

**Molekulare Aspekte
pathogener und symbiontischer
Infektion bei der Modell-Leguminose
Medicago truncatula Gaertn.**

Habilitationsschrift

von

Dr. rer. nat. Frank Colditz

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

März 2012

**Molekulare Aspekte pathogener und symbiontischer Infektion
bei der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* Gaertn.**

Angenommene

Habilitationsschrift

zur

Erlangung der Lehrbefugnis (*venia legendi*)

für das Fachgebiet Molekularbiologie

an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

von

Dr. rer. nat. Frank Colditz

Naturwissenschaftliche Fakultät der

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Datum der Habilitation:

24. Oktober 2012

*Durch alle Töne tönet
Im bunten Erdentraum
Ein leiser Ton gezogen
Für den der heimlich lauschet*

*Friedrich Schlegel
(* 1772 in Hannover; † 1829 in Dresden)*

Inhalt

TEIL A - Molekulare Aspekte pathogener und symbiontischer Infektion bei der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* - Ein Überblick

1.	Einleitung	1
2.	Die Modell-Leguminose <i>Medicago truncatula</i>	4
3.	Symbiontische und pathogene Mikroorganismen, die mit <i>M. truncatula</i> interagieren	7
4.	Molekulare Aspekte pathogener und symbiontischer Infektion in <i>M. truncatula</i>	11
4.1	Molekulare Aspekte primärer Infektionsereignisse	11
4.2	Molekulare Aspekte früher Infektiosereignisse	15
4.3	Molekulare Aspekte fortgeschrittener Infektion	19
4.4	Die Rolle von ‚ <i>PR10-l – like proteins</i> ‘ in der Pflanzenabwehr von <i>M. truncatula</i>	20
5.	Zusammenfassung	26
6.	Literaturverzeichnis	29

TEIL B - Molekulare Aspekte pathogener und symbiontischer Infektion bei der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* - Wissenschaftliche Artikel

1. – 10.	Publikationen	35
----------	---------------	----

TEIL C - Weitere wissenschaftliche Artikel

1. & 2.	Publikationen	37
---------	---------------	----

APPENDIX

A1	Danksagung	38
A2	Versicherung nach § 4 Absatz 5 und 6 der Habilitationsordnung	39

TEIL A

Molekulare Aspekte pathogener und symbiontischer Infektion bei der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* - Ein Überblick

1. Einleitung

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise und dem Fehlen eines Immunsystems benötigen Pflanzen effektive Schutzmechanismen gegenüber Infektionen durch pathogene Pilze, Bakterien und Viren. Das Vermögen der Pflanzen zur Initiierung einer effektiven Gegenwehr basiert im Wesentlichen auf der Etablierung sensitiver Mechanismen für die Perzeption mikrobieller Signalkomponenten bereits vor einer Primärinfektion sowie Mechanismen für eine rasche Aktivierung einer effektiven Abwehrreaktion (Teil B9). Generell lassen sich dabei vorgegebene morphologische Schutzmechanismen und Barrieren, so die Ausprägung einer wachshaltigen Kutikula, von aktiv induzierten Mechanismen unterscheiden, die zu einer Erhöhung der Toleranz oder gar zu einer Resistenzausprägung gegenüber den Invasoren führen.

Die auf einer molekularen Ebene induzierten Abwehrmechanismen sind dabei äußerst vielfältiger Natur. Sie umfassen: (i) eine Akkumulation struktureller Zellwandpolymere wie Kallose, Lignin und Suberin, die zu einer mechanischen Verstärkung der Zellwand führen, (ii) die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) an den Infektionsstellen, (iii) Induktion und Ausschüttung von antimikrobiellen Komponenten (Phenole, Alkaloide, Phytoalexine), und (iv) die Anreicherung induzierbarer Abwehrproteine, zu denen hydrolytische Enzyme (z. B. Chitinasen und Glucanasen für die Zellwanddegradation), Proteinaseinhibitoren, Enzyme zur Detoxifizierung (Katalasen), „pathogenesis-related (PR)“ – Proteine gehören (Dixon und Lamb 1990; Dangl und Jones 2001; Teil B9). Während eine chemosensorische Erkennung des Invasoren sowie primäre Abwehrmechanismen auf Prozessen biochemischer Natur beruhen (z. B. ein Anstieg der Ionenströme, vor allem der zytoplasmatischen Calcium – Konzentrationen, posttranslationale

Proteinmodifikationen), bedürfen die Synthese von Abwehrproteinen und antimikrobiellen Komponenten in der Regel einer spezifischen Induktion der Genexpression (Dixon und Lamb 1990; Hammond-Kosack und Jones 1997). Bei den induzierbaren Abwehrproteinen unterscheidet man generell extrazelluläre Proteine, die eine erste Abwehrlinie ausprägen, bevor es zu einer flächendeckenden Penetration durch den Invasor kommt, von interzellulären Proteinen einer nachgeschalteten, zweiten Abwehrlinie (Teil B9). Da es generell Zeit in Anspruch nimmt, diese Abwehrproteine in genügender Konzentration zu akkumulieren, können virulente Pathogene bereits die erste Abwehrlinie durchbrochen haben, sodass das Abwehrpotential der interzellulären Proteine auch in Hinsicht auf eine systemische Abwehr von großer Bedeutung ist (van Loon et al. 2006). Andererseits prägen viele phytopathogene Mikroorganismen einen hemibiotrophen Lebensstil aus, um größeren Schädigungen der Wirtspflanze und damit dem Verlust von Nährstoffen entgegenzuwirken.

Symbiotische Interaktionen mit Pflanzen

Die am besten adaptierten und gleichzeitig erfolgreichsten Mikroorganismen, die mit Pflanzen interagieren, sind somit diejenigen, die zum einen sehr effizient die Nährstoffquellen der Pflanzen zu schöpfen vermögen, zum anderen aber die geringsten Schädigungen und Einbußen bei den Wirtspflanzen verursachen (Djordjevic et al. 1987). Daher ist die Ausprägung einer symbiotischen Interaktion mit beiderseitigem Nutzen der verfügbaren Nährstoffe der Rhizosphäre aus evolutiver Sicht als differenziertere Form zu betrachten, was sich auch aus der Tatsache ableiten lässt, dass viele Symbionten pathogene Vorläufer haben, aus denen sie hervorgegangen sind (Djordjevic et al. 1987). Somit ist eine symbiotische Lebensweise häufig eine sekundär angeeignete oder weiterentwickelte Form eines primär pathogenen Infektionsmodus (Tyler 1993). Erfolgt keine Penetration des pflanzlichen Gewebes, spricht man in der Regel von einem Endophyten (Tyler 1993). Jedoch ist der pathogene Schritt des Eindringens in das pflanzliche Gewebe bei hoch differenzierten Symbionten derart adaptiert und auf die morphologischen Gegebenheiten spezialisiert, dass dabei die pflanzliche Abwehr auf ein minimales Ausmaß reduziert ist. Demnach zeigen die fortschrittlichsten Symbionten die höchste Wirtsspezifität mit dem höchsten gegenseitigen (Wieder-) Erkennungspotential (Djordjevic et al. 1987). Dies impliziert eine ebenso hoch spezialisierte molekulare Signalgebung zwischen den Interakteuren. Sicherlich zählen zu diesen hochentwickelten Symbionten die stickstofffixierenden Bodenbakterien der Gattung *Rhizobiales*, die nur mit Leguminosen eine Interaktion eingehen können (Punkt 3). Auch die Rhizobienbakterien weisen über eine kurze Phase einen pathogenen Infektionsmodus auf,

welcher eingebettet ist in einen komplexen Signalaustausch mit ihren Wirtspflanzen (Djordjevic et al. 1987). Erstaunlicherweise hat sich gezeigt, dass ein einheitlicher molekularer Signalzyklus in den Wirtspflanzen existiert, der den Rhizobienbakterien und einer ganz anderen Gruppe von Symbionten, den arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM), gemein ist und der für die Ausprägung der Symbiose ursächlich ist (Oldroyd et al. 2006; Markmann und Parniske 2009). Explizit wurden sieben sogenannte Symbiose („sym“) - Gene in der Modell – Leguminose *Lotus japonicus* identifiziert, von denen vier Orthologe in der anderen Modell – Leguminose *Medicago truncatula* aufgefunden wurden: (i - iii) *DMI 1–3* („does not make infection“), die für symbiontische Signalfaktoren kodieren („symbiotic receptor-like kinase (SYMRK)“, „cation channel protein“, „calcium and calmodulin dependent kinase (CCaMK)“), und (iv) *IPD3*, das für ein „DMI3 interacting protein“ kodiert (Markmann und Parniske 2009). Vermutlich läuft diese symbiontische Signalisierung parallel zu einem Infektionsmodus pathogener Natur ab. Beide symbiontischen Assoziationen wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit in der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* auf molekularer Ebene untersucht.

Pathogene Interaktionen mit Pflanzen

Die Ernährungsstrategien von Pflanzenpathogenen reichen von einer Nekrotrophie, bei der das Pathogen das befallene pflanzliche Gewebe abtötet und dann die freiwerdenden Nährstoffe abzieht, bis zu einer Biotrophie, bei der das Pathogen nur von lebenden Wirtszellen die Nährstoffe beziehen kann (Tyler 1993). Während nekrotrophe Pathogene in der Regel ein weites Wirtsspektrum aufweisen, zeigen biotrophe Pathogene meist eine Spezialisierung im Rahmen eines engen Wirtsspektrums sowie der Ausprägung spezieller Strukturen (zum Beispiel Haustorien) für die Nährstoffzufuhr auf. Daneben gibt es noch hemibiotrophe bzw. heminekrotrophe Formen, die an den Infektionsstellen proliferieren und in einiger Distanz zu den Orten der Primärinfektion beginnen, das pflanzliche Gewebe zu zerstören (Tyler 1993).

Aufgrund der mannigfaltigen Ausprägungsformen pathogener Infektionen stellt sich wiederum die grundlegende Frage, wie die pflanzliche Abwehr in effektiver Form umgangen, unterdrückt oder bekämpft bzw. vereitelt werden kann. Vermögen in diesem Sinne nekrotrophe Pathogene in besonders effektiver Weise die Pflanzenabwehr zu supprimieren? Wenn dem so wäre, wären aber die Unterschiede zu einer saprophytischen Lebensweise auf totem Substrat quasi nicht mehr existent (Tyler 1993). Gabriel (1986) postulierte daher die genetischen Voraussetzungen, die bei der Besiedlung der Pflanze einen pathogenen

Mikroorganismus von einem saprophytischen Organismus unterscheidet: Das Vorhandensein von (i) Genen für die Kolonisierung der Pflanze, (ii) Genen für die Ausprägung morphologischer Infektionssymptome, (iii) Genen für die Ausprägung der Wirtsspezifität, und (iv) Avirulenzgenen („*Av genes*“) oder „*race-specificity genes*“. Die beiden letzten Punkte zeigen die Bedeutung der molekularen pflanzlichen Antworten bei der Ausprägung von Pflanzenpathogenesen auf. Nach dem „*gene-for-gene*“ – Modell für die Ausprägung einer pflanzlichen Resistenz ist schon die Präsenz eines einzigen spezifischen Gens ausreichend, um zwischen einem pathogenen und einem endophytischen Mikroorganismen zu unterscheiden (Flor 1946; Tyler 1993).

In der hier vorliegenden Arbeit wird die pathogene Interaktion eines biotrophen Pflanzenpathogens - dem Oomyzeten *Aphanomyces euteiches* - zu der Modell-Leguminose *M. truncatula* auf molekularer Ebene im Detail analysiert und mit den molekularen Aspekten, die einer symbiontischen Infektion mit dem Rhizobiumbakterium *Sinorhizobium meliloti* sowie dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* in *M. truncatula* zugrunde liegen, verglichen. Die vorgestellten Studien gehen dabei auf drei zeitliche Ebenen einer mikrobiellen Infektion ein: die Charakterisierung molekularer Aspekte von (i) primären Infektionsphasen (Teil B1), (ii) frühen Infektionsphasen (Teil B, 6 und 7), und (iii) fortgeschrittenen Infektionen (Teil B, 8, 10, 11 und 12) in *M. truncatula*.

2. Die Modell-Leguminose *Medicago truncatula*

Mit mehr als 18000 Arten, die in über 650 Gattungen zusammengefasst sind, bilden die Leguminosen (Leguminosae/Fabaceae) die drittgrößte Familie der höheren Blütenpflanzen (Doyle 2001). Leguminosen kommen ubiquitär vor und zeigen eine außerordentliche Vielfalt in ihren Erscheinungsformen: von kleinen Bodenkräutern bis hin zu riesigen tropischen Bäumen (Young et al. 2003). Neben den Gräsern stellen Leguminosen die agronomisch bedeutendsten Nutzpflanzen: etwa ein Drittel der Eiweißversorgung sowie der Versorgung mit pflanzlichen Ölen für den menschlichen Nahrungsbedarf werden durch den Leguminosenanbau gedeckt (Graham and Vance 2003). Aufgrund des hohen Proteingehalts ihrer Samen (20 bis 40 %) komplementieren Hülsenfrüchte die menschliche Ernährung durch Getreide und dessen Produkte als primäre Kohlenstoffquelle (Gepts et al. 2005). Die meisten der landwirtschaftlich kultivierten Leguminosenarten gehören der Unterfamilie der *Papilionideae* an, die gleichzeitig die artenreichste der drei Unterfamilien *Caesalpinieae*,

Mimosoideae und *Papilionideae* darstellt (Gepts et al. 2005). Die *Papilionideae* unterteilen sich in die ‚tropischen‘ oder ‚phaseoloiden‘ Leguminosen mit den bedeutenden Gattungen *Phaseolus*, *Vigna*, *Glycine* und *Cajanus* (Tribus *Phaseoleae*), sowie die ‚gemäßigten‘ oder ‚galegoiden‘ Leguminosen mit den wichtigen Gattungen *Melilotus*, *Trifolium* und *Medicago* (Tribus *Trifolieae*); *Pisum* und *Vicia* (Tribus *Viceae*), und *Lotus*, *Cicer* und *Lens* (Tribus *Loteae*) (Young et al. 2003).

Für die Leguminosen (genauer: die Ordnung *Fabales* im übergeordneten phylogenetischen Kontext als Hauptglied des stickstofffixierenden Zweigs der Eurosiden I; Markmann und Parniske 2009; Wang et al. 2009) einzigartig ist die Befähigung zu einer Endosymbiose mit stickstofffixierenden Bodenbakterien der Gattung *Rhizobiales*, die den Pflanzen einen Zugang zu stickstoffarmen Böden ermöglicht sowie zur Ausprägung besonders proteinreicher Samen führt (siehe Punkt 3). Daneben tritt eine weitere symbiontische Lebensgemeinschaft zu arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM) der Abteilung *Glomeromycota* auf (siehe Punkt 3).

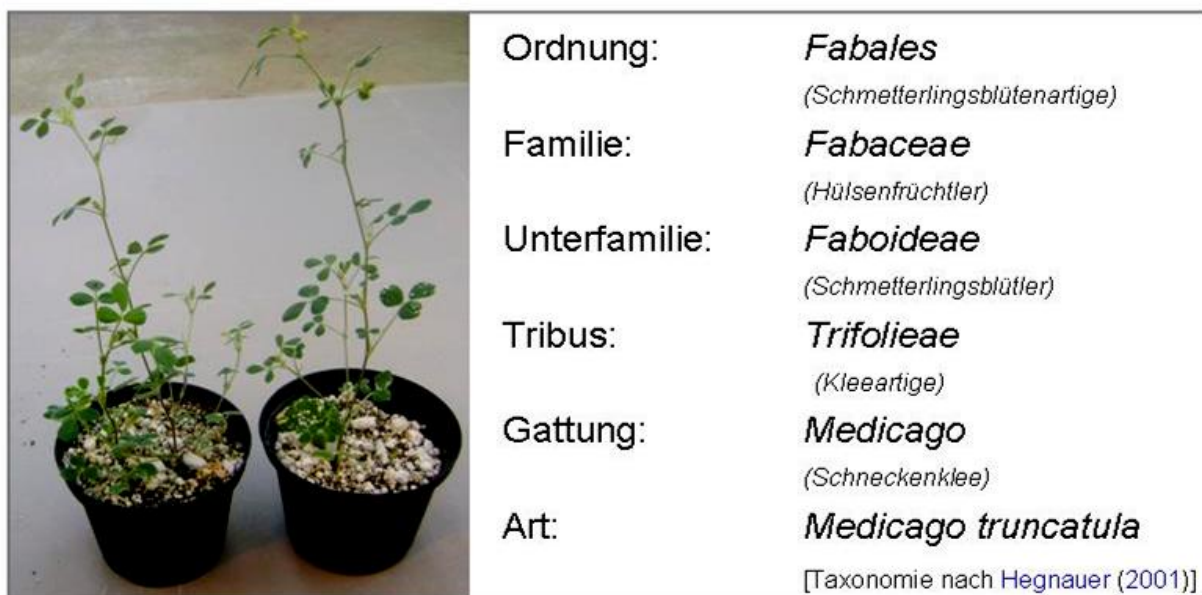


Abbildung 1: Die Modell-Leguminose *Medicago truncatula* (Gaertn.) Kultivar A17 Jemalong. Habitus und taxonomische Einordnung [nach Hegnauer (2001)].

Seit den frühen 1990er Jahren ist die einjährige, galegoide Leguminose *Medicago truncatula* (Gaertn.) neben *Lotus japonicus* (Reg.) zunehmend in den Fokus der Symbioserforschung an Leguminosen gerückt (Cook 1999; Young und Udvardi 2009) (Abbildung 1; Teil B, 2 und 5). *M. truncatula* vereinigt eine Reihe von Eigenschaften, die sie als Modellpflanze aus der Familie der *Fabaceae* auszeichnet: Im Gegenteil zu vielen polyploiden Leguminosenarten mit wirtschaftlicher Relevanz zeigt *M. truncatula* eine diploide Genomorganisation (2n=16) mit

einer vergleichsweise kleinen Genomgröße (~ 470 Millionen Basenpaare, Mbp) (Young und Udvardi 2009). Erst kürzlich wurde die Genomsequenz des *M. truncatula* Euchromatins veröffentlicht, die eine Assemblierung von 375 Mbp (davon 246 Mbp nicht-redundante Sequenzen) mit einer ~ 94-prozentigen Abdeckung aller *M. truncatula* Gene ermöglichte (Young et al. 2011). Demnach wird eine fundamentale Neuordnung der Genomstruktur nach einer Genomverdopplung („whole-genome duplication“, WGD), die die gesamte Ordnung der *Fabales* erfasste, in *M. truncatula* vor schätzungsweise 58 Millionen Jahren als entscheidender Evolutionsschritt für die Etablierung der Rhizobien - Leguminosen (RL) – Symbiose angesehen. Im Zeitraum der WGD erfuhren für die RL - Interaktion essentielle Sets von Genpaaren, die vor allem für Rezeptoren von Nodulierungsfaktoren und korrespondierenden Transkriptionsfaktoren kodieren, ihre funktionelle Spezialisierung (Young et al. 2011). Hier zeigt sich eine signifikante Makrosyntenie der Euchromatine von *M. truncatula* mit denen von *L. japonicus* und *Glycine max* (Young et al. 2011).

M. truncatula ist artverwandt mit der agronomisch bedeutenden Leguminose *Medicago sativa* (Alfalfa), jedoch ist diese aufgrund ihrer komplexeren autotetraploiden Genetik als Modellorganismus nicht geeignet (Young et al. 2011). *M. truncatula* ist selbstbefruchtend und vereint weitere Eigenschaften, die eine Modellpflanze auszeichnen, wie eine kurze Regenerationszeit und etablierte Transformationsprotokolle (Teil B, 2 und 5). Ferner sind derzeit 269238 ‚expressed sequence tags‘ (ESTs) in ‚Genbank‘ annotiert (Stand: erster Dezember 2011; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Mittels Affymetrix® Gen - Chips konnte ein Genexpressionsatlas etabliert werden (Benedito et al. 2008). Für reversgenetische Ansätze sind in großem Umfang Insertionsmutagenese *Tnt1* - Populationen (Tadege et al. 2008; 2009) sowie RNA Interferenz (RNAi) – vermitteltes ‚gene silencing‘ (Limpens et al. 2004) in *M. truncatula* etabliert.

Die nahezu vollständige Sequenzierung des *Medicago* Euchromatins ermöglicht eine ebenso vollständige Annotierung der proteinkodierenden Sequenzen (Teil B2). Für proteomische Applikationen an *M. truncatula* bedeutet dies verbesserte Voraussetzungen für eine Massenspektrometrie (MS) – basierte Proteinidentifizierung. Bereits in den letzten Jahren führte eine zunehmende Abdeckung der *M. truncatula* Genomsequenzen des laufenden Sequenzierungsprojektes und deren Verfügbarkeit in öffentlichen Datenbanken („DFCI *M. truncatula* Gene Index (MtGI)“; Quackenbush et al. 2001) zu einer merklichen Steigerung der Proteinidentifizierungsraten, was sich in den vorgestellten Arbeiten B4, B6 und B7 in einem quantitativen Anstieg der Proteindaten niederschlägt. Auch die gegebene Syntenie des

Medicago Euchromatins zu dem von *L. japonicus*, wo Sequenzierungsarbeiten bereits etwas früher (ab dem Jahr 2000) als bei *M. truncatula* (ab dem Jahr 2002) initiiert wurden, ermöglichte durch Kreuzassemblierungen die Schließung von Gensequenzlücken, die insbesondere aus der ‚clone by clone‘ - Strategie der Sequenzierungsprojekte resultierten (Young et al. 2005).

Eine Rezension von proteomischen Untersuchungen an der Modell-Leguminose seit Veröffentlichung der ersten Referenzkarten für das *M. truncatula* Wurzelproteom im Jahre 2001 (Mathesius et al. 2001) bis zu aktuellen Studien wird in den Abschnitten B2 und B5 vorgestellt.

3. Symbiotische und pathogene Mikroorganismen, die mit *M. truncatula* interagieren

Das Rhizobienbakterium Sinorhizobium meliloti

Im Pflanzenreich einzigartig ist die Fähigkeit der Leguminosen, eine Endosymbiose mit stickstofffixierenden Bodenbakterien der Gattung *Rhizobiales* einzugehen, die sogenannte Rhizobien - Leguminosen (RL) – Symbiose. Die RL – Symbiose basiert auf zwei evolutiven Fortschritten: (i) eine intrazelluläre Aufnahme der Rhizobienbakterien, und (ii) die Induktion der Organogenese für die Ausprägung der charakteristischen Wurzelknöllchen (Sprent 2007). Die Wurzelknöllchen gleichen „Mikrofermentern“, die optimale Bedingungen für die Kultivierung der Bakterien sowie für die Nitrogenase-Aktivität der Stickstoffreduktion gewährleisten, ein Prozess, der die Wirtspflanze weitgehend unabhängig von anderen Stickstoffquellen werden lässt (Markmann und Parniske 2009; TeilB, 2 und 5).

Die phylogenetisch diverse Gruppe der Rhizobienbakterien wird generell in zwei Gattungen eingeteilt: die schnell wachsenden *Rhizobiales* Arten und die langsam wachsenden *Bradorhizobiales* Arten (Djordjevic et al. 1987). Zumindest die *Rhizobiales* Arten zeigen eine extrem ausgeprägte Wirtsspezifität, sodass sich feste Inokulierungsgruppen aufstellen lassen: *Rhizobium trifolii* mit Kleearten, *R. leguminosarium* mit Erbsenarten, *R. phaseoli* mit Bohnenarten, *R. meliloti* mit Alfalfa und *Mesorhizobium loti* mit Lotus (Djordjevic et al. 1987). Der natürliche Symbiont von *M. truncatula* ist *Sinorhizobium meliloti*. Entsprechend der Verfügbarkeit der Genomsequenzen der beiden Modell-Leguminosen sind auch die für ihre Rhizobien - Symbionten verfügbar (Kaneko et al. 2000; Galibert et al. 2001), was die

beiden Interaktionspärchen für molekulare Untersuchungen der RL- Symbiose sehr attraktiv werden lässt.

Doch ein weiterer Sachverhalt der RL – Symbiose ist von gesteigertem Interesse für vergleichende molekulare Untersuchungen von symbiontischen und pathogenen Interaktionen: Die Genomanalysen für *S. meliloti* offenbarten eine ausgesprochen hohe Syntenie zu der Genomstruktur des pathogenen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens*, die die Existenz eines gemeinsamen – vermutlich pathogenen – Vorfahren implizieren (Wood et al 2001). Betrachtet man den Infektionsmechanismus von *S. meliloti* (und den von anderen *Rhizobiales* Arten), so folgen zumindest die primären Infektionsereignisse einem eher parasitärem Infektionsmodus, was Djordjevic et al. (1987) zur Definition von *Rhizobium* als einem hoch- und weiterentwickelten Parasiten (*the refined / sophisticated parasite*) veranlasste: Die Primärinfektion des spezifischen Leguminosenwirtes erfolgt an den Wurzelhaaren nach einem komplexen Austausch von Signalmolekülen. Auf die Sekretion von Flavonoiden der Wirtspflanze, vor allem in den Bereichen der Wurzelzone wo die Wurzelhaare differenziert werden, reagieren die Bakterien ebenfalls mit der Bildung von Signalmolekülen, spezifischen *Lipo-chitin-Oligosacchariden*, die *Nodfaktoren (NF)* genannt werden (Limpens et al. 2003). Daraufhin bilden die Wurzelhaare einen spezifischen symptomatischen Phänotyp aus, nämlich ihr Einrollen (*root-hair curling*), was zu einer Beherrschung der Bakterien im Zentrum des eingerollten Wurzelhaares und der späteren Infektion mit der Ausbildung des Infektionsschlauchs führt (Limpens et al. 2003; Teil B1). Dass dabei eine Pflanzenabwehr initiiert wird, die gezielt von den Bakterien transient supprimiert wird, wird im Detail in Teil B1 beschrieben.

Während der Primärinfektion repräsentieren Rhizobien Parasiten; danach vermögen sie in einen symbiontischen Modus während der Stickstofffixierung in den sich ausprägenden Knöllchen zu wechseln (Djordjevic et al. 1987). Doch auch in dieser mutualistischen Phase verbleiben die zu Bakteroiden differenzierten Rhizobien zeitlebens von dem Pflanzengewebe über die Ausprägung einer pflanzlichen Membran, der Peribakteroidmembran, getrennt - und damit unter der Kontrolle der Wirtsleguminose (Mathesius 2009).

Arbuskuläre Mykorrhiza (AM) - Pilze der Abteilung Glomeromycota

Im Gegensatz zu der RL - Symbiose ist die AM - Symbiose mit pilzlichen Organismen der Abteilung *Glomeromycota* nicht spezifisch für Leguminosen (Teil B, 2 und 5). In der Tat stellt sie die am weitesten verbreitete pflanzliche Symbiose dar, die vor über 400 Millionen

Jahren etabliert wurde und zu deren Ausprägung gut 80 % der Landpflanzen befähigt sind (Remy et al. 1994; Schüssler et al. 2001). In beiden Symbioseformen beherbergen die Pflanze die mikrobiellen Partner in ihrem Wurzelgewebe, in beiden Fällen sind sie vom pflanzlichen Gewebe über die Ausprägung einer pflanzlichen Membran separiert (periarbuskuläre Membran bei der AM), doch im Unterschied zu der RL – Symbiose erfolgt keine Organogenese in der Wirtspflanze (Teil B, 2 und 5). Für die AM – Symbiose charakteristisch ist ein bidirektionaler Austausch limitierender Nährstoffe, vor allem von Phosphor und Stickstoff zugunsten der Pflanze, und von Hexosen zugunsten des Pilzes, was in einer Steigerung der pflanzlichen Photosyntheseleistung resultiert (Nehls et al. 2007). Dieser Austausch erfolgt in den charakteristischen Arbuskeln, die in infizierten Zellen des inneren Wurzelkortex transient ausgeprägt werden und nur für einige Tage metabolisch aktiv sind (Harrison 2005). Zudem induziert eine Mykorrhizierung indirekt einen Effekt gesteigerter Resistenz / Protektion gegenüber biotischem Stress durch Pflanzenpathogene (Smith and Read 2008), was auch Gegenstand der hier vorliegenden Studien ist (Teil B10, Punkt 4.4).

Vor einer Primärinfektion, ausgehend von einer auskeimenden Spore über die Penetration der pflanzlichen Rhizodermis durch Hyphopodien, erfolgt ein ebenso komplexer Austausch von Signalmolekülen wie bei der RL – Symbiose: Von der Wirtspflanze ausgeschüttete *Strigolaktone* fördern die Verzweigung der pilzlichen Hyphen sowie die Generierung von *Myc Faktoren*, die strukturell wohl *Lipochitin-Oligosacchariden* der NF entsprechen (Maillet et al. 2011). In Analogie zu der RL – Symbiose vermitteln sie kurz vor der Infektion der Pflanze den symbiontischen Charakter der Infektion (Ercolin und Reinhardt 2011). Nach der Penetration durch die Hyphopodien wachsen die pilzlichen Hyphen zunächst durch die Epidermiszellen in einem von den Pflanzenzellen ausgeprägten ‚*pre-penetration apparatus (PPA)*‘, einem zytoplasmatischen Kanal, der vermutlich ausgeprägt wird, um eine Pflanzenabwehr zu umgehen (Genre et al. 2005; 2008).

Die AM – Symbiose in *M. truncatula* wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gezielt als symbiontischer Antagonist gegenüber der pilzähnlichen *Aphanomyces euteiches* Infektion des wurzelpathogenen Oomyzeten untersucht, da sich ihre Infektionsverläufe weitgehend ähneln (Teil B, 1 und 6). Ferner wurde der Effekt der bereits genannten Bioprotektion einer AM – Vorinfektion auf eine pathogene *A. euteiches* Sekundärinfektion auf molekularer Ebene untersucht (Teil B10).

Der wurzelpathogene Oomyzete Aphanomyces euteiches

Oomyzeten bilden mit 500 beschriebenen Arten aus 70 Gattungen eine artenreiche Klasse von pilzähnlichen Mikroorganismen innerhalb der Gruppe der *Stramenopiles* aus (Leipe et al. 1994). Sie sind somit näher mit heterokonten Braunalgen, Goldalgen und Kieselalgen verwandt als mit den Echten Pilzen (Dick et al. 1999; Adl et al. 2005). Die Gruppe der Oomyzeten umfasst filamentöse, Hyphen und Mycelien ausprägende, meist zönozytische Formen mit einer saprophytischen oder parasitären Lebensweise im Wasser und in Wassertieren, aber auch terrestrisch in Pflanzen. Terrestrische Oomyzeten leben überwiegend parasitär im Wurzel- und Blattgewebe von Pflanzen, wo sie schwere Fäulniserkrankungen hervorrufen (Bourke 1991).

Innerhalb der Familie der *Leptolegniaceae* (oder auch als *Saprolegniaceae* klassifiziert) tritt die Gattung *Aphanomyces* mit über 50 Arten überwiegend als biotrophe bzw. hemibiotrophe Pflanzenparasiten hervor (Grau 1990). *Aphanomyces* ist diploid und produziert neben den generativen Oosporen zudem vegetative Zoosporen aus, die bei den pflanzenpathogenen Formen die Infektionsüberträger repräsentieren (Grau et al. 1991; Gaulin et al. 2007). *Aphanomyces euteiches* (Drechs.) verursacht eine destruktive Wurzelfäule, die ‚*Aphanomyces root rot*‘ oder ‚*common root rot*‘, in ein- und mehrjährigen Leguminosen, so in zahlreichen Erbsen-, Bohnen- und Kleearten sowie in der Gattung *Medicago* (Hagedorn 1989). In Erbsenanbaugebieten gemäßigter Klimate in Nordamerika, Nordeuropa, Australien, Neuseeland und Japan zählt die ‚*Aphanomyces root rot*‘ zu den bedeutendsten Pflanzenkrankheiten, die für erhebliche Ertragseinbußen verantwortlich ist (Levenfors 2003). Charakteristische Symptome einer *A. euteiches* Infektion sind zunächst braunartige Verfärbungen und Läsionen am Wurzelgewebe, dann das Auftreten von Fäulnisercheinungen, eine später signifikante Reduktion der Wurzelmasse sowie das zahlreiche Auftreten von Oosporen im Wurzelgewebe (Hagedorn 1989). Isolate von *A. euteiches* zeigen eine enge Wirtsspezifität, sodass unterschiedliche ‚*forma speciales*‘ unterschieden werden (z.B. *A. euteiches* f. *sp. pisi*), doch alle Isolate sind zumeist hoch pathogen in den landwirtschaftlich bedeutenden Erbsenkultivaren (Levenfors 2003).

Eine *A. euteiches* Infektion in *M. truncatula* wurde im Rahmen der hier präsentierten Studien umfassend untersucht, da die Infektion spezifisch in Leguminosen auftritt. Zudem zeigt *M. truncatula* eine enge verwandtschaftliche Nähe zu der Hauptwirtspflanze *Pisum sativum*, sodass die Erkenntnisse der molekularen Arbeiten an *M. truncatula* durchaus auf die

wirtschaftlich bedeutende Leguminose übertragbar sind. Ferner ist von Interesse, dass *A. euteiches* als oomyzetisches Pathogen andersartige molekulare Reaktionen in der Wirtspflanze zu induzieren vermag als die umfassend untersuchten Interaktionen mit phytopathogenen Vertretern der Echten Pilze. Ein weiterer Aspekt ist, dass *M. truncatula* auf eine *A. euteiches* Infektion mit einer partiellen Resistenz reagiert (Djébali et al. 2009), sodass der Infektionsverlauf langsamer ist als in *Pisum sativum*, was eine detaillierte Analyse der ihm zugrundeliegenden molekularen Ereignisse in *M. truncatula* ermöglicht.

4. Molekulare Aspekte pathogener und symbiontischer Infektion in *M. truncatula*

4.1 Molekulare Aspekte primärer Infektionsereignisse

*Molekulare Antworten von *M. truncatula* auf eine symbiontische und pathogene Primärinfektion*

Ein wesentliches Merkmal einer initialen Reaktion von Pflanzenzellen auf eine mikrobielle Primärinfektion ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) an den Infektionsstellen. Diese radikalen Sauerstoffprodukte (Superoxid ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxyl-Radikale (HO^{\bullet}), und hauptsächlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2)) haben zum einen eine direkt antimikrobielle Wirkung, indem sie die Auskeimung von Sporen sowie das Eindringen von Infektionsorganen in das pflanzliche Zellgewebe zu inhibieren vermögen (Lamb and Dixon 1997). Zusätzlich führen sie zu einer Verstärkung der Zellwandbarriere über das Quervernetzen von Zellwandpolymeren sowie zu einer Stimulierung der Ligninbiosynthese (Peng and Kuc 1992; Ralph et al. 2004). Die massive Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies, auch „oxidative burst“ genannt, ist von fundamentaler Bedeutung bei pathogenen Infektionen: Hier werden ROS in derart hohen Konzentration erzeugt, dass sie nicht nur toxisch für das Pathogen, sondern auch für die eigenen infizierten Wirtszellen sind. In diesem Fall spricht man von einer sogenannten „hypersensitive response (HR)“ – Reaktion, einem induzierten lokalen Zelltod, der eine weitere Ausbreitung der Infektion unterbindet (Lamb and Dixon 1997). Interessanterweise erfolgt die ROS Synthese auch bei symbiontischer Infektion, wenn auch in deutlich abgeschwächter Form und nur transient, sodass sie nicht in einer HR resultiert. Sie scheint jedoch im molekularen Infektionsmechanismus fest verankert zu sein, da ein Ausbleiben dieser Reaktion in der Regel zu einer Inkompatibilität der Interaktion führt (Rubio et al. 2004; Peleg-Grossman et al. 2006).

RNAi – vermitteltes ‚gene silencing‘ der kleinen ‚Rac1‘ GTPase MtROP9 in M. truncatula erlaubt die Charakterisierung des molekularen Netzwerks, das der Regulierung der ROS Synthese zugrunde liegt

Dass eine Feinabstimmung in der ROS Synthese bei sowohl pathogener als auch symbiontischer mikrobieller Primärinfektion von fundamentaler Bedeutung für den Infektionserfolg und den weiteren Infektionsverlauf ist, zeigen die Ergebnisse einer Studie zu einem RNAi – vermittelten ‚gene silencing‘ der kleinen ‚Rac1‘ GTPase *MtROP9* in *M. truncatula*. ‚*RAC/ROP* – like‘ GTPasen fungieren als molekulare Schalter elementarer Signaltransduktionswege (Yang and Fu 2007; Liu et al. 2010). Eine Hauptaufgabe, die ihnen zugewiesen wird, ist die Regulierung der ROS Synthese über direkte Aktivierung membranständiger ‚*NADPH oxidase homologues*‘, die die ROS Generierung katalysieren und in Pflanzen als ‚*RBOH* (respiratory burst oxidase homologue)‘ bezeichnet werden. Im Rahmen der hiesigen Studie (Teil B1) wurden eine Vielzahl von *M. truncatula* Populationen (*MtROP9i*) generiert, deren transgene Wurzeln über Integration eines *silencing* – Konstrukts einen signifikanten Knockdown von *MtROP9* aufzeigten. Nach pathogener Infektion mit *A. euteiches* sowie symbiontischer Infektion mit dem AM Pilz *G. intraradices* und dem Rhizobienbakterium *S. meliloti* blieb bei allen Infektionen eine ROS Synthese direkt nach der Infektion in den transgenen Wurzelabschnitten aus, was die direkte Beteiligung von *MtROP9* an einer *RBOH* – vermittelten Generierung reaktiver Sauerstoffspezies impliziert. Expressionsanalysen, die drei und 24 Stunden nach den Infektionen durchgeführt wurden, belegten zudem eine Co-Expression von *MtROP9* und *MtRBOH* sowie eine enge Korrelation zur Induktion von Faktoren des zellulären antioxidativen Netzwerks zur Detoxifizierung von ROS (repräsentativ für *MtCat* analysiert). Proteomanalysen, die mittels ‚*differential gel electrophoresis (DIGE)*‘ zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführt wurden (die Methodik ist in Teil B3 beschrieben), belegten das Ausbleiben einer Induktion von spezifischen Enzymen zur ROS Neutralisierung in den *MtROP9* – defizienten Wurzeln, entsprechend der nach den Infektionen ausbleibenden Generierung von ROS.

Einfluss einer supprimierten ROS Synthese auf die mikrobiellen Infektionen

Der Eingriff in die Regulierung der ROS Produktion führte zu signifikanten Veränderungen bei den mikrobiellen Infektionsverläufen: Während eine pilzliche Infektion (Mykorrhizierung) bzw. die pilz-ähnliche *A. euteiches* Infektion unabhängig von ihrer symbiontischen oder pathogenen Ausprägung in den *MtROP9* – defizienten Wurzeln stimuliert wurde, zeigte sich bei der Inokulierung mit Rhizobienbakterien eine deutlich

gestörte Primärinfektion in den MtROP9 – defizienten Wurzeln. Ursächlich dafür scheint ein abnormer Phänotyp von deformierten Wurzelhaaren zu sein, der sich nach Inokulierung mit *S. meliloti* sowie auch der Applikation von *S. Meliloti* NF ausprägt: Ein nach den Applikationen sofort einsetzendes extremes Anschwellen der Wurzelhaare, und zwar dies nicht nur an der Wurzelhaarspitze, was dem typischen Infektionsphänotyp bzw. der frühen NF Signalübermittlung entspricht, sondern auch der basalen Bereiche und somit der nahezu kompletten Wurzelhaare. Dieses Phänomen einer progressiv voranschreitenden Signalübermittlung in den Wurzelhaaren von MtROP9i im Vergleich zur Vektorkontrolle wurde insbesondere bei NF Applikation beobachtet und ist ein Indiz dafür, dass eine, auf der Generierung von ROS basierende primäre Pflanzenabwehr, einer Initialisierung der NF Signalgebung entgegenwirkt. Aus dieser Erkenntnis lässt sich ableiten, dass eine transiente Reduktion der *RBOH* Transkription, die für die Generierung der ROS verantwortlich ist, in den ersten Stunden der NF Signalübermittlung fest im Infektionsschema der RL - Interaktion verankert ist, wie es von [Lohar et al. \(2007\)](#) postuliert wurde.

Zu späteren Zeitpunkten der Applikationen (> 12 Stunden) wurde dann eine Arretierung der *S. meliloti* Infektion sowie der NF Signalübermittlung in den deformierten Wurzelhaaren von MtROP9i beobachtet: In den stark angeschwollenen Wurzelhaaren kam es weder zum symptomatischen Einrollen der Wurzelhaare, noch zu einer Reinitiierung des polaren Wurzelhaarwachstums, der Verzweigung der Wurzelhaare oder der Ausprägung eines Infektionsschlauches bei *S. meliloti* infizierten MtROP9i Wurzeln. Entscheidender molekularer Impuls für die Ausprägung der genannten weiteren Infektionsereignisse ist dabei den Studien von [Lohar et al. \(2007\)](#) zufolge eine wiedereinsetzende *RBOH* Expression und somit die Generierung neuer ROS. Wird die ROS Synthese auf chemischem Wege inhibiert, erfolgt ebenso eine Arretierung der NF Signalgebung ([Lohar et al. 2007](#)). Die Situation einer permanenten Nichtverfügbarkeit von ROS aufgrund einer nahezu gänzlichen Desaktivierung der *RBOH* Expression in den MtROP9i Wurzeln scheint somit für die Inhibierung der frühen RL Interaktion hauptverantwortlich zu sein ([Teil B1](#)). Die postulierten molekularen Ereignisse sind in einem Modell in [Abbildung 2](#) zusammengefasst.

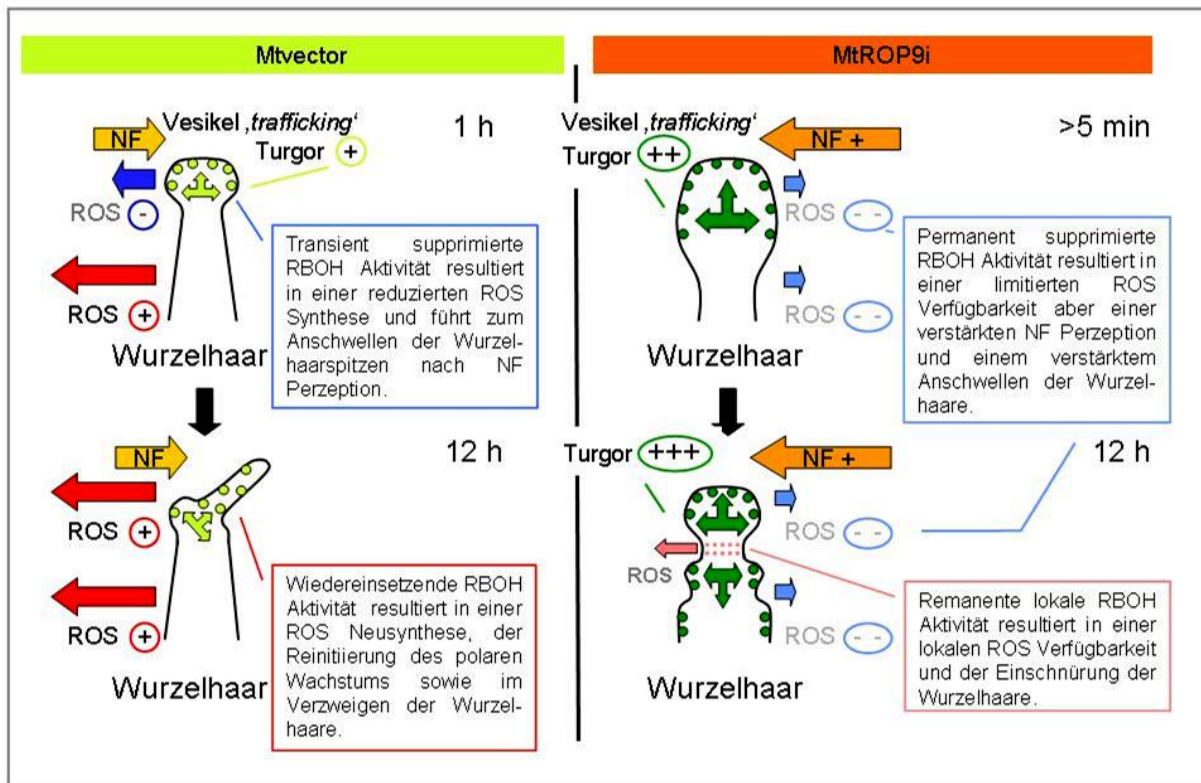


Abbildung 2: Modell für eine frühe NF Signalisierung in Wurzelhaaren von Mtvector und MtROP9i nach 1 und 12 Stunden der Applikation. Induzierte Effekte sind mittels kräftigeren Farben, längeren Pfeilen und durch [(+) – (+++)] – Zeichen gekennzeichnet. Supprimierte Effekte sind mittels blasserer Farben, kürzeren Pfeilen und durch [(-) – (---)] – Zeichen gekennzeichnet.

Einen genau gegenteiligen Effekt zeigte der Einfluss einer gezielten Suppression von ROS auf den Infektionsverlauf einer pilzlichen bzw. pilz-ähnlichen Infektion:

- (i) Die Mykorrhizierungsfrequenz der Wurzeln war 5 Tage nach der Infektion nahezu um die Hälfte erhöht in MtROP9i im Vergleich zu der Vektorkontrolle. Die Werte glichen sich jedoch mit fortschreitendem Infektionsverlauf zwischen beiden Populationen an. Das bedeutet, dass vor allem eine Primärinfektion durch die ROS Suppression erleichtert wird und folglich progressiver erfolgt.
- (ii) Die Mykorrhizierungsintensität in infizierten Wurzeln blieb dagegen über den gesamten Untersuchungszeitraum in MtROP9i signifikant erhöht. Das bedeutet, dass eine Ausbreitung im Wurzelkortex bei erfolgter Primärinfektion durch die ROS Suppression erleichtert wird und folglich progressiver erfolgt.
- (iii) Die Intensität einer *A. euteiches* Infektion war während der ersten fünf Infektionstage in MtROP9i Wurzeln signifikant erhöht. Danach steigt sie aber deutlich in der Vektorkontrolle an, so dass sich die Werte für beide Populationen 7 Tage nach der Infektion angleichen. Das

bedeutet, dass eine Primärbesiedelung durch die ROS Suppression erleichtert wird und folglich progressiver erfolgt. Da eine flächendeckende *A. euteiches* Kolonisierung des Wurzelkortex aber zumeist interzellulär erreicht wird, werden vergleichbare Infektionsintensitäten in beiden Populationen nach einer beschleunigten Primärinfektion in MtROP9i nach etwa einer Woche erreicht.

4.2 Molekulare Aspekte früher Infektionsereignisse

Molekulare Antworten von M. truncatula auf symbiontische und pathogene Infektionen zu frühen Zeitpunkten

Die symbiontischen Interaktionen zwischen *M. truncatula* und *G. intraradices* sowie zwischen *M. truncatula* und *S. meliloti*, wie auch die pathogene Interaktion der Leguminose mit *A. euteiches*, wurden zu frühen Infektionszeitpunkten sechs und 24 Stunden nach der Infektion proteomisch untersucht (Teil B6). Für diese Studien wurde erneut die Methodik der differentiellen Gelelektrophorese (DIGE) angewandt, die aufgrund der Sensitivität der differentiellen Fluoreszenzmarkierungen sowie durch die Vereinigung der Gelelektrophoreseläufe in einer elektrophoretischen Separierung die Erkennung sehr feiner Unterschiede in den Induktionsprofilen erlaubt, wie sie zu sehr kurzen Induktionszeiten nach den Infektionen vorliegen. Die Methodik und deren Durchführung unter Verwendung pflanzlicher Proteinproben sind im Detail in Teil B3 erläutert. Zum anderen erlaubte die DIGE – Technologie einen direkten Vergleich der Proteinprofile zwischen den drei Infektionsarten zu den zwei gewählten Zeitpunkten, sodass es möglich war, das „*M. truncatula* – Mikroorganismen – Interaktom“ zu bestimmen, also all diejenigen Proteinmuster zu identifizieren, die nach Infektionen mit bedeutenden symbiontischen und pathogenen Mikroorganismen des Bodens in der Modell-Leguminose induziert werden. Die Studien wurden zudem um den Aspekt erweitert, dass nicht nur der Einfluss der Einzelinfektionen auf das *M. truncatula* Wurzelproteom untersucht wurde, sondern auch kombinierte Infektionen von symbiontischer Primärinfektion und pathogener Sekundärinfektion (*G. intraradices* + *A. euteiches* bzw. *S. meliloti* + *A. euteiches*).

Die Analyse der Einzelinfektionen erlaubte die Identifizierung von Proteininduktionsmustern, die spezifisch für symbiontische sowie pathogene Infektionen in *M. truncatula* sind:

1. Proteininduktionsprofile nach symbiontischer Infektion:

- (i) Induktion von Faktoren, die in der frühen symbiontischen Signalgebung involviert sind (reguliert durch die sogenannten ‚*sym genes*‘; Oldroyd et al. 2006; Markmann und Parniske 2009); zum Beispiel: ‚*calmodulin-2 (CaM)*‘, ‚*Ran-binding protein (RANBP)*‘.
- (ii) Induktion von Proteinen der Auxin Signalgebung; zum Beispiel: ‚*auxin-induced protein*‘, ‚*ankyrin-repeat protein*‘.
- (iii) Induktion von Proteinen mit regulatorischen Funktionen des Energiehaushalts sowie mit Funktionen bei einem aktiven Transport über Membranbarrieren; zum Beispiel: ‚*ATP synthase*‘, ‚*triosephosphate isomerase*‘, ‚*nucleoside diphosphate kinase*‘.
- (iv) Induktion von Faktoren mit Funktionen in der Stickstofffixierung innerhalb der LR Symbiose (‚*acid phosphatase*‘).

2. Proteininduktionsprofile nach pathogener *A. euteiches* Infektion:

- (i) Induktion von *Pathogenesis-related (PR)* –Proteinen der Klassen PR-10, PR-5b (‚*Thaumatin-like proteins*‘) (siehe Punkt 4.3)
- (ii) Induktion von Enzymen der ABA-Biosynthese (‚*ABA-responsive proteins*‘)
- (iii) Induktion von ‚*proteinase inhibitors*‘ (‚*Kunitz-type proteinase inhibitors*‘, ‚*trypsin protein inhibitor*‘).
- (iv) Induktion weiterer Proteine mit Funktionen in der Zellabwehr: ‚*class I chitinase*‘, ‚*(glutathione) peroxidases*‘, ‚*flavanoid (UDP) glycosyltransferases*‘, ‚*galactose-binding lectin*‘.

Die Analyse der Mischinfektionen erlaubte die Identifizierung von Proteininduktionsmustern, die sowohl während symbiontischer als auch pathogener Infektionen in *M. truncatula* sind:

- (i) Induktion einer Vielzahl von Faktoren mit antioxidativer Wirkung (siehe auch Punkt 4.1): ‚*cysteine synthase*‘, ‚*glutathione-S-transferase*‘, ‚*superoxide dismutase*‘, ‚*(cationic/ascorbate) peroxidases*‘, u. a. Des Weiteren Faktoren einer mitochondrialen *HR* Antwort: ‚*cytochrome c oxidase subunit*‘, ‚*mitoch. processing peptidase*‘ der ‚*cyt c reductase*‘, ‚*aldehyde dehydrogenase*‘ (siehe auch Teil B7).
- (ii) Induktion von Enzymen des Energie- und Kohlenstoffmetabolismus: ‚*ribulose biphosphate carboxylase*‘, ‚*fructose biphosphate aldolase*‘, ‚*malate dehydrogenase*‘, ‚*formate dehydrogenase*‘, ‚*fumarate hydratase*‘, u. a.

Die Induktion mitochondrialer Proteine, vor allem von Enzymen des Zitratzyklus, war auffällig und wurde fortwährend in den Folgestudien bestätigt. Diese Ergebnisse veranlassten zu einer detaillierten Charakterisierung des mitochondrialen Proteoms der Modell-Leguminose (Teil B4). Diese Untersuchungen identifizierten auch eine starke Ausprägung des Komplexes II der mitochondrialen Atmungskette, der vornehmlich von Redoxäquivalenten aus dem Zitratzyklus gespeist wird.

- (iii) Induktion von Proteinen des phenylpropanoiden Sekundärstoffwechsels zur Synthese des Phytoalexins Medicago mit antimikrobieller Wirkung: ‚Chalcone O-methyl transferase (cOMT)‘, ‚Isoflavone reductase (IFR)‘, ‚IFR-like NAD(P)H-dependant oxidoreductase‘, ‚chalcone reductase‘, ‚chalcone-flavone isomerase I‘.

Molekulare Antworten von M. truncatula Zellsuspensionskulturen auf Inokulierung mit A. euteiches Zoosporen sowie Elizitierung mit A. euteiches Kulturmedium

Molekulare Aspekte einer pathogenen Infektion von *A. euteiches* wurden auch anhand von *M. truncatula* Zellsuspensionskulturen untersucht, die aus Wurzelzellen generiert wurden (Teil B7). Dabei wurde der Umstand genutzt, dass *A. euteiches* eine Primärinfektion über begeißelte mobile Zoosporen realisiert, die mit den Wurzelzellen assoziieren und dann in Form von Infektionshyphen auswachsen (Colditz 2005). Mikroskopische Studien zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulierung der Zellkulturen belegten in der Tat die Ausprägung eines für eine Infektion ähnlichen Phänotyps, wie er für einen typischen Infektionsverlauf *in planta* bekannt ist: Das Enzystieren der Zoosporen und das Auskeimen der Infektionshyphen in enger Assoziation mit den Pflanzenzellen, eine induzierte HR Reaktion über die Ausprägung eines ‚oxidative bursts‘, einem signifikanten Zellsterben, und letztlich die Ausbildung eines Hyphen – Netzwerks, welches zu Zellaggregaten vereinte Pflanzenzellen umspannte. Die Etablierung dieses Inokulierungsverfahrens erlaubte molekulare Untersuchungen unter sehr definierten einheitlichen Bedingungen sowie einen Vergleich der molekularen Reaktionen bei Inokulierung mit den Infektionsträgern zu einer chemischen Elizitierung mittels *A. euteiches* Kulturmedium, das nach Filtration keine lebenden Bestandteile des Oomyzeten mehr beinhaltete. Dazu wurden proteomische Untersuchungen sowie Untersuchungen des Phosphoproteoms durchgeführt.

Die Untersuchungen ließen wiederum eine Einteilung in frühe und fortgeschrittene molekulare Antworten auf die Inokulierungen zu. Generell konnte im Vergleich zu den mit

Kulturüberstand elizitierten Kulturen eine deutlich gesteigerte Anzahl an Proteinen über den gesamten Untersuchungszeitraum in den mit *A. euteiches* Zoosporen inokulierten Kulturen aufgefunden werden. Zudem zeigte sich, dass die Proteininduktion nach Elizitierung auf frühe Zeitpunkte begrenzt war, während zu späteren Zeitpunkten eine Proteomantwort der Zellen ausblieb.

Proteininduktionsmuster zu frühen Zeitpunkten (sechs Stunden bis 24 Stunden) der Inokulierung mit Zoosporen sowie der Elizitierung:

- (i) Induktion einer Vielzahl von Faktoren mit antioxidativer Wirkung: ‚*glutathione-S-transferases*‘, ‚*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*‘, ‚*superoxide dismutase*‘, ‚*(cationic/ascorbate) peroxidases*‘, ‚*Cat2 catalase*‘.

Während ausschließlich Proteine aus dieser Funktionsklasse in den elizitierten Zellen identifiziert wurden, konnte eine zusätzliche Proteininduktion anderer Funktionsklassen bereits zu frühen Zeitpunkten in den mit den Zoosporen inokulierten Zellen aufgefunden werden. Da sie zu späteren Inokulierungszeitpunkten ihre Induktionsmaxima erreichen, werden sie entsprechend dort eingeordnet.

Proteininduktionsmuster zu späteren Zeitpunkten (zwei bis vier Tage) der Inokulierung mit Zoosporen:

- (i) Induktion von *Pathogenesis-related (PR)* –Proteinen der Klassen PR-10, PR-5b (*Thaumatococcus-like proteins*), ‚*PR homeodomain proteins (PRHP)*‘, ‚*class I chitinases*‘.

Die PR Proteine wurden bereits schon sechs Stunden nach Inokulierung mit den Zoosporen aufgefunden, jedoch noch in deutlich geringerer Abundanz. Auffällig war ihre Nichtinduzierung nach einer Elizitierung mit dem Kulturmedium.

- (ii) Induktion von Enzymen des Energie- und Kohlenstoffmetabolismus: ‚*ribulose bisphosphate carboxylase*‘, ‚*fructose bisphosphate aldolase*‘, ‚*malate dehydrogenase*‘, ‚*formate dehydrogenase*‘, ‚*fumarate hydratase*‘, u. a.
- (iii) Induktion von Proteinen des phenylpropanoiden Sekundärstoffwechsels zur Synthese des Phytoalexins Medicarpin mit antimikrobieller Wirkung: ‚*Chalcone synthase 4 (Naringenin CHS)*‘, ‚*Isoflavone reductase (IFR)*‘, ‚*chalcone-flavone isomerase I*‘.

Ein nahezu exaktes Abbild dieser induzierten Proteinfunktionsklassen zeigten die Untersuchungen phosphorylierter Proteine bereits 90 Minuten nach Inokulierung. Neben der Phosphorylierung von Proteinen des antioxidativen Netzwerks, das in beiden Ansätzen gefunden wurde, zeigten die Analysen eine spezifische Phosphorylierung von PR-Proteinen, Proteinen des primären Energiestoffwechsels sowie des sekundären phenylpropanoiden Stoffwechsels in den Proben der mit *A. euteiches* Zoosporen inokulierten Kulturen.

4.3 Molekulare Aspekte fortgeschrittener Infektion

Molekulare Antworten von M. truncatula auf pathogene Infektion

Die pathogene Interaktion zwischen *M. truncatula* und *A. euteiches* wurde zu dem Zeitpunkt maximaler Wurzelinfektion 14 Tage nach Inokulierung mit dem Wurzelpathogen untersucht (Teil B, 8 und 10). Grundlage für diese Studien war zum einen Untersuchungsergebnisse über Veränderungen im Transkriptom infolge der Infektion (Teil C2) sowie über Veränderungen in den Proteininduktionsprofilen (Teil C1).

Es wurden folgende Induktionsprofile in *A. euteiches* - infiziertem Wurzelgewebe im Vergleich zu nichtinfiziertem Gewebe aufgefunden:

- (i) Die Induktion struktureller Zellwandproteine (,Proline-rich proteins', ,Glycine-rich proteins', ,Polygalacturonases').
- (ii) Die Induktion von Pathogenesis-related (PR)'-Proteinen der Klassen PR-10, PR-5b (,Thaumatococcus-like proteins'), PR-1 und PR-4A (Reihenfolge entsprechend ihrer Abundanz, beginnend mit den am stärksten abundanten Transkripten (,singletons') / Genprodukten).
- (iii) Die Induktion von Enzymen des phenylpropanoiden Stoffwechselweges zur Synthese des Phytoalexins Medicago (,cOMT', ,IFR').

Die aufgefundenen Induktionsprofile sind charakteristisch für die molekulare Antwort von *M. truncatula* auf eine fortgeschrittene *A. euteiches* Infektion und wurden stets in den folgenden Studien (Teil B, 6, 7, 8 und 10) wiedergefunden. Sie charakterisieren die Qualität der molekularen Antwort: Die Induktion von Zellwandproteinen könnte Folge einer massiven Neustrukturierung der Zellwände aufgrund einer großflächigen zellulären *A. euteiches* Infektion sowie aufgrund der Ausprägung von Haustorien und den generativ gebildeten Dauersporen, den Oosporen, sein. Beide Stadien treten bei fortgeschrittener Infektion in

großer Anzahl im Wurzelkortex auf (Teil B10). Die starke Induktion von PR – Proteinen charakterisiert eine systemische Abwehrantwort im infizierten Wurzelgewebe (Teil B10), die zum einen durch HR - Reaktionen der frühen molekularen Abwehr in den infizierten Zellen induziert wurde, andererseits auf ein angestiegenes Konzentrationsniveau an stressinduzierten Phytohormonen (vor allem von Abszissinsäure (ABA), Jasmonat (JA), Salzylsäure (SA) zurückzuführen ist (Teil B10). Die unter den PR - Proteinen vorherrschende Gruppe der ‚PR10-like proteins‘, die in Folge der Infektionen mit *A. euteiches* spezifisch und mit hoher Abundanz induziert im *M. truncatula* Wurzelgewebe aufgefunden wurden, sind Gegenstand weiterer Studien (Teil B, 8 und 10), deren Ergebnisse im Folgenden im Detail erörtert werden (Punkt 4.3.1). Für eine systemische Abwehrreaktion spricht auch die Akkumulation an sekundären Pflanzenstoffen wie die des Phytoalexins Medicago mit antimikrobieller Wirkung, aus dessen Syntheseweg eine Vielzahl an Enzymen in den Studien aufgefunden werden konnte.

4.4 Die Rolle von ‚PR10-l – like proteins‘ in der Pflanzenabwehr von *M. truncatula*

Eine Gruppe von ‚PR10-l – like proteins‘ wurde in den ersten Transkriptom- und Proteomstudien als stark induziert in *A. euteiches* – infizierten *M. truncatula* Wurzeln identifiziert (Teil C, 1 und 2). Dieses Set an Proteinen, was in den 2-dimensionalen (2-D) Proteingelen sechs verschiedene Vertreter aufweist (ein ‚disease resistance response protein pi49‘; vier ‚ABA – responsive proteins (ABR17)‘ und einem ‚PR-10-1‘ Protein) mit einem Molekulargewicht von 16 bis 18 kDa bei pI 4,7 bis 5, konnte ab sechs Stunden nach *A. euteiches* Infektion induziert aufgefunden werden und zeigte maximale Induktion bei fortgeschrittener Infektion zwischen 7 und 14 Tagen nach Inokulierung (Teil C1). PR-10 Proteine gehören zu einer Gruppe zytosolischer Abwehrproteine, die in mehr als 70 mono- und dikotyledoner Pflanzen aufgefunden wurden und die strukturelle Gemeinsamkeiten vor allem zu Pollenallergenen (Betv1 aus der Birke), aber auch zu Ribonukleasen aus Ginseng aufzeigen, weswegen sie als ‚ribonuclease-like PR proteins‘ bezeichnet werden (Moiseyev et al. 1994; Wen et al. 1997; Park et al. 2004; Van Loon et al. 2006). Im Widerspruch dazu stehen Kristallstrukturanalysen von PR-10 Proteinen, die die Ausprägung einer Bindepore für Cytokinine, Brassinosteroide (BR) und vermutlich auch ABA offenbarten, sodass davon ausgegangen wird, dass sie vielmehr als Signalmoleküle diverser zellulärer Stressantworten fungieren (Markovic-Housley et al. 2003; Imin et al. 2004). Letzteres wird durch die hier vorgestellten fortführenden Studien belegt.

Die sechs pathogen - induzierten Vertreter der PR10-Gruppe in den *M. truncatula* Wurzelproteomen zeigen eine hohe Sequenzhomologie zwischen 46 and 91 % auf Aminosäureebene auf (Teil C1). Es sind lösliche, saure Proteine von 155 bis 160 Aminosäuren Länge, die alle ein konserviertes Sequenzmotiv (GXGGXG) besitzen, das von zwei Lysineinheiten (Positionen +13 und -19) flankiert wird, die als ein ‚phosphate – binding loop (P-loop)‘ fungieren. Vermutlich ist dieser ‚P-loop‘ eine Bindestelle für eine RNA Phosphatgruppe, was wiederum eine ribonukleolytische Funktion der PR10 – Proteine indiziert (Park et al. 2004).

Die Induktion der PR10 – Proteingruppe korreliert mit dem A. euteiches Infektionsniveau in infizierten M. truncatula Wurzelzellen

Um die Induktion dieser PR10 – Proteingruppe in unterschiedlichen *A. euteiches* Infektionsstufen zu untersuchen, wurden die Induktionsmuster bei Infektion dreier *M. truncatula* Linien, die unterschiedliche Toleranzniveaus gegenüber einer *A. euteiches* Infektion aufzeigen, auf Proteomebene analysiert (Teil B10): (i) die für molekulargenetische Studien allgemein etablierte *M. truncatula* A17 Jemalong Wildtypelinie, die Gegenstand der beiden ersten Studien (Teil C, 1 und 2) sowie des Genomsequenzierungsprojektes (Young et al. 2011) war. Sie zeigte im Vergleich zu den anderen beiden Linien ein intermediäres Infektionsniveau auf (etwa 60 % Infektionsintensität, 14 Tage nach Infektion) (Teil B10). (ii) die F83.005-5 (R2002) Linie der französischen *M. truncatula* ‚CORE collection‘ des Pflanzengenetikern Jean-Marie Prospéri (Laboratoire de Ressources Génétiques et d’Amélioration des Luzernes méditerranéennes, INRA-SGAP Mauguio, Montpellier, Frankreich). Diese Linie ist für eine *A. euteiches* Infektion hoch suszeptibel (über 80 % Infektionsintensität, 14 Tage nach Infektion). (iii) die F83.005-9 (R2002) Linie, ebenfalls aus der ‚CORE collection‘, die sich als partiell resistent gegenüber einer *A. euteiches* Infektion erwies, mit deutlich niedrigeren Infektionsraten (unter 40 % Infektionsintensität, 14 Tage nach Infektion). Die Proteomanalysen zeigten, dass die Induktionsstärke der PR10 – Proteingruppe mit ansteigender Infektionsintensität der Wurzeln ebenso zunimmt und somit positiv mit dem Infektionsniveau korreliert ist. Die PR10 – Proteingruppe hat somit Proteinmarkercharakter auf zellulärer Ebene für den *A. euteiches* Infektionsstatus *in planta*. Diese Eigenschaft zeigt lediglich eine spezifische Beteiligung dieser PR – Proteine an der molekularen Antwort von *M. truncatula* gegenüber einer *A. euteiches* Infektion auf, jedoch lässt sie noch keinerlei Rückschlüsse auf die genaue Funktion dieser Proteingruppe im

Rahmen der molekularen Antwort zu. Aus diesem Grund wurden weitere molekulare Analysen initiiert (Teil B8).

„Bioprotektiver“ Effekt gegenüber pathogener Infektion nach Vorinfektion mit einem Symbionten

Ein zweiter Aspekt wurde im Rahmen dieser Studie untersucht: Der Einfluss einer Vorinfektion mit einem Wurzelmikrosymbionten, dem AM Pilz *Glomus intraradices*, auf das Infektionsniveau der pathogenen *A. euteiches* Infektion (Teil B10). Hintergrund ist eine mehrfach beschriebene Toleranzerhöhung für die pathogene Infektion bei symbiontischer Vorinfektion, ein Phänomen, was als *„bioprotektiver“* Effekt in der Literatur beschrieben ist. Demnach resultiert diese Bioprotektion in einer vorzeitigen Aktivierung oder Stimulation von molekularen Pflanzenabwehrmechanismen wie die Synthese sekundärer Pflanzenstoffe mit antimikrobieller Wirkung vor der eigentlichen pathogenen Infektion, neben der Induktion einer sogenannten physikalischen Resistenzkapazität durch eine von dem Mikrosymbionten verursachte verbesserte Nährstoffsituation der Wirtspflanze beziehungsweise die Besetzung von Infektionsstellen an der Pflanzenwurzel, die dann dem Pathogen nicht mehr zugänglich sind (Slezack et al. 1999; Larsen und Bødker 2001).

Tatsächlich führte eine Vorinfektion von *M. truncatula* Wurzeln mit *G. intraradices* zu einem verminderten Infektionsniveau einer nachherigen *A. euteiches* Infektion um etwa 20% (Teil B10, Abbildung 1). Interessanterweise entspricht diese Infektionsreduktion etwa der Reduktion im Infektionsniveau zwischen dem *M. truncatula* A17 Wildtyp und der resistenteren F83.005-9 Linie. Betrachtet man die Profile von Proteinen, die bei Infektion induziert werden, so lässt sich Folgendes feststellen (Teil B10, Abbildung 3):

- (i) Die PR10 – Proteingruppe wird durch die Mykorrhizierung in ihrer Abundanz im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle erhöht. Dieses bedeutet, dass in der Tat spezifische Komponenten der Pflanzenabwehr durch die symbiontische Vorinfektion in moderatem Umfang bereits induziert werden.

Ein zweiter Sachverhalt bestätigt diese These: Bei nachfolgender *A. euteiches* Infektion steigen die Induktionswerte der PR10 – Proteine weiter an, jedoch sie verbleiben signifikant unterhalb der Induktionswerte einer alleinigen *A. euteiches* Infektion, was mit dem verminderten *A. euteiches* Infektionsniveau nach Vorinfektion mit *G. intraradices* korreliert.

Weitere Veränderungen in den Induktionsprofilen anderer Proteingruppen:

- (ii) Enzyme der Phytoalexinsynthese (*cOMT*, *IFR1*, *CHR*) werden stärker induziert nach Mykorrhizierung als nach einer *A. euteiches* Infektion sowie im Rahmen einer gemischten symbiontischen und pathogenen Infektion. Dagegen sind ihre Induktionsprofile in *A. euteiches* infizierten Wurzeln der suszeptiblen *F83.005-5* Linie gegenüber der resistenteren *F83.005-9* Linie erhöht.
- (iii) Untereinheiten der 26S Proteasome, die nach *A. euteiches* Infektion in der resistenteren *F83.005-9* Linie deutlich induziert vorliegen jedoch in der suszeptibleren *F83.005-5* nicht, werden durch Vormykorrhizierung nicht signifikant in ihrer Abundanz erhöht. Folglich scheint diese Proteingruppe nahezu ausschließlich bei pathogener Infektion induziert zu werden und dort eine Toleranzerhöhung zu vermitteln. Das wird durch spätere Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, die in *M. truncatula* Linien mit ausgeprägter partieller Resistenz gegenüber *A. euteiches* einen ‚*Quantitative Trait Locus (QTL)*‘ für Gene der 26S Proteasome identifizieren konnten, der in suszeptibleren Linien fehlt (Djéballi et al. 2009)

RNAi – vermitteltes ‚gene silencing‘ der PR10 – Proteingruppe resultiert in einer antagonistischen Induktion anderer PR – Proteine und in einem verminderten A. euteiches Infektionsniveau in infizierten transgenen M. truncatula Wurzeln

Um die Funktion der PR10 – Proteine in detaillierter Form zu untersuchen, wurde ein RNAi - vermitteltes ‚gene silencing‘ der PR10 – Proteingruppe über Integration eines *silencing* – Vektors mittels *Agrobacterium rhizogenes* Transformation durchgeführt (Teil B8). Dieser Ansatz führte zur Generierung transgener *M. truncatula* ‚*hairy roots*‘ – Kulturen, die eine PR10 – Konsensussequenz der proteinkodierenden Nukleotidsequenzen der sechs pathogen-induzierten Vertreter in ‚*sense*‘ und ‚*antisense*‘ Richtung exprimierten. Die Fragestellung zu diesem Versuchsansatz war wie folgt: Wenn die ‚*PR10-l like proteins*‘ Markercharakter für eine *A. euteiches* Infektion in *M. truncatula* haben, wie verändert sich dann *vice versa* der *A. euteiches* Infektionsstatus bei einer generell verminderten Verfügbarkeit dieser Proteine in den infizierten Wurzelzellen?

Die Transformation der *M. truncatula* Keimlinge führte zu neun stabil wachsenden ‚*hairy roots*‘ Populationen, wovon in dreien die Integration des PR-10 ‚*silencing*‘ – Konstrukts in das Pflanzengenom nachgewiesen wurde. Für diese Populationen wurde die Induktion der

PR10 – Proteingruppe nach *A. euteiches* Infektion proteomisch untersucht: Zwei der Populationen zeigten einen effektiven Knockdown der kompletten PR10 – Proteingruppe von 88 % bzw. 92 % Reduktionen in der Abundanz bezogen auf die relative PR10 Spotintensität in den Populationen der Vektorkontrolle (Teil B8, Abbildung 1, Tabelle 1). In einer Population dagegen konnte nur eine Reduktion von 50 % ermittelt werden. Die Evaluierung des *A. euteiches* Infektionsniveaus resultierte in einem erstaunlichen Ergebnis: Die zwei Populationen mit dem effektiven PR10 – Knockdown zeigten nur noch klar abgegrenzte punktuelle *A. euteiches* Infektionen, die sich über gut 20 % des Wurzelgewebes erstreckten, während in der Population, wo die PR10- Proteingruppe nach pathogener Infektion noch teilweise ausgeprägt wird, Infektionen zeigte, die sich über weite Bereiche des Wurzelgewebes erstreckten und nicht auf einige Infektionspunkte begrenzt waren.

Weiterführende Proteomanalysen zeigten eine antagonistische Induktion anderer PR – Proteinklassen nach *A. euteiches* Infektion in den Populationen, die einen effektiven PR10 – Knockdown aufwiesen, insbesondere die von zwei hochabundanten Proteinspots eines ‚*thaumatin-like PR5b – proteins*‘ neben der Induktion einer ‚*chitinase*‘. Dass die Induktion der PR5b - Proteine ursächlich für eine Toleranzerhöhung gegenüber einer *A. euteiches* Infektion sein könnten, wurde durch zusätzliche Proteomstudien an den beiden *M. truncatula* F83.005-5 und F83.005-9 Linien belegt: In den Wurzelproteomen der resistenteren F83.005-9 Linie lagen sie nach *A. euteiches* Infektion deutlich induziert vor, dagegen war die Gruppe der PR10 – Proteine in ihrer Abundanz kaum vermehrt im Vergleich zu der nichtinfizierten Kontrolle. Konträre Proteinprofile zeigten die Gele der suszeptiblen F83.005-5 Linie: Keine Induktion der PR5b – Proteine aber eine signifikante Abundanzerhöhung bei der PR10 – Proteingruppe. Hierbei interessant ist der Aspekt, dass für die ‚*thaumatin-like PR5b – proteins*‘ aufgrund ihrer ‚ β -1,3-Glucanase‘ – Aktivität eine direkt antioomyzotische Wirkung nachgewiesen wurde (Abad et al. 1996; Fagoago et al. 2001; Hanselle et al. 2001; van Loon et al. 2006). Entsprechend der Tatsache, dass die Zellwände der Oomyzeten nahezu ausschließlich aus β -1,3-Glukanpolymeren und Zellulose bei geringfügigen Chitinanteilen aufgebaut sind (Kamoun 2003), wird eine sehr effektive molekulare Pflanzenabwehr in Form der Lysis der Zellwände der Infektionshyphen des Oomyzeten ausgeprägt, was in der deutlich erhöhten Toleranz gegenüber einer *A. euteiches* Infektion resultiert (Teil B8).

Auf der anderen Seite ist es offensichtlich eine ebenso effektive Infektionsstrategie phytopathogener Oomyzeten, die infizierten Pflanzenzellen zu der Synthese letztlich ineffektiver Chitinasen zu verleiten, was vermutlich durch die rudimentär vorhandenen Chitinpolymere und deren Potential, als Elizitoren zu fungieren, induziert wird. Die

Eigenschaft, die molekulare pflanzliche Abwehr systematisch zu umgehen, ist ein für phytophagene Oomyzeten bekanntes Phänomen (van West et al. 2003). Folglich zeigen transgene *M. truncatula* Wurzeln, bei denen ein Knockdown der PR5b – Proteine durchgeführt wurde, eine deutlich gesteigerte Suszeptibilität gegenüber einer *A. euteiches* Infektion, insbesondere im Rahmen einer progressiveren Primärinfektion der transgenen Wurzeln im Vergleich zur Vektorkontrolle (unveröffentlichte Daten). Dieser Aspekt verdeutlicht die Bedeutung von initialen Abwehrfaktoren im Apoplasten, die die apoplastischen Effektormoleküle der primär interzellulären Kolonialisierung durch das Pathogen zu binden und zu neutralisieren vermögen. Im Gegensatz zu den PR10 – Proteinen, die ausschließlich im Zytosol der Pflanzenzellen vorkommen und somit nur zytoplasmatische Effektormoleküle einer fortgeschrittenen intrazellulären Infektion binden können, besitzen PR5b – Proteine ein Signalpeptid und können somit sekretiert werden (Teil B8; Kusumawati et al. 2008). Somit stellt die Ausprägung der PR5b – Proteine im engeren Sinne eine frühe molekulare Pflanzenabwehr dar, woraus auch dessen Effektivität resultiert.

Welche Erkenntnisse lassen sich nun für die Rolle der PR10 – Proteine innerhalb der molekularen Antwort von *M. truncatula* ableiten? Aufgrund ihrer streng zytoplasmatischen Ausprägung repräsentieren sie Proteine einer späteren Abwehrreaktion, die erst bei einer intrazellulären Infektion einsetzt. Dieser Aspekt erklärt auch die deutlich reduzierten Infektionsraten bei einer antagonistischen Induktion der PR5b – Proteine: Die Wurzeln vermögen sowohl einer Primärinfektion als auch einer flächendeckenden *A. euteiches* Infektion, die aber die Folge eines progressiven interzellulären Hyphenwachstums ist, effektiv entgegenzuwirken. Dennoch zeigen die molekularen Analysen früher Infektionszeitpunkte, dass PR10 – Proteine bereits frühzeitig nach pathogener Infektion induziert werden (Teil B, 6 und 7). Diese Tatsache deutet auf eine Rolle der PR10 – Proteine bei der Pflanzenabwehr innerhalb stressinduzierter Signaltransduktionswege hin, vermutlich als Folge erhöhter endogener Konzentrationen an Phytohormonen. Die proteomischen Studien konnten aufzeigen, dass die Gruppe der PR10 – Proteine, vor allem die ‚*ABA – responsive proteins (ABR17)*‘, zumindest teilweise durch exogene Applikation dieses Phytohormons induzierbar ist (Teil C1). Kristallstrukturanalysen von PR-10 Proteinen, die die Ausprägung einer Bindepore für einige Phytohormone offenbarten, bestätigen diese These (Markovic-Housley et al. 2003). Markovic-Housley et al. (2003) postulieren für die PR10 – Proteine eine essentielle Funktion bei der Bereitstellung von Signalmolekülen sowie deren Weiterleitung an die korrespondierenden Rezeptoren im Rahmen einer schnellen Antwort auf externe Stresseinwirkung. Dass die Induktion dieser Proteine wohl balanciert und der Infektionsstärke

angepasst ist, belegen auch die Studien zur Bioprotektion über eine Vorinfektion mit symbiontischen Mykorrhizapilzen (Teil B10): Die symbiontische Infektion führt zu einer moderaten Induktion der PR10 – Proteine, die durch eine pathogene Sekundärinfektion noch verstärkt wird, aber nicht das Induktionsniveau einer alleinigen pathogenen Infektion erreicht.

Die PR10 – Proteine entsprechen somit in gewisser Weise pflanzenspezifischen „Entzündungsfaktoren“ in Analogie zu solchen die im Rahmen einer tierischen Immunantwort ausgeprägt werden.

5 Zusammenfassung

Für Leguminosen (*Fabaceae*, *Leguminosae*) einzigartig ist die Eigenschaft, eine Symbiose mit stickstofffixierenden Bodenbakterien der Gattung *Rhizobiales*, die sogenannte Rhizobien - Leguminosen (RL) – Symbiose, auszuprägen. Diese Lebensgemeinschaft, bei der die Wirtsleguminose die Bakterien für den Prozess der Stickstofffixierung in speziell gebildeten Organen, den Wurzelknöllchen, beherbergt, führt dazu dass die Pflanze weitgehend unabhängig von anderen Stickstoffquellen wird. Neben dieser agrarwirtschaftlich bedeutenden Symbiose prägen Leguminosen zudem eine symbiontische Lebensgemeinschaft zu Arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM) der Abteilung *Glomeromycota* in der Rhizosphäre aus. Über die charakteristischen Arbuskeln, die in infizierten Zellen des inneren Wurzelkortex ausgeprägt werden, erfolgt ein Nährstoffaustausch von vor allem Phosphor und Stickstoff zugunsten der Pflanze, und von Hexosen zugunsten des Endosymbionten. Dagegen gehen Leguminosen auch pathogene Interaktionen mit Mikroorganismen der Rhizosphäre ein, die in ihrer Ausprägung zum Teil für sie spezifisch sind. Eine solche Interaktion ist die von Leguminosen zu dem pathogenen Oomyzeten *Aphanomyces euteiches*, der eine destruktive Wurzelfäulniserkrankung verursacht.

Die Interaktionen dieser drei Mikroorganismen wurden in der Modell-Legumose *Medicago truncatula* auf molekularer Ebene vergleichend untersucht. Aufgrund eines vergleichsweise kleinen, sequenzierten Genoms sowie etablierter molekularbiologischer Untersuchungsmethoden ist diese diploide Leguminose als Modellpflanze etabliert. Im Fokus der Studien standen molekulare Reaktionen von *M. truncatula* (i) auf eine Primärinfektion, (ii) zu frühen Infektionszeitpunkten, und (iii) bei fortgeschrittener Infektion:

(i) Die molekularen Analysen primärer Infektionsereignisse in *M. truncatula* zeigten die fundamentale Bedeutung der Ausprägung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als erste

Abwehrbarriere auf. Mittels eines RNAi – vermittelten ‚*gene silencing*‘ – Ansatzes wurde die ‚*Rac1*‘ GTPase *MtROP9*, die über die Aktivierung membranständiger NADPH Oxidase - Homolge (*RBOH*) die ROS Synthese reguliert, in transgenen *M. truncatula* Wurzelpopulationen in ihrer Expression supprimiert. Expressionsanalysen zu initialen Infektionszeitpunkten (3h nach Infektion) belegten eine Co-Expression beider Gene, was eine direkte funktionelle Assoziation impliziert. Der Gen – Knockdown resultierte in einer Inhibierung der frühen Rhizobiensymbiose, jedoch in einer progressiveren Primärinfektion mit dem Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* und dem Pathogen *A. euteiches* im Vergleich zur Vektorkontrolle. Die Ergebnisse verdeutlichen die Schlüsselrolle einer regulierten ROS Synthese bei sowohl symbiontischer wie pathogener Primärinfektion.

(ii) Vergleichende proteomische Untersuchungen aller drei Infektionsarten zu frühen Zeitpunkten (6h bis 24h nach Infektion) erlaubten die Etablierung einer Proteomkarte, die alle Proteininduktionsprofile der drei Infektionen aufzeigte. Durch die Anwendung differentieller Fluoreszenzmarkierungen (DIGE – Methodik) konnten symbiontische Induktionsprofile von pathogenen unterschieden werden: Spezifisch für eine pathogene Infektion war demnach die Induktion von ‚*pathogenesis – related (PR)*‘ – Proteinen und von anderen Abwehrproteinen, von Enzymen der ABA – Synthese, Proteinaseinhibitoren und strukturellen Zellwandproteinen. Bei symbiontischer Interaktion wurden frühe symbiontische Signalkomponenten, Enzyme der Auxinbiosynthese und Proteine des Energiestoffwechsels vermehrt gefunden. Sowohl bei symbiontischer als auch pathogener Interaktion werden Proteine mit antioxidativer Wirkung zur Detoxifizierung von ROS induziert (vermehrt bei pathogener Infektion), sowie von Enzymen zur Synthese von antimikrobiell wirkendende Phytoalexinen (vermehrt bei symbiontischer Infektion).

(iii) Molekulare Reaktionen von *M. truncatula* auf fortgeschrittene Infektionen (7 bis 14 Tage nach Infektion) wurden detailliert für eine Gruppe von Abwehrproteinen untersucht, den ‚*pathogenesis – related (PR)*‘ – Proteinen der Klasse 10 (PR-10), die spezifisch nach *A. euteiches* Infektion in den Wurzelproteinprofilen induziert aufgefunden wurden. Die Induktion dieser Proteine korrelierte mit dem *A. euteiches* Infektionsniveau, was anhand von drei *M. truncatula* Linien mit unterschiedlich ausgeprägter Infektion untersucht wurde. Folglich fiel auch bei einer reduzierten *A. euteiches* Infektion nach einer Vorinfektion mit dem Symbionten *G. intraradices* die Induktion der PR10 – Proteine schwächer aus. Die Vorinfektion mit dem Mykorrhizapilz hatte somit einen bioprotektiven Effekt. Mittels eines RNAi – vermittelten ‚*gene silencing*‘ – Ansatzes für die PR10 – Proteine konnte eine antagonistische Induktion anderer PR – Proteine, insbesondere vermehrt von PR5b -

Proteinen, identifiziert werden, was zu einer Toleranzerhöhung gegenüber einer *A. euteiches* Infektion führte.

Die vorliegende Arbeit umfasst zudem zwei Rezensionen zu aktuellen Proteomstudien in der Modell-Leguminose *M. truncatula*, eine Rezension zu pflanzenproteomischen Arbeiten bei Wurzelinfektionen mit pathogenen Pilzen sowie eine methodische Anleitung für die Differentielle Proteingelelektrophorese (DIGE) von pflanzlichen Proteinextrakten.

6. Literaturverzeichnis

- Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, et al.** (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 118: 11-23.
- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JA, et al.** (2005) The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J Euk Microbiol* 52: 399–451.
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, et al.** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 55: 504-513.
- Bourke A** (1991) Potato blight in Europe in 1845: the scientific controversy. In: Lucas J, Shattock RC, Shaw DS, Cooke LR (Ed) *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp. 12-24.
- Colditz F** (Feb. 2005) Functional genomic approaches to analyse the parasitic interaction between the model legume *Medicago truncatula* and the oomycete *Aphanomyces euteiches*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover, pp. 107.
- Cook DR** (1999) *Medicago truncatula* – a model in the making! Commentary. *Curr Opin Plant Biol* 2: 301-304.
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Dick MW, Vick MC, Gibbins JG, Hedderson TA, Lopez-Lastra CC** (1999) 18 S rDNA for species of *Leptolegnia* and other *Perenosporomyces*: justification for the subclass taxa *Saprolegniomycetidae* and *Peronosporomycetidae* and division of the *Saprolegniaceae* sensu lato into the *Leptolegniaceae* and *Saprolegniaceae*. *Mycol Res* 103: 1119–1125.
- Dixon RA, Lamb CJ** (1990) Molecular communication in plant-microbial pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 339-367.
- Djébali N, Jauneau A, Ameline-Torregrosa C, Chardon F, Jaulneau V, Mathé C, et al.** (2009) Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Mol Plant–Microbe Interact* 9: 1043–1055.
- Djordjevic MA, Gabriel DW, Rolfe BG** (1987) *Rhizobium* – the refined parasite of legumes. *Ann Rev Phytopathol* 25: 145-168.
- Doyle JJ** (2001) Leguminosae. In: Brenner S, Miller JH (Ed) *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 1081-1085.

- Ercolin F, Reinhardt D** (2011) Successful joint ventures of plants: arbuscular mycorrhiza and beyond. *Trends Plant Sci* 16: 356-362.
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, et al.** (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol Breed* 7: 175-185.
- Flor HH** (1946) Genetics of pathogenicity in *Melospora lini*. *J Agric Res* 73: 335-357.
- Gabriel DW** (1986) Specificity and gene function in plant-pathogen interactions. *Am Soc Microbiol News* 52: 19-25.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, et al.** (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668–672.
- Gaulin E, Jacquet C, Bottin A, Dumas B.** (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol Plant Pathol* 8: 539-548.
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG** (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17: 3489-3499.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P** (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20: 1407-1420.
- Gepts P, Beavis WD, Brummer C, Shoemaker RC, Stalker T, Weeden NF, Young ND** (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* 137: 1228-1235.
- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes. Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872-877.
- Grau CR** (1990) *Aphanomyces* Root Rot. In: Stuteville DL, Erwin DC (Ed), *Compendium of Alfalfa Diseases*, 2nd Edition. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 10-11.
- Grau CR, Muehlchen AM, Tofte JE, Smith RR** (1991) Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* 75: 1153-1156.
- Hagedorn DJ** (1989) *Aphanomyces* root rot. In: Hagedorn DJ (Ed), *Compendium of Pea Diseases*. American Phytopathology Society Press, St. Paul, MN, USA, pp. 25-28.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 575-607.

- Hanselle T, Ichinoseb Y, Barz W** (2001) Biochemical and molecular biological studies on infection (*Ascochyta rabiei*)-induced thaumatin-like proteins from chickpea plants (*Cicer arietinum L.*). *Z Naturforsch* 56: 1095-1107.
- Harrison MJ** (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 59: 19-42.
- Hegnauer R** (2001) Trifolieae. In: Hegnauer R (Ed), *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band XI B-2. Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz, pp. 782-915.
- Imin N, De Jong F, Mathesius U, van Noorden G, Saeed NA, Wang X-D, Rose RJ, Rolfe BG** (2004) Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryonic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 4: 1883-1896.
- Kamoun S** (2003) Minireviews – Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryot Cell* 2: 191-199.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, et al.** (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7: 331–338.
- Kusumawati L, Imin N, Djordjevic MA** (2008) Characterization of the secretome of suspension cultures of *Medicago* species reveals proteins important for defense and development. *J Proteom Research* 7: 4508-4520.
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275.
- Larsen J, Bødker L** (2001) Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytol* 149: 487–493.
- Leipe DD, Wainright PO, Gunderson JH, Porter D, Patterson DJ, Valois F, et al.** (1994) The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia* 33: 369-377.
- Levenfors JP, Wikström M, Persson L, Gerhardson B** (2003) Pathogenicity of *Aphanomyces* spp. from different leguminous crops in Sweden. *Eur J Plant Pathol* 109: 535–543.
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, GeurtsR** (2003) LysM domain receptor kinases regulation Rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630–633.
- Limpens E, Ramos J, Franken C, Raz V, Compaan B, Franssen H, Bisseling T, Geurts RA** (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 55: 983-992.

- Liu JY, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Harrison MJ** (2003) Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell* 15: 2106–2123.
- Lohar DP, Haridas S, Gantt S, VandenBosch K** (2007) A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol* 173: 39-49.
- Maillet F, Poinot V, Andre O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, et al.** (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58-63.
- Markmann K, Parniske M** (2009) Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Trends Plant Sci* 14: 77-86.
- Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, et al.** (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 325: 123-133.
- Mathesius U, Keijzers G, Natera SH, Weinman JJ, Djordjevic MA, Rolfe BG.** (2001) Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 1: 1424–1440.
- Mathesius U** (2009) Comparative proteomic studies of root–microbe interactions. *J Proteom* 72: 353–366.
- Moiseyev GP, Beintema JJ, Federeyeva, LI, Yakolev GI** (1994) High sequence similarity between a ribonuclease from gingseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta* 193: 470-472.
- Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M, Küster H** (2007) Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* 68: 82-91.
- Oldroyd GED, Downie JA** (2006) Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr Opin Plant Biol* 9: 351-357.
- Park C-J, Kim K-J, Shin R, Park JM, Shin Y-C, Paek K-H** (2004) Pathogenesis-related protein 10 from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J* 37: 186-198.

- Peleg-Grossman S, Volpin H, Levine A** (2006) Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J Exp Bot* 58: 1637-1649.
- Peng M, Kuc J** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathol* 82: 696–699.
- Quackenbush J, Cho J, Lee D, Liang F, Holt I, Karamycheva S, et al.** (2001) The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Res* 29: 159-164.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, et al** (2004) Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem Rev* 3: 29–60.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H** (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11841–11843.
- Rubio MC, James EK, Clemente MR, Bucciarelli B, Federova M, Vance CP, et al.** (2004) Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 1294-1305.
- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C** (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421.
- Slezack S, Dumas-Gaudot E, Rosendahl S, Kjølner R, Paynot M, Negrel J, Gianinazzi S** (1999) Endoproteolytic activities in pea roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and/or *Aphanomyces euteiches* in relation to bioprotection. *New Phytol* 142: 517–529.
- Smith SE, Read DJ** (2008) Mycorrhizal symbioses. Third edition. *Academic Press, London, Cambridge*.
- Sprent JI** (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* 174: 11–25.
- Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, et al.** (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 54:335-347.
- Tadege M, Wang TL, Wen J, Ratet P, Mysore KS** (2009) Mutagenesis and beyond! Tools for understanding legume biology. *Plant Physiol* 151: 978-984.
- Tyler BM** (1993) To kill or not to kill: the genetic relationship between a parasite and an endophyte. *Trends Microbiol* 253.

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 1-28.
- Van West P, Appiah AA, Gow NAR** (2003) Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol* 62: 99-113.
- Wang H, Moore MJ, Soltis PS, Bell CD, Brockington SF, Alexandre R, et al.** (2009) Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3853-3858.
- Wen J, Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Breiteneder H** (1997) The potential of *Betv1* homologous, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* 8: 317-333.
- Wood DW, Setubal JC, Kaul R, Monks DE, Kitajima JP, Okura VK, et al.** (2001) The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2322.
- Yang Z, Fu Y** (2007) ROP/RAC GTPase signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10: 490-494.
- Young ND, Mudge J, Ellis THN** (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol* 6: 199-204.
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Dongjin K, Cook DR, Town CD, et al.** (2005) Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 137: 1174-1181.
- Young ND, Udvardi MK** (2008) Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol* 12: 1-9.
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, et al.** (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbiosis. *Nature* 480: 520-524.

TEIL B

Molekulare Aspekte pathogener und symbiontischer Infektion bei der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* - Wissenschaftliche Artikel

1. Kiirika LM, Bergmann HF, Schikowsky C, Wimmer D, Korte J, Schmitz U, Niehaus K, Colditz F (2012)
Silencing of the Rac1 GTPase *MtROP9* in *Medicago truncatula* stimulates early mycorrhizal and oomycete root colonizations but negatively affects rhizobial infection.
Plant Physiology 159: 501–516
2. Colditz F (2012)
Medicago truncatula root proteomics.
In: de Bruijn F (Ed.), Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere, Chapter 26, Wiley-Blackwell Publisher, in press
3. Rode C, Winkelmann T, Braun HP, Colditz F (2012)
DIGE analysis of plant tissue proteomes using a phenolic protein extraction method.
Methods in Molecular Biology 854: 335-342
4. Dubinin J, Braun HP, Schmitz U, Colditz F (2011)
The mitochondrial proteome of the model legume *Medicago truncatula*.
Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics 1814: 1658-1668
5. Colditz F, Braun HP (2011)
Medicago truncatula proteomics.
Journal of Proteomics 73:1974-1985

6. Schenkluhn L, Hohnjec N, Niehaus K, Schmitz U, Colditz F (2010)
Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome.
Journal of Proteomics 73: 753-768

7. Trapphoff T, Beutner C, Niehaus K, Colditz F (2009)
Induction of distinct defense-associated protein patterns in *Aphanomyces euteiches* (Oomycota)-elicited and -inoculated *Medicago truncatula* cell-suspension cultures: a proteome and phosphoproteome approach.
Molecular Plant Microbe Interactions 22: 421-436

8. Colditz F, Niehaus K, Krajinski F (2007)
Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*.
Planta 226: 57-71

9. Colditz F, Krajinski F, Niehaus K (2007)
Plant proteomics upon fungal attack.
In: Samaj J, Thelen JJ (Eds), Plant Proteomics, Chapter 18, Springer, pp. 283-309

10. Colditz F, Braun HP, Jacquet C, Niehaus K, Krajinski F (2005)
Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches*-tolerance of *Medicago truncatula*.
Plant Molecular Biology 59: 387-406

TEIL C

Weitere wissenschaftliche Artikel

1. Colditz F, Nyamsuren O, Niehaus K, Eubel H, Braun HP, Krajinski F (2004)
Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*.
Plant Molecular Biology 55: 109-120
2. Nyamsuren O, Colditz F, Rosendahl S, Tamasloukht M, Bekel T, Meyer F, Küster H, Franken P, Krajinski F (2003)
Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* roots after infection with *Aphanomyces euteiches* (oomycota) identifies novel genes upregulated during this pathogenic interaction.
Physiological and Molecular Plant Pathology 63: 17-26

APPENDIX

A1 Danksagung

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich all jenen aussprechen, die mich bei meiner Arbeit in den letzten Jahren unterstützt haben.

Ich danke ganz besonders Prof. Dr. Udo Schmitz und Prof. Dr. Hans-Peter Braun für ihre umfassende und engagierte Unterstützung und für die Betreuung und Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung. Ich möchte den beiden herzlich danken für die Möglichkeit, in den Laboren der Abteilungen Pflanzenmolekularbiologie und Pflanzenproteomik zu arbeiten, und für die Bereitstellung all der Mittel, ohne die meine Untersuchungen für die vorliegende Habilitationsschrift nicht möglich gewesen wären.

Bei Prof. Dr. Karsten Niehaus bedanke ich mich aufrichtig für die fruchtbare Zusammenarbeit über all die Jahre, für die vielen sehr lebhaften und konstruktiven Diskussionen zu unseren gemeinsamen Projekten, für seinen großen Fachverstand der molekularen Phytopathologie, für die massenspektrometrischen Untersuchungen meiner Proben und vor allem für die Möglichkeit, meine ersten Postdoc - Erfahrungen in seiner Arbeitsgruppe sammeln zu dürfen.

Dr. Christina Rode danke ich für ihre stets große fachliche Unterstützung.

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Mitarbeitern unserer AG ‚*Plant Microbe Interactions*‘, insbesondere Leonard Kiirika für seine fleißige und engagierte Mitarbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Schmitz und Braun für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für die praktische Unterstützung.

Ich möchte Prof. Dr. Helge Küster herzlich danken für eine fruchtbare Kooperation über viele Jahre hinweg sowie seiner Arbeitsgruppe für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Traud Winkelmann für ihre fachliche Unterstützung bedanken sowie bei allen Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe.

Meinen Eltern Helma und Gerhard, meiner Freundin Christina, meinem Bruder Peter mit Familie, meiner Oma Leni und der kleinen Maya danke ich von Herzen für ihre große Liebe und für die familiäre Unterstützung.

A2 Versicherungen nach § 4 Absatz 5 und 6 der Habilitationsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig verfasst habe sowie alle darin vorgelegten wissenschaftlichen Arbeiten und Veröffentlichungen ausschließlich unter der Verwendung der darin angegebenen Hilfen oder Hilfsmittel und ohne Verwendung anderer, nichtgenannter Hilfen oder Hilfsmittel angefertigt wurden.

Die Richtigkeit meiner Angaben bestätige ich mit meiner Unterschrift.

Hannover, den 12.03.2012



(Dr. Frank Colditz)