Versuch wurden die Pflanzen nach 2,25 h Überschwemmen aus dem Wasser genommen und nach einer 20 minütigen Erholungsphase zum Trocknen der Blätter, entweder auf den Blättern mit *P. syringae* oder an den Wurzeln mit *V. longisporum* infiziert. Auf die gleiche Weise wurden Pflanzen, die nicht überschwemmt waren, als Kontrolle inokuliert. Im Versuch mit *P. syringae* war der Wt nach der Vorbehandlung mit Überschwemmen deutlich resistenter, weil 3 dpi signifikant weniger CFU (Colony Forming Units) gezählt wurden (Abb. 54 und Abb. S28). Jedoch war dieser Effekt in der Doppelmutante *erf#106/107* sehr stark reduziert und zwischen den Gruppen „+ Überschwemmen“ und „- Überschwemmen“ war kein Unterschied in der CFU-Zahl erkennbar.

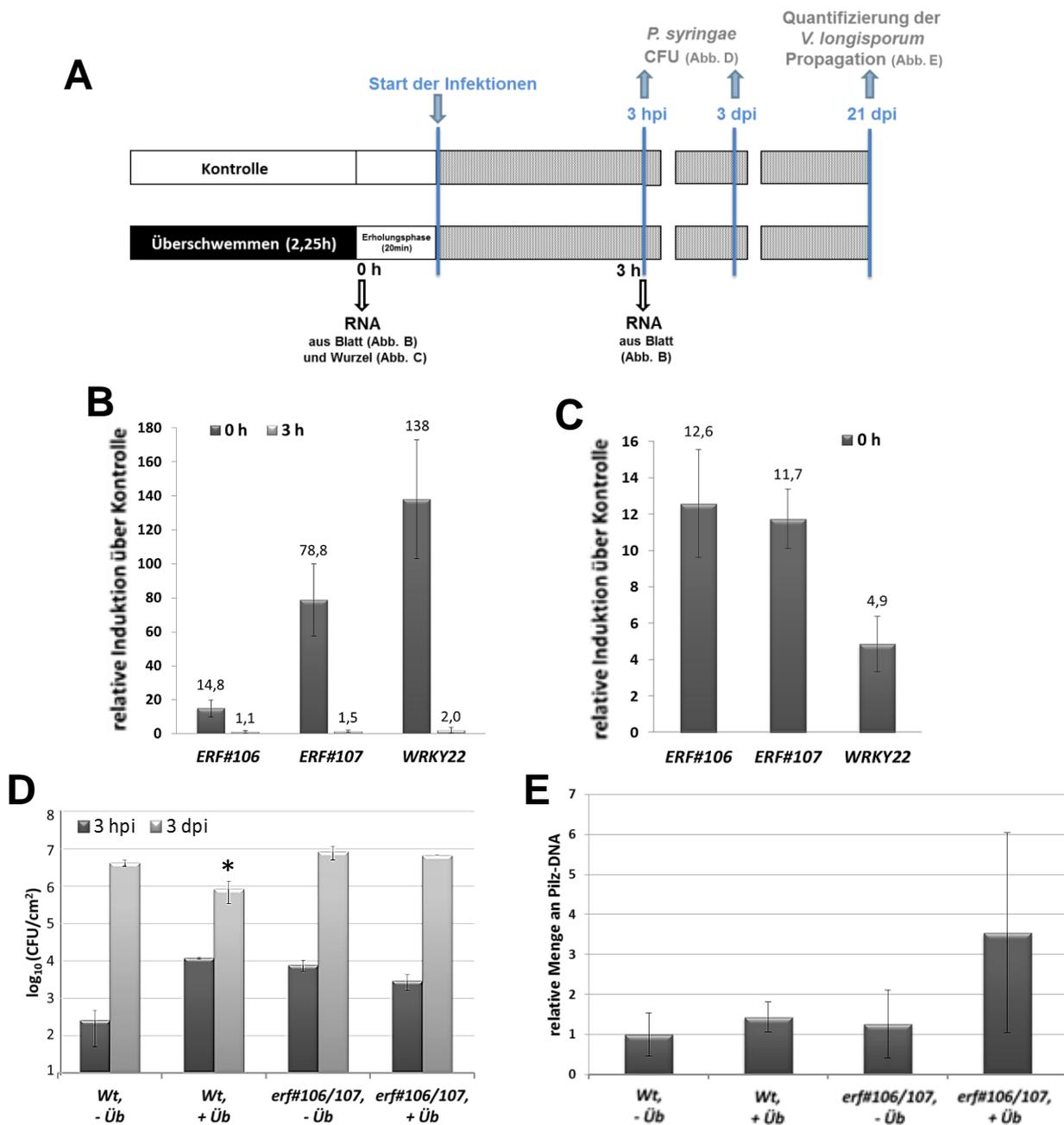


Abb. 54: Die transiente Induktion von *ERF#106*, *ERF#107* und *WRKY22* durch Überschwemmen verbesserte die Resistenz gegen *P. syringae*.

- A: Experiment-Design: Die Pflanzen wurden für 2,25 h im Dunkeln mit Wasser überschwemmt. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Sofort nach der Überschwemmungsphase (0 h) und 3 h danach wurde von beiden Versuchsgruppen Pflanzenmaterial gesammelt zur RNA-Extraktion. Andere Pflanzen des Versuchs wurden nach dem Überschwemmen für 20 min im Licht zum Trocknen gestellt (Erholungsphase). Nach dieser Erholungsphase folgte eine Infektion entweder mit *P. syringae* oder mit *V. longisporum*. 3 hpi wurden an *P. syringae* infizierten Pflanzen die CFU (Colony Forming Units) ermittelt und ebenso 3 dpi. 21 dpi wurde die systemische Ausbreitung von *V. longisporum* quantifiziert.
- B/C: Mit RNA aus Blattmaterial (B) bzw. Wurzelmaterial (C) der überschwemmten und nicht-überschwemmten Pflanzen wurden qRT-PCR Analysen angefertigt. Die Graphiken zeigen die relative Induktion der Gene *ERF#106*, *ERF#107* sowie *WRKY22* zu den Zeitpunkten 0 h bzw. 3 h. Es wurde auf nicht-überschwemmte Pflanzen normiert (Kontrolle = 1). Die über den Balken angegebenen Induktionswerte beziehen sich auf den Mittelwert. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3).
- D/E: Überschwemmte Pflanzen zeigten sich toleranter gegen *P. syringae* nicht aber gegen *V. longisporum*: Üb = Überschwemmung; Der Wt bzw. die Linie *erf#106/107* wurden entweder mit (+) Üb vorbehandelt und inokuliert oder ohne (-) Üb direkt inokuliert. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3) (\* Student's *t*-test,  $P \leq 0,05$ , wobei „- Üb“ Bezugsgruppe ist). Beim Versuch mit *P. syringae* (D) wurden die CFU/cm<sup>2</sup> zu den Zeitpunkten 3 hpi und 3 dpi bestimmt (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Jörn Herfert, Universität Würzburg, durchgeführt). Beim Versuch mit *V. longisporum* (E) wurde 21 dpi die relative Menge an Pilz-DNA in den Blättern über qRT-PCR ermittelt.

Somit scheint *ERF#106* (bzw. *ERF#107*) am erfolgreichen Zustandekommen der durch Überschwemmen induzierten Toleranz beteiligt zu sein. Für den TF WRKY22 ist bereits gezeigt, dass er nach Überschwemmen die Pathogenresistenz verbessern kann (Hsu *et al.*, 2013). Zwar war die transiente und starke Induktion der Gene nach dem Überschwemmen ausreichend, um gegen das Blatt-Pathogen *P. syringae* eine Resistenz zu vermitteln, aber der Effekt der Vorbehandlung war nicht anhaltend genug, um auch die Abwehr gegen *V. longisporum* zu verstärken (Abb. 54 E). Es könnte sogar sein, dass das Überschwemmen in einem solchen Fall eine negative Auswirkung hat, was ein zweites Experiment im Anhang demonstriert (Abb. S26). Deshalb musste, um den Effekt einer erhöhten *ERF#106* Expression auf die *V. longisporum* Infektion zu testen, eine Linie verwendet werden, in der konstitutiv *ERF#106* überexprimiert wurde.

*Eine konstitutive Überexpression von ERF#106 erhöhte die Resistenz gegen Verticillium und ebenso trugen ERF#106-homologe TF zur Toleranz bei*

Bisher ist in der Literatur für die Transkriptionsfaktoren *ERF#106* und *ERF#107* keine Beteiligung an der basalen Immunantwort beschrieben. Zum Zeitpunkt 21 dpi war in der Linie *ERF#106 OE* signifikant weniger Pilz-DNA nachweisbar als im Wt (Abb. 55).

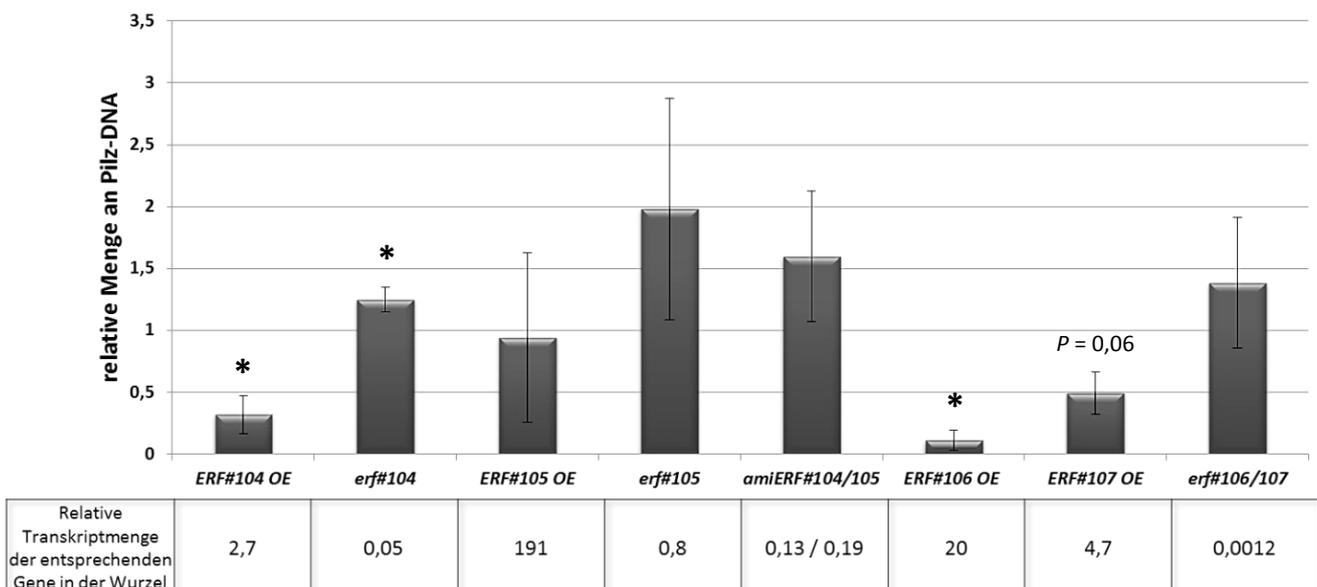


Abb. 55: **Propagation der VI43-Infektion in ERF TF „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Linien.** „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Linien wurden mit *V. longisporum* infiziert. 21 dpi wurde die Menge an Pilz-DNA in den Blattrosetten ermittelt. Die Menge an Pilz-DNA im Wt wurde auf 1 gesetzt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte aus je 3 biologischen Replikaten und die dazugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken (\* Student's *t*-test,  $P \leq 0,05$ ; wobei der jeweilige Wt im Versuch Bezugsgruppe ist). Die Tabelle unter der Graphik zeigt die relative Transkriptmenge der entsprechenden Gene in der Wurzel der Mutanten bzw. überexprimierenden Linien bezüglich des Wt (= 1). In diesem Versuch wurde das relative Frischgewicht 21 dpi ebenfalls bestimmt (vgl. S25).

Ebenso war bei *ERF#107 OE* eine klare Tendenz zu weniger Pilz-DNA vorhanden. Da im Versuch mit diesem Überexprimierer eine statistische Signifikanz von  $P = 0,06$  gegeben war, wurde der Versuch in drei biologischen Replikaten wiederholt. Das Ergebnis hatte dieselbe Tendenz (Abb. S27). Phylogenetisch sind *ERF#106* und *ERF#107* sehr nahe miteinander verwandt (Nakano *et al.*, 2006) und die beiden zeigen eine deutliche Co-Expression (Abb. S29). Folglich könnte eine funktionelle Redundanz vorhanden sein. Daher wurden die Einzelmutanten (*erf#106* und *erf#107*; T-DNA Insertionslinien) miteinander gekreuzt (Walper *et al.*, 2016). Obwohl in der daraus entstandenen Linie (*erf#106/107*) die Expression beider Gene vollständig ausgeschaltet war, konnte sich *V. longisporum* nicht signifikant besser ausbreiten als im Wt (Abb. 55).

Interessanterweise konnte 6 dpi mit *V. longisporum* keine signifikante Induktion von *ERF#106* in der gesamten Wurzel beobachtet werden (Transkriptom), obwohl für das Gen in der Untersuchung mittels Inf-TRAP-Seq in allen Zellschichten eine expressionelle Induktion feststellbar war (vgl. Abb. 56). Dies ist also ein weiteres Beispiel dafür, dass Daten, die man aus dem Transkriptom erhält, nicht unbedingt mit Daten aus dem Translatom übereinstimmen.

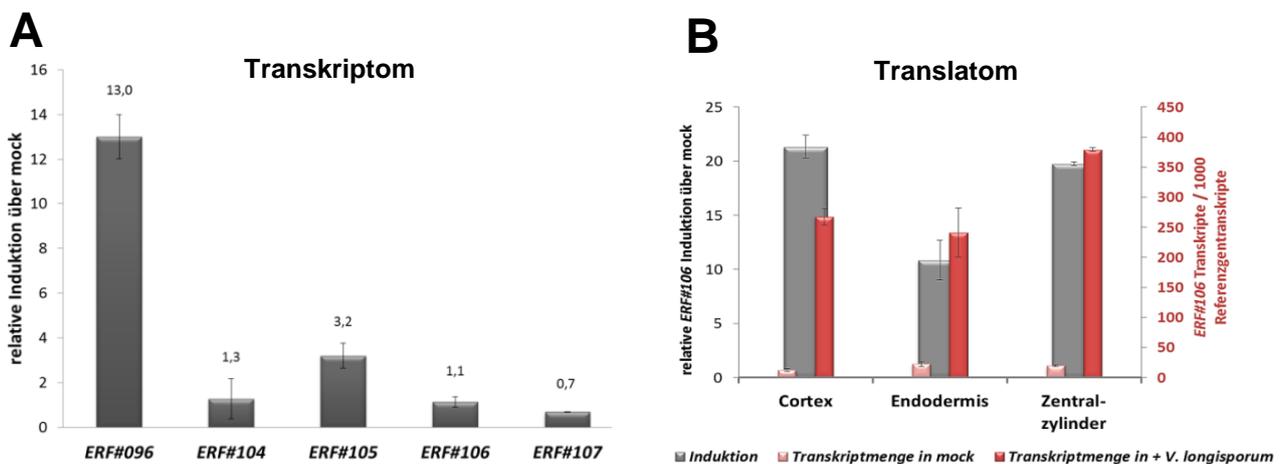


Abb. 56: **Gruppe IX ERF-Transkriptionsfaktoren und deren Induktion durch die Infektion mit VI43.**

A: Pflanzen des Wt wurden im sterilen Infektionssystem auf Petrischalen infiziert (+ VI43). 6 dpi wurde Wurzelmaterial für eine qRT-PCR Analyse verwendet (Transkriptom). Abgebildet ist die relative Induktion in der gesamten Wurzel im Vergleich zur mock-Behandlung (= 1). Die Zahlen über den Balken beziehen sich auf den Mittelwert. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3).

B: Die expressionellen Veränderungen von *ERF#106* im Translatom sind für den Zeitpunkt 6 dpi (+ VI43) angegeben. Die Wurzelzellschichten Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). Induktionswerte:  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,01$  (BH-Methode).

Der TF ERF#104 ist ein wichtiger Regulator der basalen Immunantwort und nahe mit dem TF ERF#106 verwandt (Nakano *et al.*, 2006; Bethke *et al.*, 2009). Für ERF#104 konnte weder im Transkriptom, noch im Translatom eine Induktion 6 dpi mit *V. longisporum* festgestellt werden. Dennoch erhöhte die Überexpression von *ERF#104* die Toleranz gegen das Pathogen und die Linie *erf#104* war susceptibler (Abb. 55). In einer in dieser Dissertation hergestellten *artificial microRNA* (*amiRNA*) Linie war es möglich die Expression der beiden homologen Gene *ERF#104* und *ERF#105* parallel durch RNAi herunter zu regulieren (Abb. S20). Während die Überexpression von *ERF#105* zu keiner signifikant verbesserten Resistenz führte, waren die Linien *erf#105* und *amiERF#104/105* gering susceptibler als der Wt.

Insgesamt konnte also für die im Inf-TRAP-Seq festgestellten Induktionen auffällig vieler Gene des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus eine biologische Relevanz belegt werden unter Zuhilfenahme von mehreren unabhängigen „*Loss-of-function*“ und „*Gain-of-function*“ Ansätzen.

## 5.6 Zellschichtspezifische Reaktionen der Wurzel auf Bodenorganismen im Vergleich

Es gab sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in den Reaktionen der Wurzel auf den mutualistischen Pilz *P. indica* und die beiden Pathogene *P. parasitica* sowie *V. longisporum*. Da innerhalb der Wurzel die expressionelle Reaktion auf *P. indica* im Cortex am stärksten war, wurde zunächst diese Zellschicht exemplarisch ausgewählt, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den induzierten DEG festzustellen (Abb. 57).

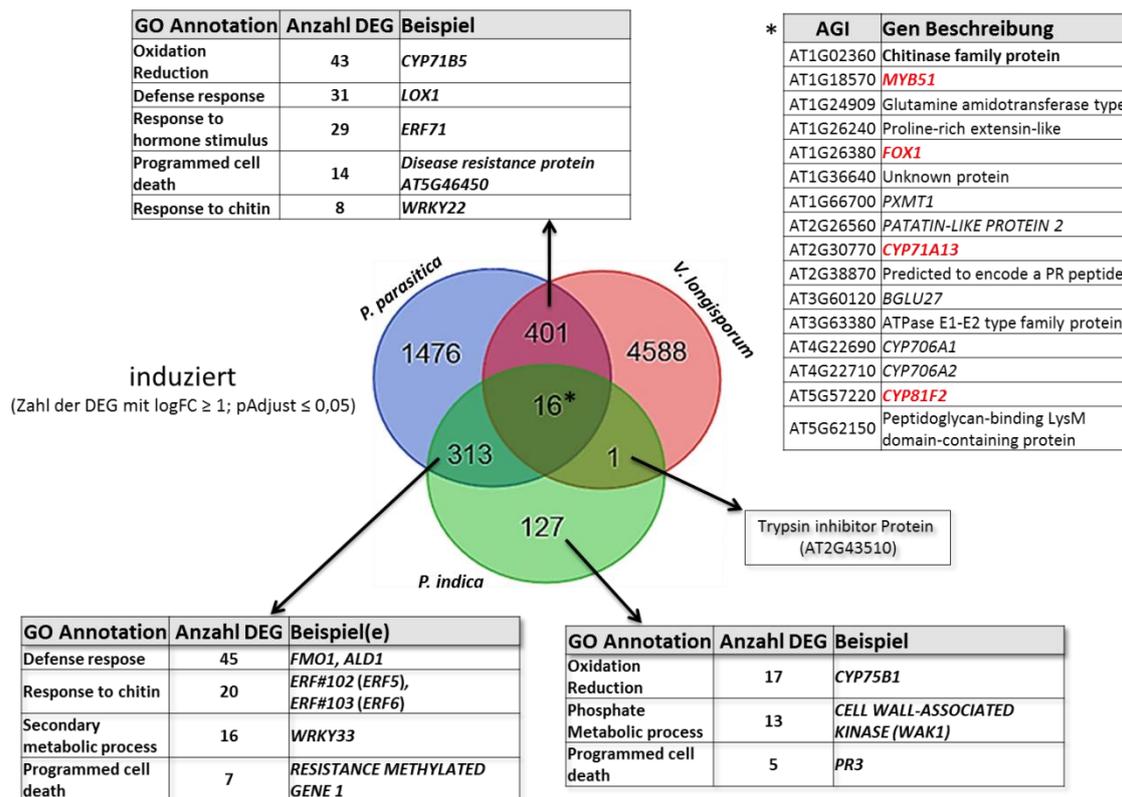


Abb. 57: Vergleich der durch *P. parasitica*-, *V. longisporum*- und *P. indica*-bedingten Geninduktionen im Wurzelcortex.

Für die Erstellung des Venn-Diagramms wurden alle induzierten Gene im Cortex mit  $\log_{2}FC \geq 1$ ,  $P \leq 0,05$  ausgewählt. Die Inokulationsbedingungen sind farblich markiert: blau = *P. parasitica* (2,5 hpi), rot = *V. longisporum* (6 dpi), grün = *P. indica* (3 dpi). Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Zellschichten lassen sich erkennen: In Schnittmengen sind die DEG angegeben, die nach der Behandlung mit zwei oder mehr Mikroorganismen gefunden wurden. Die Anzahl an Genen, die spezifisch nur durch einen Mikroorganismus induziert wurden, ist in der Menge zu finden, die sich mit keiner anderen schneidet. Die Pfeile deuten Beispiele für DEG in der entsprechenden Schnittmenge an. Rot markierte Gene in der gemeinsamen Schnittmenge \* haben eine Beteiligung am Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus.

Die differentielle Genexpression einer putativen Chitinase (AT1G02360) soll als Beispiel für ein Gen gegeben sein, das nach Inokulation mit allen drei Mikroorganismen induziert wurde, wenn auch in unterschiedlicher Stärke. *DIN2* war dagegen ein Gen, das im Laufe der Pathogeninfektionen expressionell induziert wurde, nicht aber durch die Besiedlung mit *P. indica* (Abb. 58).

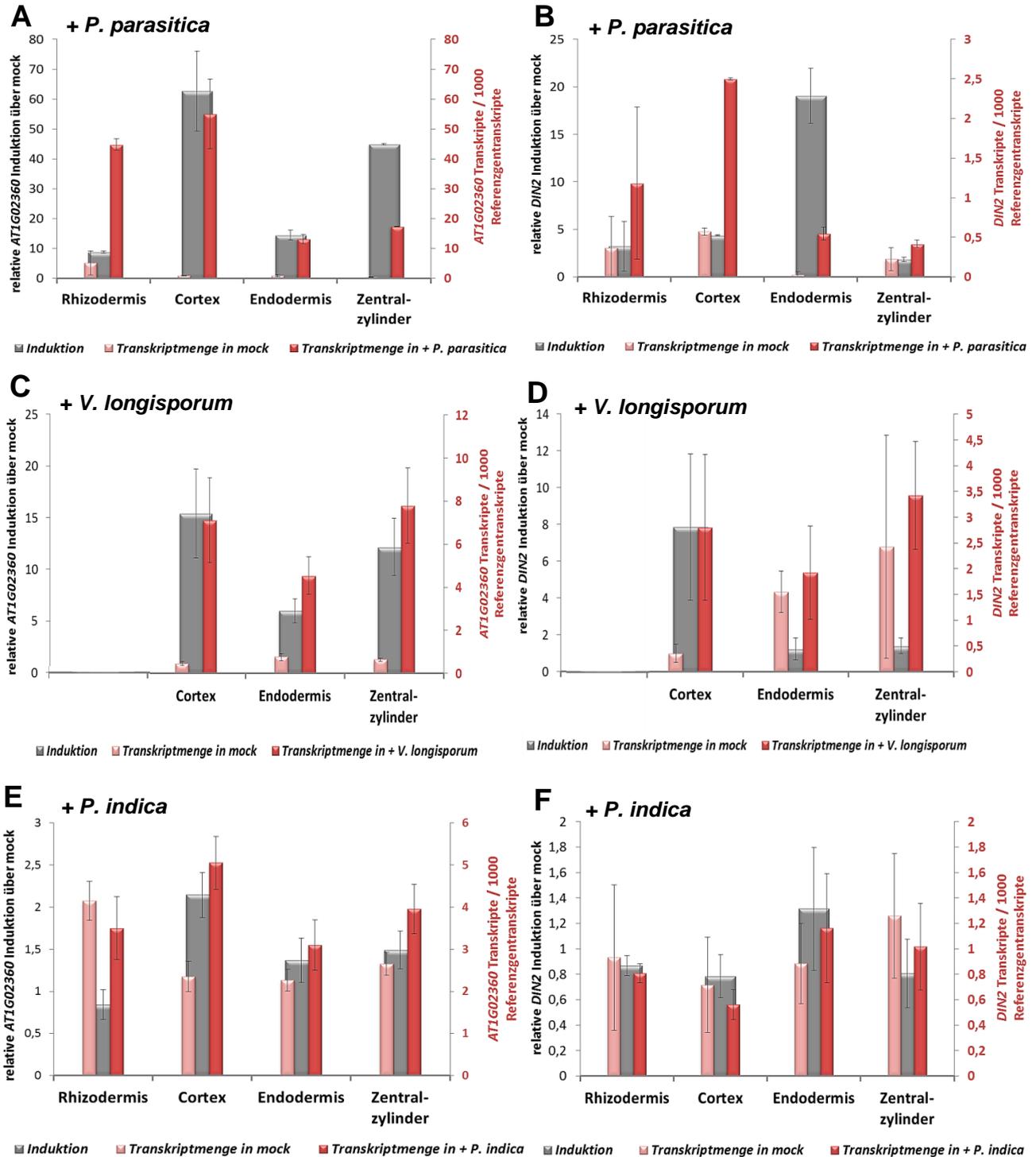


Abb. 58: Vergleich der durch *P. parasitica*-, *V. longisporum*- und *P. indica*-bedingten Induktion von AT1G02360 und *DIN2*.

Die expressionellen Veränderungen der Gene AT1G02360 (codiert für eine putative Chitinase) und *DIN2* sind für folgende Inokulationsbedingungen angegeben: *P. parasitica* (2,5 hpi), *V. longisporum* (6 dpi) und *P. indica* (3 dpi). Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden jeweils getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an: bei den Versuchen mit *P. indica* und *V. longisporum*  $n = 3$  und beim Versuch mit *P. parasitica*  $n = 2$ .

### *Das Pathogen-responsive Gen DIN2 könnte in die Pilz-Abwehr involviert sein*

Bereits Iven *et al.* (2012) haben darauf hingewiesen, dass *DIN2* ein durch *VI43* stark induziertes Gen ist. In dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden und darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch andere Pathogeninfektionen zu einer starken *DIN2*-Induktion führen (Abb. 59 A, B). Dagegen wurde *DIN2* kaum in der mutualistischen Interaktion mit *P. indica* induziert – weder in der gesamten Wurzel (Abb. 21) noch in einer der Zellschichten (Abb. 58). Prinzipiell lässt dies die Vermutung zu, dass dieses Gen spezifisch bei der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle spielen könnte. Es wurden mit *DIN2 OE #1* und *DIN2 OE #2* zwei voneinander unabhängige und starke Überexpressionslinien generiert und charakterisiert (Klonierungsprotokoll siehe Anhang 8.8). In der Wurzel der Überexpressionslinien war ein Vielfaches mehr an *DIN2*-Transkripten vorhanden als im Wt (Abb. 59 C) und in Blättern war die Überexpression sogar noch deutlicher (Abb. S23). Demnach müssten die Überexpressionslinien im Laufe der Infektion mit *V. longisporum* einen klaren Unterschied zum Wt zeigen, wenn *DIN2* tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Abwehr spielt. Unter normalen Bedingungen zeigten die beiden *DIN2 OE* Linien im Phänotyp keinen auffälligen Unterschied zum Wt. Nach der Inokulation mit *V. longisporum* im Infektionssystem auf Erde wurde 21 dpi die Pilz-DNA in den Blattrosetten quantifiziert. Dabei war im stärkeren der beiden *DIN2 OE* signifikant weniger Pilz-DNA als im Wt enthalten (Abb. 59 D; Abb. S33). Dagegen war beim schwächeren *DIN2 OE #1* kein Unterschied zum Wt erkennbar. Es schien so, als würde nur eine sehr starke Überexpression von *DIN2* eine Resistenz vermitteln können. Die beiden *DIN2 OE* wurden ebenfalls mit *P. indica* im Infektionssystem auf Erde inokuliert (Abb. 59 E, F). Anders als beim Versuch mit *V. longisporum*, lässt sich die Interaktion mit *P. indica* nicht über die Bestimmung der Pilz-DNA im Blatt quantifizieren, da der Pilz nur Cortex/Rhizodermis der Wurzel penetriert und sich nicht systemisch bis in den Spross ausbreitet (Deshmukh *et al.*, 2006; Waller *et al.*, 2008, Stein *et al.*, 2008). Deshalb wurden die Effekte auf die Pflanzen über die Messung der grünen Blattfläche und des relativen Frischgewichts analysiert. Vor allem am relativen Frischgewicht war zu erkennen, dass die Interaktion mit *P. indica* beim Wt zu einem signifikant erhöhten relativen Frischgewicht führte. Dieser wachstumsfördernde Effekt war in beiden *DIN2 OE* nicht mehr nachweisbar.

Mit *P. parasitica* wurden keine Studien am Pathophänotyp durchgeführt.

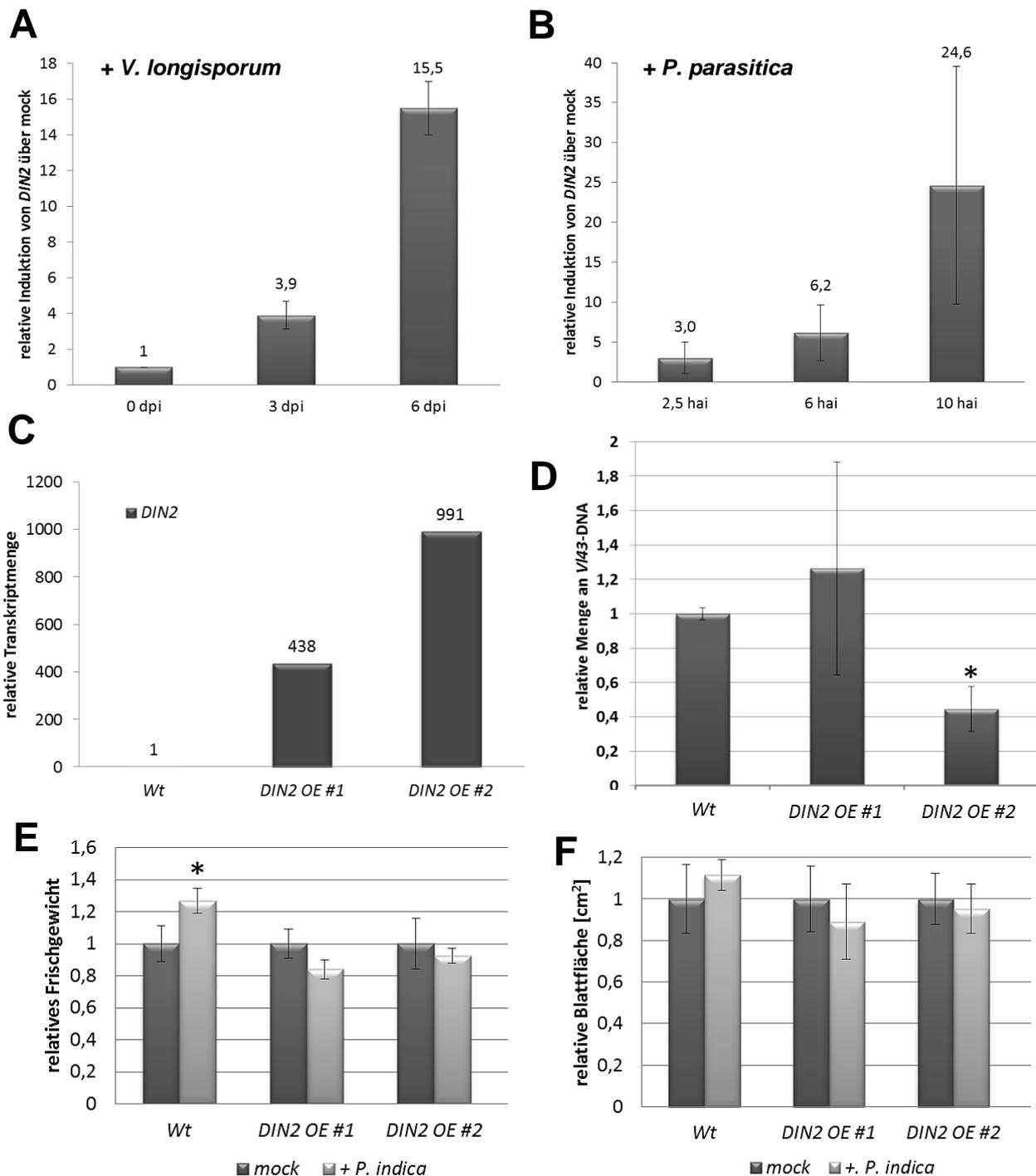


Abb. 59: ***DIN2* war stark Pathogen-induziert und beeinflusste bei starker Überexpression Pilzwachstum.**

- A/B: Pflanzen des Wt wurden im sterilen *in vitro*-Infektionssystem mit *V. longisporum* (A) oder *P. parasitica* (B) infiziert. Gezeigt ist das Ergebnis der qRT-PCR Analysen mit der relativen Induktion von *DIN2* bezüglich der mock-Behandlung (= 1). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von jeweils drei biologischen Replikaten. Die Zahlen über den Balken beziehen sich auf den Mittelwert.
- C: Mit Wurzelmaterial von 14 d alten, auf Agar-Platten angezogenen Keimlingen wurde eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Die relative Transkriptmenge des Gens *DIN2* ist graphisch dargestellt. Die zwei Überexpressionslinien *DIN2* OE #1 und *DIN2* OE #2 hatten deutlich mehr *DIN2* Transkripte als der Wt.
- D: Inokulation mit *V. longisporum*: Menge an *V43*-DNA in den Linien *DIN2* OE #1 und *DIN2* OE #2 sowie im Wt, 21 dpi. Standardabweichungen als Fehlerbalken (\* Student's *t*-test,  $P \leq 0,05$ ; wobei Wt Bezugsgruppe ist).
- E/F: Inokulation mit *P. indica*: relatives Frischgewicht, 21 dpi, 3 biologische Replikate (E). Relative Blattfläche, 14 dpi,  $n = 15$  (F). Standardabweichungen als Fehlerbalken (\* Student's *t*-test,  $P \leq 0,05$ , wobei mock Bezugsgruppe ist).

Demnach könnte durch eine starke Überexpression von *DIN2* allgemein Pilz-Wachstum eingeschränkt werden: nicht nur *V. longisporum* wurde in der Ausbreitung eingeschränkt, sondern auch die Beobachtung, dass der wachstumsfördernde Effekt der Interaktion mit *P. indica* in beiden *DIN2 OE* nicht mehr vorhanden war, könnte darauf zurückzuführen sein, dass der mutualistische Pilz ebenfalls in seinem Wachstum eingeschränkt wurde.

Eine unterschiedliche Reaktion der Wurzel auf mutualistischen und pathogenen Befall machte sich nicht nur anhand von Geninduktionen bemerkbar.

*Während Pathogeninfektionen war das Wachstum der Primärwurzel unterdrückt, während der Interaktion mit P. indica dagegen nicht*

Keimlinge wurden entweder mit *P. indica* oder einem der Pathogene *V. longisporum* oder *P. parasitica* inokuliert. Danach wurde das Wachstum der Primärwurzel über mehrere Tage verfolgt. Am Zeitpunkt 0 hpi wurde die Stelle definiert, an der sich die Wurzelspitze befand. Ab dort wurde der Zuwachs der Primärwurzel gemessen. In den Zeitreihen von Abb. 60 sieht man recht deutlich, dass die Interaktion mit *P. indica* keinen negativen Effekt auf das Wachstum der Primärwurzel hatte, wohingegen das Wachstum der Primärwurzel stark inhibiert wurde bzw. sich das Wachstum bereits ab 2-3 dpi nahezu komplett einstellte bei Infektion mit *V. longisporum* bzw. *P. parasitica*. Um den Wachstums-inhibierenden Effekt genauer analysieren zu können, wurde untersucht, inwiefern die Zellteilung beeinflusst war. Zunächst wurde über gesamt RNA-Extrakte die Expression von *CDKA1*, dessen Genprodukt ein positiver Regulator des Zellzyklus ist, bestimmt: Bei der *P. parasitica* Infektion war *CDKA1* bereits 10 hpi in der Expression reprimiert. Diese Repression war bei der *V. longisporum* Infektion 3 dpi zu beobachten, also genau zu dem Zeitpunkt, als die Primärwurzel sehr deutlich ihr Wachstum einstellte. Ebenso war die *CDKA1* Expression 6 dpi reprimiert. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Interaktion mit *P. indica* die *CDKA1* Expression zu keinem der getesteten Zeitpunkte. In den Inf-TRAP-Seq Datensätzen war es zusätzlich möglich, die Repression der *CDKA1* Expression sowie von weiteren Genen des Zellzyklus speziell im Zentralzylinder zu lokalisieren nach Inokulation mit den beiden Pathogenen (Abb. 40 und Abb. 50). Der Zentralzylinder schließt in der Spitze an das Meristem an. Dort könnte eine Verminderung der Zellteilungsrate konsequenterweise zu reduziertem Wurzelwachstums geführt haben. Ganz anders verhielt es sich 3 Tage nach der Inokulation mit *P. indica*, denn keines der betrachteten Gene (*CDKA1* / *E2FA* / *CDKB2;1* / *CYCA3;1* / *CYCB1;1* / *CYCB1;3* / *CYCB1;4* / *CYCB1;5* / *CYCB2;3* / *CYCB2;4* / *CYCD1;1* / *CYCD3;1* / *CYCD3;3* / *CYCD6;1*) wurde im

Zentralzylinder in seinem Expressionsverhalten beeinträchtigt. Somit konnten die Inf-TRAP-Seq Daten mit erklärbaren phänotypischen Erscheinungen validiert werden.

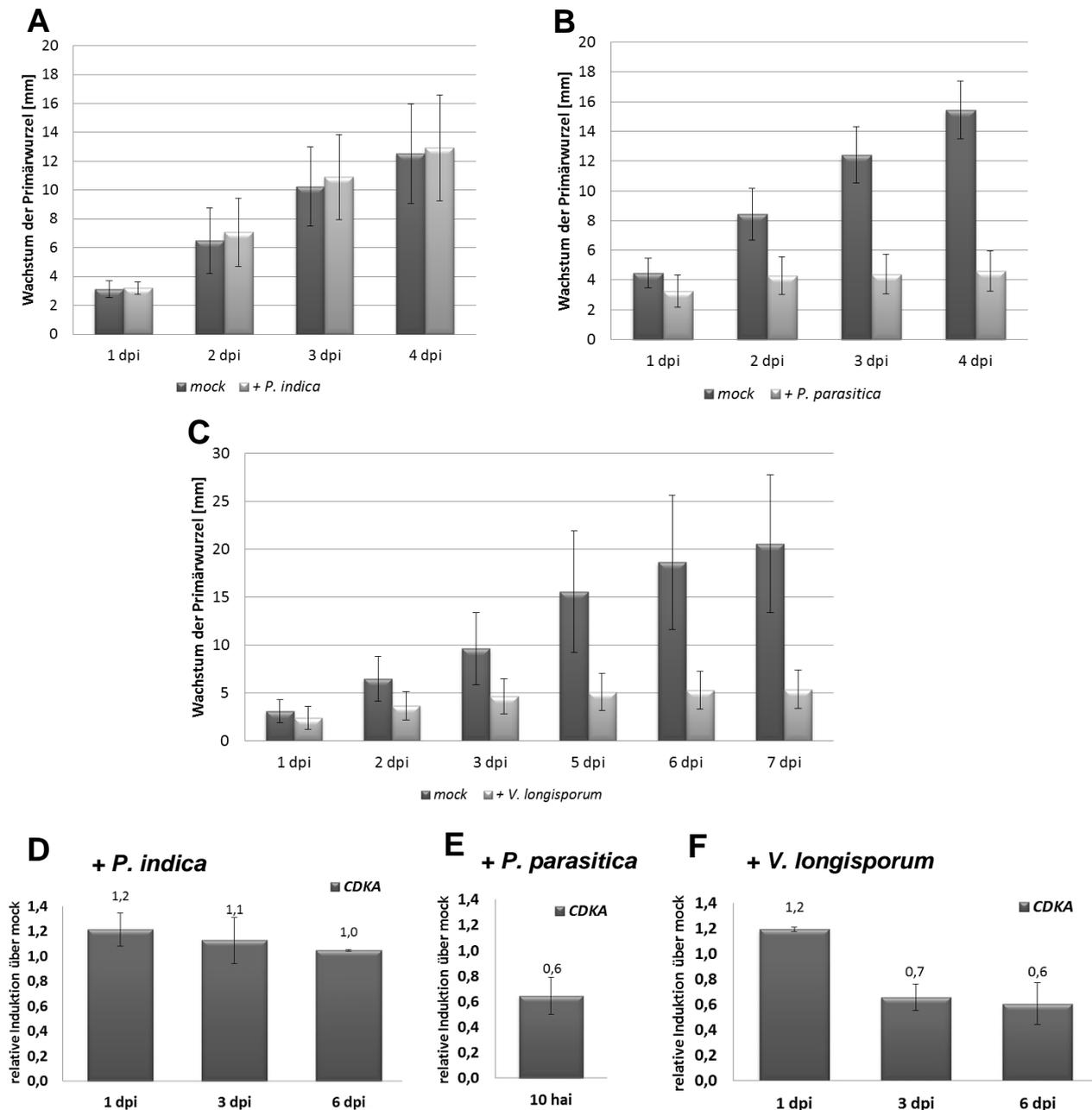


Abb. 60: Wachstum der Primärwurzel und Expression von *CDKA1* nach der Inokulation mit Mikroorganismen im Zeitverlauf.

A, B, C: Zuwachs der Primärwurzel [mm] im Zeitverlauf [dpi]. Als Startpunkt der Messung wurde die Spitze der Primärwurzel bei 0 hpi gewählt. Die mit den Bodenorganismen inokulierte Gruppe ist vergleichend zur mock behandelten Kontrollgruppe dargestellt. Aus dem Wurzelzuwachs mehrerer Pflanzen wurden Mittelwerte gebildet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen wieder. A: Interaktion mit *P. indica* (n = 20); B: Infektion mit *P. parasitica* (n = 20); C: Infektion mit *V. longisporum* (n = 30).

D, E, F: Aus Wurzelmaterial verschiedener Zeitpunkte wurde Gesamt-RNA extrahiert. In einer qRT-PCR Analyse wurde die relative Induktion des Gens *CDKA1* bestimmt. Standardabweichungen als Fehlerbalken (n = 2). Die entsprechenden Inokulationsbedingungen sind in der Graphik bezeichnet.

## 6. Diskussion

Immer ist die Reaktion eines gesamten Organs ein Querschnitt aus den Reaktionen der einzelnen Zelltypen, aus denen sich das Organ aufbaut (Heiman *et al.*, 2014). Unter Umständen verliert man bei der Betrachtung des Organs als Ganzes wichtige Informationen. An der Wurzel mit ihren konzentrisch angeordneten Zellschichten wurde bereits nachgewiesen, dass abiotische Reize, wie z.B. Sauerstoffmangel, Stickstoff- oder Salz-Expositionen, zum Teil zu sehr unterschiedlichen Reaktionen in den einzelnen Zellschichten führen (Mustroph *et al.*, 2009; Dinneny *et al.*, 2008; Gifford *et al.*, 2008). Somit stellte sich natürlich die Frage, ob auch Reaktionen auf Mikroorganismen zelltypspezifische Charakteristika besitzen. Mit Hilfe der in dieser Dissertation entwickelten Labor-Methode Inf-TRAP-Seq war es möglich, diese Frage eindeutig mit „ja“ zu beantworten.

### 6.1 Die Inf-TRAP-Seq Methodik ist ein geeignetes Verfahren zur Analyse zellschichtspezifischer Expression nach mikrobiellem Befall

*Sowohl Infektionssysteme als auch Zeitpunkte für die zellschichtspezifischen Analysen wurden nach kritischen Aspekten ausgewählt*

Die Untersuchung molekulargenetischer Reaktionen in der Wurzel stellt besondere Anforderungen an ein kontrolliertes Infektionssystem. Es sollte einfach in der Handhabung sein und bei genomweiten Analysen eine verlässliche Reproduzierbarkeit von Daten zulassen. Wenn zwei Spezies miteinander interagieren, reagieren sie mit komplexen Mechanismen aufeinander, wobei sehr viele Faktoren die Entwicklung eines Mikroorganismus an seiner Wirtspflanze beeinflussen (Castroverde, 2010). Um die Auswirkungen individueller Schwankungen zu minimieren, wurde nach einem Infektionssystem gesucht, in dem viele Pflanzen zeitgleich untersucht werden können und ein Wachstum unter sterilen Bedingungen möglich ist. Aus den verwendeten sterilen *in vitro*-Infektionssystemen auf Agarmedium erhält man Wurzelmaterial von mehr als 500 Pflanzen pro Replikat auf geringem Raum. Während man in diesen Infektionssystemen frühe transkriptionelle Reaktionen (bis etwa 7 dpi) der Pflanze auf einen biotischen Stress sehr gut untersuchen kann, sind sie für eine Analyse späterer Stadien, wie etwa 21 dpi,

kaum geeignet, da das Medium im Laufe der Zeit austrocknet und die Pflanzen zunehmend Stresssymptome in der verschlossenen Petrischale zeigen (Iven, 2009).

Ein Infektionssystem in Kulturerde wäre eine denkbare Alternative. Der Rahmen eines solchen Systems ist zwar natürlichen Bedingungen näher und spätere Zeitpunkte einer Infektion können untersucht werden, aber es hat den entscheidenden Nachteil, dass es nicht absolut steril gehalten werden kann. Dadurch kann es zu mikrobiellen Kontaminationen aus der Umgebung kommen, die Auswirkungen auf die Entwicklung der Pflanze haben könnten. Außerdem müssen die Wurzeln aus dem Boden gezogen und gesäubert werden, bevor sie in Analyseverfahren zur Genexpression eingesetzt werden können. Aufgrund des zusätzlichen Stresses könnte sich das Transkriptionsprofil verändern und außerdem nimmt die Prozedur Zeit in Anspruch, wodurch vermehrt mRNA durch pflanzeneigene RNasen degradiert wird. Demnach ist ein Infektionssystem auf Erde nicht für die hochsensitive TRAP-Seq Methodik geeignet. Allerdings kann ein Infektionssystem auf Erde sehr gut für den Vergleich von Pathophänotypen zu späten Zeitpunkten verwendet werden, um damit Feststellungen aus dem Inf-TRAP-Seq zu verifizieren. Mehrere „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Linien wurden mit *V. longisporum* inokuliert und erfolgreich auf veränderte Pathogenresistenzen untersucht. Da bereits Iven *et al.* (2012) Schwierigkeiten hatten, über die Blattfläche signifikante Unterschiede zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit das relative Frischgewicht als Parameter für die Quantifizierung äußerer Symptome bestimmt. Dabei konnte zwar häufig eine Tendenz zu mehr oder weniger Frischgewicht erkannt werden, aber Unterschiede zum Wt waren oft klein und selten signifikant. Die systemische Ausbreitung von *V. longisporum* konnte aber gut über die Bestimmung der Menge an Pilz-DNA innerhalb der Blattrosetten quantifiziert werden. Generell muss man dabei die gesamte Blattrosette verarbeiten, da einzelne Blätter unterschiedlich stark vom Pilz besiedelt sind und eine subjektive Auswahl von Blättern zu wenig reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Trotz des Einhaltens gleicher Inokulations- und Wachstumsbedingungen, waren Infektionsverläufe nicht immer exakt reproduzierbar, denn im Wt waren in unabhängigen Versuchen unterschiedliche Mengen an Pilz-DNA messbar. Als vaskulärer Pilz ist es die Eigenschaft von *V. longisporum*, das Xylem zu besiedeln und dieses kann er bei der bevorzugten Wirtspflanze Raps nach einigen Tagen erreichen (Eynck *et al.*, 2007). Dagegen konnte gezeigt werden, dass bei *Arabidopsis*-Wurzeln das Xylem nicht erreicht wird, solange die Wurzeln unverletzt sind. Das könnte an natürlichen Abwehrbarrieren liegen, die in *Arabidopsis* vorhanden sind. Weil es aber durch den Inokulationsprozess beim Infektionssystem auf Erde zu einer Verletzung des Wurzelgewebes kommt, wird dem

Pilz ein erfolgreiches Eindringen ermöglicht (Iven, 2009). Dabei könnte die Schwere der Verletzungen zwischen Versuchen variiert haben, je nach Konstitution der Pflanzen am Infektionsbeginn, d.h. je stärker die Wurzeln verletzt waren, desto besser könnte anschließend die systemische Ausbreitung des Pilzes gewesen sein.

Dagegen wurden die Wurzeln bei der Inokulation im sterilen *in vitro*-Infektionssystem nie verletzt. Induktionswerte von Markergenen variierten in unabhängigen Versuchen, weil der Pilz wahrscheinlich unterschiedlich stark außen an der Wurzeloberfläche wuchs. Unter anderem könnte das auf ein unterschiedliches Alter der Sporen zurückzuführen sein, denn ältere Sporen keimen nicht mehr gut aus. Um immer gleich alte Sporen zu verwenden, wurden diese nicht in Gefrierkulturen gelagert, wie bei Iven (2009), sondern immer frisch vom Pilzmyzel gewonnen und unmittelbar in die Inokulation eingesetzt. Auf diese Weise ließ sich die Reproduzierbarkeit deutlich verbessern. Da auch nach Inokulation mit frischen *P. indica* Sporen eine Reproduzierbarkeit von transkriptionellen Daten gegeben war, ist das sterile *in vitro*-Infektionssystem als Grundlage für das Inf-TRAP-Seq gut geeignet.

Nach der Etablierung des Infektionssystems mussten geeignete Zeitpunkte für die Analysen gefunden werden. Um die Reaktionen der Wurzel auf biotrophe Lebensphasen unterschiedlicher Mikroorganismen vergleichen zu können, wurde nach Zeitpunkten innerhalb dieser Phase gesucht, an denen eine ausreichend starke transkriptionelle Reaktion in der Wurzel vorhanden war:

*P. indica* löst über MAMPs einige Reaktionen der Basalresistenz (PTI) in der Wurzel aus, kann diese aber wahrscheinlich durch Effektoren supprimieren (Jacobs *et al.*, 2011). Am ausgewählten Zeitpunkt 3 dpi befindet sich die mutualistische Interaktion zwischen Wurzel und *P. indica* in der Etablierungsphase und *P. indica* zeigt biotrophes Wachstum (Jacobs *et al.*, 2011). Die Kinetik einer möglichen Effektor-vermittelten Immunsuppression könnte bald über einen Vergleich der festgestellten Abwehrreaktionen 3 dpi mit denen eines späteren Zeitpunkts (z.B. 6 dpi) angezeigt werden.

Um bei *P. parasitica* eindeutig die biotrophe Phase zu analysieren, müssen sehr frühe Zeitpunkte ausgewählt werden (Attard *et al.*, 2010). Für *P. parasitica* ist gezeigt, dass die Wirtsabwehr supprimiert werden kann durch die Sekretion von Effektoren (Attard *et al.*, 2014). Mit 2,5 hpi wurde ein Zeitpunkt ausgesucht, nach dem die Induktionswerte noch angestiegen sind und dementsprechend die Effektor-vermittelte Immunsuppression wahrscheinlich noch nicht stark ausgeprägt war.

Auf die Infektion mit *V. longisporum* reagierte die Wurzel ab 1 dpi mit heftigen transkriptionellen Reaktionen. Iven (2009) führte eine mikroskopische Bewertung der

Kinetik des Pilzwachstums durch. Nach Applikation der Sporen fand ein langsames Auskeimen statt. Nach 24 Stunden war ein Keimschlauch erkennbar und erst nach drei Tagen war ein enger Kontakt zwischen Wurzel und Myzel hergestellt. Deshalb wurden für die Inf-TRAP-Seq Studie ursprünglich die beiden Zeitpunkte 3 dpi und 6 dpi gewählt. Aus technischen Gründen war der 3 dpi Zeitpunkt nicht auswertbar, da sich die Methodik noch in einer Etablierungsphase befand.

Es kann vorkommen, dass eine Pathogen-Infektion zu einer reduzierten Aktivität der eingesetzten zelltypspezifischen Promotoren führt und somit zu einer geringeren Menge an FLAG-RPL18. Unter der Annahme, dass bei insgesamt weniger isolierter mRNA auch weniger mRNA der Referenzgene isoliert wurde, war es möglich, die Daten auf Referenzgene abzugleichen. Man sollte bei starker Beeinträchtigung der *FLAG-RPL18* Expression angemessene Grenzwerte („*Cutoff*“) bei den Induktionswerten definieren, d.h. nur ausreichend große Veränderungen bezüglich der mock-Referenz auswerten mit einer hohen Signifikanz. Ein Beispiel, bei dem die *FLAG-RPL18* Expression beeinträchtigt war, ist das Experiment mit *V. longisporum*. Aufgrund dessen wurden in den Venn-Diagrammen und *smear plots* nur Ergebnisse erfasst, bei denen in der differentiellen Genexpression eine sehr hohe Signifikanz unter drei biologischen Replikaten vorhanden war ( $p_{\text{Adjust}} \leq 0,01$ ). Trotzdem ist es empfehlenswert, nochmals den Zeitpunkt 3 dpi mit *V. longisporum* anzufertigen, da hier die *FLAG-RPL18* Expression nicht so stark beeinträchtigt war und man damit einige Ergebnisse bzw. Tendenzen aus dem 6 dpi Zeitpunkt validieren könnte. Bei den Experimenten mit *P. indica* und *P. parasitica* war die Beeinträchtigung der *FLAG-RPL18* Expression nicht stark ausgeprägt, deshalb wurde hier in der Signifikanz ein geringerer Grenzwert gewählt ( $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$ ). In der Linie *pPEP* war die *FLAG-RPL18* Transkriptmenge durch die Infektion mit *P. parasitica* zwar etwas verringert, da es sich aber bei 2,5 hpi um einen frühen Zeitpunkt handelte, ist anzunehmen, dass die Proteinmenge weitgehend noch nicht verändert war.

### *Die kritische Evaluation des Inf-TRAP-Seq Verfahrens bestätigte Anwendbarkeit und Vorteile*

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, mit denen sich zelltypspezifische Ereignisse lokalisieren lassen. In dieser Dissertation fiel die Auswahl bewusst auf die TRAP-Methodik, da sie gegenüber anderen Methoden mehrere Vorteile vereint:

1. Techniken, die etwa Reporterlinien mit *Promotor:GUS* oder *Promotor:GFP* Konstrukten verwenden, erlauben zwar eine zelltypspezifische Lokalisation von Genaktivitäten, aber keine genomweite Übersicht. Genauso wie *in situ* Hybridisierung oder Immunohistochemie (Heimann *et al.*, 2014). Die mittels TRAP isolierte mRNA kann dagegen genomweit analysiert werden. Im Anschluss eignen sich *Promotor:GFP* Reporterlinien hervorragend für eine Validierung expressioneller Ereignisse während mikrobiellem Befall anhand ausgewählter Markergene.
2. Andere Methoden, die eine genomweite und zelltypspezifische Analyse erlauben, wie Laser-Mikrodissektion (engl.: Microdissection), Cell Panning oder Cell Sorting (FACS) (siehe Einleitung) könnten potentielle Artefakte hervorrufen, die etwa durch Fixierung des Gewebes oder die Herstellung von Suspensionen einzelner Zellen bedingt sein können (Heimann *et al.*, 2014). Beispielsweise benötigt die Gewinnung von Protoplasten aus Wurzeln für FACS mehr als eine Stunde Zeit (Protokoll nach Birnbaum *et al.*, 2005), was durchaus von Relevanz sein kann, wenn man gezielt eine Stressantwort in der Wurzel untersuchen möchte. TRAP vermeidet durch die Prozedur bedingte Artefakte, weil das Material unverzüglich bearbeitet werden kann.
3. Auf mechanischer Separation basierende Methoden (z.B. FACS) zur Isolation zelltypspezifischer mRNA wurden bereits verwendet, um transkriptionelle Reaktionen auf abiotische Reize in Zellschichten zu identifizieren (Dinneny *et al.*, 2008; Gifford *et al.*, 2008), allerdings wird mit diesen Methoden anschließend das Transkriptom bestimmt. Dagegen ist die Expressionsanalyse mit Hilfe der TRAP ein völlig neuer Ansatz zur Bestimmung des zelltypspezifischen „Translatoms“ (Mustroph *et al.*, 2009), denn es werden post-transkriptionelle Ereignisse beachtet.

Die Transkriptmenge eines mRNA-Typs, die im Transkriptom gemessen wird, korreliert nicht zwangsläufig mit der Synthese des codierten Proteins. Die Translation der mRNA ist ein wichtiger Prozess der Genexpression und zahlreiche Umwelteinflüsse führen zu einer differentiellen und selektiven mRNA-Translation (zur Übersicht siehe Bailey-Serres *et al.*, 2009; Halbeisen und Gerber, 2009; Juntawong und Bailey-Serres, 2012).

Der nahezu in allen Zellen konstitutive 35S-Promotor sorgt für eine sehr starke *FLAG-RPL18* Expression in den Wurzeln der *p35S* Pflanzen. Theoretisch kann man aus den *p35S* Pflanzen über TRAP selektiv alle mRNA-Moleküle isolieren, die sich gerade in der Translationsphase befinden (Translatom). In gesamt RNA-Extrakten befinden sich dagegen alle mRNA-Moleküle, ungeachtet, ob sie gerade translatiert werden oder in einem inaktiven Zustand verweilen (Transkriptom). Vor kurzem konnten Reynoso *et al.*

(2013b) durch den Vergleich der aus *p35S* Pflanzen gewonnenen mRNA des Translatoms mit der mRNA des Transkriptoms zeigen, dass mRNA in der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* während der frühen Phase der Symbiose mit Rhizobien selektiv an Polysomen rekrutiert wird. Diese selektive Translation wurde in drei Kategorien eingeteilt (Reynoso *et al.*, 2013b):

1. Im Translatom werden gleiche Induktionswerte festgestellt wie im Transkriptom:  
Wahrscheinlich kommt diese Balance zwischen transkriptioneller und translationeller Antwort während der Interaktion mit Mikroorganismen dadurch zustande, dass diese Art der mRNA zügig übersetzt wird, sobald sie sich im Cytosol befindet. Es tritt wohl keine Modifikation der mRNA auf, die eine Translation unterbindet.
2. Im Translatom werden höhere Induktionswerte festgestellt als im Transkriptom:  
Dieser Typ mRNA ist zwar in Zellen von nicht-inokulierten Wurzeln vorhanden, aber z.B. als mRNP (Messenger Ribonucleoprotein) komplexiert und sequestriert (mRNP Sequestrierung z.B. in Sorenson und Bailey-Serres, 2014). Der Kontakt mit einem Mikroorganismus gibt einen Stimulus, der dazu führt, dass dieser mRNA-Typ bevorzugt an die Translations-Maschinerie rekrutiert wird.
3. Im Translatom werden geringere Induktionswerte festgestellt als im Transkriptom:  
Dabei handelt es sich um eine Inhibierung der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene, wie z.B. über die microRNA (miRNA) vermittelte RNA Interferenz (RNAi, Fire *et al.*, 1998). Das Binden der miRNA an die Ziel mRNA blockiert die nachfolgende Translation.

Unterschiede zwischen Translatom und Transkriptom konnten auch in der *Arabidopsis*-Wurzel festgestellt werden, nachdem die Pflanzen mit *V. longisporum* oder *P. indica* inokuliert wurden. Für die Gene *DIN2* und *CYP79B2* wurde im Transkriptom von *V. longisporum* bzw. *P. indica* inokulierten Wurzeln eine deutlich höhere Induktion relativ zur mock-Behandlung festgestellt als im Translatom. Das lässt vermuten, dass während der Interaktion mit beiden Pilzen die Expression dieser Gene transkriptionell induziert wurde, aber dass post-transkriptionelle Prozesse die Induktion wieder etwas drosselten. Bei *CYP81F2* wurde im Translatom der *V. longisporum* infizierten Wurzel ein höherer Induktionswert ermittelt als im Transkriptom. Vielleicht bedingte die Infektion, dass die mRNA von *CYP81F2* bevorzugt an die Ribosomen rekrutiert wurde. Dagegen war bei der *P. indica* Interaktion zu beobachten, dass die Translation der *CYP81F2* mRNA supprimiert wurde. Weitere Analysen, auch bezüglich anderer Gene, sind notwendig für eine Verallgemeinerung dieser Ergebnisse.

Vor kurzem wurde anhand von Versuchen mit Pfropfen (engl.: Grafting) gezeigt, dass einige mRNA Moleküle mobil in der Pflanze sind – zumindest über den Phloem-vermittelten Langstreckentransport – und in ihrer Zielzelle translatiert werden könnten (Thieme *et al.*, 2015). Zahlreiche solcher mobilen mRNAs konnten identifiziert werden und unter ihnen befindet sich die mRNA des bereits mehrfach diskutierten *CYP81F2* Gens (Thieme *et al.*, 2015). Die Beobachtung, dass für Proteine codierende mRNA-Moleküle auch in entfernte Gewebe gelangen können, entkoppelt die mRNA-Synthese von der Proteintranslation, d.h. die mRNA muss nicht unbedingt in der Zelle gebildet worden sein, in der sie translatiert wird (Thieme *et al.*, 2015). Zuweilen könnten also Promotor-Studien ein verfälschtes Bild über eine lokalisierte Genexpression liefern (Thieme *et al.*, 2015) und andererseits gibt die TRAP-Methodik keine eindeutige Auskunft, wo die Transkription stattgefunden hat. In den letzten Jahren wurden mehrere Methoden entwickelt, wie man mRNA visualisieren kann und diese beinhalten die Einspritzung markierter (z.B. radioaktiv) Transkripte durch Mikroinjektion oder auf Hybridisierung basierende Methoden unter Verwendung von markierten Gegenstrang-Molekülen (zur Übersicht siehe Weil *et al.*, 2010). Diese Methoden wurden kombiniert mit hochauflösender Mikroskopie, was das Verständnis der Lokalisation von mRNA erheblich revolutionierte (Weil *et al.*, 2010). Vielleicht ließe sich ein mRNA Austausch zwischen Zellschichten über ein derartiges Verfahren nachweisen. Auch die direkte Injektion eines markierten mRNA-Typs, z.B. in den Cortex, und eine anschließende Isolation FLAG-markierter Ribosomen, z.B. aus dem Zentralzylinder wäre ein denkbarer Versuchsansatz, denn ließe sich die markierte mRNA in diesem Translatom nachweisen, dann wäre das ein Beleg, dass dieser Typ mRNA mobil ist.

Die Grundlage der TRAP-Methodik ist dem Protokoll von Zanetti *et al.* (2005) entnommen. Über eine Abänderung der Pufferkonzentration wurden Qualität und Ausbeute der mRNA verbessert. Die mit dem FLAG-RPL18 Protein co-immunopräzipitierte mRNA lässt sich nicht nur in qRT-PCR quantifizieren, sondern auch mittels genomweiter Analysen wie Microarray (z.B. Mustroph *et al.*, 2009) oder RNA-Seq (diese Arbeit; Reynoso *et al.*, 2015). Aus empirischer Erfahrung lässt sich sagen, dass durch das TRAP-Verfahren bei jeder *Promotor:FLAG-RPL18* Linie aus 1,5 g Wurzelmaterial über 100 ng RNA isoliert werden können, was ausreichend für ein RNA-Seq ist. Allerdings sind je Replikat 30 Infektionsplatten nötig, um die erforderlichen 1,5 g Ausgangsmaterial zu erhalten. Das kann bei ausgedehnten Versuchen mit infizierten und nicht-infizierten Pflanzen und mehreren Pflanzenlinien, die parallel bearbeitet werden, schnell in der Handhabung und

im benötigten Platz an die Kapazitätsgrenze stoßen. Das ist der größte Nachteil des Inf-TRAP-Seq Verfahrens.

Ein Amplifikationsschritt mittels PCR ist bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek für die RNA-Sequenzierung nötig, um Adaptor-ligierte Fragmente in ausreichender Zahl zu vervielfältigen und um Index-Primer anzufügen. Jedoch ist die größte Gefahr bei diesem PCR Schritt, dass PCR-bedingte Artefakte auftreten (Planet *et al.*, 2012; Head *et al.*, 2015). Eine PCR Amplifikation mit vielen Zyklen kann das Verhältnis der Fragmente vor und nach der PCR verschieben, so dass die Komplexität von Proben verloren geht und Unterschiede beim Vergleich der Proben geringer erscheinen als sie in Wirklichkeit waren. Beim Inf-TRAP-Seq Versuch mit *P. indica* könnte dies beispielsweise der Fall gewesen sein und deshalb war in der Darstellung der zellschichtspezifischen Markergen-Transkripte keine absolute Isolation aus den Zellschichten belegbar. Wie aber unter anderem in den *smear plots* zu sehen ist, konnten dennoch klare Unterschiede zwischen den Zellschichten identifiziert werden.

Ein allgemeines Problem bei Analysen, die auf zellschichtspezifischen Promotoren basieren, ist, dass die Promotoren nicht absolut zellschichtspezifisch sind. Eine geringe Aktivität kann oft auch in anderen Zellschichten beobachtet werden. Da die für das TRAP-Konzept verwendeten Promotoren gleichfalls in anderen zelltypspezifischen Studien Verwendung fanden (z.B. Brady *et al.*, 2007; Dinneny *et al.*, 2008; Gifford *et al.*, 2008), ist ihre Anwendung für solche Zwecke allgemein akzeptiert.

Sicherlich ist die Rhizodermis eine aufschlussreiche Zellschicht, denn sie kommt als erstes mit Mikroorganismen in Berührung. Von Mustroph *et al.* (2009) wurde zwar mit dem Promotor für *GLABRA 2* (*GL2*) die potentiell Rhizodermis-spezifische *pGL2:FLAG-RPL18* Linie generiert, jedoch erwies sich diese als nicht ausreichend zelltypspezifisch, da auch eine *FLAG-RPL18* Expression in Phloem-Geleitzellen festgestellt wurde (persönliche Mitteilung, A. Mustroph). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Rhizodermis-spezifische Linie generiert. Allerdings wurde die Linie, als *pRHS12* bezeichnet, erst am Ende der Dissertation fertig gestellt und muss noch bezüglich ihrer Eignung für das TRAP-Verfahren getestet werden. Um trotzdem die Reaktion auf Mikroorganismen in der äußersten Schicht untersuchen zu können, wurde auf die Linie *pGL2* zurückgegriffen. Die mit dieser Linie erzielten Ergebnisse wurden aus oben genanntem Grund kritisch evaluiert. Der Versuch zur zelltypspezifischen Analyse während der Infektion mit *P. parasitica* zeigte, dass *pGL2* durchaus verwendet werden kann, denn es wurden aus der Linie speziell Rhizodermis-spezifische Marker-Transkripte isoliert. Zusätzlich wurde bestätigt,

dass die Transkripte der Markergene für den Zentralzylinder in der *pGL2* Probe nicht übermäßig angereichert waren.

Je nach verwendetem Promotor ist die Expression des *FLAG-RPL18* unterschiedlich. Das kann mehrere Gründe haben:

1. Die Stärke der Promotoren kann unterschiedlich sein.
2. Die Zellschichten bzw. die Anzahlen von Zellen, in denen der zelltypspezifische Promotor aktiv ist, sind unterschiedlich groß.
3. Die Aktivität der Promotoren kann auf bestimmte Entwicklungsvorgänge beschränkt sein.

Wegen den Differenzen in der *FLAG-RPL18* Expression in den Zellschichten, kann unterschiedlich viel mRNA aus den verschiedenen *Promotor:FLAG-RPL18 Arabidopsis* Linien isoliert werden, d.h. je schwächer die *FLAG-RPL18* Expression ausfällt, desto geringer ist die mRNA-Ausbeute, die man am Ende der TRAP erhält. Somit ist ein quantitativer Vergleich der Linien untereinander in einer qRT-PCR schwierig. Zusätzlich wird der Vergleich der Zellschichten erschwert, da auch ein einzelnes Referenzgen zum Relativieren nicht gleichmäßig über alle Schichten verteilt ist. Nach längerer Recherche war es mit qRT-PCRs nicht möglich, ein Referenzgen zu finden, das über alle Schichten gleichmäßig verteilt war. Erst mit der RNA-Sequenzierung konnten genomweite Informationen über die Transkriptabundanz erhalten und eine Auswahl mehrerer Referenzgene getroffen werden. Unter der Annahme, dass die Summe aus mehreren Referenzgentranskripten in allen Schichten gleich ist, konnte ein recht guter Vergleich der Zellschichten arrangiert werden. In der entsprechenden Berechnungsformel wurde die Transkriptabundanz jeden Gens auf die Summe der Transkripte von sieben Referenzgenen relativiert. Um die Rechnung noch genauer zu machen, könnte man künftig nach zusätzlichen Referenzgenen suchen.

Die vorgeschlagene Darstellungsform informiert nicht nur über Induktionswerte, sondern gleichzeitig auch über Transkriptmengen. Häufig werden bei Auswertungen nur reine Induktionswerte beachtet (z.B. in qRT-PCR Analysen). Theoretisch kann ein Induktionswert von 5-fach über der mock-Referenz einen Anstieg von 10 auf 50 Transkripte beschreiben oder von 1000 auf 5000. Welcher Anstieg mehr Relevanz hat, ist natürlich immer von der Aufgabe des entsprechenden Genprodukts abhängig, aber es sollte bei der Auswertung von bloßen Induktionswerten beachtet werden, dass sie durchaus zu einer Überbewertung führen können. Bei der hier vorgeschlagenen Abbildungsweise kann sich der Leser mit einem Blick ein Bild machen, wie viele Transkripte eines Gens in jeder Zellschicht vorhanden sind und ob es Schwerpunkte in der

Verteilung gibt. Als alternative Darstellung könnte man die logCPM (Counts per Million) Werte angeben. Hohe logCPM bedeuten dann eine große Transkriptmenge eines mRNA Typs.

Ebenso wurde im Ergebnisteil eine schematische Mappe der Wurzel vorgestellt, in die man Transkriptmengen anhand einer Farbskala eintragen kann. So kann die Verteilung von Transkripten eines Gens über die Zellschichten anschaulich dargestellt werden. Eine zukünftige Darstellung im „Cell Type Specific *Arabidopsis* eFP Browser“ (Mustroph *et al.*, 2009) ist denkbar.

## 6.2 Die Wurzelreaktion auf den Mutualisten *P. indica* unterscheidet sich von der auf Pathogene

Während der endophytisch lebende Pilz *P. indica* in der Lage ist, mit Pflanzen verschiedener Spezies zu interagieren und eine Art Symbiose zu etablieren (Deshmukh *et al.*, 2006; Sherameti *et al.*, 2008a), verursachen *P. parasitica* und *V. longisporum* schwere Schäden an Pflanzen (Johansson *et al.*, 2006a; Rygulla *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2014). Sicherlich gibt es große Unterschiede in der Wachstumskinetik der drei Mikroorganismen. Weil sich aber zum jeweiligen Zeitpunkt der Untersuchung alle drei Mikroorganismen in einer Phase biotrophen Wachstums befanden, wurde ein aussagekräftiger Vergleich der in der Wurzel ausgelösten Reaktionen ermöglicht.

*Welche Unterschiede machen *P. indica* zum Mutualisten und *V. longisporum* bzw. *P. parasitica* zu Pathogenen?*

Während bei der Infektion mit *V. longisporum* bzw. *P. parasitica* auffallend viele Gene, die für den Zellzyklus von Relevanz sind, im Zentralzylinder expressionell reprimiert worden waren (z.B. *CDKA1* und *E2FA*), war deren Expression bei der Interaktion mit *P. indica* unbeeinflusst. *CDKA1* gehört zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen und ist in meristematischem Gewebe an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Sowohl der Übergang zur S-Phase als auch das Einsetzen der Mitose benötigt aktives *CDKA1* (Nowack *et al.*, 2012), d.h. also je weniger aktives *CDKA1* vorhanden ist, desto gehemmter ist der Zellzyklus. Der TF *E2FA* stimuliert auf eine indirekte Art die Zellproliferation, indem er wahrscheinlich einen Zustand der Dedifferenzierung in den Zellen aufrechterhält (Magyar *et al.*, 2012). Da der Zentralzylinder in der Wurzelspitze an das

meristematische Gewebe angrenzt, könnte dort die Repression dieser Gene zu einer Einschränkung der Zellteilung und konsequenterweise des Wurzelwachstums führen. Und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Primärwurzel nach der Inokulation mit den beiden Pathogenen nicht weiter wuchs, wohl aber nach der Inokulation mit *P. indica*.

Es muss also Mechanismen geben, über die die Wirtspflanze den Pilz *P. indica* als Mutualisten erkennt und dementsprechend anders reagiert als auf ein Pathogen. Im Zentralzylinder der *P. indica* besiedelten Wurzel waren insgesamt nur wenige Gene differentiell exprimiert. Deshalb muss für diesen Zeitpunkt eine andere Zellschicht durchmustert werden, um Gene zu finden, die für die Etablierung der Symbiose nötig sind. Hier helfen die umfangreichen Inf-TRAP-Seq Datensätze weiter: 127 Gene wurden im Cortex spezifisch durch den Befall mit *P. indica* induziert (Abb. 61). Im Folgenden wird an Beispielen demonstriert, wie man aus den Datensätzen Hypothesen ableiten kann und es werden Vorschläge gemacht, wie man diese testen könnte.

Da *P. indica* über Oberflächenstrukturen (MAMPs) von der Pflanzenzelle als Fremdorganismus erkannt wird, werden Abwehrreaktionen ausgelöst (Jacobs *et al.*, 2011). Als Pilz besitzt dieser Mutualist Chitin, und demnach könnte über den Chitin-Erkennungs-Mechanismus die Basalresistenz (PTI) ausgelöst werden.

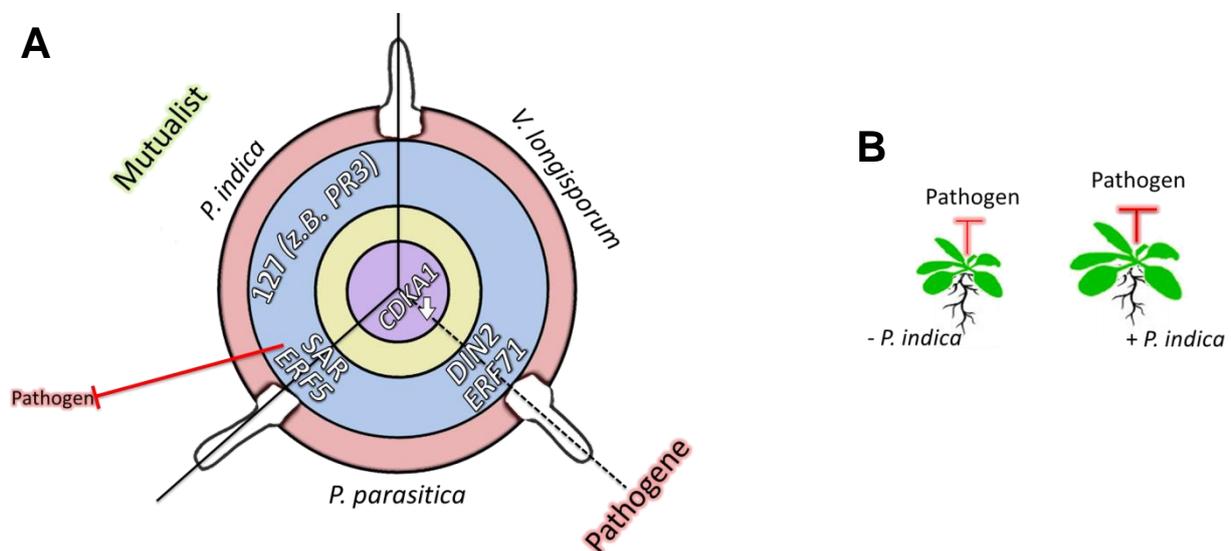


Abb. 61: **Vergleich der mutualistischen Interaktion mit Pathogeninfektionen.**

A: Schemazeichnung eines Wurzelquerschnitts, der in drei Bereiche aufgeteilt ist: Die beiden Pathogene auf der einen und der Mutualist auf der anderen Seite. Eingetragen sind Beispiele für expressionelle Reaktionen der Wurzelzellschichten auf *P. indica*, *P. parasitica* und *V. longisporum*. 127 Gene waren im Cortex (blau) spezifisch durch *P. indica* induziert und nicht durch die Pathogene. Als Beispiel ist *PR3* gekennzeichnet. Markergene für SAR sowie *ERF5* waren in *P. indica* und *P. parasitica* inokulierten Wurzeln induziert. Diese Reaktionen könnten eine Resistenz gegen Pathogene vermitteln (rote Linie). *DIN2* und *ERF71* waren im Cortex nur während Pathogeninfektionen induziert. Die Expression von *CDKA1* war dagegen im Zentralzylinder (violett) der Pathogen-infizierten Pflanzen reprimiert (Pfeil nach unten).

B: Schemazeichnung: *P. indica* besiedelte Pflanzen (+) sind größer, stresstoleranter und allgemein resistenter gegen Infektionen als Pflanzen ohne Mutualist (z.B. Varma *et al.*, 1999; Waller *et al.*, 2005; Sherameti *et al.*, 2008a und b).

Spezifisch im Cortex der mit *P. indica* besiedelten Wurzeln wurde *PR3* (*PATHOGENESIS-RELATED 3*) induziert. *PR3* kann als Chitinase enzymatisch Chitin Fragmente in Pilzzellwänden degradieren (Sharma *et al.*, 2011). Es wäre denkbar, dass *PR3* für die Etablierung der Symbiose benötigt wird, da es durch die Infektion mit Pathogenen nicht transkriptionell induziert wurde. Vielleicht könnte *PR3* im Apoplasten freigesetzte Chitinoligomere so modifizieren, dass eine Symbiose erkannt wird. Denn kurzkettige Chitinoligomere sind Signalmoleküle, die allgemeine Signalwege der Symbiose aktivieren, auch wenn die Rolle dieser Moleküle im Einzelnen noch nicht vollständig klar ist (Walker *et al.*, 2000; Genre *et al.*, 2013). Zum Testen dieser Hypothese müsste man eine *pr3* Mutante mit *P. indica* inokulieren. Wenn *PR3* für die Symbiose wichtig ist, würde der Wachstums-fördernde Effekt an *pr3* geringer ausfallen als beim Wt.

Sicherlich benötigt die Symbiose zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* auch eine ausgewogene Balance von Aktivierung und Repression gewisser Abwehrreaktionen, denn *Arabidopsis*-Mutanten mit einem Defekt in bestimmten Abwehrgenen sind oft unfähig, das Wachstum von *P. indica* einzuschränken (z.B. in Sherameti *et al.*, 2008a; Johnson und Oelmüller, 2009). Andererseits darf die Abwehr des Mutualisten nicht allzu heftig ausfallen und eine Reduktion von Abwehrreaktionen in der Wurzel ist ein Anzeichen für eine erfolgreiche Interaktion (Jacobs *et al.*, 2011). Um eine derartige Untersuchung anzufertigen, müssten aber mehrere Zeitpunkte nach Inokulation ausgewertet werden. An dem einen Zeitpunkt lässt sich sagen, dass das Gen *DIN2* (*BGLU30*) 3 dpi mit *P. indica* nicht induziert war, aber durch die Infektion mit den Pathogenen schon (Abb. 61 A). Es codiert für eine putative  $\beta$ -Glucosidase (Xu *et al.*, 2004), wobei die physiologische Funktion des Proteins noch unbekannt ist. Unter starker *DIN2* Überexpression wurde die Ausbreitung von *V. longisporum* in seiner Wirtspflanze eingeschränkt. Darüber hinaus reduzierte die Überexpression von *DIN2* den Wachstums-fördernden Effekt bei *P. indica* inokulierten Pflanzen, vielleicht weil große Mengen an *DIN2* auch hier zur Einschränkung des Pilzwachstums führten. Somit wäre erklärbar, warum *DIN2* in der Wurzel nicht während der mutualistischen Interaktion mit *P. indica* induziert vorlag. Für *DIN2* wäre eine ähnliche Rolle wie bei *PYK10* (*BGLU23*) denkbar, einem homologen Gen, dass für eine  $\beta$ -Glucosidase/Myrosinase codiert (Nitz *et al.*, 2001). *PYK10* wird in der Wurzel exprimiert und schränkt in der mutualistischen Beziehung zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* die Ausbreitung der Hyphen in der Wurzel ein (Sherameti *et al.*, 2008a).

Dennoch ist eher eine unterstützende und keine essentielle Rolle für *DIN2* bei der Abwehr von Mikroorganismen zu vermuten, da der Pilz-inhibierende Effekt erst bei sehr starker Überexpression vorhanden war. Beachtenswert wird *DIN2* auch durch verschiedene

abiotische Stimuli induziert (vgl. Anhang 8.13). Es könnte also sein, dass die generell stressbedingte expressionelle Induktion von *DIN2* etwas mit der Remobilisierung von Energiereserven zu tun hat. Aus bioinformatischen Analysen ist eine Sekretion des Proteins *DIN2* in den Apoplasten vorhergesagt und das Protein ist eventuell daran beteiligt Zucker von Polysacchariden der Zellwand zu spalten und somit als alternative Kohlenstoffquelle nutzbar zu machen (Lee *et al.*, 2007). Genauso könnte es möglich sein, dass *DIN2* an der Modifikation der Zellwand beteiligt ist, da es unter anderem im Laufe einer *V. longisporum*-Infektion zur Modifikation der Zellwand kommt mit veränderter Kohlenhydratpolymerzusammensetzung und verstärkter Lignifizierung (Floerl *et al.*, 2012).

*Wie trägt der Mutualist dazu bei, das Wachstum der Wirtspflanze zu fördern und Pathogentoleranzen zu vermitteln?*

Mehrfach wurde gezeigt, dass die Interaktion mit *P. indica* einen systemischen Schutzeffekt an Wirtspflanzen unterschiedlicher Spezies vermittelt (Waller *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2008; Schäfer und Kogel, 2009; Sun *et al.*, 2014). Beispielsweise war das Wachstum von *V. dahliae* in *P. indica* vorbehandelten *Arabidopsis*-Pflanzen stark reduziert (Sun *et al.*, 2014). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Sun *et al.* (2014), war auch die systemische Ausbreitung des nah verwandten *V. longisporum* signifikant reduziert, wenn die Pflanzen vorher mit *P. indica* inokuliert wurden. Zum einen kann vermutlich die bloße Anwesenheit des Mutualisten dazu führen, dass *Verticillium* für seine Verhältnisse nicht schnell genug wachsen kann, was wiederum die Bildung von Mikrosklerotien in der *Arabidopsis*-Wurzel erheblich unterdrückt und die Propagation einschränkt (Sun *et al.*, 2014). Zum anderen vermittelt die Interaktion mit *P. indica* zahlreiche expressionelle Veränderungen in der Wirtspflanze, was zur verbesserten Toleranz gegen *V. longisporum* beitragen könnte. 3 dpi mit *P. indica* fanden die stärksten expressionellen Veränderungen im Cortex statt. Wahrscheinlich gehen zu diesem Zeitpunkt die Cortex Zellen als erstes in einen allgemeinen Alarmzustand über, indem dort vermehrt Gene aktiviert werden, die auch während Pathogeninfektionen induziert sind. Nongbri *et al.* (2012) beschrieben, dass IAOx abhängige antimikrobielle Komponenten für eine erfolgreiche Symbiose an *Arabidopsis* essentiell sind, indem sie das Wachstum von *P. indica* einschränken. Das steht in Übereinstimmung zu den hier gewonnenen Ergebnissen, weil mehrere Gene des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus (z.B. *CYP81F2* oder *FOX1*) im *P. indica* besiedelten Cortex induziert waren.

Das Gen *ERF5* wurde im Cortex nach der Inokulation mit *P. indica* bzw. *P. parasitica* transkriptionell induziert. Der TF *ERF5* ist in die Chitin-induzierte angeborene

Immunantwort involviert (Son *et al.*, 2012) und zusammen mit dem TF ERF6 spielt er eine Rolle als positive Regulator der JA/ET vermittelten Verteidigung gegen den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* (Moffat *et al.*, 2012). Warum weder *ERF5* noch *ERF6* durch die Infektion mit *V. longisporum* induziert wurden, könnte entweder am Lebensstil des Pilzes liegen oder an dem späten Zeitpunkt, so dass die beiden Gene vielleicht in einer früheren Phase der Infektion mit *V. longisporum* im Cortex induziert waren.

Insgesamt könnte die *P. indica*-vermittelte Induktion von Genen des Chitin-Signalweges sowie von Chitinasen (z.B. AT1G02360 und *PR3*) zusammen mit der Induktion von Genen des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus dazu führen, dass bei einer nachfolgenden Infektion das Pathogen schneller und effektiver bekämpft werden kann. Darüber hinaus ist bekannt, dass *P. indica* in seiner Wirtspflanze einen Mechanismus auslöst, der zu einem systemischen Schutzeffekt gegen Pathogene führt. In Weizen etwa, dessen Wurzeln mit dem Mutualisten besiedelt sind, tritt am Blatt eine Resistenz gegen den Mehltaupilz *B. graminis* auf (Waller *et al.*, 2005). Auch an *Arabidopsis* wurde ein starker, durch *P. indica* vermittelter systemischer Schutzeffekt beschrieben (Stein *et al.*, 2008). In der Modellpflanze sind zwei Mechanismen untersucht, die eine systemische Resistenz vermitteln: Zum einen die induzierte systemische Resistenz (ISR) (zur Übersicht siehe Pieterse *et al.*, 2014), die hauptsächlich durch mutualistische Rhizobakterien ausgelöst wird und vom TF MYB72 abhängig ist (Van der Ent *et al.*, 2008; Segarra *et al.*, 2009). Zum anderen die durch nekrotrophe Pathogene oder synthetische Mittel ausgelöste SAR (Ryals *et al.*, 1996). Obwohl vermutet wird, dass ein ISR-ähnlicher Effekt durch *P. indica* vermittelt werden kann (Stein *et al.*, 2008), ist nicht geklärt, ob *P. indica* selbst Anteil am Zustandekommen des Effekts hat oder die in dem Pilz lebenden Rhizobakterien (Glaeser *et al.*, 2016). 3 dpi mit *P. indica* wurden keine Anhaltspunkte auf eine ISR-Reaktion im Cortex gefunden. Vor allem die *MYB72* Expression war in *P. indica*-inokulierten Wurzeln nicht induziert. Vielleicht ist der Zeitpunkt zu früh in der Symbiose und an einem späteren Zeitpunkt könnten ISR-Effekte nachweisbar sein. Hingegen waren in den *P. indica*- sowie den *P. parasitica*-inokulierten Wurzeln typische SAR-Markergene induziert, darunter die beiden Gene *ALD1* und *FMO1*. Beide Genprodukte sind für die erfolgreiche Ausbildung der SAR nötig (Návarová *et al.*, 2012). Von großer Bedeutung als Alarmsignal bei der Ausprägung der SAR ist Salizylsäure (Durrant und Dong, 2004). *CBP60g*, ein Markergen des SA abhängigen Signalwegs (Wang *et al.*, 2009), war im Cortex der *P. indica* besiedelten Pflanzen induziert. Zu diesem Zeitpunkt der Symbiose könnte also ein SAR Mechanismus dazu beitragen, der Wirtspflanze eine breite und systemische Resistenz gegen die Ausbreitung des Pilzes oder nachfolgende Infektionen zu verleihen (Abb. 61).

## 6.3 Die Zellschichten der Wurzel zeigen spezifische expressionelle Antworten auf Mikroorganismen

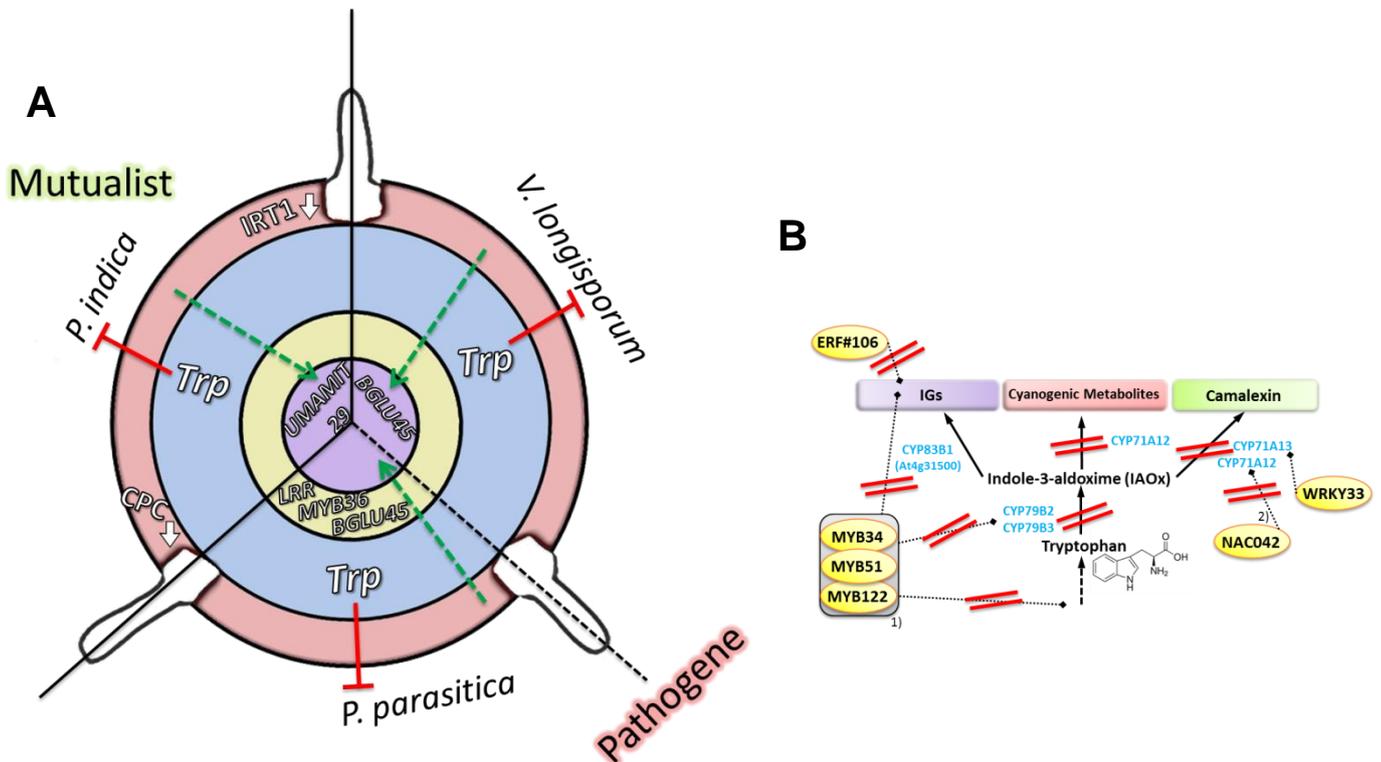


Abb. 62: **Zellschichtspezifische Genexpression nach Inokulation mit Mikroorganismen unter besonderer Berücksichtigung des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus.**

A: Schemazeichnung eines Wurzelquerschnitts, der in drei Bereiche aufgeteilt ist: Die beiden Pathogene auf der einen und der Mutualist auf der anderen Seite. Eingetragen sind Beispiele für expressionelle Reaktionen der Wurzelzellschichten auf *P. indica*, *P. parasitica* bzw. *V. longisporum*. Im Cortex (blau) vermittelte der Befall durch alle drei Mikroorganismen eine expressionelle Induktion von Genen des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus (Trp). In der Endodermis (gelb) von *P. parasitica*-infizierten Wurzeln lagen Gene für NBS-LRR (*LRR*), *MYB36* sowie *BGLU45* expressionell induziert vor. *BGLU45* war im Zentralzylinder (violett) der *V. longisporum* infizierten Wurzel expressionell induziert und *UMAMIT29* im Zentralzylinder der *P. indica* besiedelten Wurzel. *CPC* und *IRT1* waren in den Atrichoblasten (rot) der *P. indica* besiedelten Wurzel expressionell reprimiert (Pfeile nach unten). Die grünen Pfeile markieren einen postulierten Signalaustausch zwischen äußeren und inneren Zellschichten.

B: Schemazeichnung des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus. Rote Durchstriche markieren Stellen, an denen in Mutanten der Trp-abhängige Sekundärmetabolismus unterbrochen ist. Diese Mutanten wurden für eine Verifizierung von Inf-TRAP-Seq Daten verwendet.

### 6.3.1 Die Rhizodermis reagiert auf die Besiedlung mit *P. indica* besonders mit expressioneller Repression

In der Rhizodermis der *P. indica* besiedelten Wurzel waren deutlich mehr Gene in ihrer Expression reprimiert als induziert. Unter anderem befanden sich Gene mit einer Beteiligung an der Eisenaufnahme (z.B. *IRT1*: *IRON-REGULATED TRANSPORTER 1*; AT4G19690) und zur Ausbildung von Wurzelhaaren (z.B. *CPC*: *CAPRICE*; AT2G46410) unter den reprimierten Genen. Eine biologische Relevanz dessen konnte in dieser Arbeit

noch nicht geklärt werden, da dies weiterer Versuche bedarf. Eine reduzierte Wurzelhaarbildung könnte ein Anzeichen für die Vorbereitung auf die Symbiose sein, denn da das Pilzmyzel die Oberfläche für die Nährstoffaufnahme stark vergrößert, benötigt die Pflanze selbst nicht mehr so viele Wurzelhaare. Aber vielleicht konzentriert sich auch zu diesem Zeitpunkt die Pflanze noch vermehrt auf Abwehrantworten und spart Energie und Ressourcen durch eine Verringerung der Wurzelhaarbildung und der Eisenaufnahmesysteme.

### 6.3.2 Trp-abhängiger Sekundärmetabolismus als Beispiel für eine zellspezifische Lokalisation der Pathogenabwehr am Infektionsherd in den äußeren Schichten

Aus den Inf-TRAP-Seq Daten lassen sich viele Theorien aufstellen. Wissenschaftlich allerdings müssen Theorien immer durch mehrere Methoden bestätigt werden. Zum Teil war es möglich, mit Hilfe des etablierten Infektionssystems auf Erde einige Ergebnisse zu validieren. Exemplarisch wird dies nun mit dem Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus vorgestellt.

Sowohl die Induktion als auch die Transkriptabundanz von Genen des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus hatten einen Schwerpunkt in den äußeren Schichten während der Interaktion mit den Bodenorganismen *P. parasitica*, *V. longisporum* und *P. indica* (Abb. 62). CYP79B2 und CYP79B3 übernehmen eine Schlüsselaufgabe in der Biosynthese der Trp-abhängigen Sekundärmetaboliten. Besonders während der Infektion mit *P. parasitica* fiel auf, dass die meisten CYP79B2 Transkripte im Cortex und dagegen die meisten CYP79B3 Transkripte im Zentralzylinder vorhanden waren. Abhängig von der Zellschicht könnte also entweder CYP79B2 oder CYP79B3 die Umwandlung von Trp zu IAOx katalysieren. Beide Enzyme sind nicht nur Pathogen-induziert, sondern auch wichtig bei der Immunantwort, denn in der *cyp79b2/b3* Doppelmutante (vgl. Abb. 62 B) konnte sich *V. longisporum* signifikant besser ausbreiten. Da jedoch in der Mutante alle vom Trp abwärts gelegenen Sekundärmetaboliten - also IGs, ICN-Derivate sowie Camalexin - erheblich in ihrer Menge reduziert sind, gibt die erhöhte Suszeptibilität der *cyp79b2/b3* Doppelmutante nicht an, welche der drei Stoffklassen für die Abwehr von *V. longisporum* essentiell ist.

Camalexin ist das in *Arabidopsis* wichtigste Phytoalexin, dessen Synthese durch zahlreiche Phytopathogene induziert wird (Glawischnig, 2007). Weil viele Gene, deren Genprodukte am Anfang der Camalexin Biosynthese beteiligt sind, etwa CYP71A12 und

*CYP71A13*, vor allem in den äußeren Schichten induziert wurden, bzw. die Abundanz der Gentranskripte in äußeren Schichten am höchsten war, liegt die Vermutung nahe, dass dort vermehrt Camalexin gebildet wurde. Die Dreifachmutante *cyp71a12/a13/a18*, in der Camalexin fast vollständig fehlt (Müller T.M. *et al.*, 2015) war allerdings gegenüber *V. longisporum* nicht suszeptibler als der Wt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Studie von Iven *et al.* (2012), in der die Mutante *pad3*, die ebenfalls kein Camalexin bildet, nicht suszeptibler war als der Wt, obwohl dort *PAD3* in der Wt-Wurzel stark transkriptionell induziert war. Die zellschichtspezifische Auflösung der *PAD3* Expression lieferte nun ein genaueres Bild: Unter mock-Bedingungen waren von *PAD3* sowohl Transkripte als auch Protein vor allem im Zentralzylinder vorhanden. *PAD3* katalysiert den letzten Schritt zur Umwandlung zu Camalexin und vielleicht findet diese Reaktion ohne Pathogenkontakt vor allem im Zentralzylinder statt. 6 dpi mit *V. longisporum* trat eine expressionelle Induktion in den äußeren Schichten auf, aber eine Repression der Genexpression im Zentralzylinder. Entweder waren zu diesem Zeitpunkt die Zellen der Wirtspflanze zunehmend abgestorben und deshalb verringerte sich die *PAD3* Expression oder die Abwehrstrategie der Wurzel wechselte dazu, den letzten Schritt der Camalexin Synthese vermehrt im Cortex stattfinden zu lassen. Mit der Ausbreitung des Pilzes könnte also eine Verschiebung des Produktspektrums erfolgen. Die Repression der *PAD3*-Expression im Zentralzylinder während der Infektion könnte auch erklären, warum die Suszeptibilität von *pad3* nicht erhöht ist. Um die Relevanz solcher Änderungen im Expressionsprofil zu verstehen und die eigentliche antimikrobielle Substanz *in planta* zu lokalisieren, müssten die endogenen Metaboliten in einer Probe gemessen werden. Das Metabolom kann in speziellen Analysen, als „*Spectrometric imaging techniques*“ bekannt, in zellulärer Auflösung bestimmt werden (Ratcliffe und Shachar-Hill, 2001; Cooks *et al.*, 2006). Wahrscheinlich ist es bald möglich darüber das Metabolom einer Zellschicht zu charakterisieren.

Für den Trp-abhängigen IGs-Biosyntheseweg wurde im Blatt entdeckt, dass es sich bei der PEN2-katalysierten Hydrolyse von IGs Produkten um einen Abwehrmechanismus handelt, der durch Pathogene aktiv induziert werden kann (Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006; Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). In räumlicher Nähe zu PEN2 befindet sich *CYP81F2*, welches das Substrat für PEN2 liefert (Fuchs *et al.*, 2016). Mit PEN3 ist ein ABC-Transporter identifiziert worden, der in der Plasmamembran sitzt und die von PEN2 freigesetzten toxischen Produkte in den Apoplasten befördert (Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006; Underwood und Somerville, 2013). So kommt eine fein abgestimmte Abfolge zustande, in der nicht-toxische Intermediate bei Pathogenbefall durch PEN2-vermittelte

Hydrolyse umgesetzt werden und anschließend die entstandenen toxischen Produkte zügig an den Ort gelangen, wo das Pathogen sitzt (Fuchs *et al.*, 2016). Zwar sind diese Mechanismen im Blatt erforscht worden, aber vielleicht existiert in der Wurzel ein ähnlicher Mechanismus. Jedenfalls waren zum Zeitpunkt 2,5 hpi mit *P. parasitica* die meisten Transkripte der drei Gene *CYP81F2*, *PEN2* und *PEN3* in den äußeren Schichten vorhanden. Nur weil bereits im mock-Zustand viele Transkripte in den äußeren Schichten vorhanden waren, waren dort die reinen Induktionswerte geringer als in den inneren Schichten. Die Mutante *cyp81f2* wurde mit *V. longisporum* infiziert, wobei kein signifikanter Unterschied zum Wt ersichtlich war (Iven *et al.*, 2012). Einige Abzweigungen in der Kette zu IGs Substanzen sind von *CYP81F2* unabhängig und dadurch könnte der Ausfall von *CYP81F2* ausgeglichen werden.

Der dritte und kürzlich neu beschriebene Weg, der zu ICN-Derivaten führt, wurde bisher außer Acht gelassen. Vielleicht leistet er einen noch größeren Anteil an der Abwehr vaskulärer Pilze als Camalexin bzw. IGs. Sollte dies der Fall sein, wird erklärbar, warum weder die Reduktion von Camalexin noch die partielle Unterdrückung des IGs Weges zu erhöhter Suszeptibilität führt, wohl aber das Ausschalten aller Trp-abhängiger Sekundärmetaboliten. Untersuchungen mit Mutanten in diesem dritten Zweig des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus stehen noch an. Von diesem Biosyntheseweg wurden die Gene *CYP82C2* und *FOX1* vor allem in den äußeren Schichten induziert.

*Parallel zu ihren Zielgenen hatten die Regulatoren des Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus einen Schwerpunkt in den äußeren Zellschichten*

Ferner war die für den TF NAC042 codierende mRNA vor allem in den äußeren Schichten vorhanden. Es wird angenommen, dass die Expression von *CYP71A12* durch NAC042 stimuliert wird (Saga *et al.*, 2012) – ob jedoch ein direkter oder indirekter Regulationsmechanismus dahinter steckt, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht sagen. Grundsätzlich lässt die starke Co-Lokalisation der Expressionsmuster der beiden Gene sowie die erhöhte Menge an *CYP71A12* Transkripten im *NAC042 OE* (Abb. S30; Abb. S24) vermuten, dass sie eng miteinander verknüpft sind. Bei Überexpression von *NAC042* war die Resistenz gegen *V. longisporum* verbessert. Demnach könnte mit der unbestätigten Annahme, dass bei Überexpression von *NAC042* mehr *CYP71A12* und damit mehr Camalexin vorhanden ist, darauf geschlossen werden, dass hohe Konzentrationen des Phytoalexins negativen Einfluss auf das pilzliche Wachstum haben. Zwei unabhängige *nac042* Mutanten hatten in der Studie von Saga *et al.* (2012) signifikant

geringere Mengen an Camalexin verglichen mit dem Wt. Trotzdem war *nac042* nicht suszeptibler als der Wt gegenüber *V. longisporum*. Folglich begünstigt der geringere Camalexinspiegel im *nac042* die Ausbreitung von *Verticillium* nicht zusätzlich. Neben *NAC042* ist *WRKY33* ein Regulator der Camalexin Biosynthese, denn für diesen TF ist über ChIP-Methodik (chromatin immunoprecipitation) eine Rolle als Aktivator von *CYP71A13* beschrieben (Qiu *et al.*, 2008). *WRKY33* könnte also den Ausfall von *NAC042* teilweise kompensieren.

Viele Gene mit einer Beteiligung an der Synthese von IGs Substanzen werden durch die drei homologen TF MYB34, MYB51 und MYB122 reguliert (Frerigmann und Gigolashvili, 2014). Interessanterweise wurde die Expression von *MYB34* sowohl während der Infektion mit *V. longisporum* als auch während der Infektion mit *P. parasitica* in allen Zellschichten reprimiert und dagegen die von *MYB51* sowie *MYB122* in allen Zellschichten aktiviert (Abb. S3, Abb. S8). Frerigmann und Gigolashvili (2014) konnten einen unterschiedlichen Einfluss von Hormonen auf die *MYB34* und *MYB51* Expression feststellen, denn ET aktiviert die Expression von *MYB51* und wirkt sich eher negativ auf die Expression von *MYB34* aus. Da parallel zur *P. parasitica* und *V. longisporum* bedingten *MYB51* Induktion auch eine Induktion von Genen festgestellt wurde, die an der Biosynthese von ET beteiligt sind, wie z.B. *ACS7*, ist zu vermuten, dass die Wirkung von ET an der *MYB51* Induktion und *MYB34* Repression beteiligt ist. *MYB51* bzw. *MYB122* könnten wichtige regulatorische Aufgaben bei der Pathogenabwehr in der Wurzel übernehmen, *MYB34* eher weniger. Die Triple-Mutante *myb34/51/122* war signifikant suszeptibler gegenüber *V. longisporum* als der Wt. Trotzdem waren weitere Belege nötig, die für eine Beteiligung der IGs Substanzen an der Abwehr gegen *V. longisporum* sprechen.

Kürzlich wurde publiziert, dass *ERF#103* (*ERF6*) als Aktivator von *CYP81F2* fungiert (Xu *et al.*, 2016). An dem dort demonstrierten Mechanismus wurde erstmals vorgestellt, dass Mitglieder der ERF Untergruppe IXb (Klassifikation nach Nakano *et al.*, 2006) an der Regulation der IGs Biosynthese beteiligt sind. *ERF#106* gehört ebenfalls dieser Untergruppe an. Da bei Überexpression von *ERF#106* deutlich mehr Transkripte von *CYP81F2* messbar waren, könnte dieser TF ebenfalls an der Regulation der *CYP81F2* Expression beteiligt sein. Ergebnisse aus der Dissertation von Wehner (2012) bestätigen schwache Aktivierungseigenschaften von *ERF#106* bei der *CYP81F2* Expression: In einem Hochdurchsatzverfahren (Protoplast Trans Activation, kurz PTA-System) können *trans*-regulatorische Eigenschaften von TF untersucht werden, indem Protoplasten, die einen *Promotor:Luciferase-Reporter* enthalten, mit verschiedenen TF-Expressionsvektoren transformiert werden. Über die Aktivität der Luciferase kann das Transaktivierungs-

potential eines TF bestimmt werden. *ERF#106* aktivierte in diesem PTA-System in erster Linie den Promotor von *TSA1* (*TSA1* katalysiert einen der Schritte in der Biosynthese von Trp), aber eben auch schwach den Promotor von *CYP81F2*. Ob es sich um einen direkten oder indirekten Mechanismus handelt, ist noch unklar.

Auffällig viele TF der ERF Familie werden durch Hypoxie transkriptionell induziert, darunter *ERF#106* mit einem Induktionsmaximum im Zentralzylinder der Wurzel (Mustroph *et al.*, 2009; Walper *et al.*, 2016). Das Überfluten der Pflanzen mit Wasser ist eine Behandlung, die Sauerstoffmangel verursacht. Hsu *et al.* (2013) stellten einen interessanten Mechanismus vor, laut dem das Überfluten der Pflanzen zu einer erhöhten Resistenz führt, an deren Zustandekommen der TF *WRKY22* beteiligt ist (Abb. 63 A; B).

Wt Pflanzen, die für mehrere Stunden mit Wasser überschwemmt wurden, waren danach resistenter gegen das Blattpathogen *P. syringae* als nicht-überschwemmte Kontrollpflanzen. Das Überfluten ist also ein Stimulus, der die Pflanzen in einen Warnzustand versetzt, denn mit Wasser überflutet zu sein, erhöht für die Pflanze die Wahrscheinlichkeit, währenddessen oder danach mit Pathogenen infiziert zu werden (Hsu *et al.*, 2013). In Abb. 63 B wurde postuliert, dass *ERF#106* auch eine Rolle im zugrunde liegenden Resistenz-vermittelnden Mechanismus spielt.

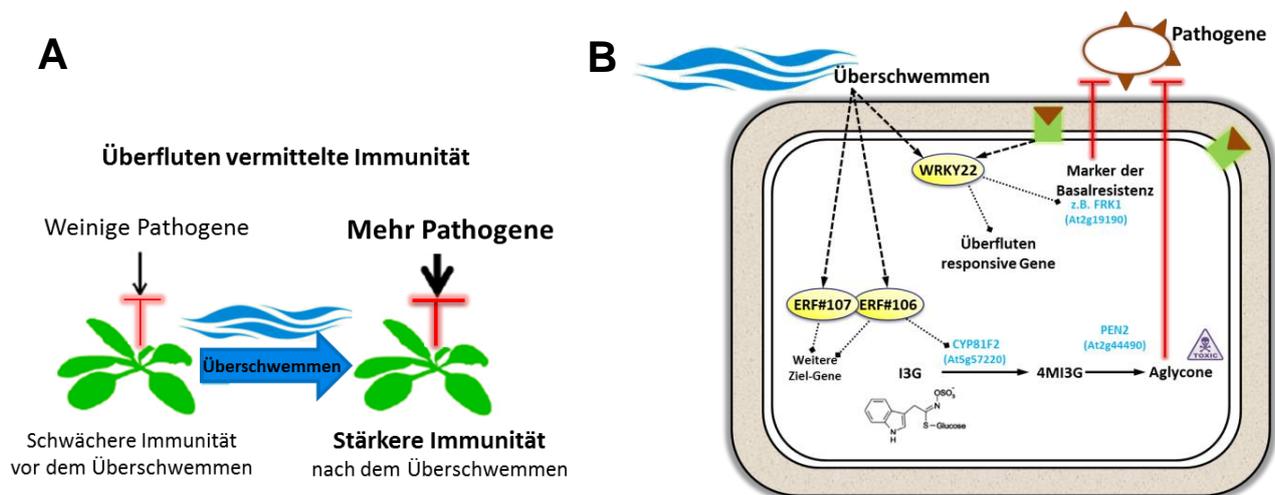


Abb. 63: **Einfaches Modell der durch Überfluten verstärkten Immunität.**

A: Überschwemmung erhöht in der Natur die Wahrscheinlichkeit für die Pflanzen, mit Pathogenen in Kontakt zu kommen und infiziert zu werden. Deshalb werden während des Zustands der Überschwemmung in der Pflanze Mechanismen in Gang gesetzt, die die Immunität stärken und einen erhöhten Schutz gegen Pathogene aufbauen. Dieser Schutz bleibt nach der Überschwemmung eine Zeit lang bestehen. Verändert nach Hsu *et al.*, 2013.

B: Überschwemmen aktiviert die Expression von *WRKY22*, *ERF#106* und *ERF#107*. Der aktive TF *WRKY22* seinerseits vermittelt Resistenz, indem er nicht nur Überfluten responsive Gene, sondern auch Gene mit einer Beteiligung an der Basalresistenz aktiviert (Hsu *et al.*, 2013). Ein Beispiel hierfür ist *FRK1* (*FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE1*). *WRKY22* wird außerdem über PRR (grün), die PAMPs gebunden haben (braun), aktiviert. Der neue, in dieser Arbeit postulierte Mechanismus geht davon aus, dass *ERF#106* transkriptionell *CYP81F2* induziert und evtl. weitere Ziel-Gene. *CYP81F2* ist Teil des IGS Biosyntheseweges. Präformierte IGS könnten während dem Überfluten gespeichert werden und bei Pathogenkontakt zügig in toxische Aglycone umgewandelt werden.

Die durch Überschwemmen induzierte *ERF#106* Expression war dagegen nicht ausreichend, um eine Resistenz gegen *V. longisporum* zu vermitteln, wahrscheinlich weil die Induktion nur transient war. Während sich *P. syringae* schnell ausbreitet, kann es von der durch Überfluten verstärkten Immunität effektiv bekämpft werden. *V. longisporum* wächst im Vergleich dazu langsam. Die Sporen müssen auskeimen, dann dauert es ein paar Tage bis die Hyphen die Wurzeln richtig penetrieren und zu jener Zeit ist die durch Überfluten verstärkte Immunität wohl weitestgehend wieder zurückgegangen.

Erst eine konstitutive *ERF#106* Überexpression verbesserte die Toleranz der Pflanze gegenüber einer *V. longisporum* Infektion. Ob diese verbesserte Toleranz auf mehr *CYP81F2* zurückzuführen ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Untersuchungen mit einer *CYP81F2* überexprimierenden Linien müssten angefertigt werden, um zu zeigen, dass mehr *CYP81F2* tatsächlich die Pathogenabwehr verstärkt. Vielleicht reguliert *ERF#106* außerdem noch weitere Komponenten des IGs Zweiges, die dann schließlich in der Summe eine Resistenz vermitteln können. Der nächste Verwandte zu *ERF#106* ist *ERF#107*. Während der Infektion mit *V. longisporum* führte die Überexpression von *ERF#107* in mehreren Versuchen zwar tendenziell zu toleranteren Pflanzen, aber dieses Ergebnis fiel nicht signifikant aus. Dies könnte in der relativ schwachen Überexpression von *ERF#107* in der verwendeten Pflanzenlinie begründet sein. Es müsste zusätzlich ein stärkerer Überexprimierer getestet werden. Da die Mutante *erf#106/107* nicht suszeptibler war als der Wt, ist eine Redundanz mit weiteren homologen TF sehr wahrscheinlich:

Bei Überexpression des Gens *ERF#104* sind ebenfalls mehr *CYP81F2* Transkripte vorhanden (Bethke *et al.*, 2009), so dass auch dieser TF aktivierende Eigenschaften bezüglich der *CYP81F2* Expression besitzen könnte. Die Überexpression von *ERF#104* verbesserte die Resistenz gegen *V. longisporum*. Dagegen beobachteten Bethke *et al.* (2009), dass eine Überexpression von *ERF#104* zu suszeptibleren Pflanzen gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea* führte, vergleichbar mit *erf#104*. *ERF#104* Proteine unterliegen in der Pflanze wahrscheinlich einer strengen Regulationskontrolle und dürfen aus physiologischen Gründen eine gewisse Menge nicht überschreiten, weshalb sich eine Überexpression nicht immer positiv auswirkt (Bethke *et al.*, 2009). Je mehr *ERF#104* vorhanden ist, desto mehr könnte seine Expression inhibiert werden (sog. Rückkopplungsschleife). Weil jedoch die Überexpression des in dieser Dissertation verwendeten *ERF#104* OE mit 4,5-fach verhältnismäßig schwach war, könnte diese negative Rückkopplungsschleife sehr viel geringer ausgefallen sein als im *ERF#104* OE von Bethke *et al.* (2009), der 200-fach überexprimierte. Das könnte erklären, warum ein

positiver Effekt der *ERF#104* Überexpression während der *V. longisporum* Infektion zu beobachten war. Prinzipiell könnte eine Überexpression von *ERF#104* auch unterschiedlichen Einfluss auf nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene haben. Obwohl *ERF#105* transkriptionell in der Wurzel durch die Infektion mit *V. longisporum* induziert wird, war zwischen *ERF#105 OE* und dem Wt kein signifikanter Unterschied im Infektionsverlauf mit *V. longisporum* feststellbar. Da es sich um eine starke *ERF#105* überexprimierende Linie (190-fach) handelte, könnten diese hohen Mengen an *ERF#105* einen negativen Effekt nach sich gezogen haben, ähnlich wie bei der starken *ERF#104* Überexpression bei Bethke *et al.* (2009). In diesem Fall müsste der Versuch mit einem schwächeren *ERF#105 OE* wiederholt werden. Mit dem Ausfall von *ERF#104* und *ERF#105* in Mutanten verlor die Pflanze wichtige Eigenschaften der Immunantwort und war teilweise gegenüber *V. longisporum* susceptibler.

Im Experiment mit *P. parasitica* waren die Transkripte von *ERF#104*, *ERF#105*, *ERF#106* sowie *ERF#107* in der mock-Probe überwiegend in den äußeren Schichten vorhanden (Abb. S5). Dies korrelierte mit der Beobachtung, dass im mock-Zustand auch die Transkripte von *CYP81F2* und anderen Genen der IGs Synthese überwiegend in den äußeren Schichten vorlagen. Es handelt sich also um einen weiteren Hinweis, dass diese Transkriptionsfaktoren an der Regulation des IGs Biosynthesewegs beteiligt sind.

Schließlich kann festgehalten werden, dass die mRNA zahlreicher Gene, deren Genprodukte in den Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus involviert sind, vor allem dort vorhanden war, wo der engste Kontakt zu den Mikroorganismen bestand bzw. zu vermuten ist, nämlich in den äußeren Schichten.

### **6.3.3 Expressionell induzierte Gene in der Endodermis deuten auf eine Verstärkung der Barrieren gegen die mikrobielle Ausbreitung hin**

Es ist bekannt, dass eine starke Endodermis den Zentralzylinder gegen Mikroorganismen abriegeln kann (Griffiths, 1971; Talboys, 1972; Fradin und Thomma, 2006) und eine verstärkte Synthese von Lignin und dessen Einlagerung in die radialen Zellwände der Endodermis könnten dazu beitragen. Lignin ist ein komplexes Polymer, das durch die Oxidation von drei Monolignolen in der Zellwand entsteht (zur Übersicht siehe Zhong und Ye, 2014). Monolignol-Glucoside können eine vorgefertigte Speicherform für die Ligninsynthese sein und eine Beteiligung von Monolignol-Glucosidasen am Lignifizierungsprozess wird vermutet (Boerjan *et al.*, 2003; Chapelle *et al.*, 2012). Die

vorgefertigten und gespeicherten Monolignol-Glucoside könnten bei Bedarf freigesetzt werden, wenn Stress-bedingt mehr Lignin benötigt wird (Chapelle *et al.*, 2012). *BGLU45* könnte als Glucosidase an dem Prozess beteiligt sein, da es Coniferin deglucosylieren kann (Xu *et al.*, 2004; Chapelle *et al.*, 2012). Besonders stark war *BGLU45* in der Endodermis der mit *P. parasitica* infizierten Pflanzen induziert (Abb. 62). Dies könnte dort zum Lignifizierungsprozess beigetragen und Abwehrbarrieren verstärkt haben.

Der Casparische Streifen ist eine Struktur, die die Endodermis mit hydrophoben Substanzen versiegelt und somit eine Diffusionsbarriere aufbaut, die eine symplastische Aufnahme von Wasser erzwingt (zur Übersicht siehe Grebe, 2011). Der TF MYB36 ist essentiell an der Bildung des Casparischen Streifens beteiligt (Kamiya *et al.*, 2015). *MYB36* war in der Endodermis der *P. parasitica*-infizierten Wurzel expressionell induziert, seine Zielgene dagegen nicht. Es kann durchaus sein, dass die Zielgene erst zeitverzögert aktiviert werden, weil aus der mRNA, die für den TF codiert, erst der funktionsfähige TF gebildet werden muss. Das müsste in einem Experiment zu einem späteren Zeitpunkt überprüft werden. Interessanterweise wurden weitere Gene mit ähnlichem Zusammenhang in der Endodermis transkriptionell induziert (z.B. *GSO2*). Die Verstärkung des Casparischen Streifens könnte eine allgemeine Reaktion sein, mit der einer mikrobiellen Ausbreitung entgegengewirkt werden soll. Wenn der Casparische Streifen fehlt (wie in der Mutante *sgn3*) ist die Barrierefunktion für den Wassertransport beeinträchtigt (Kamiya *et al.*, 2015) und vielleicht auch die Barrierefunktion für die Pathogenabwehr. Die Mutante *sgn3* ist die stärkste Mutante im Casparischen Streifen, die man bisher kennt und mit ihr ließe sich die Funktion des Casparischen Streifens bei der Pathogenabwehr gut testen (Pfister *et al.*, 2014). Über eine Infektion von *sgn3* im *in vitro*-Infektionssystem mit eGFP-*Vl43* könnte am Fluoreszenzmikroskop untersucht werden, ob der Pilz bei diesen Pflanzen das Xylem besser erreicht. Sollte dies der Fall sein, würde das die Theorie bekräftigen, dass die Barrierefunktion der Endodermis und speziell des Casparischen Streifens den Zentralzylinder vor eindringenden Mikroorganismen schützen kann.

Resistenz Gene (R-Gene) im Pflanzengenom codieren für R-Proteine, welche nötig sind, um Effektoren von Mikroorganismen zu erkennen und eine spezifische Immunreaktion auf den Fremdorganismus in Gang zu setzen (Jones und Dangl, 2006). Die Hauptklasse der R-Proteine besteht aus einer Nukleotid-Bindedomäne Seite (NBS) und sog. Domänen Leucin-reicher Wiederholungen (LRR; engl.: Leucin-rich repeat), so dass man die dafür codierenden R-Gene als NBS-LRR klassifiziert (Moffett, 2009). Diese große und weit verbreitete Gruppe ist involviert in der Erkennung von Bakterien, Viren, Pilzen,

Oomyceten, Nematoden und Insekten und die Wahrnehmung von Pathogenen durch diese R-Proteine löst eine Reihe von Konformationsänderungen aus, die von einem Nukleotid-Austausch abhängt (zur Übersicht Takken und Tameling, 2009). Aktivierte R-Proteine schalten die Pathogenabwehr an, was oft im Zelltod der infizierten Zellen endet. Viele dieser NBS-LRR Proteine wurden bei der Infektion mit *P. parasitica* spezifisch in der Endodermis induziert (Abb. 62) und passen in die GO Einteilung „Programmierter Zelltod“. Zu dem frühen Zeitpunkt befand sich *P. parasitica* in seiner biotrophen Phase. An Hyphen, die den Cortex bereits penetrieren, erreichen Haustorien-ähnliche Strukturen, die die Nährstoffaufnahme während der biotrophen Phase vermitteln, zum Zeitpunkt 10 hpi ein Maximum (Attard *et al.*, 2010). Ein paar Stunden später wechselt der Pilz aus der biotrophen in die nekrotrophe Phase (Attard *et al.*, 2010). Der gezielte Zelltod von Endodermiszellen könnte der Ausbreitung des Pathogens entgegenwirken durch den Entzug von Nahrungsquellen in der Phase biotrophen Wachstums. Eine weitere Möglichkeit der induzierten NBS-LRR könnte sein, dass diese als Rezeptoren fungieren. Vielleicht werden die nach Kontakt mit dem Mikroorganismus an der Endodermis wahrgenommenen Signale anschließend in den Zentralzylinder weitergeleitet, wo sie eine Reaktion auslösen.

Während vor allem im Experiment mit *P. parasitica* in der Endodermis starke expressionelle Veränderungen vorhanden waren, konnten in der Endodermis von *P. indica* besiedelten Wurzeln fast keine differentiell exprimierte Gene gefunden werden. Vielleicht ist dies bereits auf die mutualistische Interaktion zurückzuführen. Entweder könnte *P. indica* in der Lage sein, diese Art von Abwehr zu unterdrücken oder die Pflanze erkennt, dass für die Symbiose diese Art von Abwehr nicht nötig ist. Ebenso könnte es sein, dass die Hyphen von *P. indica* 3 dpi noch nicht weit genug in die Wurzel vorgedrungen waren, um derartige Abwehrreaktionen zu induzieren.

#### **6.3.4 Expressionelle Reaktionen im Zentralzylinder lassen einen Signalaustausch zwischen äußeren und inneren Wurzelzellschichten vermuten**

Obwohl bei intakten *Arabidopsis*-Wurzeln die Bodenorganismen *P. parasitica*, *V. longisporum* und *P. indica* den Zentralzylinder nicht direkt kontaktieren, waren in dieser Zellschicht stets DEG nachweisbar (Beispiele in Abb. 61 und 62). Dementsprechend ist es sehr wahrscheinlich, dass es Signale gibt, die von äußeren Zellschichten gebildet und bis

in den Zentralzylinder transportiert werden. Dabei könnte es sich um gelöste chemische Signale handeln, die über direkte Zell-Zell-Verbindungen (Plasmodesmen) ausgetauscht werden oder um gasförmige Verbindungen, wie z.B. ET. Denkbar wäre ebenso ein Zell-Zell-Transport von RNA-Molekülen. Kleine RNA Moleküle (miRNA und siRNA) können innerhalb der Pflanze transportiert werden und regulieren in den Zielzellen unter anderem Zelldifferenzierung und die Anpassung an biotische und abiotische Stresse (Molnar *et al.*, 2010, Melnyk *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012). Vor kurzem wurde anhand von Pfropfen-Versuchen gezeigt, dass auch einige mRNA Moleküle mobil in der Pflanze sind und in ihrer Zielzelle translatiert werden könnten (Thieme *et al.*, 2015). Sicherlich ist eine denkbare Funktion der mobilen mRNA, einen Alarmzustand in entfernten Geweben auszulösen zur Anpassung an Stress und Pathogenabwehr (Thieme *et al.*, 2015). Bei dem interzellulär ausgetauschten Signal könnte es sich prinzipiell auch um Proteine handeln, da Pflanzenzellen über den Austausch von TF miteinander kommunizieren können (z.B. in Kurata *et al.*, 2005). Allerdings sind die meisten Proteine zu groß, um über Plasmodesmen transportiert zu werden, womit dieses Prinzip eher unwahrscheinlich ist.

In den Inf-TRAP-Seq Daten kann man nun gezielt nach spezifisch in den äußeren Schichten induzierten Genen suchen, bei deren Genprodukten es sich entweder selbst um den Signalstoff handeln könnte oder deren Genprodukte das Signalmolekül synthetisieren bzw. freisetzen könnten. Bei der Suche nach potentiellen Signalstoffen müsste das Augenmerk auf die eben diskutierten Molekül-Klassen gerichtet werden. Vielleicht kann bald auf diese Weise ein Signalstoff für die Kommunikation zwischen äußeren und inneren Zellschichten identifiziert werden.

Die Genexpression von *EXPA9*, das für ein Expansin codiert, wurde stark im Zentralzylinder während der Infektion mit *V. longisporum* aktiviert. Expansine sind extrazelluläre Proteine die Zellwandstrukturen lockern, so dass im Anschluss Zellwachstum und eine erneute Verstärkung der Zellwand erfolgen können (Zur Übersicht siehe Cosgrove 2000, Cosgrove, 2015). Vielleicht ist die Expansin-vermittelte Modifikation der Zellwand in einen Abwehrmechanismus gegen *V. longisporum* involviert. 6 dpi mit *V. longisporum* wurde *BGLU45* am stärksten im Zentralzylinder induziert (Abb. 62). Da dieses Gen in Lignifizierungsprozesse involviert sein könnte, wird der Zentralzylinder vielleicht gegen ein weiteres Vordringen von *V. longisporum* abgeschottet und das Pathogen kann nicht bis in die Xylemgefäße vordringen. Da es während der Infektion mit *V. longisporum* zu einer *de novo* Synthese von Xylemgefäßen im Zentralzylinder kommt (Reusche *et al.*, 2012), könnte eine induzierte Lignifizierung ebenso damit in Zusammenhang gebracht werden. Jedoch muss das zusätzlich überprüft werden. Dazu

könnte man eine *bglu45* Mutante mit *V. longisporum* infizieren und analysieren, ob in der Mutante weniger Xylemgefäße gebildet werden als im infizierten Wt.

Im Zentralzylinder der mit *P. indica* besiedelten Wurzel war das Gen *UMAMIT29* expressionell induziert (Abb. 62). In *Arabidopsis* transportiert die Familie der UMAMI Transporter unter anderem Aminosäuren. Der Transporter UMAMIT29 kann Aminosäuren entlang des (elektro)chemischen Gradienten über die Plasmamembran transportieren (Müller B. *et al.*, 2015) und wird stark im Phloem der Wurzel exprimiert. Wahrscheinlich ist das Protein an der Entladung des Phloems beteiligt, denn in Samen werden UMAMIT in Geweben gefunden, aus denen Aminosäuren exportiert werden (Müller B. *et al.*, 2015). Es könnte also sein, dass die Induktion von *UMAMIT29* im Zentralzylinder während der Interaktion mit *P. indica* dafür sorgt, dass der Pilz mit Nährstoffen versorgt wird. Eine Inokulation von *UMAMIT29 OE* und *umamit29* Linien mit *P. indica* resultierte in beiden Fällen in keinem signifikanten Unterschied zum Wt (Daten nicht gezeigt). Entweder hat *UMAMIT29* keine essentielle Rolle in der Symbiose oder es besteht eine Redundanz mit nahe verwandten *UMAMITs* (vgl. z.B. Müller B. *et al.*, 2015). Auf der anderen Seite könnte eine ektopische Überexpression von *UMAMIT29* dazu führen, dass der Transporter in der gesamten Wurzel verteilt ist und somit seine Zielsubstanzen nicht mehr lokalisiert wären, was den Stoffaustausch mit dem Mutualisten nicht unbedingt fördern muss.

## 6.4 Potential der Methode und Ausblick für zukünftige Studien

In dieser Arbeit wurde nur ein winziger Bruchteil der in den Inf-TRAP-Seq Datensätzen enthaltenen Information exemplarisch herausgesucht, um die Funktionalität der Methode zu belegen. In naher Zukunft gilt es, weitere zellschichtspezifische Besonderheiten aus den Datensätzen zu interpretieren. Im Anhang der elektronischen Fassung befinden sich die kompletten Datensätze. Die Ableitung zahlreicher testbarer Theorien bezüglich Abwehrreaktionen der einzelnen Zellschichten ist nach einer umfangreichen bioinformatischen Auswertung möglich. Lassen sich einige dieser Theorien mit Hilfe weiterer Methoden verifizieren, dann wird man bald in der Lage sein, das Netzwerk der Pathogenabwehr besser zu verstehen und kann auf dieser Basis anfangen, nach neuen Möglichkeiten für landwirtschaftliche Innovationen zu suchen.

Z.B. kann die Rolle der endodermalen Barrierefunktion mit der *Arabidopsis* Mutante *sgn3* getestet werden, die einen starken Defekt in der Ausbildung des Casparischen Streifens besitzt (Pfister *et al.*, 2014). Wenn Wurzelpathogene in der Mutante den Zentralzylinder

leichter erreichen als im Wt, dann wäre eine generelle Barrierefunktion der Endodermis nachgewiesen und in den Inf-TRAP-Seq Datensätzen wären die zugrunde liegenden transkriptionellen Mechanismen identifizierbar, die zur Verstärkung dieser Zellschicht führen. Mit der Lignifizierung wurde nur eine von mehreren denkbaren Möglichkeiten aufgegriffen. Des Weiteren ist Suberin ein Biopolymer, das aus vielen verschiedenen hydrophoben Molekülen gebildet und zwischen Cortex und Zentralzylinder eingelagert wird (zur Übersicht siehe Franke und Schreiber, 2007; Pollard *et al.*, 2008). Daran beteiligte Gene werden bereits unter Kontrollbedingungen vor allem in der Endodermis exprimiert (Mustroph und Bailey-Serres, 2010). Es sollte detailliert analysiert werden, ob die Anwesenheit von Mikroorganismen die Suberin-Biosynthese in der Endodermis zusätzlich aktiviert, denn dies könnte ebenso die Barriere verstärken.

Besonders wichtig ist es auch, bezüglich Hormon-Signalwegen und Hormon-Biosynthesewegen gründlich nachzuforschen, denn Hormone regulieren Stressantworten und sind sicherlich maßgeblich an der Pathogenabwehr beteiligt (zur Übersicht siehe Koornneef und Pieterse, 2008). Niveau und Effektivität hängen sowohl bei der lokal ausgeprägten Resistenz als auch bei der SAR von Hormonen und deren Signalwegen ab. Welche Unterschiede herrschen zwischen den Zellschichten in der Hormon-bedingten Regulation? Da in dieser Arbeit andere Schwerpunkte gesetzt wurden, stellen Hormone ein noch kaum ausgewertetes Thema dar.

Für eine Bestätigung der hier aufgestellten Theorien wäre es sinnvoll, wie weiter oben im Text diskutiert, noch weitere Zeitpunkte nach der Inokulation mit *P. parasitica* (z.B. 6 hpi), *V. longisporum* (z.B. 3 dpi), und *P. indica* (z.B. 6 dpi) zu analysieren. Dadurch lassen sich die zeitliche Dynamik der differentiellen Genexpression und die Effektor-vermittelte Immunsuppression untersuchen. Es könnte genau lokalisiert werden, in welcher Zellschicht die Effektoren am stärksten wirken.

Weitere an *Arabidopsis* geeignete Modellerreger sollten verwendet werden, um die Antworten der Zellschichten auf die unterschiedlichsten Lebensstrategien von Mikroorganismen vergleichen zu können. Wie *V. longisporum* ist *F. oxysporum* ein bodenbürtiger, filamentöser, vaskulärer und hemibiotropher Pilz (Thaler *et al.*, 2004) und da *Arabidopsis* für die pathogenen *Fusarium* Stämme eine Wirtspflanze darstellt (Dombrecht *et al.*, 2006; van Hemelrijck *et al.*, 2006; Berrocal-Lobo und Molina, 2008; Michielse und Rep, 2009), könnte dieser Pilz in einer zukünftigen Studie verwendet werden. Außerdem wäre es empfehlenswert, Inf-TRAP-Seq Studien mit biotrophen (z.B. *Hyaloperonospora parasitica*; vgl. Hermanns *et al.*, 2003) und nekrotrophen (z.B. *Rhizoctonia solani*) Pathogenen durchzuführen und die Wurzelreaktionen auf diese

Organismen mit denen auf hemibiotrophe zu vergleichen. Über eine Untersuchung der Wurzelreaktion auf mutualistische Rhizobakterien (z.B. *Pseudomonas fluorescens*) könnte der ISR-Effekt zellschichtspezifisch aufgelöst werden. Man könnte etwa ermitteln, in welcher Zellschicht die ISR ihren Anfang nimmt, wie sich der Effekt systemisch fortsetzt und dann letztendlich in der gesamten Wirtspflanze die Pathogentoleranz verbessern kann. Bald könnte der zelltypspezifische *Arabidopsis* Translatom Atlas um die durch Bodenorganismen induzierten Genexpressionen in der Wurzel erweitert werden (Cell Type Specific *Arabidopsis* eFP Browser; Mustrup *et al.*, 2009).

In anderen Forschungsbereichen der Biologie wird die TRAP-Methodik ebenfalls genutzt, was das große und wachsende Interesse an zelltypspezifischen Untersuchungen demonstriert. Zwar beschreibt das mittels TRAP gewonnene Translatom die tatsächliche Genexpression auf einem exakteren Level als das Transkriptom. Trotzdem heißt das nicht zwangsläufig, dass die Genprodukte der induzierten Gene auch wirklich dort Reaktionen oder Stoffumwandlungen katalysieren. Post-translationelle Modifikationen können unter Umständen Enzyme wirkungsvoll deaktivieren. Um die Ergebnisse des Inf-TRAP-Seq weiter zu validieren und biologische Relevanzen der differentiell und zelltypspezifisch exprimierten Gene definieren zu können, könnte zusätzlich das Metabolom analysiert werden. Über „Metabolomics“, d.h. die Messung aller endogenen Metaboliten in einer Probe, könnte das Verständnis von Mechanismen der Pathogenabwehr erweitert werden. MSI (*Mass spectrometry imaging*) Techniken machen es seit geraumer Zeit möglich, die Metabolom Verteilung in einer Art zellulär-aufgelöster Kartierung darzustellen (Ratcliffe und Shachar-Hill, 2001; Cooks *et al.*, 2006). Auf diese Weise konnte z.B. herausgefunden werden, dass in *Arabidopsis*-Blättern die Verteilung von Glucosinolaten und anderen Abwehrmetaboliten ein typisches Muster aufweist und dass eine ungleichmäßige Mengenverteilung von Glucosinolaten in verschiedenen Blattregionen das Fressverhalten von Herbivoren kontrollieren kann (Shroff *et al.*, 2007). Vielleicht könnte diese Methode schon bald dazu genutzt werden, um die Metabolom Verteilungen in der Wurzel vor und während Pathogenbefall vergleichen zu können. Schließlich wäre dies die nächste Ebene, um zellschichtspezifische Pathogenabwehr-Strategien zu identifizieren.

## 7. Literaturverzeichnis

- AGI:** *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Ahmad P., Ashraf M., Younis M., Hu X., Kumar A., Akram N.A., Al-Qurainy F.** (2012) Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances* 30(2012): 524-540.
- Altenbach D. und Robatzek S.** (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, no. 9: 1031-9.
- Aoki Y., Okamura Y., Tadaka S., Kinoshita K., Obayashi T.** (2016) ATTED-II in 2016: A Plant Coexpression Database Towards Lineage-Specific Coexpression. *Plant Cell Physiol.* 2016 Jan;57(1):e5. doi: 10.1093/pcp/pcv165.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J.** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. 2002 Feb 28;415(6875):977-83.
- Attard A., Gourgues M., Galiana E., Panabières F., Ponchet M., Keller H.** (2008) Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda de Haan). *J Plant Physiol.* 2008 Jan;165(1):83-94.
- Attard A., Gourgues M., Callemeyn-Torre N., Keller H.** (2010) The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol.* 2010 Jul;187(2):449-60.
- Attard A., Evangelisti E., Kebdani-Minet N., Panabières F., Deleury E., et al.** (2014) Transcriptome dynamics of *Arabidopsis thaliana* root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics* 2014 Jun 29;15:538.
- Ausubel F.M.** (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol.* 2005 Oct;6(10):973-9.
- Bai Y., Müller D.B., Srinivas G., Garrido-Oter R., Potthoff E., Rott M., Dombrowski N., Münch P.C., Spaepen S., Remus-Emsermann M., Hüttel B., McHardy A.C., Vorholt J.A., Schulze-Lefert P.** (2015) Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. *Nature*. 2015 Dec 17;528(7582):364-9. doi: 10.1038/nature16192.
- Bailey-Serres J.** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci* 4: 142-148.
- Bailey-Serres J, Sorenson R., Juntawong P.** (2009) Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci* 2009; 14:443-53.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M.** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266.
- Balagopal V. und Parker R.** (2009) Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21:403-8.
- Baldauf S.L., Roger A.J., Wenk-Siefert I., Doolittle W.F.** (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 2000;290:972–7.

- Balmer D., de Papajewski D.V., Planchamp C., Glauser G., Mauch-Mani B.** (2013) Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *Plant J.* 2013 Apr;74(2):213-25. doi: 10.1111/tpj.12114.
- Balmer D. und Mauch-Mani B.** (2013) More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. *Front Plant Sci.* 4:256 10.3389/fpls.2013.00256.
- Baltruschat H., Fodor J., Harrach B.D., Niemczyk E., Barna B., et al.** (2008) Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol.* 2008;180:501–510.
- Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Peter W Barlow P.W.** (2009) The 'root-brain' hypothesis of Charles and Francis Darwin - Revival after more than 125 years. *Plant Signal Behav.* 2009 Dec; 4(12): 1121–1127.
- Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A.** (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920.
- Banhara A., Ding Y., Kühner R., Zuccaro A., Parniske M.** (2015) Colonization of root cells and plant growth promotion by *Piriformospora indica* occurs independently of plant common symbiosis genes. *Front Plant Sci.* 2015 Sep 17;6:667.
- Barazani O., Benderoth M., Groten K., Kuhlemeier C., Baldwin I.T.** (2005) *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 146, 234–243.
- Barr D.J.S.** (1992) Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* 1992;84:1–11.
- Bartinicki-Garcia S. und Wang M.C.** (1983) Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: Bartinicki-Garcia S, Tsao PH, editors. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 1983. p. 121–37.
- Beckman C.H.** (1987) The nature of wilt diseases of plants. St. Paul, MN, USA: APS Press
- Bednarek P., Pislewska-Bednarek M., Svatos A., Schneider B., Doubisky J., Mansurova M., Humphry M., et al.** (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323:101-106.
- Bednarek P.** (2012) Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other *Brassicaceae* with function in plant immunity. *Chembiochem.* 2012 Sep 3;13(13):1846-59.
- Bhat R.G. und Subbarao K.V.** (1999) Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89: 1218–1225.
- Beliën T., Van Campenhout S., Robben J. und Volckaert G.** (2006) Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1072-81.
- Bell A.A.** (1969) Phytoalexin production and *Verticillium* wilt resistance in cotton. *Phytopathology* 59: 1119-1127.
- Benhamou N.** (1995) Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with *Verticillium*-infected xylem vessels. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 321-338.

- Benhamou N.B. und Côté F.** (1992) Ultrastructure and cytochemistry of pectin and cellulose degradation in tobacco roots infected by *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. *Phytopathology* 82: 468–542.
- Benjamini Y. und Hochberg Y.** (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* Vol. 57, No. 1 (1995), pp. 289-300.
- Bent A.F.** (2000) *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol* 124: 1540-7.
- Berlanger I. und Powelson M.L.** (2000) *Verticillium* wilt. The Plant Health Instructor. *APSnet Plant Disease Lesson* <http://www.apsnet.org/education/lessonsplantpath/Verticillium/default.htm>
- Berrocal-Lobo M. und Molina A.** (2004) Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 763-70.
- Berrocal-Lobo M. und Molina A.** (2008) *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science* 13: 145-50.
- Bethke G., Unthan T., Uhrig J.F., Pöschl Y., Gust A.A., Scheel D. und Lee J.** (2009) Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signalling. *PNAS* 106 (19): 8067-8072.
- Birch P. R., Armstrong M., Bos J., Boevink P., Gilroy E. M., Taylor R. M., et al.** (2009) Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Exp. Bot.* 60:1133-1140.
- Birnbaum K., Shasha D.E., Wang J.Y., Jung J.W., Lambert G.M., Galbraith D.W., Benfey P.N.** (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* 302: 1956–1960.
- Birnbaum K., Jung J.W., Wang J.Y., Lambert G.M., Hirst J.A., Galbraith D.W., Benfey P.N.** (2005) Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nature Methods*. 2005 Aug;2(8):615-9.
- Bishop C.D. und Cooper R.M.** (1983) An Ultrastructural-Study of Vascular Colonization in 3 Vascular Wilt Diseases. Colonisation of Susceptible Cultivars. *Physiological Plant Pathology* 23, no. 3: 323-343.
- Bittel P. und Robatzek S.** (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 335-341.
- Bodirsky B.L., Rolinski S., Biewald A., Weindl I., Popp A., Lotze-Campen H.** (2015) Global Food Demand Scenarios for the 21<sup>st</sup> Century. *PLoS ONE* 10 (11): e0139201. doi:10.1371/journal.pone.0139201.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M.** (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519–546.
- Boller T. und Felix G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60: 379–406.

- Boller T. und Yang He S.** (2009) Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* Vol. 324 no. 5928: 742-744.
- Bolton E.T. und McCarthy B.J.** (1962): A general method for isolation of RNA complementary to DNA. *PNAS* 48: 1390-1397.
- Bones A.M. und Rossiter J.T.** (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol. Plant.* 97, 194–208.
- 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* 2011, 14:451-457.
- Börner H.** (2009). "Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz." *Springer-Lehrbuch*.
- Bos J.I., Kanneganti T.D., Young C., Cakir C., Huitema E. et al.** (2006) The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* 48: 165–176.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E.** (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* Vol. 161;5, October 2001: 839–851.
- Brady S.M., Orlando D.A., Lee J.Y., Wang J.Y., Koch J., Dinneny J.R., Mace D., Ohler U., Benfey P.N.** (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*. 2007 Nov 2;318(5851):801-6.
- Branco-Price C., Kaiser KA., Jang C.J., Larive CK., Bailey-Serres J.** (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 56: 743-55.
- Brasier C.M. und Sansome E.** (1975) Diploidy and gametangial meiosis in *Phytophthora cinnamomi*, *P. infestans* and *P. drechsleri*. *Trans Br Mycol Soc* 1975;65:49–65.
- Bressan M., Roncato M.A., Bellvert F., Comte G., Haichar F.Z., Achouak W., Berge O.** (2009) Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *ISME J.* 2009 Nov;3(11):1243-57.
- Buhtz A., Kolasa A., Arlt K., Walz C., Kehr J.** (2004) Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* 219: 610-8.
- Bushnell W.R.** (1972) Physiology of fungal haustoria. *Annual Review of Phytopathology* 10: 151–176.
- Carroll A.J., Heazlewood J.L., Ito J., Millar A.H.** (2008) Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Mol. Cell Proteomics* 7(2): 347-69.
- Castroverde C.D.M.** (2010) Defence gene expression in the Tomato-*Verticillium* Pathosystem. *Thesis Master of Science*, University of Guelph.  
<https://dspace.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/2146>.
- Catinot J., Huang J.B., Huang P.Y., Tseng M.Y., Chen Y.L., Gu S.Y., Lo W.S., Wang L.C., Chen Y.R., Zimmerli L.** (2015) ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96 positively regulates *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate - and ethylene-responsive defence genes. *Plant Cell Environ.* 2015 Dec;38(12):2721-34. doi: 10.1111/pce.12583.

- Chapelle A., Morreel K., Vanholme R., Le-Bris P., Morin H., Lapierre C., Boerjan W., Jouanin L., Demont-Caulet N.** (2012) Impact of the absence of stem-specific  $\beta$ -glucosidases on lignin and monolignols. *Plant Physiol.* 2012 Nov;160(3):1204-17.
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J.D.G., Felix G. und Boller T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497-500.
- Chomczynski P. und Sacchi N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1): 156-159.
- Clancy S. und Brown W.** (2008) Translation: DNA to mRNA to Protein. *Nature Education* 1(1):101.
- Clay N.K., Adio A.M., Denoux C., Jander G., and Ausubel F.M.** (2009). Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323:95-101.
- Cline E.T., Farr D.F. und Rossman A.Y.** (2008) Synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2008-0318-01-RS.
- Clough S.J. und Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-43.
- Collard B.C.Y. und Mackill D.J.** (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 363: 557-72.
- Cook R.J. und Weller D.M.** (2004) In Defense of Crop Monoculture. *4th international Crop science congress*, ISCS 2004 Symposia.
- Cooks R.G., Ouyang Z., Takats Z., Wiseman J.M.** (2006) Ambient mass spectrometry. *Science* 311:1566–1570.
- Cooper R.M. und Williams J.S.** (2004) Elemental sulphur as an induced antifungal substance in plant defence. *Journal of Experimental Botany* 55: 1947-53.
- Corrales A.R., Carrillo L., Nebauer S.G., Renau-Morata B., Sánchez-Perales M., et al.** (2014) Salinity Assay in *Arabidopsis*. *Bio-protocol* 4(16): e1216.
- Cosgrove D.J.** (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 2000, 407:321-326.
- Cosgrove D. J.** (2015) Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol.* 2015 June ; 25: 162–172.
- Daayf F., Nicole M., Boher B., Pando A., Geiger J.P.** (1997) Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 103: 125-136.
- Dangl J.L. und Jones J.D.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33.
- Darwin C.R. und Darwin F.** (1880): The Power of Movements in Plants. *John Murray*, London (<http://darwin-online.org.uk/>).

- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J.** (1985) Efficient octopine Ti plasmid vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 1985;13:4777–4788. doi: 10.1093/nar/13.13.4777.
- Delaux P.M., Séjalon-Delmas N., Bécard G., Ané J.M.** (2013) Evolution of the plant-microbe-symbiotic 'toolkit'. *TrendsPlantSci.* 18,298–304.
- Delaux P.M., Varala K., Edger P.P., Coruzzi G.M., Pires J.C. Ané J.M.** (2014).Comparative phylogenomics uncovers the impact of symbiotic associations on host genome evolution. *PLoSGenet.* 10:e1004487. doi:10.1371/journal.pgen.1004487.
- Depotter J.R., Deketelaere S., Inderbitzin P., von Tiedemann A., Höfte M., Subbarao K.V., Wood T.A., Thomma B.P.** (2015) *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other *Brassicaceae* plant hosts. *Mol Plant Pathol.* 2015 Dec 9. doi: 10.1111/mpp.12350. [Epub ahead of print].
- Deshmukh S., Hückelhoven R., Schäfer P., Imani J., Sharma M., Weiss M., Waller F., Kogel K.H.** (2006) The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Dec 5;103(49):18450-7.
- Deshmukh S. und Kogel K.H.** (2007) *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, December 2007, Vol. 114(6):263-268.
- de Wit P. J., Mehrabi R., Van den Burg H. A., Stergiopoulos I.** (2009) Fungal effector proteins: Past, present and future. *Mol. Plant Pathol.* 10:735-747.
- Dinneny J.R., Long T.A., Wang J.Y., Jung J.W., Mace D., Pointer S., Barron C., Brady S.M., Schiefelbein J., Benfey P.N.** (2008) Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science* 320: 942–945.
- Dodds P.N. und Rathjen J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat.Rev.Genet.* 11, 539–548.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B.** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development.* 1993 Sep;119(1):71-84.
- Dolan L., Duckett C.M., Grierson C.S., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig S., Roberts K.** (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development*, Vol. 120, 1994, p. 2465 - 2474.
- Dolan L.** (2001) The role of ethylene in root hair growth in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164(2):141-145.
- Dolan L. und Davies J.** (2004) Cell expansion in roots. *Curr Opin Plant Biol.* 2004 Feb;7(1):33-9.
- Dombrecht B., Kazan K. und Manners J. M.** (2006) Improved resistance to *Fusarium* wilt through genetic engineering of defense signaling pathways. in: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology.* Global Science Books, London: 388-398.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H.** (1980). *Nectria* (Fr) 1849, *Verticillium* Nees ex Link 1824. In: Compendium of Soil Fungi (pp. 829–845),Vol1. *New York: Academic Press.*
- Dörfelt H.**(Hrsg.) (1989): Lexikon der Mykologie. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.*

- Dunker S., Kuenecke H. und von Tiedemann A.** (2006) *Verticillium longisporum* in winter oilseed rape – Impact on plant development and yield. *Integrated Control in Oilseed Crops* 29: 365-374.
- Durrant W.E. und Dong X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.
- Eichmann R. und Hückelhoven R.** (2008) Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 5-18.
- Ellis J. G., Rafiqi M., Gan P., Chakrabarti A., Dodds P. N.** (2009) Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:399-405.
- Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D., Chuaqui R.F., Zhuang Z., Goldstein S.R., Weiss R.A., Liotta L.A.** (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274(5289): 998-1001.
- Erwin D. und Ribeiro O.K.** (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Esau K.** (1965). Plant Anatomy. John Wiley and Son, New York.
- Eulgem T. und Somssich I.E.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 366–371.
- Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P., von Tiedemann A.** (2007) Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur J Plant Pathol* 118: 259–274.
- Eynck C., Koopmann B., Karlovsky P., von Tiedemann A.** (2009) Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology* 99(7): 802-11.
- Felix G., Regenass M., Boller T.** (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J* 1993;4:307–16.
- Felle H.H., Waller F., Molitor A., Kogel K.H.** (2009) The mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* induces fast root-surface pH signaling and primes systemic alkalization of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009 Sep;22(9):1179-85. doi: 10.1094/MPMI-22-9-1179.
- Ferrari S., Galletti R., Denoux C., De Lorenzo G., Ausubel F.M. und Dewdney J.** (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* 144: 367-79.
- Fester T. und Hause B.** (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15: 373–379.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.
- Fischer U. und Dröge-Laser W.** (2004) Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1162-71.

- Floerl S., Drübert C., Majcherczyk A., Karlovsky P., Kues U., Polle A.** (2008) Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology* 8: 129.
- Floerl S., Majcherczyk A., Possienke M., Feussner K., Tappe H., Gatz C., Feussner I., Kues U., Polle A.** (2012) *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 2012;7(2):e31435. doi: 10.1371/journal.pone.0031435.
- Flor H.H.** (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Foley J.** (2014) A five step plan to feed the world. *National Geographic* May issue 2014.
- Fradin E.F. und Thomma B.** (2006) Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7: 71-86.
- Franke R. und Schreiber L.** (2007) Suberin--a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol.* 2007 Jun;10(3):252-9.
- Frerigmann H. und Gigolashvili T.** (2014) *MYB34*, *MYB51* and *MYB122* distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 7, 814-828. doi:10.1093/mp/ssu004.
- Fritz-Laylin L.K., Krishnamurthy N., Tör M., Sjölander K.V. und Jones J.D.** (2005) Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 611-23.
- Fröschel C.M.** (2011) Genomweite Analyse der zelltypspezifischen Expression Pilz- induzierter Gene in der *Arabidopsis*-Wurzel. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Fuchs R., Kopischke M., Klapprodt C., Hause G., Meyer A.J., Schwarzländer M., Fricker M.D., Lipka V.** (2016) Immobilized Subpopulations of Leaf Epidermal Mitochondria Mediate PENETRATION2-Dependent Pathogen Entry Control in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 28: 130–145.
- Gachon C., Langlois-Meurinne M. und Saindrenan P.** (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10: 542-9.
- Galbraith D.W., Afonso C.L. und Harkins K.R.** (1984) Flow sorting and culture of protoplasts: Conditions for high-frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplasts of suspension cultures of nicotiana. *Plant Cell Rep.*1984Aug;3(4):151-5.
- Galiana E., Riviere M.P., Pagnotta S., Baudouin E., Panabieres F., Gounon P., et al.** (2005) Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Cell Microbiol* 2005;7:1365–78.
- Galiana E., Fourné S., Engler G.** (2008) *Phytophthora parasitica* biofilm formation: installation and organization of microcolonies on the surface of a host plant. *Environ Microbiol.* 2008 Aug;10(8):2164-71.
- Gaulin E., Jauneau A., Villalba F., Rickauer M., Esquerre´-Tugaye´ M.T., Bottin A.** (2002) The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J Cell Sci* 2002;115:4565–75.

- Gaulin E., Drame N., Lafitte C., Torto-Alalibo T., Martinez Y., Ameline-Torregrosa C., et al.** (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell* 2006; 18:1766–77.
- Gechev TS., Van Breusegem F., Stone JM., Denev I., Laloi C.** (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28(11): 1091-101.
- Genre A., Chabaud M., Balzergue C. et al.** (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*;198:190–202.
- Gibson U.E., Heid C.A. und Williams P.M.** (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6 (10), 995-1001.
- Gifford M.L., Dean A., Gutierrez R.A., Coruzzi G.M., Birnbaum K.D.** (2008) Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:803–808.
- Gigolashvili T., Berger B., Mock H.P., Muller C., Weisshaar B. and Flügge U.I.** (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50, 886–901.
- Gigolashvili T., Berger B., und Flügge U.I.** (2009). Specific and coordinated control of indolic and aliphatic glucosinolate biosynthesis by R2R3–MYB transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem. Rev.* 8, 3–13.
- Glaeser S.P., Imani J., Alabid I., Guo H., Kumar N., Kämpfer P., et al.** (2016) Non-pathogenic *Rhizobium radiobacter* F4 deploys plant beneficial activity independent of its host *Piriformospora indica*. *ISME J.* 2016 Apr;10(4):871-84. doi: 10.1038/ismej.2015.163.
- Glawischnig E., Hansen B.G., Olsen C.E., und Halkier B.A.** (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8245-8250.
- Glawischnig E.** (2007) Camalexin. *Phytochemistry* 68: 401-6.
- Glazebrook J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-27.
- Göhde W.** (1968) Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion. *Patent* DE1815352.
- Gordee R.S. und Porter C.L.** (1985) Structure, germination, and physiology of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* 27: 109-118.
- Gornhardt B., Rouhara I., Schmelzer E.** (2000) Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins. *Mol Plant Microbe Interact* 2000;13:32–42.
- Grebe M.** (2011) Plant biology: Unveiling the Casparian strip. *Nature.* 2011 May 19; 473(7347):294-5. doi: 10.1038/473294a.

- Gregory P.J., Johnson S.N., Newton A.C., Ingram J.S.I.** (2009) Integrating pests and pathogens into the climate change/food security debate. *Journal of Experimental Botany* 60, 2827–2838.
- Griffiths D.A.** (1971) The development of lignitubers in roots after infection by *Verticillium dahliae* Kleb. *Canadian Journal of Microbiology* 17: 441-4.
- Grubb C.D. und Abel S.** (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11: 89-100.
- Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, H., Kindle, A. and Sogin, M.L.** (1987) Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5823–5827.
- Gutjahr C., Parniske M.** (2013) Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013, 29:593-617.
- Gutterson N. und Reuber T.L.** (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 465-71.
- Halbeisen R.E. und Gerber A.P.** (2009) Stressdependent coordination of transcriptome and translome in yeast. *PLoS Biol* 7:e105.
- Halkier, B.A. und Gershenzon, J.** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303–333.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80.
- Harrison M.J.** (2012) Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 2012, 15:691-698.
- Head S.R., Komori H.K., LaMere S.A., Whisenant T., Van Nieuwerburgh F., R. Salomon D.R., Ordoukhanian P.** (2015) Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *Biotechniques*. ; 56(2): 61–passim. doi:10.2144/000114133.
- Heath M.C.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44: 312–334.
- Hématy K., Cherk C. und Somerville S.** (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:406-413.
- Hein I., Gilroy E. M., Armstrong M. R., Birch P. R.** (2009) The zigzag-zig in oomycete-plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* 10:547-562.
- Heinz R., Lee S.W., Saparno A., Nazar R.N. und Robb J.** (1998) Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 385-396.
- Heiman M. et al.** (2008) A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135, 738–748 (2008).
- Heiman M., Kulicke R., Fenster R.J., Greengard P., Heintz N.** (2014) Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat Protoc.* 2014;9(6):1282-91.
- Hermanns M., Slusarenko A.J. und Schlaich N.L.** (2003) Organ-specificity in a plant disease is determined independently of R gene signaling. *Mol Plant Microbe Interact.* 2003 Sep;16(9):752-9.

- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J.** (1992) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Biotechnology* 24: 377-81.
- Herron M. D., Hackett J. D., Aylward F. O., Michod, R. E.** (2009) Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 3254–3258.
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F. et al.** (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-47.
- Hilbert M., Voll L.M., Ding Y., Hofmann J., Sharma M., Zuccaro A.** (2012) Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytol.* 2012 Oct;196(2):520-34.
- Hoerberichts F.A. und Woltering E.J.** (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 2003 Jan;25(1):47-57.
- Hok S., Attard A., Keller H.** (2010) Getting the most from the host: how pathogens force plants to cooperate in disease. *Mol Plant Microbe Interact.* 2010 Oct;23(10):1253-9.
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Grissem W., Zimmermann P.** (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics.* 2008;2008:420747.
- Hsu F.C., Chou M.Y., Chou S.J., Li Y.R., Peng H.P., Shih M.C.** (2013) Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2013 Jul;25(7):2699-713. doi: 10.1105/tpc.113.114447.
- Huang D.W., Sherman B.T. und Lempicki R.A.** (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.
- Huang P.Y., Catinot J. und Zimmerli L.** (2015) Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *J Exp Bot.* 2016 Mar;67(5):1231-41. doi: 10.1093/jxb/erv518.
- Hückelhoven R.** (2004) BAX inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 2004 May;9(3):299–307.
- Hückelhoven R.** (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45: 101-27.
- Ingle, R.A., Carstens, M. und Denby, K.J.** (2006) PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays* 28 (2006) 880-889.
- Inoue H., Nojima H. und Okayama H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Iven T.** (2009) Transkriptomanalyse der *Arabidopsis*-Wurzel nach Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *Verticillium longisporum* und Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren der Pathogenantwort. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen. <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2010/iven/>.
- Iven T., König S., Singh S., Braus-Stromeyer S.A., Bischoff M., Tietze L.F., Braus G.H., Lipka V., Feussner I., Dröge-Laser W.** (2012) Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol Plant.* 2012 Nov;5(6):1389-402.

- Iwai H., Usui M., Hoshino H., Kamada H., Matsunaga T., Kakegawa K., Ishii T., Satoh S.** (2003) Analysis of sugars in squash xylem sap. *Plant & Cell Physiology* 44: 582-7.
- Jacobs S., Zechmann B., Molitor A., Trujillo M., Petutschnig E., Lipka V. et al.** (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiol.* 156,726–740.
- Jansen M., Slusarenko A.J. und Schaffrath U.** (2006) Competence of roots for race-specific resistance and the induction of acquired resistance against *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Pathol.* 2006 May 1;7(3):191-5. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00331.x.
- Jiang R.H., Tripathy S., Govers F., Tyler B.M.** (2008) RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving super-family with more than 700 members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:4874–4879.
- Johansson, A., Goud, J.-K.C. und Dixelius, C.** (2006a) Plant host range of *Verticillium longisporum* and microsclerotia density in Swedish soils. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 139–149.
- Johansson A., Staal J. und Dixelius C.** (2006b) Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 958-69.
- Johansson O.N., Fantozzi E., Fahlberg P., Nilsson A.K., Buhot N., Tör M., Andersson M.X.** (2014) Role of the penetration-resistance genes *PEN1*, *PEN2* and *PEN3* in the hypersensitive response and race-specific resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2014 Aug;79(3):466-76. doi: 10.1111/tpj.12571.
- Johnson J. M. und Oelmüller R.** (2009) Mutualism and parasitism: life in an unstable continuum. What can we learn from the mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*? *Endocyt. Cell Res.* 19:81-111.
- Jones J.D. und Dangl J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Jungk A.** (2001) Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 164(2):121–129.
- Juntawong P, Bailey-Serres J.** (2012) Dynamic light regulation of translation status in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 2012; 3:66.
- Kafri R., Springer M. und Pilpel Y.** (2009) Genetic redundancy: new tricks for old genes. *Cell* 2009 Feb 6;136(3):389-92.
- Kamiya T., Borghi M., Wang P., Danku J.M., Kalmbach L., Hosmani P.S., Naseer S., Fujiwara T., Geldner N., Salt D.E.** (2015) The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 18;112(33):10533-8.
- Kamoun S., Klucher K.M., Coffey M.D., Tyler B.M.** (1993) A gene encoding A host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact.* 6(5):573–581.
- Kamoun S., Furzer O., Jones J.D., Judelson H.S., Ali G.S., Dalio R.J. et al.** (2015) The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2015 May;16(4):413-34. doi: 10.1111/mpp.12190.
- Karapapa V.K., Bainbridge B.W. und Heale J.B.** (1997) Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape 101:1281-1294.

- Karapapa V.K. und Typas M.A.** (2001) Molecular characterization of the host-adapted pathogen *Verticillium longisporum* on the basis of a group-I intron found in the nuclear SSU-rRNA gene. *Current Microbiology* 42: 217-24.
- Karimi M., Inzé D. und Depicker A.** (2002) Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002 May;7(5): 193-195.
- Kawaguchi R. und Bailey-Serres J.** (2005) mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 33:955-65.
- Kebdani N., Pieuchot L., Deleury E., Panabières F., Le Berre J.Y., Gourgues M.** (2010) Cellular and molecular characterization of *Phytophthora parasitica* appressorium-mediated penetration. *New Phytol.* 185(1):248–257.
- Kerk N.M., Ceserani T., Tausta S.L., Sussex I.M., Nelson T.M.** (2003) Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiol* 132: 27–35.
- Khatabi B. und Schäfer P.** (2012) Ethylene in mutualistic symbioses. *Plant Signal Behav.* 2012 Dec;7(12):1634-8.
- Kidd B.N. et al.** (2009). The mediator complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate-dependent defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 21, 2237–2252.
- Kidd B. N., Kadoo N. Y., Dombrecht B., Tekeoglu M., Gardiner D. M., et al.** (2011) Auxin Signaling and Transport Promote Susceptibility to the Root-Infecting Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *MPMI* 24 (6): 733-748.
- Kim D. und Salzberg S.L.** (2011) TopHat-Fusion: an algorithm for discovery of novel fusion transcripts. *Genome Biol.* 2011 Aug 11;12(8):R72.
- Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., Salzberg S.L.** (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 2013 Apr 25;14(4):R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- Klemptner R.L., Sherwood J.S., Tugizimana F., Dubery I.A., Piater L.A.** (2014) Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP). *Mol Plant Pathol.* 2014 Sep;15(7):747-61. doi: 10.1111/mpp.12127.
- Klimes A. und Dobinson K.F.** (2006) A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 283-94.
- Ko W.** (1981) Reversible change of mating type in *Phytophthora parasitica*. *J Gen Microbiol.* 125(2):451–454.
- Koncz C. und Schell J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204, 383-396.
- König S., Feussner K., Kaefer A., Landesfeind M., Thurow C., Karlovsky P. et al.** (2014) Soluble phenylpropanoids are involved in the defense response of *Arabidopsis* against *Verticillium longisporum*. *New Phytol.* 2014 May;202(3):823-37. doi: 10.1111/nph.12709.
- Koornneef A. und Pieterse C.M.J.** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839-44.

- Krämer R., Freytag S. und Schmelzer E.** (1997) *In vitro* formation of infection structures of *Phytophthora infestans* is associated with synthesis of stage specific polypeptides. *European Journal of Plant Pathology* 103: 43–53.
- Krings M., Taylor T.N. und Dotzler N.** (2011) The fossil record of the *Peronosporomycetes* (Oomycota). *Mycologia* 103, 455–457.
- Kroon L.P., Brouwer H., de Cock A.W., Govers F.** (2012) The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102(4):348–364.
- Krüger W.** (1989) Untersuchungen zur Verbreitung von *Verticillium dahliae* Kleb. und anderen Krankheits- und Schaderregern bei Raps in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 41: 49–56.
- Kurata, T., Okada, K. und Wada, T.** (2005) Intercellular movement of transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 600-605.
- Kyhse-Anderson J.** (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, 10.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lahrmann U. und Zuccaro A.** (2012) Opprimo ergo sum--evasion and suppression in the root endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 Jun;25(6):727-37. doi: 10.1094/MPMI-11-11-0291.
- Lahrmann U., Ding Y., Banhara A., Rath M., Hajirezaei M.R., Döhlemann S., von Wire´n N., Parniske M., Zuccaro A.** (2013) Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, 110:13965-13970.
- Laibach F.** (1943) *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot. Arch.* 44: 439-455.
- Lalonde S., Wipf D. und Frommer W.B.** () Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:341-72.
- Lamb C. und Dixon R. A.** (1997) THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Lamour K.H. und Kamoun S.** (2009) Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools. *Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.*
- Lanoue A., Burlat V., Henkes G.J., Koch I., Schurr U., Röse U.S.R.** (2010). *De novo* biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytol.* 185,577–588.
- Latgé J.P. und Beauvais A.** (2014) Functional duality of the cell wall. *Curr Opin Microbiol* 2014;20:111–7.
- Le Berre J.Y., Engler G. und Panabières F.** (2007) Exploration of the late stages of the tomato-*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of expressed sequence tags. *New Phytol.* 2008;177(2):480-92.

- Le Berre J.Y., Engler G. und Panabières F.** (2008) Exploration of the late stages of the tomato–*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of expressed sequence tags. *New Phytologist* 177: 480–492.
- Lee E.J., Matsumura Y., Soga K., Hoson T., Koizumi N.** (2007) Glycosyl hydrolases of cell wall are induced by sugar starvation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2007Mar;48(3):405-13.
- Liang D., White R. G. und Waterhouse P. M.** (2012) Gene silencing in *Arabidopsis* spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template dependent, nonvascular, cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* 159, 984–1000.
- Libault M., Wan J., Czechowski T., Udvardi M., Stacey G.** (2007) Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plantdefense elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 900-11.
- Lipka V., Dittgen J., Bednarek P. et al.** (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 310: 1180–1183.
- Lipka U., Fuchs R. und Lipka V.** (2008) *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 404-11.
- Livak K.J. und Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M. et al.** (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 513–545.
- Luethy B. und Matile P.** (1984) The mustard oil bomb: rectified analysis of the subcellular organization of the myrosinase system. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 179, 5–12.
- Mackey D., Holt B.F. 3rd, Wiig A. und Dangl J.L.** (2002) RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 743–754.
- Magyar Z., Horvath B., Khan S., Mohammed B., Henriques R., De Veylder L., Bako L., Scheres B., Bogre L.** (2012) *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J.* 2012; 31:1480–1493.
- Malamy J.E., Benfey P.N.** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 1997 Jan;124(1):33-44.
- Mansfield J.W.** (2009) From bacterial avirulence genes to effector functions via the hrp delivery system: An overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Mol. Plant. Pathol.* 10:721-734.
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhanga S.** (2011) Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23,1639-53.
- Matamoros M.A., Dalton D.A., Ramos J., Clemente M.R., Rubio M.C., Becana M.** (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia–legume symbiosis. *Plant Physiol* 133: 499–509.
- Matsushima et al.** (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33, 493–502.

- Matzinger P.** (2007) Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature Immunology* 8: 11-3.
- McCulloh K.A., Sperry J.S. und Adler F.R.** (2003) Water transport in plants obeys Murray's law. *Nature*. 2003 Feb 27;421(6926):939-42.
- McDonell M.W., Simon M.N. und Studier F.W.** (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, 110, 119-46.
- McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.-R., Udvardi M.K., Kazan K.** (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology* 139: 949-59.
- Melnyk C. W., Molnar A. und Baulcombe D. C.** (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* 30, 3553–3563 (2011).
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y.** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-80.
- Melotto M., Underwood W. und He S.Y.** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46: 101-22.
- Meng X., Xu J., He Y., Yang K.Y., Mordorski B., Liu Y. et al.** (2013) Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *Plant Cell* 25: 1126–1142.
- Meng Y., Zhang Q., Ding W., Shana W.** (2014) *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology* 2014 Jun; 5(2): 43–51.
- Meyer, A., Puhler, A., und Niehaus, K.** (2001). The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 213: 214–222.
- Miller S. M.** (2010) *Volvox*, *Chlamydomonas*, and the Evolution of Multicellularity. *Nature Education* 3(9):65.
- Millet Y.A., Danna C.H., Clay N.K., Songnuan W., Simon M.D., Werck-Reichhart D., Ausubel F.M.** (2010) Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell* 22:973-990.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K. et al.** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *PNAS* 104: 19613-8.
- Moffett P.** (2009) Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Adv Virus Res* 75: 1–33, 228–229.
- Molnar A., Melnyk C.W., Bassett A., Hardcastle T.J., Dunn R., Baulcombe D.C.** (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872–875 (2010).
- Müller B., Fastner A., Karmann J., Mansch V., Hoffmann T., Schwab W. et al.** (2015) Amino Acid Export in Developing *Arabidopsis* Seeds Depends on UmamiT Facilitators. *Curr Biol*. 2015 Dec 7;25(23):3126-31.

- Müller T.M., Böttcher C., Morbitzer R., Götz C.C., Lehmann J., Lahaye T., Glawischnig E.** (2015) TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASE-Mediated Generation and Metabolic Analysis of Camalexin-Deficient *cyp71a12 cyp71a13* Double Knockout Lines. *Plant Physiol.* 2015 Jul;168(3):849-58.
- Mullis K.B. und Faloona F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzym.* 155, 335–350 (1987).
- Murashige T. und Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Mustroph A., Zanetti M.E., Jang C.J.H., Holtan H.E., Repetti P.P., Galbraith D.W., Thomas Girke, Bailey-Serres J.** (2009) Profiling translatoemes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *PNAS* vol. 106 no. 44: 18843–18848.
- Mustroph A. und Bailey-Serres J.** (2010) The *Arabidopsis* translatoeme cell-specific mRNA atlas. Mining suberin and cutin lipid monomer biosynthesis genes as an example for data application. *Plant Signaling and Behavior* 5:3, 320-324.
- Nakajima K., Sena G., Nawy T., Benfey P.N.** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307–311.
- Nakano T., Suzuki K., Fujimura T., Shinshi H.** (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 140: 411-32.
- Naseer S., Lee Y., Lapierre C., Franke R., Nawrath C., Geldner N.** (2012) Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(25):10101–10106.
- Návarová H., Bernsdorff F., Döring A.C., Zeier J.** (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell.* 2012 Dec;24(12):5123-41.
- Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Keller I., Robatzek S., Boller T., Jones J.D.** (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* 135:1113-28.
- Nitz I., Berkefeld H., Puzio P.S., Grundler F.M.** (2001) PYK10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 161, 337–346.
- Nongbri P.L., Johnson J.M., Sherameti I., Glawischnig E., Halkier B.A., Oelmüller R.** (2012) Indole-3-acetaldoxime-derived compounds restrict root colonization in the beneficial interaction between *Arabidopsis* roots and the endophyte *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 Sep;25(9):1186-97.
- Nowack M.K., Harashima H., Dissmeyer N., Zhao X., Bouyer D., Weimer A.K., De Winter F., Yang F., Schnittger A.** (2012). Genetic framework of cyclin-dependent kinase function in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 22: 1030–1040.
- Nürnbergger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L.** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–266.
- Nürnbergger T. und Lipka V.** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* 6, 335–345.

- Obayashi T., Hayashi S., Saeki M., Ohta H., Kinoshita K.** (2009) ATTED-II provides coexpressed gene networks for *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37:D987-91. doi: 10.1093/nar/gkn807.
- Oelmüller R., Shahollari B., Peškan-Berghöfer T., Trebicka A., Giong P.H., Sherameti, I. et al.** (2004) Molecular analyses of the interaction between *Arabidopsis* roots and the growth-promoting fungus *Piriformospora indica*. *Endocytobiosis Cell Res.* 15, 504–517.
- Oelmüller R., Sherameti I., Tripathi S., Varma A.** (2009) *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Review Article Symbiosis* Sept. 2009, Vol. 49(1):1-17.
- Oerke E.-C.** (2006) Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144, 31–43.
- O'Grada C.** (1999) *Black '47 and Beyond: the Great Irish Famine in History, Economy and Memory.* Princeton: Princeton University Press.
- Okubara P. und Paulitz T.** (2005) Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. *Root Physiology: from Gene to Function*, 215-226.
- Oñate-Sánchez L., Anderson J.P., Young J., Singh K.B.** (2007) AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiology* 143: 400-9.
- Panabieres F., Amselem J., Galiana E., Le Berre J.Y.** (2005) Gene identification in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica* during in vitro vegetative growth through expressed sequence tags. *Fungal Genet Biol* 2005;42: 611–23.
- Parker R. und Sheth U.** (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25:635–646.
- Pedras M.S. und Ahiahonu P.W.K.** (2005) Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 66: 391-411.
- Pedrotti L., Müller M.J. und Waller F.** (2013) *Piriformospora indica* root colonization triggers local and systemic root responses and inhibits secondary colonization of distal roots. *PLoS One.* 2013 Jul 26;8(7):e69352. doi: 10.1371/journal.pone.0069352.
- Pegg G. F.** (1984). The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopathologia Mediterranea* 23: 176–192.
- Pegg G.F. und Brady B.L.** (2002) *Verticillium* Wilts. Wallingford: CABI.
- Peškan-Berghöfer T, Shahollari B, Giong PH, Hehl S, Markert C, et al.** (2004) Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum.* 2004;122:465–477.
- Pfister A., Barberon M., Alassimone J., Kalmbach L., Lee Y., Vermeer J.E., Yamazaki M., Li G., Maurel C., Takano J., Kamiya T., Salt D.E., Roppolo D., Geldner N.** (2014) A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *Elife.* 2014 Sep 16;3:e03115. doi: 10.7554/eLife.03115.
- Pham G.H., Kumari R., Singh A., Malla R., Prasad R. et al.** (2004). Axenic Culture of Symbiotic Fungus *Piriformospora indica*. *Plant Surface Microbiology* 593-612.

- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., van der Putten W.H.** (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Nov;11(11):789-99. doi: 10.1038/nrmicro3109.
- Pieterse C.M.J., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., van Wees S.C.M., Bakker P.A.** (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:347–75.
- Piotrowski M., Schönfelder S. und Weiler E.W.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2616-21. Epub 2000 Nov 1.
- Planet E., Attolini C.S.O., Reina O., Flores O., Rossell D.** (2012) htSeqTools: high-throughput sequencing quality control, processing and visualization in R. *Bioinformatics* Vol. 28 no. 4 2012, pages 589–590.
- Pollard M., Beisson F., Li Y. und Ohlrogge J.B.** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* 13: 236-46.
- Pré M., Atallah M., Champion A., De Vos M., Pieterse C.M.J., Memelink J.** (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* 147: 1347-57.
- Prell J. and Poole P.** (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14: 162-168.
- Proud C.G.** (2007) Signaling to translation: How signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 403:217–234.
- Qiang X., Zechmann B., Reitz M.U., Kogel K.H., Schäfer P.** (2012) The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *Plant Cell.* 2012 Feb;24(2):794-809.
- Qiu J.-L., Fiil B.K., Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J., Thorgrimsen S., Palma K., et al.** (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* 27: 2214-21.
- Raczy C., Petrovski R., Saunders C.T., Chorny I., Kruglyak S., Margulies E.H. et al.** (2013) Isaac: ultra-fast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics.* 2013 Aug 15;29(16):2041-3.
- Rajniak J., Barco B., Clay N.K., Sattely E.S.** (2015) A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. *Nature.* 2015 Sep 17;525(7569):376-9.
- Rask L., Andreasson E., Ekbom B., Eriksson S., Pontoppidan B., Meijer, J.** (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*. *Plant Mol. Biol.* 42, 93–113.
- Ratcliffe R.G. und Shachar-Hill Y.** (2001) Probing plant metabolism with NMR. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:499–526.
- Rehmany A. P., Gordon A., Rose L. E., Allen R. L., Armstrong M. R. et al.** (2005) Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* 17:1839–1850.

- Reusche M., Thole K., Janz D., Truskina J., Rindfleisch S., Drübert C., Polle A., Lipka V., Teichmann T.** (2012) *Verticillium* infection triggers VASCULARRELATED NAC DOMAIN7-dependent *de novo* xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 24, 3823-3837.
- Reusche M.** (2011) Analyse der *Verticillium longisporum* induzierten Seneszenz und Transdifferenzierung in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2011/reusche/>.
- Reynoso M.A., Blanco F.A. und Zanetti M.E.** (2013a) Insights into post-transcriptional regulation during legume-rhizobia symbiosis. *Plant Signal Behav.* 2013 Feb;8(2):e23102.
- Reynoso M.A., Blanco F.A., Bailey-Serres J., Crespi M., Zanetti M.E.** (2013b) Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 2013 Jan;73(2):289-301. doi: 10.1111/tpj.12033.
- Reynoso M.A., Juntawong P., Lancia M., Blanco F.A., Bailey-Serres J., Zanetti M.E.** (2015) Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) followed by RNA sequencing technology (TRAP-SEQ) for quantitative assessment of plant translomes. *Methods Mol Biol.* 2015;1284:185-207. doi: 10.1007/978-1-4939-2444-8\_9.
- Robold A.V. und Hardham A.R.** (2005) During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Curr Genet* 2005;47:307–15.
- Roos J., Bejai S., Mozūraitis R., Dixelius C.** (2014) Susceptibility to *Verticillium longisporum* is linked to monoterpene production by TPS23/27 in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2015 Feb;81(4):572-85. doi: 10.1111/tpj.12752.
- Rumberger A. und Marschner P.** (2003). 2-phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biol Biochem* 35: 445-452.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.-Y., Hunt M.D.** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 11: 1695–1708.
- Rygulla W., Snowdon R.J., Eynck C., Koopmann B., von Tiedemann A., Lühs W., Friedt W.** (2007) Broadening the Genetic Basis of *Verticillium longisporum* Resistance in *Brassica napus* by Interspecific Hybridization. *Phytopathology* 97: 1391-1396.
- Rygulla W., Snowdon R.J., Friedt W., Happstadius I., Cheung W.Y., Chen D.** (2008) Identification of Quantitative Trait Loci for Resistance Against *Verticillium longisporum* in Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Phytopathology* 98: 215-221.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H. et al.** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463–472.
- Saga H., Ogawa T., Kai K., Suzuki H., Ogata Y., Sakurai N., Shibata D., Ohta D.** (2012) Identification and characterization of ANAC042, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 May;25(5):684-96.
- Salzer P., Corbière H., Boller T.** (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208: 319–325.
- Sambrook, Fritsch und Maniatis** (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Schäfer P., Khatabi B. und Kogel K.H.** (2007) Root cell death and systemic effects of *Piriformospora indica*: a study on mutualism. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Oct;275(1):1-7.
- Schäfer P., Pfiffi S., Voll L.M., Zajic D., Chandler P.M., Waller F. et al.** (2009) Phytohormones in plant root-*Piriformospora indica* mutualism. *Plant Signal Behav.* 2009 Jul;4(7):669-71.
- Schäfer P., und Kogel, K.H.** (2009) The Sebacinoid fungus *Piriformospora indica*, an orchid mycorrhiza which may increase host plant reproduction and fitness," in *Plant Relationships*, ed.H.Deising(Berlin:Springer-Verlag),99–112.
- Scheel D.** (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol.* 1(4):305-10.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C., Weisbeek P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120, 2475-2487.
- Schiefelbein J.W. und Benfey P.N.** (1991) The development of plant roots: new approaches to underground problems. *Plant Cell.* 1991 Nov; 3(11): 1147–1154.
- Schlaeppli K., Abou-Mansour E., Buchala A., Mauch F.** (2010). Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *Plant J* 62:840-851.
- Schnathorst W.C.** (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In M. E. Mace, A. A. Bell, & C. H. Beckmann (Eds.), *Fungal wilt diseases of plants* (pp. 81–111). *New York: Academic Press.*
- Scholthof K-BG.** (2007) The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:152–6.
- Schornack S., Huitema E., Cano L.M., Bozkurt T.O., Oliva R. et al.** (2009) Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology* 10: 795–803.
- Schuhegger R., Nafisi M., Mansourova M., Petersen B.L., Olsen C.E., Svatos A., Halkier B.A. Glawischnig E.** (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiology* 141: 1248-54.
- Schüler A. und Walker C.** (2011). Evolution of the 'plant-symbiotic' fungal phylum, *Glomeromycota*, in *Evolution of fungi and fungal-like organisms*, eds. Pöggeler S., Wöstemeyer J., editors. (Berlin Heidelberg: Springer;), 163–185.
- Schwab R.** (2005) Cloning of artificial microRNAs (Protocol), MPI for Developmental Biology, Tuebingen.
- Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., und Weigel D.** (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1121-1133.
- Schwessinger B. und Zipfel C.** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 389-95.
- Segarra G., Van der Ent S., Trillas I., Pieterse C.M.J.** (2009) MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol.* 11, 90–96.

- Sellam A., Iacomi-Vasilescu B., Hudhomme P., Simoneau P.** (2007) *In vitro* antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. *Plant Pathol.* 56, 296–301.
- Shan W., Liu J. und Hardham A.R.** (2006) *Phytophthora nicotianae* PnPMA1 encodes an atypical plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase that is functional in yeast and developmentally regulated. *Fungal Genet Biol* 2006;43:583–92.
- Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K.** (2011) Role of chitinase in plant defence. *Asian J. Biochem.* 6, 29–37.
- Sherameti I., Shahollari B., Venus Y., Altschmied L., Varma A., Oelmüller R.** (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor which binds to a conserved motif in their promoters. *J. Biol. Chem.* 280, 2641–2647.
- Sherameti I., Venus Y., Drzewiecki C., Tripathi S., Dan V.M., Nitz I., Varma A., Grundler F.M., Oelmüller R.** (2008a) PYK10, a  $\beta$ -glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *The Plant Journal* 54: 428–439.
- Sherameti I., Tripathi S., Varma A., Oelmüller R.** (2008b) The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008;21:799–807.
- Shiu S.H. und Bleecker A.B.** (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2001: RE22.
- Shroff R., Muck A. und Svatos A.** (2007) Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 3295–3300.
- Skiryecz A., Reichelt M., Burow M., Birkemeyer C., Rolcik J., Kopka J., Zanol M.I., Gershenzon J., Strnad M., Szopa J., Mueller-Roeber B., Witt I.** (2006) DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2006 Jul;47(1):10-24.
- Slusarenko A.J. und Schlaich N.L.** (2003) Downy mildew of *Arabidopsis thaliana* caused by *Hyaloperonospora parasitica* (formerly *Peronospora parasitica*). *Mol Plant Pathol.* 2003 May 1;4(3):159-70. doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00166.x.
- Smith S.** (2008) Read D.J. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. Academic Press; 2008 ISBN-9780123705266.
- Sorenson R. und Bailey-Serres J.** (2014) Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Feb 11;111(6):2373-8.
- Southern E.M.** (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 100, 319-23.
- Sperry J.S.** (2003) Evolution of Water Transport and Xylem Structure. *Int. J. Plant Sci.* 164(3 Suppl.):S115–S127. 2003.

- Stark C.** (1961). Das Auftreten der *Verticillium*-Tracheomykosen in Hamburger Gartenbau-Kulturen. *Gartenbauwissenschaft* 26: 493–528.
- Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B.-H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., Somerville, S.** (2006) *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* 18, 731–746.
- Stein E., Alexandra Molitor A., Karl-Heinz Kogel K.H., Frank Waller F.** (2008) Systemic Resistance in *Arabidopsis* Conferred by the Mycorrhizal Fungus *Piriformospora indica* Requires Jasmonic Acid Signaling and the Cytoplasmic Function of NPR1. *Plant Cell Physiol.* 49(11): 1747–1751.
- Stokstad E.** (2006) Genomes highlight plant pathogens' powerful arsenal. *Science* 2006;313:1217.
- Struck C., Hahn M. und Mendgen K.** (1996) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in spores, germ tubes, and haustoria of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Fungal Genet Biol* 1996;20:30–5.
- Subbarao K. V., Chassot A., Gordon T. R., Hubbard J. C., Bonello P., Mulin R. et al.** (1995). Host range of *Verticillium dahliae* from cauliflower and genetic relationships and cross pathogenicities of isolates from different crops. *Phytopathology* 85: 1105–1112.
- Sun C., Shao Y., Vahabi K., Lu J., Bhattacharya S., Dong S., Yeh K.W., Sherameti I., Lou B., Baldwin I.T., Oelmüller R.** (2015) The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahliae* infection by downregulation plant defense responses. *BMC Plant Biol.* 2014 Oct 9;14:268. doi: 10.1186/s12870-014-0268-5.
- TAIR:** The *Arabidopsis* Information Resource, on [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), June 21, 2016.
- Takken F.L. und Tameling W.I.** (2009) To nibble at plant resistance proteins. *Science* 324: 744–746.
- Talboys P.W.** (1972) Resistance to Vascular Wilt Fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences (1934-1990)* 181: 319-332.
- Thaler, J. S., Owen, B., und Higgins, V. J.** (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* 135: 530-538.
- Thieme C.J., Rojas-Triana M., Stecyk E., Schudoma C., Zhang W., Yang L. et al.** (2015) Endogenous *Arabidopsis* messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat Plants.* 2015 Mar 23;1(4):15025. doi: 10.1038/nplants.2015.25.
- Thines M.** (2014) Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes, a global overview. *Eur. J. Plant Pathol.* 138, 431–447.
- Thomas A. et al.** (2012) A versatile method for cell-specific profiling of translated mRNAs in *Drosophila*. *PLoS ONE* 7, e40276 (2012).
- Thomma B.P., Nelissen I., Eggermont K., Broekaert W.F.** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 19: 163-71.
- Tjamos S.E., Flemetakis E., Paplomatas E.J. und Katinakis, P.** (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* 18:555-561.

- Trapnell C., Williams B.A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., van Baren M.J., Salzberg S.L., Wold B.J., Pachter L.** (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* 2010 May;28(5):511-5.
- Tryon R.C., Pisat N., Johnson S.L., Dougherty J.D.** (2013) Development of translating ribosome affinity purification for zebrafish. *Genesis* 51, 187–192 (2013).
- Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J., Katagiri F.** (2009) Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet* 5: e1000772.
- Tyler B.M.** (2002) Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu Rev Phytopathol* 2002;40:137–67.
- Tyler B.M.** (2007) *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology* 8: 1–8.
- Underwood W. und Somerville S.C.** (2013). Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the *Arabidopsis* PEN3 transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 12492–12497.
- van Alfen N.K.** (1989) Molecular bases for virulence and avirulence of fungal wilt pathogens. In E. C. Tjamos & C. H. Beckman (Eds.), *Vascular wilt diseases of plants* (pp.19–32). Springer, Berlin.
- van den Berg C., Weisbeek P. und Scheres B.** (1998) Cell fate and cell differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Planta*. 1998 Aug;205(4):483-91.
- Van der Ent S., Verhagen B.W.M., Van Doorn R. et al.** (2008) MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146, 1293–1304.
- van der Hoorn R.A.L. und Kamoun S.** (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 2008 Aug;20(8):2009-17.
- van Esse H.P., Van't Klooster J.W., Bolton M.D., Yadeta K.A., van Baarlen P., et al.** (2008) The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* 20: 1948-63.
- VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., Farmer E.E.** (1994) Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell* 6: 1191-1192.
- van Hoof A. und Wagner E.J.** (2011) A brief survey of mRNA surveillance. *Trends Biochem Sci* 2011; 36:585-92.
- van Kan J.A.L.** (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11: 247-53.
- van Loon L.C.** (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol.* 1985 Mar;4(2-3):111-6.
- Varma A., Verma S., Sudha S., Sahay N.S., Butehorn B., Franken, P.** (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth promoting root endophyte. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2741–2744.
- Varma A., Singh A., Sudha S. et al.** (2001) *Piriformospora indica*: a cultivable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In *Mycota IX* (Hock, B., ed). Germany: Springer Series, pp. 123–150.

- Venus Y., Oelmüller R.** (2013) *Arabidopsis* ROP1 and ROP6 influence germination time, root morphology, the formation of F-actin bundles, and symbiotic fungal interactions. *Mol Plant*. 2013 May;6(3):872-86. doi: 10.1093/mp/sss101.
- Verma S., Varma A., Rexer K.H., Hassel A., Kost G., et al.** (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 1998;90:896–903.
- Veronese P., Narasimhan M.L., Stevenson R.A., Zhu J.-K., Weller S.C. et al.** (2003) Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 35: 574-87.
- Vogel J.P. und Somerville S.C.** (2000) Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1897-1902.
- Vogel J.P., Raab T.K., Schiff C., Somerville S.C.** (2002) PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:2095-2106.
- Vogel J.P., Raab T.K., Somerville C.R., Somerville S.C.** (2004) Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *Plant J.* 40:968-978.
- Vollmer N.** (2015) Charakterisierung der putativen  $\beta$ -Glucosidase DARK INDUCIBLE 2 (DIN2) in der Stressantwort von *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Vorwerk S., Biernacki S., Hillebrand H., Janzik I., Müller A., Weiler E.W., Piotrowski M.** (2001) Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta* 212: 508-16.
- Walker S.A, Viprey V. und Downie J.A.** (2000) Dissection of nodulation signalling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. *P Natl Acad Sci USA* 2000;97:13413–8.
- Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Hückelhoven R., Neumann C., von Wettstein D. et al.** (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 13386–13391.
- Waller F., Mukherjee K., Deshmukh S.D., Achatz B., Sharma M., Schäfer P., Kogel K.H.** (2008) Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species. *J Plant Physiol.* 2008 Jan;165(1):60-70.
- Walper E., Weiste C., Mueller M.J., Hamberg M., Dröge-Laser W.** (2016) Screen Identifying *Arabidopsis* Transcription Factors Involved in the Response to 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins. *PLoS ONE* 11(4): e0153216. doi:10.1371/journal.pone.0153216.
- Wan J., Zhang X.-C., Neece D., Ramonell K.M., Clough S., Kim S.-Y., Stacey M.G., Stacey G.** (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 471-81.
- Wang L., Tsuda K., Sato M., Cohen J.D., Katagiri F., Glazebrook J.** (2009) *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* 5: e1000301.
- Watson F.L. et al.** (2012) Cell type-specific translational profiling in the *Xenopus laevis* retina. *Dev. Dyn.* 241, 1960–1972 (2012).

- Wehner N.** (2012) Etablierung und Anwendung molekularer Methoden zur Analyse des *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor-ORFeoms. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.  
<https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/frontdoor/index/index/docId/6033>.
- Weil T.T, Parton R.M. und Ian Davis I.** (2010) Making the message clear: visualizing mRNA localization. *Trends Cell Biol.* 2010 Jul; 20(7): 380–390.
- Weiss M., Selosse M.A., Rexer K.H., Urban A., Oberwinkler F.** (2004) *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of *heterobasidiomycetes* with a broad mycorrhizal potential. *Mycol. Res.* 108, 1003–1010.
- Weiste C., Iven T., Fischer U., Oñate-Sánchez L., Dröge-Laser W.** (2007) In planta ORFeome analysis by large-scale over-expression of GATEWAY-compatible cDNA clones: screening of ERF transcription factors involved in abiotic stress defense. *The Plant Journal* 52: 382-90.
- Weiste C., Pedrotti L., Selvanayagam J., Muralidhara P., Fröschel C.M., Ondřej Novák O., Ljung K., Hanson J., Dröge-Laser W.** (accepted) The *Arabidopsis* bZIP11 transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated primary root growth. *PLOS Genetics*.
- Werck-Reichhart D., Bak S. und Paquette S.** (2002) Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* . doi:10.1199/tab.0028. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0028>.
- Weston L.A. und Mathesius U.** (2013) Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecol.* 2013 Feb;39(2):283-97.
- Whalen M.C., Innes R.W., Bent A.F., Staskawicz B.J.** (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* 3:49–59.
- Whisson S.C., Boevink P.C., Moleleki L., Avrova A.O., Morales J.G. et al.** (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450:115–118.
- White J., Chang S.Y., Bibb M.J.** (1990) A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 18: 1062.
- Widmer T.L., Graham J.H. und Mitchell D.J.** (1998) Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. *Phytopathology* 88: 389–395.
- Wilhelm S.** (1955) Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and in the field. *Phytopathology* 45: 180-181.
- Williams J.S., Hall S.A., Hawkesford M.J., Beale M.H., Cooper R.M.** (2002) Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology* 128: 150-9.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J.** (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One.* 2007 Aug 8;2(8):e718.
- Xin X.F. und He S.Y.** (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2013;51:473-98. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102321.

- Xu Z., Escamilla-Treviño L., Zeng L., Lalgondar M., Bevan D. et al.** (2004) Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol.* 2004 May;55(3):343-67.
- Xu J., Meng J., Meng X., Zhao Y., Liu J., Sun T., Liu Y., Wang Q., Zhang S.** (2016) Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in *Arabidopsis* Immunity. *Plant Cell.* 2016 May;28(5):1144-62. doi: 10.1105/tpc.15.00871.
- Yadav V., Kumar M., Deep D.K., Kumar H., Sharma R., Tripathi T. et al.** (2010) A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *J Biol Chem* 2010, 285:26532-26544.
- Yanagisawa S.** (1998) Transcription Factors in Plants: Physiological Functions and Regulation of Expression. *Journal of Plant Research* Sept.1998, Vol. 111(3):363-371.
- Yang Y.X., Ahammed G.J., Wu C., Fan S.Y., Zhou Y.H.** (2015) Crosstalk among jasmonate, salicylate and ethylene signaling pathways in plant disease and immune responses. *Curr Protein Pept Sci.* 2015;16(5):450-61.
- Yu P., White P.J. und Li C.** (2015) New insights to lateral rooting: Differential responses to heterogeneous nitrogen availability among maize root types. *Plant Signaling & Behavior* Vol. 10, Issue 10, 2015.
- Zanetti M.E., Chang IF., Gong F., David W. Galbraith D.W., Bailey-Serres J.** (2005) Immunopurification of Polyribosomal Complexes of *Arabidopsis* for Global Analysis of Gene Expression. *Plant Physiology* 138: 624–635.
- Zeise K. und von Tiedemann A.** (2002) Host Specialization among Vegetative Compatibility Groups of *Verticillium dahliae* in Relation to *Verticillium longisporum*. *Journal of Phytopathology* 150: 112-119.
- Zhang C., Barthelson R.A., Lambert G.M., Galbraith D.W.** (2008) Global characterization of cell-specific gene expression through fluorescence-activated sorting of nuclei. *Plant Physiol* 147: 30–40.
- Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R., Goss K.A., Alonso J., Ecker J.R., Normanly J., Chory J., Celenza J.L.** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* 16(23):3100-12.
- Zhong R. und Ye Z.H.** (2014) Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol.* 2015 Feb;56(2):195-214.
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G.** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125: 749-60.
- Zuccaro A., Lahrmann U., Güldener U., Langen G., Pfiffi S. et al.** (2011) Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog.* 2011 Oct;7(10):e1002290. doi: 10.1371/journal.ppat.1002290.
- Zuccaro A., Lahrmann U. und Langen G.** (2014) Broad compatibility in fungal root symbioses. *Curr Opin Plant Biol.* 2014 Aug;20:135-45. doi: 10.1016/j.pbi.2014.05.013.



## 8. Anhang

### 8.1 Zellschichtspezifische Marker-Gentranskripte zur Überprüfung einer spezifischen Isolation der mRNA



Spezifische Markergene der Rhizodermis		spezifische Markergene des Cortex		Spezifische Markergene der Endodermis		Spezifische Markergene des Zentralzylinders	
AGI	Gen	AGI	Gen	AGI	Gen	AGI	Gen
AT1G63650	<i>EG13</i>	AT3G26290	<i>CYP71B26</i>	AT4G20140	<i>SGN3 (GSO1)</i>	AT1G71380	<i>CEL3</i>
AT5G41315	<i>GI3</i>	AT5G38550	Mannose-binding lectin superfamily protein	AT5G44700	<i>GSO2</i>	AT3G18280	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
AT3G27920	<i>GI1</i>			AT5G57620	<i>MYB36</i>	AT2G28670	<i>ESB1</i>
AT5G14750	<i>WER</i>	AT3G26300	<i>CYP71B34</i>	AT5G42180	<i>PER64</i>	AT3G21700	<i>SGP2</i>
AT1G08090	<i>FDR3</i>	AT2G43050	<i>ATPMEPCRD</i>	AT2G36100	<i>CASP1</i>	AT4G18780	<i>CESA8 (IRX1)</i>
AT1G79840	<i>GI2</i>	AT4G36670	<i>ATPMT6</i>	AT3G11550	<i>CASP2</i>	AT2G37870	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
		AT5G55250	<i>IAMT1</i>	AT3G54220	<i>SCR</i>		
		AT1G62500	<i>CO2</i>			AT2G01830	<i>WOL</i>
		AT1G09750	<i>PEP</i>			AT4G37650	<i>SHR</i>

Abb. S1: **Spezifische Markergene für jede der vier untersuchten Zellschichten.**

Die Abbildung zeigt Listen mit mehreren Markergenen, deren Expression charakteristisch für einen Zelltyp ist. Die Anreicherung der mRNA der spezifischen Markergene in der entsprechenden Probe bestätigt eine erfolgreiche zelltypspezifische Isolation der mRNA in TRAP Versuchen. Die Listen wurden aus empirischen Daten der hier angefertigten Sequenzierungen und in Zusammenarbeit mit A. Mustroph (Mustroph *et al.*, 2009) angefertigt.

**Anmerkung:** Während Pathogen-Infektionen kann die Expression der Markergene beeinflusst sein. Deshalb eignen sich diese nur bedingt, um in der infizierten Probe die zelltypspezifische Anreicherung nachzuweisen. In der *mock*-Referenz kann der Nachweis stets erbracht werden.

### 8.2 Referenzgene zur Berechnung der RNA-Sequenzierungsdaten (Transkripte<sub>Gen</sub> / 1000 Referenzgentranskripte)

Die Daten einer RNA-Sequenzierung bestehen aus vielen Millionen gelesene Sequenzen („Reads“). Durch den Abgleich auf ein Referenzgenom wird bioinformatisch jedes einzelne „Read“ einem Gen zugeordnet. Um diese Daten aussagekräftig darstellen zu können, wurde zur Normierung nach Referenzgenen gesucht, die in allen Inf-TRAP-Seq Experimenten relativ stabil exprimiert wurden, d.h. transkriptionell durch alle drei Interaktionspartner (*P. parasitica*, *V. longisporum*, *P. indica*) nicht oder nur wenig beeinflusst wurden in der Wurzel. Folgende Referenzgene wurde gewählt:

*UBQ5* (AT3G62250)

*ACT8* (AT1G49240)

*NADH-ubiquinone* (AT5G11770)

*GAPDH* (AT1G13440)

*OXA1* (AT5G62050)

*EF-1ALPHA* (AT5G60390)

*RPL18* (AT3G05590)

Mit *OXA1* (At5g62050, mitochondrial inner membrane translocase) und *NADH* (At5g11770, NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit) wurden z.B. Referenzgene gewählt, die regelmäßig bei Versuchen an *Arabidopsis* mit *Phytophthora* verwendet werden (vgl. Quentin *et al.*, 2009; Attard *et al.*, 2010) oder mit *UBQ5* ein Gen, das bei Infektionen mit *V. longisporum* schon häufig als Referenz verwendet wurde (vgl. Iven, 2009; Reusche, 2011).

Sieben Gene wurden als geeignet bewertet und als Referenzgene in folgende Berechnung eingesetzt:

Aus den absoluten „Reads“ der sieben Referenzgene wurde die Summe gebildet ( $\Sigma$ ). Anschließend wurde für jedes zu untersuchende Gen folgender Quotient gebildet:  $(\text{absolute Reads}_{\text{Gen}} / \Sigma \text{ absolute Reads}_{\text{Referenzgene}}) * 1000$ . Um die Verständlichkeit zu erleichtern, wurde in der Achsenbeschriftung für diesen Quotienten ein anderer Name gewählt, nämlich  $\text{Transkriptmenge}_{\text{Gen}} / 1000 \text{ Referenzgentranskripte}$  (alternativ: **relative Transkriptmenge**).

Um die Transkriptmengen in unabhängigen Versuchen mit den verschiedenen Pathogenen vergleichbar zu machen, wurde stets die Summe aus denselben Referenzgenen gebildet.

### 8.3 Erweiterung zum Inf-TRAP-Seq mit *P. parasitica*

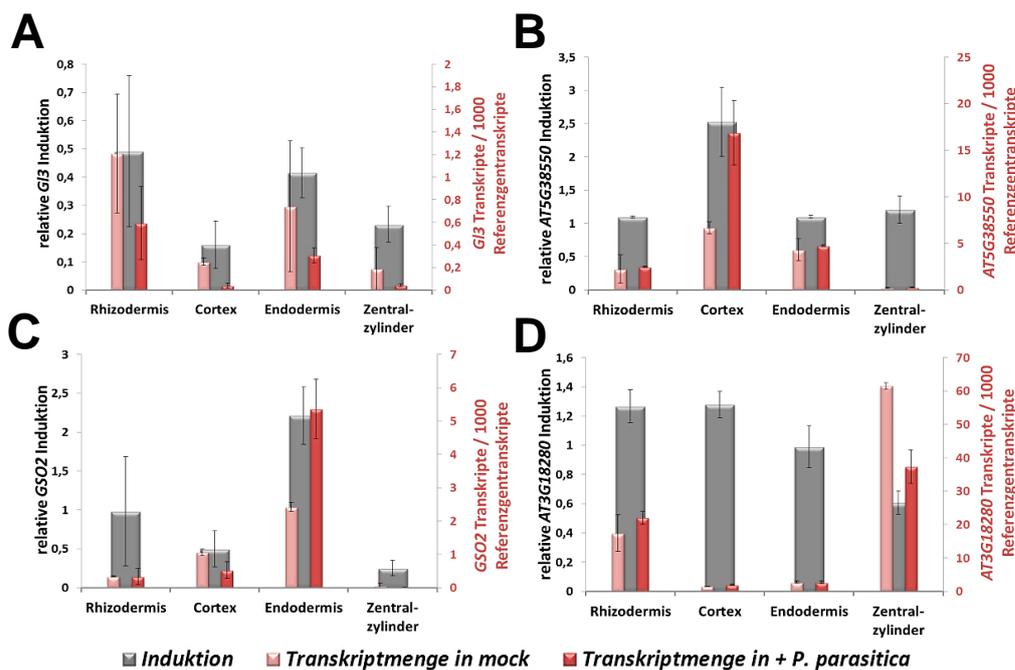


Abb. S2: **Erweiterung zu Abb. 32: Im Inf-TRAP-Seq Experiment mit *P. parasitica* wurden Marker-Transkripte spezifisch aus jeder Zellschicht aufgereinigt.**

Für jede Zellschicht wurden spezifische Markergene ausgewählt. Anhand ihrer mRNA konnte bestätigt werden, dass über die TRAP zelltypspezifische mRNA isoliert worden ist. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 2).

A: *GL3* (*GLABRA 3*) als Markergen für die Rhizodermis.

B: *AT5G38550* als Markergen für den Cortex.

C: *GSO2* als Markergen für die Endodermis.

D: *AT3G18280* als Markergen für den Zentralzylinder.

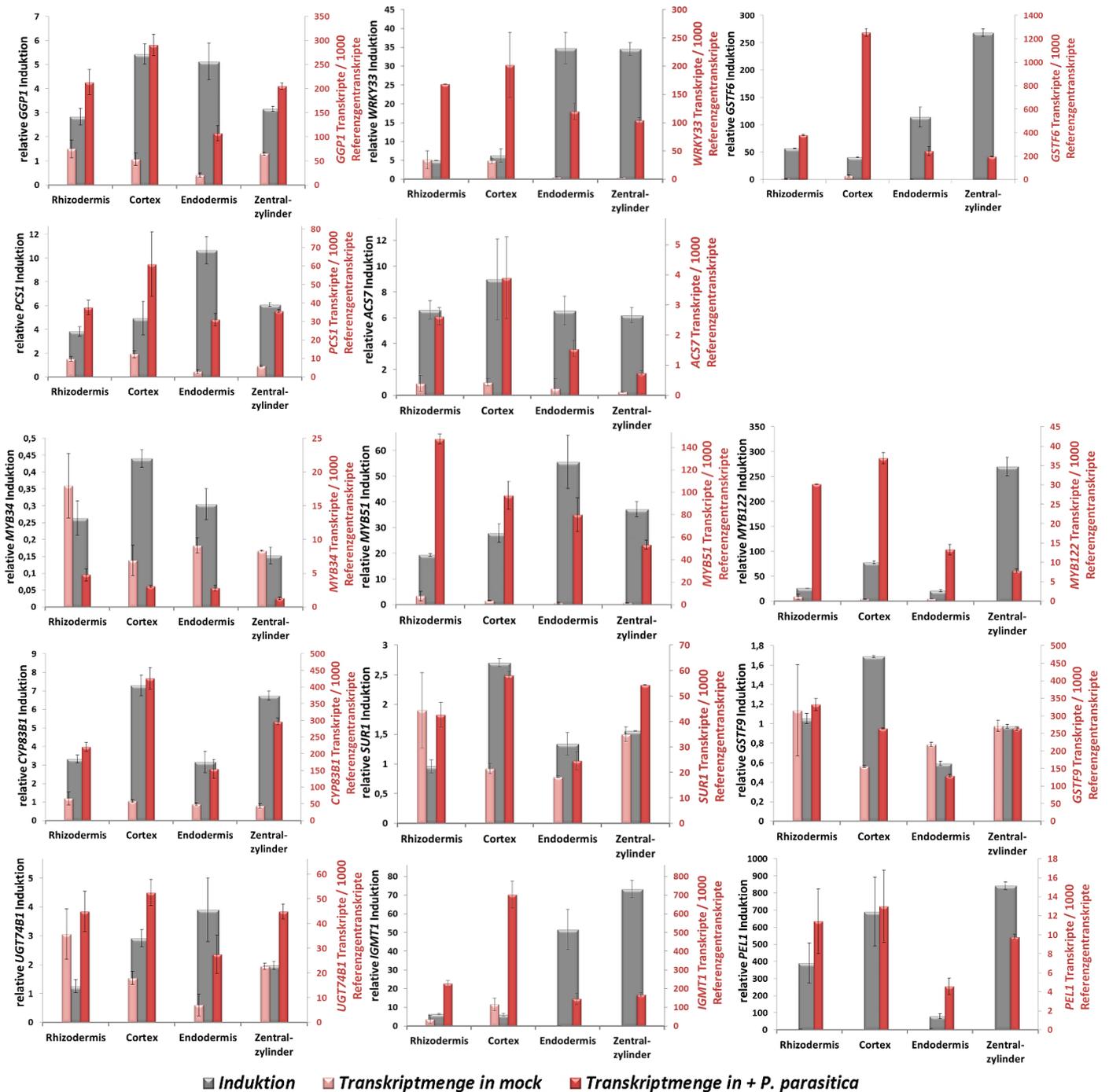


Abb. S3: Erweiterung zu Abb. 35-37: Induktion von Genen, deren Genprodukte am Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus beteiligt sind.

Die expressionellen Veränderungen für angegebene Gene sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) dargestellt. Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung aus zwei biologischen Replikaten wieder.

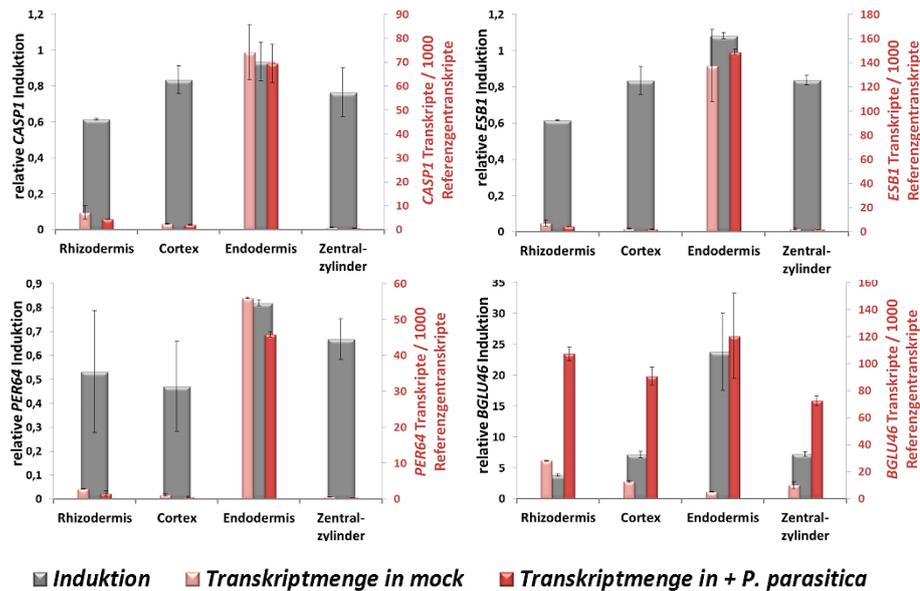


Abb. S4: Erweiterung zu Abb. 38: Genexpression in der Endodermis.

Die expressionellen Veränderungen der angegebenen Gene sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) dargestellt. Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichungen als Fehlerbalken (n = 2).

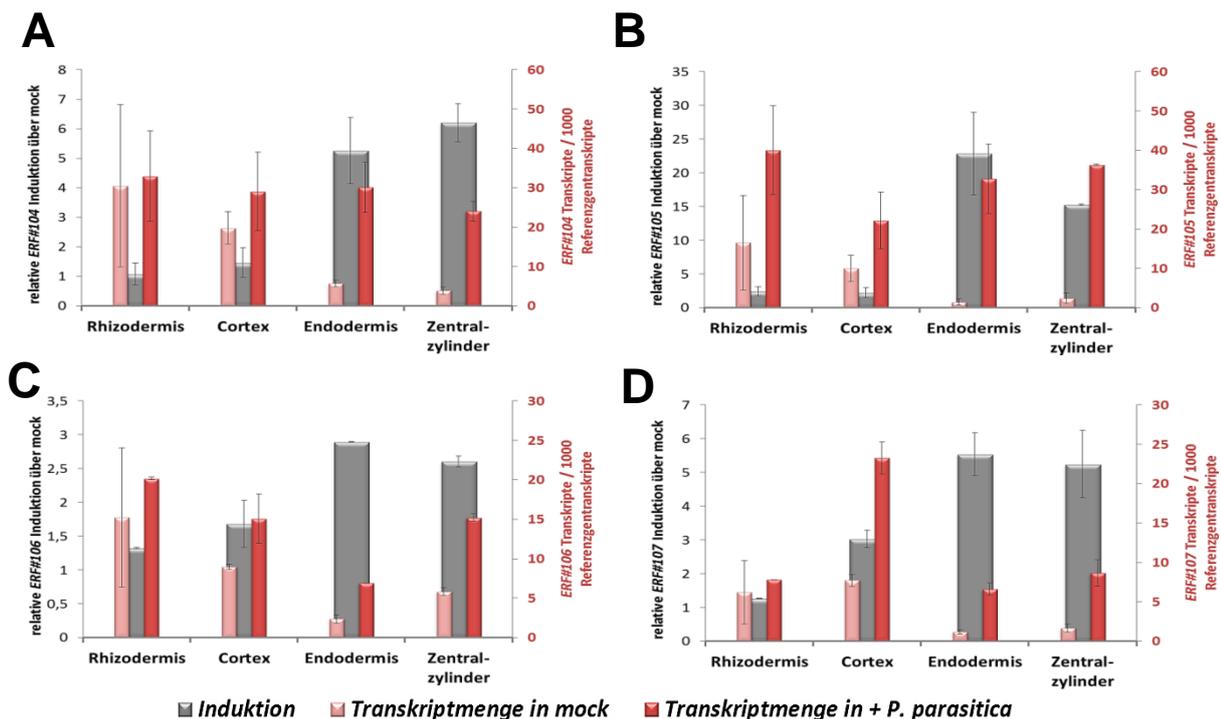


Abb. S5: Expressionelle Induktion von *ERF#104*, *ERF#105*, *ERF#106* und *ERF#107*.

Die expressionellen Veränderungen der angegebenen Gene sind für den Zeitpunkt 2,5 hpi (*P. parasitica*) dargestellt. Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips siehe Abb. 31). Standardabweichungen als Fehlerbalken (n = 2). Induktionswerte für Endodermis und Zentralzylinder mit  $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$  (BH-Methode).

Durch die Infektion mit *P. parasitica* wurde *ERF#105* besonders stark in den inneren Zellschichten induziert. Ebenso wurden *ERF#104*, *ERF#106* und *ERF#107* in den inneren Zellschichten am stärksten induziert. Auffällig war, dass die basale Expression dieser vier ERF in den äußeren Schichten am stärksten war und deshalb dort die Pathogen-bedingte Induktion geringer ausfiel als in den inneren Schichten.

## 8.4 Erweiterung zum Inf-TRAP-Seq mit *P. indica*

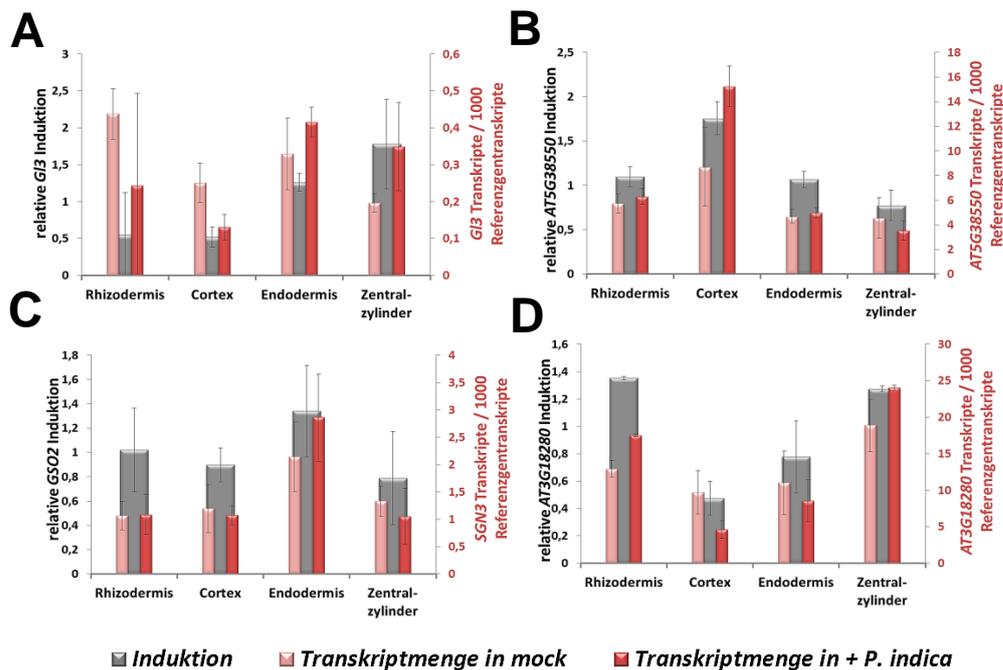


Abb. S6: Erweiterung zu Abb. 41: Im Inf-TRAP-Seq Experiment mit *P. indica* wurden Marker-Transkripte spezifisch aus jeder Zellschicht angereichert.

Für jede Zellschicht wurden spezifische Markergene ausgewählt. Anhand ihrer mRNA konnte bestätigt werden, dass über die TRAP zelltypspezifische mRNA isoliert worden ist. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). A: *GL3* (*GLABRA 3*) als Markergen für die Rhizodermis. B: *AT5G38550* als Markergen für den Cortex. C: *GSO2* als Markergen für die Endodermis. D: *AT3G18280* als Markergen für den Zentralzylinder.

## 8.5 Erweiterung zum Inf-TRAP-Seq mit *V. longisporum*

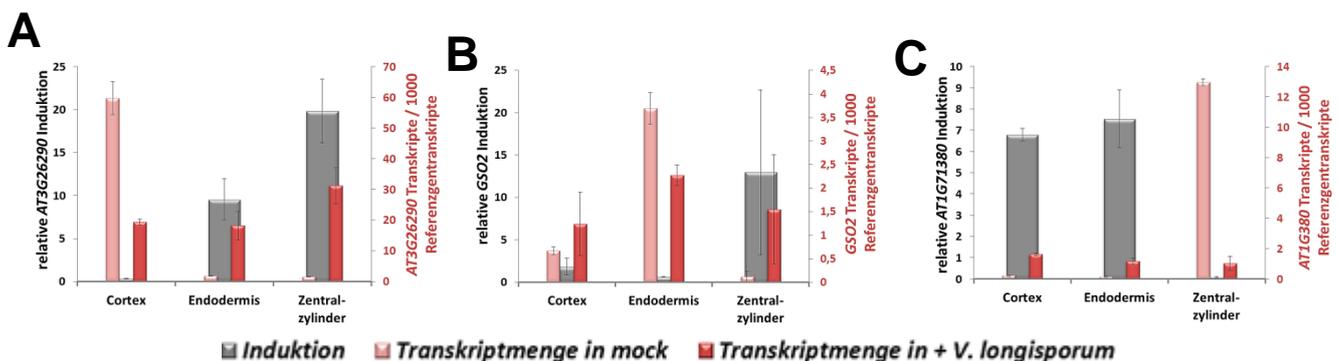


Abb. S7: Erweiterung zu Abb. 47: Im Inf-TRAP-Seq Experiment mit *V. longisporum* wurden Marker-Transkripte spezifisch aus jeder Zellschicht aufgereinigt.

Für jede Zellschicht wurden spezifische Markergene ausgewählt. Anhand ihrer mRNA konnte bestätigt werden, dass über die TRAP zelltypspezifische mRNA isoliert worden ist. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). A: *AT3G26290* (*CYP71B26*) als Markergen für den Cortex. B: *GSO2* als Markergen für die Endodermis. C: *AT1G71380* (*CEL3*) als Markergen für den Zentralzylinder.

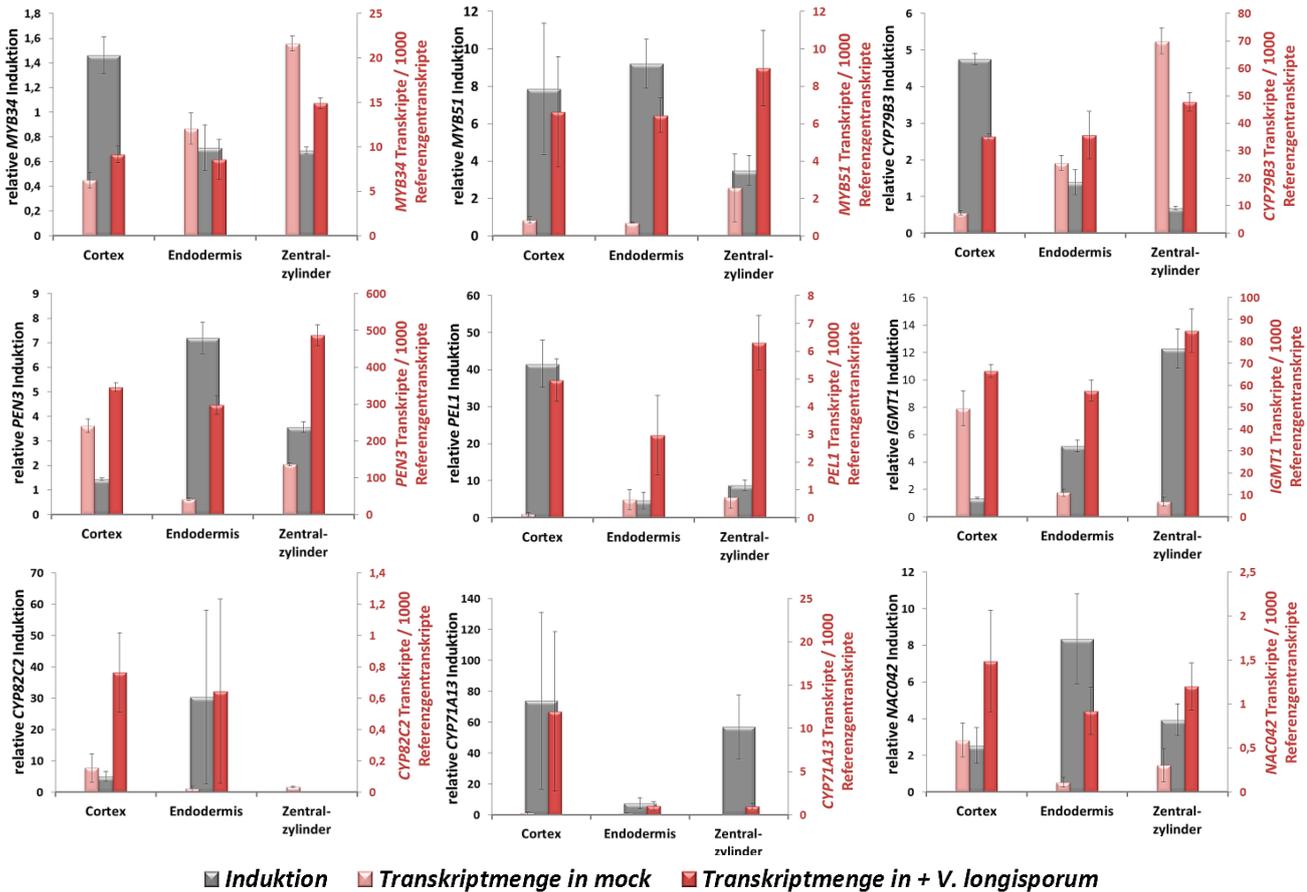


Abb. S8: Erweiterung zu Abb. 51: Induktion von Genen, deren Genprodukte am Trp-abhängigen Sekundärmetabolismus beteiligt sind.

Die expressionellen Veränderungen für angegebene Gene sind für den Zeitpunkt 6 dpi (*V. longisporum*) dargestellt. Die Wurzelzellschichten Rhizodermis, Cortex, Endodermis und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet (Beschreibung des Graphik-Prinzips in Abb. 31). Standardabweichungen als Fehlerbalken (n = 3).

### Verifizierung der *CYP79B2* und *CYP81F2* Induktion in Cortex bzw. Zentralzylinder mit qRT-PCR

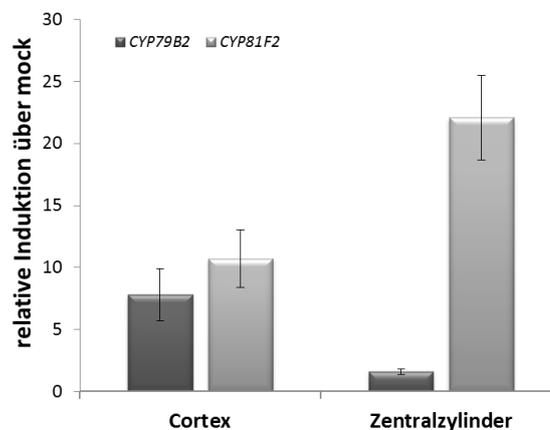


Abb. S9: Erweiterung zu Abb. 51: Induktion von *CYP79B2* und *CYP81F2* bei der *VI43*-Infektion.

Die expressionellen Veränderungen für angegebene Gene sind für den Zeitpunkt 6 dpi (*V. longisporum*) dargestellt. Nach einer TRAP-Prozedur wurde die relative Induktion über der *mock*-Referenz in einer Analyse mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Wurzelzellschichten Cortex und Zentralzylinder wurden getrennt betrachtet. Standardabweichungen als Fehlerbalken (n = 3).

## 8.6 eFP Atlas zur zellschichtspezifischen Expression der Gene *UBQ5*, *UBQ10*, *GAPDH* und *RHS12* in der Wurzel

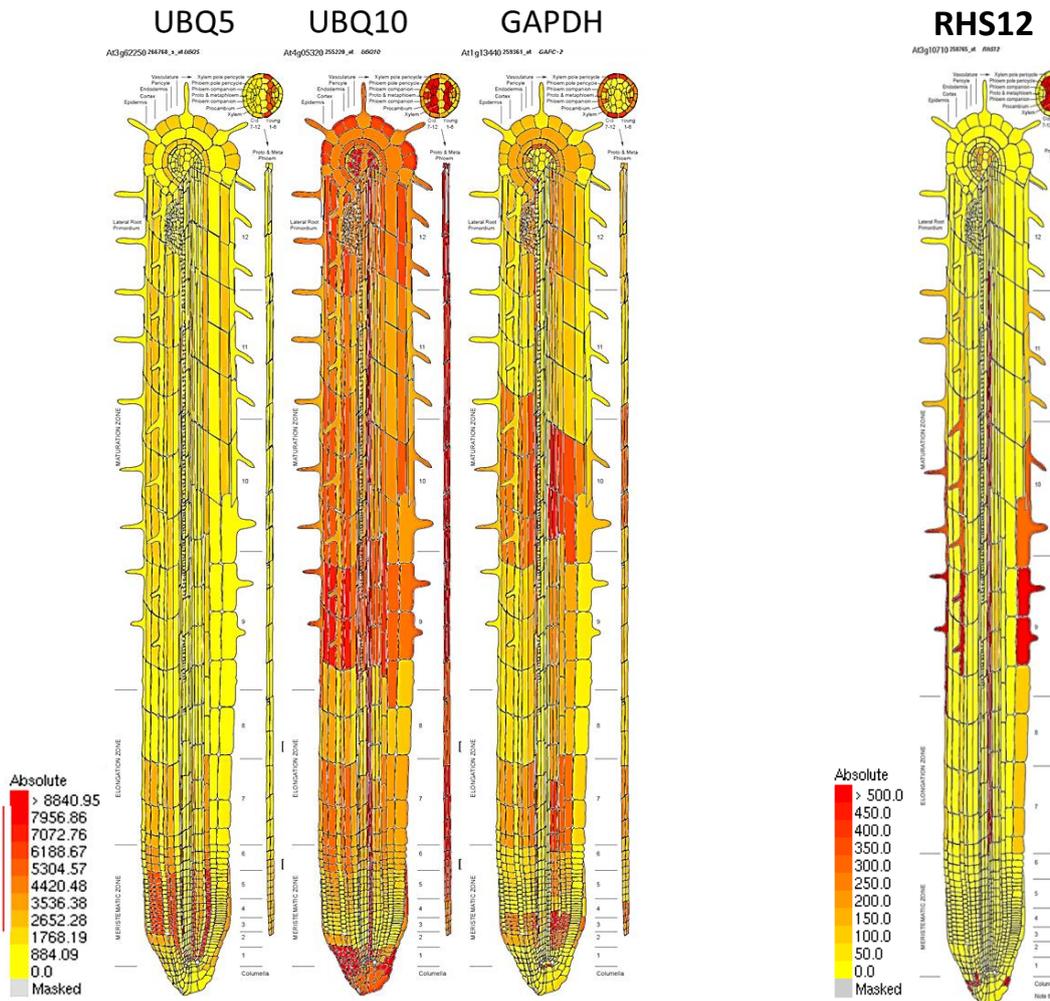


Abb. S10: **Transkriptmengenverteilung in zellschichtspezifischer Auflösung.**

Analyse mit dem eFP Atlas zur zelltypspezifischen Expression der Gene *UBQ5*, *UBQ10*, *GAPDH* und *RHS12* in der Wurzel. Gezeigt ist die basale Expression, d.h. ohne Stimulus unter Kontrollbedingungen. Quelle: <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> (Winter *et al.*, 2007 und Brady *et al.*, 2007).

## 8.7 Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die Klonierungen

Anmerkung: das kleine p steht hier als Abkürzung für Plasmid.

### > pRS300

pRS300 diente als Template für die PCRs zum Erzeugen von amiRNA Konstrukten. pRS300 enthielt die Sequenz einer natürlichen Vorstufe einer miRNA (Stammsschleife, Abb. S11). Nur der Teil, der spezifisch die Bindung an die Ziel mRNA zum „Gene-silencing“ vermittelt, wurde später ersetzt. In transgenen Pflanzen wird dieses Grundgerüst exprimiert und formt nach der Transkription eine sog. Haarnadelstruktur.

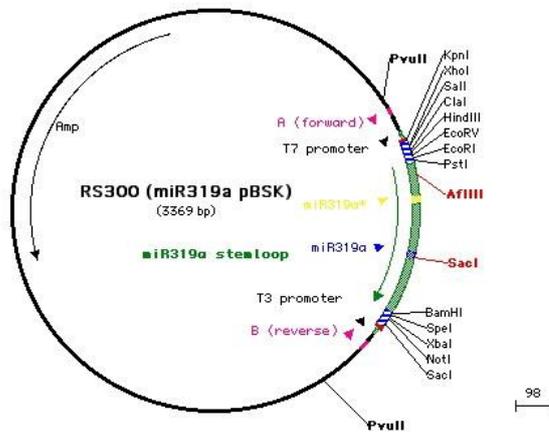


Abb. S11: **Vektorkarte von pRS300.**

Der Vektor trägt: Amp<sup>r</sup>, miR319a **Stammsschleife**, Primerbindestellen für Primer A und B.  
 Aus: Schwab (2005), *Cloning of artificial microRNAs* (Protocol).

## > pDONR<sup>TM</sup>201

Dieser Vektor wurde in allen Gateway<sup>®</sup>-Klonierungen dieser Arbeit als Donor-Vektor verwendet.

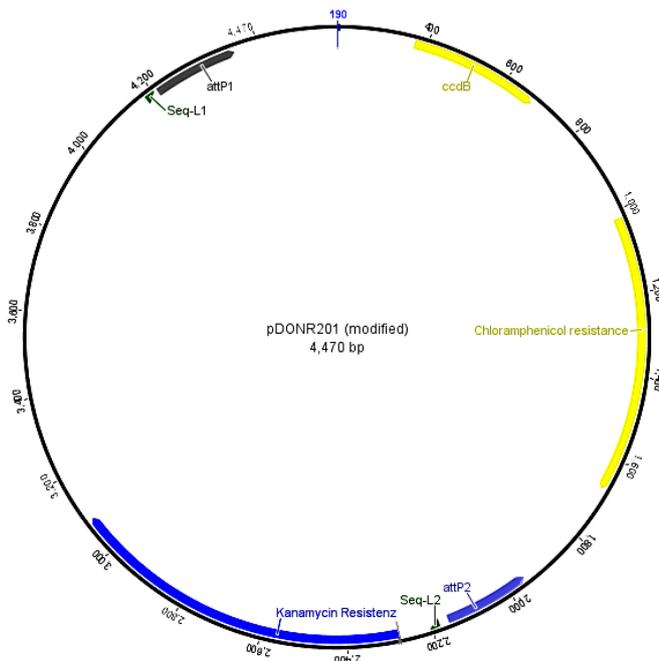


Abb. S12: **Vektorkarte des Donor-Vektors pDONR<sup>TM</sup>201.**

Der Vektor trägt: attP1 und attP2 = Rekombinationsstellen für die BP-Reaktion, ccdB (Selbstmordgen, dessen Genprodukt die Gyrase hemmt), Cm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, pUC ori, T1 und T2 (Terminatoren, nicht in Karte eingezeichnet). Seq-L1 und Seq-L2 entsprechen der Bindestellen der Primer für DNA-Sequenzierungen.

## > pGATA:HF-RPL18

Mit Hilfe von diesem Vektor konnten Sequenzen von Promotoren an die Sequenz von *FLAG-RPL18* fusioniert werden. pGATA:HF-RPL18 ist als Zielvektor in der Gateway<sup>®</sup>-Klonierung geeignet und wurde für die Erzeugung von transgenen Pflanzenlinien verwendet, die das *FLAG-RPL18* zelltypspezifisch exprimieren sollten. Der Vektor wurde von Prof. Dr. Angelika Mustroph zur Verfügung gestellt und für die Klonierung der Linie *pRHS12* verwendet.

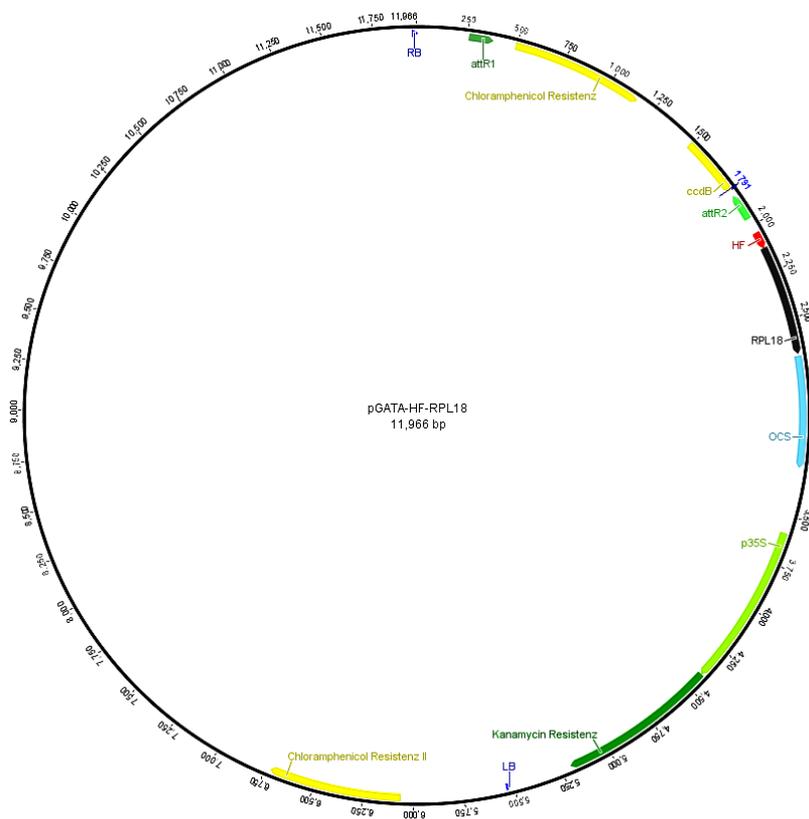


Abb. S13: Vektorkarte des Zielvektors pGATA:HF-RPL18.

Der Vektor trägt: attR1 und attR2 = Rekombinationsstellen für die LR-Reaktion, ccdB (Selbstmordgen, dessen Genprodukt die Gyrase hemmt), HF (Histidin-FLAG tag; wurde meist im Text als FLAG bezeichnet), Sequenz für *RPL18*,  $\Omega$ -Enhancer, OCS (Terminator), p35S,  $Km^r$ , zweimal  $Cm^r$ , right boarder (RB) und left boarder (LB). Nach der LR-Reaktion ist der Ziel-Promotor an die Sequenz von *HF-RPL18* (*FLAG-RPL18*) fusioniert. Auf der T-DNA befindet sich alles zwischen LB und RB. Diese Sequenz wird durch *A. tumefaciens* vermittelt ins Pflanzliche Genom inseriert.

## > pB2GW7-HA

Mit Hilfe von diesem Vektor können Ziel-Sequenzen hinter einen 35S Promotor (*p35S* aus Cauliflower Mosaik Virus mit konstitutiven und starken Expressionseigenschaften in Pflanzen) fusioniert werden. pB2GW7-HA ist als Zielvektor in der Gateway<sup>®</sup>-Klonierung geeignet und wurde für die Erzeugung von transgenen Pflanzenlinien verwendet, in denen die Ziel-Sequenz überexprimiert werden soll. Der Vektor wurde uns von Dr. Corinna Thurow (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt und in die Klonierungen von *DIN2 OE* sowie von *amiERF#104/105* eingesetzt.

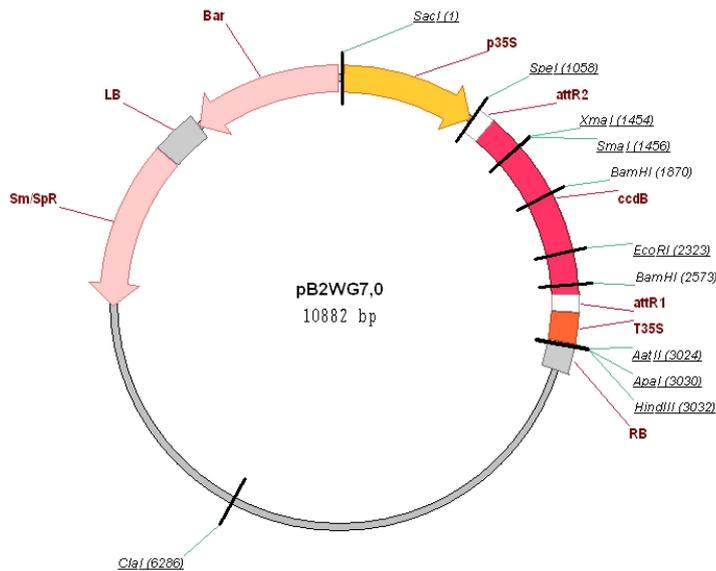


Abb. S14: Vektorkarte des Zielvektors pB2GW7.

Der Vektor trägt: attR1 und attR2 = Rekombinationsstellen für die LR-Reaktion, ccdB (Selbstmordgen, dessen Genprodukt die Gyrase hemmt), Bar, Sm<sup>r</sup>, p35S, T35S, right boarder (RB) und left boarder (LB). Nach der LR-Reaktion ist die Ziel-Sequenz an p35S fusioniert. Auf der T-DNA befindet sich alles zwischen LB und RB. Diese Sequenz wird durch *A. tumefaciens* vermittelt ins Pflanzliche Genom inseriert.

Abbildung aus: [www.psb.ugent.be/gateway/](http://www.psb.ugent.be/gateway/)

## 8.8 Klonierungsprotokoll der in dieser Arbeit generierten transgenen *Arabidopsis*-Linien: *pRHS12*, *DIN2 OE* und *amiERF#104/105*

### > *pRHS12*

Beim Promotor des Gens *Root Hair Specific 12 (RHS12)* findet man bei *Arabidopsis* exklusiv eine Aktivität in den Wurzelhaaren (Won *et al.*, 2009). Die Promotoraktivität wurde über *Promotor<sub>RHS12</sub>:GFP* Konstrukte untersucht, wobei das GFP-Signal nur in den Wurzelhaaren detektierbar war (persönliche Mitteilung Dr. Kai Konrad, Lehrstuhl für Botanik I der Universität Würzburg; außerdem Abb. S10). Nebensächlich ist, dass *RHS12* auch in Blüten exprimiert wird (TAIR Datenbank), weil nur Wurzelmaterial verarbeitet werden soll. Das Genprodukt *RHS12* ist in der Zellwand lokalisiert und dort an der Modifikation der Zellwand beteiligt als Enzym-Inhibitor mit Pektinesterase Aktivität (TAIR Datenbank). Mit Primern (ProAt3g10710 for bzw. rev), die spezifisch in der Promotorregion von *RHS12* binden (definiert als 750 bp vor dem Startcodon ATG) und Erkennungssequenzen für die Gateway<sup>®</sup>-Klonierung besitzen, wurde aus genomischer DNA als Template der Promotor in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment (weiter bezeichnet als *proRHS12*) wurde, nach Auftrennung durch Gelelektrophorese und Isolation aus dem Gel, in eine Gateway<sup>®</sup>-Klonierung eingesetzt: BP Reaktion zwischen PCR-Fragment und dem Donor-Vektor pDONR<sup>TM</sup>201, so dass pDONR<sup>TM</sup>201\_*proRHS12* entstand. Die Sequenz von *proRHS12* im Vektor pDONR<sup>TM</sup>201 wurde überprüft und stimmte mit der Sequenz des Promotors *proRHS12* der genomischen DNA (TAIR-

Datenbank) vollständig überein. Abb. S15 zeigt die Sequenz von *proRHS12*, der an die Sequenz von *FLAG-RPL18* fusioniert wurde.

Anschließend wurde eine LR Reaktion zwischen pDONR201\_*proRHS12* und dem Zielvektor pGATA:HF-RPL18 durchgeführt, so dass pGATA\_*proRHS12* entstand.

```
GATTACGAATTATCGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAGGGTCAAGAAGTTGTACAATGTATATCATCAGTATATGTAATTGGTCAAAACAAGGTTTGA
AAACTCTCTACGGAAGCAGGAGAATACATCCGCCGACAATGTCAGATGAAAAACAAATGAATTGCTCTCAAATTTTTTTTAGTAAAAATATTCTTTGACAGCTTTATTA
TATCAAACCTAACTAACTATCCAAAGTTGACATTATAATCCCTATGAATATTGTAATGTCTGATTAGGATTTCAAGAGATTCTATTAATAAACATATAAATAGAAAAGA
TCTTCTTCTCTTTTTTCAAATATAATCATATTAAGAAGAAACCGAGAATGAATTGAACCACAAATCATAAACATAACATCAAGTTGAAATATATACTTCAAACCTT
TGTAACCTAGAGATAGAAGCTCTTGAATAAATAAATTCGTTAAACCAAGAAACATGCCGAAGCTGAAATCCAACAGAAAACATAGTCCCAATCTTAAACAAATATG
TTTCACCGCAAAGCTTATATAACATAAAAGACTAAAACATGAGGAGCAGCTTGTAGTTAAATACATCCTTGGTATTTTAAATGTGAAGATTTATAATCCCCCTTTGTGCCT
CGCACGTAAGTTGTTAGAGGTCTATTCAAATGATTATATTTTCTTTCGTTTATATGGACCCCTCAACTCCAACATCTACAAACCAACATAACTAACGAGAAACTTC
AAAAGAATACAAAGAAAATTAAGAAAAGAGGGACCGGGGATACGACCCAGCTTTCTGTACAAAGTGGTCCCGATCGGTACCTATTTTTACAACAATTACCAACAA
CAACAAACAACAAACAACATTACAATTACATTTACAATTACCATGGGACATCCATCATCACCATGGTGGAGGTGATTATAAGGATGATGATGATAAGGGAGGTGG
TGGAGGAGGTGGATCCGGTATGTGATCTGATCGCCGGAGGTAAGAGTAAGAAGACCAAAAGGACAGCTCCAAAGTCTGATGATGTCTACCTCAAGCTTACTGTCAAG
CTTTACCGGTTTCTGGTAAGGAGAACTAATAGCAAGTTCAATGGTGTGATATTGAAGAGGCTTTTCATGAGCAAAGTCAACAAAGCTCCTCTTCTATCTAGGCTTG
TGGAGTTTCATGACTGGCAAGGAAAGATAAGATTGCGCTCTGGTTGGAACTATAACTGATGATTTGAGGGTACACGAGATTCCAGCCATGAAAGTGACTGCCTTGAGG
TTACAGAGAGAGCAAGGGCTCGCATTGAGAAAGCTGGAGGTGAATGCTTAACCTTTGACCAGCTCGCTCTCAGAGCTCCATTGGGCCAGAACACGGTTCTTCTAG
AGGACCTAAGAATTCACGTGAAGCAGTGAAGCATTTGACCTGCTCTGCTGGTGTGCCACACAGTCACTCCAAGCCATATGTTCCGGGCCAAGGGAAGGAAAGTTTCGAG
AAGGCCAGAGGAAAGAGGAAGAGTCTGGATTCAAGGTTAATCTAGAG
```

#### Abb. S15: Fusionsprodukt des Promotors *proRHS12* an die Sequenz von *FLAG-RPL18*.

Eine DNA-Sequenzierung des Promotors *proRHS12* in pDONR<sup>TM</sup>201 wurde vorgenommen. Als Startpunkte für die Sequenzierung wurden mehrere Primer verwendet: Seq-L1, ProRHS12\_Seq for, Seq-L2 (Details siehe unter Oligonukleotide). Das Ergebnis der DNA-Sequenzierung wurde mit den Angaben der TAIR-Datenbank für den Upstream von *RHS12* gelegenen Bereich verglichen. Eine vollständige Übereinstimmung wurde festgestellt. In der LR Reaktion wurde die richtige Sequenz für *proRHS12* in den Vektor pGATA:HF-RPL18 übertragen. Die Abbildung zeigt die Insertion von *proRHS12* (orange) in pGATA, bei der eine Fusion an HF (= FLAG, rot) und RPL18 (grau) resultierte, wobei att2 (grün) dazwischen liegt.

pGATA\_*proRHS12* wurde nach *A. tumefaciens* transformiert. Über Kolonie-PCR mit den Primern ProAt3g10710 for und ProAt3g10710 rev konnte bestätigt werden, dass die verwendete *A. tumefaciens* Kolonie das richtige Produkt enthielt. Während einer Floral-Dip Behandlung wurde der Abschnitt zwischen den Boarder-Sequenzen ins Pflanzengenom inseriert. In den transgenen Pflanzen (*pRHS12*) ist *FLAG-RPL18* hinter *proRHS12* geschaltet und somit zelltypspezifisch exprimiert. Es konnten über Segregationsanalysen vier unabhängige und homozygote Linien identifiziert werden. Eine ausführliche Charakterisierung der Linien bezüglich einer ausreichenden *FLAG-RPL18* Expression und der Verwendbarkeit in TRAP-Versuchen steht noch an.

## > *DIN2 OE*

Aus cDNA wurde die codierende Sequenz (CDS, engl. coding sequence) von *DIN2* in einer PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer (*DIN2\_CDS* for; *DIN2\_CDS* rev) waren mit Erkennungssequenzen für die Gateway<sup>®</sup>-Klonierung ausgestattet. Das PCR-Fragment (weiter bezeichnet als *DIN2-CDS*) wurde nach Auftrennung durch Gelelektrophorese und Isolation aus dem Gel in eine Gateway<sup>®</sup>-Klonierung eingesetzt: BP Reaktion zwischen PCR-Fragment und dem Donor-Vektor pDONR<sup>TM</sup>201, so dass pDONR<sup>TM</sup>201\_*DIN2-CDS* entstand. Anschließende LR Reaktion zwischen pDONR201\_*DIN2-CDS* und dem Zielvektor pB2GW7-HA, so dass pB2GW7\_*DIN2-CDS* entstand. Die Sequenz von *DIN2-CDS* im Vektor pB2GW7-HA wurde überprüft und stimmte mit der in der TAIR-Datenbank angegebenen Sequenz für die CDS von *DIN2* vollständig überein. Abb. S16 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung von *DIN2-CDS*.

ATGGCTAAGGGATCGTGGTTCTTCATTATCCTTTTTATCATCTCAATGTTAGAAAATATGATCAAACTTCTAGAATTAGATCGGCATAGTTTTCTGATGATTCATCTTT  
 GGGACAGCTGCCTCGGCGTTTCAGTACGAAGGTGCAACAAGTGAAGGTGGCAAGTCTCCAATATATGGGATCACTTCAGCCTCAGTATCCAGAAAGGACCAAAA  
 TGCATAATGCAGATGTAGCAATTGATTTTTATCATCGTTACAAGGATGACATAAAAATTGATGAAGGAGCTAAACATGGACGCTTTCCGATTTCAATCTCGTGGTCAA  
 GATTAATACCCAGTGGAAAGCTAAAGGATGGAGTAAACAAGAAGGTGTACAATTCTACAAGGATCTCATAGACGAACTTCTGCTAATGACATAACAACCTTCGATG  
 ACGCTCTATCATTGGGACCCACAATCTTTGGAGGACGAATATGGTGGCTTTCTAAGCCCTAAAATCGTAGAAGATTTTCGAGATTTTGAAGAATTTGTTTTGAA  
 GAGTTTGGAGATAAAGTTAAGATGTGGACAACAATCAACGAACCTTATATAATGACTGTTGCGGGTTATGATCAAGGTAACAAGGCGGCTGGACGATGCTCAAAAT  
 GGGTAAACGAAAAGTGTGAGGCTGGAGATTCGAGTACCGAGCCTACATGTTTTCACATCACACTCTTCTGCCATGCCGCTGCAGTGGAAAGAATTTGAAAATGT  
 GAAAAAATTCGATGATGGCCAAAATGGGATAGTACTATCACCAAGATGGTTCGAGCCTTATCATTCCGATTTCAACTGACGATAAAGAAGCAGCTGAACGAGCTCT  
 TGCCTTTGAAATGGATGGCATCTTGATCCAGTCATTACCGGAGATTATCCAGAGATTGTAAGAAAGTACGCGGAAATAAATTACCTTCATTTACTGTTGAACAATC  
 AAAGATGTTACAAAATTCATCAGATTTCTGTTGGAATTAATTACTACACGGCTCGCTTCTGCTCATCTTCTCACATAGACCCTGAAAAACCTGTTTCAAACTGACC  
 ACCATGTGGAATGGAACTGACTAATCACAGTGGTACATCATCGGACCTGGGGAAGAAAGGGGCTTCTATTTTACACCCGGAAAGGCTTACGAAAAGTTCTTAAAC  
 TATATTAAGAGAGATAACAATAACATGCCAGTCTACATCAAAGAAAATGGAATTAATGACAACGACGACGGTACAAAACCAAGAGAAGAAATTTGTGAAGGACACAT  
 TTAGGATTGAATACCATAACACATTTTGAAGAATTCACAAAGCTATAGTGGAAAGATGGGTGACGTAAGAGGATATTACGCATGGTTCATTTGAGGACAATTTT  
 GAATGGGAGCATGGATACTGCAAGATTTGGTCTATACTATGTTGATTTTGTCAATGGTCTCAAACGTTATCCAAAAGATTCCGGTCAAATGGTTTAAAGCGGTTCTT  
 AAGAAATCGGTCGTCGGAGAGAGTAACAAAGAGGAGGTAGAGGAGATGTCACGCGCGGAAGGGAATAAGACTTTTAAAGGTTTGAAGAATCGGCGGGTTCTT  
 GCATCTTTCATGGCAATGAACCAATCGAGGAGAGATGAGGAGAATAATCGTTGCTCCTTTGATTTTCTCATACTCATTGTTGGTGTGTTGCAAGGCATAGAGAACCA  
 TCTTCATTTATTGA

Abb. S16: **Sequenz von *DIN2*-CDS.**

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der DNA-Sequenzierung von *DIN2*-CDS im Vektor pB2GW7-HA. Als Startpunkte für die Sequenzierung wurden mehrere Primer verwendet: *DIN2\_CDS*\_Seq for, *DIN2*\_Seq, *DIN2\_CDS*\_Seq rev, (Details siehe unter Oligonukleotide). Das Ergebnis der DNA-Sequenzierung wurde mit den Angaben der TAIR-Datenbank für die CDS von *DIN2* verglichen und eine vollständige Übereinstimmung wurde festgestellt.

pB2GW7\_*DIN2*-CDS wurde nach *A. tumefaciens* transformiert. Über Kolonie-PCR mit den Primern *DIN2\_CDS* for und *DIN2\_CDS* rev konnte bestätigt werden, dass die verwendete *A. tumefaciens* Kolonie das richtige Produkt enthielt. Während einer Floral-Dip Behandlung wurde der Abschnitt zwischen den Border-Sequenzen ins Pflanzengenom inseriert. In den transgenen Pflanzen ist *DIN2* hinter einen 35S Promotor geschaltet und somit konstitutiv und stark exprimiert. Es konnten über Segregationsanalysen zwei unabhängige und homozygote *DIN2* überexprimierende Linien identifiziert werden, die als *DIN2* OE #1 bzw. *DIN2* OE #2 bezeichnet wurden (vgl. auch Abb. S23).

## > *amiERF#104/105*

### Auswahl der Primer für die Klonierung der transgenen Knockdown-Linie *amiERF#104/105*

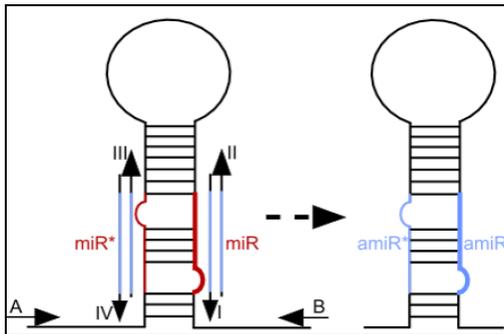
WMD3 Results				
<a href="http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Designer;rm=show_results;id=2664">http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Designer;rm=show_results;id=2664</a>				
amiRNAs ranked by efficiency and specificity using empirical data. Green amiRNAs tend to have the best properties. Red amiRNAs are fully functional but have less favorable properties like minor off-targets or weak hybridization to their target site.				
Transcript library:	TAIR8_cdna_20080412			
Target genes:	AT5G61600.1, AT5G51190.1			<b>Oligos for amiRNA "TCCCATCCAAGTTCGACGGCGG"</b>
Description:	ERF104/105			
Min. number of included targets:	2			I miR-s gaTCCCATCCAAGTTCGACGGCGGtctctctttgtattcc
Accepted off-targets:	0			II miR-a gaCCGCGTCAAAGTTGGATGGGAtcaagagaatcaatga
Annotated:	1			III miR's gaCCACCGTCAAAGTTCGATGGGTtcacaggtgtgatgt
				IV miR'a gaACCCATCGAACTTCGACGGTGGtctcatatattct
Targets: AT5G51190, AT5G61600				
amiRNA	perfect match	hybridizat...	target gene	hybridizat...
TCCCATCCAAGTTCGACGGCGG	-51,23	AT5G61600	-48,92	AT5G51190 -37,5
TCCCATCCAAGTTCGACGGCGT	-49,59	AT5G61600	-48,92	AT5G51190 -37,5

Abb. S17: **Auflistung der sense amiRNA Sequenzen.**

Auflistung der sense amiRNA Sequenzen mit den besten Eigenschaften zum Doppel-Knockdown der Transkriptionsfaktoren ERF#104 und ERF#105 in *Arabidopsis* (rot am linken Rand gekennzeichnet). Die obere Sequenz wurde ausgewählt. Die vier berechneten und verwendeten Primer sind gelb unterlegt unter „Oligos for amiRNA“.

Alle nötigen Parameter wurden durch das Programm des Web MicroRNA Designers WMD3 (Ossowski *et al.*, 2008) berücksichtigt. Es kalkulierte die Sequenz für vier Primer (I, II, III, IV), mit deren Hilfe über mehrere PCRs die DNA-Sequenz für das funktionsfähige amiRNA-Konstrukt entstehen konnte (Abb. S17 und Abb. S18).

Die Primer A und B basierten auf der Sequenz des Ausgangsplasmids pRS300. Abb. S18 zeigt das Prinzip von vier PCR-Amplifikationsschritten (a-d), die zum *amiERF#104/105* Konstrukt führten.



	forward Oligo	reverse Oligo	Template
(a)	A	IV	pRS300
(b)	III	II	pRS300
(c)	I	B	pRS300
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)

Abb. S18: **Prinzip der vier Polymerase Kettenreaktionen (a), (b), (c) und (d).**

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter Oligonukleotide gelistet. Verändert nach: Schwab (2005), Cloning of artificial microRNAs (Protocol).

Für die Klonierung wurden die errechneten Primer (Abb. S17) verwendet. An Primer A und B wurden Erkennungssequenzen für die Gateway®-Klonierung angefügt, um die Sequenz der amiRNA für eine Gateway-Klonierung kompatibel zu machen. In mehreren PCRs mit dem Plasmid pRS300 als Template wurde schließlich ein Konstrukt amplifiziert und fusioniert (Details siehe Fröschel, 2011), das in der Lage ist, später in den Pflanzen die Expression von *ERF#104* und *ERF#105* zu senken. Dieses Konstrukt wurde im Folgenden als *amiERF#104/105* bezeichnet. *amiERF#104/105* wurde nach Auftrennung durch Gelelektrophorese und Isolation aus dem Gel in eine Gateway®-Klonierung eingesetzt: BP Reaktion zwischen *amiERF#104/105* und dem Donor-Vektor pDONR™201, so dass pDONR™201\_amiERF#104/105 entstand. Der Vektor wurde unter Verwendung des Primers Seq-L1 sequenziert (Abb. S19). Die Sequenzen von Stammschleife, sense und sense\* stimmten mit den Erwartungen überein.

```
TTTGACTGATAGTGACCTGTTCTGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA
CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGCCCCCTCGAGGTCGACGGT
ATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCCAAACACACGCTCGGACGCATATTACACATGTTTCATACACTTAATACTCGCTGTTTTGAATTGATGTTTTAGGAAT
ATATATGTAGACCACCGTCAAGTTCGATGGGTTCACAGGTCGTGATATGATTCATTAGCTCCGACTCATTTCATCCAAATACCGAGTCGCCAAAATCAAAGTACTAGACT
CGTTAAATGAATGAATGATCGGGTAGACAAATTGGATCATTGATTCCTTTGATTCCCATCCAACCTTGACGGCGGTCTCTCTTTGATTCCAATTTCTTGATTAATCTT
TCCTGCACAAAAACATGCTTGATCCACTAAGTGACATATATGCTGCCTTCGTATATATAGTTCTGGTAAATAACATTTGGGTTTATCTTTATTTAAAGGCATCGCCAT
GGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTATGAGGGTTAATTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCTGTGTGAATTTGTTATCCGCGACCCAGCTTTCTTGACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAAACAGGTCACATATCAGTCAA
ATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAATCTCTGATG
```

Abb. S19: **In pDONR™201\_amiERF#104/105 befand sich die richtige Sequenz des Konstruktes *amiERF#104/105*.**

Für die DNA-Sequenzierung wurde der Primer Seq-L1 als Startpunkt verwendet (Bindestelle siehe Abb. S12). Farbkodierung der Abbildung: **Sense\***, **Sense**, **Stammschleife**.

Anschließend wurde eine LR Reaktion zwischen pDONR201\_amiERF#104/105 und dem Zielvektor pB2GW7-HA durchgeführt, so dass pB2GW7-HA\_amiERF#104/105 entstand. pB2GW7-HA\_amiERF#104/105 wurde nach *A. tumefaciens* transformiert. Über Kolonie-PCR mit Primer A und Primer B konnte bestätigt werden, dass die verwendete *A. tumefaciens* Kolonie das richtige Produkt enthielt. Während einer Floral-Dip Behandlung wurde der Abschnitt zwischen den Border-Sequenzen ins Pflanzengenom inseriert. In den transgenen Pflanzen ist *amiERF#104/105* hinter *p35S* geschaltet und somit konstitutiv und stark exprimiert. Konsequenterweise konnte nachgewiesen werden,

dass die amiRNA eine konstitutive Repression der Expression von sowohl *ERF#104* als auch *ERF#105* vermittelt (Abb. S20).

## 8.9 Charakterisierung von „Loss-“ und „Gain-of-function“ transgenen Pflanzenlinien

### 8.9.1 Untersuchung der homozygoten *amiERF#104/105* Linie

Für alle Lebewesen ist es essentiell, die Aktivität von Genen zu regulieren, da nicht jedes Genprodukt zu jeder Zeit benötigt wird. Einer der natürlichen Regelmechanismen zum gezielten Stilllegen von Genen ist die sogenannte RNA-Interferenz (RNAi)(Fire *et al.*, 1998). Sie existiert bei allen Eukaryoten, von Pflanzen über Fadenwürmer bis hin zum Säugetier (Cerutti und Casas-Mollano, 2006) und ihre Entdecker, Craig Mello und Andrew Fire, wurden 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin geehrt. Es handelt sich um eine Art der Genregulation, in deren Zentrum kurze, einzelsträngige RNA-Moleküle stehen (Hamilton und Baulcombe, 1999), die als microRNAs (miRNA) bezeichnet werden (Ruvkun, 2001; Bartel, 2004). Das dahinter steckende Funktionsprinzip nutzt man bei der amiRNA für die Genregulation (Schwab *et al.*, 2005; Schwab *et al.*, 2006). Allerdings ist das Gen für die amiRNA nicht endogenen Ursprungs, sondern durch den Menschen in den Organismus eingebracht worden, daher das Adjektiv artificial (künstlich). Über Agrobakterien-vermittelten Gentransfer wird die DNA-Sequenz für die *amiRNA* in das pflanzliche Genom eingebaut. Somit wird also die Expression des Ziel-Gens post-transkriptionell verhindert (He und Hannon, 2004). Nach diesem Prinzip wurde ein Konstrukt zum „Gene-Silencing“ mittels amiRNA entworfen, das gleichzeitig die Expression von *ERF#104* und *ERF#105* herunterregulieren sollte. Transgene *amiERF#104/105* Pflanzen wurden über BASTA®-Resistenz identifiziert (Fröschel, 2011), wobei die identifizierten Pflanzen bezüglich des Inserts heterozygot waren. Deshalb wurden an den nächsten Generationen Segregationsanalysen durchgeführt, in der homozygote Nachkommen identifiziert werden konnten. Die homozygote Linie wurde in dieser Arbeit fertiggestellt und charakterisiert (vgl. Abb. S20).

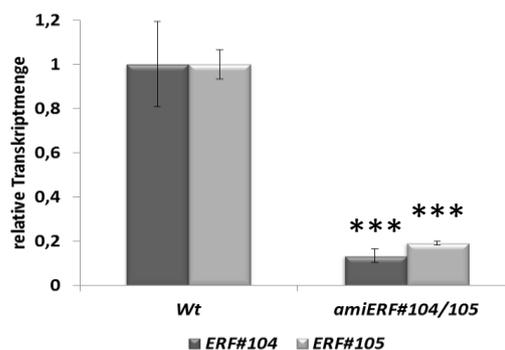


Abb. S20: Erfolgreiches „Gene-silencing“ in der neu generierten *amiERF#104/105* Linie.

Mit Blattmaterial von 14 d alten und auf Erde angezogenen Keimlingen wurde eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Die relative Transkriptmenge der Gene *ERF#104* (dunkelgrau) und *ERF#105* (hellgrau) ist graphisch dargestellt. Bezeichnungen: Wt = Wildtyp; *amiERF#104/105* = homozygote Linie mit *amiRNA* Konstrukt zum gleichzeitigen „Gene-silencing“ von *ERF#104* und *ERF#105*. Die Transkriptmenge von sowohl *ERF#104* als auch *ERF#105* war in der *amiERF#104/105* Linie signifikant geringer als im Wt. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). \*\*\* Student's *t*-test,  $P \leq 0,001$ ; wobei Wt Bezugsgruppe ist.

Die vier homologen Gene *ERF#102*, *ERF#103*, *ERF#104* sowie *ERF#105* besitzen konservierte MAPK Phosphorylierungsstellen am C-Terminus, so dass eine ähnliche Art der Regulation und Funktion vermutet wird und eine funktionelle Redundanz in der Pathogenabwehr beschrieben werden konnte (Meng *et al.*, 2013). Da *ERF#104* und *ERF#105* die engste Homologie im angesprochenen Cluster besitzen, wurde beschlossen, zusätzlich zu den *erf#104* und *erf#105* Einzelmutanten (T-DNA Insertionslinien) eine Linie zu generieren, in der gleichzeitig die Expression beider Gene reduziert ist. Doch bereits Meng *et al.* (2013) versuchten vergeblich, durch genetische Kreuzung der T-DNA Insertionslinien eine *ERF#104/#105* Doppelmutante zu generieren. Weil die beiden Gene auf demselben Chromosom und in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen (unterer Arm des Chromosoms 5, vgl. *At5g61600* und *At5g51190*; TAIR Datenbank), ist eine chromosomale Rekombination (sog. *Crossover*) sehr unwahrscheinlich und eine erfolgreiche Kreuzung der beiden T-DNA Insertionslinien zu einem Doppelknockout nahezu ausgeschlossen. Es war aber möglich, in einer sog. *artificial microRNA* (*amiRNA*) Linie die Expression beider Gene durch RNAi parallel herunter zu regulieren: Die verwendete homozygote *amiERF#104/105* Linie zeigte eine deutliche Reduktion sowohl der *ERF#104*- als auch der *ERF#105*-Transkripte (Abb. S20). Es handelte sich zwar nicht um einen vollständigen Verlust der Geneexpression, aber man kann von sog. „*Gene-silencing*“ sprechen, bei dem im Bezug zum Wt in der Linie *amiERF#104/105* nur noch etwa 13% der *ERF#104*- bzw. 19% der *ERF#105*-Transkripte vorhanden waren.

### 8.9.2 Charakterisierung der *ERF#104*, *ERF#105*, *ERF#106* und *ERF#107* „*Loss-of-function*“ und „*Gain-of-function*“ *Arabidopsis* Linien

Studien mit Transkriptionsfaktor-Überexpressions Linien („*Gain-of-function*“) sind alleine nicht ausreichend, um einen Transkriptionsfaktor zu charakterisieren, denn die ektopische Missexpression mit einem konstitutiven 35S-Promotor kann zu Effekten führen, die normalerweise nicht vom Transkriptionsfaktor reguliert werden. Deshalb sind zusätzlich „*Loss-of-function*“ Versuchsansätze erforderlich.

Mit sog. Drei-Primer-Polymerasekettenreaktionen (3-Primer-PCR) wurde die T-DNA Insertion nachgewiesen, die zum *Knockout* des entsprechenden Gens führt. Aus den Pflanzen wurde genomische DNA extrahiert, die dann in der PCR als Template eingesetzt wurde. Die PCR wurde nach dem Standard-Protokoll durchgeführt. Pro Probe wurden drei verschiedene Primerkombinationen getestet (vgl. Oligonukleotide für 3-Primer-PCR):

1. Die Kombination aus forward und reverse Primer des zu amplifizierenden Gens.
2. Die Kombination aus dem T-DNA spezifischen Primer LBa1 (bei SALK Linien) bzw. o8409 (bei GABI-Kat Linien) und dem genspezifischen Primer forward.
3. Die Kombination aus dem T-DNA spezifischen Primer LBa1 (bei SALK Linien) bzw. o8409 (bei GABI-Kat Linien) und dem genspezifischen Primer reverse.

Neben den T-DNA Insertionslinien wurde immer auch der Wt als Kontrolle getestet. Beispiel siehe Abb. S21.

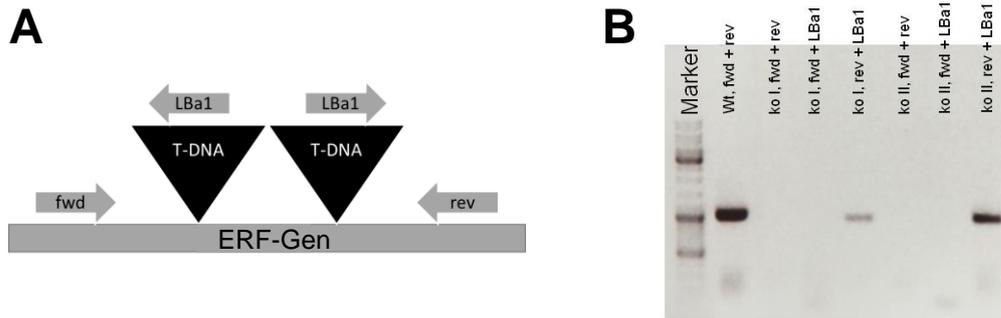


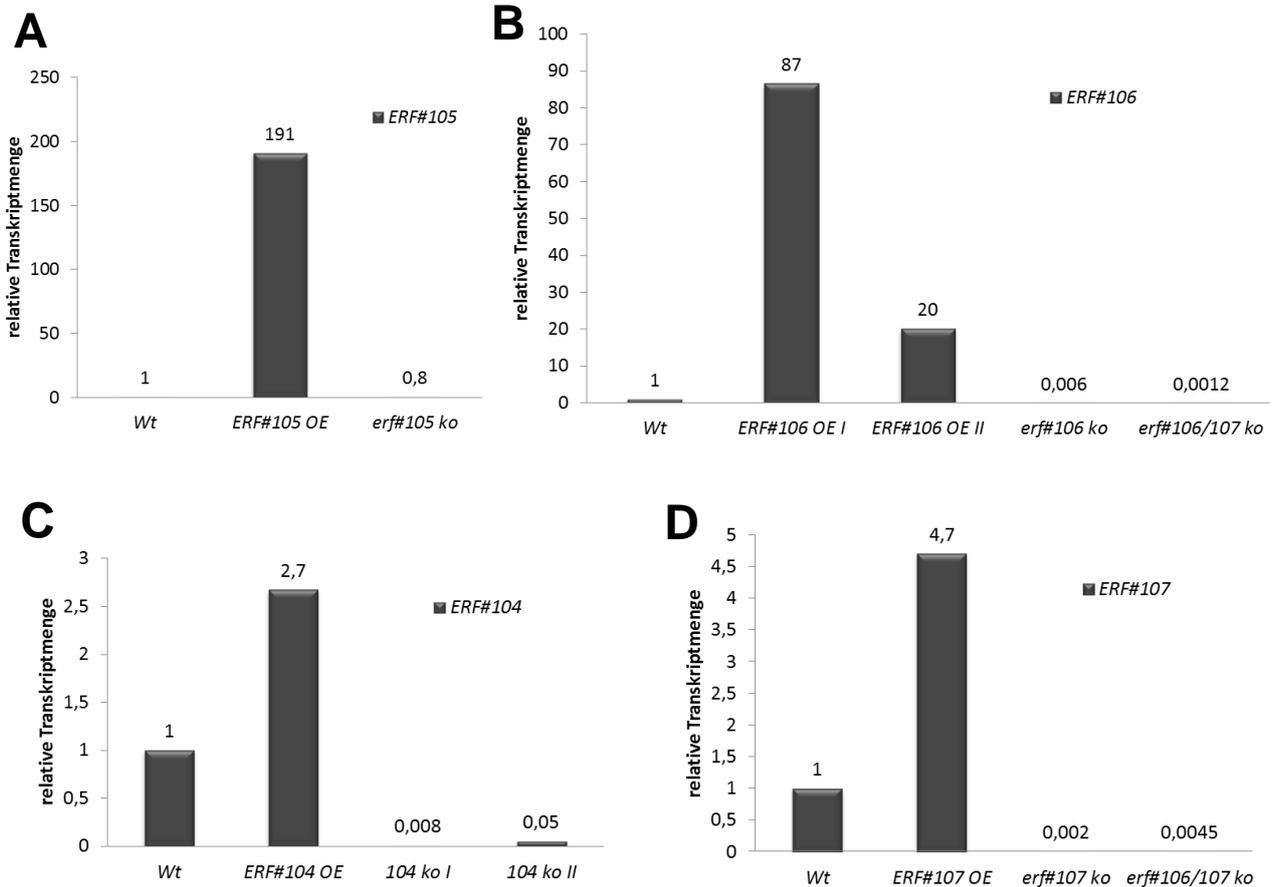
Abb.S21: **Nachweis der T-DNA Insertionen in den Knockoutlinien *erf#104 ko I* und *II*, *erf#105 ko*, *erf#106 ko* sowie *erf#107 ko*.**

A. Schematischer Aufbau der T-DNA Insertion und der Bindestellen der Primer in der 3-Primer-PCR. forward (fwd), reverse (rev) und T-DNA spezifische LBA1 Primer (bei GABI-Kat Linien muss LBA1 durch o8409 ersetzt werden). Abhängig von der Orientierung der T-DNA ist die Richtung der LBA1 Primer, deshalb wurden beide Varianten symbolisch mit zwei T-DNAs abgebildet.

B. Beispiel für ein Ergebnis der 3-Primer-PCR mit Blattmaterial. Getestet wurden hier der Wt und zwei Pflanzen mit putativer T-DNA Insertion (ko I = erste T-DNA Insertions-Pflanze, ko II = zweite T-DNA Insertions-Pflanze). Folgende Kombinationen an Primern wurden in den PCRs verwendet: 1. fwd und rev. (entspricht Wt Bande ohne T-DNA Insertion) 2. fwd und LBA1 bzw. o8309. 3. rev und LBA1 bzw. o8309. Beim Wt trat bei fwd + rev eine Bande auf (Kontrolle). Nur wenn keine Bande mit Kombination 1. aber eine Bande mit Kombination 2. oder 3. (auch bei sowohl 2. als auch 3. Bande möglich) zu Stande kam, waren die Pflanzen eindeutig als homozygot für die T-DNA Insertion identifiziert. Im gegebenen Beispiel waren sowohl ko I als auch ko II homozygot.

Auf diese Weise wurde eine T-DNA Insertion in den entsprechenden Genen bei den Linien *erf#104 ko I*, *erf#104 ko II*, *erf#105 ko*, *erf#106 ko* sowie *erf#107 ko* eindeutig bestätigt. Anschließend wurde die relative Transkriptmenge der entsprechenden Gene in den „Loss-of-function“ Mutanten mittels qRT-PCR Analysen bestimmt und mit dem Wt verglichen. Ebenso wurden die „Gain-of-function“ Linien auf Überexpression getestet (Abb. S22).

Da sich diese Arbeit vor allem mit Abwehrsystemen der Wurzel beschäftigte, wurden die Transkriptmengen in der Wurzel in Abb. S22 zusammengefaßt. Tendenziell wurde beobachtet, dass bei den *Gen-Knockouts* sowohl in Blatt als auch in Wurzel fast überhaupt keine Transkripte nachweisbar waren. Tendenziell war aber die Überexpression der untersuchten ERFs im Blatt schwächer als in der Wurzel. Da die Abwehr zwischen Wurzel und Blatt unterschiedlich ist (Hermanns, Slusarenko und Schlaich 2003; Jansen *et al.*, 2006; Balmer *et al.*, 2013), kann diese unterschiedliche Überexpression bei Pathogenbefall mit Blatt- oder Bodenpathogenen andere Konsequenzen haben.



### Abb. S22: Charakterisierung der ERF „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Linien

Aus Wurzelmaterial von 14 d alten Keimlingen wurde RNA extrahiert und diese wurde in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR Durchläufen wurde schließlich in den „Loss-of-function“ bzw. „Gain-of-function“ Linien die relative Transkriptmenge der entsprechenden Gene quantifiziert.

A: Relative Transkriptmenge von *ERF#105* in Wt, *ERF#105 OE* und *erf#105 ko*.

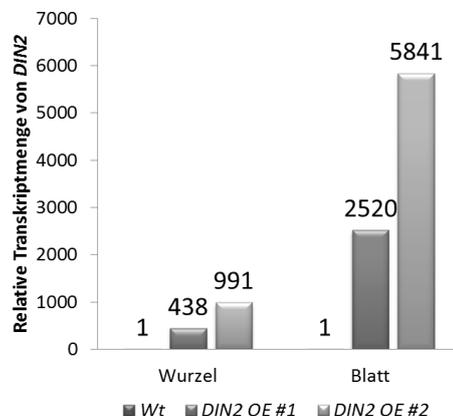
B: Relative Transkriptmenge von *ERF#106* in Wt, *ERF#106 OE I*, *ERF#106 OE II*, *erf#106 ko* und *erf#106/107 ko*.

C: Relative Transkriptmenge von *ERF#104* in Wt, *ERF#104 OE*, *erf#104 ko I* und *erf#104 ko II*.

D: Relative Transkriptmenge von *ERF#107* in Wt, *ERF#107 OE*, *erf#107 ko* und *erf#106/107 ko*.

## 8.9.3 Weitere verwendete transgene Linien im Überblick

### > *DIN2*



### Abb. S23: Charakterisierung der *DIN2* „Gain-of-function“ Linien

Die *DIN2* Transkriptmenge der beiden *DIN2* überexprimierenden Linien wurde mit dem Wt (= 1) verglichen und darauf relativiert (qRT-PCR Analyse). Die Transkriptmenge in Wurzel und Blatt ist getrennt dargestellt.

## > *NAC042*

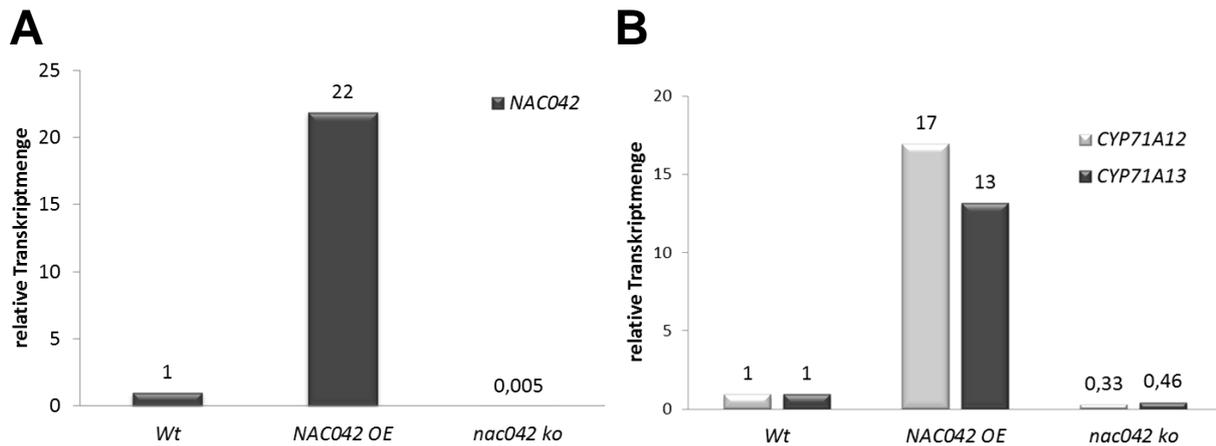


Abb. S24: **Charakterisierung der *NAC042* „Loss-of-function“ und „Gain-of-function“ Linien.**

A: Aus ganzen Keimlingen (14 d alt) wurde RNA extrahiert und diese wurde in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR Durchläufen wurde schließlich in der „Loss-of-function“ bzw. „Gain-of-function“ Linie die relative Transkriptmenge des Gens *NAC042* quantifiziert. In der Graphik ist die relative Transkriptmenge von *NAC042* in Wt, *NAC042 OE* und *nac042 ko* dargestellt.

B: Aus Wurzeln (14 d alte Pflanzen) wurde RNA extrahiert und diese wurde in cDNA umgeschrieben. In qRT-PCR Durchläufen wurde schließlich in der „Loss-of-function“ bzw. „Gain-of-function“ Linie die relative Transkriptmenge der Gene *CYP71A12* sowie *CYP71A13* quantifiziert. In der Graphik ist die relative Transkriptmenge von *CYP71A12* und *CYP71A13* in Wt, *NAC042 OE* und *nac042 ko* dargestellt. Die Überexpression von *NAC042* führte zu mehr Transkripten von sowohl *CYP71A12* als auch von *CYP71A13*. Dagegen waren in der Verlustmutante weniger Transkripte der beiden Cytochrom-Gene vorhanden.

## > *myb34/51/122*

Die Dreifachmutante *myb34/51/122* ist in der Synthese von IAOx limitiert und dementsprechend ist die Menge an IGs, aber auch an Camalexin, reduziert (Frerigmann und Gigolashvili 2014).

## > *cyp79b2/b3*

Die Doppelmutante *cyp79b2/b3* ist aus einer Kreuzung der T-DNA-Insertionsmutanten der Gene *CYP79B2* und *CYP79B3* hervorgegangen (Charakterisierung siehe Zhao *et al.*, 2002). In der Doppelmutante ist die von diesen Enzymen katalysierte Umsetzung von Tryptophan zu IAOx gestört. Deshalb werden kaum IGs und Camalexin gebildet.

## > *cyp71a12/a13/a18*

Durch das Fehlen der beiden Isoenzyme *CYP71A12* und *CYP71A13* kommt es zu sehr stark reduzierten Camalexinmengen (Müller T.M. *et al.*, 2015). *CYP71A18* zeigt eine starke Homologie in der Aminosäuresequenz mit *CYP71A12* und *CYP71A13* und könnte eine ähnlich enzymatische Aufgabe übernehmen. In den Versuchen wurde die Dreifachmutante *cyp71a12/a13/a18* verwendet, die kein Camalexin mehr produzieren kann (AG Glawischig, Technische Universität München, unveröffentlicht).

## > *Promotor:FLAG-RPL18*

Die Linien wurden uns von A. Mustroph (Universität Bayreuth) zu Verfügung gestellt. Alle *Promotor:FLAG-RPL18* Linien waren homozygot, was über Kanamycin-Selektionen getestet wurde. Alle unabhängig transgenen *Promotor:FLAG-RPL18* Pflanzen zeigten keinerlei Abnormalitäten in Entwicklung, Wachstum und Fertilität (Mustroph *et al.*, 2009).

## 8.10 Zusatz zu den Experimenten im Infektionssystem auf Erde mit *V. longisporum*

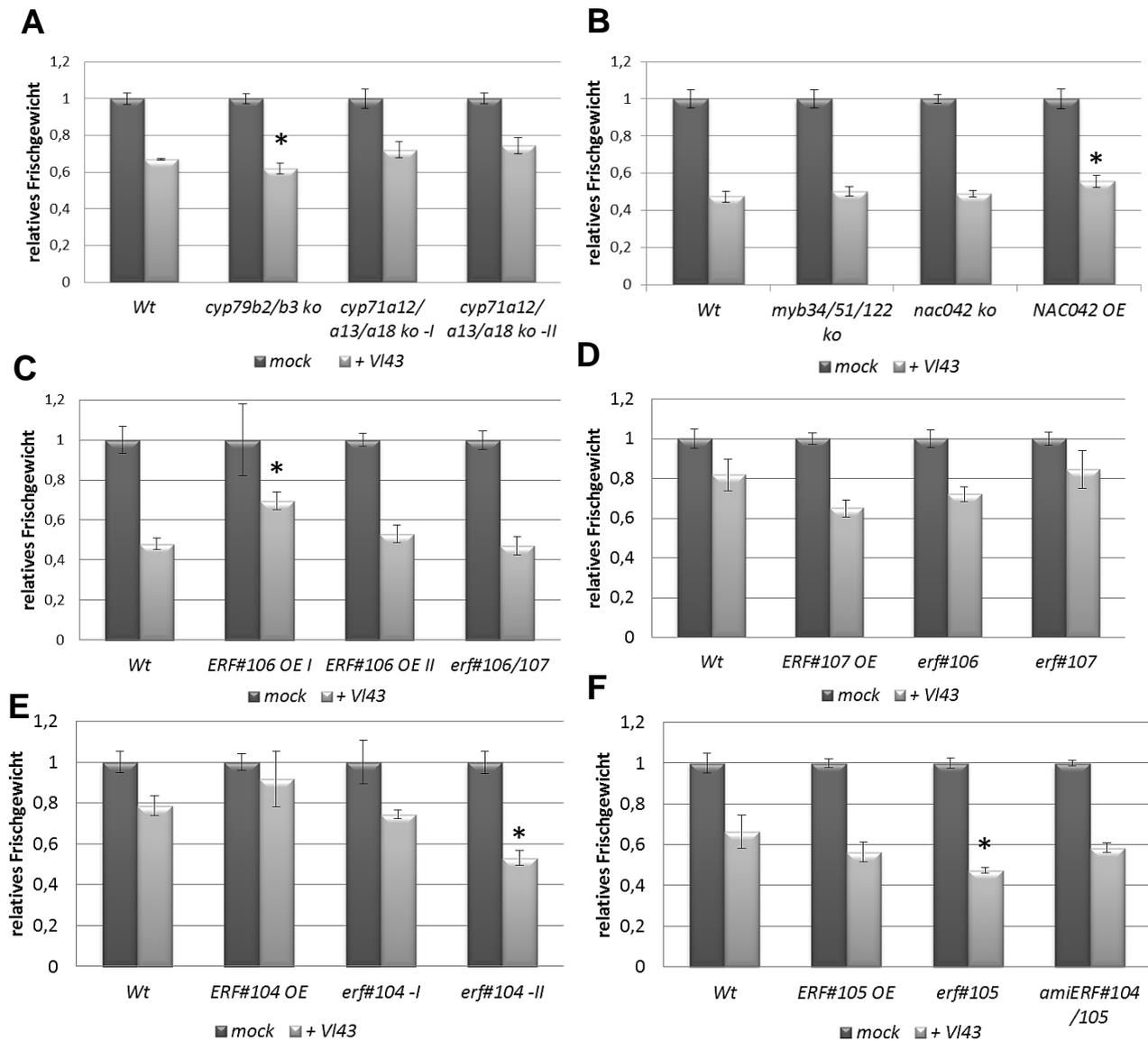


Abb. S25: **Nachtrag: Relatives Frischgewicht 21 dpi mit *V. longisporum*.**

Für die angegebenen Linien wurde das relative Frischgewicht 21 dpi mit *V. longisporum* ermittelt. Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). \*  $P \leq 0,05$ , Student's *t*-test, wobei Wt Bezugsgruppe ist.

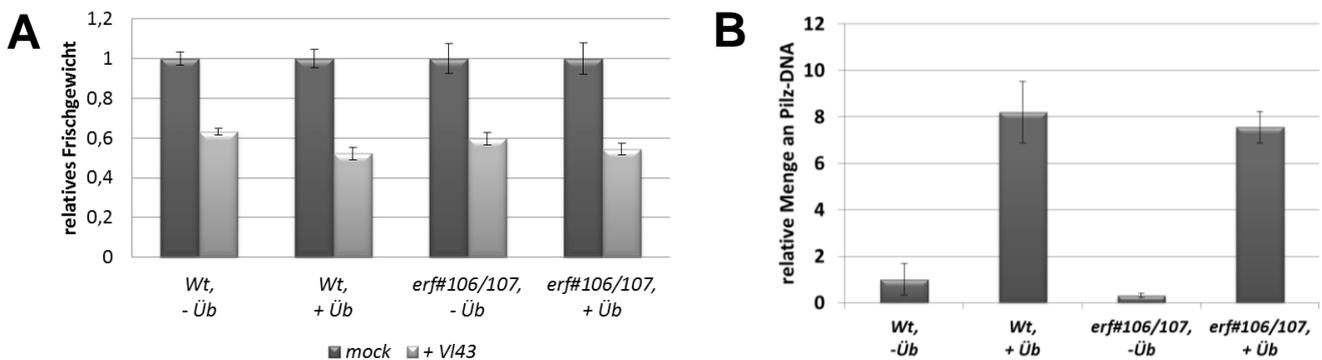


Abb. S26: **Propagation der VI43-Infektion nach Vorbehandlung der Pflanzen mit Überfluten.**

Gezeigt sind in den Graphiken die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Üb = Überschwemmen vor der Infektion (2,5 h im Dunkeln mit Wasser überflutet). A: relatives Frischgewicht, 21 dpi. B: relative Menge an Pilz-DNA, 21 dpi.

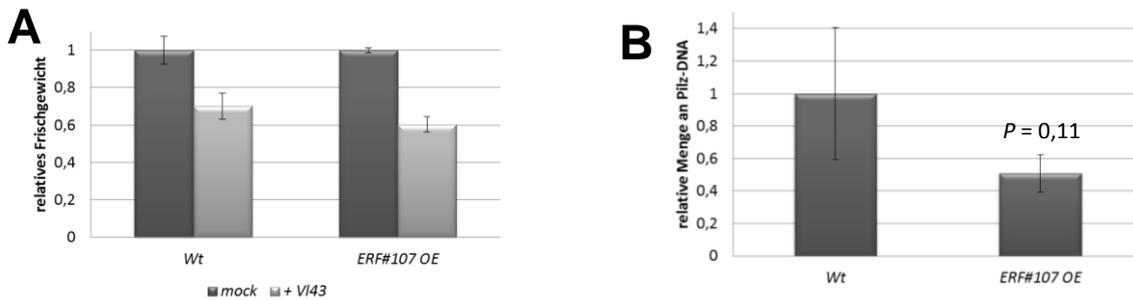


Abb. S27: **Propagation von VI43 war bei Überexpression von ERF#107 tendenziell eingeschränkt.**

Der Überexprimierer *ERF#107 OE* zeigte nur eine etwa 4,7-fach erhöhte *ERF#107*-Transkriptmenge verglichen mit dem Wt (vgl. Abb. S22 D). In zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit *V. longisporum* als Pathogen konnte zwar weniger Pilz-DNA im *ERF#107 OE* detektiert werden, aber trotz der Tendenz ergab der statistische Test beide Male einen *P* value > 0,05. Standardabweichung als Fehlerbalken (*n* = 3). A: relatives Frischgewicht, 21 dpi. B: relative Menge Pilz-DNA, 21 dpi. *P* value = 0,11 (Student's *t*-test, wobei Wt Bezugsgruppe ist).

*Überschwemmen als Vorbehandlung verbesserte im Wildtyp die Toleranz gegen P. syringae*

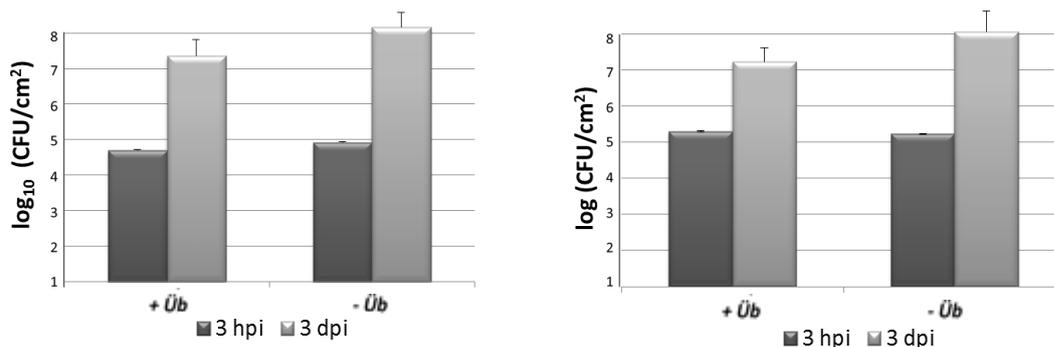


Abb. S28: **Überschwemmte Wt-Pflanzen zeigten sich toleranter gegen *P. syringae*.**

Gezeigt sind zwei voneinander unabhängige Experimente. CFU / cm<sup>2</sup> zu den Zeitpunkten 3 hpi und 3 dpi. + Üb = mit Überschwemmen vorbehandelte Wt-Pflanzen (=> 2,25 h unter Wasser im Dunkeln, danach 20 min Erholungsphase) und anschließend Infiltration mit *P. syringae*; - Üb = Kontrollgruppe, d.h. nicht überschwemmte Pflanzen wurden direkt mit *P. syringae* infiziert. Wenn die Pflanzen zuerst mit Wasser überflutet und dann infiziert wurden, war 3 dpi die Zahl CFU / cm<sup>2</sup> geringer (In Zusammenarbeit mit Jörn Herfert, Universität Würzburg).

## 8.11 Betrachtung von Co-Expressionen mit Atted II

Die Co-Expressions-Analyse anhand der ATTED-II Datenbank (Obayashi *et al.*, 2009; Aoki *et al.*, 2016) ist ein wertvolles Hilfsmittel bei der Identifizierung von Zielgenen einzelner Transkriptionsfaktoren. Eine Co-Expression eines Gens mit einem TF unter bestimmten Einflüssen muss zwar nicht immer auf eine direkte Regulation durch den TF hinweisen, aber man kann erste Anhaltspunkte bei der Suche nach Zielgenen eines TFs gewinnen. Außerdem kann die Auswertung der Co-Expression einen Hinweis liefern, ob sehr homologe Genprodukte ähnliche Eigenschaften besitzen könnten, sofern sie durch dieselben Stimuli aktiviert werden.



Mit dem Programm Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004; Hruz *et al.*, 2008) wurde nach Stimuli gesucht, die die transkriptionelle Expression von *ERF#096*, *ERF#104* sowie *ERF#105* beeinflussen (Abb. S31).

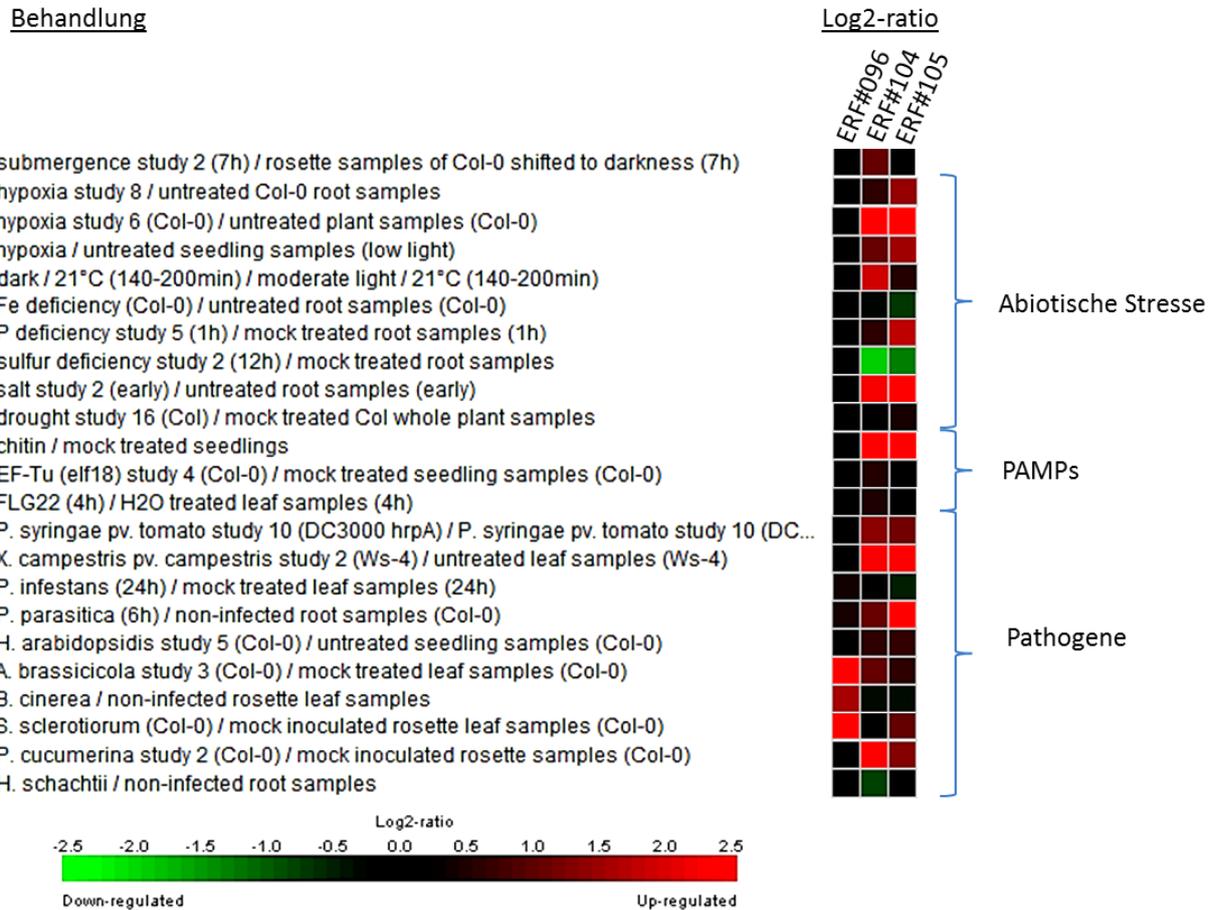


Abb. S31: **Differenzielle Genexpression von *ERF#096*, *ERF#104* und *ERF#105* unter Berücksichtigung verschiedenen Stimuli.**

Aus dem kompletten Ergebnis der Genevestigator-Analyse wurden einige Beispiele ausgewählt und hier dargestellt. Entsprechend der unten dargestellten Farbskala wurden Induktionsstärken, die sich aus verschiedenen Arrayanalysen ableiten, in eine sog. *Heatmap* aufgeteilt. Rote Felder bedeuten Induktion, grüne Felder Repression der entsprechenden Gene. Die Stress-Behandlungen sind links zusammengefasst. Verständniserklärungen: Fe = Eisen, P = Phosphor, EF = bakterieller Elongationsfaktor, FLG22 = bakterielles Flagellin 22, *P. syringae* = *Pseudomonas syringae* (hemibiotrophes Bakterium), *X. campestris* = *Xanthomonas campestris* (biotrophes Bakterium), *P. infestans* = *Phytophthora infestans* (hemibiotropher Oomycet), *P. parasitica* = *Phytophthora parasitica* (hemibiotropher Oomycet), *H. arabidopsidis* = *Hyaloperonospora arabidopsidis* (hemibiotropher Pilz), *A. brassicicola* = *Alternaria brassicicola* (nekrotropher Pilz), *B. cinerea* = *Botrytis cinerea* (nekrotropher Pilz), *S. sclerotiorum* = *Sclerotinia sclerotiorum* (nekrotropher Pilz), *P. cucumerina* = *Plectosphaerella cucumerina* (nekrotropher Pilz), *H. schachtii* = *Heterodera schachtii* (pflanzenpathogener Nematode).

*ERF#104* und *ERF#105* weisen ein anderes Expressionsprofil auf als *ERF#096*. *ERF#096* wird sehr schwach und nur durch wenige Bedingungen, wie etwa einer Exposition mit nekrotrophen Pilzen (vgl. *B. cinerea*) induziert. Jedoch stimulieren die gezeigten nekrotrophen Pilze die *ERF#104* und *ERF#105* Expression kaum. Andere biotische Stressreize (z.B. Chitin, *P. syringae* oder *P. parasitica*) induzieren *ERF#104* und *ERF#105* stärker. Abiotische Stressreize (z.B. Nährstoffmangel oder Trockenheit) führen eher weniger zu einer Induktion dieser Gene. Das ist ein weiterer Hinweis für die Beteiligung an der Pathogenabwehr.

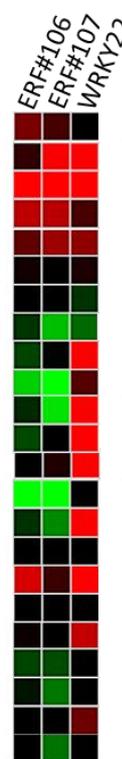
Vereinzelt sind ERFs der Gruppe IXb stärker mit abiotischem Stress assoziiert: Im Gegensatz zu *ERF#104* und *ERF#105* konnten in der Recherche mit dem Programm Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004; Hruz *et al.*, 2008), keine Hinweise auf eine transkriptionelle Induktion von *ERF#106* und *ERF#107* durch biotische Reize gefunden werden (Abb. S32) – mit der Ausnahme, dass die Exposition mit *P. parasitica* *ERF#106* sehr schwach induzieren könnte, was ebenfalls im Inf-TRAP-Seq während der *P. parasitica*-Infektion (2,5 hpi) in Zentralzylinder und Endodermis zutraf (Abb. S5). Sehr deutlich werden *ERF#106* und *ERF#107* durch Überschwemmen bzw. Sauerstoffmangel (Hypoxie) und Dunkelheit induziert, ähnlich wie *WRKY22* (Abb. S32). Andere abiotische Stresse, wie etwa Salzstress oder Trockenheit, führen nicht zur Induktion von *ERF#106* und *ERF#107*.

6 dpi mit *V. longisporum* war keine Induktion von *ERF#106* oder *ERF#107* in der gesamten Wurzel registriert worden, wohl aber im Translatom (Abb. 56).

#### Behandlung

submergence study 2 (7h) / rosette samples of Col-0 shifted to darkness (7h)  
 hypoxia study 8 / untreated Col-0 root samples  
 hypoxia study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)  
 hypoxia / untreated seedling samples (low light)  
 dark / 21°C (140-200min) / moderate light / 21°C (140-200min)  
 Fe deficiency (Col-0) / untreated root samples (Col-0)  
 P deficiency study 5 (1h) / mock treated root samples (1h)  
 sulfur deficiency study 2 (12h) / mock treated root samples  
 salt study 2 (late) / untreated root samples (late)  
 drought study 16 (Col) / mock treated Col whole plant samples  
 chitin / mock treated seedlings  
 EF-Tu (elf18) study 3 (Col-0) / mock treated seedling samples (Col-0)  
 FLG22 (4h) / H2O treated leaf samples (4h)  
*P. syringae* pv. tomato study 10 (DC3000) / mock inoculated leaf samples  
*X. campestris* pv. *campestris* (Ws-4) / untreated leaf samples (Ws-4)  
*P. infestans* (24h) / mock treated leaf samples (24h)  
*P. parasitica* (6h) / non-infected root samples (Col-0)  
*H. arabidopsidis* study 5 (Col-0) / untreated seedling samples (Col-0)  
*A. brassicicola* study 3 (Col-0) / mock treated leaf samples (Col-0)  
*B. cinerea* / non-infected rosette leaf samples  
*S. sclerotiorum* study 2 (Col-0) / mock inoculated rosette leaf samples (Col-0)  
*P. cucumerina* study 2 (Col-0) / mock inoculated rosette samples (Col-0)  
*H. schachtii* / non-infected root samples

#### Log2-ratio



Abiotische Stresse

PAMPs

Pathogene



Abb. S32: **Differentielle Genexpression von *ERF#106*, *ERF#107* und *WRKY22* unter verschiedenen Stimuli.**

Aus dem kompletten Ergebnis der Genevestigator-Analyse wurden einige Beispiele ausgewählt und hier dargestellt. Entsprechend der unten dargestellten Farbskala wurden Induktionsstärken, die sich aus verschiedenen Arrayanalysen ableiten, in eine sog. *Heatmap* aufgeteilt. Rote Felder bedeuten Induktion, grüne Felder Repression der entsprechenden Gene. Die Stress-Behandlungen sind links zusammengefasst. Verständniserklärungen: Fe = Eisen, P = Phosphor, EF = bakterieller Elongationsfaktor, FLG22 = bakterielles Flagellin 22, *P. syringae* = *Pseudomonas syringae* (hemibiotrophes Bakterium), *X. campestris* = *Xanthomonas campestris* (biotrophes Bakterium), *P. infestans* = *Phytophthora infestans* (hemibiotropher Oomycet), *P. parasitica* = *Phytophthora parasitica* (hemibiotropher Oomycet), *H. arabidopsidis* = *Hyaloperonospora arabidopsidis* (hemibiotropher Pilz), *A. brassicicola* = *Alternaria brassicicola* (nekrotropher Pilz), *B. cinerea* = *Botrytis cinerea* (nekrotropher Pilz), *S. sclerotiorum* = *Sclerotinia sclerotiorum* (nekrotropher Pilz), *P. cucumerina* = *Plectosphaerella cucumerina* (nekrotropher Pilz), *H. schachtii* = *Heterodera schachtii* (pflanzenpathogener Nematode).

Während ERF#104 und ERF#105 mit den sog. CMIX-5 und CMIX-6 Motifen zwei C-terminale MAP Kinase Phosphorylierungsstellen besitzen, ist weder bei ERF#106 noch bei ERF#107 eine MAP Kinase Phosphorylierungsstelle bekannt (Nakano *et al.*, 2006). Allen vier gemeinsam ist aber ein sog. CMIX-2 motif, das eine Region ist, die als transkriptionelle Aktivierungsdomäne funktionieren könnte (Fujimoto *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2006). Das könnte begründen, warum *ERF#104* und *ERF#105* bei ganz anderen extrazellulären Reize aktiv sind, als *ERF#106* und *ERF#107*, aber ihre Regulierungseigenschaft sehr ähnlich ist und schließlich in einer transkriptionellen Aktivierung von sehr ähnlichen oder gleichen Genen mündet. Die beiden TF ERF#106 und ERF#107 könnten in einen Mechanismus verwickelt sein, wo ein vorangegangener abiotischer Stress eine verbesserte Toleranz gegen einen nachfolgenden biotischen Stress vermittelt.

### 8.13 Der stark Pathogen-induzierte Marker *DIN2* wird auch durch abiotischen Stress induziert

*DIN2* OE #2 war toleranter gegen *V. longisporum*

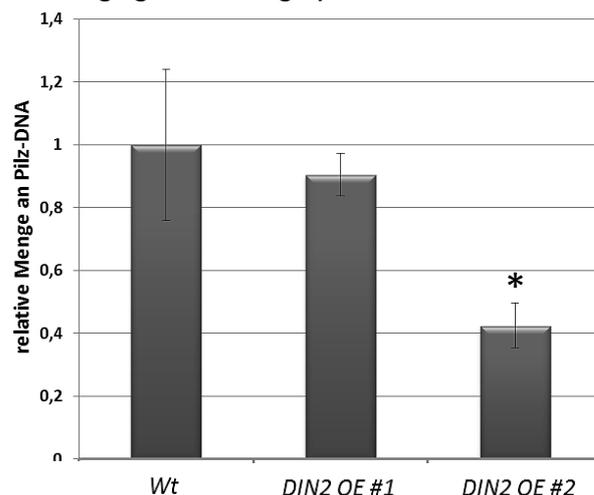


Abb. S33: ***DIN2* reduzierte bei starker Überexpression die Ausbreitung von *V. longisporum*.**

Inokulation mit *V. longisporum*: relative Menge an *VI43*-DNA in den Linien *DIN2* OE #1 und *DIN2* OE #2 sowie im Wt, 21 dpi. Standardabweichungen als Fehlerbalken (n = 3). \* Student's *t*-test,  $P \leq 0,05$ ; wobei Wt Bezugsgruppe ist.

Die putative  $\beta$ -Glucosidase *DIN2* wird durch Pathogenbefall auf transkriptioneller Ebene in der gesamten Wurzel induziert, wie es ausführlich in den Ergebnissen dargestellt wurde. Dort wurden Ereignisse bis 6 dpi untersucht. Abb. S34 zeigt, dass selbst noch 30 dpi diese *VI43*-bedingte Induktion in der Wurzel vorlag, sogar noch stärker (> 100-fach) als zu den früheren Zeitpunkten. 30 dpi treten Symptome wie Welke und vor allem die *VI43*-bedingte Seneszenz sehr stark hervor.

Mit dem Programm Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004; Hruz *et al.*, 2008) wurde nach Stimuli gesucht, die die transkriptionelle Expression von *DIN2* beeinflussen. Abb. S34 zeigt eine Zusammenfassung interessanter Aspekte.

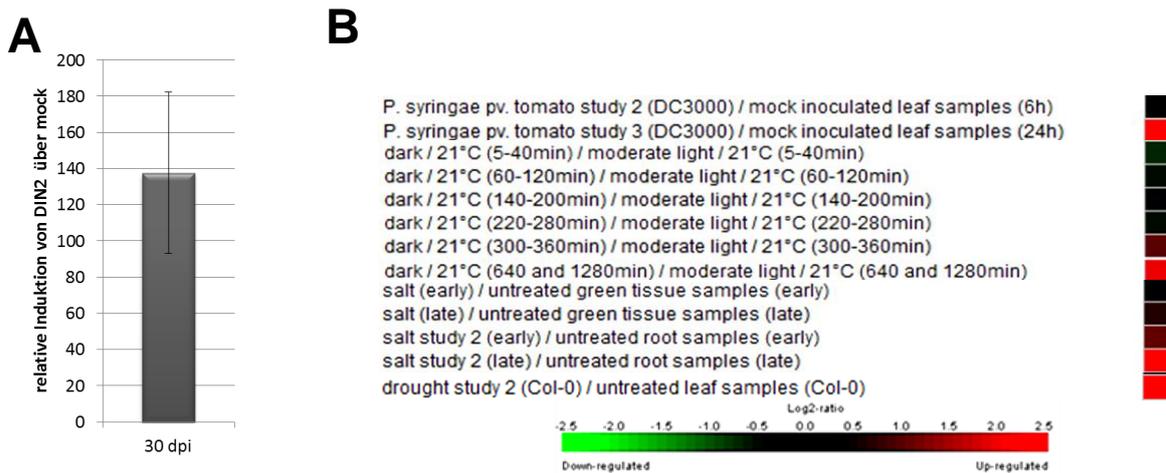


Abb. S34: Neben Pathogeninfektionen induzieren abiotische Stresse die *DIN2* Expression.

A: 30 dpi lag in *Vl43*-infizierten Pflanzen *DIN2* stark transkriptionell induziert vor. Wt Pflanzen wurden im Infektionssystem auf Erde entweder mit mock-Lösung behandelt oder mit *Vl43* infiziert. Je Replikate wurden Wurzeln von zwei Pflanzen geerntet und zu einer Probe vereinigt. Nachdem die Wurzeln so gut es ging mit Wasser von Erde gesäubert waren, wurde daraus gesamt RNA isoliert. In einer anschließenden qRT-PCR Analyse wurde die relative Induktion des Gens *DIN2* bestimmt, wobei die Kontrolle (mock) auf 1 gesetzt und so die Probe der *Vl43* infizierten Pflanzen darauf normiert wurde. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung aus zwei biologischen Replikaten.

B: Aus dem Ergebnis der Genevestigator-Analyse wurden einige Beispiele ausgewählt und hier dargestellt. Entsprechend der unten dargestellten Farbskala wurden Induktionsstärken, die sich aus verschiedenen Arrayanalysen ableiten, in eine sog. *Heatmap* aufgeteilt. Rote Felder bedeuten Induktion, grüne Felder Repression der entsprechenden Gene. Die Stress-Behandlungen sind links zusammengefasst. Infektionen mit Pathogenen induzieren *DIN2* (hier als Bsp. *P. syringae*). Abiotischer Stress (z.B. eine lange Dunkelperiode) führt ebenfalls zur Induktion der Genexpression.

Sowohl Pathogeninfektionen als auch abiotischer Stress wie Dunkelheit (vgl. Namensherkunft *DIN2* = *DARK INDUCIBLE 2*), hohe Salzkonzentrationen oder Trockenheit induzieren *DIN2*. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Masterstudentin Nicole Volmer betreut. In Zusammenarbeit mit ihr wurde die Rolle des Gens *DIN2* bei Salzstress und Dunkelheit untersucht (vgl. Masterarbeit Vollmer, 2015). Auf salzhaltigen Agar-Platten (getestet wurden die Konzentrationen 0 mM – 150 mM NaCl) wurde das Wurzelwachstum vergleichend aufgezeichnet: Unter Salzstress zeigte die Verlustmutante *din2-4 ko* keinen Unterschied zum Wt (Abb. S35). Demnach spielt *DIN2* - zumindest in dieser Art von Experimenten - eher kaum eine Rolle beim Umgang mit hohen Salzkonzentrationen, obwohl es durchaus im Wt transkriptionell induziert wird (Abb. S34).

Dunkelheit ist ein exogenes Signal für die Pflanze, die Blattseneszenz einzuleiten (Fujiki *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2007). Während der Seneszenz werden Nährstoffe aus den Blättern mobilisiert, wobei dafür unter anderem Chloroplasten abgebaut werden. Deshalb kann der Grad der Seneszenz über die Quantifizierung des Chlorophyllgehalts bestimmt werden. Pflanzen der Linien Wt, *din2 ko #4* und *DIN2 OE #1* wurden für 7 d bei ausreichender Wasserversorgung in absoluter Dunkelheit gehalten. Anschließend wurde der Chlorophyllgehalt gemessen. Es stellte sich heraus, dass *DIN2 OE #1* nach dieser Behandlung weniger Chlorophyll hatte als der Wt. Die Verlustmutante *din2-4 ko* dagegen war vergleichbar mit dem Wt. Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression von *DIN2* den durch Dunkelheit induzierten Abbau von Chlorophyll und somit die Seneszenz verstärken kann.

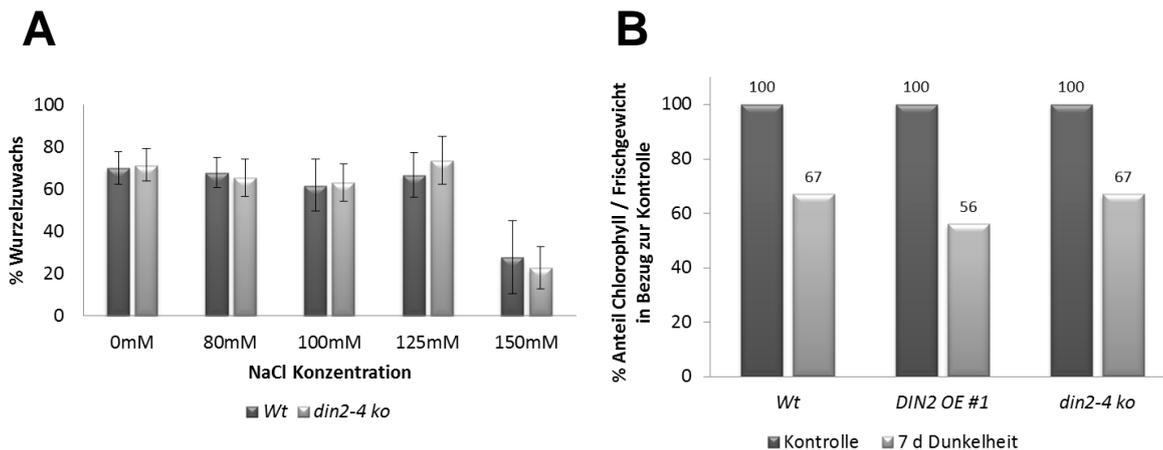


Abb. S35: *DIN2* „Loss-of-function“ bzw. „Gain-of-function“ Linien unter abiotischem Stress.

A: Kein Unterschied zwischen *din2-4 ko* und Wt im relativen Wurzelwachstum bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Die Pflanzen wuchsen zunächst auf Agarplatten ohne Salz und wurden dann auf salzhaltige Agar-Platten umgesetzt. Nach zehn Tagen Salzstress wurde der Zuwachs der Primärwurzel gemessen. Relatives Wurzelwachstum = Wurzellänge nach Behandlung / Wurzellänge vor Behandlung [%]. Aus Vollmer, 2015.

B: Die Überexpression von *DIN2* verstärkte den durch Dunkelheit induzierten Abbau von Chlorophyll. Die Graphik zeigt den Vergleich des Chlorophyllgehalts / Frischgewicht. Die Kontrollgruppe (dunkelgrau) wurde mit einem Tagesrhythmus von 12 h Licht / 12 h Nacht kultiviert, während die in Dunkelheit inkubierten Pflanzen (hellgrau) 7 d in absoluter Dunkelheit verbrachten. Daten aus Zusammenarbeit mit Nicole Vollmer (Universität Würzburg).

Des Weiteren wird durch Homologie-Analysen der Proteinsignalsequenz vermutet, dass das *DIN2* Genprodukt in den Apoplasten sekretiert wird und dort an der Degradation der Zellwand beteiligt ist (Lee *et al.*, 2007). Dort könnten *DIN2* und andere die Spaltung von Zuckern aus Zellwandpolysacchariden katalysieren. Für eine  $\beta$ -Glucosidase aus Gerste, die hohe Homologie zu Mitgliedern der Glycosid Hydrolase Familie 1 aufweist, konnte bereits gezeigt werden, dass sie den Abbau von Polysacchariden der Zellwand katalysiert (Leah *et al.*, 1995). Im Speziellen wird sie im Samen exprimiert und daher wird dieser  $\beta$ -Glucosidase eine Funktion in der Samenreife und -keimung zugeschrieben (Leah *et al.*, 1995).

Bioinformatischen Analysen der Proteinsequenz zufolge könnte *DIN2* im Sekretionspathway (Emanuelsson *et al.*, 2000), sowie der Plasmamembran, dem endoplasmatischen Retikulum, den Peroxisomen und dem Golgi-Apparat (Nakai und Kanehisa 1991) lokalisiert sein.

## 8.14 Eichgerade zur Bestimmung der *spike-in* Menge

Es wurde das AFGC Microarray Control Set (Distributed by the Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre [<http://arabidopsis.org.uk>]) verwendet. Das AFGC Microarray Control Set besteht aus sog. *spiking* Kontrollen, die auch für Experimente mit Pflanzen geeignet sind (The set of clones was assembled by the Michigan State University DNA Microarray

Facility, part of the *Arabidopsis* Functional Genomics Consortium funded by NSF grant 9872638).

Folgender Klon des Sets wurde verwendet: GFP Green Fluorescent Protein (Accession #: AF078810; Coordinates: 1603-2319; Vector: pGEM-T; Amplification Primers: unM13F/unM13R; PCR (bp) 990)

Anhand der Plasmid-DNA des Klons wurde die *spike-in* RNA hergestellt:

1. Man amplifizierte in einer PCR mit dem Plasmid als Template und mit Primern, die vom Kit vorgegeben waren, dsDNA, die einen T7 Promotor und die Sequenz des GFPs beinhaltet. Diese dsDNA wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend eluiert.



linear PCR product (990 bp)

2. Man führte eine *in vitro*-Transkription an der dsDNA durch mit einer T7 RNA-Polymerase (bindet an T7 Promotor). Man erhielt daraufhin ssRNA mit der GFP-Sequenz.



Diese ssRNA (GFP) wurde über Reverse Transkription (RT oder auch cDNA-Synthese) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA konnte mittels qRT-PCR quantifiziert werden. Zum Erstellen der Eichgerade wurden verschiedene Mengen an ssRNA (GFP) in die cDNA-Synthese eingesetzt. Anschließend wurde eine qRT-PCR mit den Primern GFP-Spike\_for und GFP-Spike\_rev durchgeführt. Die CT Werte wurden auf der y-Achse aufgetragen.

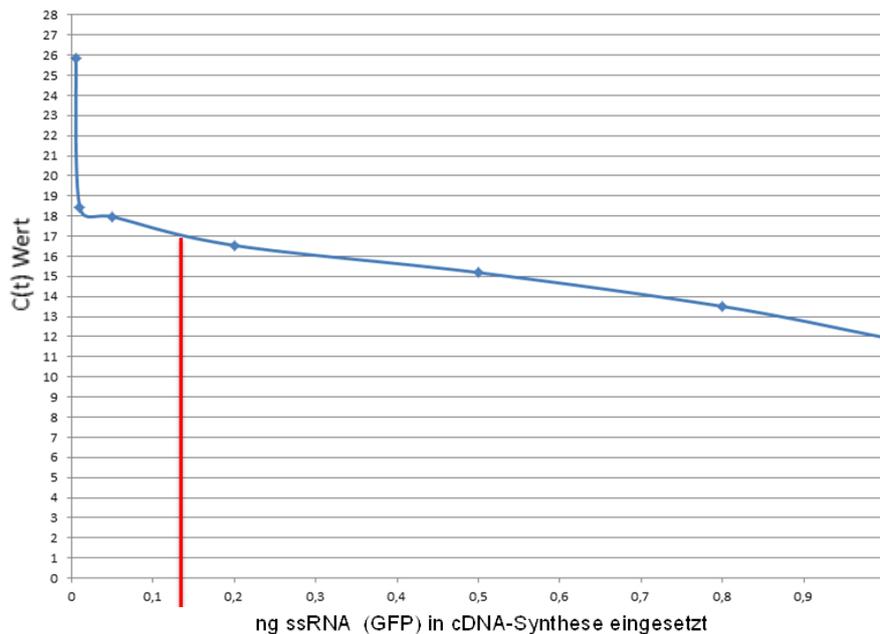


Abb. S36: **Eichgerade zur Ermittlung der Menge an *spike-in* ssRNA.**

Unterschiedliche Mengen an *spike-in* ssRNA (GFP) wurden in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde anschließend in eine qRT-PCR eingesetzt unter Verwendung der Primer GFP-Spike for und GFP-Spike rev. Die ermittelten CT-Werte sind auf der y-Achse aufgetragen worden.

Beispiel: Der rote Strich markiert, dass ein CT-Wert von 17 etwa 0,125 ng mRNA (GFP) entspricht, die in die cDNA-Synthese eingesetzt wurden.

Die ssRNA (GFP), kann der mRNA des Experimentes hinzugefügt werden, um als Normalisierungskontrolle zu dienen. Für die Qualitätskontrolle der TRAP Prozedur wurde RNA des Klons (GFP) dazu genutzt, um Kontaminationen zu bestimmen, die über nicht-spezifische Bindung an FLAG-markierten Ribosomen über die TRAP aufgereinigt wurden. Dafür wurden 100 ng ssRNA (GFP) zum PEB hinzugegeben (= vor der TRAP). Danach wurde mit Anti-FLAG *magnetic beads* inkubiert. Nach der TRAP wurde die Menge an ssRNA (GFP) im Eluat ermittelt. Das war ein Indikator für Kontaminationen, da ssRNA (GFP) nicht an FLAG-markierte Ribosomen gebunden haben dürfte und dementsprechend nicht aufgereinigt worden sein sollte. Zunächst wurde die komplette eluierte RNA in cDNA umgeschrieben und danach eine qRT-PCR durchgeführt. Der gemessene CT-Wert nach der TRAP betrug 18, das entsprach < 0,05 ng ssRNA (GFP), die im Eluat vorhanden waren. Das entsprach einer Kontaminationsrate durch RNA, die nicht an FLAG-markierten Ribosomen gebunden war, von << 1%. Die TRAP Methode ist also nicht sehr anfällig für Kontaminationen durch freie, d.h. nicht an FLAG-Ribosomen gebundene RNA.

## 8.15 Abkürzungsverzeichnis

Verkürzte Darstellungsform	Ausgeschriebene(s) Wortgruppe (Wort)
35S CaMV Promotor	Promotor mit konstitutivem Charakter bei Pflanzen; aus dem Blumenkohlmosaikvirus isoliert (engl.: Cauliflower mosaic virus)
Abb.	Abbildung
Abb. S	Abbildung im Supplement (Anhang)
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AfTORF-EX	<i>Arabidopsis thaliana</i> Transkriptionsfaktor-ORF Überexpressions-Kollektion
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
bar	BASTA <sup>®</sup> -Resistenz-Gen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	Charge-coupled Device
cDNA	complementary DNA
CDS	codierende Sequenz (engl.: coding sequence)
CERK1	Chitin Elicitor Receptor Kinase1
CFU	Kolonie bildende Einheiten (engl.: colony forming units)
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
<i>Col-0</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ökotyp Columbia-0
CLSM	Confocal laser scanning microscopy (konfokale Laser-Raster-Mikroskopie)
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
<i>cyp71a12/a13/a18</i>	Cytochrom-P450-71A12/A13/A18 Dreifachmutante
<i>cyp79b2/b3</i>	Cytochrom-P450-79B2/B3 Doppelmutante
Da	Dalton; Maßeinheit der Masse bei Proteinen
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DEG	Differentiell exprimierte(s) Gen(e)
d. h.	das heißt
<i>DIN2</i>	Gen für <i>DARK INDUCIBLE 2</i> (At3g60140)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotid

dpi	Tage nach Inokulation (engl.: days post inoculation)
DTT	Dithiothreitol
EB	Elutionspuffer (engl.: Elution Buffer)
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ein	Ethylen insensitiv
ERF	Ethylen Response Factor
ET	Ethylen
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
ETI	Effektor Triggered Immunity
evtl.	eventuell
flg22	Flagellin Peptid 22
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
f.sp.	Forma specialis
GFP / eGFP	Green Fluorescent Protein / enhanced Green Fluorescent Protein
ggf.	Gegebenenfalls
GK	Grundkurs
GO	Gen-Ontologie (engl.: Gene Ontology)
hpi	Stunden nach Inokulation (engl.: hours post inoculation)
HF	Hauptfach
H <sub>2</sub> O	Wasser
HR	Hypersensitive Response
IAOx	Indol-3-Acetaldoxim
IGs	Indol-Glucosinolate (auch Senfölglycoside)
Inf	Infektion
ISR	Induzierte Systemische Resistenz (engl.: induced systemic resistance)
JA	Jasmonic Acid (Jasmonsäure)
Kb	Kilobasen(paare)
LB	Luria-Bertani Broth
LK	Leistungskurs
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholungen (engl.: Leucine-rich Repeat)
MAMP	Microbe Associated Molecular Pattern
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
mock	Kontrollbehandlung (mock: engl. für Attrappe, Blindprobe)
MS	Murashige-Skoog-Medium
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NF	Nebenfach
<i>NIT4</i>	Gen der <i>Nitrilase 4</i>
OD	optische Dichte
OE	Überexpression (engl.: Overexpression)
<i>PAD3</i>	Gen für <i>Phytoalexin deficient 3</i>
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PEB	Polysomen Extraktionspuffer (engl.: Polysome Extraktion Buffer)
<i>P. indica</i>	<i>Piriformospora indica</i>
<i>P. parasitica</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>
PR	Pathogenesis Related
PRR	Pattern Recognition Receptor
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
PTI	PAMP Triggered Immunity
Pv.	Pathovar

qRT-PCR	quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
R-Gen	Resistenz-Gen
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	revolutions per minute (dt: Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylic Acid (Salizylsäure)
SAR	Systemic Acquired Resistance
Seq	Sequenzierung
sog.	sogenannt/e
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
T-DNA	Transfer-DNA
TIR-NBS	Toll/Interleukin1 Receptor–Nucleotide Binding Site
TF	Transkriptionsfaktor
TRAP	Translating Ribosome Affinity Purification (Methode)
Trp	Tryptophan (eine Aminosäure)
u. a.	unter anderem
UBQ5	Gen für Ubiquitin 5
UBQ10	Gen für (Poly)Ubiquitin 10
Ü.N.	Über Nacht
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
vgl.	vergleiche
<i>V. longisporum</i>	<i>Verticillium longisporum</i>
VI43	<i>Verticillium longisporum</i> Stamm 43
v/v	Volumenprozent
WBB	Waschpuffer für die <i>Beads</i> (engl.: Wash Buffer <i>Beads</i> )
WB2	Waschpuffer #2 (engl.: Wash Buffer #2)
Wt	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp ( <i>Col-0</i> )
w/v	Gewichtsprozent
XVE-ERF#106	$\beta$ -Östradiol induzierbare <i>Arabidopsis thaliana</i> ERF#106-Überexpression
z. B.	zum Beispiel

## 8.16 Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
d	Tag
dpi	Tage nach der Inokulation
Da	Dalton
g	Gramm
(x) g	Vielfaches der Erdanziehung
h	Stunde
hpi	Stunden nach der Inokulation
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
cpm	counts per million
rpm	revolutions per minute (entspricht dem deutschen UpM)
sec	Sekunde
u	unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

## 8.17 Präfixe der Einheiten

M	Mega ( $10^6$ )
k	kilo ( $10^3$ )
d	dezi ( $10^{-1}$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )
p	pico ( $10^{-12}$ )

## 8.18 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymin
U	Uracil

## 8.19 *Arabidopsis thaliana* AGI-Codes (Accession numbers)

Die in dieser Arbeit häufig erwähnten Gene können in der Datenbank der *Arabidopsis* Genom Initiative (AGI) oder bei der GenBank/EMBL database unter den folgenden Nummern gefunden werden:

*BGLU45* (At1g61810), *BGLU46* (At1g61820), *bZIP11* (At4g34590), *CBP60g* (At5g26920), *CDKA1* (At3g48750), *CYP79B2* (At4g39950), *CYP79B3* (At2g22330), *CYP81F2* (At5g57220), *CYP71A12* (At2g30750), *CYP71A13* (At2g30770), *CYP82C2* (At4g31970), *DIN2* (At3g60140), *EGL3* (At1g63650), *ERF#096* (At5g43410), *ERF#105* (At5g51190), *ERF#104* (At5g61600), *ERF#106* (At5g07580), *ERF#107* (At5g61590), *EXPA9* (At5g02260), *E2FA* (At2g36010), *FOX1* (At1g26380), *GAPDH* (At1g13440), *GL2* (At1g79840)\*, *GL3* (At5g41315), *GSO2* (At5g44700), *IGMT1* (At1g21100), *MYB34* (At5g60890), *MYB36* (At5g57620), *MYB51* (At1g18570), *MYB122* (At1g74080), *NIT4* (At5g22300), *NAC042* (At2g43000), *PAD3* (At3g26830), *PEL1* (At3g60120), *PEN2* (At2g44490), *PEN3* (At1g59870), *PEP* (At1g09750)\*, *PYK10* (At3g09260), *RHS12* (At3g10710)\*, *RPL18* (At3g05590), *SCR* (At3g54220)\*, *SGN3* (At4g20140), *SHR* (At4g37650)\*, *UBQ5* (At3g62250), *UBQ10* (At4g05320), *WOL* (At2g01830)\*, *WRKY22* (At4g01250), *WRKY33* (At2g38470).

\* AGI der Promotor-Quelle für die *Promotor:FLAG-RPL18 Arabidopsis* Linien.

## Danksagung

Ohne die Unterstützung lieber Menschen wäre wohl der erfolgreiche Abschluss einer Arbeit, die so viele Seite umfasst, kaum zu machen gewesen. Deshalb möchte ich diese beiden Seiten alleine dem „Danke sagen“ widmen.

Besonderer Dank gebührt dem Auftragsteller und Erstgutachter Wolfgang Dröge-Laser für die gute Betreuung während der letzten vier Jahre, für die Finanzierung des teuren Projektes und die besonderen Ideen, die in die Arbeit eingeflossen sind. Dein optimistisches Ermutigen und deine Begeisterung für die Forschung haben mich oft zu neuen Projekten motiviert, dank derer erfreuliche Ergebnisse erzielt werden konnten. Die ganzen Jahre hattest Du immer eine offene Tür und ein offenes Ohr für allerlei Probleme, die die *Verticillium* Forschung mit sich brachte, wenn der Pilz machte was er wollte und nicht was er sollte. Großen Dank auch, dass Du in einer für mich schwierigen Phase mein Herzensanliegen unterstützt hast, um meine Urlaubstage in mehreren Aufenthalten auf den Philippinen für eine gute Sache zu investieren und einen kleinen Beitrag zum Wiederaufbau leisten zu können, nachdem innerhalb von zwei Wochen erst ein Erdbeben und anschließend ein Hurrikan die Inseln Bohol und Leyte stark verwüsteten. Vielen Dank für alles auf einem steinigen Weg, der über ein paar Tiefs aber auch besonderen Hochs bis zum Ziel führte.

Allerbesten Dank auch an die hilfsbereite Angelika Mustroph für das Lesen der vielen Seiten als Zweitgutachterin und für die Bereitstellung der transgenen Pflanzenlinien zu den zelltypspezifischen Untersuchungen. Meine Fragen hast Du aus der Ferne immer zügig und hilfreich beantwortet. Für Deine Diskussionsbereitschaft zu jeder Zeit bin ich sehr dankbar, denn sicherlich kam sie meinem Projekt zugute.

An meine großartigen Co-Operationspartner:

Frank Waller (Universität Würzburg) danke ich herzlich für die *P. indica* Stämme und die freundliche Unterstützung beim Umgang mit *Piri*. Der Oomyceten Expertin Agnès Attard (Université Nice) danke ich herzlich für die Durchführung der Infektionsversuche mit *P. parasitica* in ihrem Labor in Frankreich. Für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den RNA-Sequenzierungen danke ich Elmar Wolf (Universität Würzburg).

Meinem Sports- und Laborkameraden Christoph Weiste spreche ich nicht nur für die vielen Stunden, die wir nach getaner Arbeit mehrmals in der Woche schweißtreibend beim Sport verbracht haben, ausdrücklichen Dank aus, sondern vor allem für die tolle Unterstützung im Labor. Immer kann man Dich mit schwierigen Fragen löchern und Du beantwortest sie bereitwillig, umfangreich und hilfreich. Cheers buddy!

Meiner Bachelor- und Masterstudentin Nicole Vollmer danke ich ganz besonders dafür, dass sie sich einem technisch sehr schwierigen Projekt tapfer entgegenstellte und mit viel Eifer die oft aussichtslos scheinenden *DIN2* Studien doch erfolgreich vorantrieb.

Vielen Dank allen anderen Kollegen im Labor: Jörn, Prathibha, Markus, Susi, Sarah, Martina und allen ehemaligen Kollegen, die inzwischen das Weite gesucht haben und in aller Welt verstreut sind. Es war mir stets eine Freude mit und neben euch zu arbeiten. Ihr habt im Labor für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt und die netten Runden beim Mittagstisch konnte man immer genießen. Die Hilfsbereitschaft und die vielen kleinen innerbetrieblichen Feiern waren super ;)

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und ganz ganz besonders auch meiner Freundin Natalia. Ihr vier schenkt mir immer Halt, Zuversicht und Selbstbewusstsein, so dass ich gerne mit meinem Zuhause verwurzelt bleibe. Ihr seid für mich unangefochten die Besten – das ist so und das bleibt so! Ohne Euch wäre ich sicherlich niemals so weit gekommen und ich hoffe, dass ich Euch so viel geben kann, wie Ihr mir gegeben habt. Ihr habt mich auf meinem Weg zum Biologen mit Mitgefühl, positivem Zuspruch und Liebe begleitet. Ihr wart immer für mich da, auch wenn mich *Verticillium* mal wieder an den Rand zum Wahnsinn trieb. Vielen Dank Natalia für die Unterstützung in meinen stressigen Phasen und die vielen Kleinigkeiten die du während dieser Zeit für mich übernommen hast. *Te quiero!*

Die letzten Zeilen der Danksagung richte ich an meinen Onkel Martin. Ich habe es Dir nie persönlich gesagt, deshalb ist es eine gute Gelegenheit, es an dieser Stelle zu tun. Du warst und bist mir ein großes Vorbild. Schon als du in Würzburg Medizin studiert hast und ich Dich im Kindesalter besucht habe, reifte in mir der Gedanke, dass ich auch etwas in diese Richtung machen möchte. Und nun, ein paar Jahre später, habe ich diesen Kindheitstraum verwirklichen können. Bleib so wie du bist – ein Vorbild für mich eben.



## Bisherige Publikationen

**Weiste C., Pedrotti L., Selvanayagam J., Muralidhara P., Fröschel C.M., Ondřej Novák O., Ljung K., Hanson J., Dröge-Laser W.** (accepted)  
The *Arabidopsis* bZIP11 transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated primary root growth. *PLOS Genetics*.

**Fröschel C.M., Iven T., Weiste C. und Dröge-Laser W.** (submitted)  
*Gain-of-function* screen to identify redundant transcription factors mediating resistance to the vascular fungal pathogen *Verticillium longisporum*. *Molecular Plant Journal*.

## Konferenzbeiträge

**Fröschel C.M., Mustroph A., Dröge-Laser W.** (2014) GENOME-WIDE ANALYSIS OF CELL-LAYER SPECIFIC EXPRESSION OF PATHOGEN-INDUCED GENES IN THE *ARABIDOPSIS* ROOT. *XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*, Rhodos, Greece. Vortrag auf der Konferenz.

**Fröschel C.M., Mustroph A. Dröge-Laser W.** (2015) GENOME-WIDE ANALYSIS OF CELL-LAYER SPECIFIC EXPRESSION OF PATHOGEN-INDUCED GENES IN THE *ARABIDOPSIS* ROOT. *International Workshop on PR Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects*, Aachen, Germany. Vortrag auf der Konferenz, ausgezeichnet mit dem 1. Preis der Deutschen Botanischen Gesellschaft.



# Erklärung

Fröschel Christian  
christian.froeschel@uni-wuerzburg.de

## Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

### Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „ **Genome-wide analysis of celltype-specific expressed genes in the *Arabidopsis*-root after inoculation with pathogenic and mutualistic microorganisms**” is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Genomweite Analyse der zellschicht-spezifischen Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Inokulation mit pathogenen und mutualistischen Mikroorganismen**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Christian Fröschel



# Lebenslauf