

13 *Agrobacterium* und *Rhizobium* – Bodenbakterien als Pflanzeningenieure

Christoph Dehio, Jozef Schell und Csaba Koncz

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung,
Abteilung Genetische Grundlagen, Köln

Die in der Familie der Rhizobiaceae zusammengefaßten Bodenbakterien leben in enger Assoziation mit Pflanzen. Am besten untersucht sind die Wechselwirkungen von *Agrobacterium* und *Rhizobium* mit ihren pflanzlichen Wirten. Beide Bakteriengattungen bilden durch die spezifische Manipulation pflanzlicher Entwicklungs- und Stoffwechselprozesse einzigartige Habitate aus. Die phytopathogenen Agrobakterien stimulieren in infizierten zweikeimblättrigen Pflanzen die Bildung von Tumoren. Diese Tumore synthetisieren und sezernieren Opine – besondere Aminosäurederivate, die ausschließlich von Agrobakterien als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden können. Verantwortlich für die Tumorbildung und die Opinsynthese ist die Übertragung genetischer Information von Agrobakterien in das Genom infizierter Pflanzenzellen. Dieses Prinzip der genetischen Kolonisation von Pflanzen bietet den Agrobakterien gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen im Boden einen klaren Selektionsvorteil. Das symbiotische Bakterium *Rhizobium* (Knöllchenbakterium) stimuliert nach Infektion seiner Wirtspflanzen aus der Ordnung der Leguminosen die Ausbildung stickstofffixierender Wurzelknöllchen. Die Entwicklung dieses Symbioseorgans bedingt eine koordinierte Ausprägung von symbiotischen Genen der Pflanze und des Mikrosymbionten, die ein wechselseitiger Signalaustausch reguliert. Im ausdifferenzierten Wurzelknöllchen leben die Rhizobien als Endosymbionten der infizierten Pflanzenzellen. Diese enge strukturelle Beziehung der Symbiosepartner resultiert auch in einer weitreichenden Integration der Stoffwechselprozesse beider Organismen. Die Pflanze deckt den hohen Energiebedarf der Rhizobien zur Fixierung von molekularem Stickstoff, während sie umgekehrt die hierbei gebildeten organischen Stickstoffprodukte assimiliert. Die Wechselwirkung zwischen Rhizobien und ihren Wirtspflanzen kann zum Teil auch parasitärer Natur sein. Die endosymbiotischen Formen einiger Rhizobien-Arten bewirken in Wurzelknöllchen die Synthese von Rhizopinen. Diese opinartigen Substanzen dienen nach ihrer Freisetzung in den Boden freilebenden Rhizobien als Nahrungsquelle.

13.1 *Agrobacterium*-induzierte Tumorbildung in Pflanzen

Die Infektion verwundeter Pflanzen durch Agrobakterien bewirkt üblicherweise die Ausbildung pflanzlicher Tumore [1]. *Agrobacterium tumefaciens* induziert Wurzelhalsgallen, deren Tumorgewebe undifferenziert wächst (Abbildung 13.1a). Zwei Eigenschaften des Tumorgewebes sind besonders hervorzuheben: In Gewebekultur proliferiert der Tumor ohne Zugabe von Phytohormonen (Auxinen und Cytokinen) zum Nährmedium, wohingegen diese Phytohormone für das Wachstum normaler Zellgewebe in Gewebekultur essentiell sind. Außerdem synthetisiert der Tumor Opine – Aminosäurederivate, die in anderen Pflanzengewebe nicht vorkommen. *Agrobacterium rhizogenes*, der Erreger der Wurzelhaarkrankheit, induziert die Bildung differenzierter Wurzeltumore, der sogenannten ‚haarigen Wurzeln‘ (Abbildung 13.1b). ‚Haarige Wurzeln‘ unterscheiden sich von normalen Wurzeln durch die Synthese von Opinen sowie in Sterilkultur durch das undeterminierte Wachstum auf hormonfreien Nährmedien.

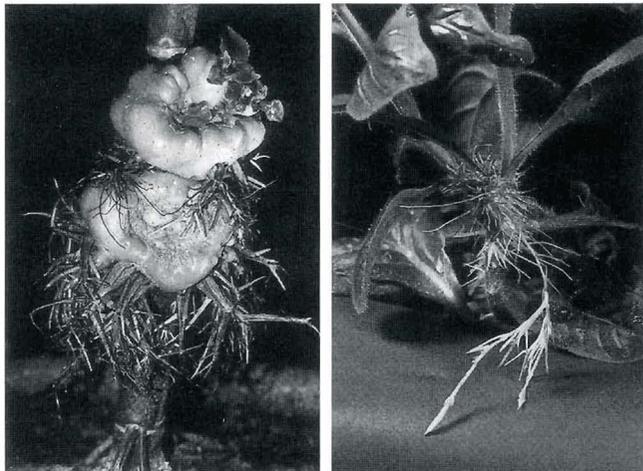


Abb. 13.1. (a) Wurzelhalsgalle an einer *Kalanchoe diargemma*-Pflanze nach der Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* und (b) „Haarige Wurzeln“ an einer Tabakpflanze nach der Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes*.

13.1.1 Natürlicher Gentransfer: Das Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Opinsynthese sowie das hormonunabhängige Wachstum *Agrobacterium*-induzierter Tumore in Abwesenheit von Agrobakterien führte zu dem Schluß, daß diese Mikroorganismen auf Pflanzen ein ‚tumorinduzierendes Prinzip‘ übertragen können. Auf der Suche nach diesem Prinzip entdeckte man, daß infektiöse Bakterien ein circa 200 kb (kb = Kilobasenpaare) großes Plasmid enthalten, das sogenannte Ti-Plasmid (Ti = Tumor induzierend) (Abbildung 13.2). Es ließ sich nachweisen, daß ein Teil des Ti-Plasmids, die circa 20 kb große t-DNA (t = Transfer), in infizierte Pflanzenzellen übertragen und stabil in das Genom integriert wird. Die t-DNA kodiert die Gene für das Tumorstadium sowie für die Opinsynthese.

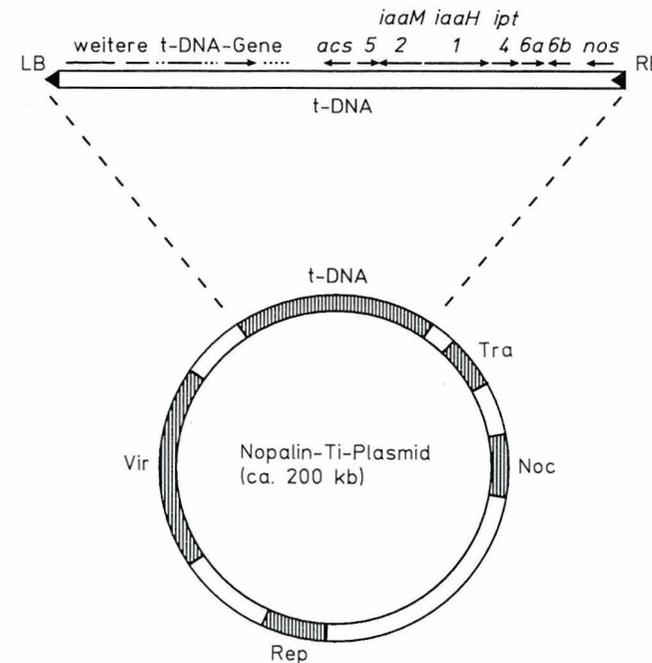


Abb. 13.2. Genetische Organisation eines Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens*. Unterer Teil: Funktionell charakterisierte Bereiche eines Nopalin-Ti-Plasmids. Noc: Nopalin-Katabolismus; Rep: Funktionen zur Replikation des Plasmids in Agrobakterien; t-DNA: in Pflanzenzellen transferierter DNA-Bereich des Plasmids; Tra: Funktionen zum Transfer des Plasmids zwischen Bakterien; Vir: Virulenzbereich für den t-DNA-Transfer in

Pflanzenzellen. – Oberer Teil: Struktur und Anordnung der auf einer Nopalin-t-DNA identifizierten Gene; transkribierte t-DNA-Gene sind als Balken dargestellt, die Transkriptionsrichtung ist, sofern bekannt, durch Pfeile markiert; *acs*: Agrocinopin-Synthetase-Gen; *iaaH*: Indolacetamid-Amidohydrolase-Gen; *iaaM*: Typtophan-Monooxygenase-Gen; *ipt*: Isopentenyl-Transferase-Gen; *nos*: Nopalin-Synthetase-Gen; LB: Linke Bordersequenz; RB: Rechte Bordersequenz.

13.1.2 Pflanzliche Signale bei der Induktion des t-DNA Transfers

Die für den t-DNA Transfer notwendigen bakteriellen Funktionen werden von den *vir*-Genen (*vir* = Virulenz) des Ti-Plasmids kodiert (Abbildungen 13.2 und 13.3). Darüber hinaus sind für die Induktion des t-DNA-Transferprozesses auch besondere Signale verwundeter Pflanzen notwendig. Als derartige Signale konnten bestimmte phenolische Verbindungen identifiziert werden, wie das Acetosyringon [3] (Abbildung 13.3a). Acetosyringon wirkt als spezifischer Induktor der Expression von *vir*-Genen, die ansonsten, mit Ausnahme der fortwährend ausgeprägten Gene *virA* und *virG*, transkriptionell inaktiv sind. Der Induktor Acetosyringon stimuliert das Transmembranprotein VirA zur Phosphorylierung des VirG-Proteins, dessen phosphorylierte Form als Aktivator der *vir*-Genexpression wirkt (Abbildung

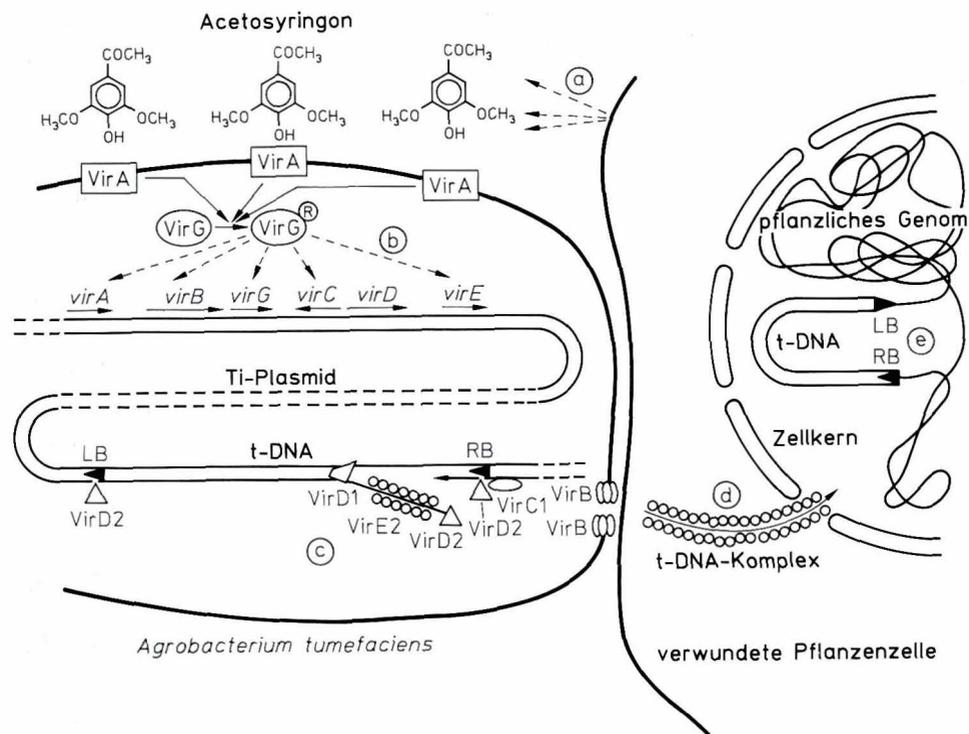


Abb. 13.3. Mechanismus des t-DNA-Transfers von *Agrobacterium* in Pflanzenzellen: (a) Exkretion des Signalmoleküls Acetosyringon durch verwundete Pflanzenzellen; (b) Induktion der *vir*-Gene; (c) Bildung des t-DNA-Komplexes; (d) Transfer des t-DNA-Komplexes; (e) Integration der t-DNA in das pflanzliche Genom.

13.3b). Vergleichbare regulatorische Zweikomponentensysteme, bestehend aus einem Umweltsensor (wie VirA) und einem Regulator (wie VirG), sind in Bakterien weitverbreitet.

13.1.3 Mechanismus des t-DNA-Transfers: Parallelen zur bakteriellen Konjugation

Der Mechanismus des t-DNA-Transfers von *Agrobacterium* in Pflanzen ist bisher noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß in *Agrobacterium* nach Induktion der *vir*-Gene durch Acetosyringon eine einzelsträngige Kopie der t-DNA des Ti-Plasmids generiert wird, die nach dem Transfer in Pflanzenzellen in das pflanzliche Genom integriert wird [2]. In diesem Prozeß konnte einigen der beteiligten Vir-Proteine eine Funktion zugewiesen werden (Abbildung 13.3). Die t-DNA wird an ihren Enden von circa 25 Bp (Bp = Basenpaare) langen direkten Sequenzwiederholungen flankiert, der rechten Bordersequenz (RB) bzw. der linken Bordersequenz (LB). Der t-DNA-Transferprozeß wird durch einen Einzelstrangbruch an der rechten Bordersequenz initiiert (Abbildung 13.3c). Diese Reaktion erfolgt durch die sequenzspezifische Endonuklease VirD2 im Zusammenspiel mit dem DNA-bindenden VirC1-Protein. Gleichzeitig wird das VirD2-Protein kovalent an das generierte Ende der einzelsträngigen t-DNA gebunden. Das VirD1-Protein bildet mit pflanzlichen Faktoren eine Helikase-Aktivität, die den t-DNA-Einzelstrang von dem komplementären DNA-Strang des Ti-Plasmids entwindet. Die entwundene einzelsträngige t-DNA wird durch Bindung des VirE2-Proteins stabilisiert und vor dem Angriff von Endonukleasen geschützt. Der gebildete t-DNA-Komplex wird schließlich durch einen Einzelstrangbruch an der linken Bordersequenz freigesetzt. Diese Reaktion katalysiert ebenfalls das VirD2-Protein. Für den Transport des t-DNA-Komplexes in verwundete Pflanzenzellen müssen die *Agrobacterium* mit den pflanzlichen Zellen in engen Kontakt treten. Die hierfür erforderliche bakterielle Anheftungsreaktion erfolgt durch die Aktivität chromosomaler Virulenzgene. Der t-DNA-Komplex wird dann durch Poren der bakteriellen Zellwand, an deren Ausbildung die verschiedenen VirB Proteine beteiligt sind, in das Cytoplasma der Pflanzenzellen geschleust (Abbildung 13.3d). Für den gerichteten Weitertransport des t-DNA-Komplexes in den pflanzlichen Zellkern sowie die sequenzunspecifische Integration des t-DNA-Einzelstrangs in das pflanzliche Genom (Abbildung 13.3e) kommt wiederum dem VirD2-Protein besondere Bedeutung zu. Das kovalent an den t-DNA-Einzelstrang gebundenen VirD2-Protein besitzt ein funktionales Signal für den Transport von Proteinen in den

Kern eukaryotischer Zellen, so daß hierdurch der gesamte t-DNA-Komplex in den pflanzlichen Zellkern geleitet wird [2]. Ferner weist ein Bereich des VirD2-Proteins Homologien zur DNA-Ligase aus *Escherichia coli* auf, die demnach am Integrationsprozeß der einzelsträngigen t-DNA in die pflanzliche DNA beteiligt sein könnte [3]. Vermutlich durch Reparatursynthese wird anschließend der fehlende Gegenstrang der integrierten einzelsträngigen t-DNA ergänzt.

Der gesamte Mechanismus des t-DNA-Transfers zeigt demnach bemerkenswerte Analogien zur bakteriellen Konjugation [1], die dem genetischen Informationsaustausch zwischen Bakterien dient. Die strukturelle Ähnlichkeit sowie die funktionale Austauschbarkeit einzelner analoger Komponenten der beiden Prozesse deuten darauf hin, daß sich der Mechanismus des t-DNA-Transfers von *Agrobacterium* in Pflanzenzellen aus der bakteriellen Konjugation entwickelt hat.

13.2 Pflanzentumore: Umsteuerung von Differenzierungsprozessen

Nach dem Transfer der t-DNA von Agrobakterien in infizierte Pflanzenzellen und deren Integration in das pflanzliche Genom werden die auf der t-DNA kodierten Gene (Abbildung 13.2) in den transformierten Pflanzenzellen ausgeprägt. t-DNA-Gene, die tumorhaftes Wachstum transformierter Pflanzenzellen bewirken, werden in Anlehnung an die Terminologie tumor-auslösender Gene tierischer Systeme als pflanzliche Onkogene bezeichnet.

Die t-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* kodiert für drei Onkogene, die eine Bildung von Wurzelhalsgallen sowie deren hormonunabhängiges Wachstum in Gewebekultur bewirken. Man konnte nachweisen, daß diese Onkogene Enzyme zur Synthese von Phytohormonen aus einfachen Metaboliten kodieren [1]. Das Auxin Indol-Essigsäure wird in zwei Schritten aus Tryptophan synthetisiert (Abbildung 13.4a). Das t-DNA-Gen 1 (*iaaM*-Gen) kodiert eine Tryptophan-2-Monooxygenase, welche die Oxidation von Tryptophan zu Indolacetamid katalysiert. Die Hydrolyse von Indolacetamid zu Indol-Essigsäure erfolgt durch die Aktivität einer Indolacetamid-Amidohydrolase, die durch das t-DNA-Gen 2 (*iaaH*-Gen) kodiert wird. Die Synthese des Cytokinins Isopentenyladenosin aus den Vorstufen Adenin und Isopentenylpyrophosphat erfolgt durch eine Isopentenyl-Transferase, die von dem t-DNA-Gen 4 (*ipt*-Gen) kodiert wird (Abbildung 13.4b).

In Wurzelhalsgallen kann die unregulierte Synthese von Auxinen und Cytokinen durch die Aktivität der Genprodukte von t-DNA-Onkogenen zu einer toxischen Anreicherung der gebildeten Phytohormone führen. Zur Gewährleistung eines optimalen Tumorwachstums werden deshalb die Wirkungen dieser Phytohormone durch die Produkte weiterer t-DNA-Gene moduliert. Das t-DNA-Gen 5 kodiert für ein Enzym zur Umwandlung von Tryptophan in Indol-Milchsäure [8] (Abbildung 13.4c). Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob diese Reaktion über das instabile Intermediärprodukt Indol-Pyruvat verläuft, oder ob Indol-Milchsäure direkt aus Tryptophan hervorgeht. Das Auxin-Analogon Indol-Milchsäure besitzt im Vergleich zur Indol-Essigsäure nur eine relativ schwache Auxinwirkung. Durch die kompetitive Inhibition der Bindung von Indol-Essigsäure an Auxin-Rezeptoren wirkt Indol-Milchsäure jedoch als ein potenter Auxin-Antagonist. Die Bildung von Indol-Milchsäure durch die Aktivität des t-DNA-Gen 5-Genprodukts erlaubt Wurzelhalsgallen somit die Tolerierung hoher Auxinkonzentrationen. Die Expression des t-DNA-Gens 5 wird jedoch erst durch hohe Auxinkonzentrationen induziert, so daß nur unter diesen Bedingungen Tryptophan in Indol-Milchsäure umgewandelt wird. Die hierdurch verminderte Auxinwirkung wiederum deaktiviert die Expression von t-DNA-Gen 5, so daß durch diesen autoregulatorischen Mechanismus die Auxinwirkungen in Wurzelhalsgallen auf einem homöostatischen Niveau gehalten werden. Die Feinregulation der Cytokininwirkungen erfolgt durch die Aktivität des t-DNA-Gen 6b-Genprodukts, dessen molekulare Wirkungsweise bisher jedoch ungeklärt ist.

Im Gegensatz zur Induktion undifferenzierter Wurzelhalsgallen durch *Agrobacterium tumefaciens* bewirkt *Agrobacterium rhizogenes* die Ausbildung differenzierter Tumore, der undeterminiert wachsenden ‚haarigen Wurzeln‘. Hierfür ist die Ausprägung von drei Onkogenen der übertragenen t-DNA verantwortlich, nämlich der Gene *rolA*, *rolB* und *rolC* (*rol* = ‚root locus‘) [1]. Obwohl Phytohormone an der Differenzierung von ‚haarigen Wurzeln‘ beteiligt sind, scheinen die *rol*-Gene keine Enzyme zur Neusynthese von Phytohormonen zu kodieren. Vielmehr ließ sich zeigen, daß das *rolB*-Genprodukt eine Erhöhung der Sensitivität von transformierten Pflanzengewebe gegenüber Auxinen bewirkt. Der zugrundeliegende molekulare Wirkungsmechanismus des *rolB*-Genprodukts ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Hingegen ist die Funktion des *rolC*-Genprodukts bekannt. Inaktive Zuckerkonjugate des Phytohormons Cytokinin werden durch die β -Glukosidase-Aktivität des *rolC*-Genprodukts gespalten, so daß aktive Cytokine freigesetzt werden [9]. Interessanterweise wirken die hierdurch in ‚haarigen Wurzeln‘ freigesetzten Cytokine zellautonom, während das in Wurzelhalsgallen durch die Aktivität des *Agrobacterium tumefaciens* t-DNA-Gen 4-Genprodukt synthetisierte Cytokinin auch transportiert wird und somit in anderen Zellen wirksam werden kann.

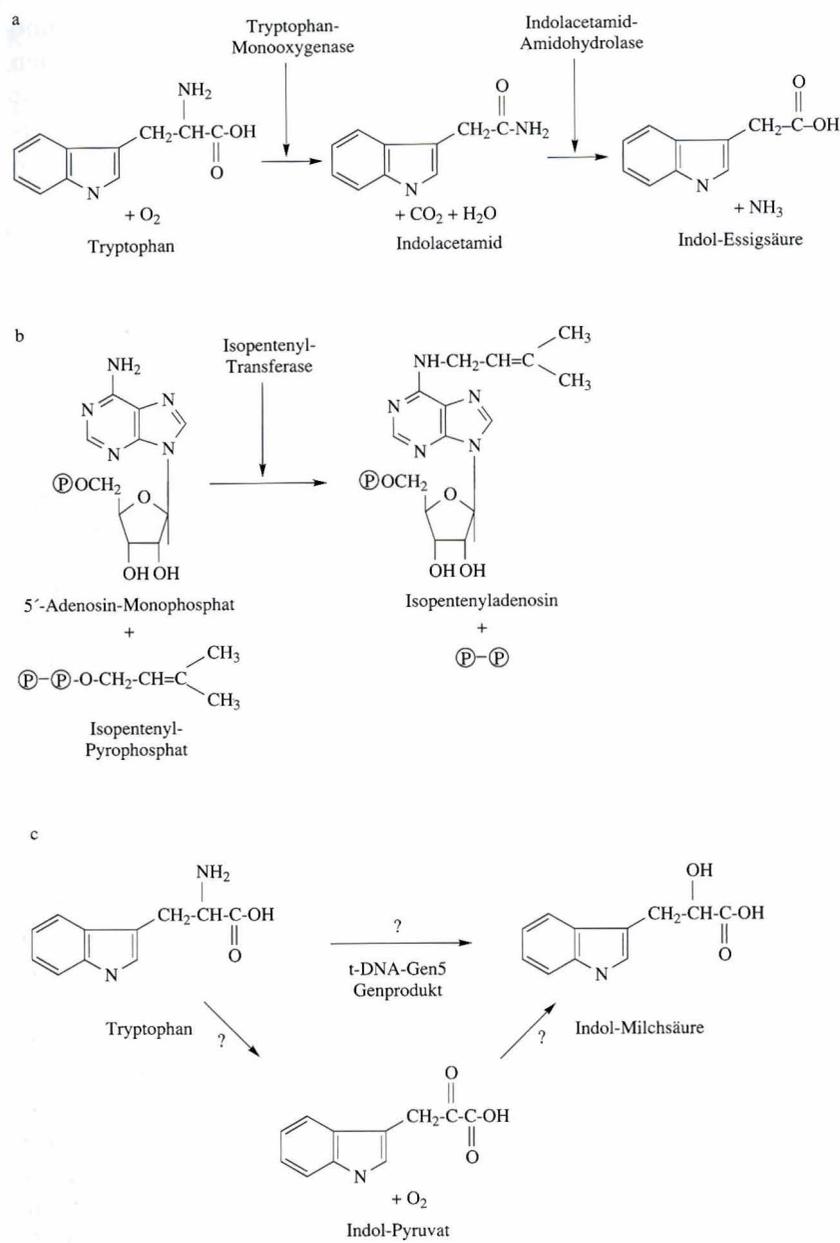


Abb. 13.4. Syntheseleistungen von *Agrobacterium tumefaciens*-induzierten Wurzelhalsgallen durch die Aktivität t-DNA-kodierter Genprodukte. (a) Synthese des Auxins Indol-Essigsäure durch die Genprodukte der Gene *iaaM* (t-DNA-Gen-1) und *iaaH* (t-DNA-Gen-2); (b) Synthese des Cytokinins Isopentenyladenosin durch das Genprodukt des *ipt*-Gens (t-DNA-Gen-4); (c) Umwandlung von Tryptophan in Indol-Milchsäure durch das Genprodukt des t-DNA-Gens 5.

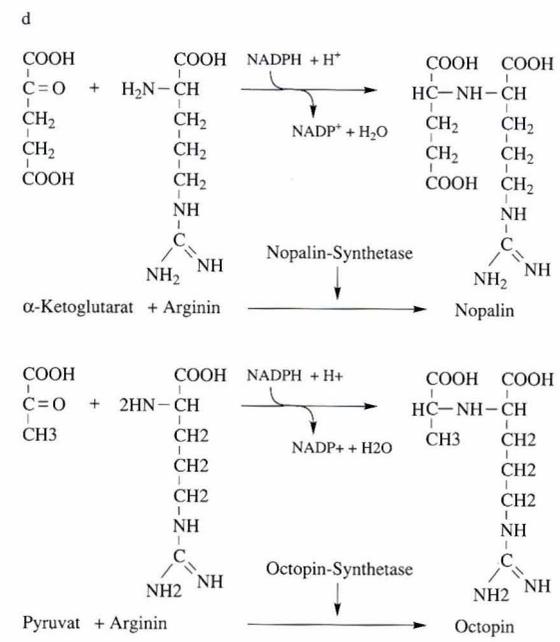


Abb. 13.4. Fortsetzung. (d) Synthese der wichtigsten Opine: Nopalin durch das Genprodukt des *nos*-Gens (oben) bzw. Octopin durch das Genprodukt des *ocs*-Gens (unten).

13.3 Freigesetzte Opine als Nahrungsgrundlage

Agrobacterium-induzierte Pflanzentumore synthetisieren und sezernieren Opine, untypische Metabolite, die in anderen Pflanzengewebe nicht gefunden werden [1]. Chemisch stellen die Opine Konjugate zwischen Aminosäuren und α -Oxosäuren dar. Ihre Synthese erfolgt mit Hilfe von Enzymen, die von t-DNA-Genen kodiert werden (wie *nos* = Nopalinsynthetase; Abbildung 13.2). Die unterschiedliche Substratspezifität der Opine-Synthetasen erlaubt eine einfache Klassifizierung von *Agrobacterium*-Stämmen anhand der in den induzierten Tumoren gebildeten Opine. Die bekanntesten Opine sind Nopalin und Octopin, Konjugate von Arginin mit α -Oxoglutarat bzw. Pyruvat (Abbildung 13.4d). Die in den Tumoren akkumulierenden Opine werden aktiv sezerniert und dienen Agrobakterien im umliegenden Boden als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Tatsächlich verfügen ausschließlich die Agrobakterien über die zum Abbau der Opine notwendigen katabolischen Funktionen. Diese Enzyme werden durch Gene auf dem Ti-Plasmid kodiert (beispielsweise *noc* = Nopalin-Katabolismus; Abbildung 13.2), die in ihrer Expression durch Opine induzierbar sind [3]. Die von einem Ti-Plasmid

kodierten Opine-katabolisierenden Enzyme zeigen immer eine ausgeprägte Substratspezifität für dasjenige Opine, welches in den durch dieses Ti-Plasmid induzierten Tumoren gebildet wird. Die Ti-Plasmid-kodierten anaboli-schen Funktionen (t-DNA-kodierte Opine-Synthetasen, im Pflanzentumor aktiv) und katabolischen Funktionen (außerhalb der t-DNA kodiert, in den Agrobakterien aktiv) des Opine-Stoffwechsels sind demnach aufeinander abgestimmt. Die von einem Tumor sezernierten Opine bewirken in der Agrobakterienpopulation eine aktive Verbreitung gerade desjenigen Ti-Plasmids, welches diesen Tumor induziert hat. Dies geschieht, indem die freigesetzten Opine die *tra*-Gene (*tra* = Transfer) des Ti-Plasmids (Abbildung 13.2) induzieren, deren Genprodukte die Konjugationsrate des Plasmids innerhalb der Agrobakterienpopulation erhöhen.

13.4 Genetische Kolonisation von Pflanzen

In der uns bekannten belebten Natur ist das Pathogenitätsprinzip von Agrobakterien gegenüber Pflanzen einzigartig, da nicht der Schadorganismus selbst, sondern die durch ihn horizontal auf den Wirtsorganismus übertragene genetische Information pathogen wirkt. Durch diesen Gentransfer von Agrobakterien in infizierte Pflanzenzellen entstehen Pflanzentumore, die Opine in das umliegende Erdreich sezernieren. Da Opine ausschließlich Agrobakterien als Nahrungsgrundlage zugänglich sind, verschaffen sich

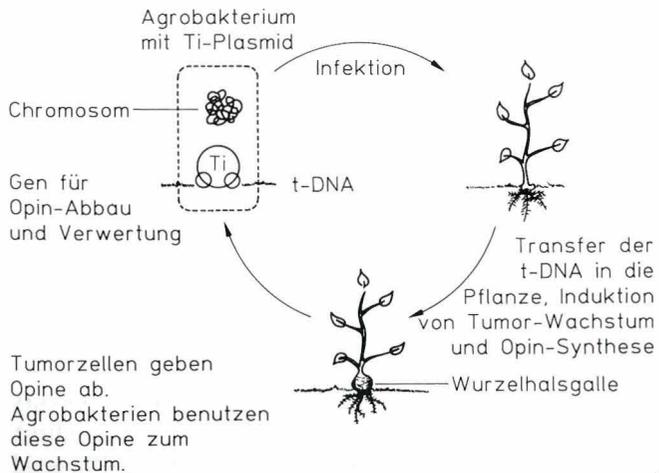


Abb. 13.5. Prinzip der genetischen Kolonisation von Pflanzen durch Agrobakterien.

Agrobakterien somit einen exklusiven Zugang zu den Photosyntheseleistungen der infizierten Pflanzen. Dieses Prinzip wird als genetische Kolonisation von Pflanzen durch Agrobakterien bezeichnet (Abbildung 13.5). Der hieraus resultierende Selektionsvorteil der Agrobakterien gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen im Boden manifestiert sich in einer bis zu tausendfachen Anreicherung der Agrobakterien in der Nähe von Pflanzentumoren.

13.5 Die *Rhizobium*-Leguminosen-Symbiose

Im Gegensatz zu den phytopathogenen Agrobakterien leben die nahe verwandten Rhizobien (Knöllchenbakterien) in Symbiose mit ihren Wirtspflanzen. Hierbei kommt es an den Wurzeln infizierter Pflanzen zur Ausbildung eines einzigartigen Symbioseorgans, des stickstofffixierenden Wurzelknöllchens [4] (Abbildung 13.6). Zum Prozeß der Knöllchenbildung, der auch als Nodulation bezeichnet wird, sind nur die in der artenreichen Pflanzenordnung Fabales zusammengefaßten Leguminosen befähigt. Die nodulierenden Mikrosymbionten finden sich in den Bakteriengattungen *Rhizobium*,

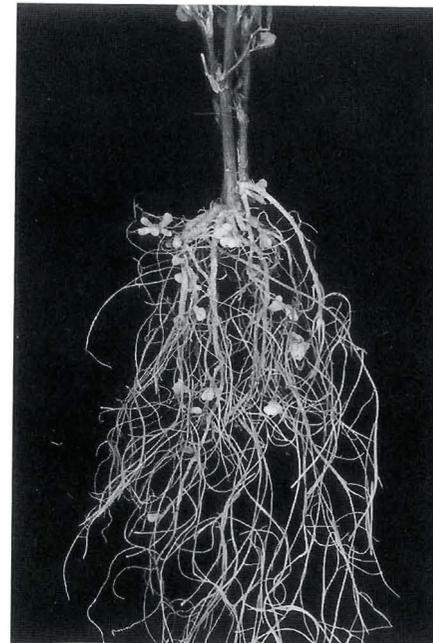


Abb. 13.6. Knöllchenbildung (Nodulation) an den Wurzeln der Luzerne nach der Infektion mit *Rhizobium meliloti*.

Bradyrhizobium und *Azorhizobium*, die sich jedoch in ihren Merkmalen sowie im Verlauf ihrer symbiontischen Wechselwirkung mit Leguminosen nur geringfügig unterscheiden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird deshalb im folgenden ausschließlich die Bakteriengattung *Rhizobium* vorgestellt, insbesondere am Beispiel der am besten untersuchten Spezies *Rhizobium meliloti*. Dieser Mikrosymbiont noduliert ausschließlich Luzernepflanzen. Im allgemeinen ist die Spezifität der *Rhizobium*-Leguminosen-Symbiose bemerkenswert. Die verschiedenen Rhizobien-Arten bewirken jeweils die Nodulation nur einer oder weniger, nahe verwandter Leguminosenarten. Umgekehrt kann eine bestimmte Leguminosenart häufig nur durch eine Rhizobien-Art noduliert werden. Die Kontrolle dieser Wirtsspezifität erfolgt durch beide Symbiosepartner.

13.5.1 Nodulation: Der Weg zum Wurzelknöllchen

Die Knöllchenbildung an Leguminosenwurzeln nach der Infektion durch Rhizobien ist ein sehr komplexer Entwicklungsprozeß, welcher der koordinierten Interaktion beider Symbiosepartner bedarf [5]. Die Wechselwirkung beginnt im Boden mit der Besiedlung der Wurzelspitze auskeimender Leguminosen durch chemotaktisch angelockte Rhizobien. Die angelagerten Bakterien verursachen bei den auswachsenden Wurzelhaaren die sogenannte Wurzelhaarkrümmung, wodurch sie in sehr engen Kontakt mit der Zellwand der Wurzelhaare gelangen. Etwa gleichzeitig werden im umliegenden Wurzelrindengewebe Zellteilungen induziert, die zur Ausbildung des zunächst undifferenzierten Knöllchengewebes führen. Die Infektion der Pflanze beginnt mit der lokalen Auflösung der Zellwand von Wurzelhaarzellen durch hydrolytische Enzyme der gebundenen Rhizobien. Die in das Wurzelhaar eindringenden Bakterien werden von einem Infektionsschlauch eingehüllt, der durch einen Umlagerungsprozeß der pflanzlichen Zellwand sowie durch die bakterielle Ausscheidung von Exopolysacchariden entsteht. Er wächst durch Teilung der Bakterien in das Knöllchengewebe ein und verzweigt sich, so daß sich der infizierte Gewebereich des wachsenden Wurzelknöllchens vergrößert. Schließlich werden die Bakterien aus dem Infektionsschlauch in die umliegenden Zellen des Knöllchengewebes entlassen.

Die Rhizobien liegen nicht frei im eukaryotischen Cytoplasma vor, sondern sind von der sogenannten Periplasmamembran umschlossen, die sich von der pflanzlichen Cytoplasmamembran ableitet. Die Aufnahme der Bakterien in Pflanzenzellen erfolgt demnach durch einen Endocytose-ähnlichen Prozeß. Die intrazellulären Rhizobien differenzieren anschließend in

ihre endosymbiontische Form, die man als Bakteroid bezeichnet. Das Knöllchen ist nun vollständig ausdifferenziert und enthält infizierte, mit Bakteroiden angefüllte sowie nicht-infizierte Zellen. Die günstigen physiologischen Bedingungen im Wurzelknöllchen erlauben den Bakteroiden mit Hilfe des Nitrogenase-Enzymkomplexes die Fixierung molekularen Stickstoffs in organische Stickstoffverbindungen.

13.5.2 Ausprägung symbiontischer Gene in beiden Symbiosepartnern

Die Einzigartigkeit der Morphogenese und Funktion von Wurzelknöllchen bedingt in beiden Symbiosepartnern die Ausprägung spezieller symbiontischer Gene [4]. Die Symbiosegene der Rhizobien werden durch ihren mutanten Phänotyp definiert. Bakterielle Symbiosegene, deren Mutierung in Defekten der Knöllchenmorphogenese resultieren, werden als *nod*-Gene (*nod* = Nodulation) bezeichnet. Die Genprodukte der *nod*-Gene sind für die Synthese bakterieller Signalmoleküle verantwortlich, die an den Leguminosenwurzeln den Prozeß der Nodulation induzieren. Die Mutierung der symbiontischen *exo*-Gene (*exo* = Exopolysaccharid) verursacht die Bildung sogenannter leerer Wurzelknöllchen, die nicht durch Rhizobien infiziert werden können. Dieser Phänotyp zeigt, daß der Prozeß der Knöllchenmorphogenese unabhängig von einer erfolgreichen Infektion durch Rhizobien ablaufen kann. Die Genprodukte der *exo*-Gene bewirken in den Infektionsschläuchen eine Veränderung der bakteriellen Oberflächenstruktur durch die Ausscheidung von Exopolysacchariden. Bakterielle Symbiosegene, deren Mutierung eine normale Knöllchenbildung erlaubt, nicht jedoch die Fixierung von molekularem Stickstoff durch die endosymbiontischen Bakterioide, teilt man in zwei Klassen ein: Weisen diese symbiontischen Gene Sequenzhomologien mit den gut untersuchten Stickstofffixierungsgenen des freilebenden Bakteriums *Klebsiella pneumoniae* (einem nicht-symbiontischen Stickstofffixierer) auf, so bezeichnet man diese Gene als *nif*-Gene (*nif* = ‚nitrogen fixation‘). Hierzu zählen beispielsweise die Gene *nifK*, *nifD* und *nifH*, die den Nitrogenase-Enzymkomplex zur Fixierung von molekularem Stickstoff kodieren. Die nicht-homologen Stickstoffierungsgene der Rhizobien heißen *fix*-Gene (*fix* = ‚fixation‘). Die Funktionen der *fix*-Gene sind weitgehend unbekannt; sie haben aber wahrscheinlich eine Bedeutung im symbiontischen Stoffwechsel mit der Pflanze. In den meisten Rhizobienarten wird die überwiegende Zahl der Symbiosegene von einem großen Plasmid, dem sogenannten Sym-Plasmid (Sym = Symbiose) kodiert. In *Rhizobium meliloti* hat das Sym-Plasmid eine Größe von etwa 1500 kb.

Die symbiontischen Gene der Pflanzen sind die Nodulingene – sie werden definitionsgemäß ausschließlich in Wurzelknöllchen ausgeprägt [7]. Nach dem Zeitpunkt der Induktion ihrer Expression unterscheidet man frühe und späte Nodulingene. Die frühen Nodulingene werden schon deutlich vor Beginn der Stickstofffixierung exprimiert; ihre Genprodukte sind am Infektionsprozeß und an der Entwicklung der Knöllchenstruktur beteiligt. Zu den frühen Nodulinen gehört das Zellwandprotein ENOD12, dem eine strukturelle Aufgabe bei der Ausbildung der Infektionsschläuche zukommt. Einem anderen frühen Nodulin, dem Zellwandprotein ENOD2, ordnet man eine Funktion bei der Ausbildung einer Sauerstoff-Diffusionsbarriere in der Knöllchenrinde zu [12]. Die späten Nodulingene werden erst zum Zeitpunkt der Stickstofffixierung induziert – sie haben die Aufgabe, die für die Stickstofffixierung notwendigen physiologischen Bedingungen innerhalb des Wurzelknöllchens zu schaffen. Das bekannteste späte Nodulin ist das Leghämoglobin, das dem tierischen Hämoglobin und Myoglobin homolog ist. Seine prosthetische Häm-Gruppe, die dem Knöllchengewebe eine charakteristische rote Farbe verleiht, wird von dem Mikrosymbionten synthetisiert. Das funktionale Leghämoglobin stellt demnach eine gemeinsame Syntheseleistung beider Symbiosepartner dar. Es wirkt ähnlich dem tierischen Hämoglobin und Myoglobin als Sauerstoff-Transportprotein, indem es im Knöllchengewebe den gebundenen Sauerstoff an die Stellen erhöhten Sauerstoffbedarfs leitet und gleichzeitig sauerstoffsensitive Reaktionen vor einer Oxidation schützt. Zu den späten Nodulinen gehören ferner Enzyme des Stickstoff-Metabolismus wie die Glutamin-Synthetase und die Uricase sowie Enzyme zur Versorgung der Bakterioide mit pflanzlichen Assimilaten wie die Saccharose-Synthase.

13.5.3 Symbiontische Signale als Auslöser der Knöllchenentwicklung

Die Symbiose von Rhizobien und Leguminosen wird durch niedermolekulare Signale eingeleitet [6]. Ein bakterielles Signal, der sogenannte Nod-Faktor (Nod = Nodulation), induziert im Prozeß der Knöllchenentwicklung die ersten erkennbaren morphologischen Veränderungen der Leguminosenwurzel. Hierzu zählen die Wurzelhaarkrümmung sowie die Induktion von Zellteilungen in der Wurzelrinde, die schließlich zur Bildung knöllchenähnlicher Strukturen führen. Der Nod-Faktor bewirkt diese Effekte bereits in geringsten Konzentrationen (im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M (M = molar)). Die chemische Struktur des Nod-Faktors konnte aufgeklärt werden, nachdem es gelungen war, diesen aus dem Überstand von *Rhizobium meliloti*-

Kulturen zu isolieren [10]. Der Nod-Faktor ist ein Lipooligosaccharid, bestehend aus vier β -1,4-verknüpften N-Acetylglucosamin-Resten, bei dem die Acetylgruppe des Zuckers am nichtreduzierenden Ende durch eine ungesättigte Fettsäure substituiert ist und die methanolische Gruppe des Zuckers am reduzierenden Ende sulfatiert ist (Abbildung 13.7). Die Synthese des Nod-Faktors erfolgt durch die Genprodukte der bakteriellen *nod*-Gene. Die allgemeinen *nod*-Gene (*nodA*, *nodB* und *nodC*) werden von allen bisher untersuchten Rhizobien-Arten kodiert. Ihre Genprodukte bewirken die Biosynthese des allgemeinen Nod-Faktors. Das Zuckergerüst des allgemeinen Nod-Faktors, ein aus N-Acetylglucosamin-Resten aufgebautes Chitooligosaccharid, wird wahrscheinlich durch das NodC-Protein synthetisiert, da dieses Sequenzhomologien zu einer Chitinsynthase der Hefe

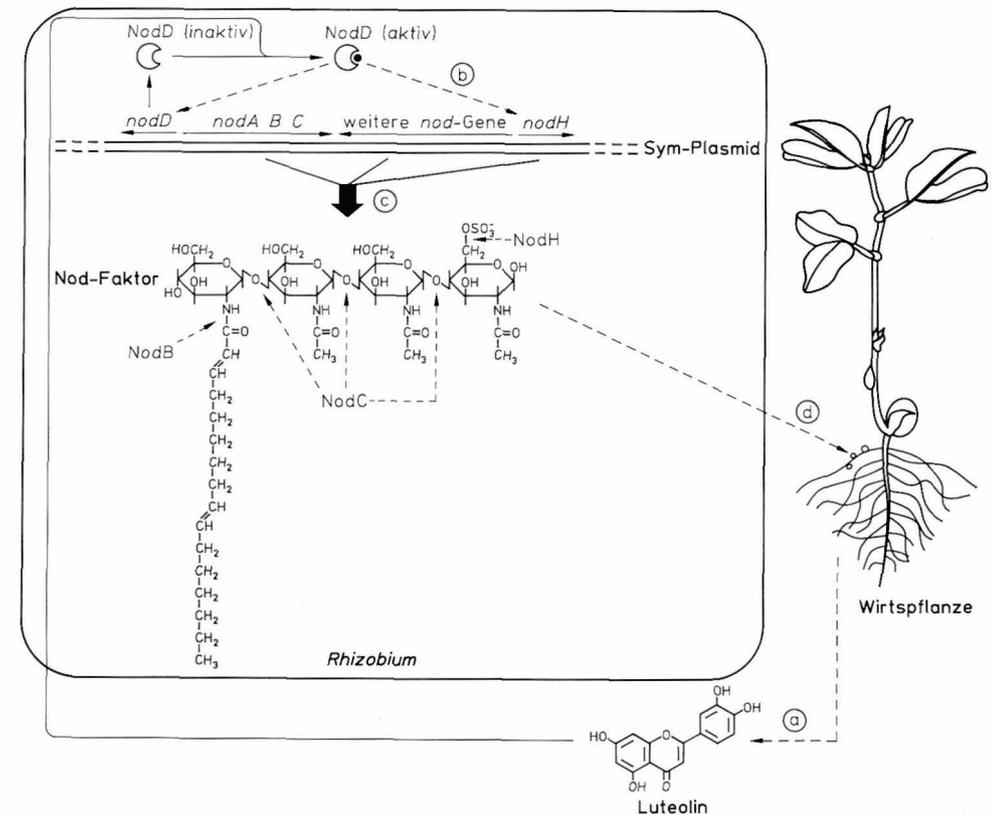


Abb. 13.7. Signalaustausch zwischen dem Mikrosymbionten *Rhizobium meliloti* und dem Makrosymbionten Luzerne. (a) Exkretion des Signalmoleküls Luteolin durch Luzernewurzeln; (b) Induktion der *nod*-Gene; (c) Synthese des Nod-Faktors; (d) Induktion des Nodulationsprozesses an Luzernewurzeln.

aufweist [4]. Dieses Chitooligosaccharid wird durch die Aktivität des NodB-Proteins am endständigen Zucker deacetyliert [11]. Die hierbei generierte freie Aminogruppe kann in einer nachfolgenden Reaktion mit einer Fettsäure acetyliert werden, so daß die Grundstruktur des allgemeinen Nod-Faktors fertiggestellt ist. Es ist bisher nicht bekannt, ob diese Reaktion durch das NodA-Protein katalysiert wird.

Neben den allgemeinen *nod*-Genen kodieren viele *Rhizobien*-Arten noch weitere *nod*-Gene, deren Genprodukte eine Modifikation des allgemeinen Nod-Faktors bewirken [6]. Die verschiedenen Leguminosen-Arten zeigen bei der Induktion des Nodulationsprozesses jeweils eine Spezifität für bestimmte derartige Modifikationen des allgemeinen Nod-Faktors. Hieraus ergibt sich ein Mechanismus zur Kontrolle der Wirtsspezifität von *Rhizobium*-Arten. In *Rhizobium meliloti* kodiert beispielsweise das *nodH*-Gen eine Sulfotransferase zur Übertragung eines Sulfatrestes auf die methanolische Gruppe des Zuckers am reduzierenden Ende des allgemeinen Nod-Faktors. Erst der derart veränderte Nod-Faktor (Abbildung 13.7c) bewirkt an den Wurzeln des Makrosymbionten Luzerne die Induktion des Nodulationsprozesses (Abbildung 13.7d).

Ein zweiter Mechanismus zur Kontrolle der Wirtsspezifität von *Rhizobien*-Arten ergibt sich aus der Tatsache, daß für die Synthese des Nod-Faktors die *nod*-Gene durch pflanzliche Signalmoleküle transkriptionell induziert werden müssen [5]. In den *Rhizobien* stimulieren bestimmte Flavonoide und Isoflavonoide aus den Ausscheidungen der Leguminosenwurzeln (Abbildung 13.7a) das regulatorische NodD-Protein zur Aktivierung der *nod*-Genexpression (Abbildung 13.7b). Eine wirtsspezifische Induktion der *nod*-Genexpression ergibt sich somit daher, daß die verschiedenen Leguminosen-Arten jeweils unterschiedliche Zusammensetzungen an Flavonoiden und Isoflavonoiden ausscheiden, während die NodD-Proteine der verschiedenen *Rhizobien*-Arten jeweils nur eine Spezifität für bestimmte dieser Induktoren aufweisen. Das NodD-Protein von *Rhizobium meliloti* besitzt zum Beispiel eine Spezifität für das durch die Wurzel des Makrosymbionten Luzerne ausgeschiedene Flavon Luteolin (Abbildungen 13.7a und 13.7b).

Die beschriebenen Mechanismen der Wirtsspezifität in der *Rhizobium*-Leguminosen-Symbiose, bedingt durch einen wechselseitigen Signalaustausch zwischen Mikrosymbionten und Makrosymbioten, stellen sicher, daß der aufwendige Prozeß der Nodulation nur zwischen den zueinander passenden Symbiosepartnern zustandekommen kann.

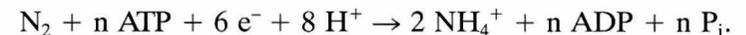
Der Wirkmechanismus des Nod-Faktors bei der Wurzelhaarkrümmung und der Induktion von Zellteilungen in der Wurzelrinde ist noch weitgehend unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der Nod-Faktor die Ausprägung pflanzlicher Symbiosegene reguliert. Bestimmte frühe Nodulingene der Leguminosen, die wie das ENOD12-Gen in den frühesten Stadien der Knöllchenentwicklung exprimiert werden, sind durch den Nod-Faktor tran-

skriptionell induzierbar [7]. Hingegen wird das frühe Nodulingen ENOD2, welches während der Knöllchenentwicklung etwas später als das ENOD12 Nodulingen zur Ausprägung kommt, durch das Phytohormon Cytokinin induziert [12]. Man nimmt daher an, daß der Nod-Faktor in einem sekundären Effekt die Veränderung der Hormonbalance in der Leguminosenwurzel bewirkt. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß sich durch die Gabe von Transportinhibitoren des Phytohormons Auxin an Leguminosenwurzeln Pseudoknöllchen induzieren lassen, die in ihrer Morphologie den durch den Nod-Faktor induzierten Knöllchen-ähnlichen Strukturen gleichen [5].

13.5.4 Symbiontischer Stoffwechsel von *Rhizobien* und ihren Wirtspflanzen

Im ausdifferenzierten Wurzelknöllchen erfolgt die Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammonium durch den Nitrogenase-Enzymkomplex der Bakterioide. Um diese Schlüsselreaktion der symbiontischen Stickstofffixierung zu ermöglichen, muß die Knöllchenstruktur einige erstaunliche physiologische und physiko-chemische Leistungen vollbringen, die einer engen Verzahnung der Stoffwechselprozesse beider Symbiosepartner bedürfen (Abbildung 13.8).

Die Fixierung von molekularem Stickstoff durch den bakteriellen Nitrogenase-Enzymkomplex erfolgt durch die Reaktion:



Diese äußerst energiebedürftige Reaktion verlangt etwa 22 bis 28 Mol ATP pro Mol reduzierter Stickstoffatome. Die hierfür notwendige Energie wird den Bakteroiden in Form von Photosynthese-Assimilaten der Pflanze zugeführt. Dem späten Nodulin Saccharose-Synthase kommt hierbei eine Schlüsselrolle zu, da es im Knöllchengewebe das Disaccharid Saccharose (die übliche Transportform von Zuckern in Pflanzen) spaltet. Die gebildeten Monosaccharide werden wahrscheinlich durch den pflanzlichen Metabolismus in organische Säuren umgewandelt, die von den Bakteroiden aufgenommen und über den Calvin-Zyklus abgebaut werden. In der gekoppelten bakteriellen Atmungskette werden dann die für die Stickstofffixierung notwendigen Energieäquivalente in Form von ATP gewonnen. Der hierdurch erhöhte Sauerstoffbedarf der Bakterioide steht im Widerspruch zu der extremen Sauerstoff-Sensitivität des Nitrogenase-Enzymkomplexes. Dieses Paradoxon löst die Aktivität des späten Nodulins Leghämoglobin: Dieses hochwirksame Sauerstoff-Transportprotein bindet molekularen Sauerstoff

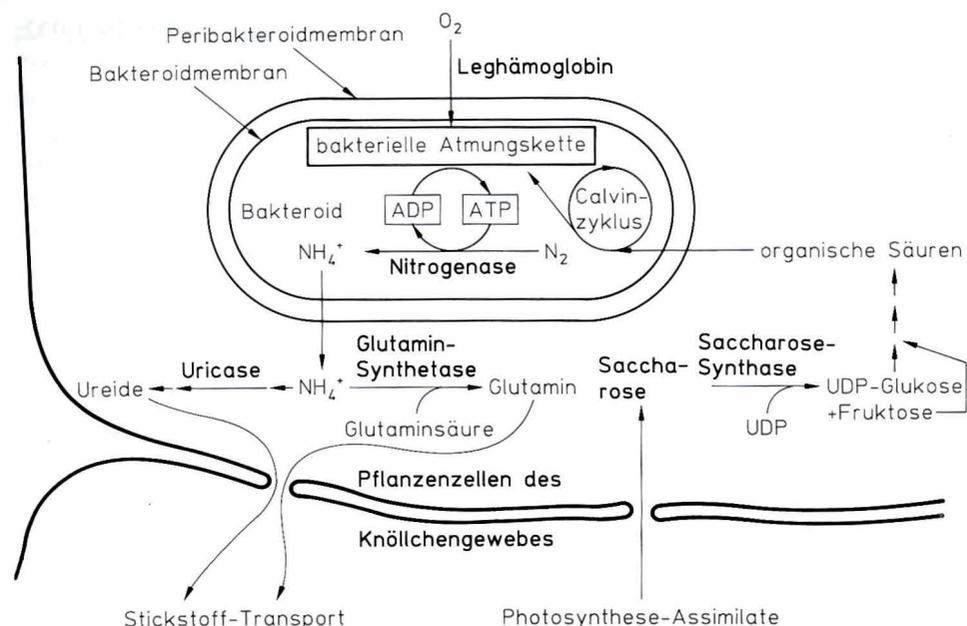


Abb. 13.8. Integration der Stoffwechselprozesse von Rhizobien und Leguminosen in den stickstofffixierenden Wurzelknöllchen.

äußerst effektiv und führt ihn gezielt der bakteriellen Atmungskette zu. Hierdurch wird die bakterielle Atmungskette ausreichend mit Sauerstoff versorgt und der Nitrogenase-Enzymkomplex vor einer Oxidation geschützt. Ferner existieren im Knöllchen auch passive Mechanismen zur Minderung des Sauerstoff-Partialdrucks, beispielsweise durch Diffusionsbarrieren in der Knöllchenrinde, an deren Ausbildung wahrscheinlich das frühe Nodulin ENOD2 beteiligt ist [12]. Das bei der Stickstofffixierung gebildete Ammonium scheidet die Bakterioide entweder direkt oder in der Form von Glutaminsäure aus. In einer dieser Formen assimilieren es anschließend die Pflanzen. Hierbei katalysiert das späte Nodulin Glutamin-Synthetase die Bildung der üblichen Stickstoff-Transportform Glutamin aus Ammonium und Glutaminsäure. In den Knöllchen bestimmter Leguminosen-Arten (wie etwa der Sojabohne) wird der fixierte Stickstoff in die Ureide Allantoin bzw. Allantoinsäure umgewandelt. An der Bildung dieser Stickstoff-Transportformen ist das späte Nodulin Uricase beteiligt. Die Aufklärung der Funktion weiterer später Noduline wird mit Sicherheit noch andere interessante Aspekte des symbiontischen Stoffwechsels in Wurzelknöllchen beleuchten.

13.5.5 Rhizopine in der *Rhizobium*-Leguminosen-Symbiose

Die Wechselwirkung zwischen Rhizobien und ihren Wirtspflanzen kann neben den beschriebenen symbiontischen Aspekten teilweise auch parasitären Charakter annehmen. Einige Rhizobien-Arten synthetisieren als Bakterioide in Wurzelknöllchen ungewöhnliche Substanzen, die nach ihrer Freisetzung in den Boden von freilebenden Rhizobien spezifisch abgebaut werden. Hierdurch verschaffen die endosymbiontisch in Wurzelknöllchen lebenden Rhizobien den freilebenden Formen gleichsam einen parasitären Zugang zu den Stoffwechsellieferungen der Wirtspflanzen. Entsprechend der ähnlichen Funktion der Opine in der parasitären Wechselwirkung von Agrobakterien und Pflanzen bezeichnet man diese Substanzen als Rhizopine. Sie wurden erstmals in der symbiontischen Wechselwirkung zwischen *Rhizobium meliloti* und der Luzerne beschrieben. Das hierbei identifizierte Rhizopin 3-O-Methyl-scyllo-inosamin (3-O-MSI) ist ein Methylether eines Inosamin-Rings. Die Ausprägung der bakteriellen Genprodukte zur Synthese bzw. zum Abbau von Rhizopinen sind in den unterschiedlichen Lebensformen der Rhizobien differentiell reguliert. Während die Genprodukte der *mos*-Gene zur Synthese von Rhizopinen nur in den endosymbiontischen Bakteroiden der Wurzelknöllchen zur Ausprägung kommen, werden die katabolischen Genprodukte der *moc*-Gene nur in freilebenden Rhizobien ausgeprägt.

13.6 Schlußbetrachtung: Analogien der Habitatbildung

In der Bakterienfamilie der *Rhizobiaceae* finden sich Bodenbakterien, die ihre Habitate auf unterschiedlichste Art und Weise durch spezifische Wechselwirkungen mit Pflanzen ausbilden. Die populärsten Vertreter der *Rhizobiaceae*, die phytopathogenen Agrobakterien sowie die symbiontischen Rhizobien, kennzeichnen die Bandbreite derartiger Wechselwirkungen. Die Kolonisation ihrer Wirtspflanzen erfolgt bei den Agrobakterien primär genetisch durch horizontalen Gentransfer, bei den Rhizobien jedoch durch eine direkte strukturelle Interaktion. Trotz dieses fundamentalen Unterschieds finden sich jedoch in einzelnen Teilaspekten dieser Wechselwirkungen bemerkenswerte Analogien. So manipulieren beide Mikroorganismen spezifisch die Entwicklungsprozesse ihrer Wirtspflanzen und erschließen sich

hierdurch einen direkten Zugang zu den pflanzlichen Photosyntheseleistungen. Bei den Agrobakterien geschieht dies durch Induktion der Bildung pflanzlicher Tumore, in denen Opine synthetisiert werden, die nach ihrer Sekretion in den Boden ausschließlich durch Agrobakterien katabolisiert werden können. Rhizobien hingegen stimulieren die Bildung symbiontischer Wurzelknöllchen, in denen sie sich als Endosymbionten direkt mit Assimilaten der Wirtspflanze versorgen lassen. Einige Rhizobien-Arten sind als Endosymbionten in Wurzelknöllchen zur Umwandlung pflanzlicher Assimilate in opinartige Substanzen befähigt. In Analogie zum Opinkonzept der *Agrobacterium*-Pflanzen-Wechselwirkung dienen diese Rhizopine nach ihrer Freisetzung aus den Wurzelknöllchen den im Boden freilebenden Rhizobien ebenfalls als Nahrungsquelle. Die Manipulation pflanzlicher Entwicklungsprozesse erfolgt in den beiden beschriebenen Wechselwirkungen durch spezifische Signalmoleküle der Bakterien, die jeweils den pflanzlichen Hormonhaushalt beeinflussen. Die Tumorbildung durch Agrobakterien erfolgt durch die Übertragung der als bakterielles Signalmolekül aufzufassenden t-DNA in Pflanzenzellen, deren genetische Ausprägung direkt die Synthese bzw. Wirkung von Phytohormonen beeinflusst. Die Bildung von Wurzelknöllchen wird hingegen durch das bakterielle Signalmolekül Nod-Faktor induziert, wodurch indirekt eine Veränderung der Hormonbalance in der Pflanzenwurzel erfolgt. Weiterhin werden beide Wechselwirkungen durch spezifische pflanzliche Signalmoleküle eingeleitet. Die Exkretion von Acetosyringon aus verwundeten Pflanzenzellen induziert den t-DNA-Transfer von Agrobakterien, während die Exkretion von Flavonoiden bzw. Isoflavonoiden durch Leguminosenwurzeln die Synthese des Nod-Faktors in Rhizobien stimuliert. Eine weitere Analogie betrifft die Organisation der für die Wechselwirkung mit Pflanzen notwendigen Gene auf großen Plasmiden, dem Ti-Plasmid der Agrobakterien bzw. dem Sym-Plasmid der Rhizobien, die einer schnellen Verbreitung dieser Eigenschaften innerhalb der jeweiligen Bakterienpopulationen durch den Konjugationsprozeß dient. Trotz der engen Verwandtschaft von Agrobakterien und Rhizobien können die beschriebenen Analogien der verschiedenartigen Wechselwirkungen mit Pflanzen nicht durch einen gemeinsamen Ursprung erklärt werden. Vielmehr scheint es sich hierbei um unabhängig voneinander entstandene Mechanismen zu handeln, deren Analogien sich aus dem Selektionsdruck der bakteriellen Koevolution mit ihren pflanzlichen Wirten ableiten.

Literatur

- [1] P. Zambryski, J. Tempe, J. Schell (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**, 193–201.
- [2] P. Zambryski (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **4**, 465–480.
- [3] S. C. Winans (1992) Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Reviews* **56**, 12–31.
- [4] S. R. Long (1989) *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* **56**, 203–214.
- [5] A. M. Hirsch (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**, 211–237.
- [6] R. F. Fischer, S. R. Long (1992) *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655–660.
- [7] H. J. Franssen, I. Vijn, W. C. Yang, T. Bisseling (1992) Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* **19**, 9–107.
- [8] H. Körber, N. Stizhov, D. Staiger, J. Feldwisch, O. Olsson, G. Sandberg, K. Palme, J. Schell, C. Koncz (1991) T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *EMBO J.* **10**, 3983–3991.
- [9] J. J. Estruch, D. Chriqui, K. Grossmann, J. Schell, A. Spina (1992) The plant oncogene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J.* **10**, 2889–2895.
- [10] P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillat, G. Truchet, J. C. Promé, J. Dénarié (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharid signal. *Nature* **344**, 781–784.
- [11] M. John, H. Röhrig, J. Schmidt, U. Wieneke, J. Schell (1993) *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 625–629.
- [12] C. Dehio, F. de Bruijn (1992) The early nodulin gene *SrEnod2* from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. *Plant Journal* **2**, 117–128.