

# Untersuchung der Plastidenentwicklung bei der arbuskulären Mykorrhiza an der Modellpflanze *Medicago truncatula*



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grads

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Swanhild Lohse

geb. am 12.04.1971 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Strack
2. Prof. Dr. W. Roos
3. HD Dr. F. Baluška

Halle (Saale), den 25.01.2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000009800**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009800>]

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

**Poster:**

**Lohse S., Strack D., Fester T.**

Expression of transcripts coding for plastid located proteins in mycorrhizal roots from *Medicago truncatula*.

19<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology (ISCE), 3.-7. August 2002, Hamburg

**Lohse S., Strack D., Fester T.**

Plastids in Arbuscular Mycorrhizal Roots from *Medicago truncatula*

4. Kolloquium im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen" vom 12.-14. Dezember 2002 in Wittenberg

**Lohse S., Fester T.**

Cloning, characterization and localization of the plastid division protein FtsZ1 from *Medicago truncatula*

Botanikertagung. 5.-10. September 2004, Braunschweig

**Zeitschriften:**

**Fester T., Schmidt D., Lohse S., Walter M.H., Giuliano G., Bramley P.M., Fraser P.D., Hause B., Strack D. (2002)**

Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots.

Planta **216**: 148–154

**Lohse S., Schliemann W., Ammer C., Kopka J., Strack D., Fester T. (2005)** Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*, Plant Physiology **139**: 329-340

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle,

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter Strack und Herrn Thomas Dr. Fester danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle-Saale sowie für die gute Betreuung der Arbeiten.

Bei Frau Dr. Bettina Hause möchte mich sehr für die engagierte Einführung in cytologische Arbeiten und Mikroskopiertechniken, insbesondere die Einarbeitung am CLSM bedanken.

Frau Kerstin Manke, Herrn Dr. Joachim Hans und Herrn Dr. Carsten Milkowski danke ich für die Unterstützung und Beratung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Für die Aufnahmen des Selfassembly von HisMtFtsZ1a mit dem Transmissionselektronenmikroskop bedanke ich mich bei Herrn Dr. Gerd Hause (Biozentrum Halle, Martin-Luther-Universität).

Herrn Dr. Baumert und Herrn Dr. Thomas Fester danke ich für die Beratung bei der Entwicklung eines HPLC-Systems für die Trennung von Nukleotiden zur Untersuchung der GTPase-Aktivität von HisMtFtsZ1a.

Für die zur Bereitstellung des pET28a+-Vektors, der Expressionsstämme BL21-CodonPlus-RIL und BL21-CodonPlus-RP, einschließlich der Transformanten mit dem pET28a+ Vektor, bedanke ich mich bei Frau Diana Schmidt.

Für die folgenden Plasmide zur GFP-Markierung von Organellen in *Medicago truncatula* möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Klösgen, Institut für Pflanzenphysiologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für das ptGFP-Konstrukt und Herrn Prof. Dr. Yasuo Niwa, Universität von Shizuoka, Yada (Japan) für das mtGFP-Konstrukt. Für die Bereitstellung von ertGFP-*Nicotiana benthamiana* Linie 16c mit GFP markiertem ER bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. David Baulcombe, Sainsbury Lab (Norwich, England).

Für die Bereitstellung einer mit *Glomus intraradices* kolonisierten Wurzelkultur von *Daucus carota* danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Boller (Basel, Schweiz).

Für die Bereitstellung der folgenden Bakterienstämme danke ich Frau Dr. Rebecca Graham (*E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, USA) für *Escherichia coli* PAT84, Herrn Dr. G. David Barker (Laboratoire de Biologie Moleculaire des Relations Plantes-Microorganismes, Castanet-Tolosan Cedex, Frankreich) für *Agrobacterium rhizogenes* und Herrn Dr. Mathias Keller (Universität Bielefeld) für *Sinorhizobium meliloti*.

Frau Prof. Dr. Maria J. Harrison (Samuel Roberts Noble Foundation; Ardmore, USA) danke ich für die Bereitstellung einer cDNA-Bank von mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln.

Frau Gerlinde Waiblinger und Frau Dagmar Knöfel danke ich für die Unterstützung bei Laborarbeiten sowie bei allen Mitarbeitern der Abteilung Sekundärstoffwechsel für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1084 (Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen) spreche ich der DFG meinen Dank aus.

## **Lebenslauf**

Swanhild Lohse  
Geboren: 12. April 1971  
In: Halle/S.  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Theodor-Römer-Str. 3/96  
06118 Halle

### **Ausbildung/Tätigkeiten:**

1977-1987	Polytechnische Oberschule „Hanns Eisler“ Halle Trotha
September 1987- Februar 1989	VEB Textilmanufaktur Halle: Lehre zum Facharbeiter für Textiltechnik/ Handweberin
Februar 1989- Januar 1991	VEB Textilmanufaktur Halle: Arbeit als Handweberin
1989-1991	Besuch der Volkshochschule Halle Abitur in den Fächern Physik, Chemie, Deutsch, Russisch und Mathematik
1991-1992	Besuch des Abendgymnasiums Halle-Neustadt Abitur in den Fächern Biologie, Geografie und Englisch
1992-1997	Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
April-September 1997	Institut für Pharmazeutische Biologie/Zellphysiologie: Diplomarbeit
Oktober 1997-März 1998	Bad-Apotheke Bad Lauchstädt Tätigkeit als Pharmaziepraktikantin
April 1998	Ablegen des 3. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin
Mai-Juli 1998	Stadt-Apotheke Klötze: Tätigkeit als Apothekerin
September 1998- Februar 1999	Apotheke im Kaufland und City-Apotheke in Wolfen Tätigkeit als Apothekerin
September 1999- Dezember 1999	Hufeland-Apotheke Roitzsch: Tätigkeit als Apothekerin
Februar 2001- April 2005	Tätigkeit im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie als wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin)

## Abkürzungen:

ACCase	Acetyl-CoA-Carboxylase
AK	Antikörper
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
$\alpha$ -	Bezeichnung von Antikörpern gegen ein bestimmtes Protein
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bandpassfilter
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBB	Coomassie Brilliantblau
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokales Laserscanningmikroskop
CT	Cycle Threshold; PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des PCR-Produktes mit interkaliertem SYBR <sup>®</sup> Green einen bestimmten Schwellenwert erreicht (bei Real-Time PCR)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide: umfassen dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase
DXS	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
ECL	Chemilumineszenzsystem auf Luminolbasis mit erhöhter Lumineszenz (luminol-based enhanced chemiluminescence detection system)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Translations-Elongationsfaktor 1 $\alpha$
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ert	ER-Signalsequenz (ER targeted)
EST	Expressed Sequence Tag
FNR	Präsequenz für Ferredoxin:NADP <sup>+</sup> -Reduktase (Plastidensignalsequenz)
FT	Farbteiler, Strahlenteiler
GTP	Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
g	Erdbeschleunigung, bei Zentrifugationen
HisMtFtsZ1	FtsZ1-Aminosäuresequenz oder FtsZ1-Protein von <i>Medicago truncatula</i> mit 6xHis enthaltender N-terminaler Sequenz aus pET28a

HisMtFtsZ1a	FtsZ1-Aminosäuresequenz oder FtsZ1-Protein von <i>M. truncatula</i> mit 6xHis enthaltender N-terminaler Sequenz aus pET28a; ohne putative Plastidensignalsequenz
<i>HisMtftsZ1</i>	Nukleotidsequenz von HisMtFtsZ1
<i>HisMtftsZ1a</i>	Nukleotidsequenz von HisMtFtsZ1a
IB	Inclusion Bodies (Einschlusskörperchen)
IgG	Immunglobulin G
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
kat	Katal = 1 mol/s
kb	Kilobasenpaare
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten Konstante
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphatpuffer
LP	Langpassfilter
m/m	Masse pro Masse
M-Medium	Minimalmedium
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MP	Meerrettich-Peroxidase
MSB	Mikrotubuli stabilisierender Puffer
<i>MftsZ1</i>	ftsZ1-Nukleotidsequenz von <i>M. truncatula</i>
MtFtsZ1	FtsZ1-Aminosäuresequenz von <i>M. truncatula</i>
<i>MftsZ1a</i>	ftsZ1-Nukleotidsequenz von <i>M. truncatula</i> ohne putative Plastidensignalsequenz
MtFtsZ1a	FtsZ1-Aminosäuresequenz von <i>M. truncatula</i> ohne putative Plastidensignalsequenz
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure, Boten-RNA
mt	Mitochondriensignalsequenz (mitochondria targeted)
m/V	Masse pro Volumen
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure.
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OMT	2-Oxoglutarat/Malat-Translokator
ORF	open reading frame (durchgängiges Leseraster einer Nukleotidsequenz)
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDS	Phytoen-Desaturase
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
pt	Plastidensignalsequenz (plastid targeted)
pET28MtftsZ1	pET-Expressionsvektor mit gesamter kodierender MtftsZ1-Sequenz

pET28MtFtsZ1a	pET-Expressionsvektor mit gesamter kodierender MtftsZ1-Sequenz ohne putative Plastidensignalsequenz
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro min
RPpET28MtftsZ1	BL21-CodonPlus-RP-Expressionsstamm, transformiert mit pET28MtftsZ1-Plasmid
RPpET28MtFtsZ1a	BL21-CodonPlus-RP-Expressionsstamm, transformiert mit pET28MtFtsZ1a-Plasmid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
STD	Plastidenimportsequenz (stroma targeting domain)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte NaCl-Lösung
TC	Tentative Consensus, vorläufige aus verschiedenen EST-Sequenzen zusammengesetzte Sequenz
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TIGR	The Institute for Genomic Research (USA)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TTBS	Trisgepufferte NaCl-Lösung mit 0,05-0,1 % (V/V) Tween-20
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität, 1 $\mu$ mol/min)
V/V	Volumen pro Volumen
v	Reaktionsgeschwindigkeit
$V_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol	Volumeneinheiten
WGA	Weizenkeimagglutinin
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZmDXR	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus <i>Zea mays</i>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Wurzelsymbiosen .....	1
1.1.1 Modellpflanzen zur Untersuchung von Wurzelsymbiosen .....	1
1.1.2 Die Wurzelknöllchen-Symbiose.....	1
1.1.3 Die Arbuskuläre Mykorrhiza.....	2
1.1.4 Apocarotinoidakkumulation in mykorrhizierten Wurzeln .....	4
1.1.5 Plastidenproliferation in kolonisierten Wurzelzellen .....	5
1.1.6 Das Plastidenteilungsprotein FtsZ.....	6
1.1.7 Zielstellung der Arbeit.....	7
<b>2. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>9</b>
2.1 Material .....	9
2.1.1 Pflanzenanzucht und Mykorrhizierung .....	9
2.1.2 Mykorrhizierte Karottenwurzelkultur .....	9
2.1.3 Bakterienstämme .....	10
2.1.4 Oligonukleotide .....	10
2.1.5 Vektoren .....	11
2.1.6 cDNA-Bank von mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> -Wurzeln .....	12
2.1.7 Chemikalien und Enzyme.....	12
2.1.8 Geräte .....	12
2.2 Methoden .....	14
2.2.1 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades.....	14
2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren.....	14
2.2.3 Glycerolkulturen von Bakterien .....	16
2.2.4 Transformationsmethoden.....	16
2.2.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....	19
2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	19
2.2.7 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse .....	24
2.2.8 Extraktion von Proteinen.....	25
2.2.9 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	27
2.2.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	27
2.2.11 Gelelektrophorese.....	27
2.2.12 Blots.....	28
2.2.13 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> .....	29
2.2.14 Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Ni-NTA Zentrifugationssäulchen .....	31
2.2.15 Aktivitätstests mit löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a.....	32
2.2.16 Herstellung und Test polyklonaler Antiseren gegen MtFtsZ1 .....	34
2.2.17 Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums.....	34
2.2.18 <i>In vivo</i> -Untersuchung von GFP-markierten Organellen.....	35
2.2.19 Immunlokalisierung.....	36
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1 Organellenproliferation in kolonisierten Wurzelzellen .....	38
3.1.1 Proliferation des endoplasmatischen Retikulums in kolonisierten Wurzelrindenzellen von ertGFP- <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	38
3.1.2 Transformationsversuche zur GFP-Markierung von Plastiden und Mitochondrien in <i>Medicago truncatula</i> .....	38
3.1.3 Strukturen von GFP-markierten Mitochondrien und Plastiden in Wurzelknöllchen von <i>M. truncatula</i> Wurzeln .....	40

3.1.4	Strukturen GFP-markierter Mitochondrien und Plastiden in mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> -Wurzeln.....	41
3.2	Untersuchung plastidenrelevanter Transkriptmengen in mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> -Wurzeln durch Real-Time RT-PCR.....	45
3.2.1	Real-Time RT-PCR: Untersuchung plastidenrelevanter Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln von <i>M. truncatula</i> durch absolute Quantifizierung ....	45
3.2.2	Real-Time RT-PCR: Untersuchung plastidenrelevanter Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln von <i>M. truncatula</i> durch relative Quantifizierung.....	46
3.3	Untersuchung der Plastidenteilung in mykorrhizierten Wurzeln von <i>M. truncatula</i> mit Hilfe des Plastidenteilungsproteins FtsZ1.....	49
3.3.1	Gewinnung einer kodierenden cDNA-Sequenz für <i>MtftsZ1</i> .....	49
3.3.2	Genomische DNA Analyse für das FtsZ1-Gen .....	52
3.3.3	Charakterisierung des MtFtsZ1-Proteins.....	53
3.3.4	Immunlokalisierung von MtFtsZ1 in <i>M. truncatula</i> .....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1	Organellenproliferation in kolonisierten Wurzelzellen .....	83
4.2	Veränderung der Transkriptmengen plastidenrelevanter Gene in kolonisierten Wurzeln von <i>M. truncatula</i> .....	86
4.3	Korrelation der Entwicklung von Plastiden und Arbuskeln in kolonisierten Wurzeln von <i>M. truncatula</i> .....	88
4.4	Charakteristik des Plastidenteilungsproteins FtsZ1 aus <i>M. truncatula</i> .....	89
4.5	Immunlokalisierung von MtFtsZ1 in kolonisierten Wurzeln .....	93
4.6	Weiterführende Arbeiten .....	95
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>99</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Wurzelsymbiosen

### 1.1.1 Modellpflanzen zur Untersuchung von Wurzelsymbiosen

Die Gruppe der Leguminosae (Hülsenfrüchtler) ist die drittgrößte Familie der Blütenpflanzen, darunter befinden sich viele bedeutende Nutzpflanzen. Die meisten dieser Pflanzen sind in der Lage, zwei wichtige Formen der Wurzelsymbiose einzugehen, die arbuskuläre Mykorrhiza und die Wurzelknöllchensymbiose. *Lotus japonicus* und *Medicago truncatula* wurden wegen einer Reihe günstiger Eigenschaften als Modellsystem für molekulare und genetische Studien ausgewählt (Udvardi, 2001). Diese Pflanzen sind autogam, besitzen ein kleines diploides Genom und die Möglichkeit zur Regeneration über somatische Embryogenese.

Die Genome von *M. truncatula* und *L. japonicus* wurden kartiert und werden derzeit sequenziert. Eine zunehmende Anzahl von EST-Sequenzen (EST = expressed sequence tag) ist in Internet-Datenbanken frei zugänglich, wie z. B. in der TIGR-Datenbank. Molekularbiologische Methoden wie Electronic Northern-Analyse, Microarray-Untersuchungen und der Vergleich differentiell exprimierter Transkripte haben unter anderem zu Einblicken in die Mykorrhiza induzierte Cytoskelettumbildung, die Grundlage der Rhizobien-Interaktion, den Wassertransport, die Isoprenoidbiosynthese und die Regulation der Sauerstoffkonzentration geführt (Hause und Fester, 2005).

Durch die Behandlung mit Ethylmethansulfonat, Bestrahlung oder Insertionsmutagenese wurden verschiedene Nodulationsmutanten (Störung der Knöllchenbildung) isoliert, von denen einige auch eine Einschränkung oder Verhinderung der Mykorrhizierung zeigen. In *Lotus* wurden mindestens sechs, in *M. truncatula* drei Genorte gefunden, die sowohl die Nodulation als auch die Mykorrhizierung kontrollieren (Stougaard, 2001).

### 1.1.2 Die Wurzelknöllchen-Symbiose

Die Wurzelknöllchen-Symbiose ist charakterisiert durch ein mutualistisches Zusammenleben von Bakterien und Pflanzen. Bei dieser Lebensform infizieren gramnegative Bodenbakterien aus der Familie der Rhizobiaceae (Rhizobien) das Wurzelgewebe von Leguminosen und induzieren die Bildung eines stickstofffixierenden Knöllchens. Die Beziehung zwischen Rhizobien und Leguminosen ist selektiv. Das heißt, eine Knöllchenbildung findet nur bei den spezifischen Wirtspflanzen statt.

Zur gegenseitigen Erkennung findet ein Austausch von Signalstoffen zwischen Makro- und Mikrosymbiont statt. Flavonoide induzieren beispielsweise die Expression von *nod*-Genen und damit die Produktion von Nod-Faktoren in den Rhizobien (Stougaard, 2000). Nod-Faktoren sind Lipochitooligosaccharide (mit  $\beta$ -1,4-verknüpftem N-Acyl-D-glucosamingrundgerüst), deren verschiedene Substituenten unter anderem für die Wirtsspezifität verantwortlich sind (Geurts und Franssen, 1996). Die Nod-Faktoren lösen in den Wurzelhaaren einen schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und eine vorübergehende Depolarisation der Cytoplasmamembran aus, verbunden mit einem Ausstrom von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$ . Gleichzeitig tritt eine Alkalisierung des Cytoplasmas auf; nach einigen Minuten findet eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation statt. Darauf folgt die Umlagerung von Aktinfilamenten und eine Richtungsänderung des Wachstums der Wurzelhaarspitze (Stougaard, 2000). Nach dem Anheften der Rhizobien an die Wurzelhaare, krümmen sich diese und bilden eine Tasche für den Beginn der Infektion. In den meisten untersuchten Leguminosen findet die Infektion über einen Infektionsschlauch statt, der die Bakterien über die Wurzelhaare in die Zellen des Wurzelkortex transportiert. Dieser Infektionsschlauch wird

durch Einstülpung der Plasmamembran und die Ablagerung von Zellwandmaterial gebildet. Wurzelkortexzellen, die unterhalb des wachsenden Infektionsschlauches liegen, redifferenzieren und bilden durch Wiederaufnahme der Zellteilung das Primordium des Wurzelknöllchens. Nach ihrer Wanderung durch den Infektionsschlauch werden die Bakterien in bestimmten Zellen durch Endocytose eingeschlossen. Umhüllt von der peribakteroiden Membran differenzieren sie sich dort zu stickstofffixierenden Bakteroiden. Die Stickstofffixierung zur Bildung von Ammoniak wird durch einen sauerstoffempfindlichen Nitrogenase-Enzym-Komplex, der aus Dinitrogenase und Dinitrogenase-Reduktase besteht, ausgeführt. Das entstehende Ammoniak wird von der Pflanze in Aminosäuren assimiliert und schließlich als Amid (Glutamin oder Asparagin) oder Ureid in die Blätter transportiert (Buchanan et al., 2000). Die Pflanze liefert dafür die Kohlenstoffquelle und schützt außerdem die sauerstoffempfindliche Nitrogenase der Bakterien (Stougaard, 2000). Der Stofftransport findet bei reifen funktionellen Knöllchen über die peripheren Leitbündel statt, die mit dem Gefäßsystem der Wurzel verbunden sind (Stougaard, 2000).

In Abhängigkeit von der Wirtspflanze existieren zwei Arten von Knöllchen, determinierte und nicht determinierte Knöllchen. Determinierte Knöllchen (z. B. bei *Lotus japonicus*) besitzen eine sphärische Form. Ihre meristematische Aktivität endet frühzeitig. Dagegen wird in den zylindrischen, nicht determinierten Knöllchen (z. B. bei *M. truncatula*) ein aktives Meristem erhalten, welches kontinuierlich neue Zellen bildet, die anschließend infiziert werden (Stougaard, 2000).

Stickstoff wird für die Ernährung von Pflanzen in sehr großen Mengen benötigt. In der Natur nehmen die Pflanzen Stickstoff durch Assimilation von Nitrat und Ammonium oder in Verbindung mit stickstofffixierenden Bakterien auf. Die Wurzelknöllchen-Symbiose ermöglicht die Besiedlung stickstoffarmer Böden und führt dort zu einer Anreicherung verwertbarer Stickstoffquellen.

### 1.1.3 Die Arbuskuläre Mykorrhiza

Die Mykorrhiza, eine Symbioseform, die meist zum gegenseitigen Nutzen von Pilz und Pflanzenwurzel ausgebildet wird, kann in verschiedenen Formen und Strukturen auftreten. Am bekanntesten ist die Ektomykorrhiza, deren Pilzpartner (z. B. verschiedene Waldpilze) auffällige Fruchtkörper ausbilden. Weniger bekannt, aber am weitesten verbreitet ist die arbuskuläre Mykorrhiza (AM). Über 80 Prozent aller Landpflanzen (Smith und Read, 1997) und Pilze aus der Ordnung Glomerales der Klasse Glomeromycetes (früher Zygomycetes) (Schüßler et al., 2001; Schüßler, 2002) bilden diese Symbiose. Die AM-Pilze vermehren sich asexuell, indem sie vielkernige Sporen ausbilden. Auf Grund von Fossilienfunden und der Divergenz der 18S-rDNA Sequenzen wird geschätzt, dass die Ordnung Glomerales vor 350 bis 460 Millionen Jahren entstanden ist und damit die Besiedlung der Erde durch Landpflanzen gefördert wurde (Simon et al., 1992). Während der Evolution verloren etwa zehn Prozent der Pflanzen die Fähigkeit zur Ausbildung der AM-Symbiose, darunter Arten aus den Familien der Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae und Urticaceae (Smith und Read, 1997; Hause und Fester, 2004; Hause und Fester, 2005). Durch eine verbesserte Ausnutzung von Bodenmineralen und eine bioprotektive Rolle gegen einige Bodenpathogene dient die arbuskuläre Mykorrhiza einer höheren Überlebensfähigkeit zahlreicher Pflanzenarten, einschließlich vieler Kulturpflanzen (Gianinazzi-Pearson, 1996). Ein teilweise beobachtetes stärkeres Pflanzenwachstum ist auf eine erhöhte Nährstoffzufuhr und eine bessere Wasserversorgung zurückzuführen. Der größte Nutzen wird dabei in Böden mit sehr geringen Phosphatkonzentrationen oder mit starker Phosphatadsorption erzielt (Powel und Bagyaraj, 1984). Die Kolonisierung von Wurzeln durch AM-Pilze kann durch Sporen, andere kolonisierte Wurzelstücke und Hyphen erfolgen. Die großen Sporen besitzen dicke, widerstandsfähige

Wände und mehrere Tausend Zellkerne (Smith und Read, 1997). Sie speichern hauptsächlich Lipide, Trehalose und Glycogen als Reservestoffe.

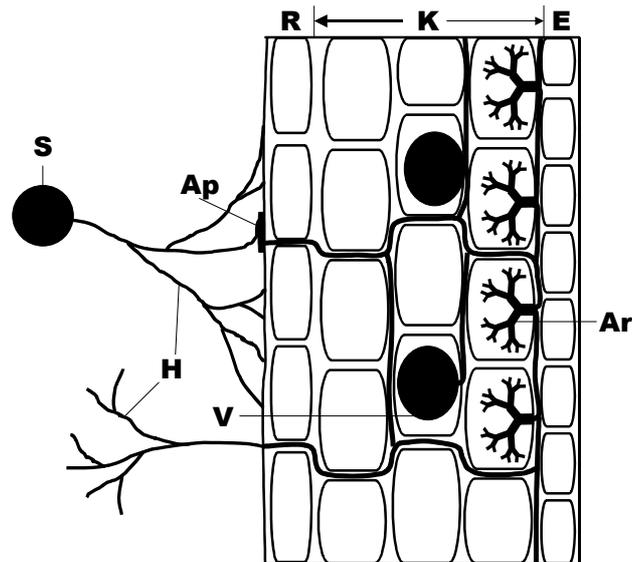
Die Interaktionen zwischen einem AM-Pilz und einer Pflanze beginnen, wenn eine Hyphe aus einer ausgekeimten Spore im Boden Kontakt mit der Wurzel des Wirtes aufnimmt (Abbildung 1.1). Durch Wurzelexsudate der Pflanze wird der Pilz zur Produktion von Substanzen angeregt, die in der Pflanzenwurzel die Expression von Genen fördern, die auch durch Nod-Faktoren induzierbar sind (Kosuta et al., 2003). Von Smith und Read (1997) wurde eine Stimulation des Hyphenwachstums des AM-Pilzes unter anderem durch Flavonoide in den Wurzelexsudaten beschrieben. Es ist jedoch noch nicht geklärt, in welchem Umfang Signale für die Ausbildung der Symbiose erforderlich sind.

Die enge Beziehung der AM-Pilze zu ihrer Wirtspflanze wird durch ihren obligat biotrophen Status deutlich. Ohne Kontakt zu einer Wirtspflanze können Hyphen nur 20 bis 30 Tage überleben (Bonfante und Perotto, 1995). Nach dem Auskeimen der Sporen in Wasser werden septenfreie Hyphen gebildet, die ihr Wachstum nur in Gegenwart von Pflanzenwurzeln oder Wurzelexsudaten fortsetzen (Barker et al., 1998).

Die Kolonisierung einer Wurzel ist schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt. An der Rhizodermis findet die Ausbildung eines Appressoriums statt, gefolgt von einem Eindringen der Hyphe in die Wurzelrinde. Es treten zwei Kolonisierungstypen bei der AM auf, der Arum- und der Paris-Typ. Nach dem Eindringen der Hyphen in Parenchymzellen der inneren Wurzelrinde entstehen intrazellulär haustorienartige verzweigte Strukturen, die als Arbuskel (*arbusculum* = Bäumchen) bezeichnet werden. Abbildung 1.1 zeigt den häufiger auftretenden und für die AM typischeren Arum-Typ, der durch dichotom verzweigte Arbuskeln sowie die Ausbildung von Speichervesikeln gekennzeichnet ist. In diesen Vesikeln werden ähnlich wie in Sporen Lipide, Trehalose und Glycogen gespeichert.

Wenn die Hyphen die Zellwände durchdringen und sich zu Arbuskeln differenzieren, finden in der Zelle umfangreiche strukturelle Veränderungen statt: die Vakuole fragmentiert, der Zellkern wandert vom Rand in das Zentrum der Zelle und die Anzahl der Organellen nimmt zu. Durch die ca. vierfache Oberflächenvergrößerung der Cytoplasmamembran wird die Arbuskel mit einer periarbuskulären Membran umhüllt (Harrison, 1999). Diese Membran zeigt eine starke H<sup>+</sup>-ATPase Aktivität. Der durch Ansäuerung des Zwischenmembranraumes entstehende Protonengradient ist für viele sekundäre Transportprozesse erforderlich. In der periarbuskulären Membran wurde eine erhöhte Expression von spezifischen Phosphattransportern (wie des *Mtpt4* in *M. truncatula*) festgestellt. Diese Transporter sind wahrscheinlich an der Aufnahme von Phosphat beteiligt, das durch den Pilz geliefert wird. Im Gegensatz dazu steht die Expressionerniedrigung von Phosphattransportern in peripheren Wurzeln, wie *Mtpt1* und *Mtpt2* (in *M. truncatula*), die in der Plasmamembran von Wurzelhaaren und Rhizodermiszellen lokalisiert sind (Harrison et al., 2002). Während der frühen Phasen der Arbuskelentwicklung bis zur Seneszenz und dem Abbau findet ein umfangreicher Umbau des Zytoskeletts statt (Blancaflor et al., 2001).

Die Lebensdauer von Arbuskeln ist sehr kurz, die aktive Phase dauert ca. zwei bis drei Tage. Degenerierende Arbuskeln sind durch das Kollabieren und Verklumpen der Arbuskeläste und des Stammes gekennzeichnet (Alexander et al., 1988).



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza (AM) vom Arum-Typ mit den charakteristischen Strukturen. S = Spore; R = Rhizodermis; K = Kortex; E = Endodermis; H = Hyphe; Ap = Appressorium; Ar = Arbuskel; V = Vesikel. Abbildung nach Barker et al. (1998)

#### 1.1.4 Apocarotinoidakkumulation in mykorrhizierten Wurzeln

Nach der Kolonisierung mit einem AM-Pilz wurde eine starke Gelbfärbung der Wurzeln vieler Pflanzen beobachtet (Jones, 1924). Als Chromophor im „gelben Pigment“ wurde Mycorradicin in mykorrhizierten Maiswurzeln (Klingner et al., 1995) und Weizen (Walter et al., 2000) beschrieben. Dabei handelt es sich um ein azyklisches  $C_{14}$ -Polyen, die 10,10'-Diaapocarotinoid-10,10'-dicarbonsäure (Klingner et al., 1995). Außerdem wurden in mykorrhizierten Wurzeln verschiedener Vertreter der Poaceae und einiger Arten der Solanaceae glykosidierte  $C_{13}$ -Cyclohexenonderivate nachgewiesen (Maier et al., 1997; Maier et al., 1999). Es wird vermutet, dass Mycorradicin und die Cyclohexenonderivate durch eine oxidativen Spaltung eines  $C_{40}$ -Carotinoids entstehen (Walter et al., 2000). Eine Akkumulation dieser Apocarotinoide in mykorrhizierten Wurzeln ist spezifisch und lässt sich nicht durch Wurzelpathogene, Endophyten oder abiotischen Stress auslösen (Maier et al., 1997; Walter et al., 2000).

Die Akkumulation von Apocarotinoiden findet bei den meisten Pflanzenfamilien nur nach Kolonisierung mit AM-Pilzen statt. Nur in wenigen Arten wird Mycorradicin auch in nicht-kolonisierten Wurzeln gebildet, allerdings in einer viel geringeren Menge, als in kolonisierten Wurzeln. Einige Arten der Unterklasse Rosopsida akkumulieren dagegen trotz starker Kolonisierung kein Mycorradicin (Fester et al., 2002).

Das „gelbe Pigment“ wird in erstmalig kolonisierten Wurzelabschnitten nur in geringer Menge gebildet, akkumuliert jedoch in späteren Kolonisierungsstadien. Dabei treten in Zellen mit degenerierenden Arbuskeln in kolonisierten Maiswurzeln zahlreiche gelb fluoreszierende Tröpfchen auf (Fester et al., 2002). Die Mykorrhiza-induzierten Apocarotinoide (Carotinoid-Spaltprodukte) könnten als Radikalfänger eine Rolle beim Abbau von oxidativem Stress spielen, da eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere von  $H_2O_2$ , in der Umgebung kollabierender Arbuskel auftritt (Fester und Hause, 2005). Eine entsprechende Funktion der Apocarotinoide wurde jedoch noch nicht nachgewiesen.

Die Synthese der Isoprenoide, die schließlich auch zur Bildung der beschriebenen Apocarotinoide führt, findet über den MEP-Weg (MEP = 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat) statt. Dieser Stoffwechselweg ist im Gegensatz zum klassischen cytosolischen Mevalonatweg in

Plastiden lokalisiert und wurde durch Markierungsversuche sowohl in Bakterien als auch in Pflanzen nachgewiesen (Rodriguez-Concepcion und Boronat, 2002).

In mykorrhizierten Wurzeln ist die Transkription der ersten beteiligten Enzyme, DXS (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase) und DXR (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase) erhöht (Walter et al., 2000; Walter et al., 2002). Die Mykorrhiza-abhängige Erhöhung der DXS-Menge ist nur bei einem Isoenzym, der DXS2 zu beobachten. Die DXS1 zeigt keine Mykorrhiza-induzierte Expressionserhöhung; die höchsten Transkriptmengen dieses Isoenzym finden sich in photosynthetischem Gewebe.

### **1.1.5 Plastidenproliferation in kolonisierten Wurzelzellen**

In nichtmykorrhizierten Tabakwurzeln variiert die Plastidendichte in Abhängigkeit von der metabolischen Aktivität. Hohe Plastidendichten treten vor allem in aktivem Meristemgewebe auf. In äußeren Kortezellen sind deutlich weniger Plastiden vorhanden als in inneren Schichten in der Nähe des Zentralzylinders (Fester et al., 2001).

In Wurzeln transformierter ptGFP-Tabakwurzeln mit GFP-markierten Plastiden (GFP = grün fluoreszierendes Protein) wurde *in vivo* eine starke Plastidenproliferation in direkter Nachbarschaft von Arbuskelstrukturen mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem CLSM (Konfokales Laserscanningmikroskop) beobachtet (Fester et al., 2001). Dabei zeigte sich ein Plastidennetzwerk, das mit der Bildung von Oktopus- oder Tausendfüßler-artigen Verbindungen in der Nähe des Zellkerns begann und schließlich die ganze Arbuskel bedeckte. Dieses Plastidennetzwerk verschwand um degenerierende, autofluoreszierende Arbuskeln. In Rindenzellen nichtmykorrhizierter Wurzeln zeigte sich hingegen eine erhöhte Plastidendichte lediglich in der Umgebung des Zellkerns, die anderen Plastiden waren ungleichmäßig im Cytoplasma verteilt (Fester et al., 2001). Die Plastidenproliferation in kolonisierten Zellen mit aktiven Arbuskeln deutet auf eine erhöhte metabolische Aktivität hin. Wurzelplastiden sind beteiligt an der Synthese von Fettsäuren, Isoprenoiden, Aminosäuren, Purinen und Pyrimidinen sowie an der Stickstoffassimilation. Es wird vermutet, dass eine Reihe dieser metabolischen Aufgaben direkt mit der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza verbunden ist, wie z. B. die Fettsäurebiosynthese zur Bildung der periarbuskulären Membran (Fester et al., 2001).

Durch Antikörper gegen die plastidenlokalisierte DXR in Mais konnten mit Hilfe des CLSM Plastiden in Wurzeln visualisiert werden (Hans, 2003; Hans et al., 2004). In nichtmykorrhizierten Wurzelzellen waren DXR-enthaltende Plastiden, ähnlich wie für Tabak beschrieben, um den Zellkern angeordnet. Die anderen Plastiden traten einzeln auf, am häufigsten in der Nähe der Zellwand. In der Umgebung von Arbuskeln (visualisiert durch WGA-TRITC) in kolonisierten Zellen wurde auch hier eine Plastidenproliferation und die Ausbildung eines Plastidennetzwerkes beobachtet. Die Plastidenverbindungen wurden als „Stromules“ (Stroma-gefüllte Kanälchen) gedeutet (Hans et al., 2004), die in nichtphotosynthetischen Geweben (Kronblätter und Wurzeln) häufig auftreten (Köhler und Hanson, 2000). DXR-enthaltende Plastiden wurden in Zellen mit verschiedenen Arbuskelstadien lokalisiert. In frühen Stadien wiesen diese Plastiden noch keine Verbindungen auf und waren in Bereichen des Arbuskelwachstums lokalisiert. Arbuskeln mit dem dichtesten Netzwerk aus DXR-enthaltenden Plastiden wurden als reife, aktive Stadien interpretiert. In der Umgebung von Arbuskeln mit beginnender Degeneration, das heißt, dem Kollabieren distaler Äste, zeigten Plastiden die stärksten DXR-Signale. Dagegen wurden in der Umgebung völlig kollabierter Arbuskeln kaum noch DXR-enthaltende Plastiden beobachtet (Hans et al., 2004).

### 1.1.6 Das Plastidenteilungsprotein FtsZ

Chloroplasten entstanden durch die Aufnahme von Cyanobakterien in Eukaryotenzellen, deren Mitochondrien sich bereits etabliert hatten (Osteryoung und Nunnari, 2003). Die meisten Bakteriengene wurden in das Genom des Zellkerns integriert oder gingen verloren. Aber auch heute noch enthalten Plastiden Gene, metabolische Aktivitäten, genetische Mechanismen und Proteinimportkomplexe, die ihren prokaryotischen Ursprung widerspiegeln (Osteryoung und Nunnari, 2003). Die Teilung dieser Organellen findet oft unabhängig von der Zellteilung statt und wird durch das Zusammenspiel vieler Proteine dirigiert (Osteryoung und Nunnari, 2003). Eine wichtige Rolle spielt dabei ein Protein, das mit dem Zellteilungsprotein FtsZ der Bakterien verwandt ist.

Der Name FtsZ leitet sich von der thermosensitiven *Escherichia coli*-Mutante PAT84 ab, die nach längerer Inkubation bei einer nicht tolerierten Temperatur von 40 °C nicht mehr zur Zellteilung fähig ist und deshalb lange Filamente ausbildet (fts = filamentous temperature sensitive). Diese Mutante gewinnt ihre Teilungsfähigkeit zurück, wenn sie anschließend bei einer tolerierten Temperatur von 30 °C kultiviert wird (Hirota et al., 1968).

FtsZ ist ein essentielles Zellteilungsprotein in Bakterien. Eine Erhöhung der FtsZ-Proteinmenge hat die Ausbildung eines Phänotyps mit Minizellen zur Folge, eine geringfügige Erniedrigung führt zur Abnahme der Teilungsaktivität (Mukherjee et al., 1993). Durch eine starke Überexpression von *ftsZ* wird die Zellteilung jedoch ebenfalls gehemmt und die Bakterien wachsen in Form von Filamenten (Ward und Lutkenhaus, 1985).

Die Entwicklung des zytokinetischen FtsZ-Ringes (Mukherjee und Lutkenhaus, 1998) in der Zellmitte in der Nähe der Cytoplasmamembran wird durch eine Reihe weiterer Proteine koordiniert (Moller-Jensen und Löwe, 2005) und stellt den ersten Schritt der Zellteilung dar. Mit fortschreitender Einschnürung verringert sich der Durchmesser des FtsZ-Ringes. Nach Beendigung der Zellteilung zerfällt dieser Ring. FtsZ aus Bakterien ist wie das homologe eukaryotische Protein Tubulin ein GDP/GTP-bindendes Protein (Mukherjee et al., 1993). Es besitzt *in vitro* GTPase-Aktivität (Sossong et al., 1999) und ist in der Lage, Protofilamente und unter bestimmten Bedingungen auch höhere Aggregate wie Blätter, Röhren oder Ringe auszubilden (Yu und Margolin, 1997; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998; Lu und Erickson, 1998; Mingorance et al., 2001). Das FtsZ-Protein der Mutante PAT84 weist einen Glycin/Serin-Austausch im Bereich der GTP-Bindungsstelle auf und zeigt deshalb eine verminderte GTP-Bindung (RayChaudhuri und Park, 1992) und GTPase-Aktivität (de Boer et al., 1992), besonders bei erhöhter, nicht tolerierter Temperatur. Bei FtsZ und Tubulin ist das GTP-Bindemotiv GGGTG(T/S)G konserviert. Die starke Ähnlichkeit zu Tubulin zeigt sich auch in der 3D-Struktur von FtsZ-Homodimeren, die eine ähnliche Faltung wie Tubulin-Heterodimere aufweisen (Carballido-López und Errington, 2003).

Der FtsZ-Ring in *E. coli* ist sehr dynamisch und zeigt *in vivo* einen ständigen Umbau mit hoher Geschwindigkeit (Stricker et al., 2002; Anderson et al., 2004). Dieser Umbau wird wahrscheinlich ähnlich wie bei Tubulin durch die Hydrolyse von GTP reguliert (Chen und Erickson, 2005).

Ein FtsZ-homologes Protein ist auch für die Plastidenteilung in Pflanzen unverzichtbar. Es wurde erstmals als kernkodiertes Gen mit Plastidensignalsequenz in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Osteryoung und Vierling, 1995). FtsZ prokaryotischen Ursprungs scheint sich in der Evolution bei der Plastidenteilung (abgeleitet von Cyanobakterien) erhalten zu haben, während FtsZ bei der Teilung von Mitochondrien (abgeleitet von  $\alpha$ -Proteobakterien) nur noch in primitiven Eukaryoten auftritt, nicht aber bei höheren Pflanzen (Takahara et al., 2000; Osteryoung und Nunnari, 2003).

Die Plastidenteilung beginnt mit der Entstehung des FtsZ-Ringes in der Mitte der Plastiden an der Stroma-Seite, gefolgt von der Ausbildung der Plastidenteilungsringe (PD-Ringe). In der

primitiven Rotalge *Cyanidioschizon merolae* kommen 3 PD-Ringe vor; an der Stromaseite, im Zwischenmembranraum und an der äußeren Membran (Miyagishima et al., 2001). Die Zusammensetzung dieser Ringe ist bisher noch nicht aufgeklärt. In höheren Pflanzen existieren nur zwei PD-Ringe; an der Stromaseite der inneren Membran und an der äußeren Membran. Es wird vermutet, dass der FtsZ-Ring unter anderem die Funktion eines Gerüsts für den Aufbau des inneren PD-Ringes hat. Die Zeit von der Erscheinung des FtsZ-Ringes bis zum Verschwinden nach der Konstriktion dauert in *Cyanidioschizon merolae* ca. zwei Stunden (Miyagishima et al., 2003).

Grünalgen und Pflanzen besitzen zwei verschiedene FtsZ-Gruppen, die an der Plastidenteilung beteiligt sind, FtsZ1 und FtsZ2. Beide sind Stromaproteine und in dem FtsZ-Ring, der in der Mitte eines Plastiden entsteht, kolokalisiert (Vitha et al., 2001). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich beide Proteine in einem Komplex zusammenlagern (Osteryoung und Nunnari, 2003). Es gibt Hinweise, dass FtsZ1 und FtsZ2 verschiedene Funktionen haben und ein Zusammenspiel beider Proteine für eine korrekte Teilung notwendig ist. Sowohl die Verarmung an einer FtsZ-Form (z. B. durch Antisense-Expression) als auch die Überexpression hat eine schwere Störung der Plastidenteilung zur Folge, verbunden mit der Entstehung einer drastisch verringerten Anzahl stark vergrößerter oder filamentartiger Plastiden (Osteryoung et al., 1998; Stokes et al., 2000; McAndrew et al., 2001; Araki et al., 2003). Umstritten ist die Deutung der Erscheinung netzwerkartiger Strukturen nach Transformation von *Physcomitrella patens* mit einem *gfp-ftsZ*-Konstrukt als Plastidenskelett (Kiessling et al., 2000; Reski, 2002).

Für FtsZ1 und FtsZ2 wird vorhergesagt, dass es sich um polymerbildende GTPasen handelt (Osteryoung und McAndrew, 2001). Die Tendenz zum Selfassembly *in vitro* wurde vor kurzem in zwei Veröffentlichungen belegt. Für FtsZ1 aus *P. sativum* wurde über die Bildung von Proteinmultimeren berichtet (Gaikwad et al., 2000). Eine *in vitro*-Polymerisierung von rekombinantem FtsZ1 aus *Nicotiana tabacum* zu Protofilamenten (durchschnittlich 5 bis 7 nm dick und 120 bis 150 nm lang) und Ringen (Durchmesser ca. 13 nm) wurde von El-Kafafi et al. (2004) beschrieben.

Eine besondere Form der FtsZ-Ringbildung wird in BY-2 Tabakzellkulturen beschrieben. Nach dem Umsetzen einer stationären Kultur in frisches Medium findet eine starke Verlängerung der Plastiden zu Bindfaden-ähnlichen Strukturen statt. Über die Länge verteilt treten dabei viele FtsZ-Ringe auf. Die Konstriktion und Teilung der Plastiden findet jedoch nur an einer Stelle in der Mitte statt, was darauf hindeutet, dass die Stellen der folgenden Teilungen durch die vorgebildeten FtsZ-Ringe bestimmt sind (Momoyama et al., 2003).

### 1.1.7 Zielstellung der Arbeit

Eine allgemeine Zunahme der Organellenzahl in kolonisierten Zellen von *Pisum sativum* wurde bereits durch EM-Aufnahmen festgestellt (Gianinazzi-Pearson, 1996). Die starke Plastidenproliferation und Ausbildung eines Plastidennetzwerkes um Arbuskeläste in ptGFP-Tabak (Fester et al., 2001) und in Mais [nach Detektion DXR enthaltender Plastiden (Hans, 2003)] spiegeln ein enges Zusammenwirken dieser Organellen mit den Pilzstrukturen wider. Der Ablauf der Proliferation sowie die Konsequenzen für den Metabolismus sollten bei der Modellpflanze *Medicago truncatula* untersucht werden.

Für eine *in vivo*-Untersuchung entsprechender Strukturen war eine Markierung der Plastiden mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) durch Transformation mit einem binären Plasmid geplant. Zu Vergleichszwecken sollten auch GFP-markierte Mitochondrien und GFP markiertes Endoplasmatisches Retikulum (ER) untersucht werden. Die vergleichende Darstellung von Plastiden und Mitochondrien durch GFP-Markierung in Wurzelknöllchen und AM-Wurzelrindenzellen war ebenfalls geplant.

Im Zusammenhang mit der Plastidenproliferation deutet die Akkumulation von Apocarotinoiden (Cyclohexanon-Derivate und Mycorradicin) und die Aktivierung des plastidenlokalisierten MEP-Weges (Walter et al., 2000) auf eine Umstellung der metabolischen Aktivität der Plastiden hin. Durch Real-Time RT-PCR-Untersuchungen der Transkriptmengen verschiedener plastidenrelevanter Stoffwechselwege und Transportproteine sollte eine Veränderung der metabolischen Aktivität in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* bestimmt werden. Das Hauptziel der Arbeit bestand in der Charakterisierung der Plastidenproliferation in AM-Wurzeln von *M. truncatula*. Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei der zeitliche Ablauf von Arbuskelentwicklung und Plastidenteilung. Für die immunocytochemische Charakterisierung der Plastidenteilung wurde das kürzlich entdeckte Plastidenteilungsprotein FtsZ gewählt (siehe Abschnitt 1.1.2). Entsprechende Untersuchungen waren nach einer Klonierung der cDNA von *ftsZ1* aus mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln geplant. Nach heterologer Expression sollten einerseits Antikörper zur cytologischen Immunlokalisation erzeugt werden, andererseits sollte eine funktionelle Charakterisierung des Proteins nach nativer Genexpression vorgenommen werden.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenanzucht und Mykorrhizierung

Alle Pflanzen, die auf LecaTon (Blähton, 2-5 mm Partikelgröße, Fibo Exclay, Pinneberg) wuchsen, wurden einmal wöchentlich mit Long Ashton Dünger (Hewitt, 1966) mit 20 % Phosphat (bezogen auf den Gesamtphosphatgehalt nach Long Ashton) gedüngt.

##### Medicago truncatula:

Die Versuche wurden mit *M. truncatula* (L.) Gaertn. var. Jemalong, Linie A17 durchgeführt. Keimung: Zur Umgehung der Samenruhephase wurden die Samen 10 min mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt und danach dreimal mit einem Überschuss von Aqua bidest gespült. Anschließend wurde eine Sterilisierung mit 12-prozentiger Natriumhypochloritlösung durchgeführt, gefolgt von dreimaligem Spülen mit Aqua bidest. Die Keimung fand dann 3 Tage bei 12 °C auf 0,8 % Wasseragar statt. Nach dieser Zeit betrug die Größe der Keimlinge durchschnittlich 1 bis 2 cm.

Je fünf Keimlinge wurden in LecaTon in Plastiktöpfe gepflanzt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei 16 h Licht ( $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ) und 22 °C. Die arbuskulären Mykorrhizapilze *Glomus intraradices* Schenk & Smith (Isolat 49, H. von Alten, Universität Hannover) und *G. mosseae* Nicholson & Gerdemann (Biorize R&D; Dijon, Frankreich) wurden mit Lauchpflanzen (*Allium porrum* L.) vermehrt und standen als Inokula in Blähton zur Verfügung. Mykorrhizierungsansätze wurden durch Anzucht von *M. truncatula*-Pflanzen in einem Gemisch aus Inokulum und Blähton [1:1 bis 1:9 (V/V)] durchgeführt.

##### ertGFP-Nicotiana benthamiana Linie 16c:

Homozygote Pflanzen mit ER-lokalisiertem GFP (an GFP gekoppelte N-terminale Sequenz für die vakuoläre basische Chitinase und C-terminale HDEL-ER-Rückhaltesequenz) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. David Baulcombe, Sainsbury Lab (Norwich, England), zur Verfügung gestellt (Haseloff et al., 1997; Ruiz et al., 1998).

Die Keimung wurde auf einem Erde-Sand-Gemisch durchgeführt. Nach 2-4 Wochen wurden die Pflanzen mit ER-lokalisiertem GFP durch Untersuchung der Blätter unter Blaulichtanregung mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop II (GFP-Filter, siehe Abschnitt 2.2.16.1) selektiert. Die weitere Kultivierung und Mykorrhizierung entsprach den für *M. truncatula* beschriebenen Bedingungen. Jede Pflanze wurde einzeln in einem Topf kultiviert.

#### 2.1.2 Mykorrhizierte Karottenwurzelkultur

Eine Wurzelkultur von *Daucus carota*, kolonisiert mit *Glomus intraradices* (Chabot et al., 1992), wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. Boller (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Alle 3 Monate wurden Wurzelbereiche, in deren Nähe sich besonders reichlich Hyphen und Sporen befanden (nach Untersuchung mit dem Stereomikroskop) auf frisches Komplettmedium umgesetzt.

### 2.1.2.1 Minimalmedium und Kompletmedium für die Kultivierung von Wurzelkulturen

Die folgenden Medien wurden für die Kultivierung von Wurzelkulturen verwendet:

	<b>Minimalmedium (M-Medium) enthalten in 1l:</b>	<b>Kompletmedium enthalten in 1l:</b>
KI	0,75 mg	0,01 mg
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	288 mg	288 mg
NaFeEDTA	8 mg	8 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6 mg	-
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	0,04 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,65 mg	0,22 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5 mg	0,45 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,13 mg	0,025 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0024 mg	0,02 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	0,025 mg
Glycin	3 mg	-
Thiamin·HCl	0,1 mg	0,1 mg
Pyridoxin·HCl	0,1 mg	0,1 mg
Myoinositol	50 mg	50 mg
Nicotinsäure	0,5 mg	0,5 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	731 mg	731 mg
KNO <sub>3</sub>	80 mg	80 mg
KCl	65 mg	65 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,8 mg	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	19 mg
NaSO <sub>4</sub>	-	200 mg
Saccharose	10 g	10 g
Phytigel oder Agar	3 oder 4 g	-
Gelrite (Roth)	-	4 g

### 2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.1 listet die verwendeten Bakterienstämme auf. Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) in Luria-Bertani-Medium (Sambrook und Russell, 2001) bei 37 °C, sofern nicht anders angegeben. Eine Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch den Zusatz des entsprechenden Antibiotikums.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Für Sequenzierungsreaktionen bzw. PCR-Amplifikationen benötigte Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und sind im Kapitel Material und Methoden sowie im Anhang aufgelistet.

**Tabelle 2.1** verwendete Bakterienstämme

Art	Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	Clontech
<i>Escherichia coli</i>	BL21-CodonPlus-RIL	Stratagene
<i>Escherichia coli</i>	BL21-CodonPlus-RP	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> PAT84 (thermosensitive ftsZ-Mutante)	6846	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, Yale University, New Haven (USA)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101	zur Verfügung gestellt von Stanislav Isayenkov, IPB Halle
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	ARqual	Dr. G. David Barker (Laboratoire de Biologie Moleculaire des Relations Plantes-Microorganismes, INRA-CNRS UMR215, BP27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, Frankreich)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	RCR2011	Stammsammlung Universität Bielefeld

### 2.1.5 Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

pBlueScript S/K (+/-) (Stratagene, LaJolla CA, USA): Ein ca. 2,9 kb großes Klonierungsphagemid, das bei der „in vivo excision“ der  $\lambda$ -ZAP-Phagen einer cDNA-Bank entsteht. Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz und ermöglicht Blau-/Weiß-Selektion durch  $\alpha$ -Komplementierung des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens (*lacZ*).

pGEM<sup>®</sup> T Easy (Promega, Mannheim): Ein 3 kb großes Klonierungsplasmid aus dem pGEM<sup>®</sup> T Easy-Klonierungskit. Es liegt dort als linearisiertes Plasmid mit 3'-T-Überhängen vor und kann zur T/A-Klonierung von PCR-Produkten verwendet werden. Das Plasmid kodiert für Ampicillin-Resistenz und erlaubt Blau-/Weiß-Selektion.

pET-28a(+) (Novagen): Ein 5369 bp-Plasmid für die heterologe rekombinante Proteinexpression in *E. coli*. Die multiple Klonierungsstelle wird flankiert von einer 6xHistidinsequenz, die die Expression als C-terminalen oder N-terminalen „His-tag“ erlaubt. Das Plasmid besitzt einen T7-Promotor und einen T7-Terminator und vermittelt Kanamycin-Resistenz.

ptGFP Konstrukt: Dieses binäre Plasmid, abgeleitet von pBin468 zur Markierung der Plastiden mit GFP (Marques et al., 2003; Marques et al., 2004) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Klösgen, Institut für Pflanzenphysiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt. Für den Transport in Plastiden ist eine *fnr*-Signalsequenz mit *egfp* (optimierte GFP-Sequenz, enhanced GFP) gekoppelt. Die Expression steht unter Kontrolle eines 2x35S-Promotors. Durch das Plasmid wird außerdem Kanamycinresistenz vermittelt. Die Überprüfung des Transformationserfolges wurde durch PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

Vorwärtsprimer: 5'-CAAAACCACTCTCTCTCCGC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CTCGAACTTCACCTCGGC-3'

Das PCR Produkt hatte eine Größe von 498 bp.

mtGFP Konstrukt: Dieser binäre Vektor 35S-mt-sGFP(S65T), abgeleitet von pSMAB701 zur Markierung von Mitochondrien mit GFP (Chiu et al., 1996; Niwa et al., 1999) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Yasuo Niwa, Universität von Shizuoka, Yada (Japan), zur Verfügung gestellt. Als Signalsequenz für den Transport von GFP in Mitochondrien ist ein an *sgfp* (optimierte GFP-Sequenz, unter anderem ist Serin in Position 65 durch Threonin ersetzt) gekoppelter Abschnitt für die F1-ATPase enthalten. Die Expression steht unter Kontrolle eines 35S-Promotors. Gegenüber *E. coli* und Agrobakterien wird Spectinomycinresistenz vermittelt. Für die Überprüfung des Transformationserfolges durch PCR wurden folgende Primer eingesetzt:

Vorwärtsprimer: 5'-GCAAGACCCTTCCTCTATATAAGC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CCGTCCAGCTCGACCAGGATG-3'

Das PCR-Produkt hatte eine Größe von ca. 500 bp.

Eine weitere Methode zur Überprüfung der Transformation war der Verdau des Plasmids mit EcoRI, wobei jeweils ein Fragment von ca. 1.400 bp und 11.000 bp entstand.

### 2.1.6 cDNA-Bank von mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln

Eine cDNA-Bank aus gemischten EST-Sequenzen von *M. truncatula*/*Glomus versiforme* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Maria J. Harrison (Samuel Roberts Noble Foundation; Ardmore, USA) zur Verfügung gestellt (AW587412; NCBI).

### 2.1.7 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth, Sigma oder Merck bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Taq DNA-Polymerase wurde von QBIOSYSTEMS, Superscript II<sup>TM</sup> Reverse Transkriptase von Invitrogen (Carlsbad, USA) und M-MLV RT von Promega bezogen. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

### 2.1.8 Geräte

Sofern nicht gesondert aufgeführt, kamen folgende Geräte zum Einsatz:

Zentrifugen:	Eppendorf 5417R-Tischzentrifuge Eppendorf 5417C-Tischzentrifuge Sorvall Super T21 (Kendro) Hettich Universal 30 RF Beckman TL-100 Ultrazentrifuge Millifuge (Millipore) Rotilabo <sup>®</sup> -Zentrifuge mit Butterfly-Rotor (Roth)
Thermocycler:	Eppendorf MasterCycler Gradient
Elektrophorese:	Hoefer Mighty Small II SE250 MBT20EL, MBT30EL (MicroBioTecBrand) ProteanII (Biorad)
HPLC:	Alliance <sup>TM</sup> Waters <sup>TM</sup> 2690 Separations Module
HPLC-Säule:	Nucleosil RP 18; Macherey & Nagel

Fluoreszenzdetektor (HPLC):	Waters™ 474 Scanning Fluorescence Detector
PDA (HPLC):	Waters™ 996 Photodiode Array Detector
Stromversorgung für Elektrophorese:	Phero-Stab. 500 (Biotec Fischer)
Geldokumentationssystem:	GelPrint 2000i (MWG-Biotech, Ebersberg)
Phosphor Imager:	Storm 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA)
pH-Meter:	pH-Meter 761 Calimatic
Ultraschall:	UW 2070 (Bandelin, Berlin)
UV-Tisch:	NU-72 (Faust)
Blotkammer:	PHERO-multiblot (Biotec Fischer)
Fotometer:	Spektrofotometer Beckman DU 640
	GeneQuantPro (Amersham, Freiburg)
Vortex:	VWR Vortex Genie II (Amphotech LTD)
Sterilbank:	Heraeus (Kendro)
Schüttelschränke:	GFL 3032
	Certomat® BS-1
Schüttler:	Infors AG Bottmingen
	TYP KL2 (Edmund Bühler)
Inkubationsschrank:	WTB Binder
Thermomixer:	Eppendorf Thermomixer Compact
Mikrotom:	HM335E (Microm, Walldorf)
Vibratom:	Leica VT 1000S
Mikroskope:	Zeiss LSM 410, Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena)
	Axioskop II (Carl Zeiss, Jena)
	Stereomikroskop Nikon Typ 104
	Stereomikroskop GSZ 2T Askania; Rathenower Optische Werke GmbH
	Fluoreszenzstereomikroskop Leica MZFLIII;
	Herbrugg (Schweiz)
Test-Tube-Rotator:	MBT Brand Model 528
Mikrowelle:	Moulimex Compact
Objektträgerstrecktisch:	OTS 40, Medite
Real-Time PCR:	ABI Prism TM 7000 Sequenzdetektionssystem (Applied Biosystems)
Dispergiergerät:	Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik Staufen)
Heizrührer:	MLW RH3
Wasserbad:	Julabo 13

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

Der Mykorrhizierungsgrad wurde durch Trypanblaufärbung (Phillips und Hayman, 1970) bestimmt. Zur Entfernung des Cytoplasmas und der Zellkerne wurden die Wurzeln 10 min in 10-prozentiger KOH erhitzt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser und 5 min Inkubation mit 10-prozentiger Milchsäure wurden Pilzstrukturen 5 min durch 0,1 % (m/V) Trypanblau in Lactophenol [0,33 % (V/V) Glycerol; 0,3 % (V/V) Milchsäure; 0,33 % (m/V) Phenol] bei 90 °C angefärbt. Der Farbüberschuss wurde nach dem Waschen in Wasser mit 10-prozentiger Milchsäure entfernt und die Wurzeln unter dem Stereomikroskop untersucht. Zur Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades wurde der prozentuale kolonisierte Anteil (bezogen auf die Gesamtlänge) einer Stichprobe geschätzt.

### 2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.2.2.1 Isolierung von RNA/ Guanidinthiocyanat-Methode

1-2 g Pflanzenmaterial (z. B. Wurzeln) wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in 50 ml-Falconröhrchen mit vorgelegtem 12 ml Extraktionspuffer und 120 µl Mercaptoethanol überführt. Es folgte eine Homogenisierung (>2 min Vortex, >10 min Rotationschüttler), dann wurden die Proben auf Eis gelagert. Nach 10 min Zentrifugation bei 3.000 g, wurde die Oberphase in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und 12 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol dazugegeben. Die Proben wurden 30 s mit dem Vortex vermischt und danach 15 min bei RT gelagert. Die Phasentrennung erfolgte durch 30 min Zentrifugation bei 12.000 g im Sorvall HB6 Swing-out-Rotor bei 18 °C. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 600 µl 1 M Essigsäure und 8,4 ml reinem Ethanol (-20 °C) eine Stunde auf Eis ausgefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 17.160 g und 4 °C im Sorvall-Festwinkelrotor wurde das Präzipitat in 2 ml 3 M K-Acetat pH 4,8 resuspendiert und erneut bei 17.160 g 20 min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 3-6 ml H<sub>2</sub>O gelöst und in die RNA in 2 M LiCl-Lösung bei 4 °C über Nacht gefällt.

Nach 30 min Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C wurde das Pellet in 1,4 ml 2M LiCl resuspendiert. Es fand eine weitere 20 min Zentrifugation bei 20.800 g und 4 °C statt. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol (V/V) gewaschen, ca. 10 min im Vakuum getrocknet und je nach Größe in 30-400 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Polysaccharide wurden durch 5 min Erhitzen auf 65 °C, 5 min Lagerung auf Eis und 2 min Zentrifugation bei 20.800 g und 4 °C abgetrennt.

Nach fotometrischer Quantifizierung und Qualitätskontrolle auf einem 1-1,2 % (m/V) Agarosegel wurde die isolierte RNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder sofort durch reverse Transkription in die entsprechende cDNA umgeschrieben.

#### 2.2.2.2 Isolierung von RNA/ Trizol-Methode

Pflanzenmaterial (z. B. Wurzeln) wurde in flüssigem Stickstoff mit Quarzsand im Mörser zerrieben und das Pulver bis zur Weiterverarbeitung in 15 oder 50 ml-Falconröhrchen bei -80 °C gelagert. Etwa 100 mg Pulver wurde in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße mit je 1 ml vorgelegtem Trizol überführt, drei mal 10 s durch Schütteln gemischt, 15 min bei RT und dann auf Eis gelagert. Anschließend wurde 10 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5-ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 200 µl Chloroform zugefügt, 15 s kräftig mit der Hand geschüttelt und bis zur beginnenden Phasentrennung (ca. 3 min) bei RT inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C wurden 450 µl

der oberen Phase in ein neues 1,5-ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 250 µl Fällungspuffer (0,8 M Na-citrat; 1,2 M NaCl) und 250 µl Isopropanol bei RT, kurzes Schütteln und 10 min Inkubation bei RT. Dann wurde 10 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert und das Pellet 2x in 75 % (V/V) Ethanol (-20 °C) gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 7.500 g wurde das restliche Ethanol mit einer Pipette entfernt und das Pellet 5 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O resuspendiert, 10 min auf 60 °C erhitzt, vorsichtig durch Schütteln gemischt und 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5-ml Röhrchen überführt. Nach fotometrischer Quantifizierung und Qualitätskontrolle auf einem 1-1,2 % (m/V) Agarosegel wurde die isolierte RNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder sofort durch reverse Transkription in die entsprechende cDNA umgeschrieben.

#### 2.2.2.3 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA von *M. truncatula* wurde aus jungen Blättern isoliert. Etwa 100 mg in flüssigem Stickstoff zerriebenes Material wurde in 1 ml Extraktionspuffer [100 mM Tris/HCl; pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1,5 % (m/V) SDS; 10 mM 2-Mercaptoethanol] resuspendiert und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) wurde 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 23.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterworfen. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min, 17.000 g) wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Das erhaltene Pellet wurde gewaschen, getrocknet und anschließend in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM NaEDTA) mit 100 µg/ml RNaseA resuspendiert. Die isolierte DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Alternativ zur oben beschriebenen Methode wurde das Qiagen DNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben der Hersteller verwendet.

#### 2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus 3-5 ml *E. coli*-Suspensionskultur (über Nacht) wurde mit dem Nucleospin Plasmid-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) oder QIAprep Spin Miniprep-Kit (Qiagen) isoliert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte dabei durch Bindung an eine Kieselgelmatrix in Spinsäulchen. Die Isolierung wurde nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.2.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde auf einem UV-Leuchttisch bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm detektiert. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QiaExII-Gelextraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert. Die Quantifizierung der eluierten DNA erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung und Vergleich der Bandenintensität mit einem Größenmarker (SmartLadder; Eurogentec, Seraing, Belgien).

### 2.2.3 Glycerolkulturen von Bakterien

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden 750 µl Bakteriensuspension mit 250 µl autoklaviertem Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.4 Transformationsmethoden

#### 2.2.4.1 Transformation von *Escherichia coli*

##### Herstellung kompetenter Zellen:

100 ml Bakterienkultur wurden in LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt, dann bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert und das Präzipitat in 20 ml eiskaltem TFB1 (30 mM K-Acetat; 100 mM RbCl<sub>2</sub>; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 15 % Glycerol) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde erneut bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB2 (10 mM MOPS pH 6,5; 10 mM RbCl<sub>2</sub>; 15 % Glycerol) resuspendiert und 30 min auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden dann in 50 µl Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

##### Transformation:

Kompetente Zellen von *E. coli* DH5α wurden auf Eis aufgetaut und 10 bis 100 ng Plasmid (1-5 µl) zugegeben. Nach 5 min Lagerung auf Eis wurden die Bakterien 75 s 42 °C ausgesetzt, gefolgt von einer 5 min dauernden Lagerung auf Eis. Dann wurde 250 µl SOC-Medium zugesetzt und 45 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 mM IPTG und 40 µg/ml X-Gal wurde auf Transformanten mit dem gewünschten Plasmid selektiert, sofern das Plasmid eine Multiklonierungsstelle mit *lacZ*-Gen enthielt. Bei weißen Kolonien war das Leseraster für die β-Galaktosidase durch die eingebaute Sequenz zerstört. Blaue Kolonien repräsentierten also wahrscheinlich Kolonien mit leerem Vektor.

Die Transformation von kompetenten *E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup>-Expressionsstämmen erfolgte nach Anweisung im Handbuch von Stratagene.

Durch Restriktionsverdau des isolierten Plasmids oder eine PCR mit spezifischen Primern nach 5 min Erhitzen der Bakterien auf 95 °C wurde der Transformationserfolg überprüft.

#### 2.2.4.2 Transformation von Agrobakterien

Kompetente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes* wurden mit Hilfe der CaCl<sub>2</sub>-Methode erhalten und durch eine Gefrier-Auftau-Methode transformiert.

##### Herstellung kompetenter Zellen:

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in 100 ml TY-Medium unter Zusatz des entsprechenden Selektionsantibiotikums bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1,0. Nach 10 min Zentrifugation bei 8.000 g wurde das Bakterienpellet in 1 ml eiskalter 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

##### Transformation:

Kompetente Zellen (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und 1 µg Plasmid (1-5 µl) zugegeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml TY-Medium [0,5 % (m/V) Trypton; 0,3 % (m/V) Hefeextrakt; 0,088 % (m/V) CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O] zugesetzt und 3 Stunden bei 28 °C und 180 rpm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde dann auf TY-Agarplatten

mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und 2 bis 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Eine Überprüfung der Transformation fand durch 5 min Erhitzen der Bakterien auf 95 °C und anschließende PCR mit spezifischen Primern statt.

#### 2.2.4.3 Transformation von *M. truncatula* – Keimlingsinfiltrationsmethode

Zur *in vivo* Markierung von Plastiden und Mitochondrien in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* wurden für eine Transformation binäre Vektoren verwendet, die eine GFP-Sequenz, fusioniert mit einer Plastiden- oder Mitochondriensignalsequenz enthielten (siehe Abschnitt 2.1.5). Die Anregung mit Blaulicht sollte dann die Visualisierung der Organellen als grün fluoreszierende Strukturen mit dem Fluoreszenzmikroskop oder dem konfokalen Laserscanningmikroskop (CLSM) ermöglichen (siehe Abschnitt 2.2.18). Eine schnelle und einfache Transformationsmethode für *M. truncatula* wurde von Trieu et al. (2000) beschrieben. Die Keimlingsinfiltrationsmethode für *M. truncatula* beinhaltete eine Behandlung mit *Agrobacterium tumefaciens* unter Vakuum und wurde gemäß Trieu et al. (2000) durchgeführt. Dafür wurde *A. tumefaciens*, Stamm GV3101, transformiert mit den entsprechenden binären Vektoren, verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Zur Selektion positiver Transformanten wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop in den Blättern der F1-Generation grün fluoreszierende Organellen gesucht. Als Variation wurde eine Verlängerung der Einwirkung des Vakuums (2,5 min statt 1 min) oder die zusätzliche Verletzung der Keimlinge getestet.

#### 2.2.4.4 Wurzeltransformation von *M. truncatula*

Eine alternative Methode zur Transformation von *M. truncatula*-Wurzeln wurde von Boisson-Dernier et al. (2001) vorgestellt. Nach dieser Methode wird durch *Agrobacterium rhizogenes* gleichzeitig die Ri-T-DNA (Ri = root inducing) und die T-DNA eines binären Vektors übertragen, was zur Ausbildung transformierter Wurzeln (hairy roots) führt.

Zur Durchführung dieser Methode wurden die entsprechenden binären ptGFP- und mtGFP-Konstrukte (siehe Abschnitt 2.1.4) in *Agrobacterium rhizogenes*, Stamm ARqual und *M. truncatula* (Linie A17) verwendet. *Agrobacterium rhizogenes* (mit dem ptGFP- oder mtGFP-Konstrukt) wurde 2 bis 3 Tage auf TY-Agar mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum kultiviert. Keimlinge von *M. truncatula* (Keimung siehe Abschnitt 2.1.1) wurden in steriles H<sub>2</sub>O gelegt. Nach dem Abschneiden der Wurzelspitze (ca. 3 mm) wurde die Schnittfläche über die Bakterienkultur gestreift. Die Keimlinge wurden dann auf Schrägagar mit modifiziertem Fahraeus-Medium in quadratische Petrischalen (12 x 12 cm) gesetzt, ca. 4-6 cm vom oberen Ende entfernt und 7 Tage bei 20 °C, anschließend bei 22 °C und einer Lichtperiode von 16 Stunden kultiviert. Nach 2 bis 3 Wochen wurde die grüne Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzstereomikroskop untersucht.

#### 2.2.4.5 Erzeugung einer ptGFP-Wurzelkultur von *M. truncatula*

Eine ptGFP-Wurzelkultur wurde gemäß Boisson-Dernier et al. (2001) angelegt. Drei Wochen nach der Wurzeltransformation wurden die transformierten Wurzeln unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem GFP-Filter (siehe Tabelle 2.8) untersucht und Wurzelstücke mit grün fluoreszierenden Plastiden selektiert. Eine Vermehrung von entsprechenden Wurzeln auf M-Agar (siehe Abschnitt 2.1.2.1 und 2.2.4.5) (Bécard und Fortin, 1988) erforderte das Abtöten der Agrobakterien. Die bei Boisson-Dernier et al. (2001) beschriebene Augmentinkonzentration (Amoxicillin + Clavulansäure) von 400 mg/l zur Abtötung der Agrobakterien reichte jedoch nicht aus. Das Bakteriumwachstum verzögerte sich um einige Tage, danach wurden die Wurzelstücke jedoch vollständig von Agrobakterien überwachsen. Auch durch Ampicillin (150 µg/ml), Cefotaxim (90 µg/ml) und Carbenicillin (500 µg/ml) sowie die Erhöhung der Augmentinkonzentration auf 1g/l im M-Agar wurden die Bakterien

nicht abgetötet. Eine Eliminierung der Agrobakterien gelang erst durch dreitägiges Schütteln der ein bis zwei Zentimeter langen Wurzelstücke mit 1 g/l Augmentin in M-Medium und anschließende Kultivierung auf M-Agar mit 1 g/l Augmentin für 8 Wochen. Danach wurden ein bis zwei Zentimeter lange Stücke von jüngeren Wurzeln abgeschnitten und auf frischem M-Agar mit 1 g/l Augmentin und nach weiteren 6 Wochen ohne Antibiotikum kultiviert. Die Wurzelkultur wuchs zunächst relativ langsam, zeigte aber kein Anzeichen von Bakterienwachstum. Eine Vermehrung und Kultivierung erfolgte durch ein Umsetzen auf frisches M-Medium (mit 0,4 % Agar) oder auf Kompletmedium (mit 0,3 % Gelrite) alle 8 Wochen.

Als Ausgangspunkt für einen Mykorrhizierungsversuch der beschriebenen Wurzelkultur diente eine mit *Glomus intraradices* mykorrhizierte Wurzelkultur von *Daucus carota* (Chabot et al., 1992). Die kolonisierten Wurzeln wurden auf M-Agar (Bécard und Fortin, 1988) oder Kompletmedium (siehe Abschnitt 2.1.2.1) in einem Kompartiment von geteilten Petrischalen kultiviert. Die Hyphen wuchsen über die Barriere in das andere Kompartiment und bildeten dort Sporen aus. Herüberwachsende Wurzeln wurden durch Abschneiden entfernt. Nach etwa 10 Wochen wurden die Petrischalen unter dem Stereomikroskop untersucht. Petrischalen, in denen das zweite Kompartiment ein dichtes Hyphennetz und reichlich Sporen aufwies, wurden für die Mykorrhizierung der ptGFP-*M. truncatula*-Wurzelkultur verwendet. Ein ca. 2 bis 3 cm großes Stück der ptGFP-Wurzelkultur wurde auf den Hyphen und Sporen enthaltenden Agar platziert (4 Petrischalen). Wurzelstückchen wurden eine Woche nach Kontaktaufnahme des Pilzes zu der Wurzel (Untersuchung mit dem Stereomikroskop) auf frischem M-Agar umgesetzt.

#### 2.2.4.6 Kultivierung wurzeltransformierter chimärer *M. truncatula* im Gewächshaus

Chimäre *M. truncatula*-Pflanzen (composite plants) mit transformierten Wurzeln und nicht transformiertem Spross wurden 2 bis 3 Wochen nach der Wurzeltransformation (siehe Abschnitt 2.2.4.4) und Kultivierung auf modifiziertem Fahraeus-Agar mit dem Fluoreszenzstereomikroskop Leica MZ FLIII untersucht. Pflänzchen mit grün fluoreszierenden Wurzelbereichen (unter Blaulichtanregung bei 425-460 nm) wurden für eine Weiterkultivierung im Gewächshaus selektiert. Eine Unterscheidung der blaugrünen GFP-Fluoreszenz von der gelbgrünen Hintergrundfluoreszenz war in vielen Fällen nicht eindeutig, so dass ein relativ großer Anteil falsch positiver Pflanzen weiterkultiviert wurde. Je ein Pflänzchen wurde in Blähton gepflanzt. Mykorrhizierungsansätze wurden in einem Gemisch aus Inokulum und Blähton (1:1) durchgeführt.

Wegen der geringeren Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus mussten die in Petrischalen auf Agar wachsenden chimären Pflanzen an diese Bedingungen angepasst werden, da sie sonst kollabierten. Die Akklimatisierung an die geringere Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus erfolgte in Zimmergewächshäusern mit lüftbarer Abdeckhaube [Edm. Romberg & Sohn (GmbH & Co.) KG, Ellerau], bei geschlossenen Lüftungsschlitzen in der ersten Woche und bei geöffneten Lüftungsschlitzen in der zweiten Woche.

Eine Inokulation mit *Sinorhizobium meliloti* zur Erzeugung von Wurzelknöllchen wurde eine Woche nach Kultivierung im Gewächshaus durch Gießen mit einer entsprechenden Bakterien suspension nach Beringer (1974) durchgeführt. Dafür wurde eine über Nacht-Kultur in Tryptonmedium von *Sinorhizobium meliloti* zentrifugiert und in einem kleineren Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen. Mit dieser Suspension wurden die Pflanzen gegossen und anschließend nur stickstofffrei gedüngt. Nach etwa 4 Wochen wurden die Knöllchen *in vivo* mit dem Fluoreszenzmikroskop oder dem CLSM untersucht. Dafür wurden sie längs oder quer mit einer Rasierklinge durchgeschnitten.

## 2.2.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

### 2.2.5.1 Restriktionsanalysen

Für Restriktionsanalysen wurde 0,5-1 µg DNA mit 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20 oder 25 µl eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei der angegebenen optimalen Temperatur des entsprechenden Enzyms. Bei präparativen Ansätzen wurden zum Teil größere Mengen DNA eingesetzt (bis 2 µg). Der Restriktionsverdau mit genomischer DNA wurden über Nacht durchgeführt. Dabei wurden 15 µg DNA mit 50 U des jeweiligen Enzyms inkubiert.

### 2.2.5.2 Ligationen

Ligationen wurden entweder mit der im pGEM<sup>®</sup> T Easy-Kit (Promega, Mannheim) enthaltenen T4-Ligase oder mit einer T4-Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt. Die Ligation wurde in einem Endvolumen von 10 µl über Nacht mit 3 Weiss-Einheiten (Promega) bei 4 °C bzw. 5 U (Fermentas) bei 14 °C durchgeführt.

### 2.2.5.3 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA, die als Sonde in Hybridisierungsexperimenten verwendet wurde, erfolgte mit dem MegaPrime<sup>™</sup>-Kit der Firma Amersham (Freiburg). 25 µg des DNA-Fragments wurden dabei nach Anlagerung von Nonameren als Zufallsprimer durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP (3.000 Ci/mmol, ICN, Eschwege) markiert (nach Vorschrift des Herstellers). Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 1 h. Die radioaktive Sonde wurde vor der Zugabe zum Hybridisierungsansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert und nicht eingebaute radioaktive Nukleotide mit ProbeQuant<sup>™</sup> G-50 Micro-Säulen (Amersham) nach dem Prinzip der Ausschlusschromatografie abgetrennt.

## 2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.2.6.1 Standard-PCR

Im Standardansatz (Endvolumen 20 µl) wurden 10 ng-1 µg DNA-Matrize mit jeweils 10 pmol der spezifischen Primer im entsprechenden Reaktionspuffer und 0,5 U (5 U/µl) *Taq* DNA-Polymerase (Qbiogene) eingesetzt. Ein typisches PCR-Programm ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

**Tabelle 2.2** Schema für PCR-Programme. Dabei betrug die Temperatur der Deckelheizung 105 °C. Die Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) in Schritt 3 lag meist 3 K unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur der verwendeten Primer.

1	Initiale Denaturierung	1 min	95 °C
2	Denaturierung	45 sec	95 °C
3	Annealing	45 sec	Annealingtemperatur
4	Elongation	1 min 30 s	72 °C
5	20 – 35 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
6	End-Elongation (Auffüllreaktion)	10 min	72 °C
7			Abkühlen auf 4 °C

### 2.2.6.2 Real-Time RT-PCR

Für die Untersuchung von Transkriptmengen durch Real-Time RT-PCR wurde doppelt konzentrierter SYBR<sup>®</sup> Green-Mastermix (Applied Biosystems) verwendet. Die Versuche wurden mit dem Gerät Prism TM 7000 durchgeführt

Durch die Interkalation von SYBR<sup>®</sup> Green in doppelsträngige DNA wird die Zunahme an PCR-Produkt mittels Fluoreszenzmessung detektierbar. Der im Mastermix enthaltene rote Fluoreszenzfarbstoff ROX dient als interner Standard zum Ausgleich von Pipettierfehlern. Durch Division der Emissionsintensität von SYBR<sup>®</sup> Green durch die Emissionsintensität von ROX ergibt sich der normalisierte Fluoreszenzmesswert Rn. Von diesem Wert wird der Fluoreszenzmesswert der Probe in den ersten Reaktionszyklen, das heißt, vor der Entstehung eines messbaren PCR-Produktes, subtrahiert. Daraus ergibt sich der normalisierte korrigierte Fluoreszenzmesswert  $\Delta Rn$ . Die Ausgabe der Reaktionskurven erfolgt durch logarithmische Auftragung von  $\Delta Rn$  gegen den CT-Wert. Der CT-Wert (Cycle Threshold) gibt den PCR-Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz in Korrelation zur Menge an PCR-Produkt den eingestellten Schwellenwert erreicht. Niedrige CT-Werte entsprechen somit einer höheren Kopienzahl.

#### Absolute Quantifizierung

Über eine Verdünnungsreihe eines pGEM<sup>®</sup> T Easy-Plasmids mit PDS-Sequenz (Phytoen-Desaturase) als Referenz und nachfolgender Real-Time RT-PCR mit spezifischen Primern wurde die Kopienzahl von cDNA aus mykorrhizierten Wurzeln und Kontrollwurzeln errechnet. Es wurde ein Molekulargewicht von 660 g/mol pro Basenpaar zugrunde gelegt (Nukleotide besitzen ein durchschnittliches Molekulargewicht von 330 Da). Das verwendete pGEM<sup>®</sup> T Easy/PDS-Plasmid enthielt 3.325 Basenpaare. Daraus ergab sich ein Molekulargewicht von 2.194.500 g/mol und bei einer Ausgangskonzentration von 0,328  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eine Kopienzahl von  $9 \times 10^{10}$  pro  $\mu\text{l}$ . Aus einer Eichgerade mit Auftragung des dekadischen Logarithmus der Kopienzahl gegen den CT-Wert wurde die Kopienzahl der Probe ermittelt. Die Transkriptmengen der folgenden plastidenbezogenen Gene in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* wurden durch Real-Time RT-PCR und nachfolgende absolute Quantifizierung untersucht:

**Shikimatweg:** EPSP-Synthase, DAHP-Synthase, Chorismat-Mutase 1

**Stickstoffassimilation:** Nitrit-Reduktase, GOGAT (Glutamat-Synthase)

**Aminosäuresynthese:** Glutamin-Synthetase

**Redoxsystem:** FNR (Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase)

**Fettsäuresynthese:** ACCase, Stearoyl-ACP-Desaturase, Omega-3-Fettsäure-Desaturase

**Stärkesynthese:** ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, Stärke-Synthase 1

**Tetrapyrrolsynthese:** Glutamyl-tRNA-Reduktase

**Oxidativer Pentosephosphatweg:** Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

**Eisenspeicherung:** Ferritin

**Nucleotidsynthese (Pyrimidine):** Aspartat-Transcarbamylase, Dihydroorotase, Dihydroorotat-Dehydrogenase, Orotat-Phosphoribosyl-Transferase, UMP-Kinase, CTP-Synthetase

**reduktive Sulfatassimilation:** (P)APS-Reduktase

**Carotinoidsynthese:** Phytoen-Synthase, Phytoen-Desaturase

**Plastidenteilung:** FtsZ1

**Kanalproteine/Translokatoren:** TOC34 (regulatorische Komponente des Proteinimport-Komplexes der Plastiden), TPT (Triosephosphat-Translokator), ADP/ATP-Translokator, GPT (Glucose-6P-Translokator), PPT (Phosphoenolpyruvat/Pyruvat-Translokator), OMT (2 Oxoglutarat/Malat-Translokator)

**Antwort auf oxidativen Stress:** Cu/ZnSOD, FeSOD (Superoxid-Dismutase), APX (Ascorbat-Peroxidase)

**plastidenkodierte Gene:** accD, ndhG, rpl20

Zusätzlich wurde die Expression folgender nicht plastidenbezogener Gene untersucht: Cu/Zn-SOD (Cytosol), Ubiquitin (Cytosol), MtPT1: Phosphattransporter mit geringerer Expression in mykorrhizierten Wurzeln (Liu et al., 1998).

Es wurden jeweils 20 µl-Ansätze mit einer Primerkonzentration von 0,5 pmol/µl (Schmelztemperatur ca. 60 °C) untersucht. Eine Zusammenstellung der verwendeten Primer und die Größe der PCR-Produkte ist in Tabelle 2.3 dargestellt. Als Standard für die absolute Quantifizierung wurde ein pGEM® T Easy-Plasmid mit einer integrierten Phytoen-Desaturasesequenz aus *M. truncatula* eingesetzt.

Für die Untersuchung wurde cDNA aus mykorrhizierten Wurzeln (10 Wochen nach Inokulation mit *G. mosseae*; 40 bis 60 % Mykorrhizierungsgrad) und Kontrollwurzeln verwendet. Die cDNA wurde durch reverse Transkription von jeweils 5 µg RNA pro 50 µl-RT-Ansatz von *M. truncatula* Wurzeln aus jeweils 6 Töpfen mit je 5 Pflanzen gewonnen. Anschließend wurde jeweils die cDNA von mykorrhizierten Wurzeln und Kontrollwurzeln vereinigt. In den Ansätzen wurden 2 bis 6 µl cDNA verwendet. Von jeder Probe wurden Drei- bis Fünffachbestimmungen vorgenommen. Das Temperaturprogramm entsprach dem in Tabelle 2.2 angegebenen Schema mit einer Annealingtemperatur von 57 °C. Die Aufnahme einer Schmelzpunktcurve im Anschluss an die Amplifikation diente zur Überprüfung der Bildung von Primer-Dimeren. Bei Abwesenheit von Primer-Dimeren sollte nur ein PCR-Produkt mit einem Maximum in der Schmelzpunktcurve entstehen.

**Tabelle 2.3** Primer und Größe der PCR-Produkte für die absolute Quantifizierung der cDNA aus mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln durch Real-Time RT-PCR. Die Sequenzen wurden durch BLAST aus der TIGR-Datenbank ermittelt, wenn nicht anders angegeben.

Sequenzname	Sequenz-Nr. (TC)	Primer	PCR-Produktgröße (bp)
EPSP-Synthase	TC36027	5'-CCAACCTGCCACATCTCTAATAGC-3' 5'-GTACAAGTCTCCGGCAATGC-3'	346
DAHP-Synthase	TC35999	5'-CTGTTGTAGTCATGATTGGATGG-3' 5'-CAAGCTGCCGAGTTACAGG-3'	305
Chorismat-Mutase 1	TC32999	5'-GAAGTTCTTTGATTTCGTCAGAGG-3' 5'-CTCCTTCCTTGACCAATTGTGG-3'	348
Nitrit-Reduktase	TC35904	5'-CTTGACAAGTCTGCAGAGTGG-3' 5'-CATCAAGTGGAAGTCTTCAGC-3'	333
GOGAT	TC32274	5'-CAAGAAGAGGTTAACAAGATCACC-3' 5'-CATAACAGATATCAGGACATGATGG-3'	361
Glutamin-Synthetase	TC33429	5'-CTTCTTTCCCTTCCCTTATTGCG-3' 5'-CAACACAGATGTCGTGCTATTCC-3'	376
FNR	TC39446	5'-GATCACTGGTGATGATGCACC-3' 5'-CAGTTCCCAACATGATGACGG-3'	371
ACCase	TC29594	5'-CACCTGGACAAATGAAGGTTTCG-3' 5'-GTCGATTCAAGAGATGTTGTGGAG-3'	321
Stearoyl-ACP-Desaturase	TC32672	5'-GTGAAGGAACTGAGAGAGAGG-3' 5'-CTATTCTCAGTCCGAGGATCC-3'	315
ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	TC40130	5'-GTTTCCCTTGCAGCTTCTTGC-3' 5'-CTCCATCTAAGATGCTTGATGC-3'	325
Stärke-Synthase 1	TC39455	5'-CGTGTATGACTGTGTCACCG-3' 5'-CTACATCTTCGCCATATGGTCC-3'	334
Glutamyl-tRNA-Reduktase	TC28714	5'-GAAGCAGAATGGCCTAGAGC-3' 5'-GTTTGCCGTTAACTCCTTGTCC-3'	331
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	TC40699	5'-GACCAGAGGGCAAATTGTGC-3' 5'-GGTCTTCAGTGAGGTATTGCTTC-3'	299
Ferritin	TC32098	5'-GAGCAGCATCTGATCAAAGTGC-3' 5'-GAAGAGGAAAGAGGGCATGC-3'	351

Tabelle 2.3 Fortsetzung

Sequenzname	Sequenz-Nr. (TC)	Primer	PCR-Produktgröße (bp)
Aspartat-Transcarbamylase	TC42822	5'-GTGCTCCTTCATTTTCTGTTGGG-3' 5'-GTATCTTCGAGCGTCTCTCC-3'	304
Dihydroorotase	TC32356	5'-GTTACTGGTACCCAAGCTGC-3' 5'-CAACACAGGACAATCCCTCC-3'	307
Dihydroorotat-Dehydrogenase	BG582355	5'-GTTAAGTTCCGAGAATGGCTGC-3' 5'-CGAGCTGCAGCTGAGACC-3'	328
Orotat-Phosphoribosyl-Transferase	TC33155	5'-GCTGCAGTTCCAACATCTGC-3' 5'-CTGATTGATAGAGAGCAAGGTGG-3'	329
UMP-Kinase	TC32384	5'-CCTTGCAGCATCAACCTTGC-3' 5'-CGTCCGAGGTAACAATTAGGC-3'	320
CTP-Synthetase	TC37892	5'-CCTTAGCATTGTCGTCAGTTCC-3' 5'-CATCCAAGAGTGGATAGAGCG-3'	323
APS-Reduktase	TC32581	5'-CTCAAGCTGACCACGTTCTGG-3' 5'-GGTTAAGTGGAACCCGGTTGC-3'	327
Phytoen-Desaturase	TC106289	5'-CAGCCGAAGAATGGATTTTAC-3' 5'-GAATCCTGTACAATAGCCTGTGC-3'	311
Phytoen-Synthase	TC37829	5'-GATTTCTGTGCGATATCCAGCC-3' 5'-CCTAATCCACGAGTCAGAAGC-3'	331
TOC34	TC32159	5'-CCAAGACCTGTTATGGTGTGC-3' 5'-CTGAGCGTCATCCTTCTTTAAGG-3'	381
ADP/ATP-Translokator	TC40026	5'-CTGGTATCTTGACAGCTGCTG-3' 5'-CGACCCCTGCAAAGAAATGG-3'	302
TPT (Triosephosphat-Translokator)	TC39474	5'-CAGCAATTGCAATGGCAGTTCC-3' 5'-CTATGCCTACATTTCCATCATTGC-3'	323
Glucose-6-Phosphat-Translokator	TC39604	5'-GTAAACGACACAGCCACTTTGG-3' 5'-GGTTGAAGGAGCAGAAACACC-3'	321
Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator	TC29108	5'-CATGGTCCATGTCTCCTTCC-3' 5'-GCATGGCACCAGTGATTTTAGG-3'	339
2-Oxoglutarat/Malat-Translokator	TC36505	5'-GTAGTACTAGGCATAGCAGGTG-3' 5'-GTTCCAAAACCAGTTGAAGTTACC-3'	353
Cu/Zn-SOD (Plastiden)	TC28706	5'-CTCTGCAACGCCGTTGGC-3' 5'-CAATGGGTGTATCTCGACAGG-3'	256
FeSOD (Plastiden)	TC101551	5'-CCTTACCATTGATGTATGGGAGC-3' 5'-CTCAAGTCTTGAGCTGACTGC-3'	120
FtsZ1	TC102111	5'-CTTCTCTCACAAACCCAAATAAGC-3' 5'-CCTAATCCACGAGTCAGAAGC-3'	331
accD	66968-67480 <sup>a</sup>	5'-GCTCAAACCTTCCTTCTGCATACG-3' 5'-CTCGGTTGATTGAATATGCTACC-3'	92
ndhG	7700-8230 <sup>a</sup>	5'-CACGTAATAAAGTAGCTGTGATGC-3' 5'-GGAGTAGTATTACTTACCAACCC-3'	129
rpl20	58057-57698 <sup>a</sup>	5'-CTGTACTATGTGTAAGTAGCAACG-3' 5'-CATAACGAAGTACCACATGAGTGG-3'	178
Cu/Zn-SOD (Cytosol)	TC106823	5'-CTTGCGGTTCCATCATCACC-3' 5'-CACGAATGGTTGCTTGCAACC-3'	129
Ubiquitin (Cytosol)	TC93934	5'-GTAGAATCATCCGACACAATCG-3' 5'-GGAGACGGAGAACAAGGT-3'	172
MtPT1 (Cytoplasmamembran)	AF000354 <sup>b</sup>	5'-CTCATGGTGGTTTGTTCAGTTGG-3' 5'-GCACTAACAGTGATGTAGCTGG-3'	310

<sup>b</sup> NCBI-Nummer einer bekannten Sequenz

<sup>a</sup> Plastidenkodierte Sequenzen von *M. truncatula*, angegeben sind die Abschnitte auf dem Plastidengenom.

### Relative Quantifizierung

Für die Gene mit Homologie zu ACCase, Aspartat-Transcarbamylase, CTP-Synthetase, 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator und FtsZ1 wurden neue Primer nach TC-Sequenzen (TC = tentative consensus) aus der TIGR-Datenbank für eine optimale PCR-Produktgröße

von 50 bis 150 bp abgeleitet (Tabelle 2.4.). Für die relative Quantifizierung wurde ebenfalls doppelt konzentrierter SYBR<sup>®</sup> Green PCR Mastermix eingesetzt. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmung untersucht. Ein 60 µl-Ansatz mit je 1 µl cDNA und 0,33 pmol/µl Primern wurde auf 3 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die cDNA wurde durch reverse Transkription von jeweils 3 µg RNA pro 50 µl RT-Ansatz gewonnen. Dafür wurden 10 Wochen alte Wurzeln von *M. truncatula* verwendet. Es wurden jeweils 4 Proben von Kontrollwurzeln, 4 Proben mit *Glomus intraradices* und 3 Proben mit *G. mosseae* mykorrhizierte Wurzeln untersucht. Eine Probe entsprach jeweils 5 Pflanzen aus einem Topf. Die Mykorrhizierungsraten betragen 40 bis 60 %. Als konstitutive Kontrolle wurde der CT-Wert des Translations-Elongationsfaktors 1α (EF) bestimmt, um die Untersuchung gleicher cDNA-Mengen zu gewährleisten. Als Maß für die Mykorrhizierung diente die Expression des *Mtpt4*-Gens, nach (Harrison et al., 2002; Isayenkov et al., 2004). Die Auswertung fand wie folgt nach der  $\Delta\Delta$ CT-Methode von Applied Biosystems (ABI-Prism, 1997) statt. Der  $\Delta$ CT-Wert wurde als Differenz aus den CT-Werten von Kontrollwurzeln und mykorrhizierten Wurzeln berechnet. Weil die Expression des Elongationsfaktors 1α konstitutiv ist, wäre die Differenz  $\Delta$ CTEF im Idealfall Null. Durch die Differenzbildung des  $\Delta$ CT der Probe und dem  $\Delta$ CT von EF fand eine Korrektur unterschiedlicher cDNA-Mengen statt. Diese Differenz repräsentierte den  $\Delta\Delta$ CT-Wert, wie in den nachfolgenden Gleichungen angegeben (Kon = Kontrollwurzeln, Myk = mykorrhizierte Wurzeln):

$$\Delta\text{CTEF} = \text{CTEF}_{\text{Kon}} - \text{CTEF}_{\text{Myk}}$$

$$\Delta\text{CTProbe} = \text{CTProbe}_{\text{Kon}} - \text{CTProbe}_{\text{Myk}}$$

$$\Delta\Delta\text{CTProbe} = \Delta\text{CTProbe} - \Delta\text{CTEF}.$$

Das Verhältnis der Expression wurde durch  $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$  bestimmt und gilt streng nur bei idealer Amplifikation, das heißt, einer DNA-Verdopplung in jedem Zyklus ( $E = 2$ ). Eine Reaktion mit 100 % Effizienz in entsprechenden Verdünnungsreihen ergäbe nach Auftragung der CT-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration einen Anstieg von -3,32. Die Amplifikationseffizienz wurde durch eine Reihe mit drei Verdünnungen der cDNA einer mykorrhizierten Probe und den spezifischen Primern nach der Formel:  $E = 10^{(-1/\text{Anstieg})}$  bestimmt (Pfaffl, 2004).

Zur Überprüfung der Bildung von Primer-Dimeren wurde im Anschluss an jeden Real-Time RT-PCR-Lauf eine Schmelzpunktkurve der PCR-Produkte erstellt. Für die Amplifikation wurde folgendes Temperaturprogramm als Standardeinstellung für das Gerät ABI-Prism 7000 verwendet:

- 1) 2 min 50 °C
- 2) 10 min 95 °C
- 3) 15s 95 °C
- 4) 1 min 60 °C; 3) und 4) wurden 40 mal ausgeführt (40 PCR-Zyklen)

**Tabelle 2.4** Primer und Größe des PCR-Produkts für die relative Quantifizierung der cDNA aus mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln durch Real-Time RT-PCR. Die Sequenzen wurden durch BLAST aus der TIGR-Datenbank ermittelt, falls nicht anders angegeben.

Sequenzname	Sequenz-Nr. (TC)	Primer	PCR-Produkt-größe (bp)
ACCCase	TC87419	5'-TTCTGCTACTGCGAGCTCTCC-3' 5'-GGAGGTAAGGCAGGTGTTGCT-3'	51
Aspartat-Transcarbamylase	TC81928	5'-CAGAACGGTTCGCTCACTTG-3' 5'-TTCACGTCATGGTACTTGGCA-3'	51
CTP-Synthetase	TC91195	5'-ACAGATGCCATCCAAGAGTGG-3' 5'-CCATCAACCGGAATCTGTGC-3'	53
2-Oxoglutarat/Malat-Translokator	TC87743	5'-CCCCTCAAGCATGGCAATTA-3' 5'-AAGCCCGGCTATCGTTGAA-3'	53
FtsZ1	TC102111	5'-CAGCCGAACAGGCTACTTTGG-3' 5'-GAAGGATCAGCCAAACTAGTCAC-3'	148
Elongationsfaktor 1 $\alpha$	TC85208	5'-AGCACCAAGCAAAGCATCCT-3' 5'-AGGTTGTTACTCGTTCGGATCCT-3'	60
MtPT4	AY116211 <sup>a</sup> (NCBI)	5'-ACAAATTTGATAGGATTCTTTTGCACGT-3' 5'-TCACATCTTCTCAGTTCTTGAGT-3'	162

<sup>a</sup> NCBI-Nummer einer bekannten Sequenz

## 2.2.7 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte als externe Auftragsarbeit durch die Firmen TopLab (Martinsried) bzw. Medigenomix (Martinsried). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas, Version 1.45 (Southport, Queensland; Australia), DNASTAR, Clone Manager 7, Version 7.07 und ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) analysiert. Die Sequenzsuchen mit BLAST (Altschul et al., 1997) erfolgten über die Internetseite der Genbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die Suche nach TC-Sequenzen (tentative consensus; Zusammensetzung aus verschiedenen EST-Sequenzen) von *M. truncatula* wurde mit der TIGR-Datenbank (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) durchgeführt. Dabei wurden die Standardeinstellungen des jeweiligen Programms verwendet. Die Vorhersage möglicher plastidärer Transitpeptide und ihrer wahrscheinlichen Prozessierungsstellen wurde mit ChloroP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>; Emanuelsson et al., 1999) durchgeführt. In die TIGR-Datenbank wurde kürzlich eine Bewertung von Sequenzen durch das Programm AmiGO eingeführt (gene ontology anotation; <http://www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>). Damit ist auch eine Vorhersage über die Lokalisierung eines Proteins (z. B. Stromaprotein) möglich.

Die FtsZ-Sequenzen und die  $\alpha$ -Tubulinsequenz, die für einen Sequenzvergleich mit MtFtsZ1 verwendet wurden, sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

**Tabelle 2.5** Sequenzen, die für einen Sequenzvergleich mit MtFtsZ1 verwendet wurden.

NCBI-Nr.	Name	Spezies
Y15383	PsFtsZ	<i>Pisum sativum</i>
AAA82068.1	AtFtsZ1-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAC35982.2	AtFtsZ2-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAK63846	AtFtsZ2-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
1FSZ	MjFtsZ	<i>Methanococcus jannaschii</i>
JC4289	EcFtsZ	<i>Escherichia coli</i>
XP_475334	OsFtsZ	<i>Oryza sativa</i>
JC4289	<i>Anabaena</i> -FtsZ	<i>Anabaena</i> sp.
AJ428993	Pp_FtsZ3 (1-1)	<i>Physcomitrella patens</i>
U12589	Ps alpha tubulin	<i>Pisum sativum</i>

## 2.2.8 Extraktion von Proteinen

### 2.2.8.1 Isolierung von löslichen Proteinextrakten aus Bakterienkulturen

Bakterienkulturen wurden 10 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert, die Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden 15 min auf Eis aufgetaut und in Extraktionspuffer 1 [100 mM KPi (pH 7,0); 300 mM NaCl; 10 % Glycerol; 2,5 mM Imidazol] oder Extraktionspuffer 2 [50 mM HEPES (pH 8,0); 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol] resuspendiert. Die Zellen wurden in 100 µg/ml Lysozym für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Ultraschallaufschluss (6 x 30 s mit 60 % Intensität) auf Eis aufgeschlossen. Bei hoher Viskosität des Lysats wurde zur Entfernung von Nukleinsäuren ein Verdau mit 10 µg/ml RNaseA und 5 µg/ml DNaseII durchgeführt. Der Überstand nach 20 min Zentrifugation (20.000 g bei 4 °C) enthielt die lösliche Proteinfraction.

### 2.2.8.2 Isolierung des Gesamtproteins und Extraktion der unlöslichen Proteinfraction aus *E. coli*

Zur Isolierung unlöslicher Proteine aus *E. coli*-Zellen wurde das Zellpellet bzw. der Rückstand nach der Extraktion der löslichen Proteine in einem denaturierenden Extraktionspuffer [100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris/Cl (pH 8,0); 8 M Harnstoff, 2,5 mM Imidazol] resuspendiert. Nach Ultraschallbehandlung (6 x 30 s mit 60 % Intensität) wurde die Suspension zentrifugiert (20 min bei 20.000 g und RT). Der Überstand enthielt jeweils die Gesamtproteine bzw. die unlösliche Proteinfraction.

### 2.2.8.3 Isolierung von Proteinen aus Inclusion Bodies (Einschlusskörperchen; IB) von *E. coli*

Bakterienkulturen wurden 10 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml/g in Puffer 1 [0,1 M Tris/HCl (pH 7); 1 mM NaEDTA] resuspendiert und auf Eis mit dem Ultraturrax (10.000 rpm) homogenisiert. 1,5 mg/g Lysozym (bezogen auf das Pellet) wurde hinzugefügt, kurz mit dem Ultraturrax gemischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss fand durch Ultraschall (6 x 30s, 60 % Intensität) statt. Ein DNA-Verdau wurde mit 10 µg/ml DNase II und 3 mM MgCl 30 min auf Eis durchgeführt. Danach wurde die Suspension mit 0,5 Volumen Puffer 2 [6 % Triton X-100; 1,5 M NaCl (pH 7)] gemischt und die IB 10 min bei 4 °C und 31.000 g (15.554 rpm in der Zentrifuge Sorvall RC28S; Rotor F-28/50) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit Puffer 3 [0,1 M Tris/HCl (pH 7)] unter Resuspendierung mit dem Ultraturrax und eine erneute Zentrifugation bei 31.000 g für 10 min bei 4 °C. Das Pellet wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Je-

weils 100 mg Pellet wurden in 10 ml denaturierendem Puffer [100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris/HCl; 8 M Harnstoff; 2,5 mM Imidazol (pH 8,0)] resuspendiert.

#### *2.2.8.4 Proteinisierung aus Pflanzenmaterial nach Meyer*

Pflanzliche Gesamtproteinextrakte wurden unter anderem durch eine phenolische Extraktion nach Meyer et al. (1988) gewonnen. In flüssigem Stickstoff zerriebenes Pflanzenmaterial wurde mit 3 ml Tris-gesättigtem Phenol (pH 8,0) und 3 ml Phenol-gesättigtem 10 mM Tris/HCl (pH 8) resuspendiert und anschließend 30 min gerührt. Die Phasentrennung wurde durch eine Zentrifugation (10 min bei 3.000 g; RT) erreicht. Die wässrige Oberphase wurde samt Interphase verworfen. Anschließend wurde das Protein aus der Phenolphase durch Zugabe von 4 Volumen 0,1 M Ammoniumacetat in Methanol ausgefällt (Inkubation mindestens 4 Stunden bei -20 °C). Das durch Zentrifugation (10 min 3.000 g; 4 °C) erhaltene Pellet wurde dreimal mit 0,1 M Ammoniumacetat/Methanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde es in Probenpuffer [68 mM Tris/HCl (pH 6,8); 2 % (m/V) SDS; 0,7 M 2-Mercaptoethanol; 10 % (V/V)] Glycerol) durch dreiminütiges Kochen gelöst.

#### *2.2.8.5 Proteinisierung aus Pflanzenmaterial mit der Trizol-Methode*

Eine weitere phenolische Extraktionsmethode für Gesamtproteine stellte die Verwendung von Tri Reagent (Sigma) dar. Mit dieser Methode war es möglich, aus einer Probe gleichzeitig RNA, DNA und Protein zu gewinnen. Proteine wurden aus dem Phenol-Ethanol-Überstand durch 10 min Inkubation mit 1 ml Isopropanol bei RT ausgefällt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 12.000 g und 4 °C. Das Pellet wurde dreimal mit 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid/95 % (V/V) Ethanol gewaschen (20 min Inkubation bei RT; 5 min Zentrifugation bei 7.500 g und 4 °C). Nach dem Waschen in 2 ml reinem Ethanol und erneuter Zentrifugation wurde das Ethanol entfernt und das Pellet unter Vakuum 5 bis 10 min getrocknet. Das Protein wurde dann in 1 % SDS gelöst und ungelöste Bestandteile durch Zentrifugieren bei 10.000 g und 4 °C abgetrennt.

#### *2.2.8.6 Isolierung von löslichen Pflanzenproteinen*

Etwa 500 mg Probe wurden in flüssigem Stickstoff zerrieben und mit 1 ml Extraktionspuffer gemischt [50 mM HEPES (pH 7); 5 % unlösliches PVP zur Abtrennung phenolischer Verbindungen; 10 mM β-Mercaptoethanol; 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Proteaseinhibitor)]. Der Zellaufschluss fand durch Ultraschallbehandlung (6 x 30 s; 60 % Intensität) statt. Anschließend wurden die Proben 30 min im Kühleinsatz bei 500 rpm auf dem Eppendorf Thermomixer geschüttelt. Die Kühleinsätze waren zuvor auf Eis gekühlt worden. Größere Zellbestandteile wurden anschließend durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 20.800 g abgetrennt. Darauf folgte eine Stunde Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4 °C. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine.

## 2.2.9 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Verdünnte Proteinlösungen aus Bakterienextrakten wurden durch Centricon YM-10 oder Centricon YM-30 (Millipore) durch Zentrifugation bei 4 °C u. 5.000 g eingeeengt. Anschließend fand eine Umpufferung mit Testpuffer [100 mM KCl; 50 mM HEPES (pH 7,5)] statt.

## 2.2.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im allgemeinen nach der Methode von Bradford (1976) mit BSA als Standard. 5 µl der Probe wurden mit 1 ml Bradford-Lösung (0,065 % (m/V) Coomassie G-250 in einer Lösung von 5 % (V/V) Methanol und 10 % (V/V) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) gemischt, und nach 5 min Inkubationszeit bei 595 nm fotometrisch gegen einen entsprechenden Blindwert vermessen.

Der Proteingehalt SDS-haltiger Lösungen wurde nach Esen (1978) bestimmt. Dazu wurden je 5 µl Proteinlösung auf Filterscheiben FN7 getüpfelt, getrocknet und anschließend 20 min in Färbelösung [0,05 % (m/V) Coomassie G-250 in 25 % (V/V) Isopropanol und 10 % (V/V) Essigsäure] gefärbt. Die Filterscheiben wurden mehrmals in kochendem H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde der Farbstoff durch Inkubation in 0,5 % (m/V) SDS eluiert und die Extinktion der Lösung bei 578 nm im Fotometer bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Bezug der Messwerte auf den Standard (2 mg/ml BSA).

## 2.2.11 Gelelektrophorese

### 2.2.11.1 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA erfolgte, sofern nicht anders angegeben, durch 0,8 bis 1,2 % (m/V) Agarosegele in TBE-Puffer [0,45 M Tris/HCl (pH 8,0); 0,45 M Borsäure; 10 mM EDTA]. Der aufgeschmolzenen Gellösung wurde vor dem Gießen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit zehnfach konzentriertem Probenpuffer [50 % Glycerol (V/V); 1 mM EDTA (pH 8); 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol] versetzt. Als Größenmarker wurde Smart Ladder (Eurogentec) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 60 bis 100 V in TBE-Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem unter UV-Anregung fotografiert.

### 2.2.11.2 Elektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche denaturierende SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese; Laemmli, 1970). Die Herstellung der Gele erfolgte mit Hilfe der konzentrierten Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth). Für das Sammelgel wurde eine 4-prozentige (V/V) und für das Trenngel eine 10-prozentige (V/V) Acrylamidlösung verwendet.

Die Proteinproben wurden vor dem Beladen mit fünffach konzentriertem Proteinprobenpuffer [0,225 M Tris/HCl (pH 6,8); 50 % Glycerol; 5 % SDS; 0,05 % Bromphenolblau; 0,25 M DTT] im Verhältnis 5:1 gemischt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA Stromstärke (8,5 x 8,5 cm Gele) bzw. bei 60 mA (16 x 16 cm Gele).

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder zum Blotten weiterverwendet (siehe 2.2.12.2) oder durch eine Stunde Schwenken in Coomassie-Lösung [0,25 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue R-250; 10 % (V/V) Essigsäure; 50 % (V/V) Methanol] gefärbt. Eine Entfärbung des Hintergrundes fand durch 30 min Schwenken in Entfärbelösung 1 [10 % (V/V) Es-

essigsäure; 50 % (V/V) Methanol] und über Nacht Schwenken in Entfärbelösung 2 [10 % (V/V) Essigsäure] statt. Anschließend wurden die Gele im Geldokumentationssystem unter Weißlicht fotografiert.

## 2.2.12 Blots

### 2.2.12.1 Blotten und Hybridisieren von DNA (Southern Blot)

Der Transfer von DNA auf 14 x 14 cm-Nylonmembranen (Amersham Hybond N<sup>+</sup>) erfolgte nach einem Halbtrocken-Verfahren (Smith und Summers, 1980). Jeweils 15 µg genomische DNA wurden über Nacht mit 50 U Enzym (Fermentas) verdaut und in einem 0,8-prozentigem Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde 30 min denaturiert (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), dann 30 min neutralisiert [1 M Tris/HCl (pH 7,5); 2 M NaCl] und anschließend zwei mal mit 2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M Na-Citrat) gespült. Der DNA-Transfer fand über Nacht mit 2xSSC statt. Es folgte eine Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran durch UV-Behandlung (UV Stratalinker 1800 von Stratagene) mit 120 mJ Energieleistung.

In Hybridisierungspuffer [7 % (m/V) SDS; 250 mM NaCl; 1 mM EDTA; 250 mM Na-phosphatpuffer (pH 7)] wurde die Nylonmembran eine Stunde bei 60 °C in einer Rollflasche vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde mindestens 16 Stunden bei 60 °C durchgeführt. Danach wurde die Membran 2 x 30 min mit 2 x SSC; 0,1 % SDS bei RT gewaschen. Anschließend wurde ein Röntgenfilm in einer Kassette mit Verstärkerfolie 1 bis 4 Stunden exponiert.

### 2.2.12.2 Blotten von Proteinen (Western Blot)

Das Blotten von Proteinen wurde mit einem Halbtrockenverfahren in einem diskontinuierlichen Puffersystem in PHERO-multiblot Kammern durchgeführt. Nach Benetzen mit Methanol wurde eine Seqi-Blot PVDF-Membran (Bio-Rad) in Anodenpuffer 2 [25 mM Tris/HCl (pH 10,4); 10 % Methanol (V/V)] inkubiert. Das Polyacrylamidgel wurde vor dem Blotaufbau in Kathodenpuffer inkubiert. Für den Blotaufbau wurden je 3 Lagen Whatmann 3MM Filterpapier in Anodenpuffer 1 [300 mM Tris/HCl (pH 10,4); 10 % (V/V) Methanol], Anodenpuffer 2 und Kathodenpuffer [25 mM Tris/HCl (pH 9,4); 40 mM 6-Aminohexansäure; 10 % (V/V) Methanol] eingeweicht. Das Polyacrylamidgel wurde auf der PVDF-Membran zwischen Filterpapier, das vorher jeweils in Anodenpuffer 2 und Kathodenpuffer getränkt wurde, platziert. Ein Proteintransfer fand bei einer Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> während einer Stunde statt.

### 2.2.12.3 Detektion von Western Blots durch Alkalische Phosphatase-Reaktion

Die PVDF-Membran wurde nach dem Blotten kurz in TBS [100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl] gespült und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % (m/V) Trockenmilchpulver (BioRad) in TBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper [in 5 % (m/V) Trockenmilchpulver/TBS] erfolgte über Nacht bei 4 °C oder eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln. Die verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind in Tabelle 2.6 angegeben.

Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TTBS [TBS (pH 7,5) mit 0,05 % (V/V) Tween-20] entfernt. Nach dem Spülen in TBS (3 x 5 min) wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in 5 % (m/V) Trockenmilchpulver inkubiert (1 Stunde bei RT). Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um Anti-IgG-Konjugate mit alkalischer Phosphatase (AP) zur enzymatischen kolorimetrischen Detektion. Nach erneutem Waschen mit TTBS (3 x 5 min) wurde die Membran in TBS pH 9,5 inkubiert (2 x 5 min) und mit AP-Substratpuffer [TBS (pH 9,5); 50 mM MgCl<sub>2</sub>] äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,165 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indo-

lylphosphat (BCIP) und 0,33 mg/ml p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gestartet und nach ausreichender Farbintensität durch Waschen der Membran in Wasser gestoppt. Die Membran wurde dann im Geldokumentationssystem unter weißem Auflicht fotografiert bzw. direkt mit einem Scanner eingelesen.

**Tabelle 2.6** Für Proteinblots mit Detektion durch Alkalische Phosphatase-Reaktion verwendete Antikörper und die normalerweise eingesetzten Verdünnungen.

<b>Primärantikörper</b>	Maus:Anti-6xHis (Novagen): 1: 1.000
	Kaninchen:Anti-MtFtsZ1 (Eurogentec) nach Reinigung über eine Affinitätssäule: 1:1.000
	Meerschweinchen:Anti-MtFtsZ1a (Eurogentec) nach Reinigung über einen Affinitätsblot: 1:1.000
	Kaninchen:Anti-AtFtsZ1-1 (Antipeptid-Antikörper, zur Verfügung gestellt von Katherine W. Osteryoung Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA): 1:3.000
<b>Sekundärantikörper aus Ziege (AP-Konjugate)</b>	Anti-Maus-IgG-AP (Novagen): 1: 1.000
	Anti-Kaninchen-IgG-AP (Chemicon): 1:5.000
	Anti-Meerschweinchen-IgG-AP (Chemicon): 1:5.000

#### 2.2.12.4 Detektion von Western Blots mit dem ECL-Plus-System (Amersham)

Die Markierungs- und Waschschrte der PVDF-Membran entsprachen im wesentlichen der unter 2.2.12.3 beschriebenen Methode und wurden nach Anleitung des Herstellers (Amersham) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenzreaktion und Exposition eines Röntgenfilmes nach Umsetzung von Lumigen PS-3 mit Meerrettich-Peroxidase unter Verwendung entsprechend enzymgekoppelter Antikörper. Als Primärantikörper wurden die gleichen Antikörper, wie in Tabelle 2.6 aufgeführt, verwendet. Die eingesetzten Sekundärantikörper sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

**Tabelle 2.7** Für Proteinblots mit Detektion durch Meerrettich-Peroxidase (MP) Reaktion verwendete Sekundärantikörper und die normalerweise eingesetzten Verdünnungen.

<b>Sekundärantikörper aus Esel (MP-Konjugate)</b>	Anti-Kaninchen-IgG-MP (Amersham): 1:25.000-1:50.000
	Anti-Meerschweinchen-IgG-MP (Chemicon): 1:25.000

### 2.2.13 Heterologe Expression in *E. coli*

#### 2.2.13.1 Doppelte PCR für die Gewinnung einer kodierenden Sequenz für MtfsZ1

Mit Primern, abgeleitet von TC90784 und TC82372 (siehe Tabelle 2.8) und 1 µl cDNA aus mykorrhizierten Wurzeln wurde eine PCR in einem 20 µl-Ansatz und 35 Zyklen durchgeführt. Diese cDNA war eine Mischung aus acht 50 µl cDNA-Ansätzen (mit je 5 µg RNA aus je 6 Wurzelproben mit durchschnittlich 60 % Mykorrhizierung, 10 Wochen nach der Inokulation mit *G. mosseae*). Der erste PCR-Ansatz diente als Matrize für einen 50 µl-Ansatz, mit dem wiederum 35 PCR-Zyklen durchgeführt wurden. Taq-Polymerase, Primer und dNTP wurden entsprechend neu dazugefügt. Das in pGEM<sup>®</sup> T Easy klonierte PCR-Produkt wurde als Matrize für alle weiteren Expressionsversuche verwendet.

**Tabelle 2.8** TC-Sequenzen aus der TIGR Datenbank und abgeleitete Primer für eine kodierende *MtftsZ1*-Sequenz

<b>TC90784</b>	Vorwärtsprimer: 5'-CAGCTTAAGCTATTAAGCTAAAAC-3' für die Anfangssequenz einschließlich ATG (Startkodon)
<b>TC82372</b>	Rückwärtsprimer: 5'-GTGAGCTACATACACTTACG-3' für die Endsequenz einschließlich TAG (Stopkodon)

#### 2.2.13.2 *MtftsZ1*-Sequenzuntersuchung der genomischen DNA

Für Amplifizierung zur Untersuchung des *ftsZ1*-Gens in *M. truncatula* wurden folgende Primer verwendet.

##### PCR-Produkt 1:

Vorwärtsprimer: 5'-CTTCTCTCACAAACCCAAATAAGC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GCAAATCCACATTCACAAGTCC-5'

##### PCR-Produkt 2:

Vorwärtsprimer: 5'-GAAGGACGTAAAAGATCCTTGC-5'

Rückwärtsprimer: 5'-CAGCTCGAGTAGTACCAACTAAAAAAGAGCTTTCG-3'

Beide PCR-Produkte hatten einen Überlappungsbereich von 201 bp und deckten 1.235 bp der cDNA-Sequenz (1.257 bp) ab.

#### 2.2.13.3 Klonierung in *pBluescriptII SK(-)*

Die *MtftsZ1a*-Sequenz ohne putative Plastidentargetsequenz (nach ChloroP) wurde in *pBluescriptII SK(-)* unter Kontrolle des *lac*-Promotors kloniert, um eine Regeneration der Teilungsfähigkeit der *E. coli ftsZ* Mutante PAT84 zu untersuchen. Als Matrize diente die *MtftsZ1*-Sequenz in *pGEM<sup>®</sup> T Easy* (siehe Abschnitt 2.2.13.1). Für die PCR-Amplifikation und das Anfügen einer BamHI-Schnittstelle in 5'-Richtung sowie einer XhoI-Schnittstelle in 3'-Richtung wurden folgende Primer verwendet (die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen):

Vorwärtsprimer: 5'-CGTGGATCCTTGTTTAGCTTATGTTGATAACGCTAA-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CAGCTCGAGTAGTACCAACTAAAAAAGAGCTTTCG-3'

Das durch 35 PCR-Zyklen erhaltene PCR-Produkt wurde nach Agarosegelelektrophorese und Elution in *pGEM<sup>®</sup> T Easy* kloniert und das Plasmid in *E. coli DH5 $\alpha$*  vermehrt. Anschließend wurden das *pGEM<sup>®</sup> T Easy*-Plasmid und *pBluescriptII SK(-)* mit BamHI/XhoI verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Gelelution fand die Ligation der Fragmente statt.

#### 2.2.13.4 Klonierung in *pET28a*

Zur Produktion von rekombinantem HisMtFtsZ1 und HisMtFts1a als Fusionsprotein mit N-terminaler 6xHistidinsequenz wurde der Vektor *pET28a* (Novagen) verwendet. Für HisMtFtsZ1 wurde die gesamte kodierende Sequenz (1.257 bp) verwendet, für HisMtFts1a die kodierende Sequenz (1.098 bp) ohne die vom Programm ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) vorhergesagte Plastidensignalsequenz. Die DNA wurde unter Verwendung von Primern zur Anfügen von BamHI/XhoI-Schnittstellen (siehe Tabelle 2.9) durch 35 PCR-Zyklen amplifiziert. Als Matrize diente die *MtftsZ1*-Sequenz in *pGEM<sup>®</sup> T Easy* (siehe Abschnitt 2.2.13.1). Das PCR-Produkt wurde nach Agarosegelelektrophorese und Elution in *pGEM<sup>®</sup> T Easy* kloniert und das Plasmid in *E. coli DH5 $\alpha$*  vermehrt. Das *pGEM<sup>®</sup> T Easy*-Plasmid und der *pET28a* Vektor wurden anschließend mit BamHI/XhoI verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Gelelution fand die Ligation der Fragmente statt.

**Tabelle 2.9** Sequenzen der Primer für die Klonierung von MtFtsZ1 und MtFtsZ1a. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte kennzeichnen die neu eingefügten BamHI bzw. XhoI-Schnittstellen.

<b>HisMtFtsZ1</b>	Vorwärtsprimer (BamHI): 5'-CGT <u>GGATCCT</u> GTATGGTTACTACGCTTCTTCC-3' Rückwärtsprimer (XhoI):5'-CAGCTCGAGTAGTACCAACTAAAAAAGAGCTTTTCG-3'
<b>HisMtFtsZ1a</b>	Vorwärtsprimer (BamHI): 5'-CGT <u>GGATCCT</u> TGTTAGCTTATGTTGATAACGCTAAG-3' Rückwärtsprimer (XhoI): 5'-CAGCTCGAGTAGTACCAACTAAAAAAGAGCTTTTCG-3'

Der pET28a-Vektor mit entsprechender FtsZ-Sequenz wurde ebenfalls in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und vermehrt. Anschließend wurden die Expressionsstämme *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL und BL21-CodonPlus-RP mit diesem Plasmid transformiert. Diese Stämme besitzen ein zusätzliches Plasmid zur Ergänzung seltener tRNAs (RP: für Arginin und Prolin; RIL: für Arginin und Isoleucin). Wegen etwas höherer Expressionsraten wurde für weitere Untersuchungen der Stamm BL21-CodonPlus-RP eingesetzt.

#### 2.2.13.5 Expression von HisMtFtsZ1 und HisMtFtsZ1a als Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies)

Die löslichen Proteinmengen nach Inkubation der Expressionsstämme bei 37 °C waren sehr gering. Das für die Immunisierung zur Produktion von Antikörpern benötigte Protein wurde deshalb durch Überexpression von unlöslichem Protein in Inclusion Bodies (IB) gewonnen.

Vorkultur: Als Vorkultur wurde eine Kolonie von der Agarplatte in LB mit 1 % Glucose, 50  $\mu$ g/ml Chloramphenicol und 50  $\mu$ g/ml Kanamycin über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Chloramphenicol diente zur Selektion der Expressionsstämme mit zusätzlichem Plasmid für seltene tRNAs, Kanamycin wurde als Selektionsmarker für das pET28a Plasmid eingesetzt. Der Zusatz von Glucose sollte die Expression des möglicherweise schädlichen Proteins unterdrücken (Novagen, 2002).

Expression: Mit der Vorkultur wurde LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika angeimpft. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet und fand bei 37 °C über 7 bis 14 Stunden statt. Die Bakterienkultur wurde wie in den Abschnitten 2.2.8.2 und 2.2.8.3 beschrieben weiterbehandelt.

#### 2.2.13.6 Produktion von löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a-Protein

Lösliches rekombinantes HisMtFtsZ1a-Protein (ohne putative Signalsequenz) wurde 9 bis 14 Stunden bei 30 °C durch Induktion mit 1 mM IPTG produziert. Die Vorbehandlung entsprach den in Abschnitt 2.2.13.3 beschriebenen Bedingungen. Anschließend wurde die Bakterienkultur wie in Abschnitt 2.2.8.1 beschrieben weiterbehandelt. Die Produktion von löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1-Protein (einschließlich putativer Signalsequenz) war nicht möglich.

### 2.2.14 Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Ni-NTA Zentrifugationssäulchen

#### 2.2.14.1 Aufreinigung des unlöslichen rekombinanten Proteins unter denaturierenden Bedingungen

HisMtFtsZ1 und HisMtFtsZ1a wurden nach Isolierung von Inclusion Bodies (IB) (siehe Abschnitt 2.2.8.3) nach Anweisung im QIAexpressionist (Qiagen) über Bindung der 6xHistidinsequenz an Ni-NTA Zentrifugationssäulchen (Qiagen) gereinigt. Die verwendeten Puffer enthielten 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl und 8 M Harnstoff. Jedem Beladungsschritt (600  $\mu$ l) mit den entsprechenden Lösungen (600  $\mu$ l) folgte eine Zentrifugation von 2 min bei 700 g. Vor dem Auftragen der Proteinlösungen wurden die Säulchen mit Extraktionspuffer (pH 8) äquilibriert. Die Proteinlösungen wurden in mehreren Fraktionen auf

die Säulchen aufgetragen. Durch ein bis zwei Waschschriffe bei pH 6,3 und einem Waschschriff bei pH 5,9 wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution fand mit 2 x 200 µl Elutionspuffer (pH 4,5) statt.

#### *2.2.14.2 Aufreinigung des löslichen rekombinanten Proteins unter nativen Bedingungen*

HisMtFtsZ1a (ohne putative Signalsequenz) wurde nach der Isolierung des löslichen Proteins (Abschnitt 2.2.8.1) mit Extraktionspuffer 2 (50 mM HEPES (pH 8.0); 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) über Ni-NTA-Zentrifugationssäulchen (Qiagen) gereinigt. Jedem Beladungsschriff mit den entsprechenden Lösungen (600 µl) folgte eine Zentrifugation von 2 bis 10 min bei 700 g bis 2.000 g. Vor dem Auftragen der Proteinlösung wurden die Säulchen mit Extraktionspuffer 2 äquibriert. Die Säulchen wurden mehrmals mit Proteinlösung beladen. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine mit zwei bis drei Fraktionen Waschpuffer (mit 20 mM Imidazol) entfernt. Die Elution fand mit 2 mal 200 µl Elutionspuffer (250 mM Imidazol) statt.

### **2.2.15 Aktivitätstests mit löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a**

#### *2.2.15.1 GTPase-Assay*

Die GTPase-Aktivität von HisMtFtsZ1a wurde durch HPLC-Bestimmung des entstehenden GDP nachgewiesen. Durch Kochromatographie mit bekannten Substanzen wurden entstehende Signale identifiziert. Zunächst fand eine Detektion über Maxplot von 200 bis 400 nm statt, nach Aufnahme eines Absorptionsspektrums wurde im Bereich des Maximums bei 256 nm gemessen. Jeder HPLC-Lauf dauerte 35 Minuten.

Der nachfolgend beschriebene Standardtest wurde mit 2 µM HisMtFtsZ1a (0,083 mg/ml) in Testpuffer [100 mM KCl; 50 mM HEPES (pH 7,5); 5 mM Mg<sup>2+</sup>] durchgeführt. Die Reaktion wurde in 100 µl-Ansätzen durch Zugabe von 200 µM GTP gestartet und fand bei 37 °C statt. Es folgte eine 10 min dauernde Hitzeinaktivierung bei 95 °C und 10 min Zentrifugation bei 20.800 g. Der Überstand wurde in HPLC-Probengefäße gefüllt. Bis zur Probenaufgabe in die HPLC wurden die Proben auf Eis gelagert.

Die HPLC-Trennung erfolgte durch einen Gradienten von Laufmittel A [100 mM Phosphatpuffer (pH 5), eingestellt mit NaOH] und Laufmittel B (Acetonitril) über eine RP18-Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min. In Tabelle 2.10 ist der verwendete Gradient angegeben. Die Detektion fand durch einen PDA (Photodiodenarraydetektor) im Absorptionsmaximum von GTP und GDP bei 256 nm statt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen von je 10 µl Probe durchgeführt. Eine Quantifizierung erfolgte über die Peakflächen nach Eichung mit sechs verschiedenen GTP-Konzentrationen von 10 µM bis 400 µM. Für diese Konzentrationen ergab sich eine lineare Abhängigkeit mit der Gleichung  $c_{\text{GTP}} [\mu\text{M}] = 1,247 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Fläche} \cdot [\mu\text{V} \cdot \text{s}]$  mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,9995$ . Die Eichwerte sind in Tabelle 2.11 dargestellt. Aufgrund des gleichen Chromophors war die Eichung sowohl für die GDP- als auch für die GTP-Bestimmung gültig.

**Tabelle 2.10** HPLC-Gradient für den Nachweis der GTPase-Aktivität von HisMtFtsZ1a

Zeit [min]	Elutionsmittel A [100 mM Phosphatpuffer (pH 5)]	Elutionsmittel B (Acetonitril)
0	100 %	0 %
20	85 %	15 %
21	20 %	80 %
24	20 %	80 %
25	100 %	0 %
35	100 %	0 %

**Tabelle 2.11** Eichung der GDP-Konzentration über die Peakflächen

GTP-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	$\emptyset$ Fläche [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	$\pm$ Standardabweichung
10	78.626	10.927
25	181.521	2.904
50	375.366	5.862
100	759.281	3.436
200	1.591.927	12.600
400	3.226.708	3.453

### 2.2.15.2 TEM-Analyse der Filamentbildung (Selfassembly) von HisMtFtsZ1a

Die Untersuchung der Fähigkeit von HisMtFtsZ1a (ohne putative Plastidensignalsequenz) zur Bildung von Protofilamenten in Abhängigkeit von GTP und  $\text{Mg}^{2+}$  wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Hause, Biozentrum Halle (Martin-Luther-Universität), untersucht. Das Assay wurde in Anlehnung an entsprechende Versuche mit bakteriellem FtsZ (Mukherjee und Lutkenhaus, 1998) durchgeführt. Die Bildaufnahme fand über die Kamera Proscan Frametransfer mit dem Transmissionselektronenmikroskop LEO 900 statt.

#### Selfassembly-Assay

100  $\mu\text{l}$ -Ansätze mit 7,3  $\mu\text{M}$  (0,3 mg/ml) HisMtFtsZ1a wurden über 30 min bei 37 °C in Testpuffer [100 mM KCl, 50 mM HEPES (pH 7,5)] inkubiert. Dabei wurden folgende Zusätze verwendet:

- 1) 1 mM GTP; 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$
- 2) 1 mM GTP; 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ; 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$
- 3) 1 mM GTP; ohne  $\text{Mg}^{2+}$
- 4) 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ; ohne GTP
- 5) ohne  $\text{Mg}^{2+}$ ; ohne GTP

Je 8  $\mu\text{l}$  Probe wurden auf Formvar-beschichtete Kupfernetze (Grids) aufgetragen. Nach 3 min Inkubation bei RT wurde die Flüssigkeit durch Filterpapier entfernt und das Grid 30 s getrocknet. Nach dreimaligem Waschen in  $\text{H}_2\text{O}$  wurde das Grid zur Negativkontrastierung 2 min mit 4-prozentiger Phosphor-Wolfram-Säure behandelt und nach Entfernen der Flüssigkeit 3 Stunden bei 37 °C getrocknet. Anschließend fand die elektronenmikroskopische Untersuchung statt.

## **2.2.16 Herstellung und Test polyklonaler Antiseren gegen MtFtsZ1**

### *2.2.16.1 Immunisierung von Kaninchen*

Mit dem gereinigten HisMtFtsZ1-Protein (siehe Abschnitt 2.2.14.1) wurde eine PAGE durchgeführt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und die betreffenden Gelbereiche ausgeschnitten. Für jede Immunisierung wurde ein Gelstück mit ca. 70 µg Protein verwendet. Durch Eurogentec wurde die Immunisierung von jeweils zwei Tieren (SA3084 und 3085) mit insgesamt vier Immunisierungen (Seraing, Belgien) über einen Zeitraum von drei Monaten durchgeführt. Die Untersuchung der gelieferten Testseren (kleine Blutentnahme, große Blutentnahme und Endblutentnahme) fand durch Western Blot mit rekombinantem HisMtFtsZ1a-Protein und Detektion über Alkalische Phosphatase-Reaktion statt (siehe Abschnitt 2.2.12.3).

### *2.2.16.2 Immunisierung von Meerschweinchen*

Rekombinantes HisMtFtsZ1a-Protein (ohne putative Signalsequenz) wurde als IB isoliert und gemäß Abschnitt 2.2.14.1 affinitätsgereinigt. Für die Immunisierung von zwei Meerschweinchen (SA271 und SA272) wurden PAGE-Gelstücke mit jeweils ca. 25 µg Protein verwendet. Die viermalige Immunisierung wurde ebenfalls durch Eurogentec (Seraing, Belgien) über einen Zeitraum von drei Monaten durchgeführt. Die Untersuchung der gelieferten Testseren (kleine Blutentnahme, große Blutentnahme und Endblutentnahme) fand durch Western Blot mit rekombinantem HisMtFtsZ1a-Protein und Detektion über Alkalische Phosphatase-Reaktion statt (siehe Abschnitt 2.2.12.3).

## **2.2.17 Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums**

### *2.2.17.1 Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums über Affinitätssäulchen*

Die Affinitätsreinigung über Ni-NTA Spinsäulchen mit gebundenem HisMtFtsZ1a wurde nach einer Methode in der Dissertation von Fester (1996), durchgeführt. Nach dem Äquilibrieren mit denaturierendem Harnstoffpuffer (pH 8), nach QIAexpressionist, Qiagen und 4 min Zentrifugation bei 650 g wurden die Säulchen mit 500 µl HisMtFtsZ1a (500 bis 600 µg) aus solubilisierten IB von HisMtFtsZ1a (ohne putative Plastidensequenz) beladen und 10 min bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurde 2 mal bei pH 6,3 gewaschen und zur Entfernung des denaturierenden Puffers 2 mal mit einem nativen Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl] gespült. Nach jedem Waschschrift wurde 4 min bei 650 g zentrifugiert. Die Säulen wurden dann mit 600 µl Antiserum beladen und 10 min bei 200 g zentrifugiert. Danach wurden die gebundenen Antikörper 5 mal mit dem nativen Puffer gewaschen, gefolgt von einer Zentrifugation von jeweils 4 min bei 650 g. Die Elution fand nach Zugabe von 4 x 600 µl 4 M MgCl<sub>2</sub> und anschließende Zentrifugation (10 min bei 200 g) statt. Schließlich wurden die gereinigten Antikörper durch Zentrifugation bei 4 °C und 5.000 g in Centricon YM-30 (Millipore) eingeeengt und in PBS umgepuffert.

### *2.2.17.2 Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums über einen Affinitätsblot*

Die Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums durch PVDF-Membran gebundenes Antigen wurde nach der Dissertation von Hans (2003) durchgeführt. Es wurden ca. 200 µg IB auf einem präparativen SDS-PAG aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Blot wurde mit Coomassieblau gefärbt [1 Stunde in 0,025 % (m/V) Coomassieblau CBS-R250 in 40 % (V/V) Methanol] und anschließend der gefärbte Streifen ausgeschnitten und 2 x 30 min in 50 % Methanol (V/V)/ 10 % (V/V) Eisessig entfärbt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Streifen eine Stunde mit 5 % (m/V) Trockenmilchpulver in TTBS inkubiert und 2 mal mit TTBS gespült. Über Nacht wurde die Membran dann mit 1,8 ml Antiserum bei 4 °C geschwenkt.

Nach vier Waschschritten mit TTBS wurden die spezifisch gebundenen Antikörper durch Inkubation mit 100 mM Glycin (pH 2,5) eluiert. Das Eluat wurde sofort durch Zugabe von 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert, um eine Denaturierung der Antikörper zu vermeiden. Eine Konzentrierung fand durch Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C über Microcon YM-30 statt.

## 2.2.18 *In vivo*-Untersuchung von GFP-markierten Organellen

### 2.2.18.1 Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop und Fluoreszenzstereomikroskop

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von GFP-Markierungen wurde hauptsächlich das Gerät AxioskopII (Carl Zeiss, Jena) eingesetzt. Die Daten sind in Tabelle 2.12 angegeben.

**Tabelle 2.12** Einstellung von AxioskopII zur Detektion von GFP. Die Zahlen geben die Wellenlänge in nm an.

Anregung	Strahlenteiler	Sperrfilter
BP 450-490	FT 510	BP 515-565 (GFP)
BP 450-490	FT 510	LP 520

Die Bildaufnahme erfolgte über die Kamera Meteor2MC und das Programm AxioVision 4.0. Mit Hilfe des Stereomikroskops Leica MZ FLIII wurde die GFP-Fluoreszenz wurzeltransformierter *M. truncatula*-Pflanzen in quadratischen Petrischalen untersucht. Die Anregung fand mit Blaulicht von 425-460 nm und die Visualisierung mit einem Sperrfilter LP 480 nm statt.

### 2.2.18.2 CLSM-Untersuchungen

Die Wurzeln von ertGFP-*Nicotiana benthamina* wurden 6-7 Wochen, die Wurzeln der ptGFP- und mtGFP-transformierten Wurzeln von *M. truncatula* 6-14 Wochen nach der Inokulation mit *G. mosseae* oder *G. intraradices* analysiert. Im Gegensatz zu Tabakwurzeln, deren Wurzelstücke wegen höherer Transparenz intakt untersucht werden konnten, mussten von *M. truncatula*-Wurzeln (auch von der Wurzelkultur) Median- oder Querschnitte angefertigt werden, um Strukturen der inneren Rindenbereiche sichtbar zu machen.

Für Medianschnitte wurden ca. 3-4 mm lange Wurzelstücke mit einer Rasierklinge halbiert. Querschnitte wurden entweder mit der Rasierklinge oder nach Fixierung (siehe Abschnitt 2.2.18.1) und Einbettung in 15 % Gelatine/PBS mit dem Vibratom angefertigt.

Für die Aufnahmen wurde der Single Track-Modus verwendet. Mit dem CLSM wird nur die Intensität, nicht aber Fluoreszenzfarbe detektiert. Den Signalen wurden deshalb entsprechende Falschfarben zugeordnet. Die Verarbeitung der Bilder erfolgte mit der Zeiss LSM 510 Meta-Software sowie dem LSMIX-Programm (Zeiss). 3D-Projektionen wurden von z-Serien einzelner optischer Schnitte berechnet.

Die Untersuchung von GFP-markierten Organellen erfolgte mit den in Wasser suspendierten Wurzelstücken nach Argonlaser-Anregung mit 488 nm bei 30 % Intensität. GFP-Signale wurden durch den Breitbandfilter BP505-530 detektiert und der Falschfarbe Grün zugeordnet. Gleichzeitig wurde ein Durchlichtbild erstellt, um auch nicht fluoreszierende Strukturen sichtbar zu machen. Zur Detektion von gelblicher Autofluoreszenz (Darstellung in der Falschfarbe Rot) fand eine Detektion mit dem Langpassfilter LP 560 statt.

## 2.2.19 Immunlokalisierung

### 2.2.19.1 Fixierung und Einbettung des Materials

Frisch geerntetes Pflanzenmaterial von *M. truncatula* wurde kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen, sofort in Fixativ {3 % [m/V] Paraformaldehyd und 0,1 % [V/V] Triton X-100 in PBS [(135 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (pH 7,0))} überführt und in kleine Stücke geschnitten. Zur schnelleren Fixierung von FtsZ wurde auch folgender MSB-Fixationspuffer (MSB: Mikrotubuli stabilisierender Puffer) verwendet: 100 mM PIPES (pH 6,9); 10 mM EDTA; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 4 % (m/V) Paraformaldehyd; 10 % (V/V) DMSO und 0,1 % Triton X-100.

Das Material wurde danach ca. 15 min im Exsikkator vakuumfiltriert. Anschließend wurden die Proben zwei Stunden bei RT fixiert. Nach zwei Waschschrritten mit PBS (jeweils 15 min) wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 30 min 10 % (V/V), 30 % (V/V), 50 % (V/V), 70 % (V/V), 90 % (V/V) und 100 % (V/V) Ethanol) bei RT dehydratisiert. Alle weiteren Schritte wurden in einem Inkubationsschrank bei 55 °C durchgeführt. Nach 30 min Inkubation in 100 % (V/V) Ethanol wurde mit PEG infiltriert. Für 2 bis 5 µm-Schnitte wurde PEG 1.500/PEG 4.000 im Verhältnis 2:1 (m/m) verwendet, für 20 µm-Schnitte PEG 1.500. Die Behandlung wurde wie folgt durchgeführt:

PEG:Ethanol	1:3	1	Stunde
PEG:Ethanol	1:1	1	Stunde
PEG:Ethanol	3:1	1,5	Stunden
reines PEG		2	Stunden.

Das Material wurde anschließend in Einbettungsformen überführt und in PEG eingebettet. Einbettungen in PEG wurden bei 4 °C gelagert.

### 2.2.19.2 PEG-Schnitte und Immunmarkierung

Am Rotationsmikrotom wurden von den eingebetteten Proben 2 bis 5 µm (Blätter, Wurzelspitzen) oder 20 µm (Wurzeln) dicke Schnitte angefertigt. 20 µm-Schnitte von Wurzeln wurden in Zellkultureinsätze mit 8 µm Polycarbonatnetz (Nunc, Wiesbaden) überführt und in den Vertiefungen von Zellkulturplatten (Greiner, Frickenhausen) behandelt. Ein Zellwandverdau und die Blockierung freier Aldehydgruppen und unspezifischer Bindungsstellen wurde wie in der Dissertation von Hans (2003) durchgeführt.

Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper in 5 % (m/V) BSA/PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % (m/V) BSA/PBS erfolgte die Färbung des Mykorrhizapilzes mit 0,05 mg/ml WGA-TRITC (Molecular Probes) 30 min bei RT (rot fluoreszierende Markierung des Pilzes durch Bindung an N-Acetylglucosamin) in PBS mit 0,1 % (m/V) BSA nach Hans (2003) und Harrison et al. (2002). Dieser und alle folgenden Schritte wurden unter Lichtabschluss durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nach drei Waschschrritten erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 0,1 % (m/V) BSA/PBS für 60 min bei 37 °C. Nach dieser Behandlung wurde wieder 3 mal in 0,1 % (m/V) BSA/PBS gewaschen, die Schnitte auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger überführt und mit Citifluor in PBS (Plano, Wetzlar) eingedeckelt.

2 bis 5-µm Schnitte wurden mittels 45-prozentiger PEG 6.000-Lösung (hängender Tropfen) auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach dem Herauslösen des PEG (10 min in PBS) wurden Aldehydgruppen 5 min mit 0,1 M NH<sub>4</sub>Cl blockiert. Anschließend wurde 5 min in PBS gespült. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min mit 5 % BSA in PBS blockiert. Bei 4 °C erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem 1. Antikörper in 5 % BSA/PBS in einer feuchten Kammer. Nach anschließendem viermaligen Waschen mit 0,1 % BSA/PBS (je 10 min) wurden die Schnitte mit dem 2. Antikörper 60 min bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Eindeckelung mit Citifluor in Glycerol (Plano, Wetzlar) fand nach weiteren 4 Waschschrritten mit 0,1 % BSA/PBS statt.

Für die Immunlokalisierung verwendete Antikörper sind in Tabelle 2.13 aufgeführt. Den detektierten Signalen wurden unterschiedliche Falschfarben zugeordnet. Aufnahmen der verschiedenen Kanäle wurden in einem Überlagerungsbild kombiniert.

**Tabelle 2.13** Für die Immunlokalisierung eingesetzte Antikörper und die verwendeten Verdünnungen.

<b>Primärantikörper</b>	Kaninchen:Anti-HisMtFtsZ1 (Eurogentec) nach Reinigung über eine Affinitätssäule: 1:500
	Meerschweinchen:Anti-HisMtFtsZ1a (Eurogentec) nach Reinigung über einen Affinitätsblot: 1:500
	Maus:Anti-GFP IgG2 JL-8 (BD Biosciences Clontech): 1:500
<b>Sekundärantikörper (aus Ziege)</b>	Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 350 (Invitrogen): 1:500
	Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (Invitrogen): 1:500
	Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 633 (Invitrogen): 1:250
	Anti-Meerschweinchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (Invitrogen): 1:500
	Anti-Maus IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (Invitrogen): 1:500

### 2.2.19.3 Analyse der Schnitte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop und Bildverarbeitung

Die immunmarkierten und gefärbten Schnitte wurden an dem Gerät Zeiss LSM 510 Meta untersucht. Zur Bildaufnahme wurde der Multitrack-Modus mit den in Tabelle 2.14 angegebenen Einstellungen verwendet. 3D-Projektionen wurden von z-Serien einzelner optischer Schnitte berechnet. Die Verarbeitung der Bilder erfolgte mit der Zeiss LSM 510 Meta-Software sowie dem LSMIX-Programm (Zeiss). Eine weitere Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Corel Photo-Paint durchgeführt.

**Tabelle 2.14** Kanaleinstellungen am LSM 510 Meta bei der Auswertung der immunmarkierten und gefärbten Schnitte. LP = Langpassfilter; BP = Bandpassfilter

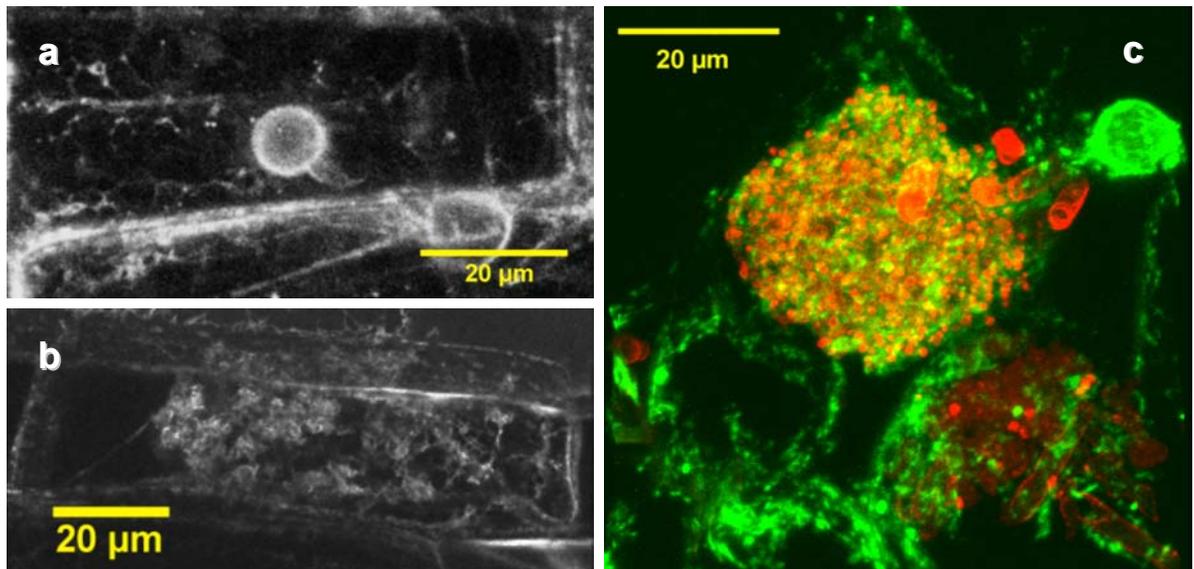
<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Exzitation</b>	<b>Emission</b>
Alexa Fluor 350	351 nm (UV-Laser Enterprise)	BP385-475
Alexa Fluor 488	488 nm (Argonlaser)	BP505-530
TRITC	543 nm (Helium-Neon-Laser 1)	BP560-615 oder LP560
Alexa Fluor 633	633 nm (Helium-Neon-Laser 2)	LP650

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Organellenproliferation in kolonisierten Wurzelzellen

##### 3.1.1 Proliferation des endoplasmatischen Retikulums in kolonisierten Wurzelrindenzellen von ertGFP-*Nicotiana benthamiana*

Untersuchungen der Wurzeln von ertGFP-*Nicotiana benthamiana* mit dem CLSM zeigten ER-Strukturen in Kontrollwurzeln im Bereich des Zellkerns und in der Nähe der Zellplatten. In diesen Bereichen zogen sich spinnwebartige Strukturen durch die gesamte Zelle (Abbildung 3.1 a). In mykorrhizierten Wurzeln zeigte sich um die Arbuskeläste eine starke Proliferation des ER (Abbildung 3.1 b und c).



**Abbildung 3.1** CLSM-Aufnahmen von ertGFP-*Nicotiana benthamiana*-Wurzeln

In den bei a) und b) gezeigten *in vivo*-Aufnahmen sind ER-Strukturen als hellere Bereiche dargestellt.

a) Längsschnitt durch eine Rindenzelle in Kontrollwurzeln; Projektion aus zehn optischen Schnitten

b) Längsschnitt einer mit *Glomus intraradices* kolonisierten Rindenzelle; Projektion aus sechs optischen Schnitten

c) Querschnitt durch eine kolonisierte Rindenzelle (*G. intraradices*; PEG-Schnitt), Projektion aus 40 optischen Schnitten: Die ER-Strukturen (Falschfarbe Grün) wurden durch Immunmarkierung des GFP sichtbar gemacht: 1. AK: Maus: $\alpha$ -GFP AK (1:500); 2. AK: Ziege: $\alpha$ -Maus IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (1:500). Der Pilz (Falschfarbe Rot) wurde mit WGA-TRITC markiert. Die Überlagerung der Falschfarben Rot und Grün ergibt Gelb.

##### 3.1.2 Transformationsversuche zur GFP-Markierung von Plastiden und Mitochondrien in *Medicago truncatula*

###### 3.1.2.1 Keimlingsinfiltration

Die Keimlingsinfiltration nach Trieu et al. (2000) zur GFP-Markierung von Mitochondrien und Plastiden (siehe Abschnitt 2.1.5 und 2.2.4.3) ergab nach Untersuchung von jeweils ca. 300 Pflanzen der F1-Generation keine positiven Transformanten. Eine Verlängerung der Einwirkung des Vakuums oder die zusätzliche Verletzung der Keimlinge führte ebenfalls nicht zu transformierten Pflanzen mit grün fluoreszierenden Organellen.

### 3.1.2.2 Wurzeltransformation

Wurzeln von *M. truncatula* wurden zur Markierung der Plastiden oder Mitochondrien nach der Methode von Boisson-Dernier et al. (2001) (siehe Abschnitt 2.2.4.4) transformiert. In den ersten Versuchen wurde dem Fahraeus-Agar im Falle der Transformation mit dem ptGFP-Konstrukt 25 mg/l Kanamycin zugesetzt. In vielen Fällen führte dies aber zum schnellen Absterben der Keimlinge, so dass in den weiteren Versuchen auf eine Antibiotikaselektion verzichtet wurde.

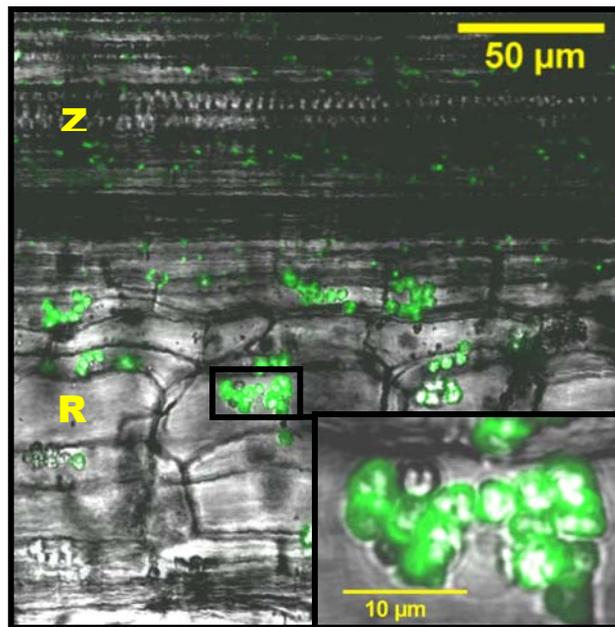
Nach ca. einer Woche bildeten sich im Bereich der Schnittstelle neue Wurzeln, zum Teil mit einer erhöhten Anzahl an Wurzelhaaren. Durch die Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Blaulichtanregung) zeigte sich ein Transformationserfolg sowohl für das ptGFP-Konstrukt als auch für das mtGFP-Konstrukt durch eine grüne Fluoreszenz der Organellen. Die Transformationsrate schwankte jedoch stark und betrug durchschnittlich 15 bis 30 %. Auch war das Ausmaß der erfolgreich transformierten Wurzelbereiche sehr unterschiedlich. In wenigen Fällen waren die Organellen des gesamten Wurzelsystems mit GFP markiert. Meistens wurde eine GFP-Markierung nur in einigen Wurzeln oder in kleinen Wurzelbereichen in der Nähe der Bakterienauftragung gefunden. Die Intensität der grünen Fluoreszenz variierte ebenfalls.

#### 3.1.2.2.1 Anlegen einer mykorrhizierten Wurzelkultur von *M. truncatula* mit GFP-markierten Plastiden

Mit dem Ziel, Plastiden in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* zu untersuchen, wurde eine ptGFP-Wurzelkultur nach der Methode von Boisson-Dernier et al. (2001) angelegt. Im Gegensatz zu Wurzeln von ptGFP-Tabak (Fester et al., 2001) waren Wurzeln von transformierten *M. truncatula*-Pflanzen nicht transparent und mussten deshalb für eine mikroskopische Untersuchung längs oder quer geschnitten werden. Die Analyse mit dem CLSM von längs halbierten älteren Wurzelstückchen (12 bis 14 Wochen Kultivierung ohne Medienwechsel) zeigte eine auffällige Vergrößerung der Plastiden in der Wurzelrinde, verglichen mit wesentlich kleineren Plastiden im Zentralzylinder (Abbildung 3.2). Damit zeigte das Erscheinungsbild einen starken Unterschied zu den ptGFP-transformierten Wurzeln der chimären Pflanzen (transformierte Wurzeln; nicht transformierter Spross; siehe Abschnitt 3.1.2.4; Abbildung 3.5 a und c).

In jüngeren Wurzelkulturen (4 Wochen nach der Umsetzung auf frisches Medium) hatten die Plastiden der Wurzelrinde eine deutlich geringere Größe. Verglichen mit Plastiden im Zentralzylinder waren dort Plastiden in der Wurzelrinde nur geringfügig größer. Generell war die Anzahl an Plastiden im Zentralzylinder der Wurzelkultur gegenüber dem Zentralzylinder von chimären Pflanzen deutlich geringer, wie durch einen Vergleich von Abbildung 3.2 und 3.5 a und c festgestellt werden kann.

Als Ausgangspunkt für einen Mykorrhizierungsversuch der beschriebenen Wurzelkultur diente eine mit *Glomus intraradices* mykorrhizierte Wurzelkultur von *Daucus carota* (Chabot et al., 1992) (siehe Abschnitt 2.2.4.5). Nach einer Woche Kultivierung eines Wurzelstücks auf Agar mit Sporen und Hyphen von *G. intraradices* fand in zwei Fällen eine Kontaktaufnahme des Pilzes mit der Wurzel statt. Nach dem Umsetzen dieser Wurzelstücke auf frischen M-Agar kam es in einem Fall in der Umgebung zur Ausbildung von Hyphen und Sporen, ein Hinweis auf die Kolonisierung der Wurzel mit dem obligat biotrophen Pilz. Eine Subkultivierung mykorrhizierter Wurzelstücke war jedoch nicht möglich. Während die Wurzeln ein normales Wachstum zeigten, fand nach erneutem Umsetzen kein Wachstum von Hyphen und keine Ausbildung von Sporen statt. Nach Anfärbung des kolonisierten Wurzelstücks mit Trypanblau wurden nur wenige Arbuskeln in einem sehr kleinen Wurzelbereich sichtbar. Ein Kolonisierungsbeginn hatte offensichtlich stattgefunden, eine weiterführende Besiedlung der Wurzel und eine Vermehrung des Pilzes war hingegen nicht möglich.



**Abbildung 3.2** *In vivo*-CLSM-Aufnahme eines längs geschnittenen Stücks einer älteren Wurzelkultur von *M. truncatula* (12 Wochen alt) mit GFP-markierten Plastiden (Falschfarbe Grün) kombiniert mit dem Durchlichtbild. Das eingefügte Kästchen zeigt eine Vergrößerung des markierten Ausschnittes. R = Wurzelrinde; Z = Zentralzylinder

#### 3.1.2.2.2 Mykorrhizierung von wurzeltransformierten *M. truncatula*-Pflanzen

Die Kultivierung der chimären Pflanzen (transformierte Wurzel, nichttransformierter Spross) im Gewächshaus erforderte die Anpassung an eine niedrigere Luftfeuchtigkeit (siehe Abschnitt 2.2.4.6). Danach zeigten diese Pflanzen ein normales Wachstum. Der Spross war dabei nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, während die Wurzeln teilweise mit einer starken Ausbildung kürzerer Seitenwurzeln reagierten. Nach Inokulation mit *Glomus mosseae* oder *G. intraradices* fand eine erfolgreiche Mykorrhizierung der chimären Pflanzen statt.

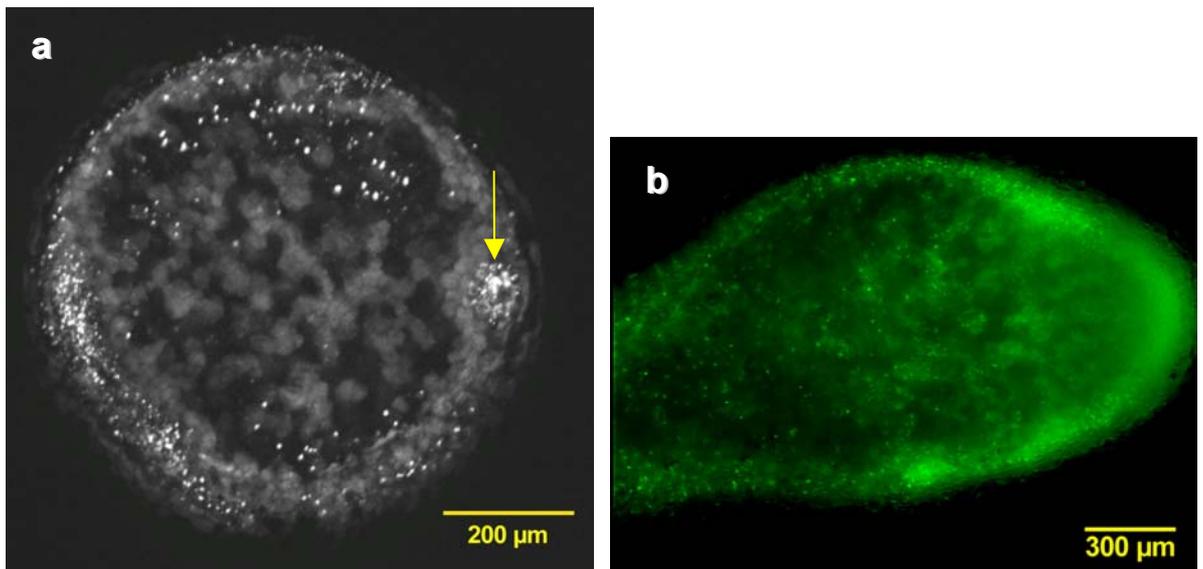
#### 3.1.3 Strukturen von GFP-markierten Mitochondrien und Plastiden in Wurzelknöllchen von *M. truncatula* Wurzeln

GFP-markierte Mitochondrien und Plastiden wurden nicht nur in mykorrhizierten Wurzeln, sondern zu Vergleichszwecken auch in Wurzelknöllchen von *M. truncatula* untersucht. Auf Fahraeus-Medium bildeten mit *Sinorhizobium meliloti* inokulierte chimäre Pflanzen Wurzelknöllchen aus, aber nur in Wurzelbereichen, die nicht vom Agar umgeben waren. Nachdem eine Möglichkeit zur Kultivierung chimärer Pflanzen auf LecaTon im Gewächshaus gefunden worden war, wurden die Wurzeln dieser Pflanzen mit *S. meliloti* behandelt (siehe Abschnitt 2.2.4.6).

Die meisten Mitochondrien zeigten sich als runde Organellen im äußeren Kortex und in der Umgebung der Leitgefäße (Abbildung 3.3a). In tiefer gelegenen Bereichen jüngerer Knöllchen waren Mitochondrien ebenfalls nachweisbar (Abbildung 3.3b). Eine auffällige Vermehrung der Organellen wurde jedoch nicht beobachtet.

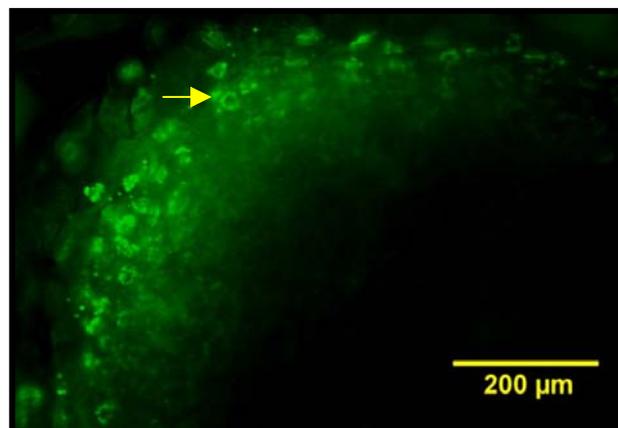
GFP-markierte Plastiden zeigten sich in Wurzelknöllchen nur im Bereich des Kortex. Nach dem Durchschneiden der Knöllchen waren in inneren Bereichen keine grün fluoreszierenden Organellen nachweisbar. Abbildung 3.4 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme

eines entsprechenden Längsschnittes. Die Plastiden im Kortex waren hauptsächlich kreisförmig angeordnet, vermutlich in der Umgebung der Zellkerne.



**Abbildung 3.3** Wurzelknöllchen von *M. truncatula* mit GFP-markierten Mitochondrien nach Inokulation mit *S. meliloti* (*in vivo*-Aufnahmen)

- a) CLSM-Projektion eines Knöllchenquerschnitts (10 optische Schnitte), die Mitochondrien sind als helle Pünktchen sichtbar; der Pfeil markiert den Bereich eines Leitbündels  
 b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Knöllchenlängsschnittes (jüngeres Stadium)



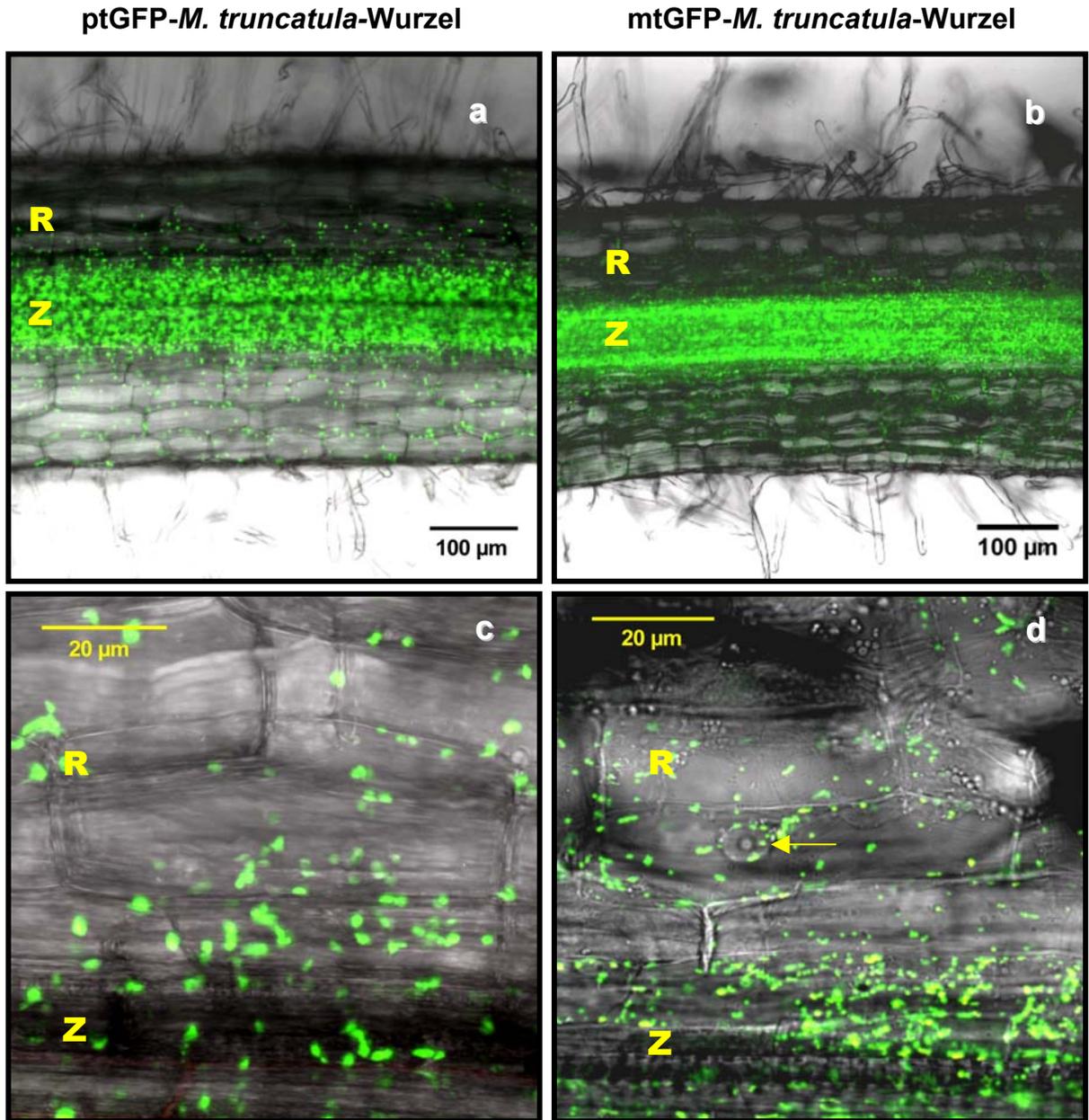
**Abbildung 3.4** Längsschnitt durch ein Wurzelknöllchen von *M. truncatula* mit GFP-markierten Plastiden nach Inokulation mit *Sinorhizobium meliloti* (*in vivo*-fluoreszenzmikroskopische Aufnahme). Mit dem Pfeil sind kreisförmig angeordnete Plastiden im Kortex markiert, die sich vermutlich um einen Zellkern angeordnet haben.

### 3.1.4 Strukturen GFP-markierter Mitochondrien und Plastiden in mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln

#### 3.1.4.1 GFP-markierte Mitochondrien und Plastiden in Kontrollwurzeln *in vivo*

Ein besonders reichliches Vorkommen GFP-markierter Plastiden und Mitochondrien zeigte sich im Zentralzylinder (Abbildung 3.5 a und b). In der Wurzelrinde waren im Vergleich dazu deutlich weniger Organellen vorhanden. Plastiden und Mitochondrien waren in der Wurzelrinde und im Zentralzylinder vergleichbar verteilt. Sie befanden sich meist verstreut im Cytoplasma oder um Zellkerne angeordnet, was durch die Kombination mit dem Durchlichtbild erkennbar wurde. Mitochondrien hatten ca. ein Drittel der Plastidengröße und traten im Vergleich zu Plastiden in einer wesentlich größeren Anzahl auf. In der Wurzelrinde zeigten

Plastiden und Mitochondrien eine eher runde Form. Dagegen konnten im Zentralzylinder und im Bereich der Wurzelspitze teilweise Ausläufer oder Verbindungen von Plastiden beobachtet werden. Auch die Mitochondrien zeigten im Zentralzylinder und der Wurzelspitze häufiger Ausläufer oder Verbindungen untereinander. In der Rinde älterer Wurzeln verringerte sich die Anzahl der Organellen stark. Gelegentlich waren dort keine fluoreszierenden Organellen mehr nachweisbar, während der Zentralzylinder noch ein reiches Vorkommen an grün fluoreszierenden Plastiden oder Mitochondrien zeigte.



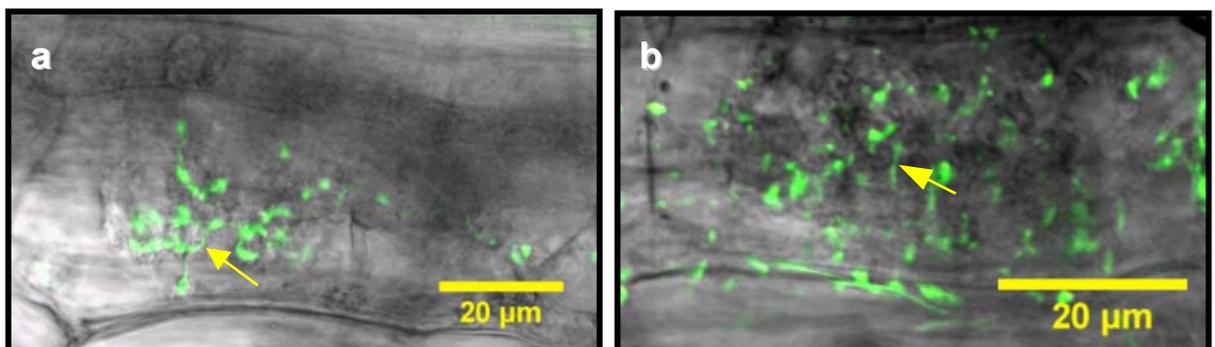
**Abbildung 3.5** CLSM-Aufnahmen von GFP-markierten Organellen in Längsschnitten transformierter *M. truncatula*-Wurzeln. Die Detektion der grünen Fluoreszenz (Falschfarbe Grün) und der gelblichen Autofluoreszenz (in diesen Bildern kaum vorhanden; Falschfarbe Rot) wurde mit dem entsprechenden Durchlichtbild kombiniert.

a) und c) Wurzel mit GFP-markierten Plastiden, c) zeigt eine CLSM-Projektion aus 13 optischen Schnitten  
 b) und d) Wurzel mit GFP-markierten Mitochondrien; der Pfeil in d) markiert einen Zellkern  
 Die unteren Bilder (c und d) zeigen jeweils eine stärkere Vergrößerung eines Ausschnitts von Wurzelrinde und Zentralzylinder. R = Wurzelrinde; Z = Zentralzylinder

### 3.1.4.2 GFP-markierte Mitochondrien und Plastiden in mykorrhizierten Wurzeln *in vivo*

Im Durchlichtbild erschienen Arbuskeln bei CLSM-Aufnahmen als lichtundurchlässige Strukturen. Kollabierende Arbuskeln, gekennzeichnet durch die Abnahme der Verästelung und eine zunehmend klumpenartige, rundliche Form (Kinden und Brown, 1976), zeigten eine gelbliche Autofluoreszenz. Die Detektion dieser Autofluoreszenz gestattete eine Unterscheidung degenerierter und intakter Arbuskeln. Längsschnitte von transformierten Wurzeln wurden wie oben beschrieben mit dem CLSM untersucht. Ein Problem bei den *in vivo* Untersuchungen war die zum Teil sehr geringe Menge an positiv transformierten Wurzeln mit entsprechender Mykorrhizierung. Außerdem konnten mit zunehmender Wurzelstärke Zellstrukturen im Durchlichtbild schlechter sichtbar gemacht werden. Junge dünne Wurzeln mit grün fluoreszierenden Organellen und einer guten Mykorrhizierung wurden nur selten angetroffen. In kolonisierten Wurzelrindenzellen mit intakten Arbuskeln zeigte sich eine starke Proliferation von Plastiden (Abbildung 3.7 a und c) und Mitochondrien (Abbildung 3.7 b und d) besonders im Bereich der Arbuskeläste, verglichen mit nichtkolonisierten Rindenzellen. Die beobachtete Vermehrung der Plastiden *in vivo* erreichte jedoch nicht die für Tabak beschriebenen Ausmaße (Fester et al., 2001). Auch konnte kein „Plastidennetzwerk“ *in vivo* beobachtet werden. Nur gelegentlich wurden Ausläufer der Plastiden mit möglichen Verbindungen untereinander sichtbar (Abbildung 3.6 a). Auch Mitochondrien zeigten teilweise Fortsätze und Verbindungen untereinander (Abbildung 3.6 b). Details dieser Strukturen konnten *in vivo* jedoch nicht untersucht werden.

Deutlich weniger Plastiden (Abbildung 3.7 e) und Mitochondrien (Abbildung 3.7 f) wurden in der Umgebung kollabierender Arbuskeln detektiert. In der Nähe abgebauter Arbuskeln waren meistens keine Organellen nachweisbar. Abbildung 3.7 e zeigt in der Mitte eine Zelle mit degenerierender Arbuskel. Plastiden sind dort nur noch im Bereich der restlichen Arbuskeläste sichtbar, haben sich aber von den kollabierten Bereichen mit höherer Autofluoreszenz bereits zurückgezogen. Rechts daneben ist eine Zelle mit einer noch intakten Arbuskel zu sehen. Abbildung 3.7 f zeigt eine im Abbau begriffene Arbuskel mit einer noch erhöhten Anzahl an Mitochondrien. Die Arbuskeln in den links daneben liegenden Zellen sind offenbar schon degeneriert, hier sind kaum noch Mitochondrien sichtbar.

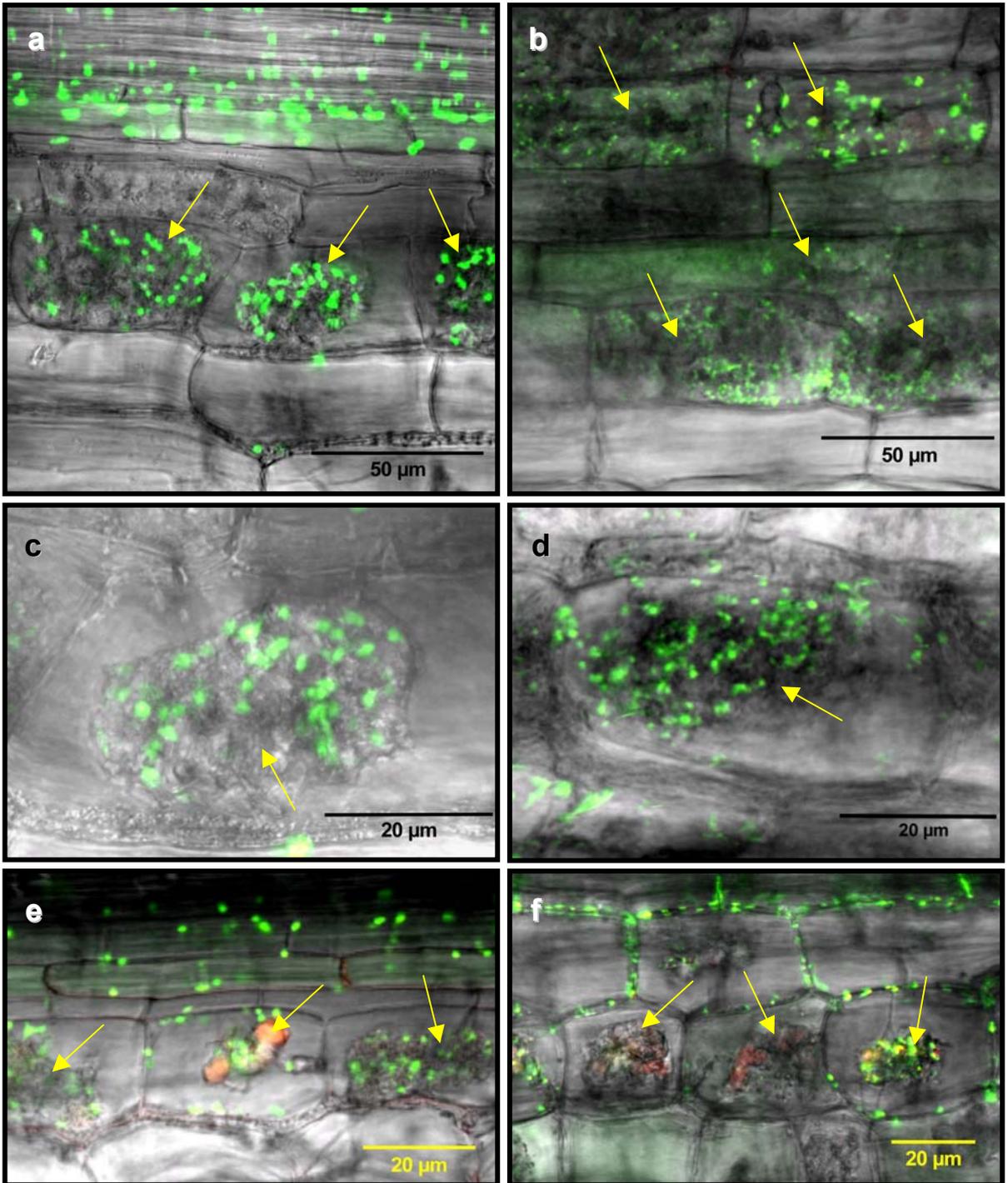


**Abbildung 3.6** *In vivo*-CLSM-Aufnahmen von GFP-markierten Organellen mit Ausläufern in Längsschnitten von mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln. Die Bilder zeigen eine Kombination aus Durchlichtbild, der Detektion grün fluoreszierender Strukturen (Falschfarbe Grün) und gelblicher Autofluoreszenz (in diesen Bildern jedoch kaum vorhanden; Falschfarbe Rot). Die Pfeile markieren Ausläufer der Organellen.

- a) Arbuskel umgeben von GFP-markierten Plastiden
- b) Arbuskel umgeben von GFP-markierten Mitochondrien

**Mykorrhizierte  
ptGFP-*M. truncatula*-Wurzeln**

**Mykorrhizierte  
mtGFP-*M. truncatula*-Wurzeln**



**Abbildung 3.7** *In vivo*-CLSM-Aufnahmen von GFP-markierten Organellen in Längsschnitten mykorrhizierter *M. truncatula* Wurzeln. Die Bilder zeigen eine Kombination aus Durchlichtbild, der Detektion grün fluoreszierender Strukturen (Falschfarbe Grün) und gelblicher Autofluoreszenz (Falschfarbe Rot). Die Überlagerung der Falschfarben Rot und Grün ergibt gelbe Signale.

a), c) und e) GFP-markierte Plastiden

b), d) und f) GFP-markierte Mitochondrien

Mehrere Wurzelrindenzellen mit jüngeren Arbuskeln sind in a) und b) gezeigt, die Vergrößerung einer solchen kolonisierten Zelle in c) und d). In e) und f) sind degenerierende Arbuskeln dargestellt, die durch eine zunehmende Autofluoreszenz gekennzeichnet sind. Die Pfeile markieren Arbuskelstrukturen.

## 3.2 Untersuchung plastidenrelevanter Transkriptmengen in mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln durch Real-Time RT-PCR

Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt, proliferieren die Plastiden stark in der Umgebung von intakten Arbuskeln in mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln. Dies deutet möglicherweise auch auf eine Aktivierung plastidenrelevanter Gene hin. Mit Hilfe der Real-Time RT-PCR (siehe Abschnitt 2.2.6.1) wurde versucht, einen Überblick über eine erhöhte Transkription plastidenrelevanter Gene in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* zu erhalten.

### 3.2.1 Real-Time RT-PCR: Untersuchung plastidenrelevanter Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* durch absolute Quantifizierung

Die Bestimmung plastidenrelevanter Transkriptmengen wurde zunächst durch Real-Time RT-PCR-Untersuchungen mit absoluter Quantifizierung durchgeführt und ist im Kapitel Material und Methoden, Abschnitt 2.2.6.1, beschrieben. In Tabelle 3.1 ist das Verhältnis der Kopienzahl in mykorrhizierten Wurzeln zu nichtmykorrhizierten Wurzeln angegeben. Die im Anschluss an die Amplifikation aufgenommene Schmelzpunktkurve wies meistens nur ein Maximum auf. In einigen Fällen zeigte die Schmelzpunktkurve jedoch zwei bis drei Maxima, was auf die Bildung von Primer-Dimeren hindeutete.

Diese Untersuchungen dienten als Vorversuche für die Bestimmung einer erhöhten Transkriptmenge in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula*. Plastidenrelevante Gene, deren Transkriptmenge in mykorrhizierten Wurzeln den geschilderten Versuchen zufolge mindestens vierfach erhöht war, wurden in den weiteren Experimenten durch relative Quantifizierung unter optimierten Bedingungen untersucht.

**Tabelle 3.1** Ergebnisse der Real-Time RT-PCR nach absoluter Quantifizierung der Kopienzahl in mykorrhizierten Wurzeln im Verhältnis zu Kontrollwurzeln von *M. truncatula*. Eine mindestens vierfache Erhöhung der Kopienzahl wurde fett gedruckt hervorgehoben.

Myk = 10 Wochen mit *G. mosseae* mykorrhizierte Wurzeln; Kon = 10 Wochen alte Kontrollwurzeln

Gene	Verhältnis der Kopienzahl Myk/Kon	Produkte der Schmelz- punktkurve
<b>Kernkodierte Gene für plastidäre Proteine</b>		
<b>Shikimatweg</b>		
EPSP-Synthase	1,3	1
DAHP-Synthase	2,7	1
Chorismat-Mutase1	1,7	1
<b>Stickstoffassimilation</b>		
Nitritreduktase	1,5	1
GOGAT (Glutamatsynthase)	2,3	1-2
<b>Aminosäuresynthese</b>		
Glutaminsynthetase	1,9	1-2
<b>Redoxsystem</b>		
FNR	nicht auswertbar	1-2
<b>Fettsäurebiosynthese</b>		
ACCCase	<b>6,8</b>	1-1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
Stearoyl-ACP-Desaturase	2,1	1
Omega-3-Fettsäuredesaturase	nicht auswertbar	1+ 1 Schulter

Tabelle 3.1 Fortsetzung

Gene	Verhältnis der Kopienzahl Myk/Kon	Produkte der Schmelzkurve
<b>Stärkesynthese</b>		
ADP-Glucosepyrophosphorylase	ca. 2 (1 auswertbarer Lauf)	1-2
Stärkesynthase 1	1,4	1
<b>Tetrapyrrolsynthese</b>		
Glucose-6P-Dehydrogenase	1,5	1
<b>Eisenspeicherung</b>		
Ferritin	0,6	1
<b>Nucleotidsynthese (Pyrimidine)</b>		
Aspartat-Transcarbamylase	<b>4,8</b>	3
Dihydroorotase	2,2	1
Dihydroorotatdehydrogenase	2,5	2
Orotatphosphoribosyltransferase	nicht auswertbar	2
UMP-Kinase	2,1	1
CTP-Synthetase	<b>4,4</b>	1
<b>reduktive Sulfatassimilation</b>		
APS-Reduktase	1,9	1
<b>Carotinoidsynthese</b>		
Phytoensynthase	2,6	1-2
Phytoen-Desaturase	2,8	1
<b>Kanalproteine/Transporter</b>		
TOC34	2,2	2
TPT (Triosephosphattranslokator)	4 (1 Lauf mit 2 auswertbaren Kurven)	2
ADP/ATP-Translokator	sehr flache, nicht auswertbare Kurven	1
GPT (Glucose-6P-Translokator)	3,0	1+ 1 Schulter
PPT (Phosphoenolpyruvat/Pyruvat-translokator)	3,4	2
OMT (2-Oxoglutarat/Malat-Translokator)	<b>6,1</b>	2
<b>Plastidenteilung</b>		
FtsZ1	<b>9,73 (4,8)</b>	1
<b>Pentosephosphatweg</b>		
Glutamyl-tRNA-Reduktase	2,8	1
<b>Reaktion auf oxidativen Stress</b>		
Cu/ZnSOD	1,9	1
APX (Ascorbatperoxidase)	2,3	1
FeSOD	1,5 (nur 1 auswertbarer Lauf)	1
<b>Plastidenkodierte Proteine</b>		
<b>Fettsäurebiosynthese</b>		
accD	4,4	1
<b>ribosomale Proteine</b>		
rpl2	4,8	1
ndhG	nicht auswertbar	1
<b>kernkodierte Gene für nichtplastidäre Proteine (als Vergleich)</b>		
Ubiquitin	2,1	1
MtPT1	1	1
CuZnSOD (cytosolisch)	1,6 (nur 1 auswertbarer Lauf)	1

### 3.2.2 Real-Time RT-PCR: Untersuchung plastidenrelevanter Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* durch relative Quantifizierung

Durch Real-Time RT-PCR-Untersuchungen mit absoluter Quantifizierung wurde bei den Genen mit Homologie zu ACCase, Aspartat-Transcarbamylase, CTP-Synthetase,

2-Oxoglutarat/Malat-Translokator und FtsZ1 eine mindestens vierfache Erhöhung der Transkriptmenge in mykorrhizierten Wurzeln bestimmt. Weil durch die relative Quantifizierung unter Einbeziehung einer konstitutiven Expressionskontrolle zuverlässigere Werte erhalten wurden, fand eine vergleichende Bestimmung der Transkriptmengen der oben aufgeführten Gene nach dieser Methode statt (siehe Abschnitt 2.2.6.1; Relative Quantifizierung). Als Maß für die Mykorrhizierung wurde die Transkriptmenge des *Mtpt4* untersucht, eines Phosphattransporters, der in der Umgebung aktiver Arbuskeln eine starke Expressionserhöhung zeigt, aber in Kontrollwurzeln kaum exprimiert wird (Harrison et al., 2002; Isayenkov et al., 2004). Die Amplifikationseffizienz der Primer für MtPT4 und EF wurde bereits überprüft (Lohse et al., 2005) und ist deshalb hier nicht aufgeführt.

Die Amplifikationseffizienz wurde für jedes Gen über eine Reihe mit drei Verdünnungen der cDNA einer mykorrhizierten Probe nach der Formel:  $E = 10^{(-1/\text{Anstieg})}$  (Pfaffl, 2004) bestimmt (Tabelle 3.2). Zur Kontrolle einer DNA-Kontamination der RNA wurden RT(-)-Ansätze (gleiche Behandlung ohne Reverse Transkriptase) untersucht. Die CT-Werte der RT(-)-Ansätze sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Die nach Beendigung der PCR aufgenommenen Schmelzpunktcurven zeigten in allen Fällen nur ein Maximum, was einer selektiven Amplifikation entsprach. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 dargestellt. Der  $\Delta\text{CT}$  des EF als Maß für die eingesetzte cDNA-Menge von mykorrhizierten und Kontrollwurzeln sollte im Idealfall Null sein. In diesen Untersuchungen wurde ein  $\Delta\text{CT}$  des EF von 1,1 bzw. 1 ermittelt. Die entsprechend korrigierten  $\Delta\text{CT}$ -Werte der untersuchten Transkripte sind als  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte in Tabelle 3.4 aufgeführt. Eine starke Erhöhung der Transkriptmenge des Phosphattransporters MtPT4 (7.000fach nach Inokulation mit *G. intraradices*; 4.000fach nach Inokulation mit *G. mosseae*) wurde in mykorrhizierten Wurzeln bestimmt. Demnach konnte von der Gegenwart aktiver Arbuskeln in den Proben ausgegangen werden. Nach Trypanblaufärbung (siehe Abschnitt 2.2.1.) jeweils einer Stichprobe aus jedem Topf war eine Kolonisierung von 40-60 % bestimmt worden.

Die Unterschiede der plastidenrelevanten Transkriptmengen fielen jedoch deutlich niedriger aus. Eine Verdopplung der Transkriptmenge fand sich in mykorrhizierten Wurzeln bei der ACCase und der Aspartat-Transcarbamylase. Keine unterschiedlichen Transkriptmengen wurden bei der CTP-Synthetase und dem 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator ermittelt. Die FtsZ1-Transkripte mykorrhizierter Wurzeln konnten auf Grund der sehr geringen Menge nicht sicher quantifiziert werden.

**Tabelle 3.2** Eichgerade für die Bestimmung der Amplifikationseffizienz. Die Eichgerade wurde mit drei Verdünnungen einer Mykorrhiza-cDNA-Probe durch Auftragung der CT-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration erhalten. Bei maximaler Effizienz würde eine Verdopplung der Kopienzahl erreicht (Anstieg -3,32). OMT = 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator

Gen	Steigung der Eichgerade	Kopienzahl pro Zyklus
ACCase	-3,90	1,8
Aspartat Transcarbamylase	-4,34	1,7
CTP-Synthetase	-4,52	1,7
OMT	-4,32	1,7
FtsZ1	-4,32	1,7

**Tabelle 3.3** CT-Werte der RT(-)-Ansätze. Die Werte geben den Mittelwert der Dreifachbestimmung an. Bei ausbleibender Amplifikation wurde der CT-Wert 40 eingesetzt. G.i. = *G. intraradices*; G.m = *G. mosseae*; EF = Elongationsfaktor 1 $\alpha$ ; AT = Aspartat-Transcarbamylyase; CS = CTP-Synthetase; OMT = 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator

Gen	RT(-) CT: Kontrollwurzeln	RT(-) CT: mykorrhizierte Wurzeln (G.i.)	RT(-): CT mykorrhizierte Wurzeln (G.m.)
EF	32,26	40	31,57
MtPt4	40	37,7	33,92
ACCcase	31,74	31,16	30,49
AT	32,18	32,18	30,61
CS	32,81	32,38	31,83
OMT	32,73	32,59	31,41
FtsZ1	28,99	30,81	30,88

**Tabelle 3.4** Ergebnisse der relativen Quantifizierung durch Real-Time RT-PCR. Stabw = Standardabweichung; Kon = Kontrollwurzeln; Myk = mykorrhizierte Wurzeln; G.i. = *G. intraradices*; G.m. = *G. mosseae*; EF = Elongationsfaktor 1 $\alpha$ ; AT = Aspartat-Transcarbamylyase; CS = CTP-Synthetase; OMT = 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator

Gen	Mittelwert CT Kon	Stabw Kon	Mittelwert CT Myk G.i.	Stabw Myk G.i.	Mittelwert CT Myk G.m.	Stabw Myk G.m.	$\Delta\Delta$ CT G.i.	$\Delta\Delta$ CT G.m.
EF	17,5	1,8	18,6	1,8	18,3	0,97		
MtPt4	30,1	4,1	18,4	1,3	18,8	0,76	12,8	12,1
ACCcase	21,57	0,33	21,67	1,32	21,29	0,75	1,01	1,08
AT	23,64	0,56	24,00	1,34	23,35	0,32	0,75	1,10
CS	23,51	0,33	24,41	2,40	23,64	0,44	0,20	0,67
OMT	23,97	0,68	25,35	2,42	24,64	0,55	-0,27	0,14
FtsZ1	25,52	0,88	27,39	0,92	27,11	0,72	-0,77	-0,79

**Tabelle 3.5** Verhältnis der Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln und Kontrollwurzeln nach relativer Quantifizierung. G.i.: *G. intraradices*; G.m.: *G. mosseae*

Gen	Verhältnis der Transkript- mengen mykorrhizierter Wurzeln (G.i.)/Kontrollwurzeln	Verhältnis der Transkript- mengen mykorrhizierter Wurzeln (G.m.)/Kontrollwurzeln
MtPt4	7312	4258
ACCcase	2,01	2,11
Aspartat-Transcarbamylyase	1,69	2,15
CTP-Synthetase	1,15	1,59
2-Oxoglutarat/Malat- Translokator	0,83	1,10
FtsZ1	0,59	0,58

### 3.3 Untersuchung der Plastidenteilung in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* mit Hilfe des Plastidenteilungsproteins FtsZ1

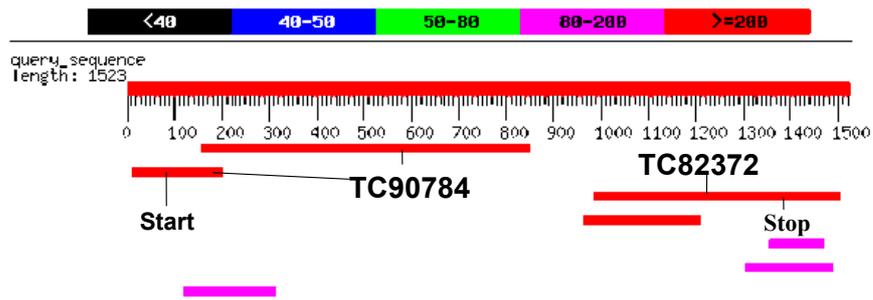
Die starke Proliferation von Plastiden in Arbuskelumgebung von *M. truncatula* (siehe Abbildung 3.7 a und b) und die Ausbildung eines Plastidennetzwerkes um Arbuskeln in Tabak (Fester et al., 2001) warf die Frage auf, in welchem Umfang die Plastidenteilung zur Proliferation beiträgt und welche Rolle die Oberflächenvergrößerung durch Plastidenausläufer dabei spielt. Deshalb konzentrierten sich die weiteren Versuche auf eine Untersuchung des Plastidenteilungsproteins FtsZ1 in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula*.

#### 3.3.1 Gewinnung einer kodierenden cDNA-Sequenz für *MtftsZ1*

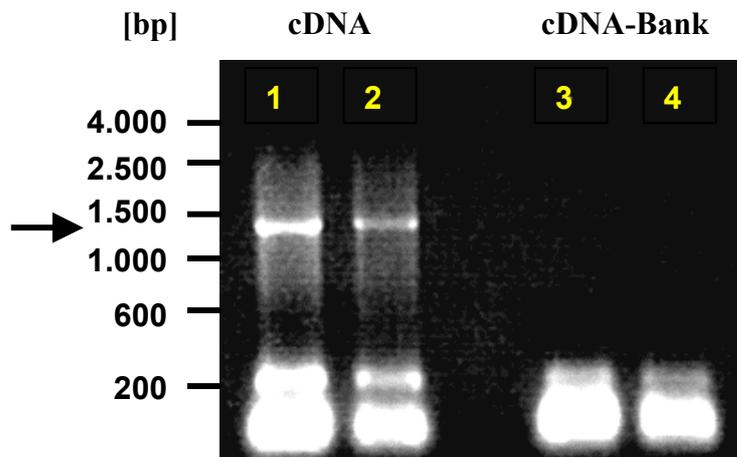
Durch Sequenzsuche mit Hilfe des BLAST-Programms in der NCBI-Datenbank nach einer homologen Sequenz zu FtsZ1-1 aus *Arabidopsis thaliana* (*AtftsZ1-1*; U39877; Stokes et al., 2000) wurde eine ähnliche Sequenz aus *Pisum sativum* gefunden (Y15383). Von Gaikwad et al. (2000) wurden die Produktion von rekombinantem Protein, der Import in isolierte Chloroplasten sowie die Komplementierung einer *ftsZ*-Mutante von *Escherichia coli* (PAT84) nach Transformation mit *PsftsZ1* beschrieben. Die kodierende Sequenz dieses Proteins umfasste 1.271 bp, entsprechend 423 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 44 kDa. Mit dieser Sequenz wurde in der TIGR-Datenbank eine BLAST-Suche nach homologen EST- bzw. TC-Sequenzen von *M. truncatula* durchgeführt. Es wurden 2 TC-Sequenzen mit ca. 90 % Übereinstimmung mit der *PsftsZ1*-Sequenz gefunden (Abbildung 3.10; Stand: Mai 2003). TC90784 deckte den Anfangsbereich mit entsprechendem Startkodon und TC82372 den Endbereich mit entsprechendem Stopkodon der kodierenden *PsftsZ1*-Sequenz ab. Im mittleren Bereich fehlte ein geschätzter Abschnitt von 100 bis 200 Nukleotiden.

Zur Untersuchung, ob beide TC-Sequenzen Bestandteile einer einzigen kodierenden *MtftsZ1*-Sequenz darstellen, wurden Primer jeweils vor dem mutmaßlichen Start- und nach dem entsprechenden Stopkodon abgeleitet. Als Matrize wurden jeweils 1 µl cDNA aus mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* und 1 µl einer cDNA-Bank (*M. truncatula*/ *Glomus versiforme*; AW587412) in einem 20 µl Ansatz eingesetzt und durch 35 PCR-Zyklen amplifiziert. Nach Auftrennung über Agarosegelelektrophorese zeigte sich nur bei der cDNA-Bank eine sehr schwache Bande in einer Größenordnung von 1.000 bis 1.500 bp. Die erhaltene DNA-Menge war für eine Gelextraktion und Klonierung in ein Plasmid zu gering. PCR-Versuche mit 20 µl-Ansätzen führten in mehreren Fällen zu keinem sichtbaren PCR-Produkt, vermutlich auf Grund der sehr geringen cDNA-Ausgangsmenge. Deshalb wurde das PCR-Produkt einer solchen Amplifikation als Matrize für eine erneute Amplifikation in einem 50 µl-PCR-Ansatz eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.13.1). Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde mit der cDNA ein entsprechendes Produkt erhalten, während mit der cDNA-Bank keine Bande sichtbar wurde (Abbildung 3.11).

### Farbschlüssel für die Bewertung der Sequenzähnlichkeit



**Abbildung 3.10** Ergebnis der BLAST-Suche in der TIGR-Datenbank mit *PsftsZ1* aus *P. sativum*. TC90784 und TC82372 deckten jeweils den Anfangs- und Endbereich der kodierenden Sequenz ab. Die enthaltenen Kodons für Start und Stop sind annähernd in den entsprechenden Positionen eingezeichnet.



**Abbildung 3.11** Elektrophoretische Auftrennung der *MtfzsZ1*-PCR-Produkte nach einer zweifachen PCR mit cDNA aus mykorrhizierten Wurzeln (*M. truncatula*/*G. mosseae*; Bahn 1 und 2) und einer cDNA-Bank von mykorrhizierten Wurzeln (*M. truncatula*/*G. versiforme*; Bahn 3 und 4) in einem Agarosegel. Die *ftsZ1*-Primer wurden nach TC90784 und TC82372 abgeleitet. Der Pfeil markiert das PCR-Produkt in der erwarteten Größe.

Das in pGEM<sup>®</sup> T Easy klonierte PCR-Produkt ergab nach Sequenzierung einen kodierenden Bereich (ORF) von 1.257 bp, entsprechend 418 Aminosäuren (Abbildung 3.12). Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen mit der *ftsZ1*-Sequenz aus *P. sativum* ergab eine Ähnlichkeit von 91,6 %. Die Übereinstimmung der entsprechenden Aminosäuresequenzen war mit 94,1 % noch höher. Für alle weiteren Klonierungen wurde das beschriebene pGEM<sup>®</sup> T Easy-Plasmid mit der *MtfzsZ1*-Sequenz als Matrize verwendet. Ein Vergleich der oben beschriebenen Gesamtsequenz mit den TC-Sequenzen und kürzeren PCR-Fragmenten der Teilsequenz deuteten auf einen Thymin/Cytosin-Basenaustausch in Position 127 hin, der zu einem Phenylalanin/Leucin-Austausch in Position 43 führt. Dieser Fehler wurde vermutlich durch die Taq-Polymerase verursacht. Da es sich aber in beiden Fällen um lipophile Aminosäuren handelte, wurde nicht von einer gravierenden Störung der Eigenschaften des Proteins ausgegangen. Seit 2005 ist in der TIGR-Datenbank die Sequenz TC102111 veröffentlicht, die der gesamten kodierenden *ftsZ1*-Sequenz von *M. truncatula* entspricht. Der oben beschriebene Thymin/Cytosin-Basenaustausch in Position 127 wurde dort bestätigt. Ein weiterer Unterschied befindet sich in Position 739. Dort liegt ein A/G-Basenaustausch vor, der den Austausch von Aspartat in der untersuchten Sequenz gegen Asparagin in Position 247 zur Folge hätte.

14 TAAGCTAAAACCCCTAACAAAAAGCAAAAAAGAAAACCCATTTTCAAGATAACAAAA  
71 **ATGGTTACTACGCTTCTTCCTTCTTCTCTCACAAACCCAAATAAGCTTCTATCACAT**  
**M V T T L L P S S L T N P N K L L S H**  
128 **TCTTCCCTTTTCCACAATTCATCACTATCCACTTCACATTACAGTTTCACTTTACCCC**  
**S S L F H N S S L S T S H S V S L Y P**  
185 **AAAACGCAACGTTTCACTCGTCGTTTTGGGTCTGTTAAATGCTCTTTAGCTTATGTT**  
**K T Q R F T R R F G S V K C S L A Y V**  
242 **GATAACGCTAAGATTAAGGTCGTTGGAATTGGGGTGGTGGTAACAATGCCGTTAAT**  
**D N A K I K V V G I G G G N N A V N**  
299 **CGCATGATTGGTAGTGGTTTGCAGGGTGTAGACTTCTATGCAATAAATACTGATGCT**  
**R M I G S G L Q G A V D F Y A I N T D A**  
356 **CAAGCACTACTACATTACAGTCTGAGAAATCCTATTAAAAATCGGAGAGCTTCTGACT**  
**Q A L L H S A A E N P I K I G E L L T**  
413 **CGTGGATTAGGTACCGGTGGGAATCCACTTTTGGGCGAACAAGCTGCCGAGGAATCA**  
**R G L G T G G N P L L G E Q A A E E S**  
470 **AAAGAAGCTATTGCTGATGCCCTTAAAGGATCAGATTTGGTGTTTATAACAGCTGGG**  
**K E A I A D A L K G S D L V F I T A G**  
527 **ATGGTGGGGGTACAGGGTCTGGTGTGCACCAGTTGTGGCCCAATATCAAAGAG**  
**M G G G T G S G A A P V V A Q I S K E**  
584 **GCAGGTTACTTGACTGTAGGTGTTGTACATATCCTTTTCAAGTTTGAAGGACGTA**  
**A G Y L T V G V V T Y P F S F E G R K**  
641 **AGATCCTTGCAGGCACCTGAAGCCATTGAAAAGCTTCAGAGAAATGTTGATACACTT**  
**R S L Q A L E A I E K L Q R N V D T L**  
698 **ATTGTAATCCAAATGATCGTCTGCTTGACATAGCTGACGAGCAGATGCCCTCCAG**  
**I V I P N D R L L D I A D E Q M P L Q**  
755 **GATGCTTTTTCGCTTGCAGATGATGTTTTACGCCAAGGAGTTCAGGGAATTTAGAC**  
**D A F R L A D D V L R Q G V Q G I S D**  
812 **ATTATAACAATACCTGGACTTGTGAATGTGGATTTTGTGATGTAAGCTGTGATG**  
**I I T I P G L V N V D F A D V K A V M**  
869 **AAAGACTCTGGTACTGCAATGCTCGGAGTAGGTGTTTCTCCGGTAAAAACCGAGCC**  
**K D S G T A M L G V G V S S G K N R A**  
926 **GAAGAAGCAGCCGAACAGGCTACTTTGGCTCCTTTAATTGGATCATCTATTCAATCA**  
**E E A A E Q A T L A P L I G S S I Q S**  
983 **GCCACTGGGGTAGTGTATAATATTACTGGAGGAAAGGACATTACCCTGCAGGAAGTT**  
**A T G V V Y N I T G G K D I T L Q E V**  
1040 **AACAGGGTATCTCAGGTTGTGACTAGTTTGGCTGATCCTTCTGCCAATATTATATTT**  
**N R V S Q V V T S L A D P S A N I I F**  
1097 **GGAGCTGTTGTTGATGATCGTTACACCGGGGAGATTACGTGACTATCATTGCCACT**  
**G A V V D D R Y T G E I H V T I I A T**  
1154 **GGCTTTTTCGAGTCTTTTTCAGAAGAAGCTGCTAACAGATCCAAGGGCAGCAAAGCTT**  
**G F S Q S F Q K K L L T D P R A A K L**  
1211 **CTTGACAAAGTGGCCGAGGGAAAAGCAAGACAGTGCCTCCCTCCCTCAAGTCC**  
**L D K V A E G K E S K T V P A P L K S**  
1268 **TCAAACCTTATCCTCAAAGTTGAATCTAGAGCACCGCCCCACGAAAGCTCTTTTTT**  
**S N L S S K V E S R A P P P R K L F F**  
1325 **TAGTTGGATAGTTCAATTTTTTTTTCTTTTTAATTATCATTTTATTGTAGTCATTAG**  
**\***  
1382 **CTGTTTGATGATGTTGAAGCTTATTTGATTTGTTGAGATGCCTTTCTTCATATGGTT**  
1439 **TATGTAACCATGTGCGTAAGTGTATGTAGCTCAC**

**Abbildung 3.12** Gesamte klonierte *MtFtsZ1*-Sequenz. Die schwarzen, fettgedruckten Buchstaben geben die kodierende Nukleotidsequenz im offenen Leserahmen (ORF) an, die blauen Buchstaben entsprechen den Aminosäuren. Hellgrau unterlegt ist die putative Signalsequenz für den Plastidenimport. Konservierte Motive des FtsZ nach Dong et al. (2002) sind blau unterstrichen. Die konservierte Aminosäuresequenz für die GTP-Bindungsstelle ist gelb unterlegt (nach Dong et al., 2002 und El-Shami et al., 2002).

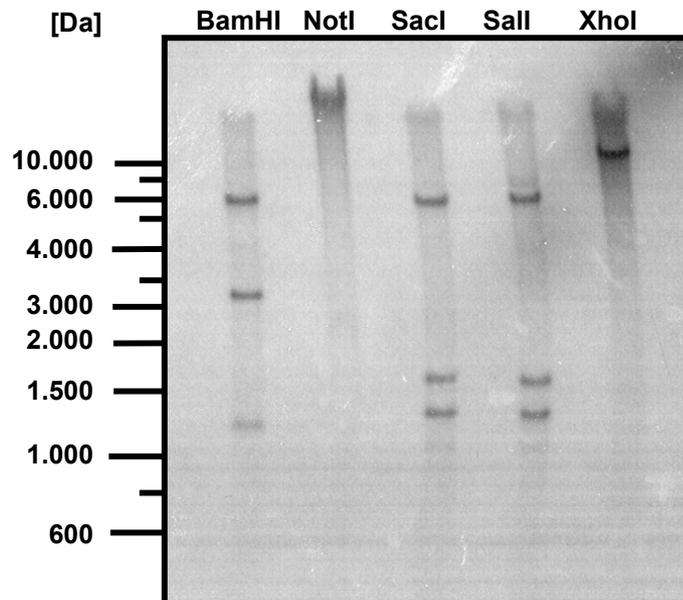
### 3.3.2 Genomische DNA Analyse für das FtsZ1-Gen

#### 3.3.2.1 Charakterisierung des *MtftsZ1*-Gens

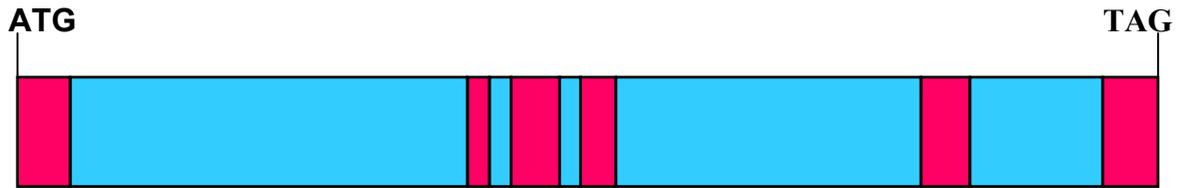
Die *M. truncatula*-Sequenz TC90784 mit hoher Sequenzähnlichkeit zu *ftsZ1* aus *P. sativum* bildete die Grundlage für eine Southern Blot-Analyse zur Untersuchung der Kopienzahl im Genom. Von dieser EST-Sequenz wurden Primer für ein PCR-Produkt von 331 bp abgeleitet. Dieses PCR-Produkt diente als Grundlage für die Herstellung einer <sup>32</sup>P-markierten *MtftsZ1*-Sonde (siehe Abschnitt 2.2.5.3).

Für den Verdau genomischer DNA von *M. truncatula* wurden die Restriktionsenzyme BamHI, NotI, SacI, Sall und XhoI gewählt, die keine Schnittstelle in der *MtftsZ1*-cDNA haben. Die Restriktionsfragmente wurden nach elektrophoretischer Trennung auf eine Nylonmembran übertragen und unter stringenten Bedingungen mit der oben beschriebenen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (siehe Abschnitt 2.2.12.1). Abbildung 3.13 zeigt den nach der Hybridisierung für zwei Stunden exponierten Röntgenfilm. Nach dem BamHI-, SacI- und Sall-Verdau erschienen drei Banden. Der NotI- und der XhoI-Verdau waren offensichtlich nicht erfolgreich.

Zur Interpretation des Southern Blots wurde versucht, eine genomische Sequenz des *MtftsZ1*-Gens zu erhalten. Eine PCR-Amplifikation des *MtftsZ1*-Gens von genomischer DNA mit Primern für die gesamte kodierende *MtftsZ1*-Sequenz war jedoch nicht erfolgreich. Auch durch eine PCR von Sequenzabschnitten gelang es nicht, Intron enthaltende Bereiche zu amplifizieren. Eine BLAST-Sequenzsuche ergab, dass sich eine *MtftsZ1*-Genkopie auf Chromosom 5 von *M. truncatula* befindet, dessen Nukleotidsequenz seit März 2005 in der NCBI-Datenbank veröffentlicht ist (CR936323). Der Sequenzvergleich der kodierenden cDNA von *MtftsZ1* und der genomischen Sequenz von Chromosom 5 ergab die Anwesenheit von fünf Introns. In Abbildung 3.14 sind die Exon- und Intronbereiche schematisch dargestellt. Dieser Sequenzbereich umfasst 5.489 Nukleotide (13.365 bis 18.855 in Chromosom 5).



**Abbildung 3.13** Southern Blot mit je 15 µg genomischer DNA von *M. truncatula* nach Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten *MtftsZ1*-Sonde. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind den entsprechenden Bahnen zugeordnet.



**Abbildung 3.14** Schematische Sequenzdarstellung des *MtftsZ1*-Gens auf dem Chromosom 5 von *M. truncatula* (NCBI: CR936323). Die Exons sind rot dargestellt, die Introns blau.

Bei *AtftsZ1-1* aus *Arabidopsis thaliana* und *MpftsZ1* aus dem Lebermoos (*Marchantia polymorpha*) sind jeweils 5 Introns bekannt (Araki et al., 2003). Die Intron/Exon-Übergangsbereiche sind konserviert und finden sich auch bei *M. truncatula* (Tabelle. 3.6)

**Tabelle 3.6** Konservierte Exon/Intron-Übergänge in *ftsZ1* aus *Marchantia polymorpha* (*MpftsZ1*) und *Arabidopsis thaliana* (*AtftsZ1-1*) im Vergleich zu entsprechenden Sequenzbereichen des *MtftsZ1*-Gens auf Chromosom 5 in *M. truncatula*. Die Großbuchstaben geben Aminosäuren, die Kleinbuchstaben Nukleotide an.

Gen	Intron 1	Intron 2	Intron 3	Intron 4	Intron 5
<i>MpftsZ1</i>	GSGLQ/GVEFW	TRGLG(g/gt) TGGN	RRAQQ/GLEAI	SDIIT/IPGLV	NRVSQ/VVTGL
<i>AtftsZ1-1</i>	SSGLQ/SVDFY	TRGLG(g/gc) TGGN	KRSLQ/ALEAI	SDIIT/IPGLV	NRVSQ/VVTSL
<i>MtftsZ1</i>	GSGLQ/GVDFY	TRGLG (tt/a) TGGN	KRSLQA/LEAI	SDIIT/IPGLV	NRVS/QVVTSL

Die genomische *MtftsZ1*-Sequenz auf Chromosom 5 enthält im Intron 4 jeweils eine XhoI- und eine BamHI-Schnittstelle. Für NotI, SacI und Sall, die anderen für den Southern Blot verwendeten Restriktionsenzyme, existieren dagegen keine Schnittstellen. Nach dem XhoI-Verdau sollten danach mindestens zwei Banden im Southern Blot erscheinen. Es ist aber nur eine Bande sichtbar, was auf einen nicht stattgefundenen Verdau hinweist. Die drei Banden nach dem BamHI-Verdau deuten darauf hin, dass eine weitere *MtftsZ1*-Sequenz im Genom von *M. truncatula* existiert. Auch die drei Banden nach dem SacI- und Sall-Verdau deuten auf eine zusätzliche *MtftsZ1*-Genkopie hin, welche jeweils eine SacI- und eine Sall-Schnittstelle in einem Intron besitzt.

### 3.3.3 Charakterisierung des MtFtsZ1-Proteins

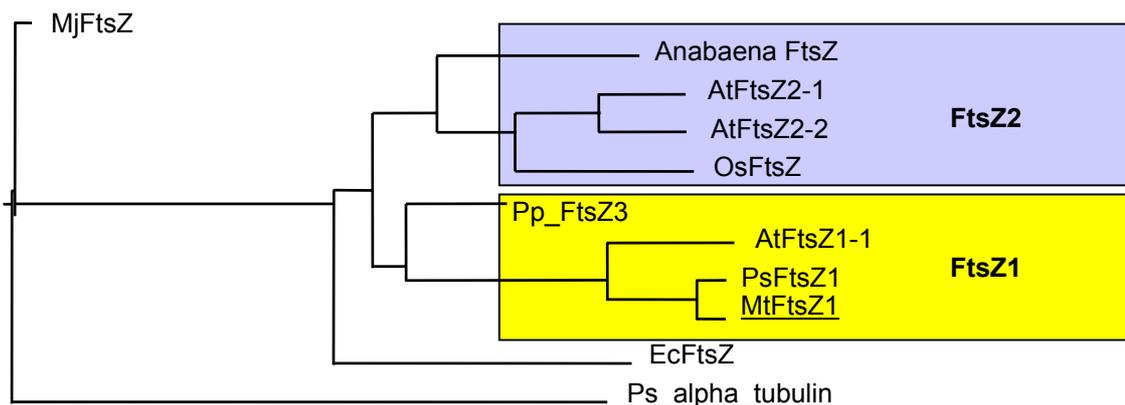
#### 3.3.3.1 Sequenzanalyse von MtFtsZ1

Die Übersetzung der Nukleotidsequenz der *MtftsZ1*-cDNA mit dem Programm EditSeq (DNASTAR) ergab ein Protein mit 418 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von ca. 44 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 7,4. Die Anzahl der hydrophilen Aminosäuren überwog mit 190 gegenüber 108 hydrophoben Aminosäuren.

In der Literatur wird FtsZ1 als lösliches, kernkodierte Stromaprotein der Chloroplasten beschrieben (McAndrew et al., 2001; Miyagishima et al., 2001). Demnach war auch bei MtFtsZ1 eine Plastidensignalsequenz zu erwarten. Eine Sequenzanalyse zur Vorhersage einer möglichen Signalsequenz wurde mit den Programmen SignalP (Nielsen et al., 1997) und ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) durchgeführt. Mit SignalP konnte keine Präsequenz festgestellt werden. Die Untersuchung der ersten 100 Aminosäuren durch ChloroP zeigte eine

relativ geringe Wahrscheinlichkeit von 0,572 (Score) für eine N-terminale Plastidensignalsequenz von 53 Aminosäuren.

Ein Sequenzvergleich der übersetzten Aminosäuresequenz von MtFtsZ1 mit verschiedenen FtsZ-Arten wurde mit dem Programm Clone Manager durchgeführt (siehe Abbildung 3.16). Dabei wurden FtsZ-Aminosäuresequenzen aus den höheren Pflanzen *P. sativum* und *Arabidopsis thaliana* (Zweikeimblättrige), *Oryza sativa* (Einkeimblättrige), dem Moos *Physcomitrella patens*, der Grünalge *Anabaena*, dem Bakterium *Escherichia coli* und dem Archebakterium *Methanococcus jannaschii* mit MtFtsZ1 verglichen. Zusätzlich wurde als Vertreter der Tubuline, die als homologe Proteine von FtsZ in Eukaryoten gelten,  $\alpha$ -Tubulin aus *P. sativum* in den Sequenzvergleich aufgenommen. Die NCBI-Zugangsnummern der verwendeten Proteine sind in Tabelle 2.5 (Material und Methoden) aufgeführt. Bei allen Organismen zeigte sich eine hohe Sequenzähnlichkeit mit mehreren konservierten Bereichen. Eine besonders hohe Übereinstimmung fand sich im Bereich der GTP-Bindungsstelle einschließlich der  $\alpha$ -Tubulinsequenz (siehe Abbildung 3.16). Ein Ähnlichkeitsbaum, der durch den Sequenzvergleich erstellt wurde, zeigt die zwei großen FtsZ-Gruppen in Pflanzen; FtsZ1 und FtsZ2 (Abbildung 3.15). Eine dritte, in einigen Pflanzen gefundene Isoform lässt sich jeweils einer der beiden Gruppen zuordnen, z. B. PpFtsZ3 der Gruppe 1 und AtFtsZ2-2 der Gruppe 2. Die untersuchte Sequenz aus *M. truncatula* lässt sich zusammen mit der entsprechenden Sequenz aus *P. sativum* der FtsZ1-Gruppe zuweisen.



**Abbildung 3.15** Ähnlichkeitsbaum für FtsZ, erstellt mit dem Programm Clone Manager nach dem Sequenzvergleich aus Abbildung 3.16. Entsprechende Abkürzungen wurden übernommen. FtsZ aus Pflanzen lässt sich zwei großen Gruppen zuordnen, FtsZ1 (gelber Kasten) und FtsZ2 (violetter Kasten).

## Sequenzvergleich mit Clone Manager 7, Version 7.01

```

MjFtsZ          1  -----mkfl-knvleeg-----
Anabaena-FtsZ   1  -----menn-----
AtFtsZ2-1       1  matyvspcftpsdsrlltvlrknvlpnhlg-rlnsirti
AtFtsZ2-2       1  maayvspcltppdsrvltvlrksvlpdhhlgtvrgclrms
OsFtsZ          1  mstqlvfpsasnggcplgvsrnn-frkvvlvgvag---hl
Pp_FtsZ3        1  -----mssmv-----rf-----
AtFtsZ1-1       1  -----ma-iiplaqlnelti-----
PsFtsZ1         1  -----matllpstisnnpkl-----
MtFtsZ1         1  -----mvtllpssltnpkl-----
EcFtsZ          1  -----
Ps_alpha_tub    1  -----

MjFtsZ          12  -----skleefnelels-----
Anabaena-FtsZ   5  -----rigeivpgr-----
AtFtsZ2-1       40  dskknrv-vvaaqksesspirnsprhyqs---qaqdpfln
AtFtsZ2-2       41  egttkryrvvashkyessirnslnshstshfqsqdsfln
OsFtsZ          37  qgk---cfsggssrpsklecsansrrvgprtrtkdalyd
Pp_FtsZ3        9  -----ssspsftgslcstspqsmhpmss-va
AtFtsZ1-1       15  -----sssssf---ltksiss-hslhs-sc
PsFtsZ1         16  -----tsysslfhnaslstspss-lttts-vs
MtFtsZ1         17  -----lshsslfhnsstst-----hs-vs
EcFtsZ          1  -----
Ps_alpha_tub    1  -----mrecisihigqagiqvgnacwelyclehg

MjFtsZ          24  --pedkel-----
Anabaena-FtsZ   14  -----van-----
AtFtsZ2-1       76  lhpeismlr-----gegtstivnprketssgp
AtFtsZ2-2       81  lhpeismr-----nprketssvp
OsFtsZ          73  lhpeismly-----gedngavaapgkeqdivk
Pp_FtsZ3        35  akvtrqcgclragnkldkdqfvgdgkplmhqqtrgwsqgr
AtFtsZ1-1       36  icassrisqfrggfskrr---sd-----strsksmr
PsFtsZ1         41  iypktq---rfg---rr---fg-----s-----
MtFtsZ1         36  lypktq---rlt---rr---fg-----s-----
EcFtsZ          1  -----
Ps_alpha_tub    30  iqpdgq-----mpgdktvgggddafn-----

MjFtsZ          30  -----leylqqtkakitvvgcggagnntitrlkme
Anabaena-FtsZ   17  -----ikvigvgggggnavnrmies
AtFtsZ2-1       103 vvedfeepsapsnyne--arikvigvggggsnavnrmies
AtFtsZ2-2       99  itedldelstpntyne--arikvigvggggsnavnrmies
OsFtsZ          100 tterledvsashryse--prikvigvggggsnavnrmies
Pp_FtsZ3        75  erchagrsvvmasmg--akikvigvgggggnavnrmigs
AtFtsZ1-1       64  lrcs-----fspmes--arikvigvgggggnavnrmiss
PsFtsZ1         55  vrcs-----layvdn--akikvvgigggggnavnrmigs
MtFtsZ1         50  vkcs-----layvdn--akikvvgigggggnavnrmigs
EcFtsZ          1  -----mfepmelnd--avikvigvgggggnavehmvre
Ps_alpha_tub    51  -----tffset-----gagkhvpravfv

```

MjFtsZ 60 giegaktvaaintdaqqlirtka--dkkiligkkltrglga  
*Anabaena*-FtsZ 37 dvsgvefwsintdaqaltlagap--sr lqigqkltrglga  
AtFtsZ2-1 141 emsgvefwivntdiqamrm spvlpdnrlqigkeltrglga  
AtFtsZ2-2 137 emigvefwivntdiqamrispvfpdnrlqigkeltrglga  
OsFtsZ 138 dmkgvefwivntdfqamrm spidpdnklqigqeltrglga  
Pp\_FtsZ3 113 giqgvdfwaaintdvqalqksqa--ehrvqigealtrglgt  
AtFtsZ1-1 96 glqsvdfyaaintdsqallqfsa--enplqigelltrglgt  
PsFtsZ1 87 glqgvdfyaaintdaqallhsaa--enpikigelltrglgt  
MtFtsZ1 82 glqgvdfyaaintdaqallhsaa--enpikigelltrglgt  
EcFtsZ 33 riegeffavntdaqalrktavg--qtiqigsgitkglga  
Ps\_alpha\_tub 69 dleptvidevrtga---yrqlfhpeqlisgkedaannfa

MjFtsZ 98 ggnpkigeeaaakesaei---kaaiqdsdmvfitcglggg  
*Anabaena*-FtsZ 75 ggnpaigqkaaeesrdei---atalegadlvfitagmggg  
AtFtsZ2-1 181 ggnpeigmnaareskevi---eealygsdmvfvtagmggg  
AtFtsZ2-2 177 ggnpeigmnaateskeai---qealygsdmvfvtagmggg  
OsFtsZ 178 ggnpeigmnaakesqelv---eqavsgadmifvtagmggg  
Pp\_FtsZ3 151 ggkpfllgeqaaeesieii---aqavvdadlvfitagmggg  
AtFtsZ1-1 134 ggnpllgeqaaeeskdai---analkgsdlvfitagmggg  
PsFtsZ1 125 ggnpllgeqaaeeskeai---analkgsdlvfitagmggg  
MtFtsZ1 120 ggnpllgeqaaeeskeai---adalkgsdlvfitag**mgggg**  
EcFtsZ 71 ganpevgrnaadedrdal---raalegadmviaagmggg  
Ps\_alpha\_tub 105 rghytigkeivdlcldrirkladnctglqgflvfnavggg

MjFtsZ 135 tgtgsapvvae-iskkigalt-vavvtlpfvmegkvr mkn  
*Anabaena*-FtsZ 112 tgtgaapivae-vakemgalt-vgvvtrpfvfegrrrtsq  
AtFtsZ2-1 218 tgtgaapviag-iakamgilt-vgiattpf sfegrrrtvq  
AtFtsZ2-2 214 tgtggapiiag-vakamgilt-vgivttpf sfegrrralq  
OsFtsZ 215 tgtggapviag-iaksmgilt-vgivttpf afegrrralq  
Pp\_FtsZ3 188 tgsgaapvvar-vakeagqlt-vgvvtypftfegrrrsqq  
AtFtsZ1-1 171 tgsgaapvvaq-iskdagylt-vgvvtypf sfegkrslq  
PsFtsZ1 162 tgsgaapvvaq-iskeagylt-vgvvtypf sfegkrslq  
MtFtsZ1 157 **tgsg**aapvvaq-iskeagylt-vgvvtypf sfegkrslq  
EcFtsZ 108 tgtgaapvvae-vakdlgilt-vavvtkpf nfegkkrmaf  
Ps\_alpha\_tub 145 tgsglgslllerlsvdygkksklgftvyp----spqvsts

MjFtsZ 173 ame-----glerlkqhtdtlvvipneklfeivpnm-plk  
*Anabaena*-FtsZ 150 aeq-----gieglksrvdtliiipnkllevipeqtpvq  
AtFtsZ2-1 256 aqe-----glaslrndvdtlivipndklltavsqstpvt  
AtFtsZ2-2 252 aqe-----giaalrndvdtlivipndkllaaavsqstpvt  
OsFtsZ 253 aqe-----giaslrsvdtlivipndklltavspntpvt  
Pp\_FtsZ3 226 ave-----aienlrksvds livipndrll dvsgdktplq  
AtFtsZ1-1 209 ale-----aieklqknvdtlivipndrll diadeqtplq  
PsFtsZ1 200 ale-----aieklqknvdtlivipndrll diadeqmplq  
MtFtsZ1 195 ale-----aieklqrnvdtlivipndrll diadeqmplq  
EcFtsZ 146 aeq-----gitelskhvds litipndkll kvlgrgisll  
Ps\_alpha\_tub 181 vvepynsvlsthsllehtdvavll dneaiydicrrsldie

MjFtsZ	206	l-afkvadevlinavkglvelitkdglinvdfadvkavmn
Anabaena-FtsZ	184	e-afryaddvrlrqqvqgisdiitipglvnvdfadvravma
AtFtsZ2-1	290	e-afnladdilrqqvrgisdiitipglvnvdfadvraima
AtFtsZ2-2	286	e-afnladdilrqqvrgisdiitipglvnvdfadvraima
OsFtsZ	287	e-afnladdilrqqvrgisdiitvpglvnvdfadvrsvms
Pp_FtsZ3	260	e-afsladdvrlrqqvqgisdiittpglvnvdfadvravms
AtFtsZ1-1	243	d-aflladdvrlrqqvqgisdiitipglvnvdfadvkavmk
PsFtsZ1	234	d-afrladdvrlrqqvqgisdiitipglvnvdfadvkavmk
MtFtsZ1	229	d-afrladdvrlrqqvqgisdiitipglvnvdfadvkavmk
EcFtsZ	180	d-afgaandvlgavqgiaelitrgplmnvdfadvrtvms
Ps_alpha_tub	221	rptytnlnrlvsqvissltaslrfdgalnvdvtefqtnlv
MjFtsZ	245	ngglamigigesdsekraeavsmalnsp11-dvdidgat
Anabaena-FtsZ	223	dagsalmgigvssgksrareaiaaaisp11-ecsiegar
AtFtsZ2-1	329	nagsslmgigtatgksrardaalnaiqsp11-digierat
AtFtsZ2-2	325	nagsslmgigtatgktrardaalnaiqsp11-digierat
OsFtsZ	326	dagsslmgigtatgktrardaalnaiqsp11-digierat
Pp_FtsZ3	299	nsgtamlgvgs ssgknraeeaaavqaasapli-ersieqat
AtFtsZ1-1	282	dsgtamlgvvsssknraeeaaeqatlapli-gssiqsat
PsFtsZ1	273	dsgtamlgvvssgknraeeaaeqatlapli-gssiqsat
MtFtsZ1	268	dsgtamlgvvssgknraeeaaeqatlapli-gssiqsat
EcFtsZ	219	emgyammgsgvasgedraeeaaemaissp11ledidlsгар
Ps_alpha_tub	261	pyprihfm1ssyapvisaekayheqlsvaeitnsafepss
MjFtsZ	284	gali-hvmgpe-----dltleearvvatvssrld
Anabaena-FtsZ	262	gvvf-nitggs-----dltlhevnaaaetiyevd
AtFtsZ2-1	368	givw-nitggs-----dltlfevnaaaeviylvd
AtFtsZ2-2	364	givw-nitggs-----dltlfevnaaaeviylvd
OsFtsZ	365	givw-nitggn-----dltltevnaaaeviylvd
Pp_FtsZ3	338	givy-nitggn-----dltlqevntvseivtglad
AtFtsZ1-1	321	gvvy-nitggk-----ditlqevnrsvqvvtslad
PsFtsZ1	312	gvvy-nitggk-----ditlqevnrsvqvvtslad
MtFtsZ1	307	gvvy-nitggk-----ditlqevnrsvqvvtslad
EcFtsZ	259	gvlv-nitagf-----dlrldefetvgntirafas
Ps_alpha_tub	301	mmakcdprhkgymacclmyrgdvvpkdvnaavatikt---
MjFtsZ	313	pnatiiwgatidenlentvrv---llvitgvqsrie---
Anabaena-FtsZ	291	pnaniifgavidrlqgevri---tviatgftg--eiq--
AtFtsZ2-1	397	ptanlifgavvdpalsgqvs---tliatgfrqeege--
AtFtsZ2-2	393	ptanlifgavvdpsysgqsi---tliatgfrqeege--
OsFtsZ	394	pganlifgsvidpsytgqvs---tliatgfrqeeae--
Pp_FtsZ3	367	psaniifgavvdkytgeihv---tliatgfsfsfqks--
AtFtsZ1-1	350	psaniifgavvdrytgeihv---tliatgfsfsfqkt--
PsFtsZ1	341	psaniifgavvdrytgeihv---tliatgfsfsfqkk--
MtFtsZ1	336	psaniifgavvdrytgeihv---tliatgfsfsfqkk--
EcFtsZ	288	dnatvvigtslpdmndelrv---tvvatgigmdkrpeit
Ps_alpha_tub	338	-krtiqfvdwcptgfkcginyqpptvvpggdlakvqravc

MjFtsZ	346	-ftdtglkrkklel-----tg-----
Anabaena-FtsZ	324	aapqqnaan-a-rv-----vsapp---
AtFtsZ2-1	432	grtvq-mvq-a-da-----asvga---
AtFtsZ2-2	428	grplq-atq-a-d-----asmga---
OsFtsZ	429	sr--q-ag--g-dn-----srshs---
Pp_FtsZ3	402	lv-dpnvsr-serq-----dapsn---
AtFtsZ1-1	385	lltdpraak-lldk-----mgssg---
PsFtsZ1	376	lltdpraak-lldk-----vaeg----
MtFtsZ1	371	lltdpraak-lldk-----vaeg----
EcFtsZ	325	lvtnkqvqqpvmr-----yqqhgmap
Ps_alpha_tub	377	misnstsvaevfsridhkfdlmyakrafvhwvgegmeeg
MjFtsZ	361	-----ipki-----
Anabaena-FtsZ	341	-krtptqtpltnspaptpepkeksgldipdfllqr-r---r
AtFtsZ2-1	448	-trrpsss-----fresgsveipeflkk-kgsr
AtFtsZ2-2	443	-trrpsss-----ftegssieipeflkk-kgrsr
OsFtsZ	442	-swfssss-----qeeqptlqipeflqr-kgrsg
Pp_FtsZ3	419	-alekpwkq-----ptptsrfrqglnskg-
AtFtsZ1-1	403	-qqenkqms-----lphqkqs-pstistkss
PsFtsZ1	393	--kesktvp-----pplkssnfsskvesrpp
MtFtsZ1	388	--kesktvp-----aplkssnlsskvesrap
EcFtsZ	347	ltqeakpvakvvnndnapqtakepdylidipafllrkqad---
Ps_alpha_tub	417	efsearedlaalekdyeevgaesgdgdddglgeey----
MjFtsZ		-----
Anabaena-FtsZ	376	ppkn---
AtFtsZ2-1	475	yprv---
AtFtsZ2-2	470	yprl---
OsFtsZ	469	fsrg---
Pp_FtsZ3	443	-----fl
AtFtsZ1-1	427	sprrlff
PsFtsZ1	417	pprklff
MtFtsZ1	412	pprklff
EcFtsZ		-----
Ps_alpha_tub		-----

**Abbildung 3.16** Sequenzvergleich von MtFtsZ1 (aus *M. truncatula*) mit MjFtsZ (aus *Methanococcus jannaschii*), Anabaena-FtsZ (aus *Anabaena sp.*), AtFtsZ2-1 und AtFtsZ2-2 (aus *Arabidopsis thaliana*); OsFtsZ (aus *Oryza sativa*); Pp\_FtsZ3 (aus *Physcomitrella patens*), EcFtsZ (aus *E. coli*). Außerdem wurde die  $\alpha$ -Tubulin-Sequenz von *P. sativum* (Ps\_alpha\_tub) aufgenommen. Die Aminosäuren sind als Ein-Buchstaben-Abkürzung angegeben. Übereinstimmungen der Aminosäuren in der Mehrheit der Sequenzen sind orange markiert, Lücken sind als Striche dargestellt. Der konservierte Bereich der GTP Bindungsstelle von MtFtsZ1 wurde durch fettgedruckte Buchstaben und einen Unterstrich hervorgehoben.

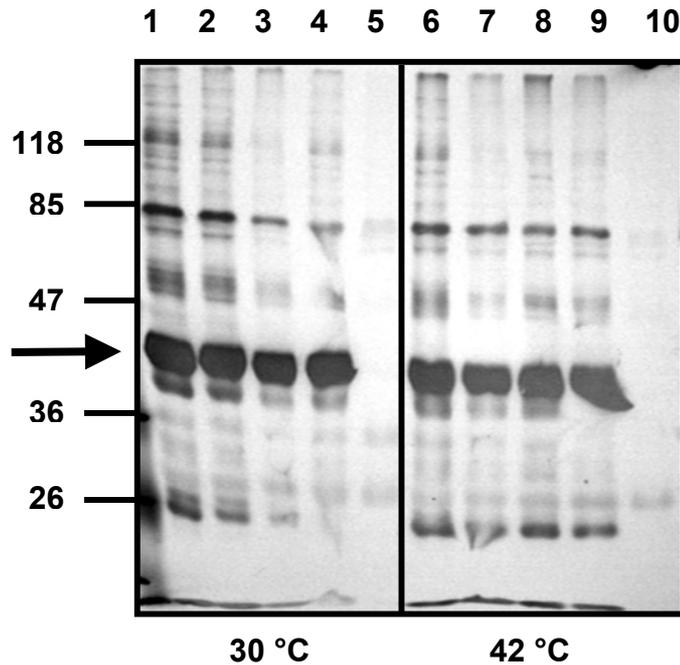
### 3.3.3.2 Supplementationsversuche mit der thermosensitiven *E. coli ftsZ*-Mutante PAT84

PAT84 ist eine thermosensitive *ftsZ*-Mutante von *E. coli* (Lutkenhaus et al., 1980) mit einer Störung der Zellteilung und Entstehung langer Filamente bei einer nicht tolerierten Temperatur von 42 °C. Bei der tolerierten Temperatur von 30 °C teilen sich die Bakterien normal, haben aber eine erheblich längere Verdopplungszeit (170 min) im Vergleich zum Wildtyp (45 min) (Koppes et al., 1978).

Nach Gaikwad et al. (2000) hatte eine Supplementierung der Mutante PAT84 mit einer plastidären *ftsZ*-Sequenz aus *P. sativum* zur Regeneration der Teilungsfähigkeit bei 42 °C geführt. Die große Ähnlichkeit der untersuchten FtsZ1-Sequenz aus *M. truncatula* (MtFtsZ1) zu der bei Gaikwad et al. (2000) beschriebenen FtsZ-Sequenz aus *P. sativum* ließ eine erfolgreiche Supplementierung der *E. coli* Mutante PAT84 mit dem FtsZ1-Protein von *M. truncatula* erwarten. Entsprechende Transformationsversuche wurden durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit von MtFtsZ1 bei der Bakterienteilung zu untersuchen.

PAT84 wurde vom *E. coli* Genetic Stock Center der Yale University bezogen. Die Bakterien wurden zunächst als Schüttelkultur bei 37 °C mit Streptomycin als Selektionsmarker kultiviert. Es zeigte sich aber, dass auch bei 37 °C die Teilung der Bakterien gestört war und diese in Form langer Filamente wuchsen. Eine Kultivierung bei 30 °C führte zu Bakterienpopulationen unterschiedlicher Länge. PAT84-Bakterien, die ihre Teilungsfähigkeit bei 30 °C wiederlangt hatten, wurden dann als schneller wachsende Kolonien auf Agarplatten selektioniert. Diese Stämme zeigten das in der Literatur beschriebene Verhalten. Durch Kultivierung bei 30 °C wuchsen die Bakterien in Form kurzer Stäbchen, die Inkubation bei 42 °C hatte hingegen die Ausbildung langer Filamente zur Folge. PAT84-Stämme, die bei 30 °C eine normale Teilungsfähigkeit aufwiesen, wurden nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Gaikwad et al., 2000) oder nach der in Abschnitt 2.2.4.1 beschriebenen Methode für eine Transformation kompetent gemacht.

Als Transformationsvektor wurde wie bei Gaikwad et al. (2000) pBluescript SK(-) mit *MtFtsZ1a*, ohne die vorhergesagte 159 Nukleotide umfassende Plastidensignalsequenz, verwendet (siehe Abschnitt 3.3.3.1 und 2.2.13.3). Die Expression der *ftsZ1*-Sequenz wurde in diesem Vektor (pBSK(-)*MtftsZ1a*) durch den *lac*-Promotor kontrolliert. Das Plasmid wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt, in kompetente Zellen der FtsZ-Mutante PAT84 (wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben) transformiert und positive Klone auf Ampicillin selektiert. Als Negativkontrolle wurde eine Transformation mit dem leeren Vektor durchgeführt. Transformanten mit pBSK(-)*MtftsZ1a* und pBSK(-) zeigten sowohl bei der tolerierten als auch bei der nicht tolerierten Temperatur eine sehr variable Erscheinung, das heißt, kurze bis mittellange Stäbchen sowie längere Filamente. Die Filamente waren nach Inkubation bei 42 °C generell kürzer als vor der Transformation. Deshalb wurde die Proteinexpression durch einen Western-Blot mit jeweils 5  $\mu$ g Gesamtprotein, gewonnen aus Kulturen nach Inkubation bei 30 °C oder 42 °C, überprüft. Zur Immunmarkierung wurde als primärer Antikörper ein affinitätsgereinigter Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper (siehe Abschnitt 2.2.17.1) und als sekundärer Antikörper ein AP-gekoppelter Antikörper verwendet (Abbildung 3.17). Die Transformanten mit pBSK(-)*MtftsZ1a* zeigten sowohl nach Inkubation bei 30 °C als auch bei 42 °C ein deutliches Signal in der erwarteten Größe von 38,5 kDa. Bei dem Kontrollstamm war nach Kultivierung jeweils bei 30 °C und 42 °C keine entsprechende Bande detektierbar. Demnach wurde das rekombinante MtFtsZ1a-Protein offenbar in der richtigen Größe produziert. Wegen der Variabilität der Bakterien nach der Transformation konnte aber keine Regeneration der Teilungsfähigkeit der *ftsZ*-Mutante PAT84 nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.17** Western Blot mit Protein aus *E. coli* PAT84, transformiert mit pBSK(-)*MtftsZ1* (Bahn 1-4 und 4-9) bzw. pBSK(-) (Bahn 5 und 10) nach 5 Stunden Inkubation bei 30 °C (1-5) bzw. bei 42 °C (6-10) in Schüttelkultur. Zur Immunmarkierung wurde als primärer Antikörper ein affinitätsgereinigter Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1 AK (siehe Abschnitt 2.2.17.1) und als sekundärer AK ein AP-gekoppelter AK verwendet. Das rekombinante MtFtsZ1-Protein in der erwarteten Größe von 38,5 kDa ist durch einen Pfeil markiert.

### 3.3.3.3 Produktion von rekombinantem MtFtsZ1-Protein

Die heterologe Expression von MtFtsZ1-Protein wurde einerseits zur Erzeugung von Antikörpern mit dem Ziel einer Immunlokalisierung in mykorrhizierten Wurzeln, andererseits mit dem Ziel der funktionellen Charakterisierung durchgeführt. Dafür wurde die gesamte kodierende *MtftsZ1*-Sequenz als XhoI/BamHI-Fragment in den Expressionsvektor pET28a(+) so kloniert, dass eine im Vektor kodierte N-terminale 6xHistidinsequenz (His-tag) angefügt wurde (siehe Abschnitt 2.2.13.4).

Das Plasmid pET28MtftsZ1 wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt und nach Sequenzüberprüfung (Medigenomix) in die Expressionsstämme BL21 CodonPlus<sup>®</sup> (DE3) RP und RIL transformiert (siehe Abschnitt 2.1.3 und 2.2.4.1). Eine Western Blot-Untersuchung des Gesamtproteins, des löslichen und unlöslichen Proteins fand durch den Nachweis der N-terminalen 6xHistidinsequenz mit Hilfe eines entsprechenden primären Antikörpers und eines an AP gekoppelten Sekundärantikörpers statt (siehe Abschnitt 2.2.12.3). Im Gesamtprotein und unlöslichen Protein beider Expressionsstämme zeigten sich eine starke (39 kDa) und zwei schwächere Banden (37 kDa und 42 kDa; Abbildung 3.18 a), bei einer theoretisch errechneten Größe von 47,5 kDa. In löslicher Form war MtFtsZ1 nicht nachweisbar (Abbildung 3.18 b). Mit Protein aus den Stämmen RIL und RP, die mit leerem Vektor transformiert worden waren, wurde keine Bande detektiert. RPpET28MtFtsZ1 wurde für die Proteinexpression weiterverwendet.

Das rekombinante MtFtsZ1-Protein wurde auch durch einen Antikörper gegen AtFtsZ1-1 aus *Arabidopsis thaliana* (zur Verfügung gestellt von K. Osteryoung, Michigan State University) erkannt. Dieser Antikörper ist gegen eine leicht zugängliche konservierte Peptidstruktur (EGRKRSLSZALEAIEK) gerichtet (Stokes et al., 2000), die auch in MtFtsZ1 vorkommt. Dabei wurde jeweils eine stärkere Bande im Gesamtprotein und im aufgereinigten Protein (über

Ni-NTA Spinsäulen gereinigte Inclusion Bodies) mit einem berechneten Molekulargewicht von 46 kDa detektiert (Abbildung 3.18 c).

Expressionsversuche bei 30 °C mit variierenden IPTG-Konzentrationen (0,1 bis 1 mM) führten nicht zur Produktion von löslichem Protein, so dass davon auszugehen war, dass HisMtFtsZ1 ausschließlich als nicht funktionsfähiges Protein in Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) abgelagert wurde. Die Untersuchung von IPTG-induzierten und nicht induzierten R<sub>P</sub>pET28MtFtsZ1-Bakterien unter dem Lichtmikroskop mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) zeigte keinen Unterschied in der Bakterienlänge, demnach war die Teilungsfähigkeit nicht beeinträchtigt.

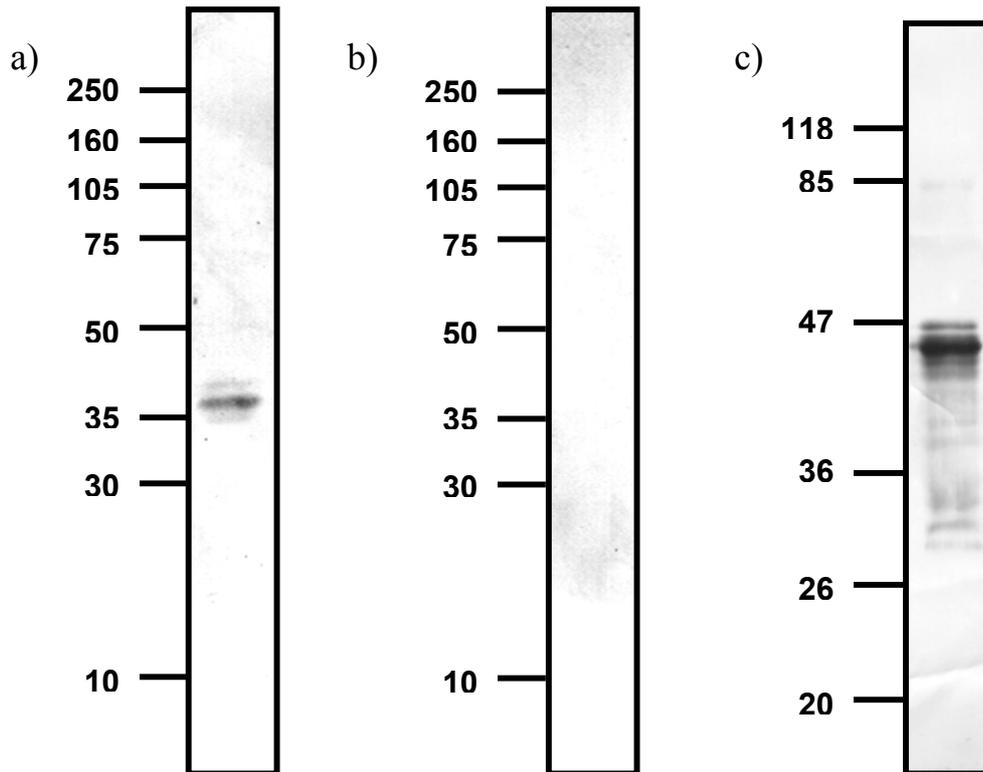
Als Inkubationsbedingung für Produktion einer optimalen Proteinmenge von MtFtsZ1 wurde die Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C während 6 bis 7 Stunden ermittelt. Für die Gewinnung von funktionellem Protein in löslicher Form wurde in weiteren Versuchen die MtFtsZ1a-Sequenz ohne putative Plastidensignalsequenz eingesetzt.

#### 3.3.3.4 Produktion von rekombinantem HisMtFtsZ1a-Protein

Um lösliches rekombinantes Protein zu produzieren, wurde die kodierende MtFtsZ1-Sequenz ohne die putative Plastidensignalsequenz (ohne die ersten 159 Nukleotide; entsprechend 53 Aminosäuren) als XhoI/BamHI-Fragment so in pET28a(+) kloniert, dass eine im Vektor kodierte N-terminale 6xHistidinsequenz (His-tag) angefügt wurde (siehe Abschnitt 2.2.13.4).

Das Plasmid pET28MtFtsZ1a wurde nach Sequenzüberprüfung in den Expressionsstamm BL21 CodonPlus<sup>®</sup> RP transformiert (R<sub>P</sub>pET28MtFtsZ1a). Nach IPTG-Induktion bei 37 °C wurde lösliches Protein nur in Spuren produziert. Allerdings bewirkte die Expression von *HisMtftsZ1a* im Gegensatz zur Expression von *HisMtftsZ1* das Auftreten langgestreckter Bakterien. Das deutete auf einen Anteil funktionellen Proteins hin, welches mit FtsZ aus *E. coli* interferierte und die Zellteilung störte (Abbildung 3.19).

Durch Expression bei 30 °C wurde neben einer größeren Menge unlöslichen Proteins auch ein geringer Anteil löslichen Proteins produziert. Nach Testung verschiedener IPTG-Konzentrationen (0,1 bis 1 mM) zeigte sich, dass durch Induktion mit 1 mM IPTG die größte Menge an löslichem Protein gebildet wurde. Im Western Blot wurde nach Markierung des 6xHistidin-Restes und Detektion durch AP-Reaktion eine Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 42 kDa erhalten. Dieser Wert stimmte gut mit der erwarteten Größe von 41,8 kDa (Berechnung durch EditSeq) überein. Eine Expression bei 30 °C nach Induktion mit 1 mM IPTG über 14 bis 16 Stunden führte zu einer besseren Ausbeute an löslichem Protein als mit 0,5 mM IPTG. Auch unter diesen Bedingungen wurde allerdings schätzungsweise zehnmal mehr unlösliches als lösliches Protein produziert.



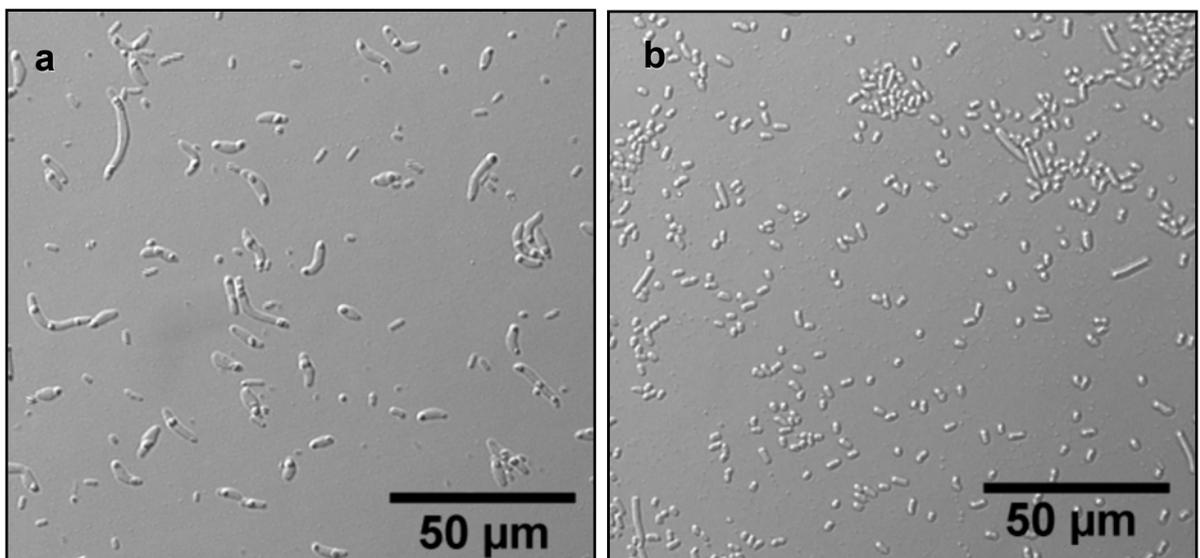
**Abbildung 3.18** Nachweis der *ftsZ1*-Expression von RPPet28MtFtsZ1 über Western-Blot-Analyse. Als sekundärer AK wurde ein AP-gekoppelter AK verwendet.

a) unlösliches Protein nach 3 h Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C; Markierung mit dem Maus: $\alpha$ -His AK

b) lösliches Protein nach 3 h Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C; Markierung mit dem Maus: $\alpha$ -His AK

c) unlösliches Protein nach 7 h Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C; Markierung mit dem Kaninchen: $\alpha$ -AtFtsZ1-1 AK

Als Größenmarker wurde bei a) und b) Full Rainbow™ RPN800 (Amersham), bei c) #SM0441 (Amersham) verwendet.



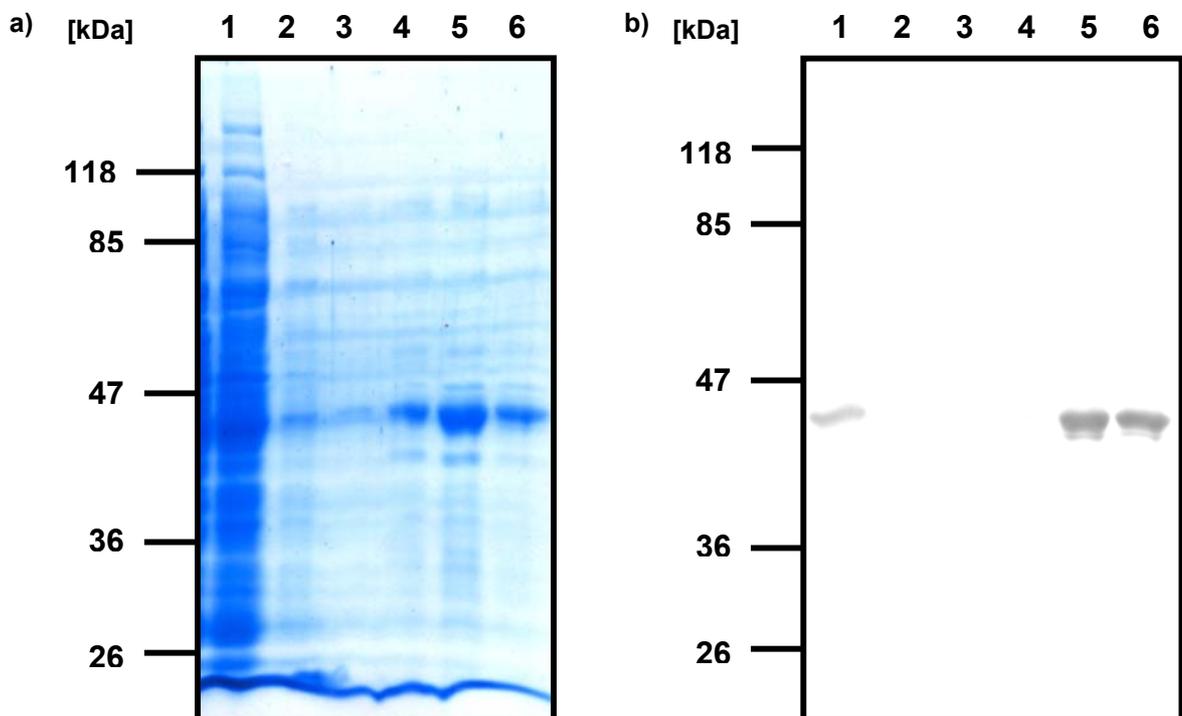
**Abbildung 3.19** Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC; Axioskop II: 63xObjektiv) von RPPET28MtFtsZ1a (Expression von *HisMftsZ1a*; ohne Plastidentargetsequenz) nach 17 h Schüttelkultur bei 37 °C:

a) nach Induktion mit 1 mM IPTG

b) nicht induzierte Kontrolle

### 3.3.3.5 Aufreinigung von unlöslichem rekombinanten HisMtFtsZ1 und HisMtFtsZ1a

Für die Gewinnung spezifischer Antikörper gegen MtFtsZ1 war es erforderlich, eine möglichst reine Proteinfraction zu gewinnen. Die Fusion der 6xHistidinsequenz mit dem zu reinigenden Protein erlaubte durch Komplexbildung mit Nickel eine Isolierung des Proteins. Die Aufreinigung fand über Ni-NTA Spinsäulchen unter denaturierenden Bedingungen statt (siehe Abschnitt 2.2.14.1; Novagen, 2002). In Abbildung 3.20 sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung von HisMtFtsZ1 dargestellt; 3.20 a zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-PAG und 3.20 b den entsprechenden Western Blot nach Immunmarkierung durch einen Mausantikörper gegen die 6xHistidinsequenz und einen an AP gekoppelten Sekundärantikörper. Die Elutionsfraktionen enthielten stark angereichertes HisMtFtsZ1 mit geringen Verunreinigungen durch Fremdproteine. Im Western Blot war in beiden Elutionsfraktionen jeweils eine stärkere Bande sichtbar. Auch in der Durchflussfraktion war HisMtFtsZ1 nachweisbar, vermutlich wegen der begrenzten Bindungskapazität der Säulchen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Aufreinigung von unlöslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a ohne putative Plastidensignalsequenz.



**Abbildung 3.20** Reinigungsfraktionen von unlöslichem rekombinanten HisMtFtsZ1 (6 h Induktion mit 1mM IPTG) nach Behandlung mit Ni-NTA-Spinsäulchen. Fraktionen: 1) Durchfluss; 2) und 3) Waschfraktionen mit pH 6,3; 4) Waschfraktion mit pH 5,9; 5) und 6) Elutionsfraktionen mit pH 4,5. Es wurde jeweils 12,5 µl Proteinlösung aufgetragen.

a) Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel

b) Western Blot: Immunmarkierung durch einen Mausantikörper gegen die 6xHistidinsequenz und einen AP-gekoppelten Sekundärantikörper

### 3.3.3.6 Isolierung und Aufreinigung von Inclusion Bodies (IB)

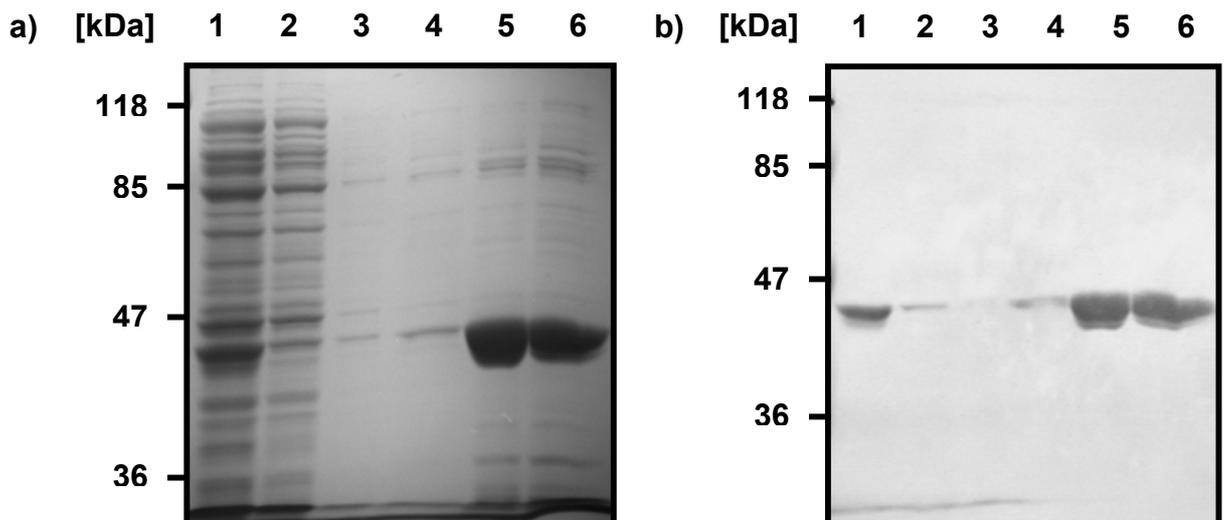
Eine Möglichkeit, unlösliches Protein nach Überexpression in relativ reiner Form zu gewinnen, ist die Isolierung von IB (Rudolph et al., 1997); Abschnitt 2.2.8.3). Die elektrophoretische Auftrennung solubilisierter IB von HisMtFtsZ1 zeigte nach Färbung mit Coomassie-Blau drei Banden von etwa 35, 38 und 46 kDa. Die größte Bande entsprach dabei annähernd der erwarteten Größe (47,5 kDa). Nach Isolierung der IB von HisMtFtsZ1a (ohne Plastidensignalsequenz) zeigte sich eine Hauptbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von

42 kDa (erwartet: 41,8 kDa). Die IB wurden zur weiteren Entfernung von Verunreinigungen durch Fremdprotein einer Aufreinigung über Ni-NTA Spinsäulchen, wie im Abschnitt 3.3.3.5 beschrieben, unterzogen.

### 3.3.3.7 Expression und Aufreinigung von löslichem HisMtFtsZ1a

Zur Gewinnung einer maximalen Proteinmenge von nativem HisMtFtsZ1a wurde die Proteinproduktion im *E. coli*-Expressionsstamm RPpET28MtFtsZ1a 14 bis 16 Stunden mit 1 mM IPTG induziert. Das lösliche rekombinante Protein wurde wie in Abschnitt 2.2.8.1 beschrieben isoliert. Eine Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen wurde ebenfalls über Ni-NTA Spinsäulen (Qiagen) gemäß Abschnitt 2.2.14.2 durchgeführt. In Abbildung 3.21 sind die Fraktionen der Aufreinigung dargestellt; 3.21 a zeigt ein mit Coomassie Blau gefärbtes SDS-PAG und 3.21 b den entsprechenden Western Blot nach Immunmarkierung der 6xHistidinsequenz und Detektion mit Hilfe eines AP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Elutionsfraktionen zeigten eine starke Anreicherung von gereinigtem Protein und wenig Verunreinigung durch Fremdproteine. Die detektierte Proteinbande von 42 kDa entsprach dem erwarteten Molekulargewicht von 41,8 kDa.

Zur Gewinnung und Konzentrierung von reinem nativem HisMtFtsZ1a wurde eine Mehrfachbeladung der Ni-NTA-Spinsäulchen durchgeführt. Eine weitere Konzentrierung der Proteinlösung und Umpufferung mit dem Testpuffer (siehe Abschnitt 2.2.9) fand durch Zentrifugation mit Centricon YM-30 statt.



**Abbildung 3.21** Reinigungsfraktionen von löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a (14h 1mM IPTG bei 30 °C) nach Reinigung über Ni-NTA-Spinsäulchen. Fraktionen: 1) Gesamtprotein; 2) Durchfluss; 3) und 4) Waschfraktionen mit 20 mM Imidazol 5) und 6) Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol. Es wurden jeweils 10 µl Proteinlösung aufgetragen.

a) Coomassie-gefärbtes PAG

b) Western Blot: Immunmarkierung durch einen Mausantikörper gegen die 6xHis-Sequenz und AP-gekoppelten Sekundärantikörper

Eine Stabilisierung des Proteins zum Aufbewahren bei -20 °C durch Zugabe von 10 % Glycerol konnte nicht erreicht werden, weil dies zum Ausflocken des Proteins führte. Auch nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff, gefolgt von einer Lagerung bei -20 °C und Auftauen, kam es zu Ausflockungen. Wegen der fehlenden Stabilisierungsmöglichkeit konnte das Protein nur direkt nach Aufreinigung und Konzentrierung für funktionelle Tests verwendet werden.

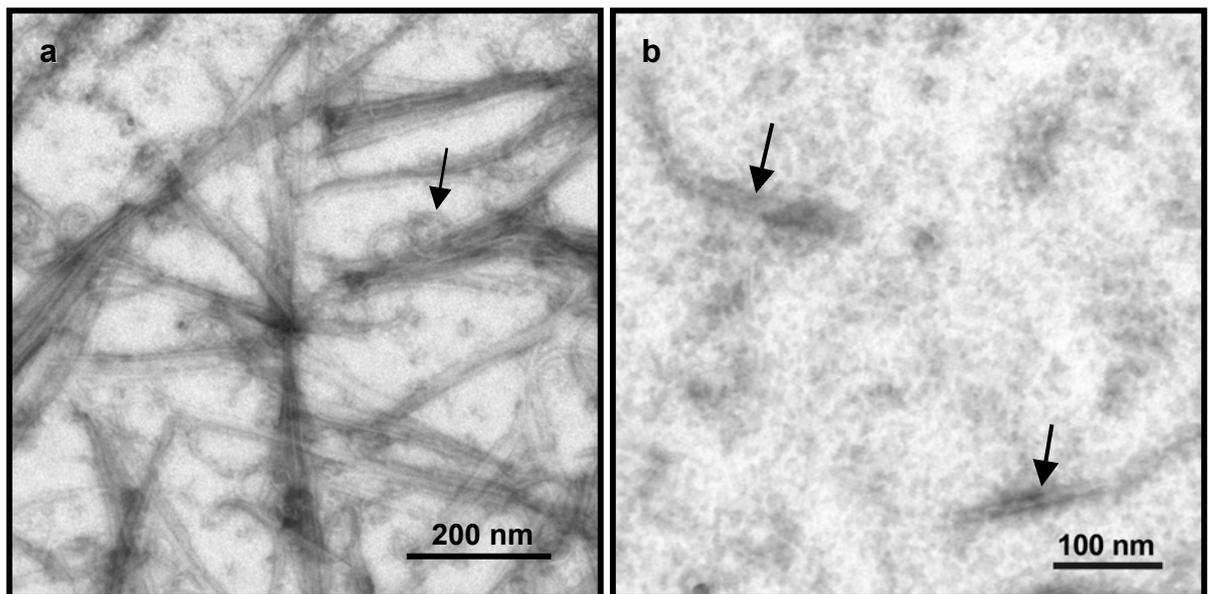
### 3.3.3.8 TEM-Analyse des *in vitro*-Selfassembly von HisMtFtsZ1a

Zur Feststellung, ob lösliches rekombinantes HisMtFtsZ1a ohne putative Signalsequenz wie FtsZ aus Prokaryoten *in vitro* die Fähigkeit zur Bildung von Filamenten (Selfassembly) besitzt, wurde eine TEM-Analyse (TEM = Transmissionselektronenmikroskopie) durchgeführt. Das lösliche HisMtFtsZ1a-Protein entspricht wahrscheinlich der im Stroma von Plastiden auftretenden Form. In diesem Zusammenhang interessierte insbesondere die Rolle von GTP und  $Mg^{2+}$  und die Frage, ob ein  $Ca^{2+}$ -Zusatz eine stabilisierende Wirkung auf eine Filamentbildung hat.

Die Ansätze zur Untersuchung des Selfassembly mit je  $7,3 \mu M$  HisMtFtsZ1a ( $0,3 \text{ mg/ml}$ ) wurden mit den folgenden Zusätzen 30 Minuten bei  $37^\circ C$  und  $pH 7,5$  inkubiert: 1)  $1 \text{ mM}$  GTP und  $5 \text{ mM}$   $Mg^{2+}$ ; 2)  $1 \text{ mM}$  GTP,  $5 \text{ mM}$   $Mg^{2+}$  und  $5 \text{ mM}$   $Ca^{2+}$ ; 3)  $1 \text{ mM}$  GTP; 4)  $5 \text{ mM}$   $Mg^{2+}$  und 5) ohne Zusätze (Kontrolle).

Zur Visualisierung im TEM fand eine Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure statt. Diese Arbeiten sowie die Elektronenmikroskopie-Aufnahmen wurden zusammen mit Dr. Gerd Hause (Biozentrum Halle) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.15.2).

Eine Bildung von Protofilamenten fand in allen Ansätzen mit Ausnahme der Kontrolle statt, dort zeigten sich nur klümpchenartige Ausfällungen. Bei geringer Vergrößerung ( $3.000$  und  $12.000x$ ) zeigten sich in Gegenwart von GTP blattartige Strukturen. Bei  $50.000$ facher Vergrößerung wurde sichtbar, dass es sich um eine vorwiegend parallele Aneinanderlagerung einzelner Protofilamente mit einem Durchmesser von  $10$  bis  $12 \text{ nm}$  handelte (Abbildung 3.22 a). Einzelne Filamentenden bildeten in Gegenwart von GTP und Abwesenheit zweiwertiger Kationen eine kurvenförmige Struktur aus (Abbildung 3.22 a). Der Zusatz von  $Ca^{2+}$  hatte keine sichtbaren Auswirkungen. Nach Zusatz von  $Mg^{2+}$  allein bildeten sich nur sehr kurze Filamente, die meist einzeln, zum Teil auch doppelt nebeneinander lagen (Abbildung 3.22 b).



**Abbildung 3.22** TEM-Aufnahmen der Protofilamentbildung von  $7,3 \mu M$  ( $0,3 \text{ mg/ml}$ ) HisMtFtsZ1a nach 30 min Inkubation bei  $37^\circ C$  und  $pH 7,5$ :

- a) in Gegenwart von  $1 \text{ mM}$  GTP, der Pfeil markiert ein kurvenförmiges Filamentende;
- b) in Gegenwart von  $5 \text{ mM}$   $Mg^{2+}$ , die kurzen Einzelfilamente sind durch Pfeile markiert.

### 3.3.3.9 GTPase-Test

Der Nachweis der GTPase-Aktivität des löslichen rekombinanten HisMtFtsZ1a wurde zunächst als gekoppelter fluorimetrischer Nachweis nach Sossong et al. (1999) geplant und nach einer Reihe von Vorversuchen als HPLC-Methode etabliert. Bei dem fluorimetrischen Nachweis handelte es sich um eine indirekte Bestimmung der Phosphatfreisetzung, die zur Bildung von 7-Methylguanin führte, verbunden mit einer Fluoreszenzabnahme. Durch einen

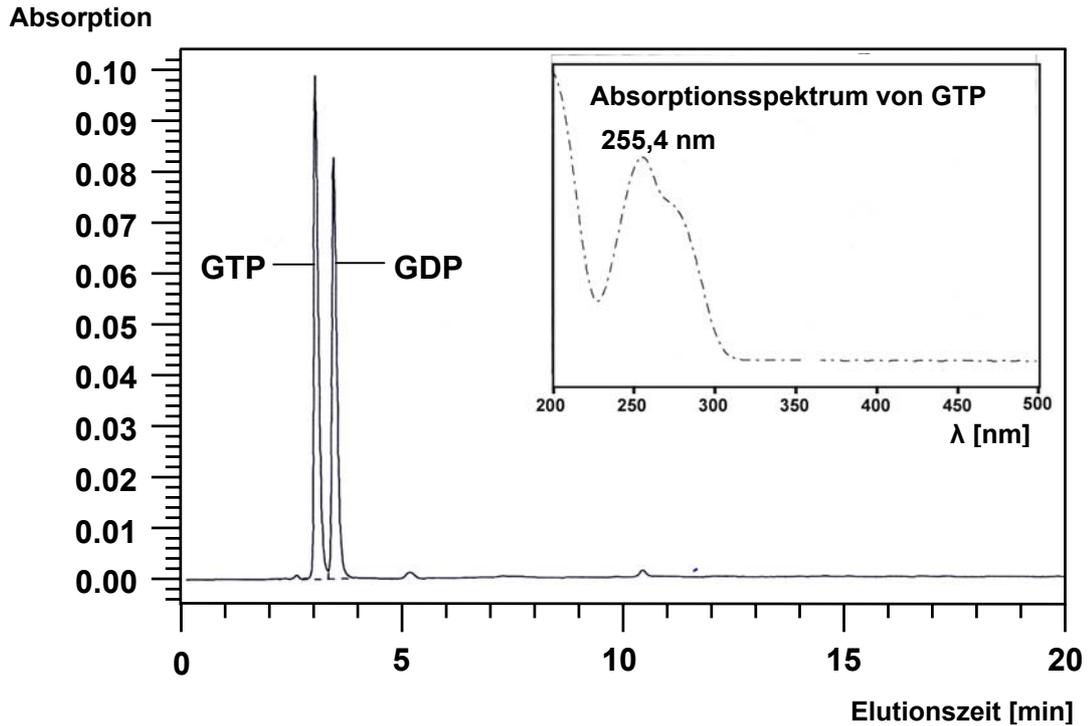
flachen Gradienten mit 1,5 % Phosphorsäure/Acetonitril war eine gute Trennung von Methylguanosin (Ausgangssubstanz) und Methylguanin (Produkt) zu erreichen. Auf Grund des aromatischen Charakters konnte auch die Absorption beider Substanzen mit einem Photodiodenarraydetektor (PAD) bestimmt werden, wodurch intensivere Signale erhalten wurden, als durch Fluoreszenzbestimmung. Da jedoch auch GTP und GDP über ihre Absorption im UV bestimmbar waren, wurde der direkte Nachweis dieser Verbindungen der gekoppelten Reaktion vorgezogen.

Die chromatographische Trennung von GDP und GTP gelang nach mehreren Versuchen mit verschiedenen Gradienten erst durch einen Gradienten aus 100 mM Phosphatpuffer pH 5/Acetonitril (siehe Abschnitt 2.2.15.1.; Abbildung 3.23). Vorversuche für die Entwicklung des GTPase-Assays wurden mit HisMtFtsZ1a durchgeführt, welches nach Glycerolzusatz Ausflockungen gezeigt hatte, jedoch noch eine geringe GTPase-Aktivität besaß. Die Zuordnung der Peaks für GTP und GDP wurde nach Kochromatographie mit den Standardverbindungen durch entsprechende Peakerhöhungen ermittelt. Abbildung 3.23 zeigt die Trennung der beiden Verbindungen und das Absorptionsspektrum von GTP.

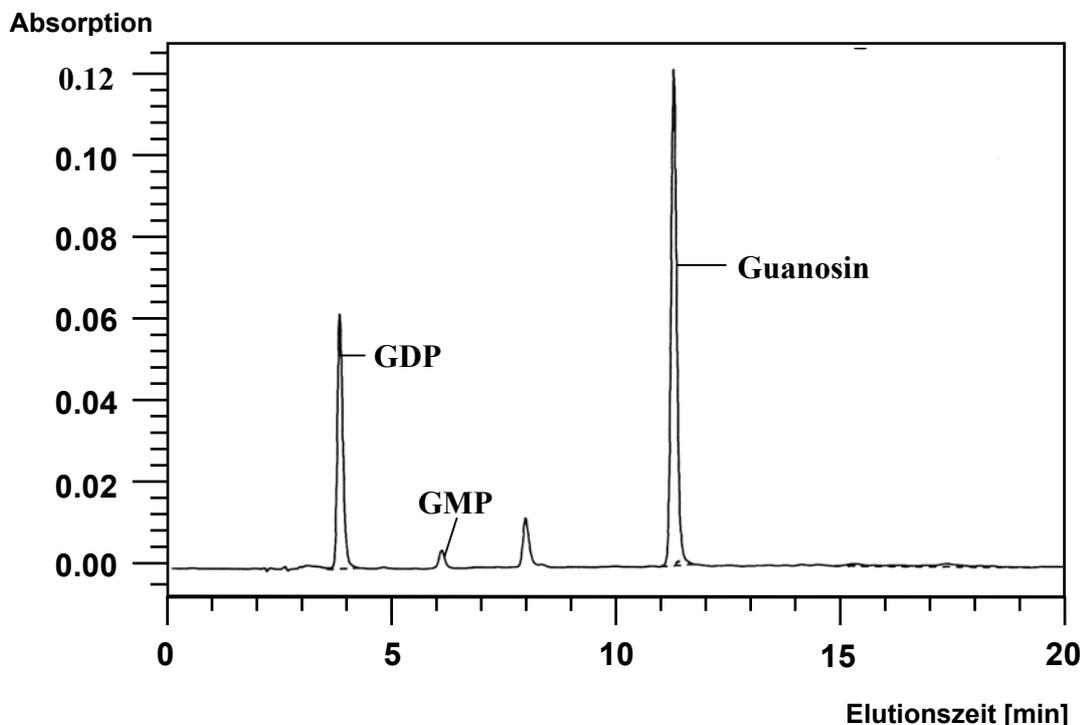
Aktivitätstests mit gereinigtem nativen HisMtFtsZ1a wurden zunächst wie bei der Selfassembly-Untersuchung mit 7,3  $\mu\text{M}$  (0,3 mg/ml) HisMtFtsZ1a, HEPES-Puffer (pH 7,5) und 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  durchgeführt. Die GTP-Konzentration wurde in Anlehnung an (Sossong et al., 1999) mit 200  $\mu\text{M}$  niedriger gewählt als für die TEM-Untersuchung der Protofilamentbildung (1 mM GTP). Nach Inkubation bei 37 °C erfolgte eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 95 °C.

Als Negativkontrolle fand jeweils die gleiche Behandlung ohne Protein und mit 0,4 mg/ml BSA statt. Ein Test mit 7,3  $\mu\text{M}$  (0,3 mg/ml) zuvor hitzebehandeltem HisMtFtsZ1a (10 Minuten 95 °C) zeigte, dass keine vollständige Inaktivierung des Proteins erreicht wurde. Nach 16 Stunden Inkubation des zuvor hitzebehandelten HisMtFtsZ1a bei 37 °C war ca. 30 % des GTP hydrolysiert. Unter den gleichen Bedingungen fand dagegen mit 0,4 mg/ml BSA anstelle von HisMtFtsZ1a nur 6 % und ohne Protein 10 % Hydrolyse des GTP statt. Durch Lagerung auf Eis nach der Hitzebehandlung von HisMtFtsZ1a konnte eine weitere GTP-Hydrolyse nach Beendigung der Assays vermieden werden. Deshalb wurden die Proben bei der Untersuchung der Zeitkinetik und Sättigungskinetik bis zur Aufgabe in die HPLC auf Eis gelagert. Die GTP-Hydrolyse wurde durch Vergleich der Peakflächen von GTP und GDP bestimmt.

In Gegenwart von 7,3  $\mu\text{M}$  (0,3 mg/ml) HisMtFtsZ1a war bereits nach 30 Minuten die gesamte GTP-Menge hydrolysiert. Außerdem bildete sich neben GDP ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von ca. 11 Minuten (Abbildung 3.24). Dabei handelte es sich nicht wie zunächst vermutet um GMP, sondern um Guanosin, was durch Kochromatographie mit den Standardsubstanzen festgestellt wurde. Die entstandene GMP-Menge war nach 16 Stunden Inkubation bei 37 °C hingegen gering (Abbildung 3.24). Um festzustellen, ob Guanosin durch spontane Hydrolyse von GTP oder GDP entstanden war, wurde eine Inkubation von jeweils 200  $\mu\text{M}$  GDP und GTP in Testpuffer bei 37 °C über 17 Stunden durchgeführt, gefolgt von einem zehnminütigen Erhitzen auf 95 °C. Sowohl GDP als auch GTP zeigten unter diesen Bedingungen keine signifikante Hydrolyse. Demnach musste die Entstehung von Guanosin auf die Aktivität von HisMtFtsZ1a zurückzuführen sein.



**Abbildung 3.23** HPLC-Trennung eines GTPase-Testansatzes mit 2  $\mu\text{M}$  (0,085 mg/ml) HisMtFtsZ1a, 200  $\mu\text{M}$  GTP und 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  nach 15 min Inkubation bei 37 °C unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.2.15.1). Im eingefügten Kasten ist das Spektrum von GTP dargestellt. Die Identität der Peaks wurde durch Kochromatographie mit Standardsubstanzen (UV/Vis-Absorption) bestimmt.



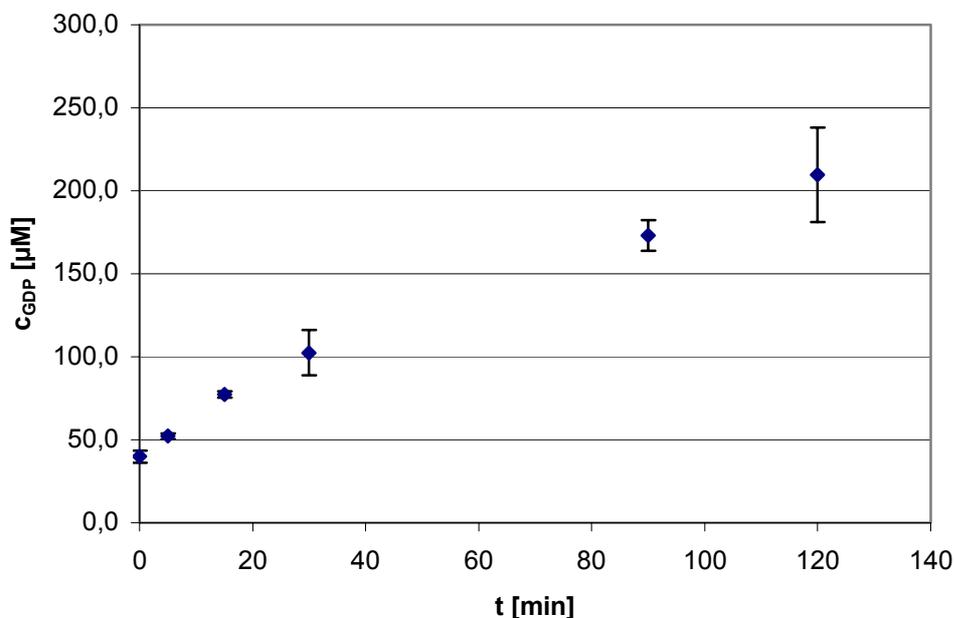
**Abbildung 3.24** HPLC-Diagramm nach 16 h Inkubation von 7,3  $\mu\text{M}$  (0,3 mg/ml) HisMtFtsZ1a mit 200  $\mu\text{M}$  GTP und 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  bei 37 °C, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung durch 10 min Behandlung bei 95 °C. Die Trennung fand über einen flachen Gradienten von 100 mM Phosphat (pH 5)/Acetonitril statt. Die Identität der Peaks wurde durch Kochromatographie mit den Standardsubstanzen bestimmt.

### 3.3.2.7.1 GTPase-Test: Zeitkinetik und Sättigungskinetik

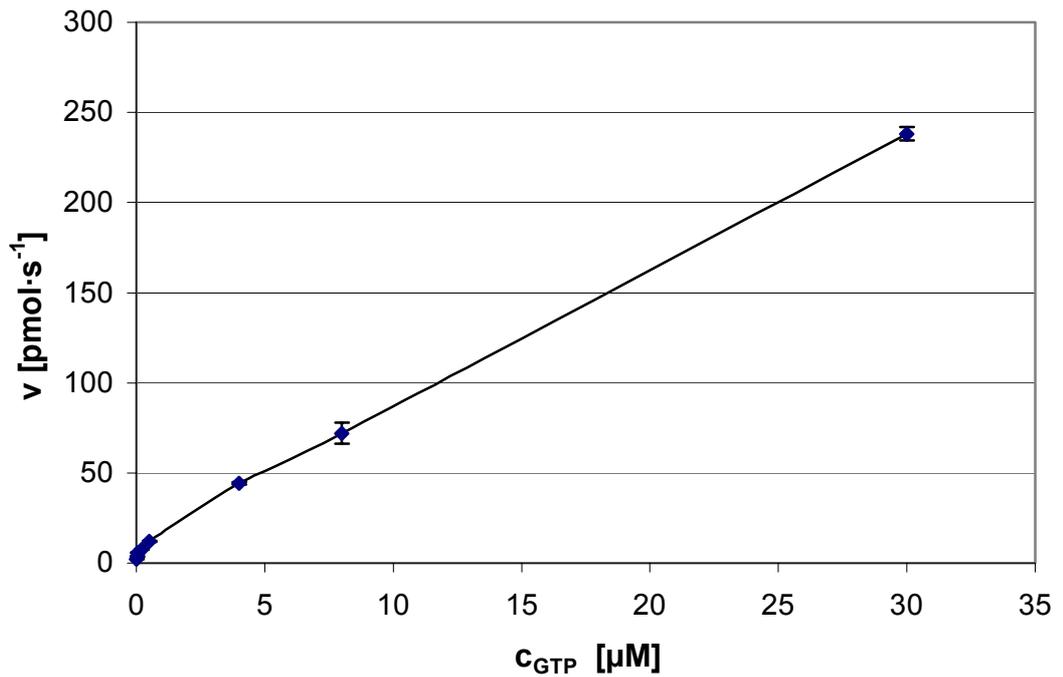
Wegen des sehr schnellen GTP-Umsatzes bei  $7,3 \mu\text{M}$  ( $0,3 \text{ mg/ml}$ ) HisMtFtsZ1a wurden für die Aufnahme einer Zeitkinetik nur  $2 \mu\text{M}$  ( $0,08 \text{ mg/ml}$ ) HisMtFtsZ1a eingesetzt. Die Durchführung des GTPase-Tests und die HPLC-Trennung fand unter Standardbedingungen in Testpuffer statt (Abschnitt 2.2.15.1). Durch die GTP-Zugabe (Endkonzentration  $200 \mu\text{M}$ ) wurde die Reaktion gestartet (siehe Abschnitt 2.2.15.1). Als Inkubationszeiten wurden 5, 15, 30, 90 und 120 Minuten gewählt. Der Extinktionskoeffizient des GDP wurde aus einer Eichreihe für verschiedene GTP-Konzentrationen übernommen (siehe Abschnitt 2.2.15.1). Abbildung 3.25 zeigt ein Diagramm mit der Darstellung der GDP-Entstehung in Abhängigkeit von der Zeit. Aus diesem Diagramm wurde entnommen, dass sich eine Inkubationszeit von 15 Minuten im linearen Bereich der Reaktion befand. Diese Zeit wurde als Grundlage für die Durchführung einer Sättigungskinetik verwendet.

Eine Untersuchung zur GTP-Sättigung des HisMtFtsZ1a-Proteins wurde unter den im vorigen Abschnitt ermittelten Bedingungen durchgeführt. Jeweils  $2 \mu\text{M}$  ( $0,08 \text{ mg/ml}$ ) HisMtFtsZ1a wurde 15 Minuten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  mit GTP in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  bis  $30 \text{ mM}$  inkubiert.

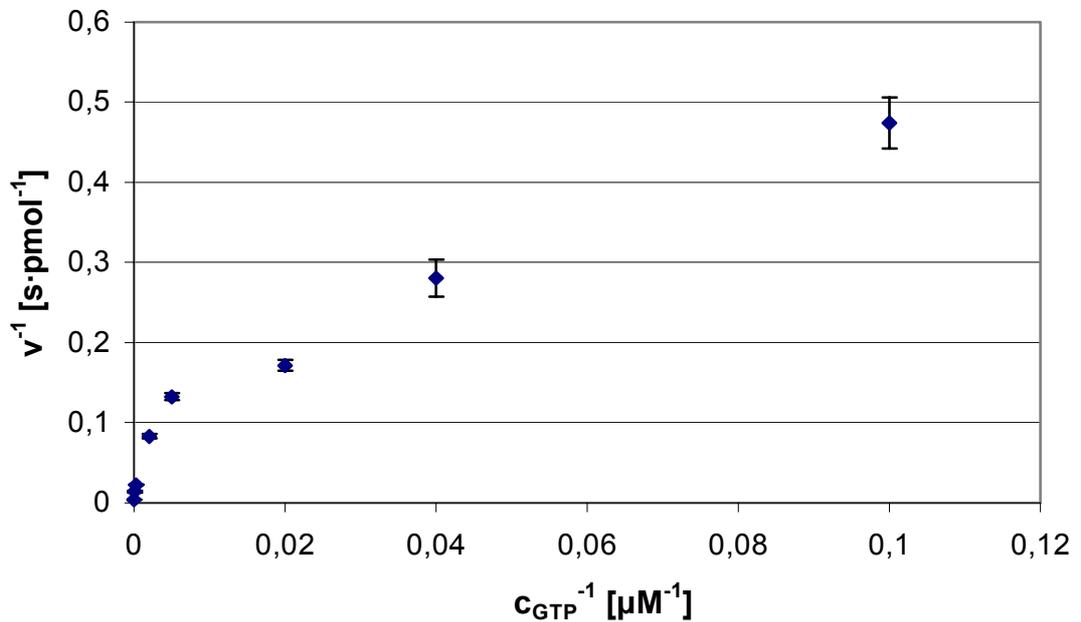
Es zeigte sich, dass bis zu einer GTP-Konzentration von  $30 \text{ mM}$  keine Sättigung erreichbar war. Die GTP-Hydrolyse nahm dabei etwa ab  $0,4 \text{ mM}$  GTP proportional zur GTP-Konzentration zu (Abbildung 3.26). Eine Auftragung der Daten nach Lineweaver-Burk ( $v^{-1}/c_{\text{GTP}}^{-1}$ ) ergab nur bei den vier niedrigsten GTP-Konzentrationen ( $10$  bis  $200 \mu\text{M}$ ) eine annähernd lineare Korrelation (Abbildung 3.27). Diese Gerade wurde extrapoliert und aus den Schnittpunkten mit der X-Achse und der Y-Achse die scheinbaren  $K_{\text{M}}$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte bestimmt (Abbildung 3.28). Für  $2 \mu\text{M}$  HisMtFtsZ1a ( $0,08 \text{ mg/ml}$ ) betrug demnach bei  $\text{pH } 7,5$  und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  der scheinbare  $K_{\text{M}}$ -Wert  $32 \mu\text{M}$  GTP. Dieser Wert liegt annähernd in der Größenordnung für FtsZ aus *E. coli* ( $K_{\text{M}}$ :  $82 \mu\text{M}$  GTP für  $5 \mu\text{M}$  FtsZ; (Sossong et al., 1999)). Für die scheinbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  wurde ein Wert von  $8,8 \text{ pmol/s}$  berechnet. Auf das Proteingewicht bezogen bedeutet das einen Wert von  $1,05 \mu\text{kat/mg}$  Protein.



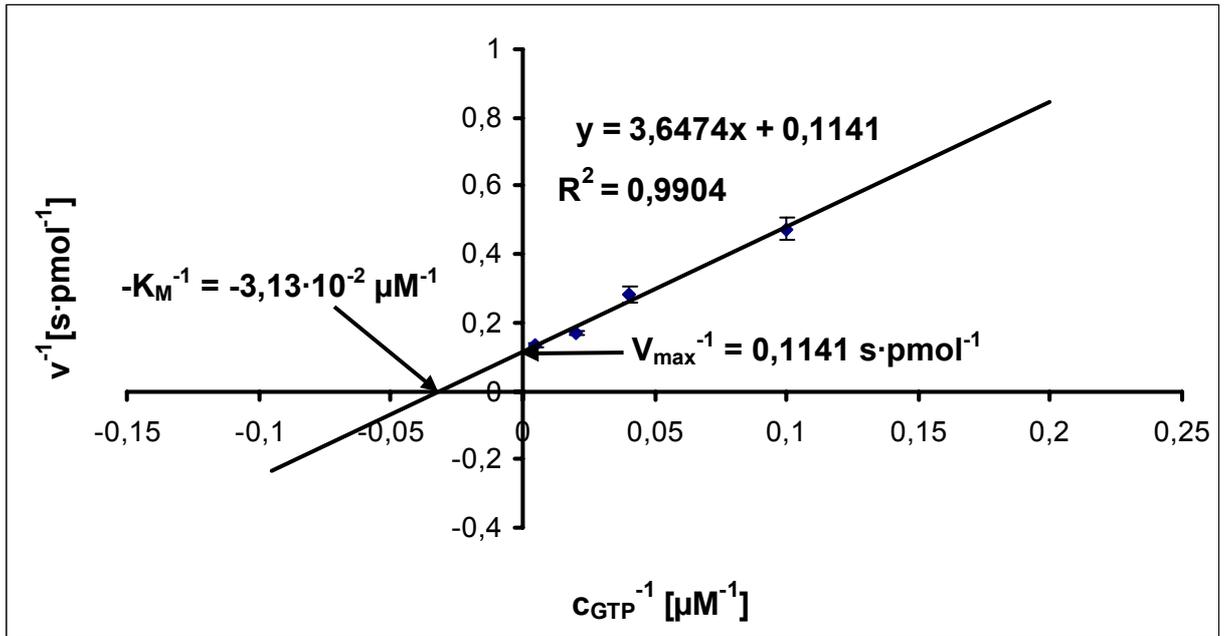
**Abbildung 3.25** GTPase-Zeitkinetik: Diagramm der GDP-Entstehung in Abhängigkeit von der Zeit. Die Bestimmung der GTPase-Aktivität wurde mit  $2 \mu\text{M}$  HisMtFtsZ1a und  $200 \mu\text{M}$  GTP unter Standardbedingungen über HPLC (Abschnitt 2.2.15.1) durchgeführt. Den Werten sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken zugeordnet.



**Abbildung 3.26** Direkte Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der GTPase-Reaktion (Standardansatz mit  $2 \mu\text{M}$  HisMtFtsZ1a) gegen die eingesetzte GTP-Konzentration ( $10 \mu\text{M}$  bis  $30 \text{mM}$ ) nach HPLC-Bestimmung unter Standardbedingungen (2.2.15.1). Den Werten sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken zugeordnet.



**Abbildung 3.27** Auftragung der reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit der GTPase-Reaktion (Standardansatz mit  $2 \mu\text{M}$  HisMtFtsZ1a) gegen die reziproken Werte der eingesetzten GTP-Konzentration ( $10 \mu\text{M}$  bis  $30 \text{mM}$ ) nach HPLC-Bestimmung unter Standardbedingungen (2.2.15.1) nach Lineweaver-Burk. Den Werten sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken zugeordnet.



**Abbildung 3.28** Auftragung der reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit der GTPase-Reaktion (Standardansatz mit 2  $\mu\text{M}$  HisMtFtsZ1a) gegen die reziproken Werte der eingesetzten GTP-Konzentration (10  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$ ; das heißt, die 4 niedrigsten Konzentrationen von Abbildung 3.27) nach HPLC-Bestimmung unter Standardbedingungen (2.2.15.1) nach Lineweaver-Burk. Den Werten sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken zugeordnet. Aus dem Schnittpunkt mit der X-Achse wurde ein scheinbarer  $K_M$ -Wert von 32  $\mu\text{M}$  GTP und aus dem Schnittpunkt mit der Y-Achse eine scheinbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 8,8 pmol/s (1,05  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) errechnet.

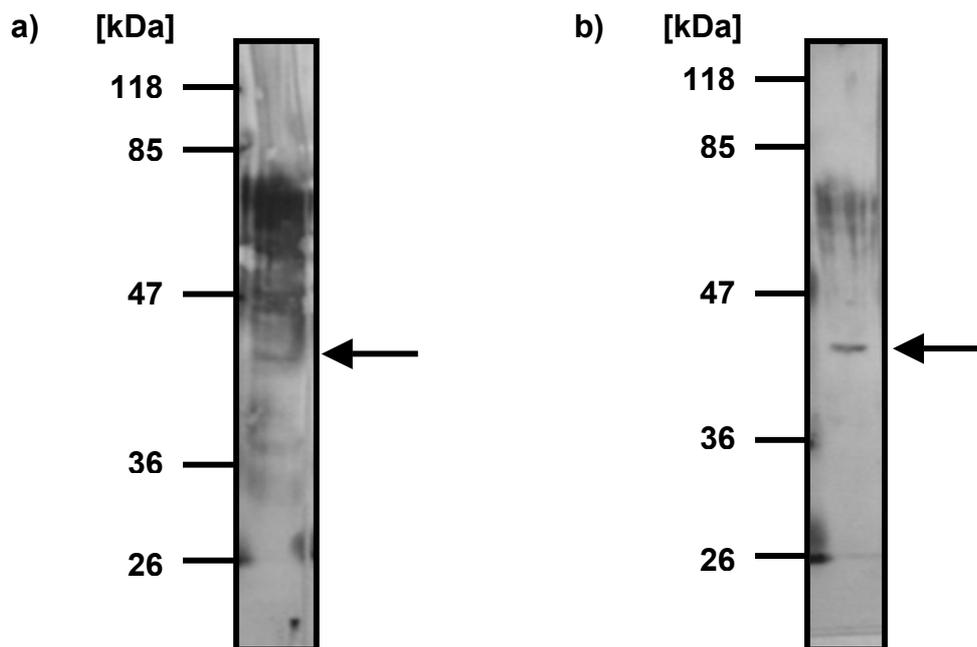
### 3.3.4 Immunlokalisierung von MtFtsZ1 in *M. truncatula*

#### 3.3.4.1 Erzeugung von heterologen $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörpern in Kaninchen

Für die Immunisierung von zwei Kaninchen zur Antikörperproduktion wurde die Proteinproduktion im Expressionsstamm RPeT28MtFtsZ1 sieben Stunden bei 37 °C mit IPTG induziert. Das unlösliche Protein wurde wie in Abschnitt 3.3.3.6 beschrieben als Inclusion Bodies nach Rudolph et al. (1997) isoliert und solubilisiert. Das erhaltene Protein wurde über Ni-NTA-Spinsäulchen affinitätsgereinigt (siehe Abschnitt 3.3.3.5) und anschließend über Centricon YM-10 konzentriert. Danach wurde eine SDS-PAGE mit einem 10-prozentigem Gel (16 x 16 cm) durchgeführt. Pro Bahn wurden 100  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Die jeweils stärkste Bande (mindestens 70  $\mu\text{g}$  Protein) in annähernd der erwarteten Größe wurde ausgeschnitten und an Eurogentec geschickt. Eurogentec führte eine vierfache Immunisierung von 2 Kaninchen (SA3084 und SA3085) durch (siehe Abschnitt 2.2.16.1). Im Western Blot wurde durch beide Antiseren (Verdünnung 1:3.000) bei 100 ng aufgereinigtem HisMtFtsZ1 eine starke und zwei schwächere Banden in der gleichen Größe wie durch den  $\alpha$ -6xHis-Antikörper detektiert. In den Bahnen mit 200 ng Gesamtprotein aus RPeT28MtFtsZ1 und 8  $\mu\text{g}$  Blattprotein von *M. truncatula* konnte keine Bande in der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Deshalb wurde zur Erhöhung der Spezifität eine Affinitätsreinigung der Antikörper durchgeführt. Da mit Präimmunsereum von Kaninchen SA3084, nicht aber mit Präimmunsereum von Kaninchen SA3085, im Western Blot mit Bakterienextrakt schwache unspezifische Banden auftraten, wurde das Antiserum von SA3085 weiterverwendet.

### 3.3.4.2 Aufreinigung des $\alpha$ -MtFtsZ1-Kaninchen-Antiserums an Affinitätssäulen

Eine Affinitätsaufreinigung der Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper wurde mit Ni-NTA-Spin-säulchen nach der in der Dissertation von Fester (1996) beschriebenen Methode in Anlehnung an Gu et al. (1994) unter Verwendung solubilisierter IB durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.17.1) Ein Vergleich der Spezifität des ungereinigten Serums im Vergleich zum affinitäts-gereinigten Antikörper ist in Abbildung 3.29 am Beispiel des Nachweises von FtsZ1 im Blattprotein von *M. truncatula* dargestellt. Der affinitätsgereinigte Antikörper erkannte im Blattprotein eine Bande in der erwarteten Größenordnung, während das ungereinigte Serum eine stärkere Kreuzreaktivität zeigte. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass der gereinigte Antikörper eine ausreichende Spezifität für eine mikroskopische Immunlokalisierung aufwies.

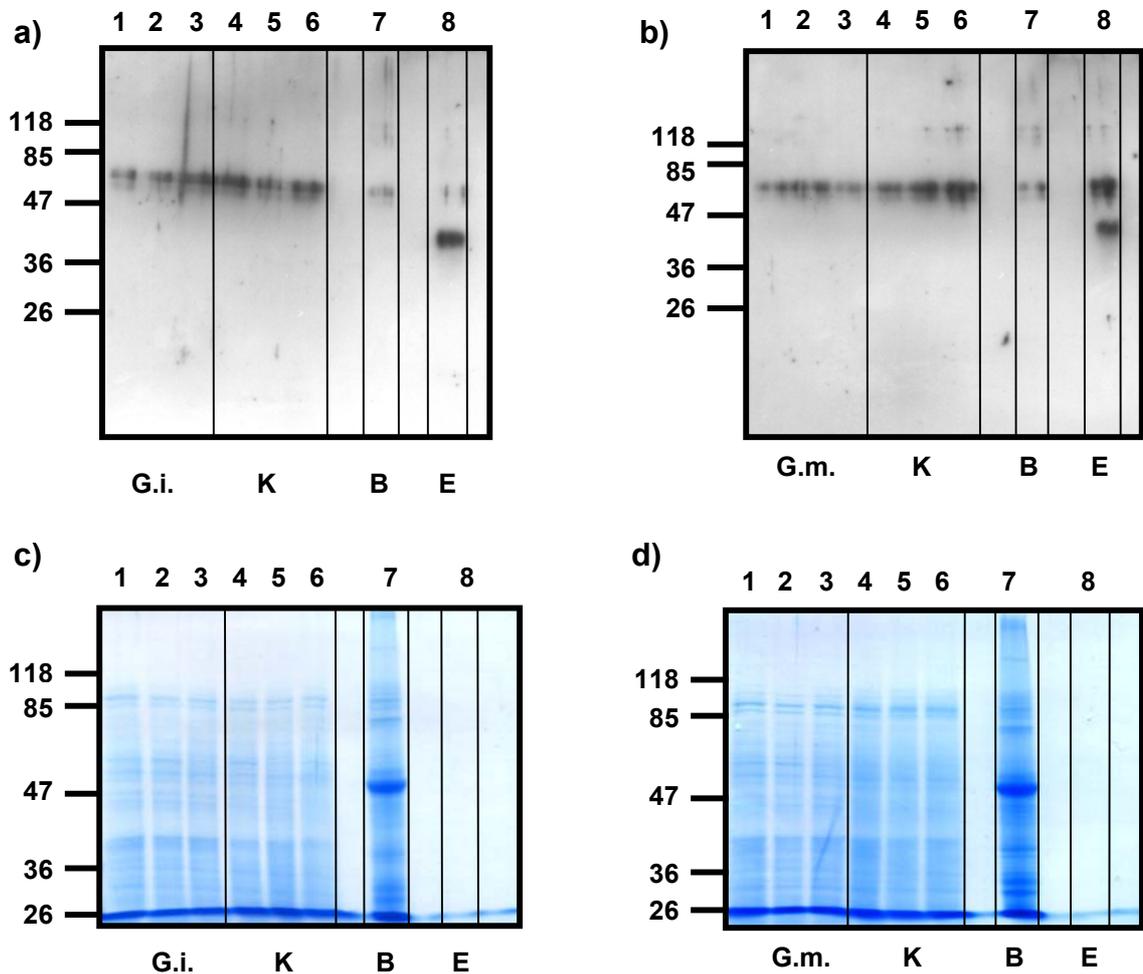


**Abbildung 3.29** Vergleich des Nachweises von FtsZ1 im Gesamtprotein aus Blättern von *M. truncatula* im Western Blot (Detektion mit dem ECL-Plus-System) mit einer 1:500 Verdünnung a) des nicht gereinigten  $\alpha$ -MtFtsZ1-Kaninchen-Antiserums (SA3085) und b) des  $\alpha$ -MtFtsZ1-AKs nach Reinigung über Affinitätssäulchen. Das Blattprotein wurde nach Meyer et al. (1988) isoliert. Die Bande in der erwarteten Größe (ca. 38 kDa) wurde mit einem Pfeil markiert.

### 3.3.4.3 Detektion von MtFtsZ1 in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper im Western Blot

Zur Untersuchung, ob in Korrelation zur Plastidenvermehrung um Arbuskeln FtsZ1 als Plastidenteilungsprotein in mykorrhizierten Wurzeln in erhöhter Menge vorlag, wurde der affinitätsgereinigte Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper in einer Western Blot-Analyse eingesetzt. Dafür wurde lösliches Protein aus *M. truncatula*-Wurzeln und -Blättern nach der in Abschnitt 2.2.8.6 beschriebenen Methode isoliert. Als Vergleich diente 1  $\mu$ l einer 1:100 Verdünnung der 2. Elutionsfraktion von löslichem HisMtFtsZ1a nach Reinigung über Ni-NTA Spin-säulchen. Diese Menge entsprach ca. 1 ng Protein und war im Coomassieblau gefärbten PAG nicht mehr detektierbar. Die Menge an FtsZ1 in 14  $\mu$ g löslichem Protein aus Wurzeln und Blättern von *M. truncatula* lag aber offensichtlich noch darunter (Abbildung 3.30). Anstelle einer Bande in der erwarteten Größe von 38 kDa wurden mehrere Banden von einem scheinbaren Molekulargewicht von 65 kDa detektiert. In Abbildung 3.30 b deuten sich auch noch Banden mit einem höheren Molekulargewicht an (Bahn 6,7 und 8). Eine erhöhte FtsZ1-Proteinmenge (in den 10 Wochen alten mykorrhizierten Wurzeln) gegenüber Kontrollwurzeln

konnte nicht festgestellt werden. Die detektierte FtsZ1-Bande aus Blattextrakten war in diesem Fall nur sehr schwach. Meistens wurde jedoch im Proteinextrakt aus Blättern eine höhere FtsZ1-Menge gefunden als in Wurzeln.



**Abbildung 3.30** ECL-Detektion von MtFtsZ1 in löslichem Protein (14  $\mu$ g pro Bahn) aus *M. truncatula* nach Markierung mit dem aufgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-AK. Die Western Blots sind in a) und b) dargestellt, die dazugehörigen Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgele in c) und d).

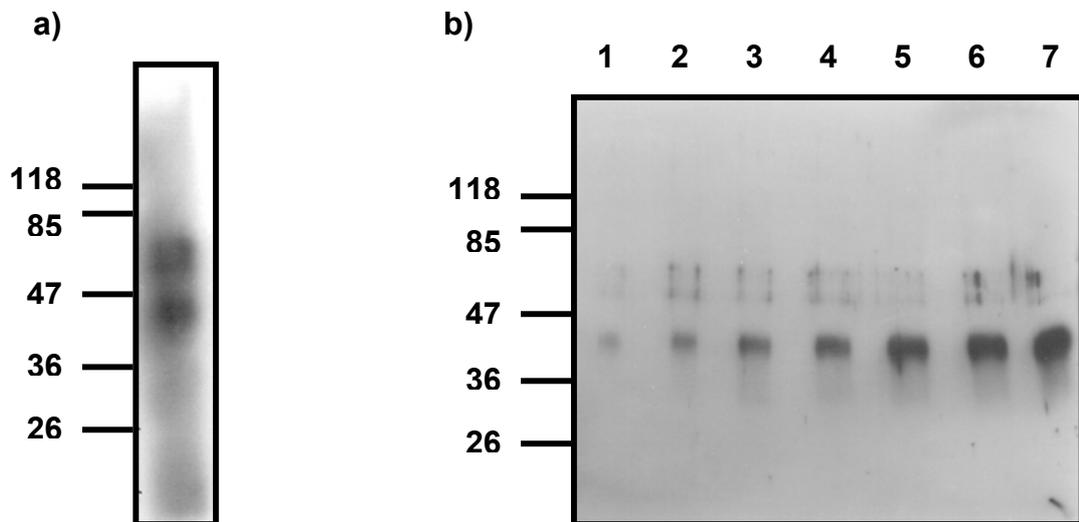
Gi = 10 Wochen mit *G. intraradices* mykorrhizierte Wurzeln; Gm = 10 Wochen mit *G. mosseae* mykorrhizierte Wurzeln; B = Blatt; E = 1  $\mu$ l einer 1:100 Verdünnung der zweiten Elutionsfraktion nach Aufreinigung von löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a über Ni-NTA Spinsäulen als Vergleich (ca. 1 ng)

#### 3.3.4.4 Erzeugung heterologer $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper in Meerschweinchen und Affinitätsreinigung

Eine Möglichkeit für die Visualisierung von Wurzelplastiden war die Detektion eines nur in Plastiden vorkommenden Proteins. Zur Immunlokalisierung des plastidären Enzyms DXR (siehe Abschnitt 1.1.3) aus Mais konnte dafür ein Kaninchen-Antiserum verwendet werden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Joachim Hans). Für eine Kolorisierung von FtsZ1 mit diesem Protein in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* war der Einsatz von Primärantikörpern aus zwei unterschiedlichen Organismen erforderlich. Deshalb fand zusätzlich eine Immunisierung von Meerschweinchen statt. Für die Immunisierung wurde in diesem Fall unlösliches rekombinantes HisMtFtsZ1a-Protein ohne putative Plastidensignalsequenz nach Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Spinsäulen und PAGE-Auftrennung als Gelstückchen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.16.1). Durch Eurogentec wurde die vierfache

Immunisierung von zwei Meerschweinchen (SA271 und SA272) mit jeweils ca. 25 µg Protein über einen Zeitraum von drei Monaten durchgeführt.

Eine Erhöhung der Spezifität des Meerschweinchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörpers durch Reinigung über Affinitätssäulen, wie in Abschnitt 3.3.4.2 beschrieben, war nicht erfolgreich. Sowohl im Western Blot, als auch nach Immunlokalisierung im Blatt zeigten sich weitgehend unspezifische Signale. Aus diesem Grund wurde versucht, eine Affinitätsreinigung wie in der Dissertation von Hans (2003) beschrieben, durchzuführen (siehe Abschnitt 2.2.17.2). In Abbildung 3.31 ist die Detektion von löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a mit ungereinigtem Antiserum und nach der Reinigung über einen Affinitätsblot dargestellt. Die Signale waren mit dem ungereinigten Antiserum stärker (Abbildung 3.31 a), mit dem gereinigtem Antikörper konnte HisMtFtsZ1a jedoch als Hauptbande annähernd in der erwarteten Größe (41,8 kDa) nachgewiesen werden (Abbildung 3.31 b). Dieses Signal erhöhte sich in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration von ca. 1 ng bis 7 ng HisMtFtsZ1a. Ein Western Blot mit löslichem Protein aus *M. truncatula* zeigte schwächere Signale als nach Einsatz des gereinigten Kaninchen-Antikörpers bei der gleichen Auftragung wie in Abbildung 3.30. Auch hier zeigten sich nur Banden in einem höheren Molekulargewichtsbereich als erwartet. Ein Vergleich der FtsZ1-Menge in zehn Wochen alten mykorrhizierten Wurzeln und Kontrollwurzeln war auch in diesem Falle nicht möglich.

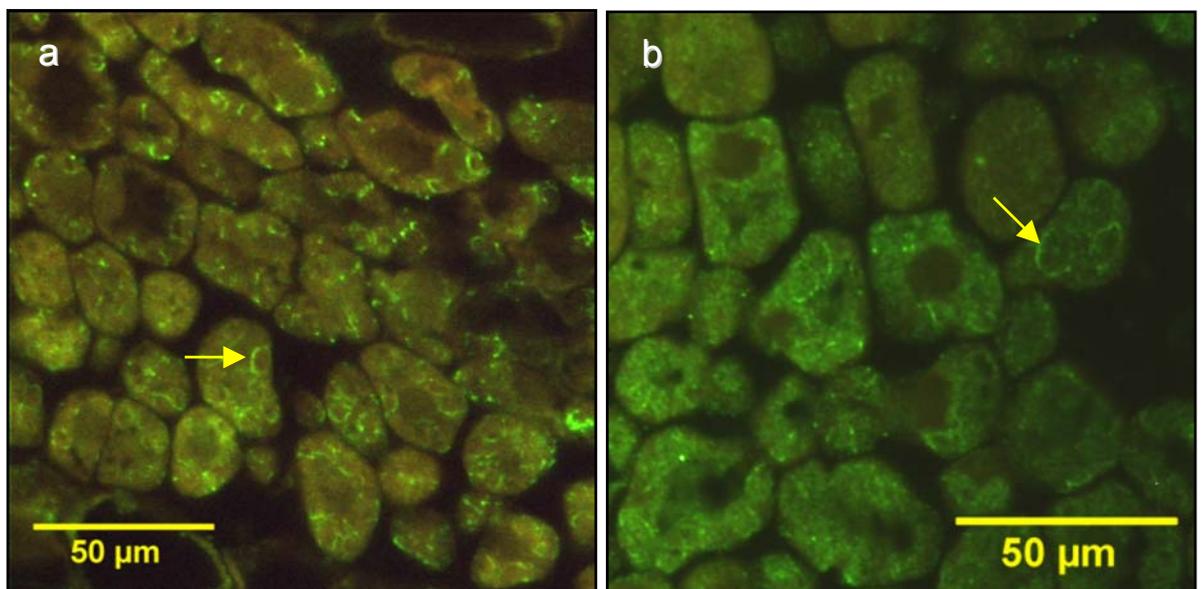


**Abbildung 3.31** ECL-Detektion der zweiten Elutionfraktion nach Aufreinigung von löslichem rekombinanten HisMtFtsZ1a über Ni-NTA-Spinsäulen. a) mit ungereinigtem  $\alpha$ -MtFtsZ1a-Antiserum von Meerschweinchen SA 272 (1:1.000) b) mit dem Meerschweinchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-AK nach Aufreinigung über einen Affinitätsblot (1:1.000) (Siehe Abschnitt 2.2.17.2). Die Proteinmenge entsprach bei a) und Bahn 1 in b) ca. 1 ng, die weiteren Bahnen in b) enthielten jeweils ca. 2, 3, 4, 5, 6, und 7 ng Protein.

### 3.3.4.5 Detektion von FtsZ1-Ringen in Blättern von *M. truncatula*

Die Detektion der typischen FtsZ1-Teilungsringe in Blattmesophyllzellen von *M. truncatula* mit den gereinigten  $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörpern aus Kaninchen und Meerschweinchen diente unter anderem als Nachweis für die Antikörperspezifität. In Proben, die mit 3 % Paraformaldehyd fixiert wurden, zeigten sich ringartige Strukturen hauptsächlich in der Nähe der Schnittflächen (Abbildung 3.32), nicht aber in tiefer liegenden Bereichen. Das deutete auf eine hohe Instabilität der FtsZ1-Polymere hin, offensichtlich war eine sofortige Fixierung für den Erhalt der Ringstrukturen notwendig. Um ein schnelleres Eindringen und damit einen schnelleren Kontakt mit dem Fixativ zu erreichen, wurde in weiteren Versuchen eine MSB-Fixierungslösung (MSB = Mikrotubuli stabilisierender Puffer) mit DMSO, Triton und 4 % Paraformaldehyd verwendet (siehe Abschnitt 2.2.19.1). Damit gelang eine Verbesserung der Fixierung,

aber ringartige Strukturen waren auch in jüngeren, noch nicht entfaltenen Blättern oft nur in der Nähe der Schnittflächen detektierbar. Die sofortige Eliminierung von Lufteinschlüssen war für den Kontakt mit Fixierungspuffer ein weiterer kritischer Punkt. Trotz sofortiger Vakuumbehandlung im Exsikkator war keine durchgängige Sofortfixierung zu erreichen. In Abbildung 3.32 sind FtsZ1-Markierungen durch den über Affinitätsäulchen gereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper (Abbildung 3.32 a) und den über Affinitätsblot gereinigten Meerschweinchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper (Abbildung 3.32 b) gezeigt. In beiden Fällen sind ringartige Strukturen zu erkennen, die auf sich teilende Chloroplasten hinweisen und die Spezifität der Antikörper zeigen. Die punktförmigen grünen Signale in Abbildung 3.29 b könnten auf eine unzureichend schnelle Fixierung oder auf eine geringere Spezifität im Vergleich zu dem Kaninchen-Antikörper hindeuten. Der mittlere Durchschnitt der Ringe betrug nach Detektion mit dem Kaninchen-Antikörper ca. 6  $\mu$ m (zehn Messungen) und mit dem Meerschweinchen-Antikörper ca. 9  $\mu$ m (vier Messungen). Weil das Chlorophyll durch die Ethanolbehandlung (siehe Abschnitt 2.2.19.1) ausgewaschen wurde, konnte seine rote Fluoreszenz hier nicht zur Visualisierung der Chloroplasten genutzt werden.



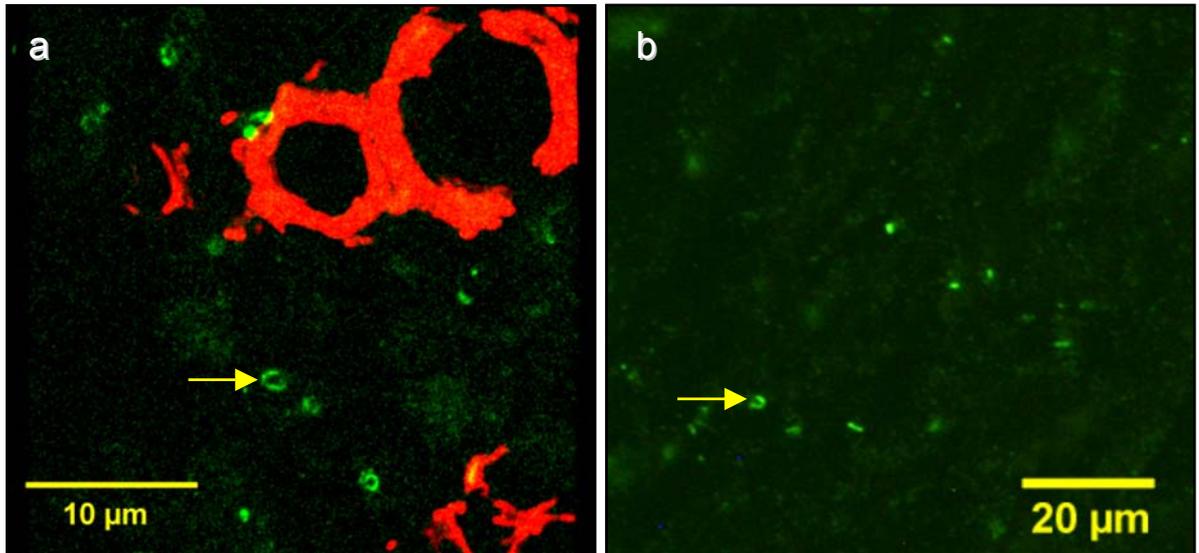
**Abbildung 3.32** FtsZ1-Ringe (grün) in Blattmesophyllzellen von *M. truncatula*; fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 2  $\mu$ m-Schnitten. Beispiele für Ringstrukturen wurden mit einem Pfeil markiert. Der 2. AK war jeweils an Alexa Fluor 488 gekoppelt.

- a) Markierung mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1 Antikörper (1:500)
- b) Markierung mit dem affinitätsgereinigten Meerschweinchen: $\alpha$ -MtFtsZ1 AK (1:500)

#### 3.3.4.6 Detektion von FtsZ1 in nichtmykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen-Antikörper

Mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1 Antikörper konnte FtsZ1 in nicht mykorrhizierten Wurzeln meist nur in Form punktchenartiger Signale detektiert werden. In einigen Fällen war es jedoch möglich, ringartige Strukturen zu detektieren (Abbildung 3.33). Wegen der geringen Größe konnten diese Formen jedoch erst mit der stärksten Vergrößerung (100er Objektiv) im Mikroskop erkannt werden. In Übereinstimmung mit der hohen Plastidendichte im Zentralzylinder (siehe Abbildung 3.5) wurden solche Ringe fast ausschließlich im Zentralzylinder beobachtet, was auf eine erhöhte Teilungsaktivität der Plastiden in diesem Bereich hindeutete (Abbildung 3.33 a). In Abbildung 3.33 a sind im Zentralzylinder grün markierte ringartige FtsZ1-Strukturen sowie rot markierte Xylemgefäße (Autofluoreszenz nach Anregung mit 543 nm) zu erkennen. Der Durchmesser der FtsZ1-Ringe im Zentralzylinder der Wurzel war mit durchschnittlich 0,9  $\mu$ m (fünf Messungen) deutlich kleiner als im

Blatt (6 bis 9  $\mu\text{m}$ ), was der geringeren Plastidengröße in Wurzeln entspricht. In der Wurzelspitze zeigten sich FtsZ1-Ringe ebenfalls gehäuft im Bereich des Zentralzylinders (Abbildung 3.33 b) mit vergleichbarer Ringgröße wie in Abbildung 3.33 a.



**Abbildung 3.33** FtsZ1-Detektion mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-AK (1:500) a) im Wurzelzentralzylinder (20  $\mu\text{m}$ -Schnitt) und b) in einer Wurzelspitze (2  $\mu\text{m}$ -Schnitt) von *M. truncatula*. Als zweiter AK wurde Ziege: $\alpha$ -Kaninchen IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (1:500) verwendet. Der Pfeil weist jeweils auf einen FtsZ1-Ring hin.

a) CLSM Projektion aus 22 Einzelbildern. FtsZ1-Signale sind durch die Falschfarbe Grün dargestellt, die Autofluoreszenz der Xylemgefäße durch die Falschfarbe Rot.

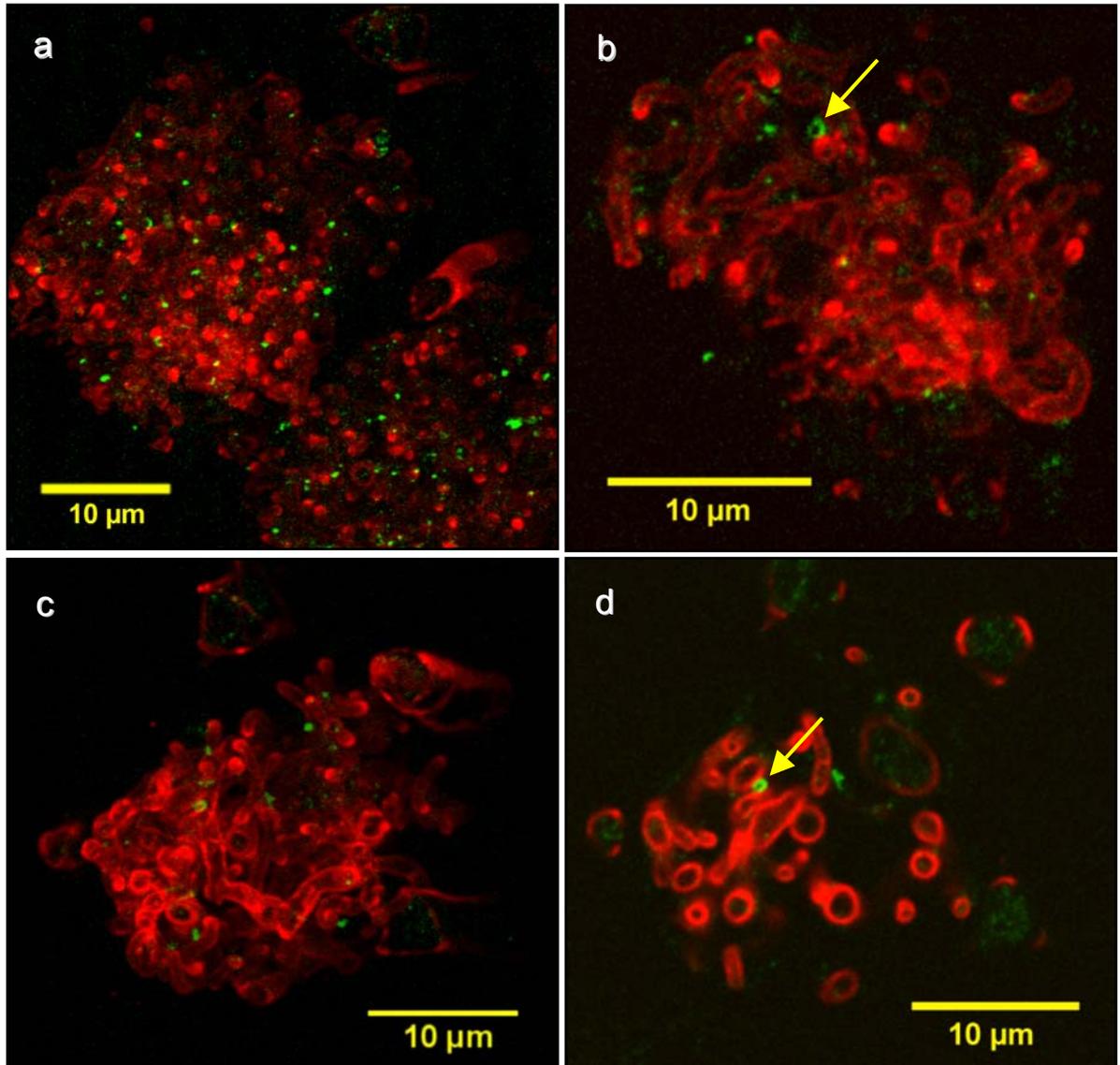
b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme: FtsZ1-Strukturen sind durch grüne Fluoreszenz sichtbar.

#### 3.3.4.7 Detektion von FtsZ1 in mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen-Antikörper

Im Gegensatz zu nichtkolonisierten Wurzelrindenzellen konnten in der Umgebung intakter Arbuskeln in kolonisierten Rindenzellen MtFtsZ1-Signale nach Immunlokalisierung mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper detektiert werden. Die Pilzstrukturen wurden durch Fluoreszenzmarkierung mit WGA-TRITC sichtbar gemacht, wie bei Harrison et al. (2002) und in der Dissertation von Hans (2003) beschrieben. In den meisten Fällen wurde eine Vermehrung punktförmiger Signale insbesondere um feinverästelte Arbuskeln beobachtet, die vermutlich ein jüngeres Stadium repräsentierten.

In einigen Fällen war es möglich, ringartige Strukturen zu markieren. Abbildung 3.34 a zeigt eine Projektion, 3.34 b einen einzelnen optischen Schnitt einer Arbuskel mit feinverästelten Strukturen. FtsZ1-Signale wurden gehäuft in der Umgebung der feinen Äste und deren Enden detektiert. Diese Arbuskel repräsentierte vermutlich ein jüngeres Stadium als die in Abbildung 3.34 c und 3.34 d dargestellte Arbuskel mit dickeren, weniger verzweigten Hyphen und einer geringeren Anzahl an FtsZ1-Signalen.

Allgemein wurde festgestellt, dass FtsZ1-Signale am häufigsten in der Umgebung von Arbuskeln mit fein verästelter Struktur und schmalen Hyphen auftraten. Dabei waren in der Umgebung des Arbuskelstamms weniger Signale als im Bereich der Äste sichtbar. Die Anzahl dieser Signale verringerte sich zunehmend in Umgebung von Arbuskeln mit dickeren Ästen, die wahrscheinlich ein älteres Stadium repräsentierten. In Zellen mit degenerierten zusammengeklumpten Arbuskeln wurde kein FtsZ1 mehr detektiert.



**Abbildung 3.34** CLSM-Aufnahmen der FtsZ1-Detektion (Falschfarbe Grün) in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula*. Der Pilz wurde mit WGA-TRITC markiert und durch die Falschfarbe Rot dargestellt. Beispiele für ringartige Strukturen wurden mit einem Pfeil markiert. Die Detektion von FtsZ1 wurde mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-AK (1:500) und dem zweiten AK Ziege: $\alpha$ -Kaninchen IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen; 1:500) durchgeführt.

- a) fein verästelte, vermutlich jüngere Arbuskel; Projektion aus 30 optischen Schnitten
- b) einzelner optischer Schnitt der Arbuskel in a)
- c) Arbuskel mit dickeren Ästen; Projektion aus 22 optischen Schnitten
- d) einzelner optischer Schnitt der Arbuskel in c)

#### 3.3.4.8 Kolokalisierungsversuch von FtsZ1 und GFP in Plastiden von mykorrhizierten, ptGFP-transformierten Wurzeln von *M. truncatula*

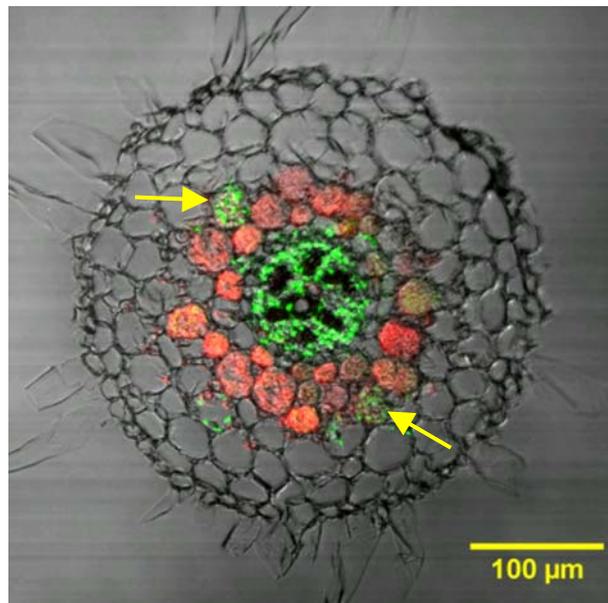
Ein Versuch zur gleichzeitigen Visualisierung von FtsZ1 und Plastiden wurde durch die Immunlokalisierung von FtsZ1 und GFP in *M. truncatula*-Wurzeln nach Wurzeltransformation mit dem ptGFP-Konstrukt (siehe Abschnitt 2.1.5), wie in Abschnitt 2.2.4.4 und 2.2.4.6 beschrieben, durchgeführt.

Die GFP-Markierung der Plastiden konnte nach der PEG-Einbettung nicht direkt zur Visualisierung verwendet werden, weil die grüne Fluoreszenz nur im Zentralzylinder erhalten blieb. Um eine gleichzeitige Markierung von FtsZ1 mit dem Kaninchen-Antikörper zu ermöglichen, wurde die GFP-Markierung mit einem Anti-GFP-Mausantikörper durchgeführt. Wegen der

im Zentralzylinder erhalten gebliebenen grünen GFP-Fluoreszenz wurde ein grün fluoreszierender Sekundärantikörper eingesetzt (Ziege:Anti-Maus IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488). Die Strukturen des Mykorrhizapilzes wurden wie in Abschnitt 3.3.4.7 beschrieben durch WGA-TRITC markiert.

Trotz der unmittelbar nach der fluoreszenzmikroskopischen Selektion auf grün fluoreszierende Plastiden stattfindenden Behandlung mit Fixierungspuffer gelang es nicht, in den entsprechenden PEG-Schnitten FtsZ1-Signale mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen: $\alpha$ -MtFtsZ1-Antikörper nachzuweisen. Wie in Abschnitt 3.3.4.5 geschildert, war eine Detektion von FtsZ1 nur durch sofortige Fixierung zu erreichen. Da zur sicheren Selektion GFP-markierter Plastiden auf eine Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht verzichtet werden konnte, erwies sich diese Methode zur gleichzeitigen Darstellung von Plastiden und FtsZ1-Teilungsringsen als ungeeignet.

Die Detektion der Plastiden mit dem Anti-GFP-Antikörper war jedoch erfolgreich. Damit konnte die Anordnung der Plastiden um Arbuskeln in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* deutlich besser als *in vivo* dargestellt werden. Durch die WGA-TRITC-Markierung wurden auch detaillierte Pilzstrukturen sichtbar. Außerdem konnte eine mögliche Verfälschung der Strukturen durch Bewegung der Organellen ausgeschlossen werden. Dank des konstitutiv exprimierten 35S-Promotors wurden Plastiden in wahrscheinlich allen Stadien markiert. Abbildung 3.35 zeigt den Querschnitt einer mykorrhizierten Wurzel von *M. truncatula* mit rot markierten Pilzstrukturen und grün markierten Plastiden. Auffällig war die hohe Plastidendichte im Zentralzylinder sowie die Plastidenproliferation in kolonisierten Zellen. Arbuskeln waren hauptsächlich in den inneren Wurzelrindenzellen lokalisiert. In nichtkolonisierten Wurzelrindenzellen wurden dagegen nur wenige Plastiden gefunden.



**Abbildung 3.35** CLSM-Aufnahme eines Querschnittes einer 6 Wochen mit *G. intraradices* mykorrhizierten, mit einem ptGFP-Konstrukt transformierten Wurzel von *M. truncatula*. Gezeigt ist die Kombination von Durchlichtbild, markierten Pilzstrukturen (WGA-TRITC-Markierung; Falschfarbe Rot) und GFP-markierten Plastiden (Falschfarbe Grün), detektiert durch einen Maus: $\alpha$ -GFP-AK (1:500) und Ziege: $\alpha$ -Maus IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen; 1:500). Die Pfeile weisen auf kolonisierte Zellen mit Plastidenproliferation hin.

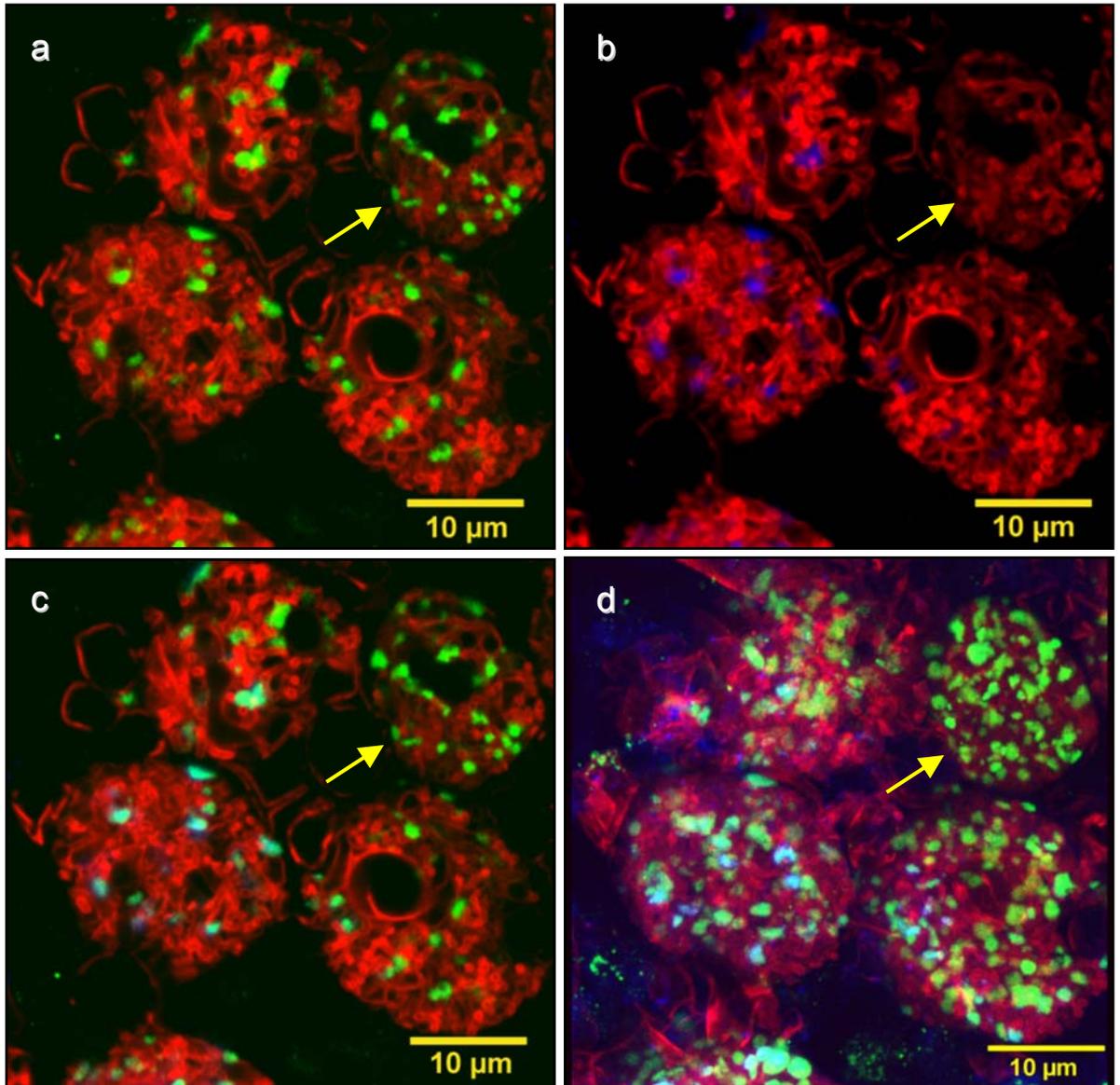
#### 3.3.4.9 Kolokalisierung von GFP und DXR in mykorrhizierten ptGFP-transformierten Wurzeln von *M. truncatula*

Eine weitere Möglichkeit der Kolokalisierung von Plastiden und FtsZ1 war die gleichzeitige Markierung der ebenfalls plastidenlokalisierten DXR (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Re-

duktoisomerase; siehe Abschnitt 1.1.3) mit einem Kaninchen-Antiserum gegen die DXR aus Mais. Zur Feststellung, ob alle Plastiden mit dem  $\alpha$ -DXR-Antikörper nachweisbar waren, wurde eine Kolokalisierung von GFP und DXR in PEG-Schnitten von mykorrhizierten ptGFP-transformierten Wurzeln von *M. truncatula* durchgeführt. Dabei zeigte sich eine unterschiedliche DXR-Konzentration in Plastiden in der Umgebung verschiedener Arbuskelstadien im Vergleich zur Intensität der GFP-Signale. In der Umgebung fein verzweigter, wahrscheinlich jüngerer Arbuskeln, war DXR nur in geringer Menge nachweisbar. Die dort auftretenden Plastiden hatten eine runde bis ovale Form. In Abbildung 3.36 sind CLSM-Aufnahmen von jüngeren Arbuskeln dargestellt, in deren Nähe viele Plastiden nur wenig DXR enthalten. In der Umgebung der mit einem Pfeil markierten Arbuskel konnte keine DXR detektiert werden. Vorausgesetzt, dass die Plastiden eine annähernd gleiche GFP-Menge enthielten, konnte die relative DXR-Menge in den einzelnen Plastiden verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass bereits die DXR-Menge der Plastiden in der Umgebung einer einzelnen Arbuskel variierte, wie man besonders in den Überlagerungsbildern an der unterschiedlichen Blaugrüntönung erkennen kann (Abbildung 3.36 c und d).

In der Umgebung älterer Arbuskeln mit dickeren Ästen wurden durch den  $\alpha$ -DXR-Antikörper grundsätzlich die gleichen Plastidenstrukturen wie durch den  $\alpha$ -GFP-Antikörper erkannt. Auffällig war in diesem Stadium die Veränderung der Plastiden von ursprünglich runden Formen zu langgestreckten, wurmartigen Gebilden (Abbildung 3.37). In der Projektion (Abbildung 3.37 d) entsteht der Eindruck eines Plastidennetzwerkes, das die Arbuskeläste umgibt. Plastidennetzwerke um Arbuskeln wurden in ptGFP-Tabak (Fester et al., 2001) sowie nach Immunlokalisierung in der Dissertation von Hans (2003) beschrieben. Wie in den einzelnen optischen Schnitten (Abbildung 3.37 a, b und c) zu sehen, kommen zwischen einzelnen Plastiden Verbindungen vor. Eine generelle Vernetzung liegt aber wahrscheinlich nicht vor. Der Eindruck eines Netzwerkes entsteht durch die Übereinanderlagerung der filamentartigen Plastiden. Auch in diesem Stadium wurden unterschiedliche DXR-Mengen in den Plastiden gefunden, wobei Plastiden in der Umgebung einer einzelnen Arbuskel eher vergleichbare DXR-Signale zeigten, wie im Überlagerungsbild der Projektion (Abbildung 3.37 d) zu erkennen ist. Besonders starke DXR-Signale in Abbildung 3.37 zeigten sich in der Umgebung der mit einem Pfeil markierten Arbuskel mit dickeren Ästen, die wahrscheinlich einem entsprechend älteren Entwicklungsstadium zuzuordnen ist.

In der Nähe degenerierender Arbuskeln, erkennbar an einer zunehmend klumpigen Form (Alexander et al., 1988) und dem Verschwinden der Verästelungen, wurden meist nur noch wenige Plastiden gefunden (Abbildung 3.38). Bei diesen Plastiden entstand ebenfalls der Eindruck einer Degeneration. Die langen, wurmartigen Strukturen schienen sich zurückgezogen zu haben und bildeten eingebuchtete rundliche bis ovale Formen. Auch diese Plastiden zeigten eine relativ hohe DXR-Akkumulation. Bereits in den wurmartigen Strukturen waren teilweise nicht fluoreszierende Einschlüsse zu erkennen, gehäuft kamen diese aber in dem Degenerationsstadium vor. In dem eingefügten Kästchen in Abbildung 3.38 a ist eine Vergrößerung eines entsprechenden Plastiden mit einem körnchenartigen Einschluss gezeigt.



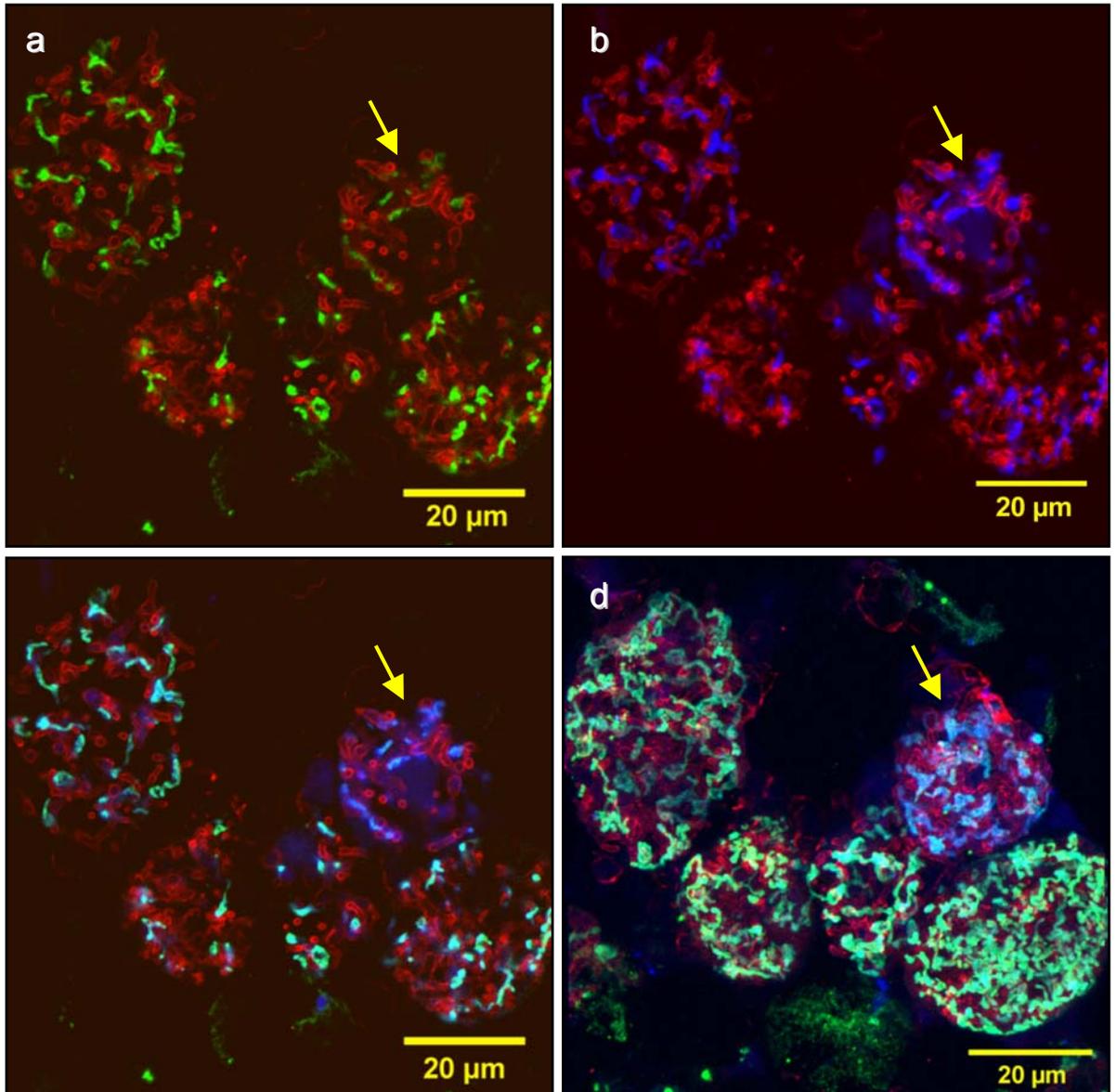
**Abbildung 3.36** DXR/GFP-Kolokalisierung in der Umgebung jüngerer Arbuskeln. CLSM-Aufnahmen einer mit *G. intraradices* mykorrhizierten, mit einem ptGFP-Konstrukt transformierten Wurzel von *M. truncatula* (20  $\mu\text{m}$ -Querschnitt). Die Pilzstrukturen wurden mit TRITC-WGA sichtbar gemacht (Falschfarbe Rot). In a, b und c sind einzelne optische Schnitte dargestellt, in d eine Projektion.

a) GFP-Detektion in Plastiden durch einen Maus: $\alpha$ -GFP AK (1:500) und  $\alpha$ -Maus IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen; 1:500); Falschfarbe Grün

b) DXR-Markierung mit dem Kaninchen-Antikörper gegen DXR aus Mais und  $\alpha$ -Kaninchen IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 (Invitrogen; 1:250); Falschfarbe Blau

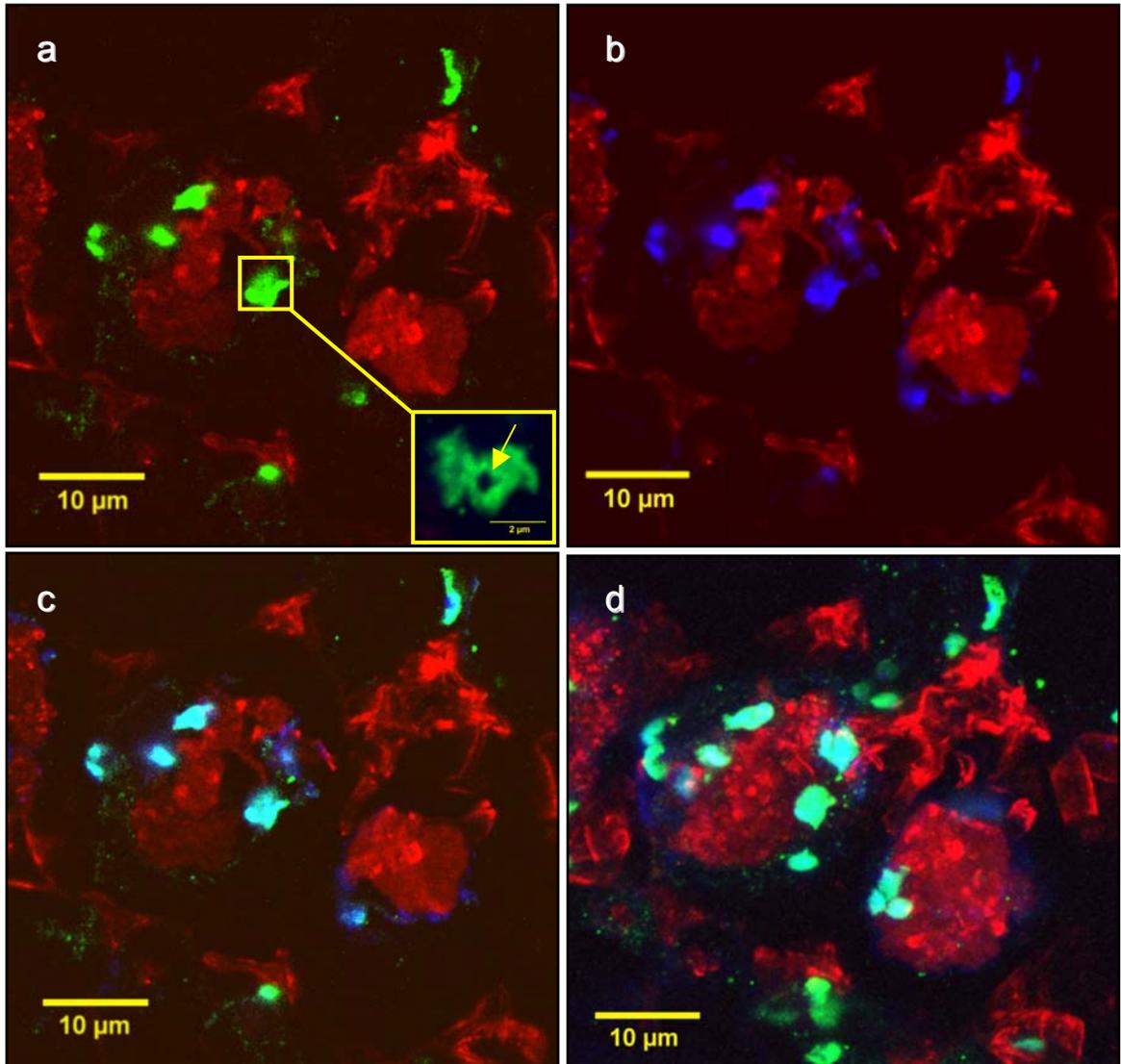
c) Kombination aus a) und b)

d) Projektion aus 26 einzelnen optischen Schnitten; Kombination von GFP- und DXR-Detektion  
In der Umgebung der mit Pfeil markierten Arbuskel war DXR nicht detektierbar.



**Abbildung 3.37** DXR/GFP-Kolokalisierung in der Umgebung älterer Arbuskeln. CLSM-Aufnahmen einer mit *G. intraradices* mykorrhizierten, mit einem ptGFP-Konstrukt transformierten Wurzel von *M. truncatula* (20 µm-Querschnitt). In a, b und c sind einzelne optische Schnitte dargestellt; in d eine Projektion. Die eingesetzten AK und ihre Verdünnungen sowie die Pilzmarkierung (Falschfarbe Rot) waren die gleichen wie bei Abbildung 3.36. Der Pfeil markiert eine Arbuskel, umgeben von Plastiden mit höherer DXR-Konzentration.

- a) GFP-Detektion in Plastiden (Falschfarbe Grün)
- b) DXR-Markierung (Falschfarbe Blau)
- c) Kombination aus a) und b)
- d) Projektion aus 26 einzelnen optischen Schnitten; Kombination von GFP- und DXR-Detektion



**Abbildung 3.38** DXR/GFP-Kolokalisierung in der Umgebung degenerierender Arbuskeln. CLSM-Aufnahmen einer mit *G. mosseae* mykorrhizierten, mit einem ptGFP-Konstrukt transformierten Wurzel von *M. truncatula* (20 µm-Querschnitt). Die eingesetzten AK und ihre Verdünnungen sowie die Pilzmarkierung (Falschfarbe Rot) waren die gleichen wie bei Abbildung 3.36. In a, b und c sind einzelne optische Schnitte dargestellt, in d eine Projektion.

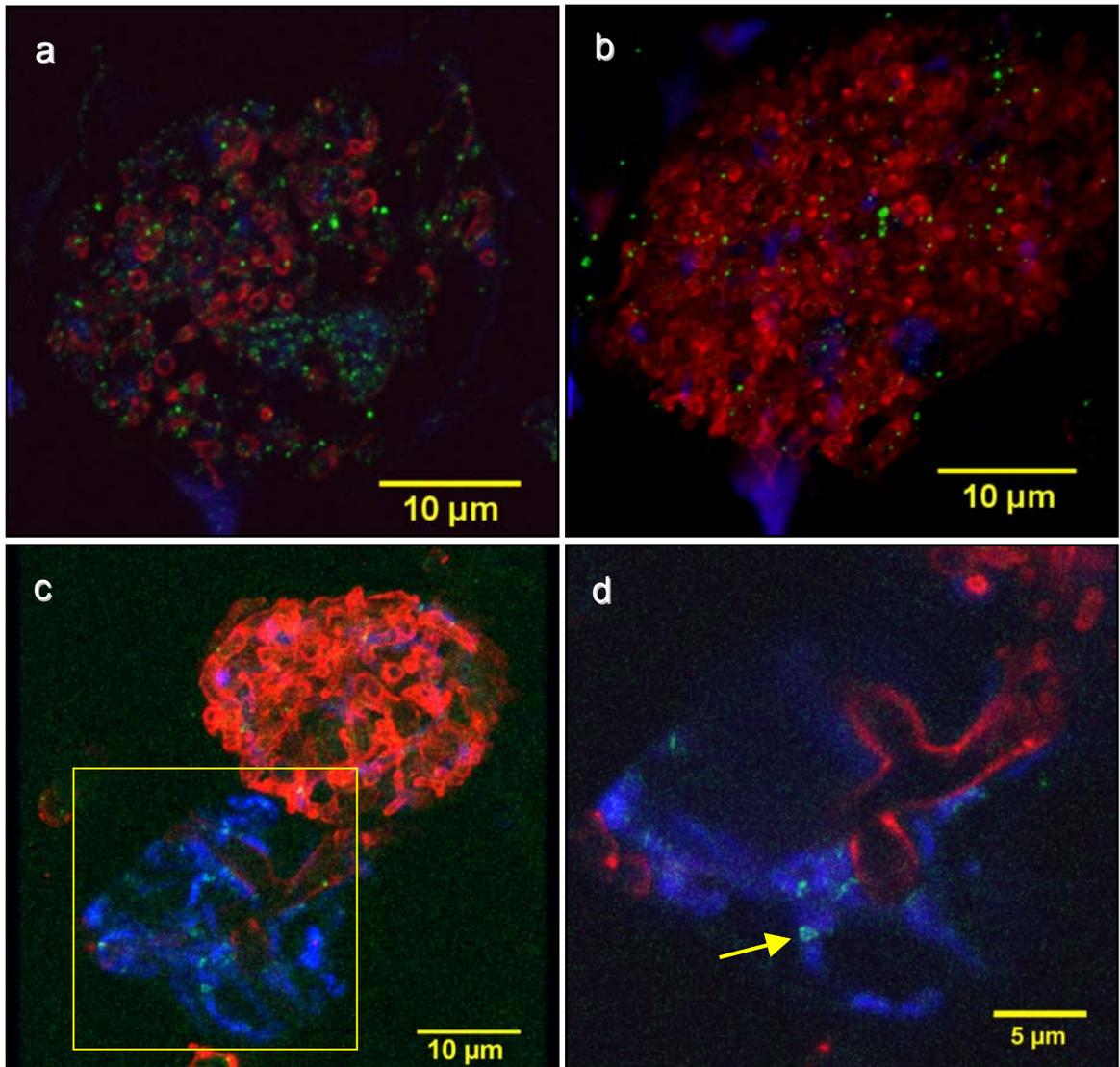
- a) GFP-Detektion in Plastiden (Falschfarbe Grün); das eingefügte Kästchen zeigt eine stärkere Vergrößerung eines einzelnen Plastiden (körnchenartiger Einschluss mit einem Pfeil markiert). Der Maßstab gibt dort 2 µm an.
- b) DXR-Markierung (Falschfarbe Blau)
- c) Kombination aus a) und b)
- d) Projektion aus 26 einzelnen optischen Schnitten; Kombination von GFP- und DXR-Detektion

#### 3.3.4.10 Kolokalisierung von *FtsZ1* und DXR in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula*

Die Kolokalisierung von DXR zur Markierung von Plastiden und *FtsZ1* in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* wurde mit dem Anti-ZmDXR-Kaninchen-Antiserum und dem affinitätsgereinigten Anti-Mt*FtsZ1*-Antikörper aus Meerschweinchen (Abschnitt 3.3.4.4) durchgeführt. Wie mit dem Kaninchen-Antikörper war auch mit dem Meerschweinchen-Antikörper in nichtkolonisierten Wurzelrindenzellen *FtsZ1* kaum nachweisbar. Wegen der sehr geringen DXR-Mengen in den Plastiden des Zentralzylinders konnten dort Plastiden und *FtsZ1*-Strukturen nicht zusammen dargestellt werden.

In der Umgebung junger, feinverzweigter Arbuskeln zeigten sich viele punktförmige *FtsZ1*-Signale, aber DXR war kaum detektierbar (Abbildung 3.39 a und b). In diesem Stadium war deshalb eine Plastidenlokalisierung zusammen mit *FtsZ1*-Signalen nicht möglich.

Gut lokalisierbar waren die Plastiden durch die DXR-Markierung in der Umgebung mutmaßlich älterer Arbuskeln mit dickeren Ästen (Abbildung 3.39 c und d) In diesem Stadium traten die schon in Abschnitt 3.3.4.9 beschriebenen langgestreckten wurmartigen Plastiden mit deutlicher DXR-Akkumulation auf. Ein entsprechender Bereich wurde in Abbildung 3.36 vergrößert. Dort konnten mehrere ringartige FtsZ-Strukturen mit den Plastiden zusammen kolokalisiert werden. Demnach teilen sich Plastiden nicht nur in der Umgebung feinverzweigter, scheinbar jüngerer Arbuskeln, sondern auch in den langgestreckten Plastiden in der Nähe dickerer Arbuskeläste oder Arbuskelstümpfe. In der Umgebung degenerierter Arbuskeln wurden keine FtsZ1-Signale detektiert.



**Abbildung 3.39** CLSM-Aufnahmen der DXR/FtsZ1-Kolokalisierung in 20 µm-Querschnitten mykorrhizierter Wurzeln von *M. truncatula*. Die Pilzstrukturen wurden mit WGA-TRITC sichtbar gemacht (Falschfarbe Rot). FtsZ1 (Falschfarbe Grün) und DXR (Falschfarbe Blau) wurden über spezifische AK detektiert: FtsZ1: 1. AK: affinitätsgereinigter Meerschweinchen:α-MtFtsZ1-AK (1:500) und 2. AK: Ziege:α-Meerschweinchen IgG Alexa Fluor® 488 (Invitrogen; 1:500); DXR: 1. AK: Kaninchen:α-ZmDXR-AK (1:500) und 2. AK: Ziege:α-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 633 (Invitrogen; 1:250).

- a) einzelner optischer Schnitt einer jüngeren, feinverzweigten Arbuskel (*G. mosseae*), umgeben von vielen punktförmigen FtsZ1-Signalen
- b) Projektion der Arbuskel in a) aus 26 optischen Schnitten
- c) Projektion älterer Arbuskeln aus 30 optischen Schnitten
- d) der in c) markierte Bereich wurde vergrößert dargestellt und zeigt einen einzelnen optischen Schnitt. Der Pfeil markiert einen FtsZ1-Ring, der mit dem plastidären Enzym DXR kolokalisiert ist.

## 4. Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen zytologische und metabolische Untersuchungen der Plastiden bei der arbuskulären Mykorrhiza in der Modellpflanze *M. truncatula*. Das Ziel dieser Untersuchungen bestand insbesondere in einer Korrelation des Ablaufs der Plastidenproliferation und der Entwicklung von Arbuskeln in kolonisierten Wurzeln mit dem Schwerpunkt der Plastidenteilung. Dabei wurde zum ersten Mal die GTPase-Aktivität und die GTP-abhängige Entstehung langer Protofilamente eines rekombinanten pflanzlichen FtsZ1-Plastidenteilungsproteins gezeigt, ähnliche Eigenschaften wie sie homologe FtsZ-Proteine aus Prokaryoten besitzen.

### 4.1 Organellenproliferation in kolonisierten Wurzelzellen

*In vivo*-Untersuchungen GFP-markierter Organellen (Plastiden, Mitochondrien und ER) in mykorrhizierten Wurzeln sollten einen Überblick dieser Strukturen in der Umgebung intakter Arbuskeln vermitteln. Durch EM-Analyse war bereits eine allgemeine Zunahme der Organellenzahl in kolonisierten Zellen von *P. sativum* beobachtet worden (Gianinazzi-Pearson, 1996). Eine genauere Charakterisierung dieser Organellen war jedoch nicht erfolgt. Durch die Transformation von Pflanzen mit GFP, fusioniert mit einer entsprechenden Signalsequenz, können inzwischen jedoch Organellen *in vivo* visualisiert werden (Chiu et al., 1996). Auf diese Weise war bei Tabakpflanzen mit GFP-markierten Plastiden in AM-kolonisierten Wurzeln eine starke Plastidenproliferation in der Umgebung aktiver Arbuskeln, verbunden mit der Ausbildung eines Plastidennetzwerkes mit Hilfe des CLSM *in vivo* beobachtet worden (Fester et al., 2001). Eine vergleichbar starke Proliferation von Plastiden in der Umgebung von Arbuskeln war nach der Immunlokalisierung des plastidären Enzyms DXR in Mais festgestellt worden (Hans et al., 2004).

Zur *in vivo*-Untersuchung des ER in kolonisierten Wurzelrindenzellen wurden mykorrhizierte Pflanzen von *ertGFP-Nicotiana benthamiana* (Linie 16c) verwendet, weil diese Pflanzen bereits GFP-markiertes ER enthielten (siehe Abschnitt 2.2.1). Wegen einer Reihe wichtiger Funktionen des ER wurde eine entsprechende Proliferation in kolonisierten Zellen erwartet. Das betrifft insbesondere die Synthese und den Umbau von Membranen, die Prozessierung und den Transport von Proteinen zu ihren Zielstrukturen und die Sekretion. Das ER stellt außerdem eine Verankerungsstelle für Aktinfilamente dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kalziumkonzentration und der N-Glykosylierung von Proteinen und Lipiden (Buchanan et al., 2000). Die CLSM-Untersuchungen zeigten, dass in nicht kolonisierten Wurzelrindenzellen ER-Strukturen hauptsächlich um den Zellkern und im Cytosol lokalisiert waren (Abbildung 3.1 a). Diese Anordnung spiegelt vor allem die Aufgabe des ER bei dem Aufbau intrazellulärer Membranen und bei Transportprozessen innerhalb der Zelle und zwischen benachbarten Zellen wider. In kolonisierten Wurzeln von *ertGFP-N. benthamiana* wurde eine Proliferation der GFP-markierten ER-Strukturen besonders in der Umgebung feiner Arbuskeläste in kolonisierten Zellen beobachtet (Abbildung 3.1 b und 3.1 c). Deutlicher als *in vivo* zeigte sich diese Proliferation in PEG-Schnitten nach Einbettung und Fixierung durch Immunmarkierung des GFP und die Färbung des AM-Pilzes mit WGA-TRITC (Abbildung 3.1 c). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine erhöhte Aktivität des ER insbesondere für die Ausbildung der periarbuskulären Membran um wachsende Arbuskeläste erforderlich ist.

Mitochondrien und Plastiden wurden *in vivo* untersucht, da bei diesen für die Energiegewinnung und den Metabolismus wichtigen Organellen ebenfalls eine Proliferation in kolonisierten Wurzelrindenzellen von *M. truncatula* erwartet wurde. Mitochondrien erfüllen in der Zelle

wichtige Aufgaben bei der Gewinnung von ATP und der Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für die Synthese von Aminosäuren aus Zwischenstufen des Citratzyklus. Außerdem befinden sich die Galacton-Dehydrogenase, das letzte Enzym der Biosynthese von Ascorbinsäure sowie Komponenten des Metabolismus von Nukleotiden in Mitochondrien. Zusammen mit dem Cytoplasma, der Vakuole und den Plastiden sind Mitochondrien für die Aufrechterhaltung einer Phosphathomöostase verantwortlich (Rausch und Bucher, 2002).

Chlorophyllfreie Plastiden sind neben den Chloroplasten bedeutende biosynthetische Organellen. Ihre Aufgaben beinhalten beispielsweise Reaktionen der Stickstoffassimilation (Esposito et al., 2003), die Stärkebiosynthese (Geigenberger et al., 2004), die Synthese von Pyrimidinnukleotiden (Buchanan et al., 2000), die Fettsäurebiosynthese und die Lipidsynthese (Buchanan et al., 2000). Im Zusammenhang mit der ausgeprägten Proliferation von Plastiden in kolonisierten Zellen von Tabak (Fester et al., 2001) und Mais (Hans et al., 2004) wurde die Aktivierung des plastidenlokalisierten MEP-Weges festgestellt, der zur Bildung von Isopentenylidiphosphat (IPP) führt (Walter et al., 2000; Hans et al., 2004). IPP stellt eine zentrale Vorstufe verschiedener Isoprenoide, unter anderem von Carotinoiden dar. In diesem Zusammenhang steht die Akkumulation von Apocarotinoiden (oxidative Spaltprodukte von Carotinoiden), wie Cyclohexenon- und Mycorradicinderivaten in späteren Mykorrhizierungsstadien, deren Funktion noch unbekannt ist (Walter et al., 2000; Fester et al., 2002; Fester et al., 2002). Als weitere wichtige Faktoren wurden kürzlich zwei plastidäre Proteine, CASTOR und POLLUX beschrieben, die sowohl für die Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza als auch für die frühe Phase der Knöllchensymbiose verantwortlich sind (Imaizumi-Anraku et al., 2004).

Für eine Untersuchung von Mitochondrien und Plastiden in AM-kolonisierten Wurzelzellen war eine Transformation von *M. truncatula* mit binären Plasmiden geplant, welche eine GFP-Sequenz, verbunden mit einer entsprechenden Signalsequenz enthielten (siehe Abschnitt 2.1.5.) Eine schnelle und einfache Transformationsmethode für *M. truncatula* war von Trieu et al. (2000) beschrieben worden. Durch die beschriebene Keimlingsinfiltrationsmethode mit *Agrobacterium tumefaciens* waren dort 27 % genetisch stabile Transformanten erhalten worden. Nach Anwendung dieser Methode zur Transformation von *M. truncatula* mit dem ptGFP- und dem mtGFP-Konstrukt konnten jedoch keine positiven Transformanten erzielt werden.

Eine weitere Transformationsmethode für *M. truncatula* war von Boisson-Dernier et al. (2001) beschrieben worden. Nach einer Wurzeltransformation mit *Agrobacterium rhizogenes* waren Experimente zur Untersuchung der Wurzelknöllchenbildung nach Inokulation mit *Sinorhizobium meliloti* an chimären Pflanzen (composite plants) durchgeführt worden, die aus transformierten Wurzeln und nicht transformiertem Spross bestanden. Durch die Kultivierung von abgeschnittenen, transgenen Wurzeln und Inokulation mit Sporen von *G. intraradices* war es möglich gewesen, eine mykorrhizierte Wurzelkultur anzulegen. Die Durchführung der genannten Transformationsmethode ermöglichte es, transgene Wurzeln von *M. truncatula* mit GFP-markierten Plastiden und Mitochondrien zu erzeugen (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Die variierende Transformationseffizienz sowie der häufig sehr niedrige Anteil transgener Wurzeln erschwerten die weiteren Untersuchungen. Auch die Intensität der GFP-Fluoreszenz zeigte relativ starke Schwankungen, vermutlich in Abhängigkeit des Integrationsortes der T-DNA im Genom der Wurzelzellen. Da die Inkubation chimärer Pflanzen auf Selektionsmedium (25 mg/l Kanamycin) in den meisten Fällen zum Absterben aller Pflanzen führte, erfolgte eine Vorselektion transformierter Wurzeln mit dem Fluoreszenzstereomikroskop. Wegen der relativ starken grünen Hintergrundfluoreszenz war eine Unterscheidung der Wurzeln mit grün fluoreszierenden Organellen von Wurzeln ohne entsprechende Markierung in vielen Fällen nicht möglich.

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente war noch keine Kultivierung chimärer Pflanzen nach Wurzeltransformation unter Gewächshausbedingungen beschrieben worden.

Darum wurde zunächst versucht, eine mykorrhizierte Wurzelkultur (wie bei Boisson-Dernier et al., 2001) zur Untersuchung GFP-markierter Plastiden anzulegen. Das dafür erforderliche Abtöten der Agrobakterien gelang jedoch erst nach der Inkubation in einem Augmentin-M-Schüttelmedium, gefolgt von einer Kultivierung auf M-Agar mit einer wesentlich höheren Augmentinkonzentration als bei Boisson-Dernier et al. (2001) beschrieben.

Ein Mykorrhizierungsversuch dieser Wurzelkultur wurde mit Hilfe einer mykorrhizierten *Daucus carota*-Wurzelkultur durchgeführt. Durch die Kultivierung dieser Wurzelkultur in geteilten Petrischalen (nach (Pfeffer et al., 1999) wurde ein Kompartiment mit Hyphen und Sporen von *G. intraradices* erhalten. Nach Kultivierung von Stücken der ptGFP-Wurzelkultur auf diesem Kompartiment erfolgte eine sehr schwache Kolonisierung; eine Weiterkultivierung mykorrhizierter Wurzelstücke war nicht möglich. Deshalb wurden Versuche zur Kultivierung chimärer *M. truncatula* (transformierte Wurzeln, nicht transformierter Spross) unter Gewächshausbedingungen durchgeführt.

Da die chimären Pflanzen in Petrischalen unter hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden, mussten sie langsam an die deutlich geringere Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus angepasst werden. Die Kultivierung unter Gewächshausbedingungen ermöglichte dann eine Etablierung der Mykorrhiza- oder Wurzelknöllchensymbiose.

In Wurzelknöllchen mit GFP-markierten Mitochondrien und Plastiden wurde keine auffällige Proliferation dieser Organellen festgestellt. Mitochondrien wurden im Kortex und in inneren Schichten von jüngeren Knöllchen detektiert, am häufigsten waren sie in der Umgebung der Leitbündel anzutreffen (Abbildung 3.3). Dagegen war keine Fluoreszenz GFP-markierter Plastiden in inneren Knöllchenbereichen nachweisbar. GFP-markierte Plastiden waren nur im Kortex in kreisförmiger Anordnung detektierbar und befanden sich damit vermutlich in der Umgebung der Zellkerne. Weil die Knöllchen eine noch geringere Transparenz als die Wurzeln besaßen, konnten Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop oder CLSM erst nach dem Anfertigen medianer Schnitte aufgenommen werden. Es wurden hauptsächlich größere, ältere Knöllchen untersucht. Das war möglicherweise ein Grund für das scheinbare Fehlen der Plastiden in den inneren Schichten. Eine weitere Ursache könnte die Fluoreszenzlöschung des GFP unter den reduzierenden Bedingungen in inneren Bereichen des Knöllchens sein. Diese Möglichkeit ergibt sich beispielsweise aus Untersuchungen von Inouye und Tsuji (1994), die beobachtet hatten, dass GFP nur in Gegenwart von molekularem Sauerstoff fluoreszieren kann, nach Zugabe von Reduktionsmitteln wie Natriumdithionit aber eine Fluoreszenzlöschung stattfindet.

In den Wurzeln chimärer Pflanzen zeigte sich eine ähnliche Verteilung von GFP-markierten Plastiden und Mitochondrien. Die Anzahl der Organellen war im Zentralzylinder gegenüber der Wurzelrinde viel höher, was besonders in den Übersichtsbildern durch die starke grüne Fluoreszenz in diesem Bereich deutlich wird (Abbildung 3.5 a und b). Mitochondrien und Plastiden waren unregelmäßig im Cytosol verteilt; zum Teil lag in der Umgebung des Zellkerns eine erhöhte Anzahl vor (Abbildung 3.5 c und d). Die hohe Organellenzahl im Zentralzylinder deutete auf eine besonders starke metabolische Aktivität im Zusammenhang mit der Funktion dieses Gewebes beim Transport von Wasser, Mineralien und Stickstoffverbindungen zum Spross sowie von Photosyntheseprodukten zu den Orten des Verbrauchs in der Wurzel hin. Die Anzahl und das Erscheinungsbild der Plastiden in der ptGFP-Wurzelkultur waren im Vergleich dazu völlig unterschiedlich (Abbildung 3.2). Im Zentralzylinder zeigten sich deutlich weniger Plastiden als bei den chimären Pflanzen und die Plastiden in der Wurzelrinde waren insbesondere bei älteren Kulturen (längere Zeit nach dem Medienwechsel) stark vergrößert. Diese Größenzunahme könnte auf eine Stärkespeicherung hindeuten, die nach dem Erreichen einer stationären Phase (Stagnieren des Wurzelwachstums) wahrscheinlich am ausgeprägtesten ist. Die geringere Plastidenanzahl im Zentralzylinder entspricht vermutlich einer geringeren Bedeutung für den Transport von Kohlenhydraten, welche über die Wurzelspitzen oder die Wurzelrinde aus dem Medium aufgenommen werden.

Weil Arbuskeln bei *M. truncatula* meist nur in den inneren Rindenschichten der Wurzel gebildet werden, die Transparenz der Wurzeln im Vergleich zu Tabak (Fester et al., 2001) aber außerordentlich gering ist, mussten Wurzeln vor einer mikroskopischen Analyse median oder quer geschnitten werden. Eine genaue Strukturaufnahme der Arbuskeln war *in vivo* nicht möglich. In kolonisierten Rindenzellen transformierter Wurzeln von chimären Pflanzen wurde jeweils eine starke Proliferation von GFP-markierten Mitochondrien und Plastiden in der Umgebung intakter Arbuskeln im Vergleich zu nicht kolonisierten Rindenzellen beobachtet. Tubuläre Ausläufer zeigten sich in einigen Fällen sowohl bei Mitochondrien als auch bei Plastiden. Das *in vivo* beobachtete Ausmaß der Bildung von Plastidenausläufern war jedoch deutlich geringer als bei Fester et al. (2001) und Hans et al., (2004) beschrieben. Das könnte teilweise daran liegen, dass entsprechende Arbuskelstadien bei den Untersuchungen nicht erfasst wurden.

In der Umgebung degenerierender Arbuskeln verringerte sich die Organellenanzahl. Nach der Zurückbildung der Arbuskeläste waren in der Nähe meist keine Plastiden oder Mitochondrien mehr nachweisbar. Degenerierende Arbuskeln sind durch eine zunehmende gelbliche Autofluoreszenz (Fester et al., 2001) sowie die Zurückbildung der Arbuskeläste gekennzeichnet, was schließlich zu einer Verklumpung führt (Alexander et al., 1988). Ein Verschwinden der Plastiden bzw. ein Zerfall des Plastidennetzwerkes um abgebaute Arbuskeln wurde auch bei Tabak und Mais beschrieben (Fester et al., 2001; Hans et al., 2004).

Die Untersuchung unterschiedlicher Organellen in kolonisierten Zellen bestätigte die allgemeine Organellenproliferation, die bereits nach EM-Aufnahmen festgestellt worden war (Gianinazzi-Pearson, 1996). Diese Proliferation, insbesondere der enge Kontakt zu den Arbuskulästen, deutet auf eine wichtige Funktion beim Stoffaustausch und eine erhöhte metabolische Aktivität in kolonisierten Zellen hin. Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien ist dabei wahrscheinlich die Bereitstellung von ATP und die Lieferung von Kohlenstoffgerüsten (Mackenzie und McIntosh, 1999). Die Plastidenproliferation in der Umgebung von Arbuskulästen spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei Austausch- und Transportvorgängen sowie bei der Bereitstellung bestimmter Metaboliten. Dabei ist die Lieferung von Fettsäuren vermutlich essentiell für die Bildung der periarbuskulären Membran. Der in Plastiden lokalisierte Ascorbat-Glutathion-Zyklus könnte bedeutend für den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies sein, die bei der Mykorrhizierung gehäuft auftreten (Fester und Hause, 2005). Beim Abbau von oxidativem Stress könnten auch die Mykorrhiza-induzierten Apocarotinoide (Cyclohexenonderivate und Mycorradicin) eine Rolle als Radikalfänger spielen, was aber noch nicht erwiesen ist. Nahe gelegt wird diese Vermutung durch die zeitliche Korrelation des erhöhten Vorkommens dieser Apocarotinoide in der späteren Mykorrhizierungsphase, in der ein erhöhter Arbuskelabbau auftritt, verbunden mit dem gehäuften Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (Fester und Hause, 2005). Eine Aktivierung der Carotinoidbiosynthese wird dabei vermutlich durch die erhöhte Genexpression der DXS2 und der DXR, Enzyme des Plastidenlokalisierten MEP-Wegs, erreicht (Walter et al., 2000; Walter et al., 2002; Hans et al., 2004). Weitere plastidäre Stoffwechselwege, wie Reaktionen der Stickstofffixierung und Aminosäurebiosynthese könnten ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (Fester et al., 2001).

Für eine Übersicht der Aktivierung metabolischer Prozesse und Transportvorgänge von kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln wurden Real-Time RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt.

## **4.2 Veränderung der Transkriptmengen plastidenrelevanter Gene in kolonisierten Wurzeln von *M. truncatula***

Mit Hilfe der Real-Time RT-PCR wurden die Mengen plastidenrelevanter Transkripte in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* untersucht, um abschätzen zu können, ob bestimmte

Stoffwechselwege, Transportprozesse oder die Reaktion auf oxidativen Stress bei der Symbiose aktiviert sind (siehe Abschnitt 3.2.1).

In den ersten Untersuchungen wurden die unterschiedlichen Kopienzahlen mittels absoluter Quantifizierung bestimmt. Da die Methodik zu dieser Zeit noch nicht etabliert war, kam es wegen verschiedener technischer Probleme wiederholt zu Reaktionsausfällen. Die untersuchten PCR-Produkte waren mit ca. 300 bp größer als vom Hersteller des Gerätes vorgesehen (50-150 bp) und die Zyklen des verwendeten PCR-Thermoprogramms waren länger, als empfohlen. Deshalb dienten die Ergebnisse nur als Hinweis auf eine erhöhte Transkriptmenge. Ein weiteres Problem bei der Untersuchung stellten die starken biologischen Schwankungen im Ausmaß der Mykorrhizierung und der variierende Anteil bereits abgestorbener Wurzeln dar. Die hohe Anzahl unabhängig von der Mykorrhizierung im Zentralzylinder vorhandener Plastiden (siehe Abbildung 3.5 a) erschwerte die Erfassung AM-induzierter plastidenrelevanter Gene zusätzlich. Sowohl die absolute als auch die relative Quantifizierung der Transkriptmengen fand zehn Wochen nach der Inokulation der Wurzeln statt, weil zu diesem Zeitpunkt unter den beschriebenen Bedingungen der höchste Mykorrhizierungsgrad des Wurzelsystems erreicht wurde. Allerdings ist es möglich, dass zu diesem Zeitpunkt bereits größere Bereiche mit degenerierten Arbuskeln existierten.

Plastidenrelevante Gene, die nach diesen Untersuchungen eine mindestens vierfache Erhöhung der Transkriptmenge in mykorrhizierten Wurzeln aufwiesen, wurden in den weiteren Experimenten durch eine relative Quantifizierung unter optimierten Bedingungen untersucht. Dabei handelte es sich um die ACCase (Fettsäurebiosynthese), die Aspartat-Transcarbamylase (Pyrimidinnukleotidsynthese), die CTP-Synthetase (Pyrimidinnukleotidsynthese), den 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator und das Plastidenteilungsprotein FtsZ1.

Die Transkriptmenge des Transkriptions-Elongationsfaktors 1 $\alpha$  (EF) diente bei der relativen Quantifizierung als konstitutive Expressionskontrolle. Als Maß für die Anwesenheit aktiver Arbuskeln wurde die Transkriptmenge des in der periarbuskulären Membran lokalisierten Phosphattransporters MtPT4 gemessen, dessen Expression in mykorrhizierten Wurzeln spezifisch erhöht ist (Harrison et al., 2002; Isayenkov et al., 2004). Da für diesen Phosphattransporter in kolonisierten Wurzeln eine 7.000fache (Kolonisierung mit *G. intraradices*) bzw. 4.000fache (Kolonisierung mit *G. mosseae*) Erhöhung der Transkriptmenge gemessen wurde, konnte von der Anwesenheit entsprechend aktiver Arbuskeln ausgegangen werden.

Eine sichere Quantifizierung der FtsZ1-Transkripte war auf Grund der sehr niedrigen Mengen nicht möglich. Durch Immunlokalisierung von FtsZ1 in Wurzeln von *M. truncatula* war jedoch in späteren Versuchen eine Zunahme entsprechender Signale in Rindenzellen mit intakten Arbuskeln gegenüber nicht kolonisierten Rindenzellen feststellbar (siehe Abschnitt 4.5).

Bei der CTP-Synthetase und dem 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator konnten keine Unterschiede der Transkriptmengen festgestellt werden. Eine Verdopplung der Transkriptmenge wurde in mykorrhizierten Wurzeln bei der ACCase und der Aspartat-Transcarbamylase gefunden. Die gemessene Erhöhung der Transkriptmenge der ACCase deutet auf eine wichtige Rolle bei der Lieferung von Fettsäuren für den Aufbau der periarbuskulären Membran hin. Die erhöhte Transkriptmenge der Aspartat-Transcarbamylase weist auf eine verstärkte Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden in kolonisierten Zellen hin. Es ist aber wahrscheinlich, dass auch andere plastidenrelevante Stoffwechselwege an der Ausbildung und Erhaltung der Symbiose beteiligt sind. Inzwischen wurden umfangreichere Real-Time RT-PCR-Untersuchungen plastidenrelevanter Transkriptmengen durchgeführt und in Korrelation dazu die Menge entsprechender Metaboliten durch GC-MS-Analyse bestimmt. Daraus ergab sich insbesondere eine Aktivierung der Fettsäurebiosynthese, der Synthese der Aminosäuren Aspartat und Asparagin sowie der Biosynthese von Apocarotinoiden in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* (Lohse et al., 2005).

Wegen der hohen Plastidendichte im Zentralzylinder und des verhältnismäßig geringen Anteils kolonisierter Rindenzellen in *M. truncatula* werden bei der Analyse des gesamten Wurzelsystems die Unterschiede der Transkriptmengen von kolonisierten gegenüber nicht kolonisierten Wurzelrindenzellen vermutlich stark unterschätzt. Der Vergleich der plastidenrelevanten Genexpression in einzelnen kolonisierten und nicht kolonisierten Wurzelrindenzellen wäre vermutlich aussagekräftiger. Solche Untersuchungen sind aber mit der Real-Time PCR nur schwer möglich. Die Lokalisierung von Transkripten über eine *in situ*-Hybridisierung oder eine Immunlokalisierung entsprechender Proteine würde wahrscheinlich ein deutlicheres Bild der Plastidenaktivität von kolonisierten Zellen ergeben, wie für das Plastidenteilungsprotein FtsZ1 gezeigt wurde.

### **4.3 Korrelation der Entwicklung von Plastiden und Arbuskeln in kolonisierten Wurzeln von *M. truncatula***

Wegen der zeitaufwendigen Selektion von Wurzeln mit GFP-markierten Plastiden und der deshalb nicht möglichen Sofortfixierung der labilen FtsZ1-Strukturen konnte keine Kolokalisierung von ptGFP und FtsZ1 durch Immunmarkierung durchgeführt werden. Deshalb wurde für die Markierung von Plastiden das plastidenlokalisierte Enzym 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) gewählt, für dessen Detektion ein Antikörper aus Kaninchen von J. Hans zur Verfügung gestellt wurde. J. Hans untersuchte im Rahmen seiner Dissertation dieses an der Isoprenoidbiosynthese beteiligte Enzym, welches eine erhöhte Expression in mykorrhizierten Maiswurzeln aufwies (Hans, 2003). In dieser Arbeit wurden unter anderem Plastiden durch Immunlokalisierung der DXR in Zellen mit unterschiedlichen Arbuskelstadien markiert. Das Maximum der DXR-Akkumulation zeigte sich in späteren Arbuskelstadien (Hans, 2003).

Der oben beschriebene Antikörper aus Kaninchen gegen die DXR in Mais markierte auch Plastiden in *M. truncatula*-Wurzeln. Ein Vergleich der mit diesem Antikörper detektierten Plastiden und GFP-markierter Plastiden in kolonisierten ptGFP-Wurzeln wurde durch eine Kolokalisierung nach einer Immunmarkierung durchgeführt. Da die GFP-Expression unter Kontrolle eines 2x35S-Promotors stand, konnte davon ausgegangen werden, dass die GFP-Expression bei allen Plastidenstadien ähnlich war.

Durch GFP-Immunmarkierung der Plastiden in Querschnitten von ptGFP-Wurzeln von *M. truncatula* zeigte sich wie bei den *in vivo*-Untersuchungen eine sehr große Plastidendichte im Zentralzylinder im Vergleich zur Wurzelrinde (Abbildung 3.35). Diese Plastiden enthielten nur sehr geringe DXR-Mengen. Die gleichzeitige WGA-TRITC-Färbung des Pilzes zeigte, dass Arbuskeln hauptsächlich in den inneren Rindenschichten kolonisierter Wurzeln auftraten. In diesen Zellen war häufig eine Plastidenproliferation zu beobachten, die DXR war jedoch nicht immer nachweisbar.

Durch Kolokalisierung von DXR und GFP und die Untersuchung mit dem CLSM wurden verschiedene Entwicklungsstadien bei Plastiden festgestellt, die teilweise den von Whatley (1983) beschriebenen Stadien in Wurzeln entsprachen. In der Umgebung junger Arbuskeln mit fein verzweigten Ästen zeigten sich runde bis ovale Plastiden, die nur sehr geringe, teilweise nicht mehr nachweisbare Mengen an DXR besaßen (Abbildung 3.36). Diese Plastiden könnten mit den ersten beiden von Whatley (1983) beobachteten Plastidenstadien mit sphärischer Form vergleichbar sein.

In der Umgebung älterer Arbuskeln mit dickeren Hyphenästen und wenig Verzweigungen wurde eine starke Formveränderung der Plastiden beobachtet. Es entstanden lange wurmartige Strukturen, die die gesamte Arbuskel einhüllten (Abbildung 3.37 d). Dieses Stadium erinnerte an ein „Plastidennetzwerk“ wie bei Fester et al. (2001) und Hans et al. (2004) beschrieben. In einzelnen optischen Schnitten wurde jedoch deutlich, dass es sich nicht um eine vollständige Vernetzung aller Plastiden handelte (Abbildung 3.37 a bis c), sondern dass

dieser Eindruck durch die Überlagerung der langgestreckten Plastiden entstand. In diesem Stadium war die DXR in allen Plastiden nachweisbar. Besonders hohe DXR-Konzentrationen fanden sich dabei in Plastiden, welche dickere Arbuskeläste umgaben und vermutlich ein älteres Stadium repräsentierten. Diese langgestreckten, wurmartigen Plastiden entsprechen dem von Whatley (1983) beschriebenen dritten Plastidenstadium (amöboide bzw. pleiomorphe, langgestreckte Plastiden). Durch das Längenwachstum wird eine starke Oberflächenvergrößerung und ein enger Kontakt zu den Arbuskelästen erreicht und damit vermutlich ein besserer Stoffaustausch ermöglicht. Eine ähnliche Veränderung elliptischer Plastiden zu langgestreckten pleiomorphen Formen war auch nach dem Medienwechsel bei BY-Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* beobachtet worden (Momoyama et al., 2003).

Die langgestreckten wurmartigen Plastiden in der Umgebung älterer Arbuskeln entsprechen vermutlich eher den oben erwähnten pleiomorphen oder amöboiden Plastiden als den Stromules (stroma filled tubules) wie bei Hans et al. (2004) interpretiert. Stromules sind dünne, Stroma-gefüllte Membranausläufer, die von einem größeren Plastidenkörper ausgehen und gewöhnlich weniger als 0,5 µm dick sind, aber mehrere Mikrometer lang sein können (Gunning, 2005). Sie sind in der Lage, Plastiden zu verbinden und Proteine zwischen Plastiden zu transportieren (Köhler und Hanson, 2000; Kwok und Hanson, 2004) und treten am häufigsten in nicht photosynthetischen Geweben auf (Köhler und Hanson, 2000; Pyke und Howells, 2002; Waters et al., 2004). Eine besondere Form der Stromules von Plastiden in Oktopus- oder Tausendfüßerform war um den Zellkern festgestellt worden (Köhler und Hanson, 2000; Fester et al., 2001). Die Breite der schmalsten langgestreckten Plastiden in der Nähe von älteren Arbuskeln lag annähernd in der Größenordnung von Stromules. Viele dieser Plastiden hatten jedoch eine Breite von 0,6 bis 1,3 µm und stellten nicht die Ausläufer eines deutlich größeren Plastidenkörpers dar. Stromule-ähnliche schmale Verbindungen zwischen größeren Plastidenkörpern wurden nur gelegentlich durch in vivo-CLSM-Aufnahmen der Plastiden detektiert (Abbildung 3.6a), nicht aber nach Immunlokalisierung.

In der Umgebung degenerierender Arbuskeln nahm die Anzahl der Plastiden ab, es waren dort große eingebuchtete Plastiden mit relativ hohen DXR-Mengen nachweisbar (Abbildung 3.38). In diesen Plastiden, aber auch zum Teil bereits in den langen pleiomorphen Plastiden waren Einschlüsse nachweisbar (Abbildung 3.38 a), bei denen es sich möglicherweise um Stärke handelt. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen waren schon früher große Stärkekörnchen in der Nähe kollabierter Arbuskelstrukturen in mykorrhizierten Maiswurzeln festgestellt worden (Kariya und Toth, 1981; Powel und Bagyaraj, 1984). Es ist unklar, ob diese späten Plastidenstadien den bei Whatley (1983) beschriebenen diskusförmigen Stadien 4 und 5 entsprechen, oder ob sie sich bereits im Abbau befinden.

Die sehr geringen DXR-Mengen in elliptischen Plastiden in der Nähe jüngerer Arbuskeln sowie die Zunahme der DXR in den langen pleiomorphen Plastiden in der Umgebung älterer Arbuskeln in Korrelation mit dem dort erhöhten Vorkommen von Apocarotinoiden (Fester et al., 2002) deuten auf unterschiedliche Funktionen der einzelnen Plastidenstadien während der Arbuskelentwicklung hin.

#### **4.4 Charakteristik des Plastidenteilungsproteins FtsZ1 aus *M. truncatula***

Zur Untersuchung der Plastidenteilung in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* wurde eine entsprechende cDNA des Plastidenteilungsproteins FtsZ1 kloniert und sequenziert. Die Primer zur Amplifikation der cDNA wurden von zwei nicht überlappenden TC-Sequenzen aus der TIGR-Datenbank abgeleitet. Wegen der sehr geringen cDNA-Menge war für eine Amplifikation eine zweifache PCR erforderlich. Die Sequenzierung des PCR-Produktes ergab eine sehr hohe Homologie zu der ftsZ1-Sequenz von *P. sativum*. Ein Vergleich der FtsZ-Sequenzen verschiedener Pflanzen, der Grünalge *Anabaena*, des Bakteriums *E. coli* und des

Archebakteriums *M. jannaschii* zeigt eine hohe Konservierung, insbesondere im Bereich der GTP-Bindungsstelle (Abbildung 3.15). Diese GTP-Bindungsstelle ist ebenso in eukaryotischen Tubulinen konserviert, die strukturell und funktionell mit FtsZ verwandt sind (Vaughan et al., 2004). Pflanzen und Grünalgen besitzen zwei phylogenetisch verschiedene FtsZ-Formen, FtsZ1 und FtsZ2, die beide eine wichtige Funktion bei der Plastidenteilung ausüben und im Stromakompartiment jeweils in der Mitte der Plastiden einen Ring ausbilden (Osteryoung und Nunnari, 2003). Der Ähnlichkeitsbaum von FtsZ (Abbildung 3.16) zeigt, dass sich die untersuchte FtsZ-Sequenz aus *M. truncatula* in die FtsZ1-Gruppe einordnen lässt.

FtsZ1 wird als lösliches, kernkodiertes Stromaprotein der Chloroplasten beschrieben (McAndrew et al., 2001; Miyagishima et al., 2001). Eine Sequenzanalyse der cDNA von MtftsZ1 mit dem Programm ChloroP ergab eine Vorhersage für eine N-terminale Plastidensignalsequenz von 53 Aminosäuren. In der TIGR-Datenbank ist seit 2005 eine TC-Sequenz veröffentlicht (TC102111), die den gesamten Bereich von MtftsZ1 umfasst und durch das Programm AmiGO (gene ontology annotation) als Stromaprotein von Plastiden bewertet wird.

Seit März 2005 ist die Sequenz von Chromosom 5 von *M. truncatula* in der NCBI-Datenbank veröffentlicht (CR936323), worin auch eine Kopie des *MtftsZ1*-Gens enthalten ist. Der Sequenzvergleich mit der kodierenden Sequenz der *MtftsZ1*-cDNA zeigt die Anwesenheit von fünf Introns (siehe Abbildung 3.14). Die Intron/Exon-Übergangsbereiche von *ftsZ1* sind bei *M. truncatula* konserviert, wie der Vergleich mit den entsprechenden Bereichen bei dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* und der Brassicacee *Arabidopsis thaliana* zeigt (Tabelle 3.6).

Der Southern Blot mit genomischer DNA von *M. truncatula* zeigte, abgesehen von den Ansätzen mit offenbar nicht erfolgreichem Verdau (NotI, XhoI), bei den Enzymen BamHI, SacI und Sall jeweils 3 Banden (Abbildung 3.13). Die größte Bande mit jeweils etwa 6.000 bp entsprach wahrscheinlich der ungeschnittenen Version des Gens, die beiden kleineren Banden jeweils einer Version mit einer internen Schnittstelle. Demzufolge existiert im Genom von *M. truncatula* neben dem Gen auf Chromosom 5 mit einer Schnittstelle für BamHI (im Intron 4) und keiner Schnittstelle für SacI und Sall vermutlich noch eine weitere Kopie, die jeweils eine Schnittstelle für SacI und Sall besitzt.

Nach heterologer Expression des MtFtsZ1-Proteins einschließlich der putativen Signalsequenz wurden im Westernblot durch Markierung der terminalen His-Sequenz eine stärkere und zwei schwächere Banden detektiert (Abbildung 3.18 a). Das gleiche Muster der Banden in entsprechender Größe wurde auch durch einen  $\alpha$ -AtFtsZ1-1-Antikörper erkannt (Abbildung 3.18 c), wodurch die Identität als FtsZ1-Protein bestätigt wurde. Die zwei Banden mit niedrigerem Molekulargewicht sind möglicherweise durch Proteinabbau im Expressionsstamm entstanden. MtFtsZ1 konnte nur als unlösliches Protein gewonnen werden. Durch Expression von *HisMtftsZ1a* ohne die putative Plastidensignalsequenz bei 30 °C war es möglich, lösliches Protein zu gewinnen. Die Detektion dieses Proteins im Westernblot durch den Nachweis der 6xHis-Sequenz zeigte eine starke Bande und zum Teil eine sehr viel schwächere Bande, die vermutlich einem Proteinabbau im Expressionsstamm entsprach (Abbildung 3.21).

Zur funktionellen Charakterisierung des MtFtsZ1a-Proteins wurde einerseits die Auswirkung einer Supplementierung der thermosensitiven *E. coli* *ftsZ*-Mutante PAT84 untersucht, andererseits wurde das Protein heterolog exprimiert und die GTPase-Aktivität sowie die Fähigkeit zum Selfassembly getestet. Die *ftsZ*-Mutante PAT84 hatte zur Entdeckung des FtsZ-Ringes bei der Bakterienteilung geführt. Die Abkürzung *fts* bedeutet filamentous temperature sensitive (gemäß dem filamentösen Wachstum bei einer nicht tolerierten Temperatur). Studien zur Bakterienteilung in der Mutante PAT84 waren unter anderem von Ricard und Hirota (1973) durchgeführt worden. Gaikwad et al. (2000) hatten die erfolgreiche Supplementierung von PAT84 mit einer FtsZ1-Sequenz ohne putative Signalsequenz aus *P. sativum* beschrieben. Die bei einer nicht tolerierten Temperatur von 42 °C nicht teilungsfähige und deshalb in Form

langer Filamente wachsende *ftsZ*-Mutante PAT84 hatte nach einer Transformation mit einer FtsZ1-Sequenz aus *P. sativum* in pBluescript SK bei 42 °C die Fähigkeit zur Zellteilung wiedererlangt und dann ein normales Wachstum gezeigt.

Wegen des sehr variablen Wachstumsverhaltens von PAT84 bei eigenen Untersuchungen konnte keine erfolgreiche Komplementation mit der *ftsZ1*-Sequenz ohne putative Plastidensignalsequenz aus *M. truncatula* nachgewiesen werden. Der Western Blot mit dem Protein der transformierten PAT84-Bakterien bestätigte die MtFtsZ1-Produktion in der richtigen Größe (ca. 38,5 kDa) sowohl bei 30 °C als auch bei 42 °C nach Transformation mit dem *MtftsZ1*-Vektor und die Abwesenheit einer entsprechenden Bande nach Transformation mit dem leeren Vektor (Abbildung 3.17). Sowohl die mit dem *MtftsZ1*-Vektor als auch mit dem leeren Vektor transformierten Bakterien zeigten bei 30 und 42 °C eine sehr variable Länge, allerdings ohne die Entstehung der sehr langen Filamente bei 42 °C. Demnach existieren offensichtlich weitere unbekannte Faktoren, welche die Bakterienteilung beeinflussen. Ein Hinweis auf die Wechselwirkung mit FtsZ aus *E. coli* ergab sich jedoch durch Überexpression im Expressionsstamm RP bei 37 °C (Abbildung 3.19 a), wobei gehäuft langgestreckte Bakterienformen nach IPTG-Induktion, nicht aber in Abwesenheit von IPTG beobachtet wurden.

Das Zellteilungsprotein FtsZ aus Bakterien ist *in vitro* durch Selfassembly in der Lage, Protofilamente und Strukturen höherer Ordnung (z. B. Röhrchen, Blätter) zu bilden und besitzt GTPase-Aktivität. Der Aufbau von Protofilamenten und Strukturen höherer Ordnung wird durch GTP und hochmolekulare Stoffe wie DEAE-Dextran gefördert (Bramhill und Thompson, 1994; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998; Lu et al., 1998; Lu und Erickson, 1998). Die Polymerisierung von FtsZ ist dynamisch und wird durch die GTP-Hydrolyse reguliert (Mukherjee und Lutkenhaus, 1998). Kontrovers diskutiert wird die Bedeutung zweiwertiger Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) beim Selfassembly. Yu und Margolin (1997) beschrieben eine Förderung der Filamentbildung durch  $Ca^{2+}$ . Mukherjee und Lutkenhaus (1999) stellten hingegen fest, dass  $Ca^{2+}$  für ein Selfassembly nicht erforderlich war und die Filamente in Gegenwart von  $Ca^{2+}$  und bei Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  ein reduziertes dynamisches Verhalten zeigten.

Entsprechende Eigenschaften von FtsZ aus Pflanzen waren bisher kaum untersucht worden. Gaikwad et al. (2000) beschrieben die Bildung von Multimeren von *P. sativum*-FtsZ nach *in vitro*-Translation, chemischer Vernetzung mit Glutaraldehyd und Analyse über SDS-PAGE. Eine Polymerisierung wurde in Gegenwart von GTP oder  $Ca^{2+}$  erreicht. Durch EGTA wurde die Polymerisierung verhindert.

Im Dezember 2004 wurde erstmals eine elektronenmikroskopische Untersuchung des *in vitro*-Selfassembly von in *E. coli* produziertem rekombinanten FtsZ1 und FtsZ2 aus *Nicotiana tabacum* veröffentlicht. Die Proteine wurden aber offenbar als Gesamtsequenz, das heißt, einschließlich der vermutlich enthaltenen Plastidensignalsequenz, exprimiert (El-Kafafi et al., 2004). Eine Filamentbildung konnte nur durch Fixierung mit Glutaraldehyd bei FtsZ1 (nicht bei FtsZ2) beobachtet werden. Es ergaben sich dabei stäbchenartige Filamente von ca. 450 nm Länge und 5 nm Durchmesser. Außerdem wurde das Auftreten von Miniringen beschrieben. Die Filamentbildung war GTP-abhängig. Da diese Daten nach dem Abschluss der praktischen Arbeit veröffentlicht wurden, hatten sie keinen Einfluss auf das Konzept eigener Experimente.

Für FtsZ aus Prokaryoten wurde eine kritische Konzentration von 2,5  $\mu$ M Protein für die Filamentbildung beschrieben (Mukherjee und Lutkenhaus, 1999) und 1  $\mu$ M als kritische Konzentration für eine nachweisbare GTPase-Aktivität (Sossong et al., 1999). In Anlehnung an diese Versuche wurde die Fähigkeit zum Selfassembly durch Transmissionselektronenmikroskopie mit 7,3  $\mu$ M (0,3 mg/ml) HisMtFtsZ1a (ohne putative Plastidensignalsequenz) bei pH 7,5 untersucht. Es stellte sich heraus, dass für die Bildung langer Protofilamente bereits die Anwesenheit von GTP ausreichte (Abbildung 3.22 a). Diese langen Protofilamente hatten ein ähnliches Erscheinungsbild wie Protofilamente aus bakteriellem FtsZ (Lu und Erickson,

1998; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998, 1998; Mukherjee und Lutkenhaus, 1999; Mingorance et al., 2001) und waren damit wesentlich länger als die stäbchenartigen Strukturen, die mit rekombinantem FtsZ1 aus Tabak erhalten wurden (El-Kafafi et al., 2004).

Ein ähnliches Bild ergab sich in Gegenwart von GTP und  $Mg^{2+}$  sowie bei zusätzlicher Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ . Kurvenförmige Filamentenden wurden jedoch nur bei alleinigem GTP-Zusatz in Abwesenheit weiterer Zusätze beobachtet. Die Gegenwart zweiwertiger Kationen ist aber vermutlich in Gegenwart von GTP wie bei FtsZ aus Prokaryoten für einen dynamischen Umbau erforderlich. Die Entstehung der kurzen Protofilamente in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  (Abbildung 3.22 a) ist vermutlich auf eine unspezifische Polymerisierung zurückzuführen. Diese Vermutung stimmt mit der Annahme von Addinall und Holland (2002) überein, dass die Bildung komplexer Polymere von anionischem prokaryotischen FtsZ in Gegenwart zweiwertiger Kationen gefördert wird.

Während über die GTPase-Aktivität von FtsZ aus Prokaryoten zahlreiche Publikationen existieren (z. B. de Boer et al., 1992; RayChaudhuri und Park, 1992; Mukherjee et al., 1993; Bramhill und Thompson, 1994; Sossong et al., 1999), gibt es bisher keine Veröffentlichungen über entsprechende Analysen der pflanzlichen Vertreter dieser Proteinfamilie. Für FtsZ aus Prokaryoten war gezeigt worden, dass es wie Tubulin GDP und GTP bindet und in der Lage ist, GTP zu GDP zu hydrolysieren (Mukherjee et al., 1993; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998). Die GTPase-Aktivität wird mit dem dynamischen Verhalten der Filamente in Zusammenhang gebracht. Über einen hohen Nukleotidumsatz von FtsZ-Polymeren war auch bei Mingorance et al. (2001) berichtet worden. In Pflanzen deutet sich ein Zusammenwirken von FtsZ1 und FtsZ2 durch die Kolokalisierung in einem Ring in der Plastidenmitte an (McAndrew et al., 2001; Vitha et al., 2001; El-Kafafi et al., 2004). Es ist vorstellbar, dass entsprechend den homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulinen nur eine FtsZ-Gruppe in Pflanzen GTPase-Aktivität aufweist, während beide Gruppen eine GTP-Bindungsstelle besitzen.

In den Versuchen mit rekombinantem MtFtsZ1a (ohne putative Signalsequenz) wurde eine starke GTPase-Aktivität *in vitro* festgestellt. Die GTP-Hydrolyse konnte über HPLC-Bestimmung durch Absorptionsmessung von GTP und GDP nachgewiesen werden. Bei einer Proteinkonzentration von  $7,3 \mu M$  ( $0,3 \text{ mg/ml}$ ) entstand durch GTP-Hydrolyse neben GDP auch Guanosin, insbesondere nachdem GTP vollständig hydrolysiert war (Abbildung 3.23). Diese Reaktion war nicht auf eine spontane Hydrolyse von GDP zurückzuführen, denn auch nach 17 Stunden Inkubation von GDP im Testpuffer in Abwesenheit von FtsZ wurde kein Guanosin gebildet. Die Abspaltung aller Phosphatreste von GTP war nach dem Einsatz von  $2 \mu M$  MtFtsZ1a ( $0,085 \text{ mg/ml}$ ) deutlich geringer ausgeprägt und erst nach dem Verbrauch von GTP nachweisbar (Abbildung 3.24). Möglicherweise spielt die räumliche Anordnung der entstehenden Filamente und die Entstehung von Strukturen höherer Ordnung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration für die Förderung der Abspaltung aller Phosphatreste von GTP eine Rolle. Da bisher nicht bekannt ist, welche FtsZ1-Konzentration lokal bei der Ausbildung des FtsZ-Ringes vorliegt, kann nicht gesagt werden, ob diese Reaktion bei der Plastidenteilung relevant ist.

Enzymkinetische Experimente mit  $2 \mu M$  MtFtsZ1a ( $0,08 \text{ mg/ml}$ ) zeigten, dass die GTP-Hydrolyse nicht nach einer Michaelis-Menten-Kinetik erfolgte. Durch GTP-Konzentrationen von  $10 \mu M$  bis  $30 \text{ mM}$  war keine Sättigung zu erreichen (siehe Abbildung 3.26); die GTP-Hydrolyse erhöhte sich hingegen etwa ab einer GTP-Konzentration von  $200 \mu M$  annähernd proportional zur GTP-Konzentration. Nach einer Lineweaver-Burk Auftragung wurde nur für GTP-Konzentrationen von  $10 \mu M$  bis  $200 \mu M$  eine Gerade erhalten (Abbildung 3.27). Aus der extrapolierten Gerade wurden über den Schnittpunkt mit der X-Achse ein scheinbarer  $K_M$ -Wert von  $32 \mu M$  GTP und über den Schnittpunkt mit der Y-Achse eine scheinbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $1 \mu \text{kat/mg}$  Protein ermittelt. Der scheinbare  $K_M$ -Wert liegt dabei annähernd in der Größenordnung für FtsZ aus *E. coli* ( $K_M$ :  $82 \mu M$  GTP für  $5 \mu M$  FtsZ; Sossong et al., 1999). Die plötzliche Änderung der kinetischen Eigenschaften bei GTP-Kon-

zentrationen über 200  $\mu\text{M}$  könnte im Zusammenhang mit der Ausbildung von Protofilamenten oder Aggregaten höherer Ordnung (z. B. blattartige Strukturen) stehen, wobei durch eine besondere dreidimensionale Anordnung die GTP-Hydrolyse erleichtert werden könnte. In Berichten über die GTPase-Aktivität von FtsZ aus Prokaryoten war ein entsprechender kooperativer Mechanismus beschrieben worden (Addinall und Holland, 2002). Dort war angenommen worden, dass durch eine Oligomerisierung des Proteins die GTPase-Aktivität stimuliert wird.

Die beschriebenen Untersuchungen zum Selfassembly und zur GTPase-Aktivität deuten darauf hin, dass FtsZ1 aus *M. truncatula* ähnliche Eigenschaften wie die homologen Proteine aus Prokaryoten besitzt. Nach der Endosymbiontenhypothese sind Plastiden aus einst freilebenden Prokaryoten mit Verwandtschaft zu heute existierenden Cyanobakterien durch Aufnahme in eine eukaryotische Zelle hervorgegangen (Buchanan et al., 2000). Die Eigenschaften der FtsZ-Proteine haben sich demnach in der FtsZ1-Gruppe vermutlich weitgehend erhalten. Die bedeutendsten Veränderungen im Verlauf der Evolution stellen dabei wahrscheinlich die Integration des *ftsZ*-Gens in das Genom des Zellkerns, die Anfügung einer N-terminalen Plastidensignalsequenz und die Entwicklung unterschiedlicher *ftsZ*-Genfamilien dar.

#### 4.5 Immunlokalisierung von MtFtsZ1 in kolonisierten Wurzeln

Für eine Immunlokalisierung in kolonisierten Wurzeln von *M. truncatula* wurde heterologes Antiserum in Kaninchen und Meerschweinchen erzeugt. Die Gewinnung des Meerschweinchen-Antiserums diente der Kolokalisierung von MtFtsZ1 und Plastiden, für deren Lokalisierung ein  $\alpha$ -DXR-Antikörper aus Kaninchen (von J. Hans) zur Verfügung stand. Für die Immunisierung der Kaninchen wurde rekombinantes MtFtsZ1-Protein einschließlich der putativen Plastidensignalsequenz nach Überexpression verwendet. Die Affinitätsreinigung des Kaninchen-Antiserums wurde dann mit MtFtsZ1a-Protein (ohne putative Signalsequenz) nach Bindung an NiNTA-Spinsäulchen durchgeführt. Die Immunisierung der Meerschweinchen fand mit rekombinantem MtFtsZ1a (ohne putative Plastidensignalsequenz) statt. Eine Affinitätsreinigung des Meerschweinchen-Antiserums über NiNTA-Spinsäulchen mit gebundenem MtFtsZ1a war nicht erfolgreich und erfolgte deshalb über einen Affinitätsblot.

Der Test der affinitätsgereinigten Antiseren im Western Blot mit löslichem rekombinanten MtFtsZ1a-Protein ergab die Detektion einer Bande in der erwarteten Größe von ca. 38 kDa (Abbildung 3.30 a und b, jeweils Bahn 8 und Abbildung 3.31 b). Oft waren jedoch noch Banden mit doppeltem und zum Teil auch dreifachem Molekulargewicht detektierbar (besonders in Abbildung 3.30 b, Bahn 8). Diese Banden könnten die allgemeine Tendenz des löslichen MtFtsZ1a-Proteins zur Aggregation zu Dimeren oder Trimeren widerspiegeln. Die Neigung von FtsZ aus *P. sativum* (ohne Plastidensignalsequenz) zur Bildung von Multimeren in Gegenwart von DEAE-Dextran,  $\text{Ca}^{2+}$  oder GTP wurde bereits von Gaikwad et al. (2000) beschrieben. Mit den affinitätsgereinigten Kaninchen- und Meerschweinchen-Antiseren gegen MtFtsZ1 aus *M. truncatula* konnten in den meisten Fällen im Western Blot mit pflanzlichem Proteinextrakt nur Banden von etwa dem doppelten Molekulargewicht der erwarteten Größe detektiert werden (siehe Abbildung 3.30). Eine Ausnahme zeigt Abbildung 3.29 b, wo durch den affinitätsgereinigten Kaninchen-Antikörper im Blattextrakt von *M. truncatula* eine Bande in der erwarteten Größe erkannt wurde.

Es ist vorstellbar, dass auch FtsZ1 aus dem pflanzlichen Proteinextrakt zur Bildung von Dimeren neigt. Die entsprechenden Banden verschwanden jedoch auch nach dem Erhitzen des Proteinextraktes mit 8 M Harnstoff auf 95 °C nicht. Daher ist ungeklärt, ob es sich wirklich um FtsZ1 oder um ein Artefakt handelt. Ein Spezifitätsnachweis für die affinitätsgereinigten Kaninchen- und Meerschweinchen-Antikörper war demnach mit dem Western Blot nicht

möglich. Unterschiede in der FtsZ1-Proteinmenge von mykorrhizierten und Kontrollwurzeln konnten deshalb mittels Western-Blot-Analyse ebenfalls nicht festgestellt werden. Die FtsZ-Proteinmenge ist besonders in Wurzeln sehr gering (Dong et al., 2002) und damit eine Detektion schwierig.

Für einen alternativen Spezifitätsnachweis wurde deshalb eine Immunlokalisierung an Blatt-schnitten von *M. truncatula* durchgeführt (Abbildung 3.32). Mit beiden affinitätsgereinigten Antikörpern konnten ringartige Strukturen in Mesophyllzellen von Blättern detektiert werden. Die Spezifität des Kaninchen-Antikörpers (Abbildung 3.32 a) erschien dabei höher als die des Meerschweinchen-Antikörpers, mit dem in der Nähe der Ringe noch weitere punktförmige Signale detektiert wurden. Es könnte sich dabei jedoch auch um die Reste zerfallener FtsZ1-Ringe handeln. Die Labilität der FtsZ1-Ringstrukturen zeigte sich besonders daran, dass sie nur in der Nähe der Schnittflächen und damit den ersten Kontaktstellen mit dem Fixativ erhalten blieben, in tieferen Gewebeschichten jedoch nicht mehr nachweisbar waren. Durch Zerschneiden des Probenmaterials in MSB-Fixationspuffer und sofortige Vakuumbehandlung im Exsikkator wurde eine Verbesserung erreicht, jedoch wurden auch nach dieser Behandlung oft keine ringartigen Strukturen, sondern nur punktförmige Signale erhalten. Die hohe Instabilität der FtsZ-Strukturen war vermutlich auch der Hauptgrund für das Scheitern einer Kolokalisierung von GFP-markierten Plastiden und FtsZ1 in chimären *M. truncatula*-Pflanzen nach der Wurzeltransformation, da vor einer Fixierung das Wurzelsystem nach Bereichen mit grün fluoreszierenden Plastiden durchsucht werden musste. In diesem Fall konnten keine FtsZ1-Signale in mykorrhizierten und Kontrollwurzeln detektiert werden.

Mögliche Gründe für die Schwierigkeit der Detektion von FtsZ-Ringen sind einerseits die kurze Dauer der Plastidenteilung und andererseits ihre hohe Dynamik. In einem Schema von Miyagishima et al. (2003) ist z. B. vom Beginn der Entstehung des FtsZ-Ringes in der primitiven Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* bis zu seinem Zerfall eine Zeitspanne von etwa zwei Stunden angegeben. Die FtsZ-Ringe selbst unterliegen einem ständigen Umbau, der beispielsweise in *E. coli* durch eine Halbwertszeit von 30 Sekunden gekennzeichnet ist (Stricker et al., 2002).

In einigen Fällen war es möglich, mit Hilfe der affinitätsgereinigten FtsZ1-Antikörper aus Kaninchen und Meerschweinchen in nicht transformierten Wurzeln von *M. truncatula* ringförmige Strukturen nachzuweisen. Zahlreiche FtsZ1-Signale im Bereich des Zentralzylinders von Wurzeln und Wurzelspitzen weisen auf eine erhöhte Teilungsaktivität in diesem Gewebe hin (Abbildung 3.33). In nichtkolonisierten Wurzeln wurden dagegen fast keine FtsZ1-Signale im Bereich der Wurzelrinde detektiert, was vermutlich einerseits auf eine niedrigere Teilungsaktivität, andererseits auf die geringere Organellenzahl pro Zelle zurückzuführen ist. In kolonisierten Wurzelrindenzellen wurden häufig um feinverästelte, jüngere Arbuskeln viele FtsZ1-Signale mit dem  $\alpha$ -MtFtsZ1-Kaninchen-Antikörper detektiert. (Abbildung 3.34 a und c). Durch Kolokalisierung von FtsZ1 mit dem  $\alpha$ -MtFtsZ1-Meerschweinchen-Antikörper und dem  $\alpha$ -DXR-Kaninchen-Antikörper waren in diesem Stadium zahlreiche FtsZ1-Signale nachweisbar, jedoch wurde kaum DXR detektiert. Am häufigsten wurden FtsZ1-Signale in der Nähe der Enden von Arbuskelästen gefunden. Das könnte bedeuten, dass parallel mit dem Wachstum der Arbuskeläste auch Plastidenteilungen stattfinden. Das Stadium der Plastiden entspricht dabei wahrscheinlich der in Abbildung 3.36 durch Kolokalisierung von DXR und GFP in Plastiden von ptGFP transformierten Wurzeln dargestellten Entwicklungsstufe mit sehr geringen DXR-Konzentrationen in den Plastiden. Die hohe Teilungsaktivität, verbunden mit einer starken Proliferation elliptischer Plastiden, ist wahrscheinlich für die Entstehung und Reifung der Arbuskeln erforderlich, wobei unter anderem Fettsäuren zur Verfügung gestellt werden müssen, die für die Bildung der periarbuskulären Membran erforderlich sind. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Erhöhung der Transkriptmenge für ACCase, die durch Real-Time RT-PCR-Untersuchungen festgestellt wurde (siehe Abschnitt 4.2). Ähnliche Ergebnisse, die zusätzlich noch auf eine Erhöhung der Biosynthese von Asparagin und Gluta-

min hindeuten, ergaben sich in unserer Arbeitsgruppe bei einer breiter angelegten Analyse von Transkript- und Metabolitenmengen in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* (Lohse et al., 2005).

Erhöhte Mengen teilweise ringförmiger FtsZ1-Signale wurden allerdings auch in späteren Arbuskelstadien mit dickeren Arbuskelästen und mit weniger Verzweigungen beobachtet (Abbildung 3.34 b und d). Die Kolokalisierung von FtsZ1 und DXR zeigte in dieser Entwicklungsstufe FtsZ1-Ringe an den langgestreckten, wurmartigen Plastiden, welche höhere DXR-Mengen enthielten. (Abbildung 3.39 c und d). Die erhöhte DXR-Konzentration in Plastiden korreliert mit der Akkumulation von Apocarotinoiden während der späten Entwicklungsphase (Fester et al., 2002), deren Funktion jedoch noch ungeklärt ist. Dieses späte Entwicklungsstadium in Abbildung 3.39 c entspricht wahrscheinlich dem Entwicklungsstand wie in Abbildung 3.37 dargestellt oder dem bereits beginnenden Abbau der Arbuskel. Wegen der geringen Auflösung kann nicht festgestellt werden, ob sich ein oder mehrere FtsZ1-Ringe an einem Plastiden befinden. Momoyama et al. (2003) hatten nach dem Medienwechsel einer BY-Tabakzellkultur die Entstehung mehrerer, über die Längsachse langgestreckter, pleiomorpher Plastiden verteilte FtsZ-Ringe beschrieben, welche die Stellen künftiger Plastidenteilungen bestimmten. Eine Konstriktion hatte dort nur in der Plastidenmitte stattgefunden. Die Rolle dieser späten Plastidenteilung in kolonisierten Zellen ist ebenso wie die morphologische Veränderung zu langgestreckten, wurmartigen Strukturen ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Als Grund für eine Plastidenteilung ist eine schnelle Desintegration der langgestreckten Plastiden für die Vorbereitung eines neuen Kolonisierungszyklus vorstellbar. Die langgestreckten, wurmartigen Plastiden könnten am Metabolismus von Abbauprodukten der degenerierenden Arbuskel, wie z. B. entstehender reaktiver Sauerstoffspezies (Fester und Hause, 2005), beteiligt sein.

#### 4.6 Weiterführende Arbeiten

Der Vergleich von Transkript- oder Proteinmengen plastidenrelevanter Gene von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln zu einem bestimmten Zeitpunkt reicht nicht für eine Charakterisierung der Plastiden während der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza aus. Zur eingehenden Untersuchung aktivierter Stoffwechselwege in kolonisierten Zellen bieten sich die *in situ*-Hybridisierung (z. B. Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung: FISH) oder eine Immunlokalisierung der entsprechenden Proteine an. Damit wäre es möglich, Veränderungen in kolonisierten gegenüber nicht kolonisierten Zellen direkt zu beobachten. Für eine Vorauswahl entsprechender aktivierter Gene könnte eine Analyse mit einem „elektronischen Northern Blot“ oder mit einem cDNA-Chip dienen. Diese Untersuchungen müssten verschiedene Entwicklungsstadien erfassen, denn wie in der Arbeit am Beispiel der DXR-Lokalisierung gezeigt wurde, unterscheidet sich die frühe Entwicklungsphase der Plastiden stark von der späten Phase.

Eine weitere Charakterisierung des löslichen rekombinanten HisMtFtsZ1a-Proteins durch die parallele Untersuchung der GTPase-Aktivität und eine elektronenmikroskopische Untersuchung bei verschiedenen Protein- und GTP-Konzentrationen könnte Aufschluss über eine Korrelation von Selfassembly und Förderung der GTPase-Aktivität geben. Dadurch könnte bestimmt werden, ob FtsZ1 aus *M. truncatula* eine „kooperative GTPase-Aktivität“ besitzt, wie für FtsZ aus Prokaryoten beschrieben (Addinall und Holland, 2002). Auch die Rolle von GDP bei der Polymerisierung/Depolymerisierung von FtsZ1 aus *M. truncatula* könnte durch Elektronenmikroskopie untersucht werden. Des weiteren könnte die Untersuchung der GTP-Hydrolyse in Abhängigkeit von der FtsZ1-Proteinkonzentration die Bildung von Guanosin erklären, denn diese Eigenschaft ist bisher noch nicht für FtsZ beschrieben worden. Außer-

dem könnte überprüft werden, ob  $Mg^{2+}$  wie bei Prokaryoten (de Boer et al., 1992) oder andere zweiwertige Kationen für die GTPase-Aktivität notwendig sind.

Die Suche nach dem Promotor für *MftsZ1* und eine Promotoranalyse wird durch die inzwischen veröffentlichte Sequenz von Chromosom 5, das eine *MftsZ1*-Genkopie enthält, erleichtert. Soweit bekannt, wurden über *ftsZ*-Promotoren in Pflanzen bisher noch keine Untersuchungen veröffentlicht.

Die Bedeutung der Plastidenteilung, die wie gezeigt sowohl während der sehr frühen als auch der späten Entwicklungsphase der Arbuskel auftritt, könnte durch Hemmung der Plastidenteilung untersucht werden. Dafür kommen Mutanten oder Transformanten in Frage. Eine Hemmung der korrekten Plastidenteilung kann dabei nicht nur durch Ausschalten von *FtsZ*, sondern auch durch Beeinflussung regulatorischer Proteine der Plastidenteilung, wie *MinD* oder *MinE*, erreicht werden. Transformierte Tabakpflanzen, die *minD* (Dinkins et al., 2001) bzw. *minE* (Reddy et al., 2002) überexprimieren, stehen für entsprechende Untersuchungen bereits zur Verfügung. Durch die Untersuchung der Kolonisierung dieser transgenen Pflanzen kann bestimmt werden, ob die Plastidenteilung für die Symbiose von entscheidender Bedeutung ist, oder ob alle wichtigen Funktionen durch Vergrößerung der Plastiden aufrecht erhalten werden können und wie sich die fehlende korrekte Teilungsmöglichkeit auf die Gestalt der Plastiden auswirkt. Eine Lokalisierung der Plastiden in kolonisierten transgenen Wurzeln wäre dabei nach einer Transformation mit einem GFP-Konstrukt mit Plastidensignalsequenz möglich.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Plastidenproliferation bei der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza in der Modellpflanze *Medicago truncatula* untersucht. Den Ausgangspunkt der Untersuchungen stellte die von Fester et al. (2001) in Tabak gefundene starke Plastidenproliferation und die Bildung eines Plastidennetzwerkes um intakte Arbuskeln in kolonisierten Wurzelrindenzellen dar.

- Durch CLSM-Analyse GFP-markierter Organellen konnte im Vergleich zu nicht kolonisierten Rindenzellen eine starke Proliferation von Plastiden, Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum in der Umgebung intakter Arbuskeln gezeigt werden. Diese Untersuchungen wurden mit transformierten Pflanzen durchgeführt, deren Organellen durch einen Import von GFP als grün fluoreszierende Strukturen sichtbar wurden. Mitochondrien und Plastiden wurden auf diese Weise in Wurzeln chimärer *M. truncatula*-Pflanzen nach Wurzeltransformation mit einem ptGFP- bzw. mtGFP-Konstrukt, das ER in Wurzeln transgener ertGFP-*Nicotiana benthamiana*-Pflanzen untersucht. Im Vergleich zur Wurzelrinde wurde eine viel höhere Anzahl von Mitochondrien und Plastiden unabhängig von einer Kolonisierung der Wurzeln im Zentralzylinder festgestellt.
- Die beobachtete Proliferation von ER, Mitochondrien und insbesondere von Plastiden in der Umgebung intakter Arbuskeln entspricht wahrscheinlich einer allgemeinen Steigerung der metabolischen Aktivität in kolonisierten Wurzelrindenzellen. Diese Aktivität betrifft beispielsweise den Aufbau der periarbuskulären Membran. Eine entsprechende Steigerung der plastidären Fettsäurebiosynthese durch die Zunahme der Transkriptmengen des Enzyms ACCase deutete sich bei Real-Time RT-PCR-Untersuchungen an.
- Durch die CLSM-Untersuchung nach der Immunfluoreszenzmarkierung von GFP in ptGFP-transformierten *M. truncatula* Wurzeln und nach einer Fluoreszenzmarkierung des AM-Pilzes wurden drei verschiedene Entwicklungsstadien von Plastiden in kolonisierten Wurzeln festgestellt. In der Umgebung früher Arbuskelstadien mit fein verzweigten Ästen fand eine starke Proliferation elliptischer Plastiden statt. Eine auffällige Veränderung der elliptischen Plastiden zu langgestreckten pleiomorphen Plastiden war in der Umgebung älterer Arbuskeln mit weniger verzweigten, dickeren Ästen nachweisbar. In der Umgebung degenerierender Arbuskeln traten nur wenige Plastiden mit eingebuchteter Form auf, die sich vermutlich ebenfalls in einer Abbauphase befanden. Eine alternative Plastidenlokalisierung war durch Kaninchen-Antiserum gegen DXR, einem in Plastiden lokalisierten Enzym aus dem MEP-Weg, möglich. Die Kolo-kalisierung von ptGFP und DXR in kolonisierten, ptGFP transformierten Wurzeln von *M. truncatula* zeigte sehr geringe, zum Teil nicht mehr detektierbare Mengen von DXR in dem frühen elliptischen Plastidenstadium. Dagegen akkumulierte DXR deutlich in den älteren Plastidenstadien, den langgestreckten pleiomorphen Plastiden und in den vermutlich degenerierenden Plastiden im letzten Stadium des Arbuskelzyklus.
- Der zentrale Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Rolle die Plastidenteilung an der beobachteten Plastidenproliferation in kolonisierten Wurzelrindenzellen von *M. truncatula* spielt und wie diese Proliferation mit der Entwicklung der Pilzstrukturen korreliert. Zur Charakterisierung der Plastidenteilung wurde das Plastidenteilungsprotein FtsZ1 aus *M. truncatula* kloniert und charakterisiert. Diese Sequenz zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu einer entsprechenden Sequenz aus *P. sativum* (Gaikwad et al., 2000) und ließ sich der FtsZ1-Gruppe zuordnen. Eine Southern Blot-Analyse und der Sequenzvergleich mit der kürzlich veröffentlichten Sequenz von

Chomosome 5 deutet auf zwei Genkopien im Genom von *M. truncatula* hin. Das auf Chromosom 5 enthaltene FtsZ1-Gen enthält 5 Introns mit konservierten Exon/Intron-Übergängen. Das lösliche rekombinante MtFtsZ1a-Protein ohne die putative Plastidensignalsequenz besaß sehr ähnliche Eigenschaften wie die verwandten FtsZ-Proteine aus Prokaryoten. Es zeigte eine hohe GTPase-Aktivität und die Fähigkeit zum Selfassembly *in vitro*. Für die Entstehung langer Protofilamente war die alleinige Gegenwart von GTP ausreichend,  $Mg^{2+}$  allein bewirkte nur die Bildung sehr kurzer Protofilamente.

- Immunaffinitätsgereinigte Antikörper aus Kaninchen bzw. Meerschweinchen gegen das heterolog exprimierte FtsZ1 aus *M. truncatula* markierten FtsZ-Ringe bei Chloroplasten von Mesophyllzellen und bei Plastiden im Zentralzylinder von Wurzeln. Mit diesen Antikörpern wurden in kolonisierten Wurzeln in der Umgebung junger, feinverästelter Arbuskeln zahlreiche FtsZ1-Signale nachgewiesen, die einer starken Teilungsaktivität der Plastiden in der frühen Entwicklungsphase entsprechen. Aber auch in einer späteren Phase wurden in der Nähe gering verzweigter Arbuskeln mit dickeren Ästen FtsZ1-Signale detektiert, die mit der DXR kolokalisiert werden konnten. Dagegen war in nichtkolonisierten Wurzelrindenzellen FtsZ1 kaum nachweisbar.
- Während die intensive Plastidenteilung in der Umgebung junger Arbuskeln zu einer starken Plastidenproliferation in der frühen Entwicklungsphase führt, könnten die beobachteten FtsZ1-Ringe bei älteren Arbuskeln entweder auf eine wiederholte Teilung und Verschmelzung der langgestreckten Plastiden hindeuten oder den abschließenden Zerfall der netzwerkartigen Strukturen für einen neuen Kolonisierungszyklus vorbereiten. Die Bedeutung der Proliferation der Plastiden in dieser Phase, ihre spezielle Form sowie die mit der DXR korrelierende Akkumulation von Apocarotinoiden bedarf zu ihrer Aufklärung noch weitergehender Untersuchungen.

## 6. Literatur

- ABI-Prism** (1997) ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. User Bulletin #2: 1-37
- Addinall S. G. und Holland B.** (2002) The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J Mol Biol* **318**: 219-236
- Alexander T., Meier R., Toth R., Weber H. C.** (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol* **110**: 363-370
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Anderson D. E., Gueiros-Filho F. J., Erickson H. P.** (2004) Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J Bacteriol* **186**: 5775-5781
- Araki Y., Takio S., Ono K., Takano H.** (2003) Two types of plastid ftsZ genes in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Protoplasma* **221**: 163-173
- Barker S. J., Tagu D., Delp G.** (1998) Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses. *Plant Physiol* **116**: 1201-1207
- Bécard G. und Fortin J. A.** (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* **108**: 211-218
- Beringer J. E.** (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198
- Blancaflor E. B., Zhao L., Harrison M. J.** (2001) Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma* **217**: 154-165
- Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard G., Rosenberg C., Barker D. G.** (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 695-700
- Bonfante P. und Perotto S.** (1995) Transley Review No. 82 - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol* **130**: 3-21
- Bradford M. M.** (1976) 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
- Bramhill D. und Thompson C. M.** (1994) GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5813-5817
- Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L.** (2000) *Biochemistry & molecular biology of plants*. Md. : American Soc. of Plant Physiologists, Rockville,
- Carballido-López R. und Errington J.** (2003) A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **13**: 577-583
- Chabot S., Becard G., Piché Y.** (1992) Life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. *Mycologia* **84**: 315-321
- Chen Y. und Erickson H. P.** (2005) Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **280**: 22549-22554
- Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J.** (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* **6**: 325-330
- de Boer P., Crossley R., Rothfield L.** (1992) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**: 254-256

- Dinkins R., Reddy M. S., Leng M., Collins G. B.** (2001) Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* MinD1 gene alters chloroplast size and number in transgenic tobacco plants. *Planta* **214**: 180-188
- Dong W., Dongdong K., Yong H., Chuanli J., Yikun H., Jingsan S.** (2002) Cloning of two plastid division *ftsZ* genes from *Nicotiana tabacum* and their expression in *E. coli*. *Progress in Natural Science* **12**: 909-914
- El-Kafafi E. S., Mukherjee S., El-Shami M., Putaux J. L., Block M. A., Pignot-Paintrand I., Lerbs-Mache S., Falconet D.** (2004) The plastid division proteins, FtsZ1 and FtsZ2, differ in their biochemical properties and sub-plastidial localisation. *Biochem J* **387**: 669-676
- El-Shami M., El-Kafafi S., Falconet D., Lerbs-Mache S.** (2002) Cell cycle-dependent modulation of FtsZ expression in synchronized tobacco BY2 cells. *Mol Genet Genomics* **267**: 254-261
- Emanuelsson O., Nielsen H., von Heijne G.** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**: 978-984
- Esen A.** (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein. *Anal Biochem* **89**: 264-273
- Esposito S., Massaro G., Vona V., Di Martino Rigano V., Carfagna S.** (2003) Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* **216**: 639-647
- Fester T.** (1996) RNA-Bindemotive als Bausteine der Evolution: Ribosomale Proteine und Matrix-lokalisierte Proteine bei pflanzlichen Mitochondrien. Dissertation. Tübingen, Berlin
- Fester T., Hause B., Schmidt D., Halfmann K., Schmidt J., Wray V., Hause G., D.Strack** (2002) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol* **43**: 256-265
- Fester T. und Hause G.** (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* **15**: 373-379
- Fester T., Schmidt D., Lohse S., Walter M. H., Giuliano G., Bramley P. M., Fraser P. D., Hause B., Strack D.** (2002) Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta* **216**: 148–154
- Fester T., Strack D., Hause B.** (2001) Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* **213**: 864-868
- Gaikwad A., Babbarwal V., Pant V., Mukherjee S. K.** (2000) Pea chloroplast FtsZ can form multimers and correct the thermosensitive defect of an *Escherichia coli* *ftsZ* mutant. *Mol Gen Genet* **263**: 231-221
- Geigenberger P., Stitt M., Fernie A. R.** (2004) Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant Cell Environ* **27**: 655–673
- Geurts R. und Franssen H.** (1996) Signal transduction in *Rhizobium*-induced nodule formation. *Plant Physiol* **112**: 447-453
- Gianinazzi-Pearson V.** (1996) Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *Plant Cell* **8**: 1871-1883
- Gu J., Stephenson C. G., Iadarola M. J.** (1994) Recombinant proteins attached to a nickel-NTA column: use in affinity purification of antibodies. *Biotechniques* **17**: 257, 260, 262
- Gunning B. E.** (2005) Plastid stromules: video microscopy of their outgrowth, retraction, tensioning, anchoring, branching, bridging, and tip-shedding. *Protoplasma* **225**: 33-42

- Hans J.** (2003) Isoprenoidbiosynthese in mykorrhizierten Maiswurzeln: Klonierung, Charakterisierung und Lokalisierung einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR). Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- Hans J., Hause B., Strack D., Walter M. H.** (2004) Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize. *Plant Physiol* **134**: 614-624
- Harrison M. J.** (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 361-389
- Harrison M. J., Dewbre G. R., Liu J.** (2002) A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429
- Haseloff J., Siemering K. R., Prasher D. C., Hodge S.** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2122-2127
- Hause B. und Fester T.** (2004) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*
- Hause B. und Fester T.** (2005) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* **221**: 184-196
- Hewitt E. J.** (1966) Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. In: Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureaux, Bucks, UK, pp 187-237
- Hirota Y., Ryter A., F.Jacob** (1968) Thermosensitive Mutants of *E. coli* Affected in the Process of DNA Synthesis and Cellular Division. *Cold Spring Harb Quant Biol* **33**: 677-393
- Imaizumi-Anraku H., Takeda N., Charpentier M., Perry J., Miwa H., Umehara Y., Kouchi H., Murakami Y., Mulder L., Vickers K., Pike J., Allan Downie J., Wang T., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Yoshikawa M., Murooka Y., Wu G. J., Kawaguchi M., Kawasaki S., Parniske M., Hayashi M.** (2004) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* **433**: 527-531
- Inouye S. und Tsuji F. I.** (1994) Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett* **351**: 211-214
- Isayenkov S., Fester T., Hause B.** (2004) Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *J Plant Physiol* **161**: 1379-1383
- Jones F. R.** (1924) A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. *J Agric Res* **29**: 459-470
- Kariya N. und Toth R.** (1981) Ultrastructure of the mycorrhizal association formed between *Zea diploperennis* and *Glomus fasciculatus*. *Mycologia* **73**: 1027
- Kiessling J., Krusea S., Rensing S. A., Harter K., Decker E. L., Reski R.** (2000) Visualization of a cytoskeleton-like FtsZ network in chloroplasts. *J Cell Biol* **151**: 945-950
- Kinden D. A. und Brown M. F.** (1976) Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. IV. Host-endophyte interactions during arbuscular deterioration 1,2. *Can J Microbiol* **22**: 64-75
- Klingner A., Bothe H., Wray V., Marnier F.-J.** (1995) Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonisation. *Phytochemistry* **38**: 53-55
- Klingner A., Hundeshagen B., Kernebeck H., Bothe H.** (1995) Localisation of the yellow pigment formed in roots of gramineous plants colonized by arbuscular fungi. *Protoplasma* **185**: 50-57
- Köhler R. H. und Hanson M. R.** (2000) Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *J Cell Sci* **113 ( Pt 1)**: 81-89

- Köhler R. H. und Hanson M. R.** (2000) Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *J Cell Sci* **113 ( Pt 1)**: 81-89
- Koppes L. J., Overbeeke N., Nanninga N.** (1978) DNA replication pattern and cell wall growth in *Escherichia coli* PAT 84. *J Bacteriol* **133**: 1053-1561
- Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Dénarié J., Barker D. G., Bécard G.** (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **131**: 952-962
- Kwok E. Y. und Hanson M. R.** (2004) GFP-labelled Rubisco and aspartate aminotransferase are present in plastid stromules and traffic between plastids. *J Exp Bot* **55**: 595-604
- Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Liu H., Trieu A. T., Blaylock L. A., Harrison M. J.** (1998) 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
- Lohse S., Schliemann W., Ammer C., Kopka J., Strack D., Fester T.** (2005) Organization and Metabolism of Plastids and Mitochondria in Arbuscular Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **139(1)**: 329-340
- Lu C. und Erickson H. P.** (1998) Purification and assembly of FtsZ. *Methods Enzymol* **298**: 305-313
- Lu C., Stricker J., Erickson H. P.** (1998) FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima* - quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**: 71-86
- Lutkenhaus J. F., Wolf-Watz H., Donachie W. D.** (1980) Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). *J Bacteriol* **142**: 615-620
- Mackenzie S. und McIntosh L.** (1999) Higher plant mitochondria. *Plant Cell* **11**: 571-586
- Maier W., Hammer K., Dammann U., Schulz B., D. Strack** (1997) Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. *Planta* **202**: 36-42
- Maier W., Schmidt J., V.Wray, Walter M. H., Strack D.** (1999) The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, induces the accumulation of cyclohexenone derivatives in tobacco roots. *Planta* **207**: 620-623
- Marques J. P., Dudeck I., Klosgen R. B.** (2003) Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol Genet Genomics* **269**: 381-387
- Marques J. P., Schattat M. H., Hause G., Dudeck I., Klösigen R. B.** (2004) In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **55**: 1697-1706
- McAndrew R. S., Froehlich J. E., Vitha S., Stokes K. D., Osteryoung K. W.** (2001) Colocalization of plastid division proteins in the chloroplast stromal compartment establishes a new functional relationship between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants. *Plant Physiol* **127**: 1656-1666
- Meyer Y., Grosset J., Chartier Y., Cleyet-Marel J. C.** (1988) Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* **9**: 704-712
- Mingorance J., Rueda S., Gómez-Puertas P., Valencia A., Vicente M.** (2001) *Escherichia coli* FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol Microbiol* **41**: 83-91

- Miyagishima S.-y., Kuroiwa H., Kuroiwa T.** (2001) The timing and manner of disassembly of the apparatuses for chloroplast and mitochondrial division in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* **212**: 517-528
- Miyagishima S. Y., Nishida K., Mori T., Matsuzaki M., Higashiyama T., Kuroiwa H., Kuroiwa T.** (2003) A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* **15**: 655-665
- Miyagishima S.-y., Takahara M., Mori T., Kuroiwa H., Higashiyama T., Kuroiwa T.** (2001) Plastid division is driven by a complex mechanism that involves differential transition of the bacterial and eukaryotic division rings. *Plant Cell* **13**: 2257-2268
- Moller-Jensen J. und Löwe J.** (2005) Increasing complexity of the bacterial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 75-81
- Momoyama Y., Miyazawa Y., Miyagishima S. Y., Mori T., Misumi O., Kuroiwa H., Tsuneyoshi K.** (2003) The division of pleomorphic plastids with multiple FtsZ rings in tobacco BY-2 cells. *Eur J Cell Biol* **82**: 323-332
- Mukherjee A., Dai K., Lutkenhaus J.** (1993) *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1053-1057
- Mukherjee A. und Lutkenhaus J.** (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J* **17**: 462-469
- Mukherjee A. und Lutkenhaus J.** (1998) Purification, assembly, and localization of FtsZ. *Methods Enzymol* **298**: 296-305
- Mukherjee A. und Lutkenhaus J.** (1999) Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol* **181**: 823-832
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G.** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6
- Niwa Y., Hirano T., Yoshimoto K., Shimizu M., Kobayashi H.** (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J* **18**: 455-463
- Novagen** (2002) pET System Manual. In. Novagen
- Osteryoung K. W. und McAndrew R. S.** (2001) The Plastid Division Machine. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 315-333
- Osteryoung K. W. und Nunnari J.** (2003) The division of endosymbiotic organelles. *Science* **302**: 1698-1704
- Osteryoung K. W., Stokes K. D., Rutherford S. M., Percival A. L., Lee W. Y.** (1998) Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial ftsZ. *Plant Cell* **10**: 1991-2004
- Osteryoung K. W. und Vierling E.** (1995) Conserved cell and organelle division. *Nature* **376**: 473-474
- Pfaffl M. W.** (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* **1**: 92-95
- Pfeffer P. E., Douds Jr D. D., Becard G., Shachar-Hill Y.** (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* **120**: 587-598
- Phillips J. M. und Hayman D. S.** (1970) Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* **55**: 158-162
- Powel C. L. und Bagyaraj D. J.** (1984) VA Mycorrhiza, Ed 1. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- Pyke K. A. und Howells C. A.** (2002) Plastid and stromule morphogenesis in tomato. *Ann Bot (Lond)* **90**: 559-566

- Rausch C. und Bucher M.** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **216**: 23-37
- RayChaudhuri D. und Park J. T.** (1992) *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**: 251-254
- Reddy M. S., Dinkins R., Collins G. B.** (2002) Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* MinE1 bacterial division inhibitor homologue gene alters chloroplast size and morphology in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants. *Planta* **215**: 167-176
- Reski R.** (2002) Rings and networks: the amazing complexity of FtsZ in chloroplasts. *Trends Plant Sci* **7**: 103-105
- Ricard M. und Hirota Y.** (1973) Process of Cellular Division in *Escherichia coli*: Physiological Study on Thermosensitive Mutants Defective in Cell Division. *J Bacteriol* **116**: 314-322
- Rodriguez-Concepcion M. und Boronat A.** (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**: 1079-1089
- Rudolph R., Böhm G., Lillie H., Jaenicke R.** (1997) *Protein Function: A Practical Approach*. Oxford University Press
- Ruiz M. T., Voinnet O., Baulcombe D. C.** (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-946
- Sambrook J. und Russell D. W.** (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Ed 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schüßler A.** (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 75-83
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C.** (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421
- Simon L., Lalonde M., Bruns T. D.** (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* **58**: 291-295
- Smith G. E. und Summers M. D.** (1980) The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyloxymethyl-paper. *Anal Biochem* **109**: 123-129
- Smith S. E. und Read D. J.** (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 2. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Cambridge
- Sossong T. M. J., Brigham-Burke M. R., Hensley P., Pearce K. H. J.** (1999) Self-activation of guanosine triphosphatase activity by oligomerization of the bacterial cell division protein FtsZ. *Biochemistry* **38**: 14843-14850
- Stokes K. D., McAndrew R. S., Figueroa R., Vitha S., Osteryoung K. W.** (2000) Chloroplast division and morphology are differentially affected by overexpression of FtsZ1 and FtsZ2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 1668-1677
- Stougaard J.** (2000) Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol* **124**: 531-540
- Stougaard J.** (2001) Genetics and genomics of root symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 328-335
- Stricker J., Maddox P., Salmon E. D., Erickson H. P.** (2002) Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3171-3175
- Takahara M., Takahashi H., Matsunaga S., Miyagishima S., Takano H., Sakai A., Kawano S., Kuroiwa T.** (2000) A putative mitochondrial *ftsZ* gene is present in the unicellular primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol Gen Genet* **264**: 452-460

- Trieu A. T., Burleigh S. H., Kardailsky I. V., Maldonado-Mendoza I. E., Versaw W. K., Blaylock L. A., Shin H., Chiou T.-J., Katagi H., Dewbre G. R., Weigel D., Harrison M. J.** (2000) Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J* **22**: 531-541
- Udvardi M. K.** (2001) Legume models strut their stuff. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 6-9
- Vaughan S., Wickstead B., Gull K., Addinall S. G.** (2004) Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol* **58**: 19-29
- Vitha S., McAndrew R. S., Osteryoung K. W.** (2001) FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J Cell Biol* **153**: 111-119
- Walter M. H., Fester T., Strack D.** (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *Plant J* **21**: 571-578
- Walter M. H., Hans J., Strack D.** (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal root. *Plant J* **31**: 243-254
- Ward J. E., Jr. and Lutkenhaus J.** (1985) Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. *Cell* **42**: 941-949
- Waters M. T., Fray R. G., Pyke K. A.** (2004) Stromule formation is dependent upon plastid size, plastid differentiation status and the density of plastids within the cell. *Plant J* **39**: 655-667
- Whatley J. M.** (1983) The ultrastructure of plastids in roots. *Int Rev Cytol.* **85**: 175-220
- Yu X.-C. and Margolin W.** (1997) Ca<sup>2+</sup>-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J* **16**: 5455-5463