

# Bedeutung von *SWEET*-Genen für den pflanzlichen Zuckerexport in einer Ektomykorrhizasymbiose

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)

Im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)



**Universität Bremen**

Vorgelegt von

**Dimitri Neb**

Referent 1: Prof. Dr. Uwe Nehls

Referent 2: Prof. Dr. Barbara Reinhold-Hurek

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 10.03.2017

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>I Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Pappel als Modelorganismus</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 Das Genom der Pappel.....	8
1.1.2 Verschiedene Arten der Pappel im Labor .....	9
<b>1.2 Pflanzentransformation</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Transformationstechniken.....	11
<b>1.3 Agrobakterien</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Infektionsprozess.....	12
1.3.1.1 Fernerkennung und Andocken des <i>Agrobacterium</i> an die Pflanzenzelle.....	12
1.3.1.2 Bildung und Übertragung der T-DNA .....	13
1.3.1.3 Transfer der Substrate durch den Pilus .....	14
1.3.1.4 Transport, Integration und Expression der T-DNA .....	14
1.3.2 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	14
1.3.2.1 Einsatzgebiet und Anwendungsmöglichkeiten der Komposit-Pflanzen .....	16
<b>1.4 Entwicklung von binären Vektor-Systemen</b> .....	<b>17</b>
1.4.1 Die in dieser Arbeit zur Pflanzentransformation verwendeten Binärvektoren .....	17
1.4.1.1 pGreen (Hellens et al., 2000) .....	17
1.4.1.2 pBin19 (Bevan, 1984) .....	18
1.4.1.3 pCAMBIA.....	18
<b>1.5 Ligase independent cloning (LIC)</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6 Mykorrhizen</b> .....	<b>21</b>
1.6.1 Ektomykorrhiza ECM .....	22
1.6.2 Die pilzliche Zuckerversorgung in der ECM Symbiose .....	24
<b>1.7 Zuckertransporter</b> .....	<b>27</b>
1.7.1 Pflanzliche Monosaccharidtransporter .....	28
1.7.2 <i>SWEET</i> „SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTER“ ....	28
1.7.2.1 Struktur.....	29
1.7.2.2 Transport .....	30
1.7.2.3 Phloem Beladung .....	31
1.7.2.4 Versorgung von Interaktionspartnern.....	31
<b>1.8 Transkriptionelle Genregulation in Eukaryoten</b> .....	<b>32</b>
1.8.1 Funktionelle Promotoranalyse.....	33
1.8.2 <i>in silico</i> Analyse einer Promotorsequenz .....	34
<b>1.9 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>37</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1 Bioinformatische Hilfsmittel</b> .....	<b>38</b>
2.1.1 Vorhersage möglicher TATA-Box und CAAT-Box Motive mittels PlantCare.....	38
2.1.2 <i>in silico</i> Analyse des <i>PtSWEET_1.c</i> Promotors mittels des Vorhersageprogramms JASPAR .....	38

2.1.3 Vorhersage von Phosphorylierungsstellen .....	39
<b>2.2 Organismen und Plasmide.....</b>	<b>39</b>
2.2.1 Verwendete Organismen .....	39
2.2.2 Verwendete Plasmide .....	40
2.2.2.1 <i>Escherichia coli</i> Klonierungsvektoren .....	40
2.2.2.2 Binärvektoren .....	40
<b>2.3 Kultivierung von Organismen.....</b>	<b>40</b>
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	40
2.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>A. rhizogenes</i> .....	41
2.3.3 Kulturen zur Langzeit-Lagerung von Bakterien .....	41
2.3.4 Pappel .....	41
2.3.5 <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	41
2.3.6 <i>Amanita muscaria</i> .....	42
<b>2.4 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>42</b>
2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren .....	42
2.4.1.1 Isolierung von gesamt RNA .....	42
2.4.1.2 Isolierung genomischer DNA.....	42
2.4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	43
2.4.2 Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR .....	43
2.4.3 Gel-Elektrophorese.....	44
2.4.3.1 Auftrennung von DNA.....	44
2.4.3.2 Visualisierung der DNA.....	44
2.4.4 Klonierung von DNA .....	45
2.4.4.1 Restriktionsanalyse.....	45
2.4.4.2 Reinigung von DNA-Fragmenten .....	45
2.4.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide.....	45
2.4.4.4 Sequenzierung von Plasmiden .....	46
2.4.5 Transformation .....	46
2.4.5.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	46
2.4.5.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	47
2.4.5.3 Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien .....	47
2.4.5.4 Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien .....	47
2.4.5.5 Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien (Dower et al., 1988).....	47
2.4.5.6 Elektroporation.....	48
2.4.5.7 Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	48
2.4.6 Komposit-Pappeln .....	49
2.4.6.1 Erzeugung von Komposit-Pappeln mittels <i>A. rhizogenes</i> .....	49
2.4.6.2 Ektomykorrhizierung von Komposit-Pappeln (Hamp et al., 1996) .....	49
<b>2.5 Mikroskopische Analysen.....</b>	<b>50</b>
2.5.1 Binokular .....	50
2.5.2 Epifluoreszenz Mikroskopie.....	50
2.5.3 konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM) .....	50
2.5.4 Herstellung von Quer- und Längsschnitten von Wurzeln.....	51
<b>3 Ergebnisse: .....</b>	<b>52</b>

<b>3.1 Entwicklung von Komposit-Pappeln</b> .....	<b>52</b>
3.1.1 Auswahl eines geeigneten <i>A. rhizogenes</i> Stammes .....	52
3.1.1.1 (i) Effizienz der untersuchten <i>A. rhizogenes</i> Stämme die Bildung transgener Wurzeln zu induzieren .....	53
3.1.1.2 (ii) Anzahl der pro Pflanze gebildeten Wurzeln .....	54
3.1.1.3 (iii) Fähigkeit der <i>A. rhizogenes</i> Stämme zur Übertragung einer biT-DNA .....	56
3.1.1.3.1 Überprüfung der Transformationseffizienz mittels Binokular .....	56
3.1.1.3.2 Überprüfung der Transformationseffizienz mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (cLSM) .....	58
3.1.2 Aktivierung der Agrobakterien .....	59
3.1.3 Ektomykorrhizierung von Pappel Komposit-Pflanzen .....	59
3.1.3.1 Überprüfung des „hairy root“ Phänotyps .....	60
3.1.3.2 Untersuchung der ECM Bildung in Abhängigkeit der Zuckerkonzentration im Anzugsmedium des Pilzes .....	60
3.1.3.3 Mikroskopische Untersuchung der ECM von Komposit-Pflanzen .....	61
3.1.3.4 Nachweis der Expression des <i>PtaSWEET1</i> in den Ektomykorrhizen einer Komposit-Pappel .....	63
<b>3.2 Analyse der Promotoren von Ektomykorrhiza spezifisch induzierten <i>SWEET</i>-Genen</b> .....	<b>64</b>
3.2.1 Auswahl eines Promotors .....	64
3.2.2 Konstruktion des binären Vektors pBI121-LIC-sYFPPTS1 .....	65
3.2.3 Untersuchung des <i>PtSWEET_1.c</i> Promotors .....	66
3.2.3.1 Klonierung der Promotorfragmente .....	67
3.2.3.2 Transformation von <i>PtSWEET_1.c</i> Promotor-Reporter Konstrukten in <i>P. tremula x alba</i> Pflanzen .....	70
3.2.3.3 Transformation ausgewählter Promotor Reporter Konstrukte in <i>Populus tremula x tremuloides</i> Pflanzen .....	71
3.2.3.4 Untersuchung der Komposit-Pflanzen Wurzeln mittels cLSM .....	72
3.2.3.5 Ektomykorrhizierung der mit pBI121-1368bp-sYFPPTS1 transformierten Komposit-Pappeln .....	75
3.2.4 Analyse des 368 bp <i>PtSWEET_1.c</i> Promotor-Reporter Konstrukts in <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	76
3.2.5 Analyse des <i>PtSWEET_1.c</i> Promotors in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	78
3.2.6 <i>in silico</i> Analyse des <i>PtSWEET_1.c</i> Promotors .....	78
3.2.7 Untersuchung der ECM Induzierbarkeit des <i>PttSWEET1.b</i> .....	80
<b>3.3 Lokalisierung ECM regulierter Monosaccharidtransporter in Blättern von <i>Nicotiana benthamiana</i></b> .....	<b>83</b>
3.3.1 Konstruktion eines Vektors für Lokalisierungsstudien .....	83
3.3.2 Klonierung der SWEET Lokalisationskonstrukte in pBI121-35S-LICsYFP .....	85
3.3.3 Klonierung der MST Lokalisierungskonstrukte in den pBI121-35S-LICsYFP .....	85
3.3.4 Transiente Expression der Lokalisierungs-Konstrukte in <i>Nicotiana benthamiana</i> ....	86
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>89</b>
<b>4.1 Komposit-Pappeln</b> .....	<b>89</b>
4.1.1 Auswahl eines geeigneten <i>A. rhizogenes</i> Stammes .....	89



4.1.1.1 Fähigkeit unterschiedlicher <i>A. rhizogenes</i> Stämme sprossbürtige Wurzeln zu induzieren.....	89
4.1.1.2 Fähigkeit der <i>A. rhizogenes</i> Stämme zur Übertragung einer biT-DNA.....	90
4.1.2 Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappeln.....	92
4.1.2.1 Ermitteln der Bedingungen zur Mykorrhizierung von Komposit-Pappeln.....	92
4.1.2.2 Auswirkungen des „hairy root“ Phänotyps auf die Mykorrhizierung von Komposit-Pappeln.....	93
4.1.2.3 Vor- und Nachteile der Komposit-Pappeln.....	94
<b>4.2 Analyse des <i>PtSWEET_1.c</i> Promotors.....</b>	<b>95</b>
4.2.1 <i>in silico</i> Analyse des <i>PtSWEET_1.c</i> .....	98
<b>4.3 Hypothetisches Modell der pilzlichen Kohlenhydrat-Versorgung in einer Ektomykorrhiza durch <i>PtSWEET</i> Facilitatoren.....</b>	<b>100</b>
4.3.1 Regulationsmechanismen der pilzlichen Kohlenhydrat-Versorgung durch die Pflanze.....	102
<b>5 Ausblick.....</b>	<b>104</b>
<b>6 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
<b>7 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>118</b>
<b>10 Danksagung.....</b>	<b>121</b>
<b>11 Erklärung.....</b>	<b>122</b>
<b>12 Lebenslauf.....</b>	<b>123</b>
12.1 Publikationsliste.....	124
<b>13 Anhang.....</b>	<b>125</b>
13.1 Technisches Equipment.....	125
13.2 Kits.....	127
13.3 Enzyme.....	127
13.4 Chemikalienliste.....	127
13.5 Primer.....	130
13.6 Vektorkarten.....	133
13.7 Aufnahmen der Lokalisierungsstudien in <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	135

## I Zusammenfassung

In mutualistischen Interaktionen zwischen Pilzen und Pflanzen, wie der Ektomykorrhiza, versorgt der Symbiont (Pilz) seinen Wirt (Pflanze) mit Nährstoffen und erhält im Gegenzug leicht verdaubare Kohlenhydrate (Smith and Read, 1997). Bisher ist nicht geklärt, wie der Kohlenhydrat-Transport von der Pflanze zum Pilz organisiert wird und welche Transporter in den Stoffaustausch involviert sind. Die von Chen et al. (2010) beschriebenen pflanzlichen *SWEET*-Gene werden im Zusammenhang mit der Zuckerversorgung in Ektomykorrhizen (ECM) diskutiert (Nehls and Bodendiek, 2012), da gezeigt werden konnte, dass bestimmte *SWEET*-Gene ECM spezifisch induziert werden (Neb et al., in Vorbereitung).

Um die Zeit, die zur Erzeugung von transgenen Pflanzen benötigt wird, zu verringern, wurden im Rahmen dieser Arbeit so genannte Komposit-Pappeln entwickelt. Komposit-Pappeln besitzen transgene Wurzeln an nicht transgenen Sprossen. Die Bildung der transgenen Wurzeln wurde dabei durch *Agrobacterium rhizogenes* induziert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der *A. rhizogenes* Stamm K599 als geeignet zur Erzeugung von Komposit-Pappeln identifiziert werden. Ebenfalls konnte ein Protokoll erarbeitet werden, das eine effiziente Mykorrhizierung der Komposit-Pappel Wurzeln mit dem Pilz *Amanita muscaria* zulässt. Im Anschluss an ihre Etablierung wurden Komposit-Pappeln für eine erste Promotor-Studie des ECM induzierten *PtSWEET\_1.c* eingesetzt. Hierfür wurde ein Promotorfragment von 1,3 kb Länge aus genomischer DNA von *P. trichocarpa* amplifiziert. Diese DNA wurde vom 5'-Ende her sukzessiv verkürzt und die daraus resultierenden Fragmente wurden vor das 5'-Ende der kodierenden DNA eines peroxisomal lokalisierten gelb fluoreszierenden Proteins (sYFP) kloniert. Die so erhaltenen Promotor-Reporter Konstrukte wurden anschließend zur *A. rhizogenes* vermittelten Erzeugung von Komposit-Pappeln eingesetzt. Mittels dieser Promotor-Studie konnte eine 32 bp lange Sequenz, die 330 bp stromaufwärts der längsten bekannten cDNA in der untersuchten Sequenz liegt, als Repressor-Bindestelle identifiziert werden. Ein Bereich von 162 bp stromaufwärts der längsten bekannten cDNA vermittelte eine sehr starke Marker Expression und wurde daher als Enhancer-Bereich identifiziert. Eine anschließende *in silico* Analyse dieser Promotorbereiche offenbarte einige potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS). Eine ECM spezifische Induktion der Promotor-Reporter Konstrukte des *PtSWEET\_1.c* konnte in Komposit-Pappeln allerdings nicht beobachtet werden, was den Schluss nahe legt, dass hierfür noch weitere Elemente notwendig sind.

Desweiteren konnten die Ektomykorrhiza (ECM) regulierten SWEET-Proteine PtSWEET\_1.b, PtSWEET\_1.c, PtSWEET1.04 sowie die ECM regulierten Monosacharid Transporter PtMST8, PtMST16, PtMST18 im Rahmen dieser Arbeit in der Plasmamembran von *Nicotiana benthamiana* Blättern lokalisiert werden. Durch die Kombination aus Proteinlokalisierung und Genexpression wurde ein hypothetisches Modell der pilzlichen Zuckerversorgung in einer ECM postuliert.

## 1 Einleitung

### 1.1 Pappel als Modelorganismus

Bäume haben sich in einer Weise an ihre Umwelt angepasst, die es ihnen erlaubt, höher zu wachsen und damit andere Pflanzen in Konkurrenz um Licht zu übertrumpfen (Brunner et al., 2004a). Eine der Eigenschaften, die ihre Dominanz unterstützt, ist ihre Fähigkeit, mit verschiedenen Bodenpilzen eine Symbiose einzugehen, die ihnen in einer stark Nährstoff limitierten Umgebung eine effizientere Aufnahme von Wasser und Nährstoffen ermöglicht (Smith and Read, 2008).

Die Pappel (*Populus*) ist eine Bedecktsamige Pflanze (*Magnoliopsida*) und gehört zur monophyletischen Gruppe der Eurosoid I, in der Ordnung der Malpighienartigen (*Malpighiales*) und der Familie der Weidengewächse (*Salicaceae*) (APG, 2012). Mit ca. 400 verschiedenen Arten sind die Weiden (*Salix*), die am weitesten verbreiteten Vertreter der *Salicaceae*, während die Pappel nur ca. 40 verschiedene Arten umfasst (Cronk, 2005). Pappelarten sind interfertil, was zur Bildung von einer großen Anzahl an natürlich vorkommenden Hybriden führt (Cronk, 2005). Die meisten Pappel Arten / Hybride findet man in Asien, während nur eine geringe Artenvielfalt auf den restlichen Kontinenten verbreitet ist (Cronk, 2005). Im Gegensatz zu den meisten Vertretern der *Salicaceae*, die häufig von Insekten bestäubt werden, ist die Pappel windbestäubend (Cronk, 2005).

Die Pappel ist eines der am weitesten verbreiteten Holzgewächse in der nördlichen Hemisphäre der Erde und daher von großer Bedeutung für die Erhaltung unterschiedlicher Ökosysteme (Dickmann, 2001). Weiterhin übernehmen Pappeln wichtige Aufgaben im Nährstoff-Zyklus der Waldböden, in der Bindung von Kohlenstoff und als Biofilter (Brunner et al., 2004a).

#### 1.1.1 Das Genom der Pappel

Das Genom der Art *P. trichocarpa* war das erste Genom einer holzbildenden Pflanze, das vollständig sequenziert wurde (Tuskan et al., 2006). Dies markierte ein bedeutendes Ereignis in der molekularen Pflanzenbiologie und Biotechnologie, wodurch die Pappel endgültig als Modelorganismus etabliert werden konnte. Pappeln weisen mehrere Eigenschaften auf, die sie zum idealen Modelorganismus machen. Neben der moderaten Größe des *P. trichocarpa* Genoms ist die Pappel eine schnell wachsende, holzbildende Pflanze und lässt sich leicht

experimentell manipulieren (Tuskan et al., 2006). So war die Pappel z.B. eine der ersten holzbildenden Pflanzen, die stabil transformiert werden konnte (Fillatti et al., 1987). Die Anzahl der Publikationen zur Untersuchung von stabil transformierten Pappeln übertrifft die Anzahl der Publikationen aller anderen Arten holzbildender Pflanzen zusammen (Pena and Seguin, 2001). Auch kann die Pappel, als eine der wenigen holzbildenden Pflanzen, leicht in *in vitro* Kulturen im Labor gehalten und vegetativ vermehrt werden (Brunner et al., 2004a).

Alle ca. 40 Pappel Arten besitzen 19 Chromosomen ( $2n = 38$ ), auf denen ca. 500 Millionen Basenpaare und ca. 45 000 Gene kodiert sind (Tuskan et al., 2006). Damit besitzt die Pappel, im Vergleich zu Reis, eine moderate Genomgröße, die ungefähr 40-mal kleiner ist als die der Fichte. Diese Tatsache erleichtert die Identifikation der unterschiedlichen Gene (Brunner et al., 2004a). Die Pappel ist paleopolyploid und unterlief damit im Laufe ihrer Evolution einer oder mehreren Genomduplikationen. Diese Annahme wird auch durch die Größe der anwesenden Genfamilien unterstützt (Brunner et al., 2000).

### 1.1.2 Verschiedene Arten der Pappel im Labor

Da das Genom von *Populus trichocarpa* sequenziert und annotiert ist, wäre es naheliegend, diese Art auch im Labor zu verwenden. Doch *P. trichocarpa* lässt sich unter sterilen Laborbedingungen nur schwer halten, während sich Pappel Hybride hier sehr robust verhalten und schnell und einfach vegetativ vermehrt werden können (Nehls, persönliche Information). Als besonders für den Laboralltag geeignet hat sich die Art *P. tremuloides* sowie die Hybride *P. tremula x alba* bzw. *P. tremula x tremuloides* herausgestellt. Diese zeichnen sich durch schnelle Bewurzelung und schnelles Wachstum unter sterilen, kontrollierten Laborbedingungen aus (Nehls, persönliche Information).

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist die Fähigkeit der verwendeten Pappelarten, Ektomykorrhizen in einem geschlossenen Petrischalen System auszubilden (Hampp et al., 1996), sowie die Bildung von Transgenen zu erlauben (Fillatti et al., 1987). Im Gegensatz zu *Arabidopsis thaliana*, gibt es für holzbildende Pflanzen nur wenige effiziente Protokolle, die sich für schnelle und einfache funktionelle Analysen eignen (Alpizar et al., 2006). Obwohl *P. trichocarpa* bereits sequenziert und annotiert ist, lässt sich diese Art nicht für *in vitro* Ektomykorrhizierungs-Experimente einsetzen, während die Pappel Hybride *P. tremula x alba* und *P. tremula x tremuloides* sich sehr gut für die Produktion von *in vitro* Ektomykorrhizen eignen (Nehls, persönliche Information).

## 1.2 Pflanzentransformation

Vor ca. 50 Jahren wurde damit begonnen Pflanzen zu transformieren (McCullen and Binns, 2006). In den frühen 1980er Jahren wurde dann die stabile Transformation erstmals für Tabak entwickelt (Deblock et al., 1984). Seither ist diese Technik eine grundlegende Methode in der Pflanzenbiologie und der Pflanzenzüchtung (Birch, 1997). Oft werden transformierte Pflanzen zur Erforschung des pflanzlichen Metabolismus erzeugt, um die Qualität der Inhalte zu steigern, die Toleranz gegenüber Schadstoffen zu erhöhen oder gegenüber bestimmten Pathogenen resistente Sorten zu entwickeln (Rivera et al., 2012). Inzwischen können ca. 120 Pflanzen Spezies, die zu 35 verschiedenen Pflanzenfamilien gehören, transformiert werden (Birch, 1997).

Je nach Fragestellung des Experiments reicht es aus, wenn das untersuchte Gen bzw. Fusionskonstrukt in einer Pflanze nur zeitlich begrenzt von wenigen Zellen exprimiert wird. Man spricht dann von einer transienten Expression. Diese Art der Expression kann schnell durchgeführt werden, ist flexibel und die Genexpression wird nicht von Positionseffekten beeinflusst (Fischer et al., 1999). Eine stabile Transformation ist hingegen oft sehr zeitaufwendig und bedarf einer Regeneration von Pflanzen aus transgenen Zellen oder Gewebekulturen (Hansen and Wright, 1999). Der Vorteil der stabilen Transformation ist die Vererbung der eingebrachten DNA an nachfolgende Generationen (Newell, 2000).

Es gibt unterschiedliche biologische Voraussetzungen, die erfüllt werden müssen, damit sich eine Pflanzenart für die Transformation eignet. (i) Zum einen muss ein transformierbares Gewebe vorhanden sein, und ganze Pflanzen müssen sich leicht aus solchen Geweben regenerieren lassen. (ii) Zum anderen wird eine effiziente Methode benötigt, die es erlaubt, fremde DNA in die Pflanze zu transferieren und sie dann in das pflanzliche Genom zu integrieren.

Nach der Integration exogener DNA in die Pflanze, ist es essentiell, auf die Zellen zu selektieren, die tatsächlich mit der fremden DNA transformiert wurden (Birch, 1997, Newell, 2000). Aber auch unter dem Einsatz eines Selektionsmarkers können nicht transformierte Zellen unter dem Schutz von transgenem Gewebe wachsen, was zu genetisch nicht einheitlichen Hybridpflanzen führt (Park et al., 1998). Derzeit gibt es ca. 50 verschiedene potentielle Selektionsmarker, von denen jedoch nur wenige eine breite Anwendung finden (Miki and McHugh, 2004).

### 1.2.1 Transformationstechniken

Derzeit ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden bekannt, die sich zur Transformation von Pflanzen eignen (Newell, 2000). Die Wahl der effizientesten Methode basiert auf dem zu transformierenden Organismus sowie der Fragestellung. Allgemein kann zwischen einem direkten Gentransfer und einer *Agrobacterium* vermittelten Transformation unterschieden werden (Newell, 2000).

Methoden zum direkten Transfer von exogener DNA in die pflanzliche Zelle eignen sich für die Transformation von bestimmten Geweben, aber auch zur Erzeugung von vollständig transgenen Pflanzen (Birch, 1997). Die beliebtesten Methoden sind dabei die biolistische Transformation mittels „particle gun“ sowie die Transformation von Protoplasten mittels Elektroporation oder Polyethylenglycol (PEG) (Newell, 2000).

Der Prozess der DNA-Übertragung und Integration durch Agrobakterien ist eine der am besten untersuchten Interaktionen zwischen Pathogenen und Pflanzen (Gelvin, 2003). Durch das sehr weit gediehene Verständnis des Prozesses der T-DNA Übertragung wurde diese Transformationsmethode immer weiter verfeinert und zählt daher heute zu den am häufigsten angewandten Methoden bei der Erzeugung und Regeneration transgener Pflanzen (Rivera et al., 2012).

### 1.3 Agrobakterien

Gramnegative Bakterien der Gattung *Agrobacterium* sind dazu in der Lage, einen Teil der eigenen DNA in Pflanzen zu transferieren und diese in das Genom zu integrieren. Durch diesen Vorgang werden in der Regel unterschiedliche pflanzliche Krankheiten ausgelöst (Van Larebeke et al., 1974). Je nach Agrobakterien Art unterscheiden sich der Ort des Befalls und die Krankheit. *A. tumefaciens*, *A. rubi* und *A. vitis* induzieren pflanzliche Tumorbildung, wogegen *A. rhizogenes* an befallenen Wurzeln die Bildung der so genannten „hairy-roots“ induziert (Gelvin, 2003, Ophel and Kerr, 1990).

Der von den entsprechenden Agrobakterien Arten übertragene DNA-Abschnitt wird auch als Transfer-DNA (T-DNA) bezeichnet (McCullen and Binns, 2006). Die T-DNA wird von 25 bp langen „border Sequenzen“ flankiert und befindet sich auf dem ca. 200 kb großem Ti-Plasmid (Tumor inducing plasmid, *A. tumefaciens*) bzw. Ri-Plasmid (root inducing plasmid, *A. rhizogenes*), die in allen virulenten *Agrobacterium* Stämmen zu finden sind (McCullen and Binns, 2006, Yadav et al., 1982). Die auf der T-DNA enthaltenen Gene kodieren für Enzyme,



die für die Synthese von Pflanzenhormonen und Stickstoff haltigen Metaboliten (Opinen) verantwortlich sind. Durch den veränderten Gehalt an Phytohormonen werden Tumore induziert, während die synthetisierten Opine (Aminosäure-Zucker Konjugate) dem *Agrobacterium* als Nahrungsquelle dienen (McCullen and Binns, 2006). Die für den Katabolismus der Opine benötigten Gene werden ebenfalls auf dem Ti- bzw. Ri-Plasmid kodiert. Da diese Gene sich jedoch nicht auf der T-DNA befinden, werden sie nicht auf die Pflanze übertragen (Chandra, 2012). Dadurch ist nur das Agrobakterium, jedoch nicht die Pflanze, dazu in der Lage, Opine zu verwerten.

Neben der T-DNA und den Genen für den Opin-Katabolismus kodiert das Ti- bzw. das Ri-Plasmid auch die so genannten Virulenz Gene (*vir*-Gene), die für die Virulenz des jeweiligen *Agrobacterium* essentiell sind. Die *vir*-Gene spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung des Wirtes sowie in der Erzeugung, Übertragung und Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom (McCullen and Binns, 2006). Es konnte auch gezeigt werden, dass die übertragenen *vir*-Proteine die pflanzlichen Abwehrmechanismen inhibieren (Gelvin, 2003).

### 1.3.1 Infektionsprozess

Am Transfer der T-DNA durch das *Agrobacterium* sind sowohl bakterielle als auch pflanzliche Proteine beteiligt (Gelvin, 2003). Grundsätzlich lässt sich die Interaktion in sieben Schritte unterteilen: (i) chemische Erkennung der Pflanze und die Aktivierung der *vir*-Gene, (ii) physische Kontaktaufnahme von Bakterium und Pflanze, (iii) Bildung der Transfermaschinerie, (iv) Transfer von T-DNA und Proteinen in die Pflanzenzelle, (v) Transfer der T-DNA in den Kern, (vi) Integration der T-DNA in das Genom der Pflanze, (vii) Expression der Gene auf der T-DNA (McCullen and Binns, 2006). Diese Prozesse werden im Folgenden näher beschrieben.

#### 1.3.1.1 Fernerkennung und Andocken des *Agrobacterium* an die Pflanzenzelle

Die Transformation der Pflanzen durch das *Agrobacterium* setzt einen engen physischen Kontakt zwischen Bakterium und Pflanze voraus (McCullen and Binns, 2006). Hierzu muss das *Agrobacterium* die Pflanze erkennen und sich aktiv zu ihr bewegen. Die Erkennung erfolgt durch chemische Signalstoffe, die von der Pflanze an Verwundungsstellen ausgeschieden werden (Gelvin, 2003). Dadurch dass an verwundeten Stellen die Ausgrenzungsstrukturen der Pflanze, wie z.B. die Rinde fehlen, kann das *Agrobacterium* hier in das pflanzliche Gewebe eindringen und es infizieren (McCullen and Binns, 2006). An verletzten Stellen der Pflanze wurden besonders hohe Mengen an Phenylpropanoid Derivaten, ein niedriger pH und eine hohe Konzentration von Zuckern festgestellt (Baron and



Zambryski, 1995). Essentiell für die Aktivierung der bakteriellen Virulenz-Faktoren sind die pflanzlichen phenolischen Substanzen, während Faktoren wie ein niedriger pH und hohe Konzentration an Zuckern das *Agrobacterium* gegenüber diesem Signal sensibilisieren (McCullen and Binns, 2006). Acetosyringon ist eine der Substanzen, die im Phenylpropanoid Syntheseweg gebildet und vom *Agrobacterium* durch einen zwei Komponenten-Rezeptor wahrgenommen werden kann (Palmer et al., 2004). Der Rezeptor besteht aus den Produkten von *virA* und *virG* (Wolanin et al., 2002) und aktiviert die Expression der übrigen *vir*-Gene sowie die chemotaktische Bewegung des *Agrobacterium* zur Quelle der phenolischen Substanzen (Ashby et al., 1988). Bei der chemotaktischen Bewegung spielen neben phenolischen Substanzen auch Zucker und Aminosäuren eine wichtige Rolle (Loake et al., 1988). Durch diese chemotaktische Bewegung wird der für die Transformation notwendige enge physikalische Kontakt zwischen Agrobakterium und Pflanze hergestellt (McCullen and Binns, 2006). Der physikalische Kontakt kann sowohl unspezifisch als auch spezifisch erfolgen (McCullen and Binns, 2006). Der unspezifische Kontakt erfolgt dabei durch die einfache Bewegung des Bakteriums zur Pflanzenzelle. Dieser Kontakt ist sehr schwach und die Bakterien lassen sich mittels geringen Aufwands (z.B. durch Waschen mit Wasser) wieder entfernen (Gurlitz et al., 1987). Jedoch können die Bakterien auch spezifisch an Pflanzenzellen andocken (Douglas et al., 1982). Der spezifische physikalische Kontakt ist weit stärker, da sich so angedockte Bakterien nur schwer entfernen lassen. Dieser Vorgang erfolgt Ti-Plasmid unabhängig, wodurch die Funktion des Pilus als Anker ausgeschlossen werden kann (McCullen and Binns, 2006). Untersuchungen zu diesem Vorgang haben gezeigt, dass die spezifische Interaktion zwischen Agrobakterien und Pflanzenzellen durch eine Rezeptor ähnliche Bindung erfolgt (McCullen and Binns, 2006). So wird die Fähigkeit der Agrobakterien, pflanzliche Tumore zu induzieren, erheblich herabgesetzt, wenn diese vor der Infektion der Pflanze mit Bruchstücken von pflanzlichen Zellen inkubiert werden (Gelvin, 2000). Der gleiche Effekt wird erzielt, wenn die zu transformierende Pflanze vor der Infektion mit den virulenten Agrobakterien mit avirulenten Agrobakterien inkubiert wird (Matthysse, 1987).

### 1.3.1.2 Bildung und Übertragung der T-DNA

Mit der Detektion phenolischer Pflanzenmetabolite wird die Expression einer Vielzahl von *vir*-Genen induziert, die für die Bildung und den Transfer der T-DNA benötigt werden. Zwei ca. 25 bp lange „border“-Sequenzen (left-border, right-border) flankieren die zu übertragende T-DNA auf den Ti- bzw. Ri-Plasmiden (Peralta and Ream, 1985). Bei diesen Sequenzen handelt es sich um Erkennungssequenzen für die Endonukleasen VirD1 und VirD2. Diese

Enzyme erzeugen Einzelstrangbrüche an der „right-border“ (VirD2) und an der „left-border“ (VirD1) (Gelvin, 2003). Das VirD2 Protein bleibt anschließend kovalent an das 5'-Ende der T-DNA gebunden, schützt die T-DNA vor pflanzlichen Exonukleasen und sorgt mit seinem Kernlokalisierungssignal (NLS) für den späteren Transport der T-DNA in den pflanzlichen Zellkern (Gelvin, 2003). VirD1 und VirD2 schneiden den gleichen DNA-Strang, der dann aus dem Plasmid herausgelöst und als einzelsträngige DNA (single strand DNA) in die Pflanze transportiert wird (Durrenberger et al., 1989). Neben seiner Funktion als Endonuklease und der Schutzfunktion, dient das VirD2 wahrscheinlich auch als Pilot-Protein, das den VirD2-T-Strang Komplex durch den Typ IV Export Apparat leitet (Gelvin, 2003).

#### **1.3.1.3 Transfer der Substrate durch den Pilus**

Neben dem VirD2-T-Strang werden auch zahlreiche andere Proteine, wie z.B. das VirE2, VirE3, VirF und VirD5 durch den Infektions-Pilus in die Pflanzenzelle transportiert. Zu diesem Zweck besitzen sie an ihrem C-terminalen Ende ein Signalpeptid, das den Transport initiiert (Vergunst et al., 2000). Der VirD2-T-Strang wird durch das ssDNA bindende Protein VirE2 vor pflanzlichen Nukleasen geschützt (T-Komplex) (Rossi et al., 1996). Neben der Schutzfunktion bewirkt das VirE2 zusammen mit dem VirD2 den Transport des T-Strangs in den Zellkern (Gelvin, 2003). Unklar ist bisher, ob der T-Komplex bereits im *Agrobacterium* oder erst in der Pflanzenzelle ausgebildet wird (Gelvin, 2003). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass das VirE2 erst eine Funktion in der Pflanzenzelle übernimmt (Gelvin, 2003).

#### **1.3.1.4 Transport, Integration und Expression der T-DNA**

Beim Transport in den pflanzlichen Zellkern interagiert der T-Komplex mit pflanzlichen Proteinen, wie z.B. Importinen, und bildet den so genannten super-T-Komplex (Chandra, 2012) Sobald der Komplex in den Zellkern der Pflanze transportiert wurde, werden die mit dem T-Strang assoziierten Proteine entfernt und die T-DNA wird in das pflanzliche Genom eingebaut (Gelvin, 2003). Derzeit ist nicht komplett geklärt wie die Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom erfolgt. Bei diesem Vorgang scheint jedoch das VirD2 eine wichtige Rolle zu spielen (Shurvinton et al., 1992, Mysore et al., 1998).

### **1.3.2 *Agrobacterium rhizogenes***

Während die meisten *A. tumefaciens* Stämme, die in der Biotechnologie Verwendung finden, die pathogene Fähigkeit nicht mehr besitzen, ist dies bei *Agrobacterium rhizogenes* anders (Veena and Taylor, 2007). Dies ist darauf zurückzuführen, dass im T-DNA Bereich der Ri-Plasmide die Pathogenitäts-Gene nicht entfernt wurden. Im Gegensatz zur T-DNA vermittelten Tumor Induktion bei *A. tumefaciens*, werden die auf der T-DNA von

*A. rhizogenes* kodierte Proteine zur Induktion transgener Wurzeln benötigt. Auf der T-DNA von Ri-Plasmiden befinden sich die so genannten *rol*-Gene (root oncogenic loci) *rolA*, *rolB* und *rolC* (Veena and Taylor, 2007). Die Funktion der abgeleiteten Proteine der *rol*-Gene ist nicht ganz geklärt, es ist jedoch bekannt, dass sie in den Hormonhaushalt der Pflanze eingreifen (Veena and Taylor, 2007). Tabak-Pflanzen, die entweder mittels Wild Typ *A. rhizogenes* Stämmen transformiert oder aus „hairy root“ Kulturen regeneriert wurden, zeigen gekräuselte Blätter, verkürzte Internodien, reduzierte Apikaldominanz, reduzierte Fertilität und plagiotrope Wurzeln (Tepfer, 1984), was als „hairy root“ Phänotyp bezeichnet wird (Veena and Taylor, 2007). Die drei *rol*-Gene *rolA*, *rolB* sowie *rolC* erwiesen sich dabei als essentiell für die Bildung von „hairy roots“ (White et al., 1985). Neben den *rol*-Genen enthält die T-DNA des Ri-Plasmids weitere offene Leseraster (ORFs), die derzeit nur wenig charakterisiert sind. Jedoch sind einige dieser ORFs in allen bekannten Ri-Plasmiden hoch konserviert (Veena and Taylor, 2007). Ebenso wie auch die *rol*-Gene scheinen sie in die Perzeption und Transduktion unterschiedlicher Phytohormone involviert zu sein (Veena and Taylor, 2007).

Verschiedene *A. rhizogenes* Stämme besitzen unterschiedliche Ri-Plasmide, die sich je nach Art der durch die Genprodukte gebildeten Opine klassifizieren lassen (Chandra, 2012). Die Ri-Plasmide des Agropine Typs sind die am besten untersuchten Ri-Plasmide. Diese enthalten zwei T-DNAs, die als  $T_L$  und  $T_R$  bezeichnet werden (Veena and Taylor, 2007). Während die  $T_L$ -DNA die *rol*-Gene kodiert, werden auf der  $T_R$ -DNA Gene kodiert, die für die Synthese von Opinen und Auxinen verantwortlich sind (Christey, 2001). Beide T-DNAs werden unabhängig voneinander übertragen und in das Genom der Pflanze integriert (Chandra, 2012). Ri-Plasmide des Typen Cucumopin und Mannopin besitzen dagegen nur eine T-DNA auf der sowohl die *rol*-Gene als auch Gene für die Synthese der Opine kodiert werden (Veena and Taylor, 2007).

Werden anstelle von Wurzelzellen Sprosszellen durch *A. rhizogenes* infiziert, so werden diese zu Wurzelzellen transformiert. Solche Wurzeln zeigen eine untypische Verteilung der Wurzelhaare, eine stärkere Verzweigung und ein gravitationsunabhängiges Wachstum und werden als „hairy roots“ bezeichnet (Veena and Taylor, 2007). Mit Hilfe von *A. rhizogenes* kann somit die Bildung transgener Wurzeln an genetisch unveränderten Sprossen induziert werden (Hansen et al., 1989). Ein Vorteil der Chimären Komposit-Pflanzen, gegenüber der Herstellung konventioneller transgener Pflanzen, ist der deutlich geringere Zeitaufwand. So lassen sich transgene Wurzeln an Komposit-Pflanzen innerhalb nur weniger Wochen

erzeugen (Veena and Taylor, 2007), wogegen Transformation und Regeneration von Pflanzen mittels *A. tumefaciens* für holzbildende Pflanzen mehrere Monate in Anspruch nimmt (Alpizar et al., 2006).

Nach der Infektion überträgt und integriert *A. rhizogenes* die auf dem Ri-Plasmid kodierte T-DNA in das Genom der Pflanze. Die Expression der *rol*-Gene induziert dann die Ausbildung sprossbürtiger Wurzeln (Veena and Taylor, 2007).

Um diese Strategie zur gezielten Manipulation von Pflanzenwurzeln einsetzen zu können, müssen die zur Infektion verwendeten *A. rhizogenes* Stämme zuvor mit einem binären Vektor transformiert worden sein und die T-DNA des binären Vektors in das pflanzliche Genom eingebaut werden (Collier et al., 2005). Da die Agrobakterien dann zwei T-DNAs enthalten (Ri-Plasmid sowie binärer Vektor), müssen beide in das Genom der Pflanze integriert werden, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Ein solches Ereignis wird als co-Transformation bezeichnet (Alpizar et al., 2006). Die Wahrscheinlichkeit für die erfolgreiche co-Transformation ist oft von den Transformationsbedingungen und der Pflanzenart abhängig (Alpizar et al., 2006). In manchen Fällen können unterschiedliche Anzahlen der beiden T-DNAs in das Pflanzengenom integriert werden (Alpizar et al., 2006, Debeuckeleer et al., 1981). Die Effizienz der Übertragung und Integration der T-DNA scheint dabei von der Kopien-Anzahl der Vektoren in der Bakterienzelle abzuhängen. So wird die T-DNA eines Binärvektors oft effizienter in das Genom der Pflanze integriert als die des Ri-Plasmids, da die Bakterien häufig eine höhere Anzahl an Binärvektoren enthalten (5-10) als Ri-Plasmide (1) (An, 1985)

#### **1.3.2.1 Einsatzgebiet und Anwendungsmöglichkeiten der Komposit-Pflanzen**

Die transgenen Wurzeln der Komposit-Pflanzen können zur Expression von visuellen Markern wie z.B.  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., 1987) oder Fluoreszenzproteinen (FP), wie dem GFP (Haseloff et al., 1997), eingesetzt werden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, Lokalisierungsstudien in Komposit-Pflanzen zu betreiben oder die Expression von Promoter-Reportergen Konstrukten zu untersuchen (Collier et al., 2005). Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Komposit-Pflanzen ist die Funktionsanalyse mittels RNA Interferenz (RNAi) (Veena and Taylor, 2007). Die Wurzeln der Komposit-Pflanzen sind in der Lage, mit unterschiedlichen Mikroorganismen zu interagieren und werden daher für die Erforschung solcher Interaktionen eingesetzt (Veena and Taylor, 2007).

## 1.4 Entwicklung von binären Vektor-Systemen

Ti- und Ri-Plasmide sind sehr groß, liegen nur in geringer Kopienzahl im *Agrobacterium* vor und können nicht in *E. coli* repliziert werden (Lee and Gelvin, 2008). Der Befund, dass die *vir*-Gene und die T-DNA auf zwei verschiedenen Replikons kodiert werden können, die sich im gleichen Agrobakterium befinden, ermöglichte die Entwicklung des binären Systems (Lee and Gelvin, 2008, Hoekema et al., 1983, Deframond et al., 1983).

Binärvektoren, die zur Agrobakterium basierten Pflanzentransformation eingesetzt werden, müssen folgende Eigenschaften besitzen: (1) Verschiedene „*origin(s) of replication*“ (*Ori*), die die Replikation sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* erlauben; (2) einen geeigneten bakteriellen Selektionsmarker; (3) left- und right-border Sequenzen, durch die sichergestellt wird, dass die dazwischen befindliche T-DNA in das Genom der Pflanze übertragen wird; (4) eine geeignete multiple cloning site (MCS) mit Erkennungssequenzen für Endonukleasen, die die Manipulation der T-DNA ermöglichen; (5) einen pflanzlichen Marker, der zur Selektion transgener Zellen bzw. Wurzeln verwendet werden kann (Lee and Gelvin, 2008).

### 1.4.1 Die in dieser Arbeit zur Pflanzentransformation verwendeten Binärvektoren

Entscheidend für die bakterielle Replikation von Plasmiden sind die *origin of replication* (*Ori*) (Honda et al., 1991), da nicht alle *Ori* mit einem Bakterienstamm kompatibel sind (Lee and Gelvin, 2008). Die für die Replikation verantwortlichen Proteine wie z.B. Helikasen oder Primasen können Plasmide der gleichen Kompatibilitätsklasse nicht replizieren, daher kann ein Bakterium nur ein Plasmid der gleichen Unverträglichkeitsgruppe enthalten (Honda et al., 1991, Thomas and Smith, 1987). Neben der Regulation der Unverträglichkeit der einzelnen Plasmide sind die *Ori* ebenfalls für die Regulation der Anzahl an Kopien des jeweiligen Plasmids pro Zelle verantwortlich (Lin-Chao and Bremer, 1986).

#### 1.4.1.1 pGreen (Hellens et al., 2000)

Der pGreen basiert auf dem pBluescript Vektor und besitzt den *pColE1-Ori* für die Replikation in *E. coli* sowie einen *pSa-Ori* für die Replikation im *Agrobacterium*. Als bakteriellen Selektionsmarker enthält der pGreen eine Kanamycin Resistenz (Hellens et al., 2000). Durch seine geringe Größe von ca. 3000 bp und seine effizienten *Ori*, lässt sich der pGreen Vektor sehr leicht handhaben und ist gleichzeitig sehr einfach replizierbar (Hellens et al., 2000).

Üblicherweise werden die Gene, die für die Replikation des jeweiligen Binärvektors benötigt werden, auf dessen Rückgrat kodiert. Ist dies nicht der Fall, werden zusätzliche Helfer-Plasmide benötigt, die die fehlenden Gene kodieren (Hellens et al., 2000). So benötigt das *pSa-Ori* des pGreen für eine erfolgreiche Replikation im *Agrobacterium* das *pSa-repA* (Hellens et al., 2000). Einige Bakterienstämme, wie der *Agrobacterium rhizogenes* Stamm K599, besitzen ein kompatibles *repABC* Operon und benötigen daher bei Verwendung des pGreen kein Helfer-Plasmid (Cevallos et al., 2008).

#### 1.4.1.2 pBin19 (Bevan, 1984)

Der pBin19 ist mit 12 kb ein relativ großer Binärvektor und besitzt einen einzigen *Ori* (*OriV* / pRK2) für die Replikation in *E. coli* und *Agrobacterium* (Frisch et al., 1995). Es wird vermutet, dass weniger als die Hälfte der offenen Leseraster des Vektorrückgrates benötigt werden, um die Funktionsfähigkeit des pBin19 zu gewährleisten (Frisch et al., 1995). Die für die Vektorreplikation benötigten Gene werden vom *trfA* Locus auf dem Rückgrat kodiert (Frisch et al., 1995).

#### 1.4.1.3 pCAMBIA

Unter dem Namen pCAMBIA wird eine Serie von Vektoren vertrieben, die eine mittlere Größe besitzen (Vektorrückgrat ca. 6 kb). pCAMBIA Plasmide besitzen verschiedene *Oris* für die beiden Bakterienarten, in denen sie eingesetzt werden. Der in *E. coli* verwendete *ColE1* ermöglicht eine hohe Kopienzahl, während der für die Replikation im *Agrobacterium* verwendete *pVS1 Ori* eine hohe Stabilität im *Agrobacterium* gewährleistet. Da alle für die Replikation benötigten Gene auf dem Vektorrückgrat kodiert werden, entfällt die Notwendigkeit von Helfer-Plasmiden.

### 1.5 Ligase independent cloning (LIC)

Die gerichtete Integration unterschiedlicher Gene in die T-DNA Region von binären Vektoren erfolgt oft mittels Restriktionsenzymen und der nachfolgenden Ligation. Für die Klonierung von mehreren PCR-Produkten oder wenn keine geeigneten Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, wurde eine neue Methode entwickelt, die Ligase unabhängige Klonierung (LIC) (Aslanidis and Dejong, 1990).

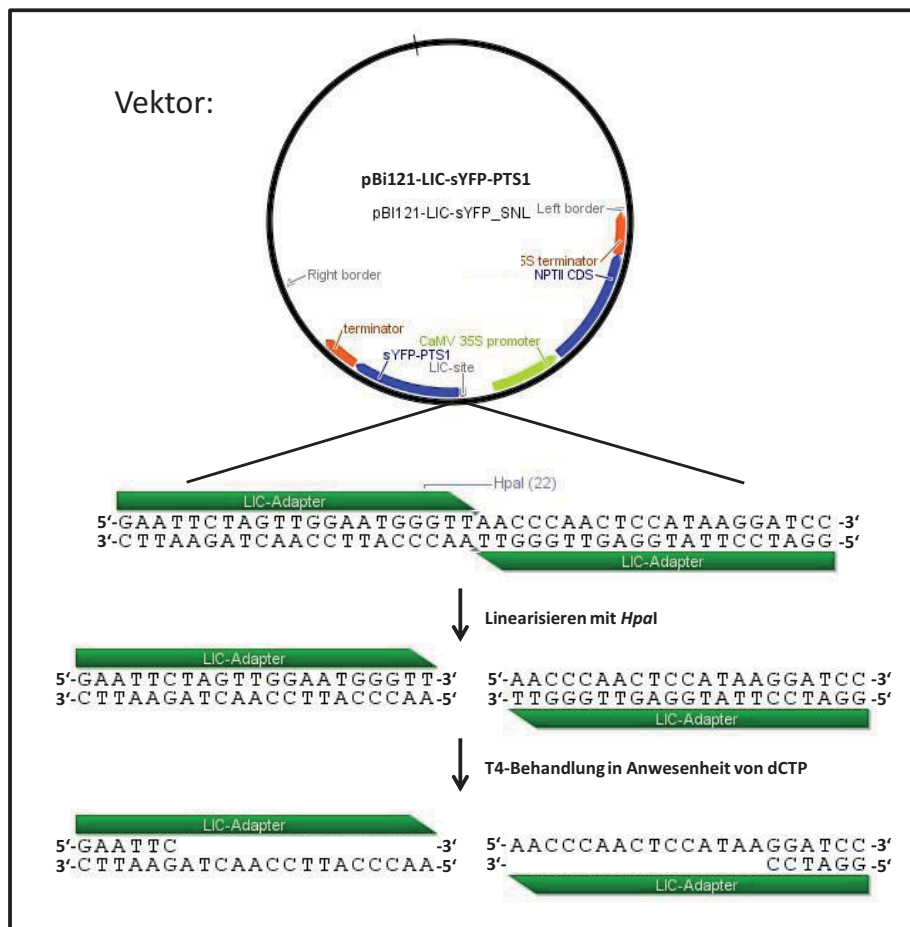
Ausgenutzt wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, die neben ihrer 5'-3' Polymerasehäufig auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzen. Wenn linearisierte doppelsträngige DNA zusammen mit T4-DNA Polymerase und nur einem der vier Desoxynukleotid triphosphaten (dNTP) inkubiert wird, wird die DNA durch die Exonukleaseaktivität so lange



abgebaut, bis ein Nukleotid erreicht wird, das durch die DNA-Polymeraseaktivität ersetzt werden kann. Da dies an beiden Enden erfolgt, können so einzelsträngige 5'-Überhänge erzeugt werden (De Rybel et al., 2011).

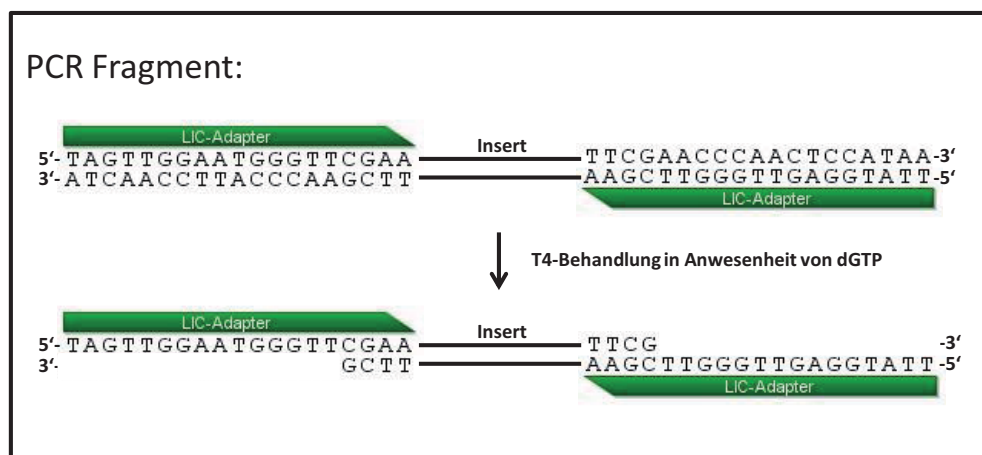
Für das LIC wurde die Multiple Cloning Site (MCS) des entsprechenden Vektors so modifiziert, dass ausgehend von einer singulären Schnittstelle erst in einer Entfernung von 15 Basenpaaren in beiden Richtungen eine bestimmte Base (z.B. Cytosin) auftritt. Wenn sich die DNA-Sequenz auf beiden Seiten der Schnittstelle unterscheidet, führt eine Behandlung mit T4-DNA Polymerase in Anwesenheit von CTP zur Bildung von nicht kompatiblen, 15 bp langen 5'-Überhängen (Abbildung 1). Für die PCR-Amplifikation eines Inserts werden Primer verwendet, die am 5'-Ende komplementär zur Ziel DNA (17-19 bp) sind (De Rybel et al., 2011).

Zusammengefasst lässt sich das LIC-System in folgende Schritte unterteilen: (I) Linearisierung des Vektors (Abbildung 1), (II) Amplifikation des Inserts (Abbildung 2), (III) Erzeugung der Einzelstrang DNA-Überhänge am Insert und Vektor (Abbildung 3), (IV) Hybridisierung der Überhänge an Insert und Vektor (De Rybel et al., 2011).



**Abbildung 1: Erzeugung einzelsträngiger LIC-Überhänge an einem LIC-Vektor.**

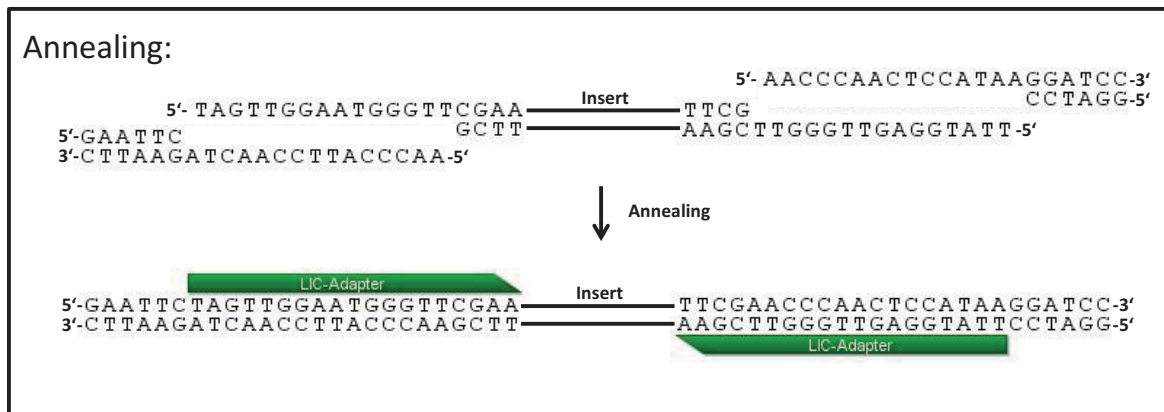
Die Linearisierung wird mittels einer singulären Restriktionsschnittstelle (hier *HpaI*) durchgeführt. Anschließend erfolgt die Generierung der einzelsträngigen Überhänge durch die 3'-5' Exonuklease Aktivität der T4-DNA Polymerase in Anwesenheit von dCTP (nach De Rybel et al., 2011 mit Veränderungen).



**Abbildung 2: Erzeugung einzelsträngiger LIC-Überhänge am Insert.**

Das Insert wird mittels einer PCR amplifiziert, dabei werden mittels Überhang-Primer LIC-Adapter an das Insert angefügt. Anschließend werden die einzelsträngigen Überhänge mittel 3'-5' Exonuklease Aktivität der T4-DNA Polymerase, in Anwesenheit von dGTP, generiert (nach De Rybel et al., 2011 mit Veränderungen).





**Abbildung 3: Hybridisierung der ssDNA Überhänge von Insert und Vektor.**

Nach der Generierung der einzelsträngigen Überhänge erfolgt das Annealing. Da die einzelsträngigen Überhänge des Vektors nicht komplementär sind, kann nur ein zirkulärer Vektor entstehen, wenn die Überhänge des Vektors und des Inserts zusammenfinden. Anschließend kann der zusammengesetzte Vektor zur Transformation von Bakterien verwendet werden. (nach De Rybel et al., 2011 mit Veränderungen).

## 1.6 Mykorrhizen

Basierend auf seinen Beobachtungen an Flechten führte de Bary 1887 erstmals den Begriff der Symbiose ein, der damals sowohl die mutualistische Interaktion als auch den Parasitismus umfasste (Smith and Read, 2008). Oft können parasitische oder mutualistische Interaktionen unterschieden werden, allerdings ist dies häufig auch ein dynamischer Prozess, bei dem in bestimmten Fällen auch von einer mutualistischen Interaktion zum Parasitismus umgeschwenkt wird (Smith and Read, 2008).

Eine für die Evolution der landlebenden Pflanzen sehr wichtige Form der Symbiose ist die Mykorrhiza (aus dem altgriechischen „*mykēs*“ für Pilz und „*rhiza*“ für Wurzel), die zwischen Pilzen und Pflanzen ausgebildet wird (Smith and Read, 2008). Es wird angenommen, dass die Besiedelung terrestrischer Räume durch die Pflanzen erst durch die Interaktion mit Pilzen ermöglicht wurde (Nicolson, 1975). Durch das weitreichende Hyphennetzwerk ist der Pilz in der Lage die Pflanze mit notwendigen Nährstoffen und Wasser zu versorgen. Im Gegenzug erhält der Pilz von seinem photoautotrophen Symbiosepartner leicht verwertbare Kohlenhydrate (Smith and Read, 2008). Diese mutualistische Interaktion ermöglicht es beiden Partnern nährstoffarme Gebiete zu kolonisieren (Nehls and Bodendiek, 2012).

Heute sind sieben verschiedene Typen der Mykorrhiza bekannt: (i) Arbuskuläre Mykorrhizen (AM), (ii) Ektomykorrhizen (ECM), (iii) Ektendomykorrhizen (EEM), (iv) Orchideenmykorrhiza (ORM), (v) Ericoide Mykorrhiza (ERM), (vi) Monotrope Mykorrhiza und (vii) Arbutoide Mykorrhiza (Smith and Read, 2008). Im weiteren Verlauf soll lediglich auf die ECM näher eingegangen werden.

### 1.6.1 Ektomykorrhiza ECM

Das Ökosystem Wald hat eine enorme Bedeutung für die Menschheit, aus ökologischer aber auch aus ökonomischer Sicht (Nehls and Bodendiek, 2012). Damit die Funktion der Wälder unserer Erde weiterhin erhalten bleibt, ist die mutualistische Interaktion zwischen den Pflanzen und Bodenpilzen, die Ektomykorrhiza, essentiell (Smith and Read, 2008). Ektomykorrhizen werden vorwiegend zwischen im Boden lebenden Pilzen und den Feinwurzeln von holzbildenden Pflanzen ausgebildet (Smith and Read, 2008). Es wird geschätzt, dass ca. 3% aller Samenpflanzen in der Lage sind, Ektomykorrhizen auszubilden (Meyer, 1973). Während die Anzahl der Arten von ECM bildenden Pflanzen relativ gering ist, führt ihre enorme Verbreitung insbesondere in der nördlichen Hemisphäre zu ihrer ökonomischen und ökologischen Bedeutung (Smith and Read, 2008). So dominieren die *Pinaceae* die Nadelwälder der nördlichen Hemisphäre, die ca. 17% der gesamten Landmasse der Erde bedecken (Rodin et al., 1975). In den Wäldern der gemäßigten Zone, in der nördlichen, sowie in manchen Wäldern der südlichen Hemisphäre und in tropischen Wäldern sind hingegen die *Fagaceae* stark verbreitet (Newbery et al., 1988, Smith and Read, 2008).

Aus der Sicht der Pflanze sind Stickstoff und Phosphat limitierende Nährstoffe, da sie im Waldboden oft in der organischen Schicht fixiert oder in Mikroorganismen enthalten und damit für die Pflanze nicht zugänglich sind (Smith and Read, 1997). Umgekehrt fehlen den entsprechenden Bodenpilzen leicht verwertbare Kohlenhydrate. Die Bildung von Ektomykorrhizen erlaubt es beiden Partnern, den Limitierungen nährstoffarmer Böden zu entgehen und Gebiete zu besiedeln, die für andere Arten unzugänglich bleiben. Als Konsequenz sind beide Partner aufeinander angewiesen und sind nur unter idealen Bedingungen, die in der Natur so gut wie nie vorkommen, dazu in der Lage, ohne einander auszukommen (Nehls and Bodendiek, 2012).

Die Wirtsspezifität ist bei der Ausbildung von Ektomykorrhizen häufig nur gering ausgeprägt. Die meisten Pflanzen können daher eine Symbiose mit mehreren Pilzarten gleichzeitig eingehen (Smith and Read, 2008). Es wird vermutet, dass dies dazu führt, dass der Pflanze der Zugang zu einer größeren Nährstoff Variation ermöglicht wird (Molina et al., 1992). Viele Waldbäume (*Pinaceae*, *Fagaceae*, *Myrtaceae* und *Dipterocarpaceae*) spezialisieren sich jedoch auf Ektomykorrhizen als einzigen Mykorrhiza-Typ.

Anatomisch unterscheiden sich Ektomykorrhizen durch drei verschiedene Merkmale von anderen Mykorrhiza-Formen: (i) einen Hyphen-Mantel, der die komplette infizierte Feinwurzel umschließt, (ii) ein Hyphennetzwerk, das in den Apoplasten der Rhizodermis

einwächst (das Hartigsche Netz) und (iii) ein sich im Boden befindliches stark verzweigendes und weitreichendes, Hyphennetzwerk des Pilzes (Smith and Read, 2008).

Die Bildung der Ektomykorrhiza erfolgt, wenn neue Feinwurzeln die Rinde der Trägerwurzel durchbrechen. Der Pilz erkennt die neu gebildete Feinwurzel und wächst in ihre Richtung (Martin et al., 2001). Nachdem der Kontakt zwischen der Feinwurzel und dem Myzel ausgebildet wurde, umschließt das Myzel die Feinwurzel vollkommen und schließt sie damit von ihrer natürlichen Umgebung ab (Blasius et al., 1986). Wurzelhaare, die normalerweise aus der Rhizodermis ausgebildet werden, werden durch die Bildung von ECM unterdrückt (Nehls and Bodendiek, 2012). Gleichzeitig mit der Umschließung der Feinwurzel beginnt das Myzel in den Apoplasten der Rhizodermiszellen hineinzuwachsen und sich dort stark zu verzweigen (Kottke and Oberwinkler, 1986). Das so entstandene Hartigsche Netz dient vermutlich dem Austausch von pilzlichen Nährstoffen und pflanzlichen Kohlenhydraten (Nehls and Bodendiek, 2012). Es ist derzeit kaum verstanden, wie der Pilz die Feinwurzel der Pflanze erkennt. Es gibt Hinweise darauf, dass Wurzeln Substanzen ausscheiden (Norton et al., 1990), die vom Pilz wahrgenommen werden können (Smith and Read, 2008). Neben Kohlenhydraten kommen auch andere Signalmoleküle, vor allem pflanzliche Sekundärmetabolite, in Frage (Smith and Read, 2008).

An der Oberfläche der Wurzel verändert sich die Morphologie der Hyphen deutlich. So verzweigen sie sich stärker und es kommt vermehrt zur Hyphen-Fusion (Jacobs et al., 1989). Der Kontakt zwischen Pflanzenwurzel und Pilz erfolgt direkt hinter der Wurzelhaube, von dort aus wachsen die Hyphen basipetal und akropetal, und umschließen die gesamte Feinwurzel (Smith and Read, 2008). An der Wurzelspitze muss der Pilzmantel ständig erweitert werden, um mit dem Spitzenwachstum der Feinwurzel Schritt halten zu können (Smith and Read, 2008). Durch den Hyphen-Mantel wird die Feinwurzel von der Außenwelt abgeschnitten, so dass der Wasser- und Stofftransport nun hauptsächlich über den Pilz erfolgen. Gleichzeitig mit der Ausbildung des Hyphen-Mantels, beginnen Hyphen in den Apoplasten der Rhizodermis Zellen einzudringen. Bei der Auswahl der Infektionsstelle scheint die Zusammensetzung der Zellwand (Pektin-Zellulose Verhältnis) eine wichtige Rolle zu spielen (Duddridge and Read, 1984). Nach dem Eindringen in den Apoplasten wird das Hartigsche Netz ausgebildet. Das Hartigsche Netz bildet die Kontaktfläche zwischen Symbiont und Wirt und dient dem Austausch von Nährstoffen und Kohlenhydraten (Nehls and Bodendiek, 2012). Um diese Kontaktfläche möglichst groß zu halten, haben verschiedene Pflanzen unterschiedliche Strategien entwickelt (Smith and Read, 2008). Die meisten

Vertreter der Angiospermen Pflanzen bilden ein „epidermales Hartigsches Netz“ aus (Godbout and Fortin, 1983). Dieses wird dadurch gekennzeichnet, dass das Hartigsche Netz nur die äußerste Zellschicht der Wurzel, die Rhizodermis, umschließt. Um dennoch eine möglichst große Kontaktfläche zu erzielen, verlängern sich die Zellen der Rhizodermis in der ECM radial (Smith and Read, 2008). Vertreter der Gymnospermen Pflanzen zeigen hingegen oft ein Hartigsches Netz, das mehrere Zellschichten umschließt und manchmal bis zur Endodermis reicht (kortikales Hartigsches Netz) (Smith and Read, 2008). Diesen Typ des Hartigschen Netzes findet man in seltenen Fällen auch bei Vertretern der Angiospermen Pflanzen wie z.B. der *Cistaceae* (Giovannetti and Fontana, 1982).

### 1.6.2 Die pilzliche Zuckerversorgung in der ECM Symbiose

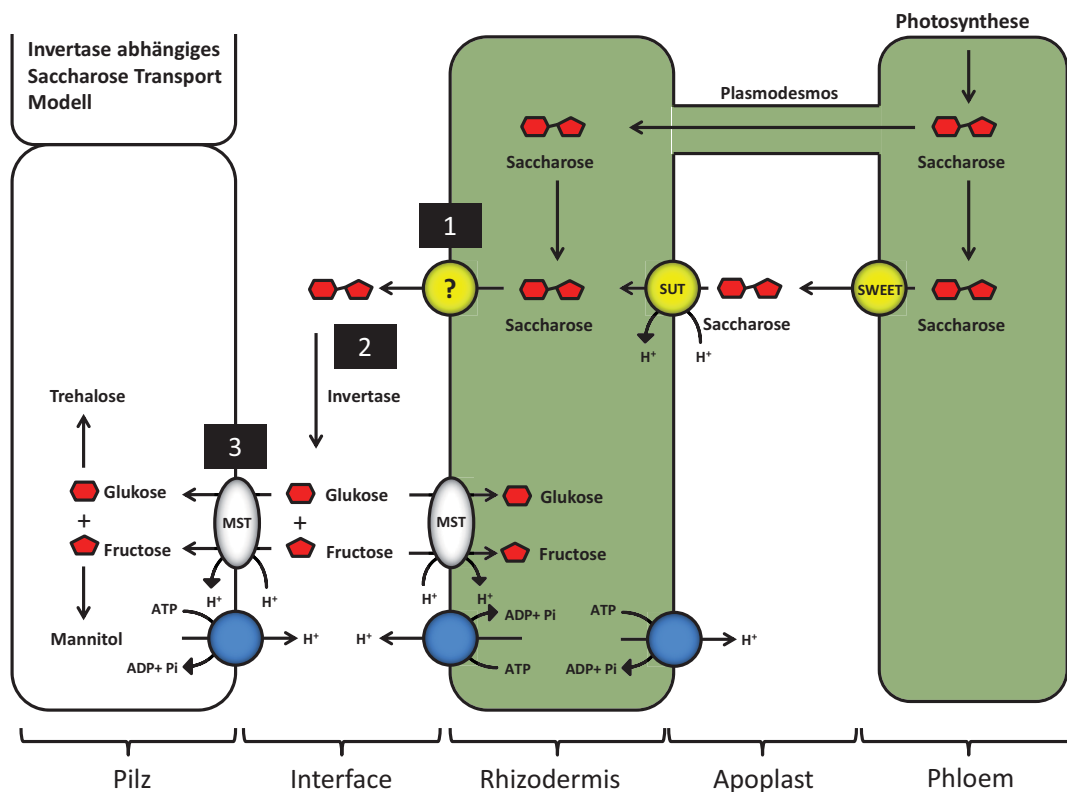
In der Ektomykorrhiza werden für die Pflanze wichtige Nährstoffe, wie Phosphat und Stickstoff, gegen für den Pilz wichtige, leicht verdaubare Kohlenhydrate (einfach- oder mehrfach-Zucker) ausgetauscht (Nehls and Bodendiek, 2012). Daneben wird die pflanzliche Wasserversorgung durch den Pilzpartner verbessert (Smith and Read, 2008).

Bei Fütterungsversuchen, mit  $^{14}\text{C}$  markiertem  $\text{CO}_2$ , konnte gezeigt werden, dass photosynthetisch gebundener Kohlenstoff von der Pflanze an den Pilz abgegeben wird (Melin and Nilsson, 1957). Es wird angenommen, dass der in der Photosynthese gebundene Kohlenstoff in Form von Saccharose auf symplastischem Wege in die Wurzeln transportiert wird (Zimmerman, 1961). Die von der Pflanze abgegebenen  $^{14}\text{C}$  markierten Kohlenhydrate tauchten in Form von Trehalose und Mannitol im Pilz wieder auf (Lewis and Harley, 1965). Während die Ausscheidungen einer normalen Wurzel zwischen 3 und 5% des photosynthetisch gebundenen Kohlenstoffs ausmachen, werden in einer ECM zwischen 8 und 17% der Photosynthese Produkte an den Pilz abgegeben (Hobbie and Hobbie, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass abgeschnittene ECM Feinwurzeln eine erhöhte Zuckeraufnahmefähigkeit (Saccharose) besitzen, die aus dem hohen Bedarf an Kohlenstoff des Pilzes resultiert (Lewis and Harley, 1965). Zucker-Importkapazität konnte für ausgewählte Modellpilze in der ECM Symbiose nachgewiesen werden (Nehls et al., 1998). Nach wie vor bleibt jedoch nicht ganz verstanden, welche molekularen Anpassungen in der Pflanze stattfinden und welcher Zucker an den Pilz abgegeben wird.

Ein hypothetisches Modell des Pflanzen-Pilz-Interfaces wurde entwickelt, bei dem Saccharose oder Glukose von der Pflanze an den Pilz abgegeben wird (Smith and Smith, 1989). Frühe Untersuchungen, die die Anwesenheit von pflanzlichen, zellwandgebundenen

Invertasen in Ekto- und Endomykorrhizen bestätigten, führten zu der Annahme, dass Saccharose von der Pflanze exportiert (Abbildung 4-1) und im Apoplasten von pflanzlichen Invertasen gespalten wird (Abbildung 4-2). Die resultierenden Monosaccharide werden dann durch den Pilz aufgenommen (Nehls, 2008, Smith and Read, 2008, Schaeffer et al., 1997) (Abbildung 4-3).



**Abbildung 4: Invertase abhängiges Saccharose Transport Modell in einer ECM.**

Die Saccharose wird in der Photosynthese synthetisiert und über das Phloem in die Wurzeln transportiert. Von hier aus wird die Saccharose symplastisch oder apoplastisch zur Rhizodermis und damit zum Interface zwischen Pilz und Pflanze transportiert. Der Saccharose-Export aus den Rhizodermis-Zellen in das Interface zwischen Pflanze und Pilz geschieht passiv mit Hilfe eines unbekanntes Facilitators (Jones and Darrah, 1996) (1). Im Apoplasten des Ektomykorrhiza Interface wird die Saccharose von pflanzlichen, zellwandgebundenen Invertasen hydrolysiert (2). Die durch die Hydrolyse gebildeten Monosaccharide, Fructose und Glukose, können von der Pflanze und dem Pilz aufgenommen werden (3). Der Pilz nimmt verstärkt Glukose auf und wandelt diese zur Speicherung in Trehalose um. Der Pilz kann ebenfalls Fructose aufnehmen, dies geschieht aber nur, wenn keine Glucose mehr vorhanden ist. Zur Speicherung kann die aufgenommene Fructose zu Mannitol umgewandelt werden. Zur Regulation der Kohlenhydratabgabe kann auch die Pflanze aktiv Glukose und Fructose importieren. Dadurch entsteht eine Konkurrenzreaktion, durch die ein möglicher Parasitismus verhindert wird.

Dass der Export von Saccharose in den Apoplasten der Pflanze tatsächlich erfolgen kann, wurde erstmals von Carpaneto et al (2005) am Beispiel des Saccharose-H<sup>+</sup> Symporters *ZmSUT1* gezeigt (Carpaneto et al., 2005). Jedoch ist der Export nur bei sehr hohen Saccharose Konzentrationen von ca. 50 mM möglich. Da so hohe Saccharose-Konzentrationen in nicht kolonisierten Wurzeln der Fichte nicht erreicht werden (max. 10 mM) (Schaeffer et al., 1995), ist ein solcher Saccharose Exportmechanismus in ECM eher unwahrscheinlich (Nehls and

Bodendiek, 2012). Darüber hinaus konnte keine erhöhten Expressionen der *SUT*-Gene in ECM festgestellt werden (Nehls, unveröffentlicht).

Wie von Jones (1996), für nicht mykorrhizierte Pflanzen, gezeigt werden konnte, erfolgt der Zuckerausport in nicht ECM Wurzeln passiv (Jones and Darrah, 1996). Tatsächlich wurden potentielle Saccharose Facilitatoren in *Leguminosen* im Zusammenhang mit der Samenbildung beschrieben (Zhou et al., 2007). Allerdings ließen sich in Pappeln keine entsprechenden Homologe identifizieren (Nehls and Bodendiek, 2012). 2010 entdeckten Chen et al. die so genannten *SWEET*-Gene (*SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTER*), die in der Folge als Facilitatoren beschrieben wurden und in der Lage sind, Glukose oder Saccharose entsprechend einem Konzentrationsgradienten zu transportieren (Chen et al., 2010). Somit könnten die *SWEET*-Facilitatoren in die Zuckerversorgung des Pilzes in einer ECM involviert sein.

Nach dem Saccharose-Export in den Apoplasten muss diese von pflanzlichen Invertasen hydrolysiert werden, da die meisten Ektomykorrhiza bildenden Pilze, im Gegensatz zu pathogenen Pilzen, dazu selbst nicht in der Lage sind (Lewis and Harley, 1965, Hampp et al., 1995). PCR basierende Genom-Untersuchungen von Ektomykorrhiza bildenden *Basidiomyceten* haben gezeigt, dass ihnen sowohl Saccharose-Transporter als auch Invertasen fehlen (Parrent and Vilgalys, 2009). Allerdings wurden zellwandgebundene pflanzliche Invertasen identifiziert (Salzer and Hager, 1993). Sie zeigen bei einem niedrigen pH-Wert (zwischen 3,5 und 4,5) ihr Aktivitätsoptimum und werden durch Fruktose inhibiert (Salzer and Hager, 1993). Zumindest in Fichte konnte in ECM jedoch keine, gegenüber nicht mykorrhizierten Feinwurzeln, erhöhte Invertase Aktivität festgestellt werden (Schaeffer et al., 1995). In Pappeln wurde zwar eine Erhöhung der Invertasen Transkriptmenge beobachtet, jedoch nur in der Wurzelspitze, wo kein Hartigsches Netz ausgebildet wird und die Invertasen damit wahrscheinlich lediglich der Entwicklung der Wurzel dienen (Nehls et al., 2010).

Da die pflanzliche Zuckerabgabe mit der pilzlichen Nährstoffversorgung gekoppelt werden soll, ist eine Kontrolle der Zuckerabgabe unerlässlich, da sich ansonsten eine parasitische Beziehung entwickeln kann. Ein möglicher Kontrollmechanismus ist die potentielle Wiederaufnahme der im Apoplasten freigesetzten Monosaccharide durch die Pflanze (Nehls, 2004). Diese Wiederaufnahme von Glukose und Fruktose kann durch Monosaccharidtransporter (MST) bewerkstelligt werden und erfolgt unter Energieverbrauch (Nehls U. et al., 2016). Tatsächlich konnten bereits ECM induzierte Hexose-Importer in



Pappeln identifiziert werden (Grunze et al., 2004). Die Alternative besteht in einer strikten Kontrolle des Zuckerexports.

## 1.7 Zuckertransporter

Zucker sind nicht nur für die Bereitstellung und Speicherung von Energie von besonderer Bedeutung, sondern auch für das zelluläre Wasserpotential, als Signal-Stoffe und als Skelett für Biosynthesen (Chen et al., 2015).

Pflanzenzellen können eine Vielzahl unterschiedlicher Zuckertransporter enthalten, die aufgrund von Phylogenetischen Analysen in folgende Gruppen eingeteilt werden (Chen et al., 2015): „Sugars will eventually be exported transporter“ (*SWEET*) mit ca. 20 Isoformen in *Arabidopsis*; „Sucrose transporter“ (*SUT*) mit ca. 5-10 Isoformen in *Arabidopsis*; „Sugar transporter“ (*STP*) mit ca. 14 Isoformen; „tonoplast monosacharide transporter“ (TMT) mit einer Isoform; „Early Response to dehydration-like“ (*ERD6-like*) mit einer Isoform; „Plastidic Glucose Transporter 1“ (*AtpGlc1*) mit einer Isoform sowie „Vacuolar Glucose Transporter“ (*VGT*) mit einer Isoform (Lalonde et al., 2004). Neben ihrer evolutionären Herkunft unterscheiden sich diese Transporterfamilien im Substratspektrum, ihrer subzellulären Lokalisation, ihrer Struktur und ihrem Transportmechanismus. So können Zucker aktiv und unter Energieverbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden (Transporter) oder passiv mit einem bestehenden Konzentrationsgradienten (Facilitatoren) (Chen et al., 2015).

Neben dem Eigenverbrauch sowie als Signalkomponenten spielen Zucker auch eine herausragende Rolle bei der Interaktion zwischen Pflanzen und anderen Organismen. So werden Zucker z.B. für die Nektarherstellung verwendet, um Insekten anzulocken (Chen et al., 2015). Ebenso sind Pflanzen dazu in der Lage, verschiedene Kohlenhydrate in die Rhizosphäre abzugeben, um mögliche Symbiosepartner anzulocken (Bisseling et al., 2009). Symbiotische aber auch parasitäre Organismen können die Expression bestimmter Zuckerexporter induzieren und damit die Kohlenhydrat Abgabe verstärken (Cohn et al., 2014). Mit der Entdeckung der *SWEET*-Gene wurden Zucker Facilitatoren identifiziert, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Pflanzen mit unterschiedlichen Organismen spielen (Chen et al., 2015). Neben den in dieser Arbeit behandelten *SWEET*-Genen konnten in Pappeln ECM regulierte Monosaccharidtransporter (MST) identifiziert werden, die eine Rolle in der Interaktion mit Mikroorganismen spielen könnten (Grunze et al., 2004).

### 1.7.1 Pflanzliche Monosaccharidtransporter

Monosaccharidtransporter (MST) können unterschiedliche Monosaccharide aktiv transportieren (Gogarten and Bentrup, 1989). Ein aktiver Transport erfolgt immer unter Energieverbrauch und kann dazu genutzt werden, Stoffe gegen einen bestehenden Konzentrationsgradienten zu transportieren und so in einem Gewebe bzw. Zellkompartiment anzureichern (Büttner and Sauer, 2000). Pflanzliche MS-Transporter besitzen üblicherweise 12 Transmembrandomänen und können durch Sequenzhomologie in sieben Unterfamilien eingeteilt werden (Büttner, 2007, Marger and Saier, 1993). Bis heute konnte eine Vielzahl an pflanzlichen MST-Genen identifiziert werden, die unterschiedliche Aufgaben in der Pflanze bewältigen (Chen et al., 2015). So können einige MS-Transporter der Pappel in die Regulation der Kohlenhydratabgabe in einer ECM involviert sein (Wittulsky, unveröffentlicht). ECM induzierte *MST*-Gene der Pappel sollen daher auch im Rahmen dieser Arbeit auf eine mögliche Funktion in der ECM untersucht und diskutiert werden.

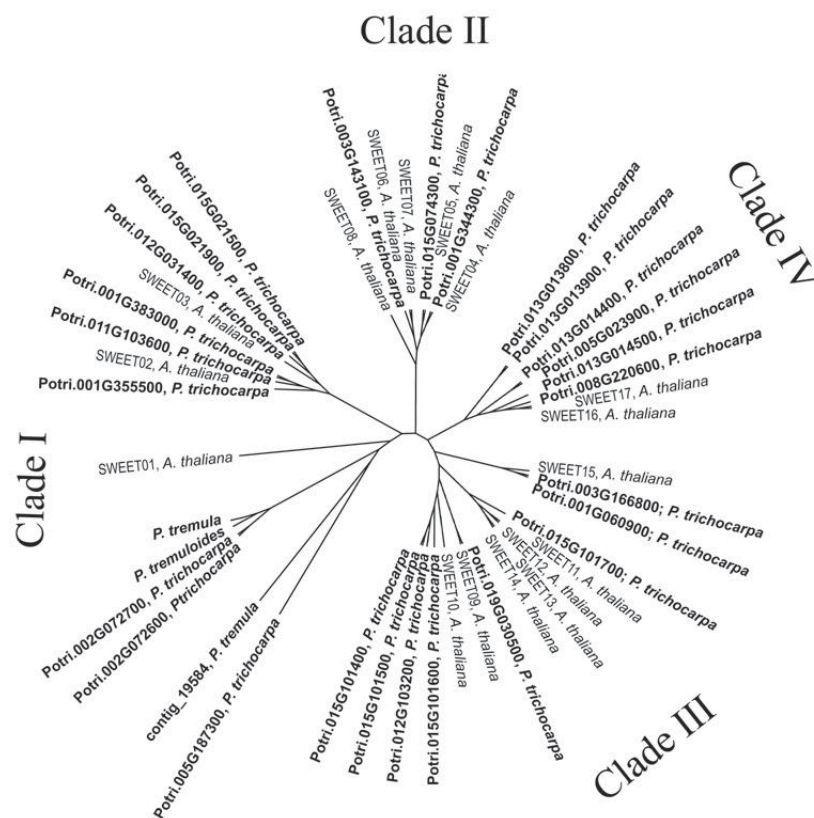
### 1.7.2 *SWEET* „SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTER“

Die *SWEET*-Genfamilie wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt (Chen et al., 2010). Die abgeleiteten Proteine der *SWEET*-Gene konnten als Zucker-Facilitatoren beschrieben werden (Chen et al., 2010). Aufgrund der sehr weiten Verbreitung, neben eukaryotischen Lebensformen (Pilzen, Pflanzen und Tieren) kommen Homologe auch in Prokaryoten (*SemiSWEET*) vor, so kann von einer sehr alten Genfamilie ausgegangen werden (Chen et al., 2015). Eukaryotische Zellen kodieren oft mehrere Isoformen der *SWEET*-Gene, die sich in Regulation, Transportkinetik und Substratspezifität unterscheiden. Das Genom von *Arabidopsis* enthält ca. 20 *SWEET*-Gene (Chen et al., 2015), während im Genom von *Populus trichocarpa* 26 *SWEET*-Gene identifiziert wurden (Neb et al., in Vorbereitung). Viele dieser Facilitatoren sind bei *Arabidopsis* in der Plasmamembran lokalisiert, allerdings können andere *SWEET*-Gene auch in den intrazellulären Zuckertransport involviert sein (Chen et al., 2015). Typisch für diese Transporter ist ihre Fähigkeit, Mono- und Disaccharide mittels erleichterter Diffusion zu transportieren (Chen et al., 2015). Obwohl die bisher untersuchten Proteine häufig eine hohe Selektivität für einzelne Zucker besitzen, verfügen sie nur über eine geringe Affinität zu ihren speziellen Substraten und zeigen in der Regel  $K_m$ -Werte im mM Bereich (Chen et al., 2015).

Die abgeleiteten Proteine der bekannten *SWEET*-Gene aus *A. thaliana* und *Populus* lassen sich anhand ihrer Sequenz in vier Untergruppen (Clades) unterteilen (Abbildung 5), die mit



funktionellen Unterschieden korrelieren, wodurch gewisse Funktionsvorhersagen über Homologe aus anderen Organismen möglich sind (Chen et al., 2015). So zeigen die bisher untersuchten SWEET-Facilitatoren des Clade I/II eine hohe Spezifität für Glukose (Chen et al., 2010), während die Mitglieder des Clade III unter anderem auch Saccharose transportieren können (Chen et al., 2012). Zwei der untersuchten SWEET-Facilitatoren aus Clade IV zeigen eine Selektivität für Fructose und sind im Tonoplasten lokalisiert, wogegen die Mitglieder der meisten anderen Gruppen vor allem in der Plasmamembran vorhanden sind (Guo et al., 2014).



**Abbildung 5:** Dendrogramm der SWEET-Gene aus *A. thaliana* und *Populus trichocarpa* bzw. *P. tremuloides*.

Die abgeleiteten Proteine der SWEET-Gene aus *Populus* und *Arabidopsis* können, mit Hilfe von Sequenzhomologien, in vier Clades eingeteilt werden (Neb et al., in Vorbereitung).

### 1.7.2.1 Struktur

Als integrale Membranproteine besitzen SWEET-Facilitatoren mehrere Transmembrandomänen. Während die vermutlich ursprünglichen bakteriellen SemiSWEET-Proteine lediglich über drei membranständige alpha-helicale Domänen verfügen, sind es bei Eukaryoten sechs bis sieben. Vermutlich sind die eukaryotischen Proteine das Ergebnis einer Genduplikation eines prokaryotischen Vorläufers, da die TM 1-3 und 5-7 eine konservierte Sequenz besitzen und von einer vierten, weniger konservierten TMD verbunden werden (Chen et al., 2015). Es wird vermutet, dass die bakteriellen SemiSWEET-Proteine ein Dimer

ausbilden, um eine funktionsfähige Pore zu erzeugen (Xuan et al., 2013). Diese Annahme wurde durch die Aufklärung der Kristallstruktur eines SemiSWEET-Proteins bestätigt (Chen et al., 2015). Experimente mit Hilfe von split ubiquitin und split GFP (green fluorescent protein) deuten aber auch bei Eukaryoten auf die Ausbildung von Homo- und Hetero-Oligomeren hin (Chen et al., 2015). Weiterhin führt die Co-Expression eines nicht funktionsfähigen *SWEET*-Gens und eines funktionellen *SWEET*-Gens in *Arabidopsis* zum Verlust der Transporter-Funktion des Wild Typ Proteins (Xuan et al., 2013). Diese Untersuchung unterstützt die Theorie der Bildung funktioneller Oligomere (Chen et al., 2015).

Es wird vermutet, dass die SWEET-Facilitatoren einen extrazellulären N-Terminus und einen cytosolischen C-Terminus besitzen. Der C-Terminus kann dabei zwischen 16 und 120 Aminosäuren lang sein und ist zwischen den einzelnen Isoformen der SWEET-Proteine nur wenig konserviert (Chen et al., 2015). Es wird postuliert, dass der C-Terminus als mögliche Bindestelle für andere Proteine, z.B. regulierende Komponenten dient (Chen et al., 2015). Weiterhin sind auf dem cytosolischen C-Terminus mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen vorhanden. Wie anhand des *AtSWEET11* bereits gezeigt werden konnte, wird der C-Terminus des Proteins tatsächlich phosphoryliert (Niittylae et al., 2007). Die Auswirkungen der Phosphorylierung auf die SWEET-Proteine sind bisher jedoch nicht untersucht.

### 1.7.2.2 Transport

Die bisher gesammelten Daten deuten auf eine mögliche Funktion der SWEET-Proteine als Uniporter bzw. bidirektionale Facilitatoren hin, was für einige SWEET-Facilitatoren bereits mittels Transportstudien gezeigt werden konnte (Cehn et al., 2015; Nehls et al., in Vorbereitung). Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass SWEET-Facilitatoren möglicherweise auch eine Funktion als co-Transporter besitzen können (Chen et al., 2015).

Analysen der Kristallstruktur des VsSemiSWEET-Proteins haben eine nach außen offene Struktur gezeigt, während die Analyse der abgeleiteten Proteine von *LbSemiSWEET* und *TySemiSWEET* eine geschlossene Konformation aufwiesen. In dieser geschlossenen Konformation waren die Protomere um 10°C geneigt, was darauf hin deutet, dass SemiSWEET-Facilitatoren und dementsprechend auch ihre eukaryotischen Homologe während des Transportes einer Strukturänderung unterlaufen. Dementsprechend würden die SWEET-Facilitatoren als Carrier und nicht als Kanäle funktionieren (Chen et al., 2015).

SWEET-Facilitatoren wurden bisher immer mit der Abgabe von Zuckern aus der Zelle und mit der interzellulären Verteilung von Zuckern diskutiert. Hierfür spricht insbesondere die Lokalisierung der Proteine in der Plasmamembran, im ER oder im Golgi (Chen et al., 2010).

### 1.7.2.3 Phloem Beladung

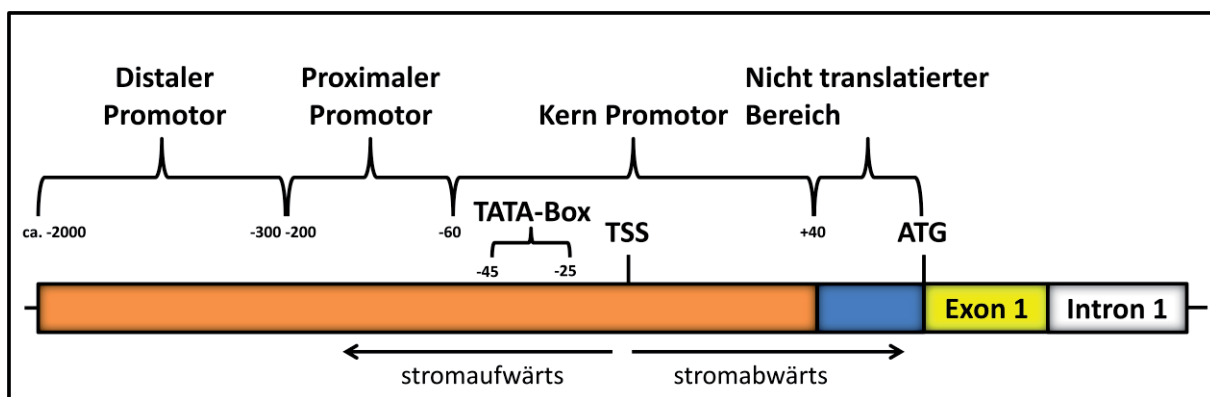
In Pflanzen sind nur einige Gewebe dazu in der Lage, Zucker durch Photosynthese zu produzieren, während die anderen Gewebe auf diese Zucker angewiesen sind (Chen, 2014). Beim Transport von Saccharose aus dem Mesophyll der Blätter in die Siebröhren, haben manche Pflanzen einen apoplastischen Zwischenschritt etabliert (apoplastische Belader). Hierbei wird Saccharose, die über symplastische Verbindungen ins Phloemparenchym gelangt, über die Plasmamembran in den Apoplasten entlassen. An diesem Schritt sind die SWEET-Facilitatoren beteiligt (Chen et al., 2012). Anschließend wird der Siebröhren/Geleitzellen-Komplex durch *SUTs* mit Saccharose beladen (Chen et al., 2012).

### 1.7.2.4 Versorgung von Interaktionspartnern

Die Expression des *OsSWEET11* wird durch das Pathogen *Xanthomonas oryzae* induziert (Chen et al., 2010). Dies erfolgt durch TAL (transcriptional activator-like) Effektoren, die direkt mit dem Promotor des betroffenen *SWEET*-Gens interagieren und die Expression dieses Gens induzieren können (Yang et al., 2006). Dadurch wird Glucose in den Apoplasten entlassen und dient der Versorgung des pathogenen Organismus (Chen et al., 2010). Doch nicht nur für Pathogene ist die Versorgung mit leicht metabolisierbaren Kohlenhydraten wichtig, sondern auch für eine Vielzahl von Organismen, die durch eine mutualistische Interaktion mit der Pflanze interagieren können (Smith and Read, 2008). So konnte in einer Genom-weiten Expressionsanalyse gezeigt werden, dass drei von 26 identifizierten *SWEET* Genen von *Populus trichocarpa* durch Mykorrhizierung induziert werden (Nehls, unveröffentlicht). Mittels vergleichender Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Gene in ektomykorrhizierten Feinwurzeln, im Vergleich zu nicht mykorrhizierten Feinwurzeln, sehr stark hochreguliert werden. Weiterhin werden diese Gene in keinen anderen vegetativen Organen exprimiert (Neb et al., in Vorbereitung). Die starke Erhöhung in der Expression dieser *SWEET*-Gene deutet auf eine wichtige Rolle in der Bildung von Ektomykorrhizen und in der Versorgung des Symbionten mit Kohlenhydraten hin. Zwei der drei untersuchten Proteine konnten bereits klar als Glukose Facilitatoren charakterisiert werden (Nintemann, 2012). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Rolle der *SWEET*-Gene bei der pilzlichen Zuckerversorgung in der Ektomykorrhiza aufzuklären.

## 1.8 Transkriptionelle Genregulation in Eukaryoten

Promotoren für die RNA-Polymerase II befinden sich stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (TSS) (Zuo and Li, 2011). Die Funktion eines Promotors ist die Initiation der Transkription eines Gens abhängig von dem Status der Zelle bzw. des Gewebes/Organs (Zuo and Li, 2011). Um diese Funktion erfüllen zu können, befinden sich neben der Bindestelle der RNA-Polymerase II weitere regulatorische Elemente im Promotor (Smale and Kadonaga, 2003). Die Summe sowie die Eigenschaften der an einen Promotor gebundenen Transkriptionsfaktoren, ist dabei für die Anzahl an gebildeter prä-mRNA (ungespleißte mRNA) entscheidend (Cartharius et al., 2005). Die wichtigsten regulatorischen Elemente (Abbildung 6) eines Promotors werden im nachfolgenden Kapitel zusammengefasst und beschrieben.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der wichtigsten regulatorischen Bereiche eines Promotors.**

Gezeigt werden unterschiedliche Bestandteile eines Promotors. Der Promotorbereich wird in Orange dargestellt, die kodierende Sequenz (Exon 1) in Gelb, die Sequenz des Introns in Weiß und die Sequenz des nicht translateren Bereichs in Blau.

Der Kernpromotor stellt die minimale Sequenz dar, durch die eine Transkription auf basalem Level initiiert werden kann (Shahmuradov et al., 2005). Der Kernpromotor enthält den Transkriptionsstartpunkt, umfasst einen Bereich von 40 bp stromabwärts bis 65 bp stromaufwärts des TSS und ermöglicht die Bindung des Präinitiationskomplexes an die DNA (Shahmuradov et al., 2005). Der Präinitiationskomplex besteht aus mehreren Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II (Smale and Kadonaga, 2003). Transkriptionsfaktoren des Präinitiationskomplexes (z.B. das TATA-Box bindende Protein TBP) binden an eine Adenosin/Thymin-reiche (AT-reiche) Region des Kernpromotors, die auch als TATA-Box bezeichnet wird (Hartl and Jones, 1998). Die TATA-Box bildet, wenn vorhanden, einen der am höchsten konservierten Bereiche eines Kernpromotors und befindet sich üblicherweise 45 bis 25 bp stromaufwärts des TSS (Shahmuradov et al., 2005). Allerdings besitzen nur ca. 30-50% aller bekannten Promotoren eine TATA-Box (Shahmuradov et al., 2005). Gerade bei Pflanzen gibt es große Gruppen, wie z.B. einige

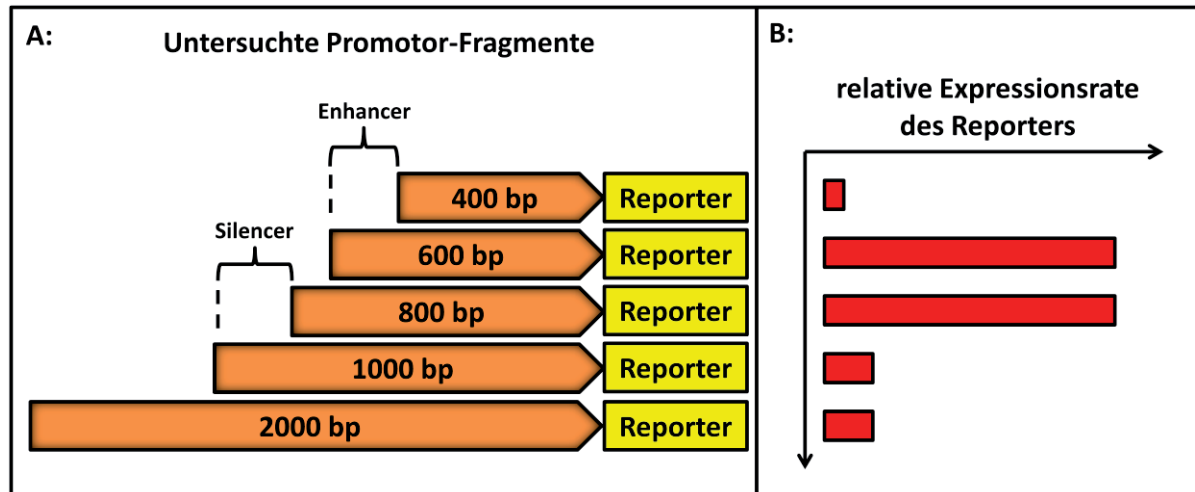
Photosynthese-Gene, die keine TATA-Box in ihrem Kernpromotor enthalten. Der Transkriptionsstart solcher Gene wird durch die transcription initiation region (Inr) oder durch das stromabwärts gelegene downstream promotor element (DPE) gesteuert (Shahmuradov et al., 2005). Ein Bereich von ca. 200 bis 300 bp, der stromaufwärts direkt an den Kernpromotor anknüpft, wird als proximaler Promotor bezeichnet (Shahmuradov et al., 2005). Hier befinden sich oft die so genannten upstream promotor elements (UPE) (Maniatis et al., 1987). Während die TATA-Box für die akkurate Initiation der Transkription wichtig ist, beeinflussen die UPEs, zu denen die GC-Box und die CAAT-Box gehören, die Anzahl an gebildeten Transkripten (Maniatis et al., 1987). Bei den UPEs handelt es sich um Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die die basale Transkription verstärken (Maniatis et al., 1987). Weiter stromaufwärts liegt der distale Promotor, der DNA-Bindestellen (*cis*-Elemente) für weitere Transkriptionsfaktoren enthalten kann, deren Anwesenheit ebenfalls die Expressionsstärke des Gens beeinflusst (Hehl et al., 2016, Shahmuradov et al., 2005).

Die *cis*-Elemente des distalen Promotors werden oft als Enhancer oder Silencer bezeichnet, abhängig davon, ob ihre Anwesenheit die Menge an gebildetem Transkript erhöht oder vermindert (Shahmuradov et al., 2005). Solche Elemente zeichnen sich dadurch aus, dass sie unabhängig von ihrer Entfernung und Orientierung zum eigentlichen Gen aktiv sein können. Aktive Enhancer bzw. Silencer Bereiche können sich sogar in einem Intron des Gens befinden, das durch sie reguliert wird (Hartl and Jones, 1998). In der Regel sind die Promotorbereiche, an die Transkriptionsfaktoren binden, nur ca. 20 bp lang (Hartl and Jones, 1998). Die konzertierte Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren erlaubt es der Zelle, unterschiedliche Informationen zu verarbeiten und so diese Gene nur dann zu transkribieren, wenn sie tatsächlich gebraucht werden (Hartl and Jones, 1998).

### 1.8.1 Funktionelle Promotoranalyse

Als ersten Schritt bei der funktionellen Analyse eines Promotors wird oft eine 5'-Deletionstudie eingesetzt (Li and Schmidt, 1997). Hierbei wird die Promotorsequenz vom 5'-Ende aus schrittweise verkürzt. Die verkürzten Promotorfragmente werden dann stromaufwärts vor ein Reporter gen kloniert und regulieren damit seine Expression (Li and Schmidt, 1997). Solche Promotor-Reporter Konstrukte werden dann zur Transformation unterschiedlicher Gewebe verwendet. Die Expressionsstärke des jeweiligen Promotorfragmentes kann aus der Menge an Reporter-Protein ermittelt werden. Dementsprechend werden für funktionelle Promotorstudien oft Reporter eingesetzt, die entweder direkt durch z.B. Fluoreszenz gemessen werden können (z.B. Fluoreszenzproteine

wie GFP, YFP oder RFP), oder deren Expression durch enzymatische Reaktionen des gebildeten Proteins bestimmt werden kann (z.B. Luciferase oder  $\beta$ -Glukuronidase). Ausgehend von den 5'-deletierten Bereichen kann so die Position eines möglichen Enhancers bzw. Silencers eingegrenzt werden (Abbildung 7). Mittels einer *in silico* Analyse lassen sich dann in den eingegrenzten Bereichen mögliche *cis*-Elemente vorhersagen.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung einer funktionellen Promotoranalyse.**

Gezeigt wird eine fiktive Promotoranalyse durch eine 5'-Deletionsstudie mit den verwendeten Promotor-Reporter Konstrukten (A) und den jeweiligen relativen Expressionsraten des Reporters im transformierten Gewebe (B). Durch die 5'-Deletionen können Silencer bzw. Enhancer entfernt werden. Das Entfernen eines Silencers resultiert in der stärkeren Expression des Reporters (800 bp und 600 bp Fragmente), während durch das Entfernen eines Enhancers die Expression des Reporters wieder sinkt (400 bp Fragment). In der hier gezeigten fiktiven funktionellen Promotoranalyse liegen die regulierenden Bereiche zwischen 1000 und 800 bp (Silencer) stromaufwärts des TSS und zwischen 600 und 400 bp (Enhancer) stromaufwärts des TSS.

### 1.8.2 *in silico* Analyse einer Promotorsequenz

Eine Strategie zur Analyse eines unbekanntem Promotors ist die Motiv-basierte, Computer gestützte (*in silico*) Vorhersage von möglichen *cis*-Elementen (Cartharius et al., 2005). Vorhersagen können durch Literatur-Recherchen oder in größerem Umfang durch Vorhersageprogramme *in silico* durchgeführt werden (Lescot et al., 2002). Die Vorhersage beruht auf detaillierten Promotor Analysen anderer Gene, zumeist aus Modellorganismen wie *Arabidopsis* für dicotyledone Pflanzen oder Reis bzw. Mais für monocotyledone Pflanzen. Heute existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Computer basierter (*in silico*) Vorhersageprogramme (Hehl et al., 2016). Da *cis*-Elemente eine Variabilität der DNA-Sequenz des Bindemotivs aufweisen (Stormo, 2000), werden bei ihrer Vorhersage in der Regel Matrizen verwendet. Die bevorzugte Methode ist dabei die Verwendung von positionsspezifischen, gewichteten Scoringmatrizen (PWM, englisch: position weight matrices).



Matrizen fassen die Ergebnisse einer großen Anzahl an Binde-Studien zusammen und geben eine Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Base an einer bestimmten Position im untersuchten *cis*-Element auftaucht. Solch eine Matrize wird auch „position probability matrix“ (PPM) genannt (Stormo, 2000). Mit Hilfe einer PPM kann eine beliebigen Sequenz auf ihre mögliche Funktion als TFBS des jeweiligen TFs überprüft werden. Die Wahrscheinlichkeit, oft auch Score genannt, ist dabei das Produkt der Wahrscheinlichkeiten für jede Base in der untersuchten Sequenz. Da in einer PPM die Wahrscheinlichkeit für das Auftauchen einer bestimmten Base an einer bestimmten Position auch 0 sein kann, bedeutet dies, dass auch der Score einer Sequenz, in der diese Base auftaucht, 0 ist. Da TFBS jedoch oft nicht nur durch eine einzelne Base definiert werden, musste ein Weg gefunden werden Basen, die mit Wahrscheinlichkeit 0 in der Sequenz auftauchen, in die Berechnung des „Scores“ einfließen zu lassen. So lässt sich aus einer PPM mittels der Formel 1.1 die PWM errechnen (Wasserman and Sandelin, 2004).

$$W_{b,i} = \log_2 [p(b,i) / p(b)] \quad \text{(Formel 1.1)}$$

$p(b)$ : Hintergrundwahrscheinlichkeit der Base  $b$   
 $p(b,i)$ : korrigierte Wahrscheinlichkeit der Base  $b$  in der Position  $i$   
 $W_{b,i}$ : PWM Wert für Base  $b$  in Position  $i$

PWM können dazu verwendet werden, jede beliebige Sequenz auf ihr Potenzial zu testen, als TFBS für einen identifizierten Transkriptionsfaktor (TF) zu dienen (Sandelin et al., 2003). Das Potential als TFBS für den jeweiligen TF zu dienen wird dabei in einem Score (relativer Score) dargestellt, der mit der Formel 1.2 errechnet wird (Sandelin et al., 2003).

$$\text{Relative score} = [100 (\text{score} - m)] / (M - m) \quad \text{(Formel 1.2)}$$

Score: Summe der korrigierten Wahrscheinlichkeiten für alle Basen einer Sequenz  
 $M$ : maximal mögliche korrigierte Wahrscheinlichkeit der untersuchten Matrix  
 $m$ : minimale mögliche korrigierte Wahrscheinlichkeit der untersuchten Matrix

Vorhersageprogramme wie JASPAR (Sandelin et al., 2004) nutzen PW-Matrizen und analysieren systematisch die zu untersuchende Sequenz. Als mögliche TFBS werden die Positionen definiert, die einen vorher festgelegten Score-Wert überschreiten. Solche Vorhersageprogramme erlauben es, eine beliebige Sequenz mit einer hohen Anzahl an Matrizen zu analysieren. Auf der Basis solch einer *in silico* Analyse kann dann eine funktionelle Analyse der möglichen *cis*-Elemente z.B. mittels EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) erfolgen (Li and Schmidt, 1997). Dabei muss berücksichtigt werden, dass *in silico* Vorhersagen, aber auch die angesprochene *in vitro* Analyse oft nicht

garantieren, dass eine *in vivo* funktionelle Transkriptionsfaktorbindestelle gefunden wurde, da beide Untersuchungen die Interaktion zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren außer Acht lassen (Wasserman and Sandelin, 2004).



## 1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Erzeugung von Komposit-Pappeln entwickelt werden. Diese Methode sollte es erlauben, transgene Pappelwurzeln, die zur Mykorrhizierung fähig sind, *in vitro*, innerhalb einer möglichst kurzen Zeit herzustellen. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene *Agrobacterium rhizogenes* Stämme auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Bildung von transgenen Wurzeln an nicht transgenen Stecklingen zu induzieren. Die Komposit-Pappeln wurden anschließend mit dem Pilz *Amanita muscaria* mykorrhiziert. Die Expression des verwendeten Reportergens sowie die Ausbildung von Ektomykorrhizen wurden sowohl visuell als auch durch qRT-PCR bestätigt.

Anschließend sollten die Komposit-Pappeln dazu verwendet werden, um den Promotor des Ektomykorrhiza induzierten Gens *PtSWEET\_1.c* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Promotorfragment amplifiziert, trunziert und vor das 5'-Ende eines peroxisomal lokalisierten gelb fluoreszierenden Proteins (sYFPPTS1) kloniert. Die so erzeugten Konstrukte mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten wurden in Komposit-Pappeln untersucht. Die Untersuchung der Expressionsstärke des jeweiligen Promotorfragmentes erfolgte sowohl visuell als auch mittels qRT-PCR. Für die Bereiche, für die diese Analyse Kontrollelemente nahe legt, sollte anschließend eine *in silico* Analyse des Promotorbereichs erfolgen, um mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) zu identifizieren.

Desweiteren war es Ziel der Arbeit, die subzelluläre Lokalisierung unterschiedlicher Ektomykorrhiza regulierter Zuckertransporter zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Fusionskonstrukte zwischen der jeweiligen kodierenden Sequenz (CDS) und einem sYFP erzeugt. Die Konstrukte sollten anschließend in *Nicotiana benthamiana* transformiert und mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (cLSM) in Blattzellen lokalisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bioinformatische Hilfsmittel

**Tabelle 1: Die in dieser Arbeit zur Analyse bzw. Manipulation von Sequenzen verwendeten Programme.**

Programm	Funktion	Quelle
Geneious Biomatters	Analyse und Manipulation von Sequenzen	Biomatters (Auckland, New Zealand)
Phytozome	gDNA-Sequenz verschiedener Gene	<a href="https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html">https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html</a>
Angiosperm phylogeny group (AGP)	Stammbäume und Verwandtschaften unterschiedlicher Pflanzenarten	<a href="http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/">http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/</a>
JASPAR	<i>in silico</i> Analyse und Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen	<a href="http://jaspar.genereg.net/">http://jaspar.genereg.net/</a>
PlantCare	<i>in silico</i> Analyse und Vorhersage von möglichen TATA- und CAAT-Box Motiven	<a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/</a>
TM Calculator	Berechnen von Annealing Temperaturen	<a href="https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html">https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html</a>

#### 2.1.1 Vorhersage möglicher TATA-Box und CAAT-Box Motive mittels PlantCare

Zur Vorhersage von möglichen TATA-Box und CAAT-Box Motiven wurde das Vorhersageprogramm PlantCare verwendet (Rombauts et al., 1999). Die Analyse erfolgte mit der Funktion „search for CARE“. Alle gefundenen Motive wurden in einem interaktiven Schaubild dargestellt und konnten ausgewählt werden. Ausgewählte Motive wurden in der Sequenz markiert und mit zusätzlichen Informationen verlinkt. Angegeben wurden: der Organismus, in dem das gefundene Motiv beschrieben wurde, die Position des vorhergesagten Motivs in der untersuchten Sequenz sowie der kodierende Strang, die Sequenz der Matrize sowie ein Matrix Score. Dieser Matrix Score gab an, wie viele Basen der Matrix-Sequenz mit der Sequenz im Promotor bei einem Alignment übereinstimmten.

#### 2.1.2 *in silico* Analyse des *PtSWEET\_1.c* Promotors mittels des Vorhersageprogramms JASPAR

Zur Vorhersage weiterer möglicher Transkriptionsfaktorbindestelle (TFBS) wurde das Vorhersageprogramm JASPAR verwendet. Zur Analyse eines pflanzlichen Promotors wurde die „JASPAR Core Plantae“ Funktion verwendet. Die Analyse des *PtSWEET\_1.c* erfolgte

unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Matrizen, außer der Matrizen für AT-hook Elemente. Es wurden lediglich solche vorhergesagten Elemente weiter betrachtet, für die im Bereich des Repressor- (368-400 bp) bzw. Enhancerabschnitts (1 bis 200 bp) potentielle Bindestellen vorhergesagt wurden. Dabei wurde ein relativer „Score“ von 90% für die Silencer-Region und 95% für die Enhancer Region verwendet.

### **2.1.3 Vorhersage von Phosphorylierungsstellen**

Zur Vorhersage von Phosphorylierungsstellen wurde das Vorhersageprogramm NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) verwendet (Blom et al., 2004). Die Sequenz des PtSWEET\_1.c C-Terminus (Position 208-250 im abgeleiteten Protein) wurde unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Daten analysiert. Berücksichtigt wurden nur die Ergebnisse mit den höchsten Score-Werten.

## **2.2 Organismen und Plasmide**

### **2.2.1 Verwendete Organismen**

#### ***Escherichia coli***

Zu Klonierzwecken und zur Vermehrung von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm TOP 10 F' (Invitrogen, Groningen, Niederlande) (lacIqTn10 (TetR))mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG verwendet.

#### ***Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes***

Die transiente Transformation von unterschiedlichen Pflanzenarten und Geweben wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Wood et al., 2001) durchgeführt. Die Generierung von Komposit-Pappeln erfolgte unter der Verwendung der folgenden *Agrobacterium rhizogenes* Stämme: 1724 (Shiomi et al., 1987), K599 (Daimon et al., 1990), 8196 (Hansen et al., 1991) und 15834 (Veena and Taylor, 2007).

#### **Verwendete *Populus* Spezies**

Zur Erzeugung von Komposit-Pappeln wurden zwei verschiedene Pappel-Hybride eingesetzt *Populus tremula x tremuloides* (T89) (Tuominen et al., 1995) und *Populus tremula x alba* (No. 7171-B4, Institut de la Recherche Agronomique, INRA). Zur Amplifikation der Promotor-Sequenzen wurde *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2006) verwendet.

## 2.2.2 Verwendete Plasmide

### 2.2.2.1 *Escherichia coli* Klonierungsvektoren

Der Vektor pJet1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurde zu Klonierungszwecken verwendet. Die Vektorkarte und die Beschreibung der wichtigsten Elemente des Vektors befinden sich auf der beiliegenden CD.

### 2.2.2.2 Binärvektoren

#### pBI121

Der Binärvektor pBI121 wurde im Rahmen dieser Arbeit zu Klonierungszwecken eingesetzt. Das Vektorrückgrat wurde dabei verwendet, um neue Binärvektoren für Lokalisierungsstudien und Promotor-Analysen herzustellen. Der Vektor wurde vom Arabidopsis stock centre (<http://arabidopsis.info/>) erworben.

#### pPLV17 und pPLV06 (De Rybel et al., 2011)

Die Binärvektoren der pPLV-Serie wurden im Rahmen dieser Arbeit zu Klonierungszwecken eingesetzt. Die T-DNA dieser Vektoren wurde in das Vektorrückgrat des pBI121 eingefügt und anschließend für Lokalisierungsstudien sowie Promotor-Analyse Studien eingesetzt.

#### pBIN19-YFPPTS1 (Nowak, 2004)

Der Vektor pBIN19-YFPPTS1 wurde zur Überprüfung der Transformationseffizienz mittels unterschiedlicher *A. rhizogenes* Stämme eingesetzt. Dieses Plasmid wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hänsch (TU-Braunschweig, Germany).

#### pCXUN

Der binäre Vektor pCXUN wurde zur Erzeugung von Komposit-Pappeln mittels *A. rhizogenes* eingesetzt. Der Vektor wurde vom Arabidopsis stock centre (<http://arabidopsis.info/>) erworben.

## 2.3 Kultivierung von Organismen

### 2.3.1. *Escherichia coli*

Das Bakterium *Escherichia coli* wurde für die Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Dafür wurde entweder ein Aliquot einer Glycerol-Kultur unter sterilen Bedingungen auf einer LB-Agarplatte (lysogeny broth) Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 18 g/l

Agar) ausgestrichen, oder es wurde eine Kolonie von einer bereits ausgestrichenen LB-Agarplatte genutzt um 3 ml flüssiges LB-Medium zu inokulieren. Die Selektion auf das jeweilige Konstrukt erfolgte mittels der Zugabe des entsprechenden Antibiotikums: Ampicillin (100 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l). Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C und 120 rpm für 16 h.

### **2.3.2 *Agrobacterium tumefaciens* / *A. rhizogenes***

Das Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* bzw. *Agrobacterium rhizogenes* wurden in dieser Arbeit zur transienten Transformation von *Nicotiana benthamiana* Blättern sowie zur Erzeugung von Komposit-Pappeln verwendet. Für die Anzucht der Agrobakterien wurde ein Aliquot einer Glycerol-Kultur auf einer CPY-Agarplatte (1 g/l Hefeextrakt, Pepton aus Casein 5 g/l, Saccharose 5 g/l, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,5 g/l) ausgestrichen, oder es wurde eine einzelne Kolonie dazu verwendet, um 10 ml CPY-Medium (in 50 ml Erlenmeyerkolben) zu inokulieren. Die Selektion auf das jeweilige Konstrukt erfolgte mittels der Zugabe von Kanamycin (50 mg/l). Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 28°C und 120 rpm für 24 h.

### **2.3.3 Kulturen zur Langzeit-Lagerung von Bakterien**

Zur Lagerung von Bakterienstämmen, sowie zur Konservierung von transgenen Bakterien wurden 600 µl der jeweiligen Kultur mit 600 µl sterilem 98%igen Glycerin versetzt und durch Vortexen gemischt. Die entstandene Bakteriensuspension wurde im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde die Glycerolkultur entweder auf festem Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, ausgestrichen oder direkt zur Inokulation von Flüssigmedium verwendet.

### **2.3.4 Pappel**

*Populus tremula x alba* / *Populus tremula x tremuloides* wurden in ½ MS Medium (Murashige and Skoog, 1962) angezogen. Die Anzucht erfolgte bei 18°C 12 h Tag/Nacht Rhythmus und 80 µmol Photonen m<sup>-2s-1</sup>. Die Vermehrung der Pflanzen erfolgte durch Stecklinge.

### **2.3.5 *Nicotiana benthamiana***

*Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden im Gewächshaus in Erde angezogen. Dazu wurden *N. benthamiana* Samen auf feuchter Erde ausgebracht und bei 23°C und 12 h Tag-Nacht-Wechsel inkubiert. Nach der Keimung wurden die Keimlinge vereinzelt. Zur Vermehrung wurden die Samen der Pflanzen geerntet und bei 4°C gelagert.

### **2.3.6 *Amanita muscaria***

Der Pilz *Amanita muscaria* wurde auf nach Kotke et al. (1987) modifiziertem festem (1,8% Agar) MMN Medium mit 50 mM Glukose bei 18°C (im Dunkeln) angezogen. Zur Vermehrung wurde jeweils ein Agarblock (Kantenlänge ca. 5 mm) aus dem äußeren Myzelbereich herausgeschnitten und auf neuem Medium platziert.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.4.1.1 Isolierung von gesamt RNA**

Alle Materialien und Lösungen, die für die Arbeit mit RNA verwendet wurden, wurden vorher autoklaviert (40 min bei 121°C und 2 bar) oder gebacken (180°C für 4 h) um mögliche RNasen zu entfernen.

Zur Isolierung von gesamt RNA wurde 5 mg gefriergetrocknetes Material eingesetzt. Die Isolierung der RNA erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin RNA<sup>®</sup> Plant Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) nach Gebrauchsanweisung. Nach der Synthese wurde 30 µl 5 mM Tris-HCl pH 8 hinzugefügt, im flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Überprüfung der isolierten gesamt RNA wurde mittels Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Photometrischer Analyse (Nano Drop<sup>™</sup> DN1000; PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany).

#### **2.4.1.2 Isolierung genomischer DNA**

Zur Isolierung pflanzlicher genomischer DNA wurden 0,8 g frisches Blattmaterial (*Populus tremula x tremuloides* / *Populus trichocarpa*) im flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend zu feinem Pulver zermahlen. Das gemahlene Pulver wurde in 4 ml CTAB Puffer (50 mM CTAB, 100 mM Tris-HCl, 26 mM EDTA, 1 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert und anschließend in 2,2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße wurden für 30-45 min bei 60°C und leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Blattreste durch Zentrifugation bei 12000 g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen und mit 500 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) durch Vortexen gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000 g für 1 min wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die genomische DNA wurde durch die Zugabe von 500 µl eiskaltem Isopropanol und



anschließendem Zentrifugieren bei 12000 g (4°C) für 5 min gefällt. Das Pellet wurde mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend ein weiteres Mal für 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde für ca. 15 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 35 µl (pro Reaktionsgefäß) TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgten Inkubationsschritte bei 50°C und 65°C für je 5 min. Zum Entfernen von RNA wurde 1 µl RNase A (5 mg/ml) hinzugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die genomische DNA durch eine Ethanol Fällung gereinigt und das Pellet in 35 µl TE Puffer aufgenommen. Die Qualität und Quantität der genomischen DNA wurde durch eine Gel-Elektrophorese bzw. Densitometrie ermittelt.

#### **2.4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde jeweils eine Kolonie des Bakteriums *Escherichia coli* dazu verwendet, um 3 ml LB Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, zu inokulieren. Das Inokulum wurde für 16 h bei 37°C und 120 rpm angezogen. Die Bakterien-Suspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugieren für 1 min bei 10000 g pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mg/ml RNase A, pH 7,5) durch Vortexen resuspendiert. 200 µl Puffer 2 (1 % (w/v) SDS, 200 mM NaOH) wurden zur Bakterien-Suspension hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Lyse der Bakterien erfolgte während der 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 200 µl Puffer 3 (1,5 M Kaliumacetat, pH 4,8 eingestellt durch Essigsäure) hinzugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Durch eine Zentrifugation bei 18000 g für 10 min wurden die denaturierte DNA und die Zellüberreste pelletiert. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA und wurde daher in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch die Zugabe von eiskaltem Isopropanol und die anschließende Zentrifugation bei 18000 g für 20 min (4°C) gefällt. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 8600 g für 5 min (20°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde für 15 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 35-50 µl 5 mM Tris-HCl aufgenommen und durch eine Inkubation bei 65°C für 5 min unter leichtem Schütteln gelöst.

#### **2.4.2 Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR**

Die PCR Reaktion (maximales Volumen 20 µl) wurde mit Hilfe von 0,2 µl der Phusion Taq Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) durchgeführt. Alternativ wurde OneTaq (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) eingesetzt. Ein

typischer Reaktionsansatz enthielt: 4 µl 5x Reaktionspuffer, 10 pmol der jeweiligen Primer, 0,2 µl dNTP (10 mM) und ca. 100 ng genomischer DNA bzw. 20 ng Plasmid-DNA. Die PCR wurde in einem Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GmbH) durchgeführt. Die Bedingungen der PCR können der Tabelle 2 entnommen werden. Die Elongationszeit und Annealingtemperatur wurde dem jeweiligen Primerpaar und Produkt angepasst. Die Annealingtemperatur wurde mit einem „TM Calculator“ (Thermo Fisher) berechnet. Die Elongationszeit wurde entsprechend den Herstellerangaben der jeweiligen Polymerase angepasst.

**Tabelle 2: Bedingungen einer typischen PCR.**

Zyklus	Funktion	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
1	Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	30	98	1
2	Denaturierung	10	98	35
3	Primer Annealing	10	50-65	
4	Elongation	60	72	
5	Terminale Amplifikation	300	72	1

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die mittels LIC-Reaktion kloniert werden sollten, oder zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen an das amplifizierte Insert, wurden Primer eingesetzt, die einen Überhang am 5'-Ende mit der gewünschten Sequenz enthielten.

### 2.4.3 Gel-Elektrophorese

#### 2.4.3.1 Auftrennung von DNA

Verdaute Plasmid-DNA und mittels PCR amplifizierte Produkte wurden zur Überprüfung mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Gel-Elektrophorese erfolgte in 1 % (w/v) Agarose Gelen, angesetzt mit ½ TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0 eingestellt mit Essigsäure). Zur Einschätzung der Fragmentgrößen wurde *EcoRI* und *HindIII* gedaute λ-DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet.

#### 2.4.3.2 Visualisierung der DNA

Nukleinsäuren, die mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt wurden, wurden mit einer Ethidium Bromid Lösung (3,3 µg/ml) gefärbt und anschließend unter UV-Licht (312 nm, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Upsala, Schweden) visualisiert. Die Dokumentation

erfolgte mit Hilfe der DOC-PRINT II Gel-Dokumentationsanlage (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany).

## **2.4.4 Klonierung von DNA**

### **2.4.4.1 Restriktionsanalyse**

Restriktionsanalysen wurden mit ca. 1 µg isolierter Plasmid-DNA, 6-10 u des jeweiligen Restriktionsenzym (NEB, Frankfurt, Germany) und 1 µl des spezifischen 10 x Enzym-Puffers in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1-2 h bei entsprechender Temperatur (20-37°C) durchgeführt.

Für präparative Restriktionen wurden 4-8 µg isolierter Plasmid-DNA, 10-20 u des jeweiligen Restriktionsenzym und 2 µl des spezifischen 10 x Enzym-Puffers in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und anschließend für 4-8 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

### **2.4.4.2 Reinigung von DNA-Fragmenten**

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten, wurde die DNA mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert. Die Fragmente, die der erwarteten Größe entsprachen, wurden unter UV-Licht (312 nm) mit einem Skalpell herausgeschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter Verwendung des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) aus Agarblöcken eluiert. Die Elution erfolgte nach Herstellerangaben.

### **2.4.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide**

Amplifizierte und eluierte DNA-Fragmente wurden in unterschiedliche Vektorrückgrate kloniert. Dafür wurden DNA-Fragmente und Vektorrückgrat mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, bei Bedarf gereinigt und anschließend bei 22°C für 1 h ligiert. Die Ligation erfolgte mittels 1 µl T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific) und 2 µl 10 x Ligase Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Für die Ligation wurden Vektorrückgrat und Insert in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

Bei der Klonierung mittels eines einzelnen Restriktionsenzym wurde das Vektorrückgrat vor der Ligation mit der FastAP<sup>™</sup> thermosensitive alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) dephosphoryliert. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 2.4.4.4 Sequenzierung von Plasmiden

Zur Analyse von klonierten DNA-Fragmenten wurde die Sanger-Sequenzierung mittels ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit eingesetzt. Das Reaktionsgemisch bestand dabei aus 1,2 µl BigDye<sup>®</sup> Puffer (2,5 x konzentriert), 0,8 µl BigDye<sup>®</sup> Reaktionsgemisch, 1 µl Primer (5 pmol/µl), 100 ng Template DNA und ddH<sub>2</sub>O (bis zu einem Gesamtvolumen von 5 µl). Die Bedingungen der anschließenden PCR werden in der Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Bedingungen einer PCR zur Sequenzierung nach Sanger.**

Zyklus	Funktion	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
1	Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	60	98	1
2	Denaturierung	10	98	45
3	Primer Annealing	5	50-65	
4	Elongation (schrittweise durchgeführt)	75 90 120	72	
5	Pause	∞	10	1

Anschließend an die Amplifikation wurden die DNA-Fragmente mittels Sephadex G-50 Gel-filtriert und in einer 96-Well Platte aufgefangen. Das eluierte PCR-Produkt wurde mittels Applied Biosystems 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) im Max Plank Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany analysiert.

#### 2.4.5 Transformation

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

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* wurde eine einzelne Kolonie, des Stammes TOP 10 F', dazu verwendet, 3 ml LB zu inokulieren. Die Bakterien wurden für 16 h bei 37°C und 120 rpm inkubiert und anschließend dazu verwendet, um 500 ml LB-Medium zu inokulieren. Das Inokulum wurde bei 37°C und 120 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.6 bis 0,8 erreicht wurde. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 4°C und 4500 g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml TSB Puffer (Chung and Miller, 1988) (Transformation and Storage Buffer: LB Medium versetzt mit 10% (w/v) PEG 3350, 5% (v/v) DMSO und 20 mM MgSO<sub>4</sub>) resuspendiert und zu 200 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden im flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **2.4.5.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli***

Zur Transformation von kompetenten *E. coli* wurde jeweils ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend mit 100 µl DNA-Lösung bestehend aus 20 µl KCM (100 mM KCl, 30 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub>), bis zu 20 µl Ligationsansatz oder Plasmid und ddH<sub>2</sub>O zum Erreichen eines Volumens von 100 µl, versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig durch auf und ab Pipettieren gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen, mit 1 ml LB Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf festem LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Anschließend wurden die Bakterien für 16 h bei 37°C inkubiert.

#### **2.4.5.3 Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien**

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien (*Agrobacterium tumefaciens* bzw. *Agrobacterium rhizogenes*) wurde eine einzelne Kolonie des entsprechenden Stammes dazu verwendet, 10 ml CPY-Medium zu inokulieren. Das Inokulum wurde bei 28°C und 120 rpm für 24 h inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde dazu verwendet, 500 ml CPY-Medium zu inokulieren. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 28°C und 120 rpm, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht wurde. Die Agrobakterien wurden bei 3000 g und 4°C für 5 min pelletiert und anschließend in 100 ml 150 mM NaCl resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 3000 g und 4°C wurde das Bakterien Pellet in 10 ml 20 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

#### **2.4.5.4 Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien**

Zur Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien wurde ein Aliquot für mindestens eine Stunde auf Eis aufgetaut. Die Bakterien-Suspension wurde mit 200 ng Plasmid versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml CPY-Medium aufgenommen und für 1 h bei 28°C und 120 rpm inkubiert. Anschließend an die Inkubation wurden die Bakterien auf festem CPY-Medium (Agar 18 g/l) ausgebracht und anschließend für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert, bis sich sichtbare Kolonien ausgebildet hatten.

#### **2.4.5.5 Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien (Dower et al., 1988)**

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 500 ml des entsprechenden Mediums mit einer Vorkultur (3 ml) eines Bakterienstamms inokuliert. Nach ca. 4 Stunden wurde in

Abständen von 10 bis 15 min ein steriles Aliquot abgenommen und vermessen. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis eine  $OD_{600}$  von ca. 0,6 bis 0,8 erreicht wurde. Diese Hauptkultur wurde in eiskalte, sterile Zentrifugenbecher transferiert und unter gelegentlichem Schütteln auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien bei 4°C für 15 min bei 4.000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 250 ml eiskaltem destillierten Wasser resuspendiert und anschließend wieder bei 4°C für 15 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Nach dem dritten Zentrifugieren wurde das Pellet in 50 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 10 ml 10 % Glycerin-Wasser-Gemisch resuspendiert und anschließend zu je 40 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. (Dieses Protokoll wurde ebenfalls für die Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* bzw. *A. rhizogenes* verwendet).

#### 2.4.5.6 Elektroporation

Zur Transformation von elektrisch kompetenten Bakterien wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut. Die Bakterien-Suspension wurde mit 100 ng Plasmid (oder max. 5 µl Ligationansatz) durch auf und ab Pipettieren gemischt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien vorsichtig in eine 2 mm Elektroporations-Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω (*Agrobacterium* bei 400 Ω), 1,8 kV und 25 µF. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium/CPY-Medium versetzt (37°C für *E. coli* und 28°C für *Agrobacterium*) und für 30 bis 60 min bei 37°C bzw. 28°C und 120 rpm inkubiert. Das gesamte Volumen wurde auf festem Medium (LB für *E. coli* bzw. CPY für *Agrobacterium*) mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für 24 Stunden (*E. coli*) bzw. 48 Stunden (*A. tumefaciens*) inkubiert.

#### 2.4.5.7 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Die transiente Expression von Lokalisierungsstrukturen in *Nicotiana benthamiana* erfolgte mittels transgener *Agrobacterium tumefaciens* (C58/PMP90) bzw. *Agrobacterium rhizogenes* (K599). Die Bakterien wurden mit dem jeweiligen Lokalisierungskonstrukt transformiert und anschließend auf festem Selektionsmedium angezogen (CPY mit 50 mg/l Kanamycin). Nach der Ausbildung von Kolonien, wurde jeweils eine Kolonie genutzt, um 10 ml CPY (50 mg/l Kanamycin) zu inokulieren. Die Kulturen wurden für 24 h bei 28°C und 120 rpm angezogen. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation bei 3000 g geerntet und in einer Aktivierungslösung resuspendiert (10 mM MES/KOH pH 5,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM Acetosyringon). Die  $OD_{600}$  wurde auf einen Wert von 0,3 eingestellt. Nach dem Einstellen der



richtigen OD<sub>600</sub> wurden die folgenden Bakterien-Suspensionen: Lokalisierungskonstrukt, Positivkontrolle und p19 Helferstamm, im Verhältnis 1:1:1 gemischt und für 2 h bei 28°C und 120 rpm inkubiert. Anschließend an die Inkubation erfolgte die Infiltration der Blätter von 4-6 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen (angezogen im Gewächshaus bei 23°C und 12 h Tag/Nacht Rhythmus) mittels einer nadellosen 1 ml Spritze. Die infiltrierten Pflanzen wurden für 2 weitere Tage im Gewächshaus inkubiert und anschließend mittels cLSM (LSM780 / ELYRA PS. 1, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) untersucht.

## 2.4.6 Komposit-Pappeln

### 2.4.6.1 Erzeugung von Komposit-Pappeln mittels *A. rhizogenes*

Zur Erzeugung von Komposit-Pappeln wurde der *Agrobacterium rhizogenes* Stamm K599 eingesetzt. Die Agrobakterien wurden mittels Elektroporation bzw. chemischer Transformation mit einem Binärvektor transformiert und für bis zu 48 h auf festem CPY-Medium mit 50 mg/l Kanamycin bei 28°C herangezogen, bis sich Kolonien ausbildeten.

Pappel Stecklinge wurden aus vier Wochen alten, sterilen *Populus tremula x alba* (bzw. *P. tremula x tremuloides*) generiert. Anschließend erfolgte die Inokulation der Schnittfläche der Stecklinge durch das Eintauchen in eine transgene Agrobakterium Kolonie. Anschließend wurden die inokulierten Stecklinge in ½ MS Agar gesteckt und bei 22°C und 12 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (12 h Tag/Nacht Rhythmus) inkubiert. Nach einer Inkubation von 3 Tagen wurden die Stecklinge auf neues MS Medium mit 1,18 mM Carbenicillin und 0,52 mM Cefotaxim transferiert. Die inokulierten Stecklinge wurden, wie vorher beschrieben inkubiert, bis zur Bildung von 1-2 cm langen Wurzeln.

### 2.4.6.2 Ektomykorrhizierung von Komposit-Pappeln (Hamp et al., 1996)

Zur Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappel Wurzeln wurde der Pilz *Amanita muscaria* eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde das Myzel auf modifiziertem MMN Medium (Kottke et al., 1987) (1,8% und 50 mM Glukose) bei 18°C im Dunkeln für ca. 6 Wochen angezogen. Jeweils sechs Agarblöcke (5 mm Kantenlänge) wurden auf neues MMN Medium (10 mM Glukose) transferiert. Zur einfachen Handhabung erfolgte die Anzucht des Myzels auf einer sterilen Cellophan Membran (Einmachfix; Max Bringmann KG, Wendelstein, Germany). Das Myzel wurde für weitere vier Wochen bei 18°C im Dunkelt inkubiert, bis das Myzel um den Agarblock einen Durchmesser von ca. 2-3 cm erreicht hatte. Die Membran wurde nun auf neues MMN Medium, mit reduziertem Stickstoffgehalt (1 mM) und ohne jegliche Kohlenhydratquelle, transferiert. Die Wurzeln der Komposit-Pappeln wurden vorsichtig auf

der Membran ausgebreitet, während der Spross in einer vorher eingebrannten Öffnung in der Seitenwand der Petrischale platziert wurde und dementsprechend außerhalb der Petrischale verblieb (Hampp et al., 1996). Die Petrischale wurde mit sterilem Silicon Fett und Parafilm versiegelt und in vertikaler Position in einem Miniatur Gewächshaus unter hoher Luftfeuchtigkeit und 18°C inkubiert. Das Wurzelsystem wurde mit dunklem Papier abgedeckt, während der Spross im Licht verblieb (12 h Tag/Nacht Phythmus, 80  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Die Bildung von Ektomykorrhizen konnte nach 2 Monaten beobachtet werden.

## **2.5 Mikroskopische Analysen**

### **2.5.1 Binokular**

Untersuchungen von Wurzelsystemen der Komposit-Pappeln wurden mit Hilfe eines Binokulars durchgeführt (Mz10F, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Das YFP wurde mit UV-Licht (LEj LQ-HXP 120, Leistungselektronik JENA GmbH, Jena, Germany) und entsprechendem YFP-Filterblock (Exzitation 510-520 nm, Emission 540-560 nm) angeregt und detektiert. Die Aufnahmen erfolgten mit der Leica DFC425C Kamera und der LAS 2.0 (Leica Application Suite) Software.

### **2.5.2 Epifluoreszenz Mikroskopie**

Unterschiedliche pflanzliche Präparate wurden mit Hilfe eines Leica DMRB Mikroskops (Leica Mikrosystems) analysiert. Zur Anregung von YFP wurde UV-Licht (LEj LQ-HXP 120, Leistungselektronik JENA GmbH) und der entsprechende YFP-Filterblock (Exzitation 490-510 nm, Emission 520-550 nm) eingesetzt. Aufnahmen erfolgten mit der Leica DFC425C Kamera und der LAS 2.0 (Leica Application Suite) Software.

### **2.5.3 konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM)**

Zur Analyse des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) und rot fluoreszierenden Proteins (RFP) wurde die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM 780 / ELYRA PS.1, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) eingesetzt. Zur Anregung wurden ein Argonlaser (488 nm) und ein DPSS (diode pumped solid state) (561 nm) verwendet. Ein Dichroitischer Spiegel (Beam splitter 488/566 nm) wurde zwischengeschaltet. Das emittierte Licht wurde mit Hilfe von verschiedenen Detektoren für das YFP zwischen 510-560 nm und für das RFP zwischen 580-650 nm detektiert. Die Detektion der Fluoreszenz der pflanzlichen Zellwände (Hintergrundfluoreszenz) erfolgte zwischen 650 und 695 nm.

#### **2.5.4 Herstellung von Quer- und Längsschnitten von Wurzeln**

Zur Herstellung von Quer- und Längsschnitten von Komposit-Pappel Wurzeln, wurden die transgenen Wurzeln geerntet (Pinzetten; Dupont, Wilmington, USA) und anschließend in einem PCR Reaktionsgefäß in 200 µl 4% Wasser-Agarose (60°C) eingebettet. Das Reaktionsgefäß wurde in ein Druckgefäß (Dobner, 2003) transferiert. Durch das Anlegen eines leichten Drucks wurden Luftblasen aus der flüssigen Agarose entfernt. Das Reaktionsgefäß verblieb im Druckgefäß, bis die Agarose komplett verfestigte (ca. 5-10 min). Anschließend wurde die eingebettete Wurzel mit flüssiger Agarose (60°C) auf einem Vibratom-Carrier befestigt. Die Erzeugung von 50-100 µm dicker Querschnitte erfolgte mittels eines Vibratoms (VT1000S, Leica)

## 3 Ergebnisse:

### 3.1 Entwicklung von Komposit-Pappeln

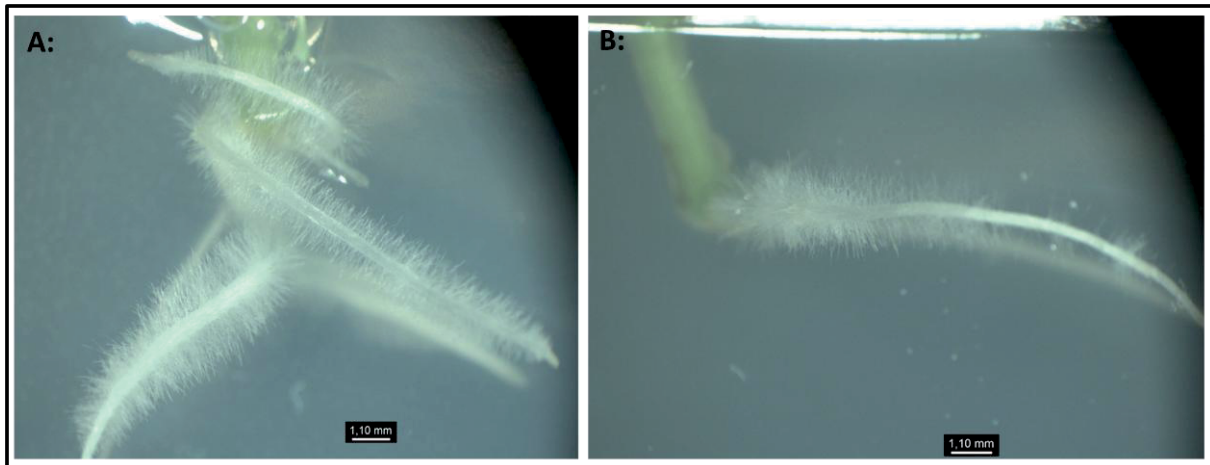
Die Herstellung von transgenen Pflanzen ist eine Voraussetzung für die Analyse von Genfunktionen (Alpizar et al., 2006). Die Transformation von holzbildenden Pflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens* und die damit einhergehende Regeneration von transgenen Pflanzen aus Kalluskulturen ist jedoch sehr zeit- und ressourcenaufwendig (Alpizar et al., 2006). Daher wurde 1989 von Hansen et al. eine alternative Methode entwickelt, bei der mittels *A. rhizogenes* die Bildung transgener Wurzeln an nicht transgenen Sprossen induziert wird (Hansen et al., 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll für die Erzeugung von Komposit-Pappeln entwickelt. Ebenfalls wurde untersucht, ob sich die transgenen Wurzeln zur Bildung funktioneller Ektomykorrhizen eignen.

#### 3.1.1 Auswahl eines geeigneten *A. rhizogenes* Stammes

Die Wirtsspezifität von *A. rhizogenes* ist in der Natur nur auf einige wenige Pflanzenarten beschränkt. Unter Laborbedingungen kann jedoch die Wirtsspezifität bestimmter *A. rhizogenes* Stämme auf viele Pflanzenarten ausgeweitet werden (Porter, 1991). Dennoch lässt sich nicht vorhersagen, durch welchen *A. rhizogenes* Stamm eine bestimmte Pflanzenart am effizientesten transformiert werden kann. Daher wurden in dieser Arbeit folgende vier verschiedene *A. rhizogenes* Stämme auf ihre Fähigkeit hin getestet, Pappel Komposit Pflanzen zu generieren: Stamm 2659 (K599) ein Cucumopin Stamm (Daimon et al., 1990), Stamm 15834 ein Agropin Stamm (Veena and Taylor, 2007), Stamm 8196 ein Manopin Stamm (Hansen et al., 1991) und Stamm 1724 ein Mikimopin Stamm (Shiomi et al., 1987). Alle untersuchten *A. rhizogenes* Stämme wurden mit dem Binärvektor pFF19-YFPPTS1 transformiert (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Robert Hänsch, Technische Universität Braunschweig, Institut für Pflanzenbiologie). Die T-DNA dieses Binärvektors exprimiert ein gelb fluoreszierendes Protein mit einem „peroxisomal targeting signal 1“ (YFPPTS1) unter der Kontrolle eines CaMV-35S Promoters (Nowak et al., 2004). Die transgenen (pFF19-YFPPTS1) *A. rhizogenes* Stämme wurden dann zur Inokulation von je 20 *Populus tremula x alba* Stecklingen verwendet. Die Wurzel-Entwicklung der inokulierten Pflanzen wurde über einen Zeitraum von sieben Wochen hinsichtlich (i) der Bewurzelungsrate, (ii) der Anzahl an induzierten Wurzeln und (iii) der Transformationseffizienz mit der T-DNA des binären Vektors beobachtet.

### 3.1.1.1 (i) Effizienz der untersuchten *A. rhizogenes* Stämme, die Bildung transgener Wurzeln zu induzieren

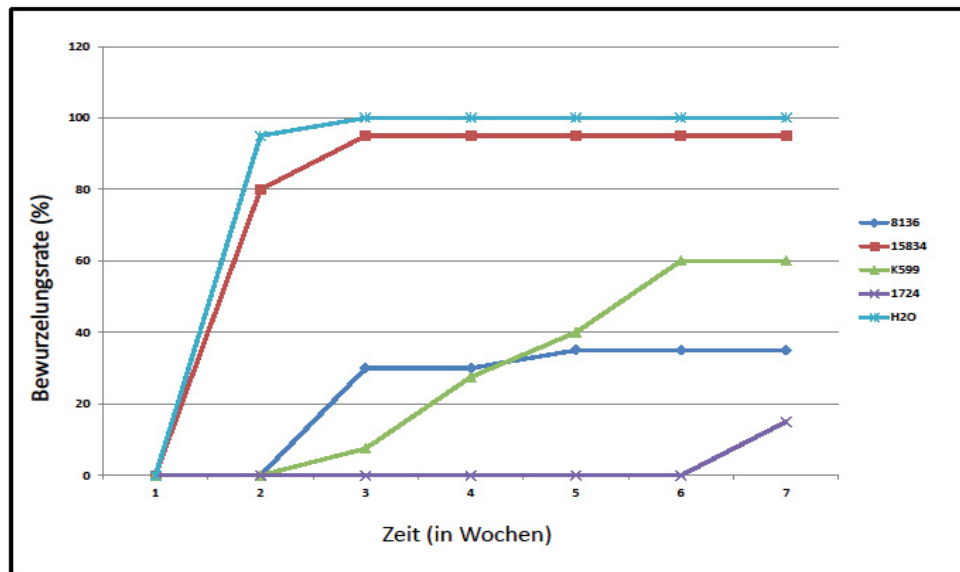
Die Transformationseffizienz wurde anhand des prozentualen Anteils an inokulierten Pflanzen, die „hairy roots“ ausgebildet hatten, bestimmt. Dadurch sollte die Aggressivität des jeweiligen Stammes eingeschätzt werden.



**Abbildung 8: Vergleich des Wurzel-Phänotyps an einer *A. rhizogenes* (Stamm 15834) Komposit-Pappel (A) und einer Negativkontrolle (B).**

*P. tremula x alba* Stecklinge wurden mit *A. rhizogenes* (Stamm 15834) inokuliert. Als Negativkontrolle dienten Stecklinge, die nicht mit Agrobakterien behandelt wurden. Dargestellt wird der Vergleich zwischen induzierten Komposit-Pappel Wurzeln (A) und den Wurzeln einer Negativkontrolle (B). Die Aufnahmen erfolgten drei Wochen nach der Inokulation mittels eines Binokulars.

Die durch *A. rhizogenes* induzierten Wurzeln unterscheiden sich häufig phänotypisch von Wildtyp Wurzeln durch eine reduzierte Wahrnehmung der Gravitation sowie eine anormale Verteilung der Wurzelhaare (Abbildung 8-A). Diese Unterschiede können als Indikatoren für eine erfolgreiche Übertragung der RiT-DNA dienen. Alle in dieser Arbeit untersuchten *A. rhizogenes* Stämme waren in der Lage, die Bildung von „hairy roots“ zu induzieren. Mittels eines Binokulars wurde die Bildung sprossbürtiger Wurzeln, über einen Zeitraum von sieben Wochen bestimmt (Abbildung 9).



**Abbildung 9: *A. rhizogenes* vermittelte Induktion der Wurzelbildung an Pappel Stecklingen.**

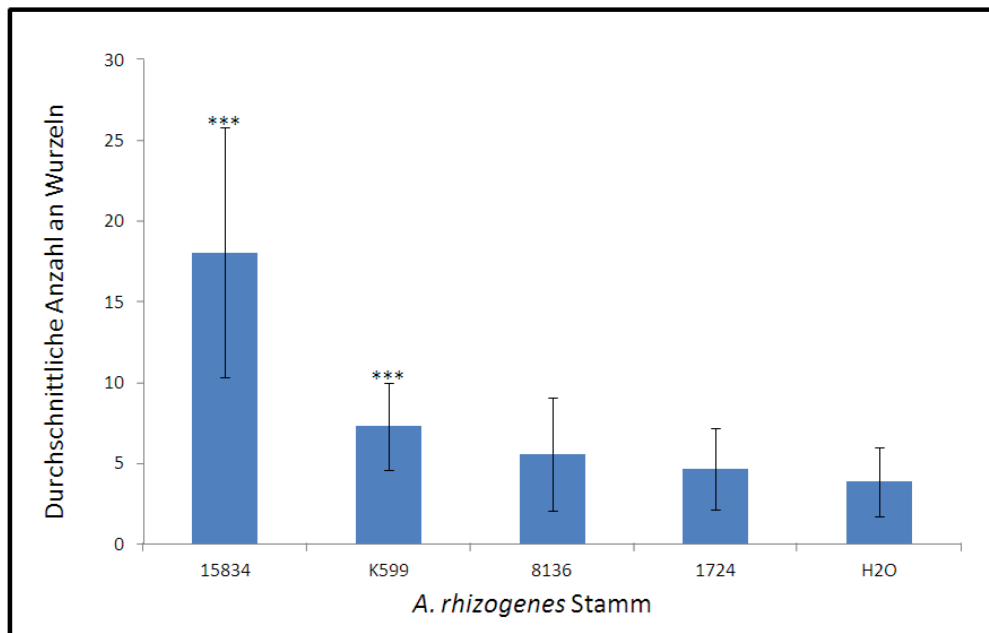
Je 20 *P. tremula x alba* Stecklinge wurden mit vier verschiedenen *A. rhizogenes* Stämmen (8136, 15834, K599, 1724) inokuliert. Als Kontrolle dienten Stecklinge, die mit sterilem Wasser (H<sub>2</sub>O) inokuliert wurden. Die Bewurzelung wurde über einen Zeitraum von sieben Wochen dokumentiert. Dargestellt wird die Bewurzelungsrate der Stecklinge in % (y-Achse) in Abhängigkeit der Inkubationszeit in Wochen (x-Achse). Gezeigt ist die Bewurzelung von Pflanzen, die mit dem Stamm 8136 inokuliert wurden in Blau, Stamm 15834 in Rot, Stamm K599 in Grün, Stamm 1724 in Violett sowie die Kontrolle (H<sub>2</sub>O) in Türkis.

Am schnellsten erfolgte die Bildung sprossbürtiger Wurzeln bei der Negativkontrolle (keine Agrobakterien) bzw. nach Inokulation mit dem Agrobakterienstamm 15834. Andere Agrobakterienstämme waren erst nach einer Inkubationszeit von drei (K599, 8196) bzw. sechs Wochen (1724) in der Lage, die Bildung von Wurzeln zu induzieren. Allerdings war die Bewurzelungsrate der Stecklinge bezogen auf die Negativkontrolle dann immer noch deutlich geringer als die des Stammes 15834 (95%) und lag für den Stamm K599 bei 60%, für den Stamm 8196 bei 35% und für den Stamm 1724 bei 15%.

### 3.1.1.2 (ii) Anzahl der pro Pflanze gebildeten Wurzeln

Zur besseren Beurteilung der einzelnen *A. rhizogenes* Stämme, wurde auch die Anzahl an induzierten Wurzeln pro Pflanze ermittelt. Hierdurch sollte ein Rückschluss auf die Anzahl der Transformationsereignisse pro inokulierte Pflanze gezogen werden (Abbildung 10). Dem zugrunde lag die Annahme, dass jede Wurzel aus einem eigenen Transformationsereignis resultiert (Costantino et al., 1983).

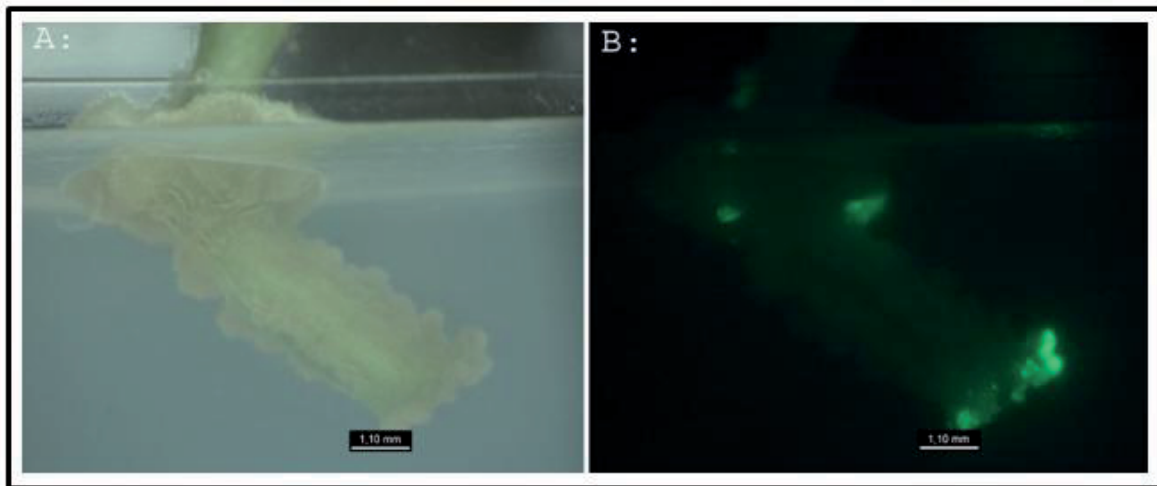




**Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl an Wurzeln pro Steckling.**

Die Bestimmung der Anzahl von Wurzeln pro Pflanze erfolgte sieben Wochen nach der Inokulation mit dem entsprechenden *A. rhizogenes* Stamm bzw. sterilem Wasser (Kontrolle). Je Ansatz wurden 20 Stecklinge verwendet (40 Stecklinge für K599). Stecklinge, die keine Wurzel ausbildeten, wurden nicht berücksichtigt. Gezeigt wird die durchschnittliche Anzahl an Wurzeln pro Pflanze in Abhängigkeit des entsprechenden *A. rhizogenes* Stammes. Signifikant unterschiedliche Daten sind mit einem \*\*\* markiert (student t-Test,  $p = 0.05$ ).

Die geringste Anzahl an Wurzeln pro Pflanze wurde bei der Negativkontrolle (keine Agrobakterien) beobachtet ( $\bar{x} 3,8 \pm 2,1$ ). Der Stamm 15834 induzierte eine stark erhöhte Anzahl an Wurzeln pro Pflanze von  $\bar{x} 18 \pm 7,7$ . Alle anderen Stämme zeigten eine, hinsichtlich des Stammes 15834, signifikant (student t-Test,  $p = 0,05$ ) geringere Anzahl an induzierten Wurzeln pro Pflanze von:  $\bar{x} 4,66 \pm 2,5$  für den Stamm 1724,  $\bar{x} 7,28 \pm 2,71$  für den Stamm K599 und  $\bar{x} 5,5 \pm 3,5$  für den Stamm 8136. Bei der Untersuchung der mit Agrobakterien inokulierten Stecklinge konnte regelmäßig die Bildung von Mikrocalli beobachtet werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Bildung *A. rhizogenes* induzierter transgener Mikrokalli an einem inokulierten *P. tremula x alba* Steckling.**

Dargestellt wird die Schnittfläche eines, mit transgenen (pFF19-YFPPTS1) *A. rhizogenes* (K599), inokulierten *P. tremula x alba* Stecklings im Durchlicht (A) sowie UV-Licht und YFP Filter (B). Die Untersuchung wurde anhand von sieben Wochen alten inokulierten Stecklingen durchgeführt.

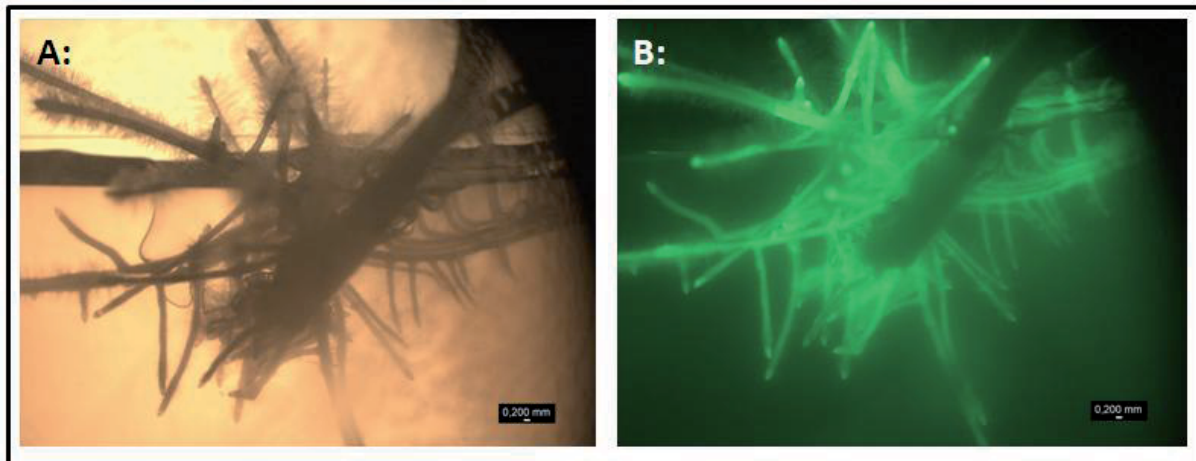
Die Bildung der Mikrokalli erfolgte an der Kontaktfläche zwischen Pflanze und Bakterium. Dies wird vor allem dadurch deutlich, dass die Bildung besonders großer Kalli an der Stelle beobachtet werden konnte, an der der Spross aus dem Medium tritt (Abbildung 11-A). Hier konnte oft die Bildung von Agrobakterien-Kolonien beobachtet werden. Im Gegensatz zu den mit Agrobakterien inokulierten Pflanzen bildeten die Kontrollpflanzen nur wenige, große Kalli an der Schnittfläche des Stecklings aus, jedoch nicht oberhalb des Mediums. Es konnte allerdings nicht eindeutig bestimmt werden, ob die Kallusbildung vor oder parallel zur Bewurzelung erfolgte. An älteren inokulierten Stecklingen konnte sowohl die Bildung von Wurzeln an einem Kallus als auch die Bildung sprossbürtiger Wurzeln beobachtet werden.

### 3.1.1.3 (iii) Fähigkeit der *A. rhizogenes* Stämme zur Übertragung einer biT-DNA

Die Komposit-Pappeln sollten entwickelt werden, um eine zeitsparende Methode für die Generierung sprossbürtiger, transgener Wurzeln zu schaffen. Daher wurden alle verwendeten *A. rhizogenes* Stämme auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die T-DNA des binären Vektors (biT-DNA) pFF19-YFPPTS1 zu übertragen.

#### 3.1.1.3.1 Überprüfung der Transformationseffizienz mittels Binokular

Für die Verifikation der Expression der biT-DNA, wurden alle gebildeten Wurzeln auf ein Fluoreszenzsignal hin untersucht (Abbildung 12). Die Untersuchung erfolgte nach einer siebenwöchigen Inkubationszeit der inokulierten Stecklinge. Die Transformationseffizienz mit der biT-DNA wurde aus dem Verhältnis der Anzahl an fluoreszierenden Wurzeln zur Gesamtwurzelzahl errechnet und wird in Prozent angegeben (Tabelle 4).



**Abbildung 12: YFP Fluoreszenzsignal einer transgenen Komposit-Pappel.**

*P. tremula x alba* Stecklinge wurden mit transgenen (pFF19-YFPPTS1) *A. rhizogenes* inokuliert. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen. Dargestellt sind eine Durchlichtaufnahme (A) sowie eine Aufnahme unter UV-Licht mit YFP-Filter (B) einer vier Wochen alten Komposit-Pappel, die mit dem transgenen Stamm K599 hergestellt wurde.

**Tabelle 4: Vergleich der Fähigkeit einzelner *A. rhizogenes* Stämme, die Bildung transgener Wurzeln zu induzieren.**

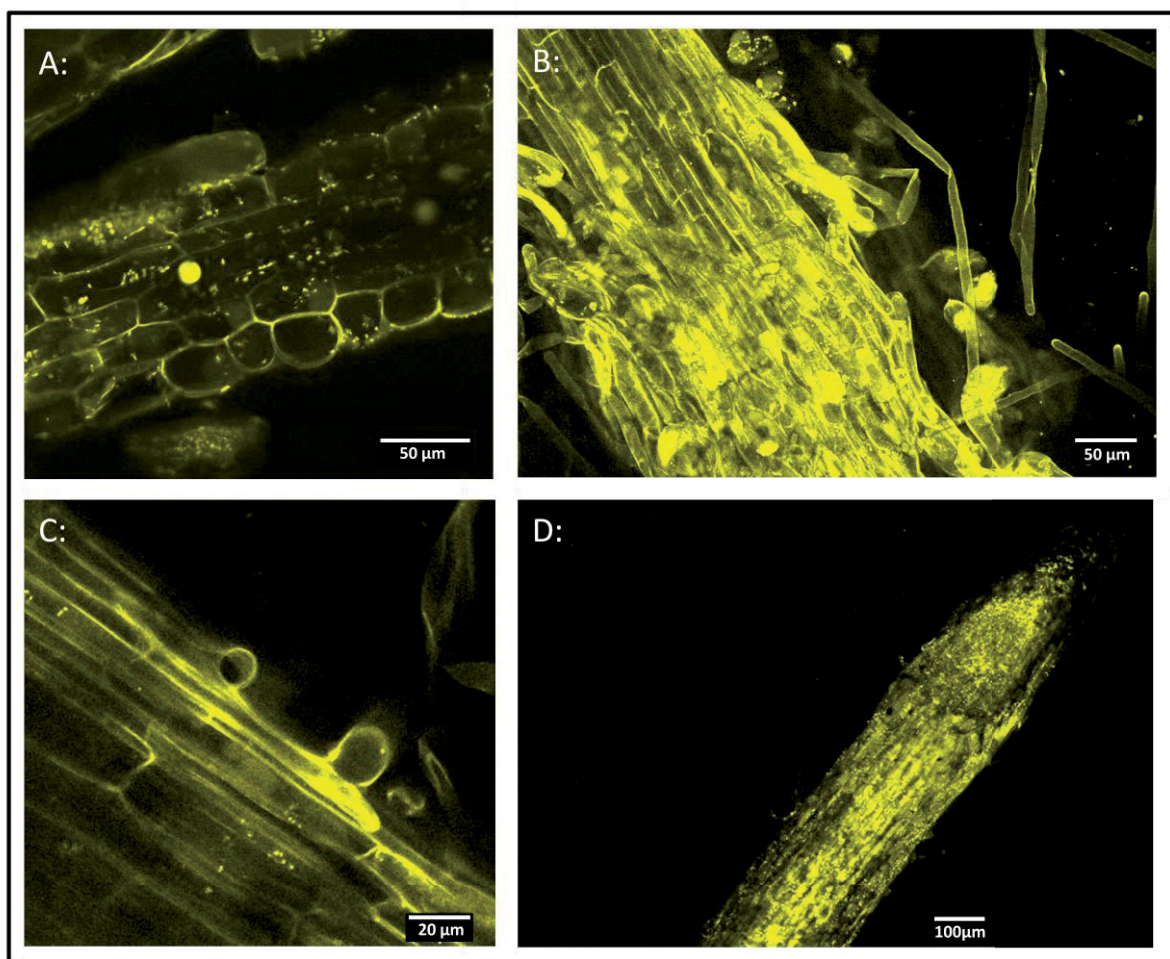
*P. tremula x alba* Stecklinge wurden mit dem entsprechenden transgenen (pFF19-YFPPTS1) *A. rhizogenes* Stamm inokuliert. Nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen wurden die gebildeten Wurzeln mittels eines Binokulars auf ein YFPPTS1 Signal hin untersucht. Gezeigt sind die untersuchten *A. rhizogenes* Stämme, die Anzahl an inokulierten Pflanzen, die Anzahl der insgesamt gebildeten Wurzeln, die Anzahl der Wurzeln mit YFPPTS1 Signal (transformiert mit biT-DNA) und der prozentuale Anteil der fluoreszierenden Wurzeln im Verhältnis zu der Gesamtwurzelzahl.

Stamm	Anzahl inokulierter Pflanzen	Wurzeln gesamt	Wurzeln mit YFPPTS1 Signal	Anteil an Wurzeln mit YFP Signal
K599	40	233	199	85,4%
15834	20	307	0	0
8136	20	34	0	0
1724	20	17	0	0

Die Untersuchung zeigte, dass der *A. rhizogenes* Stamm K599 als einziger dazu in der Lage war, Wurzeln zu induzieren, die die biT-DNA des pFF19-YFPPTS1 so stark exprimierten, dass die Fluoreszenz mittels eines Binokulars bei geringer Vergrößerung (ca. 20 fach) detektierbar war (Abbildung 12-B). Die Wurzeln, die ein eindeutiges YFPPTS1 Signal zeigten, konnten alle als „hairy roots“ identifiziert werden. Dementsprechend zeigten sie ein stärker verzweigtes Wurzelsystem und eine erhöhte Anzahl an Wurzelhaaren. Für den Stamm K599 konnte eine Transformationseffizienz von ca. 85,4% ermittelt werden. Diese Angaben variieren jedoch und waren chargenabhängig.

### 3.1.1.3.2 Überprüfung der Transformationseffizienz mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (cLSM)

Um die vorangegangenen Beobachtungen zu verifizieren, erfolgte die Untersuchung einzelner Wurzeln mittels cLSM. Bei der Untersuchung der Komposit-Pappel Wurzeln mittels cLSM konnte bei allen verwendeten transgenen *A. rhizogenes* Stämmen, ein YFP Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Wurzeln, die durch den Stamm K599 induziert worden waren, zeigten allerdings eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität (Abbildung 13-D), als Wurzeln, die mit den Stämmen 8196, 1724 oder 15834 induziert worden waren. Wurzeln der Kontrollpflanzen zeigten hingegen kein Fluoreszenzsignal.



**Abbildung 13: cLSM Untersuchung von Komposit-Pappel Wurzeln induziert durch unterschiedliche *A. rhizogenes* Stämme.**

Dargestellt sind einzelne transgene Wurzeln, die durch folgende *A. rhizogenes* Stämme induziert wurden: 1724 (A), 15834 (B), 8196 (C) und K599 (D). Die Anregung erfolgte mittels eines Argonlasers (488 nm). Die Aufnahmen A, B und C erfolgten bei einer Laserintensität von 25%. Die Aufnahme D erfolgte bei einer Laserintensität von 2%. Die Detektion des sYFPPTS1 Fluoreszenzsignals erfolgte in einem Fenster von 508-561 nm.

Da die Untersuchung am cLSM aufwendig ist und das Ziel des Projekts die möglichst einfache Signaldetektion war, wurde nur der Stamm K599 für weitere Untersuchungen ausgewählt.

### 3.1.2 Aktivierung der Agrobakterien

Der Infektionsprozess der Pflanze durch das Agrobakterium ist ein aufwendiger Prozess, der viele Ressourcen verbraucht (McCullen and Binns, 2006). Daher werden die Proteine, die für den Infektionsprozess benötigt werden, erst exprimiert, wenn das *Agrobacterium* einen geeigneten Wirt entdeckt (Stachel and Nester, 1986). Phenolische Moleküle, wie das *Acetosyringon*, fungieren dabei als Signalmoleküle (McCullen and Binns, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die vorherige Aktivierung der transgenen *A. rhizogenes* mit Acetosyringon einen positiven Effekt auf die Transformationseffizienz zeigt.

Die Untersuchung der gebildeten transgenen Komposit-Pappeln erfolgte nach einer Inkubationszeit von vier Wochen mittels eines Binokulars. Die transgenen Wurzeln wurden dabei auf ein YFPPTS1 Signal untersucht (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Vergleich der Inokulationsmethode zur Erzeugung von Komposit-Pappeln.**

Zwei verschiedene Methoden zur Inokulation von Pappel Stecklingen mit *A. rhizogenes* wurden verglichen. Dafür wurden jeweils 40 *P. tremula x alba* Stecklinge entweder mit einer durch Acetosyringon aktivierten Suspension (OD<sub>600</sub> von 1) transgener (pFF19-YFPPTS1) *A. rhizogenes* oder durch Eintauchen der Schnittfläche in eine transgene (pFF19-YFPPTS1) *A. rhizogenes* Kolonie inokuliert (ohne einer vorherigen Aktivierung durch Acetosyringon). Die Auswertung des Experiments erfolgte mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie. Gezeigt ist die Anzahl an Pflanzen, die nach einer vierwöchigen Inkubationszeit transgene Wurzeln (YFP Fluoreszenz) gebildet hatten.

Inokulationsmethode	Anzahl inokulierte Stecklinge	Anzahl an Pflanzen mit transgenen Wurzeln
Kolonie	40	26
Aktivierung	40	18

Eine höhere Ausbeute an Stecklingen mit transgenen Wurzeln konnte somit erreicht werden, wenn die Pappel Stecklinge direkt durch eine *A. rhizogenes* Kolonie inokuliert wurden. 26 von 40 Stecklingen, die auf diese Weise inokuliert wurden, bildeten transgene Wurzeln aus. Eine vorherige Aktivierung der Agrobakterien zeigte hingegen eine geringere Transformationsrate (18 von 40 Pflanzen).

### 3.1.3 Ektomykorrhizierung von Pappel Komposit-Pflanzen

Durch *A. rhizogenes* induzierte Komposit-Pappel Wurzeln zeigten einen „hairy root“ Phänotyp, der vermutlich durch die veränderte Wahrnehmung von Pflanzenhormonen, wie dem Auxin, ausgelöst wird (Veena and Taylor, 2007). Auxine spielen auch, in dem Prozess

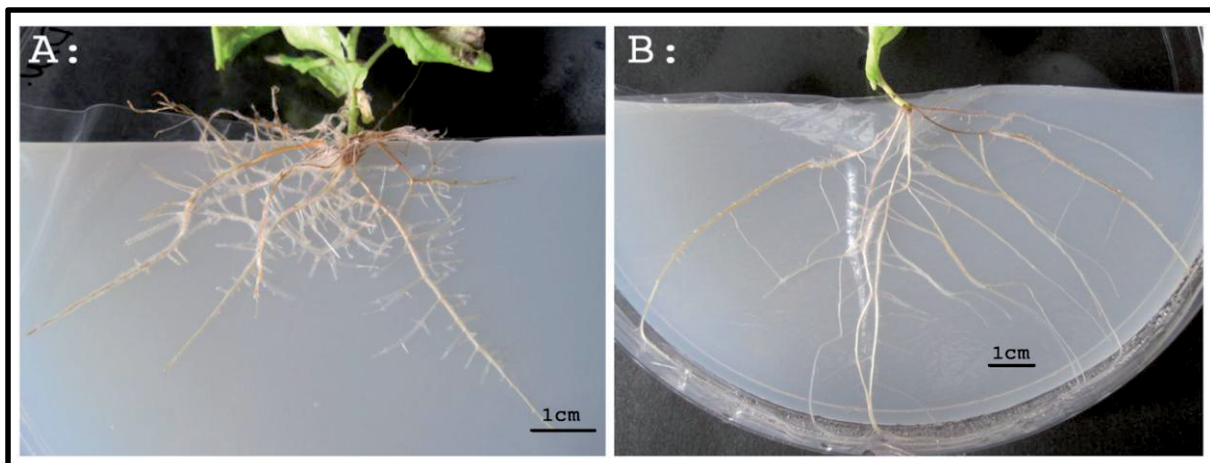


der Ektomykorrhizierung, eine entscheidende Rolle (Vayssieres et al., 2015). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich der „hairy root“ Phänotyp und die damit einhergehenden Veränderungen der pflanzlichen Physiologie, negativ auf die Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappeln auswirken.

### 3.1.3.1 Überprüfung des „hairy root“ Phänotyps

Die *in vitro* Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappeln wurde nach Hamp et al. (1996) (mit Modifikationen) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Pappel Wurzeln zusammen mit dem Myzel eines Ektomykorrhiza bildenden Pilzes auf einer Zellophanmembran inkubiert. Vor der Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappeln erfolgte zunächst eine Analyse des Wachstums der transgenen Wurzeln auf mit Zellophanmembran belegtem Wachstumsmedium. Verglichen wurde die Anatomie transgener und nicht transgener Wurzeln (Abbildung 14).

Die Komposit-Pappeln bildeten im Gegensatz zu Wildtyp Pflanzen Wurzeln mit einem „hairy root“ Phänotyp aus, die sich durch eine untypische Verteilung der Wurzelhaare, eine stärkere Verzweigung und ein gravitationsunabhängiges Wachstum kennzeichneten (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Vergleich des Wurzelsystems einer Komposit-Pflanze (A) und einer Kontrollpflanze (B).**

Die Bildung der Komposit-Pappel erfolgte durch Inokulation von *P. tremula x alba* Stecklingen mittels *A. rhizogenes* (Stamm K599). Als Negativkontrolle wurden Pflanzen verwendet, die nicht mit Agrobakterien inokuliert wurden. Vier Wochen nach der Inokulation wurden die Pflanzen in Petrischalen (150x20 cm) mit halbiertem MS6 Medium (10 g/l Saccharose) überführt. Das Wurzelsystem wurde dabei auf einer Zellophanmembran platziert. Dargestellt wird ein Vergleich der Wurzelsysteme einer Komposit-Pappel (K599) (A) und einer Negativkontrolle (B).

### 3.1.3.2 Untersuchung der ECM Bildung in Abhängigkeit der Zuckerkonzentration im Anzuchtmedium des Pilzes

Aufgrund der in der Natur vorherrschenden Mangelbedingungen, sind Ektomykorrhiza bildende Pilze und Pflanzen oft ökologisch aufeinander angewiesen (Nehls and Bodendiek,



2012). In einem *in vitro* System herrschen hingegen meistens optimale Bedingungen, unter denen häufig keine Ektomykorrhizen ausgebildet werden, da der Pilz und die Pflanze nicht aufeinander angewiesen sind (Nehls and Bodendiek, 2012). Um entsprechende Mangelbedingungen bei der *in vitro* Kultur herstellen zu können, wurde *Amanita muscaria* Myzel, auf unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen (5 mM, 10 mM, 20 mM und 50 mM) vorgezogen.

Eine effiziente Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappel Feinwurzeln wurde mit *A. muscaria* Myzel erreicht, das bei niedrigen Glukose-Konzentrationen vorgezogen wurde (20 mM, 10 mM und 5 mM). Keine Bildung von Ektomykorrhizen wurde hingegen bei der Verwendung von Pilzmyzelien erreicht, die auf 50 mM Glukose vorgezogenen waren. Die Bildung von Ektomykorrhizen an Komposit-Pappel Feinwurzel konnte nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Monaten beobachtet werden (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Ektomykorrhizen einer Komposit-Pappel mit *Amanita muscaria*.**

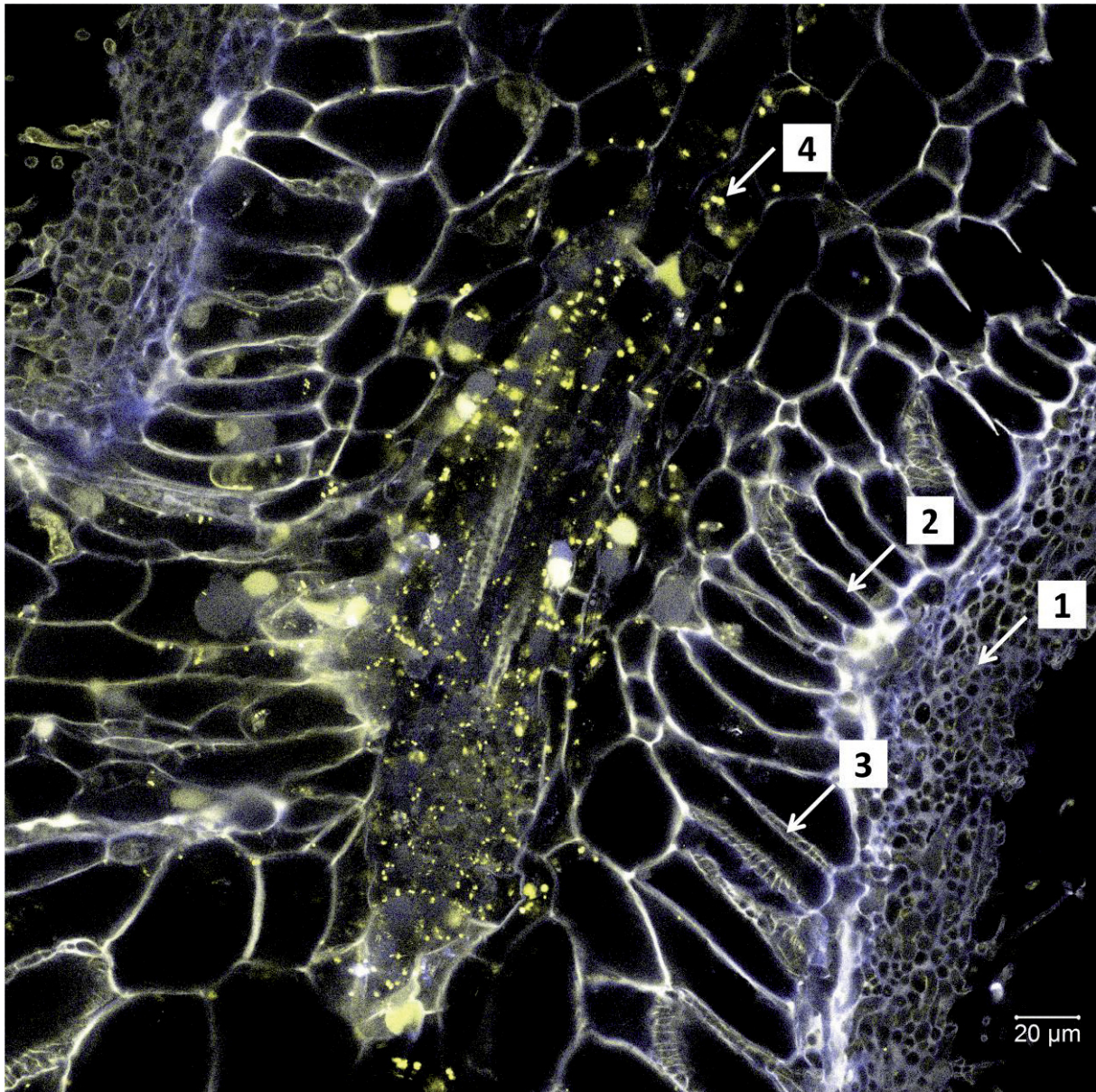
*P. tremula x alba* Stecklinge wurden mit dem *A. rhizogenes* Stamm K599 inokuliert und nach der Bewurzelung für ca. 2 bis 3 Monate zusammen mit dem Pilz *A. muscaria* in einem Petrischalensystem kultiviert. Dargestellt wird eine Auflicht-Aufnahme von ektomykorrhizierten Komposit-Pappel Feinwurzeln (Pilz angezogen bei 10 mM Glukose).

### 3.1.3.3 Mikroskopische Untersuchung der ECM von Komposit-Pflanzen

Eine ektomykorrhizierte Pappel-Feinwurzel ist gekennzeichnet durch die folgenden Merkmale: (i) einen Hyphenmantel, der die Feinwurzel umschließt, (ii) das Hartigsche Netz



zwischen den Rhizodermiszellen und (iii) radial verlängerten Rhizodermiszellen (Nehls, persönliche Information). Um die Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappel Feinwurzel zu bestätigen, erfolgte daher eine Untersuchung von einzelnen Ektomykorrhizen mittels cLSM. Diese Untersuchung sollte bestätigen, dass die genannten strukturellen Merkmale einer ECM ausgebildet wurden (Abbildung 16).

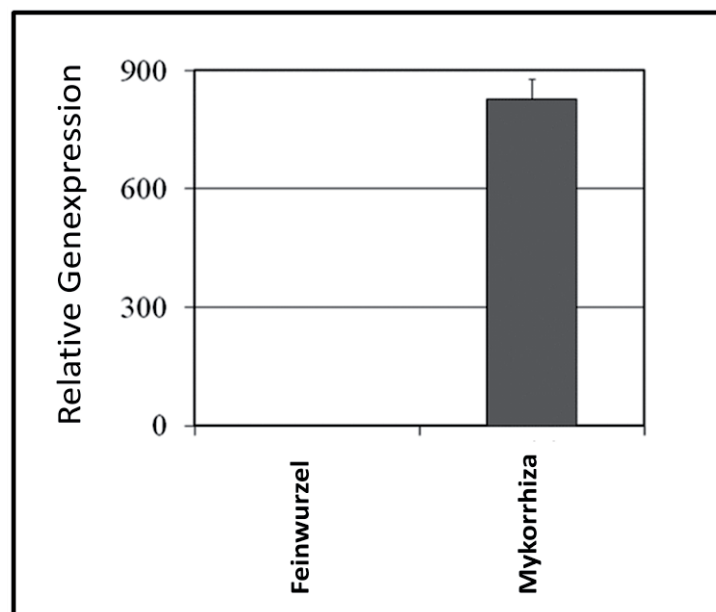


**Abbildung 16: Längsschnitt durch eine ektomykorrhizierte Feinwurzel einer Komposit-Pappel.** Komposit-Pappeln wurden durch die Inokulation mit transgenen (pBI121-1368bp-sYFPPTS1) *A. rhizogenes* (Stamm K599) erzeugt. Nach der Induktion der Wurzelbildung wurden die Wurzeln der Pflanzen in einem Petrischalensystem mit dem Pilz *A. muscaria* mykorrhiziert. Dargestellt wird ein 65 µm dicker Längsschnitt durch eine ektomykorrhizierte Feinwurzel. Die Pfeile markieren die strukturellen Merkmale einer Ektomykorrhiza (1: Myzelmantel, 2: radial verlängerte Rhizodermiszellen, 3: Hartigsches Netz) sowie die YFP Signale in Peroxisomen (4). Die Aufnahme erfolgte mittels cLSM, zur Anregung wurde ein Argonlaser (488 nm) eingesetzt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mit Photomultipliern in einem Bereich von 498-552 nm (YFP) bzw. von 650-695 nm (Hintergrundfluoreszenz).

Die Ektomykorrhizen der Komposit-Pappeln zeigten alle strukturellen Eigenschaften einer Pappel ECM. Anhand des sYFP Fluoreszenzsignals konnte auch die Expression der biT-DNA gezeigt werden.

### 3.1.3.4 Nachweis der Expression des *PtaSWEET1* in den Ektomykorrhizen einer Komposit-Pappel

Neben der mikroskopischen Analyse der Komposit-Pappel Ektomykorrhizen wurde anhand eines molekularen Markers auch die Funktionsfähigkeit der Ektomykorrhizen belegt. Hierzu wurde mittels qRT-PCR die Ektomykorrhiza spezifische Expressionssteigerung des *PtaSWEET1* Gens, das nur in ECM exprimiert wird, nachgewiesen.



**Abbildung 17: Untersuchung der Expression des *PtaSWEET1* in ektomykorrhizierten Komposit-Pappel Feinwurzeln.**

Gesamt RNA aus Ektomykorrhizen von *P. tremula x alba* Komposit-Pappeln und *A. muscaria* wurde isoliert und zur Synthese von Erststrang cDNA eingesetzt. *PtaSWEET1* spezifische Primer (Nehls, unveröffentlicht) wurden zusammen mit dem konstitutiv exprimierten *ubiquitin* Primern (Brunner et al., 2004b) für eine qRT-PCR verwendet. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen der CT Ratios des *PtaSWEET1* und *Ubiquitin*. Die qRT-PCR wurde nach (Willmann et al., 2014) durchgeführt. (Neb, Hintelmann, Nehls, unveröffentlicht).

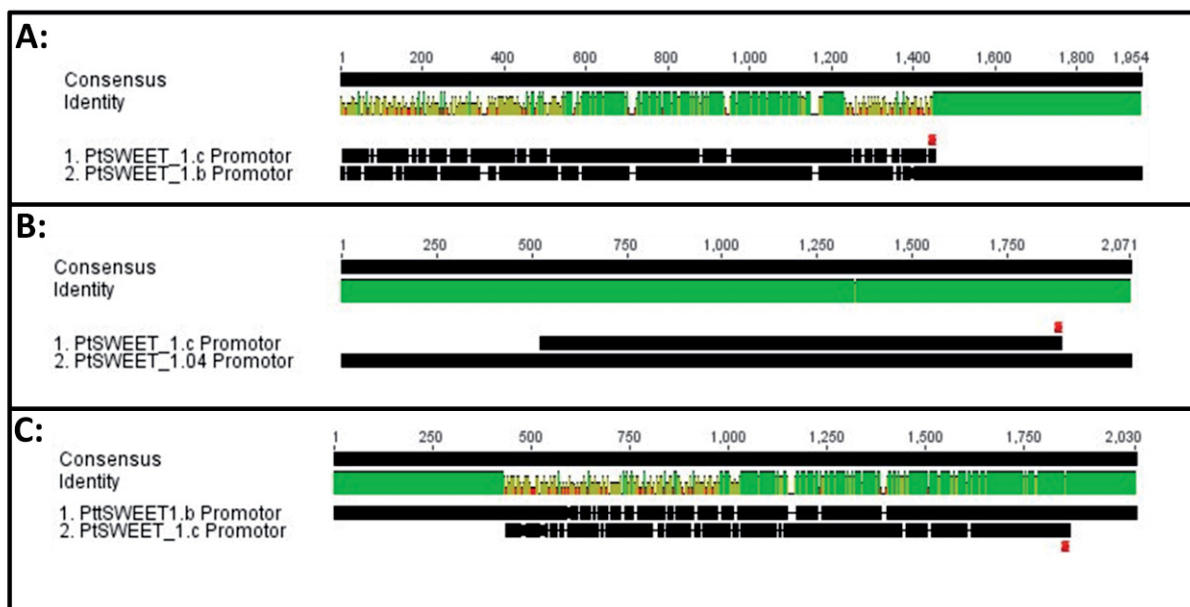
Die qRT-PCR Analyse zeigt eine Expression des *PtaSWEET1* nur in Ektomykorrhizen von Komposit-Pappeln jedoch nicht in nicht mykorrhizierten Feinwurzeln. Dieses Muster ist typisch für Pappeln (Nehls, persönliche Information).

## 3.2 Analyse der Promotoren von Ektomykorrhiza spezifisch induzierten *SWEET*-Genen

Durch vorangegangene Microarray Studien, konnte die Ektomykorrhiza spezifische Induzierbarkeit von vermutlich drei *SWEET*-Genen in *Populus trichocarpa* nachgewiesen werden (Nehls, unveröffentlicht). Die stark erhöhte Expression (bis zu 1400 fach) deutet auf Mykorrhiza spezifische Induktion der entsprechenden Gene hin. Um zu verstehen, wie die Expressionssteigerung zu Stande kommt wurde im Rahmen dieser Arbeit die Analyse eines ECM induzierten *SWEET*-Promotor Fragments durchgeführt.

### 3.2.1 Auswahl eines Promotors

Um einen für diese Analyse geeigneten Promotor auswählen zu können, erfolgte zunächst ein Abgleich der Promotorsequenzen von vier Ektomykorrhiza induzierten *SWEET*-Homologen aus *P. trichocarpa* und *P. tremula x tremuloides* (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Sequenzvergleich des Promotorbereichs von vier ECM induzierten *SWEET* Homologen.**

Die Promotorsequenzen der Gene *PtSWEET\_1.c* (1,3 kb), *PtSWEET\_1.b* (1,8 kb), *PtSWEET\_1.04* (2 kb) und *PttSWEET1.b* (2 kb) wurden mit Hilfe der Geneious Software (Biomatters) miteinander verglichen. Dargestellt sind die Vergleiche der Promotorsequenzen von *PtSWEET\_1.c* und *PtSWEET\_1.b* (A), *PtSWEET\_1.c* und *PtSWEET\_1.04* (B) und *PtSWEET\_1.c* und *PttSWEET1.b*(C).

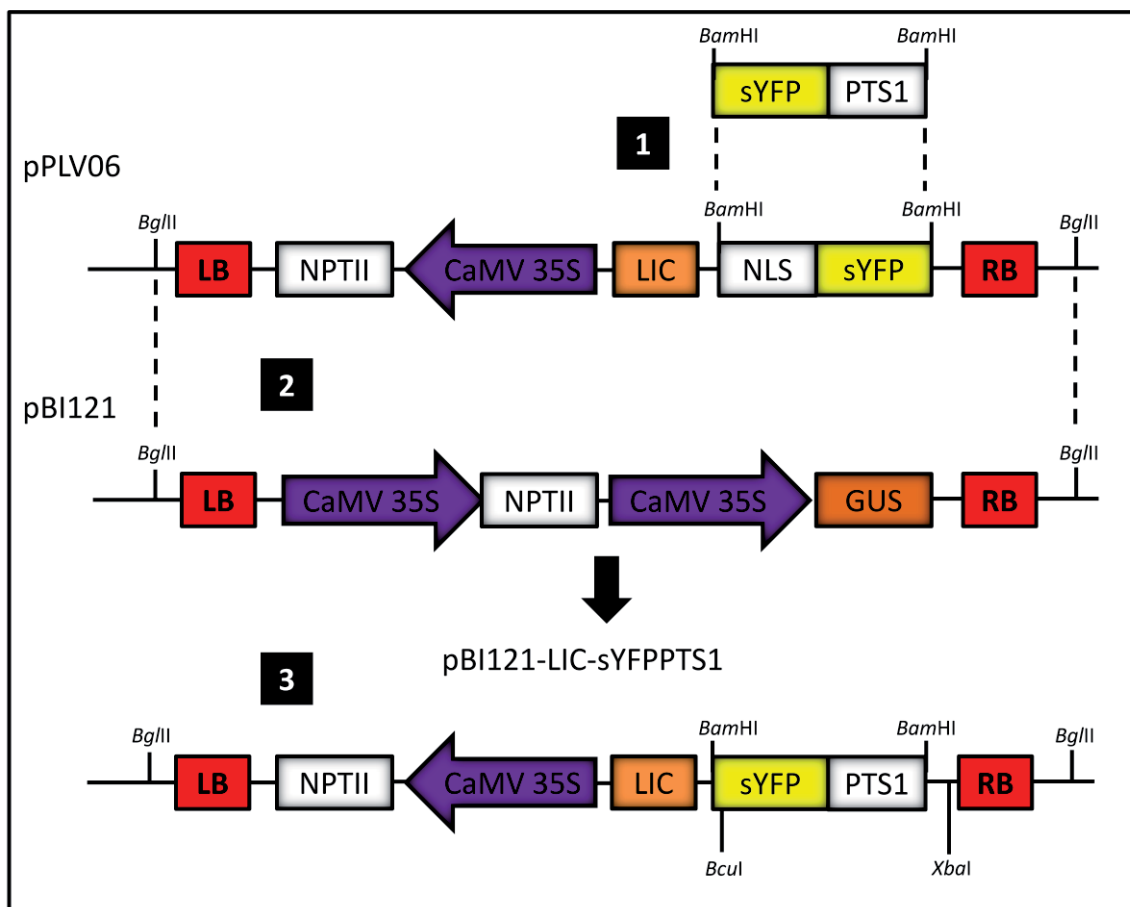
Ein Alignment der Promotor-Sequenzen von *PtSWEET\_1.c* und *PtSWEET\_1.b* zeigte eine hohe Homologie in der Region zwischen ca. 600 bis 1200 bp (Abbildung 18-A). Die Promotor-Sequenzen des *PtSWEET\_1.c* und des *PtSWEET\_1.04* sind hingegen nahezu identisch und unterscheiden sich lediglich in einer Base (Abbildung 18-B). Die Promotor-Sequenz des *PtSWEET\_1.c* und des *PttSWEET1.b* zeigen eine hohe Homologie im Bereich von ca. 1000 bis 1800 bp (Abbildung 18-C). Da *PtSWEET\_1.c* und *PtSWEET\_1.04* eine sehr



starke Homologie in ihren Promotorsequenzen zeigten, wurde davon ausgegangen, dass diese Gene auf gleiche Weise reguliert sein müssten. Aus diesem Grund wurden die Promotoren von *PtSWEET\_1.c* und *PtSWEET\_1.04* in einem ersten Sequenzabgleich für eine Promotorstudie ausgewählt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der *PtSWEET\_1.c* Promotor für eine Promotoranalyse ausgewählt, da das durch dieses Gen kodierte Protein in vorangegangenen Arbeiten bereits funktionell charakterisiert wurde, während für das *PtSWEET\_1.04* keine cDNA amplifiziert werden konnte (S. Nintemann, 2012).

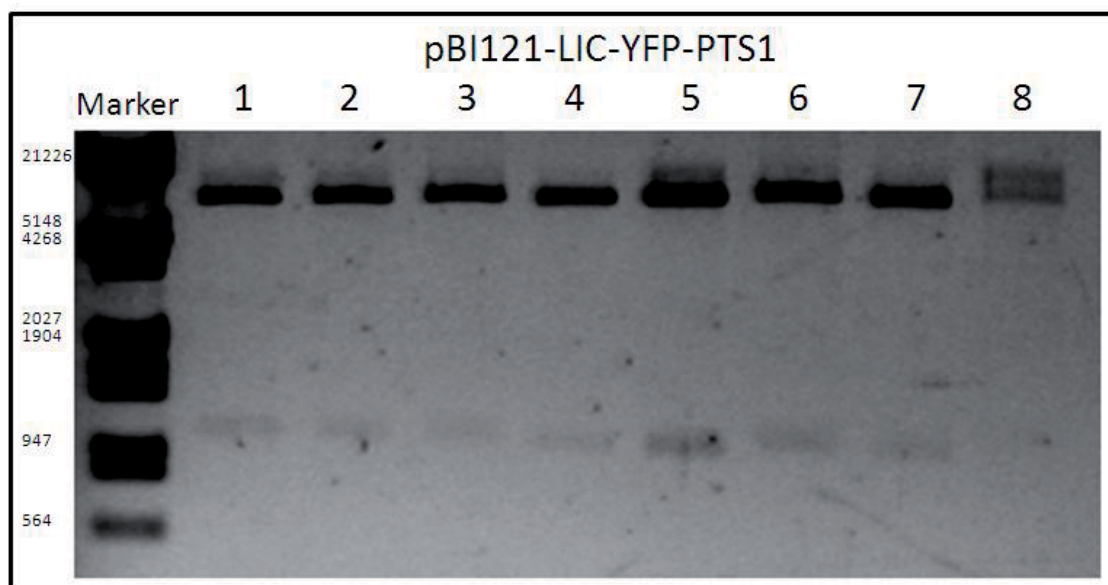
### 3.2.2 Konstruktion des binären Vektors pBI121-LIC-sYFPPTS1

Um den ausgewählten *PtSWEET\_1.c* Promotor analysieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Binärvektor modifiziert, indem eine „Ligase Independent Cloning“ (LIC) Sequenz in die T-DNA des Binärvektors integriert wurde, um eine einfache und schnelle Integration von Promotorfragmenten zu ermöglichen (Abbildung 19). Als Reporter wurde ein peroxisomal lokalisiertes gelb fluoreszierendes Protein (sYFPPTS1) verwendet.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der Konstruktion des binären Vektors pBI121-LIC-sYFPPTS1.** Als Ausgangsprodukt wurden die Vektoren pBI121 und pPLV06 verwendet. Die T-DNA des pBI121-LIC-sYFPPTS1 enthält ein Kanamycin Resistenz Gen (*nptII*, weiß) unter der Kontrolle eines 35S Promotors (violett), eine LIC-Sequenz (orange), ein sYFPPTS1 (gelb/weiß) und die border-Sequenzen (RB und LB) in Rot. Unter Verwendung der LIC-Sequenz kann eine beliebige Promotor-Sequenz mittels LIC-Reaktion in den Vektor eingefügt werden. Diese Promotor-Sequenz steuert in der Pflanzenzelle die Expression des sYFPPTS1.

Zur Klonierung des Vektors pBI121-LIC-sYFPPTS1 wurde das kernlokalisierte sYFP des Vektors pPLV06 (pGIIK-LIC-SV40-sYFP-NOST) (De Rybel et al., 2011) durch ein sYFP mit einem peroxisomalen Lokalisierungssignal (sYFPPTS1) ausgetauscht (Abbildung 19-1). Zu diesem Zweck wurde der kodierende Bereich eines sYFPs mittels PCR amplifiziert (Primer: siehe Tabelle 16; Anhang), wobei gleichzeitig an beiden Enden der DNA *Bam*HI Schnittstellen sowie am 3'-Ende des kodierenden Bereichs des sYFP eine peroxisomale Zielsequenz angefügt wurde. Anschließend wurde das sYFPNLS des pPLV06 unter der Verwendung von *Bam*HI gegen das amplifizierte *Bam*HI gedaute sYFPPTS1 ausgetauscht. Die T-DNA des so entstandenen pPLV06-sYFPPTS1 wurde unter Verwendung von *Bg*III Schnittstellen in das Vektorrückgrat des pBI121 überführt (Abbildung 19-2). Die ursprüngliche T-DNA des pBI121 wurde vorher unter Verwendung von *Bg*III entfernt. Der so erhaltene Vektor pBI121-LIC-sYFPPTS1 (Abbildung 19-3) wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft (Abbildung 20). Anschließend der sYFPPTS1 Bereich mittels Sanger Sequenzierung verifiziert.



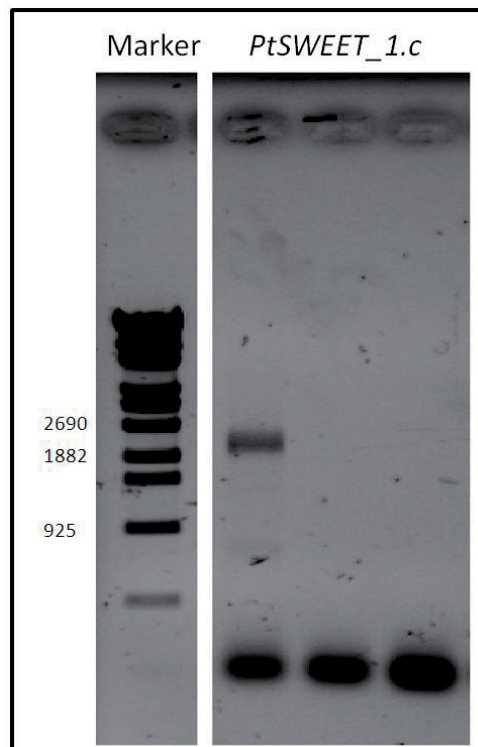
**Abbildung 20: Restriktionsanalyse des pBI121-LIC-sYFPPTS1 mit *Bcu*I und *Xba*I.**

Nach der Transformation des Konstrukts in *E. coli* wurde die Plasmid-DNA von acht Einzelkolonien isoliert und mittels Restriktionsanalyse mit *Bcu*I und *Xba*I überprüft. Bei der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA wurden DNA-Fragmente von 10287 bp und 986 bp erwartet.

### 3.2.3 Untersuchung des *PtSWEET\_1.c* Promotors

Zur Analyse des *PtSWEET\_1.c* Promotors wurde eine 2000 bp lange DNA Sequenz, die den 5'-Bereich der kodierenden Sequenz enthielt, amplifiziert (Primer: siehe Tabelle 17; Anhang) (Abbildung 21) und in den pJet1.2/blunt Vektor kloniert. Die DNA Sequenz von zwei der erhaltenen Klone wurde dann mittels Sanger Sequenzierung überprüft.



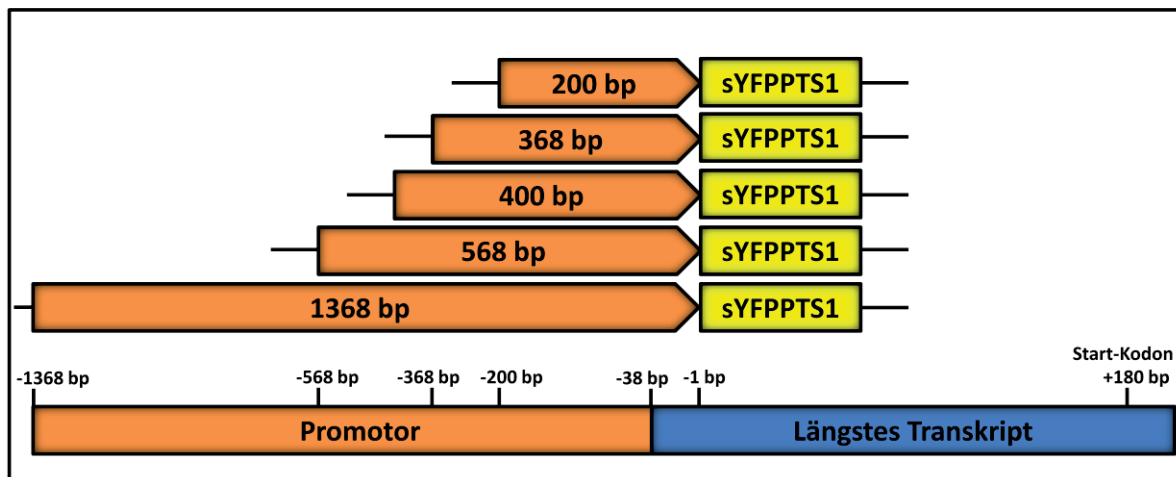


**Abbildung 21: Amplifikation eines 2 kb großen genomischen *PtSWEET\_1.c* DNA-Fragments.**

Genomische DNA wurde aus *Populus trichocarpa* Blättern isoliert und anschließend für die Amplifikation eines 2 kb langen Bereichs des *PtSWEET\_1.c* Gens eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern Pt2s07360prFOR1 und Pt2s07360prREV1. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung von Aliquots der PCR Ansätze. Die Annealingtemperaturen wurden wie folgt variiert: Spur 1 52°C, Spur 2 55°C und Spur 3 58°C.

### 3.2.3.1 Klonierung der Promotorfragmente

Mit Hilfe der Software Geneious (Biomatters) wurden Primer für die Amplifikation von unterschiedlich langen Promotorfragmenten berechnet. Ausgehend von dem gleichen Rück-Primer wurden Vorwärts-Primer für insgesamt fünf Promotorfragmente erstellt. Die Position des Rück-Primers wurde dabei so gewählt, dass 38 bp des 5'-Bereichs des längsten bekannten Transkripts (Nehls, unveröffentlicht) mit amplifiziert wurden. Bei der Verkürzung wurde die kodierende Sequenz des *PtSWEET\_1.c*-Gens entfernt. Die Benennung der untersuchten Promotorfragmente (Abbildung 22) bezieht sich auf ihre Länge ausgehend vom 5'-Ende des Rückwärts-Primers (-1 bp). Das Start-Kodon des kodierenden Bereiches liegt dabei weitere +180 bp stromabwärts der Primer-Bindungsstelle (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Schematische Darstellung der Sequenz des *PtSWEET\_1.c* Promotors sowie der trunkierten Promotor-Reporter Konstrukte.**

Dargestellt sind der Promotor des *PtSWEET\_1.c* mit dem längsten bekannten Transkript und dem Start-Kodon sowie die funktionell analysierten Fragmente des Promotors. Das längste bekannte Transkript wird in Blau dargestellt, die Promotor-Sequenz sowie die unterschiedlich langen trunkierten Promotorfragmente in Orange. Die Bindestelle des zur Amplifikation der Promotorfragmente verwendeten reverse Primers (07360 Pr VK LIC REV) wird mit -1 bp angegeben.

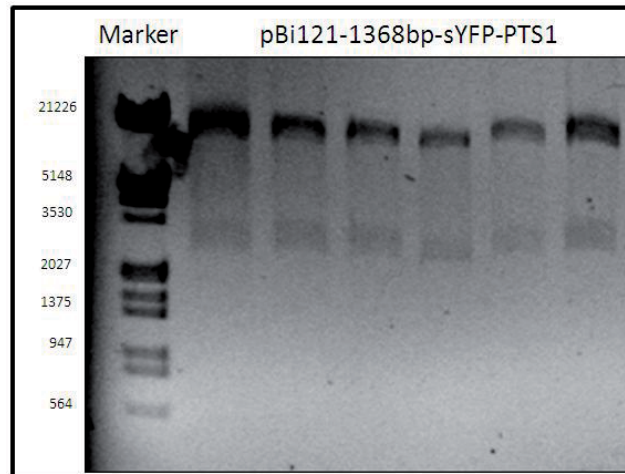
Alle verwendeten Primer wurden so erstellt, dass sie jeweils am 5'-Ende einen LIC-Adapter als Überhang enthielten (Tabelle 6). Nach der erfolgreichen Amplifikation wurden alle Promotorfragmente mittels LIC-Reaktion in pBI121-LIC-sYFPPTS1 kloniert.

**Tabelle 6: Mittels PCR amplifizierte Fragmente des *PtSWEET\_1.c* Promotors.**

Dargestellt sind (von links nach rechts) die Größen der jeweiligen amplifizierten Fragmente, die verwendeten Primerpaare sowie der gewählte Name für das endgültige Konstrukt.

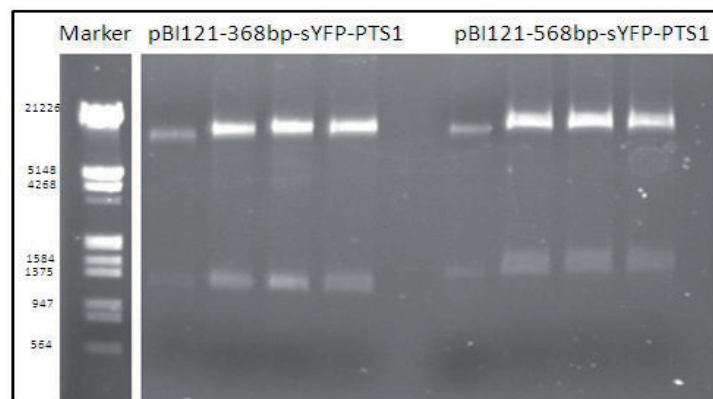
Promotorfragment	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer	Konstrukt
1368 bp	07360 Pr LIC FOR	07360 Pr VK LIC REV	pBI-1368bp-sYFPPTS1
568 bp	FOR 07360VK 568	07360 Pr VK LIC REV	pBI-568bp-sYFPPTS1
400 bp	FOR-LIC-07360-400bp	07360 Pr VK LIC REV	pBI-400bp-sYFPPTS1
368 bp	FOR 07360VK 368	07360 Pr VK LIC REV	pBI-368bp-sYFPPTS1
200 bp	FOR-LIC-07360-200bp	07360 Pr VK LIC REV	pBI-200bp-sYFPPTS1

Nach der gerichteten Klonierung der Promotorfragmente in den binären Vektor wurden jeweils mehrere Klone mittels einer Restriktionsanalyse bzw. PCR analysiert (Abbildung 23 bis Abbildung 25).



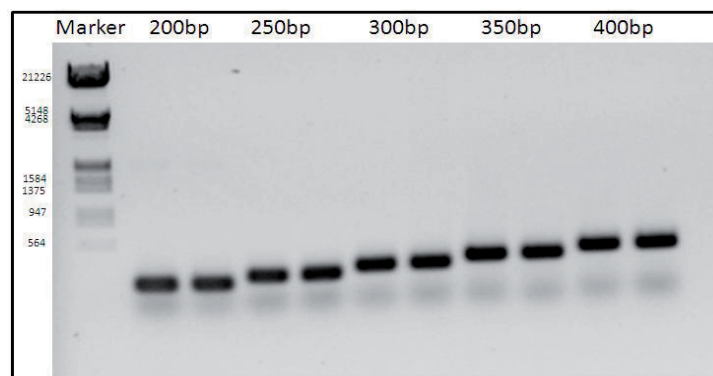
**Abbildung 23: Restriktionsanalyse von pBI121-1368bp-sYFPPTS1 mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRI*.**

Nach der Klonierung des Konstruktes pBI121-1368bp-sYFPPTS1 wurde die Plasmid-DNA aus sechs unabhängigen Klonen isoliert und anschließend einer Restriktionsanalyse mit *BcuI* und *XbaI* unterzogen. Erwartet wurden Fragmente von 10241 bp und 2400 bp.



**Abbildung 24: Restriktionsanalyse von pBI121-368bp-sYFPPTS1 und pBI121-568bp-sYFPPTS1 mit den Enzymen *XbaI* und *HindIII*.**

Nach der Klonierung der Konstrukte pBI121-368bp-sYFPPTS1 und pBI121-568bp-sYFPPTS1 wurde die Plasmid-DNA aus je vier unabhängigen Klonen isoliert und anschließend einer Restriktionsanalyse mit *XbaI* und *HindIII* unterzogen. Erwartet wurden für pBI121-368bp-sYFPPTS1 Fragmente von 10229 bp und 1412 bp, für pBI121-568bp-sYFPPTS1 10229 bp und 1612 bp.

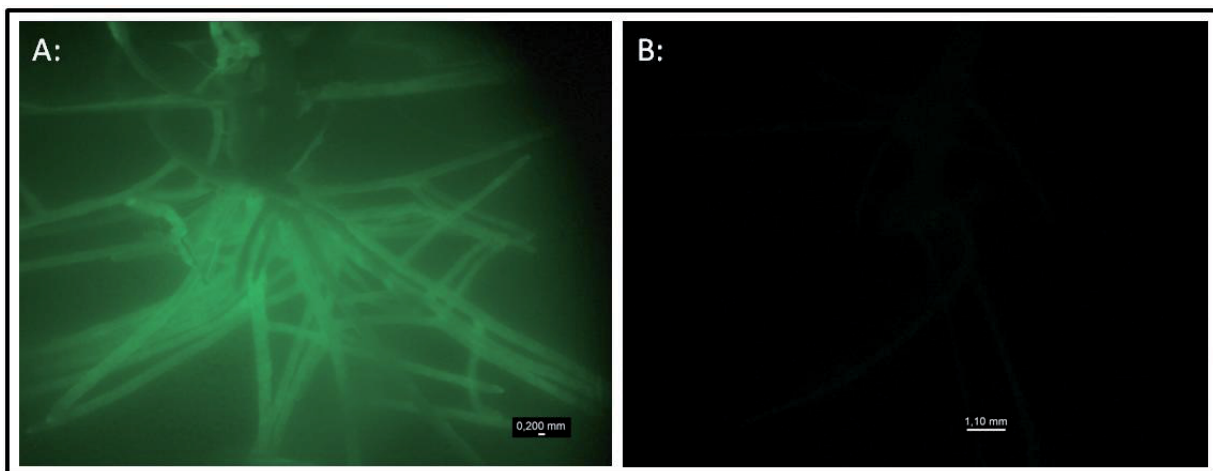


**Abbildung 25: PCR basierte Überprüfung der Klonierung von *PtSWEET\_1.c* Promotorfragmenten im Bereich zwischen 200 bp und 400 bp Länge.**

Nach der erfolgreichen Klonierung in den pBI121-LIC-sYFPPTS1 Vektor erfolgte eine PCR basierte Überprüfung der Konstrukte. Zu diesem Zweck wurde Plasmid-DNA aus je zwei Kolonien isoliert und die Inserts mittels PCR amplifiziert. Für diese Analyse wurden die LIC-Primer verwendet, die auch zur spezifischen Amplifikation der jeweiligen Konstrukte eingesetzt worden waren (Tabelle 18; Anhang). Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR-Fragmente. Erwartet wurden Fragmente von 239 bp, 289 bp, 339 bp, 389 bp und 439 bp.

### 3.2.3.2 Transformation von *PtSWEET\_1.c* Promotor-Reporter Konstrukten in *P. tremula x alba* Pflanzen

Alle Konstrukte wurden zur Herstellung von *P. tremula x alba* Komposit-Pappeln eingesetzt. Anschließend wurden die erhaltenen Wurzeln mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert. Bei dieser Untersuchung wurden die gebildeten Wurzeln auf ein peroxisomales YFP Signal hin untersucht (Abbildung 26). Ein Fluoreszenzsignal des sYFPPTS1 wurde nur an Komposit-Pappel Wurzeln beobachtet, die mit den Konstrukten pBI121-368bp-sYFPPTS1 und pBI121-200bp-sYFPPTS1 transformiert wurden (Abbildung 26-A).



**Abbildung 26: Vergleich der Fluoreszenzintensität zweier Komposit-Pappeln, die mit den Konstrukten pBI121-368bp-sYFPPTS1 (A) bzw. pBI121-1368bp-sYFPPTS1 (B) transformiert wurden.**

*P. tremula x alba* Stecklinge wurden mit transgenem *A. rhizogenes* Stamm K599 inokuliert. Nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen erfolgte die Analyse der Komposit-Pappeln mittels eines Binokulars (UV-Lampe und YFP-Filter). Dargestellt sind die Aufnahmen zweier Komposit-Pappeln unter UV-Licht, die das sYFPPTS1 unter der Kontrolle eines 1368 bp (B) bzw. 368 bp (A) langen *PtSWEET\_1.c* Promotorfragmentes exprimieren. Für die Aufnahmen wurden identische Leserintensitäten sowie Kamera-Einstellungen verwendet.

Aus der Anzahl insgesamt gebildeter Wurzeln sowie der Anzahl an fluoreszierenden Wurzeln wurde die Transformationseffizienz bestimmt (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Ergebnisse der visuellen Untersuchung des sYFPPTS1 in Komposit-Pappeln.**

Die oben beschriebenen Promotor-Reporter Konstrukte wurden in den *A. rhizogenes* Stamm K599 transformiert und anschließend dazu verwendet, um je 20 *P. tremula x alba* Stecklinge zu inokulieren (mit dem Konstrukt pBI121-368bp-sYFPPTS1 wurden 60 Stecklinge inokuliert). Als Negativkontrolle dienten Stecklinge, die nicht mit Bakterien behandelt wurden. Nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen erfolgte die Bestimmung der Transformationseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie (Leica, Mz10F). Dargestellt sind Anzahl der inokulierten Stecklinge, die Anzahl der Stecklinge mit Wurzelbildung, Gesamtzahl der ausgebildeten Wurzeln sowie der Anteil an Wurzeln, die ein Fluoreszenzsignal zeigten (in %).

Untersuchtes Konstrukt	Anzahl der inokulierten Stecklinge	Anzahl der Stecklinge mit Wurzelbildung	Gesamtzahl der Wurzeln	Wurzeln mit Fluoreszenzsignal (%)
pBI121-1368bp-sYFPPTS1	20	9	69	0 (0%)
pBI121-400bp-sYFPPTS1	20	11	41	0 (0%)
pBI121-368bp-sYFPPTS1	60	41	354	317 (89%)
pBI121-200bp-sYFPPTS1	20	7	57	56 (98%)
pBI121-LIC-sYFPPTS1 (leerer Vektor)	20	12	109	0 (0%)
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	20	20	77	0 (0%)

Die Anzahl an Pflanzen, die Wurzeln ausbildeten, zeigte chargenspezifische leichte Unterschiede. Die Transformationseffizienz lag für pBI121-368bp-sYFPPTS1 bei 89% und für pBI121-200bp-sYFPPTS1 bei 98%. Da für die anderen Konstrukte kein Fluoreszenzsignal beobachtet wurde, konnte keine Transformationseffizienz ermittelt werden.

### 3.2.3.3 Transformation ausgewählter Promotor Reporter Konstrukte in *Populus tremula x tremuloides* Pflanzen

Um die vorangegangenen Ergebnisse, der *PtSWEET\_1.c* Promotor-Untersuchung in *P. tremula x alba* Komposit-Pappeln zu bestätigen und eine mögliche Art-spezifische Aktivität in *P. tremula x alba* auszuschließen, wurden ausgewählte Promotor-Reporter Konstrukte (Tabelle 8) in *Populus tremula x tremuloides* Komposit Pflanzen analysiert. Die Auswertung des Experimentes erfolgte nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Mz10F, Leica Microsystems, UV-Lampe und YFP-Filter) (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Überprüfung der Promotor-Reporter Konstrukte in *P. tremula x tremuloides*.**

Transgene (pBI121-400 bp-sYFPPTS1 bzw. pBI121-368 bp-sYFPPTS1) *A. rhizogenes* (Stamm K599) wurden verwendet, um je 20 *P. tremula x tremuloides* Stecklinge zu inokulieren. Als Negativkontrolle dienten Stecklinge, die nicht mit Bakterien behandelt wurden. Nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen wurden die induzierten Wurzeln mittels eines Binokulars auf ein Fluoreszenzsignal des sYFPPTS1 untersucht. Gezeigt werden die Ergebnisse dieser Untersuchung mit dem prozentualen Anteil an Wurzeln, die ein Fluoreszenzsignal zeigten (Transformationseffizienz).

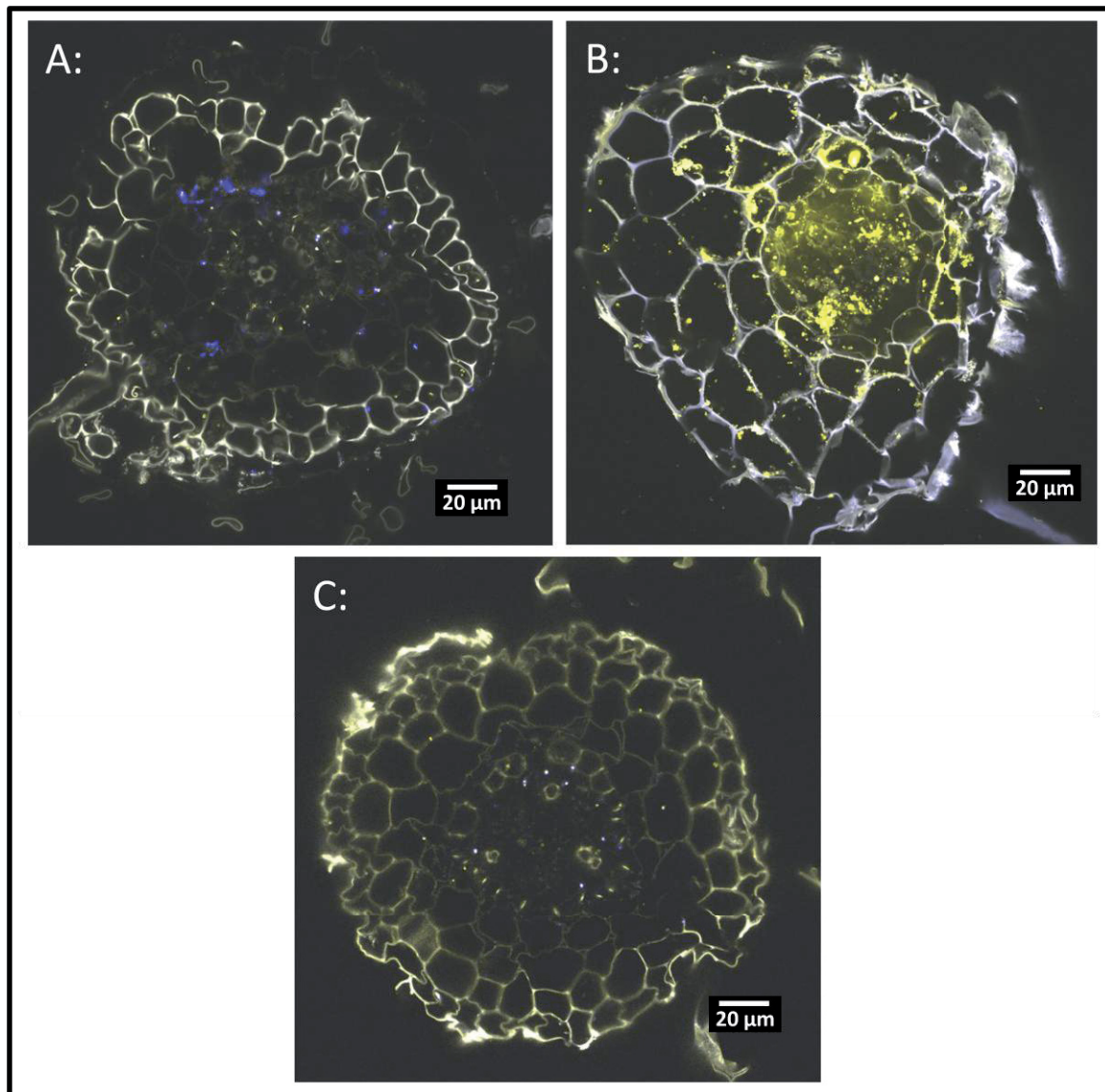
Promotorfragment	Anzahl Stecklinge mit Wurzelbildung	Wurzeln, die bei der Untersuchung mittels Epifluoreszenzmikroskopie ein YFP Signal zeigten [%]
400 bp	13	0
368 bp	18	75
H <sub>2</sub> O (Kontrolle)	17	0

An Pflanzen, die mit dem Konstrukt pBI121-368bp-sYFPPTS1 transformiert wurden, zeigten 75% der gebildeten Wurzeln ein starkes sYFPPTS1 Signal. An Pflanzen, die mittels des pBI121-400bp-sYFPPTS1 transformiert wurden, konnte kein sYFPPTS1 Signal festgestellt werden.

#### 3.2.3.4 Untersuchung der Komposit-Pflanzen Wurzeln mittels cLSM

Um die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen zu verifizieren, erfolgte eine Analyse von Komposit-Pappel Wurzel-Querschnitten (Schnittdicke: 65 µm) mittels cLSM (Abbildung 27).





**Abbildung 27: Vergleich der Fluoreszenzintensität von transgenen Komposit-Pappel Wurzeln, die mit unterschiedlichen Konstrukten transformiert worden waren.**

Verschiedene Konstrukte des trunkierten Promotors wurden verwendet, um mittels *A. rhizogenes* Stamm K599 transgene Komposit-Pappeln (*P. tremula x alba*) zu erzeugen. 65 µm dicke Querschnitte nicht mykorrhizierter, transgener Pappelfeinwurzeln wurden mittels cLSM-Mikroskopie analysiert. Die Anregung erfolgte mittels Argonlaser bei 488 nm mit einer Lasserintensität von 10%. Die Detektion des spezifischen YFP-Signals erfolgte bei 490-570 nm (YFP-Kanal), während die Hintergrundfluoreszenz bei 610-758 nm detektiert wurde (Hintergrund-Kanal). Dargestellt sind Überlagerungsbilder (YFP- und Hintergrund-Kanal) der Konstrukte pBI121-1368bp-sYFPPTS1 (A), pBI121-200bp-sYFPPTS1 (B) und des leeren Vektors pBI121-LIC-sYFPPTS1 (C). (Der Größenbalken entspricht 20 µm)

In den Querschnitten aller untersuchten transgenen Wurzeln war eine deutliche Hintergrundfluoreszenz der Zellwand erkennbar (Abbildung 27-C). Während bei der Negativkontrolle als auch beim längsten Promotorfragment im YFP-Kanal nur schwache Signale erkennbar waren, konnte beim Konstrukt pBI121-200bp-sYFPPTS1 ein starkes sYFP-Signal in den Peroxisomen detektiert werden (Abbildung 27-B). Die Expression der kurzen Promotor-Reporter Konstrukte (200 bp und 368 bp) war vorwiegend im Vaskulären System nachweisbar. Ähnliche Expressionsmuster wurden für Expressionen mittels 35S-

Promotor in *Coffea arabica* Komposit-Pflanzen Wurzeln beobachtet (Alpizar et al., 2006) und lassen sich durch das geringe Volumen der Parenchym-Zellen im Vaskulären System erklären. Da die Anzahl der Peroxisomen in verschiedenen Zellen vergleichbar groß ist, resultiert aus dem geringeren Volumen ein günstigeres Verhältnis zwischen Zelllumen und Peroxisomen. Dementsprechend befinden sich üblicherweise mehr Peroxisomen in der konfokalen Ebene und sind dadurch in solchen Geweben leichter detektierbar.

Für Promotorfragmente der Längen von 368 bp und 200 bp wurden keine Unterschiede in der Fluoreszenz-Intensität festgestellt. Um eine Einschätzung der Expressionsstärke zu ermöglichen, wurde die minimale Intensität des Anregungslasers (Argonlaser 488 nm) bestimmt, die benötigt wurde, um ein eindeutiges Fluoreszenzsignal (sYFPPTS1) zu detektieren (Tabelle 9). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen den beiden verwendeten Pappel-Hybriden festgestellt werden.

**Tabelle 9: Minimale benötigte Laserintensität zur Visualisierung des sYFPPTS1 Signals mittels cLSM.**

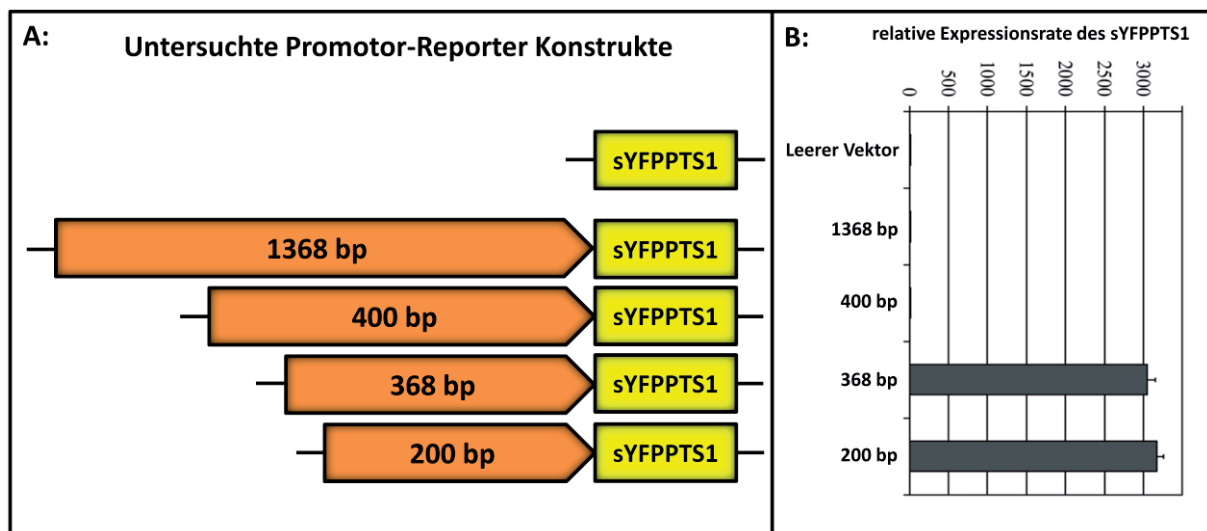
Querschnitte von transgenen *P. tremula x alba* Komposit-Pappel Wurzeln, die mit unterschiedlich langen Promotor-Reporter Konstrukten transformiert waren, wurden mittels cLSM-Mikroskopie analysiert. Dargestellt ist die minimale Laserintensität, die benötigt wurde um das sYFPPTS1 Signal visualisieren zu können. Eine hohe Laserintensität deutet auf eine niedrige Expressionsrate, während eine niedrige Laserintensität auf eine hohe Expressionsrate des sYFPPTS1 hindeutet. Für die Wurzeln der Kontrollpflanzen (H<sub>2</sub>O-Kontrolle) konnte keine Laserintensität ermittelt werden, da diese kein sYFPPTS1 exprimierten.

Konstrukt	Laserintensität [%]
pBI121-1368bp-sYFPPTS1	10
pBI121-400bp-sYFPPTS1	10
pBI121-368bp-sYFPPTS1	0,5
pBI121-200bp-sYFPPTS1	0,5
pBI121-LIC-sYFPPTS1 (leerer Vektor)	10
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	-

Die minimale notwendige Laserintensität lag für die kürzesten Promotorfragmente (368 bp und 200 bp) bei 0,5%, während für die längeren Promotorfragmente (1368 bp und 400 bp) eine Laserintensität von 10% benötigt wurde. Eine Hintergrund-Expression des sYFPPTS1 konnte, bei 10% Laserintensität auch in Wurzeln beobachtet werden, die mit dem leeren Vektor (pBI121-LIC-sYFPPTS1) transformiert worden waren (Negativ-Kontrolle). In den Wurzeln der nicht transformierten Negativkontrolle konnte hingegen kein sYFPPTS1 Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Neben der visuellen Untersuchung der Komposit-Pappel Wurzeln erfolgte auch eine Analyse der sYFPPTS1 Expression mittels qRT-PCR (Nehls et al., unveröffentlicht). Hierbei konnte

das Ergebnis der visuellen Untersuchung bestätigt werden. Während Promotorfragmente von 1368 bp bis 400 bp ebenso wie die Negativkontrolle lediglich eine schwache Hintergrundexpression des YFP-Gens zeigten, konnte bei dem kürzeren Promotor-Reporter Konstrukte eine hohe Expression festgestellt werden (Abbildung 28). Da der Bereich zwischen 400-368 bp sich negativ auf die Expression des Reporters auswirkt, wird dieser in den nachfolgenden Abschnitten als Silencer bezeichnet. Der Bereich 200-1 bp, der sich positiv auf die Expression des Reporters auswirkt, wird in den nachfolgenden Abschnitten als Enhancer bezeichnet.

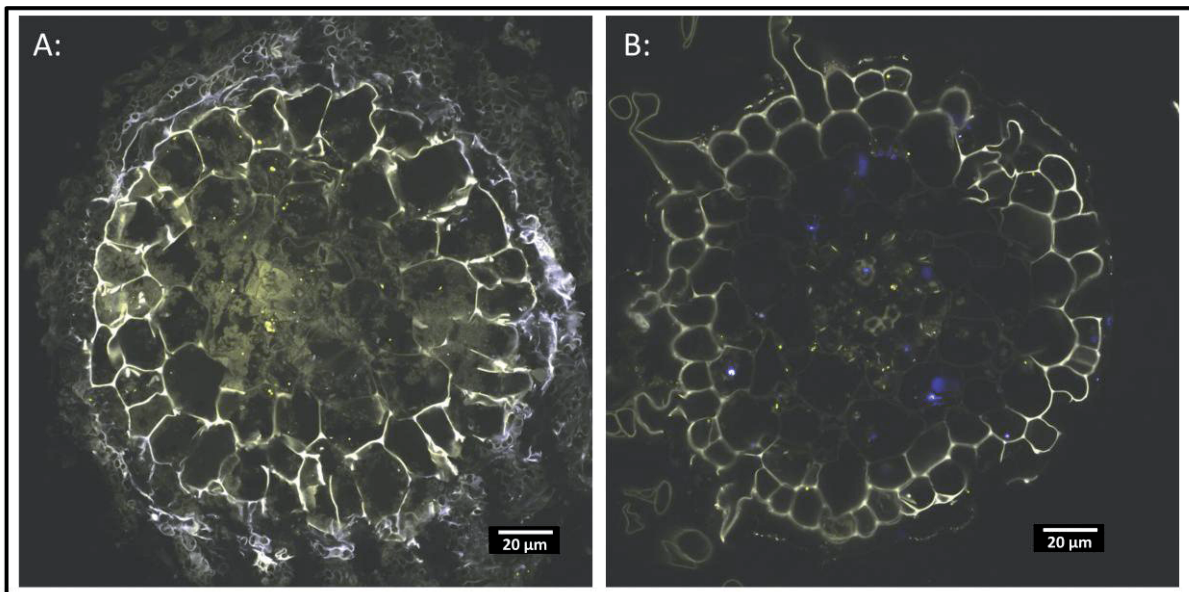


**Abbildung 28: Schematische Darstellung der *PtSWEET\_1.c* Promotor-Reporter Konstrukte und der relativen Expressionsraten des Reporters in Komposit-Pappeln.**

Die *PtSWEET\_1.c* Promotor-Reporter Konstrukte (A) wurden zur Erzeugung von transgenen Komposit-Pappel Wurzeln mittels des *A. rhizogenes* Stammes K599 eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von sieben Wochen wurden die Wurzeln einzelner Komposit-Pappeln auf ein Fluoreszenzsignal hin untersucht. Anschließend wurde die Expression des sYFPPTS1 mittels qRT-PCR nach Willmann et al., (2014) analysiert (Primer: siehe Tabelle 23; Anhang) (B). Gezeigt sind die schematische Darstellung der Promotor-Reporter-Konstrukte (A) sowie die Expressionsraten des sYFPPTS1 in Komposit-Pappeln, die mit dem jeweiligen Konstrukt transformiert wurden (B).

### 3.2.3.5 Ektomykorrhizierung der mit pBI121-1368bp-sYFPPTS1 transformierten Komposit-Pappeln

Als weiterführende Untersuchung wurde die Ektomykorrhiza spezifische Induzierbarkeit der sYFPPTS1 Expression des längeren *PtSWEET\_1.c* Promotorfragmentes untersucht. Zu diesem Zweck wurden transgene (pBI121-1368bp-sYFPPTS1) Komposit-Pappel Wurzeln mit dem Pilz *Amanita muscaria* mykorrhiziert. Die Analyse der transgenen Ektomykorrhizen erfolgte nach einer co-Inkubationszeit von 6 bis 8 Wochen. Für die visuelle Analyse wurden 65 µm dicke Querschnitte der transgenen Mykorrhizen bzw. nicht mykorrhizierter Kontrollwurzeln hergestellt (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen einer ektomykorrhizierten und einer nicht mykorrhizierten transgenen Komposit-Pappel Feinwurzel.**

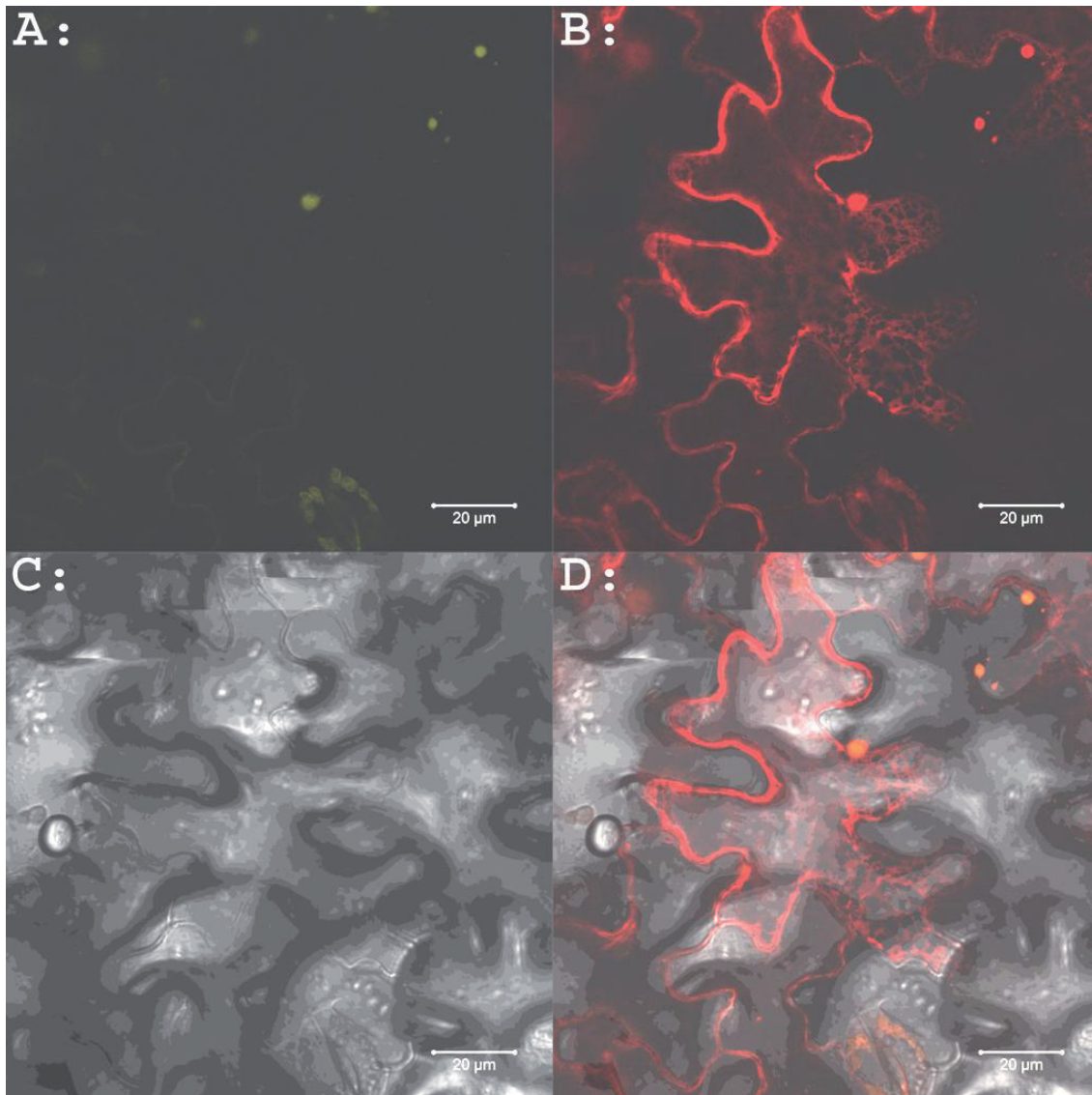
Vibratonschnitte transgener (pBI121-1368bp-sYFPPTS1) Mykorrhizen (A) bzw. nicht mykorrhizierter Feinwurzeln (B). Die Aufnahmebedingungen entsprechen denen der Abbildung 27.

Bei dieser Untersuchung konnten nur sehr schwache Fluoreszenzsignale in nicht mykorrhizierten Feinwurzeln beobachtet werden (Abbildung 29-B), während ektomykorrhizierte Feinwurzeln ein leicht erhöhtes sYFPPTS1 Fluoreszenzsignal zeigten (Abbildung 29-A). Ebenso konnte an transgenen Ektomykorrhizen eine stärkere Hintergrundfluoreszenz der Zellwand beobachtet werden. Parallel zur visuellen Analyse wurden vergleichbare Proben mittels qRT-PCR analysiert (Daten nicht gezeigt). Diese Analyse bestätigte die visuellen Ergebnisse.

### **3.2.4 Analyse des 368 bp *PtSWEET\_1.c* Promotor-Reporter Konstrukts in *Nicotiana benthamiana***

Eine Untersuchung der Expression der *PtSWEET\_1.c* Promotor-Reporter Konstrukte in Pappel-Blättern, mittels einer stabilen Pappel-Transformation bzw. Particle-Gun war aus technischen Gründen nicht möglich. Um dennoch eine organspezifische Expression der 200 bzw. 368 bp langen Promotor-Reporter Konstrukte in Blättern auszuschließen, erfolgte eine Untersuchung in transient transformierten *N. benthamiana* Blättern (Agrobakterien-Infiltration). Hierfür wurde das *PtSWEET\_1.c* Promotor-Konstrukt pBI121-368bp-sYFPPTS1 mit einer Aquaporin-mCherry Positivkontrolle (Nelson et al., 2007) transient in *Nicotiana benthamiana* Blättern co-exprimiert (Abbildung 30).





**Abbildung 30: Co-Lokalisation des pBI121-368bp-sYFPPTS1 und des Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukts.**

Das Promotor-Reporter Konstrukt pBI121-368bp-sYFPPTS1 wurde in den *A. tumefaciens* Stamm C58C1 transformiert und zusammen mit einem Plasmamembran lokalisiertem Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt (Nelson et al., 2007) zur co-Infiltration von *Nicotiana benthamiana* Blättern eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen erfolgte die Analyse der infiltrierten Blätter mittels cLSM. Gezeigt ist eine typische Aufnahme einer transformierten *N. benthamiana* Epidermiszelle im YFP Kanal (Anregung 488 nm 70% Laserleistung, Detektion: 498-552 nm) in A, RFP-Kanal (Anregung: 561 nm 0,2% Laserleistung, Detektion: 588-641 nm) in B, Durchlicht Kanal (Photomultiplier PMT) in C sowie eine Überlagerung aller drei Kanäle in D.

Die erfolgreiche Transformation der *N. benthamiana* Blatt-Epidermiszellen wurde durch die Expression der Positivkontrolle bestätigt (Abbildung 30-B). Es konnte kein sYFPPTS1-Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abbildung 30-A).

### 3.2.5 Analyse des *PtSWEET\_1.c* Promotors in *Arabidopsis thaliana*

Das 368 bp lange Promotorfragment des *PtSWEET\_1.c* Promotors zeigte in Wurzeln der Komposit-Pappeln eine starke Expression. Bei einer transienten Expression des gleichen Konstruktes in *N. benthamiana* Blättern konnte jedoch kein YFPPTS1 Signal beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob das 368 bp Promotor-Reporter Konstrukt spezifisch nur in der Pappel exprimiert wird oder lediglich eine organspezifische Expression in den Wurzeln zeigt, erfolgte eine stabile Transformation des pBI121-368bp-sYFPPTS1 in *A. thaliana* („floral dip“ Technik (Clough and Bent, 1998)). Die Transformation der *A. thaliana* Pflanzen erfolgte in Kollaboration mit der AG Groß-Hardt (Universität Bremen). Nachdem die erhaltenen Samen sterilisiert und auf synthetischem Agar-Medium gekeimt waren, erfolgte eine Untersuchung der Keimlinge mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Mz10F, Leica Microsystems). Bei der Untersuchung der Keimlinge konnte jedoch kein Signal im YFP-Kanal festgestellt werden.

### 3.2.6 *in silico* Analyse des *PtSWEET\_1.c* Promotors

Im Anschluss an den funktionellen Analysen des *PtSWEET\_1.c* Promotors erfolgte eine *in silico* Analyse der identifizierten funktionellen Bereiche. Hierbei sollten mögliche *cis*-Elemente identifiziert werden. Dabei wurde das online Vorhersageprogramm PlantCare genutzt, um mögliche TATA- bzw. CAAT-Box Motive zu identifizieren und das online Vorhersageprogramm JASPAR, um mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) in den regulierenden Bereichen zu identifizieren.

TATA-Box Motive befinden sich üblicherweise ca. -45 bis -25 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (TSS) (Shahmuradov et al., 2005). Da für das *PtSWEET\_1.c* Gen lediglich das längste bekannte Transkript bekannt ist (Nehls, unveröffentlicht), jedoch bisher kein möglicher TSS identifiziert werden konnte (Herpich, 2012), wurde ein Bereich von bis zu -150 bp stromaufwärts der Bindestelle des reverse Primers (07360 Pr VK LIC REV) zur Analyse eingesetzt. Durch PlantCare wurden zwei mögliche TATA-Box Motive vorhergesagt (Tabelle 10). Der jeweilige Score-Wert bezieht sich auf die Anzahl der in einem Sequenzvergleich übereinstimmenden Basen zwischen Template und Matrix. Berücksichtigt wurden nur Motive, die zu 100% übereinstimmen.



**Tabelle 10: Vorhersage von möglichen TATA-Box Motiven mittels PlantCare.**

Untersucht wurden 150 bp der Promotor Sequenz des *PtSWEET\_1.c* Gens mit dem Vorhersageprogramm PlantCare. Es konnten zwei mögliche TATA-Box Motive identifiziert werden. Gezeigt werden die identifizierten Motive mit: ihrer Position im Promotor ausgehend von der Bindestelle des zur Amplifikation der Promotorfragmente verwendeten reverse Primers (07360 Pr VK LIC REV), ihrer Sequenz, dem kodierenden Strang, dem Score sowie dem Organismus, in dem die Motive beschrieben wurden.

Position	Sequenz	Strang	Score	Organismus
-99 bis -104	TTTTA	+	5	<i>Lycopersicon esculentum</i>
-111 bis -116	TTTTA	-	5	<i>Lycopersicon esculentum</i>

CAAT-Box Motive befinden sich üblicherweise im proximalen Promotor, der ca. -200 bis -300 bp stromaufwärts des TSS direkt an den Kernpromotor angrenzt (Maniatis et al., 1987). Daher wurde für die Identifikation möglicher CAAT-Box Motive der Bereich von -400 bp stromaufwärts des längsten bekannten Transkripts verwendet. Es konnten fünf mögliche CAAT-Box Motive identifiziert werden (Tabelle 11). Berücksichtigt wurden nur Motive, die zu 100% mit der Sequenz der Matrix übereinstimmten.

**Tabelle 11: Vorhersage von möglichen CAAT-Box Motiven mittels PlantCare.**

Untersucht wurden -400 bp der Promotorsequenz des *PtSWEET\_1.c* Gens mit dem Vorhersageprogramm PlantCare. Fünf mögliche CAAT-Box Motive konnten identifiziert werden. Gezeigt werden die identifizierten Motive mit: ihrer Position im Promotor ausgehend von der Bindestelle des zur Amplifikation der Promotorfragmente verwendeten reverse Primers (07360 Pr VK LIC REV), ihrer Sequenz, dem kodierenden Strang, dem Score sowie dem Organismus, in dem die Motive beschrieben wurden.

Position	Sequenz	Strang	Score	Organismus
-96 bis -100 bp	CAAT	-	4	<i>Hordeum vulgare</i>
-185 bis -189 bp	CAAT	-	4	<i>Hordeum vulgare</i>
-287 bis -292 bp	CAAAT	+	5	<i>Brassica rapa</i>
-307 bis -312 bp	CAAAT	+	5	<i>Brassica rapa</i>
-373 bis -383 bp	CAAAT	+	5	<i>Brassica rapa</i>

Durch die funktionelle Analyse des *PtSWEET\_1.c* konnte die Position eines Kontrollelements (Silencer) im Bereich zwischen -368 bp und -400 bp, ausgehend von der Bindestelle des verwendeten Primers, eingegrenzt werden. Sobald diese Sequenz entfernt wurde, wurde der sYFP-Marker in Pappelwurzeln sehr stark exprimiert. Eine weitere Verkürzung des Promotors bis auf 200 bp zeigte eine vergleichbar starke Expression des Reporters (Enhancer). Die Promotorbereiche zwischen -368 bp und -400 bp (Silencer) sowie -1 bp und -200 bp (Enhancer) wurden daher einer *in silico* Analyse mittels des Vorhersageprogramms JASPAR unterzogen. Hierbei konnten 10 mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) in der Silencer-Region (Tabelle 13) und 11 in der Enhancer-Region identifiziert werden (Tabelle 12). Berücksichtigt wurden nur TFBS, für die ein relativer Score Wert von größer als 0,9 (Silencer) bzw. 0,95 (Enhancer) berechnet werden konnte.

**Tabelle 12: Mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen in der Enhancer-Sequenz.**

Der Enhancer-Bereich des *PtSWEET\_1.c* wurde mittels des online Vorhersageprogramms JASPAR analysiert. Gezeigt sind die identifizierten TFBS mit dem Namen des TF, der entsprechenden Position in der Sequenz (ausgehend von der Bindestelle des reverse Primers), der Orientierung der Bindestelle auf der DNA, der Sequenz des *cis*-Elements und dem berechneten relativen Score Wert.

Name	Position	Strang	<i>cis</i> -Element	Relative Score
Dof2	174 bis -180	-	AAAGCC	0,9906
Dof3	-174 bis -180	-	AAAGCC	0,9785
MNB1A	-174 bis -179	-	AAAGC	1,0000
PBF	-174 bis -179	-	AAAGC	0,9999
DOF5.3	-171 bis -178	-	TCAAAAG	0,9690
DOF5.3	-110 bis -117	+	ATAAAAG	0,9753
DOF5.7	-107 bis -115	+	AAAAGAGT	0,9710
NAC083	-91 bis -101	-	TTACGCAATA	0,9581
NAC025	-92 bis -100	-	TACGCAAT	0,9562
NAC043	-90 bis -100	+	ATTGCGTAAG	0,9611
GT-1	-76 bis -84	+	GTTAACCC	0,9635

**Tabelle 13: Mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen in der Silencer-Sequenz.**

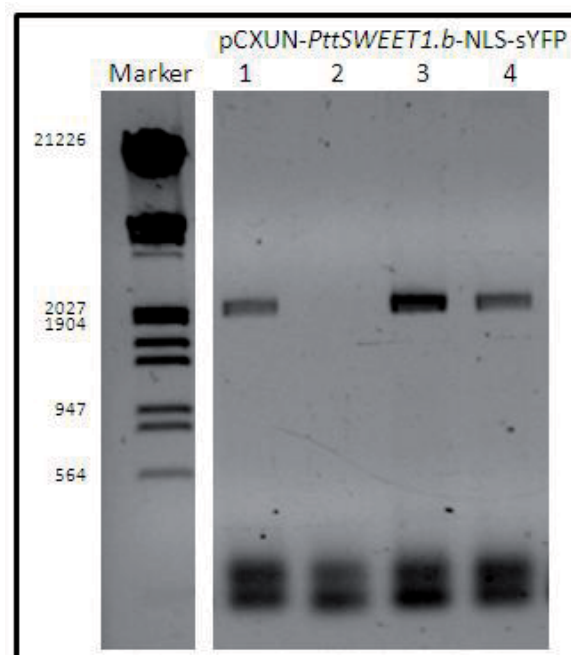
Der Silencer-Bereich des *PtSWEET\_1.c* wurde mittels des online Vorhersageprogramms JASPAR analysiert. Gezeigt sind die identifizierten TFBS mit der entsprechenden Position in der Sequenz (ausgehend von der Bindestelle des reverse Primers), der Orientierung der Bindestelle auf der DNA, der Sequenz des *cis*-Elements und dem berechneten relativen Score Wert.

Name	Position	Strang	<i>cis</i> -Element	Relative Score
MYB24	-401 bis -392	-	TTATTAGGC	0,9288
DOF1.8	-389 bis -379	-	AGAAAAGATT	0,9287
DOF5.7	-389 bis -377	-	AAAAGATT	0,9448
PHYPADRAFT_140773	-389 bis -392	-	AGAAAAGATT	0,9418
PHYPADRAFT_38837	-389 bis -392	-	AGAAAAGATT	0,9078
PHYPADRAFT_153324	-389 bis -392	-	AGAAAAGAT	0,9274
DOF2.4	-387 bis -380	-	GAAAAGA	0,9276
DOF5.6	-387 bis -379	-	AGAAAAGA	0,9259
MNB1A	-387 bis -382	-	AAAGA	0,9320
DOF5.3	-386 bis -379	-	AGAAAAG	0,9740

### 3.2.7 Untersuchung der ECM Induzierbarkeit des *PttSWEET1.b*

Im Rahmen der Untersuchung des *PtSWEET\_1.c* Promotors zeigte keines der untersuchten Promotor-Reporter Konstrukte eine Ektomykorrhiza (ECM) spezifische Induktion. Im *P. trichocarpa* Genom kommen jedoch drei Homologe vor, deren hohe Sequenzidentität eine genspezifische Expressionsanalyse unmöglich macht. Da lediglich der *PtSWEET\_1.c*

Promotor im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Promotor des falschen Homologs untersucht wurde. Im Gegensatz zu *P. trichocarpa* konnte im Genom von *P. tremula* bzw. *P. tremuloides* jeweils nur ein Homolog des ECM induzierten *SWEET*-Gens identifiziert werden (Nehls, unveröffentlicht). Daher wurde ein entsprechendes Fragment des Homologs aus *P. tremula x tremuloides* (*PttSWEET1.b*) auf seine ECM spezifische Regulation hin untersucht (Abbildung 18-C, Abschnitt 3.2.1). Hierzu wurde ein 1970 bp langes Promotorfragment aus genomischer *P. tremula x tremuloides* DNA amplifiziert (Primer: siehe Tabelle 21; Anhang), in den pJet1.2/blunt kloniert und einer Sequenzanalyse (Sanger-Sequenzierung) unterzogen. Hierdurch konnte die amplifizierte DNA dem entsprechenden *SWEET*-Promotor aus *P. tremuloides* eindeutig zugeordnet werden. Anschließend wurde der Promotorbereich mittels LIC in den Vektor pCXUN-LIC-NLS-sYFP (Nehls, unveröffentlicht) kloniert. Die Überprüfung des finalen Konstrukts erfolgte mittels PCR (Abbildung 31).

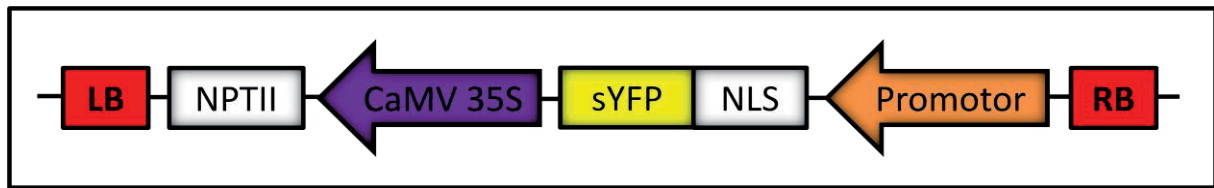


**Abbildung 31: PCR basierte Überprüfung der Klonierung des pCXUN-PttSWEET1.b-NLSsYFP Konstrukts.**

Die Plasmid-DNA aus vier Kolonien wurde isoliert und einer PCR basierten Überprüfung unterzogen. Dafür wurden LIC-Überhang Primer verwendet, die vorher zur Amplifikation des PttSWEET1.b Promotors aus genomischer DNA eingesetzt wurden (Tabelle 21, Anhang). Dargestellt ist eine Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung. Die erwarteten Fragmentgrößen lagen bei ca. 2009 bp.

In der Abbildung 32 ist die T-DNA des pCXUN-YFP-NLS Vektors dargestellt. Dieser Vektor wurde speziell für die Untersuchung von Promotoren erstellt. Um Hintergrundsignale zu vermeiden, wurde ein kernlokalisiertes sYFP (YFP-NLS) verwendet. Durch das größere

Volumen des Kerns und die damit verbundene schwächere Aufkonzentrierung des NLSsYFP sollte ein Hintergrundsignal vermieden werden.



**Abbildung 32:** Schematische Darstellung der T-DNA des pCXUN-LIC-NLSsYFP (Nehls, unveröffentlicht).

Dargestellt wird die T-DNA des pCXUN-LIC-NLS-sYFP. Die Bestandteile werden in unterschiedlichen Farben dargestellt: NPTII in Weiß (Kanamycin-Resistenz Gen), 35S-Promotor in Blau, das sYFP in Gelb, das NLS (nuclear targetingsignal) in Weiß, die eingefügte Promotorsequenz in Orange und die border-Sequenzen (RB und LB) in Rot.

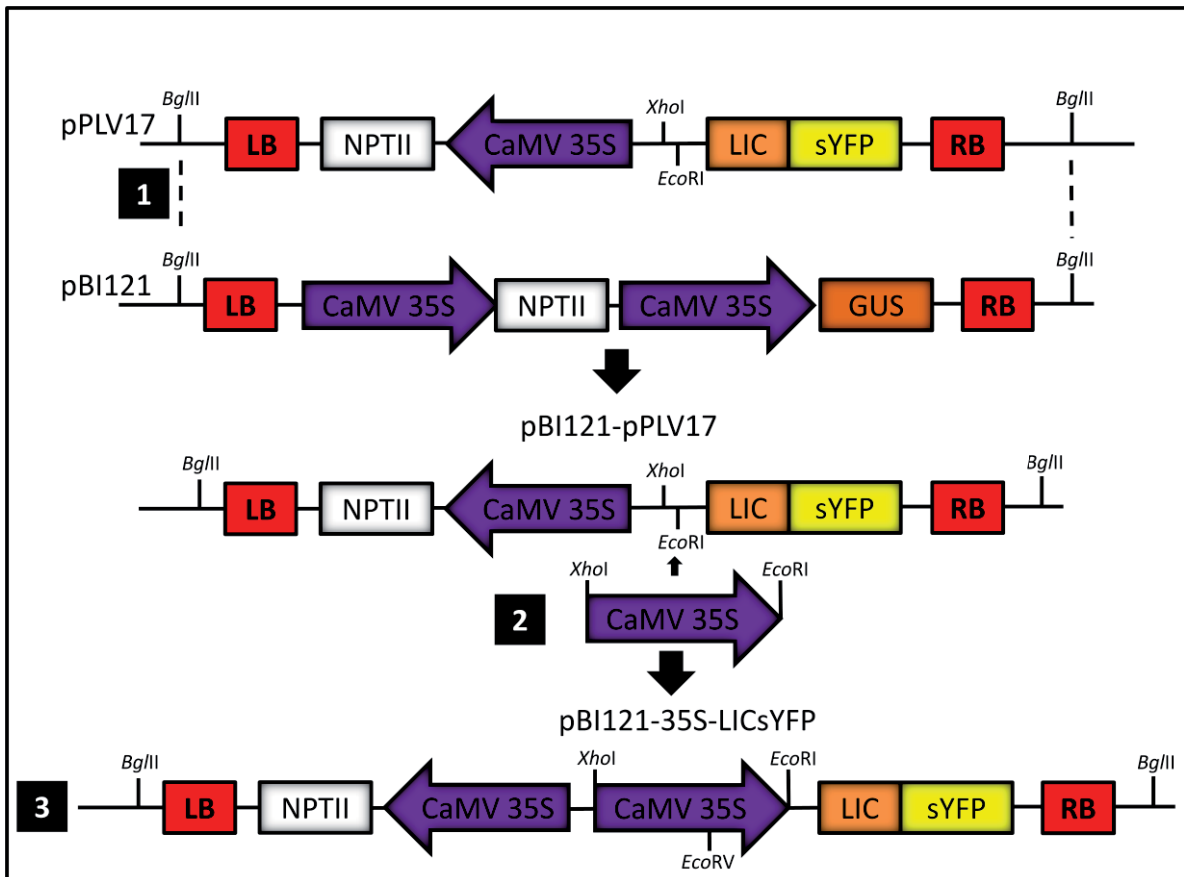
Transgene (pCXUN-*PttSWEET1.b*-NLSsYFP und pCXUN-35S-NLSsYFP) *A. rhizogenes* Bakterien (Stamm K599) wurden dazu verwendet, je 20 *P. tremula x alba* Stecklinge zu inokulieren. Als Negativkontrolle dienten 20 Stecklinge, die nicht mit *A. rhizogenes* behandelt wurden. Als Positivkontrolle diente das Konstrukt pCXUN-35S-NLSsYFP. Nach der Bewurzelung wurden die transgenen Komposit-Pappel Wurzeln mit *A. muscaria* mykorrhiziert. Nach einer co-Inkubationszeit von 6-8 Wochen wurden die Ektomykorrhizen geerntet und mittels cLSM analysiert. Die Wurzeln der Positivkontrolle (pCXUN-35S-NLSsYFP) zeigten ein starkes NLSsYFP Signal, das aufgrund der starken Expressionsrate vor allem im Zytoplasma lokalisiert war. Weder die Negativkontrolle (ddH<sub>2</sub>O) noch das zu untersuchende Konstrukt zeigten ein NLSsYFP Signal.

### **3.3 Lokalisierung ECM regulierter Monosaccharidtransporter in Blättern von *Nicotiana benthamiana***

Vorangegangene Untersuchungen erlauben die Vermutung, dass die abgeleiteten Proteine von Mykorrhiza regulierten *PtSWEET*- sowie von ausgewählten *PtMST*-Genen in die Kontrolle der pilzlichen Zuckerversorgung involviert sind. Für diese Aufgabe ist die Lokalisation der entsprechenden Proteine in der Plasmamembran der Wurzelzellen notwendig. Da die Zellwände der Pappel-Wurzelzellen eine ausgeprägte Autofluoreszenz zeigen, ist der Nachweis entsprechender Transporter-YFP Fusionsproteine in der Plasmamembran kaum möglich. Aus diesem Grund erfolgte die Subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine in Blattzellen von *N. benthamiana*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation folgender Proteine bestimmt: die SWEET-Proteine PtSWEET\_1.b, PtSWEET\_1.c, PtSWEET02.a, PtSWEET15.b und die MST-Proteine PtMST8, PtMST16, PtMST18.

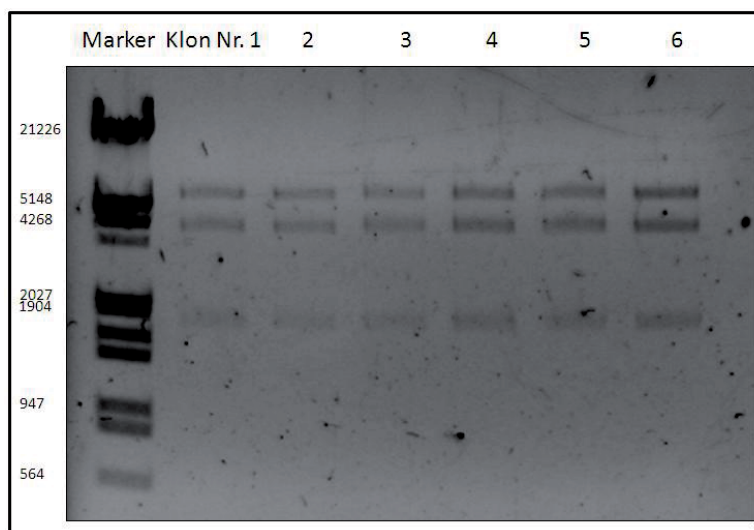
#### **3.3.1 Konstruktion eines Vektors für Lokalisierungsstudien**

Um Lokalisierungsstudien durchführen zu können, wurde der neue Lokalisierungsvektor pBI121-35S-LICsYFP kloniert (Abbildung 33-3). Zu diesem Zweck wurde die T-DNA des binären Vektors pBI121 (Jefferson et al., 1987) mittels zweier *Bg/II* Schnittstellen durch die T-DNA des Vektors pPLV17 (pGIIK-LIC-sYFP-NOST) (De Rybel et al., 2011) ersetzt, um den pBI121-pPLV17 zu erhalten (Abbildung 33-1). Anschließend wurden ein 35S Promotorfragment aus dem Vektor pBIN19-YFPPTS1 mittels PCR amplifiziert (35S-For-*XhoI* und 35S-Rev-*EcoRI*; Tabelle 19; Anhang) und unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *EcoRI* in die T-DNA des pBI121-pPLV17 eingebracht (Abbildung 33-2). Der so erstellte Vektor wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft (Abbildung 34) und anschließend einer Analyse durch eine Sanger-Sequenzierung unterzogen.



**Abbildung 33: Schematische Darstellung der Konstruktion von pBI121-35S-LICsYFP.**

Gezeigt ist die Konstruktion des binären Lokalisierungsvektors pBI121-35S-LICsYFP. Die Bestandteile der T-DNA werden in unterschiedlichen Farben dargestellt: *npII* in Weiß (Kanamycin-Resistenz Gen), 35S-Promotor in Violett, die LIC-Sequenz in Orange, das sYFP in Gelb und die „border“-Sequenzen (RB und LB) in Rot. Unter der Verwendung der LIC-Sequenz konnte die kodierende Sequenz eines beliebigen Gens im Leseraster vor das 5'-Ende des sYFP eingefügt werden. So entstandene Fusionsgene würden im abgeleiteten Fusionsprotein den zu untersuchenden Transporter mit einer C-terminalen sYFP-Domäne generieren. So erhaltene offene Leseraster würden unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert werden. Durch das sYFP sollte die Lokalisierung des Fusionsproteins *in vivo* mittels cLSM Analyse erfolgen.



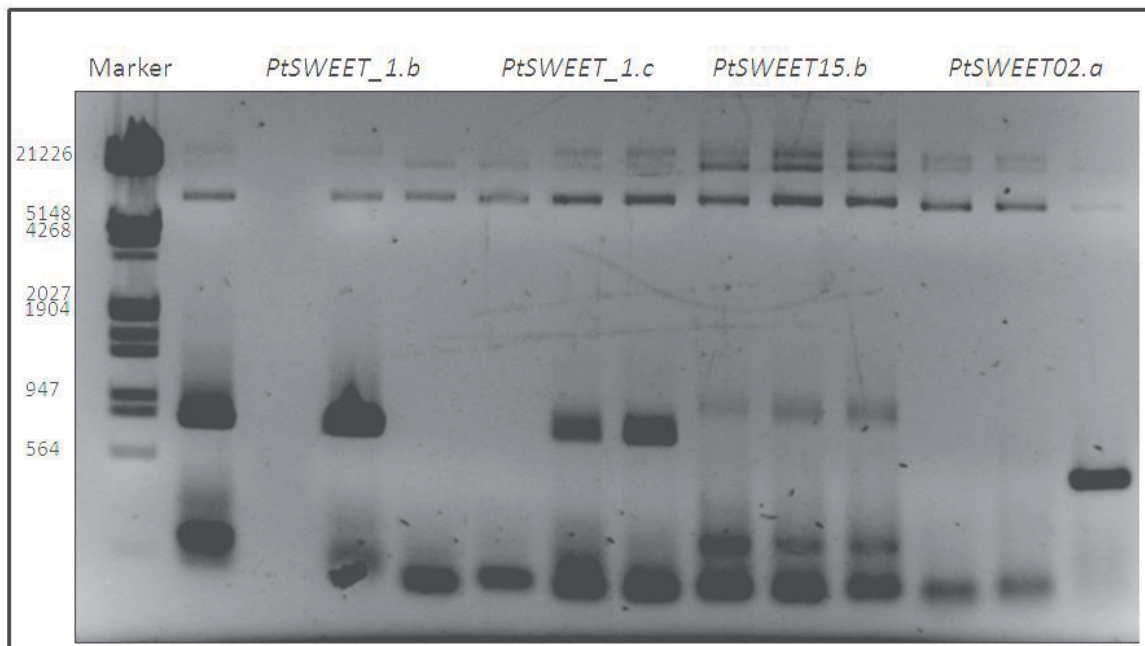
**Abbildung 34: Restriktionsanalyse des pBI121-35S-LICsYFP mit *EcoRV*.**

Zum Überprüfen der erfolgreichen Klonierung des pBI121-35S-LIC-sYFP, wurde die Plasmid-DNA aus sechs Kolonien isoliert und einer Restriktionsanalyse mit *EcoRV* unterzogen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA wurden bei erfolgreichen Klonierungen Fragmente von 6 kb, 4,2 kb und 1,8 kb erwartet.



### 3.3.2 Klonierung der SWEET Lokalisationskonstrukte in pBI121-35S-LICsYFP

Der kodierende Bereich der zu untersuchenden *SWEET*-Gene aus *P. trichocarpa* wurde aus Erststrang cDNA mit den in Tabelle 20 (Anhang) angeführten Primerpaaren amplifiziert und anschließend mittels LIC-Reaktion in den Vektor pBI121-35S-LICsYFP eingebracht. Die Konstrukte wurden mittels PCR verifiziert (Abbildung 35) und anschließend in *A. tumefaciens* (C58/pMP90) transformiert.

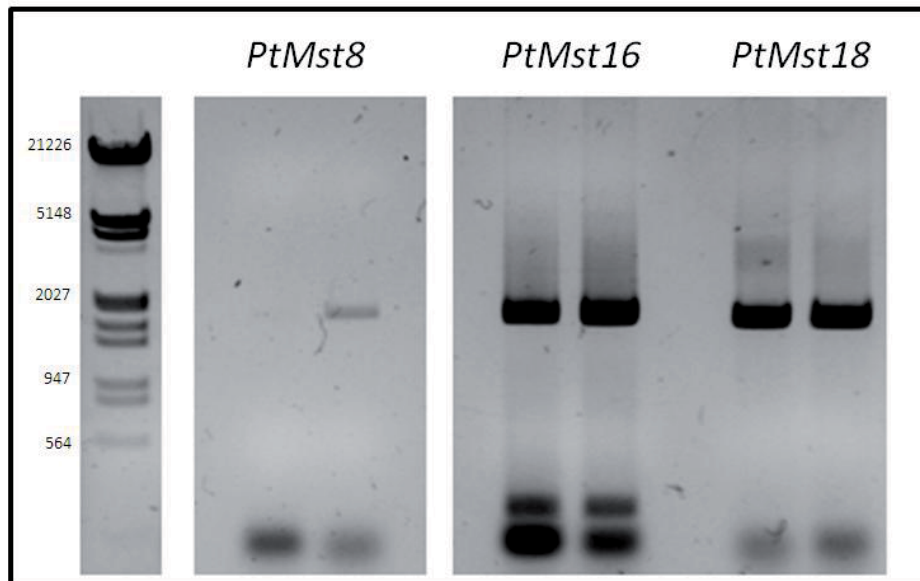


**Abbildung 35: PCR-basierte Überprüfung der SWEET-Lokalisierungskonstrukte.**

Plasmid-DNA wurde aus je drei Kolonien isoliert und die CDS mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurden die gleichen Primer wie zuvor zur Amplifikation der cDNA verwendet (Tabelle 20 Anhang). Die zu erwartenden Größen der PCR-Fragmente lagen für *PtSWEET\_1.b* bei 832 bp, für *PtSWEET\_1.c* bei 832 bp, für *PtSWEET15.b* bei 946 bp und für *PtSWEET02.a* bei 608 bp. Dargestellt ist ein Foto der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten DNA.

### 3.3.3 Klonierung der MST Lokalisierungskonstrukte in den pBI121-35S-LICsYFP

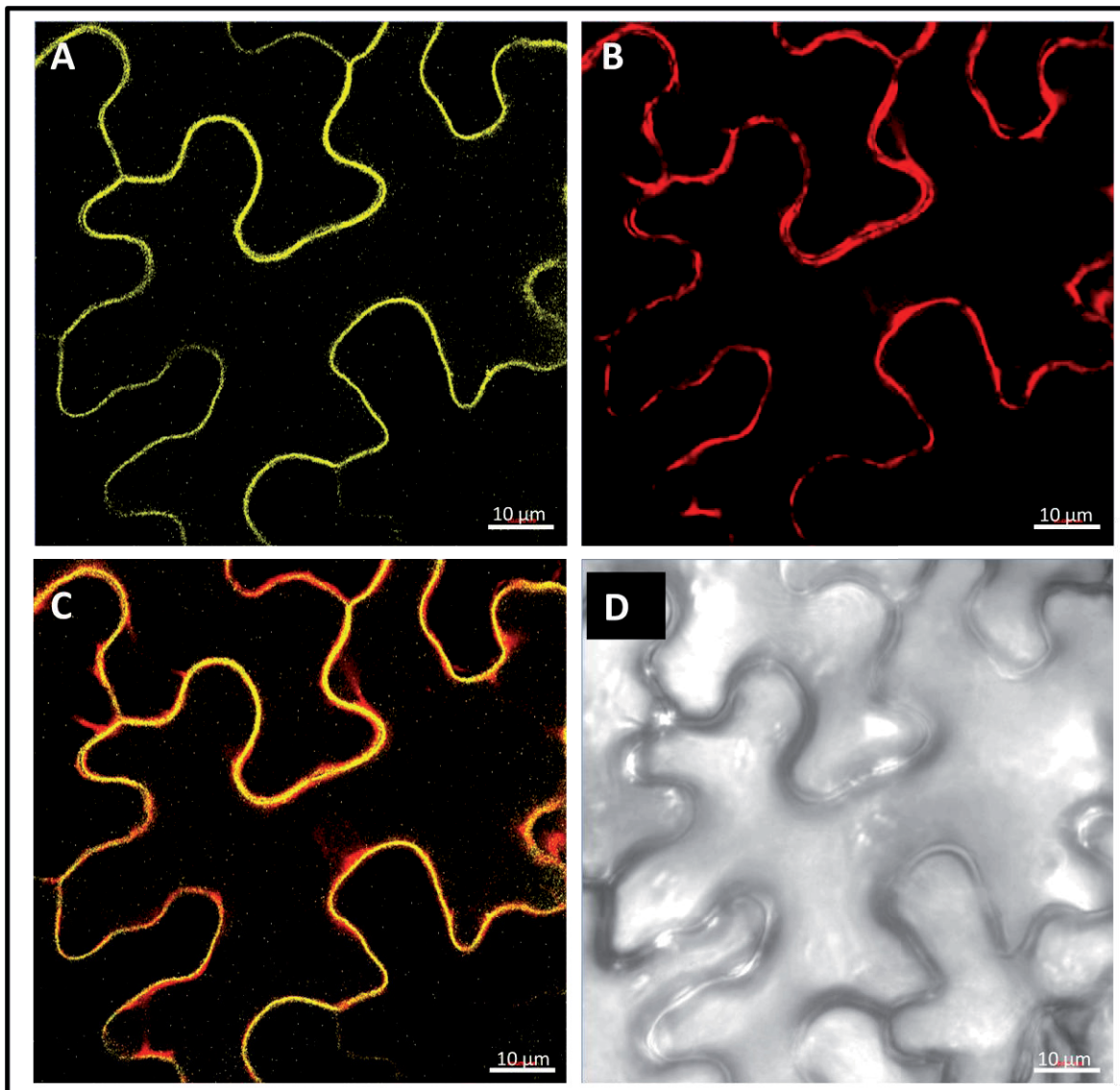
Der kodierende Bereich der zu untersuchenden *PtMST*-Gene wurde aus Erststrang cDNA mit den in Tabelle 22 (Anhang) aufgeführten Primerpaaren amplifiziert und anschließend mittels LIC-Reaktion in den Vektor pBI121-35S-LICsYFP eingebracht. Die Konstrukte wurden mittels PCR verifiziert (Abbildung 36) und anschließend in *A. tumefaciens* (C58/pMP90) transformiert.



**Abbildung 36: PCR basierte Überprüfung der Klonierung der *PtMST*-Lokalisierungsstrukture.** Plasmid-DNA wurde aus je zwei Kolonien isoliert und die CDS mittels PCR amplifiziert. Für diese Analyse wurden die LIC-Primer verwendet, die zuvor zur spezifischen Amplifikation der cDNA verwendet wurden (Tabelle 22 Anhang). Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR-Fragmente. Die zu erwartenden Bandengrößen lagen für *PtMST8* bei 1639 bp, für *PtMST16* bei 1617 bp und für *PtMST18* bei 1642 bp.

### 3.3.4 Transiente Expression der Lokalisierungs-Konstrukte in *Nicotiana benthamiana*

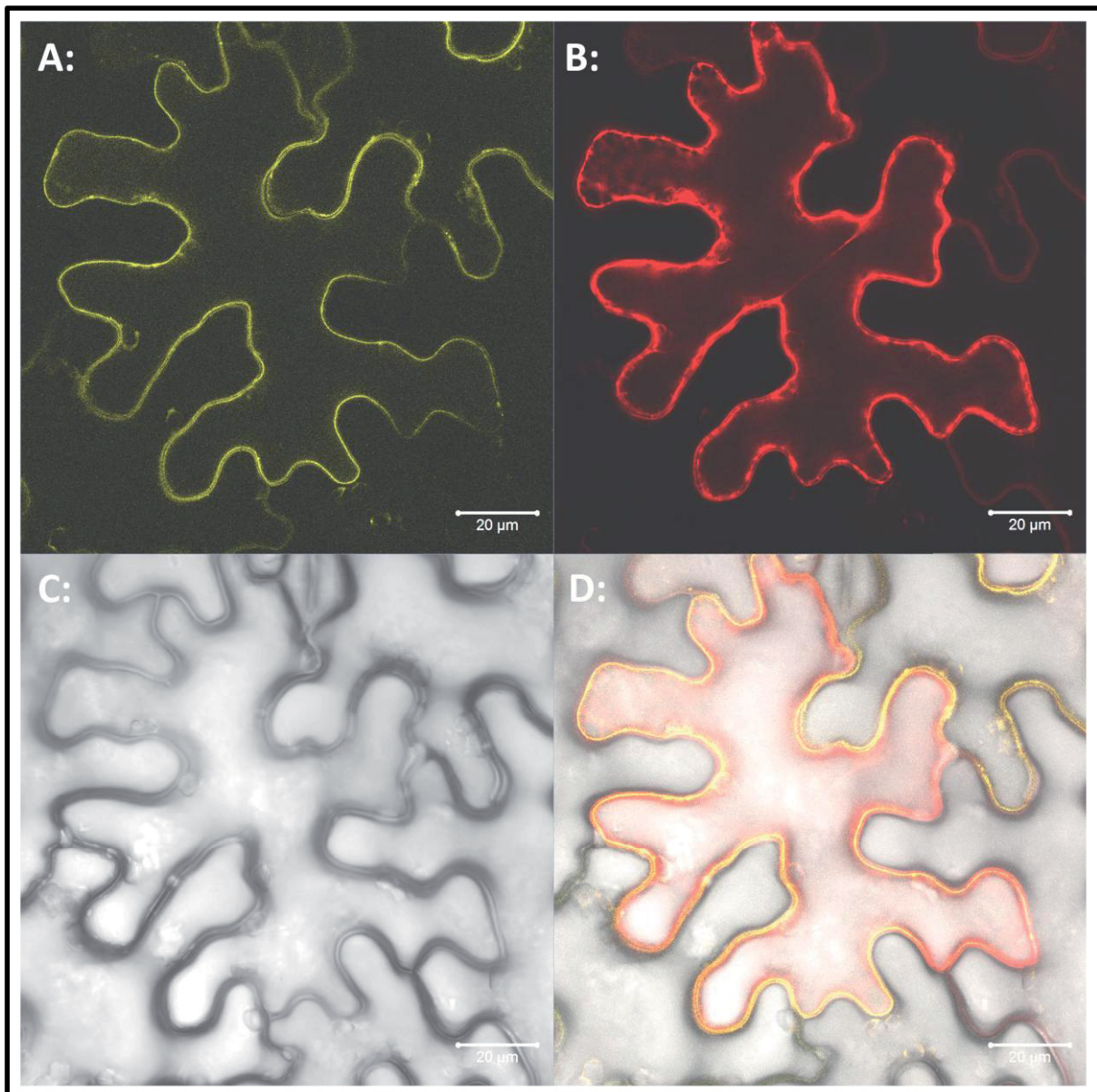
Die Analyse der verschiedenen *SWEETsYFP* / *MSTsYFP* Fusions-Konstrukte erfolgte mittels transienten Expression in Blättern vier Wochen alter *N. benthamiana* Pflanzen. Die Infiltration der Blätter wurde nach Voinnet et al. (2003) durchgeführt. In der Abbildung 37 ist eine exemplarische Aufnahme einer Lokalisierungsstudie von *PtSWEET\_1.b* dargestellt (Die Bilder der Lokalisierungsstudien der anderen Lokalisierungskonstrukte befinden sich auf der beiliegenden CD).



**Abbildung 37: Co-Lokalisation von PtSWEET\_1.b-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.**

Ein C-terminales PtSWEET\_1.b-YFP Fusionskonstrukt wurde zusammen mit einem Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukt (Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt) (Nelson et al., 2007) mittels Agrobakterien basierter Transformation transient in Tabak Blatt-Epidermiszellen exprimiert. Die infiltrierten Blätter wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mittels cLSM analysiert. Dargestellt ist der YFP-Kanal (Anregung bei 488 nm 4,8% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 520-550 nm) in A, in B der RFP-Kanal (Anregung bei 561 nm 0,2% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 579-650 nm), in C eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale sowie in D ein Durchlichtbild. (Der Größenbalken entspricht 10 µm)

Die Abbildung 38 zeigt eine exemplarische Aufnahme einer Lokalisierungsstudie von PtMST8. (Die Bilder der Lokalisierungsstudien aller weiteren untersuchten MST-Fusionskonstrukte befinden sich auf der beiliegenden CD).



**Abbildung 38: Co-Lokalisierung von PtMST8-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.**

Ein C-terminales PtMST8-YFP Fusionskonstrukt wurde zusammen mit einem Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukt (Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt) (Nelson et al., 2007) mittels Agrobakterien basierter Transformation transient in Tabak Blatt-Epidermiszellen exprimiert. Die infiltrierten Blätter wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mittels cLSM analysiert. Gezeigt ist eine Aufnahme im YFP-Kanal in A, im RFP-Kanal in B, im Durchlichtkanal in C sowie eine Überlagerung der Aufnahmen in D. Die Aufnahmebedingungen wurden wie in Abbildung 37 gewählt. (Der Größenbalken entspricht 20 µm)

Durch eine co-Lokalisierung (Abbildung 37-C) der Fusionskonstrukte (Abbildung 37-A) mit einer Plasmamembran lokalisierten Kontrolle (Nelson et al., 2007) (Abbildung 37-B), konnte die Plasmamembran-Lokalisierung der SWEET- und MST-Proteine (Abbildung 38-D) gezeigt werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Komposit-Pappeln

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Entwicklung einer schnelleren Methode zur Generierung transgener Pappeln und ihrer Ektomykorrhizen. Hierzu bot sich die Erzeugung von Komposit-Pflanzen an. Bei diesem Ansatz werden nach Infektion mit transgenen *A. rhizogenes* transgene Wurzeln an nicht transgenen Sprossen erzeugt. Diese Strategie wurde erstmals 1989 von Hansen et al. beschrieben und ermöglicht es, transgene Wurzeln im Kontext einer intakten Pflanze untersuchen zu können (Collier et al., 2005). Protokolle zur Erzeugung von Komposit-Pflanzen wurden für eine Vielzahl unterschiedlicher Arten veröffentlicht (Alpizar et al., 2006, Collier et al., 2005, Hansen et al., 1989). Allerdings gab es bisher keine Protokolle zur Bildung von *in vitro* Komposit-Pappeln. Auch war bisher unklar, ob die transgenen Wurzeln von Hybridpappeln überhaupt zur Bildung von Ektomykorrhizen befähigt sind.

#### 4.1.1 Auswahl eines geeigneten *A. rhizogenes* Stammes

Während die Wirtsspezifität von *A. rhizogenes* in der Natur auf einige wenige Pflanzenarten begrenzt ist, können diese Bakterien unter Laborbedingungen eine Vielzahl an Pflanzenarten infizieren (Porter, 1991). Obwohl bereits einige Berichte zur Generierung von Komposit-Pflanzen existieren (Alpizar et al., 2006, Collier et al., 2005, Hansen et al., 1989, Veena and Taylor, 2007), lässt sich nicht vorhersagen, welcher *A. rhizogenes* Stamm sich zur Transformation einer bestimmten Pflanzenart eignet. Daher wurden für ein erstes Screening vier unterschiedliche *A. rhizogenes* Stämme auf ihre Fähigkeit hin getestet, transgene Wurzeln an *P. tremula x alba* Stecklingen zu induzieren. Verwendet wurden in dieser Arbeit die Stämme 2659 (K599) ein Cucumopin Stamm (Daimon et al., 1990), 15834 ein Agropin Stamm (Veena and Taylor, 2007), 8196 ein Manopin Stamm (Hansen et al., 1991) sowie 1724 ein Mikimopin Stamm (Shiomi et al., 1987). Die Pappel-Hybride *Populus tremula x alba* wurde aufgrund ihrer einfachen Handhabung in *in vitro* Kulturen und der schnellen Bewurzelungsrate ausgewählt.

##### 4.1.1.1 Fähigkeit unterschiedlicher *A. rhizogenes* Stämme sprossbürtige Wurzeln zu induzieren

In dieser Studie zeigten die untersuchten Stämme deutliche Unterschiede in ihrer Effizienz sprossbürtige Wurzeln zu induzieren. Während 95% der mit dem Stamm 15834 inokulierten Pflanzen sprossbürtige Wurzeln ausbildeten, konnte für die anderen *A. rhizogenes* Stämme

eine geringere Effizienz von 60% für den Stamm K599, 35% für den Stamm 8196 und 15% für den Stamm 1724 beobachtet werden. Der Stamm 15834 induzierte auch als einziger eine im Vergleich zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle signifikant erhöhte Anzahl an Wurzeln. Diese Wurzeln zeigten jedoch einen ausgeprägten „hairy root“ Phänotyp. Die Ausbildung einer höheren Anzahl an Wurzeln sowie der eindeutige „hairy root“ Phänotyp, der durch den Stamm 15834 verursacht wird, kann durch das Ri-Plasmid des Agropin-Typs erklärt werden.

Plasmide des Agropin-Typs kodieren zwei T-DNAs, die T<sub>R</sub>-DNA und die T<sub>L</sub>-DNA (Trovato and Linhares, 1999). Die T<sub>L</sub>-DNA kodiert *rol*-Gene, deren Genprodukte für die Wurzelinduktion verantwortlich sind (Veena and Taylor, 2007). Auf der T<sub>R</sub>-DNA werden die beiden Gene *iaaM* und *iaaH* kodiert, deren abgeleitete Proteine für die Biosynthese von Auxin verantwortlich sind (De Paolis et al., 1985). Untersuchungen an Tabak haben gezeigt, dass die Expression dieser Gene tatsächlich zu erhöhten Auxin-Gehalten führt (Schmulling et al., 1993). Da Auxin für die Bildung sprossbürtiger Wurzeln essentiell ist (Cardarelli et al., 1987), könnte die zu erwartende Erhöhung der Auxin Konzentration eine höhere Anzahl sprossbürtiger Wurzeln erklären. Die RiT-DNA anderer Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wie der Stamm 8196 (Manopin-Typ), K599 (Cucumopin-Typ) und 1724 (Mikimopin-Typ), exprimieren nur die *rol*-Gene (Veena and Taylor, 2007). Diese Stämme sind daher nicht dazu in der Lage eine erhöhte Auxin-Biosynthese in transformierten Geweben zu induzieren (Cardarelli et al., 1987). In diesem Fall wird die Wurzelinduktion durch das pflanzeigene Auxin induziert (Cardarelli et al., 1987). Die *rol*-Gene bewirken unter anderem Veränderungen in der Wahrnehmung von Auxin (Christey, 2001), was für die Ausbildung des „hairy root“ Phänotyps verantwortlich gemacht wird (Veena and Taylor, 2007). Dieser Phänotyp wird vermutlich durch eine lokale Erhöhung des Auxin-Gehalts, die durch die T<sub>R</sub>-DNA des Stammes 15834 bewirkt wird, noch verstärkt. Die Stämme, die den Auxin-Gehalt im transformierten Gewebe nicht verändern können, zeigten daher vermutlich einen schwächeren „hairy root“ Phänotyp.

#### **4.1.1.2 Fähigkeit der *A. rhizogenes* Stämme zur Übertragung einer biT-DNA**

Die Induktion transgener Wurzeln setzt die vorherige Übertragung von Transfer-DNA Abschnitten und deren stabile Integration in das pflanzliche Genom voraus (Veena and Taylor, 2007). Der Transfer der RiT-DNA der Agrobakterien wird als essentiell für die Bildung transgener Wurzeln angesehen. Für den Anwender der Komposit-Pflanzen ist hingegen der effiziente Transfer der T-DNA des sogenannten binären Vektors (biT-DNA), mit dem der entsprechende Bakterienstamm zuvor transformiert wurde, entscheidend. Somit



ergibt sich die Notwendigkeit einer co-Transformation der Pflanzenzelle mit den T-DNAs zweier Plasmide (binäres-Plasmid und Ri-Plasmid) um transgene Wurzeln zu erzeugen, die das gewünschte Zielkonstrukt enthalten.

Zum Vergleich der vier untersuchten *A. rhizogenes* Stämme hinsichtlich ihrer Fähigkeit, biT-DNA zu übertragen, wurden die Stämme mit dem pFF19-YFPPTS1 transformiert und anschließend zur Erzeugung von Komposit-Pappel verwendet. Bei dieser Untersuchung wurden starke YFPPTS1 Signale lediglich in transgenen Wurzeln beobachtet, die durch den Stamm K599 induziert worden waren. Diese starken Signale könnten durch eine hohe Anzahl an in das Pflanzengenom integrierten biT-DNA-Kopien hervorgerufen worden sein. Collier et al. (2005) konnte zeigen, dass der Stamm K599 bis zu acht biT-DNA-Kopien in das Genom von *N. tabacum* integrieren kann. Auch für die Pappel gibt es Hinweise dafür, dass eine unterschiedliche Kopienzahl der biT-DNA in das Genom integriert wird. So konnten in dieser Arbeit, für das gleiche Konstrukt, unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten des Fluoreszenzmarkers beobachtet werden. Da allerdings keine Southern-Blot Analysen durchgeführt wurden, können Positionseffekte als Ursache hierfür nicht ausgeschlossen werden. Ebenso könnten die Unterschiede zwischen den Bakterienstämmen 15834, 2659, 8196 und K599 in der Expressionsstärke des YFP Markers darauf hin deuten, dass die Kopienzahl von Ri- und binär-Plasmiden sich in den *A. rhizogenes* Stämmen unterscheidet. Dies konnte für verschiedene Plasmide in *A. tumefaciens* bereits gezeigt werden (An, 1985). So wurde von den Autoren eine höhere Kopienzahl des Binärvektors (ca. 5-10 Kopien) im Vergleich zur Kopienzahl des Ti-Plasmids (1 Kopie) nachgewiesen (Gelvin, 2003). Ob dies auch auf *A. rhizogenes* zutrifft, ist bisher nicht untersucht worden. Eine Arbeitshypothese wäre demnach, dass im Stamm K599 der binäre Vektor (pBin19) in einer höheren Kopienzahl vorlag, als in den anderen untersuchten Stämmen, woraus eine höhere Transformationseffizienz der biT-DNA resultieren würde.

Eine weitere Erklärung für die höhere Transformationseffizienz durch den Stamm K599 könnten die verwendeten „border“-Sequenzen liefern. So konnten Hansen et al. (1991) zeigen, dass die „border“-Sequenzen sich zwischen *A. tumefaciens* und *A. rhizogenes* unterscheiden. Dementsprechend wäre es möglich, dass die Genprodukte von *VirD2* und *VirD1* so genannte Nikasen, Enzyme die DNA-Einzelstrangbrüche im Bereich der „border“-Sequenzen erzeugen, aus verschiedenen *A. rhizogenes* Stämmen, die aus *A. tumefaciens* stammenden „border“-Sequenzen des Binärvektor pBin19 unterschiedlich effizient prozessieren. Hierdurch könnte die Bildung der biT-DNA in den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen, unterschiedlich

effizient ablaufen. Für diese Erklärung spricht, dass der Stamm K599 auch eine starke Expression von Reporter Genen induziert, wenn andere Binärvektoren (pCAMBIA und pGreen) verwendet werden, die ebenfalls Ti-, „border“-Sequenzen enthalten (Nehls, unveröffentlicht).

Komposit-Pappeln, die mit dem *A. rhizogenes* Stamm K599 generiert wurden, konnten aufgrund der hohen YFP Expressionsrate leicht mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Aus diesem Grund wurde lediglich dieser Stamm für weitere Untersuchungen eingesetzt.

#### **4.1.2 Ektomykorrhizierung der Komposit-Pappeln**

Im Gegensatz zu arbuskulären Mykorrhiza-Pilzen, die obligat biotroph sind, sind Ektomykorrhiza-Pilze und ihre Wirtsbäume dazu in der Lage, unter idealen Bedingungen ohne den jeweils anderen Partner zu leben (Nehls, 2008). Da solche Bedingungen in der Natur jedoch nur selten vorkommen, sind Ektomykorrhiza (ECM) bildende Pflanzen und Pilze in der Regel aufeinander angewiesen (Nehls and Bodendiek, 2012). In der Natur sind Bäume mit einer Vielzahl verschiedener Pilzarten (bis zu wenigen hundert Arten (Smith and Read, 2008)), assoziiert. Allerdings sind nur bestimmte Pilz/Pflanze Kombinationen in der Natur erfolgreich. Unter Laborbedingungen können reproduzierbar Ektomykorrhizen auch von solchen Pilz-Pflanze Kombinationen synthetisiert werden, die unter natürlichen Bedingungen nicht beobachtet werden. Allerdings müssen hierzu bestimmte Randbedingungen erfüllt sein. Aus diesem Grund wurden die Bedingungen, die zu einer erfolgreichen *in vitro* Ektomykorrhizierung von Komposit-Pappeln, in einem Petrischalensystem führen, analysiert. Desweiteren wurde getestet, ob die veränderte Wurzel-Physiologie von „hairy roots“ überhaupt eine Ektomykorrhizierung zulässt.

##### **4.1.2.1 Ermitteln der Bedingungen zur Mykorrhizierung von Komposit-Pappeln**

Die Ektomykorrhizierung von Komposit-Pappeln erfolgte am effizientesten bei reduziertem Stickstoff Angebot und in Abwesenheit von Kohlenhydraten im Medium der Mykorrhizierungs-Platten. Ebenso erwies sich die Vorbehandlung des Pilzes *A. muscaria* als wichtig. Nur wenn der Pilz auf Medium mit verringertem Anteil an Kohlenhydraten (10 mM Glukose) vorgezogen wurde, konnte eine effiziente Ektomykorrhizierung beobachtet werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Pilz Glukose aus dem Medium in Form von Trehalose bzw. Glykogen speichern kann und somit bei zu reichhaltiger Versorgung in der Vorkultur erst mit Verzögerung auf die Pflanze angewiesen ist (Smith and Read, 2008). Da die Kultivierungsdauer von Pappeln im Petrischalensystem, bedingt durch den Wasserverlust

des Mediums, auf ca. drei Monate begrenzt wird, ist der Zeitpunkt der ECM-Bildung entscheidend, damit in der zur Verfügung stehenden Zeit voll entwickelte Ektomykorrhizen ausgebildet werden können.

#### **4.1.2.2 Auswirkungen des „hairy root“ Phänotyps auf die Mykorrhizierung von Komposit-Pappeln**

Der „hairy root“ Phänotyp der Komposit-Pappeln wird durch die Aktivität der *rol*-Gen Produkte induziert (Veena and Taylor, 2007) und hängt vermutlich mit der dadurch verursachten veränderten Wahrnehmung von Auxinen zusammen (Veena and Taylor, 2007). Auxin ist vermutlich auch ein Signal, das bei der Ausbildung von Ektomykorrhizen eine Rolle spielt (Vayssieres et al., 2015). Daher wurde untersucht, ob der „hairy root“ Phänotyp sich negativ auf die Mykorrhizierung der Komposit-Pappeln auswirkt.

Komposit-Pappel Wurzeln, die durch den Stamm K599 induziert wurden, zeigen einen eindeutigen „hairy root“ Phänotyp, wenn sie auf zuckerhaltigem Medium angezogen werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen bei anderen Pflanzen (Alpizar et al., 2006), konnten Wurzeln von Komposit-Pappeln, die auf zuckerfreiem Medium angezogen wurden, hingegen phänotypisch nicht von den Wildtyp-Pappel Wurzeln unterschieden werden (Das, unveröffentlicht). Da das Mykorrhizierungsmedium keinen Zucker enthielt, konnten keine Unterschiede zwischen der Mykorrhizierung von Wildtyp- und Komposit-Pappeln festgestellt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Transformation durch *A. rhizogenes* und die damit einhergehenden Veränderungen der Wurzel-Physiologie die Mykorrhizierung unter den gewählten Bedingungen nicht negativ beeinflusst.

Mittels cLSM-Analyse konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Ektomykorrhizen (ECM) der Komposit-Pappeln alle strukturellen Eigenschaften einer Wildtyp-ECM besitzen und sich von diesen anatomisch nicht unterscheiden. Als abschließende Untersuchung wurden *P. tremula x alba* Komposit-Pappeln und deren ECM mittels qRT-PCR untersucht. Als molekularer Marker wurde das *PtaSWEET1*, ein Homolog des *PtSWEET\_1.c* aus *P. tremula x alba*, das ebenfalls nur in ECM exprimiert wird, verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass wie erwartet, das *PtaSWEET1* in ECM der Komposit-Pappel, nicht jedoch in nicht mykorrhizierten Komposit-Pappel Wurzeln, exprimiert wurde. Somit konnten Komposit-Pappeln als ein neues Werkzeug für molekularbiologische Untersuchungen sowie die Manipulation von Pflanzeigenschaften in Ektomykorrhizen etabliert werden.

#### 4.1.2.3 Vor- und Nachteile der Komposit-Pappeln

Der größte Vorteil der Komposit-Pappeln im Vergleich zur klassischen Pappel-Transformation ist dabei die Zeit, die zu ihrer Herstellung benötigt wird. Während die klassische Pappel-Transformation mehrere Monate dauern kann (Nehls, persönliche Information), können Komposit-Pappeln innerhalb weniger Wochen hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil ist die kostengünstige Herstellung der Komposit-Pappeln. So werden für die Herstellung von Komposit-Pappeln keine teuren Zellkultur-Medien benötigt. Durch die einfache Herstellung der Komposit-Pappeln, mit nur wenigen Kultur-Schritten, wird auch die Kontaminationsgefahr auf ein Minimum reduziert.

Neben den genannten Vorteilen gibt es jedoch auch Nachteile der Komposit-Pappeln gegenüber klassisch erzeugten transgenen Pappeln. So werden an Komposit-Pappeln nur transgene Wurzeln ausgebildet, während der Spross nicht transformiert wird. Die Komposit-Pappeln stellen somit nur ein effizientes Werkzeug zur Untersuchung und Manipulation von Wurzeln dar. Jedoch können andere Fragestellungen nicht mit Hilfe dieser Methode beantwortet werden. So kann beispielsweise keine organspezifische Expression eines Promotor-Reporter Konstrukts untersucht werden.

In der Literatur finden sich zudem Hinweise darauf, dass jede Wurzel, deren Bildung durch *A. rhizogenes* induziert wird, ein eigenes Transformationsereignis darstellt (Costantino et al., 1983). Folglich muss davon ausgegangen werden, dass sich jede der gebildeten Wurzel genotypisch unterscheidet. So konnte bereits bei *Nicotiana tabacum* gezeigt werden, dass sich die sprossbürtigen Wurzeln in der Anzahl der stabil integrierten biT-DNAs unterscheiden können (Collier et al., 2005). Demensprechend muss bei bestimmten Fragestellungen jede Wurzel einer Komposit-Pflanze separat untersucht werden. Dies ist jedoch bei *in vitro* kultivierten Pappel-Stecklingen schwierig, da in der Regel nur sehr wenig Material zur Verfügung steht. Eine Möglichkeit, die Genexpression in gepooltem Wurzelmaterial zu bestimmen, ist die Kalibrierung mittels eines zweiten konstitutiv exprimierten Markergens in der biT-DNA. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten bot sich die Kanamycin-Marker-Kassette hierfür an.

Ein Problem der Komposit-Pappeln ist die Bildung von transgenen Wurzeln, die kein Fluoreszenzsignal zeigen. Solche Wurzeln kommen mit durchschnittlich 14,6% aller sprossbürtigen Wurzeln (für den Stamm K599) relativ häufig vor. Ihr Auftreten könnte daran liegen, dass solche Wurzeln entweder keine biT-DNA enthalten oder die Expression des Fluoreszenzmarkers durch einen Positionseffekt beeinträchtigt wird. Für bestimmte

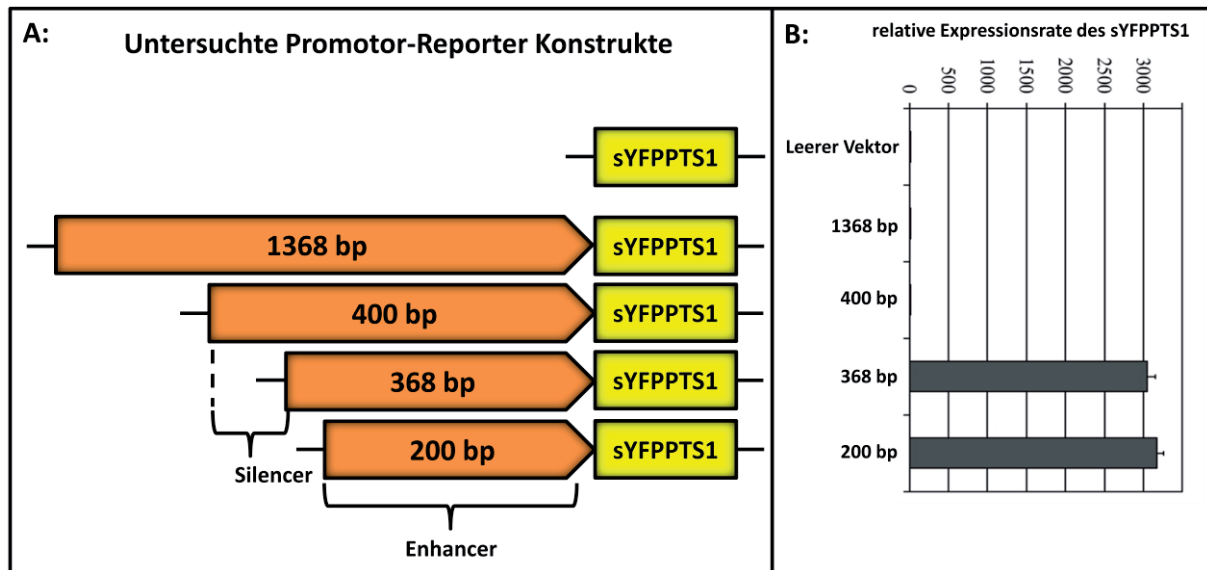
Untersuchungen (z.B. Geninaktivierung, Überexpression) wäre daher eine Vorselektion der nicht transgenen Wurzeln notwendig. Dies könnte am Einfachsten durch einen zweiten Fluoreszenzmarker mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Eigenschaften erreicht werden.

Ebenfalls muss bei der Verwendung der Komposit-Pappeln beachtet werden, dass die ausgebildeten Wurzeln je nach Kultivierungsbedingungen einen „hairy root“ Phänotyp aufweisen. Da der Hormonhaushalt der entsprechenden Wurzeln verändert ist, könnten hierdurch Untersuchungen von hormonregulierten Prozessen verfälscht werden (Christey, 2001, Kiselev et al., 2007).

#### **4.2 Analyse des *PtSWEET\_1.c* Promotors**

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass einige *SWEET*-Gene in Ektomykorrhizen von *P. trichocarpa*, *P. tremula x tremuloides* und *P. tremula x alba* induziert werden (Nehls and Bodendiek, 2012). Um zu untersuchen, wie diese Mykorrhiza spezifische Regulation ermöglicht wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse des ECM induzierten *PtSWEET\_1.c* Promotors durchgeführt. Hierzu wurde ein 1,3 kb großes genomisches DNA Fragment aus *Populus trichocarpa* amplifiziert und sukzessive vom stromaufwärts gelegenen Ende her verkürzt. Das vollständige, sowie die verkürzten Fragmente wurden dann in einen Binärvektor vor ein YFP Gen kloniert, dessen abgeleitetes Protein Peroxisomen-lokalisiert war. Die Promotor-Reporter Konstrukte wurden zur Erzeugung von Komposit-Pappeln mittels *Agrobacterium rhizogenes* (K599) verwendet. Anschließend wurden die transgenen Wurzeln sowie Ektomykorrhizen mittels cLSM und qRT-PCR analysiert.

Wie in Abbildung 39 dargestellt, führte die Verkürzung des Promotors bis auf einen Kernbereich, der sich von -1 bis -200 bp erstreckte, zu einer sehr starken Expression des Reportergens. Daher wurde dieser Bereich als Enhancer-Bereich definiert. Ein weiterer regulierender Bereich konnte zwischen -400 und -368 bp identifiziert werden. Sobald dieser Bereich vom Promotorfragment entfernt wurde, erfolgt eine starke Expression des Markergens auf ungefähr die Expressionshöhe des Mykorrhiza induzierten *PtSWEET\_1.c* (Nehls, Hintelmann, Neb, unveröffentlicht). Da dieser Bereich sich negativ auf die Expression auswirkte, wurde er als Silencer-Bereich definiert (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Schematische Darstellung der *PtSWEET\_1.c* Promotor-Reporter Konstrukte und der relativen Expressionsraten des Reporters in nicht mykorrhizierten Komposit-Pappeln.**

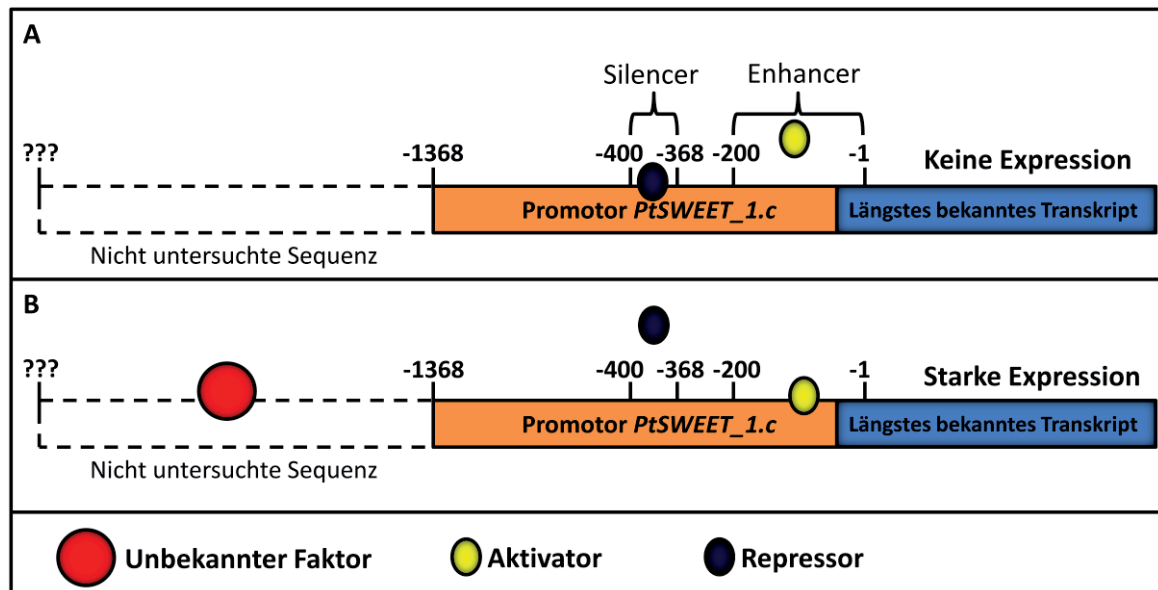
Gezeigt ist eine schematische Darstellung der in Komposit-Pappeln untersuchten Promotorfragmente (A) sowie die relative Expressionsrate des sYFPPTS1 in Komposit-Pappeln (B) (Daten Nehls, Hintelmann, Neb unveröffentlicht). Die untersuchten Promotorfragmente sind in Orange und der Reporter sYFPPTS1 in Gelb dargestellt. Markiert sind die Silencer- bzw. Enhancer-Sequenzen.

Ektomykorrhizen von transgenen Komposit-Pappeln wurden ebenfalls mittels cLSM und qRT-PCR untersucht. Allerdings konnte keines der untersuchten Promotorfragmente eine Mykorrhiza-spezifische Induktion der Expression des Reportergens (*sYFPPTS1*), wie es für *PtSWEET\_1.c* reproduzierbar beobachtet wurde. Damit ist klar, dass in den untersuchten Promotorfragmenten wichtige Elemente für die Mykorrhiza abhängige Steuerung fehlen.

Aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen lässt sich das in der Abbildung 40 dargestellte hypothetische Modell der Ektomykorrhiza spezifischen Regulation des *PtSWEET\_1.c* ableiten. Es kann geschlossen werden, dass in nicht mykorrhizierten Feinwurzeln ein Repressor im Silencer-Bereich (-400 bis -368 bp) bindet und die Expression des *PtSWEET\_1.c* verhindert. Die Repressor-Bindung führt in nicht mykorrhizierten Feinwurzeln vermutlich über Protein-Protein Wechselwirkungen mit einem Aktivator zur Unterdrückung der Enhancer-Aktivität (Abbildung 40-A). Dies setzt voraus, dass ein Aktivator im Enhancer-Bereich (-200 bis -1 bp) bindet. Für diese Hypothese spricht die sehr starke Induktion des *PtSWEET\_1.c* in Ektomykorrhizen. Wird die Feinwurzel durch einen Ektomykorrhiza bildenden Pilz kolonisiert, wird die Wechselwirkung des Repressors mit dem Aktivator verhindert und die Expression des *SWEET*-Gens induziert (Abbildung 40-B). Für diese Hypothese spricht, dass die Expressionsstärke des YFP-Markers unter der Kontrolle der Silencer-freien Promotorfragmente (368 bp und 200 bp) in nicht mykorrhizierten Feinwurzeln auf dem Niveau des *PtSWEET\_1.c*-Gens in Mykorrhizen erfolgte. Unklar bleibt der



Mechanismus, durch den der Repressor inaktiviert wird. Eine Möglichkeit wäre die Bindung eines weiteren unbekanntes Transkriptionsfaktors im nicht untersuchten Promotorbereich (Abbildung 40-B). Hierfür spricht, dass keines der untersuchten Promotor-Reporter Konstrukte eine Ektomykorrhiza spezifische Expression gezeigt hat. Die Induktion des *PtSWEET\_1.c* könnte durch eine Protein-Protein Interaktion zwischen dem Repressor und dem unbekanntes Transkriptionsfaktor oder zwischen dem unbekanntes Transkriptionsfaktor und dem Aktivator bewirkt werden.



**Abbildung 40:** Schematische Darstellung eines hypothetischen Modells zur Ektomykorrhiza spezifischen Regulation des *PtSWEET\_1.c*.

Gezeigt ist ein hypothetisches Modell der Regulation des *PtSWEET\_1.c* in nicht mykorrhizierten Feinwurzeln (A) und in mykorrhizierten Wurzeln (B). Der Repressor wird in Dunkelblau dargestellt, der Aktivator in Gelb, der unbekanntes Faktor in Rot, die untersuchte Promotorsequenz des *PtSWEET\_1.c* in Orange und das längste bekannte Transkript in Blau.

Für ausgewählte, pathogene Pflanzen-Mikroorganismen Interaktionen ist der Mechanismus der *SWEET*-Gen Induktion bereits bekannt. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von pflanzlichen *SWEET*-Genen durch das Pathogen selbst induziert werden kann (Cohn et al., 2014, Yang et al., 2006). So kann das phytopathogene Bakterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* durch Typ III „Transcription Activator Like“ (TAL) Effektoren die Expression von *SWEET*-Genen induzieren und ihren Wirt zur Abgabe von Kohlenhydraten bewegen (Chen et al., 2010, Yang et al., 2006). Diese Effektoren interagieren dabei direkt mit dem Promotor von *OsSWEET11* (Yang et al., 2006). Auch für mutualistische Interaktionen wie der ECM konnte gezeigt werden, dass pilzliche Effektoren in der Pflanze zu finden sind und dort den pflanzlichen Metabolismus verändern. So werden pflanzliche JAZ-Proteine, die als negative Regulatoren einer Jasmonsäure induzierten Pathogen-Antwort bekannt sind (Pauwels and Goossens, 2011, Thines et al., 2007, Chini et al., 2007), durch den

aus dem ECM Pilz *L. bicolor* stammenden Effektor MiSSP7 stabilisiert (Plett et al., 2014). Hierdurch wird der Abbau der JAZ-Proteine verhindert und eine Jasmonsäure induzierte Pathogen-Abwehrreaktion unterdrückt (Plett et al., 2014). Im Gegensatz zu bakteriellen Pathogenen wurden aber bisher keine Effektoren identifiziert, die für eine Mykorrhiza abhängige Steuerung der *SWEET*-Genexpression in Frage kommen. Bei einer ersten *in silico* Analyse des *PtSWEET\_1.c* Promotors konnten keine Bindemotive für bekannte TAL-Effektoren identifiziert werden (Nehls, unveröffentlicht). Um weitere mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) zu identifizieren, wurde daher der *PtSWEET\_1.c* Promotor einer *in silico* Analyse unterzogen.

#### **4.2.1 *in silico* Analyse des *PtSWEET\_1.c***

Mittels *in silico* Analyse wurden die als Silencer bzw. Enhancer identifizierten *PtSWEET\_1.c* Promotor-Sequenzbereiche untersucht. Bei dieser Analyse konnte eine Reihe von potentiellen Bindemotiven identifiziert werden, die in die Regulation des *PtSWEET\_1.c* involviert sein könnten (Tabelle 12 und Tabelle 13; Ergebnisse). Jedoch muss beachtet werden, dass die Vorhersagen der *in silico* Analyse auf Matrizen beruhen, die auf Grund von Untersuchungen an Promotoren anderer Organismen erstellt wurden, welche nicht in der Lage sind, Ektomykorrhizen auszubilden. Da genaue Daten zu den homologen Transkriptionsfaktoren aus der Pappel fehlen, sind solche Analysen daher hoch spekulativ. Weiterhin werden funktionelle Aussagen dadurch erschwert, dass entsprechende Transkriptionsfaktoren in der Regel als große Genfamilien auftreten. Aus diesem Grund werden im Weiteren lediglich solche Transkriptionsfaktoren besprochen, die in die Zucker-, Stickstoff- oder Pathogenantwort abhängige Steuerung der Genexpression involviert sind, da diese Kontrollmechanismen auch im Rahmen der Mykorrhiza-Symbiose eine Rolle spielen.

Die *PtSWEET\_1.c* Promotor-Sequenz -1 bis -200 bp stromaufwärts der Rückwärts-Primer Bindestelle konnte als möglicher Enhancer-Bereich identifiziert werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob der Enhancer organspezifisch exprimiert wird. Hierfür bot sich die Agroinfiltration an. Jedoch ist diese, in Tabak gut erprobte, Transformationsmethode bei Pappeln nicht anwendbar, da die Expression der eingebrachten Konstrukte zu gering ist, um mittels cLSM detektiert zu werden (Gehl, persönliche Information). Aus diesem Grund wurde eine transiente Expression dieses Promotor-Reporter Konstrukts in *Nicotiana benthamiana* Blättern durchgeführt. Hierbei konnte keine Expression des Reporters festgestellt werden. Da das entsprechende Promotor-Reporter Konstrukt in Komposit-Pappel Wurzeln exprimiert wurde, könnte die fehlende Expression des Markers in Tabakblättern auf eine Organspezifität

des Enhancers hinweisen. Um eine solche Organ-spezifische Expression in ganzen Pflanzen untersuchen zu können, erfolgte die Transformation des Enhancer-Reporter Konstrukts in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Allerdings konnte in transgenen *Arabidopsis* Keimlingen ebenfalls keine Expression des Reporters festgestellt werden. Somit gibt es bisher lediglich Hinweise darauf, dass der Enhancer-Bereich in Pappel Wurzeln aktiv ist. Eine Aktivität in anderen Pappel Organen kann zurzeit jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die starke Expression des Reporters, die durch das 200 bp lange Promotor-Reporter Konstrukt bewirkt wurde, deutet darauf hin, dass eine Bindestelle für einen starken Aktivator im Enhancer-Bereich vorhanden sein muss. In der *in silico* Analyse des Enhancer-Bereichs wurde ein Sequenzmotiv identifiziert, das einem *cis*-Element aus einem Reis-Promotor entspricht. Der daran bindende Transkriptionsfaktor (TF) *OsDof25* reguliert die Stickstoffaufnahme in Wurzeln (Santos et al., 2012). Bei Stickstoffmangel wird die Expression des *OsDof25* erhöht und führt zur erhöhten Expression von Ammonium-Transportern (Santos et al., 2012). In ektomykorrhizierten Feinwurzeln konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von Ammonium-Transportern beobachtet werden (Selle et al., 2005). Da in ektomykorrhizierten Feinwurzeln die Abgabe der pflanzlichen Kohlenhydrate direkt an den Stickstoff-Import gekoppelt ist (Nehls and Bodendiek, 2012), könnte die Regulation von Stickstoff-Transporter Genen und *SWEET*-Genen gekoppelt sein und durch einen ähnlichen Mechanismus reguliert werden.

Ein 32 bp langer Abschnitt, der im Bereich von -400 bis -368 bp des *PtSWEET\_1.c* Promotors liegt, konnte in dieser Arbeit als Silencer-Bereich identifiziert werden. Da dieser Bereich des *PtSWEET\_1.c* Promotors vermutlich eine Expression des Gens in nicht mykorrhizierten Feinwurzeln verhindert und *N. benthamiana* und *A. thaliana* keine Mykorrhizen ausbilden, erfolgte keine Analyse des entsprechenden Konstrukts in diesen beiden Modellsystemen. Bei der durchgeführten *in silico* Analyse wurden lediglich TF in Betracht gezogen, die in Wurzeln den Stickstoff- bzw. Kohlenstoffmetabolismus steuern oder mit einer Pathogenantwort in Verbindung gebracht werden können, da diese Funktionen auch für die Mykorrhizierung wichtig sind. Ein guter Kandidat hierfür ist MYB24, ein Repressor aus *A. thaliana* (Nishihara et al., 2013). Eine mögliche Funktion von Transkriptionsfaktoren der MYB-Familie ist die Regulation von Abwehrmechanismen der Pflanze (Raffaele et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass MYB24 mit Jasmonat-ZIM Domäne Proteinen (JAZ) interagiert und dadurch vermutlich in die Jasmonsäure (JA) induzierte Pathogenantwort involviert sein kann (Song et al., 2011). Dementsprechend lässt sich der folgende Mechanismus postulieren, der die Rolle eines potentiellen MYB24 Pappel-Homologs (PtMYB24) in der Regulation des *PtSWEET\_1.c* beschreibt.

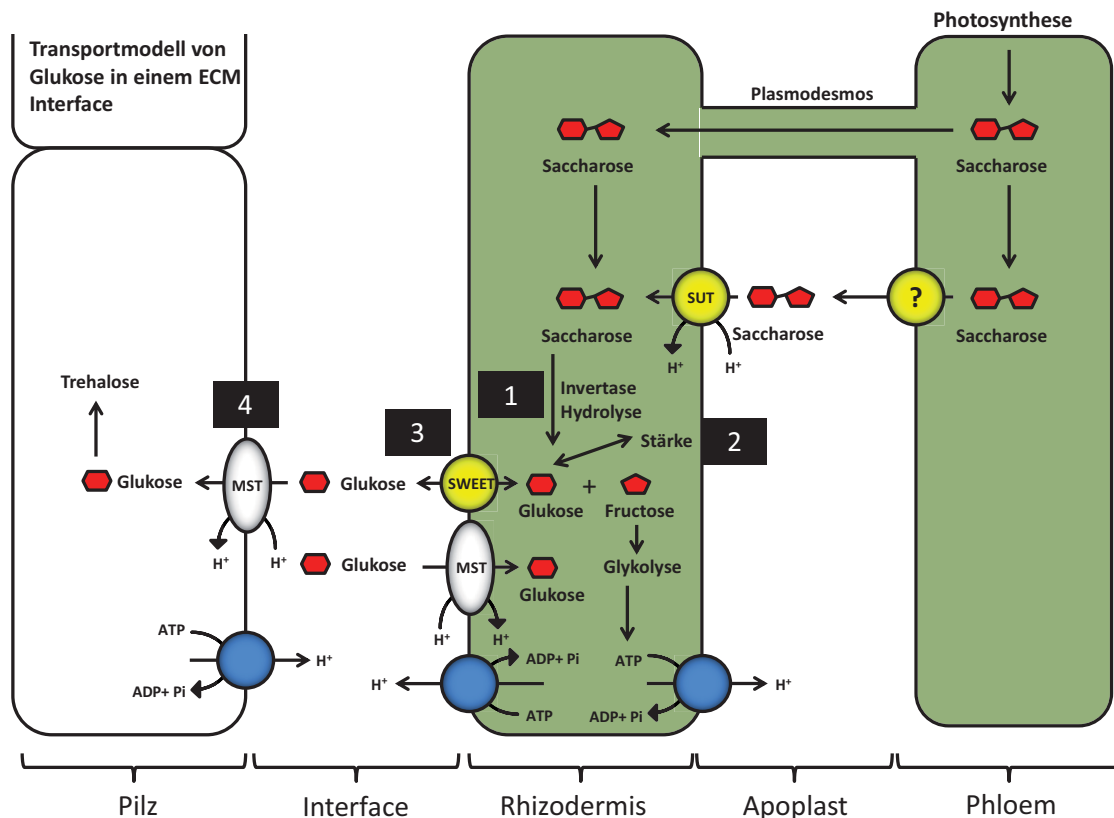
In einer nicht mykorrhizierten Feinwurzel ist das Repressor-Homolog PtMYB24 an den Promotor des *PtSWEET\_1.c* gebunden und inhibiert seine Expression. Sobald ein Pilz die Wurzel kolonisiert, injiziert dieser Effektoren in die benachbarten Pflanzenzellen, die JAZ-Proteine vor einem JA induzierten Abbau schützen. Tatsächlich konnten Plett et al. (2014) zeigen, dass der ECM Pilz *L. bicolor* solche Effektoren besitzt und diese dazu in der Lage sind, in Pflanzen JAZ-Proteine vor dem Abbau zu schützen. Wenn nun das JAZ-Protein nicht mehr abgebaut wird, kommt es zu seiner Anreicherung in der Zelle. Als Folge davon binden JAZ-Proteine an die PtMYB24-Transkriptionsfaktoren, wodurch diese vom Silencer des *PtSWEET\_1.c* Promotors entfernt werden. Dies führt zur Expression des *PtSWEET\_1.c*. In *A. thaliana* konnte tatsächlich bereits gezeigt werden, dass das AtMYB24 durch die Interaktion mit einem JAZ-Protein „inaktiviert“ wird und somit nicht länger als Repressor wirkt (Song et al., 2011). Ob der hier postulierte Mechanismus so auf ECM von Pappel-Wurzeln zutrifft, muss jedoch in Zukunft näher untersucht werden.

#### **4.3 Hypothetisches Modell der pilzlichen Kohlenhydrat-Versorgung in einer Ektomykorrhiza durch *PtSWEET* Facilitatoren**

Durch die Expressionsdaten zusammen mit der funktionellen Analyse einzelner SWEET-Proteine (Nintemann, 2012) kann postuliert werden, dass diese in Ektomykorrhizen der Pappel an der Versorgung des Pilzpartners mit Kohlenhydraten beteiligt sind. Durch die Erkenntnis, dass es sich bei diesen *SWEET*-Genen um Glukose Facilitatoren handelt sowie durch ihre Lokalisierung in der Plasmamembran von *Nicotiana benthamiana*, lässt sich folgendes hypothetisches Modell der Zuckerversorgung des Pilzes in einer ECM postulieren (Abbildung 41).

In den meisten Pflanzen werden die in den Blättern synthetisierten Kohlenhydrate zu Transportzwecken in das di-Saccharid Saccharose umgewandelt (Zimmerman, 1961). In der Wurzel kann die Saccharose entweder direkt verwertet oder in Form von Stärke gespeichert werden (Streb and Zeeman, 2012). Um Glukose an den Symbiosepartner abgeben zu können, muss sie somit vorher freigesetzt werden. Dies kann entweder durch die Invertasen vermittelte (Abbildung 41-1) Spaltung von Saccharose erfolgen (Bocock et al., 2008) oder durch den Abbau von Stärke-Speichern (Abbildung 41-2) (Nehls et al., 2016). Wie die Glukose freigesetzt wird, scheint dabei abhängig vom Alter der Pflanzen zu sein. Es wird angenommen, dass ältere Pflanzen den Bedarf des Pilzes an Kohlenhydraten aus ihren Stärke-Speicher decken (Langley et al., 2002), während junge Pflanzen, die noch über keinen großen

Stärke-Speicher verfügen, den Symbiosepartner direkt mit photosynthetisch gebildeten Kohlenhydraten versorgen (Nehls et al., 2016). Allerdings erfolgt die pilzliche Kohlenhydratversorgung im Herbst, wenn Fruchtkörper gebildet werden, auch bei älteren Pflanzen direkt durch Kohlenhydrate aus der Photosynthese (Nehls et al., 2016).



**Abbildung 41: Hypothetisches Modell zur Kohlenhydrat-Versorgung des Pilzes in einer Ektomykorrhiza Symbiose.**

Saccharose wird in der Photosynthese synthetisiert und anschließend über das Phloem in die Wurzel transportiert. Anschließend wird die Saccharose symplastisch bzw. apoplastisch zur Rhizodermis und damit zum Interface zwischen Pilz und Pflanze transportiert. In den Rhizodermiszellen wird die Saccharose durch Invertasen zu Glukose und Fructose hydrolysiert (1). Die Fructose kann durch eine Hexokinase phosphoryliert werden und in die Glykolyse Reaktion eingehen. Die Glukose kann entweder direkt verwertet oder als Stärke zwischengespeichert werden (2). Zur Glukoseabgabe wird diese entweder aus Saccharose oder Stärke freigesetzt und durch die SWEET-Facilitatoren in den Apoplasten abgegeben (3). Die abgegebene Glukose kann nun von dem Pilz aufgenommen werden (4). Der Pilz kann die aufgenommene Glukose entweder direkt verwerten oder in Form von Trehalose speichern.

Die Abgabe der Glukose kann, nach ihrer intrazellulären Bereitstellung, durch die SWEET-Facilitatoren erfolgen (Abbildung 41-3). Jedoch bleibt nach wie vor unklar, ob die identifizierten *SWEET*-Gene nur in Zellen, die direkt mit dem Pilzpartner in Kontakt stehen (Hartig'sches Netz), oder in anderen Wurzelgeweben wie dem vaskulären System exprimiert werden. In diesem Fall würden die SWEET-Facilitatoren lediglich die Gewebe des Wurzelcortexes apoplastisch mit Kohlenhydraten versorgen. Für die eindeutige Klärung der Aufgabe der SWEET-Facilitatoren in einer ECM ist daher eine zelluläre Lokalisierung ihrer

Expression notwendig. Diese Untersuchung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da die Lokalisierung der Genexpression nur durch ein vollständiges ECM spezifisch induziertes Promotor-Reporter Konstrukt oder mittels *in situ* Hybridisierung beantwortet werden kann.

Da es sich bei den *SWEET*-Genen um Facilitatoren handelt, wird die Glukose dem Konzentrationsgradienten entsprechend abgegeben. Dies bedeutet, dass der Pilz die freigesetzte Glukose effizient aufnehmen muss, damit der Fluss an Kohlenhydraten bestehen bleibt. Zu diesem Zwecke exprimiert der Pilz ECM spezifisch Monosaccharidtransporter (MST), die überwiegend Glukose aber auch Fructose aus dem Apoplasten aufnehmen können (Abbildung 41-4) (Fajardo López et al., 2008, Nehls et al., 1998). Somit kann der Pilz durch die Regulation der MST Expression die Aufnahme von Kohlenhydraten und damit auch die Flussrate der von der Pflanze abgegebenen Kohlenhydrate regulieren. Um zu verhindern, dass die ECM sich zu einer einseitigen, parasitären Interaktion entwickelt, muss die Pflanze jedoch die Abgabe der Kohlenhydrate steuern (Nehls, 2008).

#### **4.3.1 Regulationsmechanismen der pilzlichen Kohlenhydrat-Versorgung durch die Pflanze**

Zur Steuerung der pilzlichen Kohlenhydratversorgung sind zwei Mechanismen denkbar: Regulation des Zuckerausports oder Reimport der abgegebenen Kohlenhydrate aus dem Apoplasten. Ein möglicher Weg, den Zuckerausport zu steuern, stellt die transkriptionelle Regulation der *SWEET*-Facilitatoren dar. Da jedoch bisher nicht verstanden ist, wie die *SWEET*-Gene induziert werden, kann eine Fremdsteuerung der Genexpression durch pilzliche Effektoren, in der Symbiose, nicht ausgeschlossen werden. Dieser Regulationstyp würde allerdings keine schnelle Reaktion auf sich verändernde Bedingungen erlauben. Eine Möglichkeit, schnell die Flussrate der ausströmenden Glukose zu regulieren, wäre eine post-translationale Modifikation der *SWEET*-Facilitatoren selbst. Niittylä et al. (2007) konnten bereits zeigen, dass der cytoplasmatische C-Terminus des Saccharose Facilitators *AtSWEET11* bei hoher Saccharose Konzentration im Medium phosphoryliert wird (Niittylä et al., 2007). Eine *in silico* Untersuchung des *PtSWEET\_1.c* C-Terminus (208-250 aa) mittels des Vorhersageprogramms NetPhos 3.1 ergab eine mögliche Phosphorylierungsstelle im Serin (244 aa) mit einem Score von 0,571 (der minimale „Score-threshold“ liegt bei 0,5; Daten nicht gezeigt). Obwohl die Phosphorylierung bei *Arabidopsis* Kohlenhydrat abhängig erfolgt, ist ihre Bedeutung nach wie vor nicht geklärt. Chen et al. (2015) postulierte, dass der cytoplasmatische C-Terminus der *SWEET*-Proteine auch mit anderen Proteinen interagieren



könnte, was eine Funktion der Facilitatoren als Zucker-Rezeptor ermöglichen würde (Chen et al., 2015).

Neben der transkriptionellen sowie der möglichen post-translationalen Modifikation der SWEET-Facilitatoren kann der Verlust an Kohlenhydraten in einer ECM auch durch eine Wiederaufnahme abgegebener Zucker reguliert werden. Tatsächlich wurden bereits in der Pappel Ektomykorrhiza spezifisch induzierte Monosacharid Symporter (*PtMST*) identifiziert, die diese Aufgabe bewerkstelligen könnten (Wittusky, unveröffentlicht). Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Lokalisierung ausgewählter *PtMST*-Transporter in der Plasmamembran der Pappelwurzeln konnte die Arbeits-Hypothese unterstützt und eine Rolle der charakterisierten *PtMST*-Transporter bei der Wiederaufnahme von Zuckern aus dem Apoplasten der Mykorrhizen postuliert werden.

## 5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Komposit-Pappeln als Methode zur schnellen Erzeugung von transgenen Wurzeln und ihren Mykorrhizen entwickelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass nicht alle Wurzeln, die an einer Komposit-Pappel gebildet wurden, den YFP-Marker exprimieren. Eine Selektion der transgenen Wurzeln mit Hilfe eines konstitutiv exprimierten visuellen Markers, der auf der *biT*-DNA kodiert wird, ist daher für viele Anwendungen sinnvoll. Als mögliche Marker-Kassette kann beispielsweise das 200 bp lange *PtSWEET\_1.c* Promotor-Reporter Konstrukt eingesetzt werden.

Die Methode zur Mykorrhizierung der Komposit-Pappel Wurzeln muss noch weiter optimiert werden, da nicht immer eine ausreichend effiziente Mykorrhizierung erreicht wurde. Eine Möglichkeit der Optimierung wäre die Vorbehandlung der Komposit-Pflanzen. So müsste getestet werden, ob Pflanzen, die unter Mangelbedingungen vorgezogen wurden, sich effizienter mykorrhizieren lassen. Als mögliche Mangelbedingungen wäre ein reduzierter Gehalt an Stickstoff und Phosphat im Pflanzen-Medium denkbar.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Promotor-Reporter Konstrukte von *PtSWEET\_1.c* und *PttSWEET1.b* zeigten keine Mykorrhiza spezifische Induktion. Daher müssen längere Promotor-Sequenzen isoliert und auf ihre Induzierbarkeit hin untersucht werden. Desweiteren muss geklärt werden, ob der Aktivator des *PtSWEET\_1.c* spezifisch in Pappel-Wurzeln exprimiert wird oder seine Expression auch in anderen Pappel-Organen erfolgt. Für diese Analyse müssen Pappeln generiert werden, die das Konstrukt in der ganzen Pflanze exprimieren. Ebenso sollte eine weitere sukzessive Verkürzung des Enhancer-Bereichs erfolgen, um die Bindestelle potentieller Aktivatoren weiter einzugrenzen. Der in dieser Arbeit identifizierte Silencer-Bereich des *PtSWEET\_1.c* Promotors ist bereits so kurz, dass er mittels „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) auf die Interaktion mit möglichen Transkriptionsfaktoren untersucht werden kann.

Desweiteren muss das postulierte Modell der *SWEET* abhängigen Kohlenhydrat-Versorgung des Pilzpartners in einer Ektomykorrhiza durch entsprechende Pflanzen-Mutanten bestätigt werden. Hierfür bieten sich RNAi bzw. CRISPR/Cas9 als mögliche Techniken an, um mittels „knock down“ bzw. „knock out“ zu untersuchen, ob entsprechende Komposit-Pappeln noch dazu in der Lage sind, Ektomykorrhizen auszubilden.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erzeugung einzelsträngiger LIC-Überhänge an einem LIC-Vektor. ....	20
Abbildung 2: Erzeugung einzelsträngiger LIC-Überhänge am Insert. ....	20
Abbildung 3: Hybridisierung der ssDNA Überhänge von Insert und Vektor. ....	21
Abbildung 4: Invertase abhängiges Saccharose Transport Modell in einer ECM. ....	25
Abbildung 5: Dendrogramm der <i>SWEET</i> -Gene aus <i>A. thaliana</i> und <i>Populus trichocarpa</i> bzw. <i>P. tremuloides</i> . ....	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung der wichtigsten regulatorischen Bereiche eines Promotors. ....	32
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer funktionellen Promotoranalyse. ....	34
Abbildung 8: Vergleich des Wurzel-Phänotyps an einer <i>A. rhizogenes</i> (Stamm 15834) Komposit-Pappel (A) und einer Negativkontrolle (B). ....	53
Abbildung 9: <i>A. rhizogenes</i> vermittelte Induktion der Wurzelbildung an Pappel Stecklingen. ....	54
Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl an Wurzeln pro Steckling. ....	55
Abbildung 11: Bildung <i>A. rhizogenes</i> induzierter transgener Mikrokalli an einem inokulierten <i>P. tremula x alba</i> Steckling. ....	56
Abbildung 12: YFP Fluoreszenzsignal einer transgenen Komposit-Pappel. ....	57
Abbildung 13: cLSM Untersuchung von Komposit-Pappel Wurzeln induziert durch unterschiedliche <i>A. rhizogenes</i> Stämme. ....	58
Abbildung 14: Vergleich des Wurzelsystems einer Komposit-Pflanze (A) und einer Kontrollpflanze (B). ....	60
Abbildung 15: Ektomykorrhizen einer Komposit-Pappel mit <i>Amanita muscaria</i> . ....	61
Abbildung 16: Längsschnitt durch eine ektomykorrhizierte Feinwurzel einer Komposit-Pappel. ....	62
Abbildung 17: Untersuchung der Expression des <i>PtaSWEET1</i> in ektomykorrhizierten Komposit-Pappel Feinwurzeln. ....	63
Abbildung 18: Sequenzvergleich des Promotorbereichs von vier ECM induzierten <i>SWEET</i> Homologen. ....	64
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Konstruktion des binären Vektors pBI121-LIC-sYFPPTS1. ....	65
Abbildung 20: Restriktionsanalyse des pBI121-LIC-sYFPPTS1 mit <i>BcuI</i> und <i>XbaI</i> . ....	66

Abbildung 21: Amplifikation eines 2 kb großen genomischen <i>PtSWEET_1.c</i> DNA-Fragments. .....	67
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Sequenz des <i>PtSWEET_1.c</i> Promotors sowie der trunkierten Promotor-Reporter Konstrukte. ....	68
Abbildung 23: Restriktionsanalyse von pBI121-1368bp-sYFPPTS1 mit den Enzymen <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> .....	69
Abbildung 24: Restriktionsanalyse von pBI121-368bp-sYFPPTS1 und pBI121-568bp-sYFPPTS1 mit den Enzymen <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i> . ....	69
Abbildung 25: PCR basierte Überprüfung der Klonierung von <i>PtSWEET_1.c</i> Promotorfragmenten im Bereich zwischen 200 bp und 400 bp Länge. ....	69
Abbildung 26: Vergleich der Fluoreszenzintensität zweier Komposit-Pappeln, die mit den Konstrukten pBI121-368bp-sYFPPTS1 (A) bzw. pBI121-1368bp-sYFPPTS1 (B) transformiert wurden. ....	70
Abbildung 27: Vergleich der Fluoreszenzintensität von transgenen Komposit-Pappel Wurzeln, die mit unterschiedlichen Konstrukten transformiert worden waren. ....	73
Abbildung 28: Schematische Darstellung der <i>PtSWEET_1.c</i> Promotor-Reporter Konstrukte und der relativen Expressionsraten des Reporters in Komposit-Pappeln.....	75
Abbildung 29: Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen einer ektomykorrhizierten und einer nicht mykorrhizierten transgenen Komposit-Pappel Feinwurzel. ....	76
Abbildung 30: Co-Lokalisation des pBI121-368bp-sYFPPTS1 und des Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukts.....	77
Abbildung 31: PCR basierte Überprüfung der Klonierung des pCXUN-PttSWEET1.b-NLSsYFP Konstrukts. ....	81
Abbildung 32: Schematische Darstellung der T-DNA des pCXUN-LIC-NLSsYFP (Nehls, unveröffentlicht). ....	82
Abbildung 33: Schematische Darstellung der Konstruktion von pBI121-35S-LICsYFP.....	84
Abbildung 34: Restriktionsanalyse des pBI121-35S-LICsYFP mit <i>EcoRV</i> .....	84
Abbildung 35: PCR-basierte Überprüfung der SWEET-Lokalisierungsstrukture. ....	85
Abbildung 36: PCR basierte Überprüfung der Klonierung der <i>PtMST</i> - Lokalisierungsstrukture. ....	86
Abbildung 37: Co-Lokalisation von <i>PtSWEET_1.b</i> -YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.....	87
Abbildung 38: Co-Lokalisation von <i>PtMST8</i> -YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.....	88

Abbildung 39: Schematische Darstellung der <i>PtSWEET_1.c</i> Promotor-Reporter Konstrukte und der relativen Expressionsraten des Reporters in nicht mykorrhizierten Komposit-Pappeln. ....	96
Abbildung 40: Schematische Darstellung eines hypothetischen Modells zur Ektomykorrhiza spezifischen Regulation des <i>PtSWEET_1.c</i> . ....	97
Abbildung 41: Hypothetisches Modell zur Kohlenhydrat-Versorgung des Pilzes in einer Ektomykorrhiza Symbiose. ....	101
Abbildung 42: Vektorkarte des pBI121-LIC-sYFP5NL. ....	133
Abbildung 43: Vektorkarte des pBI121-35S-LICsYFP. ....	134
Abbildung 44: Co-Lokalisation von PtSWEET_1.c-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten. ....	135
Abbildung 45: Co-Lokalisation von PtSWEET02.a-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten. ....	136
Abbildung 46: Co-Lokalisation von PtSWEET15.b-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten. ....	137
Abbildung 47: Co-Lokalisation von MST16 und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten. ....	138
Abbildung 48: Co-Lokalisation von PtMST18-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten. ....	139

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit zur Analyse bzw. Manipulation von Sequenzen verwendeten Programme. ....	38
Tabelle 2: Bedingungen einer typischen PCR.....	44
Tabelle 3: Bedingungen einer PCR zur Sequenzierung nach Sanger. ....	46
Tabelle 4: Vergleich der Fähigkeit einzelner <i>A. rhizogenes</i> Stämme die Bildung transgener Wurzeln zu induzieren. ....	57
Tabelle 5: Vergleich der Inokulationsmethode zur Erzeugung von Komposit-Pappeln.....	59
Tabelle 6: Mittels PCR amplifizierte Fragmente des <i>PtSWEET_1.c</i> Promotors.....	68
Tabelle 7: Ergebnisse der visuellen Untersuchung des sYFPPTS1 in Komposit-Pappeln. ....	71
Tabelle 8: Überprüfung der Promotor-Reporter Konstrukte in <i>P. tremula x tremuloides</i> . ....	72
Tabelle 9: Minimale benötigte Laserintensität zur Visualisierung des sYFPPTS1 Signals mittels cLSM. ....	74
Tabelle 10: Vorhersage von möglichen TATA-Box Motiven mittels PlantCare.....	79
Tabelle 11: Vorhersage von möglichen CAAT-Box Motiven mittels PlantCare. ....	79
Tabelle 12: Mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen in der Enhancer-Sequenz. ....	80
Tabelle 13: Mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen in der Silencer-Sequenz. ....	80



## 8 Literaturverzeichnis

- ALPIZAR, E., DECHAMP, E., ESPEOUT, S., ROYER, M., LECOULS, A. C., NICOLE, M., BERTRAND, B., LASHERMES, P. & ETIENNE, H. 2006. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports*, 25, 959-967.
- AN, G. H. 1985. High-Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology*, 79, 568-570.
- ASHBY, A. M., WATSON, M. D., LOAKE, G. J. & SHAW, C. H. 1988. Ti Plasmid-Specified Chemotaxis of *Agrobacterium-Tumefaciens* C58c1 toward Vir-Inducing Phenolic-Compounds and Soluble Factors from Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants. *Journal of Bacteriology*, 170, 4181-4187.
- ASLANIDIS, C. & DEJONG, P. J. 1990. Ligation-Independent Cloning of Pcr Products (Lic-Pcr). *Nucleic Acids Research*, 18, 6069-6074.
- BARON, C. & ZAMBRYSKI, P. C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? *Annual Review of Genetics*, 29, 107-129.
- BEVAN, M. 1984. Binary *Agrobacterium* Vectors for Plant Transformation. *Nucleic Acids Research*, 12, 8711-8721.
- BIRCH, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 297-326.
- BISSELING, T., DANGL, J. L. & SCHULZE-LEFERT, P. 2009. Next-generation communication. *Science*, 324, 691.
- BLASIUS, D., FEIL, W., KOTTKE, I. & OBERWINKLER, F. 1986. Hartig Net Structure and Formation in Fully Ensheathed Ectomycorrhizas. *Nordic Journal of Botany*, 6, 837-842.
- BLOM, N., SICHERITZ-PONTÉN, T., GUPTA, R., GAMMELTOFT, S. & BRUNAK, S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4, 1633-1649.
- BOCOCK, P. N., MORSE, A. M., DERVINIS, C. & DAVIS, J. M. 2008. Evolution and diversity of invertase genes in *Populus trichocarpa*. *Planta*, 227, 565-76.
- BRUNNER, A. M., BUSOV, V. B. & STRAUSS, S. H. 2004a. Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science*, 9, 49-56.
- BRUNNER, A. M., ROTTMANN, W. H., SHEPPARD, L. A., KRUTOVSKII, K., DIFAZIO, S. P., LEONARDI, S. & STRAUSS, S. H. 2000. Structure and expression of duplicate AGAMOUS orthologues in poplar. *Plant Molecular Biology*, 44, 619-634.
- BRUNNER, A. M., YAKOVLEV, I. A. & STRAUSS, S. H. 2004b. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, 4, 14.
- BÜTTNER, M. 2007. The monosaccharide transporter (-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS letters*, 581, 2318-2324.
- BÜTTNER, M. & SAUER, N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465, 263-274.
- CARDARELLI, M., SPANÒ, L., MARIOTTI, D., MAURO, M. L., VAN SLUYS, M. A. & COSTANTINO, P. 1987. The role of auxin in hairy root induction. *Molecular and General Genetics MGG*, 208, 457-463.
- CARPANETO, A., GEIGER, D., BAMBERG, E., SAUER, N., FROMM, J. & HEDRICH, R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 21437-21443.
- CARTHARIUS, K., FRECH, K., GROTE, K., KLOCKE, B., HALTMEIER, M., KLINGENHOFF, A., FRISCH, M., BAYERLEIN, M. & WERNER, T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 21, 2933-42.
- CEVALLOS, M. A., CERVANTES-RIVERA, R. & GUTIERREZ-RIOS, R. M. 2008. The repABC plasmid family. *Plasmid*, 60, 19-37.
- CHALOT, M., BLAUDEZ, D. & BRUN, A. 2006. Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science*, 11, 263-266.

- CHANDRA, S. 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34, 407-415.
- CHEN, L. Q. 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist*, 201, 1150-1155.
- CHEN, L. Q., CHEUNG, L. S., FENG, L., TANNER, W. & FROMMER, W. B. 2015. Transport of Sugars. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 84, 84, 865-894.
- CHEN, L. Q., HOU, B. H., LALONDE, S., TAKANAGA, H., HARTUNG, M. L., QU, X. Q., GUO, W. J., KIM, J. G., UNDERWOOD, W., CHAUDHURI, B., CHERMAK, D., ANTONY, G., WHITE, F. F., SOMERVILLE, S. C., MUDGETT, M. B. & FROMMER, W. B. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468, 527-32.
- CHEN, L. Q., QU, X. Q., HOU, B. H., SOSSO, D., OSORIO, S., FERNIE, A. R. & FROMMER, W. B. 2012. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*, 335, 207-211.
- CHINI, A., FONSECA, S., FERNANDEZ, G., ADIE, B., CHICO, J., LORENZO, O., GARCIA-CASADO, G., LOPEZ-VIDRIERO, I., LOZANO, F. & PONCE, M. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448, 666-671.
- CHRISTEY, M. C. 2001. Invited review: Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37, 687-700.
- CHUNG, C. & MILLER, R. H. 1988. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 3580-3580.
- CLOUGH, S. J. & BENT, A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16, 735-743.
- COHN, M., BART, R. S., SHYBUT, M., DAHLBECK, D., GOMEZ, M., MORBITZER, R., HOU, B. H., FROMMER, W. B., LAHAYE, T. & STASKAWICZ, B. J. 2014. *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Mol Plant Microbe Interact*, 27, 1186-98.
- COLLIER, R., FUCHS, B., WALTER, N., KEVIN LUTKE, W. & TAYLOR, C. G. 2005. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant Journal*, 43, 449-457.
- COSTANTINO, P., SPANO, L., POMPONI, M., BENVENUTO, E. & ANCORA, G. 1983. The T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* is transmitted through meiosis to the progeny of hairy root plants. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 2, 465-470.
- CRONK, Q. C. B. 2005. Plant eco-devo: the potential of poplar as a model organism. *New Phytologist*, 166, 39-48.
- DAIMON, H., FUKAMI, M. & MII, M. 1990. Hairy root formation in peanut by the wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tissue Cult Lett*, 7, 31-34.
- DE PAOLIS, A., MAURO, M., POMPOM, M., CARDARELLI, M., SPANO, L. & COSTANTINO, P. 1985. Localization of agropine-synthesizing functions in the T R region of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plasmid*, 13, 1-7.
- DE RYBEL, B., VAN DEN BERG, W., LOKERSE, A., LIAO, C. Y., VAN MOURIK, H., MOLLER, B., PERIS, C. L. & WEIJERS, D. 2011. A Versatile Set of Ligation-Independent Cloning Vectors for Functional Studies in Plants. *Plant Physiology*, 156, 1292-1299.
- DEBEUCKELEER, M., LEMMERS, M., DEVOS, G., WILLMITZER, L., VANMONTAGU, M. & SCHELL, J. 1981. Further Insight on the Transferred-DNA of Octopine Crown Gall. *Molecular & General Genetics*, 183, 283-288.
- DEBLOCK, M., HERRERAESTRELLA, L., VANMONTAGU, M., SCHELL, J. & ZAMBRYSKI, P. 1984. Expression of Foreign Genes in Regenerated Plants and in Their Progeny. *Embo Journal*, 3, 1681-1689.
- DEFRAMOND, A. J., BARTON, K. A. & CHILTON, M. D. 1983. Mini-Ti - a New Vector Strategy for Plant Genetic-Engineering. *Bio-Technology*, 1, 262-269.
- DICKMANN, D. I. 2001. An overview of the genus *Populus*. *Poplar Culture in North America*, 1e42.
- DOBNER, I. 2003. Der Einsatz mykorrhizierter Gehölze in biologischen Sanierungsverfahren unter dem Aspekt TNT-belasteter Böden. *Universität Bremen (Dissertation)*.
- DOUGLAS, C. J., HALPERIN, W. & NESTER, E. W. 1982. *Agrobacterium tumefaciens* Mutants Affected in Attachment to Plant-Cells. *Journal of Bacteriology*, 152, 1265-1275.

- DOWER, W. J., MILLER, J. F. & RAGSDALE, C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16, 6127-6145.
- DUDDRIDGE, J. A. & READ, D. J. 1984. Modification of the Host Fungus Interface in Mycorrhizas Synthesized between *Suillus-Bovinus* (Fr) Kuntz, O. And *Pinus-Sylvestris* L. *New Phytologist*, 96, 583-&.
- DURRENBERGER, F., CRAMERI, A., HOHN, B. & KOUKOLIKOVANICOLA, Z. 1989. Covalently Bound VirD2 Protein of *Agrobacterium-Tumefaciens* Protects the T-DNA from Exonucleolytic Degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 9154-9158.
- FAJARDO LÓPEZ, M., DIETZ, S., GRUNZE, N., BLOSCHIES, J., WEIß, M. & NEHLS, U. 2008. The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil-growing hyphae. *New Phytologist*, 180, 365-378.
- FILLATTI, J. J., SELLMER, J., MCCOWN, B., HAISSIG, B. & COMAI, L. 1987. *Agrobacterium* Mediated Transformation and Regeneration of *Populus*. *Molecular & General Genetics*, 206, 192-199.
- FISCHER, R., VAQUERO-MARTIN, C., SACK, M., DROSSARD, J., EMANS, N. & COMMANDEUR, U. 1999. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 113-116.
- FRISCH, D. A., HARRISHALLER, L. W., YOKUBAITIS, N. T., THOMAS, T. L., HARDIN, S. H. & HALL, T. C. 1995. Complete Sequence of the Binary Vector Bin-19. *Plant Molecular Biology*, 27, 405-409.
- GELVIN, S. B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 223-256.
- GELVIN, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 16-37, table of contents.
- GIOVANNETTI, G. & FONTANA, A. 1982. Mycorrhizal Synthesis between *Cistaceae* and *Tuberaceae*. *New Phytologist*, 92, 533-537.
- GODBOUT, C. & FORTIN, J. A. 1983. Morphological Features of Synthesized Ectomycorrhizae of *Alnus-Crispa* and *Alnus-Rugosa*. *New Phytologist*, 94, 249-262.
- GOGARTEN, J. P. & BENTRUP, F.-W. 1989. Substrate specificity of the hexose carrier in the plasmalemma of *Chenopodium* suspension cells probed by transmembrane exchange diffusion. *Planta*, 178, 52-60.
- GRUNZE, N., WILLMANN, M. & NEHLS, U. 2004. The impact of ectomycorrhiza formation on monosaccharide transporter gene expression in poplar roots. *New Phytologist*, 164, 147-155.
- GUO, W. J., NAGY, R., CHEN, H. Y., PFRUNDER, S., YU, Y. C., SANTELIA, D., FROMMER, W. B. & MARTINOIA, E. 2014. SWEET17, a Facilitative Transporter, Mediates Fructose Transport across the Tonoplast of *Arabidopsis* Roots and Leaves. *Plant Physiology*, 164, 777-789.
- GURLITZ, R. H. G., LAMB, P. W. & MATTHYSSE, A. G. 1987. Involvement of Carrot Cell-Surface Proteins in Attachment of *Agrobacterium-Tumefaciens*. *Plant Physiology*, 83, 564-568.
- HAMPP, R., ECKE, M., SCHAEFFER, C., WALLEENDA, T., WINGLER, A., KOTTKE, I. & SUNDBERG, B. 1996. Axenic mycorrhization of wild type and transgenic hybrid aspen expressing T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Trees-Structure and Function*, 11, 59-64.
- HAMPP, R., SCHAEFFER, C., WALLEENDA, T., STULTEN, C., JOHANN, R. & EINIG, W. 1995. Changes in Carbon Partitioning or Allocation Due to Ectomycorrhiza Formation - Biochemical-Evidence. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 73, S548-S556.
- HANSEN, G., LARRIBE, M., VAUBERT, D., TEMPE, J., BIERMANN, B. J., MONTOYA, A. L., CHILTON, M.-D. & BREVET, J. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* pRi8196 T-DNA: mapping and DNA sequence of functions involved in mannopine synthesis and hairy root differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 7763-7767.
- HANSEN, G. & WRIGHT, M. S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4, 226-231.

- HANSEN, J., JORGENSEN, J. E., STOUGAARD, J. & MARCKER, K. A. 1989. Hairy Roots - a Short Cut to Transgenic Root-Nodules. *Plant Cell Reports*, 8, 12-15.
- HARTL, D. L. & JONES, E. W. 1998. *Genetics: principles and analysis*, Jones and Bartlett.
- HASELOFF, J., SIEMERING, K. R., PRASHER, D. C. & HODGE, S. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 2122-2127.
- HEHL, R., NORVAL, L., ROMANOV, A. & BÜLOW, L. 2016. Boosting AthaMap database content with data from protein binding microarrays. *Plant and Cell Physiology*, 57, e4-e4.
- HELLENS, R. P., EDWARDS, E. A., LEYLAND, N. R., BEAN, S. & MULLINEAUX, P. M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42, 819-832.
- HOBBIE, J. E. & HOBBIE, E. A. 2006. <sup>15</sup>N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology*, 87, 816-822.
- HOEKEMA, A., HIRSCH, P. R., HOOYKAAS, P. J. J. & SCHILPEROORT, R. A. 1983. A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir-Region and T-Region of the Agrobacterium-Tumefaciens Ti-Plasmid. *Nature*, 303, 179-180.
- HONDA, Y., SAKAI, H., HIASA, H., TANAKA, K., KOMANO, T. & BAGDASARIAN, M. 1991. Functional Division and Reconstruction of a Plasmid Replication Origin - Molecular Dissection of the Origin of the Broad-Host-Range Plasmid-Rsf1010. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 179-183.
- JACOBS, P., PETERSON, R. & MASSICOTTE, H. 1989. Altered fungal morphogenesis during early stages of ectomycorrhiza formation in Eucalyptus pilularis. *Scanning Microsc*, 3, 249-56.
- JEFFERSON, R. A., KAVANAGH, T. A. & BEVAN, M. W. 1987. Beta-Glucuronidase (Gus) as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Plants. *Journal of Cellular Biochemistry*, 57-57.
- JONES, D. L. & DARRAH, P. R. 1996. Re-sorption of organic compounds by roots of Zea mays L and its consequences in the rhizosphere .3. Characteristics of sugar influx and efflux. *Plant and Soil*, 178, 153-160.
- KISELEV, K., DUBROVINA, A., VESELOVA, M., BULGAKOV, V., FEDOREYEV, S. & ZHURAVLEV, Y. N. 2007. The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in Vitis amurensis transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128, 681-692.
- KOTTKE, I., GUTTENBERGER, M., HAMPP, R. & OBERWINKLER, F. 1987. An in vitro method for establishing mycorrhizae on coniferous tree seedlings. *Trees*, 1, 191-194.
- KOTTKE, I. & OBERWINKLER, F. 1986. Mycorrhiza of forest trees - structure and function. *Trees-Structure and Function*, 1, 1-24.
- LALONDE, S., WIPF, D. & FROMMER, W. B. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 341-72.
- LANGLEY, J. A., DRAKE, B. G. & HUNGATE, B. A. 2002. Extensive belowground carbon storage supports roots and mycorrhizae in regenerating scrub oaks. *Oecologia*, 131, 542-548.
- LEE, L. Y. & GELVIN, S. B. 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, 146, 325-332.
- LESCOT, M., DÉHAIS, P., THIJS, G., MARCHAL, K., MOREAU, Y., VAN DE PEER, Y., ROUZÉ, P. & ROMBAUTS, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30, 325-327.
- LEWIS, D. H. & HARLEY, J. L. 1965. Carbohydrate Physiology of Mycorrhizal Roots of Beech .3. Movement of Sugars between Host and Fungus. *New Phytologist*, 64, 256-&.
- LI, J. & SCHMIDT, A. M. 1997. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16498-16506.
- LIN-CHAO, S. & BREMER, H. 1986. Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in Escherichia coli. *Molecular and General Genetics MGG*, 203, 143-149.



- LOAKE, G. J., ASHBY, A. M. & SHAW, C. H. 1988. Attraction of *Agrobacterium-Tumefaciens* C58c1 Towards Sugars Involves a Highly Sensitive Chemotaxis System. *Journal of General Microbiology*, 134, 1427-1432.
- MANIATIS, T., GOODBOURN, S. & FISCHER, J. A. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236, 1237-45.
- MARGER, M. D. & SAIER, M. H. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences*, 18, 13-20.
- MARTIN, F., DUPLESSIS, S., DITENGOU, F., LAGRANGE, H., VOIBLET, C. & LAPEYRIE, F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist*, 151, 145-154.
- MATTHYSSE, A. G. 1987. Characterization of Nonattaching Mutants of *Agrobacterium-Tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 169, 313-323.
- MCCULLEN, C. A. & BINNS, A. N. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 101-127.
- MELIN, E. & NILSSON, H. 1957. Transport of C14-labelled photosynthate to the fungal associate of pine mycorrhiza. *Sven. Bot. Tidskr*, 51, 166-186.
- MEYER, F. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. *Marks, GC Ectomycorrhizae: Their Ecology And Physiology*.
- MIKI, B. & MCHUGH, S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107, 193-232.
- MOLINA, R., MASSICOTTE, H. & TRAPPE, J. M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. *Mycorrhizal Functioning: an Integrative Plant-Fungal Process*, 357, e423.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- MYSORE, K. S., BASSUNER, B., DENG, X. B., DARBINIAN, N. S., MOTCHOULSKI, A., REAM, W. & GELVIN, S. B. 1998. Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 668-683.
- NEHLS, U. 2004. Carbohydrates and nitrogen: nutrients and signals in ectomycorrhizas. *Plant Surface Microbiology*. Springer.
- NEHLS, U. 2008. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1097-1108.
- NEHLS, U. & BODENDIEK, I. 2012. 7 Carbohydrates Exchange Between Symbionts in Ectomycorrhizas. *Fungal Associations*. Springer.
- NEHLS, U., GOHRINGER, F., WITTULSKY, S. & DIETZ, S. 2010. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology*, 12, 292-301.
- NEHLS, U., WIESE, J., GUTTENBERGER, M. & HAMPP, R. 1998. Carbon allocation in ectomycorrhizas: Identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 167-176.
- NEHLS U., DAS A. & NEB D. 2016. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizal symbiosis. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. . Martin F. ed.: Wiley & Sons.
- NELSON, B. K., CAI, X. & NEBENFUHR, A. 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal*, 51, 1126-1136.
- NEWBERY, D. M., ALEXANDER, I. J., THOMAS, D. W. & GARTLAN, J. S. 1988. Ectomycorrhizal Rain-Forest Legumes and Soil-Phosphorus in Korup-National-Park, Cameroon. *New Phytologist*, 109, 433-450.
- NEWELL, C. A. 2000. Plant transformation technology - Developments and applications. *Molecular Biotechnology*, 16, 53-65.
- NICOLSON, T. Year. Evolution of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *In: Endomycorrhizas; Proceedings of a Symposium*, 1975.
- NIITTYLAE, T., FUGLSANG, A. T., PALMGREN, M. G., FROMMER, W. B. & SCHULZE, W. X. 2007. Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 1711-1726.

- NISHIHARA, M., SHIMODA, T., NAKATSUKA, T. & ARIMURA, G.-I. 2013. Frontiers of torenia research: innovative ornamental traits and study of ecological interaction networks through genetic engineering. *Plant Methods*, 9, 1.
- NORTON, J. M., SMITH, J. L. & FIRESTONE, M. K. 1990. Carbon Flow in the Rhizosphere of Ponderosa Pine-Seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*, 22, 449-455.
- NOWAK, K., LUNIAK, N., MEYER, S., SCHULZE, J., MENDEL, R. R. & HANSCH, R. 2004. Fluorescent proteins in poplar: a useful tool to study promoter function and protein localization. *Plant Biol (Stuttg)*, 6, 65-73.
- OPHEL, K. & KERR, A. 1990. Agrobacterium-Vitis Sp-Nov for Strains of Agrobacterium Biovar-3 from Grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 236-241.
- PALMER, A. G., GAO, R., MARESH, J., ERBIL, W. K. & LYNN, D. G. 2004. Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: Chemical perception and metabolic complementation. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 439-464.
- PARK, S. H., ROSE, S. C., ZAPATA, C., SRIVATANAKUL, M. & SMITH, R. H. 1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34, 117-121.
- PARRENT, J. L. & VILGALYS, R. 2009. Expression of genes involved in symbiotic carbon and nitrogen transport in Pinus taeda mycorrhizal roots exposed to CO<sub>2</sub> enrichment and nitrogen fertilization. *Mycorrhiza*, 19, 469-479.
- PAUWELS, L. & GOOSSENS, A. 2011. The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell*, 23, 3089-3100.
- PENA, L. & SEGUIN, A. 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends in Biotechnology*, 19, 500-506.
- PERALTA, E. G. & REAM, L. W. 1985. T-DNA Border Sequences Required for Crown Gall Tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 5112-5116.
- PLETT, J. M., DAGUERRE, Y., WITTULSKY, S., VAYSSIÈRES, A., DEVEAU, A., MELTON, S. J., KOHLER, A., MORRELL-FALVEY, J. L., BRUN, A. & VENEAL-FOURREY, C. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 8299-8304.
- PORTER, J. R. 1991. Host Range and Implications of Plant Infection by Agrobacterium-Rhizogenes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10, 387-421.
- RAFFAELE, S., VAILLEAU, F., LÉGER, A., JOUBÈS, J., MIERSCH, O., HUARD, C., BLÉE, E., MONGRAND, S., DOMERGUE, F. & ROBY, D. 2008. A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20, 752-767.
- RIVERA, A. L., GOMEZ-LIM, M., FERNANDEZ, F. & LOSKE, A. M. 2012. Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9, 308-345.
- RODIN, L., BAZILEVICH, N. & ROZOV, N. 1975. Productivity of the world's main ecosystems. *Productivity of world ecosystems*, 13-26.
- ROMBAUTS, S., DÉHAIS, P., VAN MONTAGU, M. & ROUZÉ, P. 1999. PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Research*, 27, 295-296.
- ROSSI, L., HOHN, B. & TINLAND, B. 1996. Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of Agrobacterium tumefaciens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 126-130.
- SALZER, P. & HAGER, A. 1993. Characterization of Wall-Bound Invertase Isoforms of Picea-Abies Cells and Regulation by Ectomycorrhizal Fungi. *Physiologia Plantarum*, 88, 52-59.
- SANDELIN, A., ALKEMA, W., ENGSTRÖM, P., WASSERMAN, W. W. & LENHARD, B. 2004. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 32, D91-D94.
- SANDELIN, A., HÖGLUND, A., LENHARD, B. & WASSERMAN, W. W. 2003. Integrated analysis of yeast regulatory sequences for biologically linked clusters of genes. *Functional & Integrative Genomics*, 3, 125-134.



- SANTOS, L. A., DE SOUZA, S. R. & FERNANDES, M. S. 2012. OsDof25 expression alters carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* under high N-supply. *Plant Biotechnology Reports*, 6, 327-337.
- SCHAEFFER, C., WALLEENDA, T., GUTTENBERGER, M. & HAMPP, R. 1995. Acid Invertase in Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Roots of Norway Spruce (*Picea-Abies* [L] Karst) Seedlings. *New Phytologist*, 129, 417-424.
- SCHAEFFER, C., WALLEENDA, T., HAMPP, R., SALZER, P. & HAGER, A. 1997. Carbon allocation in mycorrhizae. *Trees: Contributions to Modern Tree Physiology*.
- SCHMULLING, T., FLADUNG, M., GROSSMANN, K. & SCHELL, J. 1993. Hormonal Content and Sensitivity of Transgenic Tobacco and Potato Plants Expressing Single Rol Genes of *Agrobacterium-Rhizogenes* T-DNA. *Plant Journal*, 3, 371-382.
- SELLE, A., WILLMANN, M., GRUNZE, N., GEßLER, A., WEIß, M. & NEHLS, U. 2005. The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1. 2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 168, 697-706.
- SHAHMURADOV, I. A., SOLOVYEV, V. V. & GAMMERMAN, A. 2005. Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic acids research*, 33, 1069-1076.
- SHIOMI, T., SHIRAKAWA, T., TAKEUCHI, S., OIZUMI, T. & UEMATSU, S. 1987. Hairy root of melon caused by *Agrobacterium rhizogenes* biovar 1. *Annals of the Phytopathological Society of Japan (Japan)*.
- SHURVINTON, C. E., HODGES, L. & REAM, W. 1992. A Nuclear-Localization Signal and the C-Terminal Omega-Sequence in the *Agrobacterium-Tumefaciens* VirD2 Endonuclease Are Important for Tumor-Formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 11837-11841.
- SMALE, S. T. & KADONAGA, J. T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 84, 72, 449-79.
- SMITH, F. A. & SMITH, S. E. 1989. Membrane-Transport at the Biotrophic Interface - an Overview. *Australian Journal of Plant Physiology*, 16, 33-43.
- SMITH, S. & READ, D. 1997. Mycorrhizal symbiosis 2nd edn. *Academic, San Diego*.
- SMITH, S. & READ, D. 2008. Mycorrhizal symbiosis. UK. London: Academic Press.
- SONG, S., QI, T., HUANG, H., REN, Q., WU, D., CHANG, C., PENG, W., LIU, Y., PENG, J. & XIE, D. 2011. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 1000-1013.
- STACHEL, S. E. & NESTER, E. W. 1986. The Genetic and Transcriptional Organization of the Vir Region of the A6-Ti Plasmid of *Agrobacterium-Tumefaciens*. *Embo Journal*, 5, 1445-1454.
- STORMO, G. D. 2000. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics*, 16, 16-23.
- STREB, S. & ZEEMAN, S. C. 2012. Starch metabolism in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, e0160.
- TEPFER, D. 1984. Transformation of Several Species of Higher-Plants by *Agrobacterium-Rhizogenes* - Sexual Transmission of the Transformed Genotype and Phenotype. *Cell*, 37, 959-967.
- THINES, B., KATSIR, L., MELOTTO, M., NIU, Y., MANDAOKAR, A., LIU, G., NOMURA, K., HE, S. Y., HOWE, G. A. & BROWSE, J. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448, 661-665.
- THOMAS, C. M. & SMITH, C. A. 1987. Incompatibility Group-P Plasmids - Genetics, Evolution, and Use in Genetic Manipulation. *Annual Review of Microbiology*, 41, 77-101.
- TROVATO, M. & LINHARES, F. 1999. Recent advances on rol genes research: a tool to study plant differentiation. *Curr Top Plant Biol*, 1, 51-62.
- TUOMINEN, H., SITBON, F., JACOBSSON, C., SANDBERG, G., OLSSON, O. & SUNDBERG, B. 1995. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiology*, 109, 1179-1189.
- TUSKAN, G. A., DIFAZIO, S., JANSSON, S., BOHLMANN, J., GRIGORIEV, I., HELLSTEN, U., PUTNAM, N., RALPH, S., ROMBAUTS, S., SALAMOV, A., SCHEIN, J., STERCK, L., AERTS, A., BHALERAO, R. R., BHALERAO, R. P., BLAUDEZ, D., BOERJAN, W., BRUN, A., BRUNNER, A., BUSOV, V., CAMPBELL, M., CARLSON, J., CHALOT, M.,

- CHAPMAN, J., CHEN, G. L., COOPER, D., COUTINHO, P. M., COUTURIER, J., COVERT, S., CRONK, Q., CUNNINGHAM, R., DAVIS, J., DEGROEVE, S., DEJARDIN, A., DEPAMPHILIS, C., DETTER, J., DIRKS, B., DUBCHAK, I., DUPLESSIS, S., EHLING, J., ELLIS, B., GENDLER, K., GOODSTEIN, D., GRIBSKOV, M., GRIMWOOD, J., GROOVER, A., GUNTER, L., HAMBERGER, B., HEINZE, B., HELARIUTTA, Y., HENRISSAT, B., HOLLIGAN, D., HOLT, R., HUANG, W., ISLAM-FARIDI, N., JONES, S., JONES-RHOADES, M., JORGENSEN, R., JOSHI, C., KANGASJARVI, J., KARLSSON, J., KELLEHER, C., KIRKPATRICK, R., KIRST, M., KOHLER, A., KALLURI, U., LARIMER, F., LEEBENS-MACK, J., LEPLE, J. C., LOCASCIO, P., LOU, Y., LUCAS, S., MARTIN, F., MONTANINI, B., NAPOLI, C., NELSON, D. R., NELSON, C., NIEMINEN, K., NILSSON, O., PEREDA, V., PETER, G., PHILIPPE, R., PILATE, G., POLIAKOV, A., RAZUMOVSKAYA, J., RICHARDSON, P., RINALDI, C., RITLAND, K., ROUZE, P., RYABOY, D., SCHMUTZ, J., SCHRADER, J., SEGERMAN, B., SHIN, H., SIDDIQUI, A., STERKY, F., TERRY, A., TSAI, C. J., UBERBACHER, E., UNNEBERG, P., et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313, 1596-1604.
- VAN LAREBEKE, N., ENGLER, G., HOLSTERS, M., VAN DEN ELSACKER, S., ZAENEN, I., SCHILPEROORT, R. A. & SCHELL, J. 1974. Large Plasmid in *Agrobacterium-Tumefaciens* Essential for Crown Gall-Inducing Ability. *Nature*, 252, 169-170.
- VAYSSIERES, A., PENCIK, A., FELTEN, J., KOHLER, A., LJUNG, K., MARTIN, F. & LEGUE, V. 2015. Development of the Poplar-Laccaria bicolor Ectomycorrhiza Modifies Root Auxin Metabolism, Signaling, and Response. *Plant Physiology*, 169, 890-+.
- VEENA, V. & TAYLOR, C. G. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 383-403.
- VERGUNST, A. C., SCHRAMMEIJER, B., DEN DULK-RAS, A., DE VLAAM, C. M. T., REGENSBURG-TUINK, T. J. G. & HOOYKAAS, P. J. J. 2000. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, 290, 979-982.
- WASSERMAN, W. W. & SANDELIN, A. 2004. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*, 5, 276-287.
- WHITE, F. F., TAYLOR, B. H., HUFFMAN, G. A., GORDON, M. P. & NESTER, E. W. 1985. Molecular and Genetic-Analysis of the Transferred DNA Regions of the Root-Inducing Plasmid of *Agrobacterium-Rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 164, 33-44.
- WILLMANN, A., THOMFOHRDE, S., HAENSCH, R. & NEHLS, U. 2014. The poplar NRT2 gene family of high affinity nitrate importers: Impact of nitrogen nutrition and ectomycorrhiza formation. *Environmental and Experimental Botany*, 108, 79-88.
- WOLANIN, P. M., THOMASON, P. A. & STOCK, J. B. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3.
- WOOD, D. W., SETUBAL, J. C., KAUL, R., MONKS, D. E., KITAJIMA, J. P., OKURA, V. K., ZHOU, Y., CHEN, L., WOOD, G. E. & ALMEIDA, N. F. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2317-2323.
- XUAN, Y. H., HU, Y. B., CHEN, L. Q., SOSSO, D., DUCAT, D. C., HOU, B. H. & FROMMER, W. B. 2013. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E3685-E3694.
- YADAV, N. S., VANDERLEYDEN, J., BENNETT, D. R., BARNES, W. M. & CHILTON, M. D. 1982. Short Direct Repeats Flank the T-DNA on a Nopaline Ti Plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 79, 6322-6326.
- YANG, B., SUGIO, A. & WHITE, F. F. 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 10503-10508.
- ZHOU, Y. C., QU, H. X., DIBLEY, K. E., OFFLER, C. E. & PATRICK, J. W. 2007. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *Plant Journal*, 49, 750-764.

- ZIMMERMAN, M. 1961. Movement of Organic Substances in Trees - Photosynthates Are Translocated in a Layer of Bark Only a Fraction of a Millimeter Thick. *Science*, 133, 73-&.
- ZUO, Y. C. & LI, Q. Z. 2011. Identification of TATA and TATA-less promoters in plant genomes by integrating diversity measure, GC-Skew and DNA geometric flexibility. *Genomics*, 97, 112-20.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

μ	Micro
35S-Promotor	Promotor des <i>Cauliflower mosaic virus</i>
Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhizen
APG	angiosperm phylogeny group
ATP	Adenosinmonophosphat
AtpGlcI	Plastidic glucose transporter
biT-DNA	Binäre T-DNA (lokalisiert in einem Binärvektor)
bp	Basenpaar
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	Copy DNA
cLSM	confocal laser scanning microscope
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CPY	<i>Agrobacterium</i> spezifisches Wachstumsmedium
CTAB	Cetytrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	double distilled water
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunocleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
DPE	downstream promoter element
DPSS	Diode pumped solid state
ECM	Ektomykorrhiza
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEM	Ektendomykorrhiza
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERD6-like	Early Response to dehydration-like
ERM	Ericoide Mykorrhiza
et al.	<i>Et alia</i> (und Andere)
for	Forward
FP	Fluoreszierendes Protein
g	Erdbeschleunigung (ca. 9.81 m/s <sup>2</sup> )
gDNA	Genomische DNA
GFP	Green fluorescent protein
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Inr	Transkriptions Initiations Region
K	Kilo
Kan	Kanamycin

kb	Kilo Base
l	Liter
LB	Lysogeny broth
LIC	Ligase independent cloning
m	Milli
M	Molar
MCS	Multiple cloning site
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
min	Minute
MMN	Modified Melin Norkrans Medium
mRNA	Messenger RNA
MS	Murashige-Skoog Medium
MST	Monosacharidtransporter
n	Nano
NEB	New England Biolabs
NLS	Nuclear Localization Signal
<i>nptII</i>	Kanamycin Resistenzgen
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
Ori	Origine of replication
ORM	Orchideenmykorrhiza
p	Plasmid
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMT	Photomultiplier
Prä-mRNA	Ungesplicte RNA
PSM	positionsspezifische Scoringmatrizen
Pt	<i>Populus trichocarpa</i>
PTS1	Peroxisomales targeting Signal 1 (peroxisomal targeting signal)
Ptt	<i>Populus tremula x tremuloides</i>
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
rev	Reverse
RFP	Rot fluoreszierendes Protein (red fluorescent protein)
Ri Plasmid	Root inducing plasmid
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklease
rol	Root oncogenic locus
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SemiSWEET	Bakterielle Vorstufe der SWEET-Gene

ssDNA	Einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
STP	Sugar Transporter
Super-T-Komplex	Komplex aus T-DNA, bakteriellen sowie pflanzlichen Proteinen
SUT	Sucrose transporter
SWEET	SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTER
sYFP	Super yellow fluorescent protein
sYFPNLS	sYFP mit einem Kernlokalisierungssignal
sYFPPTS1	sYFP mit einem peroxisomalen targeting Signal 1
T4	Bakteriophage T4
T89	<i>Populus tremula x tremuloides</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
TAL	transcriptional activator-like
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Box binding protein
T-DNA	Transfer DNA
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestellen
Ti-Plasmid	Tumor inducing plasmid
TiT-DNA	T-DNA des Ti-Plasmids
T-Komplex	Komplex aus T-DNA sowie T-DNA bindenden Proteinen
T <sub>L</sub> -DNA	Linke T-DNA eines Agropin Ri-Plasmids
TMT	Tonoplast monosaccharide transporter
T <sub>R</sub> -DNA	Rechte T-DNA eines Agropin Ri-Plasmids
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
u	Unit
UPE	upstream promoter element
UTR	Untranslatierter Bereich (untranslated region)
UV	Ultra violett
v/v	volume per volume
VGT	vacuolar glucose transporter
<i>vir</i>	Virulenz Gene ( <i>Agrobacterium</i> )
w/v	Weight per volume
YFP	Yellow fluorescent protein
YFPPTS1	YFP mit einem PTS1



## 10 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von 2012-2017 im Fachbereich 2 der Universität Bremen angefertigt. An dieser Stelle meiner Dissertation möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Nehls für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Insbesondere möchte ich mich dafür bedanken, dass ich im Laufe meiner Promotion die Möglichkeit erhalten habe, meine Forschungsergebnisse auf unterschiedlichen internationalen Tagungen präsentieren zu können. Ebenso bedanke ich mich für die interessanten Diskussionen, die wir im Laufe meiner Promotion geführt haben und die motivierenden Worte in Zeiten, in denen Nichts so lief wie geplant.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Prof. Dr. Barbara Reinhold-Hurek für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ich danke auch Frau Prof. Dr. Koenig, Herrn Prof. Dr. Hänsch, Frau Hintelmann und Frau Harter als weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen gegenwärtigen sowie ehemaligen Mitgliedern der AG Nehls für die angenehme Arbeitsatmosphäre, in der ich mich immer wohl gefühlt habe. Ich danke Annette Hintelmann für ihre Hilfe im Laboralltag und die Durchführung meiner qRT-PCR Untersuchungen. Ich danke Thea Fründ für ihre offene Art und ihren Rat in unterschiedlichsten Situationen. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Mandy Hammermeister, durch die ich mich sehr schnell und einfach in die Gruppe integrieren konnte. Ich bedanke mich bei Mandy auch für ihre Mitarbeit bei der Entwicklung der Komposit-Pappeln. Ein besonderer Dank gilt auch Jenny Krützmann, die mich mehrere Jahre souverän ertragen hat und mich durch ihren schwarzen Humor und einige harte Worte wieder zurück auf den Boden geholt hat, wenn ich mal wieder abgehoben bin. Ich danke auch Arpita Das für ihre freundliche und humorvolle Art, die den Laboralltag immer aufheiterte. Ebenso möchte ich mich bei Anneke und Maria für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Ich danke meiner Familie dafür, dass sie mich immer in meinem Vorhaben unterstützten und an mich geglaubt haben, vor allem in Zeiten, in denen ich selbst schon aufgegeben hatte.

Я также благодарю свою подругу Машу за то время, которое мы провели вместе и за её поддержку в тяжёлых временах.

## 11 Erklärung

**Name:** Dimitri Neb

Bremen den

**Anschrift:** Kulenkampffalle 93, 28213 Bremen

Hiermit versichere ich, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel:

**Bedeutung von *SWEET*-Genen für den pflanzlichen Zuckerexport in einer Ektomykorrhizasymbiose**

selbstständig verfasst und geschrieben habe und außer den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Ebenfalls erkläre ich hiermit, dass es sich bei den von mir abgegebenen Arbeiten um drei identische Exemplare handelt.

\_\_\_\_\_ Bremen,

## 12 Lebenslauf

### Angaben zur Person:

**Geburtsdatum:** 07.08.1986  
**Geburtsort:** Astrachanka (Kasachstan)  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### Berufserfahrung:

**2012-2017** **Universität Bremen Institut für Botanik**  
Wissenschaftliche Mitarbeiter / PhD  
**Promotionsthema:** „Bedeutung von *SWEET*-Genen für den pflanzlichen Zuckerexport in einer Ektomykorrhizasymbiose“

### Master of science:

**2009-2011** **Technische Universität Braunschweig**  
Studium der Biologie  
**Schwerpunkt:** Biochemie / Zellbiologie  
**Thema der Abschlussarbeit:** “Analyse der transkriptionellen Regulation der pflanzlichen Sulfitoxidase durch 5‘-Promotor Deletionsstudien in *Arabidopsis thaliana* und Identifikation von möglichen Transkriptionsfaktoren“  
**Parallel Berufspraxis zur Studienfinanzierung:**  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik (TU-Braunschweig)

### Bachelor of science:

**2006-2009** **Technische Universität Braunschweig**  
Studium der Biologie  
**Thema der Abschlussarbeit:** „Postranslationale Modifikation der pflanzlichen Sulfitoxidase durch SUMO  
**Parallel Berufspraxis zur Studienfinanzierung:**  
Pharmaziegroßhandel Kehr, Braunschweig

## 12.1 Publikationsliste

### Buchbeiträge:

Nehls U., Das A., Neb D. (2016): **Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizal symbiosis**. In Molecular Mycorrhizal Symbiosis. Martin F. ed.: Wiley & Sons (in press).

### Beiträge in referierten Zeitschriften:

Neb D., Nintemann S., Krützmann J., Hintelmann A., Kohler A., Martin F., Nehls U. (2016): **Ectomycorrhiza-dependent induction of glucose facilitator (*SWEET*) gene expression in poplar roots**. (in preparation)

Neb D., Das A., Hintelmann A., Nehls U. (2016): **Composite poplar plants for investigation of ectomycorrhiza formation and function**. (in preparation)

Schmidt, H., Strauß, A., Reeve, E., Letz, A., Ludewig, A.-K., Neb, D., Pluschzick, R., Randrianiaina, R.-D., Reckwell, D., and Schröder, S. (2008). **Descriptions of the remarkable tadpoles of three treefrog species, genus *Boophis*, from Madagascar**. *Herpetology Notes* 1, 49-57.

### Tagungsbeiträge:

#### Vorträge:

Neb D., Grams M., Hintelmann A., Nehls U. (2015): ***Agrobacterium rhizogenes*-induced composite plants: A tool to investigate ectomycorrhizal symbiosis**. Ecosystem Nutrition 2015.

Neb D., Nehls U. (2014): **Composite plants, a tool to identify cis-elements responsible for ectomycorrhiza specific gene expression**. "Signaling at the Plant-Soil Interface" 1<sup>st</sup> Doctoral Researcher's Conference

#### Poster-Präsentationen:

Neb D., Nehls U. (2015): **Komposit-Pflanzen: Eine schnelle Methode zur Erzeugung transgener Pappelwurzeln zur Analyse der Ektomykorrhizasymbiose**. Workshop der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie in Einbeck (KWS).

Neb D., Tegler M., Nehls U. (2014): **Composite poplar plants: a tool to analyze ectomycorrhiza induced gene expression**. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen (2014).

Neb D., Tegler M., Hintelmann A., Nehls U. (2013): ***Agrobacterium rhizogenes*-induced composite plants: A tool to investigate ectomycorrhizal symbiosis**. Botanikertagung der DBG (Tübingen 2013).

## 13 Anhang

### 13.1 Technisches Equipment

#### Spektrometer:

Nano Drop™ DN1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany)

#### Zelldichtemessgerät:

Miochrom WPA CO8000 (Biochrom Ltd., Cambridge, United Kingdom)

#### Thermoschüttler:

Eppendorf Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

#### Zentrifugen:

Eppendorf Zentrifuge 5804R mit den folgenden verwendeten Rotoren: A-2-DWP und F-34-6-38 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Eppendorf Zentrifuge 5417R mit dem folgenden verwendeten Rotor: F 45-30-11 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Heraeus Megafuge 1.0R mit dem folgenden verwendeten Rotor: 2705 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

#### PCR-Thermocycler:

Peqlab primus 25 advanced (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany)

Biometra TGradient Thermoblock (Biometra GmbH, Göttingen, Germany)

Bio-rad MyiQ™ Real-Time PCR machine (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany)

Roche LightCycler® 480II Real-Time PCR System (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Germany)

#### Inkubatoren:

Certomat® H, type 886342/3 mit folgendem Schüttler Certomat® R 886302/4 (B.Braun Biotech International GmbH, Mesungen, Germany)

**Sterilwerkbänke:**

Scanlaf Clean Bench Fortuna 1500 (Labogene APS, Lynge, Dänemark)

Clean Air CA/RS4 (Clean Air Supplies Deutschland GmbH, Haan, Germany)

**Gel Dokumentationsanlage:**

UV desk 312 nm (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) kombiniert mit der Doc Print II (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) Kamera.

**Technisches Equipment zur mikroskopischen Analyse:****Binokular:**

Mz10F (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) kombiniert mit einer externen Lichtquelle LEj LQ-HXP 120 (Leistungselektronik JENA GmbH, Jena, Germany) und einer Leica DFC425C (Leica Microsystems) Kamera.

**Stereomikroskop:**

Leica DMRB Mikroskops (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) kombiniert mit einer externen Lichtquelle LEj LQ-HXP 120 (Leistungselektronik JENA GmbH, Jena, Germany) und einer Leica DFC425C (Leica Microsystems) Kamera.

**Konfokale Mikroskopie:**

LSM 780 / ELYRA PS.1 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany)

**Vibratom:**

VT1000S (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

**Gefriertrocknung:** Vakuumpumpe RZ5 mit einem Vacuu-Bas DCP3000 Vakuum-Messgerät (Vacuubrand GmbH + Co., Wertheim, Germany) angeschlossen an eine Kältefalle KF-2-60 (Bachofer GmbH, Reutlingen, Germany).



### 13.2 Kits

**Tabelle 14: Eingesetzte Kits.**

Name	Funktion	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Elution von, mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennter Nukleinsäuren	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG , Düren, Germany
NucleoSpin® RNA Plant	Isolierung von gesamt RNA	
ABsolute™ QPCR SYBR® Green reaction mixture	qRT-PCR Reaktionsgemisch	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Germany
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Klonierung von blunt end DNA-Fragmenten	
ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung von DNA	Invitrogen, Groningen, The Netherlands

### 13.3 Enzyme

**Tabelle 15: Eingesetzte Enzyme.**

Enzyme	Funktion	Hersteller
RNase	Degradation von RNA	CARL, ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FastAP	Dephosphorylierung DNA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Phusion	Amplifikation von Nukleinsäuren	
Diverse Restriktionsenzyme	Hydrolyse von DNA	
OneTaq	Amplifikation von Nukleinsäuren	New England Biolabs (NEB) GmbH, Frankfurt, Deutschland
Taq	Amplifikation von Nukleinsäuren	
Diverse Restriktionsenzyme	Hydrolyse von DNA	

### 13.4 Chemikalienliste

2-Merkaptoethanol	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karsruhe, Germany
Acetosyringon	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Agar	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelber, Germany
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelber, Germany
Ampicilin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Carbenicillin Disodium	DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Netherlands
Cefotaxim Natriumsalz	DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Netherlands
Chloroform	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
CTAB	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
DEPC	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
D-Glukose	DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Netherlands
DMSO	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
dNTP	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ethanol	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethidiumbromid	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Glycerol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelber, Germany
H <sub>3</sub> BO	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
HCl	Acros Organics N.V, Geel, Belgium
Hefeextrakt	Chemie Brunschwig AG, Basel, Swizerland
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Kanamycin Sulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelber, Germany
KCl	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
KOH	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
MES	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
MS Salze	DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Netherlands
Myo-Inositol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
NaCl	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Nicotinsäure	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany
PEG	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Pepton	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Phenol	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Primer	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Germany
Pyridoxinhydrochlorid	DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Netherlands
RNase	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Saccharose	Acros Organics N.V, Geel, Belgium
SDS	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Thiaminhydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

### 13.5 Primer

**Tabelle 16: Sequenzen der Primer, die für die Amplifikation des sYFPPTS1 verwendet wurden.**

Der reverse Primer enthält einen Überhang, durch den das Stop-Kodon des sYFP verschoben und das PTS1 (SNL, Serin, Asparagin, Leucin) angefügt werden sollte.

Primer Name	Annealing Temp. [°C]	Sequenz
sYFPforBamHI	60	GGATCCCATGACTAGTAAGG
sYFPprevPTS1Bam	60	GGATCCTTAGAGGTTTGACTTGTACAGCTCGTCCATGC

**Tabelle 17: Sequenzen der Primer, die zur Amplifikation des regulierenden Bereiches des Gens *PtSWEET 1.c*, aus der genomischen DNA von *P. trichocarpa*, verwendet wurden.**

Primer Name	Annealing Temp. [°C]	Sequenz
Pt2s07360prFOR1	56	GTGGAGTTTTCGCTACATCAC
Pt2s07360prREV1	56	CTTCTTATGATCCTCCTGAACG

**Tabelle 18: Sequenzen der LIC-Primer, die zur Amplifikation der unterschiedlich langen Promotorfragmente eingesetzt wurden.**

Durch die Verwendung des gleichen rückwärts Primers und unterschiedlicher vorwärts Primer, wurde der Promotor vom 5'-Ende aus verkürzt. Alle Primer-Paare wurden bei einer Annealing Temperatur von 62°C eingesetzt. Gezeigt sind die verwendeten Primer mit den entsprechenden Sequenzen und dem Promotorfragment zu dessen Amplifikation sie eingesetzt wurden.

Primer Name	Promotorfragment	Sequenz
07360 Pr LIC FOR	<b>Rückwärts Primer</b>	TAGTTGGAATGGGTTTCGAAGTGGAGTTGCGCTACATCA
FOR 07360VK 568	<b>568 bp</b>	TAGTTGGAATGGGTTTCGAAGATTATGGCAGTCGGGATGA
FOR-LIC-07360-400bp	<b>400 bp</b>	TAGTTGGAATGGGTTTCGAAGGAGATCGCGCATTTC
FOR 07360VK 368	<b>368 bp</b>	TAGTTGGAATGGGTTTCGAATTTGCCTTCAAGAGACAGTC
FOR-LIC-07360-200bp	<b>200 bp</b>	TAGTTGGAATGGGTTTCGAAGTAACAGGAAATGCCACTGC
07360 Pr VK LIC REV	<b>1368 bp</b>	TTATGGAGTTGGGTTTCGAACGTCTCTTACTGACCGGGAAA

**Tabelle 19: Sequenzen der Primer, die zur Klonierung des 35S-Promotors in den pBI121-LIC-sYFP verwendet wurden.** Die Überhänge der Primer kodieren für die jeweilige Restriktionsstelle, die später zur Ligation in den finalen Vektor verwendet wurde.

Primer Name	Sequenz
35S-For- <i>XhoI</i>	CTCGAGAGATTAGCCTTTTCAATTTTCAGAAA
35S-Rev- <i>EcoRI</i>	GAATTCGGTGTCTCTCTCAAATGAAATGAAC

**Tabelle 20: Sequenzen der zur Klonierung der *SWEET*-Lokalisierungsstrukture verwendeten LIC-Primer.**

Die Primer wurden so entworfen, dass das Stop-Kodon des jeweiligen Proteins, bei der Amplifikation des kodierenden Bereichs, entfernt wurde (die LIC-Adapter sind fett markiert, entworfen nach (De Rybel et al., 2011)). Alle LIC-Primer wurden bei einer Annealing Temperatur von 65°C eingesetzt. Gezeigt sind die Primernamen, das Gen zu dessen Amplifikation die jeweiligen Primer verwendet wurden sowie ihre Sequenz.

Primer Name	Amplifiziertes Gen	Zur Amplifikation verwendete Primer
Pt2s07350Lic FOR	<i>PtSWEET_1.b</i>	TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAAGATGGAGATCGCGCATTTC</b> TA
Pt2s07350Lic REV		TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACTTACACCTTATCAGCAACATG</b>
Pt2s07360Lic FOR	<i>PtSWEET_1.c</i>	TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAAGATGGAGATCGCGCATTTC</b> TA
Pt2s07360Lic REV		TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACTTACACCTTATCAGCAACATG</b>
Pt2s13410Lic FOR	<i>PtSWEET15.b</i>	TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAAGATGGAGGAATTAGTTCAGATG</b>
Pt2s13410Lic REV		TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACTCAAACCTGCACATTCATTG</b> A
Pt2s36550Lic FOR	<i>PtSWEET02.a</i>	TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAAGATGCCTTTTGTAAACGCCTGGA</b>
Pt2s36550Lic REV		TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACTCATGCATATGAAGCTAGCAA</b>

**Tabelle 21: Primer zur Amplifikation des *PttSWEET1.b* Promotors und LIC-Primer zur Integration des 1970 bp Promotorfragments in den pCXUN-YFP-NLS**

Primer Name	Sequenz
PttSWEETPrFor-2	GGTTTCAGGTCGAGTTTGGCGATC
PttSWEETPrRev0	CAATCCTCGAAACCTTATCTAAACC
Promoter t x t LIC-FOR	TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAAGTTTCAGGTCGAGTTTGG</b>
Promoter t x t LIC-REV3	TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACGAAACCTTATCTAAACCTAACAGTTGT</b>

**Tabelle 22: Sequenzen der zur Klonierung der *PtMST*-Lokalisierungsstrukture verwendeten LIC-Primer.**

Gezeigt sind die Primernamen, das Gen zu dessen Amplifikation die jeweiligen Primer verwendet wurden sowie ihre Sequenz.

Primer Name	Amplifiziertes Gen	Sequenz
REV-LIC-Mst18*	<i>PtMST18</i>	TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACCAACTGGGAAGCAGGATCAA</b>
FOR-LIC-Mst18		TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAACATGCCTGTTCGGAGGGTTAG</b>
REV-LIC-Mst16*	<i>PtMST16</i>	TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACCATCTGGGAGGCAGGATC</b>
FOR-LIC-Mst16		TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAACATGGCTCGAGTTTTTCAGC</b>
REV-LIC-Mst8*	<i>PtMST8</i>	TTATGGAGTTGGGTT <b>CGAACACATTCTTCGGACCTTGC</b>
FOR-LIC-Mst8		TAGTTGGAATGGGTT <b>CGAACATGCCTGCAGTAGGGATAGC</b>

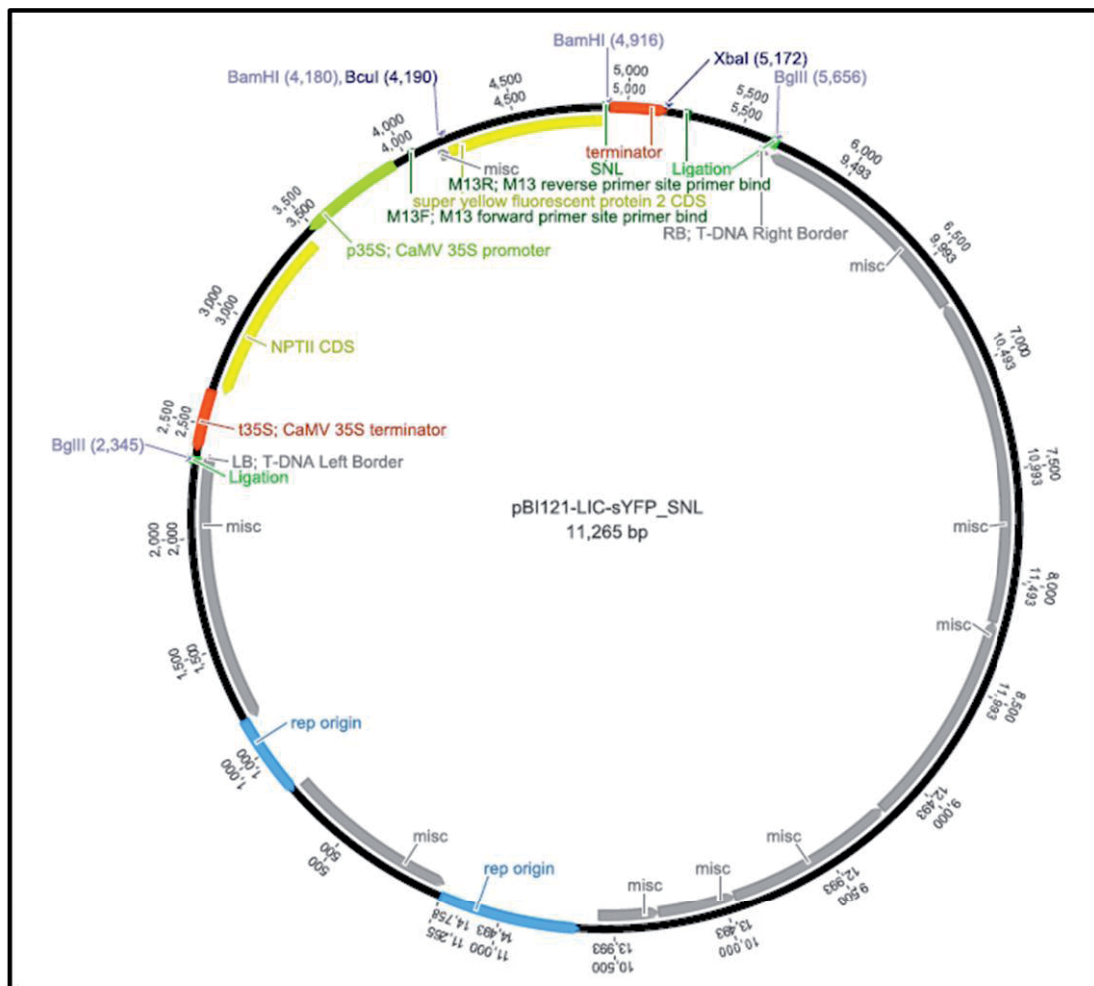
**Tabelle 23: Die in dieser Arbeit zur qRT-PCR genutzten Primer.**

Gezeigt werde die Namen der jeweiligen Primerpaare, sowie ihre Sequenz, Annealingtemperatur und Kamertemperatur, die zur qRT-PCR eingesetzt wurden (von links).

<b>Primernamen</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Annealing [°C]</b>	<b>Kamera [°C]</b>
PtSweetuni4PttFo	TTCTTCAAGGCAAATCCAGGGAGA	60	81
PtSweetuni4PttRe	GCGATACCCATCTGCATTGATTTAAC		
NTP2_REV	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG	58	85
NTP2_FOR	GGACATAGCGTTGGCTACC		
YFP-FOR	CCCGACAACCACTACCTG	58	85
YFP-REV	CTTGTACAGCTCGTCCATGC		
UBQ-rev	GATCTTGGCCTTCACGTTGT	60	81
UBQ-for	GTTGATTTTTGCTGGGAAGC		

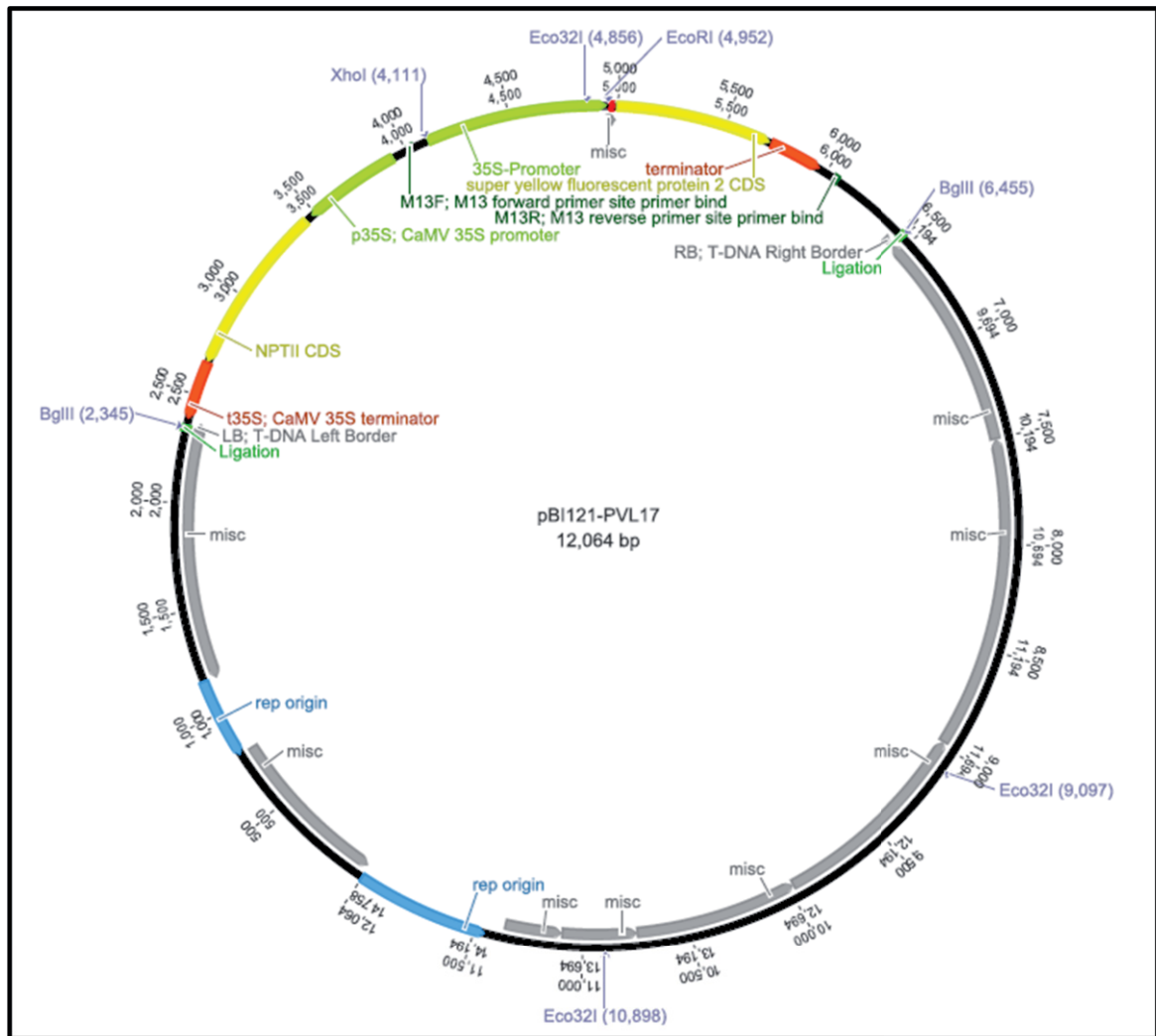


## 13.6 Vektorkarten



**Abbildung 42: Vektorkarte des pBI121-LIC-sYFP\_SNL.**

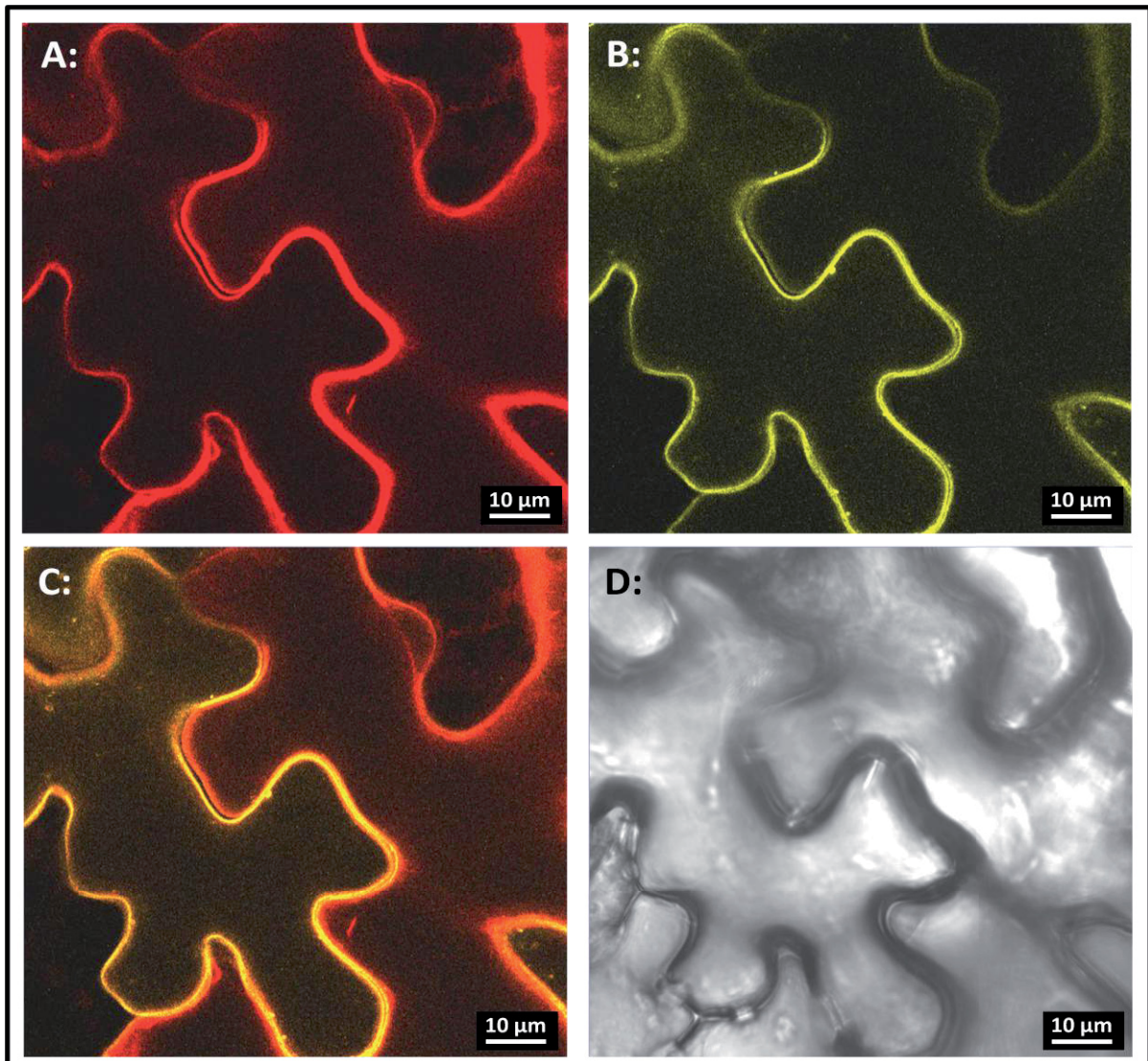
Gezeigt sind die funktionellen Elemente der pBI121-LIC-sYFP\_SNL T-DNA sowie alle für diese Arbeit relevanten Restriktionsschnittstellen: CaMV 35S Terminator (t35S), Neomycin Phosphotransferase (NPTII), 35S-Promotor, Bindestellen der M13 vorwärts (M13F) und rückwärts (M13R) Primer, die kodierende Sequenz des sYFP, das peroxisomale Lokalisierungssignal des sYFP (SNL) sowie die left- (LB) und right-border (RB) des Vektors. Die LIC-Sequenz, die zur Klonierung von Promotorfragmenten verwendet wurde, wird am 5'-Ende des sYFP\_SNL dargestellt (misc).



**Abbildung 43: Vektorkarte des pBI121-35S-LICsYFP.**

Gezeigt sind die funktionellen Elemente der pBI121-35S-LICsYFP T-DNA sowie alle für diese Arbeit relevanten Restriktionsschnittstellen: CaMV 35S terminator (t35S), Neonmycin Phosphotransferase (NPTII), 35S-Promotor, ein doppelter 35S-Promotor mit Enhancer (35S-Promotor), Bindestellen der M13 vorwärts (M13F) und rückwärts (M13R) Primer, die kodierende Sequenz des sYFP (super fluorescent protein 2 CDS) sowie die left- (LB) und right-border (RB) des Vektors. Die LIC-Sequenz, die zur Klonierung von Promotorfragmenten verwendet wurde, wird am 5'-Ende des sYFP dargestellt (misc).

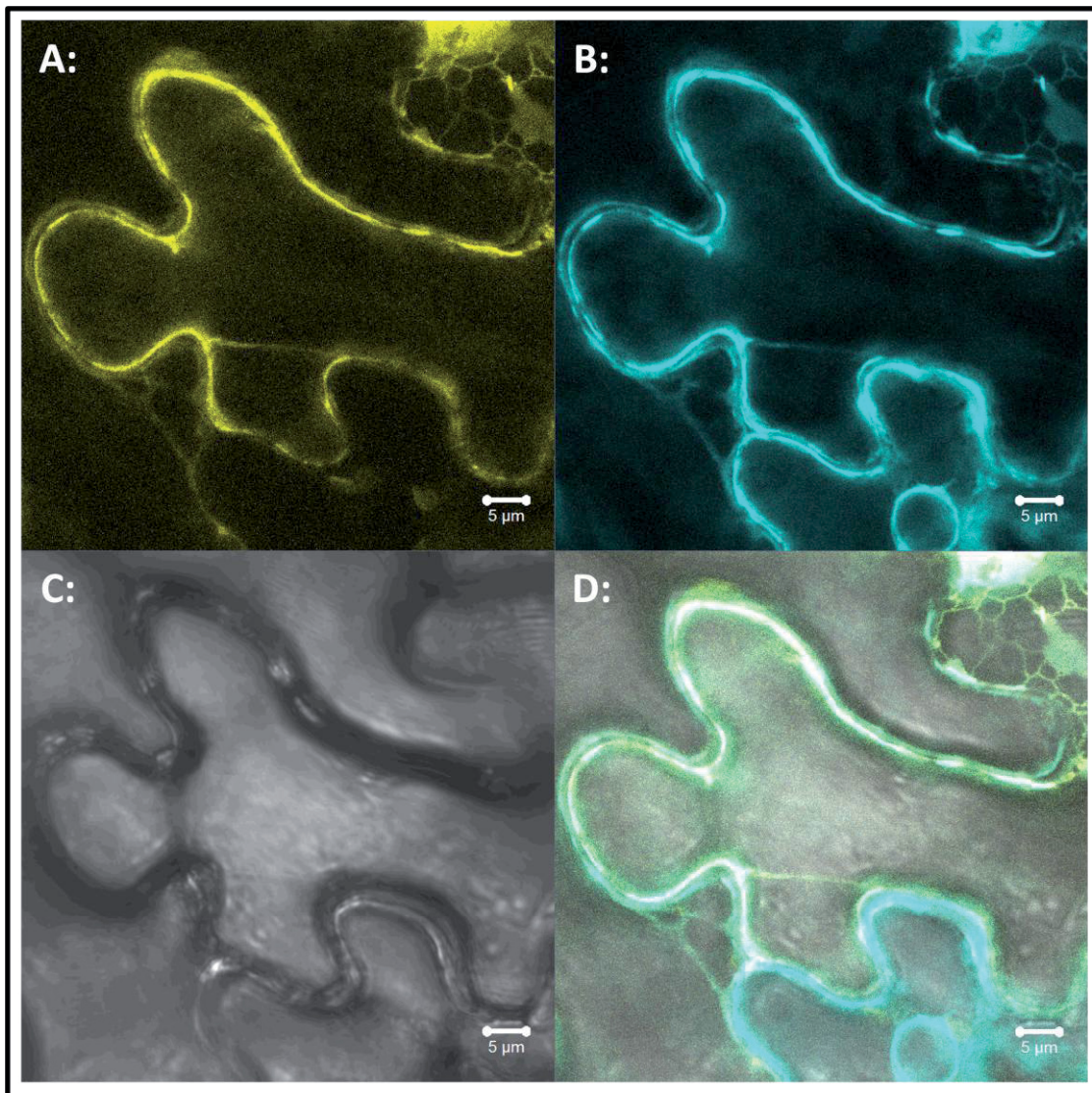
### 13.7 Aufnahmen der Lokalisierungsstudien in *Nicotiana benthamiana*



**Abbildung 44: Co-Lokalisation von PtSWEET\_1.c-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.**

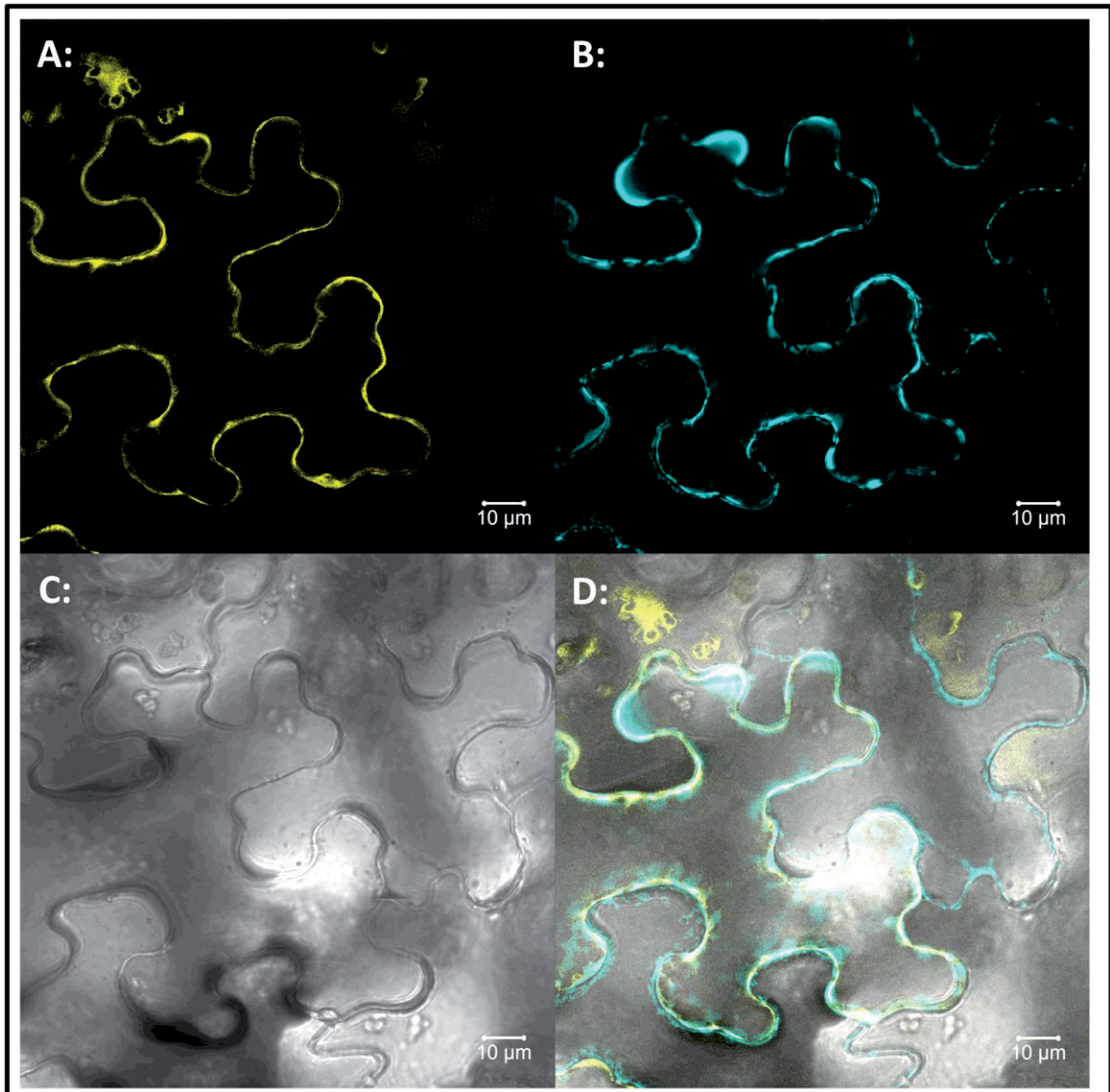
Ein C-terminales PtSWEET\_1.c-YFP Fusionskonstrukt wurde zusammen mit einem Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukt (Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt) (Nelson et al., 2007) mittels Agrobakterien basierter Transformation transient in Tabak Blatt-Epidermiszellen exprimiert. Die infiltrierten Blätter wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mittels cLSM analysiert. Dargestellt ist der YFP-Kanal (Anregung bei 514 nm 3,7% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 520-550 nm) in A, in B der RFP-Kanal (Detektion der Fluoreszenz bei 633-686 nm), in C eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale sowie in D ein Durchlichtbild.





**Abbildung 45: Co-Lokalisation von PtSWEET02.a-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.**

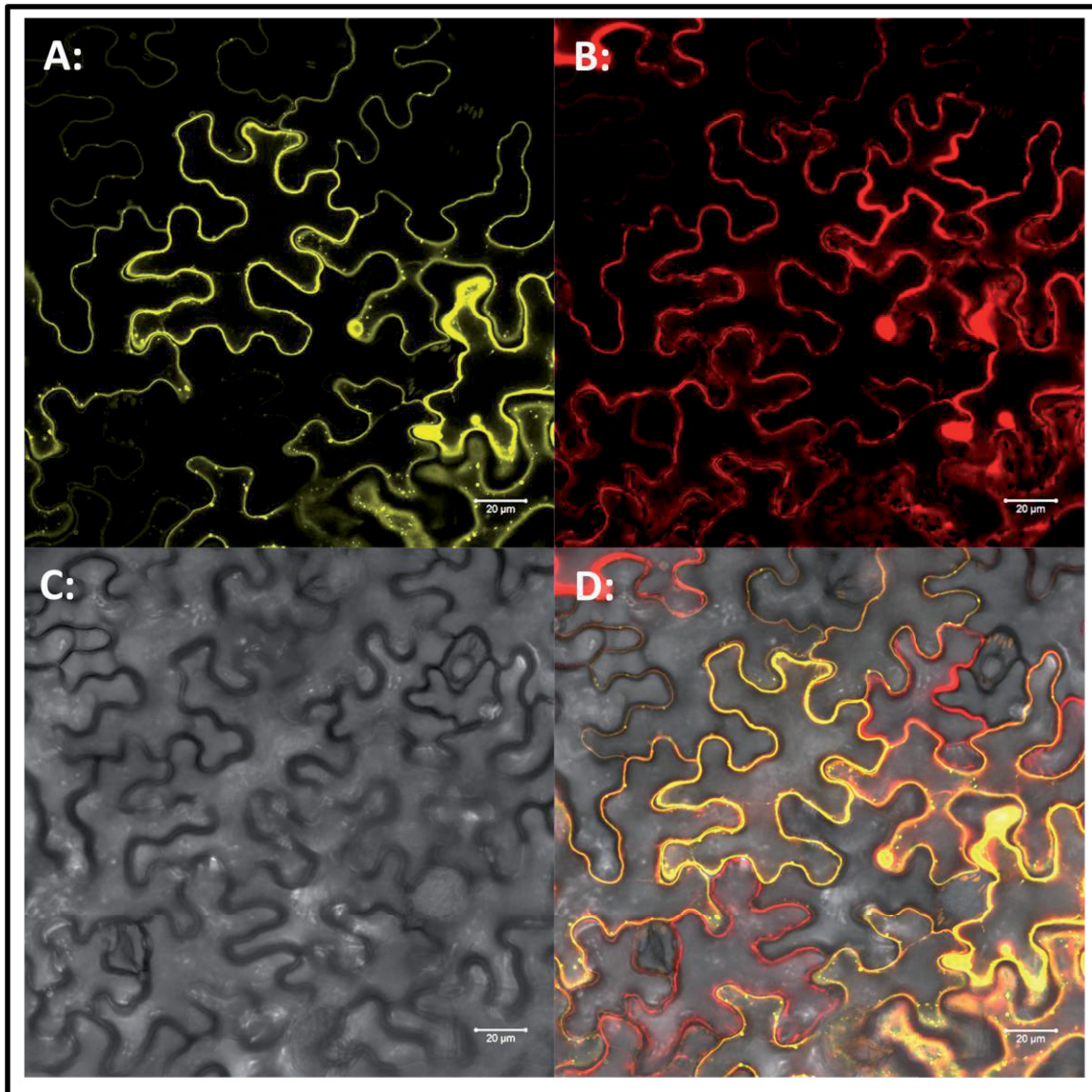
Ein C-terminales PtSWEET02.a-YFP Fusionskonstrukt wurde zusammen mit einem Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukt (Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt) (Nelson et al., 2007) mittels Agrobakterien basierter Transformation transient in Tabak Blatt-Epidermiszellen exprimiert. Die infiltrierten Blätter wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mittels cLSM analysiert. Dargestellt ist der YFP-Kanal (Anregung bei 488 nm 16% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 508-552 nm) in A, in B der RFP-Kanal (Anregung bei 561 nm 10% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 585-664 nm; dargestellt in Falschfarben: Cyan), in C ein Durchlichtbild sowie in D eine Überlagerung aller Kanäle.



**Abbildung 46: Co-Lokalisation von PtSWEET15.b-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.**

Ein C-terminales PtSWEET15.b-YFP Fusionskonstrukt wurde zusammen mit einem Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukt (Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt) (Nelson et al., 2007) mittels Agrobakterien basierter Transformation transient in Tabak Blatt-Epidermiszellen exprimiert. Die infiltrierten Blätter wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mittels cLSM analysiert. Dargestellt ist der YFP-Kanal (Anregung bei 488 nm 16% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 498-552 nm) in A, in B der RFP-Kanal (Anregung bei 561 nm 3,1% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 579-650 nm; dargestellt in Falschfarben: Cyan), in C ein Durchlichtbild sowie in D eine Überlagerung aller Kanäle.

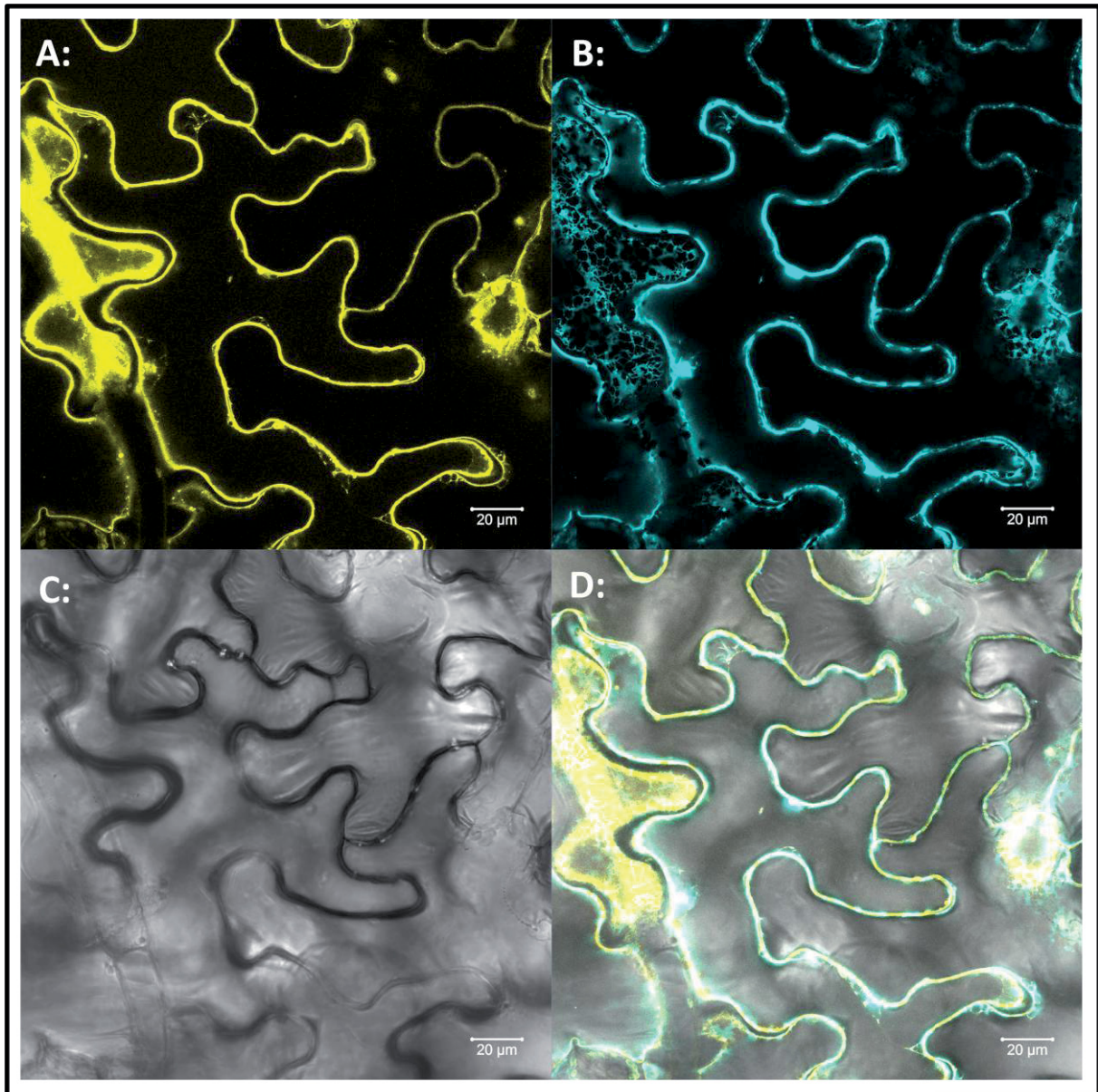




**Abbildung 47: Co-Lokalisation von MST16 und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.**

Ein C-terminales PtMST16-YFP Fusionskonstrukt wurde zusammen mit einem Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukt (Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt) (Nelson et al., 2007) mittels Agrobakterien basierter Transformation transient in Tabak Blatt-Epidermiszellen exprimiert. Die infiltrierten Blätter wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mittels cLSM analysiert. Dargestellt ist der YFP-Kanal (Anregung bei 488 nm 7% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 508-552 nm) in A, in B der RFP-Kanal (Anregung bei 561 nm 10% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 585-664 nm), in C ein Durchlichtbild sowie in D eine Überlagerung aller Kanäle.





**Abbildung 48: Co-Lokalisation von PtMST18-YFP und Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukten.**

Ein C-terminales PtMST18-YFP Fusionskonstrukt wurde zusammen mit einem Plasmamembran-mCherry Fusionskonstrukt (Aquaporin-mCherry Fusionskonstrukt) (Nelson et al., 2007) mittels Agrobakterien basierter Transformation transient in Tabak Blatt-Epidermiszellen exprimiert. Die infiltrierten Blätter wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mittels cLSM analysiert. Dargestellt ist der YFP-Kanal (Anregung bei 488 nm 15% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 499-552 nm) in A, in B der RFP-Kanal (Anregung bei 561 nm 5% Laserintensität, Detektion der Fluoreszenz bei 592-674 nm; dargestellt in Falschfarben: Cyan), in C ein Durchlichtbild sowie in D eine Überlagerung aller Kanäle.