

miniTurbo-based interactomics
to study cell-surface immune signalling
networks
in *Marchantia polymorpha*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Katharina Melkonian-Ezekian

aus Münster

Köln, April 2022

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln in der unabhängigen Forschungsgruppe Grundlegendes Immunsystem der Pflanzen unter der Leitung von Dr. Hirofumi Nakagami angefertigt.



Berichterstatterinnen:

Prof. Dr. Alga Zuccaro

Prof. Dr. Jane Parker

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Kay Hofmann

Schriftführerin:

Dr. Isabel Saur

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 2022

Es handelt sich um eine von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommene Dissertation.

Abstract

Plants deploy immune sensors at the cell surface that perceive microbial molecules and initiate rapid defence mechanisms in response to microbial pathogen attack. Lysin-motif (LysM) domain containing proteins are involved in the perception of fungal chitin and bacterial peptidoglycan. Signal transduction is mediated by rapid, transient receptor complex formations. In angiosperms, cell surface signalling is diversely regulated, while pathways are interconnected or partially redundant, resulting in highly complex networks. The liverwort *Marchantia polymorpha*, a popular model for evolutionary studies, has an overall low genetic redundancy and is well-suited for dissecting complex pathways.

Transient protein-protein interactions cannot be detected using genetic approaches. Proteomics approaches are required to understand cell surface immune signalling at the protein level. Proximity-dependent *in vivo* labelling (PL) approaches can be used to capture transient interactions. Enzyme-mediated biotin labelling was reported for interactome mapping in several model angiosperms, while a transferability to other, evolutionary distant plants remained to be determined. In this thesis, I developed a PL approach in *M. polymorpha*, suitable for plasma membrane-localized baits and interactomics of cell surface immune sensors.

The first chapter comprises two submitted/accepted manuscripts and refers to experimental design and PL workflow establishment in *M. polymorpha*. A method article on “miniTurbo-based interactomics of two plasma membrane-localized SNARE proteins in *Marchantia polymorpha*” was implemented. Biotin labelling conditions and sample preparation were established and hundreds of potential interactors of MpSYP12A and MpSYP13B were identified. Specific candidates identified for each SNARE suggested subtle functional differences between both SYPs. Additionally, a book chapter for “Methods in Molecular Biology” (Springer Protocols), including a detailed protocol of an optimized PL workflow, was implemented.

In the second chapter, potential interactors of two LysM proteins, MpLYK1 and MpLYR, were identified using the PL approach. The identified candidates revealed a potential reactive oxygen species (ROS) signalling module, while localization and stability of MpLYK1 and MpLYR might be regulated differently in *M. polymorpha*. Based on the candidates, a crosstalk between LysM- and leucine-rich repeat receptor-like kinase(LRR-RLK)-mediated salt-stress signalling might be present. A candidate interactor of MpLysMs, an LRR-RLK, was selected for CRISPR Cas9-mediated mutagenesis. ROS burst responses upon elicitor treatment and susceptibility to *Pto* DC3000 lux were comparable to wildtype in these mutant lines. Other potential functions of this LRR-RLK remain to be determined in the future.

Zusammenfassung

Pflanzen nutzen Immunsensoren an der Zelloberfläche, um mikrobielle Moleküle zu erkennen und schnelle Abwehrmechanismen, als Reaktion auf mikrobielle Pathogene, zu initiieren. Lysin-Motiv (LysM)-Proteine sind an der Wahrnehmung von Pilz-Chitin und bakteriellem Peptidoglycan beteiligt. Die Signaltransduktion wird durch transiente Rezeptorkomplexbildungen vermittelt. In Angiospermen ist die Signalweiterleitung an Zelloberflächen vielfältig reguliert, während Signalwege verbunden oder teilweise redundant sind, was zu hochkomplexen Netzwerken führt. Das Lebermoos *Marchantia polymorpha*, hat eine geringe genetische Redundanz und eignet sich gut zum Aufgliedern komplexer Signalwege. Transiente Protein-Interaktionen können mit genetischen Methoden nicht erfasst werden. Proteomik wird benötigt, um Immunsignalwege auf Proteinebene zu verstehen. Nährungsabhängige *in vivo* Markierungen (PL) können verwendet werden, um transiente Interaktionen zu erfassen. Enzym-vermittelte Biotin-Markierung wurde in mehreren Modell-Angiospermen beschrieben. Eine Übertragbarkeit von PL auf andere, evolutionär entfernte Pflanzen wurde noch nicht bestimmt. In dieser Arbeit habe ich eine PL-Methode in *M. polymorpha* entwickelt, die für Interaktomik von Zelloberflächen-Immunsensoren geeignet ist.

Das erste Kapitel umfasst zwei Manuskripte und bezieht sich auf das experimentelle Design und die Etablierung von PL in *M. polymorpha*. Ein Methodenartikel über „miniTurbo-based interactomics of two plasma membrane-localized SNARE-proteins in *Marchantia polymorpha*“ wurde implementiert. Die Bedingungen für Biotin-Markierung und Probenvorbereitung wurden etabliert und Hunderte potenzieller Interaktoren von MpSYP12A und MpSYP13B identifiziert. Spezifische Kandidaten für jedes SNARE wiesen auf subtile Unterschiede hin. Zusätzlich wurde ein Buchkapitel für „Methods in Molecular Biology“ (Springer Protocols), mit einem detaillierten Protokoll der PL-Methode, implementiert.

Im zweiten Kapitel wurden potenzielle Interaktoren von MpLYK1 und MpLYR mittels PL identifiziert. Die Kandidaten wiesen auf ein potenzielles Signalmodul für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hin, während Lokalisierung und Stabilität der MpLysMs möglicherweise unterschiedlich reguliert werden. Die Kandidaten wiesen auf eine mögliche Überschneidung mit Salz-Stress-Signalisierung, durch Leucin-reiche Rezeptor-ähnliche Kinasen (LRR-RLK), hin. Ein Interaktor-Kandidat der MpLysMs, eine LRR-RLK, wurde für die Mutagenese mittels CRISPR-Cas9 ausgewählt. ROS-Burst nach Elicitor-Behandlung und Empfindlichkeit gegenüber *Pto* DC3000 lux waren in diesen Mutantenlinien mit dem Wildtyp vergleichbar. Andere potenzielle Funktionen dieser LRR-RLK müssen in Zukunft bestimmt werden.