

**Lokalisierung von MsRab11F während der Etablierung
der Knöllchensymbiose zwischen
Medicago truncatula und *Sinorhizobium meliloti***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Prachumporn Nounurai

aus Chumphon (Thailand)

Dezember 2009

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach ISO 9706

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Stickstoff-Fixierung	2
2.2	Rhizobium - Leguminosen Symbiose	2
2.3	Erkennungsprozesse der Knöllchensymbiose	3
2.4	Infektionsprozesse der Knöllchensymbiose	6
2.5	Knöllchenentwicklung und Gewebeorganisation.....	9
2.6	Suppression der Pflanzenabwehr während des Infektionsprozesses.....	10
2.6.1	Funktion der Exopolysaccharide während der Infektion	11
2.6.2	Funktion der Lipopolysaccharide während der Infektion	13
2.7	Entwicklung der Peribakteroidmembran.....	14
2.7.1	Die Struktur der Rab-Proteine.....	15
2.7.2	Der Rab GTPase Zyklus.....	16
2.7.3	Rab-Proteine und SNARE-Hypothese (Rothman 1994).....	17
2.8	Rab-Proteine in Pflanzen.....	19
2.9	Ziele der Arbeit	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Gerät und Apparaturen	24
3.2	Chemikalien	25
3.3	Enzyme.....	26
3.4	Antikörper	26
3.5	Sonstige Materialien.....	26
3.6	Verwendete Mikroorganismen und Pflanzen.....	27
3.7	Primer und Vektoren	28
3.7.1	Primer	28
3.7.2	Vektoren	28
3.8	Mikrobiologische Methoden	33
3.8.1	Anzucht und Bestimmung der Konzentration von Bakterien	34
3.8.2	Konservierung von Bakterienstämmen	35
3.9	Molekularbiologische Methoden.....	35
3.9.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
3.9.2	PCR-Mutagenese.....	36
3.9.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
3.9.4	DNA-Sequenzierung	37
3.9.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch schnelle HB-Lyse	37
3.9.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch Spin prep Säulen.....	38
3.9.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch Midi und Maxi prep Säulen.....	38
3.9.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	38
3.9.9	Restriktionsspaltung von DNA	39

3.9.10	Behandlung mit alkalischer Phosphatase	39
3.9.11	Ligation	39
3.10	DNA-transfer Methoden	40
3.10.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	40
3.10.2	Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.10.3	Herstellung elektrokompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	41
3.10.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
3.10.5	Herstellung der elektrokompenter <i>A. rhizogenes</i> Zellen	42
3.10.6	Transformation von <i>A. rhizogenes</i>	42
3.11	Transformation und Anzucht von Pflanzen	42
	Pflanzenmedium.....	42
	Pflanzennodulationsmedium	43
3.11.1	Anzucht von <i>Medicago truncatula</i>	44
3.11.2	Transformation von <i>Medicago truncatula</i> mittels der "hairy root" Methode	45
3.11.3	Anzucht von <i>Nicotiana benthamiana</i>	45
3.11.4	Kultivierung von BY-2 Tabak Suspensionszellen	45
3.11.5	Isolierung von Protoplasten aus BY2-Zellkulturzellen.....	45
3.11.6	Transformation von BY2-Protoplasten aus <i>Nicotiana tabaccum</i>	46
3.11.7	Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> mit der Particle-Gun Methode	47
3.11.8	Infiltration von <i>Nicotiana tabaccum</i>	48
3.12	Proteinbiochemische Methoden	50
3.12.1	Proteinextraktion aus Pflanzen mittels Phenol (Huarkman und Tanaka 1986)	50
3.12.2	Gesamtproteinbestimmung.....	51
3.12.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
3.12.4	Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie	54
3.12.5	2D-Gelelektrophorese	54
3.12.6	2D-SDS-Gelelektrophorese	55
3.12.7	Western-Blot-Analyse.....	56
3.13	Mikroskopische Methoden.....	59
3.13.1	Selektion von transgenen Wurzeln.....	59
3.13.2	Immunlokalisierung	60
3.13.3	Confokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	60
4	Ergebnisse	62
4.1	Isolierung von MtRab5b aus <i>Medicago truncatula</i> cDNA-Banken	62
4.1.1	Analyse der Proteinsequenzen von MtRab5B und Ara6.....	63
4.1.2	Vergleich der Proteinsequenzen von MtRab5B und MsRab11F	63
4.1.3	Vergleich der Computer-generierten dreidimensionalen Strukturmodelle der Proteine MtRab5B und MsRab11F	64
4.2	Lokalisierung von MsRab11F und MtRab5B	65
4.2.1	Erstellung von MsRab11F- und MtRab5B-GFP Fusionen für die Expression in Pflanzen. 65	
4.2.1.1	Erstellung einer MsRab11F-GFP Fusion zur heterologen Expression in <i>E. coli</i> 65	
4.2.1.2	Heterologe Expression und immunologischer Nachweis von nativem und GFP-fusioniertem MsRab11F1 in <i>E. coli</i>	67

4.2.1.3	Erstellung von Konstrukten zur transienten Transformation.....	70
4.2.1.4	Erstellung von Ti-Plasmid basierten Konstrukten zur stabilen Transformation von Versuchspflanzen.....	72
4.2.2	Transiente Expression und Lokalisierung von MsRab11F:GFP und MtRab5B:GFP in Tabak BY-2 Protoplasten.....	75
4.2.2.1	Lokalisierung von MsRab11F1:GFP und MtRab5B:GFP in BY-2 Protoplasten	75
4.2.2.2	Kolokalisierung von MtRab5B:RFP und MsRab11:GFP in Protoplasten.....	76
4.3	Funktionelle Untersuchung von MsRab11F.....	79
4.3.1	Erstellung einer Rab11F1:mGFP6 „loss of function“ Mutante und Lokalisierung in Tabak-Protoplasten.....	79
4.3.2	Einfluss von Brefeldin A auf die MsRab11F1:GFP-Lokalisierung in der Epidermis von Tabakblättern.....	80
4.3.3	Kolokalisierung von MsRab11F:GFP und GmMan1:mCherry in Tabak-Blättern.	81
4.4	Lokalisierung von MsRab11F und MtRab5B in <i>M. truncatula</i> Wurzeln (“hairy root“ Transformation).....	83
4.4.1	Erstellung der transgenen Wurzeln von <i>M. truncatula</i> mittels der hairy root Methode	83
4.4.2	Lokalisierung von MsRab11F1:GFP in <i>M. truncatula</i> Wurzeln.....	83
4.4.3	Lokalisierung von MtRab5B:GFP in <i>M. truncatula</i> Wurzeln.....	85
4.4.4	Kolokalisierung von MsRab11:GFP mit FM4-64 in <i>M. truncatula</i> Wurzeln.....	86
4.5	Lokalisierung von MsRab11F in der <i>S. meliloti</i> Symbiose.....	87
4.5.1	Lokalisierung von MsRab11F:GFP in <i>M. truncatula</i> Knöllchen.....	87
4.5.2	λ -Scans der aus <i>M. truncatula</i> Knöllchen emittierten Fluoreszenz.....	89
4.5.3	Untersuchung der Lokalisierung von Rab11F in <i>M. truncatula</i> - Wurzelknöllchen mittels immunocytochemischer Methoden.....	91
4.5.3.1	Immunologischer Nachweis von Rab11F in Wurzel- und Wurzelknöllchengewebe von <i>M. truncatula</i>	91
4.5.3.2	2D-Gel und Western-blot vom gesamten Proteinextrakt aus <i>M. truncatula</i> -Knöllchen.....	92
4.5.3.3	Lokalisierung des MsRab11F:GFP in transgene <i>M. truncatula</i> Knöllchen.....	93
4.5.3.4	MsRab11F:GFP markierte Strukturen akkumulieren um Infektionströpfchen und umhüllen freigelassene Rhizobien.....	96
4.5.3.5	In jungen infizierten Zellen differenzieren sich die aufgenommenen Bakterien zu Bakteroiden.....	101
4.5.3.6	Während der Differenzierung der infizierten Zellen nimmt die Menge an MsRab11F:GFP markierten Strukturen ab.....	104
4.5.3.7	Reife infizierte Zellen enthalten kein MsRab11F:GFP.....	105
4.5.3.8	Kontrolluntersuchung der Lokalisierung des MsRab11F:GFP in <i>M. truncatula</i> transgenen Wurzeln mittels Anti-GFP-Antikörper.....	107
4.5.4	Rolle von MsRab11F während des Infektionsprozesses.....	108
4.5.4.1	Lokalisierung der Root Nodule Extensine im Infektionsschlauch.....	109
4.5.4.2	Kolokalisierung von Root Nodule Extensinen und MsRab11F im Infektionsschlauch.....	111
4.5.4.3	Kolokalisierung von Root Nodule Extensinen und Rhizobien während der Infektion von Wirtszellen.....	112

4.5.4.4	Kolokalisierung von Root Nodule Extensinen und MsRab11F während der Reifung der Bakterioide.....	114
5	Diskussion	116
5.1	Strukturelle Analyse der kleinen G-Proteine MtRab5b und MsRab11F.....	116
5.1.1	MtRab5B ist ein Homolog von Ara6 aus <i>M. truncatula</i>	116
5.1.2	MsRab11F	116
5.2	MsRab11F lokalisiert am trans-Golgi und an frühen Endosomen.....	118
5.2.1	Die Verteilung und das Bewegungsmuster von MsRab11F markierten Strukturen deuten auf eine Lokalisierung am Golgi hin	118
5.2.2	Die Färbung von transgenen Tabak-Epidermiszellen mit FM4-64 deutet auf eine Lokalisierung von MsRab11F am endosomalen System, dem Golgi oder prävacuolären Strukturen hin.....	120
5.2.3	Der Inhibitor Brefeldin A verändert die Morphologie von MsRab11- markierten Strukturen.....	120
5.2.4	Aus Kolokalisierungsexperimenten mit GmMan1:mCherry und MtRab5B:RFP lässt sich schlussfolgern, dass MsRab11F am trans- Golgi, TGN und frühen Endosomen lokalisiert.	121
5.2.5	MsRab11F koordiniert wahrscheinlich den anterograden Transport zwischen den trans-Golgi Zisternen und dem endosomalen System.....	123
5.2.6	MsRab11F kontrolliert wahrscheinlich den Transport von Membranmaterial zum Infektionsschlauch und den Bakteroiden	125
5.3	Lokalisierung von MsRab11F während der Infektion von Wirtszellen mit Rhizobien .	127
5.3.1	Die Entlassung der Rhizobien aus dem Infektionsschlauch kann in verschiedenen Stadien erfolgen.....	127
5.3.2	Der MAC265-Antikörper markiert die Matrix-Glykoproteine des Infektionsschlauchs	128
5.4	Funktion des MsRab11F während der Endozytose und Differenzierung der Bakterioide	130
5.5	MsRab11F-Vesikel transportieren das vom MAC-265-Antikörper markierte RNE vom Golgi zum Bakteroid	132
5.6	Ausblick	134
6	Literatur	136

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Lokalisierung des kleinen G-Proteins MsRab11F während der Etablierung der Knöllchensymbiose zwischen Leguminosen und *Sinorhizobium meliloti* untersucht. MsRab11F war bereits durch K. Schiene im Rahmen ihrer Promotion isoliert und als Knöllchen-spezifisch exprimiert erkannt worden. Zur Untersuchung der Lokalisierung und Funktion des Proteins wurde in der vorliegenden Arbeit ein MsRab11F-GFP-Konstrukt hergestellt und in drei verschiedene Systeme transformiert: da eine Transformation in die Wurzel von *Medicago truncatula* nur mit geringer Effizienz funktioniert, wurde das MsRab11F:GFP-Konstrukt außerdem in BY-2-Protoplasten von *Nicotiana tabacum* und Blattepidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* transformiert. In allen drei Systemen lokalisierte das MsRab11F-GFP-Fusionsprotein an etwa 1 µm großen Strukturen, die sich aktiv durch das Cytoplasma der Pflanzenzellen bewegten. Eine dominant-inaktive Mutante von MsRab11F hingegen war unspezifisch im Cytoplasma verteilt. Die Behandlung der transgenen Wurzeln mit dem Membranfarbstoff FM4-64 deutet darauf hin, dass MsRab11F an membranumhüllten Kompartimenten lokalisiert.

Durch Zugabe von Brefeldin A (BFA) zu transgenen Blattepidermiszellen aggregierten die durch MsRab11F markierten Strukturen im Cytoplasma. Da BFA als Inhibitor des Vesikeltransports im Golgi-Apparat bekannt ist, deutet dies darauf hin, dass MsRab11F an Golgi-Zisternen lokalisiert. Die Kolokalisierung von MsRab11F mit dem cis-Golgimarker GmMan1:mCherry in Blattepidermiszellen bestätigte dies und zeigte, dass MsRab11F an den trans-Golgi-Zisternen lokalisiert. Ein weiterer Kolokalisierungsversuch ergab eine teilweise Überlappung der Lokalisierung von MsRab11F und MtRab5B. Hieraus konnte abgeleitet werden, dass MsRab11F auch an frühen Endosomen lokalisiert sein muss.

Während der Etablierung der Knöllchensymbiose lokalisierte MsRab11F an der Spitze der Infektionsschläuche und in jungen infizierten Zellen an der Peribakteroidmembran. Gleichzeitig konnte eine Kolokalisierung von MsRab11F mit Matrixproteinen an den punktförmigen Strukturen um die Infektionsschlauchspitze nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass MsRab11F den Vesikeltransport von den trans-Golgi-Zisternen zum frühen Endosom und von dort aus weiter zu den symbiontischen Membranen reguliert. Durch die Vesikeln werden die Membranmaterialien und Matrixproteine zu den symbiontischen Strukturen transportiert.

2 Einleitung

2.1 Stickstoff-Fixierung

Stickstoff ist eines der häufigsten Elemente auf der Erde und tritt in drei Hauptreservoirien auf nämlich der Lithosphäre, der Atmosphäre und der Biosphäre. Die komplexen Verhältnisse zwischen diesen Reservoirien bilden den Stickstoffzyklus. Die Lithosphäre enthält die größten Reserven an Stickstoff, aber nur ein kleiner Teil ist für Pflanzen zugänglich, da diese Stickstoffverbindungen nur in Form von Nitrat oder Ammonium aufnehmen können (Ramos und Bisseling, 2004). Etwa 80% der Atmosphäre besteht aus gasförmigem Stickstoff (N_2), der ebenfalls nicht für Pflanzen zugänglich ist. N_2 ist aber das Substrat der Stickstoff-Fixierung, deren Produkte die Hauptquelle zur Stickstoff-Versorgung für alle Organismen sind. Die Fixierung erfolgt zu 13% physikalisch-chemisch durch Blitze und zu 87% biologisch. 80% der biologischen Fixierung geschieht durch Symbiosen und 20% durch frei lebende Organismen (Gutschick 1980, Vance 1988). Die Menge des fixierten Stickstoffs beträgt jährlich etwa 230 Megatonnen.

Die industrielle Stickstoff-Fixierung wurde von Fritz Haber entwickelt und von Robert Bosch in großtechnischem Maßstab umgesetzt. Das Verfahren wird als Haber-Bosch-Verfahren bezeichnet. Es besteht darin, den Luftstickstoff mit Wasserstoff zu Ammoniak umzusetzen. In den dann folgenden Schritten stellt man daraus Salpetersäure und Nitrate her. Der größte Teil dieser Substanzen geht unmittelbar in die Kunstdünger-Produktion. Der Nachteil des Haber-Bosch-Verfahrens ist, dass sehr viel Energie verbraucht wird. Die übermäßige Benutzung von künstlichen Düngern ist außerdem eine Umweltgefahr.

2.2 *Rhizobium* - Leguminosen Symbiose

Rhizobium ist der allgemeine Name für eine Gruppe von kleinen, stäbchenförmigen, obligat aeroben, gram-negativen Bakterien. Diese Bakterien sind in der Lage die Wurzeln oder selten die Stämme von Leguminosen zu infizieren. Dadurch entsteht ein neues Pflanzenorgan, das so genannte Knöllchen. Die Bakterien leben im Knöllchen, fixieren den Luftstickstoff und reduzieren ihn zu Ammonium. Diesen stellen die Bakterien der Wirtspflanze zur Verfügung. Als Gegenleistung liefert die Pflanze Kohlenhydrate, die den Bakterien als Nahrungsquelle dienen. Die Leguminosen sind über verschiedene Klimate weit verbreitet. Drei Taxa der Leguminosen bilden Knöllchen: Ceasalpinioidae, Mimosoideae und Papilionoideae (Defaria et al. 1989). Leguminosen gehören zu den wichtigsten landwirtschaftlichen Pflanzen.

Die Rhizobien - Leguminosen Symbiosen sind bei vielen Pflanzen aus der Gruppe Papilionoidae, z.B. *Pisum sativum*, *Vicia sativa*, *Medicago sativa*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus* und *Sesbania rostrata*, untersucht worden. Zwei Symbiose-Modelle, nämlich *M. truncatula-Sinorhizobium meliloti* für nicht-determinierte Knöllchen und *L. japonicus-Mesorhizobium loti* für determinierte Knöllchen, haben sich etabliert (Cook 1999, Stougaard 2001, Udvardi 2001). Die beiden Pflanzen besitzen ein kleines diploides Genom und sind autogam. Sie haben eine kurze Generationszeit, eine große Saatproduktion und sind transformierbar. Die Genome der beiden Pflanzen wurden zum großen Teil bereits sequenziert. Die Genome der bakteriellen Partner sind bereits sequenziert worden (VandenBosch and Stacey 2003).

2.3 Erkennungsprozesse der Knöllchensymbiose

Die Entwicklung von Wurzelknöllchen beginnt nach spezifischen Erkennungsprozessen zwischen Wirtspflanze und Rhizobien. Die Wirtspflanze scheidet Flavonoide, z.B. Luteolin und Naringenin, in die Rhizosphäre aus (Bladergroen and Spaik 1998, Charrier et al. 1995, Shirley 1996). Die Rhizobien werden dadurch chemotaktisch angezogen und sammeln sich als Biofilm an der Wurzeloberfläche (Caetanoanollés and Gresshoff 1991). Die Flavonoide werden vom konstitutiv exprimierten NodD-Protein der Rhizobien erkannt und binden an dieses (Li et al. 2008). Das NodD-Protein dient als transkriptionaler Aktivator des Nodulations-Operons indem es an die Promotoren von *nod*-Genen bindet und die Expression von weiteren Nodulationsgenen (*nod*-Gene) in den Rhizobien induziert (Long 1996, Mulligan and Long 1985, Perret et al. 2000, Shearman et al. 1986, Zuanazzi et al. 1998). Die *nod*-Gene codieren für verschiedene Enzyme, die für die Generierung eines Nod-Faktors (Lipo-chitooligosaccharid) durch die Bakterien verantwortlich sind. Der Nod-Faktor wird von Bakterien sezerniert und seinerseits von der Wirtspflanze spezifisch erkannt.

Die für die Nod-Faktor Synthese verantwortlichen Enzyme werden von den Genen *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodI* und *nodJ* codiert, die in allen bisher untersuchten Rhizobien gefunden worden sind. Die Gene *nodA*, *nodB* und *nodC* codieren für das Rückgrat des Nod-Faktors, das sich aus β -1-4-verknüpften N-Acetyl-D-Glucosamin-Resten (GlcNAc)_n zusammensetzt. Mutationen der *nodA*, *nodB* und *nodC* Gene können zu einem vollständigen Verschwinden aller Pflanzenantworten auf die Bakterien führen (Denarie et al. 1992, Fisher and Long 1992). Die *nodI* und *nodJ*-Gene sind an der Sekretion des Nod-Faktors beteiligt (Spaik et al. 1995). Neben den Genen für die Nod-Faktor-Synthese werden durch NodD noch andere Gene induziert, die allerdings zwischen den verschiedenen Bakterien nicht konserviert sind und wirtsspezifische Funktionen erfüllen.

Das Nod-Faktor-Rückgrat wird weiter von artspezifischen Nodulationsgenprodukten modifiziert (siehe Abb. 2-1) (Broughton et al. 2000, Schultze and Kondorosi 1995). *S. meliloti* z.B. enthält die Proteine NodP, NodQ und NodH, die der ATP-Sulphurylase, der Adenosin-5'-Phosphosulfatkinase und der Sulphotransferase homolog sind. Sie kontrollieren die Sulfat-Bindung an das Rückgrat des Nod-Faktors. Ohne Sulfat-Modifikation am Nod-Faktor wird keine Symbiose zwischen *S. meliloti* und *M. sativa* oder *M. truncatula* etabliert (Roche et al. 1991, Schwedock and Long 1990, Truchet et al. 1991).

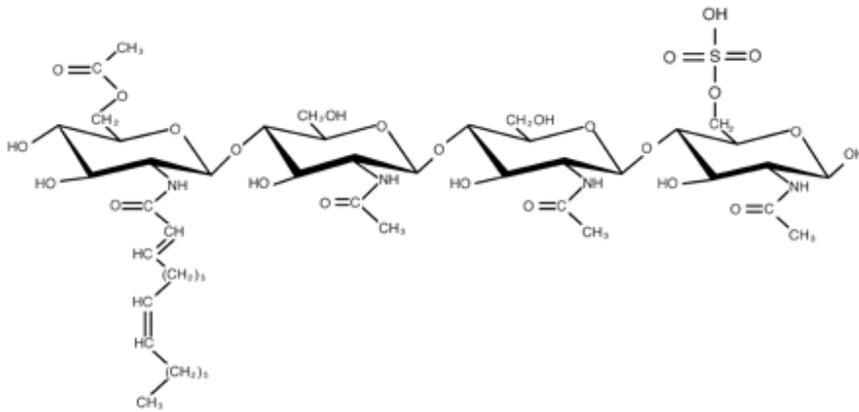


Abb. 2-1: *S. meliloti* Nod-Faktor (Albrecht et al. 1999).

Die Nod-Faktoren sind Signalmoleküle und induzieren viele der Pflanzenantworten, die während der frühen Phasen der Symbiose vor der Entwicklung des Infektionsschlauchs bemerkbar sind. Als erstes verursachen die Nod-Faktoren, sofort nach der Aufnahme, eine Ca²⁺-Zufuhr an der Spitze des Wurzelhaars (Amor et al. 2003, Felle et al. 1999, Shaw and Long 2003). Innerhalb weniger Sekunden folgt dann ein Abfluss von Cl⁻ aus den Wurzelhaaren. Die Plasmamembran wird dadurch vorübergehend depolarisiert (Ehrhardt et al. 1992, Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995). Die Membrandepolarisation wird durch einen K⁺ Ausfluss gestoppt. Die Repolarisation erfolgt durch die Aktivität der H⁺-Pumpe (Felle et al. 1998). Ca. 9 min nach der Zugabe des Nod-Faktors wird eine Oszillation der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration einmal pro Minute im perinukleären Bereich detektiert (Shaw and Long 2003). Dies wird auch als Ca²⁺-Spiking bezeichnet. Gleichzeitig werden die Aktin- und Mikrotubuli-Netzwerke an der Spitze des Wurzelhaars neu organisiert (Timmers et al. 1999, Voigt et al. 2005). Außerdem wird innerhalb von 20-30 min die Pflanzenabwehr unterdrückt (Shaw and Long 2003).

Die früheste beobachtbare morphologische Veränderung ist die Einstellung des Wachstums an der Wurzelhaarspitze (siehe Abb. 2-2). Die Anzahl der zytoplasmatischen Stränge nimmt zu (Sieberer and Emons 2000). Innerhalb 1 Stunde nach der Aufnahme von Nod-Faktoren beginnt die Wurzelhaarspitze

anzuschwellen (Heidstra et al. 1994). Diese Anschwellung ist charakteristisch für Wurzelhaare mit hohem Kalziumgehalt (de Ruijter et al. 1998). Darauf heften sich die Rhizobien an das Wurzelhaar. Dabei verstärken Lektine der Pflanze diese Bindung (Dazzo et al. 1984, Smit et al. 1992) Die lokal ausgeschiedenen Nod-faktoren verursachen an der Anheftungsstelle eine Neuausrichtung der Wurzelhaarspitze (Esseling et al. 2003). Sie wächst weiter in Richtung der Nod-Faktor-produzierenden Rhizobien. Dadurch entsteht eine Wurzelhaarkrümmung. Auf diese Art werden die Bakterien allmählich innerhalb einer Struktur eingefangen, die einem Schäferstab ähnelt und daher im Englischen als „Shepherd’s crook“ bezeichnet wird (Vanbatenburg et al. 1986). An dieser Stelle wird der Infektionsschlauch gebildet, durch den die Rhizobien in die Pflanze gelangen.

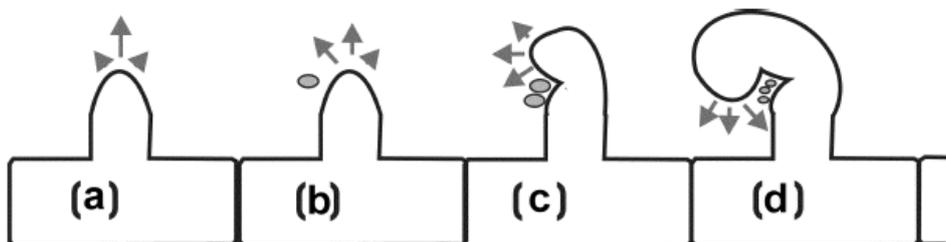


Abb. 2-2: Darstellung der Wurzelhaardeformation durch Nod-Faktoren, abgeordnet von einem Bakterium oder von einer Bakterienkolonie (Brewin 2004). (a) normales Wurzelhaarwachstum (b) durch ein Bakterium abgesonderte Nod-Faktoren verursachen ein ungleichmäßiges Zellwandwachstum (c) durch weitere Abgabe von Nod-Faktoren aus den sich teilenden Bakterien und dem dadurch verursachten unregelmäßigen Zellwandwachstum kommt es zur Krümmung des Wurzelhaars (d).

Bevor sich der Infektionsschlauch formt, aktiviert der Nod-Faktor die Zellteilung der Kortezellen, die sich später zum Knöllchenprimordium entwickeln (siehe Abb. 2-3). Bei manchen Leguminosen, z.B. Alfalfa, wird allein durch die Wirkung des Nod-Faktors, ohne eine Infektion durch Rhizobien ein vollständiges Knöllchen gebildet (Truchet et al. 1991). Dieses Knöllchen fixiert natürlich mangels der symbiontischen Rhizobien keinen Stickstoff. Es hängt von den Wirtspflanzen ab, an welcher Stelle des Kortex das Knöllchenprimordium entsteht. Bei determinierten Knöllchen entsteht es im äußeren oder mittleren Kortex. Bei nicht-determinierten Knöllchen entwickelt sich das Primordium im inneren Kortex, aber auch im äußeren Kortex wird die Zellteilung aktiviert. Hier beenden die Zellen ihre Teilung allerdings nicht, sondern bleiben in der G2-Phase stehen (Yang et al. 1994) und formen eine cytoplasmatische Brücke, den so genannten Präinfektionsschlauch, der für die nicht-determinierte Nodulation unentbehrlich ist (van Brussel et al. 1992). Einige determinierte Knöllchen-bildende Pflanzen, z.B. *L. japonicus*, formen auch einen Präinfektionsschlauch (van Spronsen et al. 2001). Eine der letzten Antworten des Wurzelhaars auf die Nod-Faktoren ist die Expression von verschiedenen Symbiose-spezifischen Pflanzengen. Diese werden als frühe Nodulin-Gene oder ENOD-Gene

bezeichnet. Die Expression der ENOD-Gene erstreckt sich von etwa einer Stunde bis zu mehreren Stunden. ENOD11 und ENOD12 werden bereits nach wenigen Stunden exprimiert (Catoira et al. 2000, Heidstra et al. 1997, Horvath et al. 1993, Journet et al. 1994).

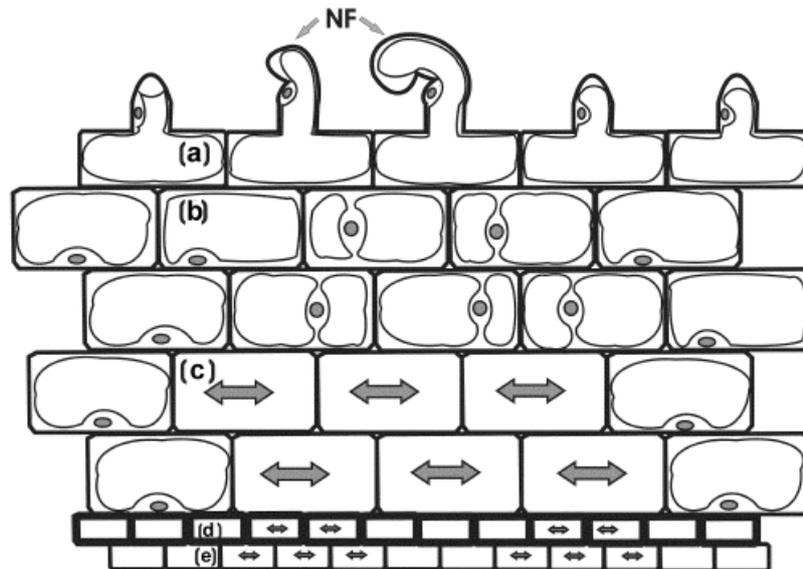


Abb. 2-3: Die Wirkung von Nod-Faktoren in der Wurzel von Pflanzen, die nicht-determinierte Knöllchen bilden (Brewin 2004). (a) Wurzelhaardeformation (b) Zellzyklus-Aktivierung im äußeren Kortex führt zur Zentralisierung von Zellkernen und zur Bildung von transzellulären zytoplasmatischen Strängen. (c) Die Zellteilung im inneren Kortex führt zur Entwicklung des Knöllchenmeristems. (d) und (e) Zellteilung in der Endodermis und den Perizyken führt zur Entwicklung von Knöllchenleitbündeln und äußerem Knöllchenkortex.

2.4 Infektionsprozesse der Knöllchensymbiose

Im Zentrum des gekrümmten Wurzelhaars sich eine Tasche, in der die Rhizobien eingefangen werden. In dieser Infektionstasche, auch als „hyaline spot“ bezeichnet, wird die Zellwand lokal aufgelöst (Bauer 1981). Die Rhizobien dringen in diese Öffnung ein und gleichzeitig erfolgt eine Einstülpung der Plasmamembran, welche die Rhizobien vom Zytoplasma der Wurzelhaarzelle abgrenzt. Anschließend wird die Zellwand neu gebildet. Zusammen mit der sich einstülpenden Plasmamembran bildet sie eine schlauchähnliche Struktur, der so genannte Infektionsschlauch (siehe Abb. 2-4). Die Bakterien vermehren sich darin und führen dazu, dass der Schlauch in Richtung der Wurzelhaarbasis wächst. Die Bedingungen innerhalb des Infektionsschlauchs entsprechen denen im extrazellulären Raum (Brewin 1991). Die Bakterien sind im Infektionsschlauch von ihren eigenen Exopolysacchariden und von Matrix pflanzlichen Ursprungs umgeben. Die Matrix des Infektionsschlauchs besteht aus verschiedenen Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen (HRGP), die auch als Extensine bezeichnet werden. Dazu gehören auch die frühen Nodulinproteine, z.B. ENOD11, ENOD12, ENOD16, ENOD20 und ENOD5 (Brewin 2004).

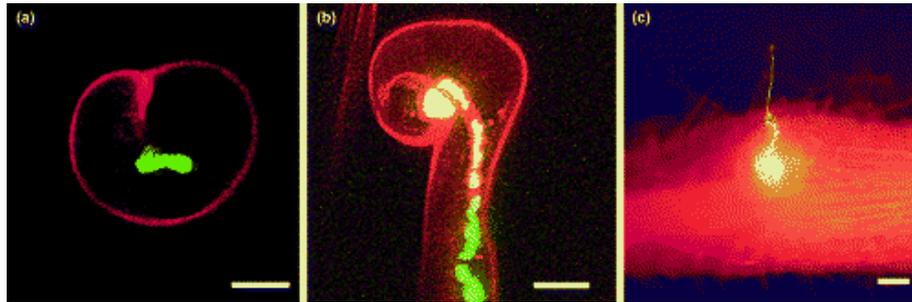


Abb. 2-4: Infektionsprozesse bei Rhizobium-Leguminosen-Symbiose (Geurts 2005). A) Querschnitt eines gekrümmten Wurzelhaars, in dessen Zentrum GFP exprimierende *S. meliloti* Bakterien eingefangen sind. Die Zellwand wird durch Propidiumiodid rot gefärbt. Im Hyalinen Spot sind die Bakterien so fest eingepackt, dass die Zellwand nicht mehr sichtbar wird. B) Der Infektionsschlauch wächst innerhalb des Wurzelhaares auf den Wurzelkortex zu. C) Der Infektionsschlauch wächst in Richtung eines Knöllchenprimordiums, das sich im inneren Kortex bildet.

Wenn der Infektionsschlauch die Basis des Wurzelhaars erreicht, werden die Bakterien in den Interzellularraum entlassen. Der Infektionsschlauch wächst dann durch den äußeren Kortex mittels einer zytoplasmatischen Brücke, dem so genannten Präinfektionsschlauch, hindurch (van Brussel *et al.*, 1992).

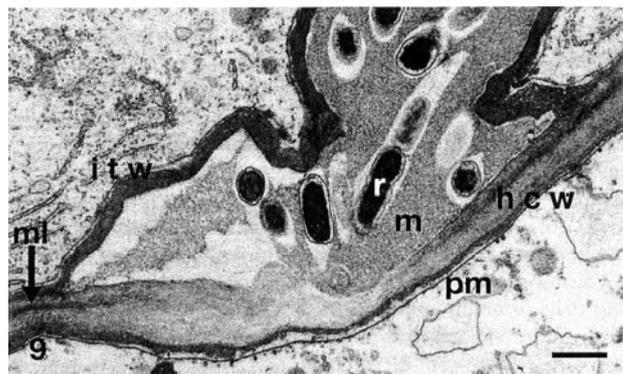


Abb. 2-5: Die Wand und die Membran des Infektionsschlauches fusioniert mit der Zellwand und Plasmamembran einer Kortexzelle (van Spronsen *et al.*, 1994). Die Rhizobien befinden sich im Interzellularraum. Die Zellwand gegenüber der cytoplasmatischen Brücke ist modifiziert. Die Mittellamelle ist nicht mehr vorhanden und die Zellwand ist weniger elektronendicht. hcw = Wirtszellwand, itw = Infektionsschlauchwand, m = Matrix, ml = Mittellamelle, pm = Plasmamembran, r = Rhizobium. Maßstab = 1 μm .

Wenn der Infektionsschlauch das Knöllchenprimordium im inneren Kortex erreicht, werden die Rhizobien durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. Während dieses Prozesses bildet sich an der Spitze des Infektionsschlauches ein Infektionströpfchen, welches als zellwandfreie, mit blasenförmigen Ausstülpungen versehene Struktur leicht zu erkennen ist. Die Rhizobien im Inneren des Infektionströpfchens werden durch fortgesetzte Teilung gegen die Membran gedrückt, die sich dadurch um die Bakterien herum legt. Im weiteren Verlauf werden die Rhizobien komplett von der Membran eingeschlossen, die sich vom Infektionströpfchen abschnürt und zusammen mit den Rhizobien ins

Cytoplasma entlassen wird (siehe Abb. 2-6). Die Rhizobien werden dann Bakterioide genannt (Vasse et al. 1990). Die Membran, welche die Rhizobien umschließt, wurde im Jahr 1958 mit Hilfe von Dünnschicht-Elektronenmikroskopie entdeckt (Bergersen and Briggs 1958) und Peribakteroidmembran (PBM) genannt. Sie besteht aus einer herkömmlichen Membrandoppelschicht mit 9-10 nm Dicke (Dart and Mercer 1963).

Die PBM hat zwei Funktionen. Zum einen dient sie als physiologische Barriere und trennt die Bakterioide vom Wirtszytosol ab. Die Bakterioide befinden sich dadurch physiologisch gesehen weiterhin im extrazellulären Raum. Dadurch wird verhindert, dass die Bakterioide als Parasiten erkannt werden. Bei Mutanten-Knöllchen, die früh die Peribakteroidmembran verlieren, werden 10-100-fach mehr Phytoalexine als in Wildtyp-Knöllchen produziert (Werner et al. 1988). Phytoalexine werden aus den Pflanzen ausgeschieden um Mikroorganismen abzuwehren. Zum anderen reguliert die PBM den Transport der Stoffwechselprodukte zwischen den symbiotischen Partnern (Udvardi and Day 1997).



Abb. 2-6: Elektronenmikroskopische Aufnahme des zellwandfreien Infektionströpfchens (Newcomb 1976). Die Masse der Infektionsschlauchwand nimmt in Richtung der Spitze ab. Hier berühren die Bakterien die Infektionsschlauchmembran (Pfeilkopf) und werden allmählich vom Infektionsschlauch befreit. B = Bakterien, CW = Zellwand, UD = unwalled droplet. $\times 16650$.

Sobald die Rhizobien von der Wirtszelle aufgenommen wurden, beginnen sie sich zu teilen und differenzieren sich zu stickstofffixierenden Bakteroiden (Brewin 1991). Bei nicht-determinierten Knöllchen teilt sich die Peribakteroidmembran gleichzeitig mit den Bakteroiden. Dadurch wird jedes einzelne Bakteroid von einer Membran umgeben (siehe Abb. 2-6) (Robertson and Lyttleton 1984). In determinierten Knöllchen ist die Teilung der PBM nicht an die Teilung der Bakterioide gekoppelt.

Deswegen sind mehrere Bakterioide von einer Peribakteroidmembran umschlossen (Goodchild and Bergersen 1966).

2.5 Knöllchenentwicklung und Gewebeorganisation

Wenn der Infektionsschlauch das Primordium erreicht, beginnt sich das Gewebe zum Knöllchen zu differenzieren. Die Knöllchen werden aufgrund unterschiedlicher Morphologie in determinierte und nicht-determinierte Knöllchen eingeteilt. Der Unterschied zwischen beiden ist, dass das nicht-determinierte Knöllchen ein persistentes Meristem besitzen. Bei determinierten Knöllchen endet die meristematische Aktivität bereits in einer frühen Phase der Entwicklung. Da das nicht-determinierte Knöllchen ständig von seinem Meristem an der Spitze mit neuen Zellen versorgt wird, besitzt es eine längliche zylindrische Form (siehe Abb.2-7). Das Gewebe des nicht-determinierten Knöllchens besteht aus Zellen, die sich in verschiedenen Stufen der Entwicklung befinden und wird entsprechend in fünf verschiedene Zonen eingeteilt: Zone I (Meristemzone), Zone II (Infektionszone), Zone II-III (Zwischenzone), Zone III (Stickstoff-Fixierungszone) und Zone IV (Seneszenzzone) (Vasse et al. 1990). Das Meristem besteht aus kleinen, unbegrenzt teilungsfähigen Zellen, die proximal ständig neue Zellen abgeben. Zellen, die sich nicht mehr teilen, werden von Bakterien infiziert. Die Bakterioide teilen sich einige Male und differenzieren zu stickstofffixierenden Bakteroiden. Durch die ständige Neuinfektion von Zellen kommt es zu einer kontinuierlichen Stickstoff-Fixierung. Die Seneszenzzone ist bei älteren Knöllchen zu finden und liegt an der Basis des Knöllchens.

Bei determinierten Knöllchen entwickelt sich das Gewebe anders. Die Knöllchen-Zellen sind ungefähr im gleichen Alter, weil sie kein Meristem besitzen. Nach der Infektion mit Rhizobien teilen sie sich die Pflanzenzellen und Bakterioide einige Male, stellen dann aber ihre Teilungsaktivität ein. Die Größe des determinierten Knöllchens hängt daher hauptsächlich von der Größe der infizierten Zellen ab. Das Knöllchen besitzt schließlich eine kugelförmige Form und sein Gewebe ist homogen. Die Stickstoff-Fixierung ist bei determinierten Knöllchen eine transiente Erscheinung. Altert das Knöllchen, breitet sich Seneszenz vom Zentrum nach außen hin aus. Die Gewebesichten der beiden Knöllchentypen sind ähnlich. Das zentrale Gewebe enthält die infizierten Zellen mit Bakteroiden und die nicht-infizierten Zellen. Um das zentrale Gewebe herum befinden sich Knöllchenparenchym, Endodermis und Knöllchenkortex. Im Knöllchen-parenchym befinden sich Knöllchenleitbündel, die aus Perizyklen entstanden sind.

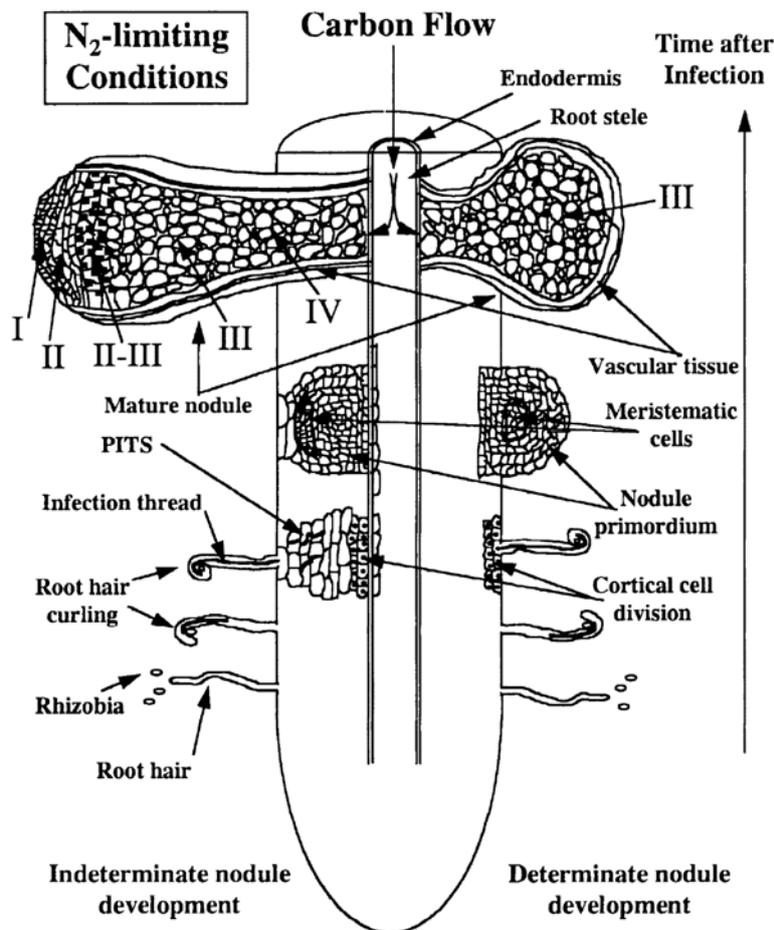


Abb. 2-7: Entwicklung von nicht-determiniertem und determiniertem Knöllchen (Crespi and Galvez 2000). Rhizobien heften sich an das Wurzelhaar und verursachen eine Wurzelhaarkrümmung. Beim nicht-determinierten Knöllchen wird die Zellteilung der Perizyklen und des inneren Kortex aktiviert, beim determinierten Knöllchen des äußeren Kortex. Die Zellen formen Knöllchenprimordien, die große Mengen von Amyloplasten enthalten. Mittels des Infektionsschlauchs gelangen die Rhizobien zu den Knöllchenprimordien und infizieren die Zelle. Beim nicht-determinierten Knöllchen bildet sich an der Spitze ein Knöllchenmeristem, dadurch entsteht eine zylindrische Form mit verschiedenen Zonen. Das determinierten Knöllchen besitzt kein Meristem, besteht aus gleich alten Zellen und deswegen ist kugelförmig.

2.6 Suppression der Pflanzenabwehr während des Infektionsprozesses

Rhizobien scheiden auf ihren Oberflächen schleimige Substanzen aus, die aus Polysacchariden bestehen. Diese werden in vier verschiedene Hauptgruppen eingeteilt, nämlich kapsuläre Polysaccharide (KPS oder K-Antigen), extrazelluläre Polysaccharide auch als Exopolysaccharide (EPS) bezeichnet, zyklische Glukane und Lipopolysaccharide (LPS). KPS bilden eine kohäsive zusammenhängende Schicht an der Zelloberfläche. EPS bilden eine Schicht, die keine oder geringe Verbindung mit der Zelle hat. Zyklische Glukane befinden sich im periplasmatischen Raum und

spielen eine wichtige Rolle bei der osmotischen Anpassung der Zelle. LPS sind an der äußeren Membran verankert. LPS und EPS sollen eine wichtige Rolle bei Etablierung der Symbiose haben (Becker A. and Pühler 1998).

2.6.1 Funktion der Exopolysaccharide während der Infektion

Die Exopolysaccharide (EPS) von *S. meliloti* sind am intensivsten untersucht worden und werden in zwei verschiedene Typen eingeteilt: EPS I und EPS II. Exopolysaccharid I (EPS I) oder Succinoglykan ist ein komplex verzweigtes Heteropolysaccharid und besteht aus sich wiederholenden Oktasacchariduntereinheiten, die jeweils aus sieben Glukose- und einem Galaktosemolekül aufgebaut sind (siehe Abb. 2-8). Die Glukose- und Galaktosemoleküle sind durch β -1,3, β -1,4 und β -1,6 glycosidisch verknüpft. Die Untereinheiten können durch Acetyl-, Pyruvyl- oder Succinylgruppen ergänzt sein. Das Exopolysaccharid II (EPS II) oder Galactoglucan unterscheidet sich strukturell deutlich von EPS I (Her et al. 1990, Zevenhuizen 1997). EPS II wird nur bei Phosphat-Mangel (Zhan et al. 1991) oder bei Mutanten mit einem Defekt der *mucR*- (Keller et al. 1995, Zhan et al. 1989) oder *expR*-Gene (Glazebrook and Walker 1989, Pellock et al. 2002) synthetisiert. EPS II ist ein Polymer aus sich wiederholenden Disacchariduntereinheiten, die jeweils aus einer acetyl-substituierten Glukose und einer pyruvyl-substituierten Galaktose aufgebaut sind. Die substituierten Glukose- und Galaktosemoleküle sind α -1,3 und β -1,3 verknüpft (Her et al. 1990). Beide Exopolysaccharide kommen in einer hochmolekularen (HMW) und einer niedermolekularen (LMW) Form vor. Die HMW-Fraktion besteht aus hunderten bis tausenden Untereinheiten mit einer Größenordnung zwischen 10^6 - 10^7 Da. Die LMW-Fraktion besteht aus Monomeren, Dimeren und Trimeren der Oktasacchariduntereinheiten für EPS I und Oligomeren (15-20) der Disacchariduntereinheiten für EPS II (Gonzalez et al. 1996, Gonzalez et al. 1998, Wang et al. 1999).

Walker 1992, Wang et al. 1999). Deshalb wird vermutet, dass die LMW-EPS als Signalmoleküle beim Invasionsprozess wirken und die Pflanzenabwehr unterdrücken. Die Strukturen von EPS I, EPS II und KPS sind zwar sehr unterschiedlich, dennoch können sie sich während des Infektionsprozesses als Suppressoren der Pflanzenabwehr funktionell ersetzen.

2.6.2 Funktion der Lipopolysaccharide während der Infektion

Neben EPS spielen Lipopolysaccharide (LPS) eine wichtige Rolle beim Infektionsprozess während der Symbioseetablierung. Die LPS der Rhizobien besitzen den gleichen Aufbau wie die LPS der Enterobakterien. Sie bestehen aus drei Abschnitten, dem Lipid A, das in der äußeren Membran verankert ist, der Kernzone (Core-Antigen) und der O-spezifischen Seitenkette (O-Antigen) (siehe Abb. 2-9). Die Struktur des Lipid A ist in allen gram-negativen Bakterien stark konserviert. Im Gegensatz zum Lipid A ist die Struktur des O-Antigens sehr variabel und Stamm-spezifisch. *Sinorhizobium* spp. Bakterienkulturen produzieren normalerweise zwei Formen von LPS, nämlich raue LPS (R-LPS) und glatte LPS (S-LPS). Das R-LPS besteht aus Lipid A und Core-Antigen. Das S-LPS hat die gleiche Struktur wie R-LPS, nur ist hier noch das O-Antigen beigefügt. Bisher ist noch nicht bekannt, mit welcher Struktur die LPS an der Initiierung und Etablierung der Symbiose beteiligt sind. Die *lpsB*-null Mutante von *S. meliloti* besitzt eine drastische Veränderung in der LPS-Kernzone, trotzdem kann das O-Antigen daran binden (Campbell et al. 2002). Diese Mutante löst bei *M. sativa* die korrekte Bildung eines Infektionsschlauchs aus und kann die Pflanzenzellen erfolgreich infizieren. Aber die Bakterien können sich nicht in stickstofffixierenden Bakterioide differenzieren und werden vorzeitig seneszent. Die infizierten Zellen enthalten mehrere Vakuolen und wenige Bakterioide, die anormal erscheinen. Hier differenzieren sich die Peribakteroidmembranen vermutlich zu Vakuolen, die ihre eigenen Bakterioide verdauen. Dieser Vorgang passiert bei den Wildtyp-Bakterien erst während der Seneszenz. Es scheint hier, dass die Pflanze die Mutante als Pathogen erkennt. Da die LPS die Pflanzenabwehr unterdrücken, löst die Mutante mit defektem LPS die Pflanzenabwehr aus (Steinmann et al. 1997). Es ist bisher nicht geklärt, warum in diesem Fall die Pflanzenabwehr nicht gleich bei der Bildung des Infektionsschlauchs ausgelöst wird.

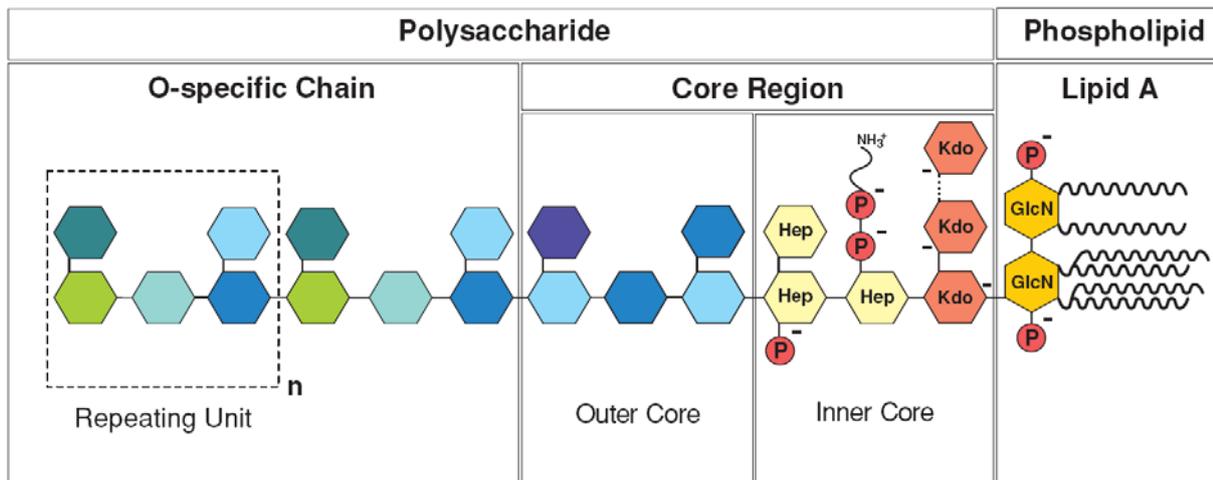


Abb. 2-9: Allgemeine Struktur der Lipopolysaccharide von gram-negativen Enterobakteria (Alexander and Rietschel 2001). LPS besteht aus dem Membran verankernden Lipid A und einem kovalent verbundenen Polysaccharidanteil, der in die Kernregion und das O-Antigen unterteilt wird. Die innere Kernregion enthält den Zucker 3- deoxy-D-manno-2-octulosonosyl (Kdo) sowie L- oder D-glycero-D-manno-heptosen (Hep) und weitere Phosphatgruppen. Die äußere Kernregion besteht vorwiegend aus Hexosen (Hex). Das O-Antigen besteht aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten, deren Strukturen stark variieren. Abkürzungen: GlcN – Acetylglucosamin, Kdo – Ketodesoxyoctonsäure, Hep – Heptose, P – Phosphat.

Die LPS-Mutante Rm6963 von *S. meliloti* hat einen Defekt in der *lpsB*-Region. Sie bildet in *M. sativa* ein stickstofffixierendes Knöllchen, nicht aber in *M. truncatula* (Niehaus et al. 1998). Das von Rm6963 in *M. truncatula* induzierte Knöllchen enthält im Vergleich zum Wildtyp-Knöllchen einen anormal großen Infektionsschlauch. Die Bakterien können sich nicht zu reifen Bakteroiden differenzieren, und wie die *lpsB*-null Mutante enthalten die infizierten Zellen wenige Bakterioide und mehrere Vakuolen. Wildtyp-Rhizobien modifizieren ihre LPS während der Differenzierung der Bakterioide. Die LPS werden hydrophober wodurch der Kontakt zwischen Bakterienmembran und Peribakteroidmembran verbessert wird. Die Modifizierung der LPS in verschiedenen Entwicklungsstufen wird vermutlich dafür benötigt um die Induktion der Pflanzenabwehr zu verhindern.

2.7 Entwicklung der Peribakteroidmembran

Während des Infektionsprozesses werden Rhizobien durch Endozytose in die Wirtszellen aufgenommen und dabei von einer Membran pflanzlichen Ursprungs, die so genannte Peribakteroidmembran umhüllt. Wie schon in Abschnitt 2.4 erwähnt, teilen sich die Bakterioide bei nicht-determinierten Knöllchen nach der Infektion weiter, wobei jedes einzelne Bakteroid von einer Membran umgeben bleibt (Robertson and Lyttleton 1984). Da eine infizierte Zelle Tausende von membranumhüllten Bakterien enthält, benötigt die Zelle enorme Mengen an Membranmaterialien. Die

Fläche der Plasmamembran einer infizierten Zelle beträgt $2800 \mu\text{m}^2$, während sich die Flächen der Peribakteroidmembranen der gleichen Zelle aber zu $21500 \mu\text{m}^2$, also mehr als dem Siebenfachen, summiert (Roth and Stacey 1989). Die Ausbildung der Symbiose geht also mit einer enormen Zunahme von Membranstrukturen einher. Ein bekannter Mechanismus zum Transport von Membranmaterialien zwischen verschiedenen Kompartimenten eukaryotischer Zellen ist der Transport mittels Vesikeln. Vesikel sind kleine membranumschlossene Räume, mit deren Hilfe Proteine und andere Zellbestandteile zielgerichtet transportiert werden können. Es gibt verschiedene Typen von Vesikeln, die im Grunde aber alle ähnlich reguliert werden. Die Abschnüren von der Donormembran und das Verschmelzen mit der Ziellmembran unterliegen immer der Kontrolle durch kleine GTP-bindende Proteine (G-Proteine). Die spezifische Erkennung von Vesikel und Ziellmembran wird dabei durch weitere Proteine aus der SNARE-Familie gewährleistet (siehe Abschnitt 2.7.3). Eine wesentliche Gruppe von kleinen G-Proteinen, die die meisten aller Vesikel regulieren, sind Rab-Proteine. Diese kommen in allen Eukaryoten vor. In *Homo sapiens* wurden bereits ca. 60 (Stenmark and Olkkonen 2001), in *Arabidopsis thaliana* 57 und in *Saccharomyces cerevisiae* 11 Rab-Proteine identifiziert. Die Rab-Proteine im tierischen System wurden intensiver untersucht als im pflanzlichen. Da die Funktionen der Rab-Proteine hoch konserviert sind, basieren die meisten Kenntnisse über die Rab-Proteine der Pflanzen auf dem Vergleich mit ihrem evolutionären Gegenstück des anderen Systems. Manche Funktionen der Rab-Proteine in Pflanzen sind jedoch einzigartig.

2.7.1 Die Struktur der Rab-Proteine

Die Rab-Proteine gehören zur Ras-Superfamilie, einer der größten Proteinfamilien in Eukaryoten. Sie sind monomere Proteine mit einer Masse von 20-30 kDa. Aufgrund ihrer Fähigkeit GTP zu hydrolysieren werden sie auch als monomere GTPasen bezeichnet. Die Rab-Proteine besitzen einen einheitlichen Grundaufbau, der aus fünf α -Helices, sechs β -Faltblättern und fünf Polypeptidschlingen (loops) besteht (BOURNE et al., 1991) (siehe Abb. 2-10). Diese Schlingen, auch G1-bis G5-Regionen genannt, sind hoch konserviert. Sie sind für die Bindung von GTP und von Effektoren verantwortlich (VALENCIA et al., 1991). Am C-terminalen Ende befinden sich ein oder zwei Cysteinreste (C) an denen die Proteine isoprenyliert werden. Die Cysteinreste bilden mit beliebigen Aminosäuren (X) verschiedene Motive, die die Sequenzfolge CXXX, CC, CXC, CCXX oder CCXXX haben können (ANANT et al., 1998). Diese Sequenzfolge dient als Substrat der Rab-Geranylgeranyltransferase (GGTase), die einen Lipidrest aus der Isopren-Familie, das so genannte Geranylgeraniol, kovalent an die Cysteinreste anhängt (Shen et al., 1996). Dieser Lipidrest ist für die transiente, GTP-abhängige Verankerung in der Membran verantwortlich (Chavrier et al., 1990; Khosravi-Far et al., 1991).

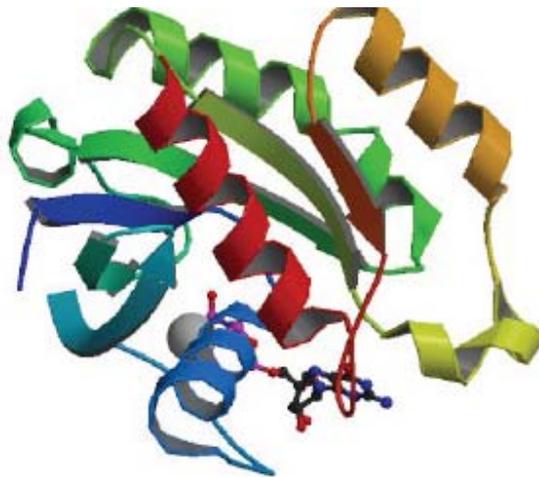


Abb. 2-10: Modell der dreidimensionalen Proteinstruktur des humanen Rab11A Proteins in GTP gebundener Form. HsRab11A besteht aus fünf α -Helices, sechs β -Faltblättern und fünf Loops. Die Loops enthalten fünf hoch konservierte Domänen, die charakteristisch für die Familie kleinen GTPasen sind. Sie formen eine Tasche, die das mit einem Magnesiumion komplexierte GTP-Nukleotid bindet.

2.7.2 Der Rab GTPase Zyklus

Rab-Proteine durchlaufen einen sich wiederholenden Zyklus zwischen GTP- und GDP-gebundener Form (siehe Abb. 2-11). Sie binden freies GTP und hydrolysieren dieses mittels ihrer intrinsischen GTPase-Aktivität zu GDP. Darüber hinaus wird der Übergang zwischen GTP- und GDP-gebundener Form von Effektorproteinen wie GDI (GDP dissociation inhibitor), GEF (guanine nucleotide exchange factor) und GAP (GTPase-activating protein) reguliert. Im inaktiven Zustand befindet sich das Rab-Protein in GDP-gebundener Form im Cytoplasma. Dabei formt es einen Komplex mit dem Protein Guanin-Dissoziationsinhibitorprotein GDI. Das GDI Protein stabilisiert die Bindung zwischen dem Rab-Protein und GDP und hemmt dadurch den Austausch von GDP gegen GTP. Der Rab-GDI-Komplex kann mit dem membranständigen Protein GEF interagieren. Das GEF-Protein ist Antagonist von GDI. Es verdrängt GDI vom Rab-Protein und beschleunigt den Austausch von GDP gegen GTP. Durch die Bindung von GTP wird das Rab-Protein aktiv und erfährt eine Konformationsänderung in deren Folge der C-terminal angebrachte Isoprenrest, der zuvor im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand in einer hydrophoben Tasche versteckt war, nun ausklappt und frei an der Oberfläche präsentiert wird. Über den Isoprenrest kann das Rab-Protein daraufhin direkt an Membranen binden und dort die Bildung von Vesikeln regulieren. Diese tragen in ihrer Membran eingelagert das weiterhin das GTP-aktivierte Rab-Protein. An der Zielmembran angekommen findet eine Interaktion zwischen dem Rab-Protein und GAP statt. GAP aktiviert die GTPase-Aktivität in Rab und steigert dieses um ein Vielfaches, so dass das gebundene GTP in GDP hydrolysiert wird. Mit der Spaltung von GTP zu GDP

wird das Rab-Protein wieder inaktiviert, bildet erneut einen Komplex mit GDI und löst sich mit dessen Hilfe von der Membran ab.

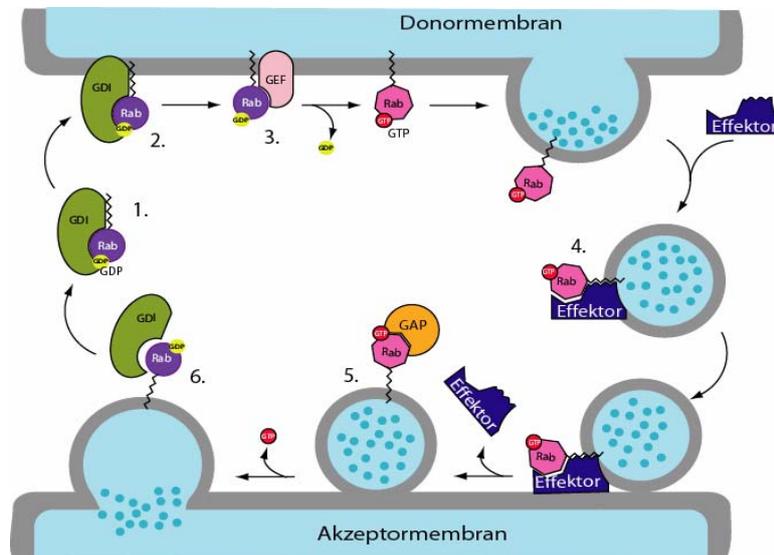


Abb. 2-11: Rab-GTPase-Zyklus. Im Cytoplasma bildet das GDP-gebundene Rab einen Komplex mit GDI (1). GDI führt das Rab-Protein an die Membran heran (2). Dann erfolgt der Austausch von GDP gegen GTP durch GEF (3). Durch die Bindung an GTP wird die Konformation des Rab-Proteins so verändert, dass es an einem Effektormolekül binden kann (4). An der Zielmembran wird GTP mit Hilfe von GAP hydrolysiert (5). Danach wird der Rab-GDP-Komplex mit Hilfe von GDI von der Membran abgelöst (6).

2.7.3 Rab-Proteine und SNARE-Hypothese (Rothman 1994)

Eine der wichtigsten Funktionen des Rab-Proteins ist das Andocken von Vesikeln an der Zielmembran zu gewährleisten. Die Erkennung von Vesikel und Zielkompartiment wird dabei durch einen spezifischen Mechanismus reguliert, der die Interaktion von Proteinen auf der Vesikeloberfläche mit Proteinen auf der Oberfläche der Zielmembran beinhaltet (siehe Abb. 2-12). Während dieses Prozesses interagiert das Rab-Protein mit verschiedenen Proteinen wie z.B. SNARE, SNAP und NSF. Die SNARE-Proteine (*SNAP receptors*) nehmen eine Schlüsselfunktion für die Membranfusion ein. In die Vesikelmembran eingebettet findet man sogenannte v-SNARE-Proteine (vesicle SNAP-receptor), die während der Vesikelbildung zusammen mit der Membran abgeschnürt werden. Als Gegenstück befinden sich in der Zielmembran t-SNARE-Proteine (target SNAP-receptor). Die SNARE-Proteine bestehen aus zwei Domänen, eine variable spiralförmige (coiled-coil) Domäne am N-Terminus und eine Transmembrandomäne am C-Terminus. Die SNARE-Proteine unterteilen sich in die drei Gruppen VAMPs (vesicle associated membrane proteins, v-SNAREs), Syntaxin-ähnliche Proteine (t-SNAREs) und SNAP-25-ähnliche Proteine (t-SNAREs), die während der Vesikelfusion in einem Komplex miteinander interagieren und die Ausbildung einer Fusionspore initiieren.

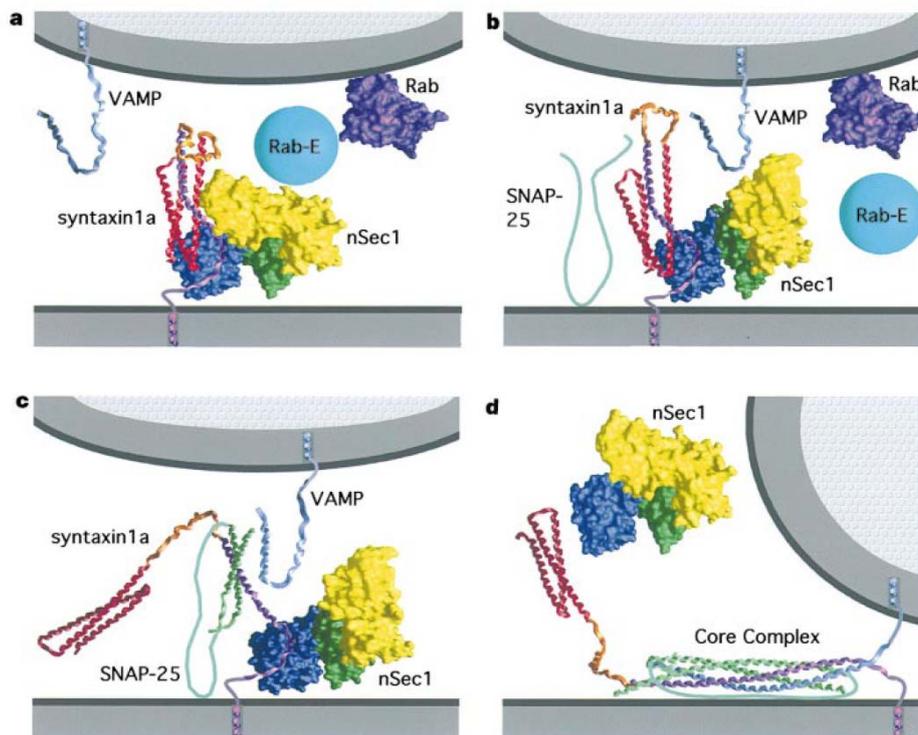


Abb. 2-12: SNARE-Hypothese zur Fusion von Vesikeln. A) Syntaxin bindet an nSec1 und formt einen Komplex, der als Erkennungsstelle für das Rab-Protein und seinen Effektor im ankommenden Vesikel dient. B) Durch die Bindung von nSec1 an den Rab-Effektor kommt es zur Auflösung des Komplexes zwischen der Domäne 3a (gelb) in nSec1 und Syntaxin. Die freiliegende Domäne des Syntaxins interagiert daraufhin mit SNAP-25. C) Das SNAP bewegt sich in Richtung des C-Terminus von Syntaxin und ermöglicht die Interaktion zwischen Syntaxin und VAMP. D) SNAP, Syntaxin und VAMP formen einen Komplex (Core Komplex), der die Ausbildung einer Fusionspore initiiert.

Für die Fusion nähert sich das Vesikel zunächst der entsprechenden Zielmembran. An der Zielmembran bildet zu diesem Zeitpunkt das Syntaxin (t-SNARE) mit dem Sec1p Protein einen Komplex und an der Vesikelmembran interagiert das GTP aktivierte Rab-Protein mit einem Rab-Effektorprotein. Das Effektorprotein verdrängt im ersten Schritt das Sec1p von Syntaxin. Die Konformation des Syntaxins wird dadurch so verändert, dass es an SNAP-25 binden kann. Der Komplex aus Syntaxin und SNAP-25 bindet dann über coiled-coil Domänen an das vesikuläre v-SNARE Protein VAMP wodurch das Vesikel und die Zielmembran näher zusammenrücken. Syntaxin, SNAP-25 und VAMP bilden zusammen den Core Komplex, der die Ausbildung einer Fusionspore initiiert. Diese dehnt sich weiter aus, woraufhin das Vesikel mit der Zielmembran verschmilzt und seinen Inhalt in das Kompartiment entleert. Nach der Fusion befinden sich alle SNARE-Proteine in der sogenannten *cis* Konfiguration, da sie sich alle auf derselben Membran befinden. Ihre Dissoziation wird durch Bindung der Proteine NSF und α -SNAP eingeleitet. Durch die Verbindung von v- und t-SNARE wird zunächst eine Bindungsstelle für α -SNAP geschaffen. α -SNAP rekrutiert nun seinerseits die

hexamere ATPase NSF zum SNARE-Komplex, die unter ATP-Hydrolyse die Dissoziation von v- und t-SNARE bewirkt. Während die t-SNARE Proteine in der Membran verbleiben, werden die v-SNARE-Proteine zur Donormembran zurück transportiert.

2.8 Rab-Proteine in Pflanzen

Rab-Proteine gehören zur Familie der ras Proteine und bilden in Pflanzen die größte Gruppe unter den kleinen GTPasen. Sie werden in 8 Untergruppen (RabA –RabH) eingeteilt (Nielsen et al. 2008) und regulieren den intrazellulären Vesikeltransport zwischen Zellkompartimenten. Einzelne Mitglieder der Rab GTPase Familie sind für verschiedene, sequentielle Vesikelfusionsprozesse verantwortlich. Dazu wechselwirken die Rab-GTPasen mit verschiedenen Effektormolekülen, die zum Beispiel die GTP Bindung und GTP-Hydrolyse während des Prozesses der Vesikelbildung, des Transports und der Fusion differenziell regulieren. Rab-Proteine und Effektoren sind über Artgrenzen hinweg konserviert. Auch in tierischen Zellen und Hefenzellen kommen Rab-Proteine vor, wobei allerdings in Hefen Proteine der beiden Untergruppen Rab2 und Rab18 fehlen. Trotz aller Gemeinsamkeiten der Rab-Proteine zwischen den verschiedenen Arten lassen sich jedoch auch deutliche Unterschiede feststellen. Verglichen mit Pflanzenzellen unterlagen die Rab-Proteine in tierischen Systemen anscheinend einer anderen evolutionären Entwicklung. In Säugertierzellen sind 41 Untergruppen von Rab-Proteinen klassifiziert, wovon 33 keine Orthologe in Pflanzen aufweisen (Rutherford and Moore, 2002). Rab3 zum Beispiel, das die Sekretion an der Plasmamembran neuroendokriner Zellen und neuronaler Zellen reguliert, erfüllt Funktionen, die im pflanzlichen System nicht benötigt werden. Eine direkte Übertragung der aus tierischen Zellen bekannten Funktionen von Rab-Proteine ist daher nicht möglich. Insgesamt gesehen sind zwar viele der pflanzlichen Rab-Proteine noch nicht gut charakterisiert, für einige Vertreter konnten aber bereits definierte Funktionen ermittelt werden (siehe Abb. 2-13).

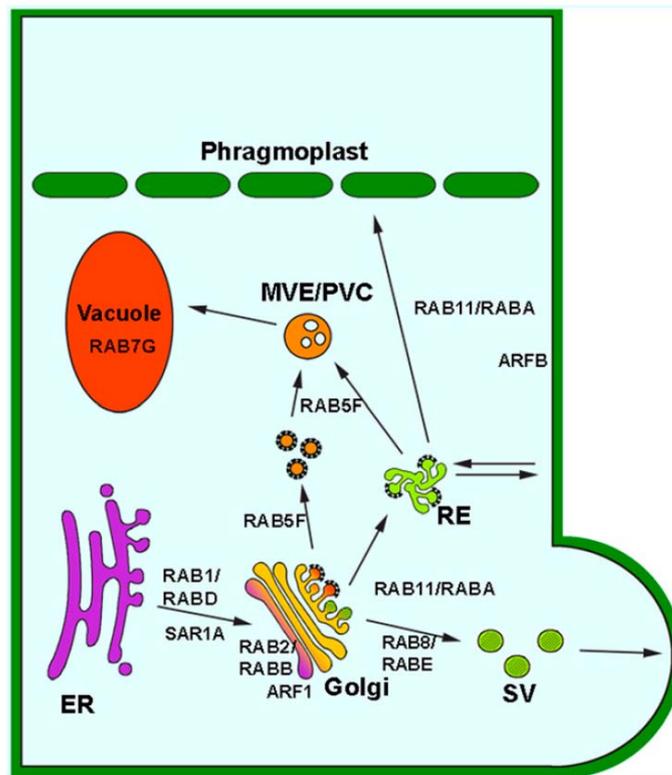


Abb. 2-13: Intrazelluläre Lokalisierung und Funktion der Rab-Proteine in Pflanzen (Nielsen et al. 2008). Die Rab-Proteine lokalisieren spezifisch an verschiedenen Organellen. Rab1 reguliert den anterograden Transport von Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat. Rab8 reguliert die Bildung von sekretorischen Vesikeln (SV) am trans-Golgi-Netzwerk. Rab11 ist am Transport von Vesikeln vom trans-Golgi-Netzwerk zum Recycling Endosom (RE) und weiter zum Phragmoplasten beteiligt. Rab5 ist in den Transport von Vesikeln vom trans-Golgi-Netzwerk zu Multivesikel-Vesikeln (MVE)/prevakuolären Kompartimenten (PVC) involviert. Rab7 lokalisiert an der Vakuole.

RabA/Rab11

Die RabA-Untergruppe besteht aus 26 Mitgliedern und bildet damit die größte Untergruppe der Rab-Proteine. Bei *Homo sapiens* (Rab11a, Rab11b und Rab25) und Hefe (Ypt31 und Ypt32) ist diese Gruppe viel kleiner und besteht nur aus 3 beziehungsweise 2 Mitgliedern. Die hohe Anzahl der Mitglieder dieser Untergruppe ist innerhalb des Pflanzenreichs konserviert und lässt sich nach Spekulationen wahrscheinlich auf die Aktin-abhängige Mobilität vieler verschiedener pflanzlicher Organellen zurückführen (Rutherford and Moore 2002). In tierischen Zellen lokalisieren an Recycling Endosomen im apikalen Teil von polarisierten Epithelzellen (Casanova et al. 1999, Segev et al. 2001). Die homologe Subklasse aus Hefe ist in den Export vom trans-Golgi zum prevakuolären/endosomalen Kompartiment und zur Plasmamembran beteiligt (Lazar et al. 1997, Ortiz et al. 2002, Segev et al. 2001). In Pflanzen organisieren Proteine aus der Rab11 und Rab25 Subklasse verschiedene Transportwege zwischen dem Recycling-Endosom und den Golgis oder der Plasmamembran

(Casanova et al. 1999, Rodman and Wandinger-Ness 2000). Rab3A und Rab4A konnten in *Pisum sativum* an Golgis, prevakuolären Kompartimenten und endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden und erfüllen wahrscheinlich eine Rolle bei prevakuolären oder endocytotischen Sortiervorgängen (Inaba et al. 2002). AtRabA5C (ARA4) ist am trans-Golgi und Golgi-Vesikeln lokalisiert und organisiert den post-Golgi/endosomalen Transport (Ueda et al. 1996), während AtRabA4B an der Spitze von wachsenden Wurzelhaaren lokalisiert und in den Export von Zellwandkomponenten aus dem Golgi involviert ist (Preuss et al., 2004).

RabB/Rab2

RabB Homologe sind in Hefen nicht vorhanden, während Rab2 in tierischen Zellen am *cis*-Golgi Membran lokalisiert und mit Golgi-Matrixproteinen interagiert (Chavrier et al. 1991, Short et al. 2001). Es spielt dort eine wichtige Rolle bei der Reifung von vesikulären tubulären Clustern (VTC), Mikrotubuli-assoziierten Intermediaten beim Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat. In Pflanzen gibt es keine VTC und die Golgis sind ganz anders als in tierischen Zellen organisiert. Dennoch scheint RabB in pflanzliche Zellen eine ähnliche Funktion erfüllen. Zum Beispiel lokalisiert RabB in Tabak am Golgi und organisiert den Transport zwischen dem ER und den Golgi-Apparaten. Eine dominante negative Mutante des Proteins verlangsamt das Wachstum von Pollenschläuchen und blockiert den Transport zwischen ER und Golgi (Cheung et al. 2002).

RabC/Rab18

RabC bzw. Rab 18 ist genau wie RabB in Hefen nicht vorhanden. In tierischen Zellen spielt Rab18 eine Rolle beim endocytotischen Transport und wird in polaren Epithelzellen vermehrt exprimiert (Hashim et al. 2000, Segev et al. 2001, Zerial and McBride 2001). In *Arabidopsis* gibt es 3 RabC Proteine, deren Sequenzen von den in tierischen Zellen vorkommenden Homologen abweichen. Gerade in den konservierten Domänen gibt es substantielle Unterschiede. Die Funktionen der Rab18 Proteine in Pflanzen sind bisher nicht aufgeklärt.

RabD /Rab1

In Säugertierzellen und Hefen regulieren Rab1 beziehungsweise Ypt1 den Vesikeltransport vom ER zum Golgi und den initialen Transport an den *cis*-Golgi Zisternen. In *A. thaliana* konnten mit RabD1, RabD2a, RabD2b und RabD2c vier Vertreter dieser Gruppe identifiziert werden. Diese erfüllen die gleichen Funktionen wie tierischen Zellen und regulieren den anterograden Transport vom ER zum

Golgi (Batoko et al. 2000, Zheng et al. 2005). Ähnlich wie Rab1 bei Säugertieren können RabD-Proteine aus Pflanzen eine Ypt1-Hefemutante komplementieren.

RabE/Rab8

Die RabE Proteine in Pflanzen sind homolog zu Rab8 und Rab10 in Säugerzellen beziehungsweise zu Sec4 in *Saccharomyces cerevisiae* und Ypt2 in *S. pombe* (Bischoff et al. 1999). In Hefen und Säugerzellen regulieren Rab8-Homologe den Transport vom trans-Golgi zur Plasmamembran. Sie spielen damit eine fundamentale Rolle bei der Sekretion während der Knospbildung der Hefe und beim basolateralen Membrantransport in Epithelzellen der Säugertiere. In *Arabidopsis* besteht die RabE/Rab8-Untergruppe aus fünf Mitgliedern. Nur einziges Mitglied, das RabE1d wurde bisher funktionell untersucht (Speth et al. 2009). Dieses reguliert den Transport vom post-Golgi zur Plasmamembran regulieren. Die dominant negative Mutante von RabE1d inhibiert den anterograden Transport vom post-Golgi zur Plasmamembran und leitet die Vesikeln zur Vakuole um.

RabF/Rab5

Die RabF-Untergruppe besteht aus drei Mitgliedern und wird nochmals in Sub-Untergruppe RabF1 und RabF2 unterteilt. Die Proteine sind Rab5 und Rab22 aus tierischen Zellen beziehungsweise Ypt51/Ypt52/Ypt53 aus Hefe ähnlich, die endocytotische Prozesse bzw. damit verbundene Sortierfunktionen regulieren (Lazar et al. 1997, Segev et al. 2001, Zerial and McBride 2001). Die Rab5-Proteine sind an verschiedenen Prozessen der Endozytose beteiligt, wie z.B. der Bewegung von Endosomen entlang von Mikrotubuli und der Regulation des Phospholipidgehalts der Endosomen. Weiterhin spielen die Proteine Rab4 und Rab9 eine wichtige Rolle bei Recyclingprozessen in tierischen Zellen (Segev et al. 2001, Zerial and McBride 2001).

In pflanzlichen Zellen ist z.B. das Protein RabF1 ein Vertreter aus der Gruppe der RabF Proteine. RabF1 (bzw. Ara6) ist unter eukaryotischen Rab-GTPasen einzigartig, da es nicht wie andere Rab-Proteine am C-Terminus sondern am N-Terminus isoprenyliert wird. Darüber hinaus erhält das Protein mit einem Myristoylrest und einem Palmitoylrest zwei verschiedene Isoprenylierungen (Ueda et al. 2001). RabF1 konnte auch in *L. japonicus*, *O. sativa* und dem Halophyten *M. crystallinum* nachgewiesen werden, wo die Expression des Protein durch Salzstress induziert wird (Bolte et al. 2000). RabF1, RabF2, RabA3 und RabA4 konnten alle an endosomalen oder prevakuolären Kompartimenten lokalisiert werden (Inaba et al. 2002, Ueda et al. 2001).

RabG/Rab7

Rab7 und Ypt7 sind in tierischen Zellen und Hefen an Transportprozessen zu den Lysosomen bzw. in Hefen an der Fusion von Vakuolen beteiligt (Lazar et al. 1997, Segev et al. 2001, Zerial and McBride 2001). In *Arabidopsis* gibt es 8 RabG/Rab7-Proteine, sieben davon lokalisieren an der Vakuolenmembran. Cheon et al. (1993) konnten zeigen, dass ein Rab7 (RabG3) antisense Transkript in *L. japonicus* die Entwicklung von Knöllchen inhibiert (Cheon et al. 1993). Rab7 lokalisiert in Pflanzen an späten Endosomen, und seine Expression ist während der Knöllchenbildung stark heraufreguliert (Verma D. et al. 1994).

RabH/Rab6

In tierischen Zellen reguliert Rab6A den retrograden Transport durch Golgi-Stapel und ist für einen COPI-unabhängigen retrograden Transport von Golgi zur ER verantwortlich (Storrie et al. 2000). Bemerkenswerterweise erfüllt eine Splicevariante von Rab6A, die sich nur in drei Aminosäurepositionen unterscheidet, eine ganz andere Funktion und ist in den retrograden Transport von frühen Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk beteiligt (Mallard et al. 2002). Eine vergleichbare Funktion erfüllt das RabH/Rab6 Homolog Ypt6 in Hefen (Siniosoglou and Pelham 2001). Im *Arabidopsis*-Genom gibt es fünf RabH Sequenzen. Davon konnte AtRabH1b den temperatursensitiven Wachstumsdefekt einer Ypt6-Null-Mutante von *S. cerevisiae* komplementieren (Bednarek et al. 1994). Dies spricht neben der strukturellen auch für die teilweise funktionelle Konserviertheit monomerer G-Proteine in Pflanzen.

2.9 Ziele der Arbeit

Während der Symbiose werden enorm grosse Mengen an Membranmaterialien benötigt. Die Bakterioide werden durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und jeweils von einer Peribakteroidmembran umhüllt. Diese verändert im Laufe der Differenzierung des Bakteroids ihre Eigenschaften. Ihre Biogenese ist bisher nicht geklärt. Da die Rab-Proteine den Membrantransport regulieren und an bestimmten Organellen lokalisieren, sind sie als Organell-Marker geeignet. Mit Hilfe von Rab-Proteinen sollte man deshalb erklären können, woher die Peribakteroidmembran stammt. MsRab11F wurde bereits im Rahmen der Dissertation von Karin Schiene isoliert und als Knöllchenspezifisch beschrieben. Die Lokalisierung und Funktion des Proteins wurden allerdings nicht untersucht. Hier setzt die nun vorliegende Arbeit an.

3 Material und Methoden

3.1 Gerät und Apparaturen

Gerät/Apparatur	Bezugsquelle
Brutschrank MEMMERT Dampfsterilisator	Schwabach Fedegeri FO21A IBS, Fernwald Typ A5 WEBECO, Bad Schwartau
Agarose-Gelelektrophoresekammern	Eigenbau der Werkstatt
Elektroporationsgerät	Easyject Prima EQUIBIO, Kent
Fluoreszenzbinokular	MZFLIII LEICA, Heidelberg
Olympus IX-81 Epifluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera Hamamatsu 4848	OLYMPUS, Hamburg HAMAMATSU Photonics, Herrsching
Fluoreszenzspektrometer FluoroMax LS50B	SPEX INDUSTRIES INC., Edison PERKIN-ELMER, Rodgau-Jügersheim
Horizontalschüttler	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Konfokal Laser Scanning Mikroskop	LEICA, Heidelberg
Küvetten	
Einmal-Küvetten (Schichtdicke 10 mm)	BRAND, Wertheim
UV-Quarzküvetten (Schichtdicke 10 mm)	HELMA, Mülheim
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen
MALDI-TOF MS Biflex	BRUKER, Bremen
Partikelkanone PDS-1000/He	BIORAD, München
PCR Mastercycler gradient	EPPENDORF, Hamburg
pH-Meter inoLab pH/Ion Level 2	WTW, Weilheim
Pipetten 1000 KI und 200 KI	EPPENDORF, Hamburg
Pipetten 20 KI und 10 KI	GILSON, Middleton
Polyacrylamid-Elektrophorese-Apparatur	
Dual Gel Caster Mighty Small SE245	HOEFER, San Francisco
Laufkammer Mighty Small II SE250 HOEFER	San Francisco
Reinstwasseranlage Milli Q Synthesis	MILLIPORE, Bedford
Schüttelinkubator 3032 GFL	Burgwedel
Sterilbank UniFlow UVUB 1200 UNIEQUIP	Martinsried
Stromversorgungsgeräte DC Power Supply 5004	UNIEQUIP, Martinsried
Transilluminator INTAS	Göttingen
Thermomixer comfort EPPENDORF	Hamburg
UV/VIS-Spektrophotometer Ultraspec 2000	AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg
Vortex Vortexgenie	BENDER & HOBEIN, Zürich
Waagen	
Analysenwaage	FAUST, Schaffhausen
Laborwaage	SATORIUS, Göttingen
Western-Blot-Apparatur	TE 22 HOEFER, San Francisco
Zentrifugen	BECKMANN Coulter, München
Allegra 25R	
Rotoren: TS-5.1-500 TA-10-250	

3.2 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	ROTH, Karlsruhe
Acetosyringon	SIGMA, Deisenhofen
Acrylamid/Bis 40%ig	BIO-RAD, München
Agar	OXOID, Wesel
Agarose	PEQLAB, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	ROTH, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	SERVA, Heidelberg
Anhydrotetracyclin-hydrochlorid	IBA, Göttingen
Beefextrakt	DIFCO, Detroit
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg
BSA	SERVA, Heidelberg
Calciumchlorid	MERCK, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	SERVA, Heidelberg
Diaminobenzidin	SIGMA, Deisenhofen
dNTP's	FERMENTAS, St. Leon-Rot
N,N-Dimethylformamid (DMF)	ROTH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SIGMA, Deisenhofen
Essigsäure	ROTH, Karlsruhe
Ethanol	ROTH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SIGMA, Deisenhofen
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-H-D-galactopyranosid (x-gal)	ROTH, Karlsruhe
Gentamycin-Sulfat	SERVA-Heidelberg
Glycin	MERCK, Darmstadt
Glycerin	MERCK, Darmstadt
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Hepes)	ROTH, Karlsruhe
Hefeextrakt	OXOID, Wesel
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Isopropyl-H-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	MERCK Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Kanamycin-Sulfat	SERVA, Heidelberg
Litiumchlorid	MERCK, Darmstadt
Magermilchpulver	Supermarkt
Magnesiumchlorid	FLUKA, Neu Ulm
β -Mercaptoethanol	ROTH, Karlsruhe
MES	SERVA, Heidelberg
Methanol	ROTH, Karlsruhe
Natriumacetat	MERCK, Darmstadt
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA, Heidelberg
Natriumhydroxid	MERCK, Darmstadt
Pepton	DIFCO, Detroit
Ponceau S	SIGMA, Deisenhofen
Saccharose	MERCK, Darmstadt
Spermidin	SIGMA, Deisenhofen

Material und Methoden

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	ROTH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN BIOMEDICALS, Irvine
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
Trypsin	PROMEGA, Madison
Trypton	OXOID, Wesel
Tween 20	SIGMA, Deisenhofen
Wasserstoffperoxi	d SIGMA, Deisenhofen

3.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonucleasen	Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, NEB, Ipswich
T4 DNA Ligase	ROCHE, Mannheim
Shrimp Alkalische Phosphatase	FERMENTAS, St. Leon-Rot
RNase A	SERVA, Heidelberg
Advantage cDNA Polymerase Mix	CLONTECH, Mountain View
Taq Polymerase	Qiagen
Lysozym	SERVA, Heidelberg
Cellulase	SERVA, Heidelberg
Macerozyme Onozuka RS	SERVA, Heidelberg

3.4 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Primärantikörper	
Anti-MsRab11, Peptid-spezifisch, aus Kaninchen	MBBL, Bielefeld
Anti-GFP, aus Kaninchen	Acris
MAC265, aus Ratte	Dr. Nick Brewin, John Innes Centre, Norwich
Sekundärantikörper	
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-Antikörper, aus Ziege	SIGMA, Deisenhofen
Alexa Fluor 488 IgG Anti-Ratte, aus Esel	Invitrogen, Molecular Probes
Alexa Fluor 647 IgG Anti-Kaninchen, aus Ziege	Invitrogen, Molecular Probes

3.5 Sonstige Materialien

Materialien	Hersteller
Deckgläser	ROTH, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten 2 mm	PEQLAB, Erlangen
1.0 Micron Gold	BIORAD, München
Gel Blotting Papier GB 003	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Macrocarrier	BIORAD, München
Nitrozellulose-Membran Hybond S Super	AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg
Objektträger	ROTH, Karlsruhe
Pflanzenerde Floradur Typ B fein	FLORAGARD, Oldenburg

PVDF Blotting-Membran
 Rupture Disc
 Sterilfilter FP30/0,2 CA5
 Stopping Screens

MILLIPORE, Bedford
 BIORAD, München
 SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
 BIORAD, München

3.6 Verwendete Mikroorganismen und Pflanzen

Bakterienstämme

Zur Transformation und Anreicherung von Plasmiden wurden die Bakterienstämme *E. coli* DH5 α von der Firma CLONTECH und *E. coli* XL1blue der Firma Stratagene eingesetzt. Zur Proteinexpression wurde der Stamm *E. coli* BL21DE3 der Firma Invitrogen und zur Pflanzentransformation die Stämme *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Gabe des IZMB, Bonn) und *Agrobacterium rhizogenes* ArQual (Quandt et al. 1993) verwendet.

Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme und ihre genetischen Eigenschaften

<i>E. coli</i> DH5 α	F- deoR recA1 endA1 hsdR17(rKmK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F ⁻ proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q lacZDM15 Tn10 (tet ^r)	(Bullock et al. 1987)
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ (tet ^r) gal (DE3) endA The	Stratagene
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90 Helferplasmid	(Koncz and Schell 1986)
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ArQual	Sm ^r -derivative of strain R1000 R1000 = derivative of strain A4T (White et al., 1985)	(Quandt et al. 1993)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011	"Wildtyp", Sm ^r , EPSI ⁺ , NOD ⁺ , FIX ⁺	(Casse et al. 1979)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011-mRFP1	"Wildtyp", Sm ^r , EPSI ⁺ , NOD ⁺ , FIX ⁺ expression mRFP1	(Smit et al. 2005)

Pflanzenarten

- *Medicago truncatula* cv. Jemalong
(Purkiss Seeds, P.O. Box 286, Armidale 2350, NSW Australia)
- *Nicotiana benthamiana*
- *Arabidopsis thaliana*

3.7 Primer und Vektoren

3.7.1 Primer

Primer	Sequenz 5`-3`
Rab11 Bam Up	5`-GGATCCATGGATCATGATGCAATTAT-3`
Rab11 Sac Lo	5`-GAGCTCTCATGAACAACAAGGAGCC-3`
Rab11 S29N up	5`-CTGGAGTTGGGAAAAACAATCTGCTTTCAAGG-3`
Rab11 S29N lo	5`-CCTTGAAAGCAGATTGTTTTCCCAACTCCAG-3`
MtRab5B Xba up	5`-TCTAGAATGGGTTGCGGCTCCTCCTTTC-3`
MtRab5B Bam lo	5`-GGATCCAGTAACCGATGGGCGTGGCAGTC-3`
mRFP Bam Up	5`-GGATCCAAAAAATGGCCTCCTCCGAGGACGTC-3`
mRFP Sac Lo	5`-GAGCTCGGCGCCGGTGGAGTGGCGG-3`
GFP BamHI up	5`-GGATCCAAAAAATGCATAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG-3`
GFP BamHI lo	5`-GGATCCCCCATCCTTTTTGTATAGTTCATCCATGCC-3`
35S EcoRI up	5`-GAATTCAGATTAGCCTTTTCAATTTTCAAG-3`
NOS Sall lo	5`-GTCGACGATCTAGTAACATAGATGACACC-3`
35S Hind up	5`-AAGCTTAGATTAGCCTTTTCAATTTTCAAG-3`
35S Hind lo	5`-AAGCTTGATCTAGTAACATAGATGACACC-3`
T7	5`-TAATACGACTCACTATAG-3`
T7term	5`-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3`
M13	5`-AGTCACGACGTTGTA-3`
M13 rev	5`-CAGGAAACAGCTATGAC-3`

3.7.2 Vektoren

Tabelle 2. Auflistung der verwendeten Plasmide. Mit Angabe ihrer Herkunft.

Plasmid	Herkunft
pGem-T easy	Promega
p35S-EGFP	Clontech
pET24(a+)	Novagen

pFlagMAC-Rab11F	Dr. Karin Schiene, Dissertation
pGemT-mGFP6	Dr. Holger Densow, Dissertation
p35S-mGFP6	Dr. Holger Densow, Dissertation
pRSET _B -mRFP1	(Shaner et al. 2004)
pBin19	Prof. Dr. Staiger, Lehrstuhl für Molekulare Zellphysiologie BioVIII, Universität Bielefeld
pBin20-GmMan1(tTMs)-mCherry	Dr. Andreas Nebenführ, University Tennessee Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Biology (BCMB) USA
pGemT-Msrab11f	Diese Arbeit
pGemT-Mtrab5B	Diese Arbeit
pGemT-mRFP1	Diese Arbeit
pET24-Msrab11f	Diese Arbeit
pET24-Msrab11f:mGFP6	Diese Arbeit
p35S- Msrab11f:GFP	Diese Arbeit
p35S- Msrab11fS29N:GFP	Diese Arbeit
p35S-Mtrab5B:GFP	Diese Arbeit
p35S-Mtrab5B:mRFP1	Diese Arbeit
pGemT-35S-mGFP6:Msrab11f-Nos	Diese Arbeit
pGemT-35S-Mtrab5B:mGFP6-Nos	Diese Arbeit
pBin-Rab11F	Diese Arbeit
pBin-Rab5B	Diese Arbeit

pGEM-T easy Vektor

Der pGEM-T-easy Vektor ist ein Bestandteil des PCR-Klonierungs-Kits der Firma PROMEGA. Er wird zur Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten eingesetzt, hat eine Größe von 3015 bp und besitzt eine Multiple-Klonierungsstelle (MCS) mit vielen Restriktions-enzymststellen. PCR-Produkte können ohne weitere Modifizierung in den linearisiert vorliegenden Vektor durch 3'-überhängende dTTP's inseriert werden. pGEM-T easy ist ein Transkriptionsvektor mit einer T7- und einer SP6-RNA-Polymerase-Promotorstelle. Weiterhin besitzt er für die Sequenzierung Bindungsstellen für die Primer universal (uni) und reverse (rev). pGEM-T easy enthält ein lacZ-Gen, welches von einer MCS unterbrochen ist und erlaubt dadurch die Blau/Weiß Selektion Insert-tragender Plasmide.

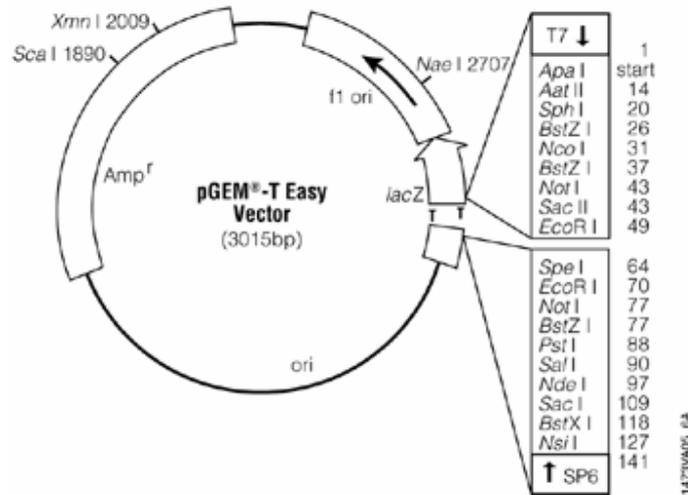


Abb. 3-1: Aufbau des pGEM-T easy Vektors. Der Vektor besitzt die Replikationsstelle f1 ori und das Ampicillin-Resistenzgen (Amp^r) für die Selektion transformierter Bakterien in Ampicillin-haltigen Medien. Das LacZ-Gen exprimiert das Enzym H-Galaktosidase und erlaubt eine Blau/Weiß Selektion rekombinanter Bakterien. In dieses Gen ist eine Multiple-Klonierungsstelle integriert, die von den T7- und SP6-Promotoren für die in vitro Transkription und von den Sequenzen für den universalen und reversen Primer flankiert wird (Produktinformation). Das lacZ-Gen exprimiert induzierbar durch Isopropyl-H-D-thiogalactopyranosid (IPTG) das Enzym H-Galaktosidase, welches eine Blau/Weiß Selektion der rekombinanten Vektoren erlaubt. Religierte Vektoren, die kein PCR-Produkt inseriert haben, exprimieren bei Induktion durch IPTG die vollständige H-Galaktosidase. Diese setzt X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-H-D-galactopyranosid) zu einem blauen Farbstoff um. Ist ein PCR-Produkt in den Vektor inseriert, so wird die H-Galaktosidase nicht mehr exprimiert und Kolonien rekombinanter Bakterien erscheinen weiß.

pET24a(+)

pET24a(+) ist ein Expressionsvektor der Firma Novagen (jetzt Merck Biosciences). Dieser enthält zwischen einem T7 Promotor und T7 Terminator eine multiple cloning site mit mehreren Schnittstellen. Der T7 Promotor steht unter Kontrolle eines Lac-Operons und ist daher über IPTG induzierbar. Ohne IPTG-Zugabe wird die Expression durch das *lacI* Genprodukt, welches für das lac Repressor codiert, reprimiert. Je nach Klonierungsstrategie kann das inklonierte Insert optional zusätzlich mit einem in der Vektorsequenz codierten N-terminalen T7 Tag oder C-terminalen His-Tag versehen werden. Zur Expression in *E. coli* wird der Stamm BL21 DE3 verwendet. Der Bakterienstamm ist speziell für die Expression aus pET-Vektoren entwickelt worden. Im Genom der Bakterien ist eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines Lac-Promotors und -Operators codiert.

Nach IPTG-Induktion bindet die Polymerase an eine T7-Promotorsequenz in *pET24a(+)* und leitet die Transkription der einklonierten Sequenz ein.

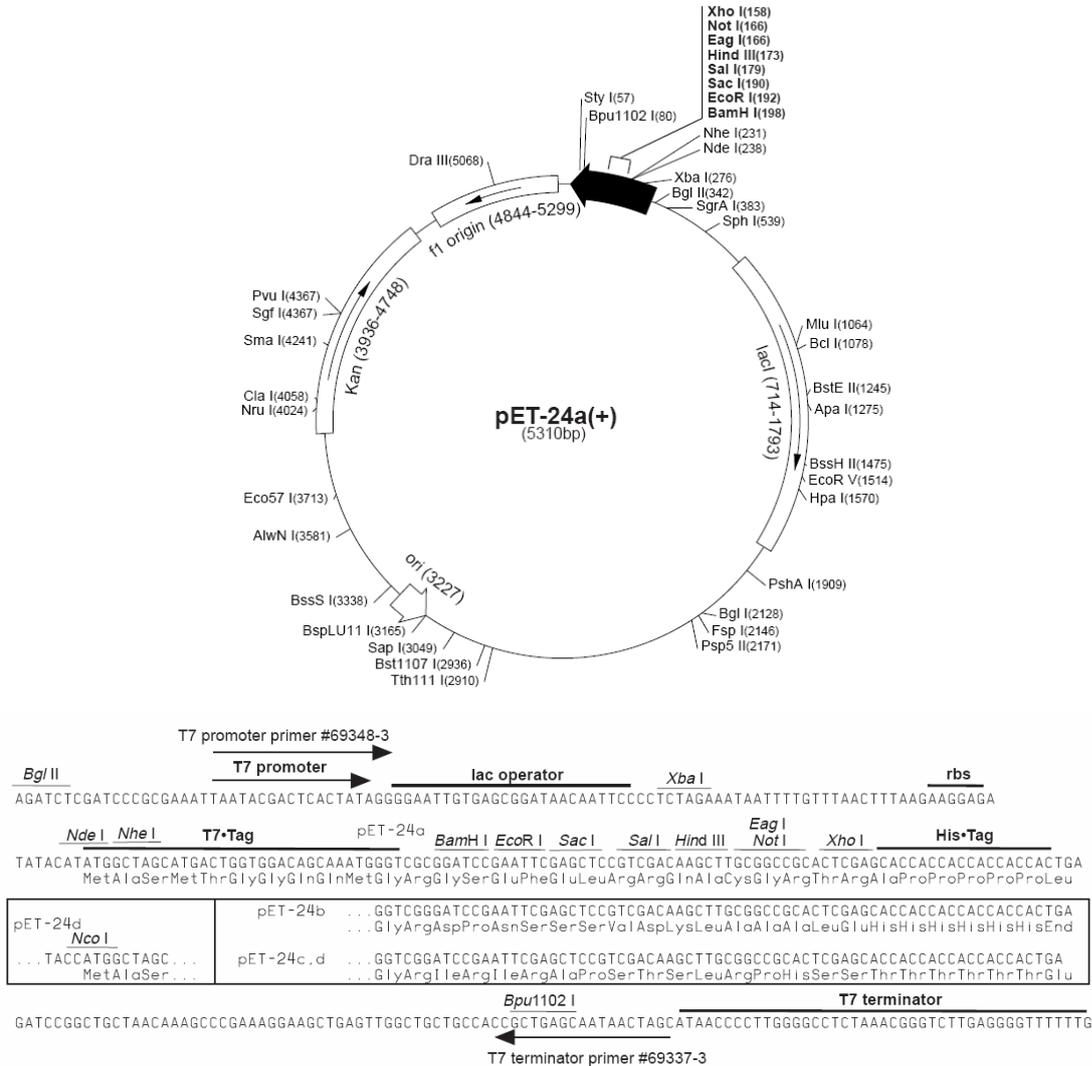


Abb. 3-2: Vektorkarte von pET24a(+). Der Vektor besitzt einen f1 origin als Replikationsstelle und ein Kanamycin-Resistenzgen (Kan^r). Die multiple cloning site ist von einem T7 Promotor und T7 Terminator flankiert. Positive Klone können über Restriktionsspaltung und anschließende Sequenzierung mittels des T7 Promotor- und T7 Terminator-Primers ermittelt werden. Der T7 Promotor steht unter der Kontrolle des Lac-Operators, der durch das im Vektor codierte lacI-Genprodukt reprimiert wird. Nach Zugabe von IPTG zu pET24a(+) tragenden *E. coli* BL21 DE3 Zellen wird die Expression von einklonierten Gene induziert.

p35S-GFP Vektor

Der p35S-GFP Vektor enthält 35S Promotor und NOS Terminator und wurde für die transiente Transformation von Protoplasten verwendet.

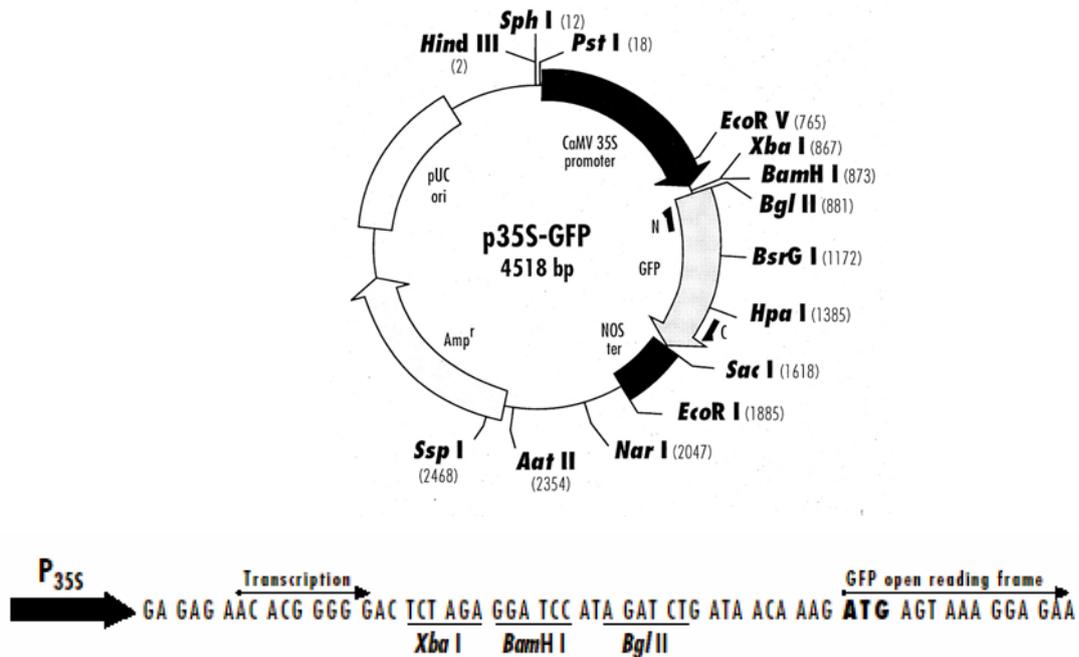


Abb. 3-3: Vektorkarte und multiple cloning site (MCS) von p35S-GFP. Der Vektor enthält einen pUC-Origin, ein Gen, das Ampicillin-Resistenz vermittelt (Amp^r), sowie eine 35S-Promotorkassette. Die Kassette umfasst einen 35S Promotor, eine MCS bestehend aus den Schnittstellen für XbaI, BamHI und BglIII, ein eGFP-Gen und einen NOS-Terminator.

pBin19 Vektor

Der binäre Vektor pBin19 wurde zur stabilen Transformation von Pflanzen genutzt. Er enthält ein Gen für Kanamycin (Kan^r)-Resistenz.

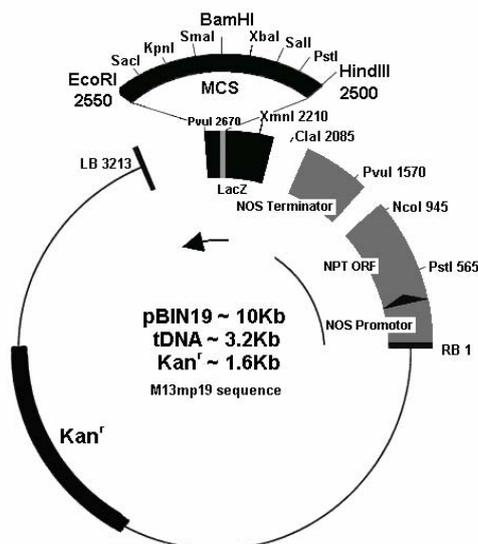


Abb. 3-4: Vektorkarte von pBIN19. pBIN19 ist ein Pflanzentransformationsvektor, der Kanamycin-Resistenz (Kan^r) zur Selektion in Bakterien vermittelt. Zwischen left- und right border enthält der Vektor einen NOS (Nopalin Synthase)-Promotor, ein Gen, das für Neomycinphosphotransferase (NPT) kodiert und einen NOS (Nopalin Synthase)-Terminator. Die Aktivität der Neomycinphosphotransferase verleiht transgenen Pflanzen Resistenz gegenüber Kanamycin. Weiterhin befindet sich eine multiple cloning site (MCS) in einem LacZ-Gen zwischen left- und right border, die das Einklonieren von Expressionskassetten erlaubt. Das LacZ-Gen erlaubt die Identifizierung positiver Klone durch Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/XGal-haltigen Agarplatten.

3.8 Mikrobiologische Methoden

Nährmedien zur Bakterienanzucht.

LB-Medium (Luria-Bertani Broth, Sambrook et al. 1989)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH7,4

LBG-Medium (Luria-Bertani Broth)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1 g Glukose

PA-Medium

17,5 g Penassy broth

TY-Medium

5 g Trypton, 3 g Hefeextrakt, 0,7 g CaCl₂×H₂O

YEP-Medium

5 g Rinderextrakt, 5 g Bacto Pepton, 5 g Saccharose, 1 g Hefeextrakt, 0,5 g MgSO₄×7H₂O

Alle aufgeführten Nährmedien werden mit Millipore-Wasser angesetzt und autoklaviert.

Medienzusätze

Agar

Zur Herstellung von festem Medium werden je 15 g Select-Agar zu den oben angeführten Lösungen gegeben und danach autoklaviert.

Antibiotika

Alle Antibiotika werden als Stammlösungen in Millipore-Wasser angesetzt, steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Die Zugabe erfolgt nach dem Autoklavieren und dem Herabkühlen des Mediums auf ca. 55°C.

Ampicillin	100µg/ml
Gentamycin	25µg/ml
Kanamycin	50µg/ml
Spectinomycin	100µg/ml
Streptomycin	600µg/ml
Tetracyclin	5µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml

X-Gal und IPTG zum Nachweis der Blau/Weiß Selektion

IPTG-Stammlösung

238,3 mg/ml IPTG werden in H₂O gelöst und steril filtriert.

X-Gal-Stammlösung

408,60 mg/l 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) werden in N,N'-dimethylformamid gelöst. Das Gefäß werde mit Alufolie bedeckt und bei -20°C aufbewahrt.

Zur Herstellung der X-Gal/IPTG Platten werden 40 µl IPTG Lösung und 40 µl X-Gal Stammlösung auf einer Mediumplatte ausplattiert. Alternativ kann man 1 ml IPTG Stammlösung und 1 l X-Gal Stammlösung zu einem Liter Medium, das auf 55°C abgekühlt ist, geben.

3.8.1 Anzucht und Bestimmung der Konzentration von Bakterien

E. coli-Stämme werden in flüssigem oder festem LB-Medium bzw. PA-Festmedium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C angezogen. *S. meliloti*-Stämme werden in flüssigem oder festem Antibiotikahaltigem TY-Medium bei 28°C für zwei Tage inkubiert.

Agrobakterium *A. rhizogenes* ArQuaI und *A. tumefaciens* GV3101 werden in YEP Flüssig- oder Festmedium mit Antibiotika bei 28°C für zwei Tage angezogen. Der Bakterientiter wird durch photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 580 nm ermittelt. Einer optischen Dichte von 0,1 entspricht bei *E. coli* eine Anzahl von 2×10^7 Zellen/ml. Bei *S. meliloti* und *Agrobakterien* entspricht eine optische Dichte von 0,1 einem Bakterientiter von 1×10^8 Zellen/ml.

3.8.2 Konservierung von Bakterienstämmen

SM-Puffer

10 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5

1:4 mit sterilem Glycerin (87 %) mischen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien in SM-Puffer mit Glycerin eingefrieren.

- 1,5 ml einer über Nacht bei 37 °C gewachsenen Bakterienkultur für 30 sec mit 8.000 g pelletieren
- Überstand abziehen, Pellet im Rücklauf durch Vortexen lösen
- 750 µl SM-Puffer mit Glycerin zugeben
- bei -20°C lagern

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine enzymatische *in vitro* Methode, die die gezielte Amplifikation von DNA-Bereichen, welche von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingegrenzt werden, erlaubt. Neben der Entwicklung des eigentlichen Verfahrens haben auch die Entdeckung von thermostabilen DNA-Polymerasen und die Konstruktion von Thermocyclern die Bedeutung der PCR-Technik entscheidend mit beeinflusst. Bei der *in vitro* Synthese werden Oligonukleotide, die als Primer bezeichnet werden und deren Sequenzen komplementär zu einer definierten DNA-Matrize sind, als Starthilfe verwendet. Von den 3'-Enden der Primer ausgehend synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen Doppelstrang. Mit Hilfe eines gegenläufig orientierten Primers wird so die DNA-Sequenz zwischen den Primern gezielt vervielfältigt, wobei das maßgebliche Prinzip in der zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte liegt. Hiermit lassen sich aus einer heterologen DNA innerhalb weniger Stunden spezifische Fragmente exponentiell vermehren.

Ein PCR-Zyklus lässt sich in drei Phasen aufteilen. Die erste Phase, auch als Denaturierungsphase bezeichnet, sorgt bei Temperaturen zwischen 90-94°C für die Trennung des DNA-Doppelstranges. In der zweiten Phase, der Anlagerungsphase, hybridisieren die Primer bei Temperaturen um 55°C an die aufgeschmolzene und nun einzelsträngige vorliegende DNA-Matrize. In der dritte Phase, der Polymerisationsphase, synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur um 72°C den neuen DNA-Strang ausgehend von den 3'-Enden der Primer.

Für einen 25 µl Ansatz folgende Komponenten mischen:

- 2,5 µl PCR-Puffer (10 x)

- je 1 µl Primer (100 µM)
- 1-3 µl dNTP-Mix (10 µM)
- 100 ng Template-DNA (Plasmide, cDNA, DNA-Fragmente)
- 1 µl Polymerase-Mix (1 U)
- auf 25 µl mit Millipore-Wasser auffüllen
- möglichst schnell für die PCR-Reaktion einsetzen. Für jede PCR-Reaktion ist ein angepasstes Programm zu entwickeln, wobei insbesondere die Annealing-Temperatur der Primer und die Elongationszeit anzupassen sind.
- nach Beendigung der PCR-Reaktion Produkt(e) mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüfen

3.9.2 PCR-Mutagenese

Für die Mutagenese wurde das QuickChange Mutagenese Kit von Stratagene (STRATAGENE, La Jolla) verwendet. Das Kit bietet die Möglichkeit, in drei Schritten verschiedene Mutationen in ein Plasmid einzubringen. Punktmutationen lassen sich genauso einfach durchführen, wie Austausch einzelner Aminosäuren Deletionen oder Insertionen. Dazu werden weder besondere Vektoren oder Schnittstellen benötigt, noch mehrfache Transformationen oder Methylierungsschritte. Für die Mutagenese werden spezifische, komplementäre Primer erstellt, die die einzubringende Mutation enthalten. Mit einer leistungsstarken Polymerase und den Mutagenese-Primern wird das gesamte Plasmid zusammen mit der Mutation amplifiziert. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird der Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI behandelt. DpnI ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA und wird genutzt, um das parentale DNA Template zu verdauen. Übrig bleibt die Mutationen tragende DNA, die in der PCR-Reaktion generiert wurde und nicht methyliert ist. Die Plasmid-DNA, wird dann in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert.

- Mit geeigneten Primern gesamten Vektor amplifizieren und dadurch gewünschte Mutationen einfügen
- Für 30 min bei 37°C mit DpnI inkubieren
- PCR-Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese auftrennen und anschließend Produkte aus dem Gel eluieren. Eluierte Produkte über Nacht bei 4°C ligieren und dann in *E. coli* DH5α transformieren.

3.9.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren ist durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm möglich. Für die Umrechnung der ermittelten optischen Dichte in Konzentration gelten folgende Regeln:

- $o.D._{260} 1,0 = 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$
- $o.D._{260} 1,0 = 40 \mu\text{g/ml ssDNA, RNA}$
- $o.D._{260} 1,0 = 33 \mu\text{g/ml Oligonukleotide}$

3.9.4 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA-Abschnitten wurden sämtlich durch die Firma IIT GmbH (Universität Bielefeld) durchgeführt.

3.9.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch schnelle HB-Lyse

Diese Methode basiert auf der Alkalidenaturierung von DNA. Die nicht überspiralisierte DNA lässt sich in einem bestimmten basischen pH-Bereich denaturieren, während überspiralisierte DNA davon unbetroffen bleibt. Eine Neutralisierung der denaturierten DNA und Proteine führt zur Ausbildung eines unlöslichen Niederschlags, der sich mittels Zentrifugation vom Plasmid-DNA haltigen Überstand abtrennen lässt. Die Plasmide lassen sich durch Isopropanol-Fällung isolieren und sind für Restriktionsspaltungen nutzbar. Die Plasmide sind für weitere Klonierungs-experimente nicht geeignet, weil sie nicht rein genug sind.

10 mM EDTA pH 8,0, autoklavieren, 0,2M NaOH und 1% (w/v) SDS, immer frisch ansetzen,
3M Kaliumacetat pH 4,8, autoklavieren, Isopropanol, 70% (v/v) Ethanol, 0,025 $\mu\text{g/ml}$ DNAase-freie RNase

- 2 \times 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur 1 min bei 13,000 rpm zentrifugieren
- Überstand restlos entfernen
- Pellet in 200 μl 10 mM EDTA resuspendieren
- Zugabe von 400 μl 0,2M NaOH und 1% (w/v) SDS, mehrmals invertieren
- Zugabe von 300 μl 3M Kaliumacetat, mehrmals invertieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues steriles Eppis überführen. Pellet verwerfen.

- 600µl eiskaltes Isopropanol zugeben, gut mischen und mindesten 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml 70% (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Ethanol vollständig entfernen
- Pellet 5 min bei 65°C trocknen lassen
- Pellet in 20 µl sterilem Millipore-Wasser lösen, 1µl DNAase-freie RNase zugeben und 10 min bei 65°C inkubieren
- Die Plasmide sind jetzt bereit für die Restriktionsspaltung.

3.9.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch Spin prep Säulen

Zur Isolierung von reiner Plasmid-DNA wurde das Qiaprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Grundlage dieser Methode ist dieselbe wie bei HB-Lyse. Der Unterschied besteht in der Anwendung eines Affinitätschromatographie-Verfahrens. Plasmid-DNA wird an eine Säule gebunden und durch Waschen mit Puffern von restlichen Proteinen, RNA und Salzen befreit. Das Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

3.9.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch Midi und Maxi prep Säulen

Um größere Mengen von reinen Plasmiden zu gewinnen wurde das Midiprep Kit und Maxiprep Kit der Firma Qiagen verwendet.

3.9.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die aus Agarosegelen zu isolierenden DNA-Fragmente werden unter UV-Licht von 365 nm möglichst knapp ausgeschnitten und mit Hilfe des *Qiagen Gel Extraktion Kits* extrahiert.

- Das Gelstück wiegen und mit 3 Gelvolumen QG- Puffer versetzen und bei 50°C solange inkubieren, bis sich das Gelstück aufgelöst hat. Dabei die Lösung alle 2-3 min mischen.
- Nachdem das Gel vollständig gelöst ist, Isopropanol entsprechend des Volumens des ursprünglich eingesetzten Gelstücks zugeben.
- die Lösung auf eine Spinsäule geben und 1 min in einer Mikrozentrifuge bei 10000 rpm zentrifugieren

- Die Säule mit QG-Puffer und PE-Puffer waschen. Dazu zunächst 0,5 ml QG-Puffer auftragen und 1 min bei 10000 rpm zentrifugieren.
- 0,75 ml PE-Puffer zugeben und erneut bei 10000 rpm zentrifugieren. Zur Entfernung noch vorhandener Ethanol-Reste anschließend noch einmal 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren. Anschließend die Säule in ein neues 1,5 ml Eppis stellen und die DNA mit 30-50 µl Millipore-Wasser eluieren.

3.9.9 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsansatz folgendermaßen mischen:

- 1 µl Inkubationspuffer
- 1-5 U Restriktionsenzym(e)
- bis zu 20 µg zu spaltende DNA
- Ansatz durch Zugabe von Millipore-Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen bringen
- Inkubation bei geeigneter Temperatur für 75 min bis 150 min
- Enzyme durch Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktivieren (optional)
- Erfolg der Spaltung durch Auftragen von 3-5 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel überprüfen

3.9.10 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

- 34µl restringierte DNA
- 2 µl alkalische Phosphatase (1U/µl) und 4µl Puffer zugeben
- 15 min bei 37°C inkubieren
- Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation für 30 min bei 65°C

3.9.11 Ligation

Bei der Ligation werden mit Hilfe einer Ligase zwei DNA-Fragmente zu einem Doppelstrang verknüpft. Dabei katalysiert die T₄-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer freien 3'-Hydroxyl-Gruppe der DNA-Fragmente. Das Konzentrationsverhältnis zwischen dem Vektor und dem zu klonierenden Fragment sollte bei 1:3 liegen. Die Ligation wird über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Ligationsansatz

Gespaltenes Plasmid	1 µl
DNA-Fragment	7 µl

Ligase-Puffer	1 μ l
T4-Ligase	1 μ l

3.10 DNA-transfer Methoden

3.10.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen können chemisch kompetent zur Aufnahmen freier, löslicher DNA gemacht werden. Dazu ist eine Behandlung mit CaCl_2 notwendig.

0,1 M MgCl_2 , 0,1 M CaCl_2 , 87% Glycerin, Flüssiger Stickstoff

- 35 ml LB-Medium mit 2 ml Übernacht-Kultur von *E. coli* beimpfen
- Bei 37°C unter Schütteln inkubieren bis $\text{OD}_{578} = 0,5-0,6$
- 5 min bei 5000 rpm und bei 0°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 10 ml eiskaltem 0,1 M MgCl_2 resuspendieren
- 5 min bei 5000 rpm und bei 0°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 10 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 resuspendieren
- 20-30 min im Eisbad inkubieren
- 5 min bei 5000 rpm und bei 0°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 3,5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 resuspendieren
- mindestens 1h im Eisbad inkubieren
- 0,7 ml 87% Glycerin zugeben, in 200 μ l Aliquots aufteilen, in flüssigem Stickstoff einfrieren und -80°C aufbewahren.

3.10.2 Transformation von *E. coli*

SOC-Medium (100 ml), pH 7,0

2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 1,0 ml, 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, dazu:

1,0 ml 2 M Mg^{2+} -Stammlösung

1,0 ml 2 M Glukose (steril filtriert)

2 M Mg^{2+} -Stammlösung (steril filtriert)

20,33g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 24,65g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Zur Herstellung des SOC-Mediums Trypton, Hefeextrakt, NaCl-Lösung und KCl-Lösung zusammen in 97 ml Millipore-Wasser mischen und autoklavieren. Nach Abkühlung bis Raumtemperatur 1 ml von

Mg²⁺-Stammlösung und 1 ml Glukose-Lösung zugeben. Danach das Medium mit sterilem Millipore-Wasser bis zu 100 ml auffüllen.

- 10 µl Ligationsansatz zu 200µl kompetenten *E. coli*-Zellen geben
- 30 min auf Eis
- 45 s bei 42°C (Hitzeschock)
- sofort auf Eis für 2 min
- 250 µl SOC-Medium dazu
- 30 bis 60 min bei 37°C inkubieren
- 5 min bei 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet im Rücklauf resuspendieren (nicht vortexen!)
- auf eine LB-platte mit entsprechenden Antibiotika ausplattieren
- 37°C Über Nacht inkubieren

3.10.3 Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

- Bakterien in 3 ml YEP-Medium ohne Antibiotika animpfen und über Nacht bei 28°C inkubieren
- Hauptkultur 200 ml YEP ohne Antibiotikum mit 2 ml *A. tumefaciens* o/n Kultur beimpfen, 28°C für ca. 5 Std. inkubieren
- OD nach ca. 5 Std. messen. OD₅₅₀=0,4-0,6
- 10 bis 15 min bei 4000rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand wegwerfen
- Waschen mit 5 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, zentrifugieren wie zuvor
- Überstand wegwerfen, Pellet in 600 µl 10% Glycerin aufnehmen und vorsichtig vortexen (Stufe 1-2)
- Aliquotieren zu je 50 µl in Eppendorf-Gefäßen, in flüssigem Stickstoff schockfrieren und dann bei -80°C lagern

3.10.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 wird gleich wie beim *A. rhizogenes* durchgeführt (siehe Abschnitt 3.10.6.)

3.10.5 Herstellung der elektrokompetenter *A. rhizogenes* Zellen

10% (v/v) Glycerin, flüssiger Stickstoff

- 3 ml Übernacht-Kultur von *A. rhizogenes* zu 250 ml LB-Medium geben
- Bei 28°C unter Schütteln inkubieren, bis $OD_{578} = 0,5-0,6$ erreicht
- 5 min bei 5000 rpm und bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 50 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin resuspendieren
- 5 min bei 5000 rpm und bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet noch mal mit eiskaltem 10% (v/v) Glycerin waschen
- Zentrifugieren wie oben
- Überstand verwerfen, 5 ml 10% (v/v) Glycerin zu dem Pellet geben
- Zellen resuspendieren und in jeweils 200 µl Aliquots aufteilen
- in flüssigem Stickstoff einfrieren und -80°C aufbewahren

3.10.6 Transformation von *A. rhizogenes*

- DNA zu den aufgetauten kompetenten Zellen geben
- In vorgekühlte Elektroporationsküvette füllen
- Elektroporation mit 2,5 kV für Küvette mit 0,2 cm Schichtdicke
- Sofort 1 ml YEP-Medium (24°C) zugeben
- In Eppis überführen, bei 28°C für 3 h rollern lassen
- 100 µl auf YEP-Festplatte mit geeigneten Antibiotika ausplattieren
- 3 Tage bei 28°C inkubieren

3.11 Transformation und Anzucht von Pflanzen

Pflanzenmedium

Makroelemente

Element	Verbindung	Stammlösung (in mmol/l)	Endkonzentration (in mol/l)
Ca, Cl	CaCl ₂	4,5	0,9
K, P	KH ₂ PO ₄	5,0	1,0
Mg	MgSO ₄	2,0	0,5

Material und Methoden

Mikroelement (1000 ×)

Element	Verbindung	Endkonzentration (in mM)
Cl	KCl	50
B	H ₃ BO ₃	25
Mn	MnSO ₄ × H ₂ O	5
Zn	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	2
Cu	CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,5
Mo	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄	0,014
Fe	Fe- EDTA	40
Co	CoSO ₄ × 7H ₂ O	1

Zur Herstellung von 1 l Medium 15 g Pflanzenagar in 1 l Millipore-Wasser autoklavieren und danach jeweils 5 ml der Stammlösung CaCl₂, KH₂PO₄, sowie 4 ml von der Stammlösung MgSO₄ und 1 ml der Stammlösung der Mikroelemente zugeben. Die Platten auf einer um 15° geneigten Oberfläche gießen.

Pflanzennodulationsmedium

Stammlösungen ohne Stickstoff für die Pflanzen

Stammlösung	Element	Menge (in g/l)
A	CaCl ₂	294
B + B1	K ₂ HPO ₄	50
	KH ₂ PO ₄	150
B1	K ₂ HPO ₄	116
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,288
	H ₃ BO ₃	0,247
	CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,1
	CoSO ₄ × 7H ₂ O	0,056
	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,048
C	Fe ₃ -Citrat × 3H ₂ O	6,7

D	MgSO ₄ ×7H ₂ O	123
	K ₂ SO ₄	87
	MnSO ₄ ×H ₂ O	0,333

Zur Herstellung von 1 l Medium werden 15 g Pflanzenagar in 1 l Millipore-Wasser autoklaviert und danach jeweils 0,5 ml der Lösung A, [B + B1], C und D, sowie 1 ml der Lösung B1 zugeben. Die Platten auf einer um 15° geneigten Oberfläche gießen.

3.11.1 Anzucht von *Medicago truncatula*

Sterilisation von *M. truncatula* Samen

M. truncatula Samen 10 min in konzentrierter Salzsäure inkubieren. Danach 4 mal 5 min mit sterilem Millipore-Wasser waschen und 15 min quellen lassen. Anschließend das Millipore-Wasser vollständig abgießen und die Samen unter der Sterilbank trocknen. Ca. 20 - 50 Samen danach auf einer Pflanzenagarplatte zwei Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur keimen lassen. Jeweils 5 Keimlinge auf einer Pflanzenagarplatte vereinzeln, so dass die Wurzeln in einer Richtung orientiert sind und die Pflanzen bei 23°C wachsen lassen.

Anzucht von Keimlingen für die Induktion von Wurzelknöllchen

- zwei Tage alte Keimlinge auf Agarplatten mit Nodulationsmedium parallel auslegen
- 1,5 ml stationäre Kultur von *S. meliloti* 2011 bei 10.000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen und Bakterienpellet in 1,5 ml sterilem PBS-Puffer (siehe Abschnitt 3.13.2) resuspendieren
- *M. truncatula* Keimlinge im Bereich der Wurzeln mit jeweils ca. 50 µl Bakteriensuspension inokulieren
- Agarplatten mit Parafilm umwickeln, diesen im Bereich zwischen Deckel und Boden der Petrischalen mehrfach mit einem Skalpell durchstechen, um den Gasaustausch zu ermöglichen.
- Anzucht aufrecht gelagert für 21 Tage bei 25°C, 200 µE/m²*s, 65% Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkelheit.
- Knöllchen mit einer sterilen Pinzette „ernten“, sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren, bei -80 °C lagern.

Anzucht von *M. truncatula* in Erde

3 Tage alte Keimlinge in Erde pikieren und in einer Klimakammer unter folgenden Bedingungen anziehen: 25°C, 200 µE/m²*s, 65% Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkelheit. Nach Bedarf mit Wasser gießen

3.11.2 Transformation von *Medicago truncatula* mittels der “hairy root” Methode

Zur „hairy root“ Transformation von *Medicago truncatula* wird der Agrobakterium-Stamm ArQual verwendet (Quandt *et al.* 1993). Bei dieser Methode werden die Wurzeln der Keimlingen abgeschnitten und die Wundstelle über eine mit Agrobakterien bewachsene Agarplatte gestrichen.

- Zwei bis drei Tage alte *M. truncatula* Keimlinge in paralleler Ausrichtung auf Pflanzenagarplatten auslegen
- gewünschten *A. rhizogenes*-Stamm auf YEP-Medium mit geeigneten Antibiotika ausstreichen und über Nacht bei 28 °C inkubieren
- 1-2 cm von der Wurzelspitze mit einer scharfen Rasierklinge schneiden und die Wundstelle die auf der Agarplatte wachsenden Agrobakterien streichen
- Agarplatten zum Schutz gegen Austrocknung mit Parafilm umwickeln, zwischen Deckel und Boden mehrfach einstecken, um Gasaustausch zu gewährleisten und für drei bis sechs Wochen inkubieren.
- Die Pflanzen im Dunkeln für 2 Tage bei 21°C stellen, danach in 14 Std. Licht/10 Std. Dunkeln bei 21°C

3.11.3 Anzucht von *Nicotiana benthamiana*

Die Pflanzen werden unsteril im Gewächshaus bei 21°C 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkeln wachsen lassen.

3.11.4 Kultivierung von BY-2 Tabak Suspensionszellen

BY-2 Zellkulturmedium

4,41 g MS-Salze, 30 g/l Saccharose, 100 mg/l Myo-inositol, 255 mg/l KH₂PO₄, 1 mg/l Thiamin-HCl, 0,2 mg/l 2,4-D, mit KOH auf pH 5,0 einstellen, autoklavieren

BY2-Zellkulturen einmal wöchentlich durch eine 1:50 Verdünnung mit frischem Medium passagieren.

Die Kolben auf einem Rundschtüttler bei 25°C und 100 rpm im Dunkeln schütteln.

3.11.5 Isolierung von Protoplasten aus BY2-Zellkulturzellen

Waschlösung

0,5%(w/v) BSA, 0,01%(w/v), 2-Mercaptoethanol, 50 mM CaCl₂, 10 mM Na-Acetat, 0,25M Mannitol, pH 5,8, steril filtrieren

Verdaulösung

1%(w/v) Cellulase Onozuka RS, 0,5%(w/v) Macerozyme Onozuka RS, in Waschlösung

- 20 ml der Zellkultur (3 Tage alt) in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführen
- 5 min bei 400 g und Raumtemperatur (RT, ca. 24°C) zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellen in 25 ml Waschlösung lösen
- 5 min bei 400 g und RT zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellen in 13 ml Verdaulösung resuspendieren
- in Petrischale (90 mm Durchmesser) geben, mit Parafilm verschließen
- Bei 26°C über Nacht inkubieren

Ab jetzt müssen die Zellen sehr vorsichtig behandelt werden.

Die gefrorene PEG-Lösung bei 37°C auftauen, andere Lösungen auf RT

- Protoplasten vorsichtig in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführen
- 5 min bei 100 g zentrifugieren (Softbrake und Bremse aus!)
- Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 ml entfernen, Pellet im Rücklauf resuspendieren
- langsam 25 ml Waschlösung zugeben, vorsichtig mischen, zentrifugieren wie oben
- Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 ml entfernen, Pellet in den Rest resuspendieren
- langsam insgesamt 10 ml W5-Lösung zugeben (zuerst 1 ml, resuspendieren, dann 2 ml usw.) zentrifugieren wie oben
- Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 ml entfernen, Pellet im Rücklauf resuspendieren langsam insgesamt 5 ml W5-Lösung zugeben
- 20-30 min im Dunkeln bei 4°C inkubieren
- Überstand vollständig entfernen, Protoplasten vorsichtig und schrittweise in insgesamt 10 ml MMM-Lösung resuspendieren zentrifugieren wie oben
- Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 ml entfernen und mit MMM-Lösung auf entsprechende Protoplastendichte einstellen (2×10^6 /ml)

Die Protoplasten sind nun bereit für die Transformation.

3.11.6 Transformation von BY2-Protoplasten aus *Nicotiana tabaccum*

W5-Lösung

154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM Glukose

mit KOH auf pH 5,8-6,0 einstellen, autoklavieren

MMM-Lösung

15 mM MgCl₂, 0,1% (w/v) MES, 0,5 M Mannitol
mit KOH auf pH 5,8 einstellen, autoklavieren

PEG-Lösung

40% (w/v) PEG 4000, 0,4 M Mannitol, 0,1 M Ca(NO₃)₂
mit KOH auf pH 8-9 einstellen, autoklavieren bei -20°C aufbewahren

BY-2 Zellkulturmedium mit Saccharose

0,4 M Saccharose in BY-2 Zellkulturmedien, steril filtrieren

- 30 µg DNA (nicht mehr als 30µl) in ein steriles Röhrchen geben
- 300 µl der Protoplastensuspension zugeben (mit einer abgeschnittenen 1 ml Spitze)
- Röhrchen zum Vermischen drehen
- Tropfenweise 300 µl PEG-Lösung zugeben und vorsichtig mischen
- 10-20 min bei RT inkubieren
- 10 ml W5-Lösung zugeben (sehr vorsichtig!), 5 min bei 100 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen, 0,7 ml BY-2 Zellkulturmedium mit Saccharose zugeben
- Die Röhrchen mit nicht ganz zugeschraubtem Deckel, fast horizontal gelagert bei 26°C für mindestens einen Tag inkubieren, dann am Mikroskop untersuchen.

3.11.7 Transformation von *Nicotiana benthamiana* mit der Particle-Gun Methode

Beschichtung von Gold mit DNA

2,5 M CaCl₂, 70% EtOH, 100% EtOH, 50% Glycerin, 0,1 M Spermidin

- 3 mg Gold (Ansatz für 6 Schuss) in 100 µl 70% Ethanol aufnehmen und 20 sec (oder länger) vortexen. Das Gold soll fein verteilt sein.
- Suspension für 1 min auf Eis stehen lassen und danach 1 min bei 6000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, 50 µl H₂O zu den Pellet geben, vortexen bis das Gold resuspendiert ist und für 1 min inkubieren
- 15 sec bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugieren, Überstand wegwerfen
- 50 µl 50% Glycerin zugeben, vortexen bis die Goldpartikel resuspendiert sind
- 10 sec Ultraschall-Behandlung
- Suspension auf Eis stellen, insgesamt 7 µl DNA (1µg/µl) zugeben, mit der Pipettenspitze mischen und zur Resuspension Gefäß leicht mit den Fingern anschnipsen

- Ansatz für 5 min auf Eis inkubieren
- 50 µl 2,5 M CaCl₂ zugeben, erneut vorsichtig resuspendieren, ca. 1 min inkubieren
- 20 µl kaltes Spermidin zugeben, vorsichtig resuspendieren, für 5 min auf Eis
- 15 sec bei 5000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 100 µl 70% EtOH zugeben, vorsichtig resuspendieren
- 5 sec bei 5000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 50 µl wasserfreien EtOH zugeben, vorsichtig resuspendieren
- Zentrifugieren wie oben, 35 µl wasserfreien EtOH zugeben
- 2-3 sec Ultraschall-Behandlung
- Je 5 µl dieser Suspension auf „flying discs“ beladen, 5 min unter der Sterilbank trocknen

Transformation durch Beschuss mit der Particle Gun

- *N. benthamiana* Blätter in einer Petrischale mit der unteren Epidermis nach oben zeigend auf Filterpapier auflegen das mit Wasser befeuchtet ist.
- Kanone mit Ethanol aussprühen.
- Einsetzen der Berstscheiben. Festschrauben in der vorgesehenen Halterung.
- Einlegen des Netzes (vorher ausglühen) und der beladenen „flying disc“ in das Acceleration Tube. Festschrauben der vorgesehenen Halterung. Einschieben in die Kanone.
- Petrischale-offen- mit dem zu beschießenden Material einstellen.
- Tür schließen.
- Vakuum anlegen (20-25 in. Quecksilbersäule).
- „Fire“-Schalter so lange halten, bis die Berstscheiben zerplatzen.
- Vakuum aufheben.
- Petrischale herausnehmen, mit Parafilm verschließen.

3.11.8 Infiltration von *Nicotiana tabaccum*

Infiltrationsmedium Stamm-Lösung

- 500 mM MES (Sigma, UK): 4,88 g in 50 ml Millipore-Wasser, bei 4°C aufbewahren
- 20 mM Na₃PO₄×12H₂O: 0,38 g in 50 ml Millipore-Wasser, bei 4° aufbewahren
- 1 M Acetosyringon (3', 5' -dimethoxy-4'- hydroxy acetophenone): 0,196 g in 1 ml DMSO. Aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

Zur Herstellung des Infiltrationsmediums 250 mg D-Glukose, 5 ml MES Stammlösung, 5 ml $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ Stammlösung und 5 μl 1 M Acetosyringon Stammlösung in einem sterilen Falcon-Röhrchen mischen und bis 50 ml mit Millipore-Wasser auffüllen. Das Medium soll immer frisch für jeden Versuch vorbereitet werden.

Anzucht und Vorbereitung von *Agrobacterium tumefaciens*

- *Agrobakterien* Stamm GV3101 5 ml YEP Medium animpfen und über Nacht bei 28°C, 200 rpm inkubieren.
- 1-1,5 ml der Kultur in ein steriles Eppi geben und für 10 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, 1 ml Infiltrationsmedium zu dem Pellet geben und resuspendieren
- Für 10 min bei 3000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml Infiltrationsmedium resuspendieren
- Die Konzentration von Bakterien auf 1 zu 10 verdünnen und $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ messen, das Ergebnis mal 10 gleich Initialkonzentration
- Die Bakterien verdünnen, bis eine Konzentration von 0,1 bis 0,02 OD erreicht ist
Initialvolumen = (Endkonzentration \times Endvolumen) \times Initialkonzentration

Beispiel: Die Bakterienkonzentration hat eine OD von 0,4 und die Endkonzentration soll bei 0,1 sein.

Die Verdünnung wird wie folgt berechnet:

$$\text{Initialvolumen} = (0,1 \times 500 \mu\text{l}) \times 0,4 = 125 \mu\text{l}$$

Daraus ergibt sich 125 μl Bakterienkultur + 375 μl Infiltrationsmedium = 500 μl Endvolumen. Falls zwei *Agrobakterien* Stämme gleichzeitig infiltriert werden sollen, werden ihre Initialvolumina zusammen in ein Eppi gegeben und mit Infiltrationsmedium bis 500 μl aufgefüllt.

Infiltration von Tabak Epidermiszellen

- Pflanzen vor der Infiltration für eine Stunde unter eine weiße fluoreszierende Lampe stellen damit sich die Stomata vollständig öffnen.
- Geeignete Blätter aussuchen. Am meisten geeignet ist das dritte oder vierte Blatt hinter dem Apikalmeristem.
- Die Blattunterseite durch eine Spritze ohne Kanüle sanft reiben, um das Kutikulawachs zu entfernen. Die Stelle mit einem Stift markieren.
- *Agrobakterien* Suspension mit einer 1 ml Spritze aufnehmen.

- Spritze auf der bearbeiteten Blattfläche ansetzen und Agrobakterien-Suspension mittels der Spritze in das Gewebe hinein filtrieren, dabei mit den Fingern auf der Blattoberseite leicht dagegen drücken.
- Infiltrierte Pflanzen im Gewächshaus inkubieren (siehe Abschnitt 3.11.3).
- Expression des Transgens nach 24 Std. bis zu 5 Tage nach der Infiltration mittels Mikroskopie untersuchen.

3.12 *Proteinbiochemische Methoden*

3.12.1 **Proteinextraktion aus Pflanzen mittels Phenol (Huarkman und Tanaka 1986)**

Extraktionspuffer (100 ml)

100 mM Saccharose	23,961 g
500 mM Tris	6,057 g
50 mM EDTA-Dihydrat	1,8612 g
100 mM KCl	0,7456 g
Millipore-Wasser	100 ml

pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren, danach jeweils 1 ml aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.

0,1 M NH₄Ac-Lösung:

0,7708 g in 100 ml Methanol

- 0,5 g Wurzelmaterial (in Stickstoff eingefroren) in der Schwingmühle zu Pulver verarbeiten
- Aufnahme des Extraktes in 750 µl Extraktionspuffer plus β-Mercaptoethanol (20 µl pro 1 ml Extraktionspuffer)
- Vortexen, 10 min auf Eis inkubieren
- 750 µl Phenol zugeben, vortexen und 30 min schütteln bei 4-10°C
- 10 min bei 11.000g und 4°C zentrifugieren
- 4-6 mal 100 µl der oberen Phase in ein neues Eppi überführen
- Äquivalentes Volumen an Extraktionspuffer (+ β-Mercaptoethanol) zu der gesammelten oberen Phase geben, vortexen
- 10 min bei 11000g und 4°C zentrifugieren. Inzwischen leeres 2 ml Eppi an der Analysewaage auswiegen

- Komplette obere Phase in 75 μ l Schritten abnehmen und in das Eppi überführen
- 5×Volumen an 0,1 M NH_4Ac -Lösung zu der gesammelten oberen Phase zugeben
- Proteinfällung bei -20°C für mindestens 4h oder über Nacht
- 5 Waschschrte des Pellets: 3×17.000g/3 min in 0,1 M NH_4AC -Lösung
2×17.000g/4 min in 80% Aceton
- 1 min das Pellet in der Speedvac trocknen, bei -80°C einfrieren

3.12.2 Gesamtproteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration kann der BioRad Protein-Assay verwendet werden. Der Nachweis basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung von Coomassie Brillant Blue G-250 in Gegenwart von Proteinen von 465 nm auf 595 nm. Die OD_{595} ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration.

- 5 – 50 μ l proteinhaltige Lösung mit H_2O auf 800 μ l auffüllen und 0,2 ml BioRad-Konzentrat hinzugeben
- Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 595 nm und Vergleich der Absorption mit einer geeigneten Eichkurve

3.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine besitzen als amphotere Makromoleküle einen unterschiedlichen Anteil an positiv (Lysin, Arginin) und negativ geladenen (Asparaginsäure, Glutaminsäure), sowie ionisierbaren (z.B. Histidin, Cystein) Aminosäureresten. Die elektrophoretische Mobilität in einer porösen Gelmatrix ist daher nicht nur von der Größe und Form, sondern auch der Nettoladung unter den jeweiligen Bedingungen abhängig. Eine Auftrennung von Proteinen ausschließlich nach Größe ist jedoch nach Behandlung mit den anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) möglich.

Bei der Probenvorbereitung werden die Proteine mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken aufgelöst. Disulfidbrückenbindung zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung wie z.B. β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) gespalten (Auflösen der Quartärstruktur). Dabei werden die Proteine vollkommen entfaltet und gegebenenfalls in Ihre Untereinheiten zerlegt. Durch hydrophobe Wechselwirkung kommt es zu einer gleichmäßigen Beladung der Polypeptidkette mit dem negativen geladenen SDS, wobei die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Im Überschuss bindet etwa 1,4 g SDS pro 1 g Protein. Deshalb unterscheiden sich die SDS-Protein-Komplexe nur noch in ihrer Größe, nicht aber in ihrer Nettoladung pro Gewichtseinheit.

Bei der SDS-Gelelektrophorese wandern die mit SDS komplexierten Proteine ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode.

Aufbau der Gießapparatur

Gießapparatur (Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster), Probenkämme, Spacer, Aluminiumoxid- und Glasplatten, Netzgerät, Elektrophoreseeinheit (2050 Midget) mit Klammern

Die Glas- und Aluminiumoxidplatten, Spacer und Probenkämme mit Millipore-Wasser und anschließend mit Ethanol säubern. Die Gelkassette mit Hilfe der Gießapparatur zusammenbauen

Herstellung der Gelmixtur

5×SDS-Puffer (Probenpuffer)

320 mM Tris/HCl pH6,8, 20 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS 40% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau

10×SDS-Elektrophoresepuffer

250 mM Tris/HCl pH8,3, 1,92 M Glycin, 1% SDS

Gebrauchsfertige Acrylamid/Bisacrylamid Mischung: 30% Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1 (Roth).

Trennbereiche von SDS-Gelen

Acrylamidkonzentration (%)	6	8	10	12	15
Trennbereich (kD)	50-200	30-95	20-80	12-60	10-43

Trenngele (Alle Angaben beziehen sich auf ein Volumen von 20 ml angesetzter Gellösung)

Gelkonzentration	6%	8%	10%	12%	15%
Aqua dest. (ml)	10,6	9,3	7,9	6,6	4,6
30% Acrylamid Mischung	4	5,3	6,7	8	10
Tris (1,5 M, pH 8,8) (ml)	5	5	5	5	5

Es wird in dieser Reihenfolge zugegeben:

200 μ l 10% SDS Lösung (Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden)

200 μ l 10% Ammoniumpersulfatlösung (frisch angesetzt)

20 µl TEMED (Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden)

Gel sofort gießen und mit Isopropanol überschichten.

Sammelgele (alle Angaben beziehen sich auf 5% Gele)

Gelmenge	1 ml	3 ml	5 ml	8 ml	10 ml
Aqua dest. (ml)	0,68	2,1	3,4	5,5	6,8
30% Acrylamid Mischung	0,17	0,5	0,83	1,3	1,7
Tris (1,0 M, pH 6,8) (ml)	0,13	0,38	0,63	1	1,25
10% SDS (µl)	10	30	50	80	100
10% APS (µl)	10	30	50	80	100
TEMED (µl)	1	3	5	8	10

Vor und nach Zugabe von SDS und TEMED den Ansatz vorsichtig mischen, Luftblasen vermeiden.

Das Sammelgel sofort gießen und vorsichtig den Kamm einstecken.

Lauf des Gels

- Das Trenngel ansetzen und bis ca. 0,5 cm unterhalb der Position des Probenkamms in die Gelkassette einfüllen
- Das Gel mit Isopropanol überschichten
- Nach dem Auspolymerisieren (ca. 30 min) das Isopropanol abgießen und die letzten Reste mittels eines Saugtuchs vom Gel entfernen
- Das Trenngel mit dem Sammelgel überschichten, Probenkamm einsetzen und 30 ca. min polymerisieren lassen
- Die Gelkassette aus der Gießapparatur nehmen und mit Klammern in der Elektrophoreseeinheit befestigen
- Den SDS-Elektrophorese-Puffer erst in den oberen, dann in den unteren Pufferbehälter füllen
- Luftblasen unter der Gelkassette entfernen
- Kamm aus dem Sammelgel entfernen
- Bis zu 10µl Probe pro Tasche auftragen
- Elektrophorese mit 60-100V durch das Sammelgel und mit 150V durch das Trenngel, bis die BPB-Front das untere Ende der Gelkassette erreicht hat

- Nach Beendigung der Elektrophorese, die Gelkassette aus der Elektrophoreseeinheit entfernen und mit Hilfe der Spacer vorsichtig öffnen, Gel zum Färben oder zur Western-Blot-Analyse verwenden

3.12.4 Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie

Coomassie-Färbelösung

1g Coomassie Blue 250, 70 ml Eisessig, 250 ml Methanol

680 ml Millipore-Wasser

Coomassie-Entfärbelösung

70 ml Essigsäure, 250 ml Methanol, 680 ml Millipore-Wasser

- Gel in einer Schale mit Coomassie-Färbelösung für 1h bei RT schütteln lassen
- Färbelösung abgießen und Entfärbelösung zugeben
- unter Schütteln bei RT entfärben lassen bis die Banden sichtbar sind
- die Entfärbelösung mehrmals wechseln

3.12.5 2D-Gelelektrophorese

Isoelektrische Fokussierung

Rehydrierungslösung:

Harnstoff 8 M 12,0 g

Triton X-100 2%(v/v) 0,5 ml

(oder CHAPS* 2% (v/v) 0,5 g)

Bromphenolblau eine kleine Spatelspitze

Millipore-Wasser ad 25,0 ml

Aliquotieren zu jeweils 2 ml pro Eppi und bei -20°C aufbewahren

Vor Gebrauch 5,6 mg DTT und 10 µl IPG-Puffer pro 2 ml Lösung zugeben.

- 350 µl Rehydrierungslösung plus DTT und IPG-Puffer zu dem Proteinpellet geben, mit einer Pipette resuspendieren
- Für 30 min auf Schüttler inkubieren, bei 13000 rpm für 10 min zentrifugieren
- Überstand in neues Eppis überführen

- Proteinlösung in einen Keramikhalter pipettieren
- Vorsichtiges Auflegen des Gelstreifens, so dass keine Luftblasen entstehen
- Auftragen des IPG-Cover-Fluids (~500 µl) um Evaporation und Fällung vom Harnstoff zu vermeiden
- Keramikhalter entsprechend der Markierung auf der IPGphor-Plattform positionieren.
- Protokoll auswählen und starten:

12 Std.	30V	(Step & Hold)
1 Std.	500V	(Steps & Hold)
1 Std.	1000V	(Gradient)
4 Std.	8000V	(Gradient)
6 Std.	8000V	(Step & Hold)

3.12.6 2D-SDS-Gelelektrophorese

Equilibrierungslösung:

1,5 M Tris/HCl, pH 7,850 mM 6,7 ml, Urea 6 M 72,07g, Glycerin (87%) 30% (v/v) 69,0 ml, SDS 2%(w/v) 4,0 g, Bromphenolblau eine kleine Spatelpitze, Millipore-Wasser ad 200,0 ml

Aliquotieren zu jeweils 40 ml und bei -20°C aufbewahren

12% iges Gel (ohne Sammelgel) gießen:

Pipettierschema für zwei Gele der Größe 20 cm × 20 cm:

Acrylamidlösung 40%	27 ml
Tricine Gelpuffer	30 ml
Glycerin 87%	12 ml
ddH ₂ O	21 ml
APS	300 µl
TEMED	30 µl

- Gel bis ca. 2 mm unterhalb der Kante der kleineren Glasplatten gießen und im Anschluss vorsichtig mit Overlay-Solution überschichten. Nach vollständiger Polymerisation ist es soweit geschrumpft, dass genug Platz für den IPG-Streifen vorhanden ist.

Equilibrierung des Gelstreifens:

Für 15 min mit Equilibrierungslösung mit DTT (0,4 g/40 ml) zur Reduktion der Cysteinbrücken inkubieren

Für 15 min mit Equilibrierungslösung mit Jodacetamid (1g/40ml) inkubieren.

Anschließend Gelstreifen in Tricin-Gelpuffer spülen.

- Positionierung des Gelstreifens: Den Streifen möglichst ohne das Gel zu berühren zwischen den beiden Glasplatten positionieren und mit einem Spacer vorsichtig nach unten schieben bis er das Tricingel berührt. Luftblasen sollten vermieden werden. Anschließend Gelstreifen mit einer Agarose-Lösung versiegeln.
- Gelapparatur in die Gelkammer stellen, Kathodenpuffer und Anodenpuffer zufügen, Luftblasen unter dem Gel entfernen.
- Strom einschalten, bei max. 500V, 30 mA je mm Geldicke etwa 20 Std. laufen lassen. Kühlung des Gels bei etwa 20°C.

3.12.7 Western-Blot-Analyse

Die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine werden mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Protein/SDS-Komplexe wandern dabei im elektrischen Feld vom Gel zur anodenseitigen PVDF-Membran.

Methanol

Ponceau S-Lösung

10×TB

50 mM Tris, 50 mM Borsäure

10×TBS

0,2 M Tris/HCL pH 7,5, 1,5 M NaCl

Immunpuffer

94,9% 1×TBS pH 7,5, 5% Magermilchpulver, 0,1% Tween20

Tankblot-Apparatur, Netzgerät, Schüttler, Färbeschalen, Blotting-Filterpapiere, PVDF-Membran
die PVDF-Membran folgt behandeln:

- 2-3 sec in 100% Methanol
- 15 min in Millipore-Wasser
- 30 min in 1×TB äquilibrieren

Folgendes Sandwich wird auf die weiße Seite des Tankblot-Einsatzes geschichtet:

- Blotting-Filterpapiere
- die PVDF-Membran
- das Gel
- Blotting-Filterpapiere

Protein-Transfer: 1,5 h bei 80 mA

- Zur Überprüfung des Transfers die Membran ca. 1 min in Ponceau S-Lösung färben. Die überschüssige Färbelösung mit Millipore-Wasser entfernen, bis die Banden gut sichtbar sind.
- Zur Dokumentation die Membran, in Cellophanfolie einpacken und fotografieren.
- Zur immunologischen Detektion Membran mit 1×TBS ca. 10 min entfärben.

Immunologische Detektion geblotteter Proteine mittels DAB. Der Nachweis spezifischer Proteine/Epitope auf der PVDF Membran erfolgt mittels einer indirekten immunologischen Methode. Hierbei bindet ein unmarkierter Primärantikörper an sein Epitop auf dem Antigen. Die Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt durch ein an einen Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym wie zum Beispiel Peroxidase. Als Substrat der Peroxidase wird DAB (Diaminobenzidin) verwendet. DAB wird durch die Peroxidase oxidiert und bildet ein in wässrigen Lösungsmitteln unlösliches Präzipitat brauner Farbe, das im normalen Licht detektiert werden kann.

Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung

1 DAB Tablette in 15 ml Millipore-Wasser lösen, unmittelbar vor der Farbreaktion 12 µl 30% H₂O₂ hinzugeben.

- Die Membran eine Stunde mit 5% (w/v) Magermilchpulver und 0,1% (v/v) Tween20 in TBS inkubieren (unspezifische Bindungen blocken)
- Über Nacht mit verdünntem Primär-Antikörper in 0,5% (w/v) BSA in TBS bei RT inkubieren
- 3 mal Waschen mit TBS
- 2 Std. mit verdünntem Sekundärantikörper in TBS bei RT inkubieren
- 3 mal Waschen mit TBS
- Mit Diaminobenzidin (DAB)-Lösung inkubieren bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind.
- DAB-Färbereaktion durch Waschen mit Wasser abstoppen
- Membran trocknen und zur Dokumentation einscannen

Probenvorbereitung für Massenspektroskopie

TDL1: 60% (v/v) CH₃CN, 0,1 % (v/v) TFA

TDL2: 50% (v/v) CH₃CN

TDL3: 50% (v/v) CH₃CN, 50 mM NH₄HCO₃

TDL4: 50% (v/v) CH₃CN, 10 mM NH₄HCO₃

TDL5: 10 mM NH₄HCO₃

Trypsinlösung: 6,6 µg/ml modifiziertes Trypsin in 10 mM NH₄HCO₃ (TDL5), frisch ansetzen

Tryptischer Verdau in Eppendorf-Gefäßen

- Eppi mit 500 µl TDL1 waschen, Lösung vollständig entfernen
- Eppi unter dem Abzug über Nacht abdampfen lassen
- Coomassie –gefärbte Proteinbande bzw. –spot aus Gel mit einem sauberen Skalpell ausschneiden, in gewaschenes Eppi überführen, Gelstücke evtl. in kleine Fragmente zerteilen.
- Zugabe von 100 µl TDL2
- 5 min bei Raumtemperatur im Eppi-Schüttler waschen
- TDL2 entfernen, durch 100 µl TDL3 ersetzen
- 30 min bei Raumtemperatur im Eppi-Schüttler waschen
- TDL3 entfernen, durch 100 µl TDL4 ersetzen
- 30 min bei Raumtemperatur im Eppi-Schüttler waschen
- TDL4 komplett entfernen
- Gelstückchen bei Raumtemperatur in Speedvac ca. 30 min komplett trocknen (ohne Speedvac über Nacht unter Aufzug trocknen)
- Zugabe von 15 µl Trypsinlösung, 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zugabe von 20 µl TDL5
- 24 Std. Inkubation bei 37°C
- Tryptischen Verdau sofort für MALDI-TOF einsetzen oder bei -20°C lagern

Tryptische Verdau in 96 Well-Microtiterplatten

- Coomassie-gefärbte Proteineinbanden bzw. –Spots aus Gel mit GelPal ausschneiden und in die Mikrotiterplatte überführen
- Zugabe von jeweils 150 µl TDL2
- 5 min bei Raumtemperatur auf dem Eppi-Schüttler waschen
- TDL2 entfernen, durch jeweils 150 µl TDL3 ersetzen
- 30 min bei Raumtemperaturen auf dem Eppi-Schüttler waschen
- TDL3 entfernen, durch jeweils 150 µl TDL4
- 30 min bei Raumtemperatur auf dem Eppi-Schüttler waschen
- TDL4 komplett entfernen

- Gelstückchen bei Raumtemperatur über Nacht oder in der Speedvac ca. 30 min komplett trocknen
- Zugabe von 0,5 µl+19,5 µl 10 mM NH₄HCO₃ pro Well
- Microtiterplatte gut abkleben und über Nacht bei 37°C inkubieren
- Tryptischen Verdau sofort für MALDI-TOF einsetzen oder bei -20°C lagern

3.13 Mikroskopische Methoden

3.13.1 Selektion von transgenen Wurzeln

Drei bis sechs Wochen nach der Transformation werden Wurzeln von *M. truncatula* auf Expression der eingebrachten Konstrukte überprüft. Für die Untersuchungen wird ein MZFLIII-Fluoreszenzbinokular der Firma Leica verwendet. Dieses ist mit einer Kaltlichtquelle, einem 100 W HBO-Brenner, zwei verschiedenen Objektiven (Plano1xNA 0,125 und PlanApo 1,6 x NA 0,125) und Filtern für GFP-, CFP-, YFP- und dsRed-Anregung ausgestattet:

Tabelle: Filterausstattung des Leica MZFLIII Fluoreszenzbinokulars. LP = long pass Filter

Filterset	Anregungsfilter	Sperrfilter
GFP Plant fluorescence	470/40 nm	520/50 nm
CFP	436/20 nm	480/40 nm
YFP	510/20 nm	560/40 nm
DsRed	546/12 nm	560/LP

Mit dem Leica MZFLIII Fluoreszenzbinokular lassen sich transformierte Pflanzen nicht invasiv überprüfen. Wie unter Punkt 3.11.2. beschrieben, werden die transformierten Pflanzen auf Nährmedium in Petrischalen kultiviert. Unter Verwendung des Fluoreszenzbinokulars müssen die Petrischalen für die Untersuchung nicht geöffnet werden, so dass das Material weiterhin steril bleibt. Transgene Wurzeln können von nicht transgenen Wurzeln anhand der deutlich sichtbaren grünen GFP-Fluoreszenz unterschieden werden. Nicht transgene Wurzeln zeigen vorwiegend gelbe Autofluoreszenz und, in Abhängigkeit von den zur Kultivierung eingesetzten Lichtbedingungen, teilweise rote Autofluoreszenz der Proplastiden.

3.13.2 Immunlokalisierung

2×PME Puffer

100 mM Pipes, 10 mM MgSO₄, 20 mM EGTA, pH 7,0, mit HCl einstellen

8%PFA (Paraformaldehyd)

0,8g PFA in 10 ml Millipore-Wasser, pH 7,0 mit KOH einstellen

Um die Fixierungslösung anzusetzen 5 ml 2×PME Puffer und 5 ml 8% PFA mischen und pH-Wert genau bei 7,0 einstellen.

PBS-Lösung

135 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

- Knöllchen mit Dünnschnittsgerät Leica VT 1000S Vibratom in 50-80µm dicke Scheiben schneiden
- 2 h in Fixierungslösung pH 7,0 (4% PFA in PME) inkubieren
- 3 mal für 10 min mit 1×PME-Lösung waschen
- 1-1½ h in Blockierungs-Puffer (2% BSA in PBS, pH 7,4) inkubieren
- Den Blockierungs-Puffer entfernen und Primärantikörper in PBS (1:20) mit 0,5% BSA zugeben
- 3 mal für 10 min mit PBS pH7,4 waschen
- 2 h mit Sekundärantikörper in PBS (1:100) inkubieren
- 3 mal für 10 min mit PBS waschen
- Die Probe am CLSM analysieren

3.13.3 Confokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Die confokale Lasermikroskopie erfolgt nach dem Prinzip der Ein-Photonen Anregung, wie sie in Abbildung 3.5. skizziert ist und verlangt daher den Einsatz einer Lochblende, um den Einfall Streulicht aus nichtfokussierten Ebenen zu minimieren.

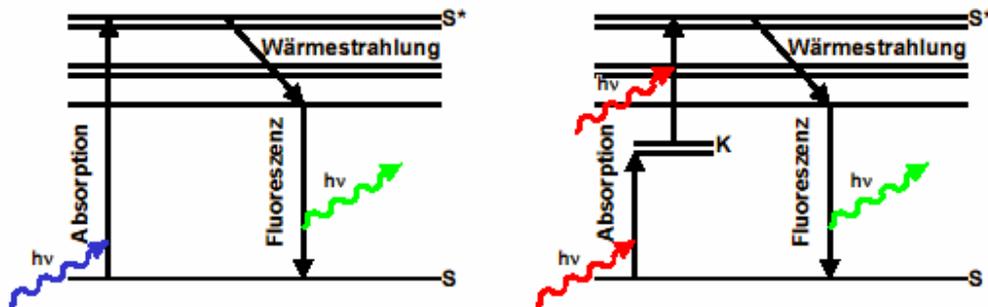


Abb. 3-5: Vergleich der Energieschemata von Fluoreszenz- und Zwei-Photonen-Anregung. Links: Bei der konventionellen Fluoreszenzanregung wird ein energiereiches Lichtquant absorbiert. Dadurch erreicht das Molekül einen energiereicheren, angeregten Zustand (S^*). Innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} Sekunden gibt das angeregte Molekül einen Teil der absorbierten Energie als Wärmestrahlung, den Rest hingegen als Fluoreszenzstrahlung ab und fällt in den nicht angeregten Grundzustand zurück (S). Rechts: Bei der Zwei-Photonen Mikroskopie wird die notwendige Energie zur Anregung des Moleküls durch Absorption von zwei Lichtquanten geliefert. Das Prinzip funktioniert nur, wenn die beiden Quanten praktisch gleichzeitig von dem Molekül absorbiert werden, so daß es einen kritischen Übergangszustand (K) überwinden kann. Genau wie bei der konventionellen Fluoreszenzanregung wird ein Teil der aufgenommenen Energie als Wärme abgestrahlt, der andere Teil hingegen als Fluoreszenz emittiert.

In dieser Arbeit wurde ein Leica DMRE (SDK) Mikroskop, ausgestattet mit einem TCS-SPE confokalen Scankopf, verwendet (Leica Microsystems, Heidelberg). Zur Datenerfassung wurde das Mikroskop von der Leica LCS (Vers. 2.00.871) Software gesteuert. Transgene Wurzeln wurden jeweils mit einem Leica 63 x HCX PIAPO Ölimmersionsobjektiv ($NA = 1.32$) mikroskopiert. Für die Untersuchung der GFP-Fluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt und die Emission zwischen 500 nm und 600 nm erfasst. Zur Doppellokalisierung von GFP und FM[®]4-64 wurde das GFP bei 488 nm angeregt und die Emission zwischen 500 nm und 540 nm gemessen. Die Farbstoffe hingegen wurden bei 532 nm angeregt und die Emission zwischen 580 nm und 670 nm dokumentiert. Für die Aufnahmen wurden generell folgende Einstellungen gewählt:

- Modus xyt
- Beam expand 3
- Format 1024x1024 Pixel
- Line Average 4
- Pinhole Airy 1
- Scangeschwindigkeit 400 Hz

Einzelbilder wurden in einem Abstand von ca. 12 Sekunden aufgenommen und mittels der Leica LCS Software als avi-Videofiles mit einer Bildwiederholungsrate von 15 pro Sekunde exportiert.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung von *MtRab5b* aus *Medicago truncatula* cDNA-Banken

Für Untersuchungen zur Kolo-kalisierung mit MsRab11F wurde ein Homolog des Organellmarkers Ara6 aus *Medicago truncatula* cDNA-Banken isoliert. Ara6 ist ein kleines G-Protein, gehört zur Rab5-Untergruppe aus *Arabidopsis thaliana* und lokalisiert am endosomalen System (Ueda et al. 2001). Zur Suche nach Homologen von Ara6 in *Medicago truncatula* wurde die Proteinsequenz gegen die *Medicago*-Datenbank <http://tigrblast.tigr.org/tgi> geblastet. Dabei konnte eine EST-Sequenz (TC93994) mit einem full-length open reading frame von 600 bp identifiziert werden.

Zur Isolierung des Gens *Mtrab5B* aus cDNA-Banken von *M. truncatula* wurde die Primer MtRab5B XbaI up und MtRab5B BamHI lo verwendet. Die beiden Primer wurden exakt gegen die Enden des offenen Leserahmens von *Mtrab5B* konstruiert, so dass sie den vollständigen „open reading frame“ umspannten. Gleichzeitig sollten mit den Primern Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BamHI* an den beiden Enden der Sequenz angefügt werden, um das Produkt für weitere Klonierungsschritte vorzubereiten. Mittels PCR konnte eine Sequenz der erwarteten Größe aus cDNA-Banken von *Medicago truncatula* amplifiziert werden (Abb. 4-1).

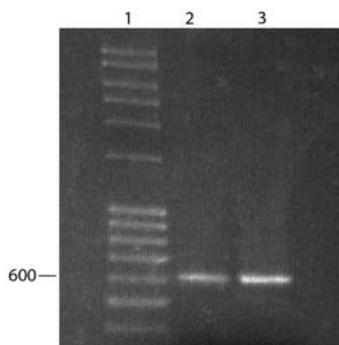


Abb. 4-1: Agarose-Gelelektrophorese der *Mtrab5B* Sequenz amplifiziert aus einer cDNA-Bank von *M. truncatula* Wurzelgewebe. Die *Mtrab5B* Sequenz wurde unter Verwendung der spezifischen Primer MtRab5B-Xba-up und MtRab5B-Xba-lo mittels PCR amplifiziert. Es konnten PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 600 bp detektiert werden.

Das entsprechende Produkt wurde anschließend aus dem Agarosegel isoliert, in den Vektor pGEM-T-easy kloniert und sequenziert. Die übersetzte Proteinsequenz des Inserts wies eine Sequenzhomologie von 85% zu Ara6 aus *Arabidopsis thaliana* auf und konnte mittels BlastP Analyse eindeutig der Proteingruppe Rab5B zugeordnet werden (Abb. 4-2).

4.1.1 Analyse der Proteinsequenzen von MtRab5B und Ara6

Die beiden Sequenzen von MtRab5B und Ara6 enthalten fünf hoch konservierte Domänen, wie sie charakteristisch für die Familie kleinen GTPasen sind. Diese werden als G-Domänen bezeichnet und befinden sich in den so genannten Loop-Regionen. Sie bilden die Verbindung zwischen den α -Helices und β -Faltblättern in der Sekundärstruktur der Proteine.

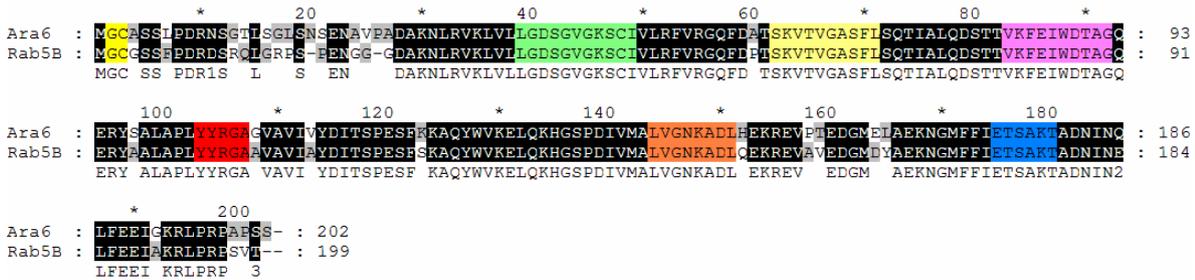


Abb. 4-2: Vergleich der Aminosäuresequenz von Ara6 und MtRab5B. Identische Aminosäuren sind schwarz markiert. Die funktionellen Domänen sind farbig markiert: G1 (grün) [-G-(X)_n-G-K-(S/T)-], G2 (gelb) [-D-(X)_n-T-], G3 (violett) [-D-T-A-G-], G4 (braun) [-G(A)-N-K-X-D-], G5 (blau) [-E-K-S-A-(K/L)-]. Die Domänen G1 und G3-G5 sind an der Bindung von GTP beteiligt. G2 ist die Effektor-Domäne. Die YVRGA Sequenz ist charakteristisch für alle Rab-Proteine. Die gelb markierten Glycin- und Cysteinreste an den Position 2 und 3 bilden Isoprenylierungsstellen, an der ein Myristoyl- bzw. Palmitoylrest angefügt wird.

Die Domänen G1-G5 in MtRab5B stimmen vollständig mit denen in Ara6 überein. Die G1-Domäne ist zuständig für die Bindung des α und β -Phosphat-Rests von GTP oder GDP. Die G2-Domäne wird als SwitchI- oder Effektor-Domäne bezeichnet und bindet an das Mg^{2+} -Ion des GTP, welches wiederum an den γ -Phosphat-Rest des GTP gebunden ist. Die Konformation dieser Domäne ist variabel und verändert sich durch die Bindung an GTP bzw. Hydrolyse von GTP zu GDP stark. Die SwitchI-Region ist in Proteinen aus der Familie der kleinen GTPasen variabel und nur unter Mitgliedern aus der gleichen familiären Untergruppe konserviert. Die G3- oder SwitchII-Domäne hingegen ist unter kleinen GTPasen hoch konserviert. Genau wie die G2-Domäne bindet sie ebenfalls an das Mg^{2+} -Ion. Die G4- und G5-Domäne sind für die Bindung an die Guanin-Base verantwortlich und verhindern dadurch, dass das Protein unspezifisch andere Nukleotide wie z.B. ATP bindet. In beiden Proteinen konnte darüber hinaus in der zweiten Position ein Glycinrest identifiziert werden, der als Myristoylierungssignal dient und an der dritten Position ein Cysteinrest, der als Palmitoylierungssignal dient (Abb. 4-2).

4.1.2 Vergleich der Proteinsequenzen von MtRab5B und MsRab11F

Die Aminosäuresequenzen von MtRab5B und MsRab11F enthalten identische Sequenzen in den hoch konservierten Domänen G1 und G3-G5:

G1	G2	G3	G4	G5
GDSGVGKS	KDEFRLDSKPTIGV	WDTAGQE	LVGNK	ETSA
GDSGVGKS	SKVTVGASFL	WDTAGQE	LVGNK	ETSA

Die Sequenz der variablen Domäne G2 allerdings ist nicht konserviert und zwischen den beiden Proteinen höchst unterschiedlich. Weitere Unterschiede werden im Alignment der beiden Proteine offensichtlich:

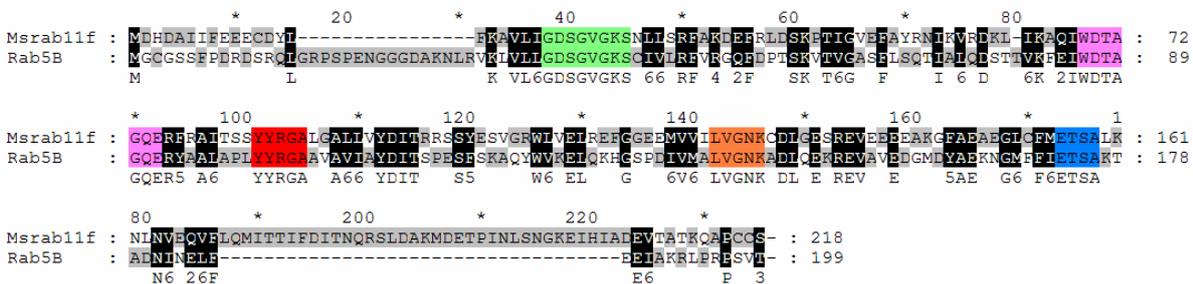


Abb. 4-3: Alignment der Aminosäuresequenz von MsRab11F und MtRab5B. Identische Aminosäuren sind schwarz markiert. Die funktionellen Domänen sind farbig markiert: G1 (grün) [-G-(X)_n-G-K-(S/T)-], G2 (gelb) [-D-(X)_n-T], G3 (violett) [-D-T-A-G], G4 (braun) [-(G/A)-N-K-X-D-], G5 (blau) [-E-K-S-A-(K/L)-]. Die für Rab-Proteine charakteristische YVRGA-Sequenz ist in den beiden Proteinen vorhanden. MsRab11F enthält das C-terminale Isoprenylierungsmotiv CCX während MtRab5B N-terminal am Glycinrest in Position 2 isoprenyliert wird.

Die Sequenz von MtRab5B ist insgesamt nur 35% mit der von MsRab11F identisch (siehe Abb. 4-3). In MsRab5B fehlt im Vergleich mit MsRab11F zum Beispiel die hypervariable Domäne am C-Terminus. Stattdessen enthält MtRab5B am N-Terminus einen Sequenzabschnitt, der in MsRab11F nicht enthalten ist. Der wesentlichste Unterschied zwischen den beiden Proteinen betrifft aber das Isoprenylierungssignal. Während MsRab11F C-terminal das typische Isoprenylierungssignal CCX aufweist, ist dieses in MtRab5B nicht zu finden. Stattdessen enthält MtRab5B in der zweiten Aminosäureposition einen Glycinrest, der in dieser Position als typisches Myristoylierungssignal beschrieben ist (Franco *et al.*, 1996) und in der dritten Position einen Cysteinrest, an dem das Protein palmitoyliert wird.

4.1.3 Vergleich der Computer-generierten dreidimensionalen Strukturmodelle der Proteine MtRab5B und MsRab11F

Für die beiden Proteine MtRab5B und MsRab11F wurden zum weiteren strukturellen Vergleich 3D-Modelle berechnet. Dabei wurden die Aminosäuresequenzen gegen HsRab11A gerendert, dessen Kristallstruktur bereits aufgeklärt wurde. Sowohl MtRab5B als auch MsRab11F zeigen Merkmale wie

für kleine G-Proteine charakteristisch sind. Sie bestehen jeweils aus fünf α -Helices, sechs β -Faltblättern und fünf Loops. Auf den ersten Blick sind sich die Strukturen von MtRab5B und MsRab11F recht ähnlich (siehe Abb. 4-4).

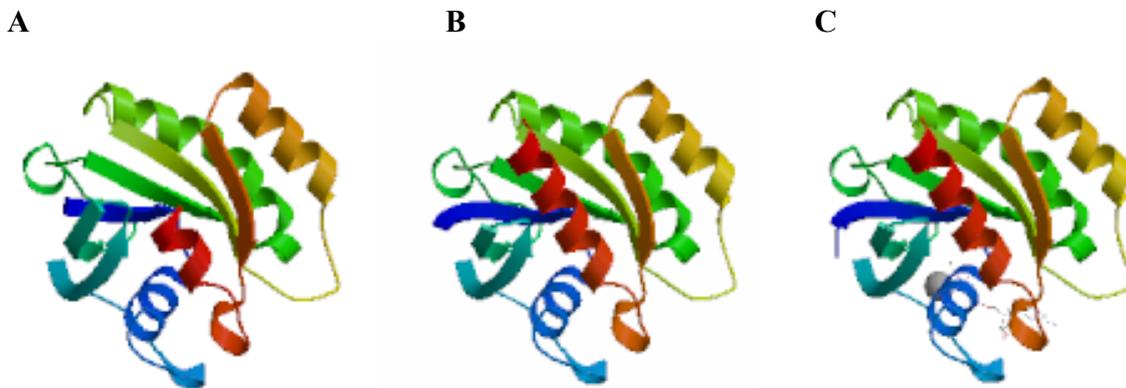


Abb. 4-4: Modelle der dreidimensionalen Proteinstruktur der pflanzlichen Proteinen MtRab5B und MsRab11F. Die Modelle wurden mit Hilfe der entsprechenden Rendering Software auf <http://swissmodel.expasy.org/> im Vergleich mit der Struktur für humanes Rab11A erstellt. (A) MtRab5B (B) MsRab11F (C) HsRab11A (GTP-gebundene Form).

Bei MtRab5B (A) ist die α_5 -Helix (rot) am C-Terminus jedoch viel kürzer und auch die β_1 -Faltblattstruktur (blau) am N-Terminus ist kürzer als MsRab11F (B) und HsRab11A (C). Auch beim Vergleich zwischen MsRab11F und HsRab11A fällt auf, dass β_1 -Faltblattstruktur (blau) am N-Terminus von MsRab11F kürzer ist als die von HsRab11A. Ingesamt gesehen sind sich die prognostizierten Strukturen von MsRab11F und HsRab11A untereinander sehr viel ähnlicher als die von MtRab5B verglichen mit den beiden Proteinen.

4.2 Lokalisierung von MsRab11F und MtRab5B

4.2.1 Erstellung von MsRab11F- und MtRab5B-GFP Fusionen für die Expression in Pflanzen.

4.2.1.1 Erstellung einer MsRab11F-GFP Fusion zur heterologen Expression in *E. coli*

Für nachfolgende *in vivo* Lokalisierungsuntersuchungen wurde MsRab11F1 mit einer GFP-Variante, dem so genannten mGFP6, fusioniert. mGFP6 wurde durch die Arbeitsgruppe von J. Haseloff (Universität Cambridge, UK) speziell für die Expression in Pflanzen optimiert. mGFP6 trägt mehrere Mutationen (Heim et al. 1994), F64L, S65T und V163A, I167T, S175G (Heim et al. 1994, Siemering et al. 1996), die die Reifung und spektralen Eigenschaften verbessern und die Löslichkeit und Fluoreszenz von GFP verstärken. Da das Wildtyp-GFP in seiner Sequenz eine Stelle enthält, die in

Pflanzen während der Transkription gespleißt wird, sind die Expressionseffizienz und daher auch die Fluoreszenz in Pflanzen sehr gering. Beim mGFP6 wurde die Spleißstelle entfernt und es dadurch für Expression in Pflanzen optimiert.

Bevor weitere Klonierungsschritte im Pflanzenstransformationsvektor begonnen wurden, wurden zunächst die Stabilität des Fusionsproteins und die Spezifität des Anti-Rab11F-Antikörpers überprüft. Dies geschah durch die Klonierung in einen Expressionsvektor, dann heterologe Expression in *E. coli* und abschließend Detektion des exprimierten Proteins mittels des Anti-Rab11F-Antikörpers in Western-Blot Analysen.

Zur Erstellung des Expressionsvektors wurde das *msrab11f1*-Fragment aus dem Vektor pFlag-Mac-*rab11f1* (K. Schiene, Dissertation) mit spezifischen PCR-Primern amplifiziert, wobei gleichzeitig die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sac*I an den beiden Enden der Sequenz anfügt wurden. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor „pGEM-T easy“ einkloniert, das Insert dann durch *Bam*HI/*Sac*I heraus gespalten und über dieselben Schnittstellen in den Expressionsvektor pET24(a+) eingefügt (siehe Abb. 4-5).

Zur Fusion von *mgfp6* an *msrab11f1* wurden das *mgfp6*-Fragment (H. Densow, Dissertation) über PCR amplifiziert und mittels der verwendeten Primer (GFP *Bam*HI up und GFP *Bam*HI lo) *Bam*HI Schnittstellen an den beiden Enden der Sequenz angefügt. Gleichzeitig wurde mittels des Primers GFP *Bam*HI lo eine Sequenz eingeführt, die für die Aminosäureabfolge GGS codierte. Zwei der codierten Aminosäuren ergaben sich aus der Sequenz für die Restriktionsstelle *Bam*HI, zudem wurde die für einen weiteren Glycin-Rest kodierende Nukleotidabfolge CCC eingefügt. Die drei zusätzlichen Aminosäuren dienten als Spacer zwischen mGFP6 und Rab11F1.

Nach Klonierung in pGEM-T-easy und Ausschneiden durch *Bam*HI konnte das *mgfp6*-Fragment erfolgreich in pET24a(+)-MsRab11F1 eingesetzt werden. Dabei wurde das mGFP6 N-terminal mit MsRab11F1 fusioniert (siehe Abb. 4-5) Diese Klonierungsstrategie wurde gewählt, weil MsRab11F1 *in vivo* C-terminal isoprenyliert wird. Die Klonierung von mGFP6 an den C-Terminus würde die Isoprenylierung von MsRab11F1 verhindern und hätte so einen Funktionsverlust zur Folge. Durch die Erstellung einer N-terminalen Fusion hingegen ist keine Beeinträchtigung während der Isoprenylierung zu erwarten. Sowohl der Aminosäure-Spacer in der Mitte des Fusionsprodukts als auch die Fusion des mGFP6 an den N-Terminus sollten dafür sorgen die funktionelle Integrität von MsRab11F1 zu bewahren.

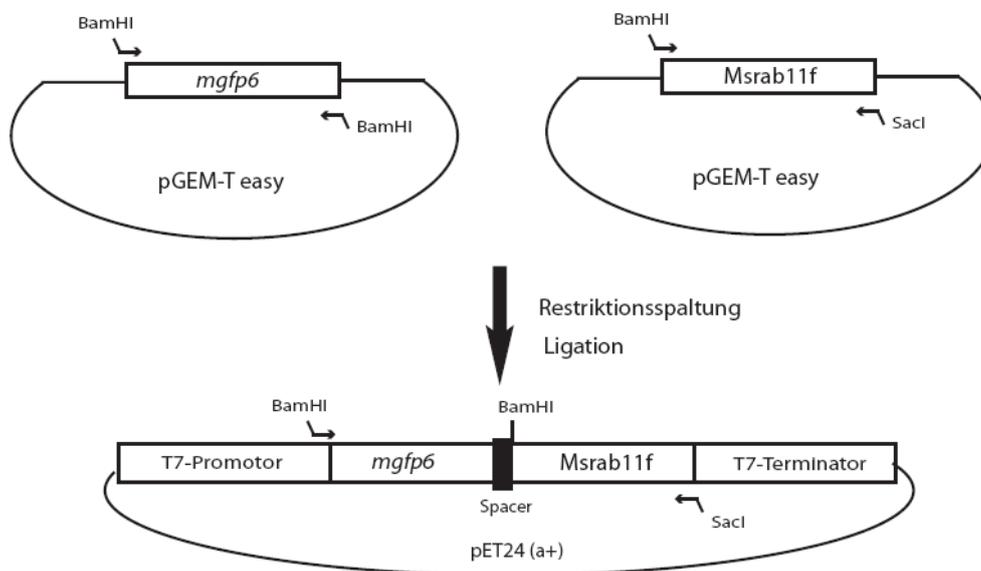


Abb. 4-5: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte für die Erstellung einer *msrab11f:mgfp6* Fusion in pET24(a+). Der MsRab11F1-Kodierbereich wurde aus dem Vektor pGEM-T easy mittels BamHI/SacI geschnitten und über dieselben Schnittstellen in pET24(a+) eingesetzt. Das *mgfp6*-Reporter gen wurde aus dem pGEM-T easy mittels BamHI ausgeschnitten und in pET24(a+) kloniert. Dabei wurde mGFP6 N-terminal mit MsRab11F1 fusioniert.

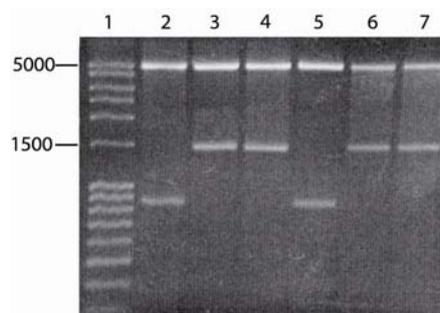


Abb. 4-6: Überprüfung des *Msrab11f:mgfp6* Fragments im pET24(a+) mittels Elektrophorese. Das Fusionskonstrukt *Msrab11f:mgfp6* wurde aus pET24(a+)-Vektor durch Restriktionsspaltung mit XbaI/SacI ausgeschnitten. Spuren 3,4,6 und 7 enthält ausgeschnittene Fragmente mit entsprechender Größe des *Msrab11f:mgfp6*-Fragments.

4.2.1.2 Heterologe Expression und immunologischer Nachweis von nativem und GFP-fusioniertem MsRab11F1 in *E. coli*

Die erfolgreiche Klonierung von sowohl der Wildtyp-Form als auch der Fusion von MsRab11F1 mit mGFP6 wurden durch Überexpression in *E. coli*BL21DE3 überprüft. Dieser Bakterienstamm ist speziell für Expression aus pET-Vektoren entwickelt worden. Im Genom der Bakterien ist eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines Lac-Promotors und -Operators kodiert. Nach IPTG-Induktion

bindet die Polymerase an eine T7-Promotorsequenz in pET24a(+) und leitet die Transkription der einklonierten Sequenz ein. Die entsprechenden Ligationsansätze wurden direkt in *E. coli* BL21 DE3 transformiert. Zur Selektion der mit dem GFP-Konstrukt transformierten Kolonien wurde ausgenutzt, dass der T7-Promotor auf dem Plasmid pET24a(+) bereits ohne IPTG-Induktion schwach aktiv ist. Dadurch wurde es möglich, Bakterienkolonien, die die gewünschten Plasmide erhalten hatten, direkt auf der Agarplatte unter Anregung mit Fluoreszenzlicht am Fluoreszenzbinokular zu selektionieren (siehe Abb. 4-7).

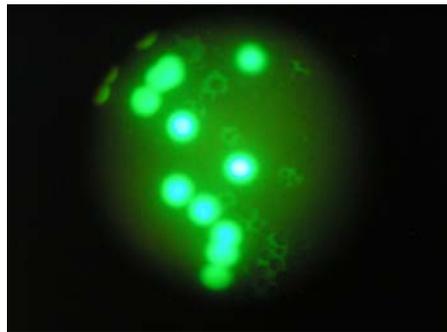


Abb. 4-7: Selektion von GFP-exprimierenden *E. coli* BL21 DE3-Kolonien am Fluoreszenzbinokular. Kolonien, die GFP-markiertes MsRab11F1 exprimierten, leuchteten grün und unterschieden sich deutlich von nicht leuchtenden Bakterien die kein GFP exprimierten.

Zur Expression des Wildtyp und GFP-fusionierten MsRab11F-Proteins aus den erstellten pET24a(+)-Plasmiden wurden entsprechende Bakterienkulturen, die eine OD₅₇₈ von 0,5-0,6 erreicht hatten, mit der IPTG induziert und anschließend Gesamtproteinextrakte gewonnen. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot-Analyse mit einem polyklonalen, peptidspezifischen MsRab11F1-Antikörper untersucht (siehe Abb. 4-8).

In den zweiten bis fünften Geltasche des SDS-Gels konnten die Banden des exprimierten MsRab11F-Proteins ohne GFP in einem Größenbereich von ca. > 30 kDa detektiert werden. Diese molekulare Masse lag eindeutig höher als die theoretisch ermittelte molekulare Masse des MsRab11F1 von 24,5 kDa zusammen mit dem T7-tag, der aus dem pET24a(+)-Vektor stammte und eine molekulare Masse von 1,4 kDa hatte (siehe Abb. 4-8). Beim Fusionsprotein MsRab11F1:mGFP6 konnten die Banden der exprimierte Proteine bei Größen von ca. > 60 kDa ermittelt werden. Diese Masse war größer als die theoretische Masse von MsRab11F1 (24,5 kDa), mGFP6 (27,3 kDa) und T7-tag (1,4 kDa) zusammen (siehe Abb. 4-8). Da die Laufeigenschaften eines Proteins im SDS-Gel jedoch von Parametern wie der Proteinladung beeinflusst werden können, wurde in diesem Stadium der Untersuchungen die Molekulargewichtsabweichungen vernachlässigt und die exprimierten Proteine nachfolgend immunologisch untersucht.

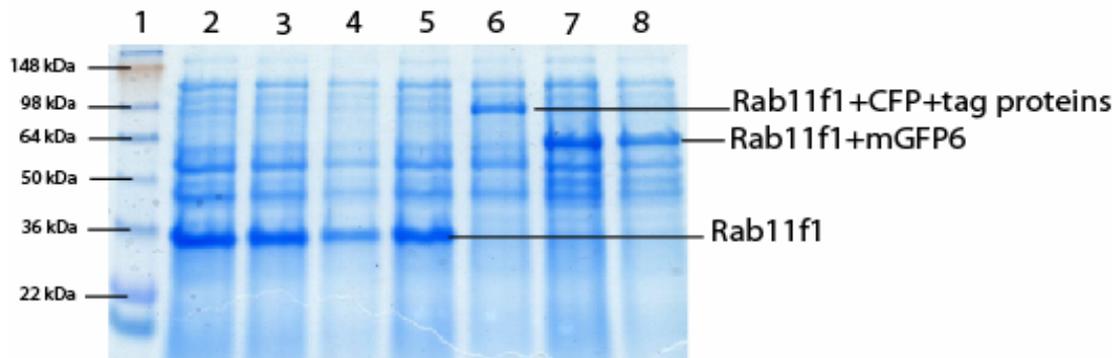


Abb. 4-8: Heterologe Expression von GFP-MsRab11F1 in *E.coli*BL21DE3. 500 µl der Bakterienkultur wurden 3 Stunden nach IPTG-Induktion geerntet. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit denaturierendem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten gekocht. Jeweils 10 µl der Proben wurden mittels SDS-PAGE (10%) analysiert. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. Spur 1: LMW-Marker SeeBlue Plus2 (Invitrogen), Spur 2-5: Gesamtproteinextrakt *E.coli*BL21DE3 (pET24a(+)) MsRab11F1), Spur 6: Gesamtproteinextrakt *E.coli*BL21DE3 (pET24a(+)) MsRab11F1:CFP), Spur 7-8: Gesamtproteinextrakt *E.coli*BL21DE3 (pET24a(+)) MsRab11F1:mGFP6).

Zum immunologischen Nachweis der heterologen Expression des Wildtyp MsRab11F1-Proteins und des Fusionsproteins MsRab11F1:mGFP6 wurden die Gesamtproteinextrakte aus *E.coli*BL21DE3 in einem SDS-Page Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde dann mit einem polyklonalen Anti-MsRab11F-Antikörper als Primärantikörper und einem anti-Rabbit Antikörper gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase als Sekundärantikörper inkubiert. Zum Nachweis der Antikörper-Bindung wurde mit DAB gefärbt.

Die Western-Blot Analyse zeigte in der zweiten bis fünften Tasche Banden im Bereich von ca. 26 kDa. Diese entsprachen den molekularen Massen von MsRab11F1 zusammen mit dem T7-Tag. In der siebten und achten Tasche wurden Banden in einem Größenbereich von ca. 55 kDa detektiert. Dieses entsprach der molekularen Masse des MsRab11F1:mGFP6 Fusionsproteins (siehe Abb. 4-9).

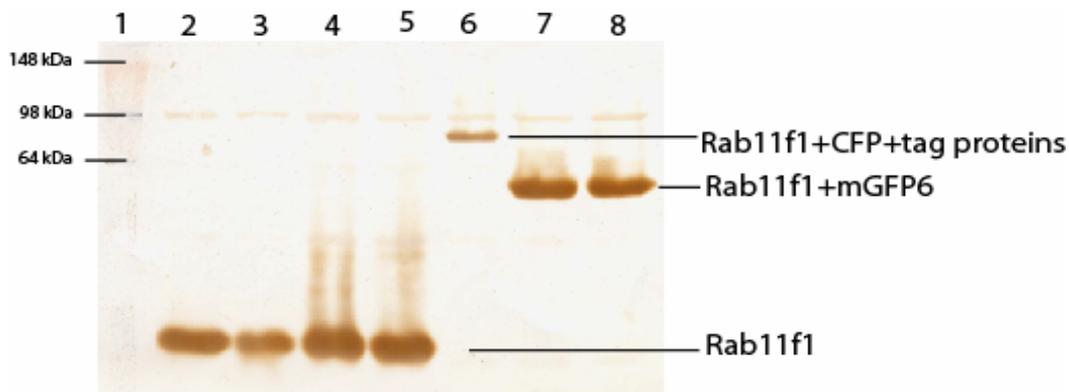


Abb. 4-9: Western Blot Analyse der mit IPTG induzierten *E.coli*BL21DE3 Bakterienkulturen. Spur 1: LMW-Marker SeeBlue Plus2 (Invitrogen), Spur 2-5: Gesamtproteinextrakt *E.coli*BL21DE3 (MsRab11F1), Spur 6: Gesamtproteinextrakt *E.coli*BL21DE3 (MsRab11F1:CFP), Spur 7-8: Gesamtproteinextrakt *E.coli*BL21DE3 (MsRab11F1:mGFP6). Zum Nachweis wurden der anti-MsRab11F Antikörper als Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 und der anti-Rabbit Antikörper gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase als Sekundärantikörper in Verdünnung von 1:5000 verwendet.

Beim Vergleich der Daten aus der SDS-Page und der Western-Blot-Analyse war keine Degradation des Fusionsproteins nachweisbar. Die Proteine konnten also sowohl erfolgreich fusioniert und als auch in *E. coli* stabil exprimiert werden.

4.2.1.3 Erstellung von Konstrukten zur transienten Transformation

Um *in-vivo* Lokalisierungsstudien in Pflanzen zu ermöglichen, wurden die Konstrukte *Msrab11f1:mgfp6* und *Mtrab5:mgfp6* mit einem Pflanzenpromotor und -terminator versehen und in einen entsprechenden Vektor kloniert. Eine geeignete Expressionskassette lag in dem Pflanzenexpressionsvektor p35S-EGFP vor, der ein Gen für Ampicillin-Resistenz (Amp^r), einen pUC-Origin zur Vermehrung in *E. coli*, sowie eine 35S-Expressionskassette enthält (siehe Abb. 3-3). Die Kassette umfasst einen 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus (cauliflower mosaic virus, CAMV), eine Multiple-Klonierungsstelle (MCS), ein *egfp*-Gen und einen NOS-Terminator. Aufgrund seiner Eigenschaften ermöglicht dieser Vektor die transiente Expression in Protoplasten, die nicht nur eine schnelle Überprüfung der Funktionalität des Fusionsgens, sondern auch Colokalisierungsstudien gewährleistet. Der Nachteil des Vektors liegt in seiner MCS, die nur aus drei Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen, *Xba*I, *Bam*HI und *Bgl*II, besteht.

Das Fusionskonstrukt *Msrab11f1:mgfp6* wurde aus dem pET24(a⁺)-Vektor durch Restriktionsspaltung mit *Xba*I und *Sac*I ausgeschnitten und in die MCS des Vektors p35S-EGFP eingefügt (siehe Abb. 4-11), wobei die *egfp*-Sequenz entfernt wurde. Daraus ergab sich in dem Vektor die Anordnung: 35S-*Msrab11f1:mgfp6*-NOS (siehe Abb. 4-10).

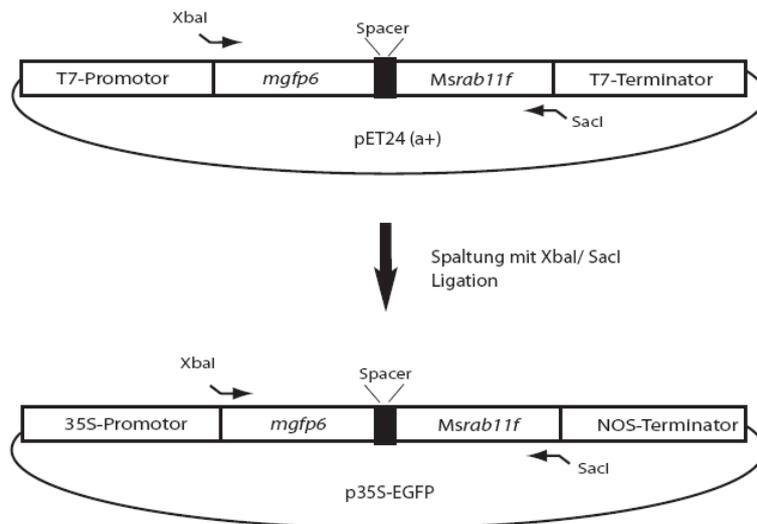


Abb. 4-10: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte für die *Msrab11f1:mgfp6*-Fusion in p35S-EGFP. Das *msrab11f1:mgfp6* Konstrukt wurde direkt aus dem pET24(a+) mit XbaI/SacI ausgeschnitten und anschließend über die gleichen Schnittstellen in p35S-EGFP (Clontech) eingefügt. Gleichzeitig wurde das Gen für EGFP entfernt.

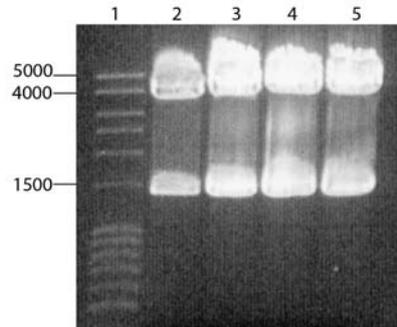


Abb. 4-11: Überprüfung des *mgfp6:Msrab11f* Fragments im p35S-Vektor mittels Elektrophorese. Das Fusionskonstrukt *mgfp6:Ms-rab11f* wurde aus dem p35S-Vektor durch Restriktionsspaltung mit XbaI/SacI ausgeschnitten. Spuren 2 bis 5 enthalten ausgeschnittene Insert-Fragmente mit entsprechender Größe des *Msrab11f:mgfp6*-Fragments.

Anders als bei MsRab11F1 findet die Isoprenylierung des MtRab5B-Proteins am N-Terminus statt. Für den Erhalt der Funktionalität darf mGFP6 daher nicht N-terminal an MtRab5B fusioniert werden (siehe Abb. 4-12). Zur Erstellung des *Mtrab5b:mgfp6* Konstrukts im p35S-Vektor wurde die *mtrab5b*-Sequenz mittels Restriktionsspaltung mit XbaI und BamHI aus dem Vektor pGEM-T-easy ausgeschnitten. Das Restriktionsfragment wurde dann in den XbaI/BamHI gespaltenen Vektor p35S-*mgfp6* ligiert (siehe Abb. 4-13). Daraus ergab sich in dem Vektor die Anordnung: 35S-*Mtrab5b:mgfp6*-NOS. Die erfolgreiche Klonierung der Expressionskassette konnte durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden. Die resultierenden Konstrukte werden im Folgenden als p35S-*Msrab11f:gfp* und p35S-*Mtrab5b:gfp* bezeichnet.

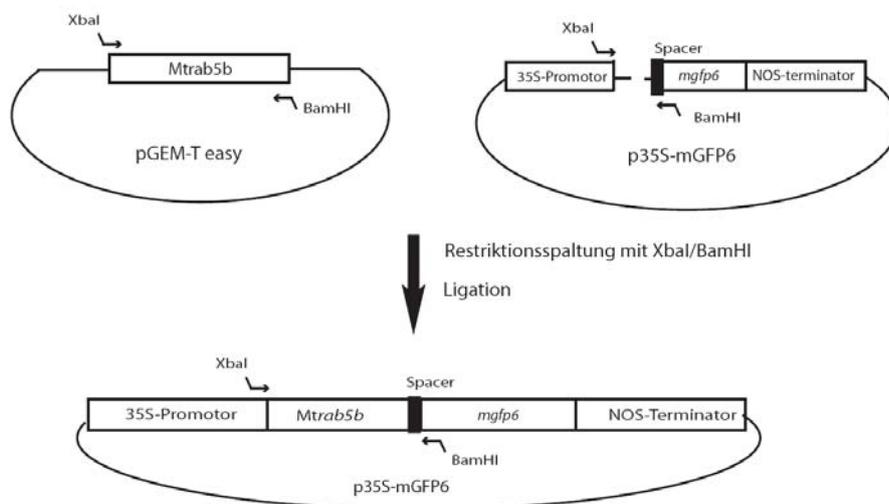


Abb. 4-12: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte für die Erstellung einer *Mtrab5b-mgfp6*-Fusion im p35S-Vektor. Das Gen für MtRab5B wurde aus dem pGEMT-easy durch Restriktionsspaltung mittels XbaI/BamHI ausgeschnitten und anschließend über die gleichen Schnittstellen in p35S-mGFP6 eingefügt.

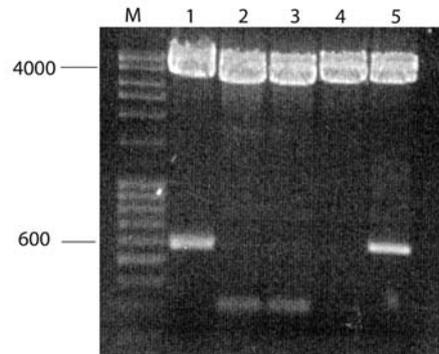


Abb. 4-13: Überprüfung des *Mtrab5b:mgfp6* Fragments im p35S-Vektor mittels Elektrophorese. Das *Mtrab5b*-Fragment wurde aus dem p35S-Vektor durch Restriktionsspaltung mit XbaI/BamHI ausgeschnitten. Klone 1 und 5 enthalten ausgeschnittene Insert-Fragmente mit der entsprechenden Größe von 600 bp.

4.2.1.4 Erstellung von Ti-Plasmid basierten Konstrukten zur stabilen Transformation von Versuchspflanzen

Als Vektor für die stabile Transformation von Versuchspflanzen wurde das Plasmid pBin19 ausgewählt. pBin19 enthält links und rechts border-Sequenzen der T-DNA-Region des Ti-Plasmids aus *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Sequenzen können mit den Pflanzen-chromosomen rekombinieren und ermöglichen dadurch die Integration des DNA-Segments, das zwischen den beiden border-Sequenzen liegt. Die T-DNA-Region enthält eine multiple cloning site (MCS) in einem *lacZ*-Gen, das die blau-weiß-Selektion von positiven Klonen in *E. coli* ermöglicht. Außerdem enthält pBin19 den Replikationsursprung aus dem Plasmid pBR322, der für eine hohe Kopienzahl in *E. coli* verantwortlich ist. Ein Gen für Neomycinphosphotransferase (NPT), welches unter Kontrolle eines NOS-Promotors und eines NOS-Terminators steht, vermittelt mit pBin19 transformierten Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Außerhalb der T-DNA-Region befindet sich noch ein weiteres Kanamycin-Resistenzgen, das für die Selektion in Bakterien verwendet wird. Ein Nachteil dieses Vektors ist, dass die MCS keinen pflanzlichen Promotor und Terminator enthält und diese Elemente zusätzlich eingefügt werden müssen. Da eine entsprechende Expressionskassette im p35S-Vektor vorhanden ist, wurde das Fusionskonstrukt zuerst in diesen Vektor eingebaut (siehe Abb. 4-14).

Das ganze Fusionskonstrukt aus *Msrab11f:mgfp6*, Promotor und Terminator wurde dann mit den Primern 35S Hind up und 35S Hind lo aus dem Vektor p35S-*Msrab11f:gfp* amplifiziert und in pGEMT-easy eingefügt. Anschließend wurde das Gen durch Restriktionsspaltung mittels HindIII ausgeschnitten und über dieselben Schnittstellen in pBin19 eingefügt (siehe Abb. 4-15).

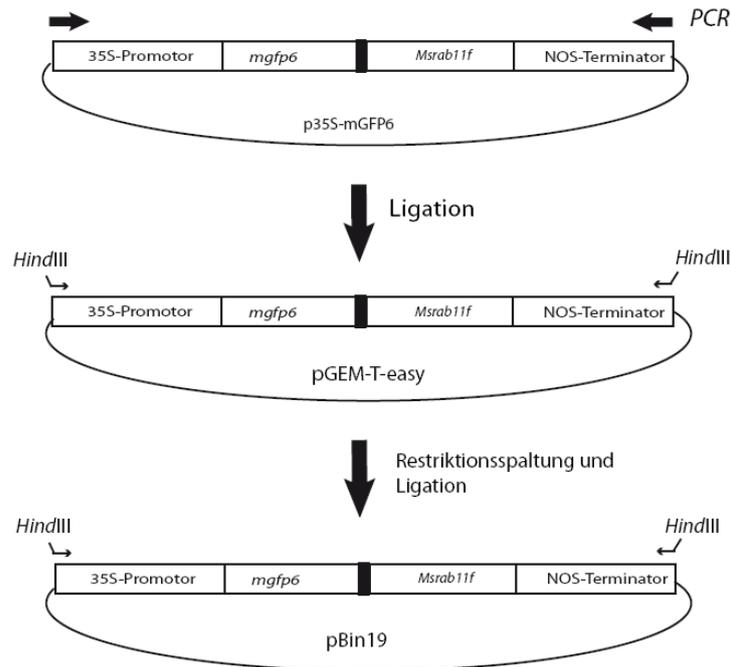


Abb. 4-14: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte für die *Msrab11f:mgfp6*-Fusion in den *pBin19*-Vektor. Die Expressionskassette *35S-Msrab11f:mgfp6*-NOS wurde mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen *HindIII* angefügt. Das PCR-Produkt wurde in den *pGEM-T easy* Vektor inkloniert. Das Insert wurde mittels *HindIII* ausgeschnitten und anschließend über die gleichen Schnittstellen in den gespaltenen Vektor *pBin19* eingefügt.

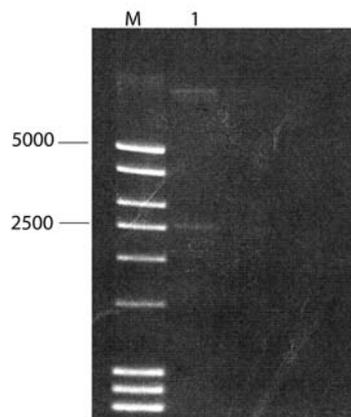


Abb. 4-15: Überprüfung des *Msrab11f:mgfp6* Fragments im *pBin19*-Vektor mittels Elektrophorese. Das ganze Fragment des Fusionskonstrukts *Msrab11f:mgfp6*, Promotor und Terminator wurde aus dem *pBin19*-Vektor durch Restriktionsspaltung mit *HindIII* ausgeschnitten. Einzige Kolonie ist auf die Platte gewachsen und ist positive. Das Insert ist mit der Größe von ca. 2500 bp den Größen des Fusionskonstrukts *Msrab11f:mgfp6*, mit *35S*-Promotor und *Nos*-Terminator entsprechend.

Bei der Klonierung der Expressionskassette *35S-Mtrab5b:mgfp6*-NOS in *pBin19* wurde dieser mittels PCR die Schnittstellen *EcoRI/SalI* angefügt (siehe Abb.4-16). Das PCR-Produkt wurde in *pGemT-easy* kloniert und später durch *EcoRI/SalI* heraus geschnitten. Das DNA-Fragment wurde dann über

dieselben Schnittstellen in den gespaltenen pBin19 kloniert (siehe Abb. 4-17). Der Erfolg der Klonierungen wurde durch Sequenzierung bestätigt. Um die Benennung zu vereinfachen werden die Konstrukte im Folgenden als pBin-Rab11F und pBin-Rab5B bezeichnet.

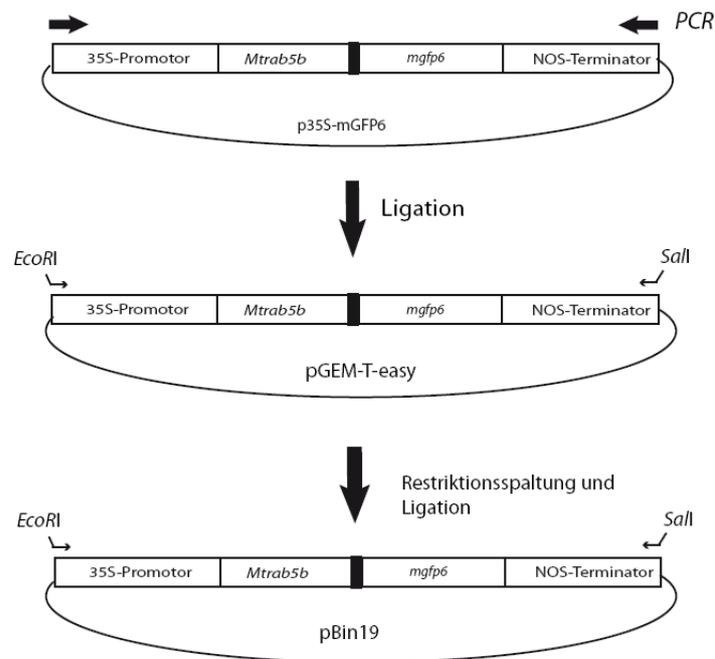


Abb. 4-16: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte für die *Mtrab5b-mgfp6*-Fusion in den pBin19-Vektor. Die Expressionskassette 35S-*Mtrab5b-mgfp6*-Nos wurde mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/Sall* angefügt. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T easy Vektor inkliert. Das Insert wurde mittels *EcoRI/Sall* ausgeschnitten und anschließend über die gleichen Schnittstellen in den gespaltenen pBin19 eingefügt.

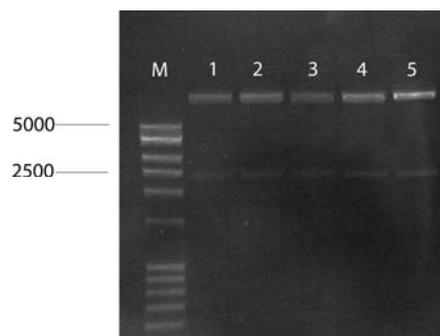


Abb. 4-17: Überprüfung des 35S-*Mtrab5b-mgfp6*-Nos Fragments im pBin19-Vektor mittels Elektrophorese. Das Fusionskonstrukts 35S-*Mtrab5b-mgfp6*-Nos wurde aus dem pBin19-Vektor durch Restriktionsspaltung mit *EcoRI/Sall* ausgeschnitten. Die Insert sind mit der Größe von ca. 2,5 Kb den Größen des Fusionskonstrukts *Mtrab5b-mgfp6* mit Promotor und Nos-Terminator entsprechend.

4.2.2 Transiente Expression und Lokalisierung von MsRab11F:GFP und MtRab5B:GFP in Tabak BY-2 Protoplasten

4.2.2.1 Lokalisierung von MsRab11F:GFP und MtRab5B:GFP in BY-2 Protoplasten

Tabak BY-2 Protoplasten wurden jeweils mit den Konstrukten MsRab11F:GFP, MtRab5B:GFP und p35-mGFP6 mittels PEG transformiert und am CLSM analysiert. Alle transgenen Protoplasten, die die oberen Konstrukte exprimierten, entwickelten eine grüne Fluoreszenz.

Bei den Protoplasten, die das Konstrukt MsRab11F:GFP exprimierten, konzentrierte sich die grüne Fluoreszenz auf viele kleine bewegliche Strukturen, die sich unspezifisch im Cytoplasma verteilten. Im Gegensatz zum Cytoplasma konnte in der Vakuole und im Zellkern keine grüne Fluoreszenz detektiert werden (siehe Abb. 4-18 A, B). Die zum Teil mobilen, GFP-markierten Strukturen waren gleichmäßig über das Cytoplasma verteilt und hatten einen einheitlichen Durchmesser von ca. 1,0 μm . Sie bewegten sich teilweise unregelmäßig durch die gesamten cytoplasmatischen Anteile der Zellen. Phasen von Bewegung wechselten sich dabei mit Ruhephasen ab, in denen die Strukturen an Ort und Stelle verharrten. Während der Ruhephasen bewegten sie sich gar nicht oder gingen in eine leichte Zitterbewegung über, wobei sich diese in ihrem Bewegungsmuster und der Geschwindigkeit allerdings deutlich von der Brownschen Molekularbewegung unterschied. Die Strukturen schienen in irgendeiner Art und Weise an dem Ort des Verharrens fixiert zu sein.

Interessanterweise waren nicht alle Strukturen gleich schnell. Während manche der Strukturen sich relativ schnell bewegten, strömten andere mit einer hohen Geschwindigkeit durch das Cytoplasma. Während der Bewegung schienen sie dabei festgelegten Bahnen zu folgen. Die Strukturen bewegten sich oft mehrere μm geradlinig durch das Cytoplasma, wechselten dann abrupt die Richtung und strömten wieder geradlinig weiter.

Bei mit dem Konstrukt MtRab5B:GFP transfizierten Protoplasten zeigte sich die GFP-Fluoreszenz wie bei MsRab11F:GFP an vielen kleinen Strukturen lokalisiert. Diese verteilten sich wiederum wahllos im gesamten Cytoplasma, in der Vakuole oder dem Zellkern war wiederum keine GFP-Fluoreszenz zu sehen (siehe Abb. 4-18 C, D). Anders als bei MsRab11F:GFP allerdings waren die Strukturen unterschiedlich groß und hatten unterschiedliche Durchmesser zwischen ca. 0,5 μm und 1,0 μm . Die Gesamtanzahl an markierten Strukturen war für das MtRab5B:GFP-Konstrukt um einiges höher als für das MsRab11F:GFP-Konstrukt (siehe Abb. 4-18 A, C). Interessanterweise waren auch die vom MtRab5B:GFP markierten Strukturen mobil und zeigten vergleichbare Bewegungsmuster wie die von MsRab11F:GFP markierten Strukturen. Dieses galt sowohl für die kleinen (0,5 μm) als auch für die großen (1,0 μm) Strukturen.

Als Kontrolle wurde das Konstrukt p35S-mGFP6 verwendet. Dies enthält nur das *mgfp6* Gen ohne fusionierte Gene. Die transformierten Protoplasten zeigten eine homogene Verteilung der GFP-Fluoreszenz in Cytoplasma und Zellkern, während in der Vakuole keine Fluoreszenz zu detektieren war (siehe Abb. 4-18 C). Eine Lokalisierung mit spezifischen Strukturen konnte nicht beobachtet werden.

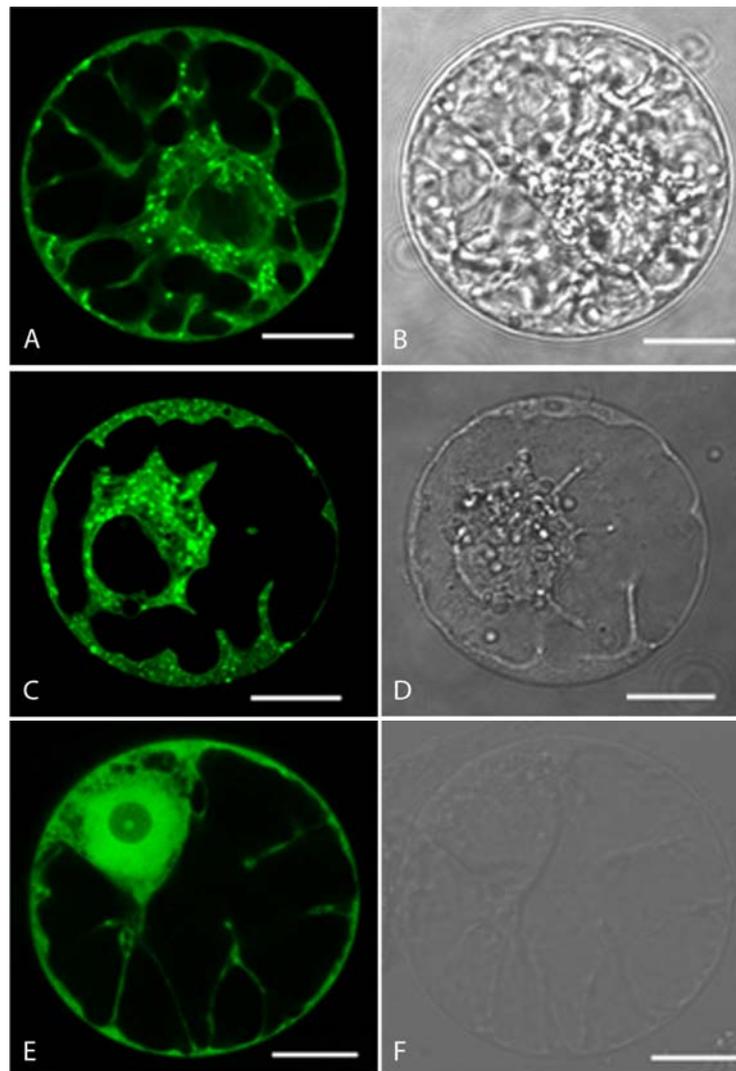


Abb. 4-18: Lokalisierung der transient exprimierten mGFP6-Fusionsproteine MsRab11F und MtRab5 in Tabak BY-2 Protoplasten. Die BY-2 Protoplasten wurden mit den Konstrukten MsRab11F:GFP (A-B), MtRab5B:GFP (C-D) und p35S-mGFP6 (E-F) transfiziert. Die Bilder wurden am CLSM aufgenommen. Links: GFP-Fluoreszenzanregung bei 488nm. Rechts: Durchlichtaufnahmen. Maßstab; (A-B) = 12,84 μm , (C-D) 15,74 μm und (E-F) =13 μm .

4.2.2.2 *Kolokalisierung von MtRab5B:RFP und MsRab11:GFP in Protoplasten*

Um zu untersuchen, ob MsRab11F und MtRab5B kolokalisieren, wurde MtRab5B mit einem rot fluoreszierenden Protein (mRFP1) markiert. Die *mrfp1* Sequenz wurde aus dem Plasmid pRSET_B-

mRFP1 (Shaner et al. 2004) mittels PCR mit den Primern mRFP_Bam_up und mRFP_Sac_lo amplifiziert. Über die Primer wurden dem Gen die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI /SacI angefügt. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEMT-easy kloniert, ausgeschnitten und über *BamHI* /*SacI* in p35S-MtRab5B-mGFP6 eingefügt. Die *mgfp6* Sequenz wurde dabei automatisch heraus geschnitten. Daraus ergab sich in dem Vektor die Anordnung: 35S- *Mtrab5b*-*mrfp1* -NOS (siehe Abb. 4-19). Durch die gewählte Klonierungsstrategie wurde zwischen der *Mtrab5b*- und der *mrfp1*-Sequenz gleichzeitig die zusätzliche Aminosäureabfolge KGS als Spacer eingefügt. Die Aminosäuren Glycin und Serin stammten aus der Sequenz für die Restriktionsstelle BamHI, während sich der Lysinrest durch die im Primer mRFP_Bam_up zusätzlich eingefügte Sequenz AAA ergab.

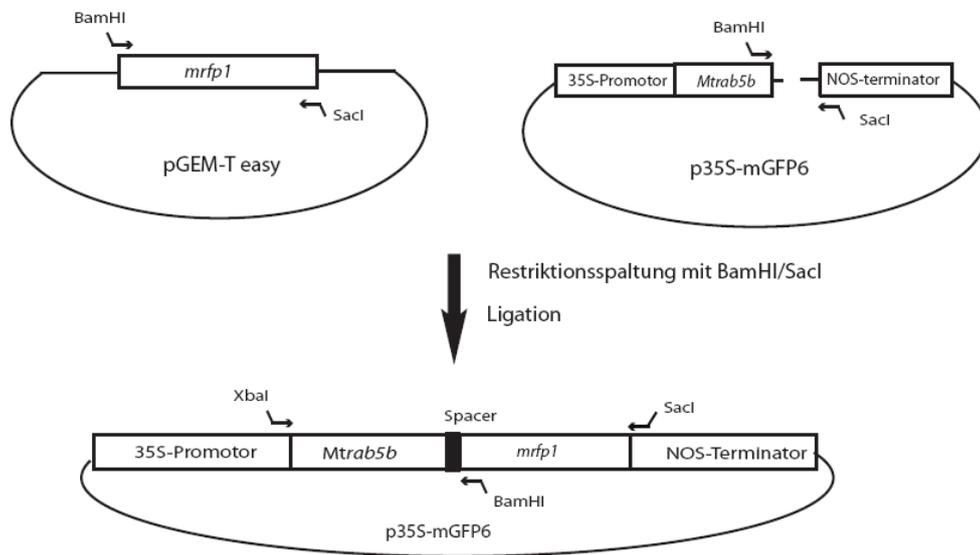


Abb. 4-19: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Erstellung einer *Mtrab5b-mrfp1*-Fusion im Vektor p35S. Das Gen für mRFP1 wurde aus pGEMT-easy durch Restriktionsspaltung mittels *BamHI/SacI* ausgeschnitten und anschließend über die gleichen Schnittstellen in p35S-mGFP6 eingefügt. Die *mgfp6*-Sequenz wurde dabei entfernt.

Für die Kollaborierungsexperimente der MsRab11F:GFP- und MtRab5B:mRFP1-Fusion wurden die entsprechenden DNA-Vektoren beider Konstrukte gleichzeitig zu den Tabak BY-2 Protoplastensuspensionen gegeben, mittels der PEG Methode transient transfiziert und am CLSM analysiert. Die MtRab11F:GFP exprimierenden Zellen wiesen ein ähnliches Expressionsmuster auf wie die MtRab5B:GFP exprimierenden Zellen. Eine Overlay-Aufnahme zeigte, dass MtRab11F:GFP zum Teil mit MtRab5B:mRFP1 kolokalisiert ist (siehe Abb. 4-20 C). Die entsprechenden Strukturen erschienen durch Überlagerung der beiden Farben Rot und Grün in der Overlay-Aufnahme gelb. Darüber hinaus konnten auch einzelne Strukturen detektiert werden, die ausschließlich grüne oder rote Fluoreszenz

aufwiesen und bei denen es folglich keine Kolokalisation gab. Die Anzahl der rein grün markierten Strukturen war allerdings bedeutend geringer als die der rein rot markierten Strukturen. Darüber hinaus konnte die rote Fluoreszenz von MtRab5B:mRFP1 an der gesamten Plasmamembran detektiert werden. Bezüglich der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Motilität der Strukturen machte es keinen Unterschied, ob die Strukturen durch beide Konstrukte markiert gleichzeitig waren oder nur durch eines der Konstrukte. Das Bewegungsmuster war also nicht davon abhängig, ob Strukturen durch MtRab11F:GFP oder MtRab5B:mRFP1 markiert waren.

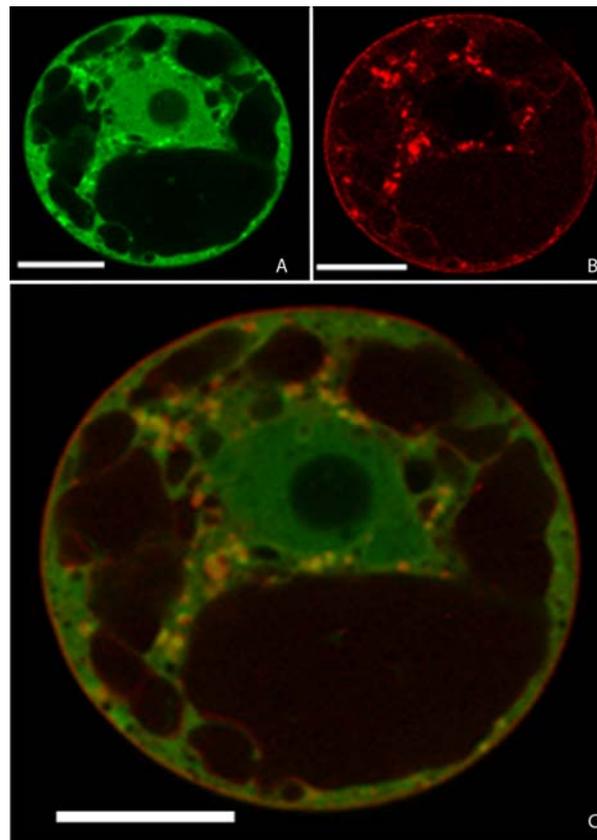


Abb. 4-20: Kolokalisierung der Konstrukte MsRab11F:GFP und MtRab5B:mRFP1 in Tabak BY2 Zellen. Die BY-2 Protoplasten wurden mit den Konstrukten MsRab11F:GFP (a), MtRab5B:RFP1 (b) oder MsRab11F:GFP und MtRab5B:RFP1 gemeinsam (c) transfiziert. Die Bilder wurden unter Anregung bei 488 nm (mGFP6) bzw. 532 nm (RFP1) am CLSM aufgenommen. MsRab11:GFP war zum Teil mit MtRab5B:mRFP1 kolokalisiert. MtRab5B:mRFP1 befand sich außerdem an der Plasmamembran. (A) GFP-Kanal. (B) DsRed-Kanal (Falschfarbendarstellung) (C) Overlay der Signale aus dem GFP- und DsRed-Kanal. Maßstab= 12,84 μ m

Die Größen der mit MtRab11F:GFP markierten Strukturen von etwa 1 μ m und ihr typisches Bewegungsmuster ließen die Vermutung zu, dass das Protein am Golgi-Apparat lokalisiert sein könnte. In Hefe reguliert Rab11 den Vesikel-Transport beim Ausgang der sekretorischen und endozytotischen Fracht am trans-Golgi (Benli et al. 1996) und von Rab11 in Reis ist bekannt, dass es den Transport von Vesikeln vom TGN zur Plasmamembran reguliert (Heo et al. 2005). Darüber hinaus entsprechen die

Bewegungsmuster der Strukturen dem Verhalten von Golgi-Apparaten in Pflanzen (Boevink et al. 1998). Um die Vermutung zu überprüfen, sollte in weiteren Versuchen die Lokalisierung von MsRab11F mit der des Golgi-Markers GmMan1:mCherry verglichen werden (siehe Abschnitt 4.3.3).

4.3 Funktionelle Untersuchung von MsRab11F

4.3.1 Erstellung einer Rab11F1:mGFP6 „loss of function“ Mutante und Lokalisierung in Tabak-Protoplasten.

Das monomere G-Protein MsRab11F1 wird durch GTP-Bindung aktiviert und durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP inaktiviert. Dabei bleibt das nach Hydrolyse gebildete GDP im inaktiven Protein gebunden. Durch passende Aminosäureaustausche im Bereich der GTP-Bindungsstelle entstehen Mutanten, die nur noch in ihrer aktiven oder inaktiven Form vorliegen. Solche Mutanten ermöglichen es, die Funktion des Proteins näher zu untersuchen. Für die Erstellung einer „loss of function“ Mutante von MsRab11F1 wurden die spezifischen Primern Rab11 S29N_up und Rab11 S29N_lo verwendet. Diese führten während der PCR-Mutagenese zum Austausch von Serin gegen Asparagin an Position 29 der Aminosäureabfolge. Das resultierende Plasmid p35S-MsRab11F1S29N:mGFP6 wurde anschließend sequenziert und dadurch die eingeführte Mutation bestätigt. MsRab11F1S29N bindet konstitutiv GDP und kann nicht durch einen Austausch von GTP gegen GDP aktiviert werden. Das Protein hat also einen Funktionsdefekt, der es ständig im inaktiven Zustand hält.

Um die Lokalisierung von MsRab11FS29N zu untersuchen, wurden BY2-Tabakprotoplasten mit dem Konstrukt p35S-MsRab11FS29N:mGFP6 transformiert und danach am CLSM analysiert. Es zeigte sich eine homogene Verteilung von MsRab11F1FS29N:GFP im Cytoplasma (siehe Abb. 4-21A). Der Zellkern und die Vakuole und enthielten wenig bzw. keine GFP-Fluoreszenz. Darüber hinaus gab es eine ganze Reihe von verschiedenen großen Kompartimenten im Cytoplasma, die ebenfalls keine Fluoreszenz enthielten und als kleine dunkle Kreise sichtbar wurden. Distinkte Strukturen, wie sie vom Wildtyp-Protein MsRab11F1:GFP markiert wurden (siehe Abschnitt 4.2.2.1), waren bei der loss of function Mutante MsRab11F1FS29N:GFP nicht zu detektieren. Es fand sich keine spezifische Lokalisierung. Im Gegensatz zu den mit dem Wildtyp-Protein transfizierten Protoplasten traten bei der Transfektion der loss of function Mutante relativ früh apoptotische Effekte bei den Zellen auf. Die Fluoreszenz konzentrierte sich zunehmend in zahlreichen großen Aggregaten, die sich vor allem um den Zellkern herum und im Zellkortex konzentrierten (siehe Abb.4-21C, E). Der Zellkern verlagerte sich in das Zentrum der Zellen und die strukturelle Identität der Zellkompartimente ging zunehmend

verloren (siehe Abb.4-21A, E). Gleichzeitig verloren die Zellen ihre typische Kugelform (siehe Abb.4-21B) und zeigten Eindrückungen an der Zelloberfläche (siehe Abb.4-21D, F).

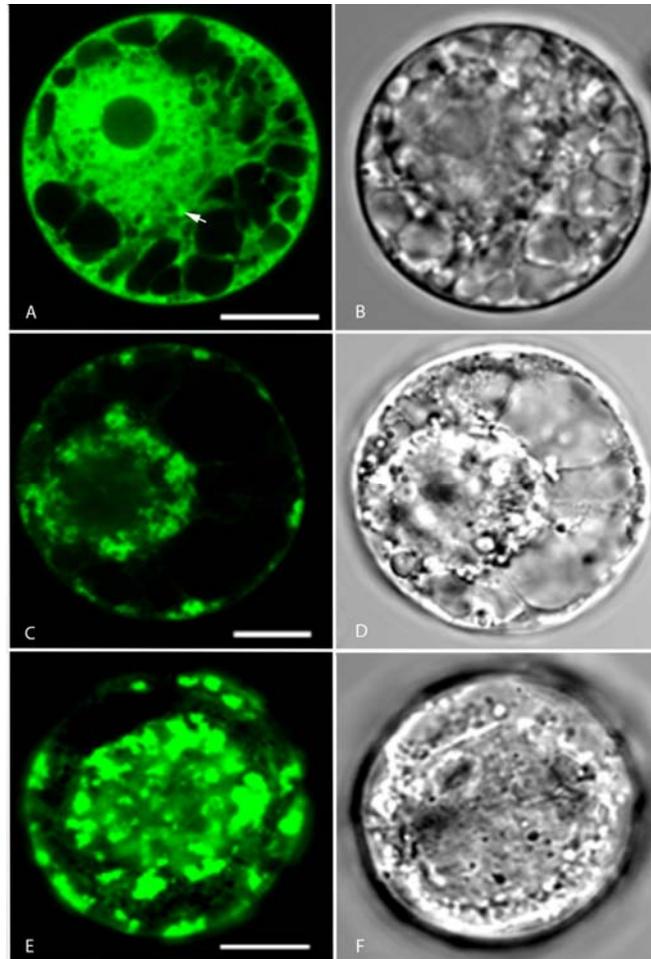


Abb. 4-21. Lokalisierung der dominant negativen Mutante MsRab11FS29N:mGFP6 in Tabak BY-2 Protoplasten. Die Aufnahmen zeigen Tabak BY-2 Protoplasten, die die mit GFP markierte dominant negative Mutante MsRab11FS29N exprimierten. Die GFP-Fluoreszenz war homogen im Cytoplasma verteilt. Die Vakuole und eine ganze Reihe von Zellkompartimenten blieb frei von GFP-Fluoreszenz, während der Zellkern etwas Fluoreszenz aufwies (A). Zahlreiche der mit der Mutante transfizierten Protoplasten zeigten Anzeichen von Apoptose (C, E). Maßstab = 15,74 μ m

4.3.2 Einfluss von Brefeldin A auf die MsRab11F1:GFP-Lokalisierung in der Epidermis von Tabakblättern

Brefeldin A (BFA) ist eine toxische Substanz, die aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum* isoliert wird. Sie bindet an einen Übergangskomplex aus dem ADP-Ribosylierungsfaktor Arf1 und Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und hemmt dadurch die Aktivierung von Arf1. Arf1 reguliert die Vesikeltransportprozesse. Dazu gehört die Rekrutierung von Coat-Proteinen an cis-Golgi-Membranen für die Bildung von COPI-Vesikeln, sowie die Rekrutierung Lipid-modifizierender Enzyme. BFA-Behandlung führt allgemein zu starken Veränderungen in der Morphologie des Golgi-Apparates.

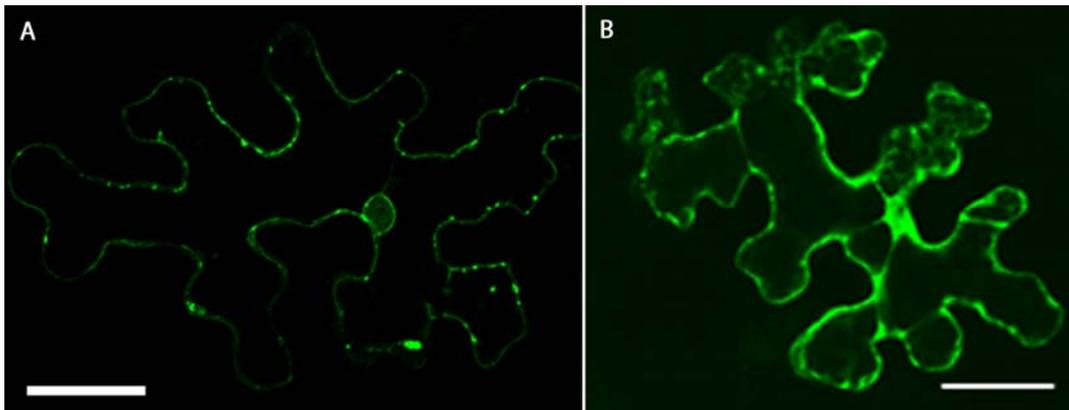


Abb. 4-22: Wirkung von Brefeldin A (BFA) auf MsRab11F:GFP-exprimierende *N. benthamiana*-Blattzellen. (A) Die MsRab11F:GFP-exprimierende Blattzelle ohne BFA-Behandlung (B) Die Blattzelle 30 min nach Zugabe von BFA (50 µg/ml). Die mit MsRab11F:GFP markierten Strukturen wandelten sich zu einem Aggregat um. Maßstab = (A) 25 µm (B) 37.17 µm.

Innerhalb weniger Minuten nach der Zugabe von BFA zerfiel der größte Teil der MsRab11F1:GFP-markierten. Darüber hinaus konzentrierte sich ein Teil der grünen Fluoreszenz am Zellkern der ohne BFA-Behandlung der Zellen nicht markiert war. Im Gegensatz dazu konnte in der Vakuole weiterhin keine Fluoreszenz detektiert werden. Die wenigen noch vorhandenen, punktförmigen cytoplasmatischen Strukturen hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von ca. 3 µm. Sie waren eindeutig größer als die unbehandelten MsRab11F1:GFP-markierten Strukturen, die einen Durchmesser von ca. 1,0 µm aufwiesen. Außerdem war ihre Strömungsaktivität stark eingeschränkt. Sie bewegten sich entweder gar nicht oder nur wenig über kurze Strecken.

4.3.3 Kolokalisierung von MsRab11F:GFP und GmMan1:mCherry in Tabak-Blättern

Um zu überprüfen, ob MsRab11F1:GFP am Golgi-Apparat lokalisiert, wurde das Protein zusammen mit dem Golgi-Marker GmMan1:mCherry in Epidermiszellen von Tabak-Blättern exprimiert. Von GmMan1:mCherry ist bekannt, dass es am cis-Golgi lokalisiert (Nelson *et al.*, 2007). Das Konstrukt entstand durch eine Fusion von α -1,2-Mannosidase I aus Sojabohne (GmMan1) und dem rot fluoreszierenden Protein mCherry. mCherry hat ein Emissionsmaximum bei 610 nm und kann am CLSM getrennt von GFP-Fluoreszenz detektiert werden.

Nach der Transformation konnten zahlreiche durch GmMan1:mCherry rot markierte Golgi-Apparate detektiert werden. Sie waren in den meisten Zellen sehr beweglich und hatten eine vergleichbare Größe wie die durch MsRab11F:GFP markierten Strukturen. Bei der Überlagerung der Bilder wurde deutlich, dass MsRab11:GFP zum größten Teil mit Man1:mCherry kolokalisierte (siehe Abb. 4-23 C). Der

überwiegende Anteil der Golgi-Apparate war durch die Mischung der Farben Rot und Grün gelb markiert. Ein geringer Anteil der Strukturen erschien ausschließlich rot oder grün markiert.

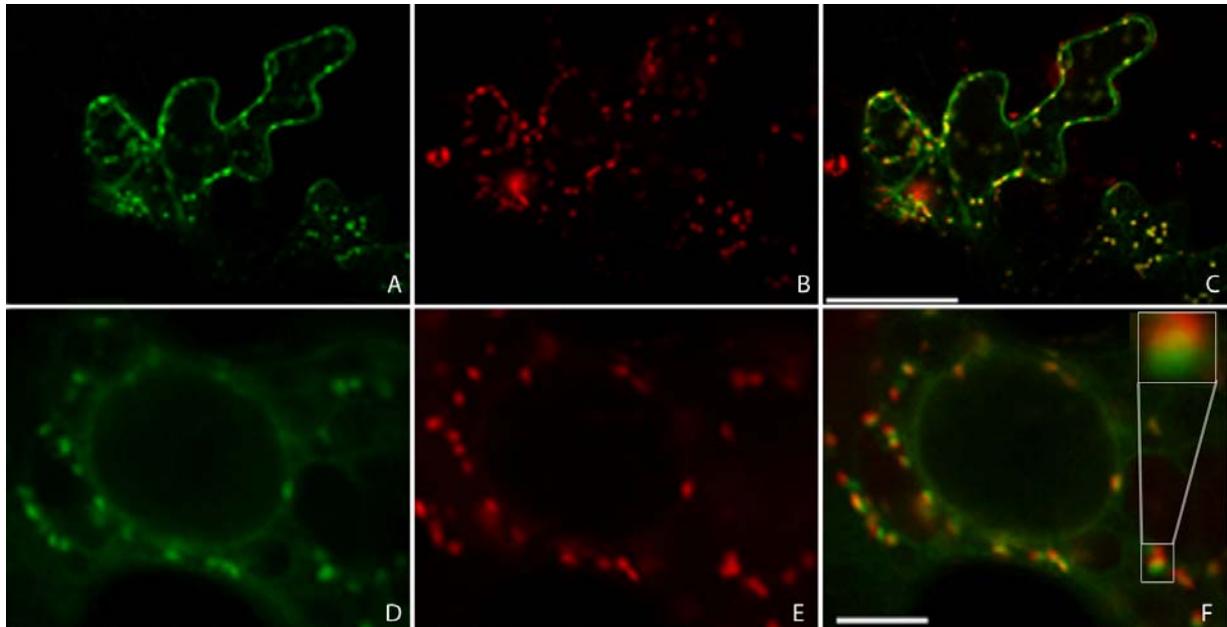


Abb. 4-23: Kolokalisierung von MsRab11F1:GFP und GmMan1:mCherry in Epidermiszellen von *N. benthamiana*. (A) MsRab11:GFP markierte Organellen im Cytoplasma. (B) GmMan1:mCherry markierte Golgi-Apparate. (C) Kolokalisierung von MsRab11F:GFP und Man1:mCherry. (E-F) Bei hoher Vergrößerung konnte festgestellt werden, dass die Golgi-Apparate teilweise dreifarbig erschienen. Maßstab = (A-C) 50µm (D-F) 10µm

Bei hoher Vergrößerung wurde deutlich, dass sich die Markierung die Golgi-Apparate teilweise dreifarbig gestaltete (siehe Abb. 4-23 F). Am einen Ende wurden sie durch mCherry rot gefärbt, am anderen Ende durch GFP grün, in der Mitte durch Überlagerung von GFP und mCherry gelb. Nelson et al. (2007) fanden, dass Man1:mCherry sich überwiegend am cis-Golgi befindet. Daraus lässt sich schließen, dass MsRab11F am trans-Golgi lokalisiert und es nur eine kleine zentrale Zone an den Golgi-Apparaten gibt in der beide Proteine kolokalisieren. Dass bei einigen Strukturen nur rote oder grüne Fluoreszenz zu detektieren war könnte darin begründet sein, dass die sich die Golgi-Apparate in verschiedene Richtungen orientieren können und es daher vom Aufnahmewinkel abhängt, in welcher Farbe sie erscheinen.

4.4 Lokalisierung von MsRab11F und MtRab5B in *M. truncatula* Wurzeln (“hairy root“ Transformation)

4.4.1 Erstellung der transgenen Wurzeln von *M. truncatula* mittels der hairy root Methode

Zur Transformation von *M. truncatula* Wurzeln wurde der *Agrobacterium rhizogenes* Stamm ArQual verwendet (Quandt *et al.*, 1993). *A. rhizogenes* ist ein Gram negatives phytopathogenes Bakterium und verursacht eine kontinuierliche Wurzelbildung, die sogenannten „hairy roots“ (Riker *et al.*, 1930). Dieses Symptom kann ArQual auch bei *M. truncatula* auslösen (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). ArQual wurde mit den Konstrukten pBin-MsRab11F:GFP oder pBin-MtRab5B:GFP elektroporiert und der Erfolg der Transformation durch Reisolierung der Plasmide aus den Bakterien oder mittels PCR unter Verwendung von Primern für MsRab11F bzw. MtRab5B überprüft. *M. truncatula* Keimlinge wurden dann mit den ArQual transformiert und nach 4-6 Wochen mittels eines Fluoreszenzbinokulars selektioniert. Transformierte Wurzeln zeigten starke grüne Fluoreszenz und konnten dadurch leicht von Wildtyp-Wurzeln unterscheiden werden, die nur eine rote oder gelbe Autofluoreszenz zeigten.

4.4.2 Lokalisierung von MsRab11F1:GFP in *M. truncatula* Wurzeln

M. truncatula Wurzeln wurden durch den pBin-Rab11F1-enthaltenden *A. rhizogenes*-Stamm (ArQual) transformiert, die transgenen Wurzeln dann unter dem Fluoreszenzbinokular selektioniert und am CLSM analysiert. Dabei wurden die Wurzeln stets entlang ihrer Längsachsen mikroskopiert (Abb.4-24). Die GFP Fluoreszenz konzentrierte sich auf viele kleine bewegliche punktförmige Strukturen. Diese hatten alle einen gleichmäßigen Durchmesser von ca. 1,0 µm. Sie waren mehr oder weniger gleichmäßig im Cytoplasma der kortikalen Region (Abb.4-24 C) und in cytoplasmatischen Strängen (Abb.4-24 A) verteilt, während im Zellkern, der Vakuole und der Zellwand hingegen keine Fluoreszenz zu sehen war.

An der Wurzelspitze, wo die Zellen noch jung und ihre Vakuolen noch klein waren, war das Cytoplasma von grünen Strukturen fast vollständig ausgefüllt (Abb. 4-24 B). Über die Streckungszone bis hin zu den älteren Teilen der Wurzeln, in denen sich die Zellen durch Streckungswachstum vollständig differenziert hatten, nahm die Anzahl der durch MsRab11F markierten Strukturen stetig ab. Ihre Morphologie veränderte sich allerdings nicht. Genau wie in den Protoplasten (siehe Abschnitt 4.2.2.1.) zeigten die markierten Strukturen in den Wurzelzellen ein typisches Bewegungsmuster. Sie bewegten sich durch das kortikale Cytoplasma wobei sie festgelegten Bahnen zu folgen schienen, unterbrochen von Phasen der Bewegungslosigkeit, in denen sie an Ort und Stelle verharrten und sich

Strukturen auch die Bewegungsrichtung. wenn nur geringfügig hin und her bewegten. Es konnte beobachtet werden, das verschiedene Partikel oftmals den gleichen Weg nahmen und sie wie an Schienen entlang bewegten. Insgesamt bewegten sich die Strukturen in den Zellen an der Wurzelspitze am wenigsten. In älteren Teilen der Wurzel hingegen, in denen die Anzahl der fluoreszmarkierten Strukturen pro Zelle deutlich war, bewegten sich diese oft mehrere μm weit durch das kortikal angeordnete Cytoplasma, bevor sie in eine Phase des Stillstands übergingen. Es gab dabei keine festgelegte Bewegungsrichtung. In den jeweiligen Bildausschnitten waren immer gegenläufige Bewegungsrichtungen zu beobachten. Während sich der eine Teil der Strukturen nach links bewegte, strömte der andere Teil nach rechts. Oftmals wechselten die Strukturen auch die Bewegungsrichtung.

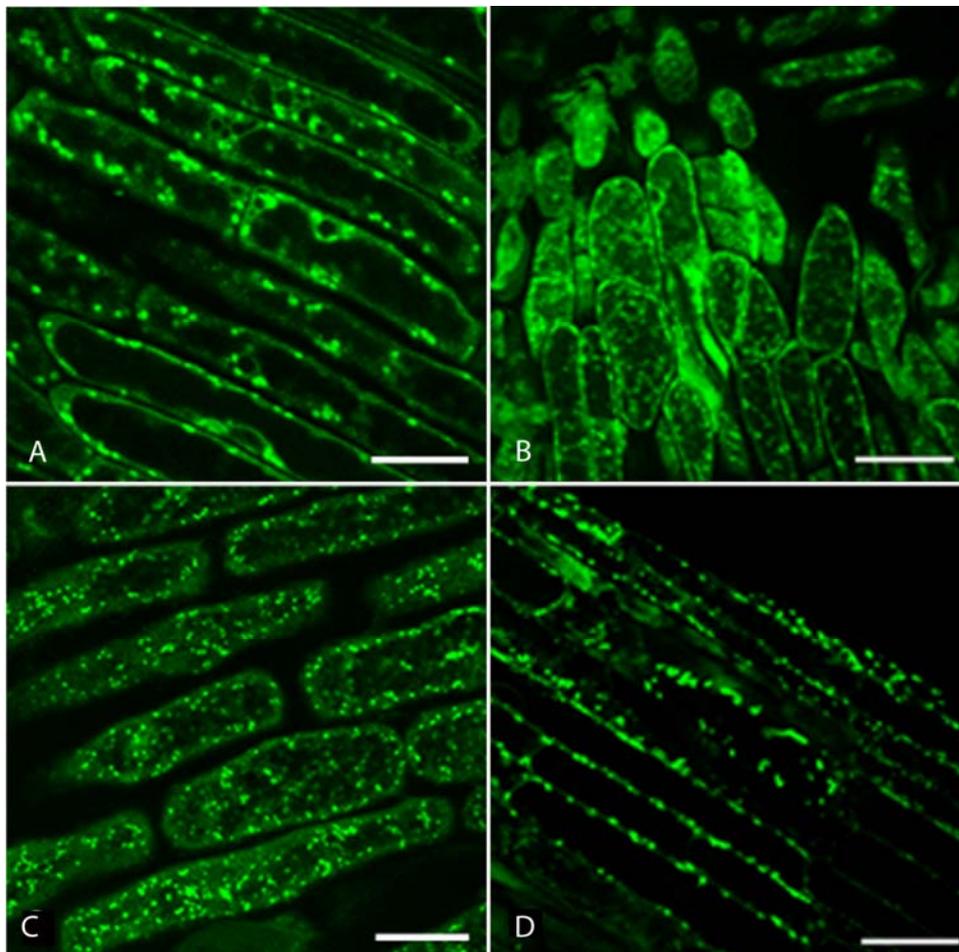


Abb. 4-24: Lokalisierung des MsRab11F:mGFP6 Fusionsproteins in *M. truncatula*-Wurzelzellen. Die Wurzeln wurden durch den *A. rhizogenes* Stamm ArQua1 mit dem Konstrukt MsRab11F:GFP transformiert und am CLSM analysiert. Die Zellen zeigten viele kleine grün fluoreszierende Strukturen, die sich wahllos im Cytoplasma verteilten und sich bewegten. (A) Zellen in der Streckungszone, (B) Zellen an der Kalyptra, (C) Zellen im kortikalen Cytoplasma der Streckungszone, (D) Zellen in den älteren Teilen der Wurzeln. Maßstab = (A) 12,93 μm , (B) 28 μm , (C) 22,59 μm (D) 23,07 μm

4.4.3 Lokalisierung von MtRab5B:GFP in *M. truncatula* Wurzeln

M. truncatula Wurzeln wurden durch den pBin-MtRab5B-enthaltenden *A. rhizogenes*-Stamm (ArQual1) transformiert, die transgenen Wurzeln dann unter dem Fluoreszenzbinokular selektiert und am CLSM analysiert. Die GFP Fluoreszenz konzentrierte sich auf viele kleine bewegliche punktförmige Strukturen. Diese waren eindeutig kleiner als die durch MsRab11F:GFP markierte Strukturen (Abb. 4-25) und waren im Durchmesser zwischen ca. 0,5 μm und 1,0 μm groß. Genau wie bei MsRab11F war ihre Zahl in den Zellen an der Wurzelspitze höher als in älteren Teilen der Wurzel. Insgesamt gesehen war aber ihre Gesamtanzahl in den Zellen der Wurzelspitze (Abb. 4-25B) geringer als für MsRab11F (Abb. 4-24 B), während in den älteren Wurzelzellen die Zahl an MsRab11F (Abb. 4-24 D) und MtRab5B (Abb. 4-25 A) markierten Strukturen in etwa gleich groß war. An manchen Stellen des Cytoplasmas konzentrierten sich die markierten Strukturen in größeren Ansammlungen (Abb. 4-25 A, Pfeil). Genau wie die MsRab11F markierten Strukturen bewegten sich auch die Strukturen, die durch MtRab5B markiert waren, durch das Cytoplasma. Die Art der Bewegungen war dabei vergleichbar mit denen der MsRab11F markierten Strukturen. Auch in diesem Fall strömte ein Teil der fluoreszenten Strukturen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das Cytoplasma, während der andere Teil sich nicht bewegt. Phasen aktiver Bewegung wechselten sich auch hier mit Pausen ab, in denen die Strukturen an einem Ort verharrten und sich nicht bewegten.

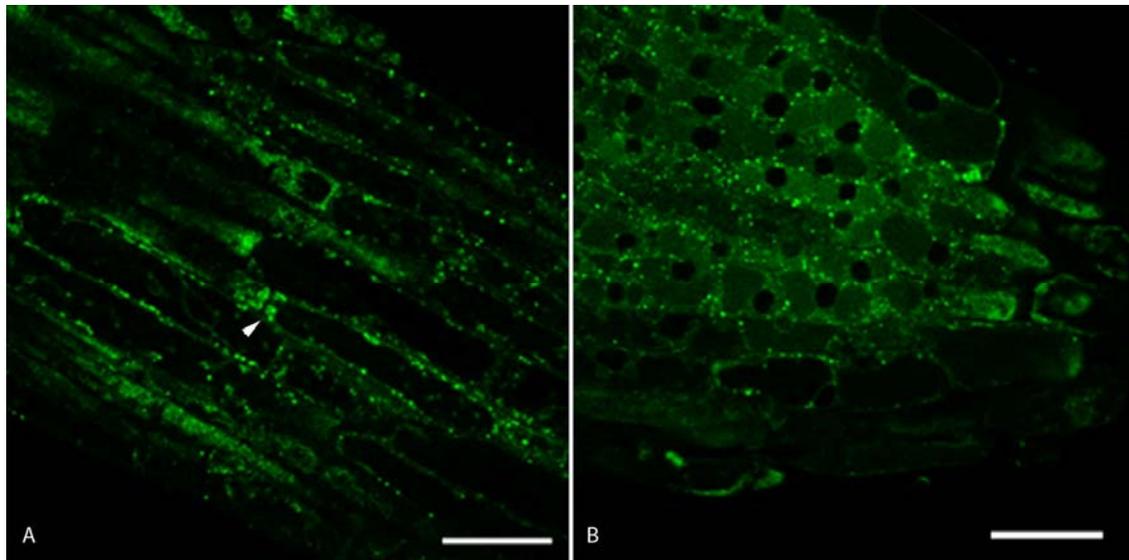


Abb. 4-26: Lokalisierung des MtRab5B:mGFP6 Fusionsproteins in *M. truncatula*-Wurzelzellen. Die Wurzeln wurden durch den *A. rhizogenes* Stamm ArQual1 mit dem Konstrukt MtRab5B:GFP transformiert und am CLSM analysiert. Die Zellen zeigten viele kleine grün fluoreszierende Strukturen, die sich wahllos im Cytoplasma verteilten und sich bewegten. (A) Zellen in den älteren Teilen der Wurzeln. (B) Zellen an der Wurzelspitze Maßstab = (A) 19,25 μm , (B) 28 μm

4.4.4 Kolokalisierung von MsRab11:GFP mit FM4-64 in *M. truncatula* Wurzeln

FM4-64 ist ein Farbstoff, der häufig als endozytotischer Marker verwendet wird. FM4-64 lagert sich selektiv in Membranen pflanzlicher Zellen und deren Organellen ein (Bolte *et al.*, 2004). Wegen seiner amphiphilen Eigenschaften ist er nicht in der Lage durch die Membran zu diffundieren. Der Farbstoff wird durch endozytotische Vesikel an der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen. FM4-64 kann durch Wellenlängen von 488-, 514- und 532 nm angeregt werden (mit einem Anregungsmaximum bei 515 nm) und hat ein Emissionsmaximum bei 670 nm. Das von FM4-64 emittierte rote Fluoreszenzlicht kann am CLSM getrennt von der grünen Fluoreszenz des GFP aufgenommen werden.

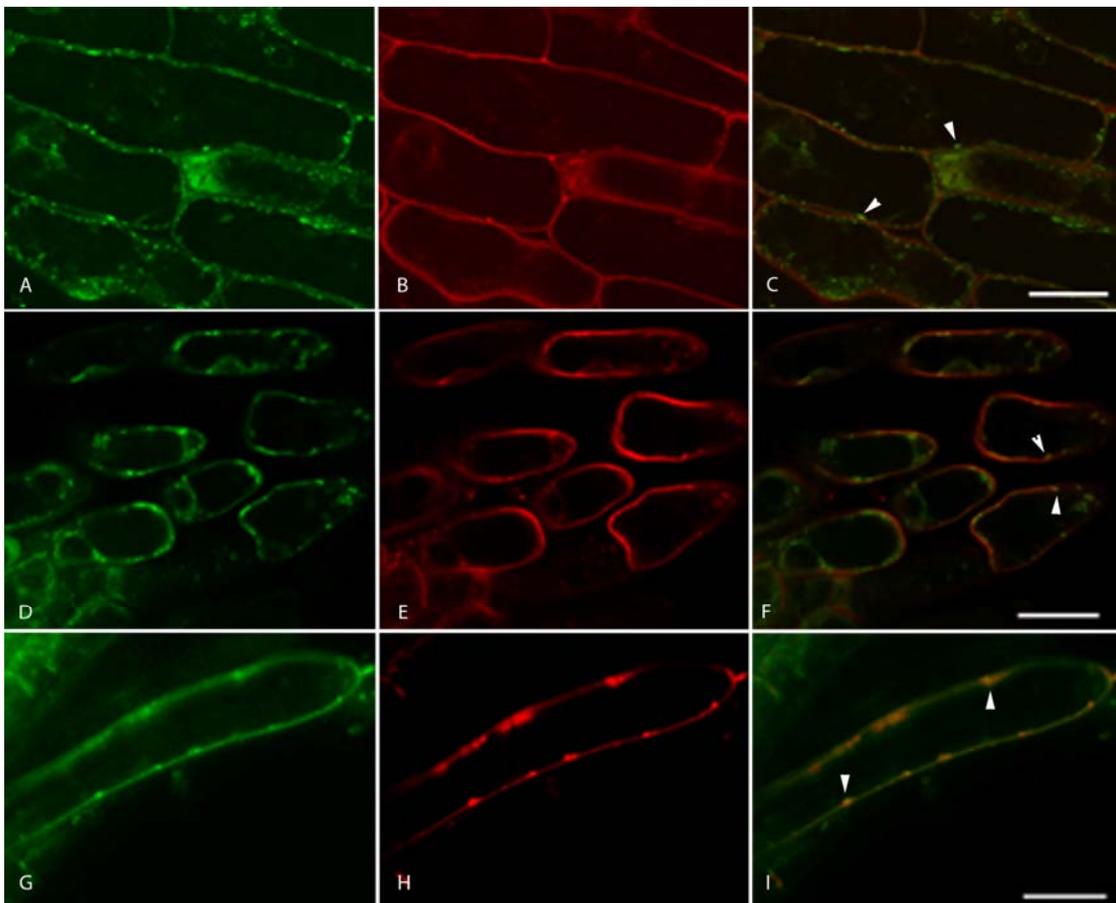


Abb. 4-27: Kolokalisierung von MsRab11F:GFP und FM4-64 in *M. truncatula* Wurzelzellen. Die Aufnahmen wurden direkt nach der Zugabe von FM4-64 (A-C), 30 min später (D-F) und 2h später gemacht (G-I). GFP-Fluoreszenz von MsRab11F:GFP (links), rote Fluoreszenz von FM4-64 (Mitte) und Überlagerung der Aufnahmen aus beiden Kanälen (rechts). Direkt nach der Zugabe von FM4-64 lagerte sich der Farbstoff in die Plasmamembran ein. Nach 30 min hatte der Farbstoff einen Teil der durch MsRab11F:GFP markierten Strukturen erreicht, nach 2 h waren alle Strukturen von FM4-64 gefärbt. Maßstab = (A-C) 14 μ m (D-F) 17,45 (G-I) 15,16 μ m

Unmittelbar nach der Zugabe von FM4-64 wurde die Plasmamembran durch den Farbstoff angefärbt (siehe Abb. 4-27 B). Die durch MsRab11F:GFP markierten Strukturen hatte FM4-64 zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht erreicht (siehe Abb. 4-27 A). In den überlagerten Bildern gab es eine klare Trennung von roter und grüner Fluoreszenz (siehe Abb. 4-27 C). 30 Minuten später wurden zusätzlich kleine, rot gefärbte Organellen mit Durchmesser von ca. 0,5-0,8 μm in der Zelle sichtbar (siehe Abb. 4-27 E). Die durch Überlagerung von grüner und roter Fluoreszenz entstehende gelbe Farbe zeigte an, dass ein Teil der von MsRab11F:GFP markierten Strukturen mit FM4-64 kolokalisierte (siehe Abb. 4-27 F). Insgesamt betrachtet aber war dieses eher die Ausnahme. Rote und grüne Fluoreszenz waren immer weitgehend voneinander getrennt. Nach zweistündiger Inkubation waren alle mit MsRab11F:GFP markierte Organelle mit dem Farbstoff FM4-64 kolokalisiert. Im Überlagerungsbild erschienen alle Strukturen gelb. Gleichzeitig hatte sich die Konzentration von FM4-64 in der Plasmamembran verringert. Während direkt nach der Zugabe des Farbstoffs zu den Wurzeln und auch noch nach 30 Minuten die Plasmamembran stark rot fluoreszierte und diese Fluoreszenz in den überlagerten Bildern deutlich hervorstach (siehe Abb. 4-27 C, F), war die Plasmamembran 2 h nach Zugabe des Farbstoff nur noch schwach markiert. Während zu diesem Zeitpunkt in der Aufnahme des roten Fluoreszenzkanals die Markierung der Plasmamembran mit FM4-64 noch schwach sichtbar war (siehe Abb. 4-27 H), zeigte diese im überlagerten Bild keine rote Fluoreszenz mehr (siehe Abb. 4-27 I).

4.5 Lokalisierung von MsRab11F in der *S. meliloti* Symbiose

4.5.1 Lokalisierung von MsRab11F:GFP in *M. truncatula* Knöllchen.

Nicht-determinierte Knöllchen werden von distal nach proximal in fünf verschiedene Zonen eingeteilt: Meristemzone (I), Infektionszone (II), Stickstofffixierungszone (III), Seneszenzzone (IV) und saprophytische Zone (V) (Timmers et al. 1999). In der Meristemzone befinden sich kleine, cytoplasmareiche Zellen, die sich ständig teilen. Die Meristemzone wächst nach außen liefert neue Zellen, die sich nach und nach in unterschiedliche Zellarten differenzieren. Bedingt durch die Teilungsaktivität der Meristemzellen entwickelt das Knöllchen eine zylindrische Form. Im Gegensatz zu den anderen Zonen ist Meristemzone nicht von einem mehrschichtigen, lateralen Knöllchengewebe umschlossen, und die Zellen in der Meristemzone enthalten keine Bakterien.

Rhizobien gelangen durch den Infektionsschlauch in das Pflanzengewebe. Sie wachsen und teilen sich innerhalb des Infektionsschlauchs, befinden sich aber physiologisch gesehen weiterhin außerhalb der Pflanzenzellen. Die Wand des Infektionsschlauchs verhindert einen direkten Kontakt der Bakterien mit der den Infektionsschlauch umhüllenden Membran. Die Infektionsschläuche wachsen durch verschiedene Zonen, ausgenommen der Meristemzone, und bilden eine netzwerkartige Struktur.

Um die Lokalisierung von MsRab11F:GFP im Knöllchen zu untersuchen, wurden *M. truncatula* Wurzeln durch den pBin-Rab11F-enthaltenden *A. rhizogenes* -Stamm (ArQual1) transformiert. Die transgenen Wurzeln wurden unter einem Fluoreszenzbinokular anhand ihrer GFP-Fluoreszenz selektioniert und mit Wildtyp *S. meliloti* 2011 inokuliert. Nach 4-6 Wochen wurden die Knöllchen geerntet, 80-100 μm dünn geschnitten und direkt am CLSM analysiert.

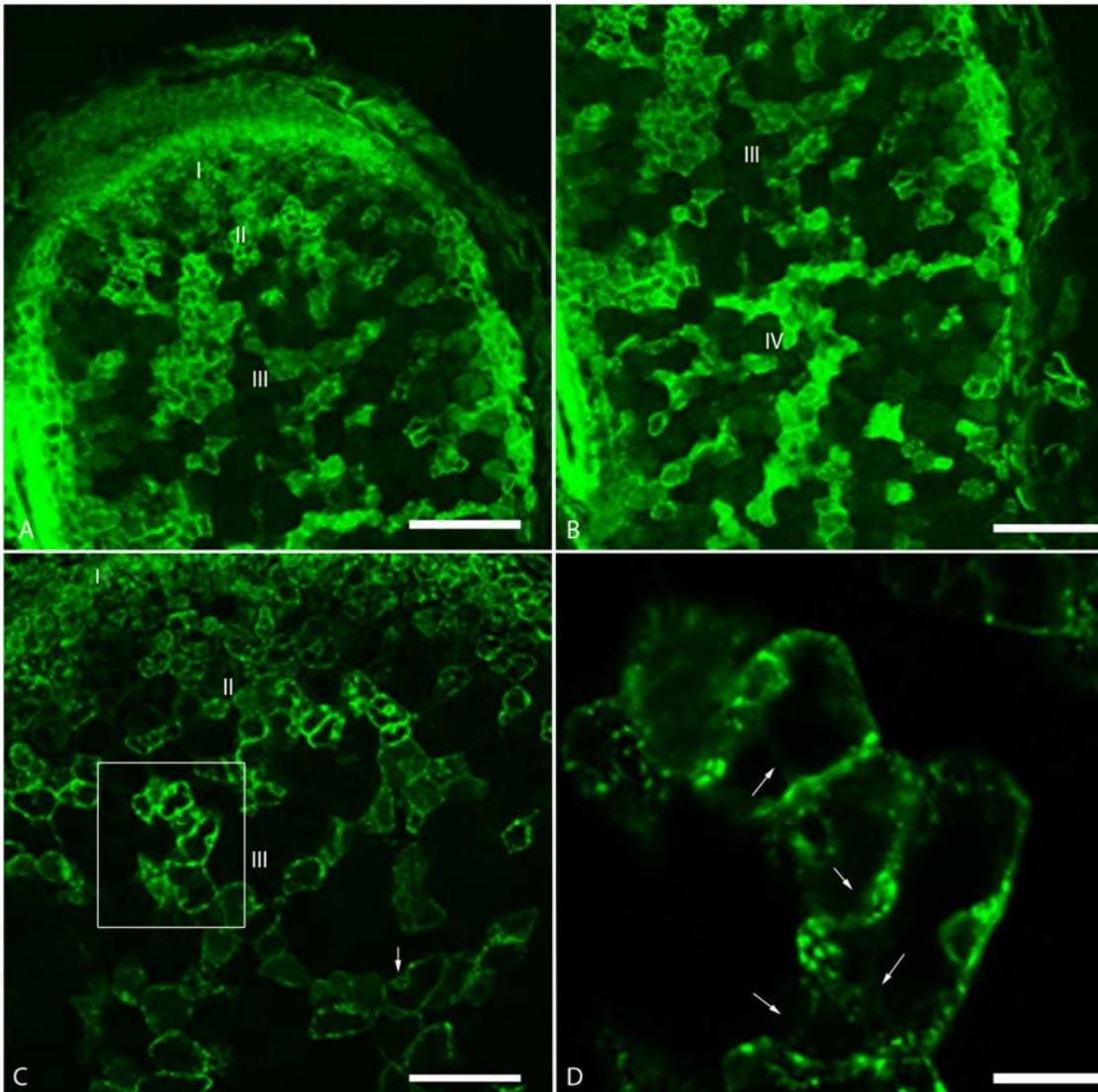


Abb. 4-28: Lokalisierung von MsRab11F:GFP in *M. truncatula* Wurzelknöllchen. (A) Übersichtsaufnahme der Meristemzone (I), Infektionszone (II) und Stickstofffixierungszone (III), Maßstab = 150 μm . (B) Übersichtsaufnahme der Stickstofffixierungszone (III) und Seneszenzzone (IV), Maßstab = 150 μm . (C) Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung A mit Meristemzone (I), Infektionszone (II) und Stickstofffixierungszone (III), Maßstab = 75 μm . (D) Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung C. Infektionsschlauch, der mehrere Zellen der Infektionszone durchzieht, Maßstab = 15 μm . Die Aufnahmen wurden am CLSM unter Anregung mit Laserlicht bei 488nm gemacht. Die Abbildung 22 A zeigt eine Übersicht der proximalen Hälfte eines transgenen Knöllchens. In der Meristemzone (I) konnte sehr starke Fluoreszenz beobachtet werden. Die Zellen leuchteten grün, waren

isodiametrisch, sehr plasmareich, dünnwandig und besaßen einen großen Zellkern. Bei höherer Vergrößerung (siehe Abb. 4-28 C) konnte man dicht gepackt viele kleine grün fluoreszierende Strukturen sehen, die sich über das gesamte Cytoplasma verteilten. Die Fluoreszenz war in der Meristemzone viel stärker als andere Zonen des Knöllchens.

An die Meristemzone schließt sich die Infektionszone (II) an (siehe Abb. 4-28 A). Diese besteht aus mehrere Schichten von Zellen, die etwas größer als die meristematischen Zellen der Zone I sind. Die Zellen enthielten einer Vielzahl grün fluoreszierender Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 1µm, die sich überall im Cytoplasma verteilten. In diesem Bereich befanden sich zahlreiche Infektionsschläuche, die in das noch junge Gewebe eindringen. Einige der Zellen waren bereits von Rhizobien infiziert worden und enthielten stickstofffixierende Bakterioide. Diese Zellen waren leicht daran zu erkennen, dass sie viel dunkler erschienen und nur schwache Fluoreszenz aufwiesen.

An die Infektionszone schließt sich die Stickstofffixierungszone an (siehe Abb. 4-28 A und B). Verglichen mit den anderen Zonen der Knöllchen war hier die Fluoreszenz am schwächsten. Fluoreszenz konnte vorrangig in nicht infizierten Zellen beobachtet werden, in die Infektionsschläuche eindringen. Bei reifen infizierten Zellen konnte hingegen nur wenig Fluoreszenz beobachtet werden. In den nicht infizierten Zellen konzentrierte sich die Fluoreszenz in kleinen Strukturen, wie sie schon in den Zellen der Infektionszone beobachtet werden konnten (siehe Abb. 4-28 C, Kästchen). Die vergrößerte Aufnahme dieses Bereichs zeigt einen Infektionsschlauch, der durch mehrere Zellen der Infektionszone hindurch verlief (siehe Abb. 4-28 D). Der Infektionsschlauch war von einer schwachen Fluoreszenz umgeben.

Am proximalen Bereich nahe Basis des Knöllchens befindet sich die Seneszenzzone. Hier werden ältere infizierte Zellen mitsamt ihren Symbionten abgebaut. Die Fluoreszenz war hier etwas stärker als in der Stickstofffixierungszone (siehe Abb. 4-28 C). Besonders die in diesem Bereich vorhandenen nicht infizierten Zellen zeigten erkennbare Fluoreszenz. Auch die Bakterioide wiesen eine schwache Fluoreszenz auf und konnten detektiert werden.

4.5.2 λ -Scans der aus *M truncatula* Knöllchen emittierten Fluoreszenz.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Fluoreszenz aus den transgenen Knöllchen um spezifische GFP-Fluoreszenz oder um Autofluoreszenz handelte, wurden in verschiedenen Bereichen λ -Scans durchgeführt. Dazu wurden zunächst Regionen ausgesucht, die besonders starke Fluoreszenz zeigten. In den Bereichen wurde mit einem Laserstrahl bei 488 nm angeregt und die Intensität der Fluoreszenzemission alle 5 nm Schritt in dem Bereich von 500-600 nm aufgenommen.

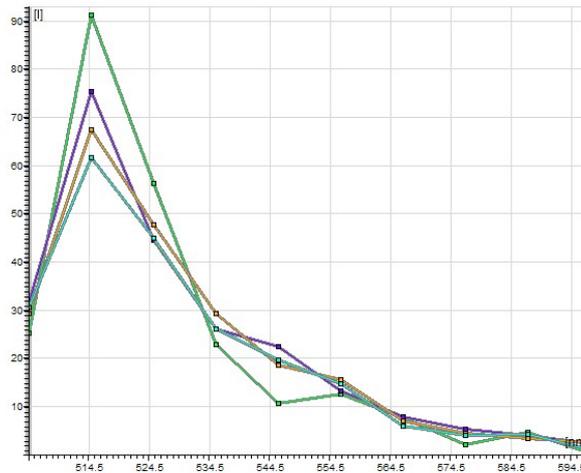


Abb. 4-29: λ -Scans zur Ermittlung der Fluoreszenzemission transgener Knöllchen. Dabei wurden verschiedene stark fluoreszierende Regionen in transgenen Knöllchen ausgewählt und am CLSM vermessen. Das Maximum der Fluoreszenzemission konnte bei einer Wellenlänge von 515 nm ermittelt werden. Dieses entspricht dem Emissionsmaximum von mGFP6.

Die Kurven in Abbildung 24 wurden an Zellen der Meristemzone (I) und nicht-infizierten Zellen der Infektionszone (II) und Fixierungzone (III) gemessen. Alle Kurven zeigten einen distinkten Peak bei ca. 514 nm auf, wie er für die Fluoreszenz von mGFP6 charakteristisch ist. In stark fluoreszierenden Zellen konnte also eindeutig GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Anschließend wurden schwach fluoreszierende Bereiche, wie zum Beispiel infizierte Zellen betrachtet. Die Emission stieg hier in einem Bereich zwischen 500nm und 530nm stetig an und pegelte sich dann auf einem mehr oder weniger gleich bleibenden Niveau ein (siehe Abb. 4-29). Nur bei 578nm zeigt sich eine kleine Spitze. Die Emission der Fluoreszenz verteilte sich über den gesamten Bereich zwischen 500nm und 600nm hinweg und es gab keinen klar definierten Peak. Für infizierte, stickstofffixierende Zellen entsprach der Verlauf der Emissionskurve nicht der vom mGFP6. Die hier detektierte schwache Fluoreszenz war also nicht auf die Expression von MsRab11F:GFP-Konstrukts zurückzuführen.

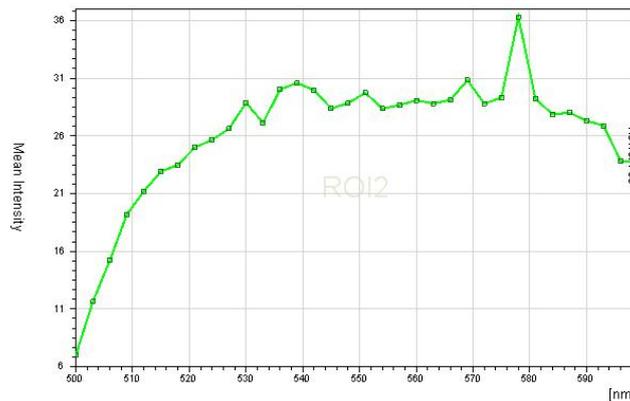


Abb. 4-30: λ -Scan von infizierten, stickstofffixierenden Zellen eines *M. truncatula* Wurzelknöllchens. Die Autofluoreszenz zeigte eine homogene Intensitätsverteilung über das gesamte Spektrum hinweg und hatte ein kleines Maximum bei 678nm. Die Emissionskurve war vollkommen unterschiedlich zu der der Fluoreszenz von mGFP6.

Wie die Ergebnisse der λ -Scans zeigten, konnte zwar GFP-Fluoreszenz in den transgenen Knöllchen nachgewiesen werden, gleichzeitig aber wurde ein Hintergrund an Autofluoreszenz detektiert. Die Überlagerung von GFP-Fluoreszenz und Autofluoreszenz machte die Interpretation der Bilder aus Abschnitt 4.5.1 unmöglich. Für weitere Untersuchungen wurde MsRab11F:GFP daher mittels geeigneter Antikörper markiert und die Fluoreszenz im roten Spektrum ermittelt. Im Gegensatz zur Anregung auf GFP-Fluoreszenz mit blauem Laserlicht, zeigen Wurzelknöllchen bei Anregung mit grünem Laserlicht extrem wenig Autofluoreszenz.

4.5.3 Untersuchung der Lokalisierung von Rab11F in *M. truncatula*-Wurzelknöllchen mittels immunocytochemischer Methoden

4.5.3.1 Immunologischer Nachweis von Rab11F in Wurzel- und Wurzelknöllchengewebe von *M. truncatula*.

Zur weiteren Untersuchung der Lokalisierung von Rab11F in *M. truncatula* Wurzelknöllchen wurde ein polyklonaler peptidspezifischer Anti-Rab11F-Antikörper verwendet, der gegen das Rab11F-Protein aus *M. sativa* gerichtet ist (K. Schiene, Dissertation). Zunächst musste überprüft werden, ob der Antikörper auch Homologe von Rab11F in *M. truncatula* erkennt. Zur immunologischen Detektion von Rab11F wurden Gesamtproteinextrakte aus Wurzel und Knöllchengewebe von *M. truncatula* verwendet. Als positive Kontrolle wurde ein Gesamtproteinextrakt aus dem Bakterienstamm *E. coli*BL21DE3 eingesetzt, der nach IPTG-Induktion MsRab11F1 vom Vektor pET24a(+) exprimiert. Die Proteinextrakte wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot analysiert.

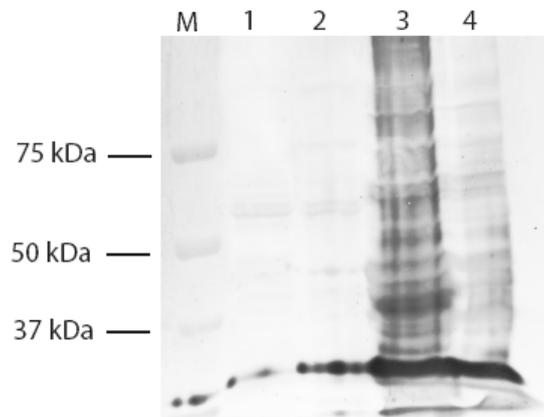


Abb. 4-31: Westernblot-Analyse zur Detektion von Rab11F1 in Wurzel- und Knöllchengewebe von *M. truncatula*. Als Primärantikörper wurde der polyklonale anti-MsRab11F Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 und als Sekundärantikörper ein anti-Rabbit Antikörper gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase in Verdünnung von 1:5000 verwendet. Der Farbnachweis erfolgte durch Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin). M: Proteinmarker, Spur 1: 20µl Gesamtproteinextrakt aus 100µg Wurzelgewebe, Spur 2: 20µl Gesamtproteinextrakt aus 100µg Knöllchengewebe, Spuren 3 und 4: 10µl Gesamtproteinextrakt aus 500µl IPTG-induzierter Bakterienkultur von *E. coli*BL21DE3 mit pET24a(+)-MsRab11F1.

Mittels des peptidspezifischen polyklonalen Antikörpers konnte sowohl in Wurzel- als auch in Knöllchengewebe von *M. truncatula* eine Bande im Bereich von ca. 25 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4-31). Dies stimmte exakt mit der Größe von MsRab11F1, das im Gesamtproteinextrakt der bakteriellen Kontrolle detektiert wurde, überein. Die ermittelte Größe von 25 kDa entsprach dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von MsRab11F1. Offensichtlich gibt es in *Medicago truncatula* ein Homolog des Rab11F1 Proteins aus *Medicago sativa*, das mittels des Antikörpers spezifisch nachgewiesen werden konnte. Der Antikörper kann also in transgenen Knöllchen sowohl MsRab11F:GFP als auch ein entsprechendes Homolog von *M. truncatula* detektieren.

4.5.3.2 2D-Gel und Western-blot vom gesamten Proteinextrakt aus *M. truncatula*-Knöllchen

Um die Homologen des MsRab11 aus *M. truncatula* zu identifizieren wurden 2D-Gel Elektrophorese und anschließend Western-blot durchgeführt. Dabei wurde das Gesamtproteinextrakt aus Knöllchen von *M. truncatula* isoliert. Die Proteine wurden mithilfe ihres isoelektrischen Punktes und ihres Molekulargewichtes getrennt. Zur immunologischen Detektion wurde ein peptidspezifischer polyklonaler Anti-MsRab11F-Antikörper verwendet. Der Antikörper markierte zwei Proteine, die jeweils einen isoelektrischen Punkt von ca. 5 und ein Molekulargewicht von 24 kDa hatten. Dies entspricht dem theoretisch berechneten Molekulargewicht und dem isoelektrischen Punkt von MsRab11F1. Diese Proteine wurden aus dem parallel durchgeführten 2D-Gel

heraus isoliert und mit einem Massenspektrometer untersucht. Da die Protein-Menge zu gering war, konnte hierbei kein Protein identifiziert werden.

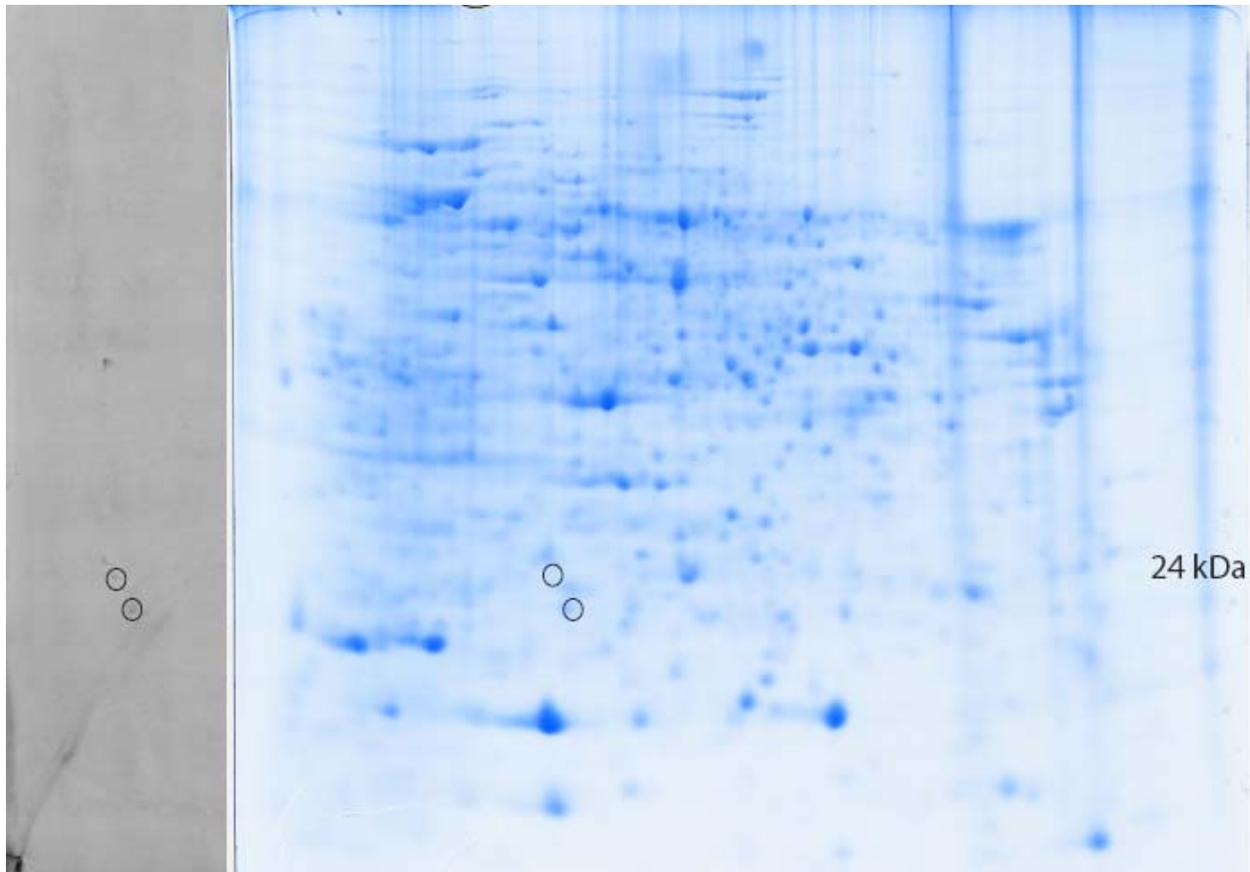


Abb. 4-32: 2D-Gel und Westernblot-Analyse zur Detektion von Rab11F1 im Knöllchengewebe von *M. truncatula*. Als Primärantikörper wurde der polyklonale anti-MsRab11F Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 und als Sekundärantikörper ein anti-Rabbit Antikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase in Verdünnung von 1:5000 verwendet. Der Farbnachweis erfolgte durch Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin).

4.5.3.3 Lokalisierung des MsRab11F:GFP in transgene *M. truncatula* Knöllchen

Die Untersuchungen von transgenen Knöllchen, die mit MsRab11F:GFP transformiert waren, hatten in den CLSM-Untersuchungen interessante Lokalisierungsmuster ergeben (siehe Abschnitt 4.5.1). Um die Lokalisierung von MsRab11F:GFP unter der Nutzung des polyklonalen MsRab11F-Antikörpers in der Knöllchensymbiose näher zu untersuchen, wurden transgene Wurzeln von *M. truncatula* mit mRFP1 exprimierenden *S. meliloti* Bakterien angeimpft. Nach 4-6 Wochen wurden die Knöllchen geerntet, 80-100 μm dünn geschnitten und fixiert (Siehe Abschnitt 3.13.2). Danach wurde die Lokalisierung von MsRab11F mit Hilfe von immunocytochemischen Methoden untersucht. Als Primärantikörper wurde der polyklonale peptidspezifischer Anti-MsRab11F1-Antikörper und als Sekundärantikörper ein Alexa647-konjugierter anti-Rabbit-Antikörper eingesetzt. Der Alexa-Farbstoff

wurde bei 635 nm angeregt und bei 660-700 nm detektiert, mRFP1 wurde bei 532 nm angeregt und bei 570-620 nm nachgewiesen. Die Spektren von Alexa647 und mRFP1 überlappen kaum, und die Fluoreszenzen können daher getrennt aufgenommen. Zur besseren Übersicht wird die Fluoreszenz des Alexa-Farbstoffs in den folgenden Abbildungen in der Falschfarbe grün dargestellt.

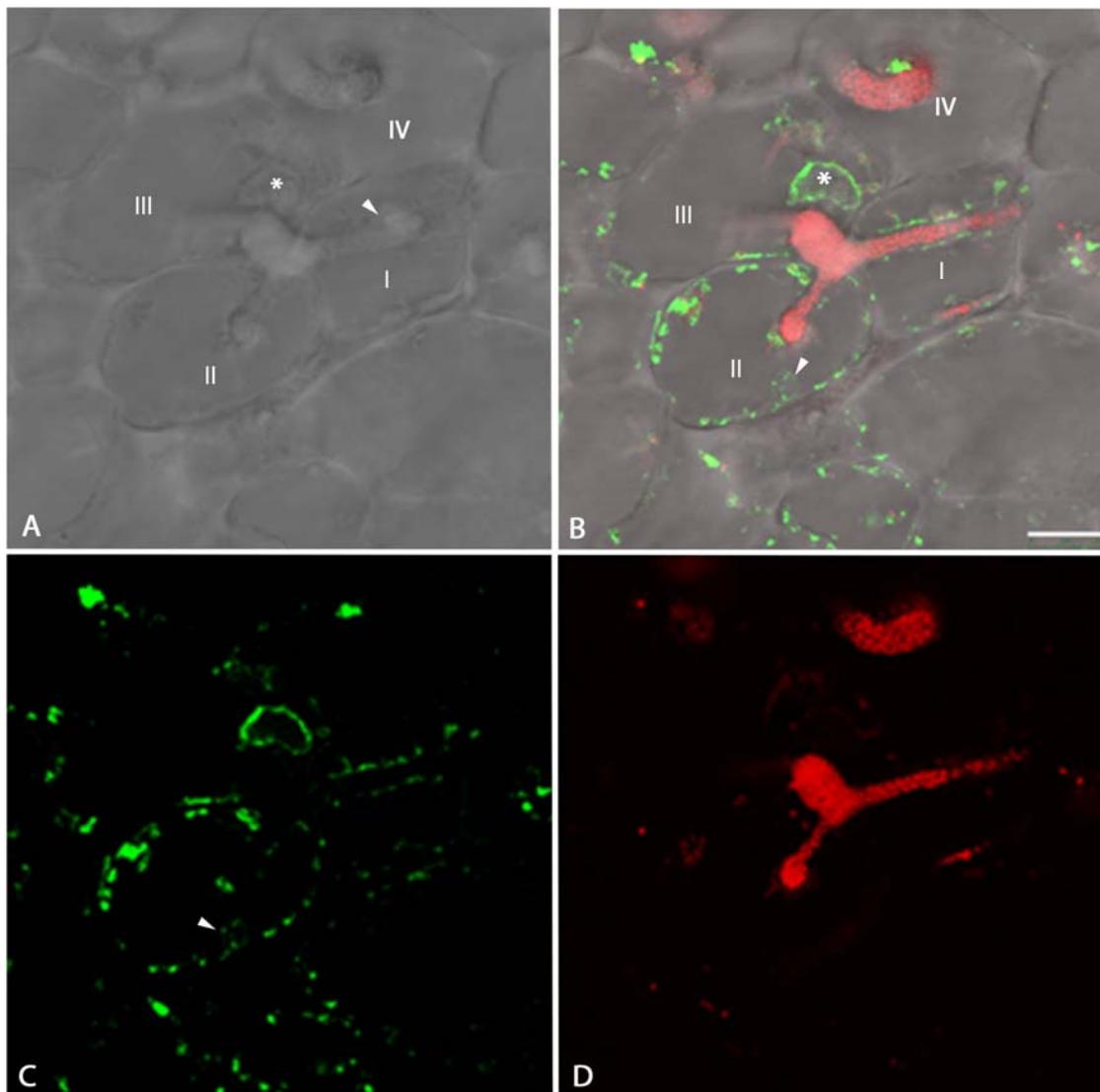


Abb. 4-33: Teil I: Lokalisierung von MsRab11F und *S. meliloti*-mRFP1 in *M. truncatula* Wurzelknöllchen. In den Aufnahmen ist ein Infektionsschlauch zu sehen, der durch die Zelle I gewachsen ist und über die Zellen II und III weiter wächst und sich verzweigt (A-D). MsRab11F ist an Strukturen im kortikalen Cytoplasma und um den Infektionsschlauch herum lokalisiert (C). An der Verdickung in Zelle III liegt eine grüne ringartige Struktur (B, Sternchen). Spiralförmiger Infektionsschlauch in Zelle IV. Im Zentrum der Spirale sind Strukturen akkumuliert, an denen MsRab11F1 lokalisiert (B). (A) Durchlicht (B) Overlay (C) Alexa647 (D) mRFP1. Maßstab = 25µm

In der Durchlichtaufnahme konnte ein Infektionsschlauch als verdickte, rohrartige Struktur erkannt werden, der sich über mehrere Zellen hinweg fortpflanzte. An Stellen, an denen der Infektionsschlauch

über die Grenzen zweier Zellen hinweg wuchs, bildete er Verdickungen und Verzweigungen, bevor er in die nächste Zelle hinein wuchs (siehe Abb. 4-33 B, Pfeile). Im Infektionsschlauch lagen dicht gepackt *S. meliloti* Bakterien, die aufgrund ihrer Expression von mRFP1 durch ihre rote Fluoreszenz leicht detektiert werden konnten. (Abb. 4-33 D). Im Infektionsschlauch lagen die Bakterien an der Spitze besonders dicht gedrängt vor, während ihre Dichte hin zu den älteren Teilen des Infektionsschlauches abnahm und sich die mRFP1-Fluoreszenz entsprechend abschwächte (Abb. 4-34 D).

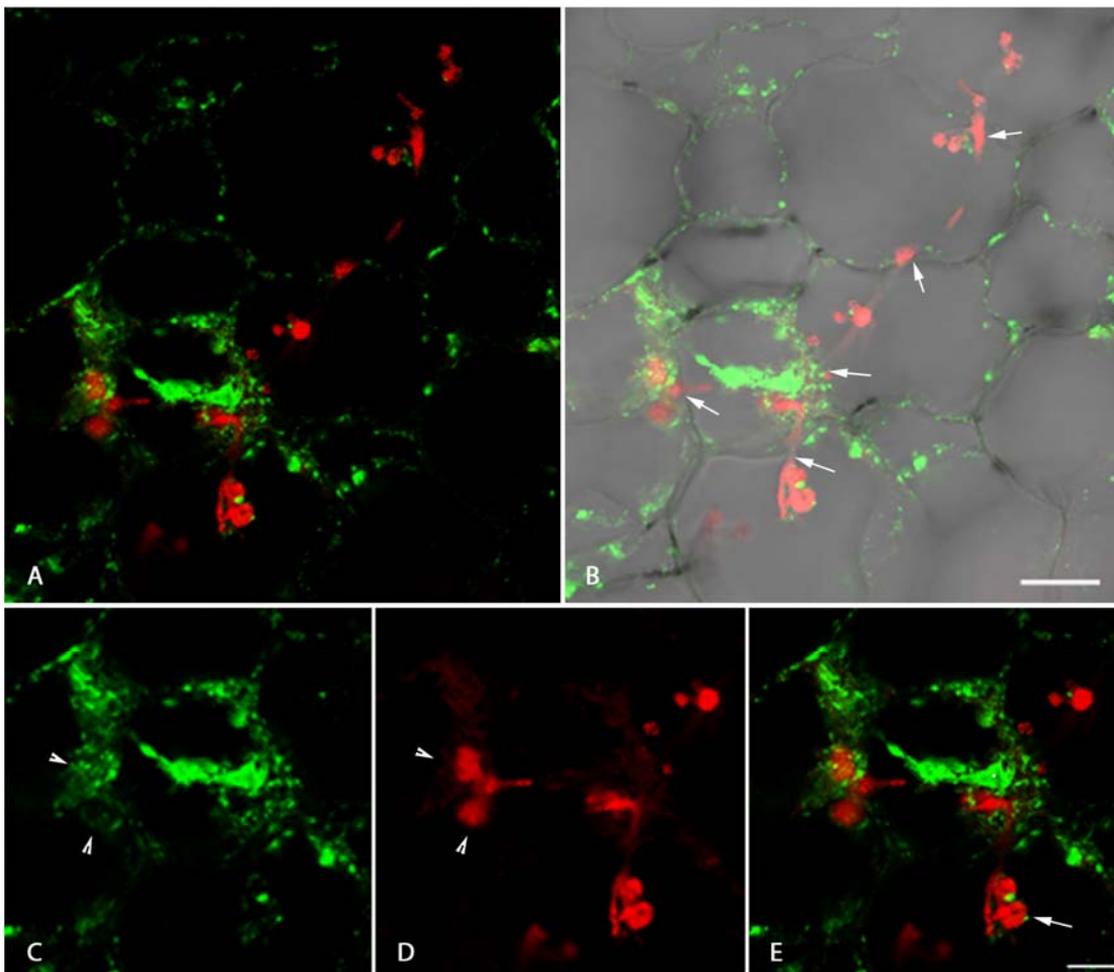


Abb. 4-34: Teil II: Lokalisierung von MsRab11F und *S. meliloti*-mRFP1 in *M. truncatula* Wurzelknöllchen. (A-B) Der Infektionsschlauch wächst durch verschiedene Zellen. Dabei entstehen an der Grenze zwischen den Zellen Verdickungen und Verzweigungen (B, Pfeile). (C-E) Die Bakterien werden an einer von beiden Verdickungen in die Zelle aufgenommen (C-D, Pfeilkopf oben). Der Infektionsschlauch bildet eine spiralförmige Struktur (E, Pfeil). MsRab11F lokalisiert an den Verzweigungen und an der Entlassungsstelle. Maßstab: (A-B) Maßstab =25 μm , (C-E) Maßstab =10 μm .

Der immunocytochemische Nachweis mit dem peptidspezifischen Antikörper zeigte, dass MsRab11F1 an kleinen punktförmigen Strukturen lokalisierte, die sich unspezifisch im Cytoplasma verteilen (siehe

Abb. 4-33 B). Die markierten Strukturen befanden sich in fast allen Zellen des Knöllchengewebes, ausgenommen der Stickstofffixierungszone, Seneszenzzone und saprophytischen Zone. In diesen Zonen konnte die Strukturen nur in bestimmten Zellen nachgewiesen werden. In der Stickstofffixierungszone befanden sich diese nur in jungen infizierten Zellen und nicht-infizierten Zellen. In reifen infizierten Zellen hingegen war keine Fluoreszenz zu detektieren. In der Matrix oder der Wand der Infektionsschläuche, genau wie in der Vakuole und dem Zellkern wurde MsRab11F ebenfalls nicht detektiert.

Um die Teilabschnitte des Infektionsschlauchs herum, die durch die Wirtszellen hindurch wuchsen, konnte MsRab11F an kleinen, vornehmlich punktförmigen Strukturen detektiert werden (siehe Abb. 4-33 B). Weiterhin konnte um den Querschnitt eines Infektionsschlauches herum eine ringartige Struktur beobachtet werden, die vermutlich aus der Fusion der kleineren, punktförmigen Strukturen hervorgegangen war (siehe Abb. 4-33 B Sternchen). Bei einem spiralförmig geformten Infektionsschlauch konnten an Strukturen im Zentrum der Spirale nachgewiesen werden, an denen MsRab11F lokalisierte (siehe Abb. 4-33 B Zelle IV). Um die Spitze des Infektionsschlauches herum, also an der Stelle an der sich die Wachstumszone des Schlauches befindet, akkumulierten besonders viele Strukturen die durch MsRab11F markiert waren. Anders als an anderen Stellen des Cytoplasmas, waren die Strukturen hier unterschiedlich groß und hatten einen Durchmesser von ca. 0,5 μm - 1,0 μm (siehe Abb. 4-34 C).

Zur negativen Kontrolle wurden Knöllchenschnitte nur mit dem MsRab11F Antikörper oder dem anti-Rabbit Antikörper inkubiert und die am CLSM untersucht. Dabei konnten keine Fluoreszenzsignale durch unspezifische Bindung der Antikörper festgestellt werden.

4.5.3.4 MsRab11F:GFP markierte Strukturen akkumulieren um Infektionströpfchen und umhüllen freigelassene Rhizobien.

Die Rhizobien werden durch Endozytose ins Cytoplasma aufgenommen. Dabei bildet der Infektionsschlauch typischerweise ein so genanntes Infektionströpfchen. Dieses ähnelt am Anfang dem Infektionsschlauch. Es vergrößert sich später und hat einen Durchmesser von 10-25 μm . Das Infektionströpfchen enthält keine oder nur einen Bruchteil der Infektionsschlauchwand und ermöglicht den Rhizobien direkten Kontakt mit der Infektionsschlauchmembran. Abb. 4-35 zeigt den Prozess der Infektion einer Wirtszelle mit Rhizobien. Die Struktur des Infektionsschlauchs in der Zelle entspricht einem Infektionströpfchen (siehe Abb. 4-35 C). Der Infektionsschlauch hat zunächst die benachbarte Zelle darüber durchdrungen, wobei er sich spiralförmig gewunden hat. Um ihn herum befanden sich eine Menge von Strukturen, die mit MsRab11F:GFP markiert waren. Deren Größe entsprach nicht der,

die in normalen Wurzelzellen detektiert wurde (siehe Abschnitt 4.4.2). Sie waren nicht vereinzelt und rund, sondern waren zu größeren Aggregaten unterschiedlicher Größe zusammengelagert.

An der Übergangsstelle zwischen den beiden Zellen verdickte sich der Infektionsschlauch, um sich dann in der unten abgebildeten Zelle zu verzweigen und in zwei getrennten Ausläufern hinein fortzupflanzen (siehe Abb. 4-35 B). Um diese Ausläufer herum befanden sich mehrere große, durch MsRab11F markierte ringförmige Strukturen (siehe Abb. 4-35 C und C). Der linke Ausläufer des Infektionsschlauchs endete in einer quer zur Wuchsrichtung verlaufenden Struktur, in der die Rhizobien aufgelockert und nicht so dicht gepackt wie im Rest des Infektionsschlauchs vorlagen. Dieser Abschnitt war komplett von einer Hülle umgeben, die mit MsRab11F markiert war (siehe Abb. 4-35 A und F). Rhizobien konnten nicht nur im Infektionsschlauch, sondern auch in der Peripherie der Zelle detektiert werden (siehe Abb. 4-35 B). Offensichtlich waren die ersten Bakterien bereits aus dem Infektionsschlauch entlassen worden und lagen frei im Cytoplasma vor. Während ein Teil der Rhizobien nur die rote Fluoreszenz des mRFP1 zeigten, war ein anderer Teil von MsRab11F markierten Strukturen eingehüllt, die leuchtend fluoreszierten (siehe Abb. 4-35 c). Eine Kolokalisation im eigentlichen Sinne konnte aber nicht detektiert werden. Die Rhizobien leuchteten weiterhin rot und die von MsRab11F markierten Strukturen grün. Eine gelbe Mischfarbe, wie man sie bei der Überlagerung der Fluoreszenz vorfindet, konnte nicht detektiert werden.

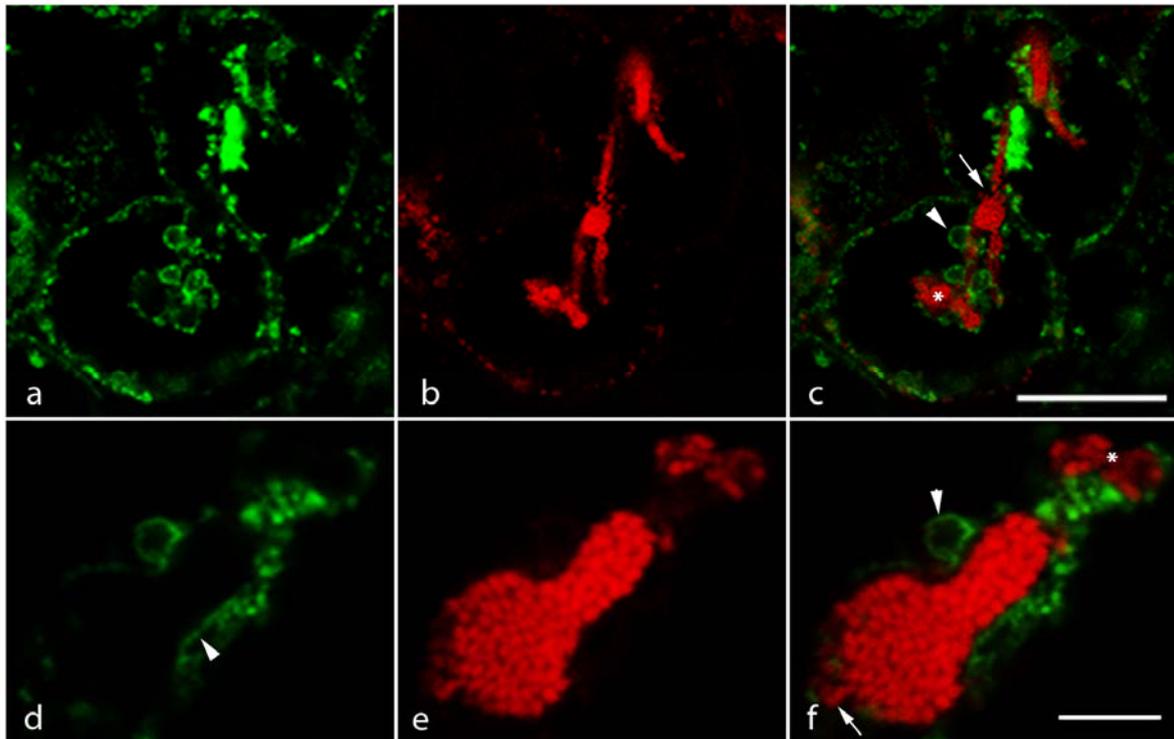


Abb. 4-35: Lokalisierung von MsRab11F und *S. meliloti*-mRFP1 am Infektionströpfchen. MsRab11F:GFP wurde wie in Kapitel 0 beschrieben immunologisch mittels des anti-MsRab11F1 Antikörpers und anti-Rabbit-Alexa647 Antikörpers nachgewiesen, mRFP wurde direkt bei 532 nm angeregt. (a-c) MsRab11F-markierte Strukturen akkumulieren um den Infektionsschlauch herum. Mehrere grüne Ringe sind erkennbar (Pfeilkopf). (d-f) Der gewölbte Infektionsschlauch verlässt den interzellulären Raum. Am dünneren Ende akkumulieren MsRab11F-markierte Strukturen. Sie bilden einen Ring (f, Pfeilkopf). Die Membran ist durch MsRab11F markiert (d, Pfeilkopf). Unten links der Verdickung liegen die Bakterien weit voneinander entfernt (f, Pfeil). Die Spitze des Infektionsschlauchs erweitert sich auf einen Durchmesser von ca. 10 μm . Hier sind Bakterien aufgelockert angeordnet (c-f, Sternchen). Maßstab (a-f) = 25 μm

In machen Zellen verzweigte sich der Infektionsschlauch während der Freilassung der Rhizobien nicht, sondern war zu einer spiralförmigen Struktur gewunden. Um diese herum befanden sich viele kleine von MsRab11F markierte Strukturen. Sie formten ein großes Bläschen, das einen Durchmesser von ca. 10 μm hatte (siehe Abb. 4-36 D). Am Rand des Bläschens fusionierten die Strukturen und bildeten einen großen Ring (siehe Abb. 4-36 C, Pfeil). Einige Bakterien waren bereits ins Cytoplasma aufgenommen worden und waren von durch MsRab11F markierten Strukturen umhüllt.

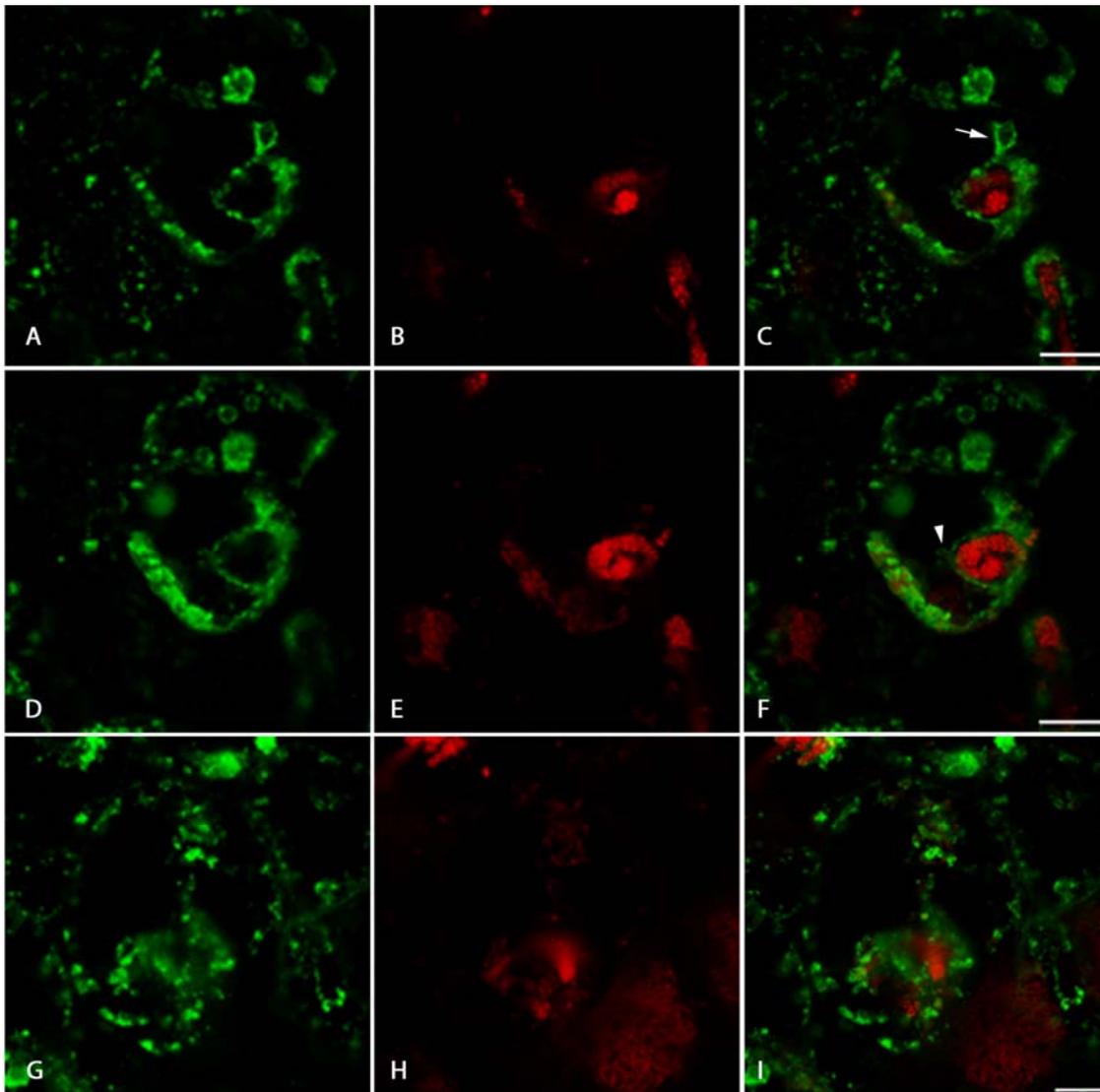


Abb. 4-36: Immunolokalisierung des MsRab11F in Knöllchen mit *S. meliloti*-mRFP1. (A-C) Der Infektionsschlauch bildet eine spiralförmige Struktur. Die Membran aus grünen punktförmigen Strukturen umschließt den Infektionsschlauch. (D-F) Bei der gleichen Zelle in einer anderen optischen Ebene (G-I) Der spiralförmige Infektionsschlauch wird aufgelöst und die Bakterien in das Cytoplasma aufgenommen. Maßstab =10µm

In der Abbildung kann man einen spiralförmigen Infektionsschlauch sehen, der sich im Prozess der Auflösung befand. Das Cytoplasma bildete hier eine Tasche um den Infektionsschlauch herum. Im Cytoplasma waren viele durch MsRab11F markierte punktförmige Strukturen sichtbar. Manche von ihnen lokalisierten direkt an den Bakterien, die gerade aus dem Infektionsschlauch entlassen wurden. Die Bakterien wanderten weiter ins Cytoplasma ein und wurden nach und nach komplett von MsRab11F markierten Strukturen umschlossen.

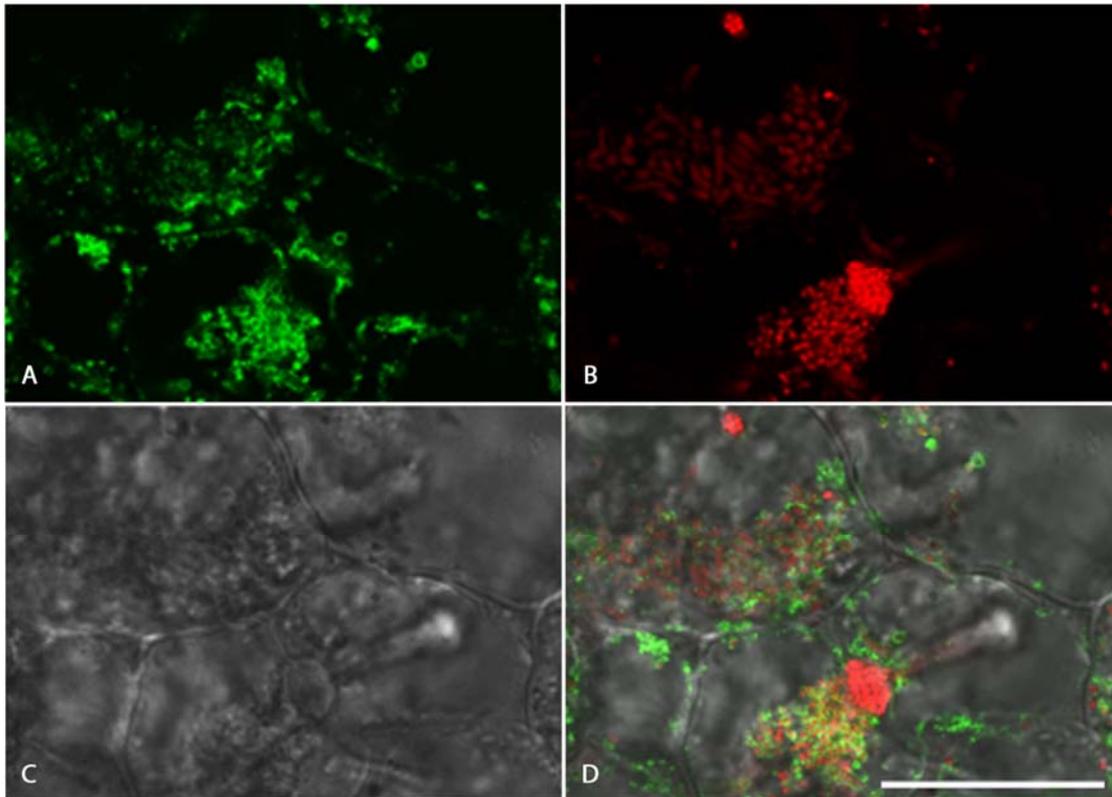


Abb. 4-37: Lokalisierung des MsRab11F bei der Freilassung von Rhizobien aus dem Infektionsschlauch. Der Infektionsschlauch erreicht die Zellwand einer Wirtszelle. Dabei verschmilzt seine Membran mit der Plasmamembran. An dieser Stelle wurde MsRab11F-GFP an der Membran detektiert (A). Die Bakterien werden aus dem Infektionsschlauch entlassen (B). Dabei wird jedes einzelne Bakterium von einer grünen Membran umschlossen (D). Maßstab= 25µm.

Neben den Infektionströpfchen war an den Zell-Zell-Grenzen, wenn der Infektionsschlauch über den interzellularen Raum von einer Zelle zur nächsten wuchs, eine der bevorzugten Stellen, an der die Rhizobien aus dem Infektionsschlauch entlassen wurden. Der Infektionsschlauch verließ zunächst seine Wirtszelle, wobei seine Membran mit der Plasmamembran und seine Wand mit der Zellwand der Wirtszelle verschmolzen. Die nun im Interzellularraum vorliegenden Bakterien vermehrten sich, übten Druck gegen die Zellwand der angrenzenden Zelle aus und gelangten dann in deren Cytoplasma (siehe Abb. 4-37 B). In der Zelle wurden fast alle freigelassenen Rhizobien dann von einer MsRab11F-GFP markierten Membran umhüllt. Die Rhizobien waren dabei weiterhin gut anhand ihrer roten Fluoreszenz detektierbar, während die grün fluoreszierende Hülle direkt um die Bakterien herum angeordnet war. Interessanterweise waren die Bakterien, die im Infektionsschlauch noch dicht gepackt eng aneinander lagen, in der Wirtszelle alle einzeln umhüllt (siehe Abb. 4-37 D).

4.5.3.5 In jungen infizierten Zellen differenzieren sich die aufgenommenen Bakterien zu Bakteroiden.

Die Rhizobien werden während der Infektion der Wirtszellen aus dem Infektionsschlauch ins Cytoplasma entlassen. Dabei werden sie von einer so genannten Peribakteroidmembran umschlossen, die ursprünglich von der Pflanze stammt. Sie hat im Gegensatz zu der Infektionsschlauchmembran keine Zellwand. Bei nicht-determiniertem Knöllchen, z.B. von *Medicago*, wird ein einzelnes Rhizobium von der Peribakteroidmembran umgeben. Das Bakterium zusammen mit der umgebenden Membran wird als Bakteroid bezeichnet. Gleich nach der Entlassung beginnen die Bakterioide sich zu teilen, zu wachsen und zu differenzieren.

Die Aufnahmen in Abbildung 30 zeigen, dass jedes Bakteroid von einer Membran umhüllt war. An diesen Membranen war MsRab11F-GFP lokalisiert, wie sich durch Nachweis mittels des Systems aus peptidspezifischem Anti-MsRab11F1-Antikörper und Alexa647-konjugiertem anti-Rabbit-Antikörper zeigte (siehe Abb. 4-38 C Pfeile). Bei quer geschnittenen Bakteroiden konnte die MsRab11F-GFP markierte Membran um das Bakterium herum eindeutig beobachtet werden (siehe Abb. 4-38 C Pfeil). Einige der MsRab11F-markierten Membranen fusionierten miteinander und bildeten eine große blasenförmige Struktur (siehe Abb. 4-38 F, Pfeil), wie sich auch während der Infektion der Wirtszellen am Infektionströpfchen vermehrt auftraten (siehe Abschnitt 4.5.3.4). In den jungen infizierten Zellen waren die Bakterioide unterschiedlich groß. Manche waren 1 µm klein und stäbchenförmig. Die älteren, differenzierten Bakterioide aber hatten schon eine Länge von ca. 5 µm erreicht (siehe Abb. 4-38 I). Das bedeutet sie waren fünfmal größer als ihre bakterielle Ausgangsform. Einige von ihnen befanden sich gerade im Prozess der Teilung hatten eine verzweigte oder Y-förmige Gestalt (siehe Abb. 4-38 G-I). Die frisch infizierten Wirtszellen waren noch nicht vollständig von Bakteroiden gefüllt.

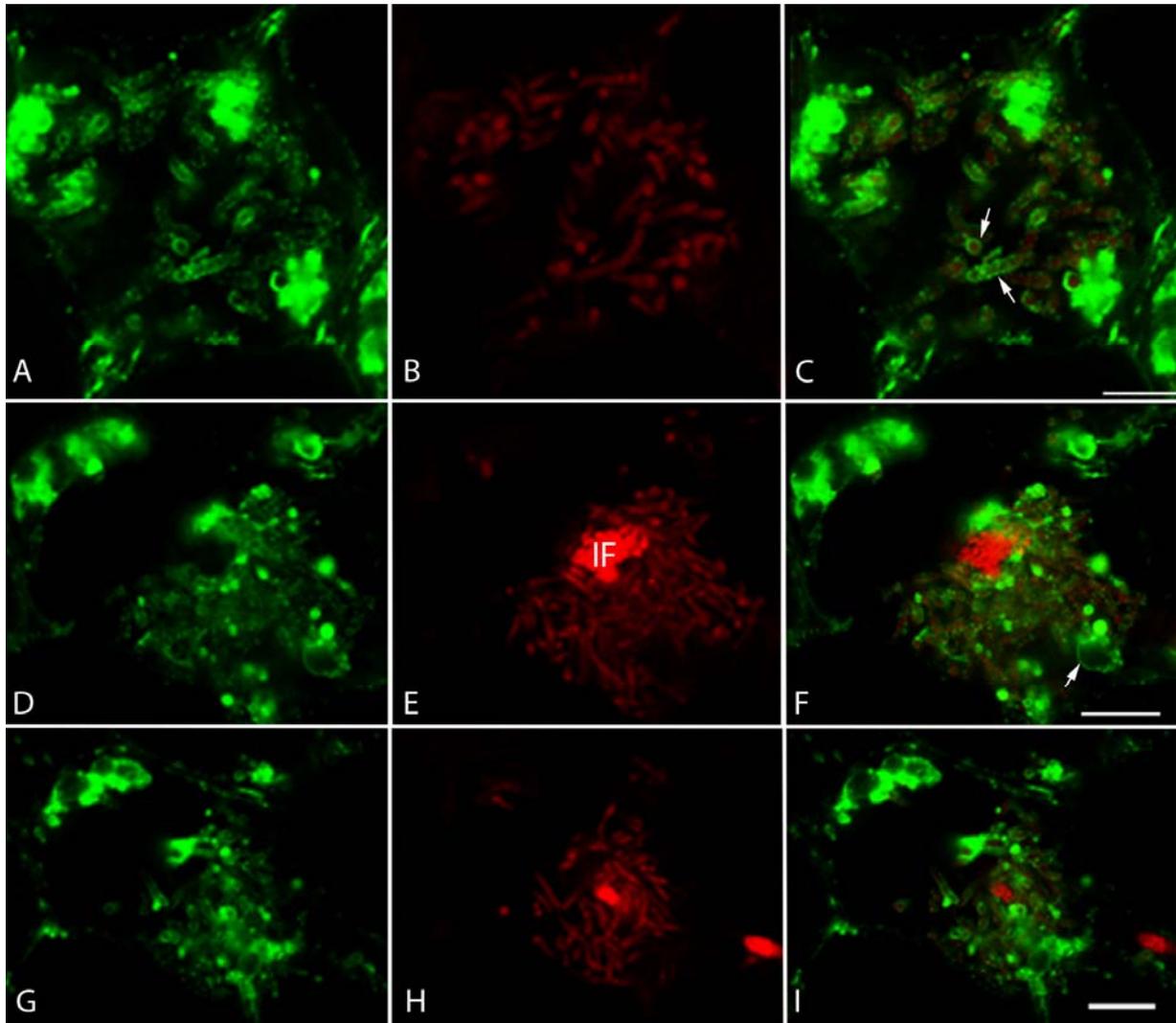


Abb. 4-38: Lokalisierung von MsRab11F in jungen infizierten Zellen. (A-C) Die infizierten Zellen enthalten viele Bakterien, die von einer Membran umschlossen sind, die von MsRab11F:GFP markiert ist. (D-F) In der Mitte der Zelle befindet sich ein Infektionsschlauch (IF), der die Bakterien zum Teil bereits entlassen hat. Die Bakterien sind von einer Membran pflanzlichen Ursprungs umschlossen, an der MsRab11F:GFP lokalisiert. Die durch MsRab11F:GFP markierten Membranen bilden teilweise große bläschenförmige Strukturen (F, Pfeil). (G-I) Die Bakterien differenzieren sich weiter zu Bakteroiden und teilen sich. Während der Teilung nehmen sie eine verzweigte oder Y-förmige Gestalt an. Maßstab: A-C = 7,5 μ m, D-F = 10 μ m.

Zur Kontrolle wurde die Lokalisierung von MsRab11F in Wildtypknöllchen untersucht. Die Lokalisierung von MsRab11F in *M. sativa* Wildtypknöllchen zeigte keine Unterschiede zur Lokalisierung des GFP-markierten Proteins in transgenen Knöllchen. Der Anti-MsRab11F-Antikörper markierte wieder kleine Strukturen, die um den Infektionsschlauch und die Bakterioide herum akkumulierten. Die Bakterioide waren in jungen infizierten Zellen von einer Membran umschlossen, an der MsRab11F detektiert werden konnte. Bei reifen infizierten Zellen zeigte sich, wie im Abschnitt 4.5.3.6, keine Markierung.

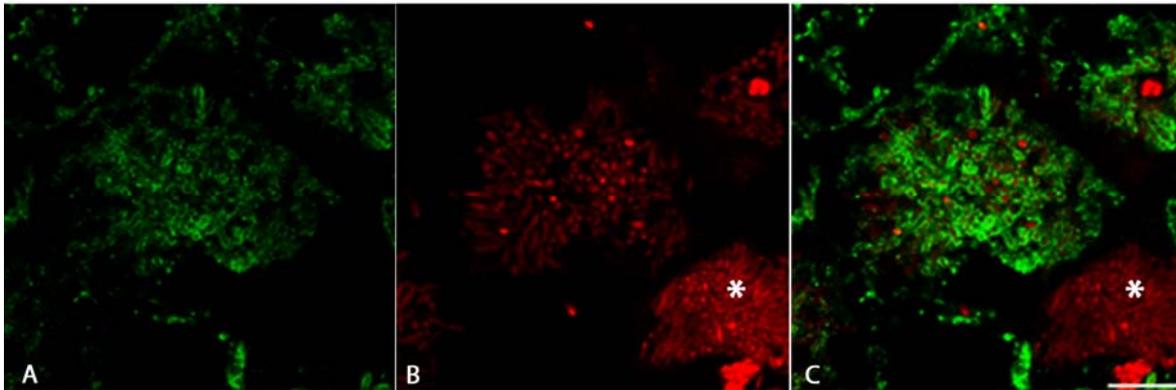


Abb. 4-39: Lokalisierung von MsRab11F in Wildtypknöllchen von *M. sativa*. (A) Immunologischer Nachweis von MsRab11F. (B) mRFP1 Fluoreszenz der Bakteriode. (C) Overlay aus den Bildern A und B. MsRab11F lokalisiert in jungen infizierten Zellen an der Persibakteroidmembran. In reifen infizierten Zellen hingegen lässt sich MsRab11F nicht an der Peribakteroidmembran nachweisen (Stern). Maßstab = 10 μ m

Um zu untersuchen, ob der Anti-MsRab11F-Antikörper ein Homolog von MsRab11F in *M. truncatula* erkennt, wurde ein immunocytochemischer Nachweis mit denselben Antikörpern im Abschnitt 4.5.3 an Wildtypknöllchen geführt. Dabei zeigte sich keine Veränderung der Lokalisierung von MsRab11F im Vergleich zu *M. sativa* Wildtypknöllchen. Der Antikörper markierte auch hier kleine punktförmige Strukturen, die am Infektionsschlauch und der Peribakteroidmembran akkumulierten.

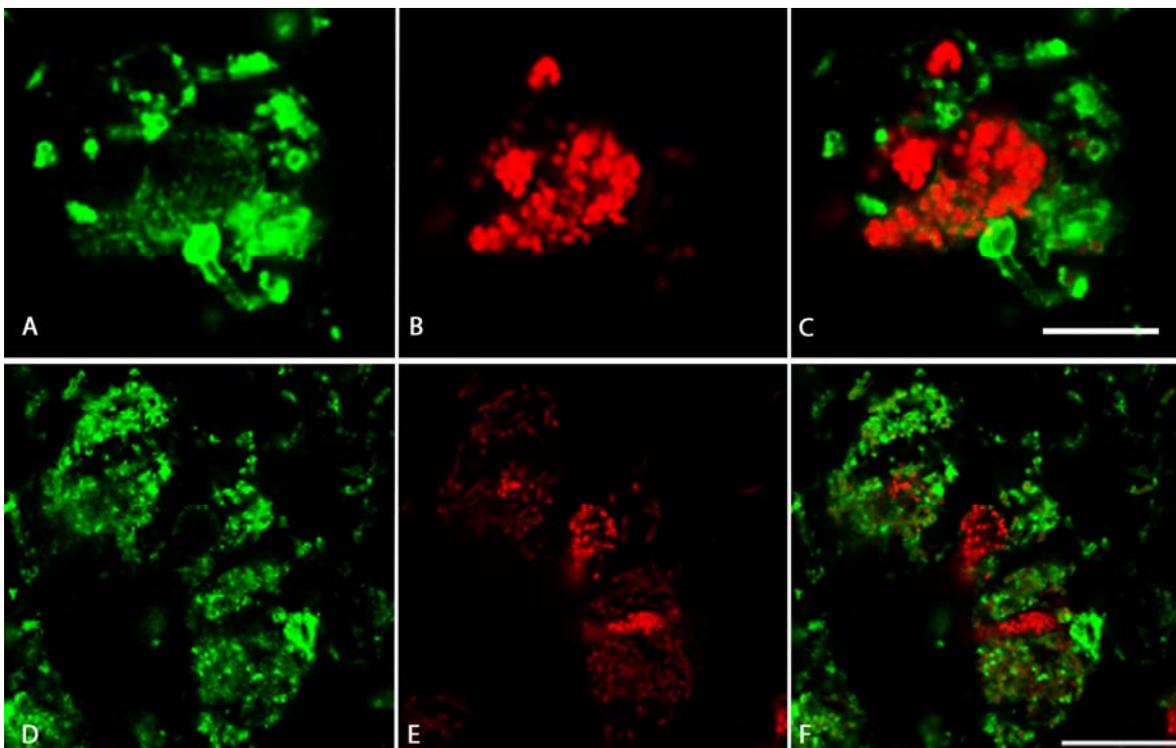


Abb. 4-40: Lokalisierung von MsRab11F in *M. truncatula* Wildtypknöllchen . Das Knöllchen wurde wie in Kapitel beschrieben, immunologisch mittels des anti-MsRab11F1 Antikörpers und anti-Rabbit-Alexa647 Antikörpers

untersucht. Die Rhizobien exprimierten mRFP, das direkt bei 532 nm angeregt wurde. (a-c) Der MsRab11F Antikörper markierte Strukturen, die um das Infektionströpfchen und die gerade aufgenommenen Bakterioide akkumulierten. Mehrere grüne Ringe sind erkennbar (Pfeilkopf). (d-f) Die markierten punktförmigen Strukturen akkumulierten um die Bakterioide. Maßstab (A-C) = 10 μm , (D-F) = 25 μm

4.5.3.6 Während der Differenzierung der infizierten Zellen nimmt die Menge an MsRab11F:GFP markierten Strukturen ab.

Gleichzeitig mit der Vermehrung der Bakterioide nimmt die Größe der Wirtszellen zu. Ihre Chromosomenanzahl verdoppelt sich mehrfach, wobei sich die Zellen nicht teilen und dadurch polyploid werden. Die zahlreichen, kleinen Vakuolen fusionieren zu wenigen, größeren Einheiten. Die Bakterioide vergrößern sich bis sie eine Länge von 8-10 μm erreicht haben und füllen die Wirtszellen mehr oder weniger komplett aus. Während dieser Prozesse entwickeln sich junge infizierte Zellen zu stickstofffixierenden reifen Zellen der Fixierungszone (III).

Im Zuge der fortschreitenden Entwicklung zu reifen, stickstofffixierenden Zellen sank die Menge an MsRab11F:GFP markierten Strukturen zunehmend immer weiter ab. Abb. 4-41 A-C zeigt eine Zelle, die noch nicht komplett mit Bakteroiden ausgefüllt ist. Zwischen den Bakteroiden befanden sich zahlreich kleine mit MsRab11F:GFP markierten Strukturen. Einige der Bakteroiden waren von einer Membran umgeben, die mit dem Protein markiert war, während bei anderen keine umgebende Membran detektiert werden konnte. Im Zuge der fortschreitenden Reifung der Wirtszellen, die später komplett mit Bakteroiden ausgefüllt waren, nahm die Menge an MsRab11F:GFP markierten Strukturen zunehmend weiter ab. Abb. 4-41 D-F zeigt eine reife stickstofffixierende Zelle. In der Zelle waren zwar noch einige markierte Strukturen zwischen den Bakteroiden zu sehen, die Bakteroiden selbst allerdings waren zum Großteil nicht mehr von markierten Membranen umgeben.

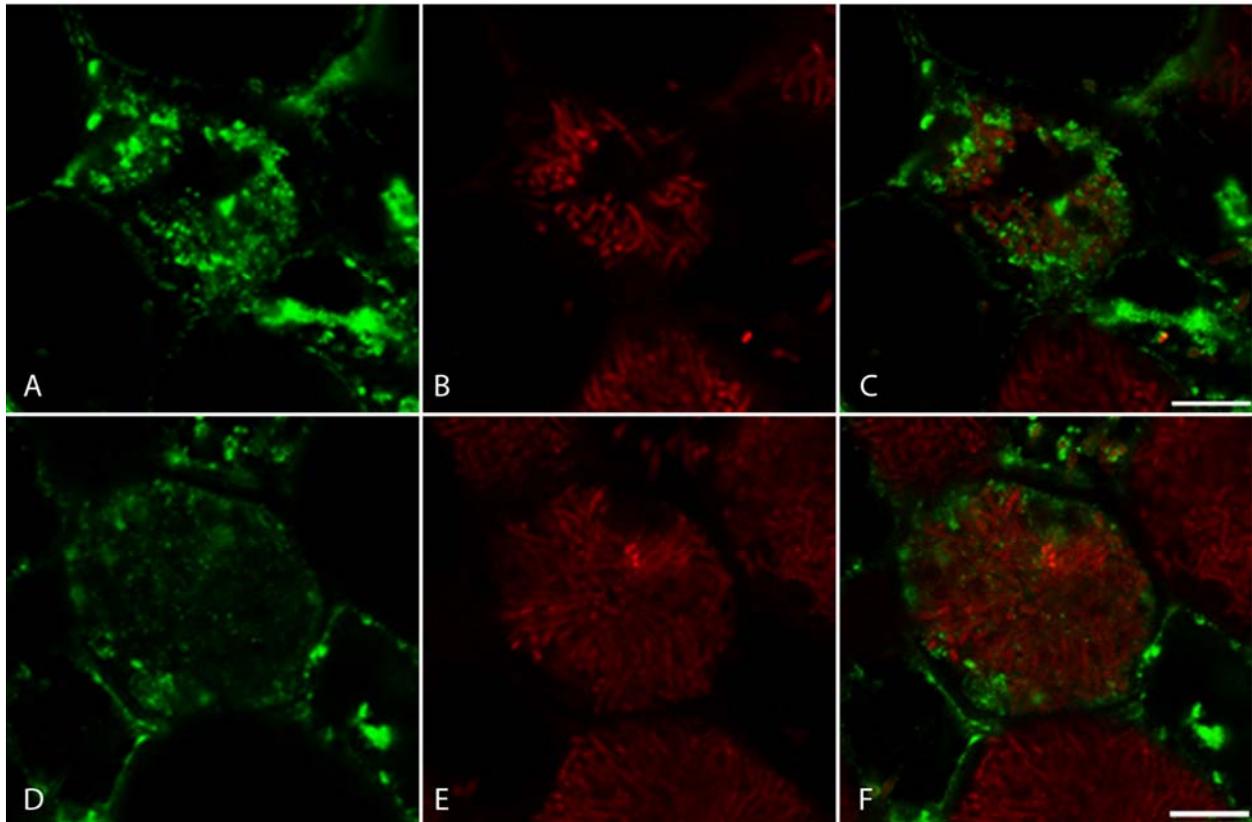


Abb. 4-41: Lokalisierung von MsRab11F:GFP in infizierten Zellen. (A-C) Wirtzelle, die zur Hälfte mit Bakteroiden gefüllt ist. Es sind zahlreiche kleine punktförmige Strukturen zu sehen, die durch MsRab11F:GFP markiert sind. Ein Teil der Bakterioide ist von einer Membran umgeben, die durch MsRab11F markiert ist. (D-F) Wirtzelle, die fast komplett im Bakteroiden gefüllt ist. Zwischen den Bakteroiden befinden sich kleine, durch MsRab11F:GFP markierte Strukturen. Die Bakteroiden selbst sind zum größten Teil nicht mehr von einer durch MsRab11F:GFP markierten Membran umgeben.

4.5.3.7 Reife infizierte Zellen enthalten kein MsRab11F:GFP.

Die Stickstofffixierungszone (III) besteht aus Zellen, die sich in verschiedenen Stadien der Symbiose befinden. Neben voll differenzierten, stickstofffixierenden Zellen, die komplett mit Bakteroiden ausgefüllt sind, finden sich auch nicht-infizierte Zellen und infizierte Zellen, die sich auf dem Weg der Entwicklung hin zu reifen infizierten Zellen befinden. Darüber hinaus wachsen auch Infektionsschläuche in die Zone ein, die in bislang noch nicht-infizierte Zellen eindringen können und sie infizieren.

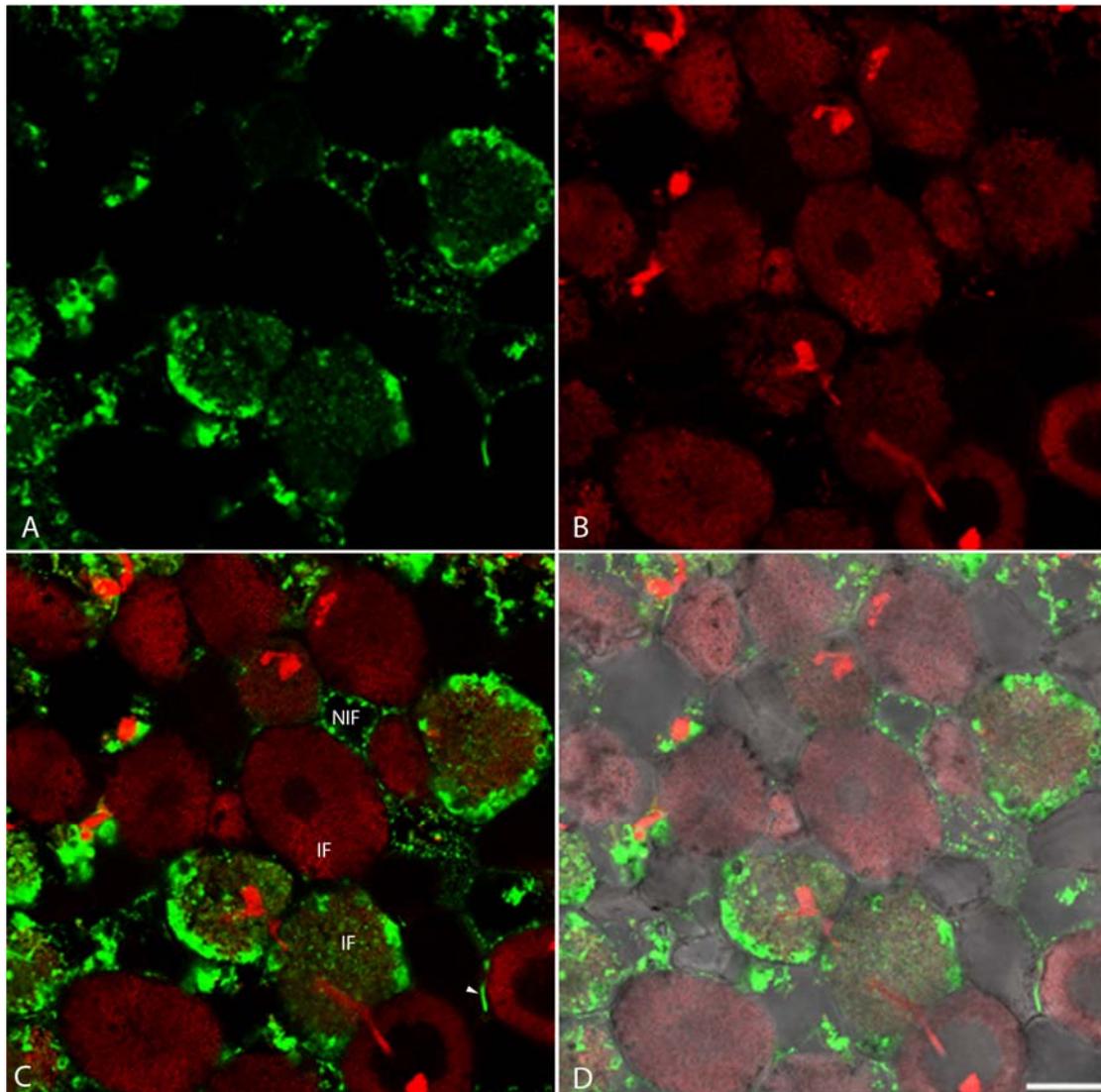


Abb. 4-42: Lokalisierung von MsRab11F:GFP in Zellen der Stickstofffixierungszone. (A-D) In der Stickstofffixierungszone kommen Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung vor. Neben nicht-infizierten Zellen (NIF), bei denen kleine punktförmige, etwa 1 μm große durch MsRab11F markierte Strukturen im Cytoplasma lokalisiert sind, gibt es infizierte Zellen (IZ), in denen sich noch MsRab11F:GFP markierte Strukturen befinden und reife infizierte Zellen (rIZ), die vollständig mit Bakteroiden ausgefüllt sind und in denen kein MsRab11F:GFP mehr lokalisiert werden kann. Ein Teil der Zellen ist von Infektionsschläuchen (IS) durchzogen, die mit Rhizobien gefüllt sind, die noch nicht-infizierte Zellen infizieren können.

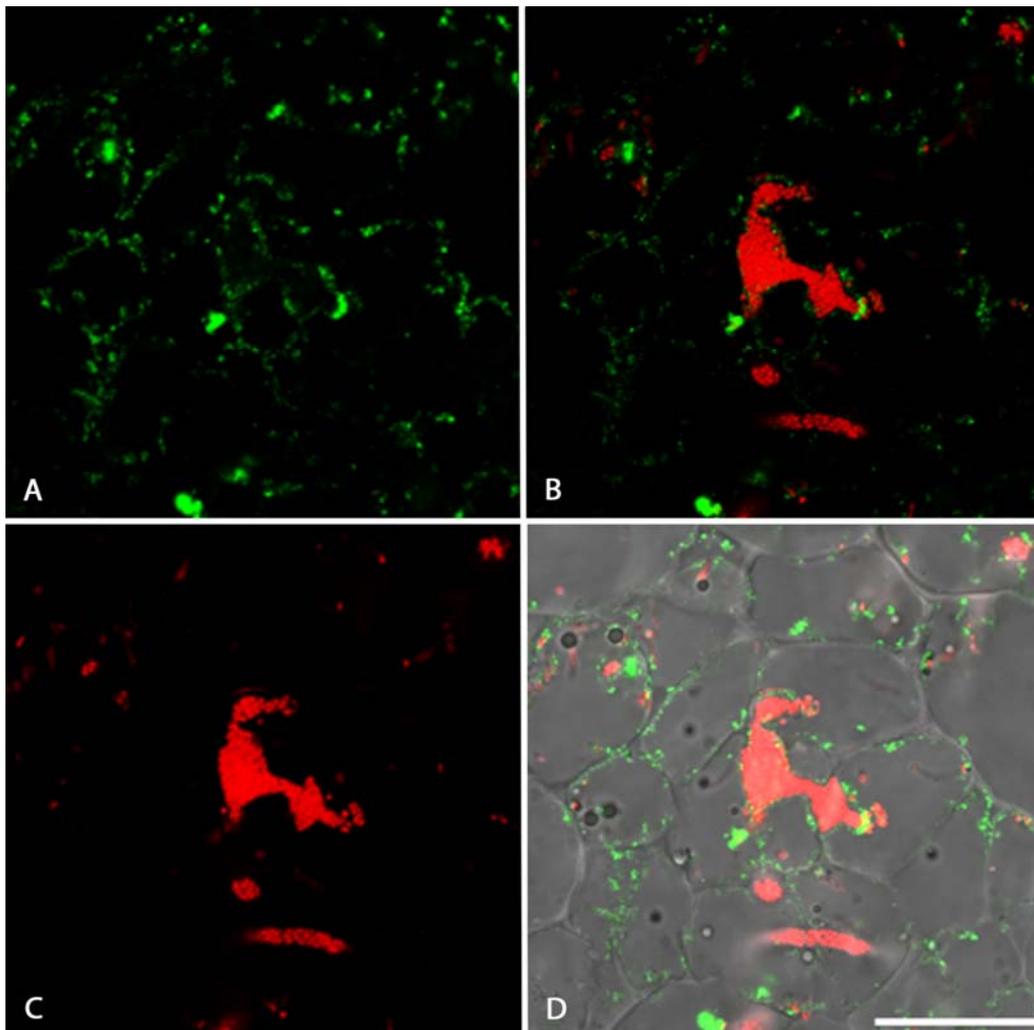
In den Aufnahmen der Stickstofffixierungszone konnte man gut die sich verschiedenen Stadien der Infektion befindenden Zellen sehen. In der Zone waren Infektionsschläuche, infizierte Zellen und nichtinfizierte Zellen gut sehen. Die nicht-infizierte Zellen enthielten viele kleine punktförmige Strukturen, die durch MsRab11F:GFP markiert waren und sich wahllos im Cytoplasma verteilten (siehe Abb. 4-42 A). Die Strukturen besaßen eine Größe von etwa 1 μm und entsprachen damit morphologisch denen in normalen Wurzelzellen detektierten grün fluoreszierenden Strukturen (siehe

Abschnitt 4.4.2). Bei jungen infizierten Zellen, konnten zwischen den Bakteroiden eine Vielzahl von Strukturen beobachtet werden, an die MsRab11F:GFP gebunden war. Interessanterweise waren die durch MsRab11F markierten Strukturen in den infizierten Zellen kleiner als in den nicht-infizierten Zellen. Ihre Größe betrug nur etwa 0,5 μm . Darüber hinaus war an vielen Bakteroiden kein MsRab11F zu detektieren. Nur in wenigen Fällen waren die Bakterioide von einer Membran umgeben, an die MsRab11F gebunden war. Überraschenderweise waren in reifen infizierten Zellen gar keine MsRab11F-markierten Strukturen mehr zu sehen (siehe Abb. 4-42 C). Keines der Bakterioide war mehr von einer Membran umgeben, die durch MsRab11F markiert war.

4.5.3.8 Kontrolluntersuchung der Lokalisierung des MsRab11F:GFP in *M. truncatula* transgenen Wurzeln mittels Anti-GFP-Antikörper

Um die Expression des MsRab11F:GFP unter der Kontrolle des 35S Promotors zu untersuchen, wurde ein Anti-GFP-Antikörper verwendet. Als Primäantikörper wurde ein Anti-GFP-Antikörper aus Kaninchen und als Sekundäantikörper ein Alexa647-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Der Alexa-Farbstoff wurde bei 635 nm angeregt und bei 660-700 nm detektiert, mRFP1 wurde bei 532 nm angeregt und bei 570-620 nm nachgewiesen.

Unter Verwendung des anti-GFP Antikörpers wurden vergleichbare Strukturen markiert bei Verwendung des peptidspezifischen MsRab11F Antikörpers. Der Anti-GFP-Antikörper detektierte die Strukturen, die um den Infektionsschlauch und die Bakterioide akkumulierten. Insgesamt war die Anzahl an markierten Strukturen allerdings geringer als bei Verwendung des MsRab11F Antikörpers.



Lokalisierung von MsRab11F:GFP in transgenen *M. truncatula* Knöllchen. Das Knöllchen wurde wie in Kapitel 0 beschrieben, immunologisch mittels des anti-GFP-Antikörpers und anti-Rabbit-Alexa647 Antikörpers inkubiert, bakteriell exprimiertes mRFP1 wurde direkt bei 532 nm angeregt. (A-C) Der MsRab11F-Antikörper markierte Strukturen, die um das Infektionströpfchen und die gerade aufgenommenen Bakterioide akkumulierten. Maßstab =25 μ m

4.5.4 Rolle von MsRab11F während des Infektionsprozesses.

Im Infektionsschlauch liegen die Rhizobien dicht gedrängt vor und sind von einer Matrix aus Glykoproteinen, den sogenannten Root Nodule Extensinen (RNEs) umgeben (Rathbun et al., 2002). Die Leguminosen-spezifischen RNEs enthalten wechselnde, sich wiederholende Sequenzen, die charakteristisch für Extensine und Arabinogalactan-Proteine (AGP) sind. Wegen ihres hohen Kohlenhydratgehalts sind die RNE-Proteine löslicher als andere Extensinproteine. Unter oxidativen Bedingungen, z.B. durch Wasserstoffperoxid, werden die RNE-Proteine vernetzt und werden unlöslich.

In den vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass a) die Infektionsschläuche von Strukturen umgeben sind, die durch MsRab11F markiert sind und b) dass Rhizobien aus dem Infektionsschlauch in das Cytoplasma der Wirtszellen entlassen und dann von einer pflanzlichen Ursprungs Membran umgeben werden, die durch MsRab11F1 markiert ist. Um die Bedeutung dieser Lokalisierungsmuster von MsRab11F während des Infektionsprozesses näher zu beleuchten, wurden in den folgenden Versuchen Kolokalisierungen mit dem monoklonalen Antikörper MAC265 gemacht. MAC265 wurde ursprünglich aus Immunisierungen gegen Präparationen aus Rhizobien-induzierten Wurzelknöllchen bei Erbsen gewonnen (Vandenbosch et al., 1989) und detektiert spezifisch die löslichen Glykoproteine der Infektionsschlauchmatrix.

4.5.4.1 Lokalisierung der Root Nodule Extensine im Infektionsschlauch.

Zur Untersuchung der Kolokalisierung von MAC265 mit *S. meliloti* in Infektionsschläuchen wurden *M. sativa* Wurzeln mit mRFP1 markierten Rhizobien inokuliert. Nach 4-6 Wochen wurden von den entsprechenden Knöllchen fixierte Dünnschnitte angefertigt und für Immunlokalisierungen eingesetzt. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Antikörper MAC265 und als Sekundärantikörper ein Alexa488-konjugierter anti-Ratten-Antikörper verwendet. Der Alexa-Farbstoff wurde bei 488 nm angeregt und bei 500-530 nm detektiert, das mRFP1 der Rhizobien wurde bei 532 nm angeregt und bei 570-610 nm nachgewiesen.

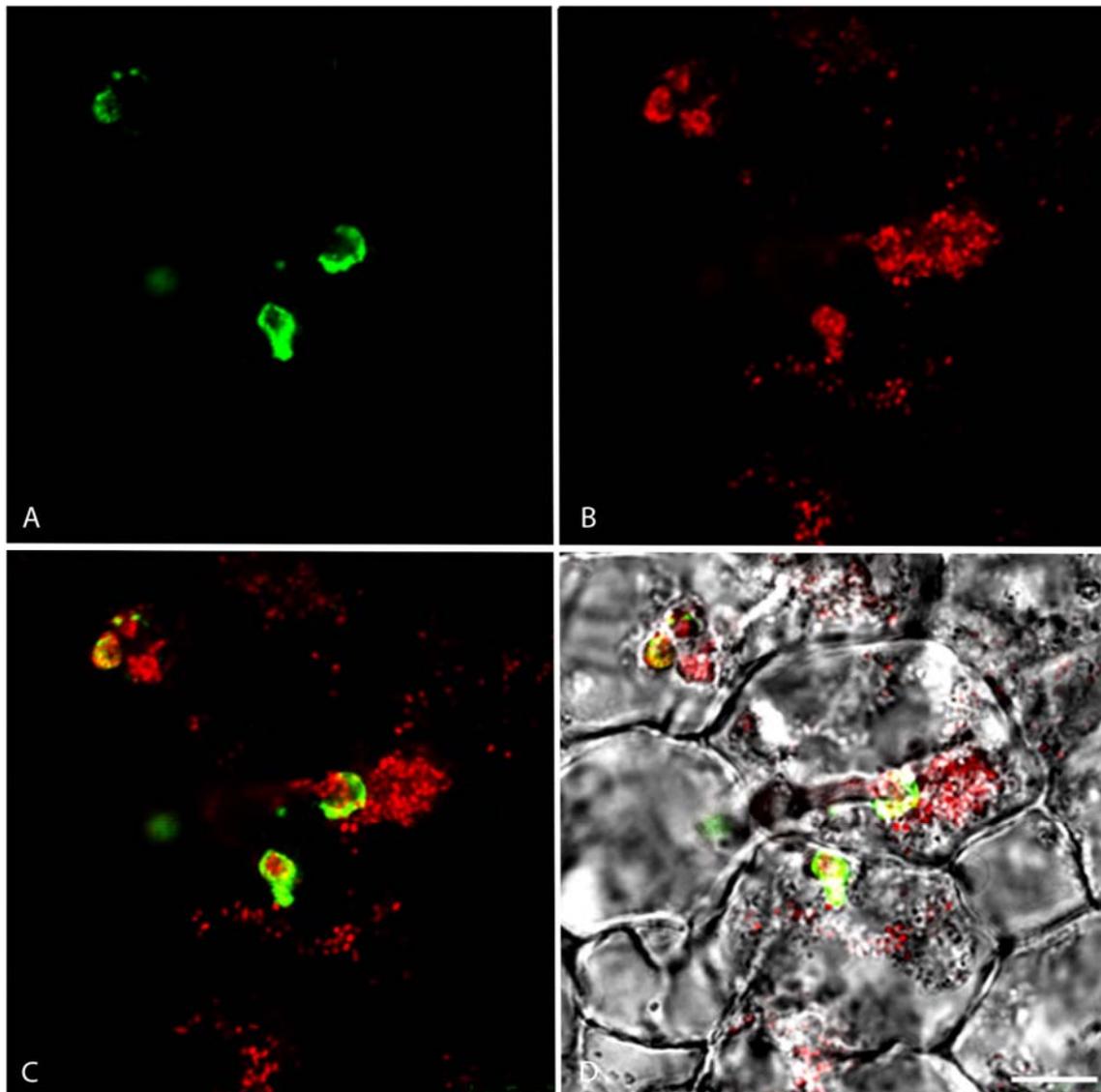


Abb. 4-43: Immunolokalisierung von Root Nodule Extensinen (RNEs) im Infektionsschlauch. Als Primärantikörper wurde der monoklonale MAC265 Antikörper (1:20), als Sekundärantikörper ein Alexa488-konjugierter Anti-Ratten-Antikörper verwendet (1:100). (A) Lokalisierung der Root Nodule Extensine (B) Lokalisierung der mRFP1-markierten Rhizobien. (C) Überlagerung der Bilder A und B (D) Überlagerung der Bilder A und B mit der Durchlichtaufnahme. Maßstab = 10 μ m

Abbildung 33 zeigt einen Infektionsschlauch, der in eine Wirtszelle eingedrungen ist und Bakterien in das Cytoplasma der Wirtszellen entlassen hat. Der MAC265-Antikörper markierte die Matrixproteine an der Spitze des Infektionsschlauchs und am Übergang zum Infektionströpfchen. Die rot markierten Rhizobien waren dort in die Matrix der Root Nodule Extensine eingebettet (siehe Abb. 4-43 C). Die Matrixproteine formten dabei keine spezifische Struktur, sondern füllten den Raum zwischen den Rhizobien komplett aus. Es wurden nur Matrixmatrixproteine in der Nähe der Infektionsschlauchspitze durch den MAC265-Antikörper markiert. Schon wenige μ m hinter der Spitze, in älteren Teilen der

Infektionsschläuche war keine Markierung zu detektieren. Genauso waren die ins Cytoplasma entlassenen Rhizobien nicht durch MAC265 markiert (siehe Abb. 4-43 C und D).

Als negative Kontrollen wurden Knöllchenschnitte nur mit dem MAC265 Antikörper bzw. dem Alexa488-konjugierten Sekundäntikörper inkubiert. Dabei konnte keine unspezifischen Signale detektiert werden.

4.5.4.2 Kolokalisierung von Root Nodule Extensinen und MsRab11F im Infektionsschlauch.

Zur Überprüfung, ob MsRab11F, Matrixproteine und Rhizobien in Wurzelknöllchen kolokalisieren, wurden Doppel-Immunlokalisierungen durchgeführt. *M. sativa* Wurzeln wurden mit mRFP1 markierten Rhizobien inokuliert, nach 4-6 Wochen von den entsprechenden Knöllchen fixierte Dünnschnitte angefertigt und für die Immunlokalisierungen eingesetzt. Als Primäntikörper wurden der monoklonale Antikörper MAC265 und der polyklonale MsRab11F-Antikörper verwendet. Als Sekundäntikörper wurden der Alexa488 konjugierte anti-Ratten-Antikörper und der Alexa647 konjugierte anti-Rabbit Antikörper eingesetzt. Der Alexa488 Farbstoff wurde bei 488 nm angeregt und bei 500-530 nm detektiert, der Alexa647 Farbstoff wurde bei 635 nm angeregt und bei 660-700 nm gemessen und das von den Rhizobien exprimierte mRFP1 bei 532 nm angeregt und bei 570-610 nm nachgewiesen. Die Fluoreszenz der Farbstoffe und der Bakterien ist in den folgenden Abbildungen in grün (MsRab11F), rot (Matrixproteine) und blau (mRFP1) dargestellt.

MsRab11F lokalisierte in größeren Strukturen, die den Infektionsschlauch kurz vor dem Infektionströpfchen teilweise umgaben (siehe Abb.4-43 E), an zahlreichen kleineren Strukturen im Infektionströpfchen (siehe Abb.4-40 E) und an der Spitze von Infektionsschläuchen (siehe Abb.4-43A). Die Rhizobien füllten die Infektionsschläuche (siehe Abb.4-43 C und G) und das Infektionströpfchen, das als größere ovale Struktur sichtbar war (siehe Abb.4-43 G). Im Gegensatz zu der Situation in Abbildung 4.33 waren die Bakterien noch nicht in das Cytoplasma der Wirtszelle entlassen worden, sondern lagen im intakten Infektionströpfchen vor. Interessanterweise waren die Infektionsschläuche nicht gleichmäßig mit Rhizobien gefüllt. Es konnten Bereiche mit hoher Bakteriendichte und bakterienfreie Regionen detektiert werden (siehe Abb.4-43 H Pfeile). In den Abschnitten kurz hinter der Spitze des Infektionsschlauchs und im Infektionströpfchen konnten mittels des MAC265 Antiköpers Matrixproteine lokalisiert werden (siehe Abb.4-43 B und F). In den überlagerten Bildern wurde deutlich, dass die Matrixproteine die Rhizobien im Infektionsschlauch umgaben. Dabei konnte zwischen Zonen mit hoher Bakteriendichte und hoher Dichte an Proteinen unterschieden werden (siehe Abb.4-43 D). Die Matrixproteine konzentrierten sich insbesondere in den Zwischenräumen zwischen den bakterienreichen Zonen. Auch im Infektionströpfchen waren die Rhizobien von den

Matrixproteinen umgeben. Insgesamt lagen die Bakterien hier aufgelockerter als im Infektionsschlauch vor und es war gut zu sehen, dass die Matrixproteine sich in den Zwischenräumen zwischen den einzelnen Bakterien konzentrierten (siehe Abb.4-43 H). MsRab11F war ebenfalls am Infektionströpfchen lokalisiert. Die Konzentration des Proteins war hier allerdings deutlich geringer als in den Strukturen, die sich um den Infektionsschlauch herum angelagert hatten. In den überlagerten Aufnahmen des Infektionsschlauches in Abb.4-43 D konnte MsRab11f an der Spitze des Schlauchs lokalisiert werden. Hier kam es zu einer Kolokalisierung mit den vom Antikörper MAC265 detektierten Matrixproteinen (Pfeilspitze).

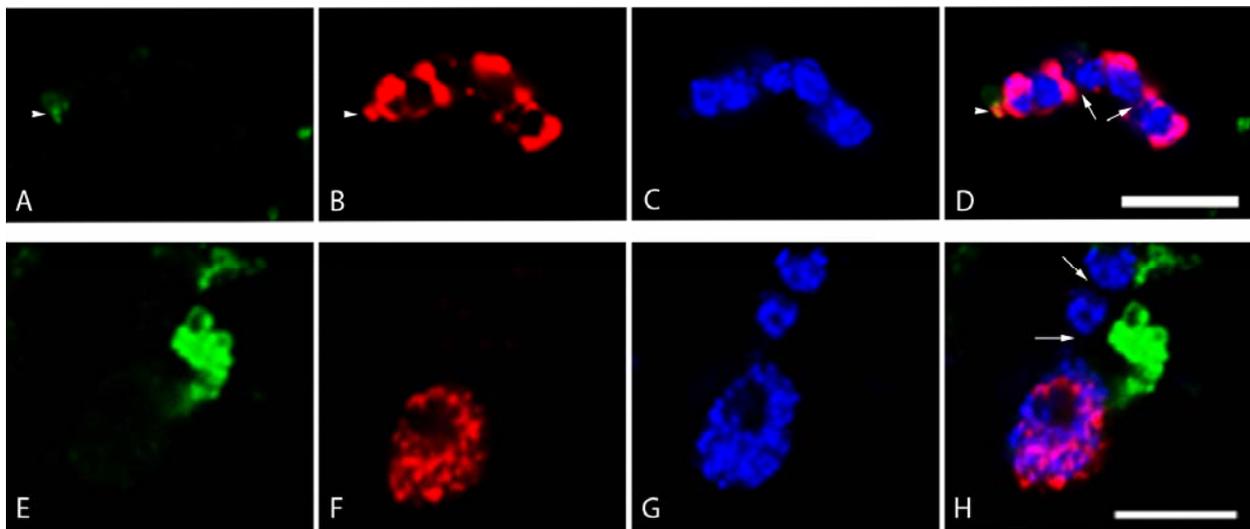


Abb. 4-44: Lokalisierung von MsRab11F, Matrixproteinen und Rhizobien in *M. sativa* Knöllchenzellen. Als Primärantikörper wurden ein monoklonaler MAC265-(1:20) und polyklonaler MsRab11F-Antikörper (1:20), als Sekundärantikörper ein Alexa488 konjugierter Anti-Ratten-Antikörper (1:100) und Alexa647 konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:100) verwendet. Die Kombination aus MAC265- und Alexa488-Antikörper markierte Root Nodule Extensine, die Kombination aus MsRab11F und Alexa647 Antikörper das kleine G-Protein MsRab11F. Die Rhizobien waren durch mRFPI markiert, das direkt angeregt werden konnte. Die Fluoreszenzen sind in den Farben grün (MsRab11F), rot (Matrixproteine) und blau (Rhizobien) dargestellt.

Rhizobien an der Infektionsschlauchspitze sind von Matrix aus Root Nodule Extensinen umschlossen (H). In älteren Abschnitten des Infektionsschlauches können nur Rhizobien detektiert werden, eine Kolokalisierung mit Matrixproteinen kann dort nicht nachgewiesen werden (H). Manche Stellen im Infektionsschlauch sind frei von Bakterium (D und H, Pfeile). MsRab11F ist an Strukturen lokalisiert, die den Infektionsschlauch teilweise umgeben (H). Direkt an der Infektionsschlauchspitze, der Entlassungsstelle der Rhizobien, kolokalisieren MsRab11F, Matrixproteine und Rhizobien (A und D, Pfeilkopf). (A) MsRab11F (B) *S. meliloti* (C) Matrixproteine (D) Überlagertes Bild aus A-C. Maßstab = 10µm

4.5.4.3 Kolokalisierung von Root Nodule Extensinen und Rhizobien während der Infektion von Wirtszellen.

Wie die Ergebnisse aus den Abschnitten 4.5.4.1 und 4.5.4.2 zeigten, sind die Rhizobien im Infektionströpfchen von Matrixproteinen umgebenen, während nach der Entlassung in das Cytoplasma

der Wirtzelle keine Matrixproteine mehr mit den Rhizobien assoziiert sind (siehe Abb. 4-434C). Um den Verbleib der Matrixproteine näher zu beleuchten, wurde die Lokalisierung von Rhizobien und Matrixproteinen in den Frühphasen der Entlassung der Bakterien untersucht. Wie im Abschnitt zuvor wurden MsRab11F und Matrixproteine über Antikörper detektiert und die Rhizobien anhand ihrer mRFP1-Fluoreszenz nachgewiesen. Die Fluoreszenz der Farbstoffe und der Bakterien ist in den folgenden Abbildungen in grün (MsRab11F), rot (Matrixproteine) und blau (mRFP1) dargestellt.

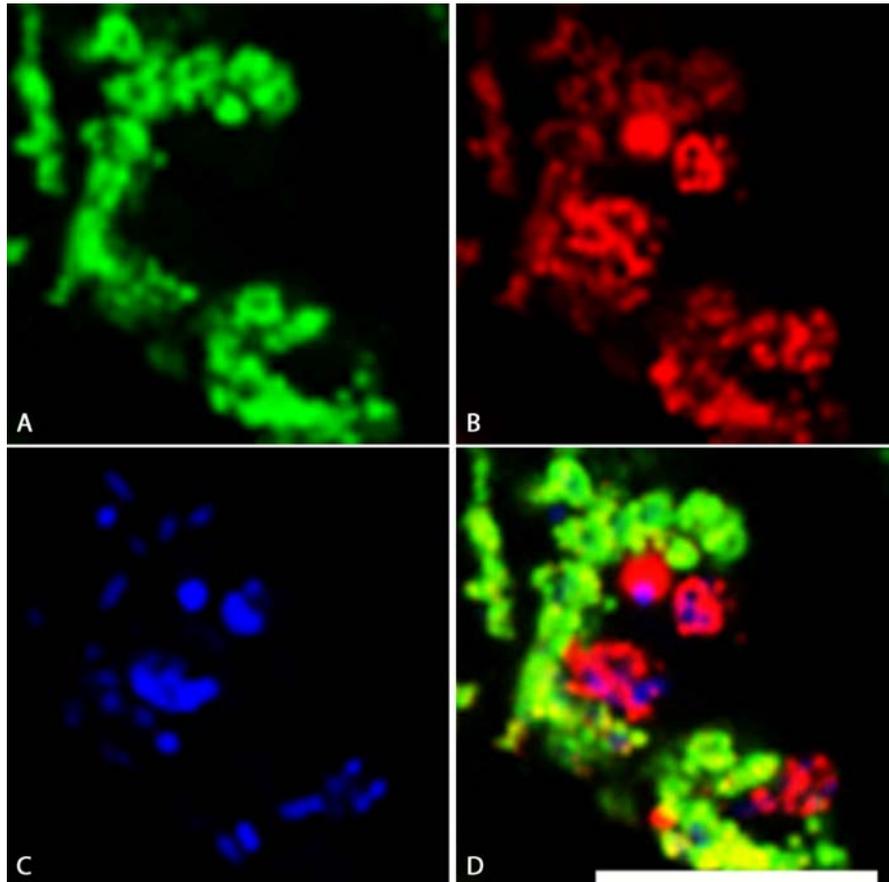


Abb. 4-45: Lokalisierung von MsRab11F, Matrixproteinen und Rhizobien während der Entlassung der Bakterien aus dem Infektionsschlauch. Als Primärantikörper wurden ein monoklonaler MAC265-(1:20) und polyklonaler MsRab11F-Antikörper (1:20), als Sekundäntikörper ein Alexa488 konjugierter Anti-Ratten-Antikörper (1:100) und Alexa647 konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:100) verwendet. Die Kombination aus MAC265- und Alexa488-Antikörper markierte Root Nodule Extensine, die Kombination aus MsRab11F und Alexa647 Antikörper das kleine G-Protein MsRab11F. Die Rhizobien waren durch mRFP1 markiert, das direkt angeregt werden konnte. Die Fluoreszenzen sind in den Farben grün (MsRab11F), rot (Matrixproteine) und blau (Rhizobien) dargestellt. A-D: Während der Entlassung der Rhizobien aus dem Infektionsschlauch sind diese von Matrixproteinen umhüllt. MsRab11F markiert Strukturen am Infektionsschlauch, während bei den entlassenen Aggregaten aus Bakterien und Matrixproteinen kein MsRab11F lokalisiert. Maßstab = 25 μ m.

Abb. 4-45A-D zeigt einen Infektionsschlauch, der in eine Wirtzelle eingedrungen war. Der Infektionsschlauch war fast vollständig von unregelmäßig geformten Strukturen umgeben, an die MsRab11F gebunden hatte. Gleichzeitig waren an mehreren Stellen an der Oberfläche des

Infektionsschlauchs kleine Aggregate von Rhizobien und Matrixproteinen lokalisiert, die aus dem Infektionsschlauch ins Cytoplasma entlassen wurden. An diesen Aggregaten war MsRab11F nicht lokalisiert.

4.5.4.4 Kolokalisierung von Root Nodule Extensinen und MsRab11F während der Reifung der Bakterioide

Um den Verbleib des RNEs in der späten Infektionsphase beziehungsweise in der Differenzierungsphase der Bakterioide zu untersuchen, wurden MsRab11F und RNEs wie im Abschnitt zuvor über Antikörper detektiert und die Rhizobien anhand ihrer mRFP1-Fluoreszenz nachgewiesen. Die Fluoreszenz der Farbstoffe und der Bakterioide ist in den folgenden Abbildungen in grün (MsRab11F), rot (Matrixproteine) und blau (mRFP1) dargestellt. Die Aufnahmen zeigen reife infizierte Zellen, die schon fast vollständig mit Bakteroiden gefüllt waren. Die Bakterien innerhalb des Infektionsschlauchs leuchteten viel stärker als die stickstofffixierenden Bakterioide, die sich im Cytoplasma befanden. Zur korrekten Faltung von mRFP ist Sauerstoff notwendig, der in den infizierten Zellen aufgrund des Leghämoglobins kaum zur Verfügung steht. Die Bakterioide umgebende Peribakteroidmembran war durch MsRab11F markiert. In reifen infizierten Zellen, die vollständig mit Bakteroiden gefüllt waren, war die Fluoreszenz des Anti-MsRab11F-Antikörpers markierte Strukturen nur noch sehr schwach zu erkennen. Hier konnten ebenfalls kein Root Nodule Extensine detektiert werden.

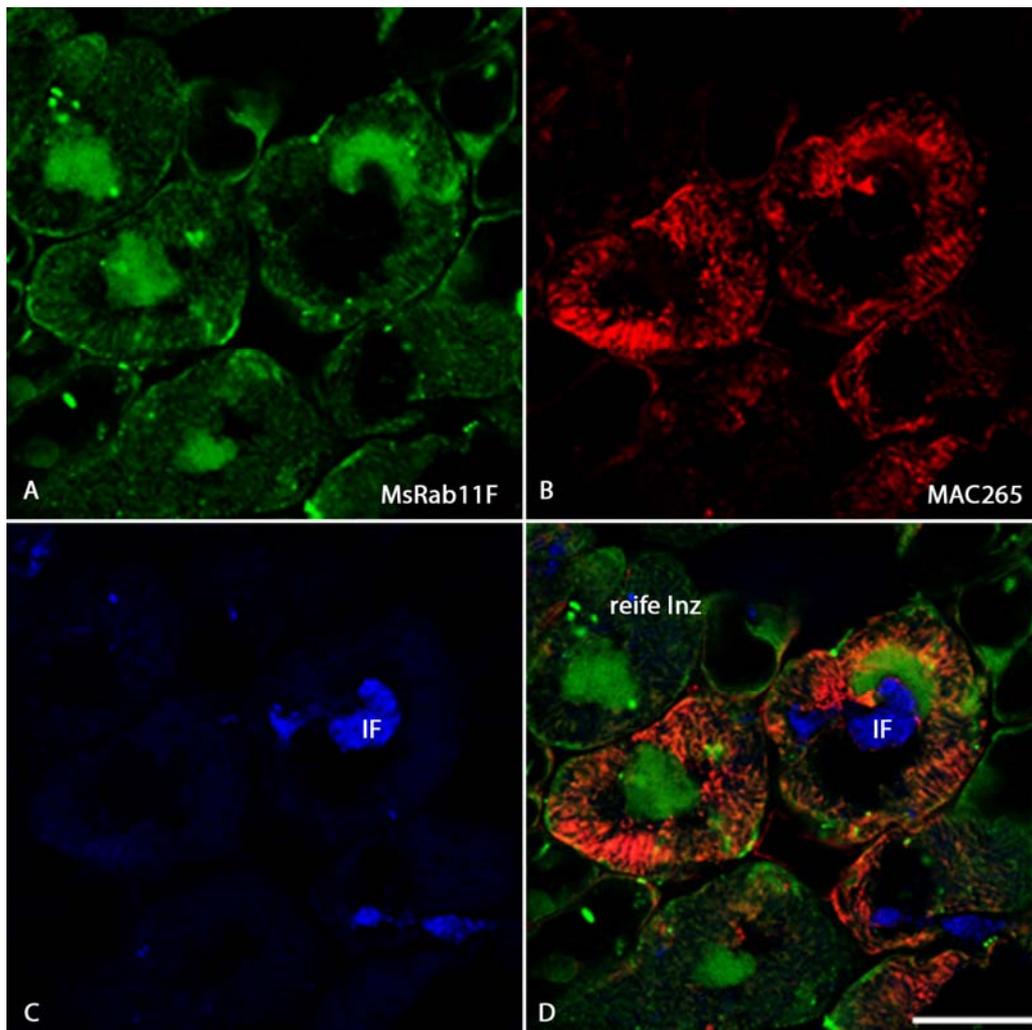


Abb. 4-46: Lokalisierung von MsRab11F, Matrixproteinen und Rhizobien in reifenden infizierten Zellen. Als Primärantikörper wurden ein monoklonaler MAC265-(1:20) und polyklonaler MsRab11F-Antikörper (1:20), als Sekundärantikörper ein Alexa488 konjugierter Anti-Ratten-Antikörper (1:100) und Alexa647 konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:100) verwendet. Die Kombination aus MAC265- und Alexa488-Antikörper markierte Root Nodule Extensine, die Kombination aus MsRab11F und Alexa647 Antikörper das kleine G-Protein MsRab11F. Die Rhizobien waren durch mRFP1 markiert, das direkt angeregt werden konnte. Die Fluoreszenzen sind in den Farben grün (MsRab11F), rot (Matrixproteine) und blau (Rhizobien) dargestellt.

A-D: Während der Differenzierung der Bakterioide in infizierten Zellen sind diese von Matrixproteinen (RNEs) und Membran umhüllt. Der Peribakteroidraum wird von den RNEs gefüllt. In reifen infizierten Zellen können nur noch schwach MsRab11F detektiert werden. Das RNE ist nicht beobachtbar. Hier sind nur noch die Bakterioide anhand ihrer schwachen mRFP Fluoreszenz nachweisbar. IF-Infektionsschlauch, Inz-Infizierte Zelle, Maßstab = 25 µm.

5 Diskussion

5.1 Strukturelle Analyse der kleinen G-Proteine *MtRab5b* und *MsRab11F*

5.1.1 **MtRab5B ist ein Homolog von Ara6 aus *M. truncatula***

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, konnte auf Basis der Sequenz von Ara6 eine Sequenz für MtRab5B aus *M. truncatula* identifiziert und aus cDNA-Banken amplifiziert werden. MtRab5B sollte in späteren Kollokalisierungsexperimenten mit MtRab11F verwendet werden.

Die Aminosäuresequenz von MtRab5B enthält die für kleine G-Proteine der Rab-Familie typischen hoch konservierten Sequenzen der Domänen G1 und G3-G5, die für die GTP-Bindung und -Hydrolyse verantwortlich sind. Genau wie für Ara6 konnte auch in MtRab5B das für Rab-Proteine ungewöhnliche N-terminale Motiv MGCX- identifiziert werden, an dem es sehr wahrscheinlich durch eine Myristoyl- und eine Palmitoyl-Isoprenylierung modifiziert wird. Beide Proteine haben fast exakt die gleiche Aminosäuresequenz in der C-terminalen Effektordomäne. MtRab5B zeigt also die gleichen konservierten Motive wie Ara6, die für die Funktion der beiden Proteine von entscheidender Bedeutung sind. Aufgrund der großen Übereinstimmungen zwischen den funktionellen Regionen von MtRab5B und Ara6, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit davon ausgegangen, dass MtRab5B ein Homolog von Ara6 aus *Medicago truncatula* ist. Ara6 wurde erstmals durch Ueda et al. (2001) beschrieben und ist recht gut charakterisiert. Ara6 ist in *Arabidopsis thaliana* an frühen Endosomen und der Plasmamembran lokalisiert und reguliert vermutlich die Fusion der endosomalen Kompartimente. Für das Protein MtRab5B wurde daher im Rahmen dieser Arbeit angenommen, dass es ebenfalls an den oben genannten Kompartimenten lokalisiert.

5.1.2 **MsRab11F**

Im Rahmen der Dissertation von Karin Schiene am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld wurde eine Sequenz für MsRab11F aus *Medicago sativa* Knöllchen isoliert. Gegen das Protein wurde ein polyklonaler peptidspezifischer Antikörper gegen die Sequenz ITNQRSLDAKMDETPIN-LSNGKEIH aus der hypervariablen C-terminalen Region generiert. Dieser Antikörper zeigte keine Reaktivität gegen andere monomere G-proteine der Rab und Rac-Unterfamilie, dies deutet darauf hin, dass die konservierten G-Boxen nicht vom Antikörper erkannt werden (Karin Schiene, Dissertation). Unter Verwendung des Antikörpers wurde MsRab11F mittels Western-Blot Analysen an Proteinextrakten aus *M. sativa* Wurzeln und Knöllchen untersucht und als knöllchenspezifisch induziert beschrieben. Gleichzeitig wurde aufgrund der Detektion von zwei Banden im Western-Blot die

Vermutung geäußert, dass es zwei Isoformen von Rab11F in *M. sativa* geben müsse (Schiene et al. 2004). Da die Lokalisierung von MsRab11F im Rahmen der Dissertation von K. Schiene nicht mehr untersucht werden konnte, war diese Fragestellung der Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Zur Lokalisierung von MsRab11F wurden eine entsprechende GFP-Fusion und der polyklonale Antikörper verwendet. Der Antikörper wurde vor Verwendung gereinigt und dann für Western-Blot Analysen an Proteinextrakten aus *Medicago truncatula* Wurzeln und Knöllchen eingesetzt. Dabei konnte ein Band entsprechend der Größe von MsRab11F in beiden Extrakten detektiert werden (siehe Abschnitt 4.5.3.1). Aus den Untersuchungen ergaben sich damit zwei bedeutende Unterschiede zu den Resultaten aus der Arbeit von K. Schiene. 1. Der Antikörper zeigte eine Kreuzreaktion mit einem entsprechenden Protein sowohl im Knöllchenextrakt als auch im Wurzelextrakt. MtRab11F ist also keineswegs nur in Knöllchengewebe zu finden. Aus der wissenschaftlichen Literatur ist darüber hinaus auch kein Hinweis bekannt, dass ein kleines G-Protein knöllchenspezifisch induziert würde oder dass es als ENOD beschrieben wurde. Auch wenn ein Unterschied in der Expression von Rab11F zwischen *M. sativa* und *M. truncatula* nicht vollständig ausgeschlossen ist, so ist es doch sehr unwahrscheinlich, dass das Protein nur knöllchenspezifisch induziert ist. 2. Mittels des Antikörpers konnte in beiden Extrakten nur jeweils eine spezifische Bande detektiert werden. Eine blastp-Analyse (Stand Dez. 2009) der zur Immunisierung verwendeten Aminosäuresequenz ergibt genau einen Treffer in der Datenbank für MsRab11F (Acc. Nr. CAG27070). Die nächst ähnliche Sequenz aus Sojabohne (Acc. Nr. ACU23574) weist nur 79% Identität zu dem Peptid auf. Auch der blastn-Vergleich der Nukleotidsequenz von MsRab11F führt nur zu einem Treffer (Acc. Nr. AJ697970) und einem Homolog aus *M. truncatula* (Acc. Nr. AC174277) in der Datenbank. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass es zwei Homologe von Rab11F in *M. sativa* oder *M. truncatula* gibt. Die Detektion von zwei Rab11F Isoformen in *M. sativa* könnte höchstens auf verschiedene Splicevarianten zurückzuführen sein. Acc. Nr. AC174277 ist ein BAC-Klon mit einer genomischen Sequenz aus *M. truncatula* und codiert ein Homolog von MsRab11F. Der codierende Bereich ist auf zwei Abschnitte verteilt (65553-65988, 96% Identität und 67153-67447, 91% Identität), die durch ein Intron unterbrochen sind. Auch wenn für *M. truncatula* im Western-Blot nur eine spezifische Bande nachgewiesen werden konnte, könnte es bei *M. sativa* eventuell zu alternativem Spleißen kommen, sollte die Sequenz von MsRab11F auch dort ein Intron besitzen. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit und der Dissertation von K. Schiene müssen sich an diesem Punkt also nicht widersprechen.

5.2 *MsRab11F* lokalisiert am trans-Golgi und an frühen Endosomen

5.2.1 Die Verteilung und das Bewegungsmuster von *MsRab11F* markierten Strukturen deuten auf eine Lokalisierung am Golgi hin

In dieser Arbeit wurde die Lokalisierung von *MsRab11F* in verschiedenen Systemen untersucht. Sowohl in Tabak BY2 Protoplasten, als auch in hairy root transformierten *M. truncatula* Wurzelzellen konnte das Protein vorwiegend an etwa 1 µm großen Strukturen lokalisiert werden, die sich zum Teil durch das Cytoplasma der Zellen bewegten. Phasen aktiver Strömung wechselten sich dabei mit Pausen ab, in denen die Strukturen an Ort und Stelle verharrten und sich nicht bewegten. Ähnliche Bewegungsmuster von Organellen wurde in den Arbeiten von Nebenführ et al. (1999) und Boevink et al. (1998) beschrieben. Nebenführ et al. (1999) hatten eine Fusion des Enzyms α -1,2-Mannosidase aus Sojabohne (*G. max*) mit GFP in Tabak Suspensionskulturzellen untersucht. Das Enzym lokalisiert in den cis-Zisternen von Golgi-Apparat und spielt eine Rolle bei der Prozessierung von N-glykosylierten Proteinen, indem es Mannose-Reste abspaltet. In fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen wurde das Konstrukt an Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 1 µm lokalisiert. Diese bewegten sich, wie es die Autoren nannten, in einem charakteristischen „stop and go“ Muster durch das Cytoplasma der Suspensionskulturzellen. Genau wie beim *MsRab11F*-Konstrukt konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Strukturen zu unterschiedlichen Zeiten mit verschiedenen Geschwindigkeiten durch das Cytoplasma strömten. Manche von Ihnen bewegten sich zu einem Zeitpunkt mit einer Geschwindigkeit von mehreren µm pro Sekunde sehr schnell um sich an einem anderen Zeitpunkt der Untersuchung wiederum nur sehr langsam oder gar nicht fortzubewegen. Vergleichbare Resultate wurden durch Boevink et al. (1998) für die Lokalisation einer Fusion der Signalsequenz für Sialyltransferase aus Ratte (STtmd-GFP) mit GFP in *Nicotiana clevelandii* Blattzellen beschrieben (Boevink et al. 1998). Die Signalsequenz des Proteins sorgt für den Import der Fusion in das ER und den Weitertransport in den Golgi. Anders als die α -1,2-Mannosidase lokalisiert das Fusionsprotein STtmd-GFP an den trans-Golgi Zisternen. Die markierten Golgi-Apparate zeigten hier ebenfalls ein alternierendes Muster aus Phasen der Bewegung, die sich mit Pausen abwechselten.

Neben den auffälligen Bewegungen konnte in hairy root transformierten *M. truncatula* Wurzelzellen ein charakteristisches Muster in der Verteilung der fluoreszenten Strukturen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen beobachtet werden. Während das Cytoplasma der meristematischen Zellen an der Wurzelspitze mit zahlreichen fluoreszenten Strukturen gefüllt war, war ihre Zahl hin in Richtung der älteren Teile der Wurzel, wo sich die Zellen bereits durch Streckungswachstum differenziert hatten, deutlich geringer. Die Anzahl an markierten Strukturen war also in den Zellen der

Wurzel am größten, die sich durch eine hohe sekretorische Aktivität bzw. durch eine hohe Teilungsaktivität auszeichnen. Pflanzen haben Regulationsmechanismen entwickelt die Zahl und subzelluläre Lokalisierung von Golgi-Apparat entsprechend den Bedürfnissen anzupassen (Iijima and Kono 1992). Zum Beispiel sind die Golgi-Apparate in Wurzelhaaren oder in Pollenschläuchen stets in der Nähe des Wachstumspols an der Spitze, an dem intensive Sekretion stattfindet, zu finden (Ridge 1988, Schnepf 1986, Sherrier and Vandenbosch 1994). Als weiteres Beispiel kommt es während der Mitose kommt es zu einer Assoziiation von Golgi-Zisternen um den Phragmoplasten herum (Couchy et al. 2003, Hepler 1982, Whaley and Mollenhauer 1963). Die Golgi-Apparate synthetisieren während der Mitose verschiedene Polysaccharide, die als strukturelle Komponenten zum Aufbau der neuen Zellwand benötigt werden. Die synthetisierten Polysaccharide werden am Golgi in sekretorische Vesikel verpackt und entlang von Mikrofilamenten und Mikrotubuli, die eine Rolle bei der Orientierung und Positionierung der neuen Zellwand am Phragmoplasten einnehmen, zur Zellplatte geleitet (Schopfer and Hepler 1991). Neben der subzellulären Lokalisierung kann darüber hinaus die Anzahl von Golgis in Pflanzenzellen reguliert werden. Zum Beispiel nimmt ihre Anzahl während der Mitose bedingt durch erhöhte sekretorische Gesamtaktivität der Zellen beträchtlich zu (Zhang and Staehelin 1992). Die Zahl der Golgi-Zisternen kann dabei auf eine einfache Weise reguliert werden. Als Antwort auf vermehrte sekretorische Aktivität teilen sie sich diese entlang ihrer Längsachse, wodurch zwei neue Golgi-Apparate entstehen und sich ihre Anzahl verdoppelt (Hirose and Komamine 1989). Auch die Zellen an der Wurzelspitze zeichnen sich durch eine intensive sekretorische Aktivität aus. Um die Wurzelspitze während des Wachstums durch die umgebende Erde vor Verletzungen zu schützen, sezernieren die Zellen in diesem Bereich große Mengen von Mucopolysacchariden. Diese legen sich als Schutzschicht über die Spitze und dienen gleichzeitig als Gleitmittel. Die Mucopolysaccharide werden im Golgi-Apparat synthetisiert und durch Exocytose aus den Zellen ausgeschleust. Entsprechend des hohen Bedarfs sekretierten Materials sind in den Zellen an der Wurzelspitze besonders viele Golgi-Apparate zu finden. So konnte zum Beispiel in Zellen an der Spitze von Maiswurzeln eine Anzahl von 300 bis 600 Golgis pro Zelle ermittelt werden (Mollenhauer and Morre 1994).

Die Größe der durch MsRab11F markierten Strukturen, ihr typisches Bewegungsverhalten und ihre unterschiedliche Anzahl in verschiedenen Abschnitten der Wurzel deuteten daher darauf hin, dass es sich um eine Lokalisierung an Golgi-Apparat handeln könnte. Da andere Organellen, z.B. Mitochondrien und Peroxisomen, in Pflanzenzellen ein vergleichbares Strömungsverhalten zeigen (Jedd and Chua 2002, Van Gestel et al. 2002) und vergleichbar groß (ca. 1 μm) sind, kann man allein aufgrund dieser Ergebnisse nicht ausschließen, dass MsRab11F auch an diese Organellen lokalisiert.

5.2.2 Die Färbung von transgenen Tabak-Epidermiszellen mit FM4-64 deutet auf eine Lokalisierung von MsRab11F am endosomalen System, dem Golgi oder prävacuolären Strukturen hin.

FM4-64 ist ein Membranfarbstoff, der verschiedene Zellkompartimente zeitabhängig anfärbt (Bolte et al. 2004). Der Farbstoff markiert sofort nach der Zugabe die Plasmamembran (Murphy et al. 2005), wird dort durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und zum endosomalen System transportiert (Geldner et al. 2003, Ueda et al. 2001) und gelangt von dort aus über weitere sequentielle Transportprozesse entweder zum Golgi-Apparat (Bolte et al. 2004) oder wird über prävacuoläre Strukturen (Bolte et al. 2004, Tse et al. 2004) bis hin zur zentralen Vakuole (Kutsuna et al. 2003) transportiert. Die einzelnen Kompartimente werden dabei nacheinander, entsprechend den nacheinander genutzten Transportwegen gefärbt. FM4-64 färbt aber nicht alle in der Zelle vorhandenen Kompartimente. Das endoplasmatische Reticulum, der Zellkern, die Mitochondrien, die Chloroplasten (Bolte et al. 2004) und die Peroxisomen (Nazarko et al. 2005, Sakai et al. 1998) werden nicht von FM4-64 angefärbt.

Bei der Färbung von *M. truncatula* Wurzelzellen konnte die sequentielle Anfärbung von Kompartimenten gut beobachtet werden. Nach zweistündiger Inkubation waren alle durch MsRab11F markierten Strukturen auch mit FM4-64 gefärbt. Eine Lokalisierung von MsRab11F am ER, Zellkern, Mitochondrien, Chloroplasten oder Peroxisomen konnte also ausgeschlossen werden. Weiterhin schlossen die Größe und das Bewegungsmuster der markierten Strukturen eine Lokalisierung an der Vakuole aus. Die Vakuole ist in Pflanzenzellen deutlich größer als nur 1µm und wird nicht aktiv innerhalb der Zelle bewegt. Das Lokalisierungsmuster der Strukturen deutete vielmehr auf eine Markierung von endosomalen Kompartimenten, Golgi-Apparat oder prävacuolären Kompartimenten (PVC) hin. Sowohl Golgi-Apparat, als auch prävacuoläre Strukturen bewegen sich in Pflanzenzellen von aktiven Transportprozessen getrieben durch das Cytoplasma (Boevink et al. 1998, Nebenfuhr et al. 1999, Tse et al. 2004) und lassen sich durch FM4-64 anfärben (Bolte et al. 2004, Tse et al. 2004).

5.2.3 Der Inhibitor Brefeldin A verändert die Morphologie von MsRab11-markierten Strukturen

Brefeldin A (BFA) ist ein Antibiotikum auf Basis eines Lacton-Rings, das durch Pilze wie zum Beispiel *Eupenicillium brefeldianum* produziert wird. Brefeldin A bindet an Sec7-Typ GEFs, die die Aktivierung des kleinen G-Proteins Arf1 katalysieren (Jackson and Casanova 2000) und inhibiert dadurch den durch Arf1 kontrollierten retrograden Vesikeltransport zwischen Golgi-Zisternen und vom Golgi zum ER. Dieses führt sowohl in pflanzlichen, als auch in tierischen Zellen zu drastischen

Veränderungen der Morphologie des Golgi-Apparates (Nebenfuhr et al. 2002). BFA ist daher als typischer Golgi-Inhibitor beschrieben.

In den unbehandelten Zellen lokalisierte MsRab11F:GFP in kleinen, punktförmigen Strukturen, die teilweise durch das Cytoplasma strömten. Eine vergleichbare Lokalisierung von MsRab11F:GFP konnte auch in unbehandelten transfizierten Tabak BY2 Protoplasten nachgewiesen werden. Die Behandlung von transgenen Tabak-Epidermiszellen mit Brefeldin A führte zu einer Aggregation durch MsRab11F:GFP markierter Strukturen im Cytoplasma und um den Zellkern herum. BFA führte also zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie von MsRab11F:GFP markierten Strukturen, jedoch entsprach das Ergebnis damit nicht den Beobachtungen von Ritzenthaler et al. (2002) für die Wirkung von BFA in Tabak BY2 Zellen. Die Autoren hatten in der Studie die Zellen mit einem GmMan1:GFP-Konstrukt transformiert und die Wirkung von BFA auf die markierten Strukturen in einer Zeitreihe untersucht (Ritzenthaler et al. 2002). Dabei konnte eine Fusion der durch GmMan1 markierten cis-Golgi Zisternen mit dem endoplasmatischen Reticulum zu ER/Golgi-Hybrid Kompartimenten beobachtet werden. Diese wiesen eine vollkommen andere Morphologie als die in dieser Arbeit beschrieben durch BFA-induzierten Aggregate auf. Diese wurden allerdings im tierischen System nach Gabe von BFA beschrieben (Lippincottschwartz et al. 1991). Hierbei kam es bedingt durch den Kollaps des trans-Golgi-Netzwerks (TGN), des endosomalen Systems und der Lysomen zur Formation von tubulären Membranstrukturen. Deutliche Veränderungen auf das trans-Golgi Netzwerk durch BFA wurden auch durch Hause et al. (2006) für Mais Epidermiszellen in der Wurzel beschrieben. Die Autoren berichteten dabei von neben einer Fusion der Golgis mit dem ER auch von einer fortschreitenden Aggregation und Fusion des TGN (Hause et al. 2006). Die nach der Behandlung von Tabak-Epidermiszellen mit BFA beobachteten Aggregaten im Cytoplasma der Tabak Epidermiszellen deuteten daher auf eine Lokalisierung von MsRab11F:GFP am TGN oder endosomalen Kompartimenten hin. Gleichzeitig konnte eine Lokalisierung von MsRab11F:GFP am cis-Golgi ausgeschlossen werden.

5.2.4 Aus Kolkolokalisierungsexperimenten mit GmMan1:mCherry und MtRab5B:RFP lässt sich schlussfolgern, dass MsRab11F am trans-Golgi, TGN und frühen Endosomen lokalisiert.

Die Behandlung von Zellen mit Brefeldin A hatte Hinweise darauf ergeben, dass MsRab11F vermutlich an Golgi-Apparat lokalisiert. Um die Hypothese zu überprüfen, wurde MsRab11F:GFP zusammen mit dem Golgi-Marker GmMan1:mCherry in Epidermiszellen von Tabak-Blättern exprimiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass MsRab11F an den gleichen beweglichen Strukturen

wie GmMan1 lokalisierte. Die Lokalisierung überlappte allerdings nur teilweise. Während die Mitte der Strukturen durch beide Konstrukte markiert war, waren die beiden Enden jeweils nur durch eine Fusion markiert, so dass sich eine dreifarbigige Anordnung ergab. Vergleichbare Resultate wurden bei der Markierung von pflanzlichen Golgi-Apparaten mit einer Kombination aus ST:GFP und ManI:YFP (Robinson et al., 2007) bzw. aus AtGRIP:GFP, STtmd:mRFP und Memb11:YFP/SYP31:YFP (Latijnhouwers et al. 2005) beschrieben. Auch in diesen Fällen konnten dreifarbig markierte Golgi-Apparate detektiert werden. Während ManI:YFP an den cis-Zisternen lokalisiert (Nebenfuhr et al. 1999), markiert ST:GFP die medial bis trans gelegenen Zisternen (Boevink et al. 1998, Saint-Jore et al. 2002, Wee et al. 1998). Die Golgis waren daher auf der einen Seite YFP- und auf der gegenüberliegenden Seite GFP-markiert. Nur in der Mitte kann es zur Überlagerung der Fluoreszenz beider Proteine (Robinson et al., 2007). AtGRIP:GFP lokalisiert am trans-Golgi, STtmd:mRFP an den medial bis trans gelegenen Zisternen und Memb11:YFP/SYP31:YFP markieren die cis-Zisternen (Latijnhouwers et al. 2005).

GmMan1 markiert die cis-Zisternen von Golgi-Apparat in Pflanzellen (Nebenfuhr et al. 1999, Nelson et al. 2007). Da MsRab11F an den gleichen Strukturen wie GmMan1 lokalisierte, die Lokalisierung aber nur teilweise überlappte, muss MsRab11F daher an den trans-Zisternen des Golgi-Apparats lokalisiert sein. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beschreibung der Funktion von Rab11 in tierischen Zellen. Dort ist das Protein in den Exozytose-Transport vom trans-Golgi Netzwerk zur Plasmamembran involviert und lokalisiert am TGN (Chen et al. 1998, Urbe et al. 1993, Zhang et al. 2004). Die Lokalisierung von Rab11 beschränkt sich aber im tierischen System nicht nur auf trans-Golgi Zisternen. So ist es dort auch an perinukleären Recycling Endosomen lokalisiert und reguliert den Rücktransport von Recyclingsrezeptoren zu der Plasmamembran (Ren et al. 1998, Rodman and Wandinger-Ness 2000, Ullrich et al. 1996). Bei der Kolokalisierung von MsRab11F:GFP mit GmMan1:mCherry konnten viele dreifarbig markierte Golgi-Apparat lokalisiert werden. Es gab allerdings auch Strukturen, die nur einfarbig markiert waren. Dafür kamen zwei verschiedene Erklärungen in Frage: Zum einen war möglich, dass die entsprechenden Golgi-Apparate zum Zeitpunkt der Aufnahme so orientiert waren, dass nur eine der Fluoreszenzfarben sichtbar war oder zum anderen, dass MsRab11F:GFP nur teilweise mit GmMan1:mCherry kolokalisierte. In einem weiteren Versuch wurde daher die Kolokalisierung von MsRab11F:GFP und MtRab5B:mRFP in Tabak BY2 Zellen untersucht. Dabei konnte eine teilweise Kolokalisierung von MsRab11F und MtRab5B ermittelt werden. Vom MtRab5B-Homolog aus *A. thaliana* Ara6 ist bekannt, dass es an der Plasmamembran und an frühen Endosomen, jedoch nicht am TGN lokalisiert (Ueda et al., 2001). Eine entsprechende Lokalisierung konnte auch für MtRab5B ermittelt werden. Ara6 kann darüber hinaus in Abhängigkeit

von der Isoprenylierung auch am ER lokalisieren. Die Mutante Ara6^{C3S}, die nicht am N-Terminus palmitoyliert wird, markiert die Strukturen des endosomalen Reticulums (Ueda et al., 2001). Für MtRab5B konnte keine Lokalisierung am ER ermittelt werden. Das Protein enthält am N-Terminus die notwendigen Aminosäurereste Glycin und Cystein in Position 2 und 3, die für die Myristoylierung und Palmitoylierung des Proteins notwendig sind.

MsRab11F zeigte eine Kollokalisierung mit MtRab5B an Strukturen im Cytoplasma, jedoch nicht an der Plasmamembran. Da MtRab5B im Cytoplasma die frühen Endosomen, aber nicht das TGN und nicht das ER markiert, können die beiden Proteine daher nur an frühen Endosomen kollokalisiert sein. MsRab11F lokalisiert also an den trans-Zisternen des Golgi und den frühen Endosomen.

5.2.5 MsRab11F koordiniert wahrscheinlich den anterograden Transport zwischen den trans-Golgi Zisternen und dem endosomalen System

Wie durch verschiedene Kollokalisierungen und Kontrollexperimente gezeigt werden konnte, lokalisiert MsRab11F an den trans Golgi-Zisternen und an frühen Endosomen. Die Golgis konnten als etwa 1 µm große, bewegliche Strukturen nachgewiesen werden, während die endosomalen Strukturen von unterschiedlicher Größe und vielgestaltiger waren. An der Spitze des Infektionsschlauchs und am Infektionströpfchen z.B. akkumulierten MsRab11F-markierte Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 0,5-0,6 µm, während am weiter distal gelegenen Teilen des Infektionsschlauches Strukturen mit einem Durchmesser bis zu 1 µm durch MsRab11F markiert waren. Die Strukturen um die Schlauchspitze lagen damit im Größenbereich der durch MtRab5B-markierten frühen Endosomen.

Robertson et al. (1978) konnten mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und verschiedenen Farbstoffen beobachten, dass sich vermehrt Golgis und Vesikel an der Spitze des Infektionsschlauchs und an der Peribakteroidmembran ansammeln. Einige dieser Vesikel transportieren Zellwandkomponenten, wie durch einen Farbstoff nachgewiesen werden konnte. In dieser Arbeit konnten keine Vesikel an der Infektionsschlauchmembran detektiert werden. Dieses ist aus rein technischen Gründen auch gar nicht möglich, da mit dem CLSM nur Strukturen bis ca. 250 nm aufgelöst werden können, Vesikel aber nur etwa 100 nm groß sind. Statt Vesikel konnten hier Strukturen an der Spitze des Infektionsschlauchs und an der proximalen Infektionsschlauchmembran detektiert werden. Dabei handelte es sich sehr wahrscheinlich um endosomale Strukturen. Die Markierung war aber nur direkt an der Spitze bzw. bis kurz hinter der Spitze zu sehen. Ältere Teile des Infektionsschlauches wiesen keine Markierung durch MsRab11F auf. Am Infektionsschlauch bildeten die endosomalen Strukturen teilweise größere Bläschen, die vermutlich durch die Fusion der einzelnen Kompartimente miteinander entstanden waren.

Die Lokalisierung von MsRab11F an trans-Golgi Zisternen und frühen Endosomen legt die Vermutung nahe, dass MsRab11F den Transport vom TGN zu den Endosomen koordiniert. Für tierische Zellen ist bekannt, dass Rab11 Proteine generell an Recyclingprozessen beteiligt sind (Zerial and McBride, 2001). Vereinzelt gibt es Hinweise darauf, dass sie dort auch in die Exocytose vom TGN involviert sind (Chen et al., 1998). Für pflanzliche Systeme hingegen ist die Situation weniger klar (Lycett 2008). Die Veröffentlichungen mehrerer Gruppen legen nahe, dass Rab11 Proteine hier den Transport von Zellwandkomponenten zur Zellmembran koordinieren (Chow et al. 2008, de Graaf et al. 2005, Inaba et al. 2002, Lu et al. 2001, Rehman et al. 2008, Ueda et al. 1996). So ist zum Beispiel die Sekretion von Zellwand-modifizierenden Enzymen, die zur Fruchtreifung benötigt werden, von Rab11 GTPasen abhängig (bin Zainal et al. 1996, Loraine et al. 1996). Tomatenpflanzen, bei denen das kleine G-Protein LeRab11a durch ein antisense Konstrukt ausgeschaltet wurde, entwickelten Früchte, die im Vergleich zu denen unbehandelter Pflanzen längere Zeit frisch blieben. Aus den transgenen Früchten konnten deutlich weniger Polygalacturonase und Pectinesterase isoliert werden (Lu et al. 2001). Die Pflanzen zeigten darüber hinaus physiologische und entwicklungspezifische Abnormalitäten. So war die Identität von Blütenorganen gestört, die Blütenstände stark verzweigt, die Blätter zerknittert, es wuchsen Triebe aus den Blättern, das Wachstums war eingeschränkt, es konnte eine reduzierte apikale Dominanz festgestellt werden und die Ethylenproduktion war verändert. In Protoplasten aus Tabakblättern konnte eine GFP-Fusion des Proteins am TGN lokalisiert werden (Rehman et al. 2008). Eine dominant negative Mutante des Proteins verhinderte in den Protoplasten nachweislich die Exocytose einer sekretierten GFP-Variante. Studien an *A. thaliana* Wurzelspitzen haben gezeigt, dass die Proteine RabA2 und RabA3 am Transport von Vesikeln zur Plasmamembran und zum Phragmoplasten beteiligt sind (Chow et al. 2008). Fluoreszenzmarkierte Varianten der Proteine markierten die Zellplatte, und dominant-negative Mutanten führten zu Störungen der Zellteilung, was eine Beteiligung an sekretorischen Prozessen zur sich neu bildenden Zellwand nahe legt. Das RabA Homolog NtRab11b in Tabak reguliert den Transport von Vesikeln zum Pollenschlauch (de Graaf et al. 2005). Das Protein konnte an Vesikeln an der Spitze des Pollenschlauchs lokalisiert werden. Eine negativ-dominante Variante des Proteins verursachte hier ein eingeschränktes Wachstum des Pollenschlauchs und reduzierte die Fertilität der Pflanzen. Aufgrund der vielen Beispiele für die Beteiligung von Rab11 GTPasen an exocytotischen Prozessen in pflanzlichen Systemen kann auch für MsRab11F eine Funktion im anterograden Transport von den trans-Golgi Zisternen zum endosomalen System angenommen werden.

5.2.6 MsRab11F kontrolliert wahrscheinlich den Transport von Membranmaterial zum Infektionsschlauch und den Bakteroiden

Während der Etablierung der Symbiose kommt es zu einer starken Zunahme der Membranoberfläche in den Wirtszellen. Während der Infektion wird ein membranumhüllter Infektionsschlauch gebildet, der von den Wurzelhaaren aus bis in den inneren Wurzelkortex wächst. Nach der Infektion werden die Bakterioide in den infizierten von der so genannten Peribakteroidmembran umgeben. Beide Prozesse tragen zu der Zunahme der Membranoberfläche bei. Die Peribakteroidmembran ist physiologisch gesehen eine Mischung zwischen Plasmamembran und Vakuolenmembran (Verma and Hong 1996). Es gibt zwei Grundmodelle für die Biogenese der Peribakteroidmembran (Mellor and Werner 1987) : a) Das Recycling-Modell, in dem sich die Peribakteroidmembran direkt von der Infektionsschlauchmembran ableitet und b) das Modell der direkten Differenzierung, bei dem Membranmaterialien vom Endomembransystem der Wirtszelle synthetisiert und direkt zu den Bakteroiden transportiert werden. Die Recycling-Modell Hypothese beruht auf dem Vergleich der Struktur zwischen der Plasmamembran und der Peribakteroidmembran. So konnte festgestellt werden, dass die Bakterien am Infektionströpfchen durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden (Bergersen and Briggs 1958, Dixon 1967, Goodchild and Bergersen 1966, Newcomb 1976). Sie werden dabei von der Infektionsschlauchmembran umgeben, die in direkter Verbindung mit der Plasmamembran steht. Bei Vergleichen der Membranen mittels Gefrierbruchtechnik (Robertson et al. 1978, Tu 1975, Verma et al. 1978) wurde festgestellt, dass die Plasmamembran und die PBM beide ca. 8-10 nm dick sind. Darüber hinaus lassen sich die Plasmamembran, die Peribakteroidmembran und auch die Infektionsschlauchmembran mit Wolframphosphorsäure anfärben. Dieses spricht gegen das Endomembransystem als Ursprung der Infektionsschlauch- und Peribakteroidmembran, da der Farbstoff sowohl die Golgi- als auch die ER-Membran nicht anfärbt (Robertson et al. 1978). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der Großteil der ATPasen der Peribakteroidmembran Plasmamembran-typische K^+/H^+ -ATPasen sind (Bassarab et al. 1986, Blumwald et al. 1985). Weniger als 30% sind Mg^+/H^+ -ATPasen, die auch im Golgi und Tonoplast vorkommen (O'Neill et al. 1991).

Das Modell der direkten Differenzierung hingegen besagt, dass die Infektionsschlauchwand, die Infektionsschlauchmembran und die Peribakteroidmembran durch die Verschmelzung von zytoplasmatischen Vesikeln entstehen, die ihren Ursprung im Endomembransystem der Wirtszelle haben. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen und unter Einsatz verschiedener Farbstoffe konnten Robinson et al. (1978) beobachten, dass sich vermehrt Golgi-Bodies und Vesikel an der Spitze des Infektionsschlauchs und an der Peribakteroidmembran ansammeln. Dabei konnten zwei Typen von Vesikeln beobachtet werden: Coated-Vesikel und glatte Vesikel. Diese Vesikel

verschmelzen mit der Infektionsschlauchmembran und der Peribakteroidmembran. Manche von diesen Vesikeln enthalten Zellwandmaterial, welches ähnlich wie die Infektionsschlauchwand mit Silber angefärbt werden kann. In der Publikation wurde zudem beschrieben, dass sich die Vesikel nah am Golgi-Apparat befinden. Robinson et al. (1978) vermuteten daher, dass der Vesikel aus dem Golgi an der Bildung von Infektionsschlauchmembran, -wand und Peribakteroidmembran beteiligt sind.

Von MsRab11F war durch die Dissertation von K. Schiene im Vorfeld bekannt, dass MsRab11F in Wurzelknöllchen hoch exprimiert ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Protein die trans Golgi-Zisternen und frühe Endosomen markiert und an der Peribakteroidmembran und an Strukturen an der Infektionsschlauchspitze und um den Infektionsschlauch herum lokalisiert. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass MsRab11F in Transportprozesse auf dem Weg hin zu den symbiontischen Strukturen involviert ist und dabei die Membranmaterialien aus dem Endomembransystem der Wirtszelle zu den Grenzflächen zwischen Wirt und Symbiont gelangt. Darüber hinaus konnten Kijne und Planqué (1979) zeigen, dass das Endoplasmatische Retikulum (ER) an der PBM-Biogenese beteiligt ist. Dabei bildet sich am Ende oder an der Seite des ER eine Wölbung, die mit fibrillären oder körnigen Materialien gefüllt ist. Diese schnürt sich als dünnwandiges Vesikel ab und verschmilzt mit der Peribakteroidmembran. In nicht-infizierten Zellen konnte bisher keine derartige strukturelle Veränderung des ER nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit und aus der Arbeit von Kijne und Planqué (1979) bestätigen also, dass die Membranen des Infektionsschlauchs und der Peribakteroidmembran ihren Ursprung zumindest teilweise im Endomembransystem der Wirtszelle haben und damit das Modell der direkten Differenzierung unterstützen (Kijne and Planque 1979). Andererseits ist dadurch keinesfalls auszuschließen, dass die Peribakteroidmembran einen Teils ihren Ursprung nicht doch aus der Membran des Infektionsschlauchs hat. Wahrscheinlich leiten sich die Infektionsschlauchmembran und Peribakteroidmembran aus verschiedenen Quellen ab, wobei ein Teil der durch MsRab11F vermittelte Vesikeltransport ist.

5.3 Lokalisierung von *MsRab11F* während der Infektion von Wirtszellen mit Rhizobien

5.3.1 Die Entlassung der Rhizobien aus dem Infektionsschlauch kann in verschiedenen Stadien erfolgen.

Eine koordinierte Sekretion von Matrixproteinen, Membranmaterial und Zellwandmaterial durch die Pflanzenzellen ist entscheidend für das Wachstum des Infektionsschlauchs bis in den inneren Kortex. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Infektionsschlauches hängt dabei allerdings in erster Linie von den eingeschlossenen Rhizobien ab. Nur die Bakterien an der Spitze des Infektionsschlauchs können sich vermehren und sind für das fortdauernde Wachstum des Infektionsschlauchs verantwortlich (Gage 2002). Nicht nur bei Pathogenen sondern auch während der Symbiose produzieren die Pflanzen Abwehrstoffe. Die Rhizobien müssen deshalb gleichzeitig in der Lage sein die Immunabwehr der Pflanzen zu unterdrücken. Die bakteriellen Oberflächenpolysaccharide wie Exopolysaccharide (EPS) und Lipopolysaccharide (LPS) können die Wirtsabwehr supprimieren (Becker A and Puhler 1998, Niehaus et al. 1998). Während die EPS essentiell für Initiierung und Wachstum des Infektionsschlauchs sind (Pellock et al. 2000), erfüllen die LPS eine wesentliche Funktion während der Zellinvasion (Brewin 2004, Campbell et al. 2003, Cheng and Walker 1998, Wang et al. 1999). EPS-Defekte verursachen den Abbruch des Wachstums des Infektionsschlauchs. Bei LPS-Mutanten, z.B. *lpsB*, wird die Infektionsschlauchbildung zwar induziert, die Bakterien werden aber nicht in die Zelle aufgenommen (Campbell et al. 2003, Perotto et al. 1994).

An der Stelle, wo die Bakterien entlassen werden, scheint die Sekretion von Zellwandmaterial und Membran- bzw. Matrixmaterial im Ungleichgewicht zu sein. Während die Sekretion der Wandkomponenten anscheinend aufhört, setzt sich die Sekretion der Membranmaterialien und der Matrixglykoproteine weiter fort, wodurch ein wandloses Infektionströpfchen entsteht (Rae et al. 1992). In dieser Arbeit wurden drei Stellen festgestellt, wo die Bakterien vom Infektionsschlauch entlassen werden: 1. Am Infektionströpfchen, hier bildet sich eine Wölbung mit einem Durchmesser von ca. 15 µm an der Infektionsschlauchspitze. 2. An Stellen, wo sich der Infektionsschlauch spiralförmig windet. 3. An Zell-Zell-Grenzen. Das Infektionströpfchen entsteht vermutlich, wie bereits erwähnt, durch die unkoordinierte Sekretion. Die Bakterien haben es hier geschafft die Immunantwort stark zu unterdrücken und können sich gut vermehren. Gleichzeitig werden die Matrixproteine weiter ausgeschieden, während keine neue Zellwand an dieser Stelle gebildet wird. Der spiralförmige Infektionsschlauch entsteht vermutlich wie bei der Wurzelhaarkrümmung durch lokal ausgeschiedene Nod-faktoren (Esseling et al. 2003). Diese Krümmung des Infektionsschlauchs kann sich anscheinend

später zum Infektionströpfchen weiter entwickeln. Bei der dritten Variante, wenn der Infektionsschlauch über Zell-Zell-Grenzen hinweg wächst, kommt es zunächst zu einer Fusion der Membran und Wand Infektionsschlauchs mit der Wand und Membran der Wirtszelle und die Bakterien werden in den Interzellularraum entlassen. Die Bakterien vermehren sich weiter und drücken gegen die Zellwand der Nachbarzelle. Wie am Wurzelhaar kommt es in den meisten Fällen zur Initiation eines neuen Infektionsschlauchs, wobei die Zellwand vermutlich zunächst durch bakterielle Cellulasen angelöst wird (Robledo et al. 2008) und dann aufgrund des durch die Bakterien ausgeübten Drucks der Invaginationsprozess gestartet wird. In einigen Fällen scheint auch hier das Gleichgewicht zwischen Zellwandauflösung und -neubildung gestört zu sein. Wird während dieses Prozesses zu wenig neues Zellwandmaterial durch die Pflanzenzelle zugeführt, kommt es zur Freilassung der Bakterien ins Cytoplasma der Wirtszelle.

5.3.2 Der MAC265-Antikörper markiert die Matrix-Glykoproteine des Infektionsschlauchs

Die Rhizobien sind innerhalb des Infektionsschlauchs von der Infektionsschlauchmatrix (Vandenbosch et al. 1989) und Exopolysacchariden umschlossen (Niehaus and Becker 1998). Die Matrixproteine sind pflanzlichen Ursprungs, hingegen die Exopolysaccharide von den Bakterien sezerniert werden. Die Markierung der Matrixproteine im Infektionsschlauch durch den MAC265-Antikörper wurde erstmals für die Knöllchensymbiose der Erbse (*Pisum sativum*) beschrieben (Rae et al. 1992, Vandenbosch et al. 1989). Durch Untersuchungen einer Fraktion löslicher Proteine aus den Knöllchen konnte nachgewiesen werden, dass der MAC265-Antikörper hauptsächlich ein 110 kDa großes Glykoprotein erkennt, das als Hauptbestandteil der Infektionsschlauchmatrix gilt (Olsson et al. 2002, Rae et al. 1992, Rathbun et al. 2002, Vandenbosch et al. 1989). Es hat einen hohen Prolingehalt und enthält das sich wiederholende Sequenzmotiv Ser-Hyp₄, das kennzeichnend für so genannte Extensine ist. Dieses Grundgerüst aus Serin- und Hydroxyprolinresten wird mit Arabinoseresten glykosyliert (Kieliszewski and Lamport 1994). Anders als gewöhnliche Extensine besitzen RNEs zusätzlich noch die sich wiederholende Sequenz Hyp₄-X-Hyp₄-X-Hyp₄, an die ein hoch glykosyliertes Arabinogalactan bindet (Brewin 2004, Goodrum et al. 2000). Arabinogalactan-Proteine (AGP) sind hoch glykosylierte Proteoglykane mit über 90% Kohlenhydratanteil und bestehen hauptsächlich aus Arabinose und Galaktose (Du et al. 1996). Die Funktion der AGPs ist bis heute nicht vollständig geklärt. Sie sind offenbar an den Zellinteraktionen während der Pflanzenentwicklung, an Abwehrmechanismen der Pflanze, bei Verwundungen und an der molekularen Interaktion an der Zelloberfläche beteiligt (Schultz et al. 2000, Seifert and Roberts 2007, Showalter 2001). AGPs sind größere Komponenten der

extrazellulären Matrix und dienen vermutlich auch als Signalmoleküle. Änderungen an den zelloberflächlichen AGP-Proteinen gehen mit der Zelldifferenzierung und sogar mit Organformung einher (Sherrier et al. 1999). Gleichzeitig könnten die RNEs mit der Zelloberfläche der Bakterien interagieren und Erkennungssignale an die Pflanzenzelle weiter geben. Die DNA-Sequenzen der RNEs sind bei den Leguminosen hoch konserviert, z.B. ist PsExt aus *P. sativum* zu mehr als 70% mit MtN12 aus *Medicago truncatula* identisch (Gamas et al. 1996, Rathbun et al. 2002).

Für Leguminosen-RNE sind also Extensin- und Arabinogalactan-reiche Sequenzen charakteristisch (Brewin 2004). Generell werden Extensine unter oxidativen Bedingungen, z.B. in Gegenwart von H₂O₂, quervernetzt und bilden eine starre Matrix (Cassab 1998). Dieser Mechanismus zur Versteifung von Zellwänden dient Pflanzen zur Abwehr von Pathogenen (Stafstrom and Staehelin 1986). Die Root Nodule Extensine sind Glykoproteine, die aufgrund ihres hohen Kohlenhydratgehalts durch die Arabinogalactaneinheiten löslicher als andere Extensine sind. Dadurch werden sie bei der Quervernetzung nicht so schnell fest oder nicht so sehr fest wie übliche Extensine. Dieses ermöglicht den Bakterien sich innerhalb des Infektionsschlauchs zu vermehren und zu überleben. Die RNEs spielen daher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellinvasion und der Infektionsschlauchbildung (Stafstrom and Staehelin 1986).

Nicht alle Infektionsschläuche führen zu einer erfolgreichen Invasion der Pflanzenzellen durch die Bakterien. Der Infektionsschlauch wächst gegen den Turgordruck. Seine fortdauernde Erweiterung hängt von der Menge der ausgeschiedenen RNEs und des Wasserstoffperoxids an der Schlauchspitze ab (Wisniewski et al. 2000). Wenn die Bakterien eine Abnormalität zeigen, wird eine starke Abwehrreaktion der Pflanze induziert, infolgedessen es zu Quervernetzung der RNEs kommt. Daraufhin werden die Zellteilung der Bakterien und das Wachstum des Infektionsschlauches eingestellt und die Invasion bricht ab (Wisniewski et al. 2000). Oftmals wird die Invasion aber auch vor der Infektion abgebrochen, obwohl die Bakterien kompatibel sind (Vasse et al. 1993). Die erhöhte Sekretion von RNEs wurde als frühe Pflanzenantwort auf die Infektion mit *Rhizobium leguminosarum* in *P. sativum* und *V. hirsuta* festgestellt (Rae et al. 1991). Im Infektionsschlauch konnten reaktiver Sauerstoff und H₂O₂ detektiert werden (Rubio et al. 2004). H₂O₂ wird durch verschiedene Enzyme, z.B. Diaminoxidase, apoplastische Oxalate, Oxidase und NADPH-Oxidase produziert (Lamb and Dixon 1997, Wisniewski et al. 2000). Die unlöslichen, quervernetzten RNEs könnte der Grund dafür sein, dass die Infektionsschlauchwände widerstandsfähig gegen Zellwandverdauungsenzyme wie Driselase sind (Higashi et al. 1986). Gewöhnliche Zellwände werden durch dieses Enzym vollständig verdaut, die Zellwand der Infektionsschläuche dagegen nicht.

Die Lokalisierung der Matrixproteine wurde in dieser Arbeit ebenfalls mit Hilfe des monoklonalen MAC265-Antikörpers untersucht. Der Antikörper markierte in *Medicago sativa* die Matrixproteine in einem Bereich bis ca. 60 µm hinter der Infektionsschlauchspitze. Weiter entfernt konnte kein MAC265-Antigen mehr detektiert werden. Außerdem konnten die Matrixproteine zwischen den Rhizobien in Infektionströpfchen und an den Bakteroiden in jungen infizierten Zellen nachgewiesen werden. Der MAC265-Antikörper konnte die Matrix möglicherweise deshalb nur in der Spitzenregion des Infektionsschlauchs erkennen, weil die RNEs vermutlich allein in dieser Region gelöst sind. In 60 µm Entfernung sind die RNEs offenbar bereits quervernetzt. Sie sind dadurch unlöslich und verlieren ihre Immunreaktivität. Die Bakterien werden in den quervernetzten RNEs gefangen und können sich nicht mehr vermehren. Nur an der Infektionsschlauchspitze, wo die RNEs in der löslichen, noch nicht quervernetzten Form vorkommen, ist eine Vermehrung der Bakterien noch möglich (Brewin 2004). Mittels Fluoreszenzprotein-exprimierender Rhizobien konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsprozess des Infektionsschlauchs nur in der Spitzenregion stattfindet (Gage 2002).

5.4 Funktion des MsRab11F während der Endozytose und Differenzierung der Bakterioide

Mittels des MAC265 Antikörpers konnte während der Entlassung der Rhizobien aus dem Infektionsschlauch eine Kolo-kalisierung mit Matrixproteinen nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer positiven Ladung können sich die Matrixproteine direkt an die negativ geladene Bakterienoberfläche binden (Bolanos et al. 1996, Mellon and Helgeson 1982). Dabei kommt es zu einer direkten Wechselwirkung von Hydroxyprolin-reichen Proteinen (HRGP) mit bakteriellem LPS (Olsson et al. 2002). Der Prozess der Aufnahme der Bakterien zeigt damit Ähnlichkeiten zu anderen endocytotischen Aufnahmeprozessen von Pflanzenzellen. Als Endozytose ist generell die Internalisierung extrazellulären Materials in die Zelle definiert. Dieses wird ausgehend von der Plasmamembran aus über frühe und späte Endosomen hin zur lytischen Vakuole transportiert (Geldner and Jurgens 2006, Robinson et al. 2008, Samaj et al. 2005). Die Aufnahme der Rhizobien in die Zelle besitzt Ähnlichkeit mit der Phagozytose, einer besonderen Form der Endocytose, tierischer Zellen. In tierischen Zellen werden phagozytierte Partikel von einer Membran umgeben, an der bald das kleine G-Protein Rab5 als Merkmal für frühe Endosomen lokalisiert. Später differenziert sich das frühe Endosom zum späten Endosom, wobei Rab5 gegen Rab7 ersetzt wird. Anschließend erfolgt die Verschmelzung mit Lysosomen, die die aufgenommenen Partikel endgültig verdauen (Behnia and Munro 2005, Brumell and Grinstein 2004, Knodler et al. 2001, Via et al. 1997). In Pflanzenzellen lokalisiert Rab5 an prevakuolären Kompartimenten (PVC), die vergleichbar zu späten Endosomen sind (Gerrard et al.

2000, Jaillais et al. 2008, Jurgens 2004, Pelham 2002, Samaj et al. 2005, Surpin and Raikhel 2004). Von Rab7 gibt es mehrere Homologe in Pflanzen, deren Lokalisierung allerdings bisher wenig untersucht ist. Untersuchungen haben aber gezeigt, dass Rab7 in *Vigna aconitifolia* (Mattenbohnen) und in *Glycine max* (Sojabohnen) eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Symbiosomen hat (Cheon et al. 1993, Son et al. 2003). Knöllchen aus Mattenbohne Pflanzen, die mit einem Rab7 antisense Konstrukt transformiert waren, waren kleiner als Wildtyp-Knöllchen und zeigten verringerte Nitrogenase-Aktivität (Cheon et al. 1993). Dabei zeigte die Entlassung der Rhizobien aus dem Infektionsschlauch keine Anormalität, dafür aber konnten negative Auswirkungen auf die Reifung der Bakterioide festgestellt werden. Die Symbiosomen verwandelten sich zu lysierenden Vakuolen, die die Bakterioide degradierten. Limpens et al. (2009) konnten zeigen, dass die Bakterioide zu keinem Zeitpunkt Rab5 rekrutierten. Stattdessen wurde Rab7 rekrutiert, sobald die Bakterioide aufhörten sich zu teilen. Die Peribakteroidmembran enthielt das SNARE Protein SYP132, das charakteristisch für die Plasmamembran ist. Erst am Übergang zur Seneszenz wurden vakuoläre SNARE-Proteine in die Membran eingelagert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MsRab11F gleich nach der Aufnahme der Rhizobien in die Wirtszellen an der Peribakteroidmembran lokalisiert. Auch in jungen infizierten Zellen konnte MsRab11F an der Symbiosomenmembran detektiert werden. Erst in reifen infizierten Zellen, in denen sich die Bakterioide nicht mehr teilen, war die Membran nicht mehr durch MsRab11F markiert. Dieser Zeitpunkt deutet darauf hin, dass sich die Identität der symbiontischen Kompartimente im Laufe der Zeit verändert. Die Kolokalisierung von MsRab11F und MtRab5B hatte gezeigt, dass das Protein an trans-Golgi Zisternen und frühen Endosomen lokalisiert. Rab7 hingegen lokalisiert an späten endosomalen Kompartimenten (Limpens et al. 2009). Die Bakterioide unterliegen anscheinend einem Reifungsprozess, wie man ihn auch bei der Phagocytose findet. Die Bakterioide erhalten dabei direkt nach der Aufnahme eine Identität als frühe endosomale Strukturen, reifen dann im stickstofffixierenden Zustand zu späten Endosomen und entwickeln nach der symbiontischen Phase eine vakuoläre Identität. Interessanterweise zeigt der Entwicklungsverlauf der Bakterioide Parallelen zu dem pathogener Bakterien. Diese sind in der Lage die Reifung des Endosom zu manipulieren. *Mycobacterium bovis* zum Beispiel verhindert auf bisher unbekannte Weise den Austausch von Rab5 gegen Rab7 an der umgebenden Membran. Damit werden die Reifung von frühen zu späten Endosomen und die nachfolgende Fusion mit Lysosomen verhindert (Via et al. 1997). Die Bakterioide durchlaufen nach der Aufnahme durch die Wirtszellen zwar einen Reifungsprozess, können den Übergang zur Seneszenz und den lytischen Verdau in der Vakuole aber lange hinauszögern. Offensichtlich muss es auch hier

Mechanismen geben, die einen Einfluss auf die zeitliche Entwicklung des peribakteriellen Kompartiments haben.

5.5 *MsRab11F-Vesikel transportieren das vom MAC-265-Antikörper markierte RNE vom Golgi zum Bakteroid*

Der Infektionsschlauch ist eine tunnelartige Struktur dessen Lumen von der Infektionsschlauchwand und –membran umschlossen ist. Die Bakterien befinden sich umringt von Matrixproteinen im Lumen des Infektionsschlauchs (Brewin 2004). Die Matrix setzt sich aus bakteriellen Exopolysacchariden und pflanzlichen Root Nodule Extensinen zusammen (Niehaus and Becker 1998) Die RNEs werden am rauhen ER synthetisiert, zu den Golgi-Apparaten transportiert und dort weiter modifiziert. In den Golgi-Stapeln findet die N- und O-Glykosylierung der Matrixproteine statt. Während die N-Glykosylierung bereits im ER beginnt und sich im Golgi fortsetzt, findet die O-Glykosylierung dagegen exklusiv im Golgi statt. Dabei werden die im ER synthetisierten Hydroxyprolin-reichen (HRGP) und Arabinogalactan-reichen Matrix-Glykoproteine (AGP) (Nebenfuhr and Staehelin 2001) mit Oligosacchariden modifiziert. Die Matrixproteine müssen dann den Golgi verlassen und zur Infektionsschlauchmembran bzw. Peribakteroidmembran transportiert werden. Dabei könnte der durch MsRab11F vermittelte Vesikeltransport eine entscheidende Rolle spielen. An der Infektionsschlauchspitze zum Beispiel konnten durch MsRab11F-markierte endosomale Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 0,5-0,6 µm detektiert werden. Gleichzeitig konnte mittels des MAC265 Antikörpers eine Kolokalisierung mit Matrixproteinen nachgewiesen werden. Auch in frisch infizierten Zellen konnten um die Bakterioide herum mittels des Antikörpers Matrixproteine nachgewiesen werden. Gleichzeitig war die Peribakteroidmembran durch MsRab11F markiert.

Eine vergleichbare Situation ist bei der Entwicklung der Zellplatte beobachtet worden. Chow *et al.* (2008) konnten zeigen, dass die beiden *Arabidopsis* Rab11-Proteine AtRabA2 und AtRabA3 BFA-sensitive Kompartimente markierten, die während der Entwicklung der Zellplatte am Phragmoplasten lokalisierten. Dominant-negative Mutanten dieser Rab-Proteine hingegen hemmten die Zellplattenbildung. Als Resultat konnten Zellen mit zwei Zellkernen detektiert werden, die unvollständig oder gar nicht geteilt waren. Die durch AtRabA2 und AtRabA3 markierten Kompartimente konnten als trans-Golgi assoziierte frühe Endosomen (TGN/EE) identifiziert werden. Die TGN/EE-Kompartimente befanden sich im Cytosol stets in enger Nähe zu Golgi-Apparat und enthielten zu 70% partiell die V-ATPase VHA-a1, die ein charakteristischer trans-Golgi Marker ist (Dettmer *et al.* 2006). Bei den am Phragmoplasten lokalisierten TGN/EE-Kompartimenten konnte allerdings kein VHA-a1 mehr nachgewiesen werden. Die Autoren spekulierten, dass sich die TGN/EE-

Kompartimente aus dem Golgi ableiten und Matrixmaterial und Membranen hin zur sich entwickelnden Zellplatte transportieren. Die Situation ist mit der Ausbildung symbiontischer Strukturen während der Knöllchensymbiose vergleichbar. Auch hier muss in erheblichem Umfang Membran- und Matrixmaterial zum Infektionsschlauch und den Bakteroiden transportiert werden. Das Matrixmaterial wird mit Sicherheit im Golgi synthetisiert. So konnten Vandenbosch et al. (1989) die Matrixproteine unter Verwendung des MAC265-Antikörper mittels Immunogold-Markierung in den Golgi-Zisternen detektieren. Während der Mitose reichert Matrixmaterial in Kompartimenten an, die ihren Ursprung im Golgi haben (Jurgens 2004, 2005, Yasuhara and Shibaoka 2000). Die Lokalisierung von MsRab11F an den trans-Golgi Zisternen und BFA-sensitiven Kompartimenten legt die Vermutung nahe, dass die durch MsRab11F regulierten Vesikel Matrixmaterialien von den trans-Golgi Zisternen zu TGN/EE Kompartimenten transportieren und dass von dort aus ein Weitertransport zum Infektionsschlauch bzw. der Peribakteroidmembran erfolgt. Dabei kommt es wahrscheinlich zunächst zur Fusion und Aggregation der TGN/EE Strukturen, wie sie auch bei der Zellteilung am Phragmoplasten beobachtet werden kann (Baluska et al. 2006). So konnten die durch MsRab11F markierten TGN/EE Kompartimente am Infektionsschlauch in größeren Aggregaten mit einem Durchmesser bis zu 2 μm detektiert werden. Von den TGN/EE erfolgt dann wahrscheinlich der durch MsRab11F vermittelte Weitertransport zu den symbiontischen Strukturen. Sowohl am Infektionsschlauch, am Infektionströpfchen als auch an der Peribakteroidmembran ließ sich eine Markierung durch MsRab11F nachweisen. Gleichzeitig konnten im Infektionsschlauch, im Infektionströpfchen und um die Bakterioide herum Matrixproteine durch den Antikörper MAC265 detektiert werden. Wahrscheinlich fusionierten durch MsRab11F regulierte Vesikel mit der jeweiligen Zielmembran und entließen die noch löslichen RNE in den extrazellulären Raum, wo sie die bakteriellen Symbionten umhüllten.

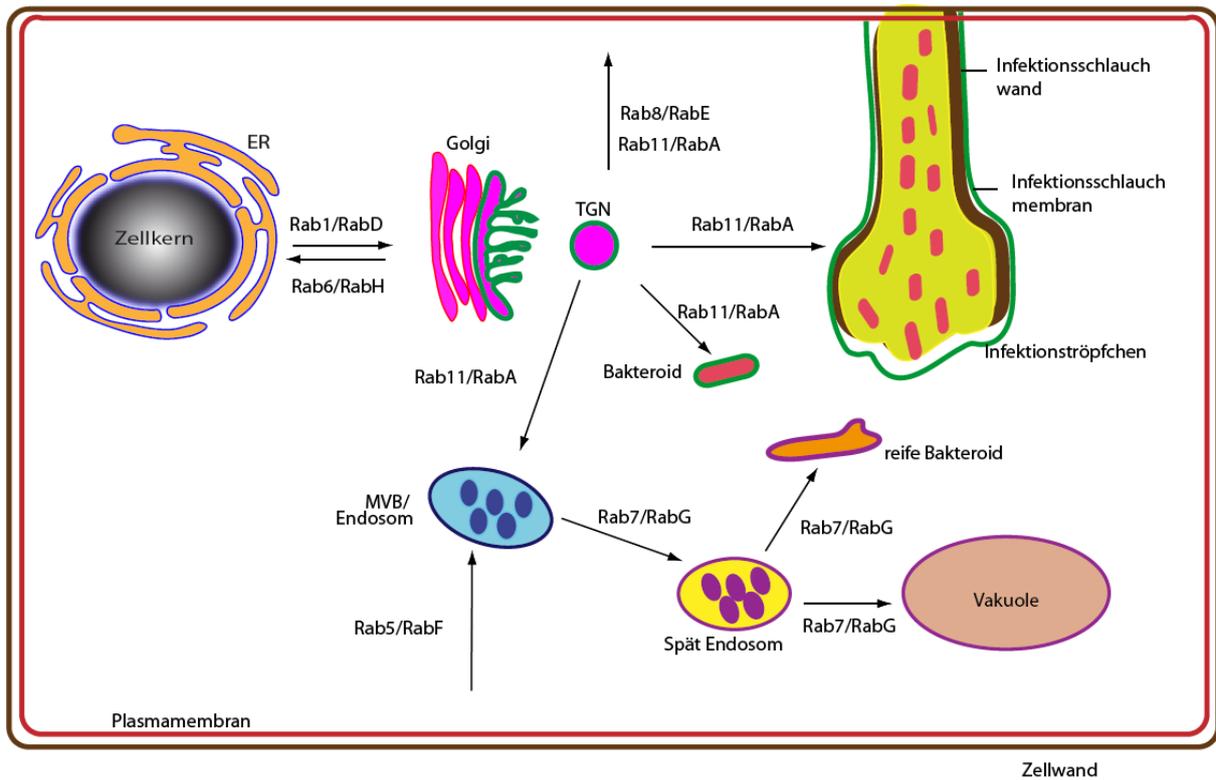


Abb. 5-1: Modell zur Funktion von MsRab11F während der Etablierung der Symbiose zwischen *M. sativa* und *S. meliloti*. Während der Knöllchensymbiose wird ein Infektionsschlauch gebildet, durch den *S. meliloti* Bakterien in den inneren Wurzelcortex gelangen und schließlich durch Endocytose in die Wirtszellen aufgenommen werden. Dabei wird jedes einzelne Bakterium von einer Membran pflanzlichen Ursprungs, der sogenannten Peribakteroidmembran, umhüllt. Die Bildung des Infektionsschlauchs und der Peribakteroidmembran benötigen hohe Mengen an Membran-, Zellwand- und Matrixmaterialien. Die Matrixmaterialien werden im ER synthetisiert und im Golgi-Apparat prozessiert. Das trans-Golgi Netzwerk (TGN) dient als Ausgangspunkt der Exocytose. Von dort aus werden die Matrixmaterialien zur Plasmamembran, zum Infektionsschlauch und zu den Bakteroiden transportiert. Die entsprechenden Transportprozesse werden durch MsRab11F reguliert. Die Peribakteroidmembran ähnelt zu Beginn ihrer Entwicklung, kurz nach der Aufnahme der Bakterien, der Plasmamembran. Solange sich die Bakterioide teilen und differenzieren, transportieren durch MsRab11F regulierte Vesikel Materialien zu ihnen, die sie zum Wachstum und zur Teilung benötigen. Die Bakterioide ähneln dabei frühen Endosomen. Später, wenn die Bakterien sich nicht mehr teilen und sich zu stickstofffixierenden Bakterioide differenziert haben, wird der MsRab11F-vermittelte Vesikeltransport eingestellt. Ab diesem Zeitpunkt verwandeln sich die Bakterioide zu späten Endosomen, die durch Rab7 regulierte Vesikel von der Spät Endosom erhalten. Dieses läutet nachher den Verdau der Bakterioide in der saprophytischen Zone der Wurzelknöllchen ein.

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Lokalisierung von MsRab11F an TGN-Strukturen bzw. frühen Endosomen und an der Infektionsschlauch- bzw. Peribakteroidmembran. Die Ergebnisse deuten hin, dass das MsRab11F an der Biogenese symbiontischer Strukturen beteiligt ist. Um zu prüfen, ob MsRab11F essentiell für die Etablierung der Symbiose ist, wäre es sinnvoll *M. truncatula* Wurzeln mit dem dominant inaktiven Konstrukt MsRab11FS29N:GFP oder einem antisense MsRab11F Konstrukt

zu transformieren und Nodulationsversuche zu starten. In transfizierten Protoplasten zeigte das dominant inaktive Konstrukt keine spezifische Lokalisierung. Das Fusionsprotein war homogen im Cytoplasma verteilt. Dazu traten relativ früh apoptotische Effekte bei den Zellen auf. Die Fluoreszenz konzentrierte sich zunehmend in zahlreichen großen Aggregaten, die sich vor allem um den Zellkern herum und im Zellkortex konzentrierten. Der Zellkern verlagerte sich in das Zentrum der Zellen und die strukturelle Identität der Zellkompartimente ging zunehmend verloren. Die Infektion der transgenen Wurzeln mit *S. meliloti* sollte Hinweise erbringen, ob die Ausbildung der Symbiose gestört oder eventuell sogar komplett inhibiert ist. Darüber hinaus wäre es sinnvoll auch eine „gain of function“-Mutante von MsRab11F, die stets aktiv ist, zu im Kontext der Symbioseetablierung zu untersuchen. Auch hier könnte es zu Störungen in der Entwicklung der Symbiose kommen.

MsRab11F lokalisiert in reifen infizierten Zellen nicht mehr an Peribakteroidmembran. Interessanterweise wurde durch Limpens et al. (2009), dass nachdem die Differenzierung der Bakterioide abgeschlossen ist und diese Stickstoff fixieren, Rab7 an der Peribakteroidmembran lokalisiert. Es wäre daher sehr interessant verschiedene Stadien der Peribakteroidentwicklung immunologisch mittels eines Anti-Rab7-Antikörpers (Limpens et al. 2009) und des Anti-MsRab11F-Antikörpers zu untersuchen, um den Zeitpunkt der Transition während der Differenzierung der Bakterioide zu verfolgen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Aufklärung, wie die Bakterien den Membrantransport manipulieren und es schaffen MsRab11F regulierte Vesikel zu sich umzulenken. Kannenberg et al. (1996) konnten zeigen, dass sich das LPS der Bakterioide im Laufe der Zeit während der Differenzierung verändert. Die LPS-Mutante Rm6963 von *S. meliloti* hat einen Defekt in der LPS B-Region. Sie bildet zwar in *M. sativa* stickstofffixierende Knöllchen, nicht aber in *M. truncatula* (Niehaus et al. 1998). Dabei zeigte sich, dass die Bakterien vom Infektionsschlauch entlassen werden, sich aber nicht zu stickstofffixierenden Bakteroiden differenzieren. Hierzu könnte man ebenfalls eine Doppel-Lokalisierung mit dem anti-Rab7-Antikörper und dem anti-MsRab11F-Antikörper durchführen, um zu überprüfen, ob die Bakterioide mit defektem LPS nicht in der Lage sind MsRab11F-Vesikel so zu steuern wie Wildtyp-Bakterien.

6 Literatur

- Albrecht C, Geurts R, Bisseling T. 1999. Legume nodulation and mycorrhizae formation two extremes in host specificity meet. *Embo Journal* 18: 281-288.
- Alexander C, Rietschel ET. 2001. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research* 7: 167-202.
- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GE, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Denarie J, Gough C. 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* 34: 495-506.
- Baluska F, Menzel D, Barlow PW. 2006. Cytokinesis in plant and animal cells: Endosomes 'shut the door'. *Developmental Biology* 294: 1-10.
- Bassarab S, Mellor RB, Werner D. 1986. Evidence for 2 types of Mg⁺⁺-ATPase in the Peribacteroid membrane from *Glycine max* root-nodules. *Endocytobiosis and Cell Research* 3: 189-196.
- Batoko H, Zheng HQ, Hawes C, Moore I. 2000. A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* 12: 2201-2217.
- Battisti L, Lara J, Leigh J. 1992. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5625 - 5629.
- Bauer WD. 1981. Infection of legumes by rhizobia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 32: 407-449.
- Becker A, Pühler A. 1998. Specific amino acid substitutions in the proline-rich motif of the *Rhizobium meliloti* ExoP protein result in enhanced production of low-molecular-weight succinoglycan at the expense of high-molecular-weight succinoglycan. *J Bacteriol* 180: 395-399.
- Becker A, Puhler A. 1998. Production of exopolysaccharides. *Rhizobiaceae*: 97 - 118.
- Bednarek SY, Reynolds TL, Schroeder M, Grabowski R, Hengst L, Gallwitz D, Raikhel NV. 1994. A small GTP-binding protein from *Arabidopsis thaliana* functionally complements the yeast YPT6 null mutant. *Plant Physiology* 104: 591-596.
- Behnia R, Munro S. 2005. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438: 597-604.
- Benli M, Doring F, Robinson DG, Yang XP, Gallwitz D. 1996. Two GTPase isoforms, ypt31p and ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *Embo Journal* 15: 6460-6475.
- Bergersen FJ, Briggs MJ. 1958. Studies on the bacterial component of soybean root nodules: cytology and organization in the host tissue. *J Gen Microbiol* 19: 482-490.

bin Zainal Z, Tucker GA, Lycett GW. 1996. A rab11-like gene is developmentally regulated in ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1314: 187-190.

Bischoff F, Molendijk A, Rajendrakumar CSV, Palme K. 1999. GTP binding proteins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 233-256.

Bladergroen MR, Spaink HP. 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 353-359.

Blumwald E, Fortin MG, Rea PA, Verma DP, Poole RJ. 1985. Presence of Host-Plasma Membrane Type H-ATPase in the Membrane Envelope Enclosing the Bacteroids in Soybean Root Nodules. *Plant Physiol* 78: 665-672.

Boevink P, Oparka K, Cruz SS, Martin B, Betteridge A, Hawes C. 1998. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant Journal* 15: 441-447.

Bolanos L, Brewin NJ, Bonilla I. 1996. Effects of boron on *Rhizobium*-legume cell-surface interactions and nodule development. *Plant Physiology* 110: 1249-1256.

Bolte S, Schiene K, Dietz KJ. 2000. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Molecular Biology* 42: 923-936.

Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Siatat-Jeunemaitre B. 2004. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy-Oxford* 214: 159-173.

Brewin NJ. 1991. Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology* 7: 191-226.

Brewin NJ. 2004. Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 293-316.

Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology* 182: 5641-5652.

Brumell JH, Grinstein S. 2004. *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Current Opinion in Microbiology* 7: 78-84.

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. 1987. XL1-BLUE - A high-efficiency plasmid transforming RECA *Escherichia-coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-&.

Caetanoanollés G, Gresshoff PM. 1991. Plant Genetic-Control of Nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345-382.

Campbell GRO, Reuhs BL, Walker GC. 2002. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3938-3943.

- Campbell GRO, Sharypova LA, Scheidle H, Jones KM, Niehaus K, Becker A, Walker GC. 2003. Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *Journal of Bacteriology* 185: 3853-3862.
- Casanova JE, Wang XY, Kumar R, Bhartur SG, Navarre J, Woodrum JE, Altschuler Y, Ray GS, Goldenring JR. 1999. Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the Cell* 10: 47-61.
- Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 281-309.
- Casse F, Boucher C, Julliot JS, Michel M, Denarie J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose-gel electrophoresis. *Journal of General Microbiology* 113: 229-242.
- Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Denarie J. 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12: 1647-1665.
- Charrier B, Coronado C, Kondorosi A, Ratet P. 1995. Molecular characterization and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavanone-3-hydroxylase and dihydroflavonol-4-reductase encoding genes. *Plant Mol Biol* 29: 773-786.
- Chavrier P, Gorvel JP, Stelzer E, Simons K, Gruenberg J, Zerial M. 1991. Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* 353: 769-772.
- Chen W, Feng Y, Chen DY, Wandinger-Ness A. 1998. Rab11 is required for trans-Golgi network to plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Molecular Biology of the Cell* 9: 3241-3257.
- Cheng H-P, Walker G. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180: 5183 - 5191.
- Cheon CI, Lee NG, Siddique AB, Bal AK, Verma DP. 1993. Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *Embo Journal* 12: 4125-4135.
- Cheung AY, Andreyeva T, Wu H. 2002. Rab GTPases and vesicular transport in pollen tubes. *Molecular Biology of the Cell* 13: 2011.
- Chow CM, Neto H, Foucart C, Moore I. 2008. Rab-A2 and Rab-A3 GTPases define a trans-Golgi endosomal membrane domain in *Arabidopsis* that contributes substantially to the cell plate. *Plant Cell* 20: 101-123.
- Cook DR. 1999. *Medicago truncatula* - a model in the making! Commentary. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 301-304.

- Couchy I, Bolte S, Crosnier MT, Brown S, Satiat-Jeunemaitre A. 2003. Identification and localization of a beta-COP-like protein involved in the morphodynamics of the plant Golgi apparatus. *Journal of Experimental Botany* 54: 2053-2063.
- Crespi M, Galvez S. 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 155-166.
- Dart PJ, Mercer FV. 1963. Development of bacteroid in root nodule of barrel medic (*Medicago tribuloides* desr.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum*). *Archiv Fur Mikrobiologie* 46: 382-&.
- Dazzo F, Truchet G, Sherwood J, Hrabak E, Abe M, Pankratz S. 1984. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* -clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 48: 1140 - 1150.
- de Graaf BHJ, Cheung AY, Andreyeva T, Levasseur K, Kieliszewski M, Wu HM. 2005. Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco. *Plant Cell* 17: 2564-2579.
- de Ruijter NCA, Rook MB, Bisseling T, Emons AMC. 1998. Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant Journal* 13: 341-350.
- Defaria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist* 111: 607-619.
- Denarie J, Debelle F, Rosenberg C. 1992. Signaling and Host Range Variation in Nodulation. *Annual Review of Microbiology* 46: 497-531.
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K. 2006. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for Endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 715-730.
- Dixon RO. 1967. Origin of membrane envelope surrounding bacteria and bacteroids and presence of glycogen in clover root nodules. *Archiv Fur Mikrobiologie* 56: 156-&.
- Du H, Clarke AE, Bacic A. 1996. Arabinogalactan-proteins: A class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. *Trends in Cell Biology* 6: 411-414.
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR. 1992. Depolarization of Alfalfa Root Hair Membrane-Potential by *Rhizobium-Meliloti* Nod Factors. *Science* 256: 998-1000.
- Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC. 2003. Nod factor-induced root hair curling: Continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiology* 132: 1982-1988.
- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M. 1995. Nod Signal-Induced Plasma-Membrane Potential Changes in Alfalfa Root Hairs Are Differentially Sensitive to Structural Modifications of the Lipochitoooligosaccharide. *Plant Journal* 7: 939-947.
- Felle HH. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant Journal* 13: 455-463.

- Felle HH. 1999. Elevation of the cytosolic free $[Ca^{2+}]$ is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiol* 121: 273-280.
- Fisher RF, Long SR. 1992. Rhizobium - Plant Signal Exchange. *Nature* 357: 655-660.
- Gage DJ. 2002. Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 184: 7042-7046.
- Gamas P, Niebel FDC, Lescure N, Cullimore JV. 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 233-242.
- Geldner N, Jurgens G. 2006. Endocytosis in signalling and development. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 589-594.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jurgens G. 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-230.
- Gerrard SR, Levi BP, Stevens TH. 2000. Pep12p is a multifunctional yeast syntaxin that controls entry of biosynthetic, endocytic and retrograde traffic into the prevacuolar compartment. *Traffic* 1: 259-269.
- Glazebrook J, Walker G. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56: 661 - 672.
- Gonzalez, Reuhs BL, Walker GC. 1996. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8636-8641.
- Gonzalez, Semino C, Wang L, Castellano-Torres L, Walker G. 1998. Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13477 - 13482.
- Goodchild DJ, Bergersen FJ. 1966. Electron Microscopy of the Infection and Subsequent Development of Soybean Nodule Cells. *J. Bacteriol.* 92: 204-213.
- Goodrum LJ, Patel A, Leykam JF, Kieliszewski MJ. 2000. Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins. *Phytochemistry* 54: 99-106.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580.
- Hashim S, Mukherjee K, Raje M, Basu SK, Mukhopadhyay A. 2000. Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* 275: 16281-16288.
- Hause G, Šamaj J, Menzel D, Baluška F. 2006. Fine structural analysis of Brefeldin A induced compartment formation after high-pressure freeze fixation of maize root epidermis: compound exocytosis resembling cell plate formation during cytokinesis. *Plant Signal Behav.* 1: 134-140.

- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaink HP, Vankammen A, Bisseling T. 1994. Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on *Vicia-Sativa*. *Plant Physiology* 105: 787-797.
- Heidstra R, Yang WC, Yalcin Y, Peck S, Emons AM, vanKammen A, Bisseling T. 1997. Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium-legume* interaction. *Development* 124: 1781-1787.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 12501-12504.
- Heo JB, Rho HS, Kim SW, Hwang SM, Kwon HJ, Nahm MY, Bang WY, Bahk JD. 2005. OsGAP1 functions as a positive regulator of OSRab11-mediated TGN to PM or vacuole trafficking. *Plant and Cell Physiology* 46: 2005-2018.
- Hepler PK. 1982. Endoplasmic-reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* 111: 121-133.
- Her, Glazebrook J, Walker G, Reinhold V. 1990. Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm 1021. *Carbohydr Res* 198: 305 - 312.
- Higashi S, Kushiyama K, Abe M, . 1986. Electron microscopic observations of infection threads in driselase treated nodules of *Astragalus sinicus*. *Can. J. Microbiol.* 32: 947-952.
- Hirose S, Komamine A. 1989. Change in ultrastructure of Golgi-Apparatus during the cell-cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *New Phytologist* 111: 599-605.
- Horvath B, Heidstra R, Lados M, Moerman M, Spaink HP, Prome JC, Vankammen A, Bisseling T. 1993. Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium* Induce Infection-Related Early Nodulin Gene-Expression in Pea Root Hairs. *Plant Journal* 4: 727-733.
- Iijima M, Kono Y. 1992. Development of Golgi-apparatus in the root cap cells of maize (*Zea-Mays L.*) as affected by compacted soil. *Annals of Botany* 70: 207-212.
- Inaba T, Nagano Y, Nagasaki T, Sasaki Y. 2002. Distinct localization of two closely related Ypt3/Rab11 proteins on the trafficking pathway in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* 277: 9183-9188.
- Jackson CL, Casanova JE. 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in Cell Biology* 10: 60-67.
- Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miege C, Gaude T. 2008. Evidence for a sorting endosome in *Arabidopsis* root cells. *Plant Journal* 53: 237-247.
- Jedd G, Chua NH. 2002. Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto-myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant and Cell Physiology* 43: 384-392.

- Journet EP, Pichon M, Dedieu A, Debilly F, Truchet G, Barker DG. 1994. Rhizobium-Meliloti Nod Factors Elicit Cell-Specific Transcription of the Enod12 Gene in Transgenic Alfalfa. *Plant Journal* 6: 241-249.
- Jürgens G. 2004. Membrane trafficking in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 481-504.
- Jürgens G 2005. Cytokinesis in Arabidopsis: rush-hour traffic during cell division. *Febs Journal* 272: 455-455.
- Keller M, Roxlau A, Weng W, Schmidt M, Quandt J, Niehaus K, Jording D, Arnold W, Puhler A. 1995. Molecular analysis of the Rhizobium meliloti mucR gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol Plant Microbe Interact* 8: 267 - 277.
- Kieliszewski MJ, Lamport DTA. 1994. Extensin - Repetitive Motifs, Functional Sites, Posttranslational Codes, and Phylogeny. *Plant Journal* 5: 157-172.
- Kijne JW, Planque K. 1979. Ultrastructural-study of the endomembran system in infected-cells of pea and soybean root-nodules. *Physiological Plant Pathology* 14: 339-345.
- Knodler LA, Celli J, Finlay BB. 2001. Pathogenic trickery: Deception of host cell processes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 578-588.
- Koncz C, Schell J. 1986. The promotor of TL-DNA gene five controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular & General Genetics* 204: 383-396.
- Kurkdjian AC. 1995. Role of the Differentiation of Root Epidermal-Cells in Nod Factor (from Rhizobium Meliloti)-Induced Root-Hair Depolarization of Medicago-Sativa. *Plant Physiology* 107: 783-790.
- Kutsuna N, Kumagai F, Sato MH, Hasezawa S. 2003. Three-dimensional reconstruction of tubular structure of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant and Cell Physiology* 44: 1045-1054.
- Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Latijnhouwers M, Hawes C, Carvalho C, Oparka K, Gillingham AK, Boevink P. 2005. An Arabidopsis GRIP domain protein locates to the trans-Golgi and binds the small GTPase ARL1. *Plant Journal* 44: 459-470.
- Laus M, van Brussel A, Kijne J. 2005. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of Rhizobium leguminosarum in attachment to and infection of Vicia sativa root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 533 - 538.
- Lazar T, Gotte M, Gallwitz D. 1997. Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends in Biochemical Sciences* 22: 468-472.

Li FQ, Hou BH, Chen L, Yao ZJ, Hong GF. 2008. In vitro observation of the molecular interaction between NodD and its inducer naringenin as monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 40: 783-789.

Limpens E, Ivanov S, van Esse W, Voets G, Fedorova E, Bisseling T. 2009. Medicago N₂-Fixing Symbiosomes Acquire the Endocytic Identity Marker Rab7 but Delay the Acquisition of Vacuolar Identity. *Plant Cell*.

Lippincottschwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD. 1991. Brefeldin-as effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67: 601-616.

Long SR. 1996. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885-1898.

Loraine AE, Yalovsky S, Fabry S, Gruissem W. 1996. Tomato Rab1A homologs as molecular tools for studying rab geranylgeranyl transferase in plant cells. *Plant Physiology* 110: 1337-1347.

Lu CG, Zainal Z, Tucker GA, Lycett GW. 2001. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene. *Plant Cell* 13: 1819-1833.

Lycett G. 2008. The role of Rab GTPases in cell wall metabolism. *Journal of Experimental Botany* 59: 4061-4074.

Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A, Yue X, Antony C, Hong WJ, Goud B, Johannes L. 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *Journal of Cell Biology* 156: 653-664.

Mellon JE, Helgeson JP. 1982. Interaction of a Hydroxyproline-rich Glycoprotein from Tobacco callus with potential pathogens. *Plant Physiology* 70: 401-405.

Mellor RB, Werner D. 1987. Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume root-nodules. *Symbiosis* 3: 75-100.

Mollenhauer HH, Morre DJ. 1994. Structure of Golgi-Apparatus. *Protoplasma* 180: 14-28.

Mulligan JT, Long SR. 1985. Induction of Rhizobium-Meliloti NodC Expression by Plant Exudate Requires NodD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 6609-6613.

Murphy AS, Bandyopadhyay A, Holstein SE, Peer WA. 2005. Endocytotic cycling of PM proteins. *Annual Review of Plant Biology* 56: 221-251.

Nazarko TY, Nicaud JM, Sibirny AA. 2005. Observation of the *Yarrowia lipolytica* peroxisome-vacuole dynamics by fluorescence microscopy with a single filter set. *Cell Biology International* 29: 65-70.

Nebenfuhr A, Staehelin LA. 2001. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 160-167.

- Nebenfuhr A, Ritzenthaler C, Robinson DG. 2002. Brefeldin A: Deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiology* 130: 1102-1108.
- Nebenfuhr A, Gallagher LA, Dunahay TG, Frohlick JA, Mazurkiewicz AM, Meehl JB, Staehelin LA. 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiology* 121: 1127-1141.
- Nelson BK, 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.
- Newcomb W. 1976. Correlated light and electron-microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root-nodules. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 54: 2163-2185.
- Niehaus K, Becker A. 1998. The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell Biochem* 29: 73-116.
- Niehaus K, Kapp D, Pühler A. 1993. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190: 415-425.
- Niehaus K, Lagares A, Pühler A. 1998. A *Sinorhizobium meliloti* Lipopolysaccharide Mutant Induces Effective Nodules on the Host Plant *Medicago sativa* (Alfalfa) but Fails to Establish a Symbiosis with *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 906-914.
- Nielsen E, Cheung AY, Ueda T. 2008. The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* 147: 1516-1526.
- O'Neill M, Darvill A, Albersheim P. 1991. The degree of esterification and points of substitution by O-acetyl and O-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. *J Biol Chem* 266: 9549 - 9555.
- Olsson PA, Kjellbom P, Rosendahl L. 2002. *Rhizobium* colonization induced changes in membrane-bound and soluble hydroxyproline-rich glycoprotein composition in pea. *Physiologia Plantarum* 114: 652-660.
- Ortiz D, Medkova M, Walch-Solimena C, Novick P. 2002. Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *Journal of Cell Biology* 157: 1005-1015.
- Pelham HRB. 2002. Insights from yeast endosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 454-462.
- Pellock, Cheng HP, Walker GC. 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology* 182: 4310-4318.
- Pellock, Teplicki M, Boinay R, Bauer W, Walker W. 2002. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 184: 5067 - 5076.

- Perotto S, Brewin NJ, Kannenberg EL. 1994. Cytological evidence for a host-defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain-3841. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 99-112.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180-201.
- Quandt HJ, Puhler A, Broer I. 1993. transgenic root-nodules of *vicia-hirsuta* - a fast and efficient system for the study of gene-expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 699-706.
- Rae AL, Bonfantefasolo P, Brewin NJ. 1992. Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Journal* 2: 385-395.
- Rae AL, Perotto S, Knox JP, Kannenberg EL, Brewin NJ. 1991. Expression of extracellular Glycoproteins in the uninfected cells of developing pea nodule tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 563-570.
- Rathbun EA, Naldrett MJ, Brewin NJ. 2002. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of rhizobium-induced infection threads in pea root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 350-359.
- Rehman RU, Stigliano E, Lycett GW, Sticher L, Sbano F, Faraco M, Dalessandro G, Di Sansebastiano GP. 2008. Tomato Rab11a characterization evidenced a difference between SYP121-dependent and SYP122-dependent exocytosis. *Plant and Cell Physiology* 49: 751-766.
- Ren MD, Xu GX, Zeng JB, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD. 1998. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6187-6192.
- Ridge RW. 1988. Freeze-substitution improves the ultrastructural preservation of legume root hairs. *Botanical Magazine-Tokyo* 101: 427-441.
- Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Pimpl P, Staehelin LA, Robinson DG. 2002. Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco bright yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* 14: 237-261.
- Robertson JG, Lyttleton P, Bullivant S, Grayston GF. 1978. Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J Cell Sci* 30: 129-149.
- Robinson DG, Jiang L, Schumacher K. 2008. The Endosomal System of Plants: Charting New and Familiar Territories. *Plant Physiol.* 147: 1482-1492.
- Robledo M, et al. 2008. Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 7064-7069.

- Roche P, Debelle F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Denarie J, Prome JC. 1991. Molecular-basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti* - NODH and NODPQ genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. *Cell* 67: 1131-1143.
- Rodman JS, Wandinger-Ness A. 2000. Rab GTPases coordinate endocytosis - Commentary. *Journal of Cell Science* 113: 183-192.
- Roth L, Stacey G. 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol.* 49: 13-23.
- Rothman JE. 1994. Molecular mechanisms of intracellular protein-transport. *Journal of Neurochemistry* 62: S86-S86.
- Rubio MC, James EK, Clemente MR, Bucciarelli B, Fedorova M, Vance CP, Becana M. 2004. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1294-1305.
- Rutherford S, Moore I. 2002. The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 518-528.
- Saint-Jore CM, Evins J, Batoko H, Brandizzi F, Moore I, Hawes C. 2002. Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant Journal* 29: 661-678.
- Sakai Y, Koller A, Rangell LK, Keller GA, Subramani S. 1998. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of specific steps and morphological intermediates. *Journal of Cell Biology* 141: 625-636.
- Samaj J, Read ND, Volkmann D, Menzel D, Baluska F. 2005. The endocytic network in plants. *Trends in Cell Biology* 15: 425-433.
- Schiene, K. 1999. Isolierung und Charakterisierung monomerer G-Proteine aus *M. sativa* ihre Beteiligung an der symbiotischen und pathogenen Interaktion von Pflanzen mit Mikroorganismen. Dissertation
- Schiene K, Donath S, Brecht M, Puhler A, Niehaus K. 2004. A Rab-related small GTP binding protein is predominantly expressed in root nodules of *Medicago sativa*. *Molecular Genetics and Genomics* 272: 57-66.
- Schnepf E. 1986. Cellular polarity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 37: 23-47.
- Schopfer CR, Hepler PK. 1991. Distribution of membranes and the cytoskeleton during cell plate formation in pollen mother cells of *Tradescantia*. *Journal of Cell Science* 100: 717-728.
- Schultz CJ, Johnson KL, Currie G, Bacic A. 2000. The classical arabinogalactan protein gene family of arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1751-1767.

- Schultze M, Kondorosi Á. 1995. What makes nodulation signals host-plant specific? *Trends in Microbiology* 3: 370-372.
- Schwedock J, Long SR. 1990. ATP sulphurylase activity of the NODP and NODQ gene-products of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 348: 644-647.
- Segev N, Price LK, Serachitopol A, Zhen HY, Newman C, Jones S. 2001. Coordination of protein transport steps by monomeric GTPases. *Molecular Biology of the Cell* 12: 1852.
- Seifert GJ, Roberts K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58: 137-161.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 22: 1567-1572.
- Shaw SL, Long SR. 2003. Nod Factor Elicits Two Separable Calcium Responses in *Medicago truncatula* Root Hair Cells. *Plant Physiol.* 131: 976-984.
- Shearman CA, Rossen L, Johnston AWB, Downie JA. 1986. The *Rhizobium-Leguminosarum* Nodulation Gene *Nodf* Encodes a Polypeptide Similar to Acyl-Carrier Protein and Is Regulated by *NodD* Plus a Factor in Pea Root Exudate. *Embo Journal* 5: 647-652.
- Sherrier, Vandenbosch KA. 1994. Localization of repetitive Proline-rich proteins in the extracellular-matrix of pea root-nodules. *Protoplasma* 183: 148-161.
- Sherrier, Prime TA, Dupree P. 1999. Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis*. *Electrophoresis* 20: 2027-2035.
- Shirley BW. 1996. Flavonoid biosynthesis: 'New' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science* 1: 377-382.
- Short B, Preisinger C, Korner R, Kopajtich R, Byron O, Barr FA. 2001. A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *Journal of Cell Biology* 155: 877-883.
- Showalter AM. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1399-1417.
- Sieberer B, Emons AMC. 2000. Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* 214: 118-127.
- Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* 6: 1653-1663.
- Siniosoglou S, Pelham HRB. 2001. An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes. *Embo Journal* 20: 5991-5998.
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Krol J. 2006. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories* 5: 7.

- Smit, Swart S, Lugtenberg B, Kijne J. 1992. Molecular mechanisms of attachment of rhizobium bacteria to plant roots. *Mol Microbiol* 6: 2897 - 2903.
- Smit, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T, Geurts R. 2005. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308: 1789-1791.
- Son O, et al. 2003. Expression of *srab7* and *SCaM* genes required for endocytosis of *Rhizobium* in root nodules. *Plant Science* 165: 1239-1244.
- Spaink HP, Wijfjes AHM, Lugtenberg BJJ. 1995. *Rhizobium* NODI and NODJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *Journal of Bacteriology* 177: 6276-6281.
- Speth EB, Imboden L, Hauck P, He SY. 2009. Subcellular Localization and Functional Analysis of the *Arabidopsis* GTPase RabE. *Plant Physiol.* 149: 1824-1837.
- Stafstrom JP, Staehelin LA. 1986. Cross-linking patterns in salt-extractable Extensin from carrot cell-walls. *Plant Physiology* 81: 234-241.
- Steinmann D, Koplín R, Puhler A, Niehaus K. 1997. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *lpsI* and *lpsJ* genes encoding putative proteins with sequence similarity to the alpha- and beta-subunits of 3-oxoacid CoA-transferases are involved in LPS biosynthesis. *Archives of Microbiology* 168: 441-447.
- Stenmark H, Olkkonen VM. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2: REVIEWS3007.
- Storrie B, Pepperkok R, Nilsson T. 2000. Breaking the COPI monopoly on Golgi recycling. *Trends in Cell Biology* 10: 385-391.
- Stougaard J. 2001. Genetics and genomics of root symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 328-335.
- Surpin M, Raikhel N. 2004. Traffic jams affect plant development and signal transduction (vol 5, pg 100, 2004). *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 329-329.
- Timmers ACJ, Auriac MC, Truchet G. 1999. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126: 3617-3628.
- Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, Debilly F, Prome JC, Denarie J. 1991. Sulfated Lipo-Oligosaccharide Signals of *Rhizobium-Meliloti* Elicit Root Nodule Organogenesis in Alfalfa. *Nature* 351: 670-673.
- Tse YC, Mo BX, Hillmer S, Zhao M, Lo SW, Robinson DG, Jiang LW. 2004. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* 16: 672-693.
- Tu JC. 1975. Structural Similarity of Membrane Envelopes of Rhizobial Bacteroids and Host Plasma-Membrane as Revealed by Freeze-Fracturing. *Journal of Bacteriology* 122: 691-694.
- Udvardi MK. 2001. Legume Models Strut Their Stuff. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 6-9.

- Ueda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, Nakano A. 2001. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Embo Journal* 20: 4730-4741.
- Ueda T, Anai T, Tsukaya H, Hirata A, Uchimiya H. 1996. Characterization and subcellular localization of a small GTP binding protein (Ara-4) from *Arabidopsis*: Conditional expression under control of the promoter of the gene for heat-shock protein HSP81-1. *Molecular & General Genetics* 250: 533-539.
- Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *Journal of Cell Biology* 135: 913-924.
- Urbe S, Huber LA, Zerial M, Tooze SA, Parton RG. 1993. RAB11, a small GTPASE associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12-cells. *Febs Letters* 334: 175-182.
- Urzainqui, Walker G. 1992. Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti* exo mutants. *J Bacteriol* 174: 3403 - 3406.
- van Brussel AAN, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaik HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW. 1992. Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipid-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257: 70-72.
- Van Gestel K, Kohler RH, Verbelen JP. 2002. Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. *Journal of Experimental Botany* 53: 659-667.
- van Spronsen PC, Gronlund M, Bras CP, Spaik HP, Kijne JW. 2001. Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 839-847.
- Vanbatenburg FHD, Jonker R, Kijne JW. 1986. *Rhizobium* induces marked root hair curling by redirection of tip growth - a computer-simulation. *Physiologia Plantarum* 66: 476-480.
- VandenBosch KA, Stacey G. 2003. Summaries of legume genomics projects from around the globe. Community resources for crops and models. *Plant Physiology* 131: 840-865.
- Vandenbosch KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW, Brewin NJ. 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *Embo Journal* 8: 335-341.
- Vasse J, Debilly F, Truchet G. 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium-Meliloti-Alfalfa* symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant Journal* 4: 555-566.
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 172: 4295-4306.
- Verma, Hong ZL. 1996. Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends in Microbiology* 4: 364-368.
- Verma, Kazazian V, Zogbi V, Bal AK. 1978. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J Cell Biol* 78: 919-936.

- Verma D, Cheon C, 3rd, Hong Z. 1994. Small GTP-Binding Proteins and Membrane Biogenesis in Plants. *Plant Physiol* 106: 1-6.
- Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *Journal of Biological Chemistry* 272: 13326-13331.
- Voigt B, et al. 2005. Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *European Journal of Cell Biology* 84: 609-621.
- Wang LX, Wang Y, Pellock B, Walker GC. 1999. Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 181: 6788-6796.
- Wee EGT, Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P. 1998. Targeting of Active Sialyltransferase to the Plant Golgi Apparatus. *The Plant Cell* 10: 1759-1768.
- Whaley WG, Mollenhauer HH. 1963. Golgi apparatus and cell plate formation - a postulate. *Journal of Cell Biology* 17: 216-&.
- Wisniewski JP, Rathbun EA, Knox JP, Brewin NJ. 2000. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 413-420.
- Yang WC, Deblank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, Vankammen A, Franssen H, Bisseling T. 1994. *Rhizobium Nod* Factors Reactivate the Cell-Cycle during Infection and Nodule Primordium Formation, but the Cycle Is Only Completed in Primordium Formation. *Plant Cell* 6: 1415-1426.
- Yasuhara, Shibaoka H. 2000. Inhibition of Cell-Plate Formation by Brefeldin A Inhibited the Depolymerization of Microtubules in the Central Region of the Phragmoplast. *Plant Cell Physiol.* 41: 300-310.
- Zerial M, McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 107-117.
- Zevenhuizen L. 1997. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers* 33: 139-144.
- Zhan, Lee C, Leigh J. 1991. Induction of second exopolysaccharide (EPS₂) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J Bacteriol* 173: 7391 - 7394.
- Zhan, Lavery S, Lee C, Leigh J. 1989. A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 that can function in root nodule invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3055 - 3059.
- Zhang, Staehelin LA. 1992. Functional compartmentation of the Golgi-Apparatus of plant-cells - immunocytochemical analysis of high-pressure frozen-substituted and freeze-substituted sycamore maple suspension-culture cells. *Plant Physiology* 99: 1070-1083.
- Zhang, Ellis S, Sriratana A, Mitchell CA, Rowe T. 2004. Sec15 Is an Effector for the Rab11 GTPase in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 279: 43027-43034.

Zheng HQ, Camacho L, Wee E, Henri BA, Legen J, Leaver CJ, Malho R, Hussey PJ, Moore I. 2005. A Rab-E GTPase mutant acts downstream of the Rab-D subclass in biosynthetic membrane traffic to the plasma membrane in tobacco leaf epidermis. *Plant Cell* 17: 2020-2036.

Zuanazzi JAS, Clergeot PH, Quirion JC, Husson HP, Kondorosi A, Ratet P. 1998. Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 784-794.

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Karsten Niehaus für das interessante Thema, für die wissenschaftliche Betreuung und die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen.

Ich bedanke mich besonders bei der thailändischen Regierung für die finanzielle Unterstützung während des gesamten Zeitraums.

Dr. Holger Densow möchte ich für das zeitaufwändige Korrekturlesen dieser Arbeit und das Plasmid pGemT-mGFP6 danken.

Dr. Frank Colditz danke ich für seine Hilfe und gute Zusammenarbeit in Hannover während des 2D-Gel-Experiments.

Dr. Dieter Kapp danke ich für die Beratung bei den mikroskopischen Arbeiten.

Dr. Natalija Hohnjec danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Benutzung des Mikrotoms.

Dr. Thorsten Seidel danke ich für die Beratung am CLSM.

Prof. Dr. Dorothee Staiger danke ich für die Plasmide pBin19 und pBin20-GmMan1(tTMs)-mCherry.

PD Dr. Robert Hänsch danke ich für die Einführung in die Pflanzentransformation mittels Particle Gun.

Gazaleh Nematollahi und Prof. Dr. Armin Hallmann danke ich für die Benutzung des Particle Gun.

Nickels Jensen danke ich für das Plasmid pRSET_B-mRFP1 und seine Hilfsbereitschaft.

Der Gärtnerei der Fakultät Biologie danke ich herzlich für die Pflanzen, die sie stets für mich zur Verfügung stellte.

Außerdem danke ich allen „Phytos“ für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art, und ihre Geselligkeit.

Besonders danke ich Ralf Jochmann für seine Unterstützung und das Korrekturlesen.

Danksagung

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern für ihr Interesse und die Ermutigung während aller Phasen dieser Arbeit.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur ganz oder annähernd entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig, noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, den 5. Januar 2010