

Praktikumsbericht

zum Praktikum beim

Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie

in der Arbeitsgruppe Krajinski (Arbuskuläre Mykorrhiza)

in Potsdam-Golm

vom 20.8. bis zum 14.9.2011

von Patricia Scholz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 2 -
2. Allgemeine Projektinformationen	- 3 -
3. Material und Methoden	- 4 -
3.1 Verwendete Medien und Lösungen	- 4 -
3.2 Verwendete Pflanzen und Pilze.....	- 4 -
3.3 Kultivierung von <i>Aphanomyces euteiches</i>	- 5 -
3.4 Samen sterilisieren.....	- 5 -
3.5 Pikieren	- 6 -
3.6 Inokulierung von <i>M.truncatula</i> Pflanzen mit <i>A. euteiches</i>	- 6 -
3.7 Ernte und Alexa-Färbung.....	- 6 -
3.8 Mikroskopie	- 7 -
3.9 Verwendete Primer	- 7 -
3.10 PCR.....	- 7 -
3.11 Ligation der PCR-Produkte in den Vektor pENTR	- 7 -
3.12 Transformation in Top10-Zellen.....	- 8 -
3.13 Animpfen.....	- 8 -
3.14 Plasmidpräparation aus E.coli	- 8 -
3.15 Verdau der Plasmide mit Restriktionsenzymen.....	- 9 -
3.16 Gelelektrophorese.....	- 9 -
4. Versuchsergebnisse	- 11 -
4.1 Piriformospora indica	- 11 -
4.2 Aphanomyces euteiches	- 11 -
4.3 Klonierung der Gene von GRAS-Proteinen	- 12 -
5. Diskussion	- 14 -
5.1 Piriformospora indica	- 14 -
5.2 Aphanomyces euteiches	- 14 -
5.3 Klonierung der Gene von GRAS-Proteinen	- 14 -
6. Fazit/Rückblick	- 16 -
7. Quellenverzeichnis	- 16 -

1. Einleitung

Zurzeit bin ich Schülerin der 12. Klasse am Martin-Andersen-Nexö-Gymnasium in Dresden. Dort habe ich auch den Auswahlwettbewerb zur Internationalen Biologieolympiade und über diesen den Förderverein der Biologieolympiade kennengelernt. Dieser ermöglichte mir ein Praktikum am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam. Dieses Gebiet war für mich völliges Neuland, ich konnte weder molekularbiologisch noch pflanzenphysiologisch praktische Erfahrungen mitbringen. Auch meine Vorlieben in Biologie gingen nicht in den Bereich der Botanik. Daher war ich sehr interessiert, was an diesem Institut wohl erforscht wird.

Das Institut schreibt über sich, dass es Ziel der Forschung sei, „ das System Pflanze mit seinen komplexen Prozessen zu verstehen.“ [1]. Dazu wird an verschiedenen Schwerpunkten geforscht, u.a. am Primärstoffwechsel höherer Pflanzen oder metabolischen Netzwerken.

Ich war in einer unabhängigen Arbeitsgruppe tätig, die die Interaktion von Pflanze und Pilz bei der arbuskulären Mykorrhiza Symbiose (AMS) an der Modellpflanze *Medicago truncatula* (Schneckenklee) und dem Modellpilz *Glomus intraradices* untersucht.

Mein Projekt verwendete die gleiche Pflanze, aber andere „Pilze“. Die Pflanzen, zwei Wildtypen und eine Mutante, sollten darauf untersucht werden, wie sie reagieren, wenn sie nicht mit dem üblichen Mykorrhizapilz in Verbindung treten sondern mit anderen, pathogenen Pilzen. Zumindest bei dem Oomyceten *Aphanomyces euteiches* war zu beobachten, dass die Pflanzen infiziert wurden. Dabei zeigte sich aber kein großer Unterschied zwischen der Mutanten und der Kontrollpflanze.

Außerdem sollte ich die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden kennenlernen, indem ich Klonierungen durchführte. Ziel war es, Gene von GRAS-Proteinen erfolgreich in ein Plasmid einzufügen, was leider nur teilweise erfolgreich war.

2. Allgemeine Projektinformationen

Bei fast allen Pflanzen ist die Mykorrhiza-Symbiose ein Teil ihrer Lebensvorgänge. Deshalb kann die Forschung an ihr in den Bereich der Pflanzenphysiologie eingeordnet werden.

Mykorrhiza bezeichnet allgemein die Symbiose zwischen einer Pflanze und einem Pilz. Dabei verflechten sich die Wurzeln der Pflanze und die Hyphen des Pilzes, um Stoffe austauschen zu können. Der Pilz kann aufgrund seiner weit verzweigten Hyphen mehr Nährsalze aufnehmen als die Pflanze, und gibt diese an sie weiter. Außerdem schützt er die Pflanze vor anderen, pathogenen Pilzen. Die Pflanze wiederum versorgt den heterotrophen Pilz mit den Kohlenhydraten, die er braucht, um zu überleben.

Man kann die Mykorrhiza weiter unterteilen in Ekto- und Endomykorrhiza. Bei der Ektomykorrhiza dringen die Hyphen des Pilzes nicht in die Wurzelzellen der Pflanze ein, bei der Endomykorrhiza schon. Ca. 80% der Landpflanzen bilden die sogenannte Arbuskuläre Mykorrhiza (AM) aus. Dabei dringen die Pilzhypen in die Zelle ein und bilden dort bäumchenförmige Strukturen, sogenannte Arbuskeln aus. Die Symbiose wird durch chemische Signale induziert. Zwischen Pilz und Pflanze wird eine Vielzahl an Botenstoffen ausgetauscht, bevor der erste physische Kontakt erfolgt.

Doch nicht nur Mykorrhizapilze reagieren auf die Botenmoleküle der Pflanzen. Auch pathogene Pilze sind bestrebt eine Verbindung mit den Wurzelzellen herstellen, um dann von den Nährstoffen der Pflanze profitieren. Ähnlich wie der Symbiosepilz bilden sie Hyphen aus, die dann in den Cortex der Wurzel eindringen. Wie eine Pflanze zwischen Symbiosepilz und pathogenem Pilz unterscheiden kann, um den pathogenen Pilz bestmöglich abzuwehren ist noch nicht geklärt.

Mein zweites Projekt ist in die Molekularbiologie einzuordnen. Die zu klonierenden Gene gehören zu GRAS-Proteinen. Das ist eine pflanzenspezifische Familie von Proteinen, die in diversen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. So sind sie z.B. in der Wurzelentwicklung, der Regulation des Pflanzenhormons Gibberellinsäure und der Bildung von Wurzelknöllchen bei der Knöllchensymbiose beteiligt. Die Proteine der GRAS-Familie weisen Gemeinsamkeiten in der Struktur auf, die tierspezifischen Transkriptionsfaktoren stark ähneln. Außerdem ist bei einigen GRAS-Proteinen Interaktion mit DNA bzw. Interaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen. Das deutet darauf hin, dass GRAS-Proteine als Transkriptionsfaktoren wirken.

Ich sollte die Gene von fünf verschiedenen GRAS-Proteinen klonieren, von denen drei allgemein als GRAS-Familien-Transkriptionsfaktoren beschrieben werden. Eins der klonierten Proteine spielt nachgewiesenermaßen eine Rolle bei der Ausbildung der Knöllchensymbiose und wurde daher Nodulation-signaling pathway 2 protein (NSP2) benannt. Das fünfte Protein hat den Namen SCARECROW und ist in das Wurzelwachstum involviert. [2]

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Medien und Lösungen

Tabelle 3.1 Medien für die Kultivierung von *Aphanomyces euteiches*

Name	Chemikalie	Menge
Pepton Maltose Broth (PMB)	Maltose	3% w/v
	Pepton	1% w/v
Seewasser	Seewasser aus dem Zernsee (Brandenburg) filtriert und autoklaviert	

Tabelle 3.2 Hoaglands Lösung zum Gießen

Chemikalie	Konzentration
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,5 mM
KNO_3	2,5 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 mM
NaFeEDTA	50 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM
H_2BO_3	10 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 μM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,0 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 μM
KH_2PO_4 K_2HPO_4	20 μM , da ein Medium mit geringen Phosphatgehalt verwendet wurde
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM
$\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM

Tabelle 3.3 Lösungen für Plasmidpräparation

Name	Chemikalie	Konzentration
Lösung I	Glucose	50 mM
	TrisCl, pH8	25 mM
	EDTA	10 mM
Lösung II	NaOH	0,2 M
	SDS	1% w/v
Lösung III	60 ml Kaliumacetat 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H_2O	5 M

3.2 Verwendete Pflanzen und Pilze

Es wurden zwei Kontrollen als Vergleich genommen. Die Pflanzen der Linie A17 sind echte Wildtypen. Die MtHa1_WT-Pflanzen sind keine echten Wildtypen mehr, da in ihnen Transposons enthalten sind, die verschiedene Gene ausschalten. Das entscheidende Gen, das bei der Mutante

durch die Transposons ausgeschaltet wird, ist in diesen Pflanzen aber voll funktionsfähig. Daher können sie ebenfalls als Kontrolle dienen. Die Mutante heißt MtHa1_Hz. Sie besitzt eine defekte H⁺-ATP-Protease. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle beim Co-Transport zur Aufnahme von Mineralstoffen wie z.B. Phosphat. Die Fehlfunktion des Enzyms bewirkt, dass die Mutante nicht mehr in der Lage ist, die Mineralien des Symbiosepilzes aufzunehmen. Sie profitiert nicht mehr von der Mykorrhiza

Infiziert wurden die Pflanzen einerseits mit dem Pilz *Piriformospora indica*. Dieser Pilz ist ein Basidiomycet und kein AM-Pilz. Er infiziert jede Pflanze, mit der er in Kontakt kommt, und beeinflusst ihr Wachstum zum Positiven, möglicherweise durch eine Beeinflussung des Hormonhaushaltes.

Der zweite verwendete Pilz ist eigentlich gar keiner, sondern *Aphanomyces euteiches* gehört zum Unterreich der Stramenopilen, „und [ist] somit viel näher mit Braunalgen, Goldalgen und Kieselalgen verwandt als mit den Echten Pilzen“ [3]. Er ist der Erreger der Leguminosen betreffenden Wurzelfäule.

3.3 Kultivierung von *Aphanomyces euteiches*

Damit *A. euteiches* Sporen bilden kann, muss er in sehr weiches Wasser inkubiert werden. Er wird zunächst auf Maismehlagar (CMA) kultiviert. Ein cm² große Agarstücke werden anschließend in Erlenmeyerkolben mit Pepton-Maltose-Broth(PMB) gegeben, drei Stücke pro Erlenmeyerkolben. Sie werden für sieben Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sie ständig geschüttelt werden müssen.

Anschließend wird das PMB abgeschüttelt und die Agarstücke mit Seewasser gewaschen. Dazu werden je 20 ml filtriertes und steriles Seewasser in die Erlenmeyerkolben getan, die anschließend wieder bei Raumtemperatur dunkel auf dem Schüttler inkubiert werden. Nach 2h wird das Seewasser abgenommen und die Agarstücke erneut mit 20 ml sterilem Seewasser bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Insgesamt muss diese zweistündige Inkubation mindestens dreimal erfolgen. Zum Abschluss wird noch einmal 20 ml steriles Seewasser in die Erlenmeyerkolben getan und diese über Nacht unter gleichen Bedingungen inkubiert. Das abgenommene Seewasser enthält nun die Zoosporen. Diese werden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Dazu zählt man die Sporen in den vier Großquadraten auf einer Diagonale der 16 Quadrate umfassenden Zählkammer. Anschließend errechnet man die Anzahl der Teilchen pro Volumen nach folgender Formel:

$$\text{Teilchenanzahl pro } \mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Teilchen}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Tiefe der Zählkammer [mm]} \times \text{Verdünnung}}$$

3.4 Samen sterilisieren

Damit die Samen auf Wasseragar (Agar ohne zusätzliche Stoffe, wie Antibiotika o.ä.) keimen können, müssen sie sterilisiert werden. Alle Samen der jeweiligen Pflanzen werden in ein Eppendorfgefäß gegeben. In diesem Fall waren das Samen von A17, MtHa1_WT und MtHa1_Hz. Dazu wird je 1ml konzentrierte Schwefelsäure, die die Samenschale angreift, gegeben und die Eppendorfgefäße für 7 min in den Schüttler getan. Anschließend wird die Schwefelsäure abgesaugt und die Samen 8x mit dH₂O gewaschen. Danach gibt man Natriumhypochlorid hinzu, welches sterilisiert, und stellt die Eppendorfgefäße für 5 min in den Schüttler. Nun saugt man das NaOCl ab und wäscht erneut mit

dest. H₂O , diesmal 3x, indem man Wasser hinzufügt und die Röhrchen für 5 min in den Schüttler stellt. Abschließend wird das Wasser abgesaugt und die Samen werden mit einer abgeflamten Pipette auf Wasseragar ausgelegt. Zum Schluss werden die Agarplatten mit Leukopor verschlossen, und über Nacht in den 4°C-Raum getan. Bevor die Samen keimen, müssen sie drei bis vier Tage bei Zimmertemperatur gelagert werden.

3.5 Pikieren

Die gekeimten Samen werden beim Pikieren aus dem Wasseragar in einen Blumentopf mit einem Gemisch von Sand und Blähton gebracht. Diese beiden Stoffe wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend wurde ein Liter Hoaglands Lösung hinzugetan, und das Gemisch auf die benötigte Anzahl Töpfe aufgeteilt. Die Hoaglands Lösung enthält alle Nährsalze, die die Pflanzen brauchen um zu überleben. Es wurden kleine Töpfe gewählt, in die je drei Pflanzen eines Typs gegeben wurden. Die gekeimten Samen wurden so eingesetzt, dass nur noch die Keimblätter zu sehen waren.

Zu den Pflanzen, mit denen die Wirkung von *Piriformospora indica* untersucht werden sollte wurden 1,5g des Pilzes hinzugefügt. Dieser war in einem normalen Medium kultiviert wurden. Das Medium wurde abfiltriert, sodass nur noch der Pilz als Überstand blieb. Der konnte nun abgewogen und zum Sand-Blähton-Gemisch gegeben werden. Zum Abschluss wurden die Keimlinge mit Hoaglands Lösung besprüht. Direkt nach dem Pikieren sollte man nicht gießen, da dabei der hinzugefügte Pilz wieder hinausgespült wird. Die pikierten Pflanzen wurden für zwei Wochen im Quarantänephytotron gelagert und zwei Mal pro Woche gegossen.

3.6 Inokulierung von *M.truncatula* Pflanzen mit *A. euteiches*

Eine Woche alte *M. truncatula* Pflanzen, die wie beschrieben pikiert worden waren, wurden mit *A. euteiches* inokuliert. Dazu wurde die wie bei 3.3 beschriebene Zoosporen-Seewasser-Suspension verwendet. Das Auszählen in der Zählkammer ergab, dass ca. 54.000 Sporen pro ml in der Suspension vorlagen. Pro Topf, d.h. drei Pflanzen, wurden 35 ml der Suspension zugegeben. Je ein Kontrolltopf für A17, MtHa1_WT und MtHa1_Hz wurde mit filtriertem, sterilem Seewasser behandelt. Nach 6 Tagen wurden die inokulierten Pflanzen geerntet.

3.7 Ernte und Alexa-Färbung

Nach 14 (*P.indica*-Pflanzen) bzw. sieben (*A. euteiches*-Pflanzen) Tagen wurden die Pflanzen geerntet. Das Sand-Blähton-Gemisch wurde abgekippt und von den Pflanzen wurden die Wurzeln abgeschnitten und in Wasser getan. Der Spross wurde verworfen. Um die Wurzeln zu untersuchen wurden sie mit der Fluoreszenzfärbung Alexa gefärbt. Diese markiert die Zellwände von *P.indica* und *A.euteiches*, sodass dies im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen sind. Dafür wurde zunächst das Wasser abgekippt und die Wurzeln mit 10%igem KOH bedeckt. Das wurde für 4 min in ein Wasserbad mit 95°C inkubiert. Danach kippt man das 10%ige KOH ab und wäscht die Wurzeln 3x mit PBS-Puffer. Für die Färbung löst man zwei Eppis Alexa-Färbung in 20 ml Wasser und bedeckt die Wurzeln mit der Färbelösung. Die Wurzeln werden nun ÜN, bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wäscht man sie noch 3x mit PBS-Puffer, dann sind sie fertig zum Mikroskopieren.

3.8 Mikroskopie

Zunächst wurden die Pflanzen in einem normalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurden die Wurzeln mit fluoreszierenden Pilzen herausgesucht und auf einen Objektträger mit destilliertem Wasser getan. Anschließend wurde ein Deckgläschen aufgesetzt und mit dem Objektträger durch Nagellack fixiert. Die so präparierten Slides wurden nun durch ein Epifluoreszenzmikroskop betrachtet, das eine höhere Auflösung bot. Um dabei auffallende ungewöhnliche Strukturen noch genauer zu betrachten, wurde ein Confokal-Mikroskop verwendet. Dieses Mikroskop kann durch Variation der betrachteten z-Ebene das Gewebe noch detaillierter darstellen. Außerdem kann durch das Übereinanderlagern von Bildern verschiedener z-Ebenen ein dreidimensionales Bild erstellt werden.

3.9 Verwendete Primer

Da fünf verschiedene Gene kloniert werden sollten wurden auch je fünf verschiedene Primer forward und die zugehörigen Primer reverse verwendet werden. Bei der PCR werden dadurch verschiedene Abschnitte der vorhandenen cDNA vervielfältigt, nämlich die Gene für die fünf GRAS-Proteine. Tab. 3.4 zeigt die verwendeten Primer.

Tabelle 3.4 verwendete Primer

Primer	codiertes Protein
Medtr 1g086970	GRAS family transcription factor
Medtr 2g089100	GRAS family transcription factor
Medtr 5g058860	Nodulation-signaling pathway 2 protein
Medtr 7g027250	Protein SCARECROW
Medtr 8g093210	GRAS family transcription factor

3.10 PCR

Für die PCR müssen zunächst die Primer vorbereitet werden. Die fünf zusammengehörenden Primerkombinationen von Primer forward und Primer reverse liegen zunächst in zu hoher Konzentration vor, und müssen mit einer Primer-spezifischen Menge an Wasser gemischt werden, um die Konzentration 100µM zu erhalten. Anschließend wird die Lösung herunterzentrifugiert. Zur weiteren Verdünnung werden

je 10 µl Primerlösung und 90 µl in ein Eppendorfgefäß getan. Die Primer liegen jetzt in der Konzentration 10 µM vor.

Zunächst stellt man nun den Master-Mix her. Es wurden jeweils 31,5 µl H₂O; 10µl Phusions Puffer; 0,5 µl Phusi Polymerase; 1µl 10 mM dNTP's und 2µl cDNA gemischt. Die cDNA stammt aus einem unabhängigen Experiment und liegt unverdünnt vor. Das Gemisch wird auf 5 Eppis mit je 9µl aufgeteilt. Dazu kommen je 0,5 eines Primer forward und des zugehörigen Primers reverse. Anschließend lässt man die PCR laufen.

3.11 Ligation der PCR-Produkte in den Vektor pENTR

Um die gewonnenen PCR-Produkte in E.coli einzuschleusen, wird der Vektor pENTR genutzt. Damit das PCR-Produkt in den Vektor eingefügt wird, gibt man je 4µl PCR-Produkt, 1µl Salt-Solution und 1µl Vektor zusammen. Anschließend wird 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird das PCR-Produkt in den Vektor eingefügt.

Der Vektor pENTR liegt als linearer Vektor vor an dessen 3'-Strangenden eine Topoisomerase kovalent gebunden hat. Außerdem gibt es am 3'-Strangende ein überhängendes Thymin. Die in der vorangegangenen PCR verwendete Taq-Polymerase hat die Eigenschaft während der Amplifikation mit hoher Wahrscheinlichkeit am 3'-Ende ein überstehendes Adenin anzufügen. Wird nun das PCR-Produkt mit überstehendem A und der Vektor mit überstehendem T zusammengebracht, wird die Topoisomerase wirksam und verknüpft A und T. Dadurch wird das PCR-Produkt in den Vektor ligiert.

3.12 Transformation in Top10-Zellen

Drei µl des hergestellten Ligationsansatzes werden in Top10-Zellen transformiert. Der Ligationsansatz wird zu den Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgt ein 30s langer Hitzeschock bei 42°C. Dabei werden die Zellmembranen durchlässiger und nehmen den Vektor auf. Anschließend gibt man 200µl SOC-Medium hinzu, in dem die Zellen eine Stunde bei 37°C im Schüttler wachsen. Die Bakterien werden anschließend auf Platten mit LB-Medium mit dem Antibiotika Kanamycin ausplattiert. Dabei werden jeweils 50µl und 200µl auf den Platten ausgestrichen. Das Antibiotikum bewirkt, dass nur E.coli-Zellen mit dem transformierten Plasmid auf den Platten überleben. In dem Plasmid ist nämlich ein Resistenzgen gegen Kanamycin enthalten. Die Zellen werden nun über Nacht bei 37°C überkopf inkubiert

3.13 Animpfen

Bei erfolgreicher Transformation bilden sich Kolonien auf dem LB-Kanamycin-Medium. Diese werden vom festen Agar in flüssiges LB-Kann.-Medium übertragen. Das vorbereitete Medium wird in große Reagenzgläser mit Verschluss gegeben. Anschließend wird mit einem sterilen Zahnstocher über die Kolonien gestrichen, der anschließend in das Flüssigmedium gegeben wird. Am Zahnstocher befinden sich etliche Bakterien aus der Kolonie, die sich nun im Flüssigmedium vermehren. Die E.coli Zellen über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

3.14 Plasmidpräparation aus E.coli

Das gewünschte Plasmid muss nun wieder aus den Bakterien isoliert werden. Dazu wird die Flüssigkultur in ein Eppendorfggefäß gegeben. Anschließend wird bei RT mit 10.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Dann gibt man 100 µl Lösung I (Glucose, TrisCl pH 8, EDTA) und 5 µl RNase auf das Pellet und inkubiert für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wird 200µl von Lösung II (NaOH,SDS) hinzugegeben und das Gemisch invertiert. Die Eppendorfggefäße werden nun für 5 min auf Eis getan, bevor man 150 µl Lösung III (Kaliumacetat, Eisessig, H₂O) hinzugibt und erneut für 5 min auf Eis stellt. Die Eppendorfggefäße werden erneut zentrifugiert, diesmal 10 min bei RT, mit 13.000 rpm . Der klare Überstand wird in neue Eppendorfggefäße überführt. Dazu gibt man 800µl 100% EtOH und 45 µl Natriumacetat. Das Gemisch wird für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei RT und 13.000 rpm wird der Überstand verworfen. Übrig bleibt ein Pellet, das man in 500µl 70% EtOH wäscht. Um das Ethanol zu entfernen werden die Eppendorfggefäße erneut zentrifugiert, diesmal für 5 min bei RT mit 13.000 rpm. Das nun überflüssige EtOH wird abgesaugt, und um letzte EtOH-Reste zu entfernen werden die Eppendorfggefäße bei 37°C inkubiert, bis der gesamte EtOH verdunstet ist. Zum Abschluss muss man das Pellet in 50 µl RNase-freies Wasser aufnehmen.

3.15 Verdau der Plasmide mit Restriktionsenzymen

Um zu überprüfen, ob die Klonierung erfolgreich war, werden die gewonnenen Plasmide durch Restriktionsenzyme geschnitten. Mit der Website des *National Center for Biotechnology Information* [4] lässt sich die Sequenz des eingefügten DNA-Abschnittes ermitteln. Mithilfe des Computers lassen sich die Restriktionsenzyme ermitteln, die in der nun bekannten Sequenz des Vektors mit eingefügtem PCR-Produkt genau einmal schneiden. Mindestens eins der Restriktionsenzyme muss dabei seine Schnittstelle im Insert haben. Zwei Restriktionsenzyme werden ausgewählt, und anschließend lässt sich bestimmen wie groß die geschnittenen Plasmidabschnitte voraussichtlich sind. In Tab. 3.5 sind die verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt.

Tabelle 3.5 verwendete Restriktionsenzyme

Primer	codiertes Protein	Restriktionsenzyme
Medtr 1g086970	GRAS family transcription factor	Hind III Eco RV
Medtr 2g089100	GRAS family transcription factor	Xba I Eco RV
Medtr 5g058860	Nodulation-signaling pathway 2 protein	Eco RI Bam HI
Medtr 7g027250	Protein SCARECROW	Eco RI Xho I
Medtr 8g093210	GRAS family transcription factor	Hind III Kpn I

Zum Verdau des Plasmids werden 8µl Plasmid, 1µl *FastDigest Green Buffer* und je 0,5µl der Restriktionsenzyme in ein Eppendorfgefäß getan und vermischt. Die Eppendorfgefäße mit den verschiedenen Ansätzen werden bei 37°C für 25 min inkubiert.

Anschließend lässt man eine Gelelektrophorese laufen, um die Größe der geschnittenen DNA-Abschnitte zu ermitteln. Stimmen die Werte mit den vorher am Computer bestimmten Werten überein, war die Klonierung erfolgreich und das Insert ist im Plasmid enthalten.

3.16 Gelelektrophorese

Um das Ergebnis des Verdau mit Restriktionsenzymen zu untersuchen wird eine Gelelektrophorese gemacht. Aus dem Ergebnis lässt sich ableiten, ob die Klonierung erfolgreich war und das PCR-Produkt im Vektor enthalten ist.

Das Gel wird hergestellt, indem man 1%ig Agarose in TAE-Puffer löst. In dem Gel ist Midori-Grün enthalten. Anschließend wird es in eine Gelkammer gegossen, in der ein Kamm eingespannt ist. Nach 30 min ist das Gel fest und der Kamm hat Taschen zurückgelassen, in die das Ergebnis der PCR gegeben werden kann.

Durch den beim Verdau verwendeten Puffer sind die Proben bereits angefärbt. Anonsten kann man sie mit 1µl Bromphenolblau anfärben.

Der Gelschlitten wird in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, in der sich TAE-Puffer befindet. Die Taschen sind dabei zum Minuspol gerichtet. In die Taschen wurden nun 8µl des gefärbten PCR-

Produktes gegeben. Zusätzlich pipettiert man in eine Tasche den *1kb Plus DNA Ladder*, der Banden bekannter Größe hinterlässt. Anschließend lässt man die Gelelektrophorese 25 min bei 100V laufen. Um das Ergebnis sichtbar zu machen wird das Gel mit UV-Licht bestrahlt. Dabei werden die gelaufenen Banden der PCR-Produkte durch das zugegebene Midori-Grün sichtbar.

4. Versuchsergebnisse

4.1 *Piriformospora indica*

Im Mikroskop ist keine Fluoreszenz des Pilzes zu erkennen. Der Zentralzylinder der Wurzel zeigt eine schwache Färbung, die aber durch Eigenfluoreszenz des Phloems entsteht. Es sind keine Hyphen von *Piriformospora indica* in die Wurzeln der Versuchspflanzen gewachsen.

4.2 *Aphanomyces euteiches*

Bei den Wurzeln der Pflanzen von MtHa1_WT und MtHa1_Hz war eine Fluoreszenz zu beobachten. Sie ist deutlich stärker als die Eigenfluoreszenz im Zentralzylinder und auch nicht in diesem lokalisiert. Stattdessen ist sie im Interzellularraum der Cortexzellen lokalisiert. Sie dringt dabei relativ weit bis in den inneren Cortex ein. Bei den Wurzeln der Mutanten sind bereits neue Sporen (gelber Pfeil) zu erkennen, die von *A. euteiches* ausgebildet wurden. Diese sind sogar in der lichtmikroskopischen Aufnahme zu erkennen.

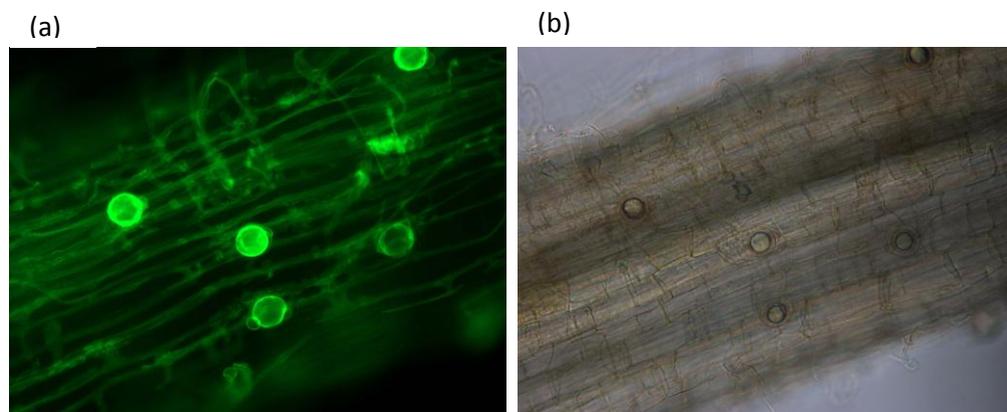


Abbildung 4.1 Alexa-Färbung (a) bzw. lichtmikroskopische Aufnahme (b) von *A. euteiches* MtHa1_Hz

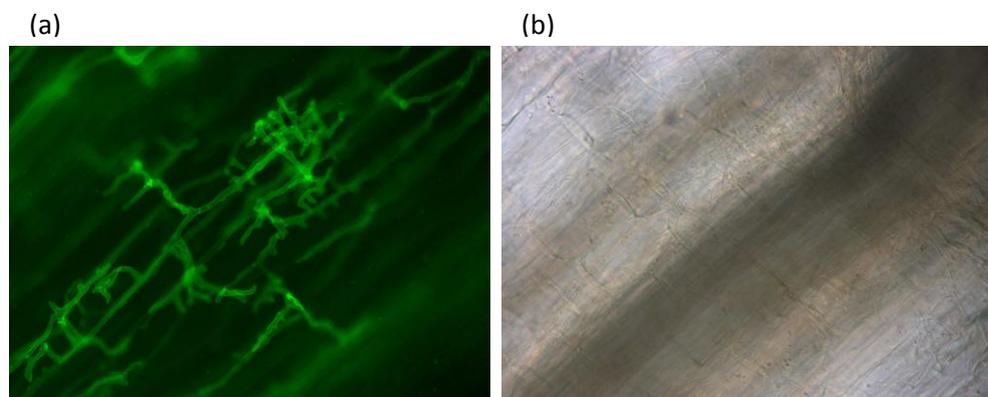


Abbildung 4.2 Alexa-Färbung (a) bzw. lichtmikroskopische Aufnahme (b) von *A. euteiches* MtHa1_WT

In den Epimikroskop-Bildern sind zahnbürstenähnliche Strukturen zu erkennen (weißer Pfeil). Sie wurden mit dem Confocal-Mikroskop noch genauer betrachtet. Die Fluoreszenz ist dort nicht mehr nur in den Zellzwischenräumen zu beobachten, sondern auch in einzelnen Cortexzellen.

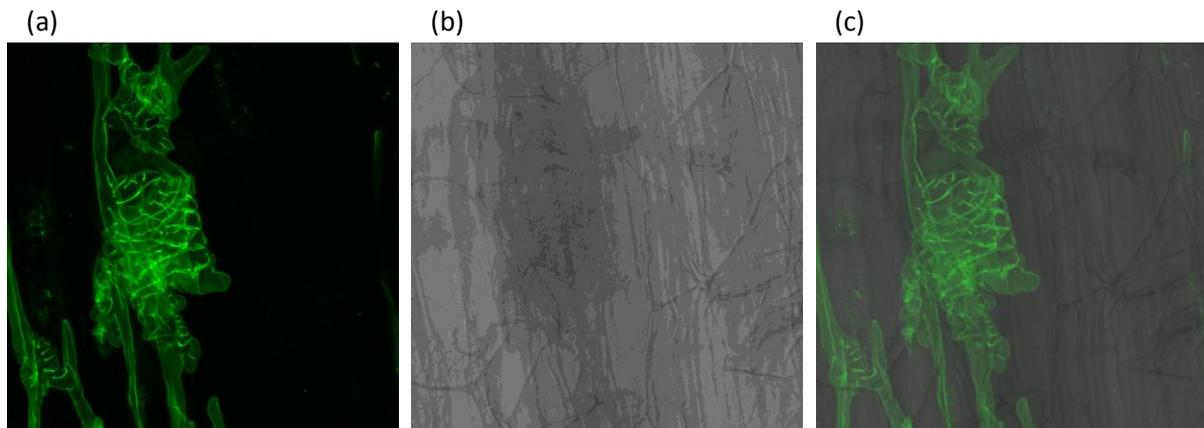


Abbildung 4.3 Alexa-Färbung (a), lichtmikroskopische Aufnahme (b) bzw. Übereinanderlagerung von *A. euteiches* MthA1_Hz

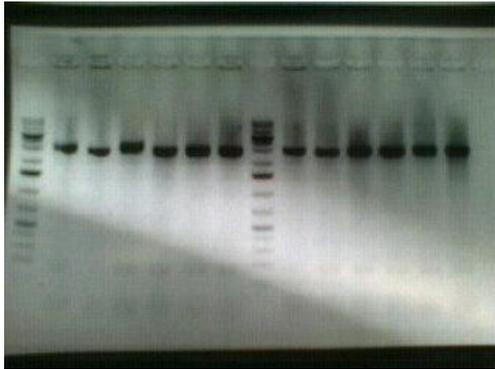
4.3 Klonierung der Gene von GRAS-Proteinen

Bei den GRAS-Transkriptionsfaktoren mit den Primern Medtr 1g086970 und Medtr 2g089100 bildeten sich sehr viele Kolonien auf den LB-Kanamycin-Medien, jeweils deutlich über 30 Stück. Die Bakterien, in die das Gen von NSP2 transformiert wurde, bildeten etwas weniger Kolonien aus. Bei den Genen von SCR und des Transkriptionsfaktors von Medtr 8g093210 bildeten sich nur zwei bzw. fünf Kolonien aus.

Die Gelelektrophoresen zeigen das Ergebnis des Verdauens mit Restriktionsenzymen. Bei einzelnen Ansätzen des GRAS-Transkriptionsfaktors, der mit Primer Medtr 2g089100 amplifiziert wurde und des Gens von NSP2 sind zwei Banden zu erkennen. Bei m Ansatz von Medtr 2g059100 liegen diese Banden knapp unter 3000kb und im Bereich von 1500kb bis 1000kb und beim Gen von NSP2 liegen sie unter 4000kb und bei 200kb.

Bei den Ansätzen der Transkriptionsfaktoren, die mit Medtr 1g086970 und Medtr 8g093210 amplifiziert wurden, sind in der Gelelektrophorese nicht mehr als eine Bande zu erkennen. Auch das Gen für das Protein SCR zeigte bei allen Ansätzen nicht mehr als eine Bande. Die Banden befinden sich bei Medtr 1g086970 auf Höhe von 3000kb; bei Medtr 8g093210 zwischen 2000kb und 3000kb und für SCR befanden sich die einzigen Banden bei 5000kb.

(a)



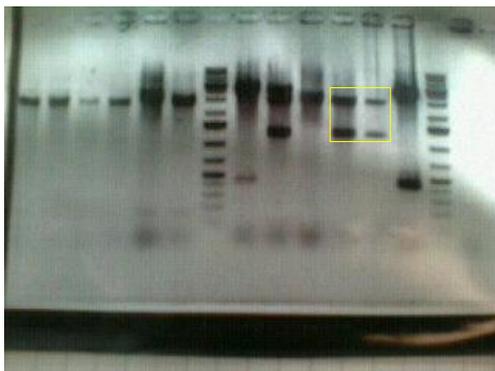
1g086970

(b)



5g058860 7g027250 8g093210

(c)



1g086970 2g089100

(d)



1g086970 5g058860

Abbildung 4.4 Gelelektrophorese der Primer 1g086970 (a); 5g058860, 7g027250 und 8g093210 (b); 1g086970 und 2g089100 (c) bzw. 1g086970 und 5g058860

5. Diskussion

5.1 Piriformospora indica

Da keine Fluoreszenz zu erkennen ist, haben die Hyphen des Pilzes die Wurzel nicht infiziert. Beim Pikieren wurde das Mycel des Pilzes neben die Pflanzen in das Sand-Blähton-Gemisch getan. Der Pilz ist jedoch auch ohne die Pflanze überlebensfähig. Daher ist anzunehmen, dass er unabhängig von der Pflanze existierte und sie nicht infizierte.

5.2 Aphanomyces euteiches

Die Bilder von MtHa1_WT und MtHa1_Hz zeigen Ähnlichkeiten: Bei beiden ist überwiegend der Interzellularraum zwischen den Cortezellen von den Hyphen durchdrungen und an einigen wenigen Stellen drang der Pilz auch in die Zellen ein. Bei der Mutante haben sich bereits neue Sporen gebildet, d.h. die Infektion ist hier in etwas fortgeschrittenerem Stadium als beim Wildtyp MtHa1_WT. Es ist aber unwahrscheinlich, dass dies durch die Mutation hervorgerufen wird. Der Defekt der ATPase wirkt sich darauf aus, was die Pflanze an Nährsalzen erhält, nicht jedoch welche Stoffe sie abgibt. Da der *A. euteiches* der Pflanze jedoch keine Mineralien liefert, ist kein Unterschied zu erwarten gewesen, was die Infizierung durch diesen Pilz betrifft. Die Abgabe von Nährstoffen an den Oomyceten funktioniert bei beiden Pflanzenlinien gleich, daher zeigen die Mikroskopbilder die genannten Ähnlichkeiten.

5.3 Klonierung der Gene von GRAS-Proteinen

Die Gene der GRAS-Proteine wurden in einen Vektor kloniert, der ein Resistenzgen gegen Kanamycin enthielt. Die Ausplattierung der transformierten Bakterien auf ein Medium mit Kanamycin bewirkte, dass nur die Bakterien Kolonien bildeten, bei denen die Transformation des Vektors in die Zellen gelungen war, bei SCR und Medtr 8g093210 weiger als bei den anderen Transformationen. Der Verdau mit Restriktionsenzymen funktionierte nur dann vollständig, wenn im Plasmid auch das klonierte Gen enthalten war. Damit sich zwei nachweisbare Plasmidfragmente ergeben, müssen beide Restriktionsenzyme schneiden. Da sich mindestens eine Schnittstelle im Insert befindet funktioniert der Verdau nur dann vollständig, wenn das Insert im Plasmid erhalten ist.

Tabelle 5.1 zeigt die erwarteten Größen der Fragmente.

Tabelle 5.1 errechnete Größen der Plasmidfragmente

Primer	codiertes Protein	Größe der Banden
Medtr 1g086970	GRAS family transcription factor	1300 bp 2700 bp
Medtr 2g089100	GRAS family transcription factor	1200 bp 2700 bp
Medtr 5g058860	Nodulation-signaling pathway 2 protein	200 bp 3900 bp
Medtr 7g027250	Protein SCARECROW	230 bp 4370 bp
Medtr 8g093210	GRAS family transcription factor	500 bp 3600 bp

Bei dem GRAS-Transkriptionsfaktor des Primers Medtr 2g089100 und NSP2 sind die Banden auf der erwarteten Höhe. Hier war die Klonierung offensichtlich erfolgreich. Das Plasmid wird noch an eine Firma gesendet, die es sequenzieren kann. Das erfolgt aber nach meiner Praktikumszeit.

Bei den anderen Ansätzen ist nur jeweils eine Bande zu sehen, bei SCR mit etwa auf Höhe des ungeschnittenen Plasmids mit Insert. Der GRAS-Transkriptionsfaktor des Primers Medtr 1g086970 zeigt eine Bande bei etwa der Größe des größeren geschnittenen Plasmidabschnitts.

Die Klonierung war hier nicht erfolgreich, die Kultivierung mit Kanamycin zeigt aber, dass das Plasmid höchstwahrscheinlich in den E.coli-Zellen enthalten ist. Nur das Insert ist nicht im Plasmid enthalten. Das kann entweder daran liegen, dass die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor nicht erfolgreich war. Und/oder durch Mutationen im Plasmid hat sich die Basensequenz derart geändert, dass das Restriktionsenzym keine Schnittstelle mehr hatte. Die genaue Ursache kann nicht ermittelt werden, da das Plasmid der fehlgeschlagenen Versuche nicht sequenziert wird.

6. Fazit/Rückblick

Nach vier Wochen Praktikum fällt mein Fazit positiv aus. Die Arbeit im Labor und im Gewächshaus hat mir insgesamt sehr gut gefallen. Ich konnte Dinge praktisch ausführen, von denen ich vorher nur in Büchern gelesen hatte, oder die völlig neu für mich waren. Gleichzeitig habe ich dabei alle Facetten des Forscherlebens kennengelernt, auch die weniger erfreulichen, wie den Frust nach mehrfachen Versuchen immer noch kein Ergebnis zu haben. Immerhin wurde mir von der Arbeitsgruppe glaubhaft versichert, dass das nicht an mir liegt, sondern ganz normal ist. Auch sonst fühlte ich mich sehr wohl in der Arbeitsgruppe, gut integriert und betreut. Insgesamt fand ich das Praktikum sehr nützlich, auch wenn ich nach den vier Wochen eher skeptisch auf einen möglichen Beruf in der Forschung vorausblicke.

Ich möchte mich hier bei allen Mitgliedern der AG Krajinski für vier schöne Wochen bedanken, ganz besonders bei Daniela Zöller für die persönliche Betreuung.

Auch dem Förderverein der Biologieolympiade, der mich dazu gebracht hat, die Herausforderung eines längeren Praktikums fern von zu Hause anzunehmen, möchte ich hiermit meinen persönlichen Dank aussprechen.

7. Quellenverzeichnis

Internetquellen

- [1] www-de.mpimp-golm.mpg.de/profil/ziele/index.html
- [2] Hirsch, S. and Oldroyd, G. : GRAS-domain transcription factors that regulate plant development; 2009
- [3] de.wikipedia.org/wiki/Eipilze
- [4] www.ncbi.nlm.nih.gov/proteinclusters
- [5] Pietschmann, C.: Pilzgespinnst im Wurzelwerk; MaxPlanckForschung; April 2011; S. 18-25