
LOKALISIERUNG UND FUNKTIONSANALYSE
VON SYMBIOSE-RELEVANTEN PROTEINEN
DER ACKERBOHNE *Vicia faba* L.



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE DER UNIVERSITÄT BIELEFELD

VORGELEGT VON **JÖRG DIETER BECKER** AUS DETMOLD

DEZEMBER 2000

Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens

Ich beantrage die Eröffnung des Promotionsverfahrens.

Titel der eingereichten Dissertation:

Lokalisierung und Funktionsanalyse
von Symbiose-relevanten Proteinen
der Ackerbohne *Vicia faba* L.

Betreuer: Prof. Dr. Alfred Pühler

Carcavelos, den 05.01.2001

Jörg D. Becker

Darstellung des Bildungsganges

Name	Jörg Dieter Becker
Geburtsdatum	26.08.1969
Geburtsort	Detmold
Grundschule	Grundschule Bültmannshof in Bielefeld 01.07.1976 bis 30.06.1980
Gymnasium	Max-Planck-Gymnasium in Bielefeld 01.07.1980 bis 05.05.1989 Abschluß: Abitur
Wehrdienst	2./272 in Wildeshausen 01.06.1989 bis 31.08.1990
Studium	Diplomstudiengang Biologie an der Universität Bielefeld Grundstudium: 01.10.1990 bis 10.10.1992 Abschluß: Vordiplom Hauptfach: Biologie Nebenfächer: Chemie, Physik Hauptstudium: 11.10.1992 bis 14.08.1996 Abschluß: Diplom Prüfungsfächer: Allgemeine Biologie Chemie Molekularbiologie und Genetik Diplomarbeit: Expression von Knöllchenproteinen der Ackerbohne <i>Vicia faba</i> L. in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der Proteine zur Gewinnung von Antikörpern
Promotion	Promotionsstudium Biologie an der Universität Bielefeld Beginn: 01.09.1996 Thema der Arbeit: Lokalisierung und Funktionsanalyse von Symbiose-relevanten Proteinen der Ackerbohne <i>Vicia faba</i> L.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, daß ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Carcavelos, den 05.01.2001

Jörg D. Becker

Ich versichere, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der zitierten Hilfsmittel angefertigt habe.

Carcavelos, den 05.01.2001

Jörg D. Becker

INHALTSVERZEICHNIS

A. ZUSAMMENFASSUNG	1
B. EINLEITUNG	2
B.1 Die Rhizobien-Leguminosen Symbiose	2
B.1.1 Die biologische Stickstofffixierung	2
B.1.2 Ein molekularer Signalaustausch führt zur Initiation von Wurzelknöllchen	3
B.1.3 Organogenese und histologische Struktur indeterminierter Wurzelknöllchen	5
B.1.4 Expression pflanzlicher Gene in Wurzelknöllchen	8
B.2 Die arbuskuläre Mykorrhizasymbiose	11
B.2.1 Bedeutung und Formen der Mykorrhizasymbiose	11
B.2.2 Entwicklung von arbuskulären Mykorrhizen	12
B.2.3 Molekulare Veränderungen bei der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza	15
B.3 Gemeinsamkeiten der arbuskulären Mykorrhiza und der Rhizobien-Leguminosen Symbiose	16
B.4 Analyse Symbiose-spezifisch exprimierter Gene der Ackerbohne <i>Vicia faba</i> L.	19
B.4.1 Das frühe Nodulin VfENOD18	21
B.4.2 Die modularen Noduline VfNOD28/32	22
B.4.3 Das Nodulin VfNOD32	23
B.4.4 Das Leghämoglobin VfLb29	23
B.4.5 Das Protein VfCaMBP1	23
B.5 Ca²⁺, Calmodulin und Calmodulin-bindende Proteine in Pflanzen	24
B.6 Ziele der Dissertation	27
B.7 Publikationen	28
B.7.1 Referierte Publikationen	28
B.7.2 Buchbeiträge	28
C. MATERIAL	29
C.1 Chemikalien, Verbrauchsmittel, Geräte, Enzyme & Kits	29
C.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel	29
C.1.2 Geräte	31
C.1.3 Enzyme & Kits	32
C.2 Pflanzenmaterial, cDNA-Genbanken, Plasmide und Bakterienstämme	33
C.2.1 Pflanzenmaterial	33
C.2.2 cDNA-Genbanken	33
C.2.3 Plasmide	33
C.2.4 Bakterienstämme	34

C.3 Nährmedien und Zusätze	34
C.3.1 Nährmedien	34
C.3.2 Zusätze	35
C.4 Primer für PCR-Reaktionen und synthetische Peptide	35
C.4.1 Primer für PCR-Reaktionen	35
C.4.2 Synthetische Peptide	35
C.5 Puffer und Lösungen	35
C.5.1 DNA-Puffer	35
C.5.2 Puffer und Lösungen zur Isolierung und Reinigung von DNA	35
C.5.3 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	37
C.5.4 Puffer und Lösungen für Enzym-Reaktionen	37
C.5.5 Puffer für die CaCl ₂ -Transformation	38
C.5.6 Puffer und Lösungen zur Isolierung von Proteinen	39
C.5.7 Puffer und Lösungen für die analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE)	39
C.5.8 Puffer und Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie von His-Tag-Fusionsproteinen	40
C.5.9 Puffer und Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie und den Faktor Xa-Verdau von MBP-Fusionsproteinen	40
C.5.10 Puffer und Lösungen für die präparative diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (präparative SDS-DISKPAGE)	41
C.5.11 Puffer für das Protein-Sequenzierblotting	41
C.5.12 Puffer für die Gesamtproteinextraktion aus Pflanzengeweben	42
C.5.13 Puffer für die Isolierung von Calmodulin	42
C.5.14 Puffer für den Calmodulin Retardationstest	42
C.5.15 Puffer für Nukleotid-Bindetests (Photomarkierung)	43
C.5.16 Puffer und Lösungen für den ATPase Aktivitätstest	43
C.5.17 Puffer für den ⁴⁵ Ca ²⁺ -Bindungstest	43
C.5.18 Puffer für die Aufreinigung von Antikörpern	43
C.5.19 Puffer und Lösungen für Immunoblotting-Verfahren	44
C.5.20 Puffer und Lösungen für den immunologischen Tissue-Print	45
C.5.21 Puffer und Lösungen für die Immuncytochemie	45
C.6 Antikörper	46
D. METHODEN	47
D.1 Pflanzenanzucht	47
D.2 Anzucht und Konservierung von Bakterienstämmen	47
D.2.1 Bakterienanzucht und Bestimmung des Gesamttiters	47
D.2.2 Konservierung von Bakterienstämmen	47

D.3 Genetische Methoden	47
D.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA	47
D.3.1.1 HB-Lyse (Mini-Präparation von Plasmid-DNA)	47
D.3.1.2 Sequenzierlyse (Midi-Präparation von Plasmid-DNA)	48
D.3.1.3 Gesamt-DNA Isolierung aus pflanzlichen Geweben	49
D.3.2 Reinigung, Quantifizierung und Darstellung von DNA	49
D.3.2.1 Ethanol- und Isopropanolfällung von DNA	49
D.3.2.2 Quantifizierung von DNA	49
D.3.2.3 Darstellung von DNA - die Agarosegelelektrophorese	49
D.3.3 <i>in vitro</i> -DNA-Manipulationen	50
D.3.3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
D.3.3.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	51
D.3.3.3 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten	52
D.3.3.4 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	52
D.3.3.5 DNA-Ligation	52
D.3.4 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten	52
D.3.5 DNA-Transfermethoden für <i>E. coli</i>	53
D.3.5.1 Transformation CaCl ₂ -behandelter kompetenter <i>E. coli</i>	53
D.3.5.2 Elektroporation von <i>E. coli</i>	54
D.4 Biochemische Methoden	55
D.4.1 Protein-Expression in <i>E. coli</i> und Gesamtproteinextraktion	55
D.4.1.1 Expression in <i>E. coli</i>	55
D.4.1.2 Zellernte und Gesamtproteinextraktion von cytoplasmatischen Proteinen	56
D.4.1.3 Zellernte und Gesamtproteinextraktion von periplasmatischen Proteinen	56
D.4.1.4 Probenvorbereitung für die analytische SDS-DISKPAGE	56
D.4.2 Analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE)	57
D.4.2.1 Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Minigele)	57
D.4.2.2 Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf	58
D.4.2.3 Färbung der Proteine und Dokumentation	58
D.4.2.4 Konservierung von PAA-Gelen	59
D.4.3 Pilot-Experimente zur Bindungsfähigkeit von Fusionsproteinen	59
D.4.3.1 Pilot-Experiment mit His-Tag Fusionsproteinen	59
D.4.3.2 Pilot-Experiment mit MBP-Fusionsproteinen	60
D.4.4 Affinitäts-Chromatographie von His-Tag-Fusionsproteinen	60
D.4.4.1 Vorbereitung des Aufschlusses und der Chromatographie	60
D.4.4.2 Affinitäts-Chromatographie	61
D.4.4.3 Regeneration des Ni-NTA-Harzes	61
D.4.5 Affinitäts-Chromatographie von MBP-Fusionsproteinen	61
D.4.5.1 Vorbereitung des Aufschlusses und der Chromatographie	61
D.4.5.2 Affinitäts-Chromatographie	62
D.4.5.3 Regeneration des Amylose-Harzes	62
D.4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford-Test	62
D.4.7 Gelfiltration mit Sephacryl S-200 HR	63
D.4.8 Faktor Xa-Verdau	64

D.4.9	Präparative diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (präparative SDS-DISKPAGE)	64
D.4.9.1	Optimierung der Laufbedingungen	64
D.4.9.2	Gießen des präparativen Gels und Aufbau der Prep Cell	65
D.4.9.3	Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf	65
D.4.10	Proteinkonzentrierung durch Ultrafiltration	66
D.4.11	Protein-Sequenzierblotting	66
D.4.12	Gesamtproteinextraktion aus Pflanzengewebe	67
D.4.13	Isolierung von Calmodulin aus <i>Vicia faba</i> Blättern	67
D.4.13.1	Herstellung einer Fluphenazin-Affinitätsmatrix	68
D.4.13.2	Acetonextraktion von Gesamtproteinen aus Blättern	68
D.4.13.3	Aufreinigung von Calmodulin	68
D.4.14	Calmodulin Retardationstest in einem harnstoffhaltigen PAA-Gel	69
D.4.15	Nukleotid-Bindetests (Photomarkierung)	69
D.4.16	ATPase Aktivitätstest	70
D.4.17	⁴⁵ Ca ²⁺ -Bindungstest	70
D.5	Immunologische Methoden	71
D.5.1	Gewinnung von Antikörpern	71
D.5.2	Aufreinigungen von Antikörpern	71
D.5.2.1	Affinitäts-chromatographische Aufreinigung von Antikörpern	71
D.5.2.2	Aufreinigung von Antikörpern an Nitrocellulose-Streifen	73
D.5.3	Immunoblotting-Verfahren	74
D.5.3.1	Western Blot	74
D.5.3.2	Dot Blot	76
D.5.3.3	Slot Blot für Calmodulin-Bindungstest	76
D.5.4	Immunologischer Tissue-Print	77
D.5.4.1	Proteintransfer durch Tissue-Print	77
D.5.4.2	Immunologische Detektion transferierter Proteine	78
D.5.4.3	Histologische Charakterisierung des Gewebeschnitts	78
D.5.5	Immuncytochemie	78
D.5.5.1	Einbetten in Acrylharz	79
D.5.5.2	Ultra-Dünnschnitte und subzelluläre Lokalisation am TEM	79
D.5.5.3	Semi-Dünnschnitte und zelluläre Lokalisation am Lichtmikroskop	80
D.6	Photographische Dokumentation	80
D.7	Computeranalysen	81
D.7.1	Auswahl von Oligonukleotiden	81
D.7.2	Analyse von DNA-Sequenzen	81
D.7.3	Analyse von Aminosäuresequenzen	81
E.	ERGEBNISSE	82
E.1	Das Nodulin VfENOD18	82
E.1.1	Nebenaktivitäten des VfENOD18-Antiserums erforderten seine Aufreinigung an rekombinantem MBP-VfENOD18 Fusionsprotein	82

E.1.2	VfENOD18-Antikörper detektieren immunoreaktive Proteine in Knöllchenextrakten verschiedener Leguminosen mit indeterminierten Knöllchen, aber auch in nicht-symbiontischen Geweben von <i>Glycine max</i> und in Geweben von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Zea mays</i>	83
E.1.3	Mittels Immunogoldmarkierung wurde das Nodulin VfENOD18 im Cytoplasma infizierter Zellen der Stickstoff fixierenden Zone von Ackerbohnenknöllchen lokalisiert	85
E.1.4	Die VfENOD18-Sequenz ist homolog zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher ESTs und zum ATP-bindenden Protein Mj0577 aus <i>Methanococcus jannaschii</i>	86
E.1.5	Das Nodulin VfENOD18 ist ein ATP-bindendes Protein	90
E.1.6	Die mutmaßlich an der ATP-Bindung von VfENOD18 beteiligten C-terminalen Sequenzmotive sind in homologen Proteinen von <i>Lens culinaris</i> , <i>Vicia hirsuta</i> , <i>Vicia sativa</i> und <i>Vicia villosa</i> konserviert	91
E.2	Die modularen Noduline VfNOD28/32	93
E.2.1	Expression des Fusionsproteins His-VfNOD32a in <i>E. coli</i> und Aufreinigung des Fusionsproteins zur Gewinnung polyklonaler Antikörper	93
E.2.2	VfNOD32a-E15 Antikörper detektieren Proteine in Knöllchenextrakten von <i>Vicia faba</i> und <i>Vicia sativa</i>	98
E.2.3	Die subzelluläre Lokalisierung von VfNOD32a zeigt Immunogoldmarkierungen im Cytoplasma, dem Peribakteroidraum und den Bakteroiden infizierter Zellen	102
E.2.4	VfNOD32a kann Ca ²⁺ -Ionen binden	103
E.3	Das Nodulin VfNOD32	104
E.3.1	Aufgereinigte VfNOD32-Antikörper detektieren VfNOD32 im Cytoplasma von Zellen der Interzone II-III und der Stickstoff fixierenden Zone III von <i>Vicia faba</i> Knöllchen	104
E.4	Das Leghämoglobin VfLb29	108
E.4.1	Ein aufgereinigter VfLb29-Peptid-Antikörper detektiert rekombinantes VfLb29 aus <i>E. coli</i> , aber in Gesamtproteinextrakten aus <i>Vicia faba</i> Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln ist kein VfLb29 nachweisbar	108
E.5	Das Protein VfCaMBP1	113
E.5.1	Die VfCaMBP1-Sequenz ist homolog zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen pflanzlicher Calmodulin-bindender Proteine	113
E.5.2	Die potentielle VfCaMBP1 CaM-Bindedomäne weist eine basische amphiphatische Helix und ein 1-8-14 B Motiv auf	116
E.5.3	Ein aufgereinigter VfCaMBP1-Antikörper detektiert rekombinantes VfCaMBP1 aus <i>E. coli</i> , aber in Gesamtproteinextrakten aus <i>Vicia faba</i> Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln ist kein VfCaMBP1 nachweisbar	117
E.5.4	Calmodulin aus <i>Vicia faba</i> kann spezifisch an His-VfCaMBP1ΔN binden	119
E.5.5	Calmodulin bindet VfCaMBP1 an der potentiellen CaM-Bindedomäne	122

F. DISKUSSION	124
F.1 Das ATP-bindende Nodulin VfENOD18	125
F.1.1 In Leguminosen der Triben Trifolieae, Viciae und Hedysareae mit caesalpinioider oder crotalarioider Knöllchenform bilden Noduline vom Typ ENOD18 eine Proteinfamilie, deren korrespondierende Gene vermutlich aus allgemeinen Pflanzengen zu Nodulin-Genen evolvierten	125
F.1.2 VfENOD18 hat eine Funktion in der funktionellen Phase des Knöllchens im Cytoplasma der infizierten Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III	128
F.1.3 VfENOD18 ist ein ATP-bindendes Nodulin und ein neues, pflanzliches Mitglied der bakteriellen „Mj0577 Superfamilie“	129
F.2 Die Ca²⁺-bindenden modularen Noduline VfNOD28/32	130
F.2.1 Das Fusionsprotein His-VfNOD32a ist ein stark saures Protein mit anormalem Laufverhalten in der SDS-DISKPAGE	130
F.2.2 Das Knöllchen-spezifische, modulare Nodulin VfNOD32a wird in einzelnen Knöllchen einer Ackerbohne unterschiedlich stark exprimiert	131
F.2.3 VfNOD32a-immunoreaktive Proteine können in Knöllchen von <i>Vicia sativa</i> nachgewiesen werden	132
F.2.4 Fungieren die modularen Noduline als Ca ²⁺ -bindende Proteine im Peribakteroidraum?	133
F.2.5 Ausblick auf weiterführende Arbeiten zu den modularen Nodulinen	135
F.3 Das Nodulin VfNOD32	135
F.3.1 VfNOD32 kommt eine vermutlich nicht essentielle Funktion in der Stickstoff fixierenden Zone von Ackerbohnenknöllchen zu	135
F.4 Das Leghämoglobin VfLb29	136
F.4.1 VfLb29 kann mit einem VfLb29-Peptid spezifischen Antikörper in <i>Vicia faba</i> Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln nicht nachgewiesen werden	137
F.4.2 Ausblick auf weiterführende Arbeiten zu VfLb29	138
F.5 Das Calmodulin-bindende Protein VfCaMBP1	138
F.5.1 Charakterisierung der Calmodulin-bindenden Domäne von VfCaMBP1	139
F.5.2 Kein Nachweis von VfCaMBP1-Protein in <i>Vicia faba</i> - stark begrenzte Expressionszeiträume, posttranskriptionale Regulation oder Proteolyse?	140
F.5.3 Mögliche Funktionen von VfCaMBP1	141
F.5.4 Ausblick auf weiterführende Arbeiten zu VfCaMBP1	142
F.6 Resümee	144
G. ABKÜRZUNGEN	145
H. LITERATUR	147
DANKSAGUNG	163

A. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden erstmals Gene der Ackerbohne *Vicia faba* L., die in der Rhizobien-Leguminosen und der arbuskulären Mykorrhizasymbiose spezifisch oder amplifiziert exprimiert werden, auf Proteinebene charakterisiert. Neben den ausschließlich in den Wurzelknöllchen vorkommenden Proteinen VfENOD18, VfNOD28/32 und VfNOD32 wurden Proteine untersucht, die von dem Mykorrhiza-amplifiziert exprimierten Gen VfCaMBP1 und dem in beiden Symbiosen der Ackerbohne spezifisch exprimierten Leghämoglobingen VfLb29 kodiert werden. Im einzelnen wurden immunologische Lokalisationsstudien an longitudinalen Dünnschnitten von Wurzelknöllchen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie durchgeführt. Die eingesetzten polyklonalen Antikörper wurden durch Immunisierungen mit heterolog exprimierten Fusionsproteinen oder mit synthetischen Peptiden gewonnen. Bei Hinweisen auf eine mögliche Funktion der Symbiose-relevanten Proteine schlossen sich biochemische Funktionsanalysen an.

Homologievergleiche zeigten, dass das Nodulin **VfENOD18** als neues, pflanzliches Mitglied der bakteriellen „Mj0577 Superfamilie“ angesehen werden kann. Als ATP-bindendes Protein im Cytoplasma von infizierten Zellen der Stickstoff fixierenden Zone ist es möglicherweise an der Signaltransduktion im symbiontischen Gewebe beteiligt. Western Blot Studien und PCR-Experimente deuten auf eine Proteinfamilie für Noduline vom ENOD18-Typ in Leguminosen der Triben Trifolieae, Viciaeae und Hedysareae mit caesalpinioider oder crotalarioider Knöllchenform hin. Die modularen Noduline **VfNOD28/32** können Ca^{2+} -Ionen binden und, da sie wahrscheinlich im Peribakteroidraum lokalisiert sind, möglicherweise den Transport des fixierten Stickstoffs vom Mikro- zum Makrosymbionten beeinflussen. Zumindest für die Isoform VfNOD32a konnte zudem eine unterschiedlich starke Abundanz in einzelnen Knöllchen nachgewiesen werden. Die Genprodukte der Knöllchen- und Mykorrhiza-spezifisch bzw. Mykorrhiza-amplifiziert exprimierten Gene VfLb29 und VfCaMBP1 konnten bisher in Wurzelknöllchen und mykorrhizierten Wurzeln der Ackerbohne nicht detektiert werden, so dass in beiden Fällen eine restriktive zeitliche und örtliche Regulation der Genexpression oder der Proteinsynthese angenommen werden kann. Auf biochemischer Ebene konnte **VfCaMBP1** experimentell als Calmodulin-bindendes Protein identifiziert und seine Calmodulin-bindende Domäne bestimmt werden. Es ist somit das erste Calmodulin-bindende Protein, das in der arbuskulären Mykorrhizasymbiose amplifiziert exprimiert wird. Mittels einer potentiellen Kernlokalisationssequenz könnte es in den Zellkern gelangen und dort eine Funktion im Zusammenhang mit einer Ca^{2+} -Calmodulin vermittelten Signaltransduktion erfüllen.

B. EINLEITUNG

Seit der Besiedlung des terrestrischen Ökosystems haben Pflanzen zahlreiche Strategien entwickelt, die unterschiedlichen biotischen und abiotischen Herausforderungen zu meistern, die sich aus ihrem seßhaften Lebenszyklus ergeben. Eine der erfolgreichsten Strategien ist dabei die Fähigkeit von Wurzelsystemen, mutualistische und beiderseits vorteilhafte symbiontische Verbindungen mit Mikroorganismen einzugehen. Zu den wichtigsten Symbiosen zählen in diesem Zusammenhang die arbuskuläre Mykorrhiza (AM), eine symbiontische Verbindung, die die allermeisten Pflanzen mit Pilzen der Ordnung *Glomales* eingehen, und die Rhizobien-Leguminosen Symbiose, bei der Bodenbakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* und *Azorhizobium* mit Pflanzen der Ordnung *Fabales* (Leguminosen) symbiontisch interagieren. Die Fähigkeit der Leguminosen, sowohl eine AM als auch eine Symbiose mit diesen Bodenbakterien ausbilden zu können, machen sie zu einem geeigneten Untersuchungsobjekt für die molekularbiologische Analyse beider Symbiosearten, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche gemeinsame genetische Grundlage für die beiden Symbiosen. Im Folgenden werden nach einer Vorstellung der Physiologie und der Entwicklungsstadien sowie der zur Zeit bekannten genetischen Grundlagen der beiden Symbiosen diese miteinander verglichen, bevor die bisherigen Erkenntnisse zu diesen Symbiosen für das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit, die Ackerbohne *Vicia faba* L., im Detail erläutert werden.

B.1 Die Rhizobien-Leguminosen Symbiose

B.1.1 Die biologische Stickstofffixierung

Die Erdatmosphäre besteht zu 80 % aus molekularem Stickstoff (N_2). Allerdings ist diese Stickstoffquelle auf Grund der großen Stabilität des N_2 -Moleküls für die meisten der Organismen nicht direkt verwertbar, obwohl sie Stickstoff in relativ großen Mengen als Bestandteil von Aminosäuren, Nukleotiden und anderen organischen Verbindungen benötigen. Autotrophe Organismen beziehen daher den von ihnen benötigten Stickstoff hauptsächlich aus dem Boden, wo er in Form von Nitrat (NO_3^-) aufgenommen wird und anschließend in die für die Assimilation erforderliche reduzierte Form des Ammoniums (NH_4^+) überführt wird.

Eine kleine Anzahl von prokaryontischen Organismen sind aber auf Grund ihres Nitrogenase-Enzymsystems zur biologischen Stickstofffixierung befähigt. Hierbei katalysiert das Nitrogenase-Enzymsystem die Spaltung der energiereichen Dreifachbindung im N_2 -Molekül, so dass der atmosphärische Stickstoff zu biologisch nutzbarem Ammonium reduziert wird. Neben freilebenden Stickstofffixierern, wie zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum* und *Azotobacter* sowie photosynthetisch aktiven Formen wie *Rhodobacter capsulatus* und auch einigen Cyanobakterien, gibt es einige Prokaryonten, die in einer Symbiose mit Pflanzen Luftstickstoff fixieren können. Zu dieser Gruppe der symbiontischen

Stickstofffixierer gehört zum Beispiel die Gemeinschaft des Cyanobakteriums *Anabaena* mit dem Wasserfarn *Azolla* oder auch die *Actinomyceten* der Gattung *Frankia*, die unter anderem eine Symbiose mit *Alnus* (Erlen)-Arten eingehen (Pawlowski, 1997).

Zu den bisher am besten untersuchten Symbiosen von Stickstofffixierern mit Pflanzen zählt die Rhizobien-Leguminosen Symbiose. Das charakteristische Merkmal dieser Wechselbeziehung sind die Spross- oder Wurzelknöllchen, die vom Makrosymbionten als symbiontische Organe ausgebildet und von den Mikrosymbionten kolonisiert werden. Die Leguminose versorgt die Bakterien mit energiereichen Kohlenstoff-Verbindungen, die Mikrosymbionten stellen der Pflanze stickstoffhaltige Verbindungen zur Verfügung. Somit erlaubt es diese Symbiose den Leguminosen, auch auf stickstoffarmen Böden zu wachsen. Hieraus resultiert die große landwirtschaftliche Bedeutung dieser Pflanzengruppe, zu der unter anderem so wichtige Nutzpflanzen wie die Sojabohne (*Glycine max*), die Ackerbohne (*Vicia faba*), die Luzerne (*Medicago sativa*) und die Erbse (*Pisum sativum*) gehören.

Die genetischen Grundlagen der entwicklungsbiologischen Abläufe, die zur Ausbildung der Wurzelknöllchen führen, wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Großen Fortschritten bei Fragen der Symbiose-spezifischen Genexpression des Mikrosymbionten (Fischer, 1994; Long, 1989; van Rhijn und Vanderleyden, 1995), stehen noch viele offene Fragen auf der Seite der Knöllchen-spezifischen Genexpression der Wirtspflanze gegenüber. Forschungsschwerpunkte sind hier die Identifizierung, Charakterisierung und Lokalisierung Knöllchen-spezifischer Proteine und die Promotor-Analyse der korrespondierenden Gene (siehe Übersichtsartikel von Bladergroen und Spaink, 1998; Cohn *et al.*, 1998; Franssen *et al.*, 1992; Gualtieri und Bisseling, 2000; Mylona *et al.*, 1995; Schultze und Kondorosi, 1998; Verma *et al.*, 1992).

B.1.2 Ein molekularer Signalaustausch führt zur Initiation von Wurzelknöllchen

Am Beginn der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen steht ein wechselseitiger molekularer Signalaustausch (Abbildung B.1). So werden in dieser frühen Phase der Interaktion, der Präinfektionsphase, im Bereich des sich entwickelnden Wurzelsystems der Pflanze unter anderem Flavonoide ausgeschieden, die als chemotaktische Signale für die Mikrosymbionten dienen (Bladergroen und Spaink, 1998; Broughton und Perret, 1999). Durch die Flavonoide wird auch die Transkription bakterieller Nodulationsgene (*nod*-Gene) induziert, wobei dieser Vorgang durch das Genprodukt des *nodD*-Gens eingeleitet wird, welches im Unterschied zu den anderen *nod*-Genen konstitutiv exprimiert wird (Fisher und Long, 1992). Nachdem das NodD-Protein wirtsspezifische Flavonoide gebunden hat (Goethals *et al.*, 1992), kann es als Transkriptionsaktivator auf weitere Gene des *nod*-Operons wirken, deren Genprodukte an der Synthese spezifischer Signalmoleküle der Mikrosymbionten, den sogenannten Nodulationsfaktoren (NOD-Faktoren), beteiligt sind. Diese Faktoren bestehen aus einem Chitoooligosaccharid-Grundgerüst aus drei bis sechs α -1-4-glykosidisch verknüpften N-acetyl-D-Glucosaminresten, das am nicht reduzierenden Ende eine ungesättigte

C16- oder C18-Fettsäure trägt und an bestimmten Stellen spezifische Substituenten aufweist (Ardourel *et al.*, 1994 ; Kamst *et al.*, 1998). Strukturelle Unterschiede der NOD-Faktoren, wie zum Beispiel die Länge und der Sättigungsgrad der angehängten Fettsäuren oder auch das Vorhandensein verschiedener Substituenten im Grundgerüst des NOD-Faktors bestimmen die bakterielle Wirtsspezifität (Cohn *et al.*, 1998; Downie, 1994; Spaink, 1994).

Für *M. sativa* und *P. sativum* konnte gezeigt werden, dass NOD-Faktoren in extrem geringen Konzentrationen (10^{-8} bis 10^{-12} mol/l) eine Reaktivierung des Zellzyklus von Zellen des inneren Wurzelkortex, die gegenüber den Protoxylemsträngen liegen, auslösen können. Im Allgemeinen haben Rhizobien einen relativ engen Wirtsbereich. So ist zum Beispiel die Spezies *R. leguminosarum* bv. *viciae* ausschließlich zur Nodulation von Pflanzen der Gattungen *Vicia* und *Pisum* befähigt, wohingegen *Rhizobium meliloti* auf eine Nodulation von *Medicago*-, *Melilotis*- und *Trigonella*-Spezies beschränkt ist (Lerouge, 1994). Die Zellen des inneren Kortex der Wurzel sind normalerweise ausdifferenziert und im Übergang von der G0- zur G1-Phase des Zellzyklus arretiert (Yang *et al.*, 1994). Die Meristematisierung dieser Zellen führt zur Ausbildung eines Knöllchenprimordiums. Gleichzeitig beginnt mit der Adsorption der Rhizobien an den Wurzelhaaren die sogenannte Infektionsphase (Abbildung B.1). Im Bereich des direkten Zell-Zell-Kontaktes kommt es zu einer typischen Wurzelhaarkrümmung mit der Folge, dass die Bakterien von der pflanzlichen Cytoplasmamembran umschlossen werden. Aus der Invagination dieser Membran und der Auflagerung pflanzlichen Zellwandmaterials resultiert der Infektionsschlauch, durch den die teilungsaktiven Bakterien in die Wurzel eindringen (Brewin, 1991; Kijne, 1992). Cytoplasmastränge und Kerne der Zellen des Wurzelkortex richten sich radial aus und erschaffen so eine Präinfektionsstruktur, an der der Infektionsschlauch in Richtung des Knöllchenprimordiums entlang wachsen kann (Van Brussel *et al.*, 1992).

Durch die Analysen Symbiose-defekter Rhizobienmutanten konnte die besondere Bedeutung bakterieller Oberflächenstrukturen für eine erfolgreiche Infektion demonstriert werden (Kannenbergh und Brewin, 1994). Insbesondere Exopolysaccharide scheinen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung des Mikrosymbionten durch die Pflanze zu spielen, was zu der Hypothese führte, dass von Oberflächenstrukturen des Mikrosymbionten abgeleitete Substanzen als Suppressoren der Pflanzenabwehr wirken (Niehaus und Becker, 1998; Niehaus *et al.*, 1993).

Hat der sich verzweigende Infektionsschlauch das Knöllchenprimordium erreicht, so wird im apikalen Bereich des Primordiums das Knöllchenmeristem angelegt. Abhängig von der Dauer der Teilungsaktivität dieses Meristems wird zwischen zwei verschiedenen Knöllchentypen unterschieden (Newcomb und Tandon, 1981). Die globulären determinierten Knöllchen tropischer Leguminosen wie *Phaseolus vulgaris* und *G. max* verfügen über ein nur zeitweise aktives Meristem und weisen daher im differenzierten Zustand eine fixierte Anordnung von Geweben auf (Brewin, 1991; Taté *et al.*, 1994). Bei den indeterminierten Wurzelknöllchen von Leguminosengattungen gemäßiger Zonen, zum Beispiel von *Vicia*, *Pisum* und *Medicago*,

bleibt hingegen das Apikalmeristem während der gesamten Funktionsphase des Knöllchens aktiv. In Abbildung B.1 sind die frühen Phasen der Organogenese determinierter und indeterminierter Knöllchen zusammengefasst.

B.1.3 Organogenese und histologische Struktur indeterminierter Wurzelknöllchen

Aufgrund der fortgesetzten Teilungen des Apikalmeristems entwickeln sich im indeterminierten Wurzelknöllchen zwei verschiedene Gewebetypen: das zentrale symbiontische Gewebe und das periphere Gewebe. Im peripheren Knöllchengewebe, das ausschließlich aus nicht infizierten Zellen besteht, können das innen liegende Knöllchenparenchym mit den Leitbündeln und der außen liegende Knöllchenkortex unterschieden werden (Abbildungen B.1 und B.2). Eine Knöllchenendodermis, die mit der Wurzelendodermis verbunden ist, trennt Kortex und Parenchym des Knöllchens (Brewin, 1991; Nap und Bisseling, 1990). Das Knöllchenparenchym ist als Diffusionsbarriere daran beteiligt, die Konzentration an freiem Sauerstoff im zentralen Knöllchengewebe gering zu halten, was essentiell für die Aktivität des Nitrogenase-Enzymsystems der Mikrosymbionten ist (Nap und Bisseling, 1990), da Sauerstoff den Nitrogenase-Cofaktor irreversibel denaturieren würde.

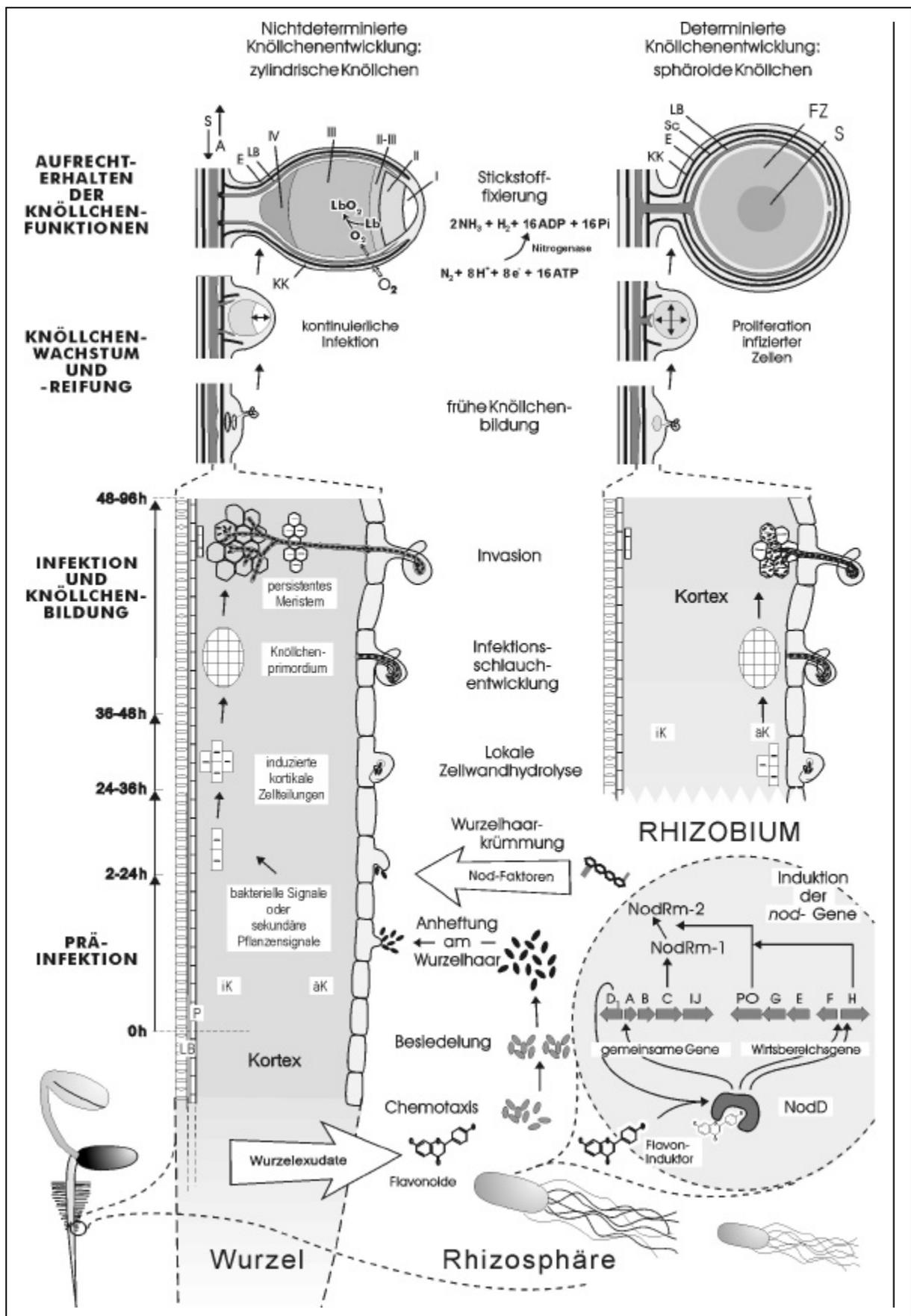
Abbildung B.1 (folgende Seite): Hauptstadien der Organogenese eines indeterminierten und eines determinierten Wurzelknöllchens.

Die aufeinander folgenden Stadien der Organogenese von indeterminierten und determinierten Wurzelknöllchen sind von der Chemotaxis des Mikrosymbionten bis zur Ausbildung eines reifen Knöllchens dargestellt (entsprechend der Differenzierung der Wurzel folgt man der Zeichnung von unten nach oben).

Rhizobien werden durch Wurzelexudate chemotaktisch angelockt und besiedeln den Wurzelraum. Im Exudat enthaltene phenolische Signalmoleküle (*nod*-Induktoren) induzieren die *nod*-Gen Transkription des homologen Rhizobienstammes, der daraufhin wirtsspezifische Chitooligosaccharid-Moleküle, sog. NOD-Faktoren synthetisiert. Die Rhizobien heften sich an junge Wurzelhaare an. Das Wurzelhaar krümmt sich unter dem Einfluß der rhizobiellen NOD-Faktoren und schließt die Rhizobienkolonie in einer Tasche ein. Nach Abbau der Wirtszellwand dringen die Rhizobien über eine neusynthetisierte tunnelähnliche Struktur, den sog. Infektionsschlauch, in das Wurzelhaar ein und weiter in das darunterliegende Gewebe. Zugleich teilen sich Wirtszellen - angeregt durch den NOD-Faktor, oder ein sekundäres Pflanzensignal - im inneren bzw. äußeren Wurzelkortex (iK; äK; indeterminierter bzw. determinierter Knöllchentyp). Nach Erreichen dieser Zellen werden Rhizobien aus den Infektionsschläuchen in die jungen Wirtszellen entlassen. Während die infizierten Zellen im Fall des nicht-determinierten Knöllchentyps ihre Teilungsfähigkeit verlieren und sich ein neues Meristem im distalen Cortex bildet, teilen sich die infizierten Zellen beim determinierten Knöllchentyp samt den Rhizobien noch einige Tage und bilden so das infizierte Knöllchengewebe. Das neu induzierte Meristem der nichtdeterminierten Knöllchen bleibt dagegen bestehen und ist stets bakterienfrei. Nach proximal proliferierte Zellen werden von den Infektionsschläuchen kontinuierlich infiziert. Die ins Wirtscytoplasma entlassenen Rhizobien differenzieren zu reifen Bakteroiden, die atmosphärischen Stickstoff fixieren. Zum Schutz der O₂-empfindlichen rhizobiellen Nitrogenase herrschen im zentralen Knöllchengewebe mikroaerobe Verhältnisse. Diese stellen sich aufgrund der Knöllchenstruktur und der hohen Stoffwechselaktivität im symbiotischen Gewebe ein. Leghämoglobin (Lb), ein wirtssynthetisiertes Hämoprotein, versorgt die aeroben Bakterioide mit Sauerstoff. Von den Bakteroiden zu Ammoniak reduzierter Luftstickstoff wird in eine geeignete Transportform (A) umgewandelt und über das Phloem der Leitbündel in das übrige Pflanzengewebe exportiert, umgekehrt wird Saccharose (S) aus den grünen Pflanzenteilen zur Versorgung des Knöllchens importiert.

Abkürzungen: Knöllchenmeristem (I); Präfixierungszone (II); Interzone (II-III); Fixierungszone (III; FZ); Seneszenzzone (IV; S); Endodermis (E); Knöllchenkortex (KK); innerer Kortex (iK); äußerer Kortex (äK); Leitbündel (LB); Sklerenchym (SC); Pericykel (P); Leghämoglobin (Lb), Asparagin (A), Saccharose (S).

Nach Kapp (1996), modifiziert.



Das zentrale symbiontische Gewebe mit seiner Zonierung ist das charakteristische Gewebe indeterminierter Wurzelknöllchen. Nach Vasse *et al.* (1990) unterscheidet man in Richtung der Knöllchenbasis aufeinander folgend (Abbildung B.2):

- die apikale meristematische Zone I
- die Präfixierungszone II
- die Interzone II-III
- die Stickstoff fixierende Zone III
- die ineffektive Zone III
- die Seneszenzzone IV (in alten Knöllchen)

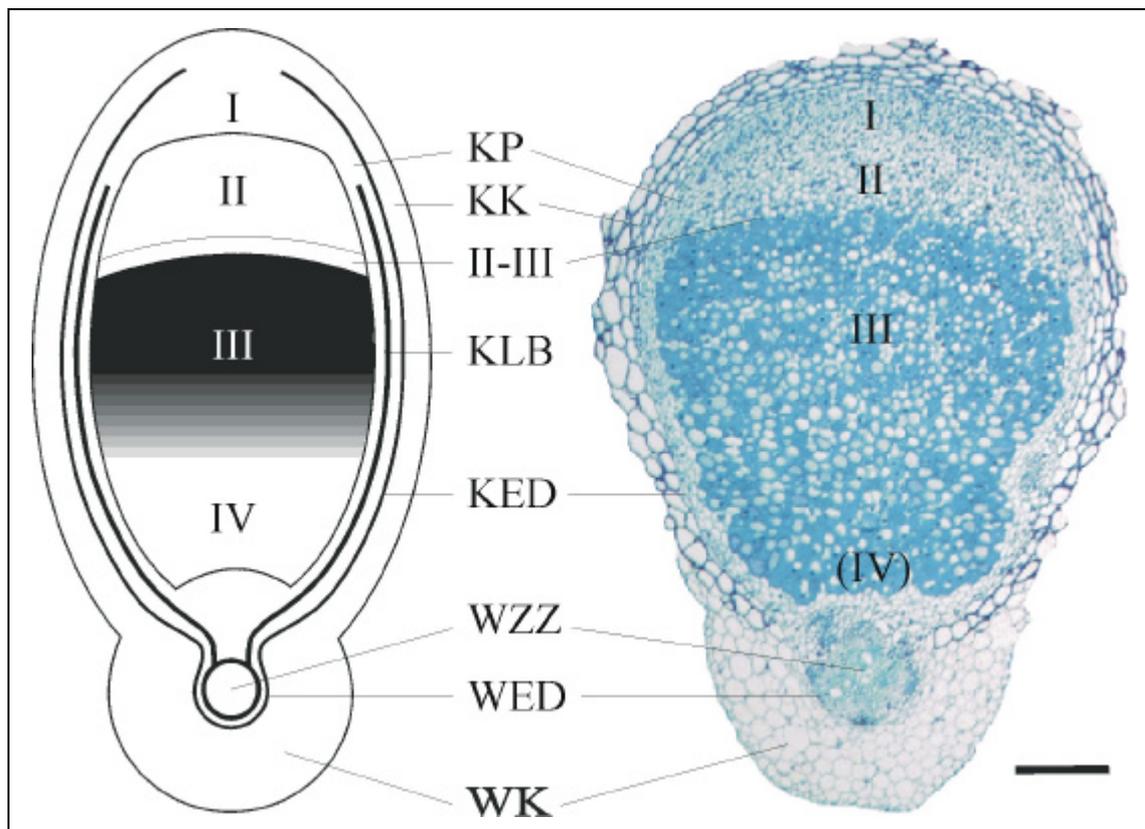


Abbildung B.2: Schematische und lichtmikroskopische Struktur eines indeterminierten Wurzelknöllchens. Die histologischen Strukturen eines medianen Longitudinalschnitts durch ein indeterminiertes Wurzelknöllchen werden anhand einer schematischen Zeichnung und der lichtmikroskopischen Aufnahme eines mit Toluidinblau 0 gefärbten Semi-Dünnschnitts durch ein Ackerbohnenknöllchen gezeigt. Die einzelnen Regionen sind wie folgt gekennzeichnet: KP, Knöllchenparenchym; KK, Knöllchenkortex; KLB, Knöllchenleitbündel; KED, Knöllchenendodermis; WZZ, Wurzelzentralzylinder; WED, Wurzelendodermis; WK, Wurzelkortex. Das zentrale symbiontische Gewebe besteht aus folgenden Zonen: I, meristematische Zone; II, Präfixierungszone; II-III, Interzone; III, Stickstoff fixierende Zone und ineffektive Zone; IV, Seneszenzzone. Der Bereich des Knöllchens, in dem effektiv Stickstoff fixiert wird, ist in der schematischen Darstellung schwarz markiert, eine abnehmende Fähigkeit zur Stickstofffixierung ist durch Graustufen angedeutet. Schematische Darstellung nach Hohnjec (1997).

Etwa die Hälfte aller Zellen im zentralen symbiontischen Gewebe werden von den Rhizobien infiziert. Die Infektionsschläuche, die teilungsaktive Bakterien enthalten, durchwachsen zunächst die Präfixierungszone II und entlassen im distalen Bereich dieser Zone die Bakterien in

das Cytoplasma der Pflanzenzellen. Dabei bleiben die Mikrosymbionten ähnlich einer Endocytose (Bassett *et al.*, 1977) von einer Membran pflanzlichen Ursprungs, der Peribakteroidmembran (Whitehead und Day, 1997) umschlossen. Der Bereich zwischen dem Mikrosymbionten und der Peribakteroidmembran (PBM) wird als Peribakteroidraum bezeichnet (Brewin, 1991; Franssen *et al.*, 1992). Innerhalb der PBM differenzieren die Bakterien zu endosymbiontischen Bakteroiden, pleomorphen Formen, die ohne weitere Zellteilungen an Größe zunehmen, so dass die infizierten Zellen des zentralen Gewebes am Ende dieses Vorganges dicht mit Bakteroiden angefüllt sind. Die PBM bildet die Schnittstelle zwischen den symbiontischen Partnern, über die Signale und Stoffwechselprodukte ausgetauscht werden und die eine Abwehrreaktion der Pflanze gegen die „intrazellulären“ Bakterien verhindert (Nap und Bisseling, 1990; Verma *et al.*, 1992).

Grundlage der Nomenklatur der einzelnen Knöllchenzonen sind die umfassenden ultrastrukturellen Veränderungen, denen die Bakteroiden während der Ausdifferenzierung der zentralen Knöllchengewebe unterliegen (Vasse *et al.*, 1990). Lediglich Bakterioide der Stickstoff fixierenden Zone III enthalten den Nitrogenase-Enzymkomplex und sind somit in der Lage, molekularen Stickstoff zu fixieren. Der überwiegende Teil des fixierten Stickstoffs diffundiert in Form von Ammonium in das Cytoplasma der Wirtspflanze, wo er assimiliert wird. In Richtung der ineffektiven Zone III und der Seneszenzzone IV nimmt die Fähigkeit der Bakterioide zur Stickstofffixierung deutlich ab (Vasse *et al.*, 1990). Die Präfixierungszone II und die Stickstoff fixierende Zone III werden durch die Interzone II-III getrennt. Dieser Bereich aus nur wenigen Zellschichten stellt eine wichtige Grenzschicht dar, in der entscheidende Schritte der Gewebe- und Bakteroiddifferenzierung kurz vor dem Einsetzen der symbiontischen Stickstofffixierung stattfinden (Franssen *et al.*, 1992; Vasse *et al.*, 1990). So werden zum Beispiel in diesen Zellen die bakteriellen Nitrogenasegene *nifA* und *nifH* dereprimiert (Yang *et al.*, 1991) und von pflanzlicher Seite wird im Luzerneknöllchen die Expression der Leghämoglobin-Gene angeschaltet (de Billy *et al.*, 1991). Die vornehmlich in der Interzone II-III zu findenden stärkehaltigen Amyloplasten erlauben eine eindeutige Identifizierung dieses Gewebes.

B.1.4 Expression pflanzlicher Gene in Wurzelknöllchen

Die Infektion einer Leguminose mit kompatiblen Rhizobien führt zur Synthese spezifischer Transkripte und Genprodukte in der Pflanze. Von besonderem Interesse für die Aufklärung der genetischen Grundlagen der Organogenese von Wurzelknöllchen und der symbiontischen Stickstofffixierung sind dabei diejenigen Transkripte (Delauney und Verma, 1988) und Proteine (Bisseling *et al.*, 1983; Campos *et al.*, 1987; Legocki und Verma, 1980), die ausschließlich oder überwiegend im Knöllchengewebe vorkommen. Nach der ursprünglichen Definition von Legocki und Verma (1980) und van Kammen (1984) werden pflanzliche Proteine, die ausschließlich in den Wurzelknöllchen vorkommen, als Noduline bezeichnet. In Abhängigkeit vom Expressionszeitpunkt der korrespondierenden Gene wird zwischen frühen und späten

Nodulinen unterschieden (Govers *et al.*, 1985; Govers *et al.*, 1987). Als Referenzzeitpunkt dient dabei der Beginn der Stickstofffixierung (Nap und Bisseling, 1990), dem der Startpunkt der Leghämoglobinexpression unmittelbar vorausgeht (Hirsch, 1992). Nach den Nomenklaturregeln von van Kammen (1984) sowie Nap und Bisseling (1990) werden die Transkripte früher Noduline als „ENOD“ und die Transkripte später Noduline als „NOD“ gekennzeichnet. Zusätzlich werden die Initialen der Pflanzengattung (groß) und der Art (klein), aus der die Nodulinsequenzen isoliert wurden, vorangestellt. Kodiert eine Sequenz für ein Nodulin unbekannter Funktion, so wird in der Regel die theoretische molekulare Masse des abgeleiteten Proteins in kD als Endzahl an die Bezeichnung angefügt, in manchen Fällen aber auch nur eine Stamm- oder Labornummer. Ein Transkript, das beispielsweise für ein frühes Nodulin aus *Vicia faba* mit einer theoretischen molekularen Masse von 18 kD kodiert, wäre als VfENOD18 zu bezeichnen. Noduline bekannter Funktion werden in der Regel in Analogie zu den homologen Proteinen benannt.

Den späten Nodulinen können überwiegend Aufgaben in der Funktionsphase des Knöllchens zugeordnet werden. Es handelt sich bei ihnen überwiegend um Enzyme des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus des Knöllchens, die der Energieversorgung des Mikrosymbionten und der Assimilation des gebildeten Ammoniums dienen (Mylona *et al.*, 1995; Verma, 1988). Zu ihnen zählen die Knöllchen-spezifisch bzw. Knöllchen-amplifiziert exprimierten Isoformen der Saccharose-Synthase (Thummler und Verma, 1987), der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Pathirana *et al.*, 1997), der Glutamin-Synthetase (Boron und Legocki, 1993; Marsolier *et al.*, 1995; Roche *et al.*, 1993), der Asparagin-Synthetase (Tsai und Coruzzi, 1990), der Aspartat-Aminotransferase (Gantt *et al.*, 1992) und der Uricase (nur in determinierten Knöllchen; Bergmann *et al.*, 1983; Sánchez *et al.*, 1987). All diese späten Noduline haben eine Funktion, die in unmittelbarem Zusammenhang mit der Energieversorgung der Bakterioide über den Abbau von Kohlenstoffverbindungen zu Dicarbonsäuren steht bzw. sind an der primären Assimilation des fixierten Stickstoffs beteiligt. Zu den am besten untersuchten späten Nodulinen zählen die für die Sauerstoffversorgung der Bakterioide essentiellen Leghämoglobine (Gualtieri und Bisseling, 2000). Diese monomeren Globine, die eine sauerstoffbindende Hämgruppe tragen, machen in der Regel den bei weitem größten Anteil der Knöllchenproteine aus. Ihre Aufgabe besteht einerseits in einer ausreichenden Sauerstoffversorgung der Bakterioide, die in der mikroaeroben Umgebung des Knöllchens eine hochaktive Zellatmung durchführen müssen, um die für die Fixierung des molekularen Stickstoffs nötigen Energieäquivalente bereitstellen zu können (Appleby, 1984; Tjepkema und Winship, 1980). Andererseits gewährleisten die Leghämoglobine gleichzeitig eine geringe Konzentration an freiem Sauerstoff in den infizierten Zellen, was den Nitrogenase-Enzymkomplex vor einer irreversiblen Hemmung schützt (Shaw und Brill, 1977).

Späte Noduline sind auch als Komponenten der Peribakteroidmembran identifiziert worden (Fortin *et al.*, 1985; Verma *et al.*, 1992). Ein bekanntes Beispiel ist das Nodulin-26 der Sojabohne (Fortin *et al.*, 1987), das als Poren-formendes Protein für die Aufnahme von Ionen

oder kleinen Metaboliten verantwortlich sein könnte (Miao und Verma, 1993; Weaver *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zu den späten Nodulinen ist die Rolle der frühen Noduline noch unzureichend untersucht. Gesicherte experimentelle Nachweise von Funktionen liegen bislang noch nicht vor, obwohl frühe Noduline bereits in vielen Leguminosen identifiziert wurden (Schultze und Kondorosi, 1998). Ergebnisse von Expressions- und Lokalisationsexperimenten lassen jedoch darauf schließen, dass sie am Infektionsprozess und an den frühen Stadien der Knöllchenentwicklung beteiligt sind (Bisseling *et al.*, 1991; Franssen *et al.*, 1992; Kouchi und Hata, 1993). Viele der identifizierten Transkripte früher Noduline kodieren für potentielle Zellwandproteine, wodurch die Bedeutung der Abänderungen der Zellwandzusammensetzung während der Infektion und der Knöllchenorganogenese deutlich wird. Zu diesen Nodulinen zählen unter anderem die Prolin-reichen Proteine ENOD2, ENOD5, ENOD10, ENOD11 und PRP4 (Hirsch und LaRue, 1997; Mylona *et al.*, 1995), Extensine (Arsenijevic-Maksimovic *et al.*, 1997), Glycin-reiche Proteine (Küster *et al.*, 1995a; Schröder *et al.*, 1997) und die Peroxidase Rip1 (Cook *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 1996). Die räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster sind für jedes Gen charakteristisch und markieren verschiedene Stadien der Knöllchenentwicklung (Schultze und Kondorosi, 1998).

Zu den frühesten NOD-Faktor-induzierten Markergenen gehören ENOD12 (Bauer *et al.*, 1994; Horvath *et al.*, 1993; Journet *et al.*, 1994) und rip1 (Cook *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 1996), die beide sowohl in Wurzelhaaren als auch in Knöllchenprimordien exprimiert werden. Den ENOD40-Genen der Leguminosen kommt eine Sonderstellung unter den bisher identifizierten und untersuchten Nodulinen zu. Sie könnten eines der Elemente sein, die die Initiation von Knöllchen kontrollieren (Schultze und Kondorosi, 1998). Die Transkripte sind in Knöllchenprimordien stark exprimiert und durch NOD-Faktoren induzierbar (Crespi *et al.*, 1994; Minami *et al.*, 1996; Vijn *et al.*, 1995a). Interessanterweise scheinen ENOD40-Gene nur für ein jeweils 12 bis 13 Aminosäuren kleines Peptid zu kodieren (Vijn *et al.*, 1995b).

Obwohl es zu erwarten ist, dass die Signaltransduktion in Wurzelknöllchen eine ganze Reihe von spezifisch exprimierten Genen erfordert, wurden bisher nur einige wenige Gene mit vermeintlicher Funktion in der Signaltransduktion isoliert. Zu diesen gehören die Gene *Msgbl* aus *M. sativa* (McKhann *et al.*, 1997) und *LjRac2* aus *Lotus japonicus* (Borg *et al.*, 1997; Borg *et al.*, 1999) mit Homologien zu GTP-bindenden Proteinen, die zwei MADS-Box Gene *nmh5* und *nmh7* aus *M. sativa* (Heard *et al.*, 1997; Heard und Dunn, 1995), ein putatives Proteinkinase-Gen und ein Zinkfinger-Gen (Frugier *et al.*, 1998), sowie das Annexin-Gen *MtAnn1* aus *M. truncatula* (Nebel F de *et al.*, 1998). Das Genprodukt des *LjCbp1*-Gens aus *L. japonicus* weist starke Homologien zu Calcium-bindenden Proteinen auf (Webb *et al.*, 2000) und könnte somit in Calmodulin-ähnlicher Weise an der Signaltransduktion beteiligt sein. Die bislang größte Entdeckung hinsichtlich der Signaltransduktion in Wurzelknöllchen stellt sicherlich das ebenfalls über „Transposon-Tagging“ aus *L. japonicus* isolierte *nin1*-Gen dar (Schauser *et al.*, 1999), da es das erste klonierte Pflanzengen ist, das nachweislich für die

Bildung von Infektionsschläuchen und die Initiation von Knöllchenprimordien benötigt wird. Die Aminosäuresequenz des abgeleiteten Nin-Proteins weist teilweise Homologien mit Transkriptionsfaktoren auf und ist möglicherweise an der Regulation von Genen in Abhängigkeit vom Stickstofflevel der Pflanze beteiligt (Schauser *et al.*, 1999).

Die Einführung sensitiverer Detektionsmethoden wie zum Beispiel RT-PCR im Vergleich zu Northern Blots und die Genomprojekte für mehrere Modellpflanzen wie zum Beispiel *Arabidopsis thaliana*, *M. truncatula* und Reis haben mittelbar zu der Erkenntnis beigetragen, dass viele Gene, die bisher als Knöllchen-spezifisch exprimiert angesehen wurden, auch im nicht-symbiontischen Gewebe der Wirtspflanze exprimiert werden und dass homologe Gene auch in Nicht-Leguminosen gefunden werden können (Gualtieri und Bisseling, 2000; Reddy *et al.*, 1999). So konnten zum Beispiel ENOD40-homologe Gene auch aus den Monokotyledonen Mais und Reis isoliert werden (Kouchi *et al.*, 1999). Diese Resultate lassen vermuten, dass Symbiose-spezifische Genfunktionen aus Genen mit einer allgemeinen Funktion, die unter höheren Pflanzen weitverbreitet sind, hervorgegangen sind und dass die Evolution der homologen Gene letztlich zu einer ursprünglichen Pflanze zurückführt (Gualtieri und Bisseling, 2000; Kouchi *et al.*, 1999; Schultze und Kondorosi, 1998). Für eine Datierung dieser evolutionären Vorgänge spielt die Tatsache eine Rolle, dass Endosymbiosen zwischen Bakterien und Pflanzen offensichtlich auf Angiospermen beschränkt sind, im Falle der Rhizobien-Leguminosen Symbiose sogar auf einige Gattungen der Familie der Leguminosae in der übergeordneten Rosid I Klasse (Soltis *et al.*, 1995). Da die frühesten Angiospermen aus der Kreidezeit datieren und ihre Verbreitung somit vor etwa 110 Millionen Jahren stattfand (Qiu *et al.*, 1999), ist dies auch der früheste Zeitpunkt der Entwicklung von Endosymbiosen zwischen Bakterien und Pflanzen.

B.2 Die arbuskuläre Mykorrhizasymbiose

B.2.1 Bedeutung und Formen der Mykorrhizasymbiose

Der Begriff Mykorrhiza, der sich aus den griechischen Worten „mykes“ für Pilz und „rhiza“ für „Wurzel“ zusammensetzt, wurde von A.B. Frank im Jahre 1885 geprägt und beschreibt die mutualistische Verbindung zwischen Pflanzenwurzeln und Pilzen (Frank, 1885). Mykorrhizapilze entwickeln ausgedehnte Hyphengeflechte im Boden, besiedeln aber gleichzeitig das kortikale Gewebe der Wurzeln und vergrößern so die effektive absorptive Oberfläche der Pflanzenwurzel. Sie sind an der Aufnahme von Phosphat und anderen löslichen Nährstoffen aus dem Boden und ihrem Transport zu den Wurzeln der Pflanzen beteiligt (Smith *et al.*, 1994). Im Gegenzug versorgt die Pflanze den Pilz mit Photosyntheseprodukten, vornehmlich in Form von Glukose und Fruktose (Bago *et al.*, 1999; Solaiman und Saito, 1997). Neben dieser Verbesserung der Nähstoffversorgung der Pflanzen vor allem auf nährstoffarmen und trockenen Böden werden diese durch die Mykorrhizasymbiose resistenter gegen Umweltstress

und Pflanzenpathogene (Jeffries, 1987; Newsham *et al.*, 1995), was die Bedeutung dieser Symbiose insbesondere für die Landwirtschaft verdeutlicht.

Etwa 95 % aller Pflanzenarten sind Familien zugeordnet, die als mykorrhizierbar gelten, obwohl eine tatsächliche Mykorrhizierung erst für ca. 3 % der Gesamtanzahl untersucht wurde (Smith und Read, 1997). Mykorrhizasymbiosen können grob in die endotrophe Mykorrhiza (Endomykorrhiza) und die ektotrophe Mykorrhiza (Ektomykorrhiza) unterteilt werden (Barker *et al.*, 1998; Smith und Read, 1997). Bei der Ektomykorrhiza gehen Basidiomyceten, Ascomyceten oder Zygomyceten als Pilzpartner eine Symbiose mit Gymnospermen und holzigen Angiospermen ein. Die Hyphen wachsen ausschließlich zwischen den kortikalen Wurzelzellen (interzellulär) der Wirtspflanze und formen einen dichten Mantel um die lateralen Wurzeln, die, einmal kolonisiert, die Elongation einstellen. Die Endomykorrhiza beschreibt Symbiosen von holzigen oder krautartigen Angiospermen, sowie Gymnospermen, Pteridophyten und einigen Bryophyten mit Basidiomyceten, Ascomyceten sowie sechs Gattungen von Pilzen in der Ordnung *Glomales* der Zygomyceten (Harrison, 1999; Morton und Benny, 1990). Hierbei wachsen die Hyphen sowohl interzellulär als auch intrazellulär. Der Pilz wächst somit bei dieser Form der Mykorrhiza auch in die kortikalen Wurzelzellen hinein. Die Endomykorrhiza kann wiederum in die arbuskuläre Mykorrhiza (Zygomyceten), die Erikaceen-Mykorrhiza (Ascomyceten) und die Orchideen-Mykorrhiza (Basidiomyceten) unterteilt werden, wobei die arbuskuläre Mykorrhiza durch ihr Auftreten bei mehr als 80 % aller existierenden Pflanzenfamilien den weitaus größten Wirtsbereich aufweist (Gianinazzi-Pearson, 1996a).

B.2.2 Entwicklung von arbuskulären Mykorrhizen

Fossile Funde weisen auf die Existenz von Mykorrhiza in den frühesten vaskulären Landpflanzen hin, die vor mehr als 400 Millionen Jahren im frühen Devon vorkamen, während molekular-phylogenetische Forschungen zeigen, dass die frühesten AM-Pilze sich etwa zur gleichen Zeit (vor 462-353 Millionen Jahren) aus einem eng verwandten, nicht-mykorrhizierenden Taxon entwickelten (Remy *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1993). Es wird daher vermutet, dass die frühe Besiedlung der Landmassen durch Pflanzen und die Evolution der Pflanzenwelt durch Pflanzen in Symbiose mit co-evolvierenden AM-Pilzen ermöglicht wurde (Pirozynski und Malloch, 1975). Jüngste Funde von fossilen Pilzhyphen- und Sporen mit starken Ähnlichkeiten zu heutigen AM-Pilzen (Redecker *et al.*, 2000) unterstützen diese Vermutungen. Mit einem Alter von ca. 460 Millionen Jahren existierten diese Glomus-ähnlichen Pilze bereits zu einer Zeit, als die Landflora sehr wahrscheinlich nur aus Pflanzen auf bryophytischer Entwicklungsebene bestand. Die obligat biotrophe Lebensweise der AMPilze hat ihre genaue Analyse sowie ihre Taxonomie wesentlich erschwert und ihre Kultivierung in Abwesenheit des pflanzlichen Symbiosepartners bisher verhindert (Harrison, 1999).

AM-Pilze sind in der Lage, die epidermalen und kortikalen Zellen von Wurzeln zu kolonisieren, aber sie dringen nicht in das vaskuläre System oder das Meristem der Wurzeln ein. Die

morphologischen Stadien der Entwicklung sind dabei variabel und hängen hauptsächlich von der beteiligten Pflanzenart ab (Bonfante-Fasolo, 1984; Bonfante-Fasolo und Perotto, 1995). Im Allgemeinen kommen wachsende Pilzhypen von Sporen im Boden oder benachbarten Pflanzenwurzeln mit der Wurzeloberfläche in Kontakt, wo sie differenzieren und ein Appressorium ausbilden (Abbildung B.3). Das Wachstum der Hyphen in Richtung Wurzel und die ausschließliche Bildung von Appressorien an den Wirtspflanzen der jeweiligen AM-Pilze lässt auf Signale pflanzlichen Ursprungs schließen, die diesen Vorgang beeinflussen. So stimulieren pflanzliche Exudate das Wachstum und die Verzweigung der Hyphen (Giovanetti *et al.*, 1993; Giovanetti *et al.*, 1994; Harrison, 1999). Insbesondere Flavonoide, Isoflavonoide und phenolische Komponenten der Zellwand von Wurzeln werden als mögliche Signalmoleküle vorgeschlagen (Bécard *et al.*, 1992; Harrison, 1997).

Ausgehend vom Appressorium dringt der Pilz zwischen zwei epidermalen Zellen oder durch Eindringen in eine epidermale oder Wurzelhaarzelle in die Wurzel ein (Bonfante-Fasolo, 1984). Die weitere interne Entwicklung des Pilzes in der Wurzel wird durch den Wirt beeinflusst, so dass ein und dieselbe Pilzart verschiedene Morphologien in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Wirtspflanze aufweisen kann (Gerdemann, 1965; Jacquelinet-Jeanmougin und Gianinazzi-Pearson, 1983). Die beiden Hauptformen werden als Paris- und als Arum-Typ bezeichnet (Smith und Smith, 1997), wobei sich die bisherigen Forschungen auf Grund der größeren Bedeutung für die Landwirtschaft ausschließlich auf den Arum-Typ konzentrieren.

In der Mykorrhiza des Arum-Typs wächst die Pilzhyphe nach dem Eindringen in die Wurzel zunächst interzellulär (Abbildung B.3). Beim Erreichen des inneren Kortex durchdringen Verzweigungen, die den interzellulären Hyphen entspringen, die kortikalen Zellwände. In den kortikalen Zellen kommt es zu einer Ausdifferenzierung der Hyphen zu stark verzweigten, terminalen Strukturen, die als Arbuskeln bezeichnet werden (Abbildung B.3).

Da die sich innerhalb der kortikalen Zellen entwickelnden Arbuskeln von der sich ausdehnenden Plasmamembran der Pflanzenzelle umschlossen sind, bleiben sie apoplastisch. Diese sich eng um die Arbuskeln legende Membran wird als periarbuskuläre Membran bezeichnet. Eine mit der Entwicklung der Arbuskeln einher gehende zunehmende Verringerung der Stärke der Pilz-Zellwand führt letztlich zu einer ausgedehnten intrazellulären Schnittstelle zwischen Mikro- und Makrosymbiont, in der diese in sehr engem Kontakt sind und nur durch ihre zwei Membranen und einen schmalen Apoplasten pflanzlichen Ursprungs getrennt sind (Bonfante-Fasolo und Perotto, 1992; Smith und Gianinazzi-Pearson, 1988). Immunologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Schnittstelle aus vielen Verbindungen pflanzlichen Ursprungs, wie zum Beispiel Xyloglukanen, Arabinogalaktanen, β -D-1,3-Glukanen und Hydroxyprolin-reichen Proteinen besteht (Balestrini *et al.*, 1997; Balestrini *et al.*, 1994). Gleichzeitig mit dem Wachstum innerhalb der Wurzel bildet der Pilz externe Hyphen aus, die sich im Boden verzweigen und der Aufnahme von Nährstoffen und Wasser dienen. Es wird angenommen, dass die Abgabe von durch die Hyphen in die Arbuskeln gelangten Nährstoffen an die Pflanze und die Aufnahme von Photosyntheseprodukten der Pflanze durch den Pilz an

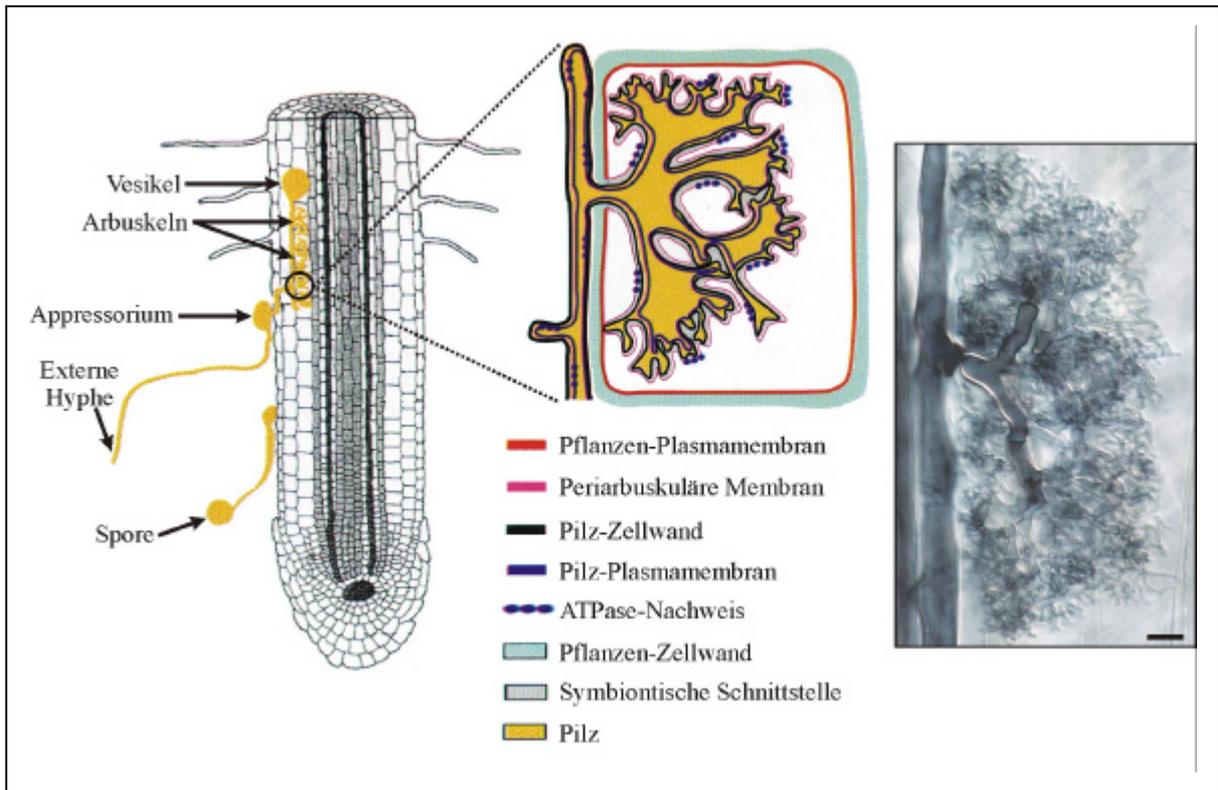


Abbildung B.3: Übersicht über die Kolonisierung einer Wurzel durch einen AM-Pilz.

Auf der linken Bildhälfte ist die Kolonisierung einer Wurzel durch einen AM-Pilz von der Sporenkeimung über die Bildung eines Appressoriums bis hin zur Entwicklung von Arbuskeln und Vesikeln im Kortexgewebe schematisch dargestellt. In der Mitte der Abbildung ist eine infizierte Kortexzelle mit Arbuskel im Detail gezeigt. Die verschiedenen Strukturen sowie die Membran-Bereiche, für die ATPase-Aktivität gezeigt werden konnte, sind durch verschiedene Farben hervorgehoben. Modifiziert nach Harrison (1997).

Die rechte Bildhälfte zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme einer ausgereiften Arbuskel des AM-Pilzes *Glomus mosseae* mit zahlreichen fein verzweigten Hyphen. Hierzu wurde ein Semi-Dünnschnitt einer infizierten Wurzel mit heißer Alkali aufgeklärt und mit dem Farbstoff Chlorazal schwarz E angefärbt (Mark Brundrett, CSIRO, Australien). Der Balken entspricht 10 µm.

der intrazellulären Schnittstelle geschehen (Harrison, 1999). Nach der Ausbildung der Arbuskeln bilden einige Arten von AM-Pilzen zusätzlich lipidgefüllte Vesikel in interzellulären Räumen der Wurzel, von denen angenommen wird, dass sie als Speicherreseven für den Pilz dienen (Smith und Gianinazzi-Pearson, 1988).

Trotz des Aufwandes, den der Pilz und die Pflanze zur Entwicklung der Symbiose haben, besitzen die Arbuskeln mit weniger als 15 Tagen eine relativ kurze Lebensdauer. Nach dieser Zeit stirbt die Arbuskel ab, die Wirtszelle aber differenziert sich wieder zu einer parenchalen Kortexzelle, die wieder die Fähigkeit zur Aufnahme einer Arbuskel besitzt (Alexander *et al.*, 1988, 1989).

B.2.3 Molekulare Veränderungen bei der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza

Sowohl die unterschiedlichen Wuchsformen, die in Wirtspflanzen des Arum- und Paris-Typs beobachtet werden können, als auch eine *Pisum sativum* Mutante, in der sich Arbuskeln kaum entwickeln, weisen darauf hin, dass die Pflanze auch dieses Stadium der Interaktion kontrolliert (Gianinazzi-Pearson, 1996a; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991a). In den infizierten Pflanzenzellen löst die Ausbildung der Arbuskel starke Veränderungen aus. Es kommt zu einer verstärkten Kernaktivität, einem Anstieg der Zahl von Zellorganellen, einer intensiven Neusynthese von Membransystemen und einer differentiellen Genexpression, die die Synthese Symbiose-spezifischer Proteine nach sich zieht (Harrison, 1999).

So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass ein α -Tubulingen aus Mais in Pflanzenzellen exprimiert wird, in denen sich Arbuskeln entwickeln (Bonfante *et al.*, 1996). Die Induktion dieses Gens steht in Übereinstimmung mit beobachtbaren Veränderungen im Cytoskelett, die eine Umorganisation der inneren Struktur der Zelle zur Folge haben, um den nötigen Raum für die sich entwickelnde Arbuskel zu schaffen. Die starke Ausdehnung der Plasmamembran zur Bildung der periarbuskulären Membran, zusammen mit der notwendigen Etablierung von Transportmechanismen in dieser Membran, um den Nährstoffaustausch zu gewährleisten, erklären, warum viele der bisher identifizierten Mykorrhiza-spezifischen cDNAs für potentielle Membranproteine kodieren. Dennoch sind die für den Transport von Kohlenstoffverbindungen oder Phosphat verantwortlichen Membrantransporter bisher unbekannt (Harrison, 1999). Zu den identifizierten potentiellen Membranproteinen zählen unter anderem eine cDNA aus der Gerste, deren abgeleitete Aminosäuresequenz Homologien mit H^+ -ATPasen aufweist (Murphy *et al.*, 1997) und eine cDNA aus der Petersilie, die für ein Mitglied der MIP („membrane intrinsic protein“-)Familie kodiert (Roussel *et al.*, 1997). Die integralen MIP-Proteine erleichtern den Transport kleiner Moleküle über Membranen. Als ein weiteres in mykorrhizierten Wurzeln verstärkt exprimiertes Mitglied dieser Familie ist das ein Aquaporin kodierende Gen MtaAQP1 der Luzerne identifiziert worden (Krajinski *et al.*, 2000). Außerdem führten Untersuchungen an mykorrhizierten Wurzeln der Erbse zu Identifikation des Psam1-Gens, das für ein Protein mit Ähnlichkeiten zu Phospholamban kodiert (Martin-Laurent *et al.*, 1997), einem Transmembranprotein aus Vertebraten, das die Aktivität von Ca^{2+} -ATPasen reguliert. Das Psam1-Genprodukt konnte im junge Arbuskeln umgebenden Cytoplasma von kortikalen Wurzelzellen lokalisiert werden (Martin-Laurent *et al.*, 1998). Die Identifikation von Mykorrhiza-spezifisch induzierten ATPasen, wie zum Beispiel der durch die Gene pma2 und pma4 kodierten Proteine (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000) und von ATPase-regulierenden Proteinen stimmt mit biochemischen Daten überein, die eine hohe ATPase-Aktivität in der die Arbuskeln umgebenden Membran vermuten lassen (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991b; Abbildung B.3). In *M. truncatula* konnte ferner die spezifische Induktion eines Hexose-Transportergens (Mtst1) in infizierten kortikalen Zellen gezeigt werden (Harrison, 1996).

Im Hinblick auf die Entwicklung der symbiontischen Schnittstelle konnten Mykorrhiza-spezifisch induzierte Gene identifiziert werden, die der *de novo* Synthese von Zellwandproteinen dienen könnten. Hierzu zählen *M. truncatula* Gene, die ein Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein (HRGP), ein putatives Arabinogalaktan Protein (AGP) und ein Xyloglukan Endo-Transglykosylase verwandtes Protein (XET) kodieren (van Buuren *et al.*, 1999).

Neben den Mykorrhiza-spezifisch hochregulierten Genen, gibt es aber auch solche, deren Expression während der Symbiose spezifisch verringert wird. So konnte in *M. truncatula* die Verringerung der Transkripte für vier Phosphatmangel-induzierbare Gene beobachtet werden (Burleigh und Harrison, 1997; Liu *et al.*, 1998). Eines dieser Gene (Mt4), dessen Funktion bislang unbekannt ist, wird sowohl durch einen transferierbaren Faktor aus dem Spross als Antwort auf einen Anstieg des Phosphatlevels als auch durch ein unbekanntes Signal des besiedelnden Pilzes reguliert (Burleigh und Harrison, 1997, 1999). Die Expression eines Gens der Erbse, Psam2, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten mit tierischen sekretorischen Membranproteinen aufweist, wird während der Symbiose verringert, aber während der Infektion der Wurzel mit Pilz-Pathogenen erhöht (Krajinski *et al.*, 1998).

B.3 Gemeinsamkeiten der arbuskulären Mykorrhiza und der Rhizobien-Leguminosen Symbiose

Auf den ersten Blick scheinen die Interaktionen von Pflanzen mit Rhizobien und AM-Pilzen nicht viele Gemeinsamkeiten aufzuweisen. Die induzierten morphologischen Antworten der Pflanze sind unterschiedlich und beide Symbiosen stellen Extreme dar, wenn es um die Wirtsspezifität geht. Dennoch ergeben sich in vielen Phasen der Symbiose Konvergenzen, die vermuten lassen, dass die genetischen Grundlagen dieser beiden Symbiosen zumindest in Teilen übereinstimmen (Übersichtsartikel von Albrecht *et al.*, 1999; Gualtieri und Bisseling, 2000; Hirsch und Kapulnik, 1998; Parniske, 2000).

Eine deutliche Parallele in beide Symbiosen ist die Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen durch beide Mikrosymbionten. Die Suppression pflanzlicher Mechanismen gegen Pathogenbefall ist bei der Rhizobien-Leguminosen Symbiose schon seit längerem bekannt (McKhann und Hirsch, 1994). Vor dem Hintergrund, dass in vielen pathogenen Pilz-Pflanzen Interaktionen die Invasion des Pflanzengewebes durch den Pilz in einer ausgeprägten Pflanzenabwehr resultiert, die das weitere Eindringen des Pilzes verhindert (Dixon *et al.*, 1994), scheint die arbuskuläre Mykorrhiza die am besten angepasste Pflanzen-Pilz-Verbindung zu sein (Harrison, 1999). In AM-Symbiosen scheinen pflanzliche Abwehrreaktionen nach einem geringen vorübergehenden Anstieg in den frühen Stadien der Symbiose auf ein Niveau reduziert zu werden, das beträchtlich unter dem von nicht-kolonisierten Pflanzen liegt (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996b; Kapulnik *et al.*, 1996). Parallelen für beide Symbiosen zeigen sich zum Beispiel bei der Expression des Psam4-Gens der Erbse, das für ein Prolin-reiches Protein kodiert. Bei Inokulation mit einem der beiden Symbiosepartner (Pilz oder Rhizobium) wird die Expression dieses Gens verringert, wohingegen es bei einer Infektion mit einem Wurzel-pathogenen Pilz zu einer verstärkten Expression kommt (Lapopin *et al.*, 1999).

Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Symbiosen ist, dass der symbiontische Mikroorganismus entweder teilweise oder vollständig von einer Membran pflanzlichen Ursprungs umgeben wird. Im Falle der Rhizobien ist dies die Peribakteroidmembran, im Falle der AM-Pilze die periarbuskuläre Membran. Die massive Biosynthese, die zum Aufbau einer symbiontischen Membran notwendig ist, ist allen endosymbiontischen Systemen gemein. Unterschiede sollten sich hingegen bei der Synthese der Proteine ergeben, die den Anforderungen an die Transporteigenschaften der jeweiligen symbiontischen Membranen gerecht werden (Parniske, 2000). Die *L. japonicus* Mutante Ljsym4 deutet auf ein gemeinsames genetisches Kernprogramm der beiden Symbiosen im Hinblick auf die ersten Schritte der Pflanze zur Aufnahme der Symbiosepartner hin. Offensichtlich erlaubt diese Mutante den Mikrosymbionten die Passage durch die epidermale Zellschicht nicht, denn in der AM-Symbiose kann in den epidermalen Zellen keine den Pilz umgebende Membran pflanzlichen Ursprungs detektiert werden und in der Rhizobien-Symbiose kommt es trotz Wurzelhaarkrümmungen nicht zur Bildung von Infektionsschläuchen (Bonfante *et al.*, 2000; Parniske, 2000).

Interessanterweise sind die NOD-Faktoren, die als rhizobielle Signalmoleküle fungieren, mit einer Klasse von Molekülen verwandt, die typischer für die Zellwand von Pilzen (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990) als für die Oberfläche von Gram-negativen Bakterien sind. Die Stimulation der Ausbildung von Mykorrhizen in Wildtyp-Pflanzen und in Nod⁻-Pflanzen der Sojabohne durch rhizobielle NOD-Faktoren (Xie *et al.*, 1995) hat zu der Hypothese geführt, dass frühe Signaltransduktionswege zwischen der Rhizobien-Leguminosen Symbiose und der arbuskulären Mykorrhiza konserviert sind.

Den ersten Hinweis, dass allgemeine Gene der Wirtspflanze für beide Symbiosen essentiell sind, erbrachten die Arbeiten von Duc *et al.* (1989) mit Erbsen-Mutanten. Sie konnten zeigen, dass Erbsen-Mutanten, die die Fähigkeit zur Nodulation verloren hatten (Nod⁻), auch die Fähigkeit zur Interaktion mit Mykorrhizapilzen eingebüßt hatten (Myc⁻). Aus Studien an *Medicago* (Sagan *et al.*, 1995), *Lotus* (Wegel *et al.*, 1998) und *Phaseolus* (Shirtliffe und Vessey, 1996) sind mittlerweile viele weitere Nodulations-Mutanten bekannt, die gleichzeitig den Myc⁻-Phänotyp aufweisen. Die Mutanten sym8, sym9 und sym19 der Erbse sind in Genen mutiert, die für frühe Schritte der Rhizobien- und Mykorrhiza-Interaktion essentiell sind. Diese Mutanten können keinen Infektionsschlauch ausbilden (LaRue und Weeden, 1994) und, obwohl die AM-Pilze noch Appressorien an diesen Nod⁻/Myc⁻-Mutanten bilden können, können sich keine interzellulären Hyphen mehr entwickeln (Gianinazzi-Pearson, 1996a).

Diese Beobachtungen führten zu Untersuchungen, ob Nodulationsgene auch während der AM-Symbiose exprimiert werden. Neben der Expression der späten Nodulationsgene VfLb29 aus *V. faba* (Frühling *et al.*, 1997 - siehe B.4.4) und NOD26 aus *G. max* (Wyss *et al.*, 1990) konnte gezeigt werden, dass die Expression der frühen *M. sativa* Nodulationsgene MsENOD40 und MsENOD2 in mykorrhizierten Wurzeln (van Rhijn *et al.*, 1997) ein ähnliches gewebespezifisches Expressionsmuster wie in mit *Rhizobium* infizierten Wurzeln aufweist. Da diese beiden frühen Gene in Wurzeln auch ohne eine Symbiose nur durch die Zugabe von

Cytokinin induziert werden können und die Cytokininwerte während der Nodulation und auch in mykorrhizierten Wurzeln erhöht sind (van Rhijn *et al.*, 1997), wird angenommen, dass Cytokinin eine der Komponenten des Signaltransduktionsweges ist, der diese beiden Gene in beiden Symbiosen induziert.

Einen weiteren Beweis für gemeinsame Signaltransduktionswege in beiden Symbiosen liefern Studien zu den Genen PsENOD5 und PsENOD12A (Albrecht *et al.*, 1998), die in Wurzeln der Erbse während der Interaktion mit AM-Pilzen und *Rhizobium* induziert werden. In der Nod⁻/Myc⁻-Mutante sym8 der Erbse ist die Expression beider Gene blockiert, was eine Beteiligung des SYM8-Genprodukts an einem Signaltransduktionsweg nahe legt, der diese Gene in beiden Symbiosen induziert (Albrecht *et al.*, 1998).

Das LjCbp1-Gen aus *Lotus japonicus*, das für ein Protein mit ausgeprägten Homologien zu Mitgliedern der Familie der Calcium-modulierten EF-Hand-Proteine kodiert, könnte als weiterer Hinweis auf Gemeinsamkeiten in der Signaltransduktion gewertet werden. Das Gen wird sowohl in Wurzelhaaren und Knöllchen als Antwort auf eine Infektion mit Rhizobien, als auch in Bereichen der Wurzel, die mit *Glomus intraradices* infiziert wurden, exprimiert (Parniske, 2000; Webb *et al.*, 2000). Die korrespondierenden Transkripte des Lektin-ähnlichen Glykoproteins PsNLEC-1C der Erbse werden ebenfalls in beiden Symbiosen exprimiert (Balestrini *et al.*, 1999; Dahiya *et al.*, 1998).

Die beständig zunehmende Anzahl von genetischen Übereinstimmungen, die zwischen den beiden Symbiosen gefunden werden, und die entwicklungsgeschichtlich deutlich spätere Datierung der Entstehung der Rhizobien-Leguminosen Symbiose in Vergleich zur arbuskulären Mykorrhiza haben zu der Hypothese geführt, dass die Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen unter Ausnutzung bereits vorhandener Signaltransduktionswege der arbuskulären Mykorrhiza entstanden ist (van Rhijn *et al.*, 1997). Die Fähigkeit der AM-Pilze, mit einer breiten Masse von höheren Pflanzen interagieren zu können, und die Beteiligung allgemeiner Wirtsgene an beiden Interaktionen lässt es möglich erscheinen, dass SYM- und ENOD-Gene, die für die Interaktion von Leguminosen mit beiden Mikrosymbionten benötigt werden, im Pflanzenreich weit verbreitet sind (Albrecht *et al.*, 1999). Die ENOD40-Homologen aus Tabak, Mais und Reis sowie die Aktivierung eines *Medicago* ENOD12-Promotors durch rhizobielle NOD-Faktoren in transgenem Reis (Reddy *et al.*, 1998) unterstützen diese Hypothese.

B.4 Analyse Symbiose-spezifisch exprimierter Gene der Ackerbohne *Vicia faba* L.

Die klein- und großsamigen Varietäten der Ackerbohne (Pferdebohne, Saubohne, Puffbohne) *Vicia faba* L. gehören zusammen mit verschiedenen *Pisum*- und *Phaseolus*-Arten zu den häufigsten in Mitteleuropa angebauten Leguminosen. Dieser auf Grund des hohen Protein- (20-33%) und Stärkegehalts (55%) ihrer Samen zur menschlichen Ernährung und als Futterpflanze in der Viehwirtschaft eingesetzten einjährigen Leguminose kommt aber auch eine große Bedeutung in Ländern des Nahen Ostens, Latein- und Nordamerikas, Asiens, Ozeaniens und Nordost-Afrikas zu (Bond *et al.*, 1985). Ihre Verwendung in der Landwirtschaft geht bis in die Jungsteinzeit (ca. 3000 Jahre vor Christus) zurück und sie stammt ursprünglich vermutlich aus dem Mittelmeerraum oder aus Vorderasien. Ausgewachsene Ackerbohnen können bis zu einem Meter groß werden und blühen zwischen den Monaten Mai und August (Abbildung B.4a), wobei das Wurzelsystem der Ackerbohne mit seiner hohen Dichte an Wurzelknöllchen (Abbildung B.4b) eine Stickstofffixierungsrate von ca. 135 kg Stickstoff pro Hektar erzielt.

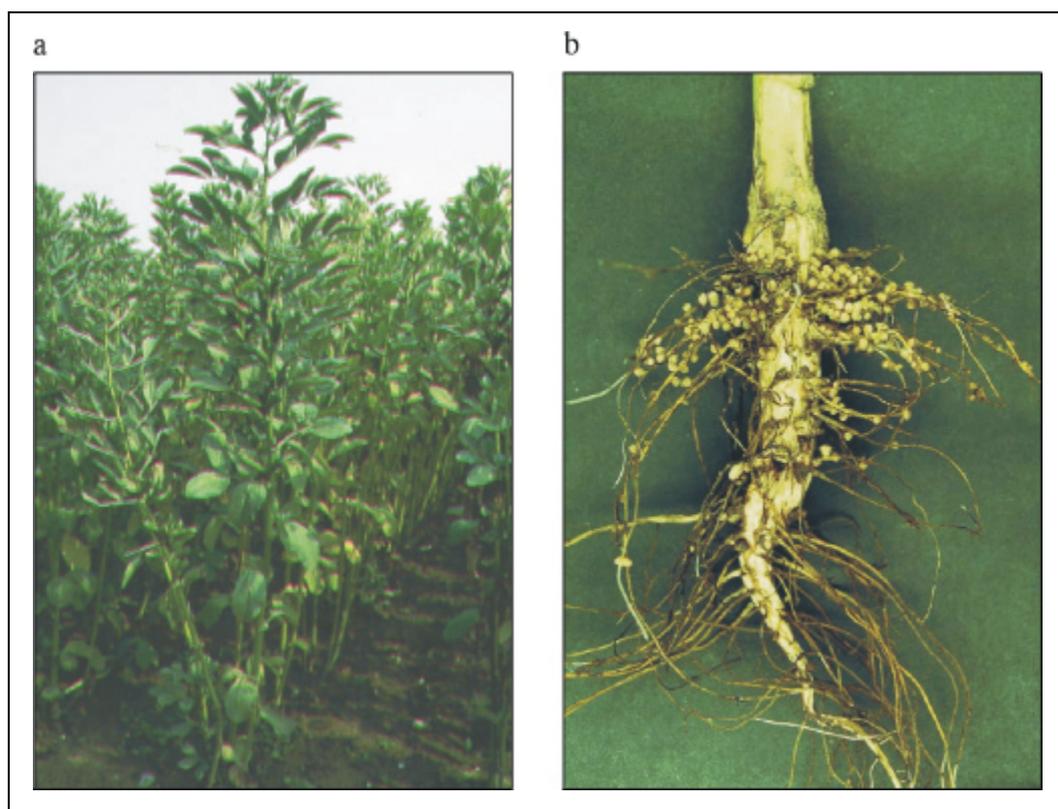


Abbildung B.4: Ausgewachsene Ackerbohnen im Feld und noduliertes Wurzelsystem einer Einzelpflanze. Die Aufnahmen zeigen im Freiland der Universität Bielefeld angezogene Ackerbohnen (a) und das von Erde befreite, nodulierte Wurzelsystem einer einzelnen Pflanze (b). Nach Küster (1995c).

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen an anderen Leguminosen (Legocki und Verma, 1980; Mohapatra und Pühler, 1986) zeigten proteinbiochemische Analysen die Existenz

spezifischer oder verstärkt exprimierter Polypeptide in Wurzelknöllchengewebe der Ackerbohne (Mohapatra *et al.*, 1987). Mit dem Ziel, eine Analyse der Sequenz und Expression der korrespondierenden Transkripte durchführen zu können, wurde mit Hilfe von differentiellen Hybridisierungen eine Knöllchen-spezifische *V. faba* cDNA-Genbank angelegt (Perlick, 1991). Die 645 cDNAs dieser Genbank wurden mittels Kreuzhybridisierungen und Sequenzanalysen in 44 Klongruppen sequenzverwandter Transkriptsequenzen unterteilt, die als VfNDS-A bis VfNDS-M und VfNDS-X1 bis VfNDS-X30 bezeichnet wurden (Frühling, 1995; Perlick *et al.*, 1994; Perlick und Pühler, 1993). VfNDS steht hierbei für „*Vicia faba* nodule differential screening“. Durch Northern- und Southnorthern-Hybridisierungen wurde die Expression aller 44 Gene im Detail analysiert (Frühling, 1995; Perlick und Pühler, 1993). Während 25 der Gene zusätzlich zum Wurzelknöllchen auch noch in anderen Geweben der Ackerbohne exprimiert wurden, wurden 19 Gene ausschließlich im Knöllchen exprimiert und repräsentierten somit definitionsgemäß Noduline. Die Analyse der Expressionskinetik der Nodulingene führte zu ihrer Einstufung als frühe oder späte Noduline der Ackerbohne (Frühling, 1995; Frühling *et al.*, 1997).

Die von den 44 in *V. faba* Wurzelknöllchen aktiven Genen kodierten Proteine können in acht Klassen unterteilt werden (siehe Übersichtsartikel von Küster *et al.* (2001) und Zitate darin): (1) Leghämoglobine, (2) Prolin-reiche Proteine (PRPs), (3) Glycin-reiche Proteine (GRPs), (4) Cystein-Cluster Proteine (CCPs), (5) andere Noduline, (6) Enzyme des Knöllchenmetabolismus, (7) andere Genprodukte bekannter Funktion, (8) Genprodukte ohne signifikante Homologien zu Proteinen bekannter Funktion. Die Klasse der Legämoglobin-Sequenzen umfasst die Transkripte VfLbB, VfLbK, VfLb49 und VfLb29 (siehe B.4.4). Zu den PRPs gehören die in anderen Leguminosen intensiv untersuchten frühen Noduline ENOD2, ENOD5 und ENOD12 sowie zwei weitere Prolin-reiche Proteine mit potentieller Zellwand-modifizierender Funktion. Die fünf GRPs stellen mit ihrem Glycingehalt von zwischen 18 % und 35 % (Küster *et al.*, 1995a; Schröder *et al.*, 1997) möglicherweise eine neue Klasse von Zellwandproteinen dar, wohingegen für die fünf CCPs eine Rolle bei der Bindung von Metallionen im Knöllchengewebe diskutiert wird (Frühling *et al.*, 2000). Für Enzyme, die für den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Metabolismus im Knöllchen von Bedeutung sind, wurden Transkripte isoliert, die für Saccharose-Synthase (Küster *et al.*, 1993), Asparagin-Synthetase (Küster *et al.*, 1997) und Cystein-Synthase (Perlick und Pühler, 1993) kodieren. Zur fünften Gruppe zählen unter anderem VfENOD40-Transkripte, aber auch Transkript-Sequenzen, die für die modularen Noduline VfNOD28/32 (siehe B.4.2), das Nodulin VfNOD32 (siehe B.4.3) und das frühe Nodulin VfENOD18 (siehe B.4.1) kodieren.

Mit dem Ziel, Hinweise auf die mögliche Funktion der kodierten Noduline zu erlangen und Markergene für die verschiedenen Knöllchenzonen zu identifizieren, wurde der Expressionsort einer Reihe von Transkripten im Knöllchen mit Hilfe von „Tissue-Print“-Hybridisierungen untersucht (Albus, 1996; Schröder, 1995). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass VfENOD2, die PRPs VfPRP1 und VfExt1, sowie die Lipoxygenase VfLOX1 (Perlick *et al.*,

1996b) ihre Funktion wahrscheinlich im peripheren Knöllchengewebe erfüllen, die Gene VfENOD-GRP5 (Schröder *et al.*, 1997) und VfNOD-CCP4 (Frühling *et al.*, 2000) beispielsweise aber im zentralen Gewebe des Knöllchens exprimiert werden.

Die Aktivität der Promotoren einiger *V. faba* Nodulingene wurde in Form von *gusA*int Reportergen-Fusionen in transgenen *V. hirsuta* Knöllchen untersucht. Hierbei vermittelte zum Beispiel der Promotor des VfENOD-GRP3 Gens in Übereinstimmung mit der Transkript-lokalisierung (Küster *et al.*, 1995a) eine überwiegende GUS-Expression im Bereich der Interzone II-III (Küster *et al.*, 1995b).

Im Rahmen seiner Doktorarbeit hat M. Frühling (1995) unter anderem die Expression von Nodulin-Transkripten in Wurzeln der Ackerbohne untersucht, die von dem arbuskulären Mykorrhizapilz *G. fasciculatum* kolonisiert waren. Eine Induktion ausschließlich sowohl in der Rhizobien-Leguminosen Symbiose und in der arbuskulären Mykorrhiza konnte er dabei für das Leghämoglobinen VfLb29 (siehe B.4.4) nachweisen. Darüber hinaus wurden die Transkripte der Gene VfCaMBP1 (siehe B.4.5) und VfCLIC1 in mykorrhizierten Wurzeln im Vergleich zu nicht-infizierten Wurzeln und zu Wurzelknöllchen amplifiziert exprimiert.

Auf die größtenteils auf Gen- und Transkript-Ebene beschränkten Ergebnisse für die fünf Symbiose-spezifisch oder -amplifiziert exprimierten Transkripte, die in der vorliegenden Arbeit auf der Ebene der Proteine analysiert wurden, wird in den folgenden Abschnitten B.4.1 bis B.4.5 näher eingegangen.

B.4.1 Das frühe Nodulin VfENOD18

Zwei vollständige, kreuzhybridisierende Transkripte der cDNA-Genbank repräsentierten das Nodulingen VfENOD18. Da dessen Expression fünf Tage nach der Inokulation der Wurzeln mit *R. leguminosarum* begann und somit wenigstens einen Tag früher einsetzt als das erste Auftreten von Leghämoglobin-Transkripten, was als Marker für den Beginn der funktionellen Phase des Knöllchens angesehen wird, wurde es als frühes Nodulin bezeichnet (Hohnjec *et al.*, 2000). Zu Beginn dieser Arbeit konnten in Datenbankvergleichen der abgeleiteten Aminosäuresequenz keine signifikanten Homologien zu Proteinen oder Proteinmotiven bekannter Funktion gefunden werden. Lediglich in der dbEST-Datenbank (Boguski *et al.*, 1993), in der sogenannte „expressed sequence tags“ (ESTs) gespeichert werden, konnten homologe cDNA-Sequenzen aus *A. thaliana* und *Z. mays* identifiziert werden. Auf Basis dieser Homologien ergaben sich jedoch keine Hinweise auf die mögliche Funktion des 165 AS großen Nodulins VfENOD18, denn die cDNA-Sequenzen der ESTs kodierten für Genprodukte, deren Funktion nicht untersucht worden war.

Durch Screening einer genomischen Bank konnte N. Hohnjec im Rahmen ihrer Diplomarbeit 10 Klone mit VfENOD18-Sequenzen isolieren (Hohnjec, 1997). Diese zeigten, dass die VfENOD18-Transkripte durch vier Exons kodiert werden. Die Sequenzanalyse der genomischen Klone deckte die Existenz einer VfENOD18-Genfamilie auf, die aus zwei Klassen von Isogenen bestand. Die Klasse II Isogene enthielten die durch die cDNAs

repräsentierte 5' UTR Sequenz, wohingegen Klasse I Isogene in diesem Bereich eine andere Sequenz aufwiesen. In transgenen *V. hirsuta* Wurzelknöllchen vermittelte der Klasse II Promotor GUS-Aktivität in der Interzone II-III und der Stickstoff fixierenden Zone III (Hohnjec *et al.*, 2000). Dies steht in Übereinstimmung mit der Lokalisation von VfENOD18-Transkripten in Knöllchen der Ackerbohne und macht VfENOD18 zu einem geeigneten Marker Gen für die funktionelle Phase der Entwicklung von *V. faba* Knöllchen (Küster *et al.*, 2001).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Becker, 1996) habe ich das VfENOD18-Protein in Form eines Fusionsproteins in *Escherichia coli* exprimiert und anschließend das rekombinante VfENOD18 aufgereinigt. Unter Einsatz dieses Proteins konnte ein Antiserum gewonnen werden, das das Nodulin VfENOD18 in Western Blots mit Gesamtproteinextrakten aus *V. faba* Wurzelknöllchen spezifisch detektierte. Mit der Verfügbarkeit des VfENOD18-Antiserums und des aufgereinigten VfENOD18-Proteins war somit der Grundstein für die Analyse dieses Nodulins auf Proteinebene gelegt.

B.4.2 Die modularen Noduline VfNOD28/32

Sequenzanalysen von 32 VfNOD28/32 cDNAs zeigten, dass sechs Isoformen dieser Transkripte existieren (Küster *et al.*, 1994). Sie kodieren für sechs verschiedene Noduline VfNOD28/32 mit einer theoretischen molekularen Masse von 28 kD bis 32 kD, denen bei einer Länge zwischen 269 und 299 Aminosäuren verschiedene interne Bereiche von 12 bis 19 Aminosäuren fehlen. Ihr Aufbau aus einem N- und einem C-terminalen Sequenzmodul in Verbindung mit zwei verschiedenen repetitiven Sequenzmodultypen („Repetition 1“ und „Repetition 2“) im zentralen Bereich führte zu der Bezeichnung „modulare Noduline“ (Küster *et al.*, 1994). Alle internen Deletionen entfernen vollständige „Repetition 1“-Module, möglicherweise hervorgerufen durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte des als Einzelkopie nachgewiesenen VfNOD28/32-Gens (Küster *et al.*, 1996). Für das N-terminale Modul konnte eine potentielle sekretorische Signalsequenz identifiziert werden.

Die singulären und repetitiven Sequenzmodule weisen Homologien zu Sequenzmodulen des Nodulins Nms25 aus *M. sativa* (Kiss *et al.*, 1990; Végh *et al.*, 1990), für das eine Lokalisation im Peribakteroidraum postuliert wurde, und des Nodulins Ngo28 aus *Galega orientalis* auf. Zusätzlich konnten Transkript- und Gensequenzen aus *V. hirsuta* (Küster *et al.*, 1999) und *M. truncatula* (Küster *et al.*, 2001) isoliert werden, die für VfNOD28/32-homologe modulare Noduline kodieren. Die Lokalisation der VfNOD28/32-Transkripte in Ackerbohnenknöllchen und die Aktivität des Promotors in transgenen *V. hirsuta* Knöllchen stimmen mit der von VfENOD18 überein (Küster *et al.*, 1996; Küster *et al.*, 1999). Aber weder über diese Lokalisationsstudien auf RNA- und Promotorebene noch durch die homologen modularen Noduline konnte die Funktion der modularen Noduline VfNOD28/32 aufgeklärt werden. Auf Grund der stark negativen Gesamtnettoladung der VfNOD28/32-Proteine und in Anlehnung an das Calcium-bindende, modulare ARP-Protein aus *Euglena gracilis* (Gumpel und Smith, 1992) postulierten (Küster *et al.*, 1996) aber, dass sie im Lumen des Peribakteroidraums als Binde-

moleküle für Ionen, bakterielle Signalmoleküle oder Metaboliten des Knöllchenstoffwechsels fungieren könnten.

B.4.3 Das Nodulin VfNOD32

VfNOD32-Transkripte konnten in der Stickstoff fixierenden Zone III lokalisiert werden (Perlick *et al.*, 1996a) und kodieren für ein Homolog des *V. narbonensis* (α/β)₈-Barrel Samenproteins Narbonin (Schlesier *et al.*, 1978). Darüber hinaus wies die abgeleitete VfNOD32-Aminosäuresequenz lokale Homologien zu stark konservierten Bereichen des aktiven Zentrums von Klasse III Chitinasen auf (Perlick *et al.*, 1996a). S. C. Frosch (Universität Bielefeld) hat in seiner Doktorarbeit das Protein VfNOD32 als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und in aufgereinigter Form zur Gewinnung von polyklonalen VfNOD32-Antikörpern eingesetzt (Frosch *et al.*, 2001). Durch Western und Northern Blots konnte gezeigt werden, dass das Protein nur in einem kleinen Bruchteil der untersuchten *V. faba* Population exprimiert wurde, wobei es aber in Knöllchen, die VfNOD32 exprimierten, fast 10 % der Gesamtproteinmenge ausmachte (Frosch *et al.*, 2001). Trotz intensiver Bemühungen konnte dem Protein aber keine enzymatische Funktion, wie zum Beispiel eine Chitinase-Aktivität, zugeordnet werden.

B.4.4 Das Leghämoglobin VfLb29

Für das Leghämoglobin-Transkript VfLb29 konnte M. Frühling (1995) im Rahmen seiner Doktorarbeit zeigen, dass es sowohl in Wurzelknöllchen der Ackerbohne induziert wird als auch in Wurzeln der Ackerbohne, die von *G. fasciculatum* kolonisiert sind. In transgenen *V. hirsuta* Wurzeln vermittelte der VfLb29-Promotor Aktivität in der Interzone II-III und der Stickstoff fixierenden Zone III (Küster *et al.*, 2001). Da VfLb29 ein ungewöhnlich geringes Maß an Sequenz-Homologie mit anderen Leghämoglobinen der Ackerbohne sowie mit Leghämoglobinen anderer Leguminosen aufwies, postulierten Frühling *et al.* (1997), dass VfLb29 eine neue Klasse von Leghämoglobinen repräsentiert, die in verschiedenen symbiontischen Interaktionen induziert werden können. Als mögliche Funktion von VfLb29 in mykorrhizierten Wurzeln wird spekuliert, dass es wie in Wurzelknöllchen für die Sauerstoffversorgung der Respiration des Mikrosymbionten in den infizierten Zellen verantwortlich sein könnte. Die Lokalisation von VfLb29 in mykorrhizierten Wurzeln könnte diese Hypothese unterstützen.

B.4.5 Das Protein VfCaMBP1

In den ersten Experimenten zu VfCaMBP1 wurde die Expression einer zum damaligen Zeitpunkt noch verkürzten Form des VfCaMBP1-Transkripts (bezeichnet mit VfNDS-X8) in Knöllchen, mykorrhizierten Wurzeln und nicht-infizierten Wurzeln der Ackerbohne untersucht (Frühling, 1995). Die Erkenntnis, dass es sich bei VfNDS-X8 um ein in mykorrhizierten

Wurzeln verstärkt und in Wurzelknöllchen nur sehr schwach exprimiertes Transkript handelte, führte zu Bestrebungen, das vollständige Transkript zu isolieren, um das Genprodukt genauer charakterisieren zu können. Die Isolierung eines größeren Klons durch M. Strangmann (1998) ermöglichte die Identifizierung von VfNDS-X8-homologen Calmodulin-bindenden Proteinen in Datenbankvergleichen und führte zu der Umbenennung in VfCaMBP1 (*Vicia faba* Calmodulin Binding Protein 1). J. Krüger (1999) gelang es schließlich, die für VfCaMBP1 kodierende Nukleotidsequenz zu vervollständigen. Es ergaben sich daraus aber keine neuen Erkenntnisse durch Homologien zu Proteinsequenzen in Datenbanken.

B.5 Ca²⁺, Calmodulin und Calmodulin-bindende Proteine in Pflanzen

Im Rahmen einer großen Anzahl zellulärer Antworten auf externe Reize in Eukaryonten spielen Ca²⁺-Signale als second messenger eine wichtige Rolle. So kontrolliert die Ca²⁺-Konzentration in tierischen Zellen beispielsweise die Endo- und Exocytose sowie Zellteilung und Muskelkontraktion. Die Übertragung der Ca²⁺-Signale, die Eingliederung ihrer Effekte in solche anderer Signalübertragungswege und die Aufrechterhaltung der homeostatischen Balance von Ca²⁺, um seine cytotoxischen Auswirkungen zu minimieren, werden durch eine spezialisierte Gruppe von zellulären Proteinen initiiert. Es handelt sich hierbei um die Familie der Calcium-modulierten EF-Hand-Proteine (Helix-Turn-Helix Motiv). Als verbreitetstes Mitglied dieser Familie fungiert Calmodulin (CaM) wahrscheinlich als der primäre Ca²⁺-Rezeptor in allen Eukaryonten (Zielinski, 1998).

Die CaM-vermittelte Signalübertragung in Pflanzen aktiviert zahlreiche Zielproteine, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (Snedden und Fromm, 1998). Biotische und abiotische Signale wie zum Beispiel Pathogene oder Temperaturänderungen, führen nach ihrer Perzeption in manchen Fällen zu einer vorübergehenden Änderung der Ca²⁺-Konzentration im Cytosol und/oder den Organellen. Durch eine Erhöhung der Konzentration an freiem Ca²⁺ kann dessen Bindung an Ca²⁺-modulierte Proteine inklusive Calmodulin erfolgen. Eine Konformationsänderung der Calmoduline wird ausgelöst und ermöglicht deren Bindung an eine Vielzahl zellulärer Zielproteine, die wiederum Zellfunktionen wie Metabolismus, Ionenbalance, Cytoskelett und Proteinmodifikation in einer schnellen, direkten zellulären Antwort innerhalb von Sekunden bis Minuten kontrollieren. Darüber hinaus sind Calmoduline wahrscheinlich über komplexe Signalkaskaden oder direkte Bindung an Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Genexpression beteiligt. Diese indirekt CaM-vermittelten zellulären Antworten benötigen Gentranskription, RNA-Prozessierung und Proteinmodifikationen und sind daher langsamer (Minuten bis Tage). Die CaM-vermittelten zellulären Prozesse zusammen mit solchen, die durch andere Signalübertragungswege gesteuert werden, machen die Antwort der Pflanze auf externe Signale aus (Snedden und Fromm, 1998).

Calmodulin bindet mit hoher Affinität an Peptide mit einer Länge von 17 bis 25 Aminosäuren, die eine basische, amphiphatische Struktur aufweisen (O'Neil und DeGrado, 1990). An der Bindung von Calmodulin an basische, amphiphatische α -Helices sind überwiegend hydrophobe

Wechselwirkungen beteiligt (siehe Übersichtsartikel von Crivici und Ikura, 1995; Torok und Whitaker, 1994). Tryptophanreste in der Aminosäuresequenz der CaM-Bindestelle wurden lange als wichtige Kennzeichen, wenn auch nicht absolute Bedingung für eine solche Bindestelle angesehen (O'Neil und DeGrado, 1990). Sie wurden allerdings nur in etwa der Hälfte der CaM-Bindedomänen von pflanzlichen CaM-bindenden Proteinen gefunden (Zielinski, 1998). Neben diesen allgemeinen Gemeinsamkeiten von CaM-Bindestellen konnte in Vergleichen der Sequenzen von CaM-Bindedomänen in CaM-regulierten Proteinen drei Sequenzmotive identifiziert werden, die als Konsensus für CaM-bindende Domänen dienen können (Rhoads und Friedberg, 1997). Das sogenannte „1-8-14 Typ B“ Motiv mit der Konsensussequenz (FILVW)_{xxxxxx}(FAILVW)_{xxxxxx}(FILVW) zeichnet sich durch konservierte hydrophobe Aminosäurereste an eben diesen Positionen 1, 8 und 14 des CaM-Bindemotivs und eine Nettoladung von +2 bis +4 aus. Es kann unter anderem in den CaM-bindenden Proteinen Caldesmon und Titin des Menschen und Mastoparan X aus der Wespe gefunden werden (Rhoads und Friedberg, 1997).

Obwohl die Primärstruktur von Calmodulinen in allen Linien der Phylogenie der Eukaryonten stark konserviert ist (Kawasaki und Kretsinger, 1994) und in Tieren eine einzelne Form von Calmodulin durch eine Multi-Genfamilie kodiert wird (Fischer *et al.*, 1988), wurden in Pflanzen mittlerweile mehrere CaM-Sequenzen (bis zu 12) identifiziert, die für mehrere CaM-Isoformen und divergierende Calmoduline kodieren (Zielinski, 1998). So wurden in *A. thaliana* die CaM-Isoformen AtCaM1-9 identifiziert (Köhler *et al.*, 1999). Neueste Untersuchungen zeigen, dass einige dieser Isoformen Unterschiede in ihrer Affinität zu Zielproteinen in *A. thaliana* aufweisen (Reddy *et al.*, 1999), die sogar bis hin zu einer Zielspezifität gehen, die in einem völligen Ausbleiben einer Bindung an eine CaM-Bindedomäne resultiert (Köhler *et al.*, 1999). Ergebnisse mit den konservierten CaM-Isoformen SCaM1-3 aus *G. max* und den dazu divergierenden Isoformen SCaM4&5, mit 32 differierenden Aminosäuren im Vergleich zu den konservierten Isoformen, deuten auf ähnliche Isoform-abhängige Bindespezifitäten in der Sojabohne hin (Lee *et al.*, 1995).

Den mehr als 25 identifizierten Zielen von Calmodulin in Tieren, die Kinasen, Rezeptoren, Ionenkanäle und G-Proteine beinhalten (Rhoads und Friedberg, 1997), steht bisher noch eine relativ kleine Anzahl von in Pflanzen identifizierten CaM-bindenden Proteinen gegenüber. Dennoch handelt es sich hierbei eine sehr diverse Gruppe von Proteinen, was vermuten lässt, dass möglicherweise ein breites Spektrum an Prozessen in Pflanzen über Calmodulin und Calmodulin ähnliche Proteine gesteuert wird. Zu den Calmodulin-bindenden Proteinen aus Pflanzen zählen zum Beispiel die Ca²⁺-bindende, Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Kinase CCaMK (Ramachandiran *et al.*, 1997), eine NTPase (Hsieh *et al.*, 1996), das basische Leucin-Zipper-Protein TGA3 (Gawienowski, 1996) und mehrere Glutamat Decarboxylasen, deren Homologe in Tieren interessanterweise nicht über Calmodulin reguliert werden (Baum *et al.*, 1993; Zik *et al.*, 1998).

Für eine große Zahl von CaM-bindenden Proteinen ist bekannt, dass sie sogenannte PEST-Sequenzen enthalten und anfällig für eine Proteolyse durch endogene neutrale Proteasen wie zum Beispiel Calpain I und Calpain II sind (Barnes und Gomes, 1995; Wang *et al.*, 1989). So zeigte eine Untersuchung der Aminosäuresequenzen von 42 CaM-bindenden Proteinen, dass 36 dieser Proteine PEST-Sequenzen enthielten (Barnes und Gomes, 1995). PEST-Sequenzen sind Bereiche einer Aminosäuresequenz, die reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind und nicht von basischen Aminosäureresten unterbrochen werden. Sie weisen eine hohe Konzentration an negativ geladenen Resten auf und sind von einer Gruppe basischer Aminosäuren umgeben (Rogers *et al.*, 1986). Mit Hilfe des Programms PEST-FIND (Rogers *et al.*, 1986) können potentielle PEST-Sequenzen identifiziert werden. PEST-Werte reichen von -50 bis +50, wobei Werte > 0 eine starke PEST-Sequenz anzeigen und Werte zwischen -5 und 0 eine schwache PEST-Sequenz.

Außerdem sind eine ganze Reihe CaM-bindender Proteine anfällig für eine Phosphorylierung durch Serin-/Threonin-Kinasen und werden *in vitro* durch eine oder mehrere der drei vorwiegenden multifunktionalen Serin-/Threonin-Kinasen phosphoryliert: cyclische AMP-abhängige Proteinkinase, CaM-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und Proteinkinase C (siehe Übersichtsartikel von Crivici und Ikura, 1995). In vielen Fällen reduziert die Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes, der innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der CaM-bindenden Domäne liegt, deren Affinität für Calmodulin und inhibiert so die CaM-induzierte Aktivierung des Enzyms. Aber auch der gegenteilige Effekt wird beobachtet. So wird die CaM-Affinität von CaMKII durch die Autophosphorylierung eines Threoninrestes in der autoinhibitorischen Domäne, die N-terminal zur Grenze der überlappenden CaM-Bindedomäne liegt, um das 1000-fache gesteigert (Colbran *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1992).

Um eine effektive Funktion von Ca^{2+} als Signalüberträger zu gewährleisten und cytotoxische Effekte zu verhindern, wird seine Konzentration im Cytosol von Pflanzenzellen gewöhnlich auf einem ausreichend geringen Niveau gehalten. Diese Regulation erfolgt über die Sequestrierung überschüssiger Mengen des Kations in intrazelluläre Ca^{2+} -speichernde Organellen oder seinen Transport über das Plasmalemma aus der Zelle heraus (Bush, 1995). Entsprechende Untersuchungen sprechen für eine derartige Regulation auch in infizierten Zellen von Wurzelknöllchen. So sind Ca^{2+} -Ionen in der Lage, den Ionen- und Metabolit-Transport über die Peribakteroidmembran der Symbiosomen zu kontrollieren (Tyerman *et al.*, 1995; Whitehaed *et al.*, 1995). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} für die Aktivität einer Proteinkinase benötigt wird, die in der Sojabohne die Aufnahme von Malat durch die Symbiosomen stimuliert (Ouyang *et al.*, 1991; Weaver *et al.*, 1991; Weaver und Roberts, 1992). Außerdem inhibiert Ca^{2+} die Transportaktivität einer H^+ -ATPase in der PBM von *Lupinus luteus* Wurzelknöllchen (Andreev *et al.*, 1997). Weitere Versuche an Symbiosomen dieser Leguminose belegen, dass die Symbiosomen in infizierten Zellen als Ca^{2+} -Speicher fungieren und somit möglicherweise auch an der Ca^{2+} -Homöostasis im Cytosol der Pflanze beteiligt sind (Andreeva *et al.*, 1999).

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Calcium in Symbiosomen infizierter Zellen von Ackerbohnenknöllchen in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration im Nährmedium zeigten hohe Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytoplasma der Bakterioide und auf der Oberfläche der dem Cytoplasma der Pflanzenzelle zugewandten Seite der PBM (Izmailov *et al.*, 1999), wobei es bei normaler Ca^{2+} -Konzentration nicht zu einer Anhäufung von Ca^{2+} -Ionen im Peribakteroidraum der Symbiosomen kam. In Arbeiten von Andreev *et al.* (1999) an aufgereinigten Symbiosomen und PBM-Vesikeln aus *V. faba* Knöllchen konnte eine ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpe in der PBM funktionell identifiziert werden, die für den aktiven Transport von Ca^{2+} über die PBM verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte mit diesen Experimenten die Existenz vermeintlicher endogener Ca^{2+} -Reservoire in Symbiosomen und insbesondere in Bakteroiden von Ackerbohnenknöllchen belegt werden. Dieses macht eine Beteiligung der Symbiosomen an der Regulation des cytoplasmatischen Ca^{2+} -Niveaus in den infizierten Zellen von Ackerbohnenknöllchen wahrscheinlich (Andreev *et al.*, 1999).

B.6 Ziele der Dissertation

Die bisherigen Studien zu Genen, die in Verbindung mit der Rhizobien- oder AM-Symbiose der Ackerbohne spezifisch oder amplifiziert exprimiert werden, befassten sich fast ausschließlich mit der Analyse der Gene und ihrer Transkripte. Es konnten zwar für eine ganze Reihe der kodierten Symbiose-relevanten Proteine Funktionen anhand von Homologien zu bereits bekannten Nodulinen postuliert werden. Aber es wurden auch Transkripte identifiziert, die im Zusammenhang mit der Rhizobien-Leguminosen oder AM-Symbiose noch nicht beschrieben worden waren und deren Funktionen weitgehend unbekannt waren. Es war das Ziel dieser Arbeit, eine Auswahl dieser Symbiose-relevanten Gene, die auf Grund ihres zeitlichen oder räumlichen Expressionsmusters von besonderem Interesse waren, auf Proteinebene zu analysieren. Diese Auswahl umfasste die Knöllchen-spezifisch exprimierten Gene VfENOD18, VfNOD28/32 und VfNOD32, das Knöllchen-/Mykorrhiza-spezifisch exprimierte Gen VfLb29 und das Mykorrhiza-amplifiziert exprimierte Gen VfCaMBP1. Lokalisierungsstudien mittels Licht- und Elektronenmikroskopie unter Einsatz von Antikörpern für diese Proteine sollten zur Bestimmung ihres Funktionsortes im jeweiligen symbiontischen Gewebe führen. Anhand dieser Studien und über die Analyse von eventuellen Homologien zu Proteinen bekannter Funktion sollten Hypothesen für eine mögliche Funktion dieser Symbiose-relevanten Proteine aufgestellt werden. Zur Überprüfung dieser Hypothesen waren im Anschluss biochemische Funktionsanalysen unter Verwendung von in *E. coli* exprimierten und nachfolgend aufgereinigten Fusionsproteinen geplant.

B.7 Publikationen

Veröffentlichungen, in denen wesentliche Teile dieser Dissertation publiziert oder zur Publikation eingereicht wurden, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

B.7.1 Referierte Publikationen

- * **Becker JD, Moreira LM, Kapp D, Frosch SC, Pühler A, Perlick AM:** The nodulin VfENOD18 is an ATP-binding protein in infected cells of *Vicia faba* L. nodules. *Plant Mol Biol*: eingereicht (2000)
 - * **Frosch SC, Becker JD, Schultze M, Schlesier B, Kahmann U, Pühler A, Perlick AM:** The nodulin Nvf32 is highly abundant only in a subpopulation of *Vicia faba* L. cv. Kleine Thüringer. *Plant Sci*: eingereicht (2001).
 - * **Hohnjec N, Küster H, Albus U, Frosch SC, Becker JD, Pühler A, Perlick AM, Frühling M:** The broad bean nodulin VfENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily. *Mol Gen Genet* 264: 241-250 (2000).
- Hohnjec N, Becker JD, Pühler A, Perlick AM, Küster H:** Genomic organization and expression properties of the MtSucS1 gene, which encodes a nodule-enhanced sucrose synthase in the model legume *Medicago truncatula*. *Mol Gen Genet* 261: 514-522 (1999).
- Moreira LM, Becker JD, Pühler A, Becker A:** The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microbiol* 146: 2227-2248 (2000).

B.7.2 Buchbeiträge

- Küster H., Frühling M., Albus U., Becker J.D., Böhner S., Frosch S.C., Geise G., Hohnjec N., Krüger J., Pham V.-A., Rieping M., Schröder G., Stavridis T., Strangmann M., Tchetkova S., Pühler A. und Perlick A.M.:** The Rhizobium-legume symbiosis: Characterization of marker genes for the organogenesis and functioning of nitrogen-fixing root nodules in the grain legume broad bean (*Vicia faba* L.). In: Pandalai S (ed), *Recent Research Developments in Plant Physiology*. Research Signpost, im Druck (2001).
- Perlick AM, Frühling M, Schröder G, Albus U, Frosch SC, Becker J, Böhner S, Quandt H-J, Broer I, Küster H, Pühler A:** Analysis of genes expressed in root nodules of broad bean (*Vicia faba* L.). In Legocki A, Bothe H, Pühler A (eds): *NATO ASI Series, Vol. G 39. Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*, pp. 91-94. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1997).

C. MATERIAL

C.1 Chemikalien, Verbrauchsmittel, Geräte, Enzyme & Kits

C.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Chemikalie / Verbrauchsmittel	Hersteller / Bezugsquelle
40 % Acryl/Bisacrylamidamid (37.5:1)	Amresco
Agar	Gibco
Agarose	Gibco
Ammoniumpersulfat	Amresco
Amylose-Harz	New England Biolabs
Antibiotika	Serva
Autoradiographiefilm	Sterling
Bromphenolblau	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Gibco, Life Technologies
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
DNA-Längenstandard X	Boehringer
Eppendorfgefäße	Brand
Ethidiumbromid	Serva
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech
$8N_3$ ATP[γ]biotin, $8N_3$ GTP[γ]biotin	Affinity Labeling Technologies
ATP, GTP	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
Einwegküvetten	Greiner
Elektroporations-Küvetten 0.2 cm	Invitrogen
Entwickler	Kodak
Ethidiumbromid	Merck
Filme: Pan-F Ektachrom 100	Ilford Kodak
Filterpapier 3 MM und Nr.5	Whatman
Fischgelatine	Aurion
Fixierer	Kodak
Frischhaltefolie	Melitta
Glaspipetten	Brand
Glutaraldehyd 25 %	British BioCell
Glycerin	Merck
Glycin	Serva
Hefeextrakt	Oxoid
Hybond-N-Schutzfolie	Amersham Pharmacia Biotech
Imidazol	Sigma-Aldrich
Ionenaustauschersäulen Tip20	Qiagen
IPTG	BTS
LR-White, Metacryleinbettungsharz	Polysciences

Chemikalie / Verbrauchsmittel	Hersteller / Bezugsquelle
LSA (Lammserumalbumin)	Gibco
Malachite Grün Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Glücksklee
β -Mercaptoethanol	Roth
Netzchen	Polysciences
NI-NTA Superflow Harz	Qiagen
Nitrocellulosemembran Biotrace NT	Pall Gelman Sciences
Objektträger SuperFrost-Plus	Menzel-Glaser
Oligonukleotide	ARK Scientific
Parafilm	American National
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Softstrips	Biozym
PE-Röhrchen (12 und 50 ml)	Greiner
Petrischalen	Greiner
Penassay Broth	Oxoid
Pipettierspitzen	Greiner
Phenol	Roth
Polyallomer-UZ-Röhrchen	Beckmann
Ponceau-S	Sigma-Aldrich
Prestained SDS-PAGE Standard (broad range)	Bio-Rad
Proteinmarker VII-L	Sigma-Aldrich
Protein-Assay (Bradford Farbstoffkonzentrat)	Bio-Rad
PVDF-Membran	Fisher Scientific
SDS	Serva
Sephacryl® S-200 HR	Amersham Pharmacia Biotech
Sepharose 4B, Cyanogenbromid-aktiviert	Sigma-Aldrich
Sepharose 4B, Epoxid-aktiviert	Sigma-Aldrich
Sterilfilter 0.45 und 0.2 μ m	Millipore
Spritzen	Becton-Dickinson
TEMED	Amresco
Toluidinblau 0	Serva
Transferplatten, 8-Kanal	Dunn Labortechnik
Triethanolamin	J.T.Baker
Tris-base	Amersham Pharmacia Biotech
Tris/Glycin-SDS Elektrophorese-Pufferlösung	Amresco
Triton X-100	Serva
Trypton	Oxoid
Tween 20	Serva
Ultrafree-0.5, -4 und -15 Konzentratoren	Millipore
Vermiculit	Deut. Verm. Dämmstoff GmbH

Weitere in der Arbeit verwendeten und hier nicht aufgelisteten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Boehringer, Fluka, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen.

C.1.2 Geräte

Gerät/Apparatur	Hersteller/Bezugsquelle
Autoklav	Tecnorama, Webeco
Automatische Pipetten	Eppendorf, Gilson
Binokular SZ 40-PT	Olympus
Bio-Dot SF (Slot Blot)	Bio-Rad
Brutschränke	Memmert
Chromatographie-Säule (Ø 1.6 cm, Länge 5 cm)	Merck
Chromatographie-Säule (Ø 1.6 cm, Länge 60 cm)	Merck
Diamantmesser	Diatom
Elektronische Sofortbildkamera Cybertech CS-1	Cybertech
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Werkstatt Uni Bielefeld
Eismaschine	Scotsman
Durchfluß-Photometer UV-1	Amersham Pharmacia Biotech
Fraktions-Sammler FRAC-200	Amersham Pharmacia Biotech
Gel-Trockner	Uni-Equip
Gelplatten, Spacer und Käbme für SDS-PAGE	Hofer
Gene Pulser™ und Pulse Controller	Bio-Rad
GenQuant II	Amersham Pharmacia Biotech
Inkubations-Schüttler G25	New Brunswick Scientific
Heizblock 5320	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Bachhofer
Lichtmikroskop Axiophot	Zeiss
Magnetrührer Combimag RCT	IKA
Midget 2050 Electrophoresis-Unit	Hofer
Mighty-Small SE245 Dual-Gel-Caster-System	Hofer
Mighty Small SE200 Multiple-Gel-Caster	Hofer
Peristaltische Pumpe P-1	Amersham Pharmacia Biotech
pH-Meter Multi-Calimatic	Knick
Präparative Gelelektrophorese Model 491 Prep Cell	Bio-Rad
Puffer-Kreislauf Pumpe	Bio-Rad
Proben-Applikator SA-5	Amersham Pharmacia Biotech
Schreiber REC-482	Amersham Pharmacia Biotech
Schütteltisch KL2	Bühler
Spannungsgeber DC Power 5004	Uni-Equip
Spectro-Photometer 4049	LKB Biochrom
Sterilbänke	UniEquip
Thermocycler PTC-100™	MJ Research
Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Transmissions-Elektronenmikroskop EM109	Zeiss
Ultramikrotom Ultracut II	Reichert
UV-Transiluminator	UVP
Vakuumpumpe RS5	Brand
Vortex	Cenco, Bender & Hobein
Waagen	Satorius

Gerät/Apparatur	Hersteller/Bezugsquelle
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen: Ultrazentrifuge L8-70 Hochgeschwindigkeitszentrifugen J2-21, J-21C Kühlzentrifuge 5403 Tischzentrifuge 5414 Tischzentrifuge Biofuge A Tischzentrifuge Universal II	Beckmann Beckmann Eppendorf Eppendorf Heraeus Christ Hettich
Rotoren: JA-10, JA-14, JA-17, JA-20 SW-40Ti 16F24-11 16A4-44	Beckmann Beckmann Eppendorf Eppendorf

C.1.3 Enzyme & Kits

Enzym	Hersteller
DNase I	Serva
Faktor Xa Protease	New England Biolabs
Klenow-Fragment	Boehringer
Lysozym	Serva
RNase A	Serva
Restriktionsendonukleasen- und Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, New England Biotech, Boehringer
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	Boehringer
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB
T4 DNA-Ligase	Boehringer
Kit	
QIAEX Gel Extraction Kit	Qiagen
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
ECL-Plus Western Blot detection system	Amersham Pharmacia Biotech
Silberverstärker Kit R-Gent SE-EM	Aurion

C.2 Pflanzenmaterial, cDNA-Genbanken, Plasmide und Bakterienstämme

C.2.1 Pflanzenmaterial

Für die Anzucht von Ackerbohnen wurde Saatgut des Kultivars *Vicia faba* L. cv. Kleine Thüringer (Gärtnerei der Universität Bielefeld) eingesetzt. Saatgut für alle anderen Pflanzen stammte ebenfalls aus Beständen der Gärtnerei.

C.2.2 cDNA-Genbanken

Im Phagenvektor λ gt11 wurden eine allgemeine cDNA-Genbank aus Wurzelknöllchen der Ackerbohne *Vicia faba* L. cv. Kleine Thüringer und eine differentielle cDNA-Genbank angelegt (Perlick 1991). Letztere enthält 645 Klone, die potentiell für knöllchenspezifische Transkripte kodieren. Für die Klonierung in die *EcoRI*-Schnittstelle des Phagenvektors wurden die cDNAs mit *EcoRI*-Adaptoren (GGAATTCGGCAGAG) versehen.

C.2.3 Plasmide

Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
Vektorplasmide		
pSVB30	<i>lacZα</i> , mcs, Ap ^r ; Klonier-, Sequenzier- und Expressionsvektor	Arnold und Pühler (1988)
pBluescript [®] II SK +	<i>lacZα</i> , mcs, Ap ^r ; Klonier-, Sequenzier- und Expressionsvektor	Stratagene
pMAL [™] -c	<i>malE</i> Δ (2-26)-(mcs)- <i>lacZα</i> -Fusion, <i>lacI</i> , Ap ^r , Faktor Xa Erkennungssequenz; Expressionsvektor (cytoplasmatische Fusionsprot.)	New England Biolabs
pMAL [™] -p	<i>malE</i> -(mcs)- <i>lacZα</i> -Fusion, <i>lacI</i> , Ap ^r , Faktor Xa Erkennungssequenz; Expressionsvektor (periplasmatische Fusionsproteine)	New England Biolabs
pMAL [™] -cd	<i>malE</i> Δ (2-26)-(mcs)- <i>lacZα</i> -Fusion mit 40 bp Deletion in mcs, <i>lacI</i> , Ap ^r , Faktor Xa Erkennungs-Sequenz; Expressionsvektor	Becker (1996)
pWH844	Histidine-Hexapeptid-Sequenz (His-Tag), mcs, Ap ^r , <i>lacI</i> ^q ; Expressionsvektor	Schirmer <i>et al.</i> (1997)
Plasmide mit cDNA-Sequenzen		
pJB-M18	pMAL [™] -cd Derivat, trägt die Kodierregion der VfENOD18 cDNA VfNDS-X9-278-1 in einem 511 bp großen <i>PstI</i> Fragment aus pSKII-ENOD18 (5'→3' Orientierung); Expressionsplasmid	Becker (1996)
pJB-Q32a	pQE-9 Derivat, trägt die Kodierregion der VfNOD32a cDNA VfNDS-L39 in einem 873 bp großen <i>BamHI/HindIII</i> Fragment aus pSKII-NOD32a; Expressionsplasmid	Becker (1996)
pJB-W32a	pWH-844 Derivat, trägt die Kodierregion der VfNOD32a cDNA VfNDS-L39 in einem 873 bp großen <i>BamHI/HindIII</i> Fragment aus pJB-Q32a; Expressionsplasmid	diese Arbeit
p257-1	pSVB30 Derivat, trägt die 648 bp große vollständige VfLb29 cDNA VfNDS-X29 als <i>EcoRI</i> Fragment	Frühling (1995)
pJB-M29c	pMAL [™] -c Derivat, trägt die Kodierregion der VfLb29 cDNA VfNDS-X29 in einem über <i>HindIII/StuI</i> in 5'→3' Orientierung klonierten 644 bp großen PCR-Produkt; Primer Lb29-up und M13 „universal“; Expressionsplasmid	diese Arbeit
pPMP-X8	pMAL [™] -p Derivat, trägt die Kodierregion einer unvollständigen Vf-CaMBP1 cDNA in einem in 5'→3' Orientierung klonierten 713 bp großen PCR-Produkt; Expressionsplasmid	Pham (1999)

C.2.4 Bakterienstämme

Stämme	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, hsdR17, supE44, lac⁻, [F⁺ proAB, lacI^q ZΔM15, Tn10 (tet^r)], thi</i> ; Klonier- und Sequenzierstamm	Bullock <i>et al.</i> , 1987
W 3110	F'(lacI ^q , L8), <i>hsdR⁻, hsdM⁺</i>	Brent und Ptashne, 1981
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>		
Vf39	Wildtyp	Priefer (1989)
<i>Bradirhizobium japonicum</i>		
USDA 110	Wildtyp	Bernhard Nußbaumer (Universität Bielefeld)

C.3 Nährmedien und Zusätze

C.3.1 Nährmedien

Die Medien werden, sofern nicht anders vermerkt, mit Milli-Q™-Wasser (Millipore) angesetzt und autoklaviert.

PA-Medium (Penassay Broth)

17.5 g/l Penassay Broth

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

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl

Der pH sollte bei 7.4 liegen.

SB-Medium (Superbroth)

32 g/l Trypton
20 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl

Auf pH 7.5 einstellen.

SOC-Medium

2 % (w/v) Trypton
0.5 % (w/v) Hefeextrakt
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose

TY-Medium

5 g/l Trypton
3 g/l Hefeextrakt
0.7 g/l CaCl₂

Auf pH 7.5 einstellen.

C.3.2 Zusätze

➤ Agar

Zur Herstellung von Festmedien werden 15 g Agar pro Liter Flüssigmedium zugesetzt.

➤ Antibiotika

Ampicillin (Ap): 100 µg/ml Medium 100 mg/ml stock in H₂O, sterilfiltriert
Lagerung bei -20 °C

Tetracyclin (Tet): 12.5 µg/ml Medium 12.5 mg/ml stock in 70 % Ethanol
Lagerung bei -20 °C

➤ IPTG zur Induktion

1 M IPTG

Sterilfiltrierte Lösung in Millipore, Lagerung in 1 ml Aliquots bei -20 °C

C.4 Primer für PCR-Reaktionen und synthetische Peptide

C.4.1 Primer für PCR-Reaktionen

Primer	Template	Sequenz (5'→3')
ENOD18-A	genomische DNA	GTK GTK GCW AAR YTK TAY TGG GGW GAT
ENOD18-B	genomische DNA	CTT MAC MAC RGT MAC WGG RCA
Lb29-up	p257-1, unterer Strang	GAG TTT ACT TTG AGG CAA GA
M13 „universal“	p257-1, oberer Strang	AAC AGC TAT GAC CAT G

C.4.2 Synthetische Peptide

Peptid	Herkunft	Sequenz (NH ₂ →COOH)
NOD32a-E15	VfNOD32a, Aminosäuren 237-254	DEK FDD QKG IDS MET PKS
Lb29	VfLb29, Aminosäuren 92-105	GVV HTQ KRV DGL HF
CaMBP1	VfCaMBP1, Aminosäuren 482-500	LWC KIR AVV KLG ISV RRI A

C.5 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen werden, sofern nicht anders vermerkt, mit Milli-QTM-Wasser (Millipore) angesetzt.

C.5.1 DNA-Puffer

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7.5
1 mM EDTA

C.5.2 Puffer und Lösungen zur Isolierung und Reinigung von DNA

HB1-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
10 mM EDTA

Kurz vor Gebrauch 10 mg/ml RNase A zugeben.

HB2-Puffer

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

HB3-Puffer

3 M K-Acetat
Auf pH 4.8 mit konz. Essigsäure einstellen.

P1-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
10 mM EDTA

P2-Puffer

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

P3-Puffer

2.55 M K-Acetat
Auf pH 4.8 mit konz. Essigsäure einstellen.

QBT-Äquilibrierungspuffer

750 mM NaCl
50 mM MOPS
15 % (v/v) Ethanol
0.15 % (v/v) Triton-X-100
Auf pH 7 einstellen.

QC-Waschpuffer

1 M NaCl
50 mM MOPS
15 % (v/v) Ethanol
Auf pH 7 einstellen.

QF-Elutionspuffer

1,25 M NaCl
50 mM MOPS
15 % (v/v) Ethanol
Auf pH 8.2 einstellen.

RNase A Lösung

10 mg/ml RNase A
10 mM Tris-HCl, pH 8
15 mM NaCl
10 min bei 100 °C, Lagerung bei 4 °C

QX1-Puffer

4 M NaClO₄
3 M NaI
10 mM Tris-HCl, pH 7
0.1 % (v/v) Na₂S₂O₃

QX2-Puffer

8 M NaClO₄
10 mM Tris-HCl, pH 7

QX3-Puffer

100 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl, pH 7
70 % (v/v)	Ethanol

C.5.3 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese20 x TAE-Puffer

800 mM	Tris-base
300 mM	NaOAc
25 mM	EDTA

Auf pH 8.3 mit konz. Essigsäure einstellen.

DNA-Ladepuffer

10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
50 % (v/v)	Glycerin
0.2 % (w/v)	Bromphenolblau
0.2 % (w/v)	Xylencyanol

Ethidiumbromid-Färbelösung

1 µg/ml	Ethidiumbromid
---------	----------------

C.5.4 Puffer und Lösungen für Enzym-Reaktionen**Restriktion:**10 x NEBuffer 1

100 mM	Bis Tris Propane-HCl, pH 7
100 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT

10 x NEBuffer 2

100 mM	Tris-HCl, pH 7.9
100 mM	MgCl ₂
500 mM	NaCl
10 mM	DTT

10 x NEBuffer 3

500 mM	Tris-HCl, pH 7.9
100 mM	MgCl ₂
1 M	NaCl
10 mM	DTT

10 x NEBuffer 4

200 mM	TrisAc
100 mM	MgAc
500 mM	KAc
10 mM	DTT

Auf pH 7.9 einstellen.

Dephosphorylierung:10 x SA Phosphatase-Puffer

200	mM	Tris-HCl, pH 8
100	mM	MgCl ₂

Klenow-Fragment-Reaktion:10 x Klenow-Puffer

100	mM	Tris-HCl, pH 7.5
50	mM	MgCl ₂
75	mM	DTT

Ligation:10 x Ligasepuffer

500	mM	Tris-HCl, pH 7.6
100	mM	KCl
10	mM	rATP
10	mM	DTT
50	% (w/v)	PEG 8000

Polymerase-Kettenreaktion (PCR):dNTP-Mix

10	mM	dATP
10	mM	dTTP
10	mM	dCTP
10	mM	dGTP

10 x *Pwo*-Puffer

100	mM	Tris-HCl, pH 8.85
250	mM	KCl
50	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
20	mM	MgSO ₄

C.5.5 Puffer für die CaCl₂-TransformationTbf1-Puffer

10	mM	MES
100	mM	RbCl
10	mM	CaCl ₂
50	mM	MnCl ₂

Auf pH 6 einstellen.

Tbf2-Puffer

10	mM	MOPS
10	mM	RbCl
75	mM	CaCl ₂
15	% (v/v)	Glycerin

Auf pH 6.5 einstellen.

C.5.6 Puffer und Lösungen zur Isolierung von Proteinen

Aufschlusspuffer

25 % (w/v)	Saccharose
50 mM	Tris-HCl, pH 8
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA

LysozymbLösung

20 mg/ml	Lysozym
----------	---------

Frisch in Aufschlusspuffer ansetzen, nicht vortexen.

DNase I Lösung

4 mg/ml	DNase I
59 % (v/v)	Glycerin

In 50 mM Tris-HCl pH 8 ansetzen, Lagerung bei -20 °C

RNase A Lösung

10 mg/ml	RNase A
10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
15 mM	NaCl

10 min bei 100 °C, Lagerung bei 4 °C

Periplasma-Puffer

20 % (w/v)	Saccharose
30 mM	Tris-HCl, pH 8
1 mM	EDTA

C.5.7 Puffer und Lösungen für die analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE)

Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)-Stammlösung (40 %)

38.93 g	Acrylamid
1.07 g	N,N'-Methylen-Bisacrylamid

In 100 ml Millipore lösen und filtrieren; Lösung ist neurotoxisch! Lagerung bei 4 °C

4 x Trenngelpuffer

1.5 M	Tris-HCl, pH 8.8
0.4 % (w/v)	SDS

4 x Sammelgelpuffer

500 mM	Tris-HCl, pH 6.8
0.4 % (w/v)	SDS

10 x SDS-Elektrophorese-Puffer

250 mM	Tris-base
1.92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

⇒ pH 8.2 - 8.4 (nicht einstellen)

10 % Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung

10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
------------	-------------------

Lagerung bei -20 °C

10 % TEMED

10 % (v/v) Tetramethylethyldiamin
Lagerung bei 4 °C

reduzierender Proteingel-Ladepuffer (PBJR)

100 mM Tris-HCl, pH 6.8
200 mM DTT
4 % (w/v) SDS
0.2 % (w/v) Bromphenolblau
20 % (v/v) Glycerin

Coomassie-Färbelösung

2 g Coomassie® Brilliant Blue R 250
475 ml Ethanol

Rühren, bis sich Coomassie gelöst hat, dann

425 ml H₂O
100 ml konz. Essigsäure

Sollte auch nach halbstündigem Rühren ein Präzipitat verbleiben, so muss die Lösung filtriert werden.

Proteingel-Entfärbelösung

210 ml Ethanol
510 ml H₂O
80 ml konz. Essigsäure

Ansetzen in der angegebenen Reihenfolge.

C.5.8 Puffer und Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie von His-Tag-FusionsproteinenWaschpuffer 1

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
300 mM NaCl
10 % (v/v) Glycerin

Waschpuffer 2

100 mM Tris-HCl, pH 8.9
500 mM NaCl

C.5.9 Puffer und Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie und den Faktor Xa-Verdau von MBP-FusionsproteinenPhosphatpuffer 0.5 M

A) 69 g / l NaH₂PO₄
B) 134 g / l Na₂HPO₄

Je 1 Liter herstellen und 117 ml (A) mit 382 ml (B) mischen.
Der pH sollte bei 7.2 liegen.

Säulen-Puffer MBP

10 mM	Phosphatpuffer 0.5 M
500 mM	NaCl
1 mM	NaN ₃
10 mM	β-Mercaptoethanol
1 mM	EDTA

Der pH sollte bei 7 liegen.

Faktor Xa Puffer

20 mM	Tris-HCl, pH 8
100 mM	NaCl
2 mM	CaCl ₂

Waschpuffer I

100 mM	NaAc, pH 4.0
500 mM	NaCl

Waschpuffer II

100 mM	Tris-HCl, pH 8
500 mM	NaCl

C.5.10 Puffer und Lösungen für die präparative diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (präparative SDS-DISKPAGE)4 x Trenngelpuffer

1.5 M	Tris-HCl, pH 8.8
0.4 % (w/v)	SDS

4 x Sammelgelpuffer

500 mM	Tris-HCl, pH 6.8
0.4 % (w/v)	SDS

10 x SDS-Elektrophorese-Puffer

250 mM	Tris-base
1.92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

⇒ pH 8.2 - 8.4 (nicht einstellen !)

SDS Proben-Puffer (reduzierend)

60 mM	Tris-HCl, pH 6.8
10 % (w/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0.025 % (w/v)	Bromphenolblau

C.5.11 Puffer für das Protein-SequenzierblottingPS-Transferpuffer

25 mM	Tris-HCl, pH 8.3
192 mM	Glycin
10 % (v/v)	Methanol

C.5.12 Puffer für die Gesamtproteinextraktion aus PflanzengewebenExtraktionspuffer

700 mM	Saccharose
500 mM	Tris-HCl, pH 9.5
50 mM	EDTA
100 mM	KCl
2 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	optional Protease-Inhibitoren

denaturierender Proteinpuffer

10 mM	Tris-HCl, pH 9.5
2 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
2 % (w/v)	SDS

C.5.13 Puffer für die Isolierung von CalmodulinPuffer A

10 mM	Hepes-KOH, pH 7.0
0.5 mM	CaCl ₂

Puffer B

10 mM	Hepes-KOH, pH 7.0
0.5 mM	CaCl ₂
500 mM	KCl

Puffer C

10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
1 mM	EGTA

C.5.14 Puffer für den Calmodulin Retardationstest

Den Puffern werden je nach Test 1 mM CaCl₂ oder 5 mM EGTA zugegeben.

Inkubationspuffer

100 mM	Tris-HCl, pH 8.0
4 M	Harnstoff

Trenngelpuffer

375 mM	Tris-HCl, pH 8.8
4 M	Harnstoff

Probenpuffer

375 mM	Tris-HCl, pH 6.8
30 % (v/v)	Glycerin
0.023 % (v/v)	Bromphenolblau

Elektrophorese-Puffer

25 mM	Tris-HCl, pH 8.3
192 mM	Glycin

C.5.15 Puffer für Nukleotid-Bindetests (Photomarkierung)Bindungspuffer

15 mM	Tris-HCl, pH 6.8
10 mM	MgCl ₂

Stripping-Puffer

62.5 mM	Tris-HCl, pH 6.7
100 mM	β-Mercaptoethanol
2 % (w/v)	SDS

C.5.16 Puffer und Lösungen für den ATPase AktivitätstestReaktionspuffer

40 mM	Tris-HCl, pH 7
4 mM	MgCl ₂ , MnCl ₂ oder CaCl ₂
5 % (v/v)	Glycerin

Farbreagenz

Lösung A:	0.034 % (w/v)	Malachite Grün Hydrochlorid
	0.1 % (v/v)	Triton X-100
Lösung B:	10.5 g/l	Ammonium Molybdate in 1 M HCl
3:1 Mischung der Lösungen A und B herstellen, 20 min mischen und durch Whatman Nr.5 Filterpapier filtrieren.		

C.5.17 Puffer für den ⁴⁵Ca²⁺-BindungstestRenaturierungspuffer

60 mM	KCl
10 mM	Imidazol
5 mM	MgCl ₂

Auf pH 7 einstellen.

C.5.18 Puffer für die Aufreinigung von AntikörpernLigandenpuffer

100 mM	NaHCO ₃ , pH 8.3
500 mM	NaCl

Waschpuffer A

100 mM	NaAc, pH 4.0
500 mM	NaCl

Waschpuffer B

100 mM	Tris-HCl, pH 8
500 mM	NaCl

Waschpuffer I

10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
0.02 % (w/v)	NaN ₃

Waschpuffer II

10 mM	Tris-HCl, pH 8.8
0.02 % (w/v)	NaN ₃

Waschpuffer III

10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
500 mM	NaCl
0.02 % (w/v)	NaN ₃

Elutionspuffer I

100 mM	Glycin
0.02 % (w/v)	NaN ₃

Auf pH 2.5 einstellen.

Elutionspuffer II

100 mM	Triethanolamin
0.02 % (w/v)	NaN ₃

Frisch ansetzen und auf pH 11.5 einstellen.

C.5.19 Puffer und Lösungen für Immunoblotting-VerfahrenTowbin-Transferpuffer

48 mM	Tris-base
39 mM	Glycin
0.04 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Methanol

⇒ pH 8.2 - 8.4 (nicht einstellen !)

Ponceau-S-Lösung

0.2 %	Ponceau S
3 %	Trichloressigsäure

10 x PBS-Puffer

1.4 M	NaCl
27 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
18 mM	KH ₂ PO ₄

Auf pH 7.3 einstellen.

10 x TBS-Puffer

200 mM	Tris-HCl, pH 7.5
1.5 M	NaCl

AP-Puffer

100 mM	Tris-HCl, pH 9.5
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂

Entwickler-Lösung

NBT-Lösung:	75 % (w/v)	NBT
	70 % (v/v)	Dimethylformamid

X-Phosphat-Lösung: 50 % (w/v) X-Phosphat in Dimethylformamid

10 ml AP-Puffer mit 45 µl NBT-Lösung und 35 µl X-Phosphat-Lösung mischen.

Stoppuffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
1 M	EDTA

C.5.20 Puffer und Lösungen für den immunologischen Tissue-Print

Blockingpuffer

100	mM	Tris-HCl, pH 8.0
0.25	% (w/v)	BSA
0.25	% (w/v)	Fischgelatine
0.3	% (v/v)	Tween-20
0.02	% (w/v)	NaN ₃

Waschpuffer A

100	mM	Tris-HCl, pH 8.0
0.3	% (v/v)	Tween-20
0.02	% (w/v)	NaN ₃

Waschpuffer B

100	mM	Tris-HCl, pH 8.0
1	% (w/v)	SDS
0.3	% (v/v)	Tween-20
0.02	% (w/v)	NaN ₃

Lugol'sche Lösung

1	% (w/v)	KI
1	% (w/v)	I ₂

C.5.21 Puffer und Lösungen für die Immuncytochemie

Fixierlösung

100	mM	KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.2
2	% (v/v)	Paraformaldehyd (depolymerisiert)
0.2	% (v/v)	Glutaraldehyd

Blockingpuffer I

20	mM	Tris-HCl, pH 7.5
150	mM	NaCl
50	mM	Glycin

Inkubationspuffer

20	mM	Tris-HCl, pH 7.5
150	mM	NaCl
1	% (w/v)	BSA
0.1	% (v/v)	Fischgelatine
0.05	% (v/v)	0.05 Tween-20

Blockingpuffer II

20	mM	Tris-HCl, pH 7.5
150	mM	NaCl
1	% (w/v)	BSA
0.1	% (v/v)	Fischgelatine
10	% (v/v)	LSA
0.05	% (v/v)	0.05 Tween-20

alkalische Toluidinblau 0-Lösung

5	g/l	Toluidinblau 0
1	% (w/v)	H ₃ BO ₃
Auf pH 9 einstellen.		

C.6 Antikörper

- Anti-Leghämoglobin IgG, gegen Erbsenleghämoglobine gerichteter Antikörper
Ton Bisseling (Wageningen, Niederlande)
- Anti-Kaninchen IgG (Fc), alkalische Phosphatase-konjugierter Spezies-spezifischer Antikörper aus Ziegen
Bezugsquelle: Promega, Produkt-Nr. S373B
- Anti-Kaninchen IgG, biotinylierter Spezies-spezifischer Antikörper aus Affen
Bezugsquelle: Amersham Life Science, Produkt-Nr. RPN 1004
- Streptavidin-biotinylierte-Meerrettich-Peroxidase Komplex
Bezugsquelle: Amersham Life Science, Produkt-Nr. RPN 1051
- Anti-Kaninchen IgG, Immunogold-konjugierte (15 nm, 12 nm oder 1 nm) Spezies-spezifische Antikörper aus Ziegen
Bezugsquelle: British BioCell

D. METHODEN

Falls nicht anders angegeben, werden die Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt.

D.1 Pflanzenanzucht

Nodulierte Ackerbohnenpflanzen werden im Gewächshaus der Gärtnerei in vorher sterilisiertem Vermiculit gezogen. Hierzu wird die Oberfläche der Samen durch 15-minütiges Eintauchen in 32 % (w/v) Hydrochloresäure sterilisiert und anschließend werden die Samen intensiv mit sterilem Wasser gewaschen. Zur Keimung werden die Samen zwischen steriles, angefeuchtetes Filterpapier 3MM gelegt und 3 bis 4 Tage im Dunkeln bei RT gehalten. Schließlich werden die Keimlinge einzeln in mit sterilem Vermiculit gefüllte Tontöpfe von 12 cm Durchmesser transferiert. Die Keimlinge werden fünf Tage nach dem Setzen mit *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 inokuliert. Zur Anzucht von Ackerbohnen mit sterilen Wurzeln unterbleibt diese Inokulation. Alle Pflanzengewebe bis auf Blüten werden 8 Wochen nach der Inokulation abgeerntet. Sojabohnen werden in gleicher Weise angezogen, aber mit dem Stamm *Bradirhizobium japonicum* USDA 110 inokuliert.

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen sowie die Ackerbohnen zur Gewinnung von Blattgewebe für die Calmodulin-Isolierung werden im Freiland der Gärtnerei gezogen und 6 Wochen nach dem Säen abgeerntet.

D.2 Anzucht und Konservierung von Bakterienstämmen

D.2.1 Bakterienanzucht und Bestimmung des Gesamttiters

Escherichia coli Stämme werden je nach Verwendungszweck in LB-Medium, in SB-Medium oder auf PA-Agarplatten bei 37 °C angezogen. Für die Anzucht der *R. leguminosarum* und *B. japonicum* Stämme wurde TY-Flüssig- und Festmedium verwendet. Bei vorhandener Resistenz werden den Medien Antibiotika gemäß C.3.2 zugesetzt.

Der Bakterientiter wird mittels photometrischer Bestimmung der Zelldichte bei 600 nm ermittelt. Hierbei entspricht eine optische Dichte (o.D.₆₀₀) von 0.1 einem Titer von 2×10^7 *E. coli*/ml bzw. bei *R. leguminosarum* und *B. japonicum* einem Titer von 1×10^8 Zellen/ml.

D.2.2 Konservierung von Bakterienstämmen

1 ml einer ü.N. in LB-Flüssigmedium selektiv angezogenen Bakterienkultur werden mit 172 µl Glycerin 87 % (Endkonz. 15 %) vermischt und bei -70 °C aufbewahrt. Diese Glycerin-Kultur kann so mindestens ein Jahr gelagert werden.

D.3 Genetische Methoden

D.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

D.3.1.1 HB-Lyse (Mini-Präparation von Plasmid-DNA)

Die HB-Lyse ist ein schnelles Verfahren, um kleine Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* zu gewinnen. Es ist die Methode der Wahl, wenn die Plasmide zahlreicher Einzelkolonien einer analytischen Reihenuntersuchung über Restriktionsspaltungen unterworfen werden sollen.

Der Abbau der Zellwand durch Lysozym-Behandlung ermöglicht die Zerstörung der Zellmembran durch Detergenzeinwirkung. Eine alkalische Denaturierung der freigesetzten Nukleinsäuren mit anschließender Renaturierung führt zur Vernetzung der chromosomalen Bakterien-DNA zu wasserunlöslichen Komplexen, wogegen die Plasmid-DNA korrekt renaturiert und bei Zentrifugation im Überstand verbleibt.

- Bakterien ü.N. auf LB/PA-Platten (bei Resistenz mit entsprechenden Antibiotika) bei 37 °C konfluent wachsen lassen
- 200 µl HB1-Puffer in ein Eppendorfgefäß pipettieren, mit einer sterilen Glaspipette die Bakterien von der Platte abstreichen und im Puffer resuspendieren
- 200 µl HB2-Puffer zugeben und mischen
- 5 min bei RT inkubieren
- 200 µl HB3-Puffer zugeben und mischen
- 5 min auf Eis inkubieren
- 15 min bei 13 000 Upm (4 °C) in der Biofuge zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen und mit 500 µl Isopropanol mischen
- 25-30 min bei 13 000 Upm (4 °C) in der Biofuge zentrifugieren
- Überstand vorsichtig vom Pellet abziehen
- Pellet zweimal mit 70 % Ethanol waschen
- Pellet im Vakuum trocknen und in 70-100 µl sterilem Millipore resuspendieren

D.3.1.2 Sequenzierlyse (Midi-Präparation von Plasmid-DNA)

Auch diese Methode nutzt die Vernetzung von chromosomaler DNA durch Denaturierung und Renaturierung über Änderung des pH-Wertes (Alkalidenaturierung). Nach Zentrifugation wird der plasmidhaltige Überstand über eine Tip20-Ionenaustauschersäule (Qiagen) gereinigt. Die gebundene Plasmid-DNA wird im Gegensatz zu verunreinigenden Proteinen und anderen Nukleinsäuren erst bei einer NaCl-Konzentration von 1.25 M eluiert, was ein effektives Waschen der Säule ermöglicht. Die so gewonnene Plasmid-DNA eignet sich unter anderem für Sequenzierungen.

- Bakterien ü.N. auf LB/PA-Platten (bei Resistenz mit entsprechenden Antibiotika) bei 37 °C konfluent wachsen lassen
- Dem P1-Puffer pro ml 10 µl RNase A Lösung frisch zugeben und 500 µl in ein Eppendorfgefäß pipettieren
- Bakterien mit einer sterilen Glaspipette von der Platte abstreichen und im Puffer resuspendieren
- 500 µl P2-Puffer zugeben und 5 x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- 500 µl P3-Puffer zugeben und sofort 5 x invertieren
- 15 min bei 13 000 Upm in der Biofuge zentrifugieren
- Tip20-Säule mindestens 10 min mit 1 ml QBT-Puffer äquilibrieren
- klaren Überstand im Eppendorfgefäß mit blauer Spitze abziehen, auf die Säule geben und durchlaufen lassen
- Säule mit 3 ml QC-Puffer waschen
- Plasmid-DNA mit 800 µl QF-Puffer in neues Eppendorfgefäß eluieren
- Eluat mit 700 µl Isopropanol mischen
- 30 min bei 15 000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand quantitativ vom DNA-Pellet abziehen
- Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol waschen (2 min RT)
- 2 min bei 13 000 Upm in der Biofuge zentrifugieren
- Überstand quantitativ abziehen und Pellet im Vakuum trocknen
- Pellet in 20 µl sterilem Millipore resuspendieren

D.3.1.3 Gesamt-DNA Isolierung aus pflanzlichen Geweben

Zur Isolierung von pflanzlicher Gesamt-DNA wird der DNeasy™ Plant Mini Kit von Qiagen eingesetzt. Aus 100 mg Startmaterial (vorzugsweise junge Blätter) kann damit DNA mit einer Fragmentlänge von durchschnittlich 20-25 kb in µg-Mengen isoliert werden. Die sehr reine Gesamt-DNA ist unter anderem für den direkten Einsatz in PCR-Reaktionen geeignet (→ D.3.3.1). Die Isolierung erfolgt gemäß dem Protokoll des Herstellers.

D.3.2 Reinigung, Quantifizierung und Darstellung von DNA

D.3.2.1 Ethanol- und Isopropanolfällung von DNA

Mittels Ethanol- oder Isopropanolfällung kann DNA von Salzen gereinigt und konzentriert werden.

- DNA-Lösung mit 0.1 Vol. 3 M Na-Acetat versetzen
- 3 Vol. Ethanol (98 %) oder 0.8 Vol. Isopropanol zugeben und mischen
- 2 h bei -20 °C oder 20 min bei -80 °C inkubieren (Fällung)
- 20 min bei 15 000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen und Pellet 2 x mit je 1 ml 70 % Ethanol waschen
- Pellet im Vakuum trocknen
- Pellet in adäquater Menge sterilem Millipore oder TE resuspendieren

D.3.2.2 Quantifizierung von DNA

Durch Messung der Absorption bei 260 nm kann die Nukleinsäurekonzentration einer wässrigen Lösung bestimmt werden. Es gelten folgende Umrechnungsregeln:

Doppelsträngige DNA: 50 µg entsprechen einer o.D.₂₆₀ von 1.0

Oligonukleotide: 33 µg entsprechen einer o.D.₂₆₀ von 1.0

Zusätzlich kann durch eine Messung bei 280 nm die Konzentration an aromatischen Aminosäuren bestimmt werden. Bei erfolgreicher Reinigung sollte die Absorption bei dieser Wellenlänge möglichst gering sein. Ein Verhältnis o.D.₂₆₀ : o.D.₂₈₀ von 2:1 weist auf eine hinreichende Präparationsqualität hin. Die Messungen werden mit dem GenQuant II durchgeführt.

D.3.2.3 Darstellung von DNA - die Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle (und RNA) wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. In einer Agarosematrix trennen sie sich dabei gemäß ihrer Größe und Konformation (ccc, oc oder linear) im Gel auf. Für Moleküle mittlerer Größe besteht dabei eine halblogarithmische Beziehung zwischen Molekülgröße und Mobilität. Der Größenbereich, in dem die stärkste Auftrennung der Fragmente erfolgt, ist abhängig von der Agarosekonzentration. Für die meisten Darstellungen werden 0.8 bis 2 %ige (w/v) Gele verwendet.

Zur Längenbestimmung der Nukleinsäure-Fragmente werden Standardfragmente bekannter Größe im gleichen Gel mit aufgetrennt. Als DNA-Längenmarker wird der DNA-Längenstandard X von Boehringer verwendet.

- Agarose gewünschter Konzentration in TAE-Puffer aufkochen
- auf 65 °C abgekühlt in Gelkammer gießen und Probenkamm einsetzen
- Gel nach dem Erstarren mit TAE-Puffer überschichten und Kamm herausziehen
- Nukleinsäure-Proben mit ¼ Vol. DNA-Ladepuffer versetzen
- Proben in Taschen laden und 80 bis 140 V Spannung anlegen

- bei gewünschter Auftrennung Lauf stoppen (Bromphenolblau-Bande gibt Anhaltspunkt)
- Gel 3 min in Ethidiumbromid-Färbelösung färben und mindestens 10 min wässern
- Detektion der Nukleinsäuren mittels UV-Licht und fotografische Dokumentation mit elektronischer Sofortbildkamera

D.3.3 *in vitro*-DNA-Manipulationen

D.3.3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“) ist eine *in vitro*-Methode zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Sie wurde von K. B. Mullis entwickelt (Mullis und Faloona, 1987), der dafür im Jahre 1993 den Nobelpreis erhielt. Bei einer PCR reichen geringste Mengen an Template-DNA und im Überschuss zugesetzte Oligonukleotide („Primer“) aus, um in nur wenigen Stunden das gewünschte Fragment millionenfach zu amplifizieren.

Hierbei werden bis zu 50 gleiche Temperatur-Zyklen durchlaufen, die sich wiederum in folgende drei Abschnitte aufteilen:

Denaturierung

Die Template-DNA wird thermisch denaturiert

Annealing

Oligonukleotide („Primer“) werden so gewählt, dass sie antiparallel an die beiden Stränge der Zielsequenz hybridisieren und das gewünschte Fragment somit flankieren. Das „Annealing“ an die komplementären Sequenzen erfolgt bei Abnahme der Temperatur.

Polymerisation

Eine erneute Temperaturhöhung lässt eine thermostabile DNA-Polymerase ausgehend von den 3'-OH-Enden der Primer den neuen DNA-Strang synthetisieren (alle vier dNTPs im Reaktionsansatz).

Dieser neue Strang dient im darauf folgenden Zyklus zusätzlich als Template, was letzten Endes zu einer exponentiellen Anreicherung des durch die Primer eingegrenzten Target-Fragments führt.

Unter den thermostabilen DNA-Polymerasen ist der *Pwo*-Polymerase vor der *Taq*-Polymerase der Vorzug zu geben. *Pwo*-Polymerase hat eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität („proof reading“) und somit eine geringere Fehlerrate als *Taq*-Polymerase. Außerdem erzeugt sie glatte Enden, die eine direkte Klonierung des PCR-Produkts erlauben. *Taq*-Polymerase hingegen erzeugt Adenosinüberhänge am 3'-Ende des PCR-Produkts.

Design von PCR-Primern

Beim Design von PCR-Primern sollten einige wichtige Regeln beachtet werden (McPershon, 1995), da der Erfolg der PCR ganz entscheidend davon abhängt. So sollten z.B. gewollte Fehlpaarungen mit der Matrize nicht am 3'-Ende des Primers eingebaut werden, da so die Polymerisation behindert bzw. unterbunden würde. Generell sollten die Primer 18-30 Nukleotide groß und möglichst genau komplementär zur Target-DNA sein. Es ist ferner ein GC-Gehalt von ca. 50 % anzustreben.

Zur Überprüfung weiterer Faktoren wie störende Sekundärstrukturen, Dimerisierung und maximal 5° C Unterschied in der Annealing-Temperatur beider Primer stehen hilfreiche Computerprogramme zur Verfügung (→ D.7.1).

PCR-Reaktion

- 100 µl-Ansatz in PCR-Softstrips auf Eis :

84.5 µl	steriles Millipore
10 µl	10 x <i>Pwo</i> -Puffer mit MgSO ₄
1 µl	Template-DNA (40 ng/µl)
1 µl	Primer 1 (Endkonz. 0.5 µM)
1 µl	Primer 2 (Endkonz. 0.5 µM)
2 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0.5 µl	<i>Pwo</i> -Polymerase (10 U/µl)
- Ansatz mischen und in Thermocycler stellen
- PCR-Programm:

Zyklus 1:	1 min	95 °C
Zyklus 2 bis 36:	30 sec	95 °C
	1 min	ca. 50 °C (variabel)
	1 min	72 °C
Terminale Verlängerung:	7 min	72 °C
- 5 µl des PCR-Ansatzes in einem 0.8 bis 2 %igen (w/v) Agarosegel analysieren (→ D.3.2.3)
- Ethanol-fällung (→ D.3.2.1)

D.3.3.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

(Sambrook *et al.*, 1989)

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen Sequenz-spezifisch gespalten werden. Häufigste Verwendung finden die Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die innerhalb einer spezifischen palindromischen Sequenz schneiden. Abhängig vom Restriktionsenzym entstehen glatte oder überstehende Enden („blunt ends“ oder „sticky ends“).

Die für die verschiedenen Restriktionsenzyme optimalen Reaktionsbedingungen werden entsprechend des New England BioLabs Produktkatalogs mit den 10-fach konzentrierten NEBuffern 1 bis 4 eingestellt (wenn erforderlich mit 100 µg/ml BSA zusätzlich).

Die für eine vollständige Spaltung notwendige Menge an Restriktionsenzym wird mit folgender Formel errechnet:

$$U_{\text{Enzym}} / \text{mg Substrat} = \frac{Bp (I) * S_{\text{(Substrat)}}}{S (I) * Bp_{\text{(Substrat)}}}$$

U: Units (Einheiten Enzym)
 λ: λ-Phagen-DNA

S: Schnittstellen
 Bp: Basenpaare

Das Volumen des Restriktionsenzym sollte 1/10 des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da es sonst zu unspezifischen Spaltungen kommen kann („star activity“).

- Steriles Millipore bis zum Erreichen des geplanten Endvolumens unter Berücksichtigung aller Komponenten in ein Eppendorfgefäß geben
- DNA-Lösung in gewünschter Menge und Konzentration zugeben
- 1/10 Vol. 10 x NEBuffer, wenn erforderlich 1/10 Vol. 10 x BSA zugeben
- errechnete Menge Restriktionsenzym zugeben
- optional: 0.2 µl RNase A Lösung zugeben
- Reaktionsansatz mischen
- mindestens 1 h bei dem enzymespezifischen Temperaturoptimum inkubieren
- optional: 10 min bei 65 °C oder 30 min bei -70 °C zur Enzyminaktivierung inkubieren
- Ethanol-fällung (→ D.3.2.1)

D.3.3.3 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten

(Sambrook *et al.*, 1989)

Das Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten mit Hilfe des Klenow-Fragments erzeugt glatte Enden. Auf diese Weise werden Ligationen von DNA-Fragmenten mit zuvor nicht kompatiblen Enden ermöglicht.

- 20 µl-Ansatz im Eppendorfgefäß:

15 µl	gespaltene DNA (0.1 µg in sterilem Millipore)
2 µl	10 x Klenow-Puffer
2 µl	dNTP-Mix (10mM/Nukleotid)
1 µl	Klenow-Fragment (1 U/µl)
- Reaktionsansatz mischen und 15 min bei 37 °C inkubieren
- Klenow-Fragment durch Zugabe von 0.4 µl 0.5 M EDTA (Endkonz. 10 mM EDTA) und 10 min Inkubation bei 75 °C inaktivieren

D.3.3.4 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die Religation eines „leeren“ Vektors stellt bei Klonierungsexperimenten ein Problem dar. Sie kann aber auf ein Minimum reduziert werden, wenn zuvor der geschnittene Vektor mit alkalischer Phosphatase aus Gamelen behandelt wird. Dieses Enzym bewirkt eine Entfernung der 5'-Phosphatgruppen von den Enden des linearisierten Vektors. So kann im Ligationsansatz (→ D.3.3.5) nur noch mit den 5'-Phosphatgruppen des Inserts eine Ligation erfolgen.

- 20 µl-Ansatz im Eppendorfgefäß:

17 µl	gespaltene DNA (1 µg in sterilem Millipore)
2 µl	10 x Shrimp Alkaline (SA) Phosphatase-Puffer
1 µl	Shrimp Alkaline Phosphatase (20 U/µl)
- Reaktionsansatz mischen und 1½h bis 2 h bei 37 °C inkubieren
- SA-Phosphatase durch 10 min Inkubation bei 65 °C inaktivieren
- Ethanol-fällung (→ D.3.2.1)

D.3.3.5 DNA-Ligation

(Sambrook *et al.*, 1989, modifiziert)

Durch Einsatz der T4-DNA-Ligase werden 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle kovalent miteinander verknüpft. Es muss sich dabei um kompatible überstehende Enden („sticky-ends“) oder um glatte Enden („blunt ends“) handeln. Die ligierte DNA kann zur Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt werden.

- gespaltene Vektor-DNA und zu klonierende DNA in ein Eppendorfgefäß geben; molares Verhältnis bei überstehenden Enden mindestens 1:2, bei glatten Enden mindestens 1:7
- 3 µl 10 x Ligasepuffer zugeben
- 1-6 U T4-DNA-Ligase (Ligation glatter Enden benötigt höhere Enzymkonzentration) zugeben
- mit sterilem Millipore auf ein Endvolumen von 30 µl auffüllen
- Reaktionsansatz mischen
- 2 h bei RT oder ü.N. bei 16 °C inkubieren
- Ethanol-fällung (→ D.3.2.1)

D.3.4 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel kann neben der bloßen Darstellung von DNA auch zur präparativen Isolierung von Fragmenten einer Restriktion oder

PCR-Reaktion genutzt werden. Die Isolierung wird mit Hilfe des „QIAEX Gel Extraction“-Kits von Qiagen durchgeführt.

- DNA-Fragmente in 0.8 bis 2 %igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch auftrennen
- Gel 3 min in Ethidiumbromid-Färbelösung färben und kurz wässern
- die gewünschte Bande auf dem UV-Transiluminator (möglichst kurz dem UV-Licht aussetzen - Gefahr von Mutationen !) ausschneiden und in ein Eppendorfgefäß überführen
- je 300 µl QX1-Puffer und 10 µl Qiaex zu 100 mg Gel zugeben
- 10 min bei 50 °C inkubieren, alle 2 min vortexen
- 30 sec bei 13 000 Upm zentrifugieren
- Überstand abziehen und Pellet zweimal mit QX2-Puffer waschen, nach jedem Waschschrift 30 sec bei 13 000 Upm zentrifugieren
- Überstand abziehen und Pellet zweimal mit QX3-Puffer waschen, nach jedem Waschschrift 30 sec bei 13 000 Upm zentrifugieren
- Überstand abziehen und Pellet trocknen
- DNA mit 20 µl TE-Puffer 5 min von Qiaex eluieren, alle 30 sec vortexen
- 30 sec bei 13 000 Upm zentrifugieren und DNA-haltigen Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen

D.3.5 DNA-Transfermethoden für *E. coli*

E. coli verfügt über kein natürliches Transformationssystem, das heißt nackte zirkuläre DNA kann aus dem umgebenden Medium erst aufgenommen werden, wenn die Zellen vorher transformationskompetent gemacht wurden. Die klassische Methode ist die CaCl₂-Transformation mit einer Transformationseffizienz von 10⁵- 10⁶ Kolonien / µg Plasmid-DNA. Wesentlich höhere Transformationsraten erbringt die Elektroporation von *E. coli* mit 10⁹- 10¹⁰ Kolonien / µg Plasmid-DNA. Die Elektroporation ist also in der Regel zu bevorzugen.

D.3.5.1 Transformation CaCl₂-behandelter kompetenter *E. coli*

(Sambrook *et al.*, 1989, modifiziert)

Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

- 100 ml LB-Selektivmedium 1:100 mit einer ü.N.-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes animpfen
- bei 37 °C im Inkubationsschüttler zu einer o.D.₆₀₀ von 0.5 bis 0.6 anziehen
- 20 ml Kultur bei 2000 Upm und 4 °C 15 min abzentrifugieren
- Bakterienpellet in 12 ml eiskaltem Tbf1-Puffer resuspendieren und 15 min auf Eis inkubieren
- Ansatz bei 2000 Upm und 4 °C 12 min abzentrifugieren
- Pellet in 2 ml Tbf2-Puffer resuspendieren
- die so gewonnenen kompetenten Zellen in Eppendorfgefäße aliquotieren und bei -70 °C lagern

Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- 30-100 µl kompetenter Zellen mit 20-200 ng zu transformierender DNA mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 1 min Hitzeschock im 42 °C Wasserbad und 5 min auf Eis abkühlen
- LB-Medium zusetzen und 30 min bei 37 °C rollern
- Ansätze portionsweise auf Selektivmedium ausplattieren und ü.N. bei 37 °C inkubieren

D.3.5.2 Elektroporation von *E. coli*

Präparation elektroporierfähiger *E. coli*-Zellen

- 10 ml ü.N.-Kultur des gewünschten Stammes in SB-Selektivmedium anziehen
- 1 l SB-Selektivmedium mit der Kultur animpfen, auf 2 x 500 ml aliquotieren und im Inkubationsschüttler bei 330 Upm und 37 °C bis zu einer o.D.₆₀₀ von 0.9 anziehen
- 5 min auf Eis abkühlen, alle weiteren Schritte werden mit auf Eis gekühlten Lösungen und Gefäßen durchgeführt
- Kulturen in 2 JA-10 Becher überführen
- 10 min bei 3 000 Upm und 4 °C zentrifugieren und Überstand vollständig abziehen
- Bakterienpellets in je 1/4 sterilem Millipore resuspendieren und Zentrifugation wiederholen (Waschschritt)
- Waschschritt wiederholen und Pellets in je 20 ml sterilem 15 %igen (v/v) Glycerin resuspendieren
- nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) Pellets in je 1 ml sterilem 15 %igen (v/v) Glycerin resuspendieren (⇒ 1-3 x 10¹⁰ Zellen/ml)
- je 40 µl der Suspension in kalte Eppendorfgefäße aliquotieren und bei -70 °C lagern

Elektroporation von *E. coli*-Zellen

- elektroporierfähige Zellen auf Eis auftauen
- 50 ng zu transformierender DNA (gelöst in 1-3 µl sterilem Millipore - geringe Ionenstärke ist entscheidend!) vorsichtig untermischen
- 1/2 min -1 min auf Eis inkubieren
- Gene Pulser auf 25 µF und 2.5 kV, Pulse Controller auf 200 Ω einstellen
- Suspension in eine auf Eis gekühlte Elektroporations-Küvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführen
- Elektroporations-Küvette in Elektroporationskammer einschieben
- 2,5 kV aus 25 µF-Kondensator über Parallelschaltung von 200 Ω und Küvette entladen - eine Zeitkonstante von 4-5 msec (Feldstärke von 12.5 kV/cm) weist auf erfolgreiche Elektroporation hin
- sofort 1 ml SOC-Medium zugeben und Zellen resuspendieren
- in 12 ml-PE-Röhrchen überführen und 1 h bei 37 °C rollern
- 10 µl, 100 µl und 4 x 200 µl auf Selektivmedium ausplattieren und ü.N. bei 37 °C inkubieren

D.4 Biochemische Methoden

D.4.1 Protein-Expression in *E. coli* und Gesamtproteinextraktion

Mittels genetischer Methoden werden Expressionsvektoren konstruiert, die nach Transformation in spezielle *E. coli*-Stämme zur Expression des gewünschten Proteins genutzt werden können. In solchen Vektoren steht die Expression der klonierten cDNA-Sequenzen zum Beispiel unter der Kontrolle eines lac-Operators, dessen starke Repression durch hohe Konzentrationen an lac-Repressor bewirkt wird. Für eine stringente Repression sorgt das lacI^q-Gen. Durch IPTG-Zugabe in der logarithmischen Wachstumsphase wird die Expression des gewünschten (Fusions-) Proteins induziert. Die Fusionsproteine verbleiben im Cytoplasma der Zellen (Expressionsvektoren pMALTM-c, pMALTM-cd und pWH844) oder werden mittels einer Signalsequenz ins Periplasma exportiert (pMALTM-p). Ein Export ins Periplasma hat den Vorteil, dass durch die deutlich geringe Konzentration an *E. coli* Proteinen eine nachfolgende Aufreinigung des Fusionsproteins erleichtert wird. Die Ausbeute ist allerdings im Vergleich zum Verbleib des Fusionsproteins im Cytoplasma meistens deutlich geringer.

Bei cytoplasmatischen Fusionsproteinen erfolgt der Aufschluss der Expressionskultur mittels Lysozym zur Zerstörung der Zellwand und einem Detergenz wie beispielsweise Triton X-100 zur Zerstörung der Zellmembran. Beim Aufschluss von periplasmatischen Proteinen werden die Proteine durch einen osmotischen Schock freigesetzt. In beiden Fällen ist in der Regel EDTA als Protease-Inhibitor für Proteasen mit Ca²⁺-Kofaktoren im Aufschlusspuffer enthalten - weitere Inhibitoren für Proteasen können je nach Bedarf zugesetzt werden. Bei Expression eines His-Tag-Fusionsproteins, dessen spätere affinitäts-chromatographische Aufreinigung an komplexierten Ni²⁺-Ionen erfolgen soll, darf der Aufschlusspuffer allerdings kein EDTA enthalten!

D.4.1.1 Expression in *E. coli*

- 5 ml ü.N.-Kultur des gewünschten Klones in SB-Selektivmedium anziehen
- 200 ml SB-Selektivmedium mit dieser Vorkultur animpfen
- im Inkubationsschüttler bei 330 Upm und 37 °C inkubieren
- bei erster Expression in 30 min Abständen 1 ml Kultur steril entnehmen und o.D.₆₀₀ messen, bei Folge-Expressionen erfolgt Entnahme und Messung lediglich direkt nach dem Animpfen, direkt vor und nach der Induktion und bei der Zellernte
- Je 200 µl der Probe in Eppendorfgefäße überführen und bis zu ihrer Vorbereitung zur analytischen SDS-DISKPAGE auf Eis lagern
- bei einer o.D.₆₀₀ von 0.5 bis 0.7 wird durch Einstellen auf 1 mM IPTG (200 µl von 1 M IPTG) induziert
- bei erster Expression weitere Entnahmen und Messungen bis ca. 9 h nach dem Animpfen, dann erneut Antibiotika zugeben und letzte Probe nach weiteren 15 h; restliche Kultur entsorgen!
- bei Folge-Expression erfolgt die Zellernte und Gesamtproteinextraktion zu einem Zeitpunkt, an dem bei der Erst-Expression eine hohe Konzentration an exprimiertem Protein auftrat

Toxische Gene bzw. Genprodukte können zu geringer oder gänzlich fehlender Expression des gewünschten Proteins führen. Damit verbunden ist die Gefahr, dass sich Transformanten mit Deletionen und Mutationen anreichern. Diese Probleme können eventuell durch folgende Wachstumsbedingungen, die für eine maximale Repression vor der Induktion sorgen sollen, überwunden werden:

- Kulturen generell in SB-Medium mit 200 µg/µl Ampicillin und 2 % (w/v) Glukose anziehen
- keine ü.N.-Kultur verwenden, sondern 2 ml Starter-Kultur mit Einzelkolonie von frischer Platte anziehen
- 2-3 h bei 30 °C inkubieren
- 400 ml SB-Selektivmedium mit dieser Vorkultur animpfen
- im Inkubationsschüttler bei 330 Upm und 30 °C inkubieren
- weiter wie oben, allerdings möglichst schon bei einer o.D.₆₀₀ von 0.5 induzieren

D.4.1.2 Zellernte und Gesamtproteinextraktion von cytoplasmatischen Proteinen

- Kultur in einen JA-10 Becher überführen und 10 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen
- Bakterienpellet vollständig in 15 ml Aufschlusspuffer resuspendieren
- 1 ml Lysozymlösung zugeben und durch mehrmaliges Umschwenken mischen (Zellwandlyse)
- 25 min auf Eis inkubieren
- Lösung auf 0.01 % (v/v) Triton X-100 einstellen (Endkonz.) und mit einer Glaspipette durch Rühren mischen (Zerstörung der Zellmembran)
- den Zentrifugenbecher in 37 °C Wasserbad überführen und Inhalt rühren, bis eine starke Viskositätszunahme auftritt (Freiwerden der DNA)
- 25 µl RNase A- und 25 µl DNase I- Lösung zugeben
- weiter unter Rühren inkubieren, bis die Viskosität drastisch abnimmt
- 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- Suspension in JA-20 Becher überführen und 10 min bei 12 000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- den Überstand, der unter anderem die lösliche Fraktion des exprimierten Proteins enthalten sollte, abziehen und bis zu späteren Aufreinigungsschritten bei 4 °C lagern.

D.4.1.3 Zellernte und Gesamtproteinextraktion von periplasmatischen Proteinen

- Kultur in einen JA-10 Becher überführen und 10 min bei 4000 Upm und 4°C zentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen
- Bakterienpellet vollständig in 80 ml Periplasma-Puffer resuspendieren
- 5-10 min unter Schütteln auf Eis inkubieren
- 20 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen
- Bakterienpellet vollständig in 80 ml eiskaltem 5 mM MgSO₄ resuspendieren
- 10 min unter Schütteln auf Eis inkubieren (osmotischer Schock)
- 20 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- den Überstand, der die periplasmatischen Proteine enthalten sollte, abziehen und bis zu späteren Aufreinigungsschritten bei 4 °C lagern.

D.4.1.4 Probenvorbereitung für die analytische SDS-DISKPAGE

Die Proben, die während der Expression (→ D.4.1.1) entnommen und auf Eis gelagert wurden, werden wie folgt für eine analytische SDS-DISKPAGE (→ D.4.2) vorbereitet:

- 2 min bei 13 000 Upm und RT in der Biofuge A zentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen
- Bakterienpellet in 20 µl reduzierendem Proteingel-Ladepuffer (PBJR) resuspendieren
- 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubieren
- Proben sofort zur Analyse einsetzen oder unbegrenzt bei -20 °C lagern

Als Faustregel gilt, dass bei einer o.D.₆₀₀ von 4 ca. 20 µl der Kultur in eine Spur eines Minigels (mit 10er-Kamm) geladen werden sollen. Diese Menge ergibt bei noch ausreichender Trennung der prominenten Banden auch eine gute Detektierbarkeit schwächer vertretener Proteine. Die Faustregel lässt sich in folgende Formel umwandeln:

$$x \text{ ml (Probe)} = \frac{8}{\text{o.D.}_{600}}$$

Es werden also x µl der vorbereiteten Probe in ein 10er-Minigel geladen.

D.4.2 Analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE)

(Laemmli, 1970, modifiziert)

Bei der analytischen SDS-DISKPAGE werden Proteingemische einer größenabhängigen Auftrennung im elektrischen Feld unterworfen. SDS hat als anionisches Detergenz zwei Wirkungen auf Proteine. Es führt zum einen zu einer Auflösung von Quartär- und Tertiärstrukturen mit der Folge einer länglichen Konformation und zum anderen bindet es im Überschuss in konstantem Verhältnis (1.4 g SDS / 1 g Protein) an Proteine, was eine gleichartige negative Ladung pro Masseneinheit bewirkt.

Diese negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode. Zur Auftrennung der Komplexe nutzt man die Molekularsiebeigenschaften von Polyacrylamidgelen (PAA-Gel) aus. Dabei ist die Beweglichkeit bei den meisten Proteinen umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer molekularen Masse. Das diskontinuierliche Puffersystem nach Laemmli (1970) bewirkt eine Konzentrierung der Proben an der Übergangsstelle zwischen Sammelgel und Trenngel, was zu einer hohen Auflösung bei der anschließenden Trennung führt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts unbekannter Proteine lässt man Eichproteine bekannten Molekulargewichts mitlaufen (→ Eichgerade).

Die Porengröße des Gels wird durch das Verhältnis der Konzentration an Acrylamid zum Quervernetzer N-N'-Methylenbisacrylamid bestimmt. Der Acrylamid-Anteil (% T) und der Vernetzungsgrad (% C) sind daraus resultierende Größen, die ein Polyacrylamidgel charakterisieren:

$$\% T = \frac{\text{Acrylamid (g)} + \text{Bis (g)}}{\text{Volumen (ml)}} \times 100 \quad \% C = \frac{\text{Bis (g)}}{\text{Acrylamid (g)} + \text{Bis (g)}} \times 100$$

Der % T-Anteil bestimmt den Trennbereich eines PAA-Geles (→ Tabelle unter D.4.2.1).

D.4.2.1 Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Minigele)

- Glasplatten, Aluminiumplatten, Spacer (0.75 mm Dicke) und Probenkämme mit Millipore und Ethanol säubern
- Gelkammer mittels Mighty-Small SE245 Dual-Gel-Caster-System (für bis zu zwei Gele) oder Mighty Small SE200 Multiple-Gel-Caster (für bis zu sechs Gele) zusammenbauen
- Trenngel-Lösung (siehe Tabelle unten) in Saugflasche ansetzen und 2 min entgasen
- „Starter“ Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugeben und gut vermischen
- Gel(e) bis ca. 1 cm unter den oberen Rand der Gelkammer gießen
- jedes Gel mit 250 µl Wasser-gesättigtem t-Butanol überschichten (für glatte Oberfläche)
- mindestens 10 min auspolymerisieren lassen, dann t-Butanol abgießen
- Sammelgel-Lösung (siehe Tabelle unten) in Saugflasche ansetzen und 2 min entgasen
- "Starter" Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugeben und gut vermischen
- Sammelgel(e) aufgießen und Probenkamm einsetzen
- mindestens 30 min auspolymerisieren lassen
- die Gelkammern können dann sofort verwendet werden oder bis zu 14 Tage bei 4 °C gelagert werden

Die Angaben der folgenden Tabelle über die Zusammensetzung der Gele beziehen sich auf die unter C.5.7 aufgeführten Stamm-Lösungen und Puffer. Die Volumina reichen für das Gießen von zwei Minigelen (8 cm x 8 cm) aus.

Trenngel (15 ml):

Acrylamid (% T)	5 %	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %
Trennbereich	50-180 kD	30-120 kD	18-75 kD	15-60 kD	15-45 kD
Stammlösung (40 %)	1.875 ml	2.8 ml	3.75 ml	4.7 ml	5.625 ml
4 x Trenngelpuffer	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
steriles Millipore	9.025 ml	8.8 ml	7.65 ml	6.2 ml	5.275 ml
TEMED (10 %)	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
APS-Lsg. (10 %)	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

Sammelgel (5 ml):

Acrylamid (% T)	3 %	6 %
Stammlösung (40 %)	0.375 ml	0.75 ml
4 x Sammelgelpuffer	1.25 ml	1.25 ml
steriles Millipore	3.245 ml	2.87 ml
TEMED (10 %)	0.1 ml	0.1 ml
APS-Lsg. (10 %)	0.03 ml	0.03 ml

D.4.2.2 Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf

- sofern nicht schon geschehen, werden die Proben je nach Volumen und Proteinkonzentration mit 1-10 µl reduzierendem Proteingel-Ladepuffer (PBJR) gemischt
- diese und eventuelle fertige Proben direkt vor dem Lauf 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubieren (Imidazol-haltige Proben nur bei 37 °C!)
- Gelkammer mittels Klammern in einer Midget 2050 Elektrophorese-Einheit (für 1-2 Gele) befestigen
- ca. 170 ml SDS-Elektrophorese-Puffer in oberen und unteren Pufferbehälter füllen
- Probenkamm ziehen, Proben in der Tischzentrifuge abzentrifugieren und maximal 25 µl Probe (bei Verwendung eines 10-er Kammes) in die Taschen pipettieren
- Elektrophoreselauf mit 15 mA/Gel bis Bromphenolblau-Bande beginnt, aus dem Gel zu laufen
- Gelkammer entnehmen und mit Hilfe der Spacer vorsichtig öffnen
- Gel färben oder zum Western Blot einsetzen

D.4.2.3 Färbung der Proteine und Dokumentation

Durch Färbung mit Coomassie® Brilliant Blue R 250 werden die Proteine im Gel sichtbar gemacht und fixiert.

- Gel vorsichtig in die Coomassie-Färbelösung geben
- in der Mikrowelle kurz bis zum Aufkochen erhitzen und dann 10 min unter leichtem Schütteln färben; alternativ dazu ohne Erhitzen ca. 1 h bei RT und unter leichtem Schütteln färben
- Färbelösung abgießen und stattdessen Proteingel-Entfärbelösung zugeben

- in der Mikrowelle kurz bis zum Aufkochen erhitzen und dann 20 min unter leichtem Schütteln entfärben, mit Wechsel der Entfärbelösung mindestens 1 h weiter entfärben; alternativ dazu ohne Erhitzen ca. 4-5 h bei RT und mit Wechsel der Entfärbelösung entfärben
- Für die Dokumentation kann das Gel auf einen Transiluminator gelegt werden und mit der elektronischen Sofortbildkamera fotografiert werden oder es kann in eine Klarsichtfolie gelegt und eingescannt werden

D.4.2.4 Konservierung von PAA-Gelen

- Filterpapier 3 MM in dreifacher Gelgröße ausschneiden
- Filterpapier mit Millipore anfeuchten und drei entfärbte PAA-Gele darauflegen
- nach oben mit Klarsichtfolie abdecken und alles auf Gel-Trockner transferieren
- Gelrockner auf 80 °C einschalten und Vakuum anlegen
- ca. 3 h trocknen lassen

Die so dauerhaft konservierten Gele sollten zunächst noch für mindestens 1 Woche in einem Buch gelagert werden, um ein Aufrollen zu verhindern.

D.4.3 Pilot-Experimente zur Bindungsfähigkeit von Fusionsproteinen

Bevor eine Zeit- und Kosten-intensive Aufreinigung der Fusionsproteine über eine Affinitäts-Chromatographie versucht wird, sollte die Bindungsfähigkeit des Fusionsproteins an seine jeweilige Matrix in einem Pilot-Experiment geprüft werden. Es wird im sogenannten Batch-Verfahren im Eppendorfgefäß durchgeführt. Das bedeutet, dass das Waschen der Matrix, die Bindung des Fusionsproteins, erneute Waschschrte und die Elution des Fusionsproteins durch eine Suspension der Matrix in der jeweiligen Lösung erfolgt.

Das Pilot-Experiment für Fusionsproteine mit Histidin-Hexapeptid-Sequenz (His-Tag) und das für Fusionsproteine mit Maltosebindeprotein (MBP) werden zur besseren Übersicht getrennt behandelt.

D.4.3.1 Pilot-Experiment mit His-Tag Fusionsproteinen

Der Expressionsvektor pWH844 bzw. dessen Derivat pJB-W32a soll ein Fusionsprotein exprimieren, das an seinem N-Terminus ein Histidin-Hexapeptid trägt. Die damit verbundene Aufreinigungsmethode beruht auf der Bindung dieses Hexapeptids an die komplexierten Ni²⁺-Ionen eines Ni-NTA („nitrilo-triacetic-acid“-)Harzes und ist in meiner Diplomarbeit (Becker, 1996) ausführlich beschrieben. Im Pilot-Experiment wird das Fusionsprotein mit EDTA eluiert, das die Ni²⁺-Ionen komplexiert.

- 50 µl Ni-NTA Harz in ein Eppendorfgefäß geben
- 10 sec bei 13 000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abziehen
- 1 ml Aufschlusspuffer zugeben
- Harz-Pellet mittels vortexen vollständig resuspendieren und 2 min inkubieren
- 10 sec bei 13 000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugieren und Überstand abziehen
- Waschschrte zweimal wiederholen
- 1 ml Aufschluss (lösliches Fusionsprotein in Aufschlusspuffer → D.4.1.2) zugeben und Harz resuspendieren
- mindestens 45 min rollern
- 25 sec bei 13 000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand vorsichtig vollständig abziehen und auf Eis aufheben, 2,5 µl werden als Probe in der analytischen SDS-DISKPAGE eingesetzt

- zweimaliger Waschschrift wie oben mit Waschpuffer 1
- zweimaliger Waschschrift wie oben mit Waschpuffer 2 kostenintensiv
- 20 µl 0.5 M EDTA und 20 µl reduzierenden Proteingel-Ladepuffer (PBJR) zugeben
- kräftig vortexen und 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubieren
- kurz abzentrifugieren und 20 µl vom Überstand in analytischer SDS-DISKPAGE einsetzen

D.4.3.2 Pilot-Experiment mit MBP-Fusionsproteinen

Die Expressionsvektoren pMALTM-c, pMALTM-cd und pMALTM-p bzw. deren Derivate pJB-M29c, pJB-M18 und pPMP-X8 sollen Fusionsproteine exprimieren, die an ihrem N-Terminus ein Maltosebindeprotein tragen. Die Aufreinigung erfolgt hierbei über die Bindung des Maltosebindeproteins an ein Amylose-Harz. Der theoretische Hintergrund der Aufreinigung ist in meiner Diplomarbeit (Becker, 1996) ausführlich beschrieben.

- 50 µl Amylose-Harz in Eppendorfgemäß geben
- 10 sec bei 13 000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abziehen
- 1 ml Säulen-Puffer MBP + 0.25 % (v/v) Tween 20 zugeben
- Harz-Pellet mittels vortexen vollständig resuspendieren und 2 min inkubieren
- 10 sec bei 13 000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugieren und Überstand abziehen
- Waschschrift zweimal wiederholen
- cytoplasmatische MBP-Fusionsproteine: 250 µl Aufschluss (lösliches Fusionsprotein in Aufschlusspuffer → D.4.1.2) und 750 µl Säulen-Puffer MBP + 0.25 % (v/v) Tween 20 zugeben und Harz resuspendieren
- periplasmatische MBP-Fusionsproteine: 1 ml Aufschluss (Fusionsprotein in 5 mM MgSO₄ → D.4.1.3) + 20 µl 0.5 M Phosphatpuffer zugeben und Harz resuspendieren
- mindestens 45 min rollern
- 25 sec bei 13 000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand vorsichtig vollständig abziehen und auf Eis aufheben, 10 µl werden als Probe in der analytischen SDS-DISKPAGE eingesetzt
- zweimaliger Waschschrift wie oben
- 20 µl 0.5 M EDTA und 20 µl reduzierenden Proteingel-Ladepuffer (PBJR) zugeben
- kräftig vortexen und 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubieren
- kurz abzentrifugieren und 20 µl vom Überstand in analytischer SDS-DISKPAGE einsetzen

D.4.4 Affinitäts-Chromatographie von His-Tag-Fusionsproteinen

D.4.4.1 Vorbereitung des Aufschlusses und der Chromatographie

- Aufschluss (→ D.4.1.2) in Polyallomer-UZ-Röhrchen überführen
- 45 min bei 45 000 Upm und 4 °C in der Ultrazentrifuge im VTi60-Rotor zentrifugieren (Pelletierung unlöslicher Zelltrümmer, die die Säule verstopfen würden, z.B. Membran-Fragmente)
- Überstand vorsichtig abziehen und bei 4 °C lagern
- mit dem gewünschten Volumen an Ni-NTA Superflow-Harz gemäß Herstellerangaben eine Chromatographie-Säule (z.B. Ø 1.6 cm, Länge 5 cm) packen
- die Verbindung zwischen peristaltischer Pumpe und Einlass der Säule herstellen
- den Auslass der Säule unter Durchleitung durch die optische Einheit des Durchfluss-Photometers mit dem Fraktions-Sammler verbinden

D.4.4.2 Affinitäts-Chromatographie

Die Chromatographie wird zur Schonung der Proteine bei 4 °C im Kühlkabinett durchgeführt.

- Äquilibrieren (Flussrate 30 ml/h): gepackte Säule (gemeint ist das Ni-NTA-Harz) mit 5 Säulenvolumen Aufschlusspuffer (ohne EDTA!) waschen
- Referenz-Küvette mit Aufschlusspuffer eichen
- Schreiber mit 50 mV und 1 mm/min starten; vollen Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchfluss-Photometers (Absorption bei 280 nm) passend einregeln
- Beladen (Flussrate 25 ml / h): Ein Volumen Aufschluss über die Säule leiten, in dem so viel Fusionsprotein enthalten sein sollte, dass es die Bindungskapazität der Säule (5-10 mg Protein / ml Harz) um das 1/4-fache übersteigt. Dieses bewusste Überladen der Säule soll die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen minimieren.
- Durchlauf in Form einer Fraktion auffangen
- Waschen 1 (Flussrate 30 ml/h): Schreiber auf 20 mV umstellen und mit Waschpuffer 1 waschen, bis der Schreiber eine Grundlinie zeigt; Durchlauf in 6 min (= 3 ml) Fraktionen sammeln
- Waschen 2 (Flussrate 30 ml/h): mit Waschpuffer 2 waschen bis der Schreiber wieder eine Grundlinie zeigt; Durchlauf in 6 min (= 3 ml) Fraktionen sammeln
- Referenz-Küvette mit Waschpuffer 2 neu eichen und vollen Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchfluss-Photometers auf 0.5 einstellen
- Elution (Flussrate 30 ml/h): gebundene Proteine mit einem 0-1 molaren Gradienten von Imidazol in Waschpuffer 2 eluieren; Durchlauf in 3 min (= 1.5 ml) Fraktionen sammeln

Zur Auswertung der Affinitäts-Chromatographie werden geeignete Volumina des Durchlaufs beim Beladen der Säule, beim Waschen und insbesondere bei der Elution als Proben in einer analytischen SDS-DISKPAGE (→ D.4.2) eingesetzt.

D.4.4.3 Regeneration des Ni-NTA-Harzes

Das gepackte Amylose-Harz kann fast unbegrenzt oft regeneriert werden und wird in der Zwischenzeit bei 4 °C gelagert. Alle Waschschritte werden mit einer Flussrate von 30 ml/h durchgeführt.

- mit 5 Säulenvolumen sterilem Millipore waschen
- mit 5 Säulenvolumen 0.1 M EDTA waschen (Auswaschen der komplexierten Ni²⁺-Ionen)
- mit 5 Säulenvolumen sterilem Millipore waschen
- mit 5 Säulenvolumen 0.2 M NiCl₂ die Säule von Neuem mit Ni²⁺-Ionen beladen
- mit 5 Säulenvolumen sterilem Millipore + 0.02 % (w/v) NaN₃ waschen

D.4.5 Affinitäts-Chromatographie von MBP-Fusionsproteinen

(Guan *et al.*, 1987; Maina *et al.*, 1988)

D.4.5.1 Vorbereitung des Aufschlusses und der Chromatographie

- Aufschluss (→ D.4.1.2 & D.4.1.3) in Polyallomer-UZ-Röhrchen überführen
- 45 min bei 45 000 Upm und 4 °C in der Ultrazentrifuge im VTi60-Rotor zentrifugieren (Pelletierung unlöslicher Zelltrümmer, die die Säule verstopfen würden, z.B. Membran-Fragmente)
- Überstand vorsichtig abziehen und bei 4 °C lagern
- mit dem gewünschten Volumen an rehydriertem Amylose-Harz gemäß Herstellerangaben eine Chromatographie-Säule (z.B. Ø 1.6 cm, Länge 5 cm) packen
- die Verbindung zwischen peristaltischer Pumpe und Einlass der Säule herstellen

- den Auslass der Säule unter Durchleitung durch die optische Einheit des Durchfluss-Photometers mit dem Fraktions-Sammler verbinden
- cytoplasmatische MBP-Fusionsproteine: Aufschluss 1:3 bis 1:5 mit Säulen-Puffer MBP + 0.25 % (v/v) Tween 20 verdünnen - Endkonzentration ca. 2.5 mg Gesamtprotein/ml Lösung
- periplasmatische MBP-Fusionsproteine: Aufschluss mit 2 % (v/v) 0.5 M Phosphatpuffer mischen

D.4.5.2 Affinitäts-Chromatographie

Die Chromatographie wird zur Schonung der Proteine bei 4 °C im Kühlkabinett durchgeführt.

- Äquilibrieren cytoplasmatische Fusionsproteine (Flussrate 10 ml/h): gepackte Säule (gemeint ist das Amylose-Harz) mit 3 Säulenvolumen Säulen-Puffer MBP + 0.25 % (v/v) Tween 20 waschen
- Äquilibrieren periplasmatische Fusionsproteine (Flussrate 10 ml/h): gepackte Säule mit 3 Säulenvolumen 5 mM MgSO₄ + 0.02 % (v/v) 0.5 M Phosphatpuffer waschen
- Referenz-Küvette mit Säulen-Puffer MBP + 0.25 % (v/v) Tween 20 bzw. 5 mM MgSO₄ + 0.02 % (v/v) 0.5 M Phosphatpuffer eichen
- Schreiber mit 20 mV und 1 mm/min starten; vollen Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchfluss-Photometers (Absorption bei 280 nm) passend einregeln
- Beladen (Flussrate 10 ml/h): Ein Volumen an verdünntem Aufschluss über die Säule leiten, in dem so viel Fusionsprotein enthalten sein sollte, dass es die Bindungskapazität der Säule um das 1¼-fache übersteigt. Dieses bewusste Überladen der Säule soll die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen minimieren.
- Durchlauf in Form einer Fraktion auffangen
- Waschen 1 (Flussrate 15 ml/h): mit 3 Säulenvolumen Säulen-Puffer MBP + 0.25 % (v/v) Tween 20 waschen; Durchlauf in 12 min (= 3 ml) Fraktionen sammeln
- Waschen 2 (Flussrate 15 ml/h): mit 5 Säulenvolumen Säulen-Puffer MBP waschen; Durchlauf in 12 min (= 3 ml) Fraktionen sammeln
- Referenz-Küvette mit Säulen-Puffer MBP + 10 mM Maltose neu eichen
- Elution (Flussrate 10 ml/h): mit 5 Säulenvolumen Säulen-Puffer MBP + 10 mM Maltose eluieren; Durchlauf in 12 min (= 2 ml) Fraktionen sammeln

Zur Auswertung der Affinitäts-Chromatographie werden geeignete Volumina des Durchlaufes beim Beladen der Säule, beim Waschen und insbesondere bei der Elution als Proben in einer analytischen SDS-DISKPAGE (→ D.4.2) eingesetzt.

D.4.5.3 Regeneration des Amylose-Harzes

Das gepackte Amylose-Harz kann bis zu fünf Mal regeneriert werden und wird in der Zwischenzeit bei 4 °C gelagert. Alle Waschschritte werden mit einer Flussrate von 15 ml/h durchgeführt.

- mit 3 Säulenvolumen sterilem Millipore waschen
- mit 3 Säulenvolumen 0.1 % (w/v) SDS waschen (Elution restlicher noch gebundener Proteine)
- mit einem Säulenvolumen sterilem Millipore waschen
- mit 3 Säulenvolumen Säulen-Puffer MBP + 0.02 % (w/v) NaN₃ äquilibrieren

D.4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford-Test

(Bradford, 1976)

Der Bradford-Test ist eine colorimetrische Methode zur Quantifizierung von Proteinen in Lösung. Gemessen wird die Menge an Coomassie Brilliant Blue, die an die Proteine bindet. Über einen Vergleich mit der Eichkurve eines Standardproteins (normalerweise BSA) lässt sich so die Proteinkonzentration in der Lösung abschätzen. Jeder verwendete Puffer erfordert eine individuelle Eichkurve.

- mit dem verwendeten Puffer 10-12 BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 0.05-15 µg/µl in Eppendorfgefäßen ansetzen
- von der Probe (zu bestimmendes Protein in verwendetem Puffer) Verdünnungen mit 25 % (v/v) und 50 % (v/v) im verwendeten Puffer ansetzen.
- In einer Mikroküvette 800 µl steriles Millipore und 5 µl der jeweiligen Probe mischen (BSA -Lösungen, 100 %, 50 % und 25 % zu bestimmende Proteinlösung)
- 800 µl steriles Millipore + 5 µl Puffer dienen als Referenz
- 200 µl Bradford Farbstoff-Konzentrat zugeben, mischen und 2 min bei RT inkubieren
- o.D.₅₉₅ aller Proben am Spectro-Photometer bestimmen
- Eichgerade erstellen und Proteinkonzentration der zu bestimmenden Proteinlösung ablesen

Stehen nur sehr geringe Volumina an Proteinlösung für einen Bradford-Test zur Verfügung, so kann auch nur 1 µl der jeweiligen Probe im Test verwendet werden. Alle sonstigen Schritte des Protokolls bleiben dabei unverändert.

D.4.7 Gelfiltration mit Sephacryl S-200 HR

Bei der Gelfiltrations-Chromatographie bzw. Gelfiltration erfolgt die Auftrennung von Proteinen und anderen makromolekularen Substanzen unter Ausnutzung des unterschiedlichen Molekulargewichts und dem daraus resultierenden Molekularsiebeffekt. Die Gele, die in eine Säule gepackt werden, bestehen aus chemisch inerten Kügelchen mit schwammartiger Struktur und einheitlicher Porengröße. Als Trägermaterial finden Sephadex-Polydextran-Gele, Acrylamid-Gele, Agarose-Polyamid-Gele oder Glasperlen Anwendung - je nach gewünschter Porengröße.

Unter dem Begriff Molekularsiebeffekt ist zu verstehen, dass Substanzen unterschiedlicher Größe auch in unterschiedlichem Maße in die Poren eindringen können bzw. bei zu großem Molekulargewicht aus diesen ausgeschlossen bleiben. Diese zu großen Teilchen bleiben in der wässrigen Phase außerhalb der Gelpartikel, im sogenannten Ausschlussvolumen. Kleine Teilchen hingegen diffundieren in die Poren und werden retardiert. Demnach werden zunächst größere Moleküle und dann in zunehmendem Maße kleine Moleküle aus der Säule eluiert. Gleichzeitig kann auf diesem Wege eine Umpufferung erfolgen, wie sie z.B. für einen späteren Verdau mit einer Protease notwendig sein kann.

Der Grad der Retardierung kann zum Molekulargewicht der retardierten Substanz in Beziehung gesetzt werden. Über eine Eichkurve mit Proteinen bekannter Molekularmasse lässt sich das Molekulargewicht unbekannter Proteine bestimmen. Das Verfahren der Gelfiltration zeichnet sich durch geringen Kosten- und Zeitaufwand sowie Schonung der Substanzen und geringem Substanzverlust aus.

In dieser Arbeit findet Sephacryl S-200 HR mit einem Auftrennungsbereich für globuläre Proteine von 5 bis 250 kD Molekulargewicht Anwendung. Eine Chromatographie-Säule XK16 / 60 (Länge 60 cm, Durchmesser 16 mm) wird gemäß den Angaben des Herstellers mit Sephacryl S-200 HR gepackt. Zur Schonung der Proteine werden alle Arbeiten im Kühlkabinett bei 4 °C durchgeführt.

- die Verbindung zwischen peristaltischer Pumpe, Proben-Applikator und Einlass der Säule herstellen
- den Auslass der Säule unter Durchleitung durch die optische Einheit des Durchfluss-Photometers mit dem Fraktions-Sammler verbinden
- Referenz-Küvette mit gewünschtem Puffer (z.B. Faktor Xa Puffer) eichen
- Schreiber mit 10 mV und 1 mm/min starten; vollen Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchfluss-Photometers (Absorption bei 280 nm) passend einregeln
- Äquilibrieren: gepackte Säule mit 3 Säulenvolumen des gewünschten Puffers (z.B. Faktor Xa Puffer) äquilibrieren; Flussrate 60 ml/h

- Vorbereitung der Probe: Probe, falls Volumen größer als 5 ml, mittels Ultrafiltration (→ D.4.10) auf 5 ml einengen. Probe auf eine Endkonzentration von 10 % (v/v) Glycerin einstellen.
- Beladen: vorbereitete Probe mittels Spritze in den Proben-Applikator einfüllen
- Elution: Proteine mit ca. 3 Säulenvolumen Puffer eluieren; Flussrate 28 ml/h ! Durchlauf in 6 min (= 2,8 ml) Fraktionen sammeln.

Zur Auswertung der Gelfiltration werden geeignete Volumina der Fraktionen, die laut Durchfluß-Photometrie Protein enthalten, als Proben in einer analytischen SDS-DISKPAGE (→ D.4.2) eingesetzt.

D.4.8 Faktor Xa-Verdau

Die Expressionsvektoren pMALTM-c, pMALTM-p und pMALTM-cd bzw. deren Derivate pJB-M29c, pPMP-X8 und pJB-M18 sollen Fusionsproteine exprimieren, die zwischen der MBP-Domäne und der Ziel-Domäne die Erkennungssequenz "Ile-Glu-Gly-Arg" des Blutgerinnungsfaktors Xa aufweisen. Die Faktor Xa Protease wandelt während des Gerinnungsprozesses Prothrombin durch Schnitt nach diesem Tetrapeptid in aktives Thrombin um (Jackson, 1984). Nach Abspaltung der MBP-Domäne kann die weitere Aufreinigung durch eine Rechromatographie an Amylose-Harz und/oder eine präparative SDS-DISKPAGE (→ D.4.9) erfolgen. Das Fusionsprotein sollte zur Proteolyse in Faktor Xa Puffer gelöst sein.

- Konzentration des Fusionsproteins mittels Bradford-Test (→ D.4.6) bestimmen
- 0.1 % - 1 % (w/w) Faktor Xa zugeben - Vortests zur Ermittlung einer ausreichenden Konzentration sind empfehlenswert
- 20 h bei RT und 20 h bei 4 °C inkubieren

D.4.9 Präparative diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (präparative SDS-DISKPAGE)

Die präparative SDS-DISKPAGE wird mit Hilfe einer präparativen Gelelektrophorese „Model 491 Prep Cell“ der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die theoretischen Grundlagen einer SDS-DISKPAGE sind unter D.4.2 ausführlich geschildert. Hier erfolgt lediglich ein Ausbau der Methode hin zu präparativen Maßstäben.

Während des Laufs durch ein zylindrisches, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel werden die Proteine einer Probe in ringförmige Banden aufgetrennt. Die Einzelbanden wandern am unteren Ende der Säule aus dem Gel, wo sie direkt in die Elutionskammer gelangen. Von dort wird das Eluat mittels einer peristaltischen Pumpe durch eine Elutions-Sammelröhre im Kühlkern nach außen geleitet. Ein Durchfluss-Photometer (Absorption bei 280 nm) misst die Proteinkonzentration, bevor das Eluat in Fraktionen gesammelt wird.

Temperaturgradienten im Gel würden die Migration der Proteine in kompakten, parallelen Banden behindern. Um diese Gefahr zu minimieren, werden die Temperaturen der inneren und äußeren Oberfläche des Gels einander angeglichen. Das erfolgt durch kontinuierliches Pumpen von Elektrophoresepuffer der unteren Pufferkammer, in der die Säule hängt, durch den Kühlkern im Gel. Der Elektrophoreselauf wird im Kühlkabinett bei 4 °C durchgeführt.

D.4.9.1 Optimierung der Laufbedingungen

Auswahl der Säulengröße

Es stehen zwei Säulen von 15 cm Länge mit 28 mm und 37 mm innerem Durchmesser zur Verfügung. Die Auswahl erfolgt zum einen unter Berücksichtigung der aufzutrennenden Proteinmenge, wobei hier

die Quantität an Zielprotein und nächstem kontaminierendem Protein gemeint ist, zum anderen ist die Molekulargewichtsdifferenz dieser beiden zu trennenden Proteine von Bedeutung (2-10 %, 10-15 % oder >15 %). Genaue Richtlinien sind der Bedienungsanleitung zu entnehmen.

Optimale Porengröße (% T)

Ist die Molekulargewichtsdifferenz der beiden zu trennenden Proteine kleiner als 10 %, so muss eine Serie von analytischen Gelen mit unterschiedlichen % T-Werten gemacht werden. Die Porengröße mit der besten Auflösung für das zu trennende Protein resultiert in einem relativen Mobilitätswert (Rf) von 0.55-0.6. Nähere Erläuterungen hierzu sind der Bedienungsanleitung zu entnehmen.

Für solche Proben, bei denen die Molekulargewichtsdifferenz ≥ 10 % ist, kann der optimale % T-Wert und somit die optimale Porengröße aus einem Diagramm in der Bedienungsanleitung (Seite 18) ersehen werden.

D.4.9.2 Gießen des präparativen Gels und Aufbau der Prep Cell

Nicht näher erläuterte Arbeitsschritte sind ebenso wie die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ausführlich in der Bedienungsanleitung beschrieben.

- die Säule inklusive Kühlkern auf der speziellen Gießvorrichtung montieren
- Kühlkreislauf für den Kühlkern aufbauen und Puffer-Kreislauf-Pumpe mit einer Flussrate von 100 ml/h einschalten
- Trenngel-Lösung in Saugflasche ansetzen und 5 min entgasen
- Lösung in Becherglas überführen
- „Starter“ Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugeben und gut vermischen
- Trenngel-Lösung vorsichtig in Säule gießen - kleine Luftblasen können durch Klopfen auf die Gießvorrichtung entfernt werden
- vorsichtig mit ca. 3 ml Wasser-gesättigtem t-Butanol überschichten (für glatte Oberfläche)
- nach 1-2 h das Wasser-gesättigte t-Butanol durch 5 ml SDS-Elektrophorese-Puffer ersetzen
- ü.N. auspolymerisieren lassen, danach Puffer vorsichtig dekantieren
- Sammelgel-Lösung in Saugflasche ansetzen und 5 min entgasen
- „Starter“ Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugeben und gut vermischen
- Sammelgel-Lösung vorsichtig auf das Trenngel gießen
- nach dem Überschichten mit Wasser-gesättigtem t-Butanol noch 1-2 h auspolymerisieren lassen
- die Elutionskammer und die Pufferkammern montieren, sämtliche Schlauch-Verbindungen herstellen
- ca. 7 Liter SDS-Elektrophorese-Puffer in Saugflasche ansetzen und 10 min entgasen
- alle Kammern mit Puffer füllen
- Elutionskammer und Elutionsschlauch von Luftblasen befreien
- das Ende des Elutionsschlauchs unter Durchleitung durch eine peristaltische Pumpe und die optische Einheit des Durchfluss-Photometers mit dem Fraktions-Sammler verbinden
- Puffer-/Kühlkreislauf schließen und Puffer-Kreislauf-Pumpe mit einer Flussrate von 100 ml/h einschalten

D.4.9.3 Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf

- Probe mindestens 1:4 mit SDS Proben-Puffer (reduzierend) verdünnen
- 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubieren
- Probe mittels der Auftragespritze vorsichtig auf das Gel laden

- Prep Cell schließen und Lauf mit 40-50 mA/240-300 V bei Verwendung der kleinen Säule und 50-60 mA/200-400 V für die große Säule starten; Flussrate der peristaltischen Pumpe 60 ml/h
- Referenz-Küvette mit SDS-Elektrophorese-Puffer eichen
- Schreiber mit 10 mV und 1 mm/min starten; vollen Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchfluss-Photometers (Absorption bei 280 nm) passend einregeln
- wenn die ringförmige Bromphenoblau-Bande noch ca. 1 cm vom unteren Ende des Geles entfernt ist, Fraktionssammler starten und Eluat in 2.5 min (= 2.5 ml) Fraktionen sammeln
- Lauf gegebenenfalls ü.N. fortsetzen

Zur Auswertung des Laufs werden geeignete Volumina ausgewählter Fraktionen (das Elutionsprofil gibt Anhaltspunkte für die Auswahl) als Proben in einer analytischen SDS-DISKPAGE (→ D.4.2) eingesetzt. Erfahrungsgemäß ist vorher allerdings eine Aufkonzentrierung der Fraktionen mittels Ultrafiltration (→ D.4.10) nötig, um bei der Analyse mit Volumina arbeiten zu können, die gut zu handhaben sind. Demontage und Reinigung der Apparatur werden unter Berücksichtigung der Hinweise in der Bedienungsanleitung durchgeführt.

D.4.10 Proteinkonzentrierung durch Ultrafiltration

Durch Ultrafiltration können Proteine schonender konzentriert werden als bei Präzipitationsverfahren, die mit Denaturierung oder Fällung der Proteine einhergehen. Mittels Zentrifugalkraft wird die Proteinlösung durch eine Ultrafiltrationsmembran gepresst. Die Poren definierter Größe halten Proteine ab einem bestimmten Molekulargewicht zurück, was zur gewünschten Konzentrierung führt. Durch mehrfache Konzentrierung unter Zugabe eines neuen Puffers nach jedem Lauf kann auch die Umpufferung eines Proteins erfolgen.

Für verschiedene Volumina stehen unterschiedliche Ultrakonzentratoren der Firma Millipore (Ultrafree-0.5, Ultrafree-4 und Ultrafree-15) mit einem Ausschluss-Molekulargewicht von z.B. 5 kD zur Verfügung. Sie werden gemäß Herstellerangaben in Zentrifugen verwendet. Da der Ultrafree-4 Konzentrator mit einem maximalen Volumen von 4 ml erfahrungsgemäß die häufigste Verwendung findet, wird für diesen der Vorgang exemplarisch erläutert:

- Ultrafree-4 Konzentrator in 12 ml-PE-Röhrchen stecken und Proteinlösung einfüllen
- 12 ml-PE-Röhrchen mit Gummifinger in JA-17 Rotor stecken
- 20 min bei 7000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- nach gewünschter Konzentrierung Lösung aus dem Konzentrator vorsichtig abziehen oder mit gewünschtem Puffer wieder auffüllen und Vorgang wiederholen (Umpufferung)

D.4.11 Protein-Sequenzierblotting

Bevor die Aminosäure-Sequenz eines Proteins bestimmt werden kann, muss es in ausreichender Menge und Reinheit zugänglich sein. Um dieses zu erreichen, werden Proteingemische mittels analytischer SDS-DISKPAGE (→ D.4.2) aufgetrennt und in einem nachfolgenden Arbeitsschritt mit der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Khyse-Anderson, 1984) zwischen zwei Graphitplatten im elektrischen Feld vom Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Die gewünschten Banden mit immobilisiertem Protein können dann zur Protein-Sequenzierung eingesetzt werden:

- mit adäquaten Volumina der zu untersuchenden Proteine eine analytische SDS-DISKPAGE durchführen.
- eine PVDF-Membran und 6 Filterpapiere 3MM in den Maßen 7 cm x 9 cm (bei Minigel) ausschneiden
- PVDF-Membran 1 min in Methanol äquilibrieren, dann 5 min in PS-Transferpuffer äquilibrieren
- das ungefärbte, zu blottende Proteingel 10 min in PS-Transferpuffer äquilibrieren

- die Filterpapiere in PS-Transferpuffer tränken
- folgendes Sandwich auf die untere Graphitplatte (Anode) einer "Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" schichten:
 - 3 Filterpapiere 3 MM (unten)
 - PVDF-Membran
 - Proteingel (ohne Sammelgel!)
 - 3 Filterpapiere 3 MM (oben)
- eventuelle Luftblasen sorgfältig aus dem Sandwich herausrollern
- obere Platte (Kathode) auflegen, Kontakte befestigen
- bei 150 mA in 45 min transferieren
- Blot-Sandwich vorsichtig abbauen; die Membran darf nicht mit den Fingern angefasst werden!
- PVDF-Membran ca. 3 min in Coomassie-Färbelösung färben
- ca. 2 h unter mehrfachem Wechsel der Proteingel-Entfärbelösung entfärben
- PVDF-Membran gegebenenfalls zur Dokumentation einscannen

Die Proteinbanden, die die N-terminal zu sequenzierenden Proteine enthalten, können aus der Membran ausgeschnitten werden und in Eppendorfgefäßen zur Sequenzierung (Dr. Jaeger, Universität Bochum) verschickt werden.

D.4.12 Gesamtproteinextraktion aus Pflanzengeweben

- 50-150 mg Pflanzengewebe in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver mörsern
- Gewebe-Pulver in Eppendorfgefäß überführen und sofort 200 µl Extraktionspuffer zugeben
- identisches Volumen an TE-gesättigtem Phenol zugeben, vortexen und mindestens 5 min auf Eis inkubieren
- Homogenat 10 min bei 4 °C und 10 000 g sedimentieren
- Phenolphase abziehen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Präzipitation der Proteine durch Zugabe von 5 Volumen 100 mM Ammoniumacetat (w/v) in Methanol und 16 h Inkubation bei -20 °C
- 10 min bei 4 °C und 10 000 g zentrifugieren
- Überstand vom Pellet abziehen und werfen
- Pellet mit 80 % Aceton (v/v) waschen und im Vakuum trocknen
- Pellet im kleinstmöglichen Volumen (20-50 µl, je nach Proteinmenge) denaturierendem Proteinpuffer aufnehmen und 1 min im 100 °C Wasserbad inkubieren

Im Anschluss kann direkt die Proteinkonzentration der Lösung mittels Bradford-Test (→ D.4.6) bestimmt werden oder die Proben können bei -20 °C gelagert werden.

D.4.13 Isolierung von Calmodulin aus *Vicia faba* Blättern

Calmodulin kann relativ unproblematisch in hochreiner Form aus Pflanzengewebe isoliert werden, wobei sich Blattmaterial besonders gut für die Aufarbeitung eignet. Ein großer Vorteil für die Aufreinigung ist, dass Calmodulin sehr hitzestabil ist, also im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen auch bei einer vorübergehenden Erhitzung auf 82 °C nicht denaturiert und ausfällt. Ein weiterer Schritt in der Isolierung von reinem Calmodulin ist die Aufreinigung an dem schwach anionischen Ionenaustauscher DEAE. In einer Affinitäts-Chromatographie wird über die Bindung des durch Ca^{2+} -aktivierten Calmodulin an Fluphenazin-Sepharose und seine Elution auf Grund seiner Inaktivierung durch die Komplexbildung der Ca^{2+} -Ionen (EGTA) letztlich hochreines Calmodulin gewonnen.

D.4.13.1 Herstellung einer Fluphenazin-Affinitätsmatrix

- 800 mg Fluphenazindihydrochlorid in 100 ml 50 %igem (v/v) Dioxan lösen
- pH dieser Lösung mit NaOH auf 12 einstellen
- zu diesem Ansatz 50 ml Epoxid aktivierte Sepharose 4B geben und bei 45 °C für 40 h schütteln (nicht kälter, da dies die Kopplungsrate erniedrigt)
- das Gel auf einem Filter mit 1 l 50 %igem Dioxan, 500 ml Methanol oder Ethanol und 2 l sterilem Millipore waschen
- Gel trocknen und lichtgeschützt aufbewahren
- für die Bestimmung der Kopplungsrate (%) wird vom eingesetzten Fluphenazin und vom nach der Kopplung noch vorhandenen Fluphenazin die optische Dichte bestimmt (jeweils Spektrum von 240 bis 340 nm aufnehmen). Das Absorptionsmaximum für Fluphenazin liegt bei $A_{\max} = 256.5$ nm, Extinktionskoeffizient = $30.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

D.4.13.2 Acetonextraktion von Gesamtproteinen aus Blättern

- 1 kg Blätter in 2 l Aceton (10 °C) in einem explosionsgeschützten Homogenisator 3 - 4 min bei maximaler Umdrehungszahl homogenisieren.
- Homogenat über einen Keramikfilter unter Vakuum abfiltrieren (die zurückbleibende Masse kann gefriergetrocknet und bei 80 °C aufbewahrt werden oder wird mit 1 l 50 mM Tris HCl, pH 7.5, 20 mM β -Mercaptoethanol, 0.4 mM Nametabisulfid gewaschen und nochmals homogenisiert)
- das Homogenat 30 min bei 13 000 g zentrifugieren
- den Überstand in der Mikrowelle 2 min bei 82 °C erwärmen (einschließlich der 4 min um diese Temperatur zu erreichen), anschließend den Überstand sofort auf Eis abkühlen
- hitzedenaturierte Proteine 30 min bei 13 000 g abzentrifugieren
- den Überstand für die Affinitäts-Chromatographie verwenden

D.4.13.3 Aufreinigung von Calmodulin

- DEAE-Cellulose (100 g / kg Blätter) mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 vorwaschen
- den Überstand (siehe oben) mit der DEAE-Cellulose 5 min inkubieren und unter Vakuum abfiltrieren
- zurückbleibende DEAE-Cellulose mit 500 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 waschen und die gebundenen Proteine mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 0.4 M KCl in ein sauberes Glasgefäß eluieren
- Eluat auf 4 mM CaCl_2 einstellen und 10 min mit der Fluphenazin-Sepharose (vorgewaschen mit Puffer A) inkubieren
- Gemisch nach Vorschrift in eine Chromatographie-Säule einfüllen und Schlauchverbindungen mit peristaltischer Pumpe, Durchfluss-Photometer und Fraktionssammler herstellen
- Schreiber mit 20 mV und 1 mm/min starten; vollen Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchfluss-Photometers (Absorption bei 280 nm) passend einregeln
- mit 3 Säulenvolumen Puffer B waschen; Flussrate 15 ml/h
- Referenz-Küvette mit Puffer C eichen
- mit 2 Säulenvolumen Puffer C eluieren (Flussrate 15 ml/h); Durchlauf in 6 min (= 1.5 ml) Fraktionen sammeln
- die Fluphenazin-Sepharose mit 10 Säulenvolumen sterilem Millipore und 5 Säulenvolumen 10 % Ethanol oder Methanol waschen
- Fluphenazin-Sepharose lichtgeschützt bei 4 °C lagern

Das isolierte Calmodulin liegt im Eluat in seiner inaktivierten Form vor, da der Elutionspuffer EGTA enthält. Da das EGTA in nachfolgenden Bindungstests stören würde, sollte eine Umpufferung auf

10 mM Tris-HCl, pH 7.5 mittels Ultrafiltration (→ D.4.10) erfolgen, bevor die konzentrierte VfCaM-Lösung in Aliquots bei -70 °C gelagert wird.

D.4.14 Calmodulin Retardationstest in einem harnstoffhaltigen PAA-Gel

(Reddy *et al.*, 1996, modifiziert)

Die Bindung von aktiviertem Calmodulin an eine CaM-Bindedomäne führt in einem Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) zu einer Verringerung der Laufstrecke (Retardation) im Vergleich zu nicht gebundenem Calmodulin oder nicht aktiviertem Calmodulin (Erickson-Viitanen und DeGrado, 1987). Durch den Zusatz von 4 M Harnstoff werden Komplexe von niedriger Affinität und nicht-spezifische Komplexe dissoziiert, so dass nur spezifische Komplexe im Gel sichtbar werden. Die potentielle VfCaMBP1-Bindedomäne wird bei diesem Retardationstest in Form eines synthetischen Peptids (19-AS-Peptid mit Immunitätsgrad (> 70 % Reinheit); ARK Scientific Biosystems, Darmstadt) eingesetzt. Das eingesetzte Calmodulin stammt aus Rinderhirnextrakten. Für den Retardationstest mit aktiviertem Calmodulin werden der Inkubationspuffer, der Trenngelpuffer, der Probenpuffer und der Elektrophorese-Puffer mit 1 mM CaCl₂ angesetzt, für den Test mit inaktiviertem Calmodulin (Kontrolle) dagegen mit 5 mM EGTA.

- Calmodulin mittels Ultrafiltration (→ D.4.10) auf den jeweiligen Inkubationspuffer umpuffern
- Peptid in jeweiligem Inkubationspuffer lösen (z.B. hier 1 µg/µl)
- Calmodulin (hier 134 pmol) in Eppendorfgefäßen mit ansteigenden Konzentrationen an synthetischem Peptid mischen (Endvolumen 20 µl) und 1 h bei RT inkubieren
- je 10 µl des jeweiligen Probenpuffers zugeben und gut mischen (kein Aufkochen!)
- 12 %ige PAA-Gele unter Verwendung des jeweiligen Puffers gießen (10er Minigel ohne Sammelgel)
- Elektrophoreselauf mit den jeweiligen Proben bei 25 mV
- Gele wie unter D.4.2.3 beschrieben färben und dokumentieren

D.4.15 Nukleotid-Bindetests (Photomarkierung)

Um die Bindung der Nukleotide ATP oder GTP an ein potentiell Nukleotid-bindendes Protein zu testen, kann man sich die besonderen Eigenschaften der Nukleotid-Derivate 8-Azidoadenosine 5'-triphosphate-biotin (8N₃ATP[γ]biotin) und 8-Azidoguanosine 5'-triphosphate-biotin (8N₃GTP[γ]biotin) zu Nutze machen. Deren photoaktive Azidgruppen-Substitution im basischen Ring kann durch UV-Licht aktiviert werden, woraufhin es zu einer kovalenten Verknüpfung mit dem Protein kommt, an das das Nukleotid zum Zeitpunkt des UV-Lichtblitzes gebunden war. Mit Hilfe von HRP-gekoppeltem Streptavidin können die somit durch das Biotin des Nukleotids markierten Proteine nach ihrer Auftrennung im Western Blot detektiert werden.

- Proteine mittels Ultrafiltration (→ D.4.10) auf Bindungspuffer umpuffern
- Proteinkonzentrationen der umpufferten Proteinlösungen über Bradford-Tests (→ D.4.6) bestimmen
- je 30 µg der Proteine in Eppendorfgefäße überführen und auf ein Endvolumen von 30 µl mit Bindungspuffer auffüllen
- 5 min auf Eis inkubieren
- je 10 µl 5 mM 8N₃ATP[γ]biotin bzw. 8N₃GTP[γ]biotin in Bindungspuffer zugeben (Endkonzentration 50 µM) und gut mischen
- 12 min auf Eis inkubieren; bei Verdrängungsexperimenten nach 6 min ATP bzw. GTP (gelöst in Bindungspuffer und auf pH 6.8 eingestellt) bis zu einer Endkonzentration von 5 mM zugeben

- Proben 2 min mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge (Intensität 4600 μ W) bei einem Abstand von 4 cm bestrahlen
- Proben sofort mit β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 mM) versetzen und kurz vortexen
- Proteine durch Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration 15 %) und Inkubation ü.N. bei 4 °C ausfällen
- Proteine 15 min bei 15 000 Upm und 4 °C pelletieren
- Überstand abziehen und Pellet mit 80 % Aceton waschen
- Pellet im Vakuum trocknen und je 10 μ l Bindungspuffer + 1 % (w/v) SDS zugeben
- je 5 μ l Proteingel-Ladepuffer (PBJR) zugeben und 5 min bei 100 °C inkubieren
- mit allen Proben einen Western Blot mit ECL-Plus Detektion (\rightarrow D.5.3.1) durchführen, wobei sich direkt nach der Blockierung der unspezifischen Bindestellen der Membran die Inkubation mit dem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat anschließt

Zur nachträglichen immunologischen Detektion bestimmter Proteine durch spezifische Antikörper kann das Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat nach der ECL-Detektion durch eine 30-minütige Inkubation in Stripping-Puffer und zwei anschließende Waschschrte mit großen Volumina an PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 wieder abgelöst werden.

D.4.16 ATPase Aktivitätstest

(Koronakis *et al.*, 1993; Lanzetta *et al.*, 1979, modifiziert)

Durch Hydrolyse wird ATP in ADP und anorganisches Phosphat gespalten. Beim Nachweis der ATPase-Aktivität eines Proteins macht man sich zu Nutze, dass das freigesetzte anorganische Phosphat mittels eines colorimetrischen Nachweisverfahrens bis in den nanomolaren Bereich detektiert werden.

- gewünschte Menge an Protein (z.B. 40 μ g) mittels Ultrafiltration (\rightarrow D.4.10) auf Reaktionspuffer umpuffern
- in Eppendorfgefäß mit Reaktionspuffer auf 90 μ l auffüllen
- 5 min bei gewünschter Temperatur (z.B. 22 °C) inkubieren
- Zugabe von 10 μ l ATP gelöst in Reaktionspuffer und auf pH 7 eingestellt (Endkonzentration 4 mM)
- 10 min bei gewünschter Temperatur inkubieren
- 800 μ l Farbreagenz zugeben und 1 min bei RT inkubieren
- 100 μ l 34 %ige Zitronensäure zugeben und vortexen
- in Mikroküvetten transferieren und 30 min inkubieren (Farbentwicklung)
- o.D.₆₆₀ am Spectro-Photometer bestimmen
- Eichgerade mit KH_2PO_4 (0.01 nmol bis 10 nmol) erstellen und Phosphat-Konzentration der zu bestimmenden Probe ablesen

D.4.17 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Bindungstest

(Maruyama *et al.*, 1984, modifiziert)

Bei diesem Nachweisverfahren für die Ca^{2+} -Bindefähigkeit von Proteinen wird das zu testende aufgereinigte Protein einer analytischen SDS-DISKPAGE unterworfen und mittels Semi-Dry Proteinblot auf eine PVDF-Membran transferiert (\rightarrow D.4.11). Nach einer Renaturierung der Proteine auf der Membran wird über die Bindung von radioaktivem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ und eine anschließende Autoradiographie der Nachweis für eine Ca^{2+} -Bindung geführt.

- Proteine in einer analytischen SDS-DISKPAGE auftrennen und auf eine PVDF-Membran transferieren

- Membran ü.N. mit Renaturierungspuffer inkubieren
- 10 min mit Renaturierungspuffer + 2 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inkubieren
- 5 min in eiskaltem 50 % (v/v) Ethanol waschen
- Membran an der Luft trocknen lassen
- Autoradiographie wie bei ECL-Plus System (\rightarrow D.5.3.1) durchführen, aber ohne Frischhaltefolie und mit einer Expositionszeit von 24 h

D.5 Immunologische Methoden

D.5.1 Gewinnung von Antikörpern

Die Gewinnung von gegen VfnOD32a gerichteten polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec (Belgien) durchgeführt. Jedem zu immunisierenden Kaninchen wurden dabei 4 Injektionen des jeweiligen Antigens appliziert. Nach 38 Tagen konnte eine erste Blutprobe entnommen werden. Weitere Blutabnahmen erfolgten 66 und 80 Tage nach der ersten Injektion.

In analoger Weise wurden polyklonale Antikörper gegen das Vflb29-Peptid (Eurogentec) und das VfnOD32a-Peptid (BioScience, Göttingen) gewonnen, wobei der Immunisierung erst noch die Synthese des jeweiligen Peptids und dessen Kopplung an ein Trägerprotein vorausgingen.

D.5.2 Aufreinigungen von Antikörpern

Antikörper, die gegen ein spezifisches Antigen gerichtet sind, können aus einem Antiserum aufgereinigt werden, wenn das Antigen selbst in ausreichend reiner Form vorliegt. Bei dem Antigen kann es sich dabei um ein aufgereinigtes Fusionsprotein, aber auch um ein zur Immunisierung eingesetztes Peptid handeln. Durch die Aufreinigung sollen alle nicht gegen das Antigen gerichteten IgGs sowie alle anderen Bestandteile des Antiserums wie zum Beispiel Serumalbumin abgetrennt werden.

Voraussetzung für eine Aufreinigung ist die Immobilisierung des Antigens an einem Trägermaterial. Dies kann zum einen durch die kovalente Bindung des Antigens an Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B geschehen, wobei hierbei das Antigen möglichst rein vorliegen sollte (affinitätschromatographische Aufreinigung). Bei der zweiten Methode werden die Proteine in einem präparativen SDS-DISKPAGE Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Anschließend wird der Nitrocellulose-Streifen ausgeschnitten, an den das gewünschte Antigen gebunden ist. Bei diesem Verfahren spielt somit die Homogenität des zur Gelelektrophorese eingesetzten Proteingemisches nur eine untergeordnete Rolle, Peptide sind aber auf Grund ihres geringen Molekulargewichts für diese Methode nicht geeignet.

Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgt bei beiden Verfahren durch eine drastische Veränderung des pH-Wertes. Die Antikörper, die über Basen-sensitive Interaktionen an das Antigen binden, werden bei pH 11.5 eluiert und solche, die über Säure-sensitive Interaktionen binden, bei pH 2.5.

D.5.2.1 Affinitäts-chromatographische Aufreinigung von Antikörpern

(Harlow und Lane, 1988, modifiziert)

Herstellung der Affinitätsmatrix

Zur Immobilisierung des Antigens erfolgt zunächst seine Kopplung an Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B; 1 g des Sepharose-Pulvers ergibt ein Endvolumen von etwa 3.5 ml. Es binden 5-10 mg Protein (Ligand) pro ml Gel, bei kleinen Proteinen bzw. Peptiden 1-10 μmol Ligand pro ml Gel.

- gewünschte Menge an Sepharose-Pulver in 200 ml 1 mM HCl, pH 2.5 pro g Pulver 15 min quellen lassen

- in steriler Glasnutsche abfiltrieren und mit 500 ml sterilem Millipore waschen
- Ligand in Ligandenpuffer lösen (5 ml Ligandenpuffer pro 1 g Sepharose-Pulver) und kleines Aliquot bei 4 °C lagern (Probe vor Bindung)
- vorbehandeltes Gel mit Ligandenlösung versetzen und 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C vorsichtig rollern (keinen Magnetprüher verwenden!)
- in steriler Glasnutsche abfiltrieren, kleines Aliquot der filtrierten Lösung bei 4 °C lagern (Probe nach Bindung) und Rest der Lösung verwerfen
- das Gel mit 5 Volumen Ligandenpuffer waschen
- Gel 2 h bei RT oder 10 h bei 4 °C mit 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 inkubieren (Inaktivierung nicht gebundener CNBr-Gruppen)
- mit 3 Volumen Waschpuffer A und 3 Volumen Waschpuffer B waschen
- mit 5 Volumen Waschpuffer A und 5 Volumen Waschpuffer B waschen
- Affinitätsmatrix (Gel) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 % (w/v) NaN₃ bei 4 °C lagern
- Proteinkonzentrationen der Proben vor und nach der Bindung mittels Bradford-Test (→ D.4.6) messen, um die Kopplungsrate zu bestimmen

Mit der Affinitätsmatrix wird nach Herstellerangaben eine Chromatographie-Säule gepackt und im Kühlkabinett bei 4 °C in Analogie zum Vorgehen bei anderen Affinitäts-Chromatographien mit dem Durchfluss-Photometer und dem Fraktionssammler verbunden. Bei der Chromatographie wird durchgängig eine Flussrate von 15 ml/h eingehalten, lediglich die Bindung der Antikörper erfolgt bei einer Flussrate von 10 ml/h. Die ersten fünf Waschschritte dienen der Entfernung von schlecht gebundenen Antigenen, die sonst bei den späteren Elutionsschritten mit eluiert würden und die Antikörper blockieren könnten. Bei nachfolgenden Antikörper-Aufreinigungen an dieser Affinitätsmatrix sind diese fünf Waschschritte daher nicht nötig und es kann direkt mit der Bindung von Antikörpern begonnen werden.

Affinitäts-Chromatographie

- waschen der Affinitätsmatrix mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer I
- waschen mit 10 Säulenvolumen Elutionspuffer I (sauer)
- waschen mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer II, pH-Wert testen und nötigenfalls weiter waschen bis ein pH-Wert von 8 erreicht ist
- waschen mit 10 Säulenvolumen Elutionspuffer II (basisch)
- waschen mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer I, pH-Wert testen und nötigenfalls weiter waschen bis ein pH-Wert von 7.5 erreicht ist
- 2 ml Antiserum 1:10 mit Waschpuffer I verdünnen und zur Bindung über die Säule leiten (Flussrate 10 ml/h!)
- waschen mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer I
- waschen mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer III
- Elution der durch Säure-sensitive Interaktionen gebundenen Antikörper durch 10 Säulenvolumen Elutionspuffer I; Eluat in einem sterilen Gefäß, in das vorher ein Säulenvolumen 1 M Tris-HCl, pH 8.0 pipettiert wurde, auffangen
- waschen mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer II, pH-Wert testen und nötigenfalls weiter waschen bis ein pH-Wert von 8 erreicht ist
- Elution der durch Basen-sensitive Interaktionen gebundenen Antikörper durch 10 Säulenvolumen Elutionspuffer II; Eluat in einem sterilen Gefäß, in das vorher ein Säulenvolumen 1 M Tris-HCl, pH 8.0 pipettiert wurde, auffangen
- waschen mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer I, pH-Wert testen und nötigenfalls weiter waschen bis ein pH-Wert von 7.5 erreicht ist; Affinitätsmatrix bei 4 °C lagern

- das Eluat, das laut Schreiber-Protokoll eine hohe Proteinkonzentration enthält, mittels Ultrafiltration (→ D.4.10) konzentrieren und auf PBS + 0.02 % (w/v) NaN_3 umpuffern
- Konzentration der aufgereinigten Antikörper mittels Bradford-Test (→ D.4.6) bestimmen
- 1 % (w/w) BSA zur Antikörper-Lösung zugeben und in Aliquots à 20 μl bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lagern

D.5.2.2 Aufreinigung von Antikörpern an Nitrocellulose-Streifen

(Harlow und Lane, 1988, modifiziert)

Immobilisierung des Antigens mittels Proteinblot

Die Vorgehensweise zur Immobilisierung des Antigens an einer Nitrocellulose-Membran gleicht im Wesentlichen einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (→ D.4.2) mit anschließendem Proteinblot (→ D.5.3.1). Da eine möglichst große Menge an Protein aufgetrennt werden soll, wird die Gelelektrophorese dabei im präparativen Maßstab (8 cm x 10 cm Gel mit 1.5 mm Dicke) durchgeführt.

- präparatives Gel unter Verwendung von großen Glas- und Aluminiumplatten (8 cm x 12 cm), Spacern mit 1.5 mm Dicke, präparativem Kamm und der entsprechenden Gießvorrichtung in Analogie zu D.4.2 gießen.
- ca. 80 μl Proteinlösung mit 40 μl reduzierendem Proteingel-Ladepuffer (PBJR) mischen und 5 min bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad erhitzen (Imidazol-haltige Proben nur bei $37\text{ }^\circ\text{C}$!)
- Gelkammer mittels Klammern in passender Elektrophorese-Einheit befestigen
- ca. 180 ml SDS-Elektrophorese-Puffer in oberen und unteren Pufferbehälter füllen
- Probenkamm ziehen, Probe in der Tischzentrifuge abzentrifugieren und in die Taschen pipettieren
- Gelelektrophorese wie unter D.4.2. beschrieben durchführen
- aufgetrennte Proteine mittels Semi-Dry Proteinblot (→ D.5.3.1) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen; dabei 3 MM-Papier und Membran in der Größe 8 cm x 8 cm verwenden und 1.5 h bei 15 V transferieren
- Nitrocellulose-Membran mit Ponceau-S-Lösung solange anfärben, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind.
- zwecks Dokumentation photographieren oder einscannen
- Banden, die das gewünschte Antigen enthalten, aus der Membran ausschneiden und in etwa 5 mm lange Stücke zerschneiden (immobilisiertes Antigen)
- Membranstücke in 12 ml-PE-Röhrchen übertragen und 2 x 5 min mit PBS waschen (Entfärbung)
- In PBS + 0.02 % (w/v) NaN_3 bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ lagern oder sofort zur Affinitäts-Aufreinigung einsetzen

Affinitäts-Aufreinigung

Die Vorgehensweise bei der Aufreinigung von Antikörpern an Membran-immobilisierten Antigenen gleicht in vielen Schritten der immunologischen Detektion geblotteter Proteine (→ D.5.3.1). Bei der Aufreinigung ist das Ziel aber nicht die Detektion der gebundenen Antikörper, sondern ihre Elution.

- alle Schritte erfolgen in 12 ml-PE-Röhrchen.
- Membranstücke 2 h in 5 ml 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Puffer rollern - so werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert
- 5 ml PBS-Puffer mit 0.3 % (w/v) Magermilchpulver mischen und ca. 50 μl Antiserum zugeben - das Volumen an Antiserum ist abhängig von der Konzentration an gegen das Antigen gerichteten Antikörpern im Serum
- Membranstücke 2 h mit Antiserum-Mix rollern
- 6 x 15 min mit je 10 ml PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- Elution der durch Säure-sensitive Interaktionen gebundenen Antikörper durch 10 min Inkubation mit 2 ml Elutionspuffer I auf dem Schüttler

- Eluat in neues 12 ml-PE-Röhrchen überführen und 200 µl 1 M Tris-HCl, pH 8, + 800 µl PBS zugeben
- Membranstücke 4 x 15 min mit je 10 ml PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- Elution der durch Basen-sensitive Interaktionen gebundenen Antikörper durch 10 min Inkubation mit 2 ml Elutionspuffer II auf dem Schüttler
- Eluat in neues 12 ml-PE-Röhrchen überführen und 200 µl 1 M Tris-HCl, pH 8, + 800 µl PBS zugeben
- Membranstücke 4 x 15 min mit je 10 ml PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen und in PBS + 0.02 % (w/v) NaN₃ bei 4 °C lagern
- die Eluate mittels Ultrafiltration (→ D.4.10) konzentrieren und auf PBS + 0.02 % (w/v) NaN₃ umpuffern
- Proteinkonzentrationen der umpufferten, konzentrierten Eluate mittels Bradford-Test (→ D.4.6) bestimmen - die gebundenen Antikörper werden in der Regel nur bei einem der beiden Elutions-schritte eluiert
- 1 % (w/w) BSA zur Antikörper-Lösung zugeben und in Aliquots à 20 µl bei -20 °C lagern

D.5.3 Immunoblotting-Verfahren

D.5.3.1 Western Blot

Mittels Western Blot können Proteine selbst in Gesamtproteinextrakten, also sehr komplexen Proteingemischen, äußerst effizient nachgewiesen und quantifiziert werden. Wie schon beim Protein-Sequenzierblotting (→ D.4.11) werden Proteingemische mittels analytischer SDS-DISKPAGE (→ D.4.2) aufgetrennt und in einem nachfolgenden Arbeitsschritt mit der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Khyse-Anderson, 1984) zwischen zwei Graphitplatten im elektrischen Feld vom Gel auf eine Membran transferiert. In diesem Fall wird allerdings eine Nitrocellulose-Membran verwendet. Die immobilisierten Proteine sind so einer Antigen/Antikörper-Bindung zugänglich.

Semi-Dry Proteinblot

- mit adäquaten Volumina der zu untersuchenden Proteingemische eine analytische SDS-DISKPAGE durchführen.
- eine Nitrocellulose-Membran und 6 Filterpapiere 3MM in den Maßen 5.5 cm x 8.5 cm (bei Mini-gel) ausschneiden
- das ungefärbte, zu blottende Proteingel 15 min in Towbin-Transferpuffer äquilibrieren
- Nitrocellulose-Membran 5 min in Towbin-Transferpuffer äquilibrieren
- die Filterpapiere in Towbin-Transferpuffer tränken
- folgendes Sandwich auf die untere Graphitplatte (Anode) einer „Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell“ schichten:
 - 3 Filterpapiere 3 MM (unten)
 - Nitrocellulose-Membran
 - Proteingel (ohne Sammelgel!)
 - 3 Filterpapiere 3 MM (oben)
- eventuelle Luftblasen sorgfältig aus den Sandwich herausrollern
- obere Platte (Kathode) auflegen, Kontakte befestigen
- 1 h bei 15 V transferieren
- Blot-Sandwich vorsichtig abbauen; die Membran darf nicht mit den Fingern angefasst werden!
- Nitrocellulose-Membran mit Ponceau-S-Lösung solange anfärben, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind (Überprüfung des Transfers)
- zwecks Dokumentation photographieren oder einscannen

- Nitrocellulose mit PBS-Puffer unter mehrfachem Pufferwechsel entfärben
- die Nitrocellulose-Membran kann so zur immunologischen Detektion eingesetzt werden

Immunologische Detektion geblotteter Proteine

Spezifische Proteine / Epitope werden auf der Nitrocellulose-Membran durch ein indirektes immunologisches Verfahren nachgewiesen. Zunächst bindet der unmarkierte Primärantikörper (→ D.5.1) an das gesuchte Antigen. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wiederum wird im zweiten Schritt von einem Sekundärantikörper (→ C.6) erkannt, der den Primärantikörper der verwendeten Spezies erkennt (z.B. Kaninchen IgG). Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert. Dies erlaubt die Sichtbarmachung der Bindestellen des Sekundärantikörpers mittels Inkubation mit dem Phosphatase-Substrat X-Phosphat / NBT, dessen Umsetzung in einen sichtbaren Farbkomplex katalysiert wird. Auf diese Weise werden Antigene, an die der Primärantikörper auf der Membran gebunden hat, nachgewiesen.

- alle Inkubationen und Waschschrte erfolgen bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und bei Antikörper-haltigen Lösungen in Folie eingeschweißt
- Nitrocellulose-Membran 1 h in 20 ml 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Puffer inkubieren; so werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert
- 3 ml PBS-Puffer mit 0.3 % (w/v) Magermilchpulver mischen
- 2 µg Primärantikörper/ml Puffer bzw. eine adäquate Verdünnung (1:1000 bis 1:5000) des Primärantikörpers mit diesem Puffer mischen
- Membran 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C mit Primärantikörper-Mix inkubieren
- 3 x 15 min in PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- Membran 1 h mit Anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat (Promega), 1:7500 Verdünnung in 3 ml PBS + 0.3 % (w/v) Magermilchpulver + 0.05 % (v/v) Tween-20, inkubieren
- 3 x 15 min in PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- 2 x 5 min in AP-Puffer äquilibrieren
- in 10 ml Entwickler-Lösung inkubieren bis die Banden deutlich sichtbar sind
- Reaktion durch Inkubation der Membran in Stoppuffer beenden
- zwecks Dokumentation einscannen und Membran bei -20 °C lagern.

Das ECL-Plus System

Falls der Nachweis über diese Methode sich als nicht sensitiv genug herausstellt, kann auf das ECL-Plus System von Amersham Pharmacia Biotech zurückgegriffen werden. Dieses Nachweis-System basiert auf der enzymatischen Erzeugung eines Acridinium-Esters, katalysiert durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase. Dieses Intermediat reagiert mit Peroxid, wobei es Energie in Form von intensiver Chemolumineszenz abgibt, die auf Autoradiographiefilm detektiert werden kann. In Kombination mit einer Verstärkung des an Antigene auf der Membran gebundenen Primärantikörpers durch ein Brückensystem aus Biotin und Streptavidin ist dieses System bis zu 30-mal sensitiver als die herkömmliche Detektion.

- alle Inkubationen und Waschschrte erfolgen bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und bei Antikörper-haltigen Lösungen in Folie eingeschweißt
- Nitrocellulose-Membran 1 h in TBS-Puffer + 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubieren; so werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert
- 3 ml TBS-Puffer mit 0.3 % (w/v) Magermilchpulver mischen
- 2 µg Primärantikörper/ml Puffer bzw. eine adäquate Verdünnung (1:1000 bis 1:5000) des Primärantikörpers mit diesem Puffer mischen
- Membran 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C mit Primärantikörper-Mix inkubieren
- 3 x 15 min in TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen

- Membran 1 h mit biotinyliertem Anti-Kaninchen IgG (Amersham Life Science), 1:2000 Verdünnung in 3 ml TBS + 0.3 % (w/v) Magermilchpulver + 0.05 % (v/v) Tween-20, inkubieren
- 3 x 15 min in TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- Membran 1 h mit Streptavidin-biotinylierte-Meerrettich-Peroxidase Konjugat, 1:500 Verdünnung in 3 ml TBS, inkubieren
- 3 x 15 min in TBS waschen
- die Detektionslösungen A und B auf Raumtemperatur erwärmen lassen
- Detektionslösungen A und B im Verhältnis 40:1 (z.B. 2 ml Lösung A + 50 µl Lösung B) mischen - das Endvolumen an benötigtem Detektionsreagenz beträgt 0.1 ml/cm²
- überschüssigen Waschpuffer von der Membran abfließen lassen und sie mit der Proteinseite nach oben auf eine saubere Unterlage legen
- Detektionsreagenz auf die Membran geben (ohne Schütteln) und 5 min inkubieren
- überschüssiges Detektionsreagenz mit Gewebetuch vorsichtig absaugen
- Membran auf ein Stück Frischhaltefolie legen, damit abdecken und eventuell eingeschlossene Luftblasen vorsichtig herausstreichen
- umschlossene Membran in eine Expositionskassette legen und in der Dunkelkammer mit Autoradiographiefilm abdecken
- die Expositionszeit wird je nach Stärke des Signals empirisch bestimmt (30 sec bis 15 min), da mehrere aufeinanderfolgende Expositionen möglich sind
- Film 2-3 min in Kodak-Entwickler LX24 eintauchen
- in Wasserbad gut abspülen
- 3 min in Terental Superfix Fixiererlösung tauchen
- Film gründlich wässern und zum Trocknen aufhängen

D.5.3.2 Dot Blot

Diese Methode ist zum schnellen Nachweis von Antigenen in Proteinlösungen bzw. zur Überprüfung, ob ein Antiserum Antikörper gegen ein spezifisches Antigen enthält, geeignet. Sie ist besonders dann von Nutzen, wenn es sich bei dem Antigen um ein kurzes Peptid handelt, denn dieses ließe sich durch seine geringe molekulare Masse in der SDS-DISKPAGE nur schwer darstellen.

- verschiedene Konzentrationen, z.B. von 10 bis 3000 ng eines Proteins oder Peptids in jeweils gleichem Volumen an Puffer auf eine Nitrocellulose-Membran tropfen
- alle weiteren Schritte laufen in Analogie zur immunologischen Detektion geblotteter Proteine beim Western Blot (→ D.5.3.1) ab

D.5.3.3 Slot Blot für Calmodulin-Bindungstest

Der Slot Blot unterscheidet sich vom Dot Blot eigentlich nur in der Hinsicht, dass durch die Verwendung einer Apparatur die Proteine einer Lösung gleichmäßiger und in vorgegebenen, begrenzten Bereichen auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Hierbei wird der „Bio-Dot[®] SF Microfiltration Apparatus“ von Bio-Rad verwendet. Da ein Slot Blot in dieser Arbeit nur für den Nachweis der Bindung von *V. faba* Calmodulin (VfCaM) an das Calmodulin-bindende Protein VfCaMBP1 Anwendung findet, wird an dieser Stelle auch die Vorgehensweise für diesen Bindungstest erläutert.

- jede Probe (Proteinlösung) im Eppendorfgefäß auf ein Endvolumen von 400 µl mit TBS auffüllen
- „Bio-Dot“-Apparatur gemäß Herstellerangaben inklusive Filterpapiere und Nitrocellulose-Membran zusammensetzen
- Vakuum anlegen und Proben gemäß Herstellerangaben auf die Membran übertragen

- waschen mit TBS
- Membran aus der Apparatur nehmen und mit Ponceau-S-Lösung solange anfärben, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind (Überprüfung des Transfers)
- zwecks Dokumentation fotografieren oder einscannen
- Protein-Streifen ausschneiden, damit nachfolgend mit einzelnen Streifen Bindungstest unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden können (in 8-Kanal-Transferplatten)
- Nitrocellulose-Streifen mit TBS-Puffer unter mehrfachem Pufferwechsel entfärben - in den folgenden Schritten bis zur Farbreaktion werden die einzelnen Streifen getrennt voneinander inkubiert. Der Ca^{2+} -haltige Puffer besteht aus TBS mit 50 mM MgCl_2 und 0.5 mM CaCl_2 , der EGTA-haltige aus TBS mit 2 mM EGTA.
- Blockierung unspezifischer Proteinbindstellen auf den Membranen durch 1 h Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in jeweiligem Puffer
- 3 x 10 min waschen mit jeweiligem Puffer + 0.05 % (v/v) Tween-20
- 2 h mit 2 ml VfCaMBP1 Δ N-Lösung (0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VfCaMBP1 Δ N in jeweiligem Puffer + 0.3 % (w/v) Magermilchpulver + 0.05 % (v/v) Tween-20) inkubieren - bei der Kontrolle, die mit einem Überschuss an VfCaM in der Lösung inkubiert werden soll, wird zusätzlich 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VfCaM zugegeben. Die VfCaMBP1 Δ N-freie Kontrolle enthält dementsprechend kein VfCaMBP1 Δ N in der Inkubationslösung
- 3 x 10 min waschen mit jeweiligem Puffer + 0.05 % (v/v) Tween-20
- Membranen 1½h mit aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörpern, 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 2 ml des jeweiligen Puffers + 0.3 % (w/v) Magermilchpulver, inkubieren
- 3 x 10 min waschen mit jeweiligem Puffer + 0.05 % (v/v) Tween-20
- Membranen 1½h mit 3 ml Anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat (Promega), 1:7500 Verdünnung in jeweiligem Puffer + 0.3 % (w/v) Magermilchpulver, inkubieren
- 3 x 10 min waschen mit jeweiligem Puffer + 0.05 % (v/v) Tween-20
- alle Streifen 2 x 5 min in AP-Puffer + 0.5 mM CaCl_2 äquilibrieren
- in je 2.5 ml Entwickler-Lösung + 0.5 mM CaCl_2 inkubieren bis die Banden sichtbar sind
- Reaktion durch Inkubation der Membranen in Stopppuffer beenden
- zwecks Dokumentation einscannen und Membranen bei -20 °C lagern

D.5.4 Immunologischer Tissue-Print

Beim immunologischen Tissue-Print werden die auf einem Longitudinalschnitt durch ein Wurzelknöllchen aus den angeschnittenen Zellen austretenden Proteine und andere lösliche Komponenten der Zelle auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Auf der Membran liegt somit dann ein räumliches Abbild der Proteinverteilung dieses Gewebeschnitts vor. In Analogie zur immunologischen Detektion geblotteter Proteine können bestimmte Proteine unter Einsatz spezifischer Antikörper auf der Membran detektiert werden. Zur histologischen Charakterisierung wird der Gewebeschnitt mit Lugol'scher Lösung gefärbt (Stärkenachweis). Die photographische Dokumentation (→ D.6) erfolgt durch die Aufnahme von Schwarzweiß-Photos bzw. Diapositiven an einem Binokular des Typs Olympus SZ 40-PT.

D.5.4.1 Proteintransfer durch Tissue-Print

- Wurzelknöllchen (möglichst mit zugehörigem Wurzelanteil) mit gereinigter Rasierklinge in der Mitte durch einen Längsschnitt teilen
- von der Knöllchenhälfte durch einen zweiten Längsschnitt eine Gewebescheibe von 100 μm bis 500 μm Dicke abtrennen
- Gewebescheibe auf Filterpapier 3 MM legen und mit weiterem Filterpapier 3 MM leicht andrücken (Entfernung überschüssiger Flüssigkeit)

- Gewebeschnitt auf Nitrocellulosemembran transferieren und mit Hybond™-Schutzfolie abdecken
- Proteine durch mäßigen Fingerdruck auf den abgedeckten Gewebeschnitt für ca. 20 sec auf die Membran transferieren
- Gewebeschnitt bis zur histologischen Charakterisierung in Eisessig/Ethanol (1:1) im Eppendorfgefäß lagern
- Membran an der Luft trocknen

D.5.4.2 Immunologische Detektion transferierter Proteine

- Nitrocellulosemembran in 12 ml-PE-Röhrchen überführen
- 10 min mit 10 ml Waschlösung A rollern (z.B. im Hybridisierungssofen)
- 90 min mit 5 ml Blockingpuffer rollern
- 2 µg Primärantikörper/ml bzw. eine adäquate Verdünnung (1:1000 bis 1:5000) des Primärantikörpers in 5 ml Blockingpuffer ansetzen
- 1 h mit diesem Primärantikörper-Mix rollern
- 4 x 10 min mit Waschlösung A rollern
- 1 h mit Anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat (Promega), 1:7500 Verdünnung in 5 ml Blockingpuffer rollern
- 10 min mit 10 ml Waschlösung A rollern
- 2 x 15 min mit 10 ml Waschlösung B rollern
- 10 min mit 10 ml Waschlösung A rollern
- 10 min in 10 ml AP-Puffer (→ D.5.3.1) äquilibrieren
- Membran in einer Petrischale mit 10 ml Entwickler-Lösung inkubieren bis die Signale deutlich sichtbar sind
- Reaktion durch Inkubation der Membran in Stoppuffer (→ D.5.3.1) beenden
- Membran an der Luft trocknen
- photographische Dokumentation

D.5.4.3 Histologische Charakterisierung des Gewebeschnitts

- den in Eisessig/Ethanol (1:1) gelagerten Gewebeschnitt über eine abfallende Ethanolreihe von 100 % (v/v) EtOH in 10 % Schritten in Millipore überführen
- 30 sec bis 2 min in Lugol'scher Lösung färben
- Gewebeschnitt in Millipore aufklaren
- photographische Dokumentation

D.5.5 Immuncytochemie

Die Lokalisierung von Proteinen auf subzellulärer Ebene erfolgt mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM). Bei der TEM müssen die zu untersuchenden Objekte sehr dünn und stabil sein, da sie sonst vom Elektronenstrahl nicht durchdrungen würden und sie im Hochvakuum den energiereichen Elektronen standhalten müssen. Biologische Materialien mit ihrer überwiegend weichen Konsistenz und einem Wassergehalt von über 90 % müssen daher chemisch fixiert, entwässert, in Kunststoff eingebettet und ultradünn geschnitten werden. Für den immuncytochemischen Nachweis eines Makromoleküls im Dünnschnitt ist es ausschlaggebend, dass auch nach dieser Behandlung des Gewebes die gegen das Molekül gerichteten Antikörper spezifisch an das Makromolekül binden. Eine wesentliche Rolle spielt neben der strukturellen Erhaltung der antigenen Stellen, dass die erkannten Epitope auch sterisch zugänglich sind, das heißt von den Antikörpern erreicht werden können. Eine Lösung dieses Problems stellen unter anderem die polaren und wassermischbaren Einbettungsmedien auf der Basis von

Acrylharzen dar. Harze auf Acrylgrundlage erlauben wegen ihrer außerordentlich geringen Viskosität, die Infiltration des Gewebes bei niedrigen Temperaturen durchzuführen, was die Stabilität des biologischen Materials erhöhen soll. Außerdem eröffnen sie die Möglichkeit, auch die Polymerisation der Proben bei tiefen Temperaturen durchzuführen, weil die Polymerisation der Acrylmonomeren nicht nur thermisch, sondern auch radikalisch durch Bestrahlung mit langwelligem ultravioletten Licht (UV) ausgelöst werden kann.

Die mikroskopische Lokalisation eines Antigen-Antikörper-Komplexes in der TEM erfolgt unter Anwendung der Immunogold-Technik. Hierbei werden sekundäre Antikörper verwendet, an die kolloidales Gold gebunden ist. Kolloidale Goldpartikel lassen sich in definierter Größe herstellen und eignen sich aufgrund ihrer hohen Elektronendichte hervorragend als kontrastreiche Markierung für die Elektronenmikroskopie. Ein weiterer Vorteil von kolloidalem Gold als Markierung ist neben der hohen erreichbaren Auflösung im EM die Möglichkeit, die gleiche Markierung für die Detektion von Antigen-Antikörper-Komplexen auf Semi-Dünnschnitten in der Lichtmikroskopie einzusetzen. Bei sehr dichter Markierung ist die Goldfärbung schon an der roten Farbe des Goldkolloids zu erkennen, in der Regel muss sie jedoch durch einen photochemischen Entwicklungsschritt verstärkt werden. Dieser Silberverstärkung genannte Prozess beruht auf der katalytischen Abscheidung von metallischem Silber an der Oberfläche der Goldpartikel. Die Färbung ist kontrastreich braun bis schwarz, bleicht nicht aus und ist lichtmikroskopisch im Hell- und Dunkelfeld sowie im Phasenkontrast darstellbar.

Die licht- und elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden gemäß Protokollen der Dissertation von D. Kapp (1996) durchgeführt. Mit dem Verweis auf die dort zu findenden detaillierten Protokolle werden diese immunocytochemischen Methoden hier nur in stark gekürzter Form dargestellt.

D.5.5.1 Einbetten in Acrylharz

- Wurzelknöllchen (möglichst mit zugehörigem Wurzelanteil) mit gereinigter Rasierklinge in der Mitte durch einen Längsschnitt teilen
- von der Knöllchenhälfte durch einen zweiten Längsschnitt eine Gewebescheibe von 100 µm bis 500 µm Dicke abtrennen
- Gewebescheiben für 2 h bei 4 °C in Fixierlösung inkubieren
- 1 h in Waschpuffer waschen
- in einer aufsteigenden Ethanolreihe (15 % bis 100 %) auf Eis entwässern
- Gewebescheiben einzeln bei 4 °C in LR-White Acrylharz einbetten
- Polymerisation durch Bestrahlung mit UV-Licht ü.N. bei 4 °C

D.5.5.2 Ultra-Dünnschnitte und subzelluläre Lokalisation am TEM

- am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser Ultra-Dünnschnitte (70-100 nm) machen
- Schnitte auf Parlodion-befilmte, Kohle-bedampfte (Nickel)-Netzchen (300 Maschen) aufnehmen
- bei 40°C im Trockenschrank für mindestens 2 h trocknen
- Netzchen mit Schnitten 15 min in Blockingpuffer I inkubieren (Blockieren freier Aldehydgruppen)
- 2 x 1 min mit Inkubationspuffer waschen
- 30 min in Blockingpuffer II inkubieren
- 16 h bei 4 °C mit Primäntikörper (z.B. 12 µg/4ml aufgereinigter Antikörper oder adäquate Menge an Präimmenserum) in 40 µl Inkubationspuffer inkubieren
- 6 x 5 min mit Inkubationspuffer waschen

- 2 h bei RT mit Immunogold-konjugiertem Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege (15 nm kolloidales Gold bei VfENOD18 und VfNOD28/32, 12 nm bei VfNOD32) 1:30 Verdünnung in 30 µl Inkubationspuffer inkubieren
- 4 x 5 min mit PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- 4 x 5 min mit sterilem Millipore waschen
- 20 min in 2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS inkubieren (chemische Fixierung des gebundenen kolloidalen Gold)
- 2 x 1 min mit PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- 3 x 1 min mit sterilem Millipore waschen
- Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Reynold's Bleicitrat
- Untersuchung und Dokumentation der Schnitte am Zeiss EM109 Transmissions-Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 50 kV

D.5.5.3 Semi-Dünnschnitte und zelluläre Lokalisation am Lichtmikroskop

- am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser Semi-Dünnschnitte (1 µm) machen
- Schnitte auf Gelatine-beschichtete SuperFrost-Plus Objektträger überführen und antrocknen lassen
- in diesem Stadium kann zur histologischen Charakterisierung eines Schnitts auch eine Färbung mit alkalischer Toluidinblau 0-Lösung durchgeführt werden
- 3 h mit Blockingpuffer II inkubieren (dieser und weitere Schritte erfolgen auf dem Schüttler)
- 12 h bei 4 °C mit Primärantikörper (z.B. 1.2 µg/ml aufgereinigter Antikörper oder adäquate Menge an Präimmunserum) in 100 µl Inkubationspuffer inkubieren
- 6 x 10 min mit PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- 2 h mit Immunogold-konjugiertem Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege (1 nm kolloidales Gold) 1:100 Verdünnung in 75 µl Inkubationspuffer inkubieren
- 4 x 10 min mit PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20 waschen
- Silberverstärkung mit dem Kit R-Gent SE-EM nach Herstellerangaben durchführen
- Auswertung und photographische Dokumentation am Zeiss Axiophot Mikroskop

D.6 Photographische Dokumentation

Die histologische Untersuchung von Gewebeschnitten sowie die Auswertung der immunologischen Tissue-Prints werden am Binokular (Olympus SZ 40-PT) vorgenommen. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt bei den Gewebeschnitten durch Diapositive und bei den Tissue-Prints mittels Schwarzweiß-Photos. Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen an longitudinalen Semi-Dünnschnitten am Zeiss Axiophot werden ebenfalls auf Schwarzweiß-Negativfilmen dokumentiert. Die Schwarzweiß-Negativfilme des Typs Ilford PAN F (25 ASA) werden wie folgt entwickelt:

- Film in der Dunkelkammer bei völliger Dunkelheit auf eine Spule wickeln
- in passender Photodose lichtdicht verschließen
- Entwickler (Perceptol) 1:2 mit H₂O (20 °C) verdünnen
- verdünnten Entwickler in die Photodose geben und diese 1 min kontinuierlich invertieren
- 14 min alle 30 sec 4-mal invertieren
- Entwickler entsorgen und Photodose 1 min unter Invertieren mit H₂O (20 °C) ausspülen
- Fixierer (20 °C) in Photodose füllen und 2-3 min alle 30 sec invertieren
- Film so lange fixieren bis er klar ist
- danach 10 min unter fließendem H₂O waschen, 2 min mit Mirasol (1:400 in H₂O) spülen und an der Luft trocknen lassen

D.7 Computeranalysen

D.7.1 Auswahl von Oligonukleotiden

Geeignete Primer für die PCR-Reaktionen (→ D.3.3.1) wurden mit Hilfe des Programms Oligo V4.0 (Rychlik und Rhoads, 1989) ausgewählt.

D.7.2 Analyse von DNA-Sequenzen

Nukleinsäure-Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm CLUSTALW V1.8 (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt und mit BOXSHADE V3.2 graphisch aufgearbeitet. Sequenzvergleiche mit der aktuellen GenBank Datenbank erfolgten mit Hilfe der BLASTN, BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) und PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) Algorithmen. Für das Erstellen von Plasmid- und Restriktionskarten, die Simulation von Klonierungsschritten und die Übersetzung von Nukleinsäuresequenzen in Aminosäuresequenzen waren Programmteile des Clone Manager V5.03 (Scientific and Educational Software) hilfreich.

D.7.3 Analyse von Aminosäuresequenzen

Analysen zur theoretischen molekularen Masse und zur Antigenität von Proteinen sowie Darstellungen von Proteinabschnitten als Helikales Rad erfolgten mit Programmteilen von ANTHEPROT V4.6 (Geourjon und Deleage, 1995). Das Programm PROSITE-Profiles (Gribskov *et al.*, 1987) wurde zur Suche von spezifischen Mustern in Aminosäuresequenzen wie z.B. Mustern für potentielle Phosphorylierungsstellen oder Kernlokalisationssequenzen genutzt. Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen auf Basis von multiplen Alignments erfolgte mit dem Jpred2 Programm (Cuff *et al.*, 1998). Berechnungen und Analysen sowie Darstellungen von tertiären Proteinstrukturen wurden mit Hilfe der Programme SWISS-MODEL V3.5 und Swiss-PdbViewer V3.7 durchgeführt (Guex und Peitsch, 1997).

E. ERGEBNISSE

Die in dieser Arbeit für die untersuchten Symbiose-relevanten Transkripte der Ackerbohne auf Proteinebene erzielten Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt. Hierbei wird zunächst auf die Knöllchen-spezifisch exprimierte Noduline VfENOD18, VfNOD28/32 und VfNOD32 eingegangen. Im Anschluss werden die Ergebnisse zu dem Mykorrhiza-/Knöllchen-spezifischen Transkript VfLb29 und dem Mykorrhiza-amplifiziert exprimierten Transkript VfCaMBP1 präsentiert.

E.1 Das Nodulin VfENOD18

Die bisherigen intensiven Studien zum frühen Nodulin VfENOD18 auf genomischer Ebene und auf Transkript-Ebene (siehe B.4.1) hatten keine Hinweise auf die Funktion dieses Nodulins erbracht. Daher war bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durch die Gewinnung polyklonaler Antikörper unter Einsatz von rekombinantem VfENOD18-Protein die Voraussetzung für eine Lokalisation und Funktionsanalyse dieses Nodulins geschaffen worden.

E.1.1 Nebenaktivitäten des VfENOD18-Antiserums erforderten seine Aufreinigung an rekombinantem MBP-VfENOD18 Fusionsprotein

Erste Versuche, VfENOD18 auf subzellulärer Ebene mittels Elektronenmikroskopie unter Einsatz des VfENOD18-Antiserums auf Ultra-Dünnschnitten von *Vicia faba* Wurzelknöllchen zu lokalisieren (U. Kahmann, Universität Bielefeld), waren nicht auswertbar, da auch das als Kontrolle eingesetzte Präimmenserum zu Goldmarkierungen auf den Proben führte. Dieses legte die Vermutung nahe, dass ähnliche, auf den mit VfENOD18-Antiserum inkubierten Proben auftretende Signale nicht von der Detektion des VfENOD18-Antigens herrührten. In den im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführten Western Blots unter Einsatz des VfENOD18-Antiserums in Knöllchenextrakten der Ackerbohne wurde lediglich ein Protein mit einer molekularen Masse von ca. 18 kD detektiert. Daher war es wahrscheinlich, dass das VfENOD18-Antiserum auf den Ultra-Dünnschnitten außer dem VfENOD18-Protein auch andere Strukturen erkannte, die sich einer Detektion im Western Blot entzogen.

Eine Affinitäts-Chromatographie sorgte für die Abtrennung der gegen VfENOD18 gerichteten Antikörper vom übrigen Serum. Hierzu wurde das rekombinante Fusionsprotein MBP-VfENOD18 (Becker, 1996) in *Escherichia coli* exprimiert und an Amylose-Harz aufgereinigt. Bei der nachfolgenden Immobilisierung des Fusionsproteins an Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose 4B banden von den eingesetzten 3.7 mg des Fusionsproteins 2.9 mg an die aktivierte Matrix. Bei der affinitäts-chromatographischen Aufreinigung des VfENOD18-Antiserums an dieser MBP-VfENOD18-Matrix konnte eine VfENOD18-spezifische IgG-Fraktion eluiert werden, deren Proteinmenge ca. 1.5 % der eingesetzten Menge an IgG entsprach. Dieser

Prozentsatz entspricht durchaus dem Wert, den man als Anteil an spezifischen Antikörpern in einem polyklonalen Antiserum erwarten darf. Die erhaltenen aufgereinigten VfENOD18-Antikörper wurden im Folgenden in allen Western Blots und Lokalisierungen eingesetzt.

E.1.2 VfENOD18-Antikörper detektieren immunreaktive Proteine in Knöllchenextrakten verschiedener Leguminosen mit indeterminierten Knöllchen, aber auch in nicht-symbiontischen Geweben von *Glycine max* und in Geweben von *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays*

Um die Verbreitung potentieller VfENOD18-homologer Proteine in anderen Leguminosen als der Ackerbohne zu untersuchen, wurden die VfENOD18-Antikörper in Western Blots mit Gesamtproteinextrakten aus Knöllchen, sterilen Wurzeln, Sprossen und Blättern verschiedener Leguminosen mit indeterminierten und determinierten Knöllchen eingesetzt. In Gesamtproteinextrakten aus *V. faba* Geweben wurde ein Protein von 18 kD, was der erwarteten molekularen Masse von VfENOD18 entspricht, ausschließlich im Knöllchenextrakt nachgewiesen (Abbildungen E.1 und E.2).

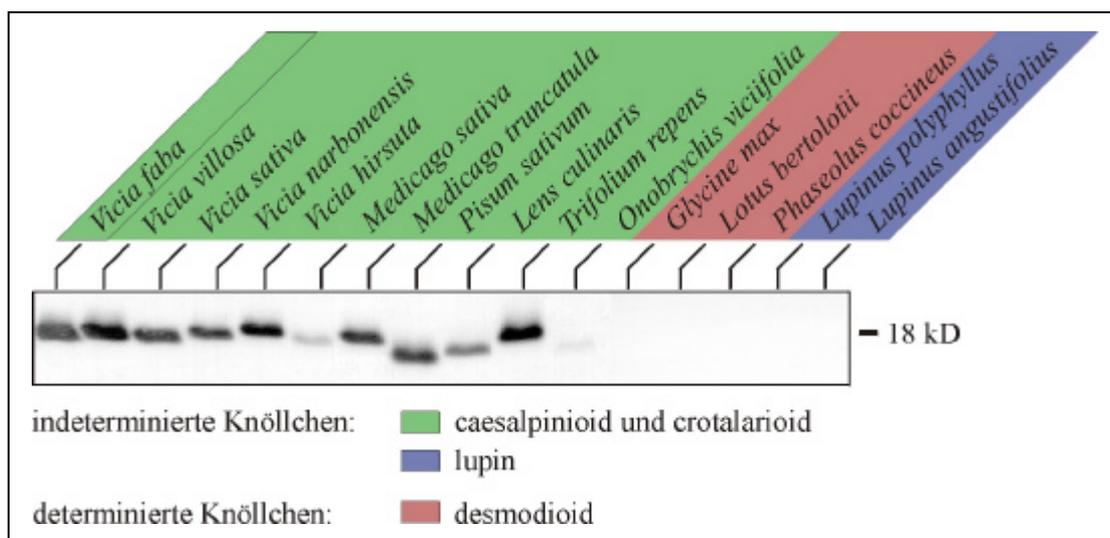


Abbildung E.1: Immunologische Detektion VfENOD18-immunoreaktiver Proteine in Knöllchenextrakten verschiedener Leguminosen.

Je 10 µg Knöllchen-Gesamtproteinextrakt von Leguminosen mit Knöllchen von indeterminierter (caesalpinioide, crotalarioide und lupiner) und determinierter (desmodioide) Form wurden in Western Blots mit VfENOD18-Antikörpern eingesetzt. Die jeweilige Leguminosenart ist über den Gelspuren angegeben. Die Position des immunreaktiven 18 kD-Proteins im *V. faba* Knöllchenextrakt ist angezeigt.

Außerdem zeigten die Untersuchungen ein Knöllchen-spezifisches Vorkommen VfENOD18-immunoreaktiver Proteine für alle getesteten Leguminosen, die indeterminierte Knöllchen mit langgezogener (caesalpinioide) oder fächerartiger (crotalarioide) Form bilden (Corby, 1988), (Abbildung E.1). Die getesteten Leguminosen mit diesem Expressionsmuster gehören zu den Triben Viciae, Trifolieae und Hedysareae (letzterer nur *Onobrychis viciifolia*), (Sanderson und Wojciechowski, 1996). Die detektierten Proteine waren von ähnlicher molekularer Masse

wie VfENOD18, wohingegen die Intensität der Signale unterschiedlich war, obwohl gleichwertige Proteinmengen geladen worden waren (Abbildung E.1). Diese Unterschiede können sowohl durch niedrigere Expressionsraten als auch durch Abweichungen in der Aminosäuresequenz der detektierten Proteine erklärt werden.

Western Blots mit Gewebe-Extrakten von Leguminosen, die Knöllchen mit großer, runder (desmodioider) Form bilden oder von *Lupinus* mit ihrer indeterminierten, aber einzigartigen lupinoiden Knöllchenform, erbrachten andere Ergebnisse. In Extrakten von *Lotus bertolotii*, *Phaseolus coccineus*, *Lupinus polyphyllus* und *Lupinus angustifolius* konnten mit den VfENOD18-Antikörpern keine immunoreaktiven Proteine detektiert werden (Knöllchenextrakte siehe Abbildung E.1), wohingegen in *Glycine max* ein VfENOD18-immunoreaktives Protein mit einer molekularen Masse von etwa 20 kD in Extrakten der Wurzel, der Blätter und des Sprosses, aber nicht in Knöllchenextrakten nachgewiesen wurde (Abbildung E.2).

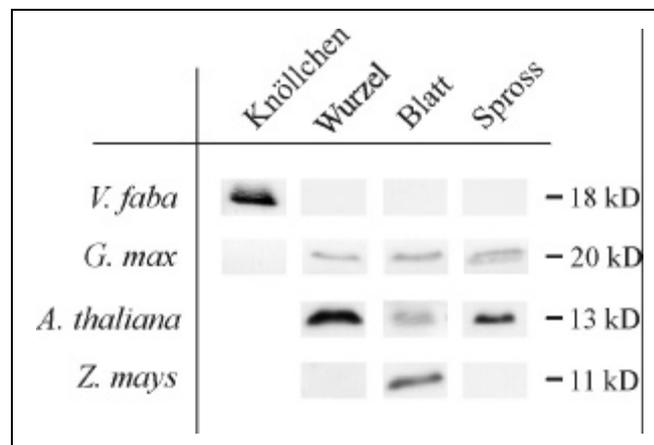


Abbildung E.2: Vergleich der immunologischen Detektion VfENOD18-immunoreaktiver Proteine in Gewebe-Extrakten von Leguminosen und Nicht-Leguminosen.

Je 10 µg des jeweiligen Gewebe-Extrakts der Leguminosen *Vicia faba* und *Glycine max* und der Nicht-Leguminosen *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* wurden in Western Blots mit VfENOD18-Antikörpern eingesetzt. Das getestete Gewebe ist über den Gelspuren angegeben. Die anhand der Laufstrecke in der SDS-DISKPAGE errechnete theoretische molekulare Masse der jeweiligen detektierten Proteine ist angegeben.

Die Identifikation stark homologer hypothetischer Proteine, abgeleitet von ESTs aus *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* (Hohnjec *et al.*, 2000), warf die Frage auf, ob Proteine vom Typ ENOD18 in Gewebe-Extrakten dieser Nicht-Leguminosen detektiert werden können. In Western Blots mit Gesamtproteinextrakten aus *A. thaliana* Geweben wurden immunoreaktive Proteine mit einer molekularen Masse von etwa 13 kD in der Wurzel, dem Spross und den Blättern nachgewiesen. In Gewebe-Extrakten der Monokotyledone *Z. mays* jedoch konnte ein Protein mit einer molekularen Masse von ca. 11 kD ausschließlich in den Blättern gezeigt werden (Abbildung E.2).

E.1.3 Mittels Immunogoldmarkierung wurde das Nodulin VfENOD18 im Cytoplasma infizierter Zellen der Stickstoff fixierenden Zone von Ackerbohnenknöllchen lokalisiert

Unter Verwendung der aufgereinigten Antikörper wurde VfENOD18 lichtmikroskopisch in longitudinalen Semi-Dünnschnitten von Ackerbohnenknöllchen lokalisiert. Nach Immunogoldmarkierung und Silberverstärkung zeigten ausschließlich die Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III (Vasse *et al.*, 1990) eine hohe Markierungsdichte (Abbildung E.3a). Die Kontrolle mit Präimmunserum hingegen zeigte keine Signale (Abbildung E.3b). Die Kontrolle mit Präimmunserum hingegen zeigte keine Signale (Abbildung E.3b).

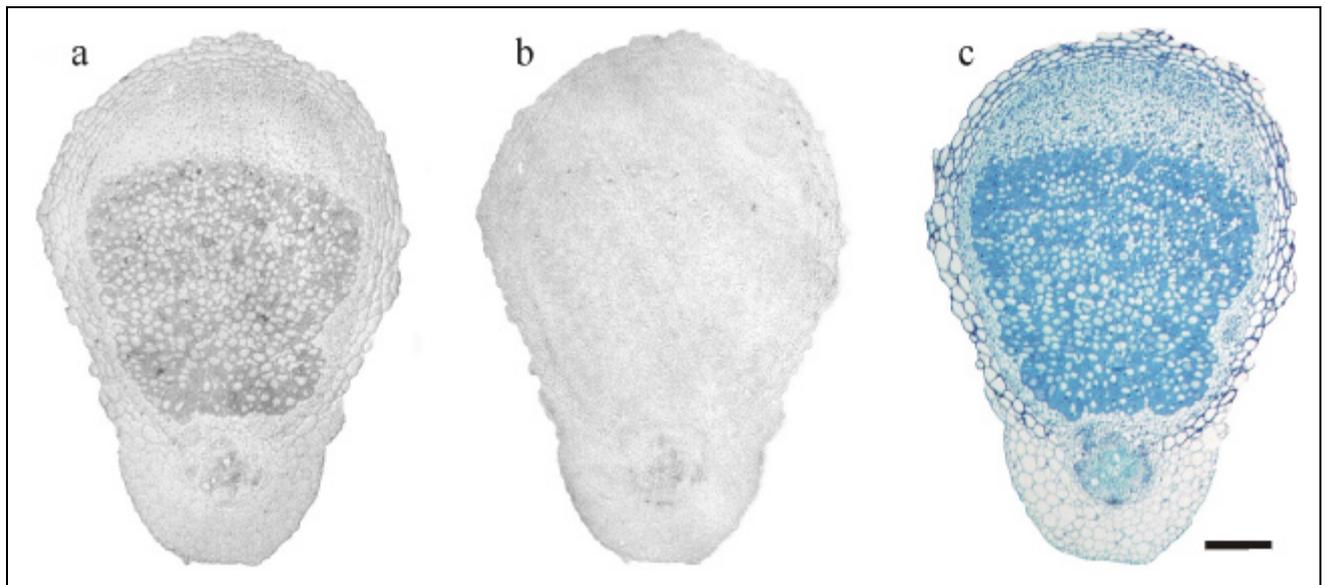


Abbildung E.3: Lichtmikroskopische Lokalisation von VfENOD18 in *V. faba* Knöllchen.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen silberverstärkte Immunogoldmarkierungen auf longitudinalen Semi-Dünnschnitten von Ackerbohnenknöllchen. Die Schnitte wurden mit VfENOD18-Antikörpern (a) oder Präimmunserum (b) inkubiert. Zum Vergleich sind in (c) die histologischen Strukturen des verwendeten Knöllchens durch eine Färbung mit Toluidinblau 0 hervorgehoben (siehe auch Abbildung B.2). Der Balken entspricht 400 µm.

Mittels Elektronenmikroskopie von immunogoldmarkierten longitudinalen Ultra-Dünnschnitten war es möglich, VfENOD18 auf subzellulärer Ebene zu lokalisieren. Kolloidale Goldpartikel wurden hierbei im Cytoplasma infizierter Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III nachgewiesen (Abbildung E.4a). Gelegentlich im Cytosol der angeschnittenen Bakterioide vorkommende Goldpartikel sind vermutlich als unspezifischer Hintergrund anzusehen, da eine solche unspezifische Bindung von IgGs im Cytosol von Bakteroiden auch von anderen Studien her bekannt ist (Fedorova *et al.*, 1999). Alle anderen Gewebe der untersuchten Knöllchen, wie auch die angeschnittenen Wurzelgewebe zeigten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Untersuchungen keine signifikanten Markierungen durch Goldpartikel. Die Kontrolle mit Präimmunserum war in allen Geweben frei von signifikanten Immunogoldmarkierungen (Abbildung E.4b).

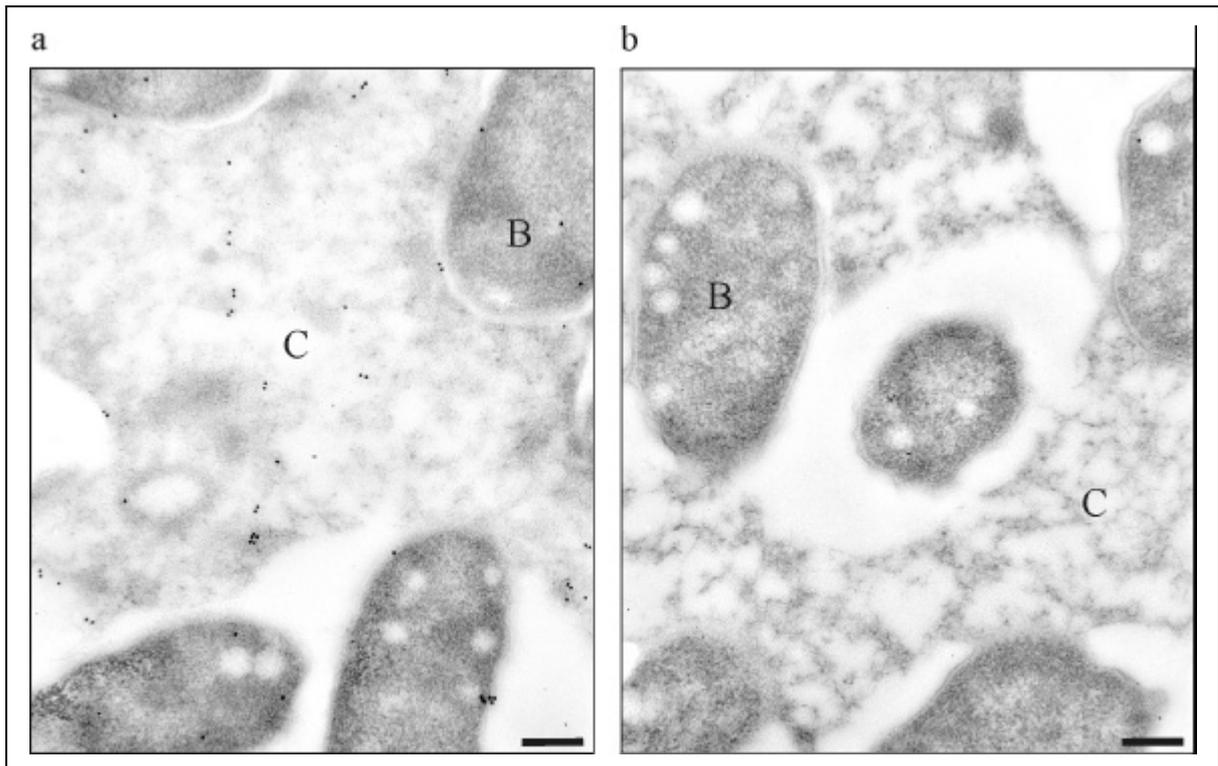


Abbildung E.4: Elektronenmikroskopische Lokalisation von VfENOD18 in *V. faba* Knöllchen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Immunogoldmarkierungen auf longitudinalen Ultra-Dünnschnitten von Ackerbohnenknöllchen. (a) VfENOD18-spezifische Antikörper detektieren VfENOD18 im Cytoplasma infizierter Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III. (b) Mit Präimmenserum inkubierte Schnitte weisen keine Immunogoldmarkierungen auf. Der Balken entspricht 200 nm. Abkürzungen: C, Cytoplasma; B, Bakteroid.

E.1.4 Die VfENOD18-Sequenz ist homolog zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher ESTs und zum ATP-bindenden Protein Mj0577 aus *Methanococcus jannaschii*

In Homologievergleichen mit aktuellen Datenbanken zeigte die abgeleitete VfENOD18-Aminosäuresequenz starke Homologien zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen mehrerer „expressed sequence tags“ (ESTs) sowohl aus Dikotyledonen, wie zum Beispiel *A. thaliana*, als auch aus Monokotyledonen, wie zum Beispiel *Z. mays*. Eine Auflistung einer Auswahl dieser ESTs zusammen mit einigen Zusatzdaten, wie zum Beispiel theoretischen molekularen Massen der abgeleiteten Proteine und Ursprungsgewebe der cDNA-Sequenzen, gibt Tabelle E.5. Es sollte beachtet werden, dass in fast allen hier aufgelisteten Pflanzenarten mehr als ein VfENOD18-homologes Transkript identifiziert wurde, was darauf hinweist, dass die korrespondierenden Gene Mitglieder von Genfamilien sind.

Das Nodulin VfENOD18 zeigt auch signifikante Homologien zu einer Reihe von bakteriellen Proteinen, unter anderem zu Mitgliedern der als „Mj0577 Superfamilie“ bezeichneten Proteinfamilie (Zarembinski *et al.*, 1998). Die genaue biologische Funktion dieser bakteriellen, wie auch der pflanzlichen abgeleiteten VfENOD18-homologen Proteinsequenzen ist bisher unbekannt.

Latein. Name	Trivialname	Genbank-Nr.	Ursprung der cDNA	AS	kD
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ackerschmalwand	At_T42446	Gesamtgewebe	160	17.8
<i>Zea mays</i>	Mais	Zm_T18265	membranfreie Polysomen des Endosperms	164	17.8
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	Le_AI773178	Blätter	154 ^(u)	17.3 ^(u)
<i>Gossypium hirsutum</i>	Baumwolle	Gh_AI731011	unreife Baumwollfaser	159 ^(u)	17.5 ^(u)
<i>Glycine max</i>	Sojabohne	Gm_AI900735	2-3 wöchige Sämlinge	164	18.4
<i>Medicago truncatula</i>	Luzerne	Mt_AJ388842	Wurzelknöllchen	165 ^(u, k)	18.1 ^(u, k)

Tabelle E.5: Eine Auswahl pflanzlicher ESTs mit Homologien zu VfENOD18.

Eine Auflistung einiger ESTs, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zur VfENOD18-Aminosäuresequenz aufweisen, ist mit zusätzlichen Daten, zum Beispiel zum Ursprungsgewebe der cDNAs, gezeigt. Abkürzungen: (u) Unvollständige Aminosäuresequenzen, die somit theoretisch auch eine höhere molekulare Masse haben sollten; (k) bei der Ableitung der Aminosäuresequenz des Klons Mt_AJ388842 wurden zwei offensichtliche Leserasterverschiebungen korrigiert.

Die kürzlich aufgeklärte Röntgen-Kristallstruktur des für die „Mj0577 Superfamilie“ namensgebenden *Methanococcus jannaschii* Proteins Mj0577 gab jedoch einen ersten Hinweis. Das als Homodimer kristallisierte Mj0577-Protein hat pro Monomer ein Molekül ATP gebunden (Zarembinski *et al.*, 1998). Der multiple Sequenzvergleich in Abbildung E.6 zeigt, dass die meisten an der Bindung von ATP und der Dimerisierung von Mj0577 beteiligten Aminosäurereste in VfENOD18 und seinen pflanzlichen homologen Proteinen konserviert sind. Aminosäurereste, die in der „Mj0577 Superfamilie“ konserviert sind und im Mj0577-Protein an der ATP-Bindung und der Dimerisierung beteiligt sind, sind umrahmt.

Es muss betont werden, dass nicht nur die bloßen Aminosäuresequenzen in diesen an der ATP-Bindung beteiligten Abschnitten der Mj0577-Sequenz ein hohes Maß an Homologie mit den pflanzlichen Sequenzen aufweisen, sondern dass auch die Vorhersage der Sekundärstruktur für VfENOD18 und seine pflanzlichen Homologe, wie sie das Jpred2 Programm auf Basis des multiplen Sequenzvergleichs berechnen kann, in weiten Bereichen mit der für das Mj0577-Protein von seiner Kristallstruktur abgeleiteten Sekundärstruktur übereinstimmt (Abbildung E.6).

Eine phylogenetische Klassifizierung von hypothetischen Proteinen, deren Kodierbereiche in vollständig sequenzierten Genomen identifiziert wurden (Tatusov *et al.*, 2000; Tatusov *et al.*, 1997), führte zur Klassifizierung von Mj0577 als Mitglied des COG 0589 (cluster of orthologous groups of proteins 0589), der das „universal stress protein UspA“ und verwandte Nukleotid-bindende Proteine umfasst. VfENOD18 zeigt Homologien zu einigen eubakteriellen und Archaea-Proteinen, die zum COG 0589 gezählt werden, aber mit der stärksten Homologie zum *M. jannaschii* Protein Mj0577.

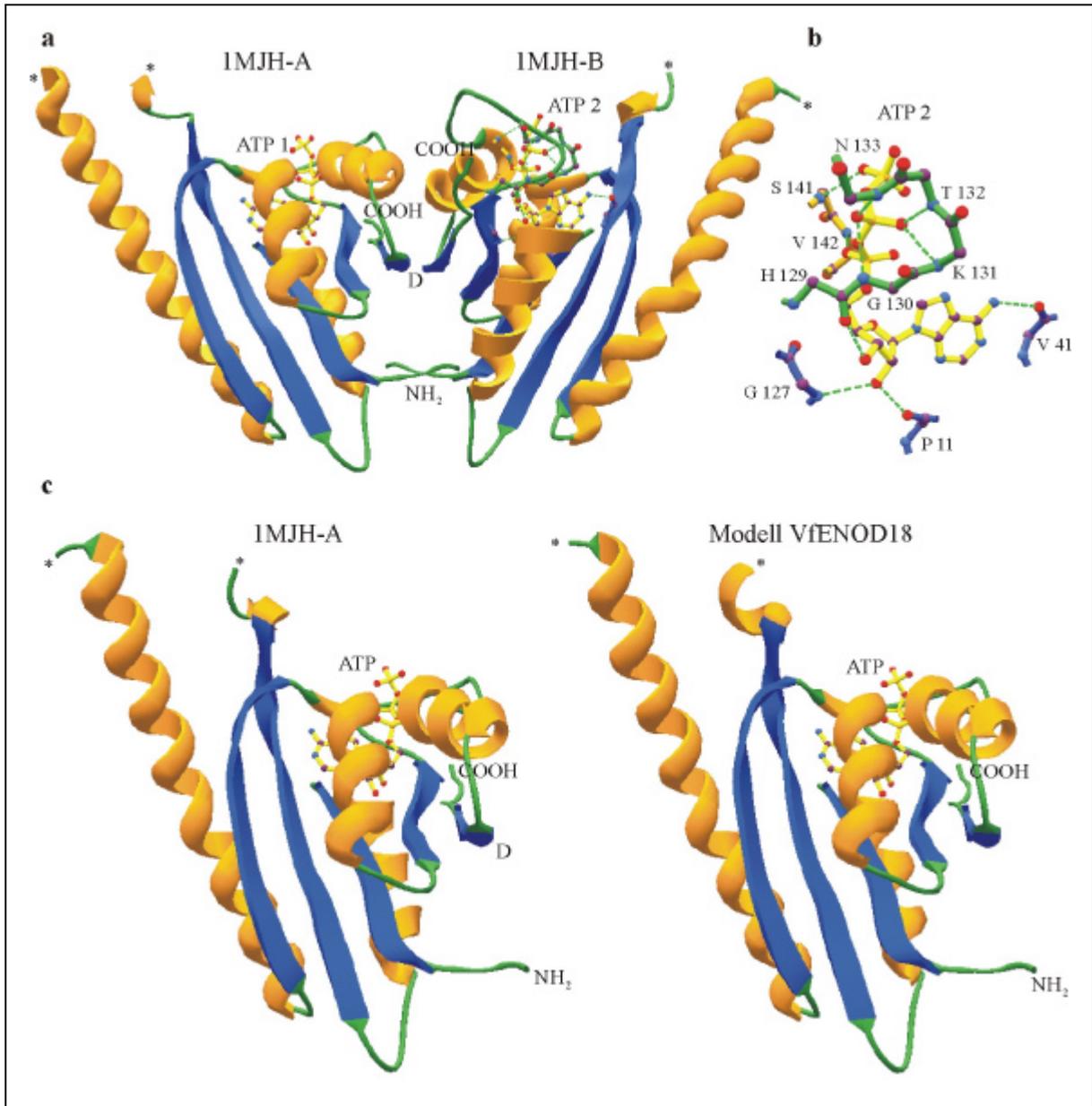


Abbildung E.7: Ribbon-Graphiken für die Tertiärstruktur des Mj0577-Homodimers und die errechnete Modellstruktur des VfENOD18-Proteins.

Dargestellt sind sogenannte Ribbon-Graphiken, wie sie auf der Basis der Röntgenstrukturdaten für das Protein Mj0577 errechnet werden können. Die für das VfENOD18-Protein durch Überlagerung auf die Mj0577-Struktur errechnete Modellstruktur ist in gleicher Weise gezeigt. Bild (a) zeigt das Mj0577-Homodimer mit seinen zwei gebundenen Molekülen ATP. Die Dimer-Schnittstelle sowie die N- und C-Termini der Monomere 1MJH-A und 1MJH-B sind angegeben. Sterne markieren jeweils Beginn und Ende einer Schleife im Protein, für den die Elektronendichte unzureichend für eine Berechnung war (AS 49 bis 65 - vergleiche Alignment E.6). Für das ATP2-Molekül sind wesentliche Wasserstoffbrückenbindungen mit den dazugehörigen Aminosäureresten vereinfacht eingezeichnet. Dieser Bereich ist in (b) nebst Bezeichnung der Aminosäurereste vergrößert dargestellt. In (c) sind das Monomer 1MJH-A und das VfENOD18-Modell jeweils mit einem gebundenen Molekül ATP gezeigt. Abkürzungen: COOH, C-Terminus; NH₂, N-Terminus, D; Dimerisierungsschnittstelle.

Farbcode Struktur: orange, α -Helix; blau, β -Strang; grün, unregelmäßige Bereiche; gelb, ATP; grüngestrichelt, Wasserstoffbrückenbindungen.

Farbcode Atome: pink, Kohlenstoff; blau, Stickstoff; orange, Phosphor; rot, Sauerstoff.

In der Kristallstruktur bildet jedes Mj0577-Monomer ein offen-verdrehtes, fünf-strängiges paralleles β -Faltblatt mit zwei α -Helices an jeder Seite des Faltblattes aus (Zarembinski *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurden im Kristall über antiparallele Wasserstoffbrückenbindungen der hochkonservierten Aminosäuren 153 bis 158 Homodimere gebildet. Auf Basis der Röntgenstrukturdaten für Mj0577 (PDB-Code: 1MJH) und des Alignments von VfENOD18 und Mj0577 konnte mit Hilfe des SWISS-MODEL Programms ein Vorschlag für die Tertiärstruktur des VfENOD18-Proteins berechnet werden. Die Abbildungen E.7a-c veranschaulichen die Tertiärstruktur des Mj0577-Homodimers mit den zwei gebundenen Molekülen ATP und die abgeleitete VfENOD18-Modellstruktur, wie sie durch die Überlagerung der VfENOD18-Aminosäuresequenz auf die Mj0577-Struktur vorhergesagt wurde. Der Vergleich der Tertiärstrukturen zeigt, dass die für VfENOD18 berechnete Struktur fast identisch ist mit der des Mj0577-Proteins.

E.1.5 Das Nodulin VfENOD18 ist ein ATP-bindendes Protein

Da die in Mj0577 an der Bindung von ATP beteiligten Aminosäurereste in VfENOD18 und seinen homologen Proteinen zum Großteil konserviert waren und die VfENOD18-Modellstruktur große Ähnlichkeit mit der Mj0577-Tertiärstruktur aufwies, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei VfENOD18 ebenfalls um ein ATP-bindendes Protein handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden ATP-Bindestudien unter Einsatz des Biotin-Photoaffinitäts-Analogons 8-Azidoadenosin 5'-triphosphat-biotin ($8N_3ATP[\gamma]biotin$) durchgeführt. Hierzu musste zunächst das Fusionsprotein MBP-VfENOD18 (Becker, 1996) in *E. coli* exprimiert werden, an Amylose-Harz affinitäts-chromatographisch aufgereinigt und mittels Faktor Xa Verdau in MBP und rekombinantes VfENOD18-Protein gespalten werden. Daraufhin wurde $8N_3ATP[\gamma]biotin$ mit den Produkten der Spaltung inkubiert, gefolgt von der Aktivierung der Azid-Gruppe des ATP-Analogons durch Bestrahlung mit UV-Licht, so dass bei erfolgter Bindung des Analogons an VfENOD18 eine kovalente Verknüpfung mit dem Protein erfolgen konnte. Eine Analyse des Protein-ATP-Gemisches mittels Western Blot mit Detektion durch an Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase in Verbindung mit einer Chemolumineszenz-Reaktion zeigte, dass das biotinylierte ATP an das rekombinante VfENOD18 gebunden worden war (Abbildung E.8, Spur 1). Dass es sich bei der signalgebenden Bande um das rekombinante VfENOD18 handelte, wurde durch eine erneute Inkubation der Blotting-Membran mit VfENOD18-Antikörpern bestätigt (Daten nicht gezeigt). In einem Verdrängungsexperiment zum Nachweis der Spezifität der Bindung wurde zusätzlich 100-fach nicht markiertes ATP zu den Ansätzen gegeben. Hierbei wurde das Signal auf Hintergrundstärke reduziert (Abbildung E.8, Spur 2). Bei der Kontrolle ohne Zugabe von markiertem oder unmarkiertem ATP zu dem Proteingemisch ergibt sich im Western Blot kein Signal (Abbildung E.8, Spur 3).

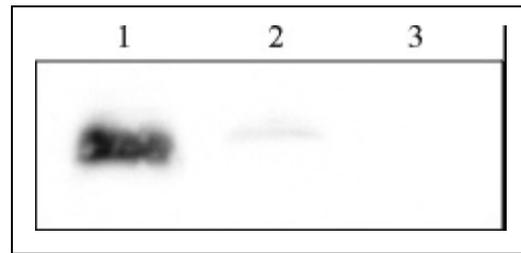


Abbildung E.8: Western Blot Analyse von rekombinantem VfENOD18 nach der Bindung des ATP-Analogons $8N_3ATP[\gamma]biotin$.

Rekombinantes VfENOD18 wurde mit dem ATP-Analagon $8N_3ATP[\gamma]biotin$ inkubiert, einer Bestrahlung mit UV-Licht ausgesetzt und mittels Western Blot analysiert (Spur 1). Im Verdrängungsexperiment mit einem 100-fachen Überschuss an unmarkiertem ATP ist das Signal auf Hintergrundstärke reduziert (Spur 2). Die Kontrolle ohne ATP zeigt kein Signal (Spur 3).

Identische Experimente wurden mit $8N_3GTP[\gamma]biotin$ als Photoprobe durchgeführt. Die detektierten Signale waren jedoch nicht stärker als der Hintergrund im Verdrängungsexperiment (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen lässt, dass rekombinantes VfENOD18 GTP nicht spezifisch binden kann.

Die nachgewiesene ATP-Bindefähigkeit von rekombinantem VfENOD18 zog die Frage nach sich, ob VfENOD18 das gebundene ATP auch hydrolysieren kann. Durch Hydrolyse freigesetztes anorganisches Phosphat kann mittels eines colorimetrischen Nachweisverfahrens bis in den nanomolaren Bereich detektiert werden. Es wurden sowohl über Affinitäts-Chromatographie und nachfolgende Gelfiltration aufgereinigtes Fusionsprotein MBP-VfENOD18 als auch dessen Spaltprodukte MBP und VfENOD18 mit ATP inkubiert. Weder verschiedene Temperaturen (22 °C, 30 °C und 37 °C), noch die Zugabe verschiedener divalenter Kationen (Mg^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+}), die eine wichtige Rolle als Kofaktoren spielen, resultierten in einer nennenswerten ATPase-Aktivität des Fusionsproteins oder des rekombinanten VfENOD18 (Daten nicht gezeigt).

E.1.6 Die mutmaßlich an der ATP-Bindung von VfENOD18 beteiligten C-terminalen Sequenzmotive sind in homologen Proteinen von *Lens culinaris*, *Vicia hirsuta*, *Vicia sativa* und *Vicia villosa* konserviert

Die Detektion von VfENOD18-immunoreaktiven Proteinen in Leguminosen mit indetermierten Knöllchen warf die Frage auf, in welchem Ausmaß die korrespondierenden Gene in diesen Leguminosen homolog zum VfENOD18-Gen sind. Hierbei waren insbesondere die Kodierbereiche für die C-terminalen Abschnitte der jeweiligen Genprodukte von Interesse, die für den Großteil der potentiellen ATP-Bindestelle kodieren sollten. Deshalb wurden PCR-Experimente mit genomischer DNA verschiedener Leguminosen durchgeführt, die Knöllchen von indeterminierter oder determinierter Form bilden. Die hierbei getesteten Arten waren mit den im Western Blot untersuchten identisch (siehe E.2). Für die PCR-Experimente wurden die degenerativen Primer ENOD18-A und ENOD18-B verwendet, die in DNA-Bereichen binden

sollten, die für die in Abbildung E.6 mit Pfeilen markierte VfENOD18-Aminosäuresequenz kodieren. Das mögliche Amplifikationsprodukt enthält das letzte Intron des VfENOD18-Gens (Hohnjec *et al.*, 2000; Genbank AJ277286). Die PCR-Reaktionen und die Klonierung der Produkte in Sequenziervektoren wurden von L. Moreira (Universität Bielefeld) durchgeführt, die Sequenzierungen der Inserts durch das IIT (Institut für Innovationstransfer, Universität Bielefeld). Auf diese Weise konnten neben der bereits bekannten VfENOD18-Sequenz genomische Sequenzen von *Lens culinaris*, *Vicia hirsuta*, *Vicia sativa* und *Vicia villosa* amplifiziert werden. Obwohl diese im direkten Vergleich zum VfENOD18-Gen signifikante Unterschiede in der Nukleotidsequenz und der Länge des letzten Introns zeigten (Daten nicht gezeigt), war die Position des Introns konserviert und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen waren fast vollständig identisch mit der VfENOD18-Aminosäuresequenz (Abbildung E.9). Einzige Ausnahmen bildeten eine konservative Substitution in der *V. hirsuta* Sequenz und ein Austausch in der *V. sativa* Sequenz.

VfENOD18	107	ARQKLMSIEDLKLDALV	LGSRGLST	IKRILL	GSVS	NFVMVHSP
Lc37	1	ARQKLMSIEDLKLDALV	LGSRGLST	IKRILL	GSVS	NFVMVHSP
Vh49	1	ARQKLMSIEDLKLDALV	LGSRGLST	IKRILL	GSVS	NFVMVHSP
Vs3	1	ARQKLMSIEDLKLDALV	LGSRGLST	IKRILL	GSVS	NFVMVHSP
Vv10	1	ARQKLMSIEDLKLDALV	LGSRGLST	IKRILL	GSVS	NFVMVHSP
			R P		P	

Abbildung E.9: Multipler Sequenzvergleich des C-terminalen Bereichs der VfENOD18-Aminosäuresequenz mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von vier von unterschiedlichen Leguminosen isolierten genomischen Sequenzen.

Der multiple Sequenzvergleich der VfENOD18-Aminosäuresequenz mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von vier genomischen Sequenzen wurde mittels CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) gefolgt von BOXSHADE erstellt. VfENOD18-Aminosäurereste, die in wenigstens 50 % der Sequenzen konserviert sind, sind invers dargestellt (schwarz: identische Aminosäuren; grau: konservative Austausche). Umrahmte Bereiche markieren in der „Mj0577 Superfamilie“ konservierte Aminosäurereste, die im Mj0577-Protein an der Bindung an ATP beteiligt sind (R: Ribose, P: Phosphat). Abkürzungen: (Lc) *Lens culinaris*; (Vh) *Vicia hirsuta*; (Vs) *Vicia sativa*; (Vv) *Vicia villosa*.

E.2 Die modularen Noduline VfNOD28/32

Für die modularen Noduline VfNOD28/32, die eine potentielle N-terminale Signalsequenz aufweisen, wurde eine Funktion als Bindemolekül für Ionen, bakterielle Signalmoleküle oder Metaboliten des Knöllchenstoffwechsels im Lumen des Peribakteroidraums postuliert (siehe B.4.2). Die Expression der größten Isoform der modularen Noduline als Fusionsprotein in *E. coli* sowie die Gewinnung eines Antiserums gegen die modularen Noduline dienten in dieser Arbeit als Grundlage zur Überprüfung dieser Hypothese durch Lokalisations- und Funktionsstudien.

E.2.1 Expression des Fusionsproteins His-VfNOD32a in *E. coli* und Aufreinigung des Fusionsproteins zur Gewinnung polyklonaler Antikörper

Die zunächst verfolgte Strategie zur Gewinnung VfNOD32a-spezifischer polyklonaler Antikörper basierte auf der Immunisierung von Kaninchen mit einem in *E. coli* exprimierten His-VfNOD32a Fusionsprotein. Dazu wurde die für das potentielle VfNOD32a-Signalpeptid kodierende Sequenz verkürzte VfNOD32a-Sequenz aus dem bereits vorhandenen Expressionsplasmid pJB-Q32a (Becker 1996), ein Derivat des Expressionsvektors pQE-9, in den Expressionsvektor pWH844 (Schirmer *et al.*, 1997) umkloniert. Dies konnte über die in beiden Vektoren vorhandenen singulären *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstellen erfolgen, da es sich bei dem Vektor pWH844 ebenfalls um ein Derivat des Expressionsvektors pQE-9 handelt, in den zusätzlich ein *lacI*^q Gen kloniert worden ist, um eine maximale Repression des Promotors zu erreichen. Das neu entstandene Expressionskonstrukt, das für ein Fusionsprotein aus His-Tag und VfNOD32a-Aminosäuresequenz ohne potentielles Signalpeptid kodiert (His-VfNOD32a - Abbildung E.10b), wurde mit pJB-W32a bezeichnet und in den *E. coli* Stamm W3110 transformiert. Die Plasmidkarte zu pJB-W32a ist in Abbildung E.10a dargestellt.

Der Stamm *E. coli* W3110 x pJB-W32a sollte also bei Induktion mit IPTG das 295 Aminosäuren große Fusionsprotein His-VfNOD32a mit einer theoretischen molekularen Masse von 33.5 kD exprimieren. In Abbildung E.11 sind die Expression und nachfolgende Aufreinigungsschritte des Fusionsproteins zusammenfassend dargestellt.

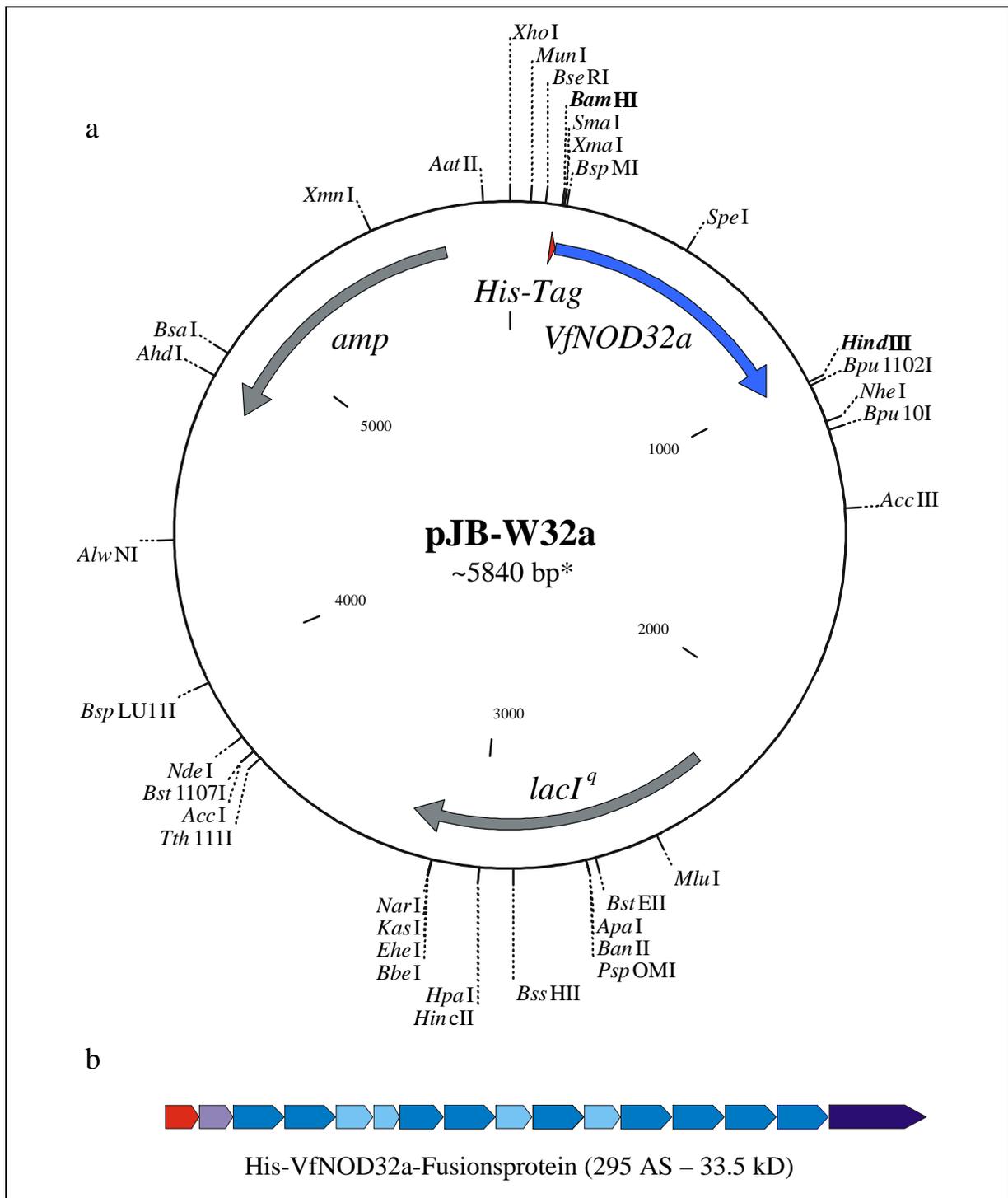


Abbildung E.10: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pJB-W32a und schematische Darstellung des Fusionsproteins His-VfNOD32a.

Die Plasmidkarte (a) zeigt das Expressionplasmid pJB-W32a, das unter anderem eine für ein Histidin-Hexapeptid (His-Tag) kodierende Sequenz „in frame“ mit einer VfNOD32a-Sequenz trägt, die für das Nodulin VfNOD32a ohne potentielles Signalpeptid kodiert. Die singulären Schnittstellen sind angegeben und die bei der Klonierung verwendeten Schnittstellen durch Fettdruck hervorgehoben. In Abbildung E.10b ist das kodierte Fusionsprotein His-VfNOD32a schematisch dargestellt. Farbcode: rot, His-Tag; pastellblau, N-terminales Sequenzmodul ohne potentielle Signalsequenz; blau, repetitives Sequenzmodul Typ 1; hellblau, repetitives Sequenzmodul Typ 2; dunkelblau, C-terminales Sequenzmodul. Abkürzungen: *amp*, Ampicillin-Resistenzgen; *lacI^q*, Lac-Repressorgen; *, ungefähre Plasmidgröße, da die direkt an das *lacI^q*-Gen angrenzenden Sequenzbereiche nicht sequenziert wurden.

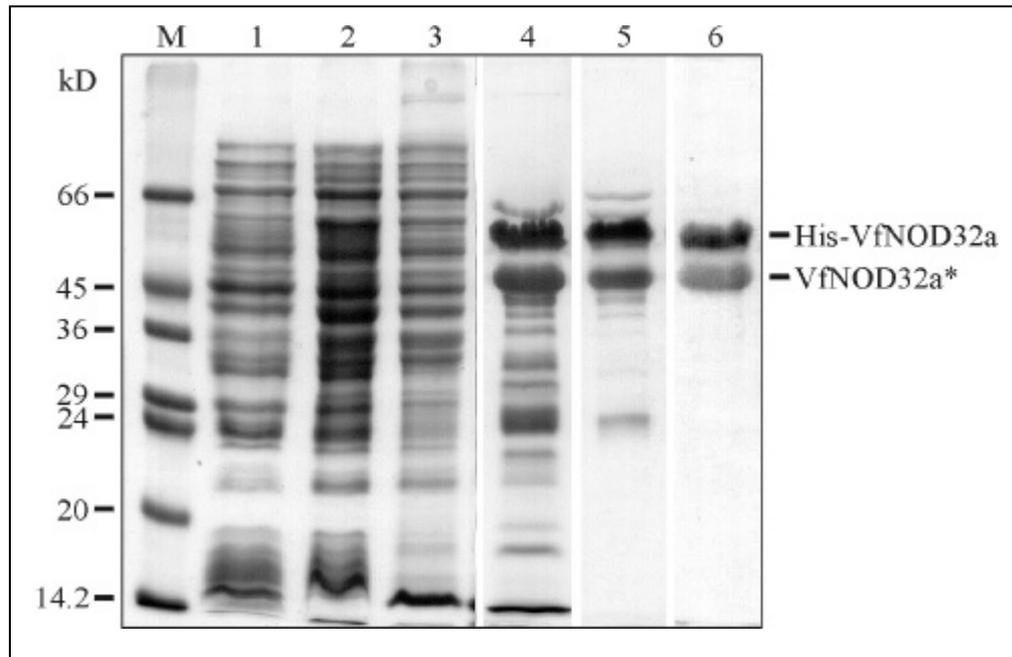


Abbildung E.11: Zusammenfassende analytische SDS-DISKPAGE der Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins His-VfNOD32a und seiner verkürzten Form VfNOD32a*.

Die Abbildung zeigt eine Coomassie-gefärbte analytische SDS-DISKPAGE (12.5 %) von *E. coli* Gesamtzell-extrakten vor und nach der Induktion des Expressionsstamms *E. coli* W3110 x pJB-W32a und von Proteinproben der aufeinander folgenden Schritte der Aufreinigung des Fusionsproteins His-VfNOD32a und seiner verkürzten Form VfNOD32a*.

- Spur M: Dalton Marker VII-L
- Spur 1: *E. coli* W3110 x pJB-W32a Gesamtzellextrakt vor der Induktion
- Spur 2: *E. coli* W3110 x pJB-W32a Gesamtzellextrakt nach der Induktion
- Spur 3: Überstand nach Zellaufschluß und Ultrazentrifugation
- Spur 4: His-VfNOD32a, VfNOD32a* und Verunreinigungen nach der Affinitäts-Chromatographie an Ni-NTA Harz
- Spur 5: His-VfNOD32a, VfNOD32a* und Verunreinigungen nach der Gelfiltration
- Spur 6: His-VfNOD32a und VfNOD32a* nach der präparativen SDS-DISKPAGE

Wie aus den Spuren 2 und 3 der SDS-DISKPAGE zu ersehen ist, wurde das Fusionsprotein His-VfNOD32a nicht ausreichend stark exprimiert, um im Vergleich zum *E. coli* Gesamtzell-extrakt vor der Induktion (Spur 1) zu deutlich sichtbaren zusätzlichen Banden in diesen Spuren zu führen. Eine Affinitäts-Chromatographie an Ni-NTA Harz führte dann aber zu einer deutlichen Anreicherung von zwei Proteinen, die auf einer Höhe bandierten, die einer abgeleiteten molekularen Masse der Proteine von etwa 60 und 47 kD entsprach (Spur 4). Die Diskrepanz zwischen der theoretischen molekularen Masse des Fusionsproteins von 33.5 kD und den hier abgeleiteten theoretischen molekularen Massen war nicht überraschend, sondern glich dem anormalen SDS-DISKPAGE Laufverhalten eines bereits während meiner Diplomarbeit exprimierten Fusionsproteins aus Maltosebindeprotein und VfNOD32a-Protein ohne Signalpeptid (Becker, 1996). Auch die unregelmäßige Form der oberen der beiden prominenten Banden war aus diesen früheren Expressionsversuchen bereits bekannt. Es lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der unteren prominenten Bande um ein Abbauprodukt des Fusionsproteins His-VfNOD32a handelte. Interessanterweise wurden bei der nachfolgenden

Gelfiltration mit Sephacryl S200 HR beide Banden gemeinsam eluiert (Spur 5). Sie bildeten also offensichtlich Di- bzw. Multimere. Der Zeitpunkt ihrer Elution entsprach dabei einer abgeleiteten theoretischen molekularen Masse von ca. 90 kD. Dieser Berechnung hat allerdings nur für Proteine Gültigkeit, die in ihrer nativen Form als globuläre Proteine vorliegen, was hier nicht der Fall sein musste. Sowohl die Affinitäts-Chromatographie als auch die Gelfiltration hatten bereits zu einer deutlichen Abnahme verunreinigender Proteine geführt. Den letzten Schritt der Aufreinigung bildete eine präparative SDS-DISKPAGE, die in etwa 1 mg aufgereinigtem Protein resultierte. Eine Abtrennung des Proteins mit der vermeintlich geringeren molekularen Masse hätte erhebliche experimentelle Probleme verursacht und sicherlich zu einer wesentlichen Verringerung der Ausbeute geführt. Mittels eines Western Blots, durchgeführt von V.-A. Pham im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Pham, 1999), unter Einsatz eines Antikörpers, der spezifisch gegen His-Tags gerichtet ist, konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem Protein, das die obere 60 kD-Bande bildet, um ein Protein mit His-Tag handelte (Abbildung E.12a&b).

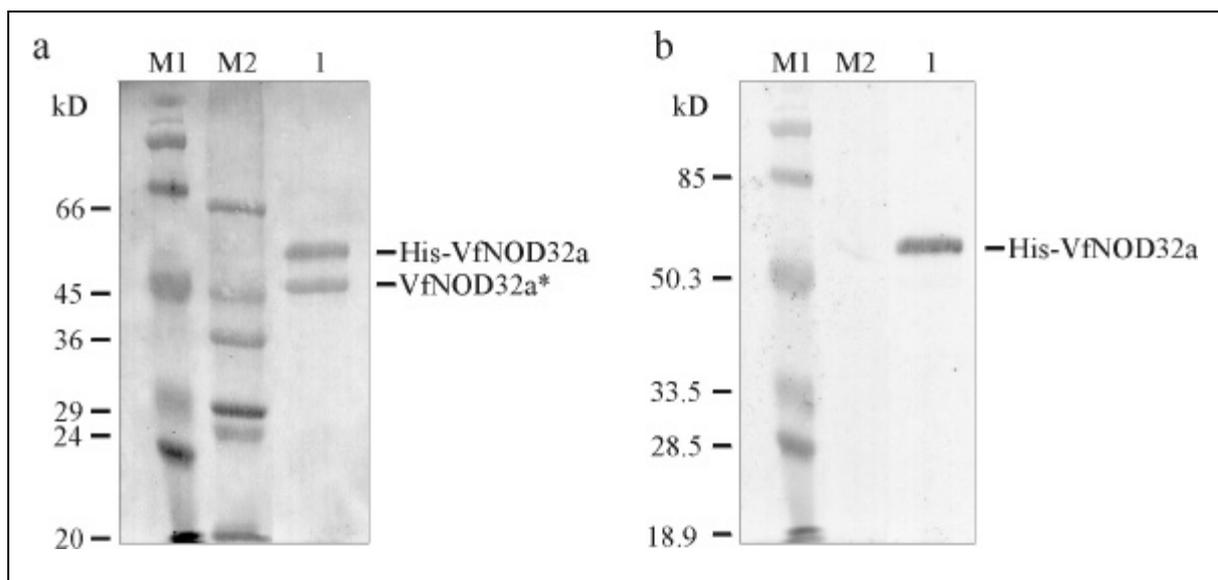


Abbildung E.12: Western Blot unter Einsatz eines gegen His-Tags gerichteten Antikörpers.

Zum Nachweis des Fusionsproteins His-VfNOD32a wurde ein Western Blot unter Einsatz eines gegen His-Tags gerichteten Antikörpers durchgeführt. In (a) sind die transferierten Proteine auf der Nitrocellulosemembran mittels Ponceau-Färbung transient sichtbar gemacht und die Molekulargewichtsgrößen für den Marker M2 angegeben. In (b) ist der entwickelte Blot gezeigt und die Molekulargewichtsgrößen für den Marker M1 angegeben.

Spur M1: Prestained Marker

Spur M2: Dalton Marker VII-L

Spur 1: 14 µg His-VfNOD32a und VfNOD32a*

Gleichzeitig ließ dieses Ergebnis vermuten, dass es sich bei dem tiefer bandierenden Protein um ein N-terminal verkürztes Fusionsprotein (VfNOD32a*) handelte, dem zumindest die Histidine des His-Tags fehlten. Aufklärung brachte hier eine N-terminale Ansequenzierung der Proteine der beiden Banden (Dr. Jaeger, Universität Bochum). Die Aminosäuresequenz, die sich für das Protein der oberen Bande ergab, entsprach der für das Fusionsprotein His-VfNOD32a

erwarteten Sequenz (Aminosäuren 1 bis 15). Bei dem tiefer bandierenden Protein handelte es sich tatsächlich um ein Produkt proteolytischer Degradation des Fusionsproteins, denn die Ansequenzierung erbrachte eine Sequenz, die den Aminosäuren 30 bis 44 des Fusionsproteins entsprach (Abbildung E.13). Die Aminosäuresequenz dieses verkürzten Fusionsproteins (VfNOD32a*) begann mit der letzten Aminosäure des N-terminalen Sequenzmoduls. Es hatte somit eine theoretische molekulare Masse von 30.3 kD.

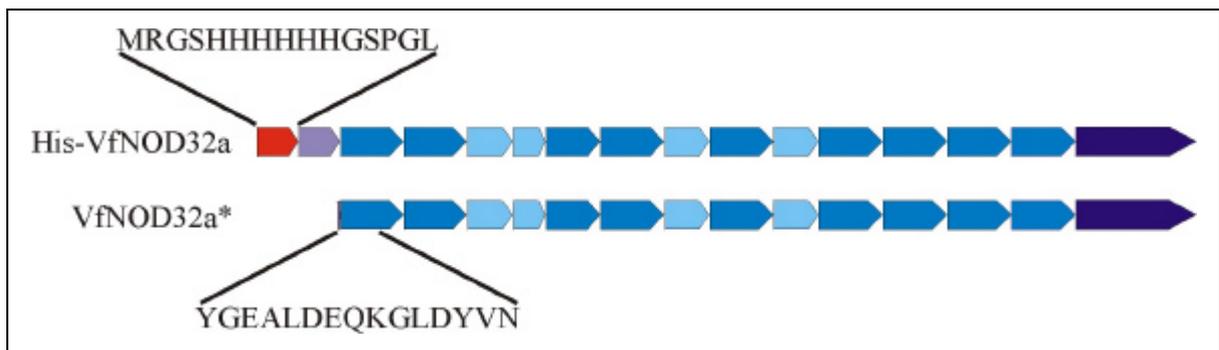


Abbildung E.13: Schematische Darstellung des Fusionsproteins His-VfNOD32a und des verkürzten Fusionsproteins VfNOD32a*.

Das Fusionsprotein His-VfNOD32a und das verkürzte Fusionsprotein VfNOD32a* sind schematisch gezeigt. Die bei der N-terminalen Ansequenzierung der Proteine erhaltenen Aminosäuresequenzen sind über bzw. unter dem jeweiligen Schema angegeben. Farbcode: rot, His-Tag; pastellblau, N-terminales Sequenzmodul ohne potentielle Signalsequenz; blau, repetitives Sequenzmodul Typ 1; hellblau, repetitives Sequenzmodul Typ 2; dunkelblau, C-terminales Sequenzmodul.

600 µg dieser Proteine wurden eingesetzt, um zwei Kaninchen zu immunisieren (Eurogentec, Belgien). Die erhaltenen polyklonalen Antiseren zeigten nur eine schwache Reaktion mit dem Antigen. Darüber hinaus kam es zu einer Detektion von Proteinen in *E. coli* Extrakten, sowie in Extrakten von *Rhizobium leguminosarum* (Daten nicht gezeigt). Daher wurde ein Teil der Antiseren einer Aufreinigung unterzogen. Hierzu wurde über Affinitäts-Chromatographie und Gelfiltration aufgereinigtes His-VfNOD32a und VfNOD32a* an Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose 4B immobilisiert und nachfolgend versucht, VfNOD32a-spezifische Antikörper an dieser Matrix aufzureinigen. Die erhaltenen Antikörper führten zwar zu einer deutlichen Verstärkung der Signale in Western Blots sowohl mit Extrakten des Produzenten-Stammes *E. coli* W3110 x pJB-W32a als auch von *V. faba* Knöllchenextrakten, aber es kam auch weiterhin zu deutlichen Signalen in Western Blots mit Extrakten des Nicht-Produzenten *E. coli* W3110 x pWH844 und mit Extrakten von *R. leguminosarum* (Daten nicht gezeigt). Auch eine IgG-Fällung der Antiseren mit nachfolgender präparativer isoelektrischer Fokussierung (MBBL, Bielefeld) führte zu keiner besseren Aufreinigung der VfNOD32a-Antiseren. Die unspezifischen Signale und/oder Kreuzreaktionen der VfNOD32a-Antikörper mit *E. coli*- und *R. leguminosarum*-Proteinen machten sie für einen spezifischen Nachweis von VfNOD32a unbrauchbar. Eine Peptid-Immunisierung stellte aber einen geeigneten Ausweg zur Gewinnung VfNOD32a-spezifischer Antikörper dar.

E.2.2 VfNOD32a-E15 Antikörper detektieren Proteine in Knöllchenextrakten von *Vicia faba* und *Vicia sativa*

Um die Gefahr von Kreuzreaktionen der Antikörper und/oder unspezifischer Antikörper durch eventuelle Verunreinigungen in der zur Immunisierung eingesetzten Proteinfraction zu minimieren, wurde eine Peptid-Immunisierung in Auftrag gegeben (BioScience, Göttingen). Es wurde eine 18 Aminosäuren lange Peptidsequenz ausgewählt, die den Aminosäuren 237 bis 254 der VfNOD32a-Aminosäuresequenz entsprach, da diese laut Computeranalyse eine hohe Antigenität aufweisen sollte. Dieser Sequenzabschnitt liegt im letzten repetitiven Sequenzmodul (Typ 1) der VfNOD32a-Aminosäuresequenz (Abbildung E.14) und wird auf Nukleotidebene vom Exon 15 der VfNOD28/32-Sequenz kodiert. Daher wurden die gewonnenen Antikörper als VfNOD32a-E15 Antikörper bezeichnet.

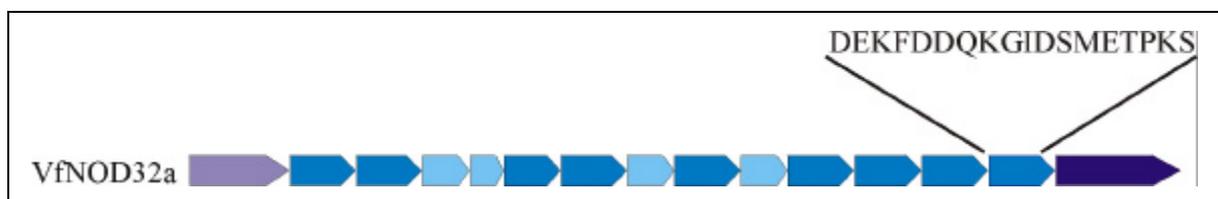


Abbildung E.14: Schematische Darstellung des VfNOD32a-Proteins mit der Sequenz des zur Immunisierung eingesetzten Peptids.

Anhand der schematischen Darstellung des VfNOD32a-Proteins sind Lage und Aminosäuresequenz des zur Immunisierung eingesetzten Peptids gezeigt. Farbcode: pastellblau, N-terminales Sequenzmodul; blau, repetitives Sequenzmodul Typ 1; hellblau, repetitives Sequenzmodul Typ 2; dunkelblau, C-terminales Sequenzmodul.

In einem Dot Blot Versuch unter Verwendung der beiden VfNOD32a-E15 Antiseren wurden sowohl das reine VfNOD32a-E15 Peptid als auch das aufgereinigte His-VfNOD32a Fusionsprotein von beiden Antiseren detektiert (Daten nicht gezeigt). Schon ein Test der Präimmunsere der beiden zur Immunisierung eingesetzten Kaninchen hatte allerdings gezeigt, dass sie Antikörper enthielten, die im Western Blot Proteine sowohl aus *E. coli*- als auch aus *R. leguminosarum*-Extrakten erkannten. Eine Aufreinigung der erhaltenen VfNOD32a-E15 Antiseren war daher unumgänglich. Um das Antigen in möglichst reiner Form immobilisiert vorliegen zu haben, wurde im Gegensatz zum vorherigen Aufreinigungsversuch die Methode der Aufreinigung an Blot-Streifen gewählt. Hierbei wurde über Affinitäts-Chromatographie und Gelfiltration aufgereinigtes His-VfNOD32a und VfNOD32a* in einer SDS-DISKPAGE im präparativen Maßstab aufgetrennt und dann auf Nitrocellulose geblottet. Nach transientser Ponceau-Färbung wurden die beiden prominenten Banden, die die Proteine His-VfNOD32a und VfNOD32a* repräsentierten, herausgeschnitten und zur Aufreinigung VfNOD32a-E15-spezifischer Antikörper genutzt. In diesem Zusammenhang muss beachtet werden, dass die Aminosäuresequenz des zur Immunisierung eingesetzten Peptids nicht nur in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der VfNOD32a-Isoform auftritt, sondern auch in den Isoformen VfNOD28, VfNOD30b und VfNOD31 (Küster *et al.*, 1996). Es war daher theoretisch zu

erwarten, dass die aufgereinigten Antikörper im Western Blot auch diese Isoformen detektieren können.

Ein erster Western Blot mit einem *V. faba* Knöllchenextrakt und einem *R. leguminosarum* Extrakt unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper erbrachte zwei Ergebnisse (Abbildung E.15).

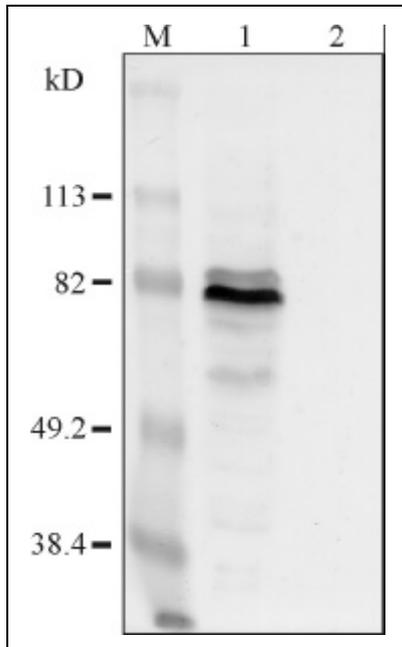


Abbildung E.15: Western Blot mit *V. faba* Knöllchen- und *R. leguminosarum*-Extrakten unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper.

Dieser erste Western Blot unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper zeigt den Erfolg der Antikörper-Aufreinigung.

Spur M: Prestained Marker

Spur 1: 15 µg *V. faba* Knöllchen-Gesamtproteinextrakt

Spur 2: 25 µl *R. leguminosarum* Gesamtzellextrakt

Zum einen wurde durch das Fehlen von Signalen in Spur 2 gezeigt, dass durch die Aufreinigung jene IgG-Fractionen abgetrennt werden konnten, die gegen Antigene in *R. leguminosarum* Gesamtzellextrakten gerichtet waren. Zum anderen wurden im Gesamtproteinextrakt von *V. faba* Knöllchen gleich mehrere Proteine detektiert, die in der SDS-DISKPAGE eng beieinander bandierten (Spur 1). Ob

es sich dabei um mehrere verschiedene Isoformen der modularen Noduline handelte oder nur um beispielsweise die Isoform VfNOD32a mit und ohne Signalpeptid (oberste Bande und prominente Bande darunter) und kleinere Degradationsprodukte dieser Isoform, ließ sich aus diesem Western Blot allerdings nicht ableiten. Die vom Laufverhalten des Markers ableitbaren scheinbaren molekularen Massen der detektierten Proteine würden zu Fehlinterpretationen führen, wie anhand der Marker des in Abbildung E.16 dargestellten Western Blots zu ersehen ist. Durch diesen ersten Western Blot unter Verwendung der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper wurde aber deutlich, dass diese Antikörper zur Detektion der modularen Noduline geeignet waren.

In einem zweiten Western Blot sollte das Vorkommen des VfNOD32a-Proteins bzw. der modularen Noduline VfNOD28/32 in Proteinextrakten verschiedener Gewebe der Ackerbohne und das Vorkommen VfNOD28/32-homologer Proteine in Extrakten von *V. sativa* Knöllchen überprüft werden (Abbildung E.16). Wie schon im vorhergehenden Blot traten deutliche Signale in der mit *V. faba* Knöllchen-Gesamtproteinextrakt beladenen Spur 1 auf. Die Anzahl der hierbei deutlich sichtbaren Banden war auf zwei Banden beschränkt. Beim Vergleich der beiden Markerspuren zeigte sich eine deutliche Diskrepanz in den abgeleiteten Molekulargewichtsgrößen. Dieses ist darauf zurück zu führen, dass der vorgefärbte Marker (Spur M1) nur eine sehr ungenaue Größenangabe liefert und mehr der Überprüfung der SDS-DISKPAGE und des Transfers auf die Nitrocellulosemembran dient, als einer Bestimmung des Molekulargewichts eventuell detektierter Antigene. Eine deutlich bessere Abschätzung lässt der Dalton

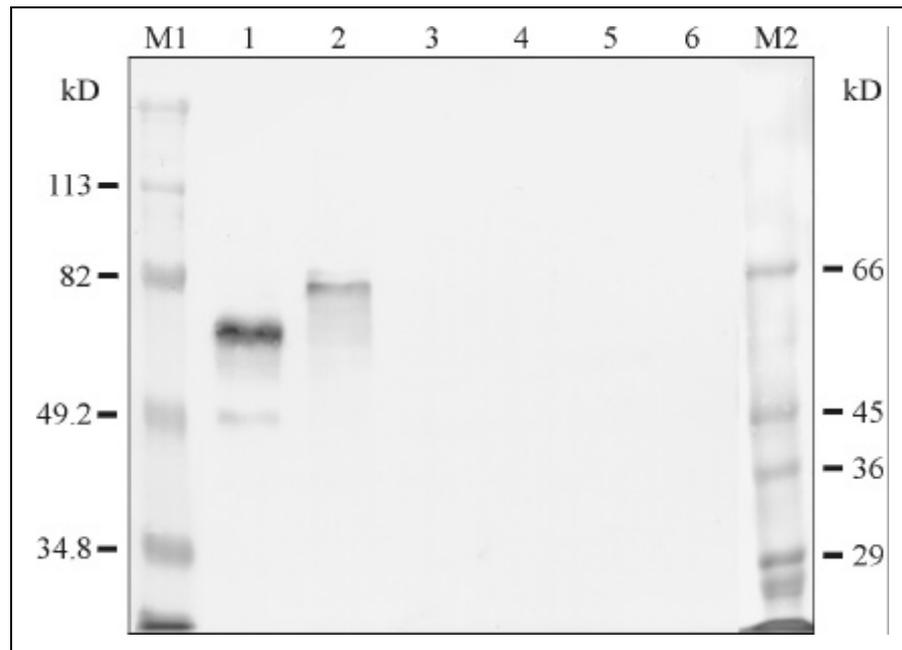


Abbildung E.16: Western Blot mit verschiedenen *V. faba* Gewebeextrakten und einem *V. sativa* Knöllchenextrakt unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper.

Proteinextrakte von Knöllchen, sterilen Wurzeln, Blättern, Sprossen und Samen der Ackerbohne und *V. sativa* Knöllchen wurden im Western Blot mit VfNOD32a-E15 Antikörpern getestet. Links sind die Molekulargewichtsgrößen des Markers M1 angegeben, rechts die des genaueren Markers M2, wie sie nach dem Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran durch transiente Ponceau-Färbung sichtbar gemacht wurden.

- Spur M1: Prestained Marker
- Spur 1: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Knöllchen
- Spur 2: 30 µg *V. sativa* Gesamtproteinextrakt von Knöllchen
- Spur 3: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von sterilen Wurzeln
- Spur 4: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Blättern
- Spur 5: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt vom Spross
- Spur 6: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Samen
- Spur M2: Dalton Marker VII-L

Marker zu (Spur M2), dessen Proteine allerdings nur direkt nach dem Transfer vorübergehend sichtbar gemacht werden können. Wird dieser Marker also zu Grunde gelegt, bandierte die obere, prominente der beiden Banden auf einer Höhe, die einer molekularen Masse von etwa 56 kD entsprach. Dem steht eine theoretische molekulare Masse des VfNOD32a-Nodulins von 32 kD gegenüber. Berücksichtigt man aber, dass das Fusionsprotein His-VfNOD32a mit einer theoretischen molekularen Masse von 33.5 kD bei etwa 60 kD bandierte, so wird klar, dass beim anormalen Laufverhalten der beiden Proteine in der SDS-DISKPAGE das Verhältnis der Abweichung gewahrt bliebe. Die untere der beiden Banden bandierte auf einer Höhe, die einer abgeleiteten molekularen Masse von etwa 46 kD entsprach. Es könnte sich dabei um eine kleinere Isoform der modularen Noduline handeln, obwohl beispielsweise das VfNOD28-Protein bei Wahrung des Größenverhältnisses der Abweichung bei etwa 49 kD bandieren sollte. Eine andere Möglichkeit ist, dass es sich um ein spezifisches Abbauprodukt des Proteins handelte, das in der oberen Bande detektiert wurde. In allen anderen Geweben der Ackerbohne, die getestet wurden (sterile Wurzeln, Blätter, Spross und Samen), konnten keine Antigene detektiert werden (Spuren 3-6). Im Knöllchen-Gesamtproteinextrakt von *V. sativa* jedoch

detektierten die VfNOD32a-E15 Antikörper ein Protein mit einer abgeleiteten molekularen Masse von ca. 65 kD. Direkt über dieser Bande war eine weitere schwache Bande zu erkennen, wie es auch schon für den *V. faba* Knöllchen-Gesamtproteinextrakt im ersten Blot der Fall gewesen war (Abbildung E.15). Es handelte sich bei den detektierten Antigenen wahrscheinlich um VfNOD28/32-homologe Proteine in Knöllchen von *V. sativa*.

Um der Frage nachzugehen, ob sich VfNOD28/32-immunoreaktive Proteine auch in Knöllchen-Gesamtproteinextrakten weiterer Leguminosen nachweisen lassen, wurden auch Gesamtproteinextrakte aus Knöllchen von *M. truncatula*, *M. sativa* und *P. coccineus* im Western Blot unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper getestet (Daten nicht gezeigt). Mit den Antikörpern wurden jedoch in keinem dieser Extrakte Proteine detektiert.

Eine weitere Frage war, ob einzelne Knöllchen einer Ackerbohnenpflanze untereinander Unterschiede im Expressionsmuster der modularen Noduline zeigten. Daher wurden im Gegensatz zur standardmäßigen Proteinextraktion aus Knöllchen, bei der mehrere Knöllchen zusammen verarbeitet wurden, von einer *V. faba* Pflanze 5 Proteinextrakte aus jeweils einem Knöllchen gewonnen und im Western Blot getestet (Abbildung E.17a&b).

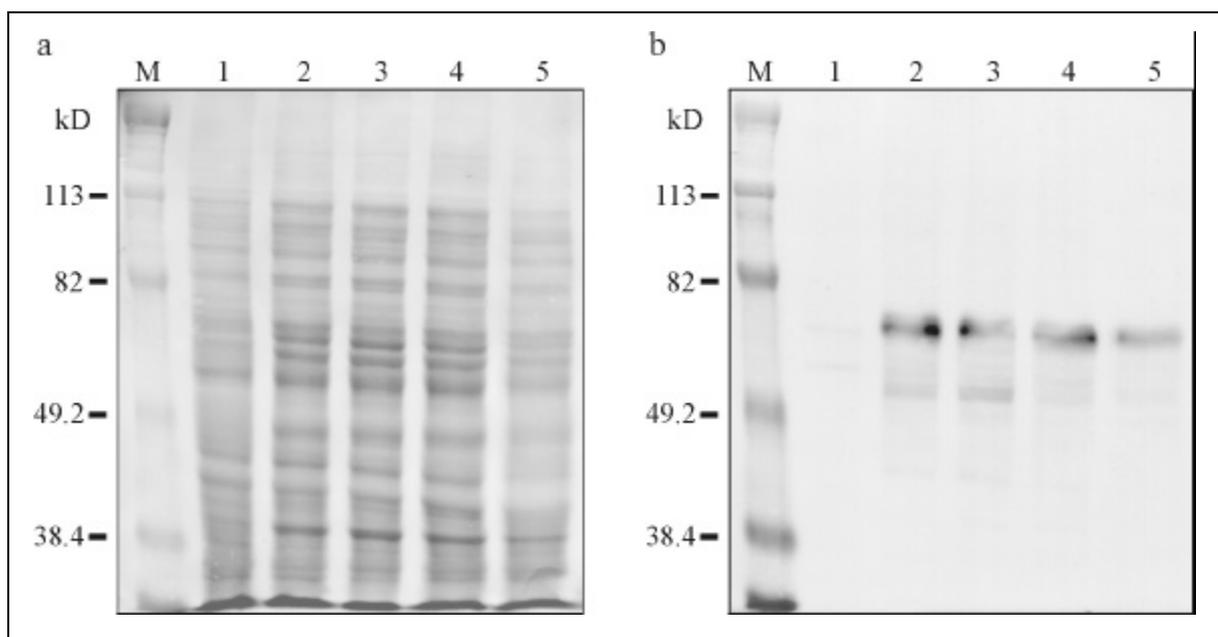


Abbildung E.17: Western Blot mit Proteinextrakten einzelner Knöllchen einer *V. faba* Pflanze unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper.

Von einer *V. faba* Pflanze wurden von 5 einzelnen Knöllchen Proteinextrakte gewonnen und im Western Blot unter Verwendung der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper getestet. In (a) sind die transferierten Proteine auf der Nitrocellulosemembran mittels Ponceau-Färbung transient sichtbar gemacht, in (b) ist der entwickelte Blot gezeigt.

- Spur M: Prestained Marker
- Spur 1: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Knöllchen 1
- Spur 2: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Knöllchen 2
- Spur 3: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Knöllchen 3
- Spur 4: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Knöllchen 4
- Spur 5: 20 µg *V. faba* Gesamtproteinextrakt von Knöllchen 5

Im Bandenmuster der Spuren 2 bis 5 des Blots ließen sich nur geringe Unterschiede feststellen. Die obere Bande war fast immer gleich intensiv, lediglich die untere Bande schwankte in ihrer Intensität. Der Vergleich mit den durch Ponceau-Färbung transient angefärbten Proteinen zeigt, dass der Proteinextrakt des Knöllchens 5 (Spur 5) eine geringere Konzentration als angenommen hatte. Hierdurch ließe sich die schwächere Intensität der detektierten Bande(n) in dieser Spur erklären. Überraschend war das Ergebnis des Proteinextraktes von Knöllchen 1 (Spur 1). Obwohl die Ponceau-Färbung auf eine annähernd so große geladene Proteinmenge wie in Spur 5 schließen lässt, sind nur zwei sehr schwache Banden zu erkennen. Offensichtlich war in diesem Knöllchen die Expression der modularen Noduline sehr stark reprimiert.

E.2.3 Die subzelluläre Lokalisierung von VfNOD32a zeigt Immunogoldmarkierungen im Cytoplasma, dem Peribakteroidraum und den Bakteroiden infizierter Zellen

Um VfNOD32a bzw. die modularen Noduline VfNOD28/32 auf subzellulärer Ebene zu lokalisieren, wurden longitudinale Ultra-Dünnschnitte von *V. faba* Wurzelknöllchen mit aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörpern inkubiert und gebundene Antikörper über Gold-markierte sekundäre Antikörper detektiert.

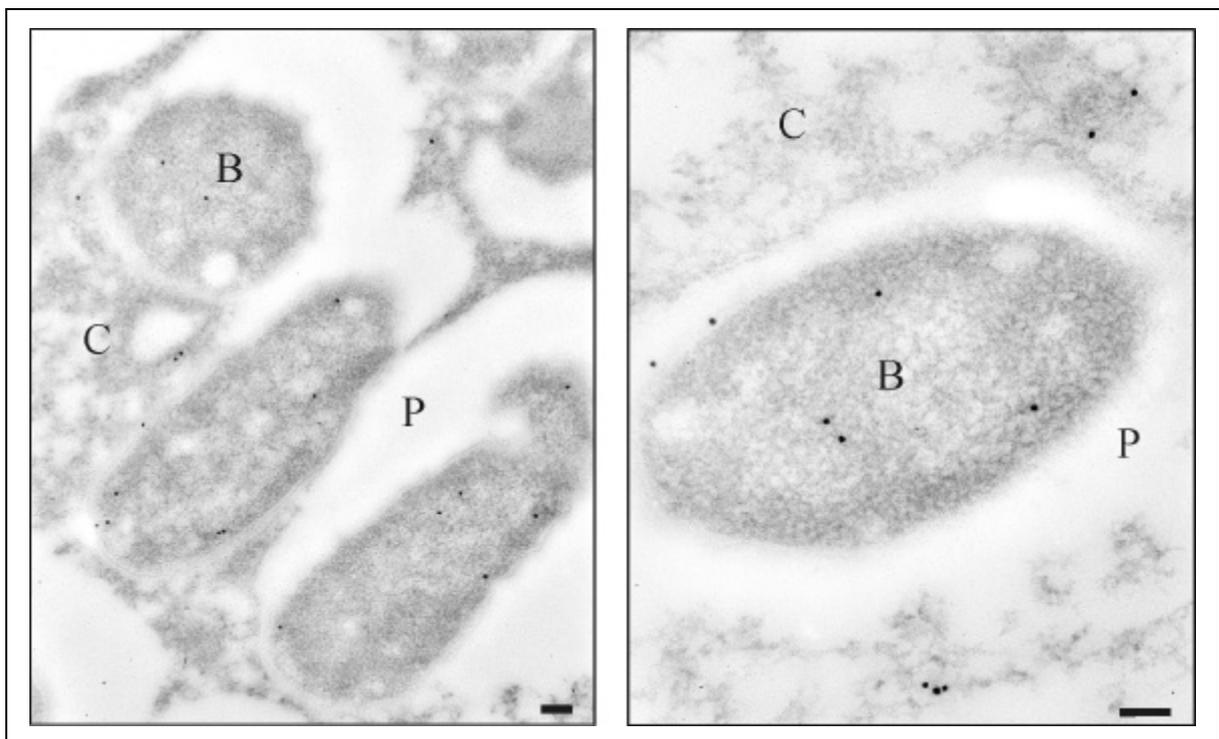


Abbildung E.18: Elektronenmikroskopische Lokalisation von VfNOD32a in *V. faba* Knöllchen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Immunogoldmarkierungen auf longitudinalen Ultra-Dünnschnitten von Ackerbohnenknöllchen. VfNOD32a-E15 Antikörper detektieren Antigene im Cytoplasma, dem Peribakteroidraum und den Bakteroiden infizierter Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III. Die Balken entsprechen 100 nm. Abkürzungen: C, Cytoplasma; P, Peribakteroidraum; B, Bakteroid.

Bei der nachfolgenden Untersuchung im Elektronenmikroskop wurden kolloidale Goldpartikel im Cytoplasma, dem Peribakteroidraum und den Bakteroiden der infizierten Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III gefunden (Abbildung E.18). Alle anderen Gewebe der untersuchten Knöllchen wie auch die angeschnittenen Wurzelgewebe zeigten keine signifikanten Markierungen durch Goldpartikel. Eine Kontrolle mit dem Präimmunserum konnte auf Grund der bekannten Probleme durch die Detektion von Antigenen in Gesamtzellextrakten von *E. coli* und *R. leguminosarum* nicht gemacht werden.

E.2.4 VfNOD32a kann Ca^{2+} -Ionen binden

Auf Grund der stark negativen Gesamtnettoladung der modularen Noduline bei pH 7.0 von -17.43 bis -20.42 und ihres modularen Aufbaus hatten Küster *et al.* (1996) im Vergleich mit dem Ca^{2+} -bindenden, modularen Protein ARP („acid repeat protein“) aus *Euglena gracilis* (Gumpel und Smith, 1992) postuliert, dass die modularen Noduline der Ackerbohne als Ionenbindende Proteine fungieren könnten.

Daher wurden die beiden über Affinitäts-Chromatographie, Gelfiltration und präparative SDS-DISKPAGE aufgereinigten rekombinanten Proteine His-VfNOD32a und VfNOD32a* nach Western Blot und Renaturierung in einem Bindungstest mit radioaktivem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inkubiert. Das Ergebnis dieses Versuchs, der von L. Moreira (Universität Bielefeld) durchgeführt wurde, ist in Abbildung E.19 gezeigt.

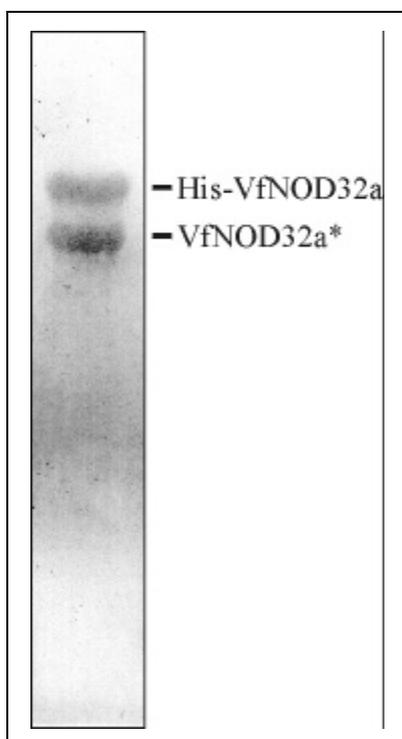


Abbildung E.19: Autoradiogram des $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Bindungstests mit His-VfNOD32a und VfNOD32a*.

Aufgereinigtes rekombinantes His-VfNOD32a und VfNOD32a* wurden nach Western Blot und Renaturierung einem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Bindungstest unterzogen. Die Position der beiden Proteine im Autoradiogram ist markiert.

Sowohl das Fusionsprotein His-VfNOD32a als auch sein Degradationsprodukt VfNOD32a* konnten $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binden. Problematisch war in diesem Zusammenhang die Fähigkeit des His-Tags, zweiwertige Ionen zu binden. Eine klare Aussage wäre somit bei Verwendung des Fusionsproteins His-VfNOD32a allein nicht möglich gewesen. Durch das Fehlen des His-Tags am VfNOD32a*-Protein und das auch bei diesem Protein auftretende Signal im Autoradiogram wurde aber deutlich, dass nicht nur der His-Tag $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden kann, sondern auch das VfNOD32a-Protein allein.

E.3 Das Nodulin VfNOD32

S. C. Frosch (Universität Bielefeld) befasste sich im Rahmen seiner Doktorarbeit mit dem VfNOD32-Gen und seinem Genprodukt (siehe B.4.3). Ein gegen VfNOD32 gerichtetes Antiserum wurde dabei durch die Immunisierung von Kaninchen mit aufgereinigtem His-VfNOD32 Fusionsprotein gewonnen. Die Lokalisationsstudien in dieser Arbeit wurden mit dem Ziel durchgeführt, neue Hinweise auf die Funktion dieses Nodulins zu erhalten.

E.3.1 Aufgereinigte VfNOD32-Antikörper detektieren VfNOD32 im Cytoplasma von Zellen der Interzone II-III und der Stickstoff fixierenden Zone III von *Vicia faba* Knöllchen

Für immunhistochemische Arbeiten erwies sich die Spezifität des VfNOD32-Antiserums als nicht ausreichend. Daher wurde eine affinitäts-chromatographische Aufreinigung des Antiserums an immobilisiertem His-VfNOD32 Fusionsprotein durchgeführt. Dazu wurde aufgereinigtes His-VfNOD32 (bereitgestellt von S. C. Frosch) an Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B gebunden. Aus der Aufreinigung des VfNOD32-Antiserums an dieser Matrix resultierten VfNOD32-spezifische Antikörper, die zur Lokalisation von VfNOD32 auf zellulärer und subzellulärer Ebene eingesetzt werden konnten.

S. C. Frosch hatte in Western Blots mit Gesamtproteinextrakten aus Knöllchen verschiedener *V. faba* Pflanzen gezeigt, dass das VfNOD32-Gen nur in etwa jeder fünften Pflanze der untersuchten Ackerbohnen-Population exprimiert wurde (Frosch *et al.*, 2001). Unbedingte Voraussetzung für eine erfolgreiche Lokalisation war somit die Identifikation VfNOD32-exprimierender Pflanzen im Western Blot. In Abbildung E.20 ist ein solcher Western Blot exemplarisch gezeigt. Signale traten in den Extrakten der Spuren 7 und 11 der zwölf getesteten Extrakte auf. Die beiden korrespondierenden Pflanzen waren also VfNOD32-Produzenten. Die zusätzliche, etwas tiefer liegende Bande in den beiden Spuren war vermutlich auf eine spezifische Proteolyse der VfNOD32-Proteine zurückzuführen (Frosch *et al.*, 2001). Als interne Kontrolle, dass fehlende VfNOD32-Signale nicht auf zu geringe Konzentrationen der in der SDS-DISKPAGE geladenen Proteine oder eine unsachgemäße Handhabung der Proteinextrakte zurückzuführen waren, wurde der Blot gleichzeitig mit den aufgereinigten VfNOD18-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die 18 kD-Bande des detektierten VfNOD18 war in allen Spuren gleichermaßen sichtbar.

Mit Wurzelknöllchen der als VfNOD32-Produzenten identifizierten Pflanzen wurden immunologische Tissue-Prints unter Verwendung der aufgereinigten VfNOD32-Antikörper durchgeführt. Hierbei wurden die Knöllchen longitudinal in Scheiben geschnitten und die auf der Schnittfläche austretenden Proteine durch Druck auf eine Nitrocellulose-Membran auf diese transferiert. Die nachfolgenden Schritte der Inkubation mit den Antikörpern und der Detektion gleichen denen eines Western Blots. Zur besseren Identifikation der verschiedenen Zonen des Knöllchens wurde der jeweilige Gewebeschnitt einer Stärkefärbung unterzogen.

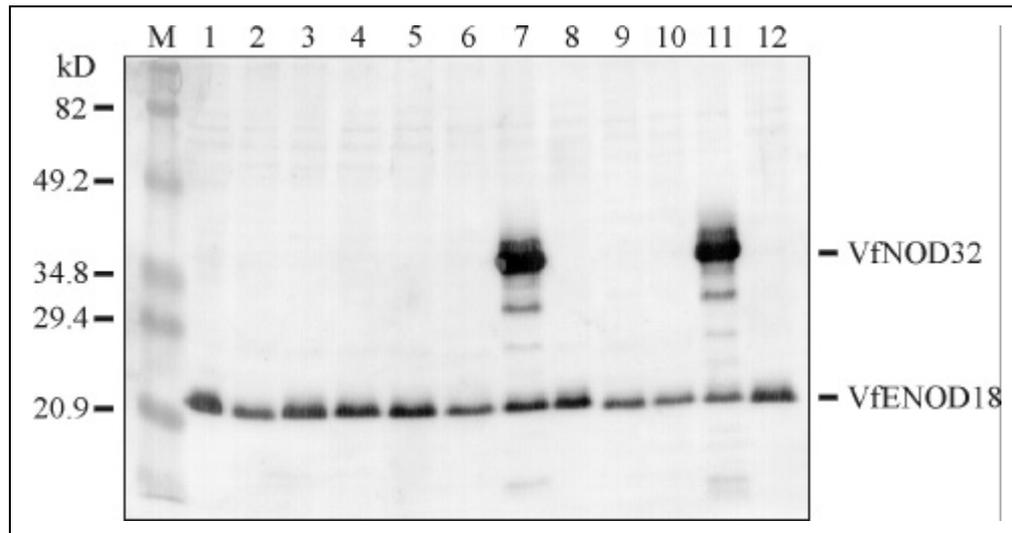


Abbildung E.20: Western Blot mit Knöllchenextrakten verschiedener *V. faba* Pflanzen unter Einsatz der aufgereinigten VnNOD32- und VnNOD18-Antikörper.

Es wurden Western Blots mit Gesamtproteinextrakten von Knöllchen unterschiedlicher *V. faba* Pflanzen unter gleichzeitiger Verwendung aufgereinigter VnNOD32- und VnNOD18-spezifischer Antikörper durchgeführt. Die Positionen der immunreaktiven Proteine im *V. faba* Knöllchenextrakt, die den erwarteten Größen für VnNOD32 und VnNOD18 entsprechen, sind angezeigt.

Spur M: Prestained Marker
 Spur 1-12: Je 10 µg Knöllchen-Gesamtproteinextrakt
 von einzelnen *V. faba* Pflanzen

In Abbildung E.21a&b ist ein immunologischer Tissue-Print und der dazugehörige Stärkenachweis gezeigt. Im angefärbten Gewebeschnitt (Abbildung E.21b) fehlte eine charakteristische Anfärbung der Stärkekörner der Interzone II-III, was allerdings ein recht häufig auftretendes Phänomen bei Ackerbohnenknöllchen ist (U. Albus, Universität Bielefeld, persönliche Mitteilung). Dennoch waren im zentralen Knöllchengewebe die gelb-bräunlich angefärbten infizierten Zellen der Interzone II-III und der Stickstoff fixierenden Zone III gut zu erkennen. Im dazugehörigen VnNOD32 Tissue-Print (Abbildung E.21a) wurden die VnNOD32-Antigene im zentralen Knöllchengewebe und dort in der Stickstoff fixierenden Zone III und möglicherweise schon in der Interzone II-III detektiert. In entsprechenden immunologischen Tissue-Prints unter Verwendung von Knöllchen, die von VnNOD32-Nichtproduzenten stammten, die also im Western Blot kein Signal gezeigt hatten, wurden keine VnNOD32-Antigene detektiert (Daten nicht gezeigt).

Diese Lokalisation von VnNOD32-Proteinen in *V. faba* Wurzelknöllchen steht in weitestgehender Übereinstimmung mit der bereits über Tissue-Print Hybridisierungen bekannten Lokalisation der VnNOD32-Transkripte in der Präfixierungszone II, der Interzone II-III und der Stickstoff fixierenden Zone III von Ackerbohnenknöllchen (Perlick *et al.*, 1996a), wie sie exemplarisch in Abbildung E.22a&b gezeigt ist.

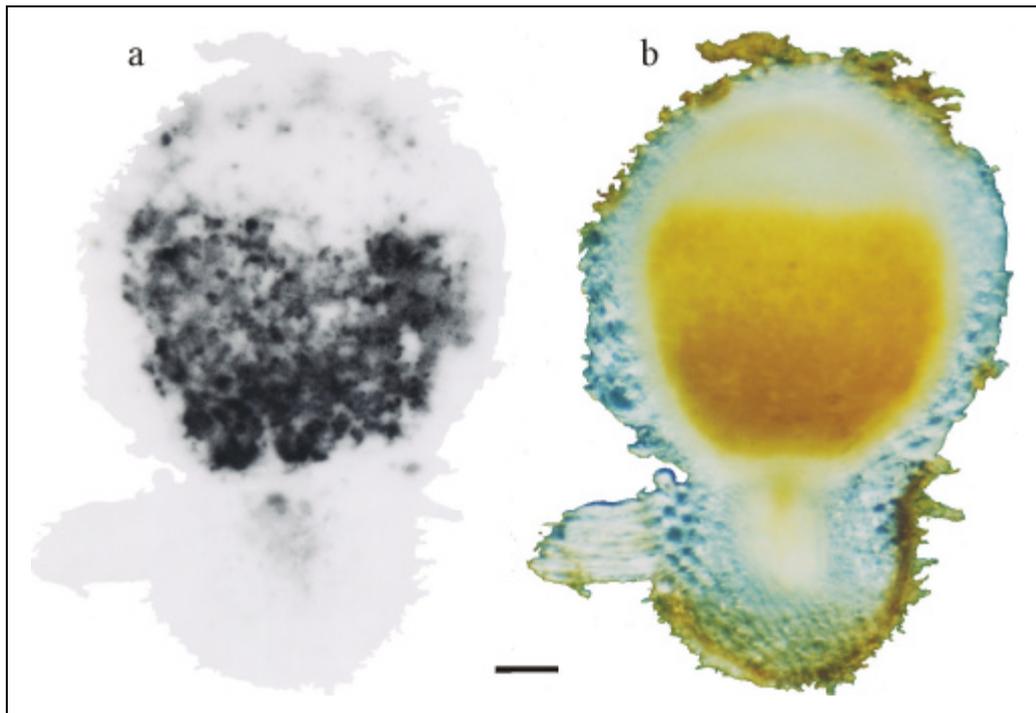


Abbildung E.21: Lokalisation von VfNOD32-Proteinen in *V. faba* Knöllchen mittels immunologischem Tissue-Print.

In (a) ist die immunologische Detektion von VfNOD32-Proteinen mittels eines immunologischen Tissue-Prints longitudinaler Schnitte von Ackerbohnenknöllchen unter Verwendung der aufgereinigten VfNOD32-Antikörper gezeigt. Abbildung (b) zeigt die Anfärbung zwecks Stärkenachweis im dazugehörigen Gewebeschnitt. Der Balken entspricht 400 µm.

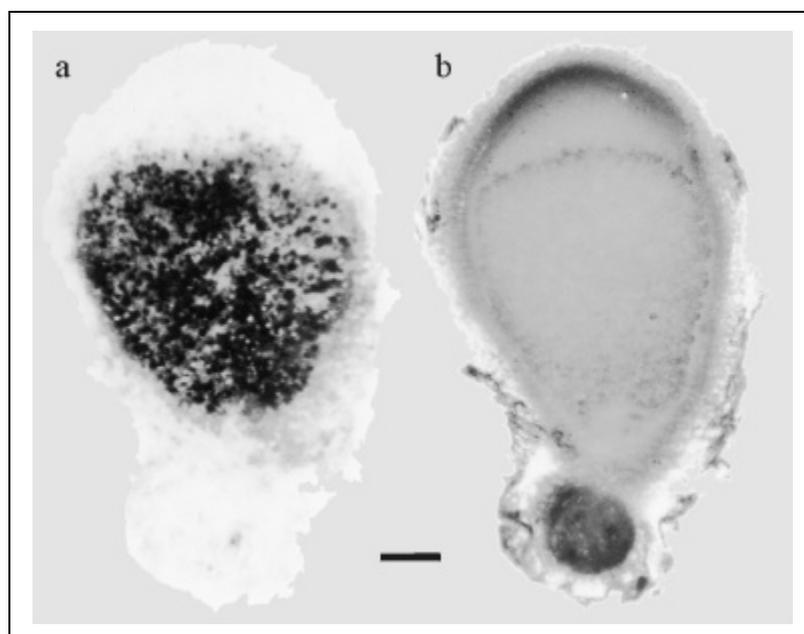


Abbildung E.22: Lokalisation von VfNOD32-Transkripten in *V. faba* Knöllchen mittels Tissue-Print Hybridisierung.

In (a) ist die Detektion von VfNOD32-Transkripten mittels Tissue-Print Hybridisierung von longitudinalen Schnitten von Ackerbohnenknöllchen unter Verwendung einer VfNOD32-Antisense Riboprobe gezeigt. Abbildung (b) zeigt die Anfärbung zwecks Stärkenachweis im dazugehörigen Gewebeschnitt. Der Balken entspricht 400 µm. (Aus: Perlick *et al.*, 1996a)

In diesem Fall lässt sich die Interzone II-III im zentralen Knöllchengewebe auf dem angefärbten Gewebeschnitt gut erkennen (Abbildung E.22b). Eine vergleichbare Lokalisation des VfnOD32-Proteins in der Präfixierungszone lässt sich aus dem immunologischen Tissue-Print allerdings nicht ableiten.

Unter Verwendung der aufgereinigten VfnOD32-Antikörper war es auch möglich, mittels Elektronenmikroskopie von immunogoldmarkierten longitudinalen Ultra-Dünnschnitten VfnOD32 auf subzellulärer Ebene zu lokalisieren. Eine dichte Markierung mit kolloidalen Goldpartikeln wurde hierbei im Cytoplasma von infizierten und nicht infizierten Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III nachgewiesen (Abbildung E.23).

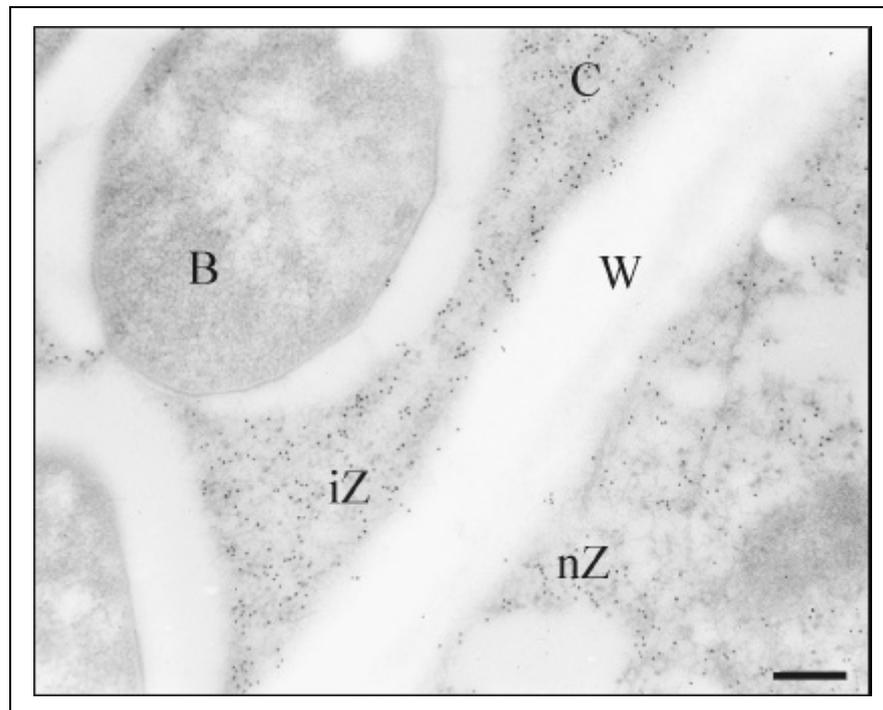


Abbildung E.23: Elektronenmikroskopische Lokalisation von VfnOD32 in *V. faba* Knöllchen. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Immunogoldmarkierungen auf einem longitudinalen Ultra-Dünnschnitt eines Ackerbohnenknöllchen. Aufgereinigte VfnOD32-Antikörper detektieren VfnOD32 im Cytoplasma von Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III. Der Balken entspricht 200 nm. Abkürzungen: C, Cytoplasma; B, Bakteroid; W, Zellwand; iZ, infizierte Zelle; nZ, nicht infizierte Zelle

Alle anderen Gewebe der untersuchten Knöllchen wie auch die angeschnittenen Wurzelgewebe zeigten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der immunologischen Tissue-Prints keine signifikanten Markierungen durch Goldpartikel. Die Kontrolle mit Präimmunsereum war in allen Geweben frei von signifikanten Immunogoldmarkierungen (Daten nicht gezeigt).

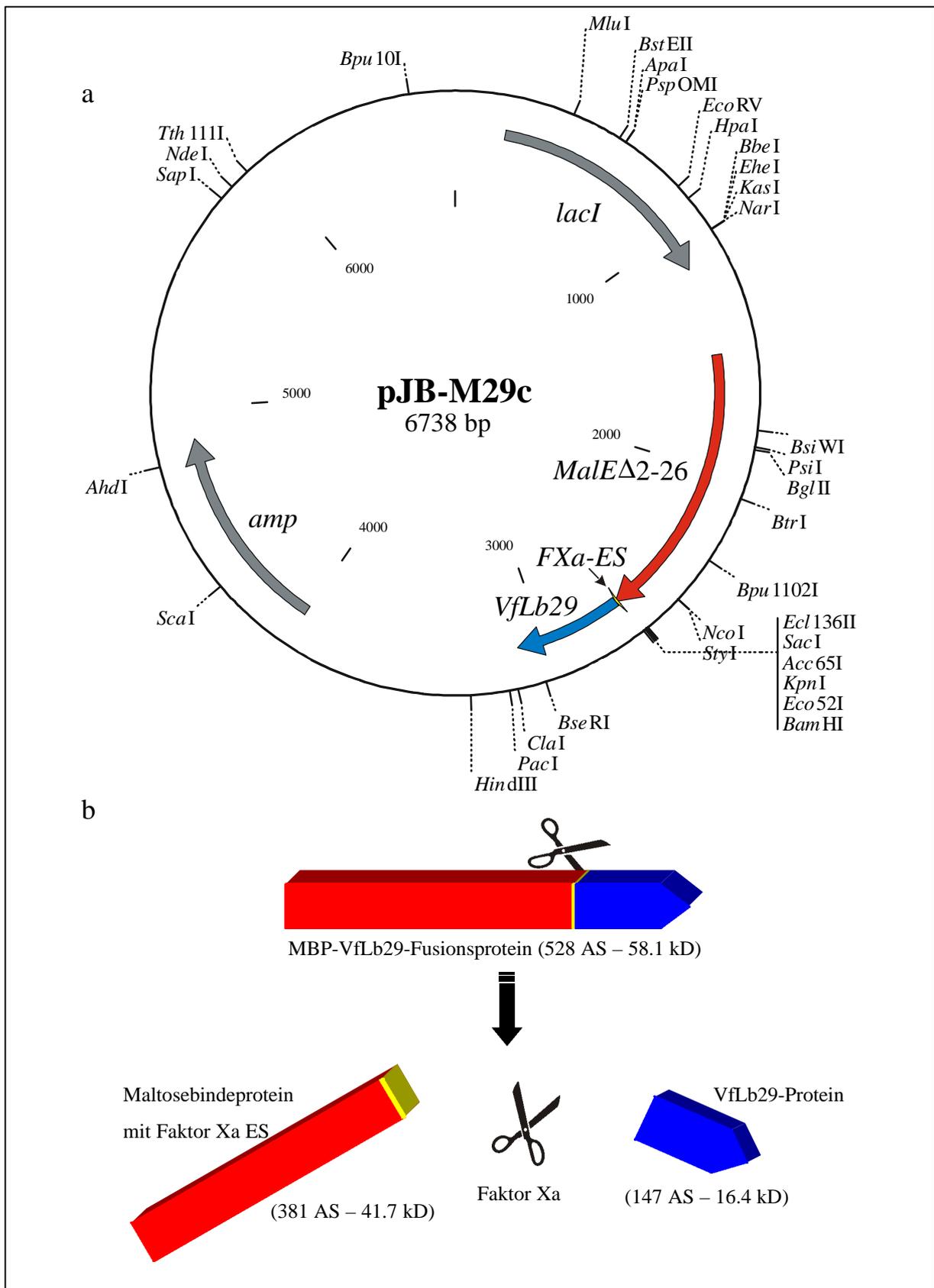
E.4 Das Leghämoglobin VfLb29

Frühere Studien haben gezeigt, dass VfLb29 sowohl Knöllchen- als auch Mykorrhiza-spezifisch exprimiert wird (siehe B.4.5). Die Funktion von Leghämoglobinen als Sauerstoff-bindende und -transportierende Hämproteine in den infizierten Zellen des Knöllchens ist bekannt. Über die Gewinnung eines gegen VfLb29 gerichteten Antiserums sollte im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese einer vergleichbaren Funktion des Leghämoglobins VfLb29 bei der Sauerstoffversorgung des Mykorrhizapilzes abgesichert werden.

E.4.1 Ein aufgereinigter VfLb29-Peptid-Antikörper detektiert rekombinantes VfLb29 aus *E. coli*, aber in Gesamtproteinextrakten aus *Vicia faba* Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln ist kein VfLb29 nachweisbar

Eine Voraussetzung für den Nachweis von VfLb29 in *V. faba* Geweben war die Gewinnung von VfLb29-spezifischen Antikörpern. Da es das Ziel war, einen polyklonalen Antikörper zu erhalten, der spezifisch das VfLb29-Antigen und nicht gleichzeitig auch die stark homologen Leghämoglobine aus *V. faba* Wurzelknöllchen detektiert, hätte die Überexpression, Aufreinigung und Immunisierung mit rekombinantem VfLb29-Protein wenig Aussicht auf Erfolg gehabt. Einzige Alternative war die Immunisierung mit einem Peptid, dessen Sequenz einen Bereich der VfLb29-Aminosäuresequenz abdecken sollte, die einerseits eine möglichst geringe Homologie zu den bekannten *V. faba* Leghämoglobinen VfLbB, VfLbK und VfLb49 aufwies und andererseits theoretisch von hoher Antigenität war. Anhand einer Computer-Analyse wurde eine Peptid-Sequenz ausgewählt, die den Aminosäuren 92-105 der VfLb29-Aminosäuresequenz entsprach (Abbildung E.24).

Die Synthese und Kopplung des Peptids sowie die anschließende Immunisierung von zwei Kaninchen wurde von Eurogentec (Belgien) durchgeführt. Die erhaltenen Antiseren wurden in Dot Blot Versuchen mit dem reinen Peptid getestet. So konnte gezeigt werden, dass die Antiseren Antikörper enthielten, die gegen das VfLb29-Peptid gerichtet waren (Daten nicht gezeigt). Erste Versuche, unter Verwendung dieser Antiseren VfLb29 in Gesamtproteinextrakten aus *V. faba* Wurzelknöllchen im Western Blot zu detektieren, blieben allerdings erfolglos (Daten nicht gezeigt). Um die Wahrscheinlichkeit der Detektion auch geringer Mengen an VfLb29 in Gesamtproteinextrakten zu erhöhen, wurden VfLb29-Peptid spezifische Antikörper aus den Antiseren aufgereinigt. Hierzu wurde ein Teil des reinen VfLb29-Peptids an Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose 4B immobilisiert. Die affinitäts-chromatographische Aufreinigung des VfLb29-Peptid-Antiserums an dieser Matrix resultierte in einer aufkonzentrierten VfLb29-Peptid spezifischen IgG-Fraktion. Um sicher zu stellen, dass diese aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörper nicht nur das VfLb29-Peptid detektieren konnten, sondern auch das gesamte VfLb29-Protein, wurde die Detektion von rekombinantem VfLb29 im Western Blot getestet. Hierzu musste zunächst ein geeignetes Expressionskonstrukt für die heterologe Expression in *E. coli* erstellt werden. Ausgangspunkt war das Plasmid p257-1



Der für VfLb29 kodierende Abschnitt des Plasmids wurde durch das IIT (Institut für Innovationstransfer, Universität Bielefeld) sequenziert und stimmte zu 100 % mit dem entsprechenden Bereich der cDNA überein. Der Stamm *E. coli* W3110 x pJB-M29c sollte bei Induktion mit IPTG das 528 Aminosäuren große Fusionsprotein MBP-VfLb29 mit einer theoretischen molekularen Masse von 58.1 kD synthetisieren (siehe Abbildung E.25b). Da dem Maltosebindeprotein durch eine Deletion der Aminosäuren 2 bis 26 die den Export ins Periplasma vermittelnde Signalsequenz fehlte, sollte sich das Fusionsprotein im Cytoplasma der Zellen anreichern. Die für eine Erkennungssequenz der Endopeptidase Faktor Xa kodierende Nukleotidsequenz im direkten Anschluss an die für das Maltosebindeprotein kodierende Sequenz sollte die Spaltung des Fusionsproteins in einerseits Maltosebindeprotein inklusive Erkennungssequenz mit einer theoretischen molekularen Masse von 41.7 kD und andererseits VfLb29-Protein mit einer theoretischen molekularen Masse von 16.4 kD ermöglichen (siehe Abbildung E.25b). Bedingt durch die Klonierungsstrategie war das Start-Methionin des rekombinanten VfLb29-Proteins deletiert.

Nach Expression in *E. coli* konnte das Fusionsprotein MBP-VfLb29 aus der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses mittels Affinitäts-Chromatographie an Amylose-Harz aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl dieses Fusionsprotein als auch seine Proteolyse-Produkte MBP und VfLb29 wurden im Western Blot mit aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörpern eingesetzt (Abbildung E.26a&b). Die transiente Ponceau-Färbung der Nitrocellulosemembran ließ in Spur 2 (Abbildung E.26a) im Gesamtzellextrakt des Stammes W3110 x pJB-M29c nach Induktion knapp oberhalb des 49.2 kD-Markers die deutliche Bande des Fusionsproteins MBP-VfLb29 erkennen. Nach Affinitäts-Chromatographie und Proteolyse des Fusionsproteins mit Faktor Xa waren in Spur 3 außer einem Rest des Fusionsproteins dessen Spaltprodukte Maltosebindeprotein (ca. 42 kD) und rekombinantes VfLb29 (ca. 16 kD) angefärbt. Sowohl das Fusionsprotein als auch das rekombinante VfLb29 wurden von den aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörpern spezifisch detektiert (Abbildung E.26b - Spur 2 und 3). Somit war sichergestellt, dass auch eine Detektion von VfLb29 in Gesamtproteinextrakten von *V. faba* Wurzelknöllchen erfolgen konnte, wenn genügend Antigen vorhanden war. Aber, obwohl in der Ponceau-Färbung der transferierten Gesamtproteine auf der für die Leghämoglobine zu erwartenden Laufhöhe von ca. 16 kD eine deutliche Bande zu sehen war (Abbildung E.26a - Spur 1), detektierten die VfLb29-Peptid-Antikörper kein Antigen in dieser Spur (Abbildung E.26b - Spur 1). Zum Vergleich wurde der gleiche Western Blot unter Einsatz eines gegen *Pisum sativum* Leghämoglobine gerichteten Antiserums (T. Bisseling, Wageningen, Niederlande) durchgeführt (Abbildung E.26a&b - Spuren 4 bis 6). Auf Grund der großen Homologien der Leghämoglobine der Leguminosen untereinander, war zu erwarten, dass diese polyklonalen, gegen Leghämoglobine aus der Erbse gerichteten Antikörper auch die Leghämoglobine der Ackerbohne detektieren konnten. Sowohl das Fusionsprotein MBP-VfLb29 als auch das rekombinante VfLb29 wurden gut erkannt, aber zusätzlich auch die bei ca. 16 kD bandierenden Leghämoglobine im *V. faba* Gesamtproteinextrakt aus Wurzelknöllchen (Spur 4). Obwohl also offensichtlich große Mengen an Leghämoglobinen im

V. faba Knöllchen-Gesamtproteinextrakt enthalten waren, wurde durch die aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörper kein VfLb29 in diesem Extrakt detektiert. Dieses Ergebnis zeigt aber auch deutlich, dass die Gewinnung von VfLb29-Peptid-spezifischen Antikörpern eine sehr erfolgreiche Strategie war, da die anderen, im Extrakt eindeutig nachweisbaren *V. faba* Leghämoglobine, trotz der klaren Homologien der *V. faba* Leghämoglobine untereinander von den aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörpern nicht detektiert wurden. Die gewonnenen Antikörper waren somit sehr spezifisch für VfLb29.

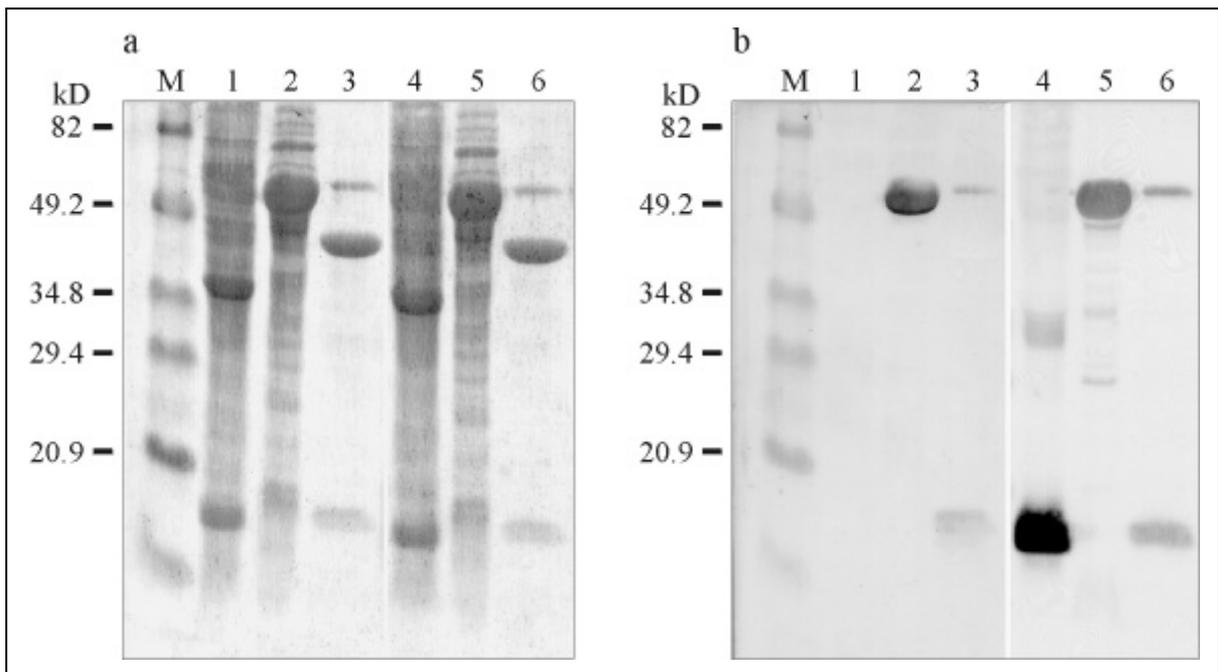


Abbildung E.26: Vergleichender Western Blot unter Einsatz der aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörper und eines gegen *P. sativum* Leghämoglobin gerichteten Antiserums.

Gesamtproteinextrakte von *V. faba* Knöllchen, Gesamtzellextrakte des *E. coli* Stammes W3110 x pJB-M29c nach der Induktion und Proteolyseprodukte des Fusionsproteins MBP-VfLb29 nach Faktor Xa Verdau wurden im Western Blot mit aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörpern (Spuren 1-3) und einem gegen *Pisum sativum* Leghämoglobin gerichteten Antiserum (Spuren 4-6) getestet. In (a) sind die transferierten Proteine auf der Nitrocellulosemembran mittels Ponceau-Färbung transient sichtbar gemacht, in (b) ist der entwickelte Blot gezeigt.

- | | |
|---|---|
| Spur M: Prestained Marker | |
| Spur 1: 30 µg <i>V. faba</i> Gesamtproteinextrakt von Knöllchen | } Detektion mit aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörpern |
| Spur 2: <i>E. coli</i> W3110 x pJB-M29c Gesamtzellextrakt | |
| Spur 3: MBP-VfLB29, MBP und VfLb29 nach Faktor Xa Verdau des Fusionsproteins MBP-VfLb29 | |
| Spur 4: 30 µg <i>V. faba</i> Gesamtproteinextrakt von Knöllchen | } Detektion mit <i>P. sativum</i> Leghämoglobin Antiserum |
| Spur 5: <i>E. coli</i> W3110 x pJB-M29c Gesamtzellextrakt | |
| Spur 6: MBP-VfLB29, MBP und VfLb29 nach Faktor Xa Verdau des Fusionsproteins MBP-VfLb29 | |

Es wurden weitere Western Blots mit zahlreichen Gesamtproteinextrakten von Knöllchen verschiedener *V. faba* Pflanzen unter Verwendung der aufgereinigten VfLb29-Peptid-Antikörper durchgeführt, aber in keinem der Extrakte konnte VfLb29 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso verhielt es sich mit Gesamtproteinextrakten aus mykorrhizierten Wurzeln (Material von V. Gianinazzi Pearson, INRA Dijon). Auch der Einsatz des hochsensitiven

Chemolumineszenz-Systems ECL-Plus führte in keinem Extrakt dieser beiden Symbiose-relevanten Gewebe der Ackerbohne zu einem Nachweis von VfLb29 (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend waren die Ergebnisse einer zellulären Lokalisation von VfLb29 mittels lichtmikroskopischer Untersuchung immunogoldmarkierter longitudinaler Semi-Dünnschnitte von Ackerbohnenknöllchen negativ (Daten nicht gezeigt). In einem Parallelversuch unter Einsatz des gegen *P. sativum* Leghämoglobin gerichteten Antiserums traten deutliche Signale im gesamten Cytoplasma der infizierten Zellen auf (Daten nicht gezeigt).

E.5 Das Protein VfCaMBP1

Für das Mykorrhiza-amplifiziert exprimierte Gen VfCaMBP1 lagen zunächst nur sehr kurze cDNAs vor, deren Sequenzanalyse keinerlei Rückschlüsse auf das kodierte Genprodukt zuließen (siehe B.4.5). Im Zuge der Vervollständigung der VfCaMBP1-cDNA ergaben sich erste Homologien zu Calmodulin-bindenden Proteinen. Ziel dieser Arbeit war es, die potentielle Interaktion zwischen Calmodulin und dem VfCaMBP1-Protein zu verifizieren und die Calmodulin-Bindestelle des VfCaMBP1-Proteins zu identifizieren. Außerdem sollte der Versuch eines Nachweises des VfCaMBP1-Genprodukts in mykorrhizierten Wurzeln und Knöllchen der Ackerbohne unternommen werden.

E.5.1 Die VfCaMBP1-Sequenz ist homolog zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen pflanzlicher Calmodulin-bindener Proteine

In Vergleichen mit aktuellen Datenbanken zeigte die abgeleitete VfCaMBP1-Aminosäuresequenz Homologien zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Calmodulin-bindenden Proteine TCB60 aus *Nicotiana tabacum* (Lu und Harrington, 1994), CanCBP aus *Cicer arietinum* (Genbank: CAB71126) und CBP-1&5 aus *Z. mays* (Reddy *et al.*, 1993). Die TCB60-cDNA wurde aus Tabakzellen-Suspensionskulturen gewonnen, das CanCBP-Transkript aus Epikotylen der Kichererbse und die CBP-5-cDNA aus Wurzelspitzen des Mais. Darüber hinaus ergaben sich Homologien zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von vier potentiellen Calmodulin-bindenden Proteinen aus *A. thaliana* (Genbank: AAD08944 und AAD18103 (Lin *et al.*, 1999), CAA18193 und T04234), deren Nukleotidsequenzen Genom-Sequenzierprojekten entstammten. Im multiplen Sequenzvergleich in Abbildung E.27 wurde zur besseren Übersichtlichkeit nur die längste der *A. thaliana* Sequenzen (AAD08944) und nur die längere CBP-5 Sequenz aus *Z. mays* aufgenommen. Ein Bereich besonders prägnanter Homologien ist der Sequenzbereich einer Calmodulin-Bindestelle, die im *N. tabacum* Protein TCB60 experimentell nachgewiesen worden war (Dash *et al.*, 1997; Lu und Harrington, 1994). Für das Protein CBP-5 aus *Z. mays* wurde für diesen Sequenzabschnitt eine Calmodulin-bindende Domäne vorausgesagt, aber bis dato noch nicht experimentell bestätigt (Reddy *et al.*, 1993). Sowohl für CBP-5 als auch für CanCBP ist zu beachten, dass es sich bei den zugrunde liegenden Transkripten um unvollständige mRNAs handelt, so dass auch nur ein C-terminaler Bereich der Aminosäuresequenzen abgeleitet werden konnte.

Eine Analyse der VfCaMBP1-Aminosäuresequenz mit Hilfe des PROSITE-Profile Programms führte zur Identifikation eines potentiellen Kernlokalisierungssignals im Bereich der Aminosäuren 27 bis 44 (Abbildung E.27). Die Konsensussequenz eines solchen „bipartite nuclear localization signal“ besteht aus zwei aufeinander folgenden basischen Aminosäuren (Lysin (K) oder Arginin (R)), gefolgt von einem Zwischenraum mit 10 beliebigen Aminosäuren, der wiederum gefolgt wird von fünf Aminosäuren, von denen mindestens drei basisch sein müssen (Dingwall and Laskey, 1991; Robbins *et al.*, 1991). Zur besseren Veranschaulichung sind die basischen Aminosäuren des potentiellen Kernlokalisierungssignals der VfCaMBP1-Sequenz in Abbildung E.27 fett gedruckt.

Für eine Vielzahl CaM-bindender Proteine ist bekannt, dass sie sogenannte PEST-Sequenzen empfindlich für eine Proteolyse durch endogene neutrale Proteasen machen (Barnes und Gomes, 1995). Mit Hilfe des Programms PEST-FIND (Rogers *et al.*, 1986) konnte für VfCaMBP1 eine potentielle PEST-Sequenz gefunden werden. Sie umfasst den Bereich der Aminosäuren 409 bis 444, beginnend und abschließend mit basischen Histidin-Resten (Abbildung E.27). Mit einem errechneten PEST-Wert von -3.27 zählt sie zu den schwachen PEST-Sequenzen. Sie ist im C-Terminus und in der Nähe der potentiellen CaM-Bindedomäne des VfCaMBP1-Proteins lokalisiert, was für 50 % der von Barnes und Gomes (1995) untersuchten Calmodulin-bindenden Proteine ebenso der Fall war.

Der Einfluss, den die Phosphorylierung von Serin-/Threoninresten auf die CaM-Affinität vieler CaM-bindender Proteine hat (Crivici und Ikura, 1995), legte es nahe, auch die VfCaMBP1-Aminosäuresequenz auf das Vorkommen und die Verteilung eventueller Zielsequenzen für eine entsprechende Phosphorylierung hin zu untersuchen. Unter Verwendung des Programms PROSITE-Profile konnte an Position 495 der VfCaMBP1-Aminosäuresequenz eine mögliche Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle in der potentiellen CaM-Bindestelle identifiziert werden und an den Positionen 476, 502 und 520 weitere in unmittelbarer Nähe (Konsensussequenz (ST)-x-(RK); Kishimoto *et al.*, 1985; Woodgett *et al.*, 1986). Die Positionen sind in Abbildung E.27 mit Sternen über der VfCaMBP1-Sequenz gekennzeichnet. Besonders auffällig ist die unmittelbar N-terminal zur möglichen CaM-Bindedomäne liegende potentielle Phosphorylierungsstelle an Position 176, da sie als einzige in allen in diesem Alignment enthaltenen homologen Proteinen konserviert ist.

Abbildung E.27 (folgende Seite): Multipler Sequenzvergleich der abgeleiteten VfCaMBP1-Aminosäuresequenz mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen pflanzlicher Calmodulin-bindender Proteine.

Der multiple Sequenzvergleich der VfCaMBP1-Aminosäuresequenz mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von drei Calmodulin-bindenden Proteinen und einem potentiell Calmodulin-bindenden Protein wurde mittels CLUSTALW gefolgt von Boxshade erstellt. VfCaMBP1-Aminosäurereste, die in wenigstens 50 % der Sequenzen konserviert sind, sind invers dargestellt (schwarz: identische Aminosäuren; grau: konservative Austausch). Umrahmte Bereiche markieren die Aminosäuresequenz des potentiellen Kernlokalisierungssignals der VfCaMBP1-Sequenz (basische Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben) und die Aminosäuresequenz der experimentell ermittelten CaM-Bindedomäne des CaM-bindenden Proteins TCB60 aus *N. tabacum*. Die potentielle PEST-Sequenz des VfCaMBP1-Proteins ist als Pfeil über der Sequenz angegeben. Mögliche Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen des VfCaMBP1-Proteins in und um die hypothetische CaM-Bindedomäne sind über der Sequenz mit Sternen markiert. Abkürzungen: (At) *Arabidopsis thaliana*; (Nt) *Nicotiana tabacum*; (Ca) *Cicer arietinum*; (Zm) *Zea mays*.

pot. Kernlokalisierungssignal

VfCaMBP1	1	-----MRFGMVSGKQARKDHRSSKIPILGS	KRNHGVTKQTSNSRLKR	MLKRMNAHDSL
At_AAD08944	1	MQTRYMERTNSMREKRKLEEDNDQQQQQPERKRPALASVIVEALKMDSLQRLCSSLEPIILRRVVSILIRI		
Nt_T03793	1	-----		
Ca_CAB71126	1	-----		
Zm_T03250	1	-----		
VfCaMBP1	55	LMKSFIRG-----EVRDEVERKFQELLVSREKIN-----EG--GRS--GARSLELCFINNKL	PI	
At_AAD08944	71	VYMSFGALCCFFGLLICFVSVKQVSEEVERALAKLGPARLSERSSPKRIEGIGGRNLQLQFRSRLSV	PL	
Nt_T03793	1	-----MEETCSFSSGLGYLY	PL	
Ca_CAB71126	1	-----		
Zm_T03250	1	-----		
VfCaMBP1	106	TTYTKTNIIPNDEPFQVAIFDVR	SKSIVNDGPFSSIKIEICPIKGEFESVDD	EDWTENEFNGNILHERKN
At_AAD08944	141	FTGGKIEGEQAA-IHVVLDMT	TGHVLTVGPESAKLDVVVLGD	FNTEDDGWSGEEFEGHLVKERQG
Nt_T03793	18	FTGAKVEGEHGAA-IHVVL	ADTGHVLTGAE	SCIKLDVVVLEGD
Ca_CAB71126	1	-----		
Zm_T03250	1	-----		
VfCaMBP1	176	KEPLLVGDRFVTL	ENGVASISKIMFN	DNSGVRN
At_AAD08944	210	KRPLLTGDVQVTLKEGVGT	IGELIFTDNSSWIRCRK	FRLGLRVSSGYCEGMRVREAKTEAF
Nt_T03793	87	KRPLLTGELQVTLKGGVGT	IGDITFTDNSSWIRSRK	FRLGMKVASGYCEGVRIREAKTEAF
Ca_CAB71126	1	-----		
Zm_T03250	1	-----		
VfCaMBP1	243	FKKHYPPFLNDYV	VWRKLISKNGPF	FKHLR-----
At_AAD08944	280	YKKHYPPALDDEV	VRLKIKDGA	FHKKLNKAGIYNVKEFLRLMVKDSQKLR
Nt_T03793	157	YKKHYPPALND	DVWRLEKIKDGS	FKHLNKA
Ca_CAB71126	1	-----		
Zm_T03250	1	-----		
VfCaMBP1	273	-----DYEIHT	VKDLLRLLIINEASLHOK	-----FGKIQNE
At_AAD08944	350	SKTCVLSEMLYVYYPEDS--VG	VFNNIYEFSGISGQYYPADSLSD	NQKGYVDGLVRKAYENWEQVIE
Nt_T03793	227	AKTCVLSGKLYVYYSDDSR	NVGVFNNIYELNGIAGEQYYSADSLSD	SOKVYVDSLVRKAYENWNQVVE
Ca_CAB71126	1	-----ITNDQYYSADSL	SNSOKVYVDTLVRKAYENWMHVIE	
Zm_T03250	1	-----RNNIYAFCG	ISGEQFYSSSELDD	SOKLFDALVRKAYENWMYVIE
VfCaMBP1	311	HARSCVDFDKLYGYEMIG---	QPIILLFNVI	FELVG-----VFDAQ-----EF---Y
At_AAD08944	418	YDSKSLMNFNQVSKTDDI---	DYSMPVSVPSQ-----STSYSDVT-----V--EAY	
Nt_T03793	297	YDGKSLNLIKQNKAGSS---	RNELPVG	PVDVYNN--MVNQLPQSRP
Ca_CAB71126	37	YDGKSLNLYNQNRNLGMS---	QPVVPGSHDYSISNSLDQ	QISIPSPVPVPTGQPSMDPSATVG--GY
Zm_T03250	47	YDGKSLNPKPKKKSASTGQ	VETHALRVG	PLDYSNN-----TMSSMACQ-----G---H
VfCaMBP1	354	LPDDLTLTENQKNLVET-----	VKQDAYRNT	EKLKAIDEAALNSISLEACIKSTQEQDL
At_AAD08944	460	NQSPASSFPQGSOLADIT	TYMHFGNSSFAPQDI	VNTHESQSMINSNGGVRALGPATGSON
Nt_T03793	361	NDSIVARMPNCSQMMNS-	SSRSQFESTPFA	QQITNTHQLQSTSYDNNVGLALGPPQSSSF
Ca_CAB71126	101	HHGTTFGFSIQPHNSNL	NSSIQFGNTAFPLQNL	TSASHQSOLPTNDNELSLGPPQSATPGFQ
Zm_T03250	93	HHQLELILQGMAS	TKSQHIHLSCR	VHPPMSRHHMT
VfCaMBP1	416	-----NGNDGMQNI	EMNVD	PVEDIGETIPENNYCHSTENLIN-----VG
At_AAD08944	529	PPEINSYNDWSNTCN	RGVDFLSEEE	IRARSNEMLEND
Nt_T03793	430	QTNLNPFEDWPHNRD	KGVDFLSEEE	IRMRSHEITLEND
Ca_CAB71126	171	-----TYRGF	EDFFPEED	IRMRSHEITLEND
Zm_T03250	163	FSQQTWDMVIGPGT	VTVSILMTSLK	TFLRATSLLEGED
VfCaMBP1	459	EWSTLVDLLNSD	MEISNSEKPKA	LWCKIRAVVKLGI
At_AAD08944	597	SFGQTSMADYEEDR-	SNSGKAVV	GWLKIKAA
Nt_T03793	498	MPSPTFGYDEDP-	KPSGKAVV	GWLKIKAA
Ca_CAB71126	228	MPATSIYNMDD	ERNRSSGKAVV	GWLKIKAA
Zm_T03250	229	MPSMPNLGFET	ERTHSSGKAVV	GWLKIKAA

CaM-Bindedomäne (Nt)

E.5.2 Die potentielle VfCaMBP1 CaM-Bindedomäne weist eine basische amphiphatische Helix und ein 1-8-14 B Motiv auf

Auf Grundlage der theoretischen Anforderungen an eine Calmodulin-Bindestelle und der Erkenntnisse über die Calmodulin-Bindestelle des Proteins TCB60 aus *N. tabacum* (Dash *et al.*, 1997) wurde die potentielle Calmodulin-Bindestelle von VfCaMBP1 einer genauen Untersuchung unterzogen. In einer amphiphatischen α -Helix sind hydrophobe Seitenketten auf der einen Seite der Helix exponiert und hydrophile auf der anderen. Abbildung E.28 zeigt die Aminosäuren der CaM-Bindestelle des Proteins TCB60 und der potentiellen CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 in einer Darstellung als helikales Rad erstellt mit dem Programm ANTHEPROT. Eine Projektion als helikales Rad zeigt eine Ansicht an der Achse der Helix herab, wobei die Aminosäurereste in der Form eines Rades arrangiert sind. Angenommen, die Helix vollzieht alle 3.6 Aminosäurereste eine ganze Drehung, so wiederholt sich das Muster alle 18 Aminosäurereste.

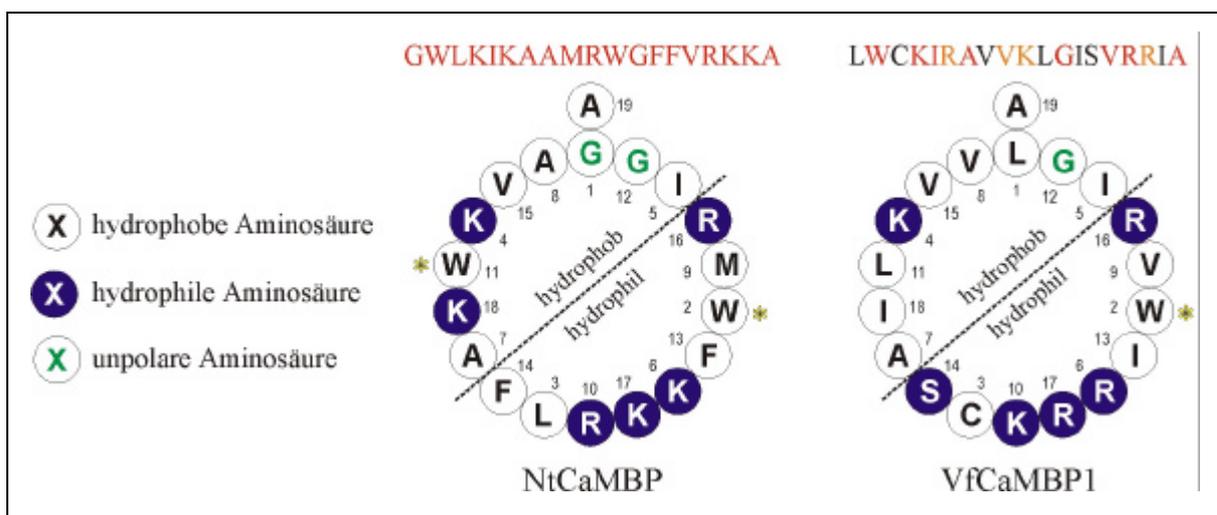


Abbildung E.28: Projektion der Aminosäuren der CaM-Bindestelle des Proteins TCB60 und der potentiellen CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 als helikales Rad.

In dieser Darstellung der Aminosäuren der CaM-Bindestelle des Proteins TCB60 und der potentiellen CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 als helikales Rad sind die hydrophoben, hydrophilen und unpolaren Aminosäuren verschiedenfarbig hervorgehoben. Eine gestrichelte Linie unterteilt die α -Helix in eine hypothetisch hydrophile und eine hypothetisch hydrophobe Seite. Tryptophanreste sind durch gelbe Sterne markiert. Über dem jeweiligen helikalen Rad ist die Polypeptidkette in linearer Form angegeben. In der VfCaMBP1-Sequenz sind mit der TCB60-Sequenz identische Aminosäuren rot gedruckt und konservative Austausche orange.

Wie aus der Abbildung E.28 ersichtlich, erfüllen sowohl die Aminosäurereste der CaM-Bindestelle des Proteins TCB60 als auch die der potentiellen CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 die Kriterien einer basischen, amphiphatischen Helix. Zusätzlich wiesen beide Sequenzen als weiteres Kennzeichen für eine potentielle CaM-Bindestelle mindestens einen Tryptophanrest auf (O'Neil und DeGrado, 1990). Die beiden Sequenzabschnitte zeigten eine für CaM-Bindestellen auffallend starke Homologie. Dies war insbesondere deshalb ungewöhnlich, weil die geringen Anforderungen an eine funktionelle CaM-Bindestelle ein hohes Maß an

Sequenzvariabilität erlauben. Die potentielle CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 beinhaltet darüber hinaus einen Sequenzbereich, der die Kriterien des 1-8-14 Typ B Motivs für Calmodulin-Bindung erfüllt. Beginnend mit der zweiten Aminosäure der potentiellen CaM-Bindestelle zeichnet sich die Sequenzabfolge (W)xxxxxx(V)xxxxx(V) durch hydrophobe Aminosäurereste an den Positionen 1, 8 und 14 aus und die Nettoladung für diesen Sequenzbereich liegt mit einem Wert von +3 im zulässigen Wertebereich von +2 bis +4. Zusammenfassend ließ sich anhand der Analysen die Hypothese aufstellen, dass die Aminosäuren 482 bis 500 der VfCaMBP1-Sequenz eine Calmodulin-bindende Domäne bilden und somit VfCaMBP1 ein Calmodulin-bindendes Protein ist.

E.5.3 Ein aufgereinigter VfCaMBP1-Antikörper detektiert rekombinantes VfCaMBP1 aus *E. coli*, aber in Gesamtproteinextrakten aus *Vicia faba* Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln ist kein VfCaMBP1 nachweisbar

Für einen immunologischen Nachweis von VfCaMBP1 und die Verifizierung der Hypothese, dass es sich bei VfCaMBP1 um ein Calmodulin-bindendes Protein handelt, war die heterologe Expression von VfCaMBP1 als Fusionsprotein in *E. coli* und die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins unbedingte Voraussetzung. V.-A. Pham hat daher im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Pham, 1999) den unvollständigen, kodierenden Sequenzabschnitt der zu diesem Zeitpunkt längsten bekannten VfCaMBP1-cDNA VfNDS-X8 λ #84 (λ gt11-Derivat, Strangmann, 1998) in den Expressionsvektor pWH844 (Schirmer *et al.*, 1997) kloniert. Dieser kodierte somit für ein Fusionsprotein aus His-Tag und den Aminosäuren 289 bis 524 der VfCaMBP1-Sequenz (His-VfCaMBP1 Δ N). Trotz einer theoretischen molekularen Masse von 27.9 kD bandierte es in der SDS-DISKPAGE bei ca. 33 kD (Abbildung E.29). Das von V.-A. Pham über Affinitäts-Chromatographie und präparative SDS-DISKPAGE aufgereinigte Fusionsprotein wurde von ihr zur Gewinnung VfCaMBP1-spezifischer polyklonaler Antikörper eingesetzt. Diese standen mir nebst aufgereinigtem Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N zum Ende ihrer Diplomarbeit zur Verfügung.

Die erhaltenen polyklonalen Antiseren detektierten zwar das Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N im Western Blot, darüber hinaus kam es aber auch zu einer Detektion von Proteinen in Extrakten des Kontroll-Stammes *E. coli* W3110 x pWH844 (Abbildung E.29). Daher musste das Antiserum einer Aufreinigung an rekombinantem VfCaMBP1 unterzogen werden. Zur Gewinnung ausreichender Mengen des Proteins wurde das von V.-A. Pham konstruierte Expressionsplasmid pPMP-X8 (Pham, 1999) verwendet, das ein Fusionsprotein aus Maltosebindepotein mit N-terminaler Signalsequenz zum Transport ins Periplasma, gefolgt von der Erkennungssequenz für die Endoprotease Faktor Xa und den Fusionsanteil VfCaMBP1 Δ N kodierte. Dieses MBP-VfCaMBP1 Δ 1 Fusionsprotein hatte nach Abspaltung des Signalpeptids eine theoretische molekulare Masse von 68.2 kD. Nach Expression des Fusionsproteins durch IPTG-Induktion des Produzenten *E. coli* W3110 x pPMP-X8,

Aufschluß des Periplasmas und Affinitäts-Chromatographie an Amylose-Harz resultierte eine Auftrennung des Eluats in der SDS-DISKPAGE in einer Bande, deren Laufstrecke einer molekularen Masse von ca. 68 kD entsprach (Daten nicht gezeigt). Das Eluat wurde in einer SDS-DISKPAGE im präparativen Maßstab aufgetrennt und dann auf Nitrocellulose geblottet. Nach transienter Ponceau-Färbung wurde die prominente Bande, die das Fusionsprotein MBP-VfCaMBP Δ 1 repräsentierte, herausgeschnitten und zur Aufreinigung VfCaMBP1-spezifischer Antikörper genutzt. Diese aufgereinigten Antikörper detektierten im Western Blot weiterhin das Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N, aber keine Proteine mehr in Extrakten des Kontrollstammes *E. coli* W3110 x pWH844 (Abbildung E.29). Sie waren somit für einen spezifischen Nachweis von VfCaMBP1 geeignet. Dennoch ließ sich VfCaMBP1 in Gesamtproteinextrakten von *V. faba* Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln mittels Western Blot unter Verwendung der aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörper nicht nachweisen (Abbildung E.29). Gleiche Ergebnisse ergaben sich auch bei Verwendung des hochsensitiven Chemolumineszenz-Systems ECL-Plus zur Detektion (Daten nicht gezeigt).

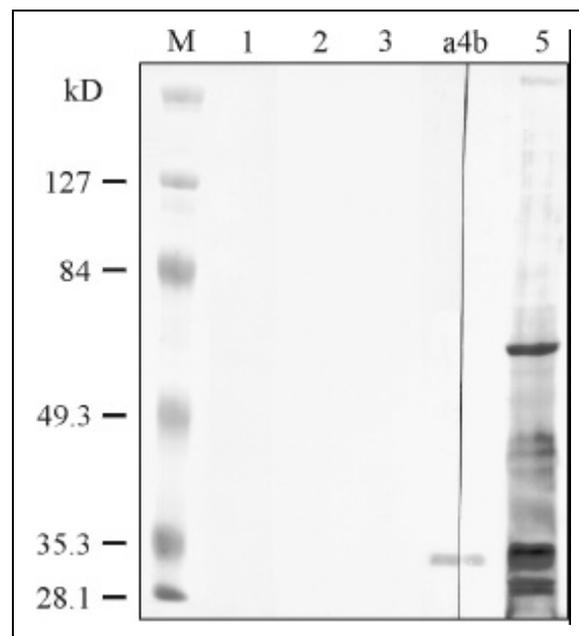


Abbildung E.29: Vergleichender Western Blot unter Einsatz der aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörper und des nicht aufgereinigten VfCaMBP1-Antiserums.

Gesamtzellextrakte des *E. coli* Stammes W3110 x pWH844 (Spuren 3 und 5), das aufgereinigte Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N (Spuren 4a&b) und Gesamtproteinextrakte von *V. faba* Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln (Spuren 2 und 3) wurden im Western Blot mit den aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörpern (Spuren 1-4a) und dem nicht aufgereinigten VfCaMBP1-Antiserum (Spuren 4b und 5) getestet.

- | | | |
|----------|---|---|
| Spur M: | Prestained Marker | |
| Spur 1: | 50 μ g <i>V. faba</i> Gesamtproteinextrakt von Knöllchen | } Detektion mit aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörpern |
| Spur 2: | 50 μ g <i>V. faba</i> Gesamtproteinextrakt von myk. Wurzeln | |
| Spur 3: | <i>E. coli</i> W3110 x pWH844 Gesamtzellextrakt | |
| Spur 4a: | 5 ng aufgereinigtes His-VfCaMBP1 Δ N | } Detektion mit nicht aufgereinigtem VfCaMBP1-Antiserum |
| Spur 4b: | 5 ng aufgereinigtes His-VfCaMBP1 Δ N | |
| Spur 5: | <i>E. coli</i> W3110 x pWH844 Gesamtzellextrakt | |

Im Rahmen eines Forschungsaufenthalts bei V. Gianinazzi Pearson (INRA, Dijon) wurden daraufhin Gesamtproteinextrakte von frisch mykorrhizierten *V. faba* Wurzeln hergestellt. Hierbei wurde eine Pflanze vor der Proteinextraktion auch für 12 Stunden Stressbedingungen ausgesetzt (Dunkelheit und 6 °C), da es denkbar ist, dass die Expression eines Calmodulin-bindenden Proteins unter Stressbedingungen gesteigert wird. Aber auch in diesen Extrakten aus Dijon detektierten die aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörper im Western Blot selbst unter Verwendung des ECL-Plus Systems kein VfCaMBP1 (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend verliefen die Versuche einer subzellulären Lokalisation von VfCaMBP1 mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung immunogold-markierter longitudinaler Ultra-Dünnschnitte von Ackerbohnenknöllchen negativ (Daten nicht gezeigt).

E.5.4 Calmodulin aus *Vicia faba* kann spezifisch an His-VfCaMBP1ΔN binden

Für eine erfolgreiche Bindung von Calmodulin an Calmodulin-bindende Proteine muss die Aminosäuresequenz des Calmodulin-bindenden Proteins nicht vollständig sein, wie es unter anderem das Beispiel der CaM-bindenden Proteine CBP-1 und CBP-5 aus *Z. mays* zeigt (Reddy *et al.*, 1993). Die Aminosäuresequenz lässt sich vielmehr bis auf die eigentliche CaM-bindende Domäne verkürzen, wie zum Beispiel die Experimente mit verkürzten Formen des CaM-bindenden Proteins TCB60 aus *N. tabacum* eindrucksvoll unter Beweis stellen (Lu *et al.*, 1995). Calmodulin sollte also auf Grund der für VfCaMBP1 postulierten CaM-Bindedomäne an das Fusionsprotein His-VfCaMBP1ΔN binden können. Um diese Interaktion experimentell nachweisen zu können, wurde zunächst mit Hilfe von C. Zeilinger (Institut für Biophysik, Hannover) *V. faba* Calmodulin aus Blättern der Ackerbohne isoliert und aufgereinigt. Abbildung E.30 zeigt eine Probe des aufgereinigten Calmodulins nach Auftrennung in einer SDS-DISKPAGE. Es bandiert ebenso wie reines Calmodulin aus Blättern des Spinats (zur Verfügung gestellt von C. Zeilinger) bei etwa 14-15 kD, obwohl die überwiegende Anzahl pflanzlicher Calmoduline eine molekulare Masse von ca. 16.8 kD aufweist (Zielinski, 1998). Es handelt sich hierbei jedoch um ein für Calmoduline und andere Proteine mit EF-Hand Aufbau typisches Laufverhalten in der SDS-DISKPAGE, das sich durch eine scheinbare molekulare Masse von ca. 17 kD in Gegenwart von EDTA und ca. 15 kD in Gegenwart von Ca²⁺ auszeichnet (Klee und Vanaman, 1982).

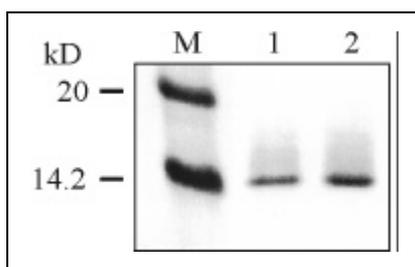


Abbildung E.30: SDS-DISKPAGE von aufgereinigtem Calmodulin aus Blättern der Ackerbohne und von Spinat.

Gezeigt ist eine Coomassie-gefärbte analytische SDS-DISKPAGE (15 %) von aufgereinigtem Calmodulin aus Blättern der Ackerbohne und aufgereinigtem Calmodulin aus Spinatblättern.

Spur M: Dalton Marker VII-L

Spur 1: 2.55 µg aufgereinigtes Calmodulin aus Ackerbohnenblättern

Spur 2: 2.55 µg aufgereinigtes Calmodulin aus Spinatblättern

Unter Verwendung des aufgereinigten Fusionsproteins His-VfCaMBP1 Δ N, des aufgereinigten *V. faba* Calmodulins und der aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörper wurde ein Testsystem entwickelt, das den Nachweis einer Bindung von Calmodulin an VfCaMBP1 erlaubt. Wie in Abbildung E.31 schematisch dargestellt und in der Bildunterschrift detailliert erläutert, beruht es auf der Bindung von His-VfCaMBP1 Δ N durch das immobilisierte, aktivierte Calmodulin und den nachfolgenden immunologischen Nachweis dieses Komplexes.

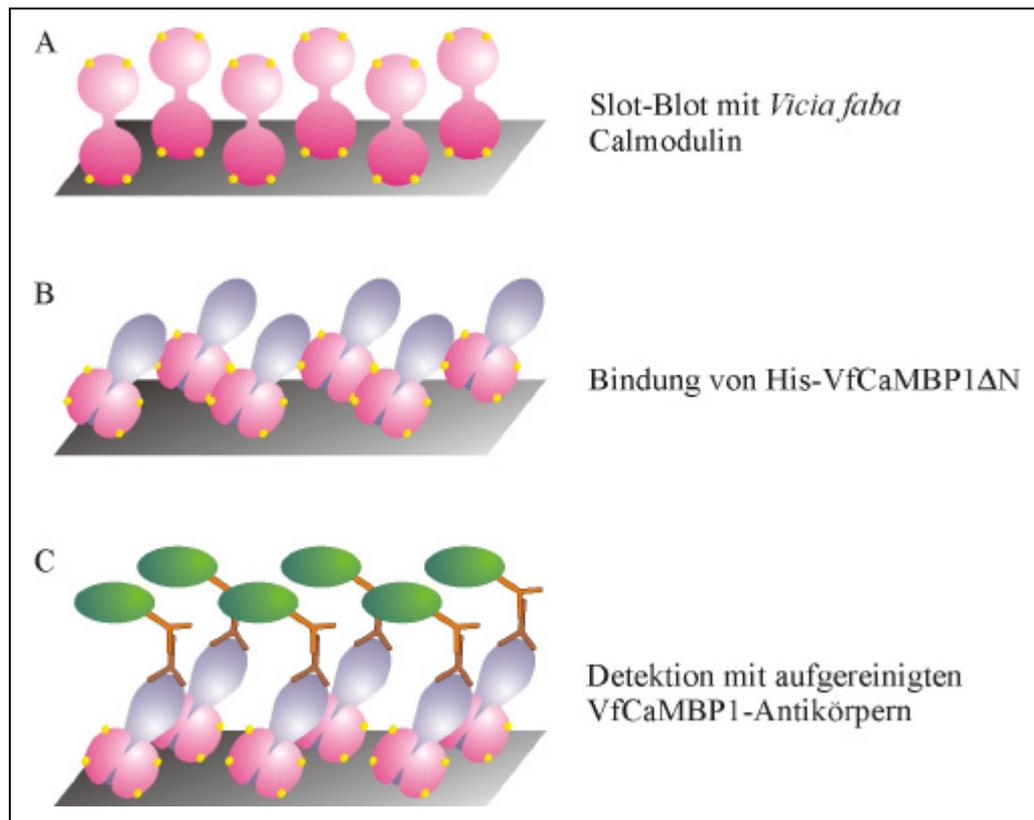


Abbildung E.31: Schematische Darstellung des Testsystems zum Nachweis der Bindung von Calmodulin an VfCaMBP1.

Das Testablauf zum Nachweis der Bindung von Calmodulin an VfCaMBP1 lässt sich in drei Phasen unterteilen (A-C). In Phase A wird *V. faba* Calmodulin (rot) per Slot Blot-Verfahren an einer Nitrocellulose-Membran (grau) immobilisiert. Enthält der Puffer Ca^{2+} -Ionen (gelb), so liegt das Calmodulin in seiner aktivierten Form vor. In Phase B wird die Membran mit einem Puffer inkubiert, der das aufgereinigte Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N (blau) in Lösung enthält. Das aktivierte Calmodulin kann an die CaM-Bindedomäne des Fusionsproteins binden. In Phase C wird in Analogie zu den Detektionsschritten in einem Western Blot zunächst das Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N von den aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörpern (braun) detektiert. Diese wiederum werden dann von einem sekundären Antikörper detektiert (orange), an den das Enzym alkalische Phosphatase (grün) gebunden ist, das zum Farbnachweis des Komplexes dient.

Die Abbildung E.32 zeigt die Ergebnisse des eigentlichen Tests (Streifen A) nebst drei Kontrollen (Streifen B bis C). Auf den Streifen selber war an den Spuren 1 und 2 je 250 ng bzw. 500 ng *V. faba* Calmodulin (VfCaM) aufgeblottet, die Spuren 3 (500 ng BSA) und 4 (5 ng His-VfCaMBP1 Δ N) dienten wiederum als Kontrollen. Die einzelnen Positionen lassen sich wie in einem Koordinatensystem angeben - so beschreibt die Position A1 beispielsweise die Spur 1 des Streifen A.

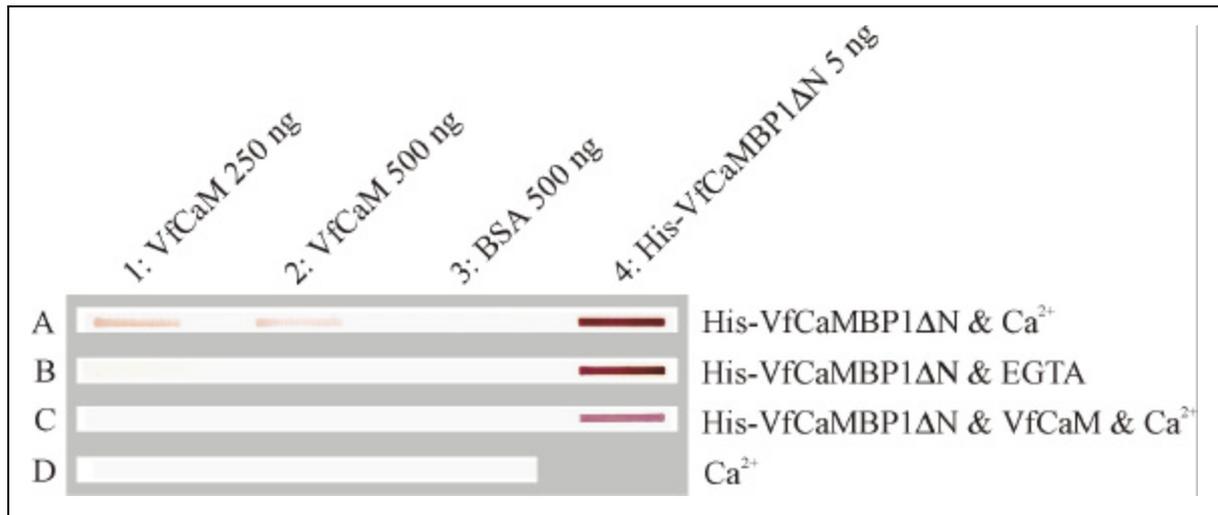


Abbildung E.32: Slot Blot-Versuch zum Nachweis der Bindung von Calmodulin an VfCaMBP1.

Gezeigt ist die Detektion des Fusionsproteins His-VfCaMBP1 Δ N unter Verwendung der aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörper. Der Streifen A stellt den eigentlichen Versuch dar, die Streifen B bis C zeigen die Ergebnisse von dazugehörigen Kontrollexperimenten. Über den Spuren sind die auf der Membran immobilisierten Proteine und deren Mengen angegeben, rechts neben den Streifen die Zusätze in der Lösung mit der der jeweilige Streifen inkubiert wurde.

Streifen A: Inkubation mit 0.6 μ g aufgereinigtem His-VfCaMBP1 Δ N in Ca²⁺-haltigem Puffer

Streifen B: Inkubation mit 0.6 μ g aufgereinigtem His-VfCaMBP1 Δ N in EGTA-haltigem Puffer

Streifen C: Inkubation mit 0.6 μ g aufgereinigtem His-VfCaMBP1 Δ N und 3.2 μ g aufgereinigtem *V. faba* Calmodulin in Ca²⁺-haltigem Puffer

Streifen D: Inkubation nur mit Ca²⁺-haltigem Puffer

Durch die Signale an den Positionen A1&2 wurde bewiesen, dass VfCaM in seiner aktivierten Form an das Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N binden kann. Beim Vergleich der beiden Signalstärken fiel auf, dass die größere Menge an VfCaM nicht etwa mehr sondern weniger His-VfCaMBP1 Δ N gebunden hatte. Eine mögliche Erklärung wäre eine sterische Hinderung der Bindung bei zu großen Mengen von immobilisiertem VfCaM. Das Protein BSA an Position A3, das keine CaM-Bindedomäne aufweist, zeigt kein Signal (negative Kontrolle). Das starke Signal an Position A4 wurde durch die Detektion des direkt an der Membran immobilisierten Fusionsproteins hervorgerufen (positive Kontrolle). Die Stärke des Signals ließ eine relative Abschätzung der Menge an His-VfCaMBP1 Δ N zu, die von VfCaM gebunden wurde (A1&2). Die Komplexierung von Ca²⁺-Ionen durch zum Beispiel EGTA führt zu einer Inaktivierung von Calmodulin, das daraufhin nicht mehr an die CaM-Bindedomänen CaM-bindender Proteine binden kann. Dementsprechend zeigt sich im Kontrollversuch mit EGTA an den Positionen B1&2 kein Signal. Die Bindung von His-VfCaMBP1 Δ N durch VfCaM war also Ca²⁺-abhängig. Die Ergebnisse der negativen (B3) und der positiven Kontrolle (B4) stimmten mit denen des Streifen A überein.

Im Kontrollversuch, dessen Ergebnisse der Streifen C zeigt, wurde dem Ca²⁺-haltigen Puffer, der das Fusionsprotein His-VfCaMBP1 Δ N enthielt, *V. faba* Calmodulin im Überschuss zugegeben, so dass das gebundene VfCaM und das VfCaM in Lösung um die CaM-bindende Domäne des Fusionsproteins konkurrierten. Dadurch wurde die Bindung am immobilisierten

Calmodulin so stark reduziert, dass die gebundene Menge an Fusionsprotein für eine Detektion durch die Antikörper nicht mehr ausreichte (C1&2). Die Ergebnisse der negativen (C3) und der positiven Kontrolle (C4) stimmten mit denen der Streifen A und B im Wesentlichen überein. Auffallend war allerdings, dass das Signal der positiven Kontrolle in C4 deutlich schwächer war als die Signale in A4 und B4. Diese schwächere Detektion wurde möglicherweise durch eine Bindung des gelösten VfCaM an die CaM-bindende Domäne des immobilisierten His-VfCaMBP1 Δ N verursacht, da dieses zu einer sterischen Hinderung bei der Bindung der aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörper an das Antigen führen konnte.

Die Ergebnisse des Kontrollversuchs, bei dem im Ca²⁺-haltigen Puffer weder His-VfCaMBP1 Δ N noch VfCaM enthalten waren, zeigt der Streifen D. Um jegliche Kontamination mit dem Fusionsprotein zu vermeiden, wurde auf die positive Kontrolle (D4) verzichtet. Die fehlenden Signale an den Positionen D1&2 zeigen, dass die Signale auf dem Streifen A in den Positionen 1&2 auf die Bindung des Fusionsproteins His-VfCaMBP1 Δ N durch das immobilisierte *V. faba* Calmodulin zurückzuführen sind und nicht etwa auf die Detektion eines anderen Proteins.

Mit diesem Slot Blot-Versuch konnte also bewiesen werden, dass VfCaMBP1 ein Calmodulin-bindendes Protein ist. Außerdem ließ die Verwendung des Fusionsproteins His-VfCaMBP1 Δ N in diesem Test den Rückschluss zu, dass die CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 im Bereich der Aminosäuren 289 bis 524 der VfCaMBP1-Sequenz lokalisiert sein muss. Die genaue Bestimmung der Lage der CaM-Bindedomäne erfolgte im nachfolgenden Versuch.

E.5.5 Calmodulin bindet VfCaMBP1 an der potentiellen CaM-Bindedomäne

Die Bindung von Calmodulin an eine CaM-Bindedomäne lässt sich durch eine Veränderung der Mobilität (Laufstrecke) von Calmodulin in einem Polyacrylamidgel nachweisen, das 4 M Harnstoff enthält (Erickson-Viitanen und DeGrado, 1987). Durch den Zusatz von Harnstoff werden Komplexe von niedriger Affinität und nicht-spezifische Komplexe dissoziiert, so dass nur spezifische Komplexe im Gel sichtbar werden.

Die per Homologievergleich und genaue Analyse identifizierte potentielle CaM-Bindedomäne von VfCaMBP1 wurde in Form eines 19 Aminosäuren großen Peptids bei ARK (Darmstadt) synthetisiert. Um die Ca²⁺-Abhängigkeit der Bindung des Peptids durch Calmodulin zu testen, wurden Bindestudien mit dem Peptid und Calmodulin (aus Rinderhirn) sowohl in Ca²⁺-haltigen als auch in EGTA-haltigen Lösungen durchgeführt und die Proben anschließend in harnstoffhaltigen Gelen aufgetrennt (Abbildung E.33). Bei Zusatz von 0.1 mM CaCl₂ retardierte das synthetische Peptid die Mobilität des Calmodulins im Gel (Abbildung E.33a), was auf die Bildung eines Komplexes von Calmodulin und Peptid hinwies. Keine Veränderung der Mobilität des Calmodulins konnte hingegen beobachtet werden, wenn der Lösung 5 mM EGTA an Stelle des CaCl₂ zugesetzt wurde (Abbildung E.33b), was die Notwendigkeit von

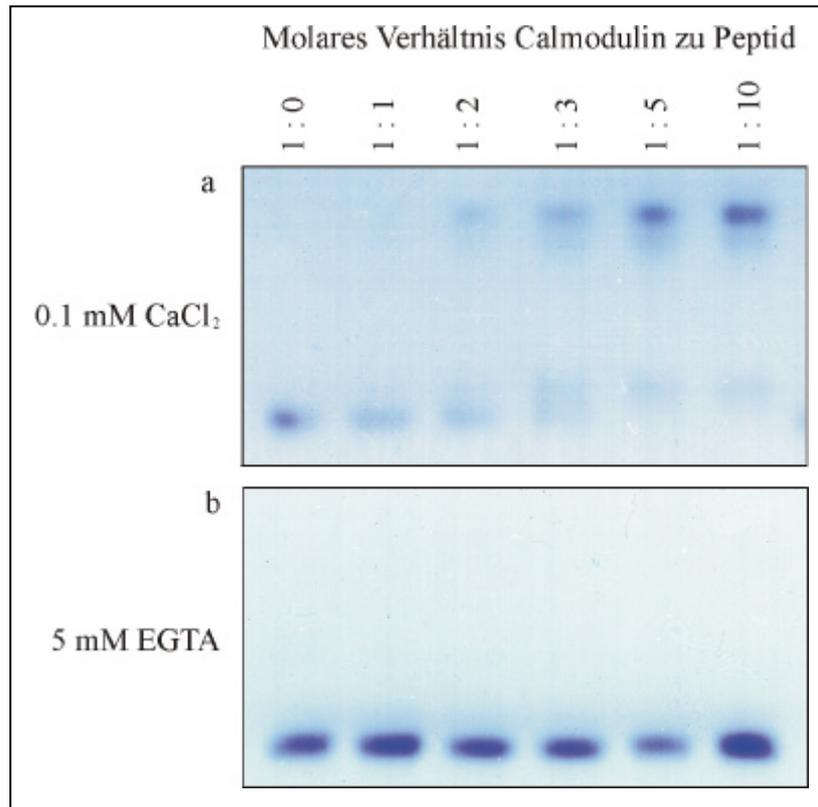


Abbildung E.33: Analyse der Bindung von Calmodulin an ein synthetisches Peptid mittels Retardation in einem harnstoffhaltigen PAA-Gel.

Die Abbildung zeigt Coomassie-gefärbte harnstoffhaltige Polyacrylamidgele (12 %) mit 0.1 mM CaCl₂ (a) bzw. 5 mM EGTA (b). Das jeweilige molare Verhältnis von Calmodulin zu synthetischen Peptid der Proben, die in den jeweiligen Gelspuren aufgetragen wurden, ist über diesen angegeben.

Ca²⁺ zur Ausbildung eines Calmodulin-Peptid-Komplexes verdeutlichte. Bei einem molaren Verhältnis von 1:2 (Peptid : Calmodulin) zeigte ca. 50 % des Calmodulins eine Veränderung der Mobilität im Gel (Abbildung E.33a, Spur 3). Die Erhöhung des molaren Verhältnisses führte auch zu einer stetigen Zunahme der Bande, die dem Calmodulin-Peptid-Komplex entsprach, und zu einer Abnahme der Bande, die dem freien Calmodulin entsprach (Abbildung E.33a, Spuren 4 bis 6). Eine Bestimmung der Stöchiometrie des Calmodulin-Peptid-Komplexes war nur bedingt möglich, da das in den Tests eingesetzte synthetische Peptid laut massenspektrographischer und HPLC-Analyse einen Reinheitsgrad von maximal 70 % hatte (Daten nicht gezeigt). Es musste also davon ausgegangen werden, dass nur ein verminderter Anteil des jeweils eingesetzten Peptids eine ausreichende Länge und damit verbunden eine hinreichende Konformation aufwies, um von Calmodulin gebunden zu werden. Die Ergebnisse dieses Bindungstests hätten auf eine Binde-Stöchiometrie zwischen 1:3 und 1:5 zwischen Calmodulin und Peptid schließen lassen.

Die Ergebnisse des Bindungstests verifizierten aber die Hypothese, dass es sich bei dem anhand von Homologievergleichen und einer genauen Analyse identifizierten Sequenzabschnitt des VfCaMBP1-Proteins, der die Aminosäuren 482 bis 500 umfasst, um die Calmodulin-bindende Domäne dieses Proteins handelte.

F. DISKUSSION

Die vielfältigen Interaktionen von Pflanzen mit Mikroorganismen führen in einigen Fällen zur Ausbildung von Symbiosen. Große Unterschiede ergeben sich hierbei bei der Wirtsspezifität der beteiligten Mikroorganismen. So können Rhizobien zum Beispiel nur eine Symbiose mit Leguminosen eingehen. Hierbei werden durch den pflanzlichen Symbiosepartner Wurzelknöllchen ausgebildet, in denen die Rhizobien zu Bakteroiden differenzieren und die Pflanze mit fixiertem Stickstoff versorgen. Pilze der Ordnung *Glomales* können hingegen mit mehr als 80 % aller Pflanzenfamilien eine als arbuskuläre Mykorrhiza (AM) bezeichnete Symbiose eingehen, bei der der Pilz einerseits ein ausgedehntes Hyphengeflecht im Boden ausbildet und andererseits in Kortezellen der Wurzel einwächst und dort Arbuskeln formt. Über diese Schnittstellen versorgt er die Pflanze mit Phosphat und anderen löslichen Nährstoffen und erhält dafür im Gegenzug Hexosen. Sowohl in der Rhizobien-Leguminosen Symbiose als auch in der AM-Symbiose werden während der Entwicklungs- und Funktionsphase der symbiontischen Strukturen spezifische Pflanzengene aktiviert. Auf Seiten der Rhizobien-Leguminosen Symbiose werden die Genprodukte dieser Gene als Noduline bezeichnet. Einer großen Zahl von identifizierten und charakterisierten Nodulingenen steht bisher noch eine deutlich geringere Zahl an identifizierten Mykorrhiza-spezifisch oder -amplifiziert exprimierten Pflanzengenen gegenüber. Pflanzenmutanten, die in beiden Interaktionen eingeschränkt sind, und die Expression insbesondere früher Nodulationsgene auch während der AM-Symbiose lassen aber bereits vermuten, dass diese beiden Symbiosen zumindest in Teilen auf einem gemeinsamen genetischen Grundprogramm aufbauen.

Die Ackerbohne *Vicia faba* L. kann beide genannten Symbiosen ausbilden. Die Analyse einer in Bielefeld angelegten Knöllchen-spezifischen cDNA-Genbank führte zur Identifikation von 44 Klongruppen. Für einen Teil der durch diese Klone repräsentierten Gene wurden intensive Expressionsanalysen auf Gen- und Transkriptebene durchgeführt. Die Untersuchung ihrer Expression in der AM-Symbiose der Ackerbohne führte zur Identifikation von vier Mykorrhiza-spezifisch bzw. Mykorrhiza-verstärkt exprimierten Genen. In dieser Arbeit wurden die Knöllchen-spezifisch exprimierten Gene VfENOD18, VfNOD28/32 und VfNOD32, sowie das Knöllchen-/Mykorrhiza-spezifisch exprimierte Gen VfLb29 und das Mykorrhiza-amplifiziert exprimierte Gen VfCaMBP1 auf Proteinebene untersucht. Immunologische Lokalisationsstudien mit gegen diese Symbiose-relevanten Proteine gerichteten Antikörpern verfolgten das Ziel, den Funktionsort dieser Proteine zu bestimmen, um daraus Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten. Einem Teil der Symbiose-relevanten Proteine konnte über biochemische Analysen mit aufgereinigten Fusionsproteinen eine Funktion zugeordnet werden. Die Ergebnisse zu den fünf Symbiose-relevanten Proteinen der Ackerbohne werden in der oben angegebenen Reihenfolge diskutiert und in einem abschließenden Kapitel einer Bewertung unterzogen.

F.1 Das ATP-bindende Nodulin VfENOD18

Bisherige Studien zum *V. faba* Nodulin VfENOD18 waren auf der Ebene der VfENOD18-Transkripte und -Gene angesiedelt (Hohnjec *et al.*, 2000). Sowohl die Verteilung von VfENOD18-Transkripten in Ackerbohlenknöllchen als auch die Aktivität des in transgenen *Vicia hirsuta* Knöllchen getesteten VfENOD18-Promotors waren auf die Stickstoff fixierende Zone III beschränkt. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war das VfENOD18-Protein und hierbei insbesondere seine Lokalisation und mögliche Funktion. Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Becker, 1996) hatte ich bereits rekombinantes VfENOD18 durch heterologe Expression in *Escherichia coli* und nachfolgende Aufreinigung erhalten. Dieses war zur Gewinnung eines gegen VfENOD18 gerichteten Antiserums eingesetzt worden.

F.1.1 In Leguminosen der Triben Trifolieae, Viciae und Hedysareae mit caesalpinioider oder crotalarioider Knöllchenform bilden Noduline vom Typ ENOD18 eine Proteinfamilie, deren korrespondierende Gene vermutlich aus allgemeinen Pflanzengen zu Nodulin-Genen evolvierten

Unter Verwendung der aufgereinigten VfENOD18-Antikörper wurden Proteine in allen getesteten Leguminosen detektiert, die indeterminierte Knöllchen der caesalpinioiden oder crotalarioiden Form bilden. Ihr Vorkommen in diesen Leguminosen war auf das Knöllchengewebe beschränkt, so dass sie definitionsgemäß als Noduline bezeichnet werden können (van Kammen, 1984). Das Knöllchen-spezifische Auftreten des VfENOD18-Proteins steht in Übereinstimmung mit dem Nachweis von VfENOD18-Transkripten in Geweben der Ackerbohne, da diese ebenfalls auf das Knöllchengewebe beschränkt waren (Hohnjec *et al.*, 2000; Perlick und Pühler, 1993). Da die Detektion von Epitopen durch ein polyklonales Antiserum keinen direkten Rückschluß auf den Grad an Sequenz-Homologie zwischen zwei detektierten Proteinen zulässt, werden die in anderen als *V. faba* Geweben detektierten Proteine im Folgenden als VfENOD18-immunoreaktiv bezeichnet.

Interessanterweise wurden in fast allen getesteten Leguminosen, die determinierte (desmodioide) oder indeterminierte Knöllchen der lupinen Art bilden, keine VfENOD18-immunoreaktiven Proteine detektiert. Die einzige Ausnahme bildet hier die tropische Leguminose *Glycine max*, bei der sich VfENOD18-immunoreaktive Proteine in allen Geweben außer dem Knöllchengewebe nachweisen ließen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in den getesteten Knöllchen von desmodioider oder lupiner Form VfENOD18-immunoreaktive Proteine nur in einer kurzen Phase der Knöllchen-Entwicklung auftreten und/oder nur sehr schwach exprimiert werden, was ihren Nachweis erheblich erschweren würde. Die Unterschiede im Auftreten von Nodulinen des Typs ENOD18 in den verschiedenen Knöllchenformen sind möglicherweise mit physiologischen Unterschieden zwischen indeterminierten und determinierten Knöllchen verbunden. Ein bekanntes Beispiel sind die Unterschiede im Stickstoffmetabolismus. In determinierten Knöllchen findet die Assimilation des

fixierten N₂ in den Peroxisomen der nicht infizierten Zellen statt (Newcomb und Tandon, 1981; Nguyen *et al.*, 1985) und wird katalysiert durch Knöllchen-spezifische Urikasen (Takane *et al.*, 1997), wohingegen in indetermierten Knöllchen das Enzym Asparagin Synthetase in infizierten und nicht infizierten Zellen für den Einbau des fixierten Stickstoffs in Asparagin sorgt (Shi *et al.*, 1997). Die Phylogenie der Leguminosen, aufgestellt anhand von Sequenzdaten für das Chloroplasten-Gen *rbcL* (Doyle *et al.*, 1997), verdeutlicht den hohen Verwandtschaftsgrad der Triben, für deren getestete Arten sich VfENOD18-immunoreaktive Proteine im jeweiligen Knöllchengewebe nachweisen ließen (Abbildung F.1).

VfENOD18-immunoreaktive Proteine konnten nicht nur in den nicht-symbiontischen Geweben der Leguminose *G. max* detektiert werden, sondern auch in verschiedenen Geweben der Nicht-Leguminosen *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays*. Die teilweise erhebliche Abweichung der vom Western Blot abgeleiteten molekularen Massen der detektierten Proteine, wenn diese mit den von den *A. thaliana*, *Z. mays* und *G. max* ESTs abgeleiteten zu erwartenden molekularen Massen von ca. 18 kD verglichen werden, ist möglicherweise auf eine Degradation der Proteine während der Preparation der Protein-Extrakte oder posttranslationale Modifikationen zurückzuführen. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass die für die immunoreaktiven Proteine kodierenden Transkriptsequenzen eventuell bisher noch nicht isoliert wurden. Andererseits hätten die von den in den Datenbanken vorhandenen ESTs abgeleiteten Proteine mit ihrer hohen Homologie zur VfENOD18-Aminosäuresequenz durch die VfENOD18-Antikörper detektiert werden sollen.

Die Identifikation von potentiellen Nodulin-Homologen in nicht-symbiontischen Geweben wie im Fall von VfENOD18 ist nicht einmalig. Eine vergleichbares Beispiel sind die MADS-box Gene *nmhC5* und *nmh7*, deren Expression in den Wurzelknöllchen von *Medicago truncatula* nachgewiesen werden konnte (Heard *et al.*, 1997; Heard und Dunn, 1995). Obwohl *nmhC5*- und *nmh7*-homologe Gene in Wurzeln und Blüten verschiedener Nicht-Leguminosen exprimiert werden, scheint die Expression von *nmhC5* und *nmh7* in *M. truncatula* auf die Knöllchen beschränkt zu sein (Doyle, 1998).

Genomische Sequenzen, die für Proteinbereiche kodieren, die mit dem VfENOD18-C-Terminus stark homolog sind, konnten aus den nah verwandten Leguminosen *Lens culinaris*, *Vicia hirsuta*, *Vicia sativa* und *Vicia villosa* isoliert werden. Fehlende Amplifikationsprodukte für die restlichen Leguminosen, die immunoreaktive Proteine im Western Blot aufwiesen, sind möglicherweise auf eine durch Sequenzabweichungen verursachte unzureichende Bindung der Primer und/oder Abweichungen in der Position des letzten Introns zurückzuführen.

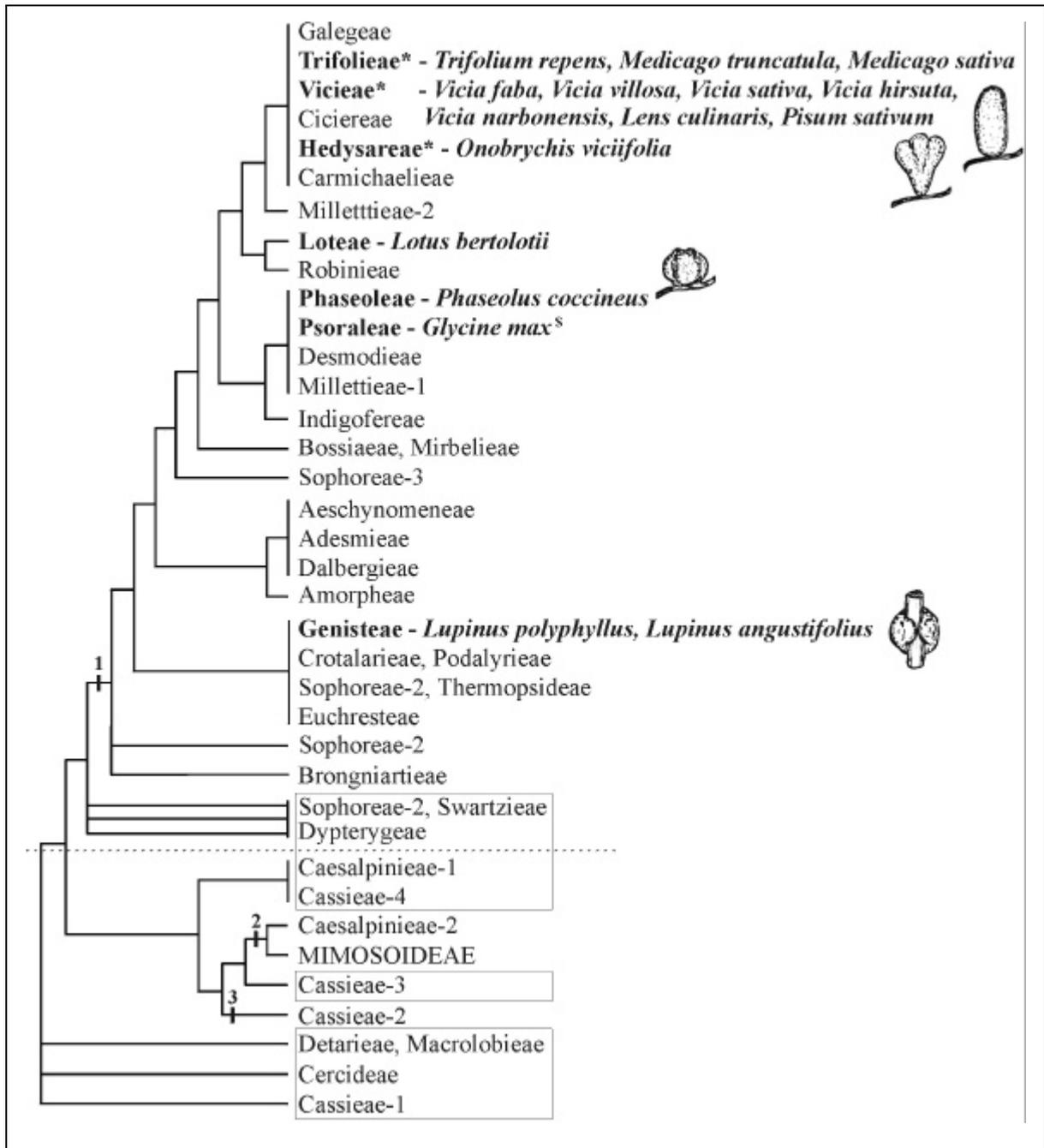


Abbildung F.1: Einordnung der im Western Blot getesteten Arten in die Phylogenie der Leguminosen. Dargestellt ist die Phylogenie der Leguminosen, wie sie anhand von *rbcL*-Sequenzdaten aufgestellt wurde (Doyle *et al.*, 1997). Alle Gruppen über der gestrichelten Linie gehören zur größten Unterfamilie, den Papilionoideae, unter der Linie zu den Caesalpinioideae und Mimosoideae. Die Namen der Triben sind in den Fällen, in denen sie aus nicht verwandten Abstammungen bestehen, mehrfach verwendet (zum Beispiel Caesalpinieae). Für die umrahmten Triben ist eine Nodulation nicht bekannt. Mögliche unabhängige Ursprünge für Nodulation, wie sie bei parsimoniärer Optimierung dieser Eigenschaft berechnet wurden, sind durch vertikale, numerierte Balken gekennzeichnet. Die im Western Blot getesteten Arten sind ihren jeweiligen Triben zugeordnet und durch Fettdruck hervorgehoben. Ihre jeweilige Knöllchenform ist durch Symbole dargestellt: langezogene, indeterminierte Knöllchen (caesalpinioid); fächerartige, indeterminierte Knöllchen (crotalarioid); große, runde, determinierte Knöllchen (desmodioid); große, unregelmäßig rund geformte, indeterminierte Knöllchen (lupin). Abkürzungen: *, Triben, deren getestete Arten VtENOD18-immunoreaktive Proteine nur im Knöllchen aufweisen; §, VtENOD18-immunoreaktive Proteine in allen getesteten Geweben außer dem Knöllchengewebe. Nach Doyle (1998), modifiziert

Zusammengenommen unterstützen die genomischen und immunocytochemischen Daten sowie auch die Ergebnisse zu VfENOD18-homologen ESTs, die Hypothese, dass Noduline vom Typ ENOD18 in Leguminosen mit caesalpinoiden oder crotalarioiden indetermierten Knöllchen der Triben Trifolieae, Viciae und Hedysareae eine Proteinfamilie bilden, deren korrespondierende Gene wahrscheinlich aus einer allgemeinen Familie von Pflanzengenen zu Nodulin-Genen evolvierten. Es ist denkbar, dass die treibende Kraft dieser evolutionären Entwicklung die besonderen regulatorischen und/oder physiologischen Bedingungen der symbiontischen Stickstofffixierung waren. Auf Grund des Vorkommens homologer Proteine sogar in den nicht-symbiontischen Geweben verwandter Arten (*G. max*) ist es wahrscheinlich, dass nur die regulatorischen Sequenzen dieser Gene sie zu Nodulin-Genen machen, wie vorgeschlagen durch Doyle (1994). Daher könnten weitergehende Studien zur Verbreitung VfENOD18-homologer Gene und Untersuchungen der regulatorischen Sequenzen, die eine Knöllchen-spezifische Expression von ENOD18-Genen vermitteln, neue Erkenntnisse zur Evolution von Nodulingenen erbringen (siehe Übersichtsartikel von Doyle, 1998; Gualtieri und Bisseling, 2000; Nap und Bisseling, 1990).

F.1.2 VfENOD18 hat eine Funktion in der funktionellen Phase des Knöllchens im Cytoplasma der infizierten Zellen der Stickstoff fixierenden Zone III

Die lichtmikroskopische Lokalisation des VfENOD18-Proteins in der Stickstoff fixierenden Zone III von *V. faba* Wurzelknöllchen legt eine Funktion des Proteins während der funktionellen Phase der Stickstofffixierung nahe. Diese Lokalisation steht in Übereinstimmung mit der Lokalisation der VfENOD18-Transkripte in „Tissue Print“-Hybridisierungen und der Aktivität des VfENOD18-Promotors in transgenen *V. hirsuta* Wurzelknöllchen (Hohnjec *et al.*, 2000). Die Lokalisierung des VfENOD18-Proteins in der Stickstoff fixierenden Zone III zeigt deutlich, dass VfENOD18 weder an frühen Stadien der Infektion noch an der Organogenese der Wurzelknöllchen beteiligt ist, wie es zum Beispiel für die Noduline ENOD12 (Bauer *et al.*, 1994; Journet *et al.*, 1994) und Rip1 (Peng *et al.*, 1996) gezeigt wurde, da deren korrespondierende Gene in Knöllchen-Primordien, wie auch in Wurzelhaaren exprimiert werden. Es muss daher betont werden, dass die Bezeichnung „VfENOD18“ ausgehend von der Definition nach van Kammen (1984) auf der ersten Detektion von VfENOD18-Transkripten beruht, welche in *V. faba* Wurzelknöllchen einen Tag vor dem Beginn der Leghämoglobin-Expression nachgewiesen wurden (Hohnjec *et al.*, 2000).

Die Lokalisation des VfENOD18-Proteins auf subzellulärer Ebene lässt darauf schließen, dass VfENOD18 eine Funktion im Cytoplasma der infizierten Zellen von Wurzelknöllchen erfüllt. Die infizierten Zellen in der Stickstoff fixierenden Zone von Leguminosen-Knöllchen zeigen eine hohe Aktivität sowohl im Kohlenstoff- als auch im Stickstoff-Metabolismus (siehe Übersichtsartikel von Pawlowski, 1997). Es ist denkbar, dass VfENOD18 im Rahmen der damit verbundenen spezifischen regulatorischen und physiologischen Anforderungen eine Aufgabe zukommt.

F.1.3 VfENOD18 ist ein ATP-bindendes Nodulin und ein neues, pflanzliches Mitglied der bakteriellen „Mj0577 Superfamilie“

Nukleotid-Bindestudien zeigten, dass VfENOD18 ein ATP-bindendes Protein ist. Den Anstoß zu diesen Studien gaben die ausgeprägten Homologien der abgeleiteten VfENOD18-Aminosäuresequenz zum *Methanococcus jannaschii* Protein Mj0577, für das eine ATP-Bindfähigkeit nachgewiesen worden war (Zarembinski *et al.*, 1998). Die Kristallstruktur dieses bakteriellen ATP-bindenden Protein-Dimers weist zwei gebundene Moleküle ATP auf. Die Nukleotid-Bindetaschen des Mj0577-Proteins sind von Sequenzmotiven umgeben, die nur eingeschränkte Ähnlichkeit zu Motiven haben, die man üblicherweise unter ATP-bindenden Proteinen findet (Patel und Latterich, 1998; Traut, 1994; Walker *et al.*, 1982). Auf Grund der hohen Divergenz der sequenziellen Anordnung der Motive und der Abstände zwischen ihnen im Vergleich zu anderen ATP-bindenden Proteinen, kamen Zarembinski und Mitarbeiter zu dem Schluss, dass diese Struktur eine neue Familie von ATP-bindenden Proteinen repräsentiert (Zarembinski *et al.*, 1998). Zusammen mit weiteren zu Mj0577 homologen hypothetischen Proteinen von Archaeobakterien wird sie als „Mj0577 Superfamilie“ bezeichnet. Somit ist VfENOD18 als neues, pflanzliches Mitglied der „Mj0577 Superfamilie“ anzusehen.

ATPase Aktivitätstests zeigten, dass rekombinantes VfENOD18 allein die Hydrolyse von ATP nicht katalysiert. Das gleiche Fehlen von ATPase-Aktivität wurde jedoch auch für das rekombinante Mj0577-Protein festgestellt (Zarembinski *et al.*, 1998). Interessanterweise führte die Zugabe eines *M. jannaschii* Zellextraktes zu einer ATPase-Aktivität von Mj0577, was darauf hinweist, dass dieses Protein ein oder mehr lösliche Komponenten des Zellextraktes benötigt, um seine immanente ATPase-Aktivität zu ermöglichen. Daher ist es möglich, dass eine ATPase-Aktivität des VfENOD18-Proteins ebenfalls von Komponenten der infizierten Zellen von *V. faba* Knöllchen abhängig ist. Hierbei könnte es sich in Analogie zu den GTPase-aktivierenden Proteinen, die die GTPase-Aktivität kleiner G-Proteine anregen (Borg *et al.*, 1999; Scheffzek *et al.*, 1998), um ein oder mehrere ATPase-aktivierende Proteine handeln. Solche Komponenten müssten identifiziert und analysiert werden, um die zelluläre Funktion von VfENOD18, möglicherweise als Teil der intrazellulären Signaltransduktion in Wurzelknöllchen, genauer bestimmen zu können. Erste Erkenntnisse zur Knöllchenspezifischen Signaltransduktion und daran beteiligten Transkriptionsfaktoren werden gerade erst gewonnen. Dazu zählen unter anderem die MADS-box Gene *nmh7* und *nmhC5* aus *Medicago sativa* (Heard *et al.*, 1997; Heard und Dunn, 1995), die RacGTPase *LjRac2* aus *Lotus japonicus* (Borg *et al.*, 1999) sowie das *nin1*-Gen aus *L. japonicus*, das für einen potentiellen Transkriptionsfaktor kodiert und für die Bildung von Infektionsschläuchen und die Initiation von Knöllchenprimordien benötigt wird (Schäuser *et al.*, 1999). VfENOD18 als ein Mitglied einer neuen Familie von ATP-bindenden Proteinen in Pflanzen ist möglicherweise ein weiterer molekularer Schalter, der an der Signaltransduktion in Wurzelknöllchen beteiligt ist. Als ein Schritt hin zur Verifizierung dieser Hypothese empfiehlt sich in zukünftigen Arbeiten eine genaue Analyse der möglichen ATPase-Aktivität von VfENOD18.

F.2 Die Ca²⁺-bindenden modularen Noduline VfNOD28/32

Die sechs *V. faba* Transkripte VfNOD28/32 kodieren für sechs verschiedene Noduline, die aus einer unterschiedlichen Anzahl von zwei Arten repetitiver Sequenzmodule flankiert von einzelnen N- und C-terminalen Modulen bestehen (Küster *et al.*, 1994). Die Transkripte, die vermutlich das Produkt eines alternativen Spleißvorganges sind, wurden in der zentralen Region von Ackerbohnenknöllchen lokalisiert (Küster *et al.*, 1996). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war der VfNOD28/32-Promotor in der zentralen Region von transgenen Knöllchen an haarigen Wurzeln von *V. hirsuta* aktiv (Küster *et al.*, 1999). Es ergibt sich somit ein abgerundetes Bild auf der Ebene der Genexpression für die modularen Noduline VfNOD28/32. Zur möglichen Funktion dieser Proteine gab es bisher keine Daten. Kiss *et al.* (1990) postulierten in diesem Zusammenhang für das homologe modulare Nodulin Nms-25 aus *M. sativa* eine Lokalisation im Peribakteroidraum. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, durch die Lokalisation und biochemische Analyse der modularen Noduline VfNOD28/32 zur Aufklärung der möglichen Funktion dieser Proteine in Knöllchen der Ackerbohne beizutragen. Hierzu wurde mit VfNOD32a die größte der sechs Isoformen zur Analyse ausgewählt.

F.2.1 Das Fusionsprotein His-VfNOD32a ist ein stark saures Protein mit anormalem Laufverhalten in der SDS-DISKPAGE

Die Expression des rekombinanten His-VfNOD32a in *E. coli* und seine nachfolgende Aufreinigung resultierten in einer Proteinfraktion mit His-VfNOD32a und seiner N-terminal um 15 Aminosäuren verkürzten Form VfNOD32a*. Auffallend war, dass dieses vermutlich aus einer endogenen Proteolyse resultierende verkürzte Protein trotz des Fehlens des His-Tags bei der Affinitäts-Chromatographie an Ni-NTA Harz zusammen mit His-VfNOD32a aufgereinigt worden war. Hier war es entweder zur Bildung von Di- bzw. Multimeren zwischen His-VfNOD32a und VfNOD32a* gekommen oder die verkürzte Form des Fusionsproteins war auch ohne His-Tag in der Lage, an die komplexierten Ni-Ionen der Affinitätsmatrix zu binden. Die gemeinsame Elution der beiden Proteine in der nachfolgenden Gelfiltration macht die Bildung von Multimeren wahrscheinlicher, obwohl auch eine Interaktion der Proteine über eine Bindung an zweiwertige Kationen denkbar ist.

Das ungewöhnliche Laufverhalten des Proteins VfNOD32a in der SDS-DISKPAGE war bereits aus Erfahrungen mit Fusionsproteinen aus meiner Diplomarbeit bekannt Becker (1996). Küster *et al.* (1994) berichten in ihrer Analyse der VfNOD28/32-Aminosäuresequenzen von einem hohen Anteil an geladenen Resten bei neutralem pH. Für die prozessierte Form des Nodulins VfNOD32a errechneten sie eine Gesamt-Nettoladung von -20 mit einem daraus resultierenden sauren isoelektrischem pH (pH_i)-Wert, der laut Computeranalyse 4.5 beträgt. Ferner konnte die stark negative Gesamt-Nettoladung auf die Präsenz der „Repetition 2“-Sequenzmodule zurückgeführt werden, die zwar insgesamt 13 negativ geladene AS-Reste enthielten, aber keine positiv geladenen Seitenketten.

Ein Vergleich mit anderen Proteinen, die ebenfalls in der SDS-DISKPAGE zu hoch bandierten, lässt klare Parallelen erkennen. So berichten Takano *et al.* (1988) von zu hoch bandierenden Proteinen mit bis zu 23.5 % Gehalt an sauren Resten, Graceffa *et al.* (1988) von bis zu 34.8 % und Kleinschmidt *et al.* (1986) von 25.8 %. In letzterem Fall bandierte das Protein bei ca. 110 kD in der SDS-DISKPAGE, während die Computeranalyse der AS-Sequenz eine molekulare Masse von 64.8 kD voraussagte. In diesem Zusammenhang ist auch die Arbeit von Bryan (1989) erwähnenswert, der für eine Reihe von Proteinen eine lineare Relation zwischen dem Gehalt an sauren AS-Resten und einer anormalen Migration zeigen konnte.

Das ungewöhnliche Laufverhalten des His-VfNOD32a-Fusionsproteins lässt sich also höchstwahrscheinlich auf einen Sequenzbereich in der VfNOD32a-Domäne zurückführen, der sich durch einen sehr hohen Gehalt an sauren Aminosäureresten und eine stark negative Gesamtnettoladung auszeichnet. Neben dieser Möglichkeit, dass das abnorme Laufverhalten des Fusionsproteins auf eine in Teilbereichen verminderte Bindung von SDS, ausgelöst durch die Abstoßungskräfte der partiell stark negativen Sequenzbereiche zurückzuführen ist, ist es aber auch möglich, dass das Fusionsprotein eine hochasymmetrische Sekundärstruktur aufweist, die auch durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-DISKPAGE nicht vollständig aufgelöst werden kann.

F.2.2 Das Knöllchen-spezifische, modulare Nodulin VfNOD32a wird in einzelnen Knöllchen einer Ackerbohne unterschiedlich stark exprimiert

Die unter Einsatz des rekombinanten His-VfNOD32a gewonnenen polyklonalen Antikörper wiesen trotz Aufreinigung Nebenaktivitäten oder Kreuzreaktionen mit Antigenen in Proteinextrakten von *Rhizobium leguminosarum* und *E. coli* auf. Um insbesondere die Gefahr von Kreuzreaktionen zu verringern, wurde daher eine Peptid-Immunisierung gegen einen Sequenzabschnitt aus dem letzten repetitiven VfNOD32a-Sequenzmodul in Auftrag gegeben. Auf Grund des modularen Aufbaus der VfNOD28/32-Proteine sollte dieser Peptid-Antikörper theoretisch in der Lage sein, auch die Isoformen VfNOD28, VfNOD30a und VfNOD31 zu detektieren.

Die aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper detektierten Proteine ausschließlich in Proteinextrakten aus *V. faba* Knöllchengewebe und nicht in Extrakten anderer Gewebe der Ackerbohne. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem auf Transkriptebene für VfNOD28/32 geführten Nachweis ausschließlich im Knöllchengewebe (Küster *et al.*, 1994) und unterstützt die Klassifizierung der abgeleiteten Proteine als Noduline. Das Auftreten mehrerer Banden im Western Blot mit Ackerbohnenextrakt aus Knöllchengewebe könnte auf die Detektion der verschiedenen Isoformen der modularen Noduline VfNOD28/32 zurückzuführen sein, ist aber mit den vorliegenden Daten nicht schlüssig zu beweisen. So ist es zum Beispiel auch denkbar, dass es sich bei dem am höchsten bandierenden detektierten Protein in Abbildung E.14 um das modulare Nodulin VfNOD32a inklusive N-terminalem Signalpeptid

handelt und bei der prominenten Bande darunter um seine verkürzte Form ohne Signalpeptid. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass detektierte Proteine auf eine Degradation des VfNOD32a-Proteins zurückzuführen sind.

Ein Western Blot mit Proteinextrakten aus Einzelknöllchen einer Ackerbohnenpflanze ließ keine Unterschiede im Expressionsmuster im Bezug auf die mögliche Expression verschiedener Isoformen in verschiedenen Knöllchen erkennen. Das fast völlige Fehlen eines Signals in einem der fünf Knöllchenextrakte zeigte aber, dass zumindest die Transkription oder Translation des modularen Nodulins VfNOD32a in den Knöllchen einer einzelnen Ackerbohnenpflanze nicht gleich ist. Dabei könnte das Alter des einzelnen Knöllchens von Bedeutung sein (zum Beispiel fortgeschrittene Seneszenz), aber auch spezifische biotische oder abiotische Faktoren, die im Wurzelsystem einer Pflanze sicherlich örtlichen Schwankungen unterliegen.

F.2.3 VfNOD32a-immunoreaktive Proteine können in Knöllchen von *Vicia sativa* nachgewiesen werden

Frühere Arbeiten führten zur Isolierung von Transkripten, die für Proteine mit ebenfalls modularem Aufbau in *Galega orientalis* (S. Kaijalainen, University of Helsinki, persönliche Mitteilung), *V. hirsuta* (Küster *et al.*, 1999), *M. truncatula* (H. Küster, Universität Bielefeld, persönliche Mitteilung) und *M. sativa* (Kiss *et al.*, 1990) kodieren. Die versuchte Detektion von homologen modularen Nodulinen im Western Blot mit verfügbaren Gesamtproteinextrakten aus Knöllchen von *M. truncatula*, *M. sativa*, *Phaseolus coccineus* und *V. sativa* unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper führte nur im Fall von *V. sativa* zu Signalen. Die Höhe der Bande lässt darauf schließen, dass es sich bei den detektierten Proteinen um immunreaktive Proteine mit einer höheren molekularen Masse als die modularen Noduline VfNOD28/32 handelte oder um Proteine, deren Gesamtnettoladung noch negativer als die der VfNOD28/32-Proteine war, was möglicherweise zu einer Verstärkung der anormalen Migration in der SDS-DISKPAGE führte (Bryan, 1989). Das größere der beiden VfNOD28/32-homologen Transkripte aus *V. hirsuta*, VhNOD28/32-A10 (Küster *et al.*, 1999), kodiert trotz Fehlens des Startcodons in der isolierten Sequenz für ein Protein mit einer theoretischen molekularen Masse von 43.6 kD und einem pI-Wert von 4.5. Es konnte also aus einer der Ackerbohne eng verwandten Art bereits ein Transkript isoliert werden, das für ein VfNOD28/32-homologes modulares Nodulin mit wahrscheinlich deutlich höherer molekularer Masse als 32 kD kodierte, bei gleichzeitiger Beibehaltung des pI-Wertes im Vergleich zum VfNOD32a-Protein. Diese Daten machen es wahrscheinlich, dass es sich bei den im *V. sativa* Knöllchen-Gesamtproteinextrakt detektierten Proteinen um VfNOD28/32-homologe Proteine mit einer höheren molekularen Masse als 32 kD handelt.

Das Ausbleiben einer Detektion von homologen Proteinen in den Knöllchen-Gesamtproteinextrakten von *M. truncatula* und *M. sativa* ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Sequenzabschnitt, den die aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper detektieren, in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser *Medicago*-Transkripte sehr schlecht konserviert ist.

Peptid-Antikörper gegen spezifische Sequenzabschnitte der kodierten modularen Noduline würden vermutlich auch in diesen Arten zu einer erfolgreichen Detektion führen. Zum eventuellen Vorkommen von VfnOD28/32-homologen Nodulinen in den determinierten Knöllchen von *P. coccineus* lässt sich keine Aussage treffen, da bis heute keine VfnOD28/32-homologen Transkripte aus dieser Leguminose oder aus anderen Leguminosen, die determinierte Wurzelknöllchen ausbilden, isoliert wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Detektion von Proteinen durch die aufgereinigten VfnOD32a-E15 Antikörper in Knöllchen von *V. sativa* den ersten Beweis für das Vorkommen von Proteinen des Typs NOD28/32 in anderen Leguminosen darstellt.

F.2.4 Fungieren die modularen Noduline als Ca^{2+} -bindende Proteine im Peribakteroidraum?

Bei der Lokalisation des VfnOD32a-Proteins beziehungsweise der durch die aufgereinigten VfnOD32a-E15 Antikörper detektierten Isoformen der modularen Noduline auf longitudinalen Ultra-Dünnschnitten von *V. faba* Knöllchen traten Signale im Cytoplasma der infizierten Zellen, im Peribakteroidraum und in den Bakteroiden auf. Die modularen Noduline weisen ein N-terminales potentiell Signalpeptid auf, welches in *E. coli* in der Lage ist, den Export einer C-terminalen translatorischen Fusion der VfnOD31-Sequenz mit einem *phoA*-Reporter gen über die periplasmatische Membran zu vermitteln (Küster, 1995c). Diese Signalsequenz könnte also wie von Küster *et al.* (1994) postuliert auch den Export der modularen Noduline aus dem Cytoplasma der infizierten Zellen über die Peribakteroidmembran in den Peribakteroidraum vermitteln. Ein Signalsequenz-vermittelter Export in den Peribakteroidraum wurde auch für das VfnOD28/32-homologe Protein Nms-25 aus *M. sativa* vorgeschlagen (Kiss *et al.*, 1990). Eine Aufnahme der prozessierten Formen der modularen Noduline in die Bakterioide zum Beispiel über ein bisher nicht identifiziertes Signalpeptid im C-terminalen Modul wäre denkbar, ist aber mit den vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu beweisen. Da aber die unspezifische Bindung von IgGs im Cytosol von Bakteroiden schon bei der subzellulären Lokalisation des VfnOD18-Proteins auftrat und auch aus anderen Studien bekannt ist (Fedorova *et al.*, 1999), handelt es sich möglicherweise auch hier um unspezifische Signale. Western Blots mit Extrakten von isolierten Symbiosomen und Bakteroiden aus Ackerbohnenknöllchen unter Einsatz der aufgereinigten VfnOD32a-E15 Antikörper könnten entscheidend zur Validierung der aus den elektronenmikroskopischen Analysen vorliegenden Ergebnisse beitragen.

Küster *et al.* (1996) hatten in Anlehnung an das Calcium-bindende, modulare ARP-Protein aus *Euglena gracilis* (Gumpel und Smith, 1992) postuliert, dass die modularen Noduline VfnOD28/32 auf Grund ihrer stark negativen Gesamtnettoladungen ebenfalls als Ionen-bindende Proteine fungieren könnten. Ein $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Bindungstests zeigte, dass das rekombinante Protein His-VfnOD32a und seine N-terminal verkürzte Form VfnOD32a* Ca^{2+} -Ionen binden können. Könnte die Bindung bei His-VfnOD32a noch auf die Fähigkeit des His-Tags, zwei-

wertige Kationen zu binden, zurückzuführen sein, so fehlt dieser bei der verkürzten Form des Proteins. Eine Bindung musste hier somit an den repetitiven Modulen oder am C-terminalen Modul erfolgt sein. Es muss hervorgehoben werden, dass es nicht ausgeschlossen werden kann, dass die modularen Noduline auf Grund ihrer stark negativen Gesamtladung generell zweiwertige Kationen binden können und keine besondere Präferenz für Ca^{2+} -Ionen aufweisen. Der möglichen Bindung von Ca^{2+} durch die modularen Noduline im Peribakteroidraum könnte jedoch eine interessante physiologische Rolle zukommen. Die Untersuchungen von Izmailov *et al.* (1999) an Ackerbohnenknöllchen haben gezeigt, dass eine verhältnismäßig hohe Konzentration von Calcium-Ionen auf der Oberfläche der dem Cytoplasma der Pflanzenzelle zugewandten Seite der Peribakteroidmembran und im Cytoplasma der Bakteroiden zu finden ist. Die Konzentration von Calcium-Ionen im Peribakteroidraum ist hingegen relativ gering. Die weiterführenden Arbeiten von Andreev *et al.* (1999) belegen die Existenz einer ATP-abhängigen Ca^{2+} -Pumpe in der PBM, die für den Import von Ca^{2+} in den Peribakteroidraum sorgt. In diesem Zusammenhang wird eine Beteiligung der Symbiosomen an der Regulation des cytoplasmatischen Ca^{2+} -Niveaus in den infizierten Zellen postuliert. Versuche an funktionell aktiven Symbiosomen der Sojabohne belegen, dass ein Energie-abhängiger Ammoniumtransport von den Bakteroiden über die PBM in das Cytosol der infizierten Zellen nur bei einer relativ geringen Ca^{2+} -Konzentration im Peribakteroidraum auftritt und bei mikromolaren Konzentrationen dieses Kations fast vollständig blockiert ist (Tyerman *et al.*, 1995). Welche Rolle könnten die modularen Noduline der Ackerbohne vor dem Hintergrund dieser Resultate spielen? Durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen im Peribakteroidraum könnten sie dazu beitragen, die Konzentration an freien Calcium-Ionen im Peribakteroidraum der Symbiosomen gering zu halten, um den Transport des fixierten Stickstoffs in Form von Ammonium vom Mikrosymbionten zum Makrosymbionten zu gewährleisten. Unter der Voraussetzung, dass die unterschiedlich großen Isoformen durch die divergierende Anzahl ihrer repetitiven Typ1-Module auch eine unterschiedliche Bindekapazität für Calcium-Ionen aufweisen, könnte die Pflanze mittels alternativen Spleißens die Abundanz der einzelnen Isoformen der modularen Noduline und somit die Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen im Peribakteroidraum feinregulieren. Möglicherweise könnte die Pflanze so über die Beeinflussung des Ammoniumtransports auch auf die Rate der Stickstofffixierung durch den Mikrosymbionten einwirken. Eine Verringerung der Expression der modularen Noduline hätte dann zum Beispiel durch das Ausbleiben einer Bindung von Ca^{2+} an die modularen Noduline im Peribakteroidraum eine Erhöhung der Konzentration an freien Calcium-Ionen in diesem Kompartiment zur Folge, was wiederum zur Verringerung des Ammoniumtransports führen würde und letztlich über eine Akkumulation des fixierten Stickstoffs zu einer Herabsetzung der Stickstofffixierungsrate der Bakterioide führen könnte. In diesem Zusammenhang wurde für *R. leguminosarum* Bakterioide nachgewiesen, dass ihre Nitrogenase-Aktivität dem sogenannten Ammonium „switch off“-Effekt unterliegt (Laane *et al.*, 1978). Hierbei verursacht eine Akkumulation von Ammonium eine kovalente Modifikation der Dinitrogenase-Reduktase, was

den Verlust der Enzymaktivität zur Folge hat. Dieser Vorgang ist reversibel und stellt somit eine schnelle Methode dar, den ATP-Verbrauch durch die Nitrogenase zu kontrollieren.

Vor dem Hintergrund einer hohen Ca^{2+} -Konzentration in den Bakteroiden (Izmailov *et al.*, 1999) der Ackerbohne ist es jedoch ebenfalls denkbar, dass die modularen Noduline VfNOD28/32 Ca^{2+} -Ionen im Peribakteroidraum binden und zu den Bakteroiden transportieren, wo es dann zum Import nur der Calcium-Ionen oder der mit Calcium beladenen Noduline kommen könnte.

F.2.5 Ausblick auf weiterführende Arbeiten zu den modularen Nodulinen

Die zuletzt angeführten Überlegungen machen deutlich, dass eine Absicherung der subzellulären Lokalisierung der modularen Noduline von großem Wert ist. Hierzu sollten Proteinextrakte von isolierten Symbiosomen und von isolierten Bakteroiden im Western Blot unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32a-E15 Antikörper auf das Vorkommen der modularen Noduline hin überprüft werden. Eine etwaige Präferenz des VfNOD32a-Proteins für eine Bindung von Ca^{2+} -Ionen könnte mittels weiterer Bindungstests mit dem rekombinanten Protein und den radioaktiven Isotopen anderer zweiwertiger Kationen überprüft werden.

F.3 Das Nodulin VfNOD32

Die VfNOD32-Aminosäuresequenz zeigt starke Homologien zu dem *Vicia narbonensis* (α/β)₈-Barrel Samenprotein Narbonin und enthält zwei konservierte Motive, die charakteristisch für Klasse-III-Chitinasen sind (Perlick *et al.*, 1996a). S. C. Frosch (Universität Bielefeld) hat das VfNOD32-Protein im Rahmen seiner Doktorarbeit in *E. coli* exprimiert und nach Aufreinigung zur Gewinnung polyklonaler Antikörper eingesetzt (Frosch *et al.*, 2001). Er konnte zeigen, dass das Nodulin zwar Knöllchen-spezifisch exprimiert wird, aber nur in etwa jeder fünften Ackerbohnenpflanze. Enzymatische Assays mit dem Ziel, eine Chitinase-ähnliche Funktion des Proteins nachzuweisen, führten zu keinem positiven Ergebnis (Frosch *et al.*, 2001). Hinweise auf eine mögliche Funktion dieses Nodulins erwartete man daher von einer Lokalisation in Ackerbohnenknöllchen auf zellulärer und subzellulärer Ebene.

F.3.1 VfNOD32 kommt eine vermutlich nicht essentielle Funktion in der Stickstoff fixierenden Zone von Ackerbohnenknöllchen zu

Für eine erfolgreiche Lokalisation des Nodulins war zunächst die Identifikation von VfNOD32a-Produzenten, also Pflanzen, die das Nodulin exprimieren, notwendig. Obwohl sie keine phänotypischen Unterschiede aufwiesen, waren in diesem Fall nur 2 von 12 Pflanzen VfNOD32-Produzenten. Alle 12 Pflanzen zeigten hingegen eine annähernd gleich starke Expression von VfENOD18. Dem Nodulin VfNOD32 kommt in Ackerbohnenknöllchen also offensichtlich keine essentielle Funktion zu.

Aufgereinigte VfNOD32-spezifische Antikörper detektierten VfNOD32 in immunologischen Tissue-Prints im zentralen Knöllchengewebe und dort in der Stickstoff fixierenden Zone III und möglicherweise schon in der Interzone II-III. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Western Blots zeigten Tissue-Prints mit Knöllchen von Pflanzen, die als VfNOD32-Nichtproduzenten identifiziert worden waren, keine Signale. Albus (1996) hatte im Rahmen ihrer Diplomarbeit bereits einen immunologischen Tissue-Print unter Verwendung des nicht aufgereinigten VfNOD32-Antiserums gemacht und die Ergebnisse deuteten auf eine Lokalisation von VfNOD32 ausschließlich im Cortex der Knöllchen hin. Diese neue Lokalisation und die Identifikation von VfNOD32-Nichtproduzenten machen es sehr wahrscheinlich, dass das von ihr untersuchte Knöllchen von einer solchen Nichtproduzenten Pflanze stammte und es sich bei den vermeintlichen Signalen lediglich um unspezifischen Hintergrund durch das nicht aufgereinigte Antiserum handelte. Die Lokalisation von VfNOD32 im zentralen Gewebe steht in Übereinstimmung mit der Lokalisation der VfNOD32-RNA (Perlick *et al.*, 1996a) und unterstreicht, dass das VfNOD32-Protein eine Funktion in der funktionellen Phase von Ackerbohnenknöllchen haben könnte.

Unter Einsatz der aufgereinigten VfNOD32-spezifischen Antikörper konnte VfNOD32 in Ultra-Dünnschnitten von Ackerbohnenknöllchen im Cytoplasma der infizierten und nicht infizierten Zellen lokalisiert werden. Die hohe Signaldichte ist in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis, dass dieses Protein in VfNOD32-Produzenten bis zu 10 % des gesamten Proteingehalts der Knöllchen ausmacht (Frosch *et al.*, 2001). Die Lokalisation von VfNOD32 im Cytoplasma der Zellen würde für eine enzymatische Funktion des Proteins und gegen eine bloße Funktion als Strukturprotein oder Speicherprotein sprechen (Frosch *et al.*, 2001). Trotz dieser erfolgreichen Lokalisationsstudien ergaben sich aber aus ihnen keine entscheidenden Hinweise auf die Art dieser eventuellen Funktion.

F.4 Das Leghämoglobin VfLb29

Das Leghämoglobin VfLb29 zählt zu den wenigen bisher identifizierten Nodulinenen, die sowohl in der Knöllchensymbiose als auch in der Mykorrhiza verstärkt exprimiert werden (Albrecht *et al.*, 1999; Frühling *et al.*, 1997). So konnten in Northern- und Southnorthern-Versuchen mit *V. faba* Geweben und den vier bisher bekannten Leghämoglobin-Transkripten der Ackerbohne (VfLb29, VfLbB, VfLbK und VfLb49) zwar alle vier Transkripte in Knöllchen nachgewiesen werden, nur VfLb29 war jedoch zusätzlich auch noch in mykorrhizierten Wurzeln induziert (Frühling *et al.*, 1997). Es wurde postuliert, dass dem VfLb29-Protein in mykorrhizierten Wurzeln eine Rolle bei der Sauerstoffversorgung für die Atmungskette des Mikrosymbionten zukommen könnte. Eine Lokalisation des Proteins in mit *G. fasciculatum* infizierten Wurzelzellen der Ackerbohne würde diese Hypothese untermauern. Daher war ein Teilbereich dieser Arbeit der Gewinnung von VfLb29-spezifischen Antikörpern und dem Versuch gewidmet, das VfLb29-Protein in *V. faba* Geweben nachzuweisen.

F.4.1 VfLb29 kann mit einem VfLb29-Peptid spezifischen Antikörper in *Vicia faba* Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln nicht nachgewiesen werden

Um eine eindeutige Detektion des VfLb29-Proteins auch in Ackerbohnenknöllchen zu gewährleisten, sollten die Antikörper nach Möglichkeit so spezifisch für dieses Protein sein, dass sie andere Leghämoglobine der Ackerbohne nicht detektierten. Daher kam die Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen ein rekombinantes VfLb29-Protein nicht in Frage. Ein synthetisches Peptid, das einen Sequenzbereich der VfLb29-Aminosäuresequenz mit verhältnismäßig geringer Homologie zu den anderen drei abgeleiteten Leghämoglobinsequenzen repräsentierte, konnte aber erfolgreich zur Gewinnung eines VfLb29-Antiserums eingesetzt werden. Aufgereinigte, VfLb29-Peptid spezifische Antikörper detektierten zwar rekombinantes VfLb29, aber in Proteinextrakten aus Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln der Ackerbohne wurde kein VfLb29 detektiert. Parallelversuche unter Einsatz eines gegen Leghämoglobine der Erbse gerichteten Antiserums zeigten aber durch ihre Kreuzreaktion mit Proteinen des *V. faba* Knöllchenextraktes, dass in den Knöllchengeweben der Ackerbohne durchaus große Mengen an Leghämoglobinen vorhanden waren. Obwohl die fehlende Detektion von VfLb29 in diesen Proteinextrakten der Ackerbohne belegte, dass das Ziel eines VfLb29-spezifischen Antikörpers erreicht wurde, warf sie doch vor allem die Frage auf, warum trotz der nachgewiesenen VfLb29-Transkripte in diesen Geweben das Genprodukt selbst nicht nachweisbar war.

Möglicherweise wird VfLb29 nur unter besonderen physiologischen Bedingungen in Knöllchen und mykorrhizierten Wurzeln der Ackerbohne exprimiert, zum Beispiel beim Auftreten von anaeroben Bedingungen, die in einem Sauerstoffmangel für den jeweiligen Mikrosymbionten resultieren könnten. So wurde für Gerste nachgewiesen, dass die Hämoglobin-Expression in den Wurzeln durch Sauerstoffmangel induziert wird (Taylor *et al.*, 1994). Diese Studie wirft allerdings auch die Frage auf, ob das VfLb29-Gen unabhängig von einer Symbiose durch eine Limitierung des Sauerstoffangebots aktiviert werden kann (Frühling, 1995).

Während für Hybridisierungen meist das Gewebe zahlreicher Pflanzen gepoolt werden muss, um ausreichende Mengen an RNA zu erhalten, reichen bei Western Blot Experimenten Proteinextrakte aus Einzelpflanzen, in diesem Fall sogar aus einzelnen Knöllchen, völlig aus. Daraus resultiert die Gefahr, dass seltene Induktionsereignisse zwar auf Transkriptebene detektiert werden, auf der Proteinebene aber nicht.

Northern Blot Analysen deuten auf eine deutlich stärkere Expression von VfLb29 in Knöllchen als in mykorrhizierten Wurzeln der Ackerbohne hin (Frühling *et al.*, 1997). Aus diesen Analysen lässt sich außerdem ableiten, dass im Knöllchengewebe die Leghämoglobingene VfLbB, VfLbK und VfLb49 jeweils stärker exprimiert werden als das VfLb29-Gen. In seltenen Fällen wird im Western Blot ein an der Membran gebundenes Protein von anderen Proteinen, die auf derselben Höhe bandieren, überdeckt (D. Bartling, MBBL Bielefeld, persönliche Mitteilung). Die Leghämoglobine bilden in der SDS-DISKPAGE von Knöllchenproteinextrakten eine sehr prominente Bande in dem Bereich, in dem Proteine mit einer mole-

kularen Masse von 10 bis 30 kD bandieren. Die hohe Konzentration von Leghämoglobinen an dieser Stelle der Blotmembran könnte dazu geführt haben, dass eine verhältnismäßig geringe Menge an VfLb29-Protein überdeckt wurde bzw. die VfLb29-Peptid spezifischen Antikörper an einer Bindung sterisch gehindert wurden. Dies würde aber trotzdem nicht die fehlende Lokalisation von VfLb29 auf longitudinalen Ultra-Dünnschnitten von Ackerbohnenknöllchen erklären, denn in Übereinstimmung mit Untersuchungen in Knöllchen von Sojabohnen (Verma *et al.*, 1978), waren die nachweisbaren Leghämoglobine im gesamten Cytoplasma der infizierten Zellen verteilt und somit für eine Detektion leicht zugänglich. Die Lokalisationsstudien sprechen also eher für ein Fehlen des VfLb29-Proteins in den untersuchten Ackerbohnenknöllchen.

In diesem Zusammenhang muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass eine posttranskriptionale Regulation der VfLb29-RNA die Absenz des Proteins bewirken könnte. Eine Regulation auf dieser intermediären Ebene wurde bereits für eine ganze Reihe von Transkripten/Proteinen postuliert (Gitelman, 1997; Scholz *et al.*, 1998).

F.4.2 Ausblick auf weiterführende Arbeiten zu VfLb29

Die Expressionsdaten für VfLb29 sollten durch Untersuchungen an Einzelpflanzen zum Beispiel mittels RT-PCR abgesichert werden. Diese Methode könnte auch dazu genutzt werden, den Einfluss von abiotischen Faktoren auf die Expression von VfLb29 in *V. faba* Geweben zu untersuchen. Sollte es dann gelingen, VfLb29-Protein mit Hilfe des Peptid-spezifischen Antikörpers im Western Blot zu detektieren, könnte sich eine subzelluläre Lokalisation der Funktionsorte von VfLb29 in den beiden Symbiosen anschließen.

F.5 Das Calmodulin-bindende Protein VfCaMBP1

Das VfCaMBP1-Gen wird in mykorrhizierten Wurzeln der Ackerbohne amplifiziert exprimiert; in Wurzelknöllchen der Ackerbohne hingegen deuten die Ergebnisse von Southern-Northern-Experimenten nur auf eine sehr schwache Expression hin (Frühling, 1995). Dieses Expressionsmuster zog Arbeiten nach sich, die die Isolation eines vollständigen VfCaMBP1-Transkripts zum Ziel hatten (Krüger, 1999; Strangmann, 1998), um nachfolgend eine Charakterisierung des Genprodukts zu ermöglichen.

Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des vollständigen VfCaMBP1-Transkripts zu Beginn dieser Arbeit führte zur Identifikation homologer CaM-bindender Proteine mit bis dato unbekannter Funktion. Da der stark homologe Bereich der Aminosäuren 482 bis 500 der VfCaMBP1-Sequenz sowohl die Kriterien für das 1-8-14 Typ B Motiv für Calmodulin-Bindung erfüllte als auch für die Ausbildung einer basischen, amphiphatischen Helix, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei dem entsprechenden Abschnitt der VfCaMBP1-Aminosäuresequenz um eine CaM-bindende Domäne handelt und VfCaMBP1 somit als CaM-bindendes Protein zu klassifizieren ist. Mit der Gewinnung von reinem rekombinanten His-

VfCaMBP1 Δ N durch Expression in *E. coli* und die nachfolgende Aufreinigung des Proteins sowie dessen Einsatz zur Induktion eines VfCaMBP1-Antiserums (Pham, 1999) wurden die Voraussetzungen für eine Überprüfung dieser Hypothese und einen immunhistochemischen Nachweis von VfCaMBP1 in Gewebeextrakten der Ackerbohne geschaffen.

F.5.1 Charakterisierung der Calmodulin-bindenden Domäne von VfCaMBP1

In einem Bindungstest konnte gezeigt werden, dass aktiviertes Calmodulin aus *V. faba* Blättern spezifisch an das verkürzte rekombinante VfCaMBP1 Δ N-Protein binden kann. In einem weiterführenden Experiment unter Einsatz von Calmodulin und einem synthetischen Peptid wurde bewiesen, dass die Calmodulin-bindende Domäne des VfCaMBP1-Proteins aus den Aminosäuren 482-500 der Aminosäuresequenz gebildet wird. Die Bildung eines stabilen Komplexes aus Calmodulin und Peptid in Gegenwart von 4 M Harnstoff lässt den Rückschluss zu, dass das Peptid mit einer Dissoziationskonstante von weniger als 100 nM an Calmodulin bindet (Erickson-Viitanen und DeGrado, 1987). Darüber hinaus deutete dieses Experiment auf eine 1:3 bis 1:5 Stöchiometrie der Bindung von Calmodulin an das synthetische Peptid hin. Andere pflanzliche Calmodulin-bindende Proteine wiesen jedoch in ähnlichen Experimenten mit Calmodulin und synthetischen Peptiden eine Binde-Stöchiometrie von 1:1 (Arazi *et al.*, 1995, 2000) bzw. 1:2 auf (Reddy *et al.*, 1996). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Calmodulin-bindende Domäne des VfCaMBP1-homologen Proteins TCB60 aus *Nicotiana tabacum* (Lu und Harrington, 1994), deren Bindetest im harnstoffhaltigen Gel auf eine 1:2 Stöchiometrie schließen ließ (Dash *et al.*, 1997). Mehrere Faktoren können bei dieser Art von Bindetest theoretisch eine Rolle spielen:

Die Qualität des synthetischen Peptids beeinflusst die stöchiometrischen Berechnungen. Das im Bindetest eingesetzte synthetische Peptid hatte einen Reinheitsgrad von maximal 70 %, so dass mindestens 30 % des eingesetzten Peptids kürzer als 19 Aminosäuren waren und somit wahrscheinlich eine unzureichende Konformation/Ladungsverteilung für eine Bindung durch Calmodulin aufgewiesen haben. Eine HPLC-Untersuchung des Peptids in Lösung (A. Becker, Universität Bielefeld), bestätigte diese Verunreinigungen durch unvollständige Syntheseprodukte (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigten die HPLC-Daten, dass das Peptid in Lösung einer Proteolyse unterworfen war, die den Anteil an vollständigem Peptid in Abhängigkeit von der Zeit weiter reduzierte. Aber selbst die Berücksichtigung der Verunreinigungen in den Berechnungen der Menge des eingesetzten Peptids würde allenfalls zu einer Stöchiometrie von 1:3 führen.

Eine erfolgreiche Bindung des synthetischen Peptids kann von der Art des eingesetzten Calmodulins abhängen. Bei der Mehrzahl von Bindungstests dieser Art mit pflanzlichen Calmodulin-Bindedomänen wurde bisher wie auch hier heterologes Calmodulin aus Gehirnen von Rindern eingesetzt (Arazi *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen in Pflanzen haben aber zur Identifikation von Sequenzen geführt, die für Calmodulin-Isoformen und divergierende Calmoduline kodieren (Zielinski, 1998). Die Ähnlichkeiten zwischen den

unterschiedlichen CaM-Isoformen von zum Beispiel *A. thaliana* und *G. max* sind so groß, dass die Divergenz von CaM-Genen nicht auf diese Arten beschränkt sein sollte (Köhler *et al.*, 1999). Eine ähnliche Divergenz wäre somit auch für *V. faba* denkbar. Möglicherweise haben solche hypothetischen CaM-Isoformen aus *V. faba* auch eine divergierende Affinität für die Calmodulin-Bindedomäne von VfCaMBP1. Unter Berücksichtigung der unter anderem für einige CaM-Isoformen von *A. thaliana*, *G. max* und der Kartoffel nachgewiesenen unterschiedlich starken Expression in verschiedenen Geweben und als Antwort auf externe Stimuli (Lee *et al.*, 1995; Takezawa *et al.*, 1995; Zielinski, 1998) ist es nicht auszuschließen, dass eine eventuelle *V. faba* CaM-Isoform mit der höchsten Affinität für die Calmodulin-Bindedomäne von VfCaMBP1 im *V. faba* Calmodulin-Isolat aus Blättern nur in geringem Maße enthalten war, dafür aber im Wurzelgewebe, gegebenenfalls auch erst auf einen externen Reiz hin, verstärkt exprimiert wird. Diese Überlegungen führen zu dem Schluss, dass eine verlässliche Bestimmung der Binde-Stöchiometrie und der Affinität von Calmodulin und Calmodulin-bindender Domäne Experimente voraussetzt, die der Aufklärung der Frage dienen, ob es CaM-Isoformen in *V. faba* mit unterschiedlicher Affinität für die CaM-bindende Domäne von VfCaMBP1 gibt.

Darüber hinaus muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Phosphorylierungen in und um die CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 die Affinität des Proteins für Calmodulin beeinflussen können, wie es auch für andere CaM-bindende Proteine bereits nachgewiesen wurde (Crivici und Ikura, 1995). Die Computeranalyse der VfCaMBP1-Aminosäuresequenz führte zur Identifikation einer potentiellen Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C innerhalb der CaM-Bindestelle und von drei weiteren in ihrer unmittelbaren Nähe. Von besonderem Interesse ist hierbei die mögliche Phosphorylierungsstelle unmittelbar N-terminal zur CaM-Bindestelle, da diese als einzige auch in den homologen Proteinen aus Tabak, Mais, der Kichererbse und der Ackerschmalwand konserviert war. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Phosphorylierung dieses Serinrestes an Position 176 der VfCaMBP1-Aminosäuresequenz in Analogie zur CaM-Affinitätssteigerung der CaM-abhängigen Proteinkinase II bei Phosphorylierung eines Threoninrestes in der N-terminal zur CaM-Bindestelle gelegenen autoinhibitorischen Domäne (Colbran *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1992) ebenfalls zu einer Steigerung der CaM-Affinität von VfCaMBP1 führt.

F.5.2 Kein Nachweis von VfCaMBP1-Protein in *Vicia faba* - stark begrenzte Expressionszeiträume, posttranskriptionale Regulation oder Proteolyse?

Die Detektion von *E. coli* Proteinen im Western Blot machte eine Aufreinigung des VfCaMBP1-Antiserums notwendig. Die aufgereinigten VfCaMBP1-Antikörper detektierten zwar spezifisch das rekombinante Protein VfCaMBP1 Δ N, aber im Western Blot mit Gesamtproteinextrakten sowohl aus mykorrhizierten Wurzeln als auch aus Knöllchen der Ackerbohne war ebenso wie auf Ultra-Dünnschnitten von *V. faba* Knöllchen keine Detektion des VfCaMBP1-Antigens möglich. Die von Frühling (1995) auf Transkript-Ebene gewonnenen

Ergebnisse wiesen aber auf eine verstärkte Expression von VfCaMBP1 in mykorrhizierten Wurzeln im Vergleich zu sterilen Wurzeln und Knöllchen hin. Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären?

Es muss an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass die VfCaMBP1-mRNA offensichtlich nur sehr schwach exprimiert wird, was sich darin widerspiegelt, dass das Transkript in Northern Blots mit *V. faba* Geweben gar nicht detektierbar war, sondern erst in wesentlich sensitiveren Southnorthern Blots (Frühling 1995). Die Expression von VfCaMBP1 könnte aber auch zusätzlich als Reaktion auf spezifische Reize zeitlich und räumlich stark begrenzt sein und so eine Detektion des Proteins erschweren. So wurde zum Beispiel für das Wurzel-exprimierte und vor allem in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der CaM-Bindestelle stark homologe Protein CBP-5 aus *Z. mays* auf Transkriptebene eine verstärkte Expression nach Stimulation durch Wind festgestellt (Reddy *et al.*, 1993). Die RNA-Menge des homologen TCB60 aus *N. tabacum* hingegen wurde durch einen zweistündigen Hitzeschock um mindestens 70 % reduziert (Lu und Harrington, 1994). Die abiotischen Faktoren Dunkelheit und Kälte führten nicht zu einer Zunahme des VfCaMBP1-Proteins in mykorrhizierten Wurzeln, die eine Detektion des Proteins im Western Blot ermöglicht hätte. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass andere als diese beiden Reize zu einer Steigerung der Expression von VfCaMBP1 führen können. Da VfCaMBP1-Transkripte sowohl in der Knöllchensymbiose als auch in der arbuskulären Mykorrhiza der Ackerbohne nachweisbar sind (Frühling, 1995), spielt ein solcher Reiz möglicherweise für beide Symbiosen eine Rolle.

Eine mögliche schnelle Proteolyse des Proteins VfCaMBP1 in den Zellen würde seine Detektion im Western Blot erschweren. Wie für viele andere Calmodulin-bindende Proteine (Barnes und Gomes, 1995) wurde auch in der VfCaMBP1-Aminosäuresequenz eine PEST-Sequenz gefunden, die das Protein potentiell anfällig für eine Proteolyse durch endogene neutrale Proteasen bzw. das 26S-Proteasom machen (Rechsteiner und Rogers, 1996; Wang *et al.*, 1989). Schon bei seiner heterologen Expression in *E. coli* hatte die geringe Stabilität von VfCaMBP1 Δ N im Zellextrakt zu Problemen bei der Gewinnung ausreichender Mengen des Proteins geführt (Pham, 1999). Eine rasche Degradation von VfCaMBP1 *in vivo* ist somit nicht unwahrscheinlich.

Da der bisherige Nachweis von VfCaMBP1 in Geweben der Ackerbohne ausschließlich auf Transkriptebene erfolgt ist, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die VfCaMBP1-RNA einer posttranskriptionalen Regulation unterworfen ist. Eine posttranskriptionale Inhibierung der VfCaMBP1-RNA würde die Diskrepanz zwischen nachweisbarer RNA und nicht nachweisbarem Protein erklären.

F.5.3 Mögliche Funktionen von VfCaMBP1

VfCaMBP1 ist nach heutigem Wissensstand das erste Calmodulin-bindende Protein, dessen Transkripte in mykorrhizierten Wurzeln verstärkt exprimiert werden. Die Funktion des Proteins wird vermutlich über die Bindung von Calmodulin an seine Calmodulin-bindende

Domäne gesteuert und spielt so wahrscheinlich eine Rolle in der Verarbeitung von Ca^{2+} -Signalen in mykorrhizierten *V. faba* Wurzeln und möglicherweise auch in Knöllchen der Ackerbohne. Eine zusätzliche Steuerung über die potentiellen Phosphorylierungsstellen in und um die CaM-Bindestelle ist denkbar. Es wurden bereits eine ganze Reihe von Genen identifiziert, die auf gemeinsame Signaltransduktionswege in der AM-Symbiose und der Rhizobien-Leguminosen Symbiose hindeuten. Hierzu zählen unter anderem die bekannten Gene PsENOD5 und PsENOD12A (Albrecht *et al.*, 1998), aber auch das kürzlich isolierte LjCpb1-Gen, das interessanterweise für ein Calmodulin-ähnliches Protein kodiert (Parniske, 2000; Webb *et al.*, 2000). Möglicherweise ist VfCaMBP1 ein weiteres Element in einem Signaltransduktionsweg, der beiden Symbiosen gemeinsam ist.

Die abgeleitete VfCaMBP1-Aminosäuresequenz weist ein potentielles Kernlokalisierungssignal auf. Sollte diese potentielle Signalsequenz tatsächlich den Transport des Proteins in den Nukleus vermitteln, so würde VfCaMBP1 eine Funktion im Zellkern zukommen. Obwohl Calmodulin üblicherweise als cytoplasmatisches Protein angesehen wird, konzentrieren sich neuere Untersuchungen auch auf die Rolle von Calmodulin und CaM-bindenden Proteinen im Zellkern (siehe Übersichtsartikel von Agell *et al.*, 1998; Bachs *et al.*, 1994). Neben der großen Anzahl von im Zellkern lokalisierten CaM-bindenden Proteinen aus tierischen Systemen wurden mittlerweile auch einige wenige aus Pflanzen isoliert und charakterisiert. Dazu gehören der bZIP Transkriptionsfaktor TGA3 aus der Ackerschmalwand, der *in vitro* an den Promotor des Cam-3 *Arabidopsis*-Calmodulingens bindet (Szymanski *et al.*, 1996) und eine Chromatin-assoziierte NTPase aus der Erbse, die wie VfCaMBP1 ein „bipartite nuclear localization signal“ aufweist und deren Expression lichtreguliert ist (Hsieh *et al.*, 1996). Es gibt aber eine ganze Reihe von Zellkern-spezifischen Funktionen, an denen VfCaMBP1 bei Import in den Zellkern beteiligt sein könnte. So wurde für Calmodulin in Tieren gezeigt, dass es an der Regulation von Zellkernfunktionen wie DNA-Synthese, Mitose, Reparatur von DNA-Schäden und der Genexpression beteiligt ist (siehe Übersichtsartikel von Bachs *et al.*, 1994; Zielinski, 1998).

F.5.4 Ausblick auf weiterführende Arbeiten zu VfCaMBP1

Eine weiterführende Charakterisierung der CaM-bindenden Domäne von VfCaMBP1 ist denkbar, erscheint vor der aktuellen Literaturlage aber nur sinnvoll, wenn sie die Identifikation einer potentiellen CaM-Isoform aus *V. faba* mit der höchsten Affinität für die CaM-Bindestelle von VfCaMBP1 einschließt. Mit deutlich weniger Arbeitsaufwand wären sicherlich Untersuchungen zu den potentiellen Phosphorylierungsstellen verbunden, deren tatsächliche Phosphorylierung mittels Nachweis im Western Blot nach Phosphorylierung des rekombinanten Proteins erfolgen könnte.

Vor allem ist jedoch die Aufklärung der genauen Funktion des Calmodulin-bindenden Proteins VfCaMBP1 von Interesse. Hierzu wäre es zunächst sinnvoll, der Frage nachzugehen, ob es sich bei der potentiellen Kernlokalisierungssequenz um eine aktive Signalsequenz handelt, die

tatsächlich einen Import in den Zellkern vermitteln kann. Eine einfache Methode, um die Aktivität potentieller Kernlokalisationsignale auf der Basis ihrer Funktionalität in Hefezellen zu testen, wurde erst kürzlich von Rhee *et al.* (2000) vorgestellt. Außerdem wäre es wünschenswert, das VfCaMBP1-Protein auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu lokalisieren. Dieses wäre nicht nur ein anderer Ansatzpunkt, um die potentielle Kernlokalisierung zu untersuchen, sondern würde auch der Klärung der Frage dienen, ob VfCaMBP1 nur in den infizierten Zellen der mykorrhizierten *V. faba* Wurzeln exprimiert wird bzw. wie die entsprechenden Verhältnisse bei Expression des Gens in Zellen von *V. faba* Knöllchen sind. Gegen VfCaMBP1-gerichtete Antikörper, die das rekombinante Protein VfCaMBP1 Δ N spezifisch detektieren, sind ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit. In sich anschließenden Arbeiten müssen jedoch zunächst diejenigen Bedingungen gefunden werden, unter denen es eventuell zu einer verstärkten Expression von VfCaMBP1 kommt. Idealerweise würde dies durch Versuche mit Einzelpflanzen geschehen, die verschiedenen Reizen ausgesetzt werden und von denen anschließend über quantitative RT-PCR die Menge an exprimiertem VfCaMBP1-Transkript analysiert wird. Falls ein VfCaMBP1-homologes Transkript aus der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* (Barker *et al.*, 1990) isoliert werden kann, könnte die Analyse des Expressionslevels des entsprechenden Transkripts auch im Zuge der angestrebten Microarray-Analyse für Mykorrhiza-spezifische bzw. Mykorrhiza-amplifiziert exprimierte Gene dieser Leguminose erfolgen.

F.6 Resümee

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Studien wurden erstmals Gene der Ackerbohne, die in der Rhizobien-Leguminosen und der AM-Symbiose spezifisch oder amplifiziert exprimiert werden, auf Proteinebene charakterisiert. So konnte das frühe Nodulin VfENOD18 als neues Mitglied der „Mj0577 Superfamilie“ und ATP-bindendes, cytoplasmatisches Protein in infizierten Zellen der Stickstoff fixierenden Zone von Wurzelknöllchen identifiziert werden. Auf Grund der Lokalisation in dieser Zone des Knöllchens kommt ihm ebenso wie den untersuchten modularen Nodulinen VfNOD28/32 und dem Nodulin VfNOD32 eine Aufgabe in der Funktionsphase des Knöllchens zu, in der die Bakterioide molekularen Stickstoff fixieren. VfNOD32 erfüllt vermutlich eine nicht-essentielle, möglicherweise enzymatische Funktion im Cytoplasma infizierter und nicht infizierter Zellen, die aber bisher nicht identifiziert werden konnte (Frosch *et al.*, 2001). Für die modularen Noduline konnte eine Bindefähigkeit für Ca^{2+} -Ionen nachgewiesen werden und die Lokalisationsstudien deuten auf den Peribakteroidraum als Funktionsort dieser Noduline hin, wo sie zum Beispiel Einfluss auf den Ammoniumtransport nehmen könnten. Im Fall der Genprodukte der Knöllchen/Mykorrhiza-spezifisch bzw. Mykorrhiza-amplifiziert exprimierten Gene VfLb29 und VfCaMBP1 konnten mit den jeweiligen aufgereinigten Antikörpern keine entsprechenden Antigene in Wurzelknöllchen und mykorrhizierten Wurzeln der Ackerbohne detektiert werden. In beiden Fällen ist eine restriktive zeitliche und örtliche Regulation auf Ebene der Genexpression oder der Proteinsynthese denkbar.

VfCaMBP1 konnte als Calmodulin-bindendes Protein identifiziert und seine Calmodulin-bindende Domäne experimentell bestimmt werden. Eine potentielle Kernlokalisationssequenz ermöglicht möglicherweise seinen Import in den Zellkern, wo es eine Funktion im Kontext einer Ca^{2+} -Calmodulin vermittelten Signaltransduktion erfüllen könnte.

Für zukünftige Experimente mit dem Ziel einer weitergehenden Funktionsaufklärung für die untersuchten Symbiose-relevanten Proteine wäre es wünschenswert, über eine Expression von entsprechenden Sense- und Antisense-Konstrukten in transgenen Pflanzen den Effekt einer verstärkten oder verringerten Expression in den jeweiligen symbiontischen Geweben untersuchen zu können. Die Ackerbohne ist für solche Versuche nicht geeignet, da für sie kein Transformationssystem existiert. Eine gute Ausweichmöglichkeit bietet sich aber in Form der Modell-Leguminose *M. truncatula* an. Neben anderen Vorteilen wie zum Beispiel einer kleinen Genomgröße, Autogamie, der Existenz groß angelegter EST-Sequenzierprojekte und einer umfangreichen Sammlung von Mutanten (Cook *et al.*, 1997) kann sie effizient transformiert und regeneriert werden (Trieu *et al.*, 2000; Trinh *et al.*, 1998). Für die modularen Noduline VfNOD28/32 konnte das korrespondierende *M. truncatula* Gen MtNOD25 bereits isoliert werden und für VfENOD18 existiert eine homologe *M. truncatula* EST-Sequenz. Diese Daten und der hohe Verwandtschaftsgrad zwischen *Vicia faba* und *M. truncatula* lassen es möglich erscheinen, auch homologe Sequenzen für VfLb29, VfNOD32 und VfCaMBP1 mittels RT-PCR oder genomischer PCR aus *M. truncatula* zu isolieren, um diese dann in funktionalen Analysen in transgenen *M. truncatula* Pflanzen einsetzen zu können.

G. ABKÜRZUNGEN

A	Adenosin	g	Erdbeschleunigung
A.	<i>Arabidopsis</i>	G.	<i>Glycine</i>
Ac	Acetat	GRP	Glycin-reiches Protein
AM	arbuskuläre Mykorrhiza	GTP	Guanosintriphosphat
Amp	Ampicillin	h	Stunde(n)
APS	Ammoniumpersulfat	HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]- piperazin- N'-[2-Ethansulfonsäure]
AS	Aminosäure(n)	His	Histidin
AP	alkalische Phosphatase	IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D- galaktosid
ATP	Adenosintriphosphat	Ig	Immunglobulin
bp	Basenpaar(e)	k	kilo (x 10 ³)
BSA	Rinderserumalbumin	kb	Kilobasen
bv.	biovar	kD	Kilo-Dalton
bzw.	beziehungsweise	l	Liter
ca.	circa	LB	Luria-Bertani Broth
⁴⁵ Ca ²⁺	Calciumisotop der relativen Masse 45	LOX	Lipoxygenase
C	Cytosin	LSA	Lammserumalbumin
°C	Grad Celsius	Lsg.	Lösung
CaM	Calmodulin	m	milli (x 10 ⁻³)
CaMBP	Calmodulin-bindendes Protein	M	molar
cDNA	„copy“ DNA	mA	Milliampère
Ci	Curie	MBP	Maltosebindeprotein
cm	Zentimeter	mcs	multiple cloning site
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'- Triphosphat	mg	Milligramm
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'- Triphosphat	MOPS	Morpholinoorthopropionsäure
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'- Triphosphat	mRNA	„messenger“ RNA
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'- Triphosphat	μ	mikro (x 10 ⁻⁶)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	n	nano (x 10 ⁻⁹)
DISKPAGE	diskontinuierliche Polyacryl- amidgelelektrophorese	N	Normalität, normal
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NBT	Nitroblau Tetrazolium
DNase	DNA abbauendes Enzym	Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Acetat
DTT	Dithiothreitol	o.D.	optische Dichte
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	o.D. _{xxx}	optische Dichte bei xxx nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	p	piko (x 10 ⁻¹²)
EST	„expressed sequence tag“	PA	Penassay Broth
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)	PAA	Polyacrylamid
g	Gramm	PBJR	Proteingel-Ladepuffer
		PBM	Peribakteroidmembran
		PCR	Polymerase-Kettenreaktion
		PDB	Brookhaven Proteindatenbank
		PE	Polyethylen

PEG	Polyethylenglycol	U	Enzymeinheit (Unit)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration	ü.N.	über Nacht
		Upm	Umdrehungen pro Minute
		UV	ultraviolettes Licht
pH _i	isoelektrischer pH	UZ	Ultrazentrifuge
PRP	Prolin-reiches Protein	V	Volt
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid	V.	<i>Vicia</i>
R.	<i>Rhizobium</i>	VfNDS	<i>Vicia faba</i> „nodule differential screening“
RNA	Ribonukleinsäure	Vol.	Volumen
RNAse	Ribonuklease	W	Watt
RT	Raumtemperatur	X-Phosphat	5-Chlor-4-Chlor-3-Indolylphosphat
SB	Super Broth		
sec	Sekunde(n)	z.B.	zum Beispiel
SDS	Natriumdodecylsulfat	% [v / v]	Volumenprozent
T	Thymin oder Zeit	% [w / v]	Gewichtsprozent
TEMED	Tetramethylethylendiamin		
Tet	Tetracyclin		

H. LITERATUR

- Agell N., Aligue R., Alemany V., Castro A., Jaime M., Pujol M.J., Rius E., Serratosa J., Taules M. und Bachs O.:** New nuclear functions for calmodulin. *Cell Calcium* 23: 115-121 (1998).
- Albrecht C., Geurts R., Lapeyrie F. und Bisseling T.:** Endomycorrhizae and rhizobial nod factors activate signal transduction pathways inducing *PsENOD5* and *PsENOD12* expression in which Sym8 is a common step. *Plant J* 15: 605-615 (1998).
- Albrecht C., Geurts R. und Bisseling T.:** Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J* 18: 281-288 (1999).
- Albus U.:** Transkriptlokalisierungen in Wurzelknöllchen der Ackerbohne *Vicia faba* L. mit nicht-radioaktiven Nachweismethoden. Diplomarbeit, Universität Bielefeld (1996).
- Alexander T., Meier R., Toth R. und Weber H.C.:** Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* with reference to *Zea mays* L. *New Phytol* 110: 363-370 (1988).
- Alexander T., Toth R., Meier R. und Weber H.C.:** Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. *Can J Bot* 67: 2505-2513 (1989).
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. und Lipman D.J.:** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410 (1990).
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. und Lipman D.J.:** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402 (1997).
- Andreev I., Dubrovo P., Krylova V., Andreeva I.N., Koren'kov V., Sorokin E.M. und Izmailov S.F.:** Characterization of ATP-hydrolyzing and ATP-driven proton-translocating activities associated with the peribacteroid membrane from root nodules of *Lupinus luteus* L. *J Plant Physiol* 151: 563-569 (1997).
- Andreev I.M., Dubrovo P.N., Krylova V.V. und Izmailov S.F.:** Functional identification of ATP-driven Ca^{2+} pump in the peribacteroid membrane of broad bean root nodules. *FEBS Lett* 447: 49-52 (1999).
- Andreeva I.N., Andreev I.M., Dubrovo P.N., Kozharinova G.M., Krylova V.V. und Izmailov S.F.:** Calcium stores in symbiosomes from yellow lupin root nodules. *J Plant Physiol* 155: 357-363 (1999).
- Appleby C.A.:** Leghemoglobin and rhizobial respiration. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 443-478 (1984).
- Arazi T., Baum G., Snedden W.A., Shelp B.J. und Fromm H.:** Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant Physiol* 108: 551-561 (1995).
- Arazi T., Kaplan B. und Fromm H.:** A high-affinity calmodulin-binding site in a tobacco plasma-membrane channel protein coincides with a characteristic element of cyclic nucleotide-binding domains. *Plant Mol Biol* 42: 591-601 (2000).
- Ardourel M., Demont N., Debellé F., Maillet F., de Billy F., Promé J.C., Dénarié J. und Truchet G.:** *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* 6: 1357-1374 (1994).
- Arnold W. und Pühler A.:** A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing. *Gene* 70: 171-179 (1988).
- Arsenijevic-Maksimovic I., Broughton W.J. und Krause A.:** Rhizobia modulate root-hair-specific expression of extensin genes. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 95-101 (1997).

- Bachs O., Agell N. und Carafoli E.:** Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nucleus. *Cell Calcium* 16: 289-296 (1994).
- Bago B., Pfeffer P.E., Douds D.D.J., Brouillette J., Becard G. und Shachar-Hill Y.:** Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* 121: 263-272 (1999).
- Balestrini R., Romera C., Puigdoménech P. und Bonfante P.:** Location of a cell-wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and β -1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta* 195: 201-209 (1994).
- Balestrini R., José-Estanyol M., Puigdoménech P. und Bonfante P.:** Hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA accumulation in maize root cells colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus revealed by *in situ* hybridization. *Protoplasma* 198: 36-42 (1997).
- Balestrini R., Perotto S., Gasverde E., Dahiya P., Guldmann L.L., Brewin N.J. und Bonfante P.:** Transcription of a gene encoding a lectin-like glycoprotein is induced in root cells harboring arbuscular mycorrhizal fungi in *Pisum sativum*. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 785-791 (1999).
- Barker D.G., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad S., Flament P., Gallusci P., Génier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Dénarié J. und Huguet T.:** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep* 8: 40-49 (1990).
- Barker S.J., Tagu D. und Delp G.:** Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Phys* 116: 1201-1207 (1998).
- Barnes J.A. und Gomes A.V.:** PEST sequences in calmodulin-binding proteins. *Mol Cell Biochem* 149-150: 17-27 (1995).
- Bassett B., Goodman R.N. und Novacky A.:** Ultrastructure of soybean nodules. I: release of rhizobia from the infection thread. *Can J Microbiol* 23: 573-582 (1977).
- Bauer P., Crespi M.D., Szécsi J., Allison L.A., Schultze M., Ratet P., Kondorosi E. und Kondorosi A.:** Alfalfa Enod12 genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. *Plant Physiol* 105: 585-592 (1994).
- Baum G., Chen Y., Arazi T., Takatsuji H. und Fromm H.:** A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. *J Biol Chem* 268: 19610-19617 (1993).
- Bécard G., Douds D.D. und Pfeffer P.E.:** Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl Environ Microbiol* 58: 821-825 (1992).
- Becker J.D.:** Expression von Knöllchenproteinen der Ackerbohne *Vicia faba* L. in *E. coli* und Aufreinigung der Proteine zur Gewinnung von Antikörpern. Diplomarbeit, Universität Bielefeld (1996).
- Bergmann H., Preddie E. und Verma D.P.S.:** Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J* 2: 2333-2339 (1983).
- Bisseling T., Been C., Klugkist J., van Kammen A. und Nadler K.:** Nodule-specific host proteins in effective and ineffective root nodules of *Pisum sativum*. *EMBO J* 2: 961-966 (1983).
- Bisseling T., Franssen H., Govers F., Horvath B., Moerman M., Scheres B., van de Wiel C. und Yang W.-C.:** Early nodulins in pea and soybean nodule development. In: Henneke H. und Verma D.P.S. (eds), *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, pp. 300-303. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande (1991).
- Bladergroen M.R. und Spaink H.P.:** Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 1: 353-359 (1998).
- Boguski M.S., Lowe T.M.J. und Tolstoshev C.M.:** dbEST: database for "expressed sequence tags". *Nature Genet* 4: 332-333 (1993).

- Bond D.A., Lawes D.A., Hawtin G.C., Saxena M.C. und Stephens J.S.:** Faba Bean (*Vicia faba* L.). In: Summerfield R.J. und Roberts E.H. (eds), Grain Legume Crops, pp. 199-265. William Collins Sons, London (1985).
- Bonfante P., Bergero R., Uribe X., Romera C., Rigau J. und Puigdoménech P.:** Transcriptional activation of a maize α -tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants. *Plant J* 9: 737-743 (1996).
- Bonfante P., Genre A., Faccio A., Martini I., Stougaard J., Schauser L., Webb K.J. und Parniske M.:** The *Lotus japonicus* *LjSym4* gene is required for the passage of root epidermis cells by rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1109-1120 (2000).
- Bonfante-Fasolo P.:** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell C.L. und Bagyaraj D.J. (eds), VA Mycorrhizae, pp. 5-33. CRC Press, Boca Raton, FL (1984).
- Bonfante-Fasolo P., Faccio A., Perotto S. und Schubert A.:** Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol Res* 94: 157-165 (1990).
- Bonfante-Fasolo P. und Perotto S.:** Plant and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction. In: Verma D.P.S. (ed), Molecular Signals in Plant-Microbe Communications, pp. 445-470. CRC Press, Boca Raton, FL (1992).
- Bonfante-Fasolo P. und Perotto S.:** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol* 130: 3-21 (1995).
- Borg S., Brandstrup B., Jensen T.J. und Poulsen C.:** Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. *Plant J* 11: 237-250 (1997).
- Borg S., Pødenphant L., Jensen T.J. und Poulsen C.:** Plant cell growth and differentiation may involve GAP regulation of Rac activity. *FEBS Lett* 453: 341-345 (1999).
- Boron L.J. und Legocki A.B.:** Cloning and characterization of a nodule-enhanced glutamine synthetase-encoding gene from *Lupinus luteus*. *Gene* 136: 95-102 (1993).
- Bradford M.M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254 (1976).
- Brent R. und Ptashne M.:** Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4204-4208 (1981).
- Brewin N.J.:** Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* 7: 191-226 (1991).
- Broughton W.J. und Perret X.:** Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. *Curr Opin Plant Biol* 2: 305-311 (1999).
- Bryan J.:** Caldesmon, acidic amino acids and molecular weight determinations. *J Muscle Res Cell Motil* 10: 95-96 (1989).
- Bullock W.C., Fernandez J.M. und Short J.M.:** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-379 (1987).
- Burleigh S.H. und Harrison M.J.:** A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. *Plant Mol Biol* 34: 199-208 (1997).
- Burleigh S.H. und Harrison M.J.:** The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol* 119: 241-248 (1999).
- Bush D.S.:** Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 95-122 (1995).

- Campos F., Padilla J., Vázquez M., Ortega J.L., Enríquez C. und Sánchez F.:** Expression of nodule specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol* 9: 521-532 (1987).
- Cohn J., Day R.B. und Stacey G.:** Legume nodule organogenesis. *Trends Plant Sci* 3: 105-110 (1998).
- Colbran R.J., Smith M.K., Schworer C.M., Fong Y.L. und Soderling T.R.:** Regulatory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Mechanism of inhibition and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 264: 4800-4804 (1989).
- Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E. und van den Bosch K.:** Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* 7: 43-55 (1995).
- Cook D.R., van den Bosch K., de Bruijn F.J. und Huguet T.:** Model legumes get the nod. *Plant Cell* 9: 275-281 (1997).
- Corby H.D.L.:** Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. *Kirkia* 13: 53-123 (1988).
- Crespi M.D., Jurkevitch E., Poiret M., d'Aubenton-Carafa Y., Petrovics G., Kondorosi E. und Kondorosi A.:** Enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J* 13: 5099-5112 (1994).
- Crivici A. und Ikura M.:** Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24: 85-116 (1995).
- Cuff J.A., Clamp M.E., Siddiqui A.S., Finley M. und Barton G.J.:** Jpred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14: 892-893 (1998).
- Dahiya P., Sherrier D.J., Kardailsky I.V., Borisov A.Y. und Brewin N.J.:** Symbiotic gene *sym31* controls the presence of a lectin-like glycoprotein in the symbiosome compartment of nitrogen-fixing pea nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 933-936 (1998).
- Dash S., Niemaczura W. und Harrington H.M.:** Characterization of the basic amphiphilic alpha-helix calmodulin-binding domain of a 61.5 kDa tobacco calmodulin-binding protein. *Biochemistry* 36: 2025-2029 (1997).
- de Billy F., Barker D.G., Gallusci P. und Truchet G.:** Leghemoglobin gene transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfalfa. *Plant J* 1: 27-37 (1991).
- Delauney A.J. und Verma D.P.S.:** Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. *Plant Mol Biol Rep* 6: 279-285 (1988).
- Dingwall C. und Laskey R.A.:** Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* 16: 478-481 (1991).
- Dixon R.A., Harrison M.J. und Lamb C.J.:** Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* 32: 479-501 (1994).
- Downie J.A.:** Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol* 2: 318-324 (1994).
- Doyle J.J.:** Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu Rev Ecol Syst* 25: 325-349 (1994).
- Doyle J.J., Doyle J.L., Ballenger J.A., Dickson E.E., Kajita T. und Ohashi H.:** A phylogeny of the chloroplast gene *RBCL* in the leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *Am J Bot* 84: 541-554 (1997).
- Doyle J.J.:** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci* 3: 473-478 (1998).

- Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V. und Gianinazzi S.:** First report of non-mycorrhizal plant mutants (myc⁻) obtained in pea (*Pisum sativum*) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci* 60: 215-222 (1989).
- Erickson-Viitanen S. und DeGrado W.F.:** Recognition and characterization of calmodulin-binding sequences in peptides and proteins. *Methods Enzymol* 139: 455-478 (1987).
- Fedorova E., Thomson R., Whitehead L.F., Maudoux O., Udvardi M.K. und Day D.A.:** Localization of H⁺-ATPase in soybean root nodules. *Planta* 209: 25-32 (1999).
- Fischer H.M.:** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* 58: 352-386 (1994).
- Fischer R., Koller M., Flura M., Mathews S., Strehler-Page M.A., Krebs J., Penniston J.T., Carafoli E. und Strehler E.E.:** Multiple divergent mRNAs code for a single human calmodulin. *J Biol Chem* 263: 17055-17062 (1988).
- Fisher R.F. und Long S.R.:** Rhizobium-plant signal exchange. *Nature* 357: 655-660 (1992).
- Fortin M.G., Zelechowska M. und Verma D.P.S.:** Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. *EMBO J* 4: 3041-3046 (1985).
- Fortin M.G., Morrison N.A. und Verma D.P.:** Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res* 15: 813-824 (1987).
- Frank A.B.:** Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges* 3: 128-145 (1885).
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C. und Bisseling T.:** Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol* 19: 89-107 (1992).
- Frosch S.C., Becker J.D., Schultze M., Schlesier B., Kahmann U., Perlick A. und Pühler A.:** The nodulin Nvf32 is highly abundant only in a subpopulation of *Vicia faba* L. cv Kleine Thüringer. *Plant Sci*: eingereicht (2001).
- Frugier F., Kondorosi A. und Crespi M.:** Identification of novel putative regulatory genes induced during alfalfa nodule development with a cold-plaque screening procedure. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 358-366 (1998).
- Frühling M.:** Genexpression in Wurzelknöllchen und mykorrhizierten Wurzeln der Ackerbohne *Vicia faba* L. Dissertation, Universität Bielefeld (1995).
- Frühling M., Roussel H., Gianinazzi-Pearson V., Pühler A. und Perlick A.M.:** The *Vicia faba* leghemoglobin gene Vflb29 is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 124-131 (1997).
- Frühling M., Albus U., Hohnjec N., Geise G., Pühler A. und Perlick A.M.:** A small gene family of broad bean codes for late nodulins containing conserved cysteine clusters. *Plant Sci* 152: 67-77 (2000).
- Gantt J.S., Larson R.J., Farnham M.W., Pathirana S.M., Miller S.S. und Vance C.P.:** Aspartate aminotransferase in effective and ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol* 98: 868-878 (1992).
- Gawienowski M.C.:** Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* CaM-3 promoter. *Plant Cell* 8: 1069-1077 (1996).
- Geourjon C. und Deleage G.:** ANTHEPROT 2.0: a three-dimensional module fully coupled with protein sequence analysis methods. *J Mol Graph* 13: 209-212, 199-200 (1995).
- Gerdemann J.W.:** Vesicular-arbuscular mycorrhizas on maize and tulip tree by *Endogone fasciculata*. *Mycol* 57: 562-575 (1965).

- Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Guillemin J.P., Trouvelot A. und Duc G.:** Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. In: Hennecke H. und Verma D.P.S. (eds), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 336-342. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande (1991a).
- Gianinazzi-Pearson V., Smith S.E., Gianinazzi S. und Smith F.A.:** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* 117: 61-74 (1991b).
- Gianinazzi-Pearson V.:** Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8: 1871-1883 (1996a).
- Gianinazzi-Pearson V., Dumas-Gaudot E., Golotte A., Tahiri-Alaoui A. und Gianinazzi S.:** Cellular and molecular defense-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133: 45-57 (1996b).
- Gianinazzi-Pearson V., Arnould C., Oufattole M., Arango M. und Gianinazzi S.:** Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 211: 609-613 (2000).
- Giovanetti M., Sbrana C., Avio L., Citernes A.S. und Logi C.:** Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol* 125: 587-593 (1993).
- Giovanetti M., Sbrana C. und Logi C.:** Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 127: 703-709 (1994).
- Gitelman I.:** Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol* 189: 205-214 (1997).
- Goethals K., Van Montagu M. und Holsters M.:** Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1646-1650 (1992).
- Govers F., Gloude-mans T., Moerman M., van Kammen A. und Bisseling T.:** Expression of plant genes during development of pea root nodules. *EMBO J* 4: 861-867 (1985).
- Govers F., Nap J.-P., Moerman M., Fransen H.J., van Kammen A. und Bisseling T.:** cDNA cloning and developmental expression of pea nodulin genes. *Plant Mol Biol* 8: 425-435 (1987).
- Graceffa P., Wang C.L. und Stafford W.F.:** Caldesmon. Molecular weight and subunit composition by analytical ultracentrifugation. *J Biol Chem* 263: 14196-14202 (1988).
- Gribskov M., McLachlan A.D. und Eisenberg D.:** Profile analysis: detection of distantly related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4355-4358 (1987).
- Gualtieri G. und Bisseling T.:** The evolution of nodulation. *Plant Mol Biol* 42: 181-194 (2000).
- Guan C., Li P., Riggs P.D. und Inouye H.:** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67: 21-30 (1987).
- Guex N. und Peitsch M.C.:** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723 (1997).
- Gumpel N.J. und Smith A.G.:** A novel calcium-binding protein from *Euglena gracilis*. Characterisation of a cDNA encoding a 74-kDa acidic-repeat protein targeted across the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* 210: 721-727 (1992).
- Harlow E. und Lane D.P.:** *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988).
- Harrison M.J.:** A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J* 9: 491-503 (1996).

- Harrison M.J.:** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends Plant Sci* 2: 54-60 (1997).
- Harrison M.J.:** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 361-389 (1999).
- Heard J. und Dunn K.:** Symbiotic induction of a MADS-box gene during development of alfalfa root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5273-5277 (1995).
- Heard J., Caspi M. und Dunn K.:** Evolutionary diversity of symbiotically induced nodule MADS box genes: characterization of nmhC5, a member of a novel subfamily. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 665-676 (1997).
- Hirsch A.M.:** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* 122: 211-237 (1992).
- Hirsch A.M. und LaRue T.A.:** Is the legume nodule a modified root or stem or an organ sui generis? *Crit Rev Plant Sci* 16: 361-392 (1997).
- Hirsch A.M. und Kapulnik Y.:** Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: comparisons with the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Fungal Gen Biol* 23: 205-212 (1998).
- Hohnjec N.:** Das Nodulieren VfENOD18 der Ackerbohne *Vicia faba* L.: Charakterisierung der VfENOD18 Genfamilie und Identifizierung eines VfENOD18 Promotors, der in transgenen *Vicia hirsuta* Knöllchen aktiv ist. Diplomarbeit, Universität Bielefeld (1997).
- Hohnjec N., Becker J.D., Pühler A., Perlick A.M. und Küster H.:** Genomic organization and expression properties of the MtSucS1 gene, which encodes a nodule-enhanced sucrose synthase in the model legume *Medicago truncatula*. *Mol Gen Genet* 261: 514-522 (1999).
- Hohnjec N., Küster H., Albus U., Frosch S.C., Becker J.D., Pühler A., Perlick A.M. und Frühling M.:** The broad bean nodulin VfENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily. *Mol Gen Genet* 264: 241-250 (2000).
- Horvath B., Heidstra R., Lados M., Moerman M., Spaink H.P., Promé J.C., van Kammen A. und Bisseling T.:** Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J* 4: 727-733 (1993).
- Hsieh H.L., Tong C.G., Thomas C. und Roux S.J.:** Light-modulated abundance of an mRNA encoding a calmodulin-regulated, chromatin-associated NTPase in pea. *Plant Mol Biol* 30: 135-147 (1996).
- Izmailov S.F., Andreeva I.N. und Kozharinova G.M.:** Subcellular calcium localization in the root nodules of legumes. *R J Plant Physiol* 46: 93-101 (1999).
- Jackson C.M.:** Factor Xa. In: Spaet T.H. (ed), *Progress in hemostasis and thrombosis*, pp. 55-108. Grune and Stratton, New York (1984).
- Jacquelinet-Jeanmougin S. und Gianinazzi-Pearson V.:** Endomycorrhizas in the Gentianaceae. I. The fungus associated with *Gentiana lutea* L. *New Phytol* 95: 663-666 (1983).
- Jeffries P.:** Uses of mycorrhizae in agriculture. *Crit Rev Biotechnol* 5: 319-357 (1987).
- Journet E.P., Pichon M., Dedieu A., de Billy F., Truchet G. und Barker D.G.:** *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J* 6: 241-249 (1994).
- Kamst E., Spaink H.P. und Kafetzopoulos D.:** Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. *Subcell Biochem* 29: 29-71 (1998).
- Kannenbergh E.L. und Brewin N.J.:** Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends Microbiol* 2: 277-283 (1994).

- Kapp D.:** Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Infektionsverhalten von *Rhizobium meliloti* Mutanten mit veränderter Exopolysaccharidsynthese in der Symbiose mit Luzerne (*Medicago sativa* L.). Dissertation, Universität Bielefeld (1996).
- Kapulnik Y., Volpin H., Itzhaki H., Ganon D. und Galili S.:** Suppression of defense responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytol* 133: 59-64 (1996).
- Kawasaki H. und Kretsinger R.H.:** Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. *Protein Profile* 1: 343-517 (1994).
- Khyse-Anderson J.:** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* 10: 203-209 (1984).
- Kijne J.W.:** The *Rhizobium* infection process. In: H. S., Burris R.H. und Evans H.J. (eds), *Biological nitrogen fixation*, pp. 349-398 (1992).
- Kishimoto A., Nishiyama K., Nakanishi H., Uratsuji Y., Nomura H., Takeyama Y. und Nishizuka Y.:** Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260: 12492-12499 (1985).
- Kiss G.B., Vincze E., Végh Z., Tóth G. und Soós J.:** Identification and cDNA cloning of a new nodule-specific gene, Nms-25 (nodulin-25) of *Medicago sativa*. *Plant Mol Biol* 14: 467-475 (1990).
- Klee C.B. und Vanaman T.C.:** Calmodulin. *Adv Prot Chem* 35: 213-321 (1982).
- Kleinschmidt J.A., Dingwall C., Maier G. und Franke W.W.:** Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *EMBO J* 5: 3547-3552 (1986).
- Köhler C., Merkle T. und Neuhaus G.:** Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18: 97-104 (1999).
- Koronakis V., Hughes C. und Koronakis E.:** ATPase activity and ATP/ADP-induced conformational change in the soluble domain of the bacterial protein translocator HlyB. *Mol Microbiol* 8: 1163-1175 (1993).
- Kouchi H. und Hata S.:** Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol Gen Genet* 238: 106-119 (1993).
- Kouchi H., Takane K., So R.B., Ladha J.K. und Reddy P.M.:** Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant J* 18: 121-129 (1999).
- Krajinski F., Martin-Laurent F., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. und Franken P.:** Cloning and analysis of *psam2*, a gene from *Pisum sativum* L. regulated in symbiotic arbuscular mycorrhiza and pathogenic root-fungus interactions. *Physiol Mol Plant Pathol* 52: 297-307 (1998).
- Krajinski F., Biela A., Schubert D., Gianinazzi-Pearson V., Kaldenhoff R. und Franken P.:** Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211: 85-90 (2000).
- Krüger J.:** Isolierung und Charakterisierung mykorrhizainduzierter Gene der Ackerbohne *Vicia faba* L. Diplomarbeit, Universität Bielefeld (1999).
- Küster H., Frühling M., Perlick A.M. und Pühler A.:** The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodule tissue of *Vicia faba*. *Mol Plant Microbe Interact* 6: 507-514 (1993).
- Küster H., Perlick A.M. und Pühler A.:** Members of a broadbean nodulin family with partial homologies to the alfalfa nodulin 25 are composed of two types of amino acid repeats flanked by unique amino acid sequence termini. *Plant Mol Biol* 24: 143-157 (1994).
- Küster H., Schröder G., Frühling M., Pich U., Rieping M., Schubert I., Perlick A.M. und Pühler A.:** The nodule-specific VfENOD-GRP3 gene encoding a glycine-rich early nodulin is located on chromosome I of *Vicia faba* L. and is predominantly expressed in the interzone II-III of root nodules. *Plant Mol Biol* 28: 405-421 (1995a).

- Küster H., Quandt H.J., Broer I., Perlick A.M. und Pühler A.:** The promoter of the *Vicia faba* L. VIENOD-GRP3 gene encoding a glycine-rich early nodulin mediates a predominant gene expression in the interzone II-III region of transgenic *Vicia hirsuta* root nodules. *Plant Mol Biol* 29: 759-772 (1995b).
- Küster H.:** Molekulare Analyse von zwei knöllchenspezifisch exprimierten Genen der Ackerbohne *Vicia faba* L. Dissertation, Universität Bielefeld (1995c).
- Küster H., Frühling M., Pühler A. und Perlick A.M.:** The modular nodulins Nvf-28/32 of broad bean (*Vicia faba* L.): alternative exon combinations account for different modular structures. *Mol Gen Genet* 252: 648-657 (1996).
- Küster H., Albus U., Frühling M., Tchetkova S.A., Tikhonovitch I.A., Pühler A. und Perlick A.M.:** The asparagine synthetase gene VfAS1 is strongly expressed in the nitrogen-fixing zone of broad bean (*Vicia faba* L.) root nodules. *Plant Sci* 124: 89-95 (1997).
- Küster H., Pühler A. und Perlick A.M.:** Analysis of genes encoding modular nodulins from *Vicia hirsuta* and *Vicia faba*. *Plant Sci* 149: 1-11 (1999).
- Küster H., Frühling M., Albus U., Becker J.D., Böhner S., Frosch S.C., Geise G., Hohnjec N., Krüger J., Pham V.-A., Rieping M., Schröder G., Stavridis T., Strangmann M., Tchetkova S., Pühler A. und Perlick A.M.:** The *Rhizobium*-legume symbiosis: Characterization of marker genes for the organogenesis and functioning of nitrogen-fixing root nodules in the grain legume broad bean (*Vicia faba* L.). In: Pandalai S (ed), Recent Research Developments in Plant Physiology. Research Signpost, im Druck (2001).
- Laane C., Haaker H. und Veeger C.:** Involvement of the cytoplasmic membrane in nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. *Eur J Biochem* 87: 147-153 (1978).
- Laemmli U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).
- Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S. und Candia O.A.:** An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100: 95-97 (1979).
- Lapopin L., Gianinazzi-Pearson V. und Franken P.:** Comparative differential RNA display analysis of arbuscular mycorrhiza in *Pisum sativum* wild type and a mutant defective in late stage development. *Plant Mol Biol* 41: 669-677 (1999).
- LaRue T.A. und Weeden N.F.:** The symbiosis genes of the host. In: Kiss G.B. und Endre G. (eds), Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference, pp. 147-151. Officina Press, Szeged, Hungary (1994).
- Lee S.H., Kim J.C., Lee M.S., Heo W.D., Seo H.Y., Yoon H.W., Hong J.C., Lee S.Y., Bahk J.D., Hwang I. et al.:** Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. *J Biol Chem* 270: 21806-21812 (1995).
- Legocki R.P. und Verma D.P.:** Identification of nodule-specific host proteins (nodulins) involved in the development of rhizobium-legume symbiosis. *Cell* 20: 153-163 (1980).
- Lerouge P.:** Symbiotic host specificity between leguminous plants and rhizobia is determined by substituted and acylated glucosamine oligosaccharide signals. *Glycobiology* 4: 127-134 (1994).
- Lin X., Kaul S., Rounsley S., Shea T.P., Benito M.I., Town C.D., Fujii C.Y., Mason T., Bowman C.L., Barnstead M., Feldblyum T.V., Buell C.R., Ketchum K.A., Lee J., Ronning C.M., Koo H.L., Moffat K.S., Cronin L.A., Shen M., Pai G., Van Aken S., Umayam L., Tallon L.J., Gill J.E., Venter J.C. et al.:** Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 761-768 (1999).
- Liu H., Trieu A.T., Blaylock L.A. und Harrison M.J.:** Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 14-22 (1998).
- Long S.R.:** Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56: 203-214 (1989).

- Lu Y. und Harrington H.M.:** Isolation of tobacco cDNA clones encoding calmodulin-binding proteins and characterization of a known calmodulin-binding domain. *Plant Physiol Biochem* 32: 413-422 (1994).
- Lu Y.T., Dharmasiri M.A. und Harrington H.M.:** Characterization of a cDNA encoding a novel heat-shock protein that binds to calmodulin. *Plant Physiol* 108: 1197-1202 (1995).
- Maina C.V., Riggs P.D., Grandea A.G.d., Slatko B.E., Moran L.S., Tagliamonte J.A., McReynolds L.A. und Guan C.D.:** An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74: 365-373 (1988).
- Makarova K.S., Aravind L., Galperin M.Y., Grishin N.V., Tatusov R.L., Wolf Y.I. und Koonin E.V.:** Comparative genomics of the archaea (Euryarchaeota): Evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. *Genome Res* 9: 608-628 (1999).
- Marsolier M.C., Debrosses G. und Hirel B.:** Identification of several soybean cytosolic glutamine synthetase transcripts highly or specifically expressed in nodules: expression studies using one of the corresponding genes in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Mol Biol* 27: 1-15 (1995).
- Martin-Laurent F., van Tuinen D., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. und Franken P.:** Differential display analysis of RNA accumulation in arbuscular mycorrhiza of pea and isolation of a novel symbiosis-regulated plant gene. *Mol Gen Genet* 256: 37-44 (1997).
- Martin-Laurent F., Arnould C., Chatagnier O., van Tuinen D., Franken P., Gianinazzi S. und Gianinazzi-Pearson V.:** Cellular localization of a plant protein PSAM 1 in arbuscular mycorrhizas of *Pisum sativum*. *Planta* 207: 153-157 (1998).
- Maruyama K., Mikawa T. und Ebashi K.:** Detection of calcium binding proteins by ⁴⁵Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J Biochem* 95: 511-519 (1984).
- McKhann H.I. und Hirsch A.M.:** Does Rhizobium avoid the host response? In: Dings J. (ed), *Bacterial Pathogenesis in Plants and Animals. Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 139-162. Springer-Verlag, Berlin (1994).
- McKhann H.I., Frugier F., Petrovics G., de la Peña T.C., Jurkevitch E., Brown S., Kondorosi E., Kondorosi A. und Crespi M.:** Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone-mediated cell division? *Plant Mol Biol* 34: 771-780 (1997).
- McPershon R.A.:** Evolution of polymerase chain-reaction to a quantitative laboratory tool. *Clinical Chemistry* 41: 1065-1067 (1995).
- Meyer T., Hanson P.I., Stryer L. und Schulman H.:** Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256: 1199-1202 (1992).
- Miao G.H. und Verma D.P.S.:** Soybean nodulin-26 gene encoding a channel protein is expressed only in the infected cells of nodules and is regulated differently in roots of homologous and heterologous plants. *Plant Cell* 5: 781-794 (1993).
- Minami E., Kouchi H., Cohn J.R., Ogawa T. und Stacey G.:** Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *Plant J* 10: 23-32 (1996).
- Mohapatra S.S. und Pühler A.:** Detection of nodule-specific polypeptides from effective and ineffective root nodules of *Medicago sativa* L. *Plant Physiol* 126: 269-281 (1986).
- Mohapatra S.S., Perlick A.M. und Pühler A.:** Nodule specific polypeptides of broadbean (*Vicia faba* L.). *Symbiosis* 3: 219-232 (1987).
- Morton J.B. und Benny J.L.:** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491 (1990).
- Mullis K.B. und Faloona F.A.:** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350 (1987).

- Murphy P.J., Langridge P. und S.E. S.:** Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 135: 291-301 (1997).
- Mylona P., Pawlowski K. und Bisseling T.:** Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-885 (1995).
- Nap J.P. und Bisseling T.:** The roots of nodulins. *Phys Plant* 79: 407-414 (1990).
- Newcomb E.H. und Tandon S.R.:** Uninfected cells of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science* 250: 1394-1396 (1981).
- Newsham K.K., Fitter A.H. und Watkinson A.R.:** Arbuscular mycorrhizha protect an annual grass from pathogenic fungi in the field. *J Ecol* 83: 991-1000 (1995).
- Nguyen T., Zelechowska M., Foster V., Bergmann H. und Verma D.P.S.:** Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5040-5044 (1985).
- Niebel F de C., Lescure N., Cullimore J.V. und Gamas P.:** The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 504-513 (1998).
- Niehaus K., Kapp D. und Pühler A.:** Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPSI)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190: 415-425 (1993).
- Niehaus K. und Becker A.:** The role of microbial surface polysaccharides in the Rhizobium-legume interaction. *Subcell Biochem* 29: 73-116 (1998).
- O'Neil K.T. und DeGrado W.F.:** How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem Sci* 15: 59-64 (1990).
- Ouyang L.J., Whelan J., Weaver C.D., Roberts D.M. und Day D.A.:** Protein phosphorylation stimulates the rate of malate uptake across the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett* 293: 188-190 (1991).
- Parniske M.:** Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol* 3: 320-328 (2000).
- Patel S. und Latterich M.:** The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol* 8: 65-71 (1998).
- Pathirana M.S., Samac D.A., Roeven R., Yoshioka H., Vance C.P. und Gantt J.S.:** Analyses of phosphoenolpyruvate carboxylase gene structure and expression in alfalfa nodules. *Plant J* 12: 293-304 (1997).
- Pawlowski K.:** Nodule-specific gene expression. *Physiol Plant* 99: 617-631 (1997).
- Peng H.M., Dreyer D.A., Van den Bosch K.A. und Cook D.:** Gene structure and differential regulation of the Rhizobium-induced peroxidase gene rip1. *Plant Physiol* 112: 1437-1446 (1996).
- Perlick A.M.:** Untersuchungen zur gewebespezifischen Genexpression in Wurzelknöllchen der Ackerbohne *Vicia faba* L. Dissertation, Universität Bielefeld (1991).
- Perlick A.M. und Pühler A.:** A survey of transcripts expressed specifically in root nodules of *broadbean* (*Vicia faba* L.). *Plant Mol Biol* 22: 957-970 (1993).
- Perlick A.M., Frühling M., Küster H., Schröder G. und Pühler A.:** Analysis of nodulin genes expressed in root nodules of *Vicia faba* L. In: Endre G. und Kiss G.B. (eds), Proceedings of the First European Nitrogen Fixation Conference, pp. 225-228. Officina Press, Szeged (1994).

- Perlick A.M., Frühling M., Schröder G., Frosch S.C. und Pühler A.:** The broad bean gene VfNOD32 encodes a nodulin with sequence similarities to chitinases that is homologous to (alpha/beta)8-barrel-type seed proteins. *Plant Physiol* 110: 147-154 (1996a).
- Perlick A.M., Albus U., Stavridis T., Frühling M., Küster H. und Pühler A.:** The *Vicia faba* lipoxygenase gene VfLOX1 is expressed in the root nodule parenchyma. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 860-863 (1996b).
- Pham V.-A.:** Expression einer VfENOD-GRP5 und einer VfCaMBP1-Transkriptsequenz in *E. coli*, sowie Aufreinigung der entsprechenden Genprodukte zur Gewinnung von Antikörpern. Diplomarbeit, Universität Bielefeld (1999).
- Pirozynski K.A. und Malloch D.W.:** The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *BioSystems* 6: 153-164 (1975).
- Qiu Y.L., Lee J.H., Bernasconi-Quadroni F., Soltis D.E., Soltis P.S., Zanis M., Zimmer E.A., Chen Z.D., Savolainen V. und Chase M.W.:** The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407 (1999).
- Ramachandiran S., Takezawa D., Wang W. und Poovaiah B.W.:** Functional domains of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase: regulation by autoinhibitory and visinin-like domains. *J Biochem (Tokyo)* 121: 984-990 (1997).
- Rechsteiner M. und Rogers S.W.:** PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-271 (1996).
- Reddy A., Takezawa D., Fromm H. und Poovaiah B.:** Isolation and characterization of two cDNAs that encode for calmodulin-binding proteins from corn rot tips. *Plant Sci* 94: 109-117 (1993).
- Reddy A.S., Safadi F., Narasimhulu S.B., Golovkin M. und Hu X.:** A novel plant calmodulin-binding protein with a kinesin heavy chain motor domain. *J Biol Chem* 271: 7052-7060 (1996).
- Reddy P.M., Ladha J.K., Ramos M.C., Maillet F., Hernandez R.J., Torrizo L.B., Oliva N.P., Datta S.K. und Datta K.:** Rhizobial lipochitoooligosaccharide nodulation factors activate expression of the legume early nodulation gene *ENOD12* in rice. *Plant J* 14: 693-702 (1998).
- Reddy P.M., Aggarwal R.K., Ramos M.C., Ladha J.K., Brar D.S. und Kouchi H.:** Widespread occurrence of the homologues of the early nodulin (ENOD) genes in *Oryza* species and related grasses. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 148-154 (1999).
- Reddy V.S., Safadi F., Zielinski R.E. und Reddy A.S.:** Interaction of a kinesin-like protein with calmodulin isoforms from *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 274: 31727-31733 (1999).
- Redecker D., Kodner R. und Graham L.E.:** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921 (2000).
- Remy W., Taylor T.N., Hass H. und Kerp H.:** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizas. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11841-11843 (1994).
- Rhee Y., Gurel F., Gafni Y., Dingwall C. und Citovsky V.:** A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Nat Biotechnol* 18: 433-437 (2000).
- Rhoads A.R. und Friedberg F.:** Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* 11: 331-340 (1997).
- Robbins J., Dilworth S.M., Laskey R.A. und Dingwall C.:** Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64: 615-623 (1991).
- Roche D., Temple S.J. und Sengupta-Gopalan C.:** Two classes of differentially regulated glutamine synthetase genes are expressed in the soybean nodule: a nodule-specific class and a constitutively expressed class. *Plant Mol Biol* 22: 971-983 (1993).

- Rogers S., Wells R. und Rechsteiner M.:** Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368 (1986).
- Roussel H., Bruns S., Gianninazzi-Pearson V., Hahlbrock K. und Franken P.:** induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Sci* 126: 203-210 (1997).
- Rychlik W. and Rhoads R.E.:** A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucl Acids Res* 17: 8543-8551 (1989).
- Sagan M., Morandi D., Tarengi E. und Duc G.:** Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after γ -ray mutagenesis. *Plant Sci* 111: 63-71 (1995).
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T.:** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- Sánchez F., Campos F., Padilla J., Bonneville J.M., Enriquez C. und Caput D.:** Purification, cDNA cloning and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 84: 1143-1147 (1987).
- Sanderson M.J. und Wojciechowski M.F.:** Diversification rates in a temperate legume clade: Are there "so many species" of *Astralagus* (Fabaceae)? *Am J Bot* 83: 1488-1502 (1996).
- Schauser L., Roussis A., Stiller J. und Stougaard J.:** A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402: 191-195 (1999).
- Scheffzek K., Ahmadian M.R. und Wittinghofer A.:** GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* 23: 257-262 (1998).
- Schirmer F., Ehrt S. und Hillen W.:** Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *J Bacteriol* 179: 1329-1336 (1997).
- Schlesier B., Manteuffel R., Rudolph A. und Behlke J.:** Studies on seed globulins from legumes. VII. Narbonin, a 2S globulin from *Vicia narbonensis* L. *Biochem Physiol Pflanz* 173: 420-428 (1978).
- Scholz T.D., Koppenhafer S.L., ten Eyck C.J. und Schutte B.C.:** Ontogeny of malate-aspartate shuttle capacity and gene expression in cardiac mitochondria. *Am J Physiol* 274: C780-788 (1998).
- Schröder G.:** Molekulare Analyse und Lokalisation von Transkripten Prolin- und Glycin-reicher Proteine in den Wurzelknöllchen der Ackerbohne *Vicia faba* L. Dissertation, Universität Bielefeld (1995).
- Schröder G., Frühling M., Pühler A. und Perlick A.M.:** The temporal and spatial transcription pattern in root nodules of *Vicia faba* nodulin genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol Biol* 33: 113-123 (1997).
- Schultze M. und Kondorosi A.:** Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* 32: 33-57 (1998).
- Shaw V.K. und Brill W.J.:** Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3249-3753 (1977).
- Shi L., Twary S.N., Yoshioka H., Gregerson R.G., Miller S.S., Samac D.A., Gantt J.S., Unkefer P.J. und Vance C.P.:** Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *Plant Cell* 9: 1339-1356 (1997).
- Shirtliffe S.J. und Vessey J.K.:** A nodulation (Nod⁺/Fix⁻) mutant of *Phaseolus vulgaris* L. has nodule like structures lacking peripheral vascular bundles (Pbv⁻) and is resistant to mycorrhizal infection (Myc⁻). *Plant Sci* 118: 209-220 (1996).
- Simon L., Bousquet J., Levesque R.C. und Lalonde M.:** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69 (1993).

- Smith F.A. und Smith S.E.:** Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 137: 373-388 (1997).
- Smith S.E. und Gianinazzi-Pearson V.:** Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 211-244 (1988).
- Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V., Koide R. und Cairney J.W.G.:** Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant Soil* 159: 103-113 (1994).
- Smith S.E. und Read D.J.:** *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London (1997).
- Snedden W.A. und Fromm H.:** Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci* 3: 299-304 (1998).
- Solaiman M.D.Z. und Saito M.:** Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol* 114: 1-38 (1997).
- Soltis D.E., Soltis P.S., Morgan D.R., Swensen S.M., Mullin B.C., Dowd J.M. und Martin P.G.:** Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2647-2651 (1995).
- Spaink H.P.:** The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65: 81-98 (1994).
- Strangmann M.:** Charakterisierung von Mykorrhiza-induzierten Transkriptsequenzen aus Ackerbohnen-Wurzeln. Staatsexamensarbeit, Universität Bielefeld (1998).
- Szymanski D.B., Liao B. und Zielinski R.E.:** Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* Cam-3 promoter. *Plant Cell* 8: 1069-1077 (1996).
- Takane K., Tajima S. und Kouchi H.:** Two distinct uricase II (nodulin 35) genes are differentially expressed in soybean plants. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 735-741 (1997).
- Takano E., Maki M., Mori H., Hatanaka M., Marti T., Titani K., Kannagi R., Ooi T. und Murachi T.:** Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 27: 1964-1972 (1988).
- Takezawa D., Liu Z.H., An G. und Poovaiah B.W.:** Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol Biol* 27: 693-703 (1995).
- Taté R., Patriarca E.J., Riccio A., Defez R. und Iaccarino M.:** Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 582-589 (1994).
- Tatusov R.L., Koonin E.V. und Lipman D.J.:** A genomic perspective on protein families. *Science* 278: 631-637 (1997).
- Tatusov R.L., Galperin M.Y., Natale D.A. und Koonin E.V.:** The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28: 33-36 (2000).
- Taylor E.R., Nie X.Z., MacGregor A.W. und Hill R.D.:** A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* 24: 853-862 (1994).
- Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J.:** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680 (1994).
- Thummler F. und Verma D.P.:** Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J Biol Chem* 262: 14730-14736 (1987).
- Tjepkema J.D. und Winship L.J.:** Energy requirement for nitrogen fixation in actinorhizal and legume root nodules. *Science* 209: 279-281 (1980).

- Torok K. und Whitaker M.:** Taking a long, hard look at calmodulin's warm embrace. *Bioessays* 16: 221-224 (1994).
- Traut T.W.:** The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *Eur J Biochem* 222: 9-19 (1994).
- Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldona-Mendoza I.V., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H.S., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D. und Harrison M.J.:** Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J* 22: 531-541 (2000).
- Trinh T.H., Ratet P., Kondorosi E., Durand P., Kamate K., Bauer P. und Kondorosi A.:** Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 17: 345-355 (1998).
- Tsai F.-Y. und Coruzzi G.M.:** Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. *EMBO J* 9: 323-332 (1990).
- Tyerman S.D., Whitehead L.F. und Day D.A.:** A channel-like transporter for NH_4^+ on the symbiotic interface of N_2 -fixing plants. *378*: 629-632 (1995).
- van Brussel A.A.N., Bakhuizen R., van Spronsen P.C., Spaink H.P., Tak T., Lugtenberg B.J.J. und Kijne J.B.:** Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipopoligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257: 70-71 (1992).
- van Buuren M.L., Maldonado-Mendoza I.E., Trieu A.T., Blaylock L.A. und Harrison M.J.:** Novel genes induced during an arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis formed between *Medicago truncatula* and *Glomus versiforme*. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 171-181 (1999).
- van Kammen A.:** Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbioses. *Plant Mol Biol Rep* 2: 43-45 (1984).
- van Rhijn P. und Vanderleyden J.:** The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59: 124-142 (1995).
- van Rhijn P., Fang Y., Galili S., Shaul O. und Atzmon N.:** Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5467-5472 (1997).
- Vasse J., de Billy F., Camut S. und Truchet G.:** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 172: 4295-4306 (1990).
- Végh Z., Vincze E., Kadirov R., Tóth G. und Kiss G.B.:** The nucleotide sequence of a nodule-specific gene, Nms-25 of *Medicago sativa*: its primary evolution via exon-shuffling and retrotransposon-mediated DNA rearrangements. *Plant Mol Biol* 15: 295-306 (1990).
- Verma D.P., Kazazian V., Zogbi V. und Bal A.K.:** Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J Cell Biol* 78: 919-936 (1978).
- Verma D.P.S.:** Plant genes involved in carbon and nitrogen assimilation in root nodules. In: Poulton J.E., Romeo J.T. and Conn E.E. (eds), *Plant Nitrogen Metabolism*, pp. 43-63. Plenum Press, New York (1988).
- Verma D.P.S., Hu C.-A. und Zhang M.:** Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiol Plant* 85: 253-265 (1992).
- Vijn I., Martínez-Abarca F., Yang W.C., das Neves L., van Brussel A., van Kammen A. und Bisseling T.:** Early nodulin gene expression during Nod factor-induced processes in *Vicia sativa*. *Plant J* 8: 111-119 (1995a).
- Vijn I., Yang W.C., Pallisgård N., Ostergaard Jensen E., van Kammen A. und Bisseling T.:** VsENOD5, VsENOD12 and VsENOD40 expression during *Rhizobium*-induced nodule formation on *Vicia sativa* roots. *Plant Mol Biol* 28: 1111-1119 (1995b).

- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. und Gay N.J.:** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-951 (1982).
- Wang K.K., Villalobo A. und Roufogalis B.D.:** Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem J* 262: 693-706 (1989).
- Weaver C.D., Crombie B., Stacey G. und Roberts D.M.:** Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules. *Plant Physiol* 95: 222-227 (1991).
- Weaver C.D. und Roberts D.M.:** Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry* 31: 8954-8959 (1992).
- Weaver C.D., Shomer N.H., Louis C.F. und Roberts D.M.:** Nodulin 26, a nodule-specific symbiosome membrane protein from soybean, is an ion channel. *J Biol Chem* 269: 17858-17862 (1994).
- Webb J., Skot L., Nicholson M.N., Jorgensen B. und Mizen S.:** *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 606-616 (2000).
- Wegel E., Schauser L., Sandal N., Stougaard J. und Parniske N.:** Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 933-936 (1998).
- Whitehaed L.F., Tyerman S.D., Salom C.L. und Day D.A.:** Transport of fixed nitrogen across symbiotic membranes of legume nodules. *Symbiosis* 19: 141-154 (1995).
- Whitehead L.F. und Day D.A.:** The peribacteroid membrane. *Phys Plant* 100: 30-44 (1997).
- Woodgett J.R., Gould K.L. und Hunter T.:** Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur J Biochem* 161: 177-184 (1986).
- Wyss P., Mellor R.B. und Wiemken A.:** Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mossae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182: 22-26 (1990).
- Xie Z.P., Stachelin C., Vierheilig H., Wiemken A., Jabbouri S., Broughton W.J., Vögeli-Lange R. und Boller T.:** Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybean. *Plant Physiol* 108: 1519-1525 (1995).
- Yang W.C., de Blank C., Meskiene I., Hirt H., Bakker J., van Kammen A., Franssen H. und Bisseling T.:** 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 (1994).
- Yang W.C., Horvath B., Hontelez J., van Kammen A. und Bisseling T.:** *In situ* localization of *Rhizobium* mRNAs in pea root nodules: nifA and nifH localization. *Mol Plant Microbe Interact* 4: 464-468 (1991).
- Zarembinski T.I., Hung L.W., Mueller-Dieckmann H.J., Kim K.K., Yokota H., Kim R. und Kim S.H.:** Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15189-15193 (1998).
- Zielinski R.E.:** Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 49: 697-725 (1998).
- Zik M., Arazi T., Snedden W.A. und Fromm H.:** Two isoforms of glutamate decarboxylase in *Arabidopsis* are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution. *Plant Mol Biol* 37: 967-975 (1998).

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Genetik bedanken, die mich während meiner Promotion durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre Ratschläge unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler für die Vergabe des interessanten Themas und seine Unterstützung während jeder Phase dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Andreas Perlick, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir damit sehr geholfen hat. Mein spezieller Dank gilt ferner Natalija Hohnjec, Dr. Helge Küster und Dr. Martin Frühling, deren ständige Diskussionsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung mir ebenfalls von großem Wert waren.

Dr. Dieter Kapp danke ich sehr herzlich für seine geduldige Hilfe bei der Licht- und Elektronenmikroskopie. In diesem Zusammenhang gebührt mein Dank auch Dr. Peter Heimann und Dr. Karsten Niehaus. Für die freundliche Hilfsbereitschaft bei der Isolation von Calmodulin danke ich Dr. Carsten Zeilinger (Institut für Biophysik, Hannover) und für die schöne Zeit am INRA in Dijon Dr. Vivienne Gianinazzi-Pearson.

Darüber hinaus bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin Leonilde. Ihr liebevoller Rückhalt und ihre beständige Unterstützung haben einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.