

**Molekulare Analyse des Biotin-regulatorischen Netzwerks in  
*Sinorhizobium meliloti* durch Proteomanalyse, Expressionsstudien und  
Mutagenesen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Elke Heinz  
aus Arad/Rumänien

Göttingen 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen angefertigt.

D7

Referent:	Prof. Dr. W. Liebl
Korreferent:	Prof. Dr. G. Gottschalk
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2002

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti</i> und die symbiontische Stickstoff-Fixierung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rhizobielles Überleben unter limitierenden Bedingungen und die stationäre Wachstumsphase</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Rhizobielles Wachstum in Abhängigkeit von Biotin</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Intention der Arbeit</b>	<b>7</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Bakterienstämme und Plasmide</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Bakterienanzucht</b>	<b>10</b>
2.2.1 Nährmedien	10
2.2.2 Antibiotika und andere Medienzusätze	13
2.2.3 Wachstumsbedingungen und Stammhaltung	13
2.2.3.1 Zellanzucht	13
2.2.3.2 Anzucht von <i>S. meliloti</i> zur Gewinnung von Biotin-limitierten Kulturen	14
2.2.3.3 Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 zur Detektion von Autoinduktoren	14
2.2.3.4 Anlegen von Stammplatten	14
2.2.3.5 Anlegen von Glycerinkulturen	14
2.2.3.6 Trübungsmessungen	15
2.2.3.7 Anzucht für Überexpressionsversuche mit dem T7-RNA-Polymerase/Promotor-System	15
<b>2.3 Basistechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>15</b>
2.3.1 Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	15
2.3.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	15
2.3.2.1 Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol	15
2.3.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion	16
2.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA	16
<b>2.4 Methoden zur Charakterisierung von DNA-Fragmenten</b>	<b>16</b>
2.4.1 Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung von DNA	16
2.4.2 Fragmentlängenbestimmung von DNA	17
<b>2.5 Isolierung von DNA</b>	<b>18</b>
2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979, mod.)	18
2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch <i>QIAprep Spin Miniprep-Kit</i>	19
2.5.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>S. meliloti</i>	20

2.5.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	21
<b>2.6 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren</b>	<b>21</b>
2.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	21
2.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden	22
2.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten	22
<b>2.7 Transformationsverfahren</b>	<b>23</b>
2.7.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	23
2.7.2 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	23
2.7.3 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen mit Hilfe der CaCl <sub>2</sub> -Methode	24
2.7.4 Transformation von kompetenten Zellen	24
2.7.5 Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> Klone durch X-Gal-Test	25
<b>2.8 DNA-Übertragung durch Konjugation</b>	<b>25</b>
<b>2.9 Herstellung von <i>S. meliloti</i>-Mutanten mit Hilfe des <i>sacB</i>-Systems</b>	<b>26</b>
<b>2.10 <i>In vitro</i> Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>26</b>
<b>2.11 Southern-Hybridisierung (Southern, 1975, mod.)</b>	<b>28</b>
2.11.1 Vakuum-Blotting	28
2.11.2 Hybridisierung	29
2.11.3 Sondenherstellung	30
2.11.4 Antikörperbindung und colorimetrische Detektion	30
<b>2.12 Proteinbestimmung</b>	<b>31</b>
<b>2.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</b>	<b>32</b>
2.13.1 Probenvorbereitung	33
<b>2.14 Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese</b>	<b>34</b>
2.14.1 Probenvorbereitung für native Gele	35
<b>2.15 2D-PAGE (O'-Farell, 1975, mod.)</b>	<b>35</b>
2.15.1 Probenvorbereitung	35
2.15.2 Isoelektrische Fokussierung	37
2.15.3 Equilibrierung	38
2.15.4 SDS-Gelelektrophorese als 2. Dimension	39
<b>2.16 Probenpräparation für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie</b>	<b>40</b>
<b>2.17 Färbung von Proteinen</b>	<b>41</b>
2.17.1 Coomassie-Färbung	41
2.17.2 Silberfärbung (Blum et al., 1987, mod.)	42
<b>2.18 Proteinaufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie</b>	<b>43</b>
2.18.1 Zellaufschluß und Aufreinigung unter nativen Bedingungen	43
2.18.2 Zellaufschluß und Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen	44
<b>2.19 <math>\beta</math>-Glucuronidase-Messungen</b>	<b>45</b>

<b>2.20</b>	<b>Dünnschichtchromatographie</b>	<b>46</b>
<b>2.21</b>	<b>Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme</b>	<b>46</b>
<b>2.22</b>	<b>Geräte, Kits und andere Materialien</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>2D-Gelelektrophorese</b>	<b>51</b>
3.1.1	Vergleichende 2D-Gelanalyse von <i>S. meliloti</i> Proteinextrakten	51
3.1.2	Ausgewählte Proteine mit erhöhter Expression nach Biotinsupplementation	55
3.1.3	Auswertung der MALDI-TOF-MS-Analyse	59
3.1.4	Identifizierte Proteine aus <i>S. meliloti</i> mit erhöhter Expression nach Biotinsupplementation	62
<b>3.2</b>	<b>Konstruktion von Reporterfusionen</b>	<b>66</b>
3.2.1	Aktivitätsmessungen der <i>nodD1</i> - und <i>nodD3</i> -Promotorregionen	69
3.2.2	Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion von <i>ORF</i> SMc04882, eines möglichen LysR-Typ-Transkriptionsregulators	71
3.2.3	Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion des <i>bioM</i> -Operons	73
3.2.4	Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion des <i>plsX</i> -Gens	75
3.2.5	Promotoraktivitätsmessungen einer Autoinduktor Synthase und eines Acyl-Homoserin-Lacton-abhängigen Transkriptionsregulators	77
3.2.6	Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion des <i>copC</i> -Gens	85
3.2.7	Sequenzanalyse von Biotin-regulierten Promotoren	87
3.2.8	Detektion von <i>S. meliloti</i> 1021 Acyl-HSL durch Dünnschichtchromatographie	90
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung des <i>surE</i>- und <i>pcm</i>-Gens aus <i>S. meliloti</i></b>	<b>92</b>
3.3.1	Klonierung und heterologe Überexpression der <i>surE</i> - und <i>pcm</i> -Gene von <i>S. meliloti</i> und Aufreinigung der Genprodukte	94
3.3.2	Phosphataseaktivität des SurE-Proteins	97
3.3.3	Konstruktion der <i>pcm</i> -Mutante Rm1021-EH45 und der <i>surE</i> -Mutante Rm1021-EH47	99
3.3.3.1	Konstruktion von pEH40	99
3.3.3.2	Konstruktion von pEH40-6	99
3.3.3.3	Konstruktion von pEH40-9	101
3.3.3.4	Expression des <i>surE</i> -Gens	103
3.3.3.5	Transkriptionsanalyse des <i>pcm</i> -Gens in TY-Vollmedium	103
3.3.3.6	Transkriptionsanalyse des <i>pcm</i> -Gens in GTS-Minimalmedium	104
3.3.3.7	Überleben von Rm1021-EH45, Rm1021-EH47 und Rm1021 in TY-Vollmedium	106
3.3.3.8	Wachstumsversuche der <i>pcm</i> -Mutante Rm1021-EH45, der <i>surE</i> -Mutante Rm-EH47 und Rm1021 in GTS-Minimalmedium	108
3.3.3.9	Komplementation der <i>pcm</i> -Mutante Rm1021-EH45	110

---

3.3.3.10 Wachstumsversuche von Rm1021-EH45, Rm1021-EH47 und Rm1021 unter verschiedenen Streßbedingungen	111
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>114</b>
<b>4.1 <i>S. meliloti</i> 1021-Proteine mit erhöhter Expression nach Biotin-supplementation des Mediums</b>	<b>116</b>
<b>4.2 Expressionsanalysen</b>	<b>122</b>
4.2.1 Erhöhte Expression von <i>sinI</i> und <i>sinR</i> unter Biotin-limitierenden Bedingungen	122
4.2.2 Expression der <i>nodD1</i> - und <i>nodD3</i> -Reporterfusion	129
4.2.3 Expression des <i>bioM</i> -Operons	130
<b>4.3 Charakterisierung des <i>surE</i>- und <i>pcm</i>-Gens aus <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>131</b>
4.3.1 <i>SurE</i> - und <i>pcm</i> -Gene und ihre Funktion	131
4.3.2 Expressionsanalyse des <i>pcm</i> -Gens	133
4.3.3 Überleben der <i>pcm</i> - und <i>surE</i> -Mutante Rm1021-EH45 und Rm1021-EH47	133
4.3.4 Überleben unter Streß	135
4.3.5 Phosphataseaktivität des SurE-Proteins	136
4.3.6 Wachstum von <i>S. meliloti</i> unter Biotin-limitierenden Bedingungen	138
<b>4.4 Biotinlimitierung als ein spezielles Streß-Signal für <i>S. meliloti</i> ?</b>	<b>139</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>142</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>144</b>

**ABKÜRZUNGEN**

$\alpha$ -NP	$\alpha$ -Naphthyl-Phosphat
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A.	Agrobacterium
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b(p)	Basenpaare (DNA)/Basen (RNA)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bidest.	zweifach destilliert
Bis	N,N-Methylen-bis-Acrylamid
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius; Kohlenstoff
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamodopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat Hydrat
Cm	Chloramphenicol
d	Desoxy-, Kuvettenschichtdicke
Da	Dalton
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Enzymkommission)
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani
$\mu$	Mikro
m	Milli
M	Molar
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight</i>
max	maximal
min	Minute
MM	Minimalmedium
mod.	modifiziert
MS	Massenspektrometrie

n	nano
NBT	Nitroblautetrazolium
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> (Offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PHB	Poly-3-hydroxybutyrat
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
ppGpp <sub>r</sub>	Guanosintetraphosphat
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg
S.	<i>Sinorhizobium</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
SSC	Standard-Saline-Citrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TY	<i>Trypton-Yeast-Medium</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Glucuronsäure-Cyclohexylammonium-Salz
z.B.	zum Beispiel

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti* und die symbiontische Stickstoff-Fixierung

Das Gram-negative Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* gehört zu der Familie der *Rhizobiaceae* und ist in der Lage, eine Symbiose mit Leguminosen einzugehen und dabei molekularen Stickstoff zu fixieren. *S. meliloti* induziert bei seiner Wirtspflanze die Entwicklung von Wurzelknöllchen, in denen die zu Bacteroiden differenzierten Mikrosymbionten den atmosphärischen Stickstoff zu Ammonium reduzieren. Jede Rhizobienart hat ein individuelles Wirtsspektrum. Symbiosepartner von *S. meliloti* ist unter anderem die Luzerne (*Medicago sativa* L.), die in der Agrarwirtschaft als Gründünger oder Futtermittel eingesetzt wird (Schultze et al., 1992). Durch die Symbiose erlangt die Pflanze einen Wachstumsvorteil, da sie von der Stickstoff-Fixierung in Form von zur Verfügung gestellten Ammoniumionen profitiert. Die Pflanze ist daher weitestgehend unabhängig vom Stickstoffgehalt des Bodens und damit zur Besiedlung stickstoffarmer Böden geeignet. Landwirtschaftlich genutzte Flächen können auf diese Weise mit stickstoffhaltigen Verbindungen angereichert werden, was die Zugabe von kostenintensiven Nitrat- oder Ammoniumdünger in den folgenden Anbaujahren verringert bzw. eliminiert. Die Mikrosymbionten erhalten im Austausch von der Pflanze C4-Dicarbonsäuren als Kohlenstoffquelle und leben in einem abgegrenzten Habitat, dem Wurzelknöllchen, welches auch als „induzierte ökologische Nische“ bezeichnet wird.

Zu den Stickstoff-Fixierern gehören ausschließlich Prokaryoten, da nur diese über die notwendige Enzymausstattung zur Reduktion des molekularen Stickstoffs, den Nitrogenase-Komplex, verfügen. Anders als Bakterien aus den Gattungen *Azotobacter*, *Clostridium* oder *Klebsiella* können Rhizobien nur in Symbiose Stickstoff reduzieren.

Man geht davon aus, daß weltweit jährlich 60-80 Mio. Tonnen Stickstoff durch die Rhizobien-Leguminosen Symbiose fixiert werden (Vance, 1998). Gerade die Symbiose mit der Luzerne stellt mit durchschnittlich 250 kg fixiertem Stickstoff pro Jahr und Hektar eine sehr leistungsfähige Interaktion dar, während z.B. in der Symbiose von *Bradyrhizobium* mit der Sojabohne durchschnittlich nur 80 kg Stickstoff pro Hektar und Jahr fixiert werden (Peoples et al., 1995; Marquard, 2000).

Die molekularen und genetischen Grundlagen der Symbiose wurden in den letzten Jahren detailliert untersucht aber noch nicht vollständig aufgeklärt. In den verschiedenen Stadien der Symbiose kommt es zu einem Signalaustausch, bei welchem spezifische

Genexpressionen bei beiden Symbiosepartnern letztlich zur Ausbildung symbiose-spezifischer Eigenschaften auf physiologischer und morphologischer Ebene führen. Eine weitergehende molekularbiologische Analyse dieser Interaktionen und der daran beteiligten Signaltransduktion könnte die Effektivität bereits bestehender Symbiosen optimieren und die symbiontische Stickstoff-Fixierung möglicherweise auch auf andere Pflanzen übertragbar machen.

Die Mehrzahl der symbiosespezifischen Gene sind bei *S. meliloti* auf den beiden Megaplasmiden lokalisiert, die aufgrund ihrer Größe von 1,35 Mb (pSymA) und 1,68 Mb (pSymB) auch als zweites und drittes Chromosom neben dem Hauptchromosom (3,65 Mb) bezeichnet werden (Honeycutt et al., 1993; Capela et al., 2001). Die Nodulationsgene (*nod*-Gene), die essentiell für die Synthese des Nodulationsfaktors und somit der Knöllchenentwicklung sind, und die Stickstoff-Fixierungsgene (*nif* und *fix*-Gene) befinden sich auf dem Plasmid pSymA (Barnett et al., 2001). Letztere codieren unter anderem für die Komponenten des komplexen Nitrogenase-Enzymsystems. Auf Megaplasmid pSymB sind neben den Genen für den Dicarbonsäuretransport (*dct*-Gene) die *exo*-Gene lokalisiert, die für Enzyme der Exopolysaccharidsynthese codieren und eine Rolle bei der Infektion der Pflanze spielen (Gonzales et al., 1996; Finan et al., 2001).

## **1.2 Rhizobielles Überleben unter limitierenden Bedingungen und die stationäre Wachstumsphase**

Rhizobien sind in der Lage, Phasen unter Nährstofflimitierung und in Abwesenheit ihrer Wirtspflanze für einige Jahre im Boden zu überdauern (Bottomley, 1992; Sadowsky et al., 1998). Die Fähigkeit unter limitierenden Wachstums- und Umweltbedingungen zu überleben und auf ein verbessertes Nährstoffangebot mit schnell einsetzendem Wachstum zu reagieren ist eine Grundvoraussetzung für Bakterien, nahezu alle Lebensräume erfolgreich zu besiedeln. Generell passen sich Gram-negative Mikroorganismen durch das Eintreten in die Stationärphase an das Überleben unter limitierenden Bedingungen an (Matin et al., 1989). Anders als bei einigen Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* kommt es dabei nicht zur Differenzierung der Zellen zu Sporen. Dennoch ist die stationäre Wachstumsphase durch physiologische und morphologische Veränderungen charakterisiert und sie wurde besonders bei Bakterien wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Vibrio* sp. untersucht (siehe Übersichtsartikel: Wai et al., 1999; Spector, 1998; Siegele et al., 1993; Loewen et al., 1998). Morphologisch kennzeichnend für Stationärphase-Zellen

ist ein verkleinertes Zellvolumen und eine kokkoide Form. Die physiologischen Veränderungen sind vielfältig und zeigen sich durch eine allgemein verringerte Stoffwechselaktivität, welche eine verminderte Nukleinsäure- und Protein-Synthese nach sich zieht, Akkumulation von Speicherstoffen, Umstrukturierung der Zellwand oder durch eine veränderte Zusammensetzung der Zellmembran. Die Bakterien besitzen eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Streßfaktoren wie Hitze, osmotischen Veränderungen der Umwelt, UV-Bestrahlung oder Schwermetallen. Stationärphase-Kulturen von *E. coli* weisen eine hohe genetische Diversität auf und es kommt zur Entwicklung von sogenannten GASP-Mutanten (*growth advantage in stationary-phase*), welche einen Überlebensvorteil gegenüber Zellen aus jüngeren Kulturen haben (Finkel und Kolter, 1999). Auf molekularer Ebene aktiviert der Stationärphase-Sigmafaktor RpoS in *E. coli* die Expression von mindestens hundert Genen (Lange und Hengge-Aronis, 1991; Hengge-Aronis, 1999). In *Vibrio cholerae* führt die Mutation des *rpoS*-Gens zu einer verminderten Überlebensfähigkeit unter diversen Streßbedingungen (Yildiz und Schoolink, 1998). Vermutlich sind aber noch weitere Faktoren daran beteiligt, die Anpassung an die stationäre Wachstumsphase oder generell die Anpassung an limitierende Umweltbedingungen zu regulieren. In *E. coli* ist die Induktion vieler RpoS-abhängiger Promotoren nur in Anwesenheit von ppGpp (Guanosintetraphosphat) möglich (Kvint et al., 2000; Chatterji und Ojha, 2001). Dieses Effektormolekül wird während verschiedener limitierender Nährstoffbedingungen produziert und leitet die sogenannte stringente Kontrolle ein, welche u. a. zur Inhibierung der RNA-Polymerase, rRNA- und tRNA-Synthese und zur Aktivierung katabolischer Gene oder zur Chaperonin-Synthese führt. Desweiteren kann cAMP *rpoS*-unabhängige Gene in der Stationärphase induzieren (Hengge-Aronis, 1993). Signalmoleküle wie Acyl-Homoserinlactone (Acyl-HSL), welche am sogenannten *quorum sensing* beteiligt sind, spielen ebenfalls eine Rolle beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (Lazazzera, 2000). In *Pseudomonas aeruginosa* wird die Expression des Stationärphase-Sigmafaktors in *lasR*-Mutanten verhindert, wobei *lasR* für einen Acyl-HSL abhängigen Transkriptionsaktivator codiert (Latifi et al., 1996). In *Ralstonia solanacearum* wiederum führt die Mutation eines *rpoS*-homologen Gens zur verminderten Expression der *solI*- und *solR*-Gene, welche an der Produktion von Acyl-HSL beteiligt sind (Flavier et al., 1998).

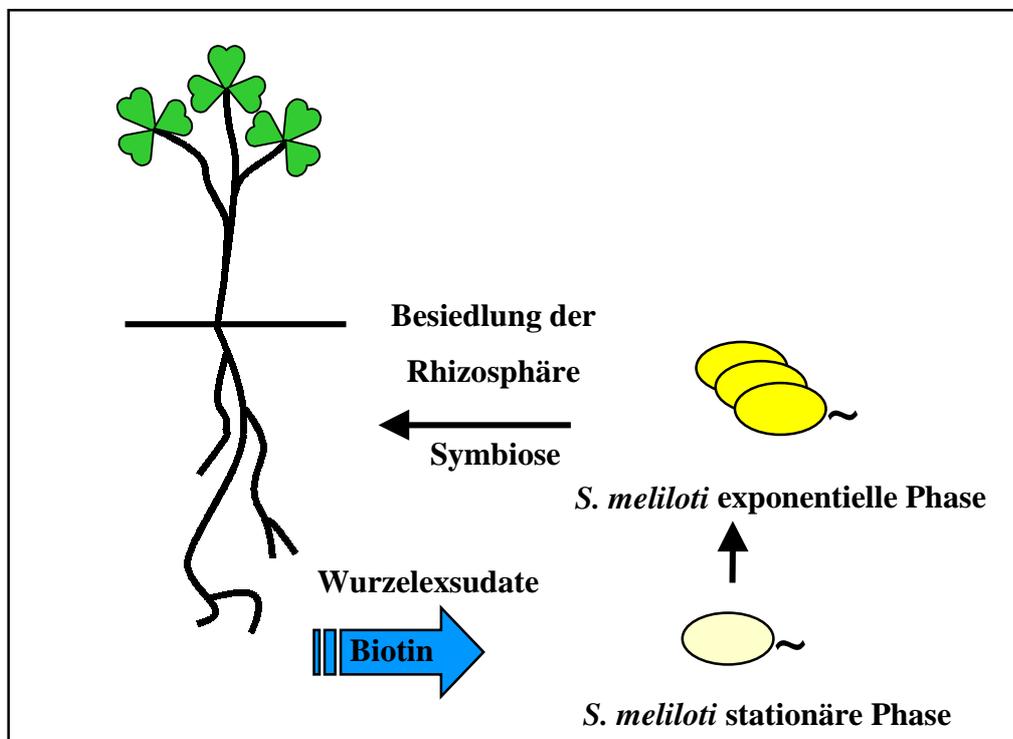
Bei Rhizobien werden ebenfalls solche Anpassungsmechanismen in der Stationärphase beobachtet. So bleibt die Überlebensfähigkeit von *R. leguminosarum* nach 55-tägigem Entzug von Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphat-Quellen bei nahezu 100 %. Die Zellen

nehmen eine kokkoide Form an und besitzen Resistenz gegenüber verschiedenen Stressfaktoren (Thorne und Williams, 1997). Desweiteren hängt das Überleben von der Populationsdichte beim Eintreten in die Stationärphase ab, wobei Acyl-Homoserin-Lactone Zelldichte-abhängiges Überleben fördern (Thorne und Williams, 1999). *S. meliloti* reagiert auf andauernde Inkubation unter Nährstoffmangel mit eingeschränkter Motilität und erhöhter Sensitivität gegenüber chemotaktisch wirksamen Verbindungen. Diese erhöhte Sensitivität ist für das Austreten aus der Stationärphase von Bedeutung (Wei und Bauer, 1998; Sourjik et al., 2000). Es konnten auch verschiedene Gene identifiziert werden, die unter Nährstoff-limitierenden Bedingungen induziert werden oder die für die Wiederaufnahme von exponentiellen Wachstum essentiell sind (Uhde et al., 1997; Davey und de Bruijn, 2000). Unter Stickstoff- und Kohlenstoff-Mangel wird in *S. meliloti* beispielsweise das *hmgA*-Gen induziert, dessen Genprodukt beim Abbau von Tyrosin beteiligt ist. *HmgA*-Mutanten zeigen eine verminderte Überlebensfähigkeit in der stationären Wachstumsphase (Milcamps und de Bruijn, 1999). In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe interessant, in denen bereits zwei Gene aus dem sogenannten *Survival-Locus* aus *S. meliloti* charakterisiert wurden, welche am Überleben in der Stationärphase (*nlpD*) oder bei der Wiederaufnahme von Wachstum unter limitierenden Bedingungen (*bioS*) beteiligt sind (Heinz et al., 1999; Streit et al., 2000). Die Genomsequenzierung zeigte, daß es in *S. meliloti* kein dem Stationärphase-Sigmafaktor homologes Gen gibt, wobei aber nicht auszuschließen ist, daß andere Sigmafaktoren oder Regulatoren die Funktion dieses Proteins übernehmen.

### 1.3 Rhizobielles Wachstum in Abhängigkeit von Biotin

Vor der Etablierung einer Symbiose muß *S. meliloti* zunächst die stationäre Wachstumsphase verlassen und die Rhizosphäre der Wirtspflanze besiedeln. Dies erfordert die Wahrnehmung pflanzenspezifischer Signalmoleküle. Eine keimende Leguminose gibt eine Vielzahl von Verbindungen in den Boden ab, darunter phenolische Komponenten wie Flavonoide, Zucker, Aminosäuren organische Säuren oder Vitamine (Phillips und Streit 1996; Rovira und Harris, 1961). Diese Verbindungen können nicht nur als Nährstoffquelle dienen, sondern üben auch regulatorische Funktionen aus, was sich beispielsweise in der Induktion der *nod*-Gene durch Flavonoide zeigt (Peters et al., 1986). Eine Verbindung, welche eine Schlüsselfunktion bei der Rhizosphärenkolonisierung übernimmt, ist Biotin (Streit et al., 1996). Dieses Vitamin wird von Pflanzen der Familie der Leguminosen in den Boden abgegeben (Rovira und Harris, 1961) und in Rhizosphärentests konnte gezeigt

werden, daß Biotin stimulierend auf Wachstum von *S. meliloti* wirkt (siehe Abb. 1). Die Bindung des von der Pflanze exsudierten Biotins durch Avidin führt zu einer schlechteren Besiedlung der Rhizosphäre (Streit et al., 1996). Offensichtlich stellt pflanzliches Biotin bei Wachstum in der Rhizosphäre die wichtigste Biotinquelle dar und ist möglicherweise eine der Komponenten, die den Bakterien die Anwesenheit eines potentiellen Symbiosepartners vermitteln. Der stimulierende Effekt von Biotin auf Wachstum von Rhizobien auch außerhalb der Rhizosphäre ist bereits seit längerem bekannt und auch in neueren Studien wurde die Abhängigkeit des Wachstums von *S. meliloti* 1021 und weiteren 26 *S. meliloti*-Stämmen von exogenem Biotin unter Laborbedingungen gezeigt (Watson et al., 2001). Somit scheint der stimulierende Effekt von Biotin in der Gruppe von *S. meliloti* ein generelles Prinzip darzustellen.



**Abb. 1 Darstellung der stimulierenden Wirkung von pflanzlichen Biotin**

Biotin wird durch die Wirtspflanze in den Boden exsudiert und fördert rhizobielles Wachstum. Dieses Vitamin stellt eine Schlüsselkomponente für die Besiedlung der Rhizosphäre durch *S. meliloti* dar und ist damit daran beteiligt die ruhenden Bodenbakterien zu schnell wachsenden Rhizosphärenkolonisierern umzuwandeln (Streit et al., 1996).

Im Genom von *S. meliloti* wurden einige der bekannten Biotinbiosynthesegene identifiziert, jedoch konnte nur für drei dieser Gene die Funktionalität durch Komplementationsstudien gezeigt werden (Entcheva et al., 2002). Daher nimmt man an, daß die endogene Biotinbiosynthese unzureichend und damit limitierend für Wachstum

von *S. meliloti* ist. Bemerkenswert ist das gute Aufnahmesystem von *S. meliloti* für Biotin, an welchem die *bioM*- und *bioN*-Gene beteiligt sind (Entcheva et al., 2002). Biotin ist als Kofaktor für verschiedene Carboxylasen an der vorübergehenden Bindung von CO<sub>2</sub> beteiligt. In *S. meliloti* und *Rhizobium etli* führt Biotinlimitation zu einer verminderten Aktivität der Biotin-abhängigen Pyruvatcarboxylasen (Dunn et al., 1997; Dunn et al., 2001).

Zur Identifizierung Biotin-regulierter Gene und zum besseren Verständnis der Prozesse, welche an der Wahrnehmung des pflanzlichen Biotins in der Rhizosphäre beteiligt sind, wurden Transposonmutagenesen durchgeführt. Dabei konnte das *bioS*-Gen identifiziert werden, welches bereits durch picomolare Konzentrationen an Biotin induzierbar ist und in der Stationärphase maximal exprimiert wird (Streit und Phillips, 1997). Sehr hohe Biotinkonzentrationen reprimieren dagegen die Expression. Mutationen des *bioS*-Gens führen zu einer verlängerten *lag*-Phase nach Biotinsupplementation einer unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogenen Kultur und zu einer erhöhten Aufnahme von exogenem Biotin. Das BioS-Protein reguliert seine eigene Expression und zeigt Ähnlichkeiten zu Proteinen aus der Familie der LysR-Typ-Regulatoren (Streit und Phillips, 1997; Heinz et al., 1999). Bisher wurde das *bioS*-Gen nur in weiteren *S. meliloti*-Stämmen und *Rhizobium* NGR234 nachgewiesen. Interessanterweise befindet sich das *bioS*-Gen in *S. meliloti* im sogenannten *Survival-Locus*. Diese Region umfaßt in vielen Gram-negativen Bakterien die *surE*-, *pcm*- und *nlpD/lppB*-Gene. Das *surE*-Gen anderer Bakterien codiert für eine saure Phosphatase, wobei die physiologischen Substrate und damit auch die biologische Funktion bisher nicht aufgeklärt sind (Zhang et al., 2001; Lee et al., 2001). *Pcm*-Gene (auch *pcmt*-Gene genannt) codieren für L-Isoaspartyl-Protein-Carboxymethyltransferasen, welche spontan durch Deamidierung von Asparagin- und Aspartat-Resten entstehende L-Isoaspartylreste durch Methylierung reparieren können (siehe Übersichtsartikel Visick und Clarke, 1995). In *E. coli* werden die *surE*- und *pcm*-Gene maximal in der Stationärphase exprimiert (Li et al., 1997). *NlpD/lppB*-Gene codieren für Lipoproteine und in *S. meliloti* führt die Mutation des *nlpD*-Gens zu einer verminderten Überlebensfähigkeit in der stationären-Wachstumsphase (Streit et al., 2000). Bei manchen Organismen wie *E. coli* befindet sich unmittelbar stromabwärts dieser Gene das *rpoS*-Gen, welches für den Stationärphase-Sigmafaktor codiert. Allein in *S. meliloti* ist diese konservierte Anordnung durch das *bioS* Gen, welches unmittelbar in 5'-Richtung des *pcm*-Gens lokalisiert ist, aufgehoben. Auf der Suche nach einem übergeordneten Regulator des *bioS*-Gens wurde das *birS*-Gen identifiziert. In *birS*-Mutanten kommt es zur von Biotin

unabhängigen Expression von *bioS* (Schmeißer, 2001). Ein weiteres Biotin-reguliertes Gen in *S. meliloti* ist das *bdhA*-Gen. Es codiert für ein Gen, welches an der Mobilisierung des Speicherstoffes Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrat (PHB) beteiligt ist. Unter Biotin-limitierenden Bedingungen kommt es zur Synthese dieses Speicherstoffes und bereits durch 0,4 nM Biotin im Anzuchtmedium wird der Abbau von PHB induziert. Reporterstudien zeigten, daß die Transkription des *bdhA*-Gens durch Biotin induziert wird (Hofmann et al., 2000). Zusammenfassend betrachtet ist die Frage offen, ob Biotin einen direkten oder indirekten Einfluß auf die Transkription dieser Gene hat.

## 1.4 Intention der Arbeit

Biotin übernimmt eine Schlüsselfunktion bei der Besiedlung der Rhizosphäre durch *S. meliloti* und stellt möglicherweise eines der Signale dar, welche den Rhizobien die Anwesenheit eines potentiellen Symbiosepartners vermitteln. Biotinlimitierung dagegen ist mit der Abwesenheit einer Pflanze und damit dem Überdauern in der stationären Wachstumsphase gleichzusetzen. Welche Prozesse auf physiologischer Ebene daran beteiligt sind, exogenes Biotin zu *sensen* und Wachstum in Abhängigkeit dieses Vitamins wieder aufzunehmen ist bisher weitgehend unbekannt. Daher war es Ziel dieser Arbeit Gene zu identifizieren, welche an der Wahrnehmung von Biotin beteiligt sind. Als zentrale Methode sollte dabei die 2D-Gelelektrophorese angewendet werden, um so die Proteinmuster Biotin-limitierter Kulturen mit denen Biotin-supplementierter Kulturen zu vergleichen. Biotin-induzierte Proteine sollten durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden. Desweiteren sollte mittels Reporteranalyse die Promotoraktivität von gezielt aus den Datenbanken ausgewählten Genen, welche an Prozessen der Nodulation, Membransynthese oder *quorum-sensing* beteiligt sind, in Abhängigkeit von Biotin bestimmt werden. Aufgrund der ungewöhnlichen Lokalisation des Biotin-regulierten Stationärphasegens *bioS* im *Survival Locus* von *S. meliloti*, sollten die stromaufwärts liegenden *surE*- und *pcm*-Gene mutiert und charakterisiert werden, um zu ermitteln, welche Funktion diese Gene für das Überleben von *S. meliloti* haben. Weiterhin sollte analysiert werden, ob Biotin einen regulatorischen Einfluß auf die Expression dieser Gene ausübt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Primer sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

**Tab. 1 Bakterienstämme**

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta lacU169(\Phi 80 lacZ\Delta M15)$ , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	GibcoBRL
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lacF'</i> , <i>proAB</i> , <i>lacZ\Delta M15</i> , Tn10 (Tet <sup>r</sup> )	Bullock et al., 1987
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ DE3	Novagen
S17-1	Sm <sup>r</sup> , Tp <sup>r</sup> , mod <sup>+</sup> , <i>res<sup>-</sup></i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA<sup>-</sup></i> , <i>hsdR17</i> , integriertes Plasmid RP4-2-Km::Tn7/Tc::Mu,	Simon et al., 1983
BL21(DE3)-25	pEH25 in Überexpressionsstamm	diese Arbeit
BL21(DE3)-26	pEH26 in Überexpressionsstamm	diese Arbeit
<u><i>Sinorhizobium</i></u>		
<u><i>meliloti</i></u>		
Rm1021	WT-Stamm, Sm <sup>r</sup>	Meade et al., 1982
Rm1021-B5	<i>bioS1::Tn5B30</i> ; <i>bioS1<sup>-</sup></i>	W. Streit
Rm1021-EH45	<i>pcm::gusA</i> ; <i>pcm<sup>-</sup></i>	diese Arbeit
Rm1021-EH47	<i>surE::gfp</i> ; <i>surE<sup>-</sup></i>	diese Arbeit
Rm1021-K-EH45	pBBR1MCS:: <i>pcm</i> in Rm1021-EH45;	diese Arbeit
<u><i>Agrobacterium</i></u>		
<u><i>tumefaciens</i></u>		
NTL4 (pCF218)(pCF372)	Reporterstamm zur Detektion von Acyl- Homoserinlactonen, Tc <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	Fuqua und Winans, 1996
KYC (pCF218)	Acyl-Homoserinlacton Überproduzierer Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Fuqua und Winans, 1996

**Tab. 2 Plasmide**

Plasmide	Eigenschaften	Referenz
pBluescriptII SK(+)	Kloniervektor, Amp <sup>r</sup> , <i>lacPOZ'</i>	Stratagene
pET19b	Amp <sup>r</sup> , Expressionsvektor	Novagen
pEH25	pET19b:: <i>surE/pcm</i>	diese Arbeit
pEH26	pET19b:: <i>pcm</i>	diese Arbeit
pBK3	mobilisierbarer Vektor mit <i>lacZ</i> - und <i>gusA</i> -Reportergenen, Tc <sup>r</sup>	Kusian et al., 1995
pk18 <i>mobsacB</i>	mobilisierbarer Vektor zur Konstruktion von Rm Mutanten	Schäfer et al., 1994
pk18 <i>mobsacB-EcoRI</i>	pk18 <i>mobsacB</i> mit entfernter <i>EcoRI</i> Schnittstelle	diese Arbeit
pEH40	<i>pk18mobsacB-EcoRI</i> :: <i>surE/pcm</i>	diese Arbeit
pPR- <i>nodD1</i>	pPR mit 324 bp <i>nodD1</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>nodD3</i> -kurz	pPR mit 867 bp <i>nodD3</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>nodD3</i> -lang	pPR mit 1190 bp <i>nodD3</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>sinI</i>	pPR mit 267 bp <i>sinI</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>sinR</i>	pPR mit 401 bp <i>sinR</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>bioM</i>	pPR mit 333 bp <i>bioM</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>plsX</i>	pPR mit 273 bp <i>plsX</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>copC</i>	pPR mit 253 bp <i>copC</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pPR- <i>tr4882</i>	pPR mit 176 bp <i>tr4882</i> -Promotorregion	diese Arbeit
pBBRMCS-1	Km <sup>r</sup> , mobilisierbar nach Rm	Kovach et. al., 1995
pKW120	Amp <sup>r</sup> , enthält promotorloses <i>gusA</i> -Fragment	Wilson et al., 1995
pEN322:: <i>gfp</i>	Plasmid mit <i>gfp</i> -Kassette	Egener et al., 1998

**Tab. 3 Primer**

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>surE-NdeI-fw</i>	ggg gca tat gcg cat cct gct gac gaa tga cga
<i>surE-rev</i>	ata ggg aaa gcc gcg tcc gtc cgt
<i>pcm-NdeI-fw</i>	ggg gca tat ggc gct gcg gct tcg ctc ggg
<i>pcm-NdeI-rev</i>	ggg gca tat gtt aaa gga acg acg cta cct gtg
<i>gusA-rev</i>	gat ttc acg ggt tgg ggt ttc tac
<i>gusA-181-rev</i>	ata cca gac gtt gcc cgc ata aat
<i>gusA-XhoI-fw</i>	ggg gct cga gga gtc cct tat gtt acg tcc tgt a
<i>gusA-XhoI-rev</i>	ggg gct cga gtc att gtt tg cct ccc tg
<i>sinI-PstI-fw</i>	gca agc tgc agc gca cgc tg
<i>sinI-XbaI-rev</i>	gaa cat cta gac gat ggc ctg g
<i>sinR-PstI-fw</i>	ggc gct gca ggc gca tat tct g
<i>sinR-XbaI-rev</i>	gat gtt cta gac gca tca ggg cg
<i>copC-PstI-fw</i>	ggt gct gca ggg cat ctc ggc gg
<i>copC-XbaI-rev</i>	tga gtc tag agc cgc ggc aag aag
<i>plsX-PstI-fw</i>	ggt gct gca gga ctg gaa aaa gg
<i>plsX-XbaI-rev</i>	gac ttc tag acc ata gtc gcc tcc
<i>bioM-PstI-fw</i>	cga cct gca gga agc cga tgt c
<i>bioM-XbaI-rev</i>	cca gtc tag aag gat gaa gcg c
<i>tr4882-PstI-fw</i>	cgt ctg cag ata cga aac tat tct c
<i>tr4882-XbaI-rev</i>	cac gtc tag aac cag tcg gcg gc
<i>nodD1-PstI-fw</i>	ttc cac tgc agt ttt aag gac atg taa
<i>nodD1-XbaI-rev</i>	gac gag gag gtc tag atc tag gcc cct
<i>nodD3-PstI-fw-kurz</i>	ctt tat ctg cag atc gga gcg acg
<i>nodD3-PstI-fw-lang</i>	gca tct gca ggg aca gca tct tc
<i>nodD3-XbaI-rev1</i>	ctc gtt cta gaa gga gcg tag gcg

## 2.2 Bakterienanzucht

### 2.2.1 Nährmedien

Die angegebenen Mengen beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter im demineralisierten Wasser. Zur Herstellung von Festmedien wurde jeweils noch 1,5 %

(w/v) Agar hinzugegeben. Alle Lösungen und Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C.

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

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

(für LBG-Medium)

TY-Medium (Sambrook et al, 1989)

Trypton	5 g
Hefeextrakt	3 g
CaCl <sub>2</sub>	0,2 g

*Agrobacterium tumefaciens*-Medium (AT-Medium)

20 x AT-Puffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	214 g
---------------------------------	-------

pH 7 (mit NaOH einstellen)

20 x AT-Salzlösung

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	3,2 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,024 g

Für die Herstellung von einem Liter AT-Medium wurden je 50 ml 20 x AT-Puffer und 20 x AT-Salzlösung vermischt, mit 10 ml einer 50 %-igen Glucose-Lösung (w/v) versetzt und auf einen Liter mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt.

GTS-Minimalmedium (Kiss et al., 1979)

<u>Komponente 1</u>	<u>Endkonzentration x l<sup>-1</sup></u>	<u>Stammlösungen</u>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	131 mg	655 mg/l
NaCl	1 g	5 g/l
Tris-HCl	3 g	15 g/l
Na-Succinat	2,7 g	13 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	10 g/l
pH 7,5		
<u>Komponente 2</u>		
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	246 mg	24,6 g /100 ml
<u>Komponente 3</u>		
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	14,5 mg	1,45 g/ 100 ml
<u>Komponente 4</u>		
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,27 mg	2,7 mg/100 ml
<u>Komponente 5</u>		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,242 mg	24,2 mg/100 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg	300 mg/100 ml
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,83 mg	183 mg/ 100 ml
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,287 mg	28,7 mg/100 ml
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,125 mg	12,5 mg/100 ml
CoCl x 6H <sub>2</sub> O	0,119 mg	11,9 mg/100 ml
<u>Komponente 6</u>		
Biotin	1 x 10 <sup>-2</sup> mg	0,1 mg/ml
<u>Komponente 7</u>		
Glucose	2 g	

Die Medienbestandteile wurden in MilliQ-Wasser gelöst. Für ein Liter Medium wurden 200 ml der Komponente 1, je 1 ml der Komponenten 2, 3 und 5 und 10 ml der Komponente 4 zusammengefügt, bei Bedarf mit 2 g Glucose und 100 µl Biotinlösung (Endkonzentration 40,9 nM) versetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st bzw. MilliQ-Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

### 2.2.2 Antibiotika und andere Medienzusätze

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika und anderer hitzelabiler Medienbestandteile erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlung der Medien auf ca. 55 °C.

**Tab. 4 Antibiotika und andere Medienzusätze**

Antibiotikum/ Medienzusatz	Endkonzentration im Medium (µg/ml)			Lösungsmittel
	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>	<i>A. tumefaciens</i>	
Ampicillin	100			H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st
Kanamycin	25	240	100	H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st
Streptomycin		500		H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st
Tetracyclin	10	2	4,5	Ethanol
Chloramphenicol	34			Ethanol
Spectinomycin			50	H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st
Neomycin		80		H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st
IPTG	100			H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st
X-Gal	50			Dimethylformamid

### 2.2.3 Wachstumsbedingungen und Stammhaltung

#### 2.2.3.1 Zellanzucht

Bei *E. coli* erfolgte die Anzucht über Nacht in LB-Flüssigmedium in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Dazu wurde mit einer sterilen Impföse von einer Einzelkolonie in das Anzuchtmedium überimpft. Hauptkulturen wurden 1-5 %-ig (v/v) mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur versetzt. Die Inkubation von *E. coli* Kulturen erfolgte bei 37 °C im

Roller oder auf einem Schüttler. *S. meliloti* wurde in TY oder GTS-Medium angezogen und mindestens 24 h bei 28 °C oder 30 °C inkubiert. Die Anzucht konnte mit Hilfe von Antibiotika selektiv erfolgen.

#### **2.2.3.2 Anzucht von *S. meliloti* zur Gewinnung von Biotin-limitierten Kulturen**

Als Probenmaterial für die 2D-Gelelektrophorese, Promotoraktivitätsmessungen, Wachstums- und Überlebensversuchen war es notwendig, *S. meliloti* unter Biotin-limitierenden Bedingungen anzuziehen. Dazu wurde *S. meliloti* in GTS-Medium angeimpft und ein Aliquot dieser 2-3 Tage alten Kultur 0,4-2 %-ig in frisches GTS-Medium überführt. Nach 2 bis 3 solcher Transfers wurde die Kultur als Biotin-limitiert bezeichnet, sofern nach mindestens 48 h Inkubation, eine geringere OD<sub>600</sub> als 0,8 zu messen war.

#### **2.2.3.3 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 zur Detektion von Autoinduktoren**

Nach Animpfen von 25 ml AT-Minimalmedium mit einer Übernachtskultur des *A. tumefaciens* Reporterstamm NTL4 erfolgte die Inkubation unter Selektionsdruck bis zur späten exponentiellen Phase. Diese Kultur wurde zu 50 ml desselben Mediums, welches nach dem Autoklavieren bei 45° C inkubiert wurde und 1,5 % Agar (w/v) und X-Gal (60 µg/ml) enthielt, gegeben und nach guter Durchmischung auf die vorbereiteten Dünnschichtplatten etwa 3 mm dick gegossen.

#### **2.2.3.4 Anlegen von Stammplatten**

Zellen von einer Einzelkolonie wurden von der Platte mit einer steriler Glaspipette oder Platindrahtöse abgenommen und auf einer zweiten Platte mittels Verdünnungsausstrich ausgestrichen.

#### **2.2.3.5 Anlegen von Glycerinkulturen**

500 µl einer frischen *E. coli* Übernachtskultur wurden mit derselben Menge 87 %-igem Glycerin (w/v) vermischt und bei -20 °C oder -70 °C gelagert. Für die Anlegung von *S. meliloti* Glycerinkulturen wurde, abgesehen von der länger benötigten Anzuchtzeit, ebenso verfahren.

### **2.2.3.6 Trübungsmessungen**

Die optische Dichte von Flüssigkulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm mit unbeimpften Medium als Referenz bestimmt (Photometer: Pharmacia Biotech Ultrospec 3000). Dabei wurden die Kulturen so verdünnt, daß die Extinktion nicht größer als 0,8 war. Eine OD von 0,1 entspricht ungefähr einer Konzentration von  $10^8$  Zellen/ml. Zur Messung wurden Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

### **2.2.3.7 Anzucht für Überexpressionsversuche mit dem T7-RNA-Polymerase/Promotor-System**

Die *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3)-25 und BL21(DE3)-26 mit den entsprechenden Plasmiden wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht angezogen. Mit 5 ml dieser Kultur wurde 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz angeimpft und unter starkem Schütteln bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 inkubiert. Die Expression wurde durch Zusatz von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Kulturen weiter bei 37 °C geschüttelt. Die Zellernte erfolgte nach 3 h Induktion durch 20 minütige Zentrifugation bei 4000 Upm und 4 °C. Bis zur Lyse konnte das Zellpellet bei -20 °C aufbewahrt werden.

## **2.3 Basistechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren**

### **2.3.1 Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren**

Thermostabile Lösungen, Glaswaren und andere Geräte wurden zur Inaktivierung von Nukleasen autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert, Geräte mit 70%-igem Ethanol (v/v) behandelt und wenn möglich abgeflammt.

### **2.3.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren**

#### **2.3.2.1 Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol**

Zum Fällern von DNA wurde die DNA-Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol und 0,3 Volumen einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung bzw. 1/8 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt. Alternativ dazu konnte auch mit 2,5 Volumen unvergälltem Ethanol und NaCl-Lösung mit einer Endkonzentration von 0,3 M gefällt werden, wonach eine 10 minütige Inkubation bei -70 °C oder über Nacht bei -20 °C

angeschlossen wurde. Nach beiden Methoden wurde 20 min bei 13000 Upm abzentrifugiert, zweimal mit 70 %-igem unvergälltem Ethanol (v/v) gewaschen und das getrocknete Pellet im gewünschten Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen.

### **2.3.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Zur Extraktion von Proteinen wurden die DNA-Lösungen im Verhältnis 1:1 mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1 (v/v)) versetzt und gründlich durchmischt. Zur Phasentrennung wurden die Ansätze 20 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Danach konnte die obere wäßrige Phase mit abgeschnittenen 1 ml Spitzen in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Die Extraktion wurde zweimal mit dem Phenol/Chloroform-Gemisch und einmal mit Chloroform wiederholt. Anschließend wurde die DNA gefällt.

### **2.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Zur Ermittlung der Konzentration wurde die  $\text{OD}_{260}$  einer DNA-Lösung in einer Quarzküvette gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Die Reinheit konnte durch die Bildung der Quotienten von Absorptionswerten bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt werden. Für reine DNA-Lösungen gelten folgende Richtwerte:

$$\text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} \geq 1,8 \quad (\text{Sambrook et al., 1989})$$

## **2.4 Methoden zur Charakterisierung von DNA-Fragmenten**

### **2.4.1 Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung von DNA**

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Charakterisierung von DNA ist die Agarosegelelektrophorese. Mit Hilfe dieser Technik können DNA-Moleküle im Gel aufgetrennt werden. Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit eines DNA-Fragmentes von mehreren Faktoren ab, wie der Größe des DNA-Moleküls, der Größe der Gelporen die durch die Agarosekonzentration bestimmt wird, der angelegten Spannung und den Salzkonzentrationen des Puffers. Es wurden 0,8 %-ige Gele für die Analyse von Restriktionsspaltungen und 1,2 %-ige Gele zur Auftrennung von PCR-Produkten in 1 x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer verwendet wurde, gegossen. Vor Beladen der Geltaschen wurde die DNA mit Ladepuffer im Verhältnis 10:1 vermischt, was zum einen

der Beschwerung und zum anderen durch den enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau der Markierung der Lauffront bei ca. 500 bp diene. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60-100 V und einer Laufzeit von 45-90 min. Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgte die Färbung der DNA durch Überführung des Gels in ein Ethidiumbromidbad für 5 min. Das Gel konnte nach anschließender Wässerung bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) fotografiert werden.

#### 50 x TAE-Puffer, pH ~ 8,5

Tris-HCl	242 g
Eisessig	57,1 ml
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	37,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 l

#### 10 x DNA-Ladepuffer

Ficoll 400	20 g
Bromphenolblau	0,25 g
SDS	1 g
EDTA (0,5 M)	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml
pH 8	

#### Ethidiumbromid-Färbebad

2 Tropfen einer 2 mg/ml Ethidiumbromidlösung wurden mit 500 ml H<sub>2</sub>O vermischt.

### **2.4.2 Fragmentlängenbestimmung von DNA**

Zur Ermittlung der Länge von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Molekülen dienten Längenmarker, deren Fragmentgrößen bekannt waren (*Gene Ruler*<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder, Firma MBI Fermentas). Diese Längenstandards wurden parallel zur analysierenden DNA im Agarosegel aufgetrennt.

## 2.5 Isolierung von DNA

### 2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979, mod.)

Diese Methode wurde eingesetzt, wenn eine große Anzahl von Klonen/Transformanten auf das Vorhandensein des richtigen rekombinanten Plasmides hin überprüft werden sollte. Die isolierte Plasmid-DNA konnte dann zur Restriktionsanalyse oder als *template* für die PCR verwendet werden.

Vorgehensweise:

- 1,5 ml einer Übernachtskultur 1 min im Eppendorfgefäß bei 13000 Upm abzentrifugieren
- Resuspension des Pellets in 200 µl Puffer 1
- Alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl Puffer 2, dreimaliges invertieren des Eppendorfgefäßes und 5 minütige Inkubation bei RT
- Proteinfällung durch Zugabe von 200 µl Puffer 3, 2 s vortexen (bei größeren Plasmiden Eppendorfgefäß vorsichtig dreimal invertieren) und 5-15 minütige Inkubation auf Eis
- Nach 15 minütigem zentrifugieren bei 13000 Upm Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Bei Bedarf an sehr reiner Plasmid-DNA Durchführung einer Phenol/Chloroform Extraktion zur Verminderung von Proteinkontaminationen; dazu jeden Ansatz mit 200 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches versetzen, vortexen und nach 5 min Abzentrifugieren den Überstand in ein neues Gefäß überführen
- Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol und 1/8 Vol einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH5,2)
- 20 min zentrifugieren bei 13000 Upm und Pellet zweimal mit 1 ml 70 %-igem eiskaltem unvergälltem Ethanol waschen
- Trocknen des Pellets bei 37 °C und Resuspension in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### Puffer P1 (Resuspensionslösung)

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
pH 8	

RNA konnte durch Zusatz von RNaseA (1 mg/ml) zu Puffer 1 entfernt werden.

Puffer P2 (Lysepuffer)

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)

Puffer P3 (Neutralisierungslösung)

Eisessig	29,5 ml
KOH	ad pH 4,8
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

**2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch *QIAprep Spin Miniprep-Kit***

Dieses Verfahren beruht auch auf der alkalischen Lyse und wurde zur Plasmidisolierung eingesetzt, wenn die Plasmide z. B. für anschließende Transformationen oder Sequenzierungen eingesetzt wurden.

Vorgehensweise:

- 1,5-3 ml einer Übernachtskultur durch einminütige Zentrifugation pelletieren und nach Entfernen des Überstandes in 250 µl Puffer P1 resuspendieren
- Zugabe von 250 µl Puffer P2, vorsichtiges mischen und 5 min Inkubation bei RT
- Zugabe von 350 µl Puffer P3, vorsichtiges viermaliges invertieren des Reaktionsgefäßes und Inkubation auf Eis für 5 min
- 10 min Zentrifugation bei 13000 Upm und RT
- Transfer des Überstandes in ein Qiagen-Säulchen und erneute Zentrifugation 1 min bei 13000 Upm, Entfernung des Durchlaufs
- Waschen der Säule mit 750 µl Waschpuffer PE
- Zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers erneut 2 min bei 13000 Upm zentrifugieren
- Zugabe von 30 –50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 1- 10 minütige Inkubation bei RT; Elution der Plasmid-DNA durch Zentrifugation

### 2.5.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus *S. meliloti*

Vorgehensweise:

- 1,5–3 ml von 2 Tage alten Kulturen bei 13000 Upm abzentrifugieren, nach Entfernen des Überstandes in 1 ml 1 M NaCl-Lösung resuspendieren und 1 h bei Raumtemperatur stehenlassen
- Abzentrifugieren und Pellet in 200 µl TE-Saccharose-Lösung resuspendieren
- Zugabe von 200 µl Lysepuffer und Inkubation 45-60 min bei 37 °C
- Versetzen mit 200 µl Sarkosyl-ProteinaseK-Lösung, vorsichtig mischen und Inkubation bei 37 °C für mindestens 60 min
- Extraktion: Zugabe von 200 µl eines Chloroform/Phenol-Gemisches im Verhältnis 1:1, gründlich durchmischen und 20 min bei 13000 Upm abzentrifugieren; obere Phase vorsichtig mit abgeschnittenen 1 ml Spitzen in ein neues Eppendorfgefäß überführen; Vorgang zweimal mit einem Chloroform/Phenol-Gemisch und einmal mit reinem Chloroform wiederholen
- Zur Fällung DNA-Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol und 0,3 Volumen einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung versetzen und über Nacht bei –20 °C lagern
- 20 min zentrifugieren bei 13000 Upm; Entfernung des Überstandes und Trocknen; Aufnahme der DNA in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Lösung der DNA für 60 min bei 60 °C

Die Gesamt-DNA wurde bei 4 °C gelagert.

#### TE-Saccharose-Puffer

20 % Saccharose (w/v) in TE-Puffer

#### Lysepuffer

10 mg/ml Lysozym und 1 mg/ml RNase in TE-Puffer

#### Sarkosyl-ProteinaseK-Lösung

25 µl einer 20 %-igen ProteinaseK-Lösung (w/v) wurden in 1 ml 5 %-ige Sarkosyl-Lösung gegeben

## 2.5.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach PCR oder Restriktionsverdau und Überprüfung des Ergebnisses auf einem Agarosegel konnten DNA-Fragmente, die für eine Ligation benötigt wurden, unter Verwendung des QiaexII-Kits (Qiagen) aus dem Gel eluiert werden.

Vorgehensweise:

- Das Fragment mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel schneiden und in ein Eppendorfgefäß mit bekanntem Leergewicht transferieren
- Abwiegen und Bestimmung des Nettogewichtes des Gelblöckchens; pro 100 mg Gewicht 300 µl Puffer QX1 in das Gefäß pipettieren
- Zugabe von 30 µl QIAEX II und 30 s vortexen
- Das Eppendorfgefäß 10 min bei 50 °C inkubieren und alle 2 min kurz vortexen
- 30 s abzentrifugieren bei 13000 Upm und entfernen des Überstandes
- Das Pellet mit 500 µl Puffer QX1 zur Beseitigung von Agarosekontaminationen und zweimal mit je 500 µl Puffer PE zur Entfernung von Salzen waschen
- Trocknen des Pellets bei 37 °C für ca. 20 min
- Zugabe von 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, vortexen und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 30 s bei 13000 Upm abzentrifugieren und Überstand mit eluierter DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführen

## 2.6 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

### 2.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen kurze DNA-Sequenzen und schneiden doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen innerhalb oder benachbart zur Erkennungssequenz, wobei überhängende oder glatte DNA-Enden entstehen können. In der Regel wurden Spaltungsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt.

DNA in TE-Puffer oder

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	x µl
10 x Spaltungspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	1-5 U/µg DNA
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 µl

Die Inkubation erfolgte 1-2 h oder auch über Nacht bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur, meist 37 °C. Als Spaltungspuffer wurde entweder *One Phor-All-Puffer* (Firma Amersham Pharmacia), TAM-Puffer oder der vom Enzymhersteller empfohlene Puffer verwendet.

#### 10 x TAM-Puffer

Kaliumacetat	660 mM
Magnesiumacetat	100 mM
Tris-HCl	330 mM
DTT	5 mM
BSA	1 mg/ml

mit Eisessig auf pH 7,9 einstellen und sterilfiltrieren

Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze 10-20 min bei 75 °C inkubiert.

### **2.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Zur Vermeidung von Selbstligation konnten die 5'-Phosphatgruppen von restriktionsverdauter Vektor-DNA enzymatisch durch alkalische Phosphatase abgespalten werden. Nach der Restriktion wurden zu 20 µl eines Restriktionsansatzes 1 µl *Shrimp* alkalische Phosphatase pipettiert und 20 min bei 37 °C inkubiert. Ein spezieller Puffer war für diese Reaktion nicht nötig. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Chloroform und anschließender Extraktion oder durch Erhitzen für 10 min auf 75 °C gestoppt. Nach einer Ethanol-fällung konnte die DNA für Ligationen eingesetzt werden.

### **2.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende in doppelsträngiger DNA. Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, dem einzigen Enzym, das effizient glatte Enden ligieren kann, wurden DNA-Fragmente ligiert. Die Ligationen wurden in möglichst wenig Volumen durchgeführt, mit einem Überschuß an *Insert*-DNA. Ein 20 µl-Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

Vektor	3-5 $\mu$ l
T4-Ligase-Puffer 10 x	2 $\mu$ l
T4-Ligase	0,5 $\mu$ l (= 1U)
Insert	12,5-14,5 $\mu$ l

## 2.7 Transformationsverfahren

### 2.7.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

- *E. coli* von einer frischen LB-Platte in eine 30 ml Vorkultur animpfen und 12-14 h auf dem Schüttler bei 37 °C inkubieren
- Aus der gut angewachsenen Vorkultur 500 ml LB-Medium mit 1-2 % animpfen und auf dem Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 inkubieren
- Medium möglichst schnell in Eiswasser abkühlen, Zellen in sterilen Zenrifugenbecher ernten (5000 x g, 15 min, 4 °C) und alle weiteren Arbeitsschritte unter ständiger Kühlung durchführen
- Überstand abgießen, Pellet in 500 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vollständig resuspendieren und die Zellen erneut ernten (5000 x g, 15 min, 4 °C)
- Zellen in 40 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin aufnehmen, in sterile SS34-Röhrchen überführen und zentrifugieren (5000 x g, 15 min, 4 °C)
- Überstand abgießen, Volumen des Pellets abschätzen und gleiches Volumen 10 %-iges Glycerin zugeben; etwa 500  $\mu$ l
- Zellen resuspendieren, aliquotieren (60  $\mu$ l pro E-Cup) und bei – 70 °C lagern

### 2.7.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

- Kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen und mit der DNA-Lösung mischen; bei Bedarf Ligationsansätze zum Entfernen von Salz einer Tropfendialyse gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> unterziehen
- Suspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettieren und eventuell vorhandene Luftblasen durch Aufklopfen entfernen
- Küvette außen sorgfältig abtrocknen und bei den Standardbedingungen (Spannung: 1,5 kV, Parallelwiderstand: 200  $\Omega$ , Kapazität: 25  $\mu$ F) elektroporieren

- Zellen nach dem Puls (optimale Entladungszeit: 4,5-5,0 ms) sofort mit 1 ml LB-Medium mischen und in einem E-Cup 1 h bei 37 °C zur phänotypischen Expression eines Selektionsmarkers inkubieren
- Aliquots unterschiedlicher Größe (20-100 µl) auf LB-Agarplatten unter dem entsprechendem Selektionsdruck ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren

### 2.7.3 Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen mit Hilfe der CaCl<sub>2</sub>-Methode

- Einzelkolonie in Flüssigmedium überimpfen und über Nacht bei 37 °C inkubieren
- 200 ml LB-Medium 1 %-ig (v/v) mit dieser Kultur animpfen und bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,375 weiter inkubieren
- Nach Aliquotieren der Kultur auf 4 Zentrifugenbecher und 10 min Inkubation auf Eis, Pelletierung der Zellen bei 4 °C und 4000 Upm für 7 min
- Resuspension jedes Pellets in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung und Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 4000 Upm
- Pellets in 2 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendieren und jeweils 200 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführen
- Die Zellen entweder direkt für eine Transformation verwenden oder sofort bei -70 °C lagern

#### Calciumchloridlösung

CaCl <sub>2</sub>	60 mM
Glycerin	15 % (v/v)
PIPES	10 mM
pH 7	

### 2.7.4 Transformation von kompetenten Zellen

- Eingefrorene kompetente Zellen 10 min auf Eis auftauen
- Zugabe von 5-8 µl eines Ligationsansatzes, bzw. 1 µl ungeschnittenem Plasmid als Positivkontrolle und vorsichtiges mischen
- Zur Adsorption der DNA an die Zellen 30 min auf Eis inkubieren
- 90 s Hitzeschock bei 42 °C mit anschließender Inkubation auf Eis für 3-5 min
- Nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium, Zellen zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 45-60 min bei 37 °C inkubieren

- Ausplattieren von 100  $\mu$ l auf vorgewärmte Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz zur Selektion und Inkubation über Nacht bei 37 °C

### 2.7.5 Selektion rekombinanter *E. coli* Klone durch X-Gal-Test

Der verwendete *E. coli* Klonierstamm DH5 $\alpha$  ist durch eine Deletion im *lacZ*-Gen gekennzeichnet und kann daher keine aktive  $\beta$ -Galactosidase mehr bilden. Durch Transformation mit Plasmiden wie pBlueskriptII SK+, die über die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase verfügen, in der sich wiederum die Multiklonierungsstelle befindet, kommt es zur Bildung eines aktiven Enzyms. Dies kann auf X-Gal und IPTG haltigen Platten sichtbar gemacht werden, auf denen das *lacZ*-Gen durch IPTG induziert wird und die  $\beta$ -Galactosidase das Glucoseanalogon X-Gal spaltet wonach durch Luftoxidation ein blauer Farbstoff entsteht. Soll in die Multiklonierungsstelle des Plasmids ein Insert ligiert werden, kann man den Erfolg der Insertion nach Transformation anhand der Kolonienfarbe sehen. Plasmide mit einer Insertion in der Multiklonierungsstelle und damit im *lacZ*-Gen können keine aktive  $\beta$ -Galactosidase bilden und erscheinen weiß (Blau/Weiß-Selektion).

## 2.8 DNA-Übertragung durch Konjugation

Da für Rhizobien keine effizienten Transformationssysteme zur Verfügung stehen, wurden Plasmide wie pPR mittels Konjugation mit *E. coli* als Donorstamm nach *S. meliloti* mobilisiert. Der verwendete *E. coli*-Stamm S17-1 verfügt über eine chromosomale Integration des RP4-Plasmids, was den Transfer der zu mobilisierenden Plasmide ermöglicht. Der Donor sollte sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, während der Rezipient in der stationären Wachstumsphase geerntet werden sollte.

Durchführung:

- Je 0,5 ml Donor und Rezipient separat für 1 min bei 13000 Upm zentrifugieren
- Verwerfen des Überstandes und zweimal mit 0,5 ml TY-Medium waschen, dabei die Zellen immer vorsichtig resuspendieren
- Abzentrifugieren und gründliches entfernen des Überstandes
- Pellets von Donor und Rezipient in je 50  $\mu$ l TY-Medium resuspendieren, vereinigen und in die Mitte einer TY-Platte ohne Selektionsdruck pipettieren
- Inkubation ÜN bei 30 °C

- Mit einer gelben Spitze Zellen von der Platte abnehmen und in ein Reagenzglas mit GTS-Minimalmedium überführen
- Inkubation für 5-6 h bei 30 °C auf dem Schüttler und unter Selektionsdruck auf den Rezipienten auf TY oder GTS-Platten in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattieren

## 2.9 Herstellung von *S. meliloti*-Mutanten mit Hilfe des *sacB*-Systems

Für die Mutationen des *surE*- und *pcm*-Gens in *S. meliloti* wurde das *sacB* System eingesetzt. Das *sacB*-Gen codiert für eine Levansucrase aus *B. subtilis* und ist ein effizienter Gegenselektionsmarker, der sowohl in Gram-negativen und auch Gram-positiven Bakterien verwendet werden kann (Jäger et al., 1995; Gay et al., 1983).

Die zu mutierenden DNA-Abschnitte wurden in den Vektor pK18*mobsacB* kloniert, der über eine Multiklonierungsstelle und das *sacB*-Gen verfügt. Nach Insertion der entsprechenden Reportergene in die zu mutierenden Gene konnte das Konstrukt mit *E. coli* S17-1 als Donor nach *S. meliloti* mobilisiert werden. Durch homologe Rekombination können die mutierten DNA-Abschnitte in die Zielregion integrieren. Dabei unterscheiden sich Transkonjuganten, bei denen nur eine einfache Rekombination und damit eine Integration des Vektors stattgefunden hat gegenüber doppelt homolog rekombinierten Klonen durch die Sensitivität gegenüber Saccharose im Anzuchtmedium. Rezipienten, die das Plasmid nicht enthalten, können im Gegensatz zu *sacB* exprimierenden Rezipienten auf LB-Agarplatten mit 10 %-iger Saccharose wachsen. Warum die Expression der Levansucrase toxisch ist, ist bisher noch nicht im Detail geklärt.

## 2.10 *In vitro* Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Die spezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten im Rahmen der Klonierung des *surE*- und *pcm*-Gens, der verschiedenen putativen Promotoren und bei der Selektion und Charakterisierung von rekombinanten Plasmiden wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Für die Klonierung der verschiedenen Gene und Promotoren wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet, da sie verglichen mit anderen thermostabilen Polymerasen die geringste Fehlerrate besitzt. PCR-Ansätze wurden auf Eis angesetzt und waren folgendermaßen zusammengesetzt:

H <sub>2</sub> O	74 µl
10 x Puffer für <i>Pfu</i> - Polymerase	10 µl
dNTP (je dNTP 2,5 mM)	8 µl
Primer fw (20 µM)	2 µl
Primer rev (20 µM)	2 µl
<i>S. meliloti</i> -Gesamt-DNA (50-100 ng/µl)	2 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	2 µl
<b>Σ</b>	100 µl

Nach einem ersten Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C wurden 35 Zyklen nach folgendem Schema durchlaufen, dabei richteten sich die Anlagerungstemperaturen nach den Schmelztemperaturen der Primer.

Denaturierung	94 °C	60 sec
Anlagerung	40-58 °C	60 sec
Elongation	72 °C	120 sec

Nach Ablauf der 35 Zyklen wurde der letzte Elongationsschritt auf 10 min ausgedehnt.

Bei den übrigen PCR-Reaktionen erfolgte die Amplifikation mit Hilfe der *Taq*-Polymerase nach dem gleichen Schema unter Verwendung eines speziellen *Taq*-Puffers. Als *template* wurden die zu untersuchenden Plasmide verwendet. Alternativ dazu konnte auch von den zu untersuchenden Kolonien Zellmaterial mit der Pipettenspitze direkt in den PCR-Ansatz gegeben werden. Die Elongationszeiten richteten sich nach der Größe der zu amplifizierenden Fragmente, wobei man davon ausgeht, daß die *Taq*-DNA-Polymerase in einer Minute 1000 Basen einbauen kann. Für eine optimale Amplifikation sollten die Schmelztemperaturen der Primer im gleichen Bereich liegen. Der Schmelzpunkt berechnet sich nach folgender Formel:  **$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt des Primers}) - 650/L$**

L gibt die Länge des Primers an (Chester und Marshak, 1993).

## 2.11 Southern-Hybridisierung (Southern, 1975, mod.)

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Southern-Hybridisierungen zur Analyse von Klonen wurde die DNA nach dem Verfahren des Vakuum-Blotting auf Nylonmembranen (Hybond-N, Firma Amersham Pharmacia) übertragen und anschließend mit DIG markierten DNA-Sonden hybridisiert.

### 2.11.1 Vakuum-Blotting

Die mit Restriktionsenzymen verdaute Gesamt-DNA wurde im 0,8 %-igem Agarosegel 2 h lang bei 60 V getrennt, wobei die äußeren Taschen des Gels freigelassen wurden. Nach Färbung im Ethidiumbromidbad erfolgte die Fotografie des Gels mit einem Lineal als Größenstandard, um später die detektierten Banden besser zuordnen zu können.

Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran wurde auf die gut angefeuchtete Unterlage einer Vakuum-Blot-Apparatur (Firma BioRad<sup>®</sup>, Vacuum Blotter) gelegt und mit einer Plastik-Maske bedeckt. Dabei sollte der Ausschnitt der Maske etwas kleiner als Membran und Gel sein, um eine vollständige Abdichtung zu gewährleisten. Nach dem Anschalten der Vakuum-Pumpe (Firma BioRad<sup>®</sup>, Vacuum Regulator) wurde das Gel auf die Membran gelegt und der Deckel der Apparatur geschlossen. Während der folgenden Vorbehandlungen und des Transfers wurde ein Vakuum von 5-10 mm Hg angelegt, wobei das Gel mit den entsprechenden Lösungen überschichtet wurde:

- 10 min Depurinierungslösung
- 20 min Denaturierungslösung
- 30 min Neutralisierungslösung
- 2 h Transferlösung

Anschließend wurden vor Entfernen des Gels die Taschen zur Markierung mit einer Nadel durchstochen und die noch feuchte Membran zur Fixierung der transferierten DNA mit der DNA Seite direkt auf den UV-Schirm für 45 s in die Gel-Dokumentationsanlage (Firma BioRad<sup>®</sup>) gelegt. Die Membran konnte sofort für die Prähybridisierung verwendet oder auch gelagert werden.

Depurinierungslösung

0,25 M HCl

Denaturierungslösung

0,5 N NaOH und 1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung

0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 und 3 M NaCl

Transferlösung

20 x SSC; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 und 3 M NaCl

**2.11.2 Hybridisierung**

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde mindestens eine Stunde prähybridisiert. Dazu wurde die Membran mit der DNA-Seite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen (Firma Ochs) überführt und mit mind. 20 ml Prähybridisierungslösung pro 100 cm<sup>2</sup> Membranfläche versetzt. Die Prähybridisierung erfolgte im Hybridisierungssofen (Firma Biometra) bei 63-68 °C.

Für die Hybridisierung über Nacht bei ebenfalls 63-68 °C wurde die Sonde aufgetaut, 10 min im Wasserbad zur Denaturierung der DNA gekocht und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Nach erfolgter Hybridisierung konnte die Sondenlösung weggefroren und mehrfach wiederverwendet werden. Die Membran wurde anschließend 2 x 5 min bei RT mit mind. 50 ml Waschpuffer 1 und 2 x 15 min bei der Hybridisierungstemperatur mit 50 ml vorgewärmtem Waschpuffer 2 zur Entfernung ungebundener bzw. unspezifisch gebundener Sonde gewaschen.

Prähybridisierungslösung

20 x SSC 12,5 ml

Blocking-Stammlösung 5,0 ml

10 % (w/v)

N-Lauryl-Sarkosin 10 % 0,5 ml

(w/v)

SDS 10 % (w/v) 0,1 ml

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 50 mlBlocking-Stammlösung

Blockierungsreagenz 10 g

Maleinsäurepuffer ad 100 ml

### Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	11,6 g
NaCl	8,76 g
NaOH	7 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
pH 7,5	

### Waschpuffer 1

2 x SSC/ 0,1 % SDS (w/v)

### Waschpuffer 2

0,1 x SSC/ 0,1 % SDS (w/v)

Die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung entsprach der der Prähybridisierungslösung mit Ausnahme der zugesetzten Sonde.

### **2.11.3 Sondenherstellung**

Die Sonden wurden durch PCR (2.10) hergestellt, wobei chromosomale DNA als *template* eingesetzt wurde. Dabei wurde ein dNTP-Mix verwendet, das DIG markiertes dUTP enthielt, so daß während der PCR markierte Nukleotide in die amplifizierte DNA eingebaut wurden. Die so hergestellte Sonde wurde auf einem Agarosegel analysiert und konnte direkt aus dem Gel ausgeschnitten und nach Denaturierung dem Prähybridisierungspuffer zugesetzt werden.

Alternativ konnte die Sonde durch *Klenow-labelling* hergestellt werden. Dazu wurden dem zu markierenden gelgereinigten Fragment (15 µl) nach Denaturierung für 10 min bei 100 °C und Transfer auf Eis folgende Komponenten hinzugefügt: 2 µl Hexanukleotidgemisch, 2 µl dNTP-Mix mit DIG-markiertem dUTP und 1 µl *Klenow*-Fragment (Firma Boehringer). Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt.

### **2.11.4 Antikörperbindung und colorimetrische Detektion**

Zum Blockieren der Membran wurde diese 30 min in mind. 50 ml Puffer 2 bei RT inkubiert. Nach Zugabe des vorher kurz anzentrifugierten Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP *Fab*-Fragmente (Roche), 1µl/10ml Puffer 2) und 30 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Entfernung der ungebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen in DIG-Waschpuffer für 15 min. Nach zweiminütigem Äquilibrieren im Detektionspuffer wurde die Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen herausgenommen, in eine Folie

gelegt und mit der Färbelösung versetzt. Nach Zuschweißen der Folie wurde die Membran im Dunkeln inkubiert bis deutlich sichtbare Banden auftraten. Die Membran wurde aus der Folie entfernt, mit Wasser gespült und getrocknet.

#### Puffer 2

Blocking-Stammlösung	5 ml
Maleinsäurepuffer	45 ml

#### DIG-Waschpuffer

Tween 20 (100 %)	0,3 ml
Maleinsäurepuffer	ad 100 ml

#### Detektionspuffer

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM

pH 9,5

#### Färbelösung

NBT-Lösung	66 µl
BCIP-Lösung	33 µl
Detektionspuffer	ad 10 ml

#### NBT-Lösung

75 mg/ml NBT in Dimethylformamid

#### BCIP-Lösung

50 mg/ml BCIP in Dimethylformamid

## **2.12 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit dem BioRad<sup>®</sup>-Protein-Microassay durchgeführt (modifiziert nach Bradford, 1976). Dieser Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau in saurer Lösung von 465 nm auf 595 nm beim Binden von Proteinen. Zur Proteinbestimmung wurden 10 µl einer Proteinlösung mit 1 ml Farbreagenz versetzt, das entsprechend der Anleitung des Herstellers verdünnt wurde. Nach mind. 5 Minuten wurde die OD bei 595 nm gemessen.

Bei einer  $OD_{595}$  von über 0,5 wurde die Messung mit entsprechend verdünnter Proteinlösung wiederholt. Mit Hilfe einer mit Rinderserumalbumin aufgenommenen Eichgeraden im Bereich von 1-20  $\mu\text{g}$  Protein/ml, konnte die Menge an Protein in der jeweiligen Probe bestimmt werden.

### 2.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Trennverfahren setzt man die Eigenschaften des Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) ein, sich an Proteine zu lagern und fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zu zerstören. Dabei wird ein SDS-Anion pro zwei Aminosäurereste gebunden, wodurch die Eigenladung des Proteins überlagert wird und die negative Ladung des SDS-Protein-Komplexes der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Daher erfolgt die Auftrennung der Proteine bei dieser Gelelektrophorese in Abhängigkeit von der Masse. Für die Elektrophorese wurde eine Minigel-Elektrophorese-Kammer verwendet. Es wurden ausschließlich diskontinuierliche Gele gegossen, die aus einem Trenngel und einem darüber liegendem Sammelgel bestehen, was zu einer besseren Auftrennung der Proben führt.

**Tab. 5 Zusammensetzung der Minigele**

	10 % Trenngel	15 % Trenngel	5 % Sammelgel
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	1,75 ml	1 ml	1,05 ml
TG	1,05 ml	1,0 ml	-
SG	-	-	0,45 ml
AA	1,4 ml	2,5 ml	1,33 ml
APS 10 % (w/v)	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
TEMED	3 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$

#### Acrylamidlösung (AA)

30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung im Verhältnis 37,5:1

#### Ammoniumpersulfat (APS)

10 % (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

4 x Trenngelpuffer (TG)

Tris-HCl	18,2 g
SDS	0,4 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml
pH 8,8	

4 x Sammelgelpuffer (SG)

Tris-HCl	6,1
SDS	0,4
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml
pH 6,8	

Elektrophorese-Laufpuffer

Tris-HCl	6,04 g
Glycin	28,84 g
SDS	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 2000 ml

Für ein Gel wurden je eine große und eine kleine Glasplatte mit 70 %-igem Ethanol gereinigt und mit dazwischen liegenden Abstandhaltern in eine Gelapparatur eingesetzt. Danach wurde das Trenngel zwischen die senkrecht stehenden Glasplatten gegossen und vorsichtig mit H<sub>2</sub>O überschichtet, um eine gerade Geloberfläche zu erhalten. Nach mindestens 45 minütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser mit saugfähigem Papier entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Danach wurde der Kamm luftblasenfrei eingesetzt und das Gel nach Polymerisation und Ziehen des Kammes für die Gelelektrophorese verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 150 Volt im Elektrophoresepuffer durchgeführt und nach 50-70 min beendet.

**2.13.1 Probenvorbereitung**

Die Proben wurden sofern nicht anders angegeben 1:5 mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C erhitzt.

### 5 x SDS-Probenpuffer für denaturierende Gele

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,8 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
Glycerin	0,8 ml
SDS 10 % (w/v)	1,6 ml
2-Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenolblau 1 % (w/v)	0,4 ml

## **2.14 Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Bei dieser Methode erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Ladung und Größe bei gegebenem pH-Wert des Elektrophoresepuffers und gegebenem Vernetzungsgrad des Polyacrylamids. Die nativen Proteingele wurden auf die gleiche Weise wie die SDS-Gele gegossen und waren auch aus einem Trenngel und einem Sammelgel zusammengesetzt. Anstelle von SDS-haltigen Lösungen wurden die unten aufgeführten SDS-freien Lösungen eingesetzt.

### 4 x Trenngelpuffer-Nativ (TG-N)

Tris-HCl	18,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml
pH 8,8	

### 4 x Sammelgelpuffer-Nativ (SG-N)

Tris-HCl	6,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml
pH 6,8	

### 10 x Elektrophorese-Laufpuffer-Nativ

Tris-HCl	30,3 g
Glycin	144,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
pH 8,4	

### 2.14.1 Probenvorbereitung für native Gele

Die Proteinproben wurden 4:1 mit dem Probenpuffer versetzt und ohne vorherige Denaturierung in die Geltaschen gefüllt. Nach einem Vorlauf von 15 min bei 50 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei 100 V für 2 h.

#### 4 x Probenpuffer für native Gele

Glycerin	7,5 ml
Bromphenolblau (2 % Lösung)	0,5 ml
Tris-HCl	0,4 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 25 ml
pH 6,8	

### 2.15 2D-PAGE (O'-Farell, 1975, mod.)

Die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) ermöglicht es Proteine aufgrund ihrer Ladung (isoelektrischer Punkt) durch isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension und aufgrund ihrer molekularen Masse durch SDS-PAGE in der zweiten Dimension aufzutrennen.

#### 2.15.1 Probenvorbereitung

Nach Lyse der Bakterienzellen müssen die Proteine so aufbearbeitet werden, daß sie als Probenmaterial für die Isofokussierung einsetzbar sind. Dieser Prozeß umfaßt idealerweise die Solubilisierung, Denaturierung und Reduktion der Proteine, um alle Proteininteraktionen aufzuheben.

Durchführung:

- *S. meliloti*-Kulturen bei 4 °C und 10000 Upm 10 min abzentrifugieren und bei -20 °C ÜN lagern
- Aufnahme des Zellpellets in Lysepuffer; Menge hängt vom Volumen und der OD<sub>600</sub> der Ausgangskultur ab; Richtwert: 6 ml Lysepuffer/100 ml gut angewachsener Biotin supplementierter Kultur und 3 ml Lysepuffer /100 ml Biotin limitierter Kultur
- 2 Durchgänge in der gekühlten *french pressure cell*

- Lysierte Zellen in SS34 Zentrifugenbecher oder bei kleinen Mengen in E-Cups überführen und bei 4 °C 20 min 13000 Upm zentrifugieren
- Überstände vereinigen und mit drei Volumen eiskaltem Aceton versetzen und (mindestens 2 h) über Nacht bei –20 °C präzipitieren
- Bei 4 °C, 20 min und 13000 Upm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet gut bei RT trocknen lassen
- Pellet in mindestens 1 ml Probenpuffer aufnehmen; zur vollständigen Denaturierung und Lösung Extrakt bis zu einer Stunde bei RT stehen lassen

#### Lysepuffer

Harnstoff	8 M	19,2 g
CHAPS	2-4 % (w/v)	0,8-1,6 g
Tris-HCl	40 mM	0,194 g
MilliQ-Wasser		ad 40 ml

Frisch zubereiten oder in Aliquots bei –20 °C aufbewahren.

Optional: Zusatz von Protease Inhibitor: Pefabloc 5 mM; 11,975 mg auf 10 ml Puffer

#### Probenpuffer

Harnstoff	8 M	4,8 g
CHAPS	2 % (w/v)	200 mg
*Pharmalyte	0,5 % (v/v)	50 µl
Tris-HCl	35 mM	42,4 mg
		(Stammlsg.)
*DTT	1 % (w/v)	100 mg
MilliQ-Wasser		ad 10 ml

\*Frischen Probenpuffer ansetzen und nur 1 ml davon mit 5 µl Pharmalyte und 10 mg DTT versetzen; restlichen Puffer aliquotieren und nach einmaligem Auftauen und Zugabe von Pharmalyte und DTT nicht wieder einfrieren.

### Rehydrierungslösung

Harnstoff	8 M	12 g
CHAPS	2% (w/v)	0,5 g
*Pharmalyte	0,5 % (v/v)	125 µl
Bromphenolblau	wenige	Körner
MilliQ-Wasser		ad 25 ml

\* In 1 ml Aliquots lagern und direkt vor Gebrauch 2,8 mg DTT und 0,5 µl Pharmalyte hinzufügen.

### **2.15.2 Isoelektrische Fokussierung**

Bei diesem Trennverfahren wandern die Proteine im elektrischen Feld innerhalb einer Gelmatrix bis zu dem pH-Wert, an dem sich die Summe der positiv und negativ geladenen Aminosäurereste des Proteins gegenseitig aufheben (isoelektrischer Punkt). Am isoelektrischen Punkt ist daher die elektrophoretische Mobilität des Proteins in einem angelegten elektrischen Feld gleich Null.

Die bei den Isokussierungen eingesetzten Gelstreifen sind dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Gradient durch Kopolymerisation definierter Chemikalien, sogenannter Immobiline, an die Acrylamid-Matrix stabil gehalten wird, (**Immobilisierte-pH-Gradienten**, Bjellqvist et al.1982) (IPG-Streifen, Firma Amersham Pharmacia).

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die gewünschte Menge des zu trennenden Proteingemisches mit Probenpuffer auf 170 µl Probenvolumen aufgefüllt. Danach erfolgte die Zugabe von 170 Rehydrierungslösung. Die Probe wurde gemischt und in die Mitte einer Keramikhalterung pipettiert. Vorteile der gemeinsamen Applikation von Probe und Rehydrierungslösung sind eine bessere Auflösung und die Möglichkeit größere Proteinmengen zu trennen (Sanchez et al. 1997; Rabilloud et al. 1994).

Der IPG-Streifen wurde unmittelbar vor Gebrauch aus dem  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  Gefrierfach entnommen, die Plastikfolie entfernt und mit der Gelseite nach unten in die Keramikhalterung gelegt. Dabei wurde die Probe vorsichtig mit Hilfe des Streifens in der Halterung verteilt. Vor Überschichtung des Streifens mit 2 ml Silikonöl (*Dry-strip-cover-fluid*, Firma Amersham Pharmacia) wurden Luftblasen zwischen Probenlösung und Gelstreifen mit Hilfe einer Pipettenspitze entfernt. Danach wurde die Halterung mit der spitzen Seite nach oben auf die *IPGphor*-Apparatur (Firma Amersham Pharmacia) gelegt, so daß Anoden- und Kathodenseite richtig ausgerichtet waren.

Die Isokussierungen wurden bei konstant 20 °C und 50 µA pro Streifen durchgeführt. Laufzeiten richteten sich u.a. nach der Probenmenge und dem gewählten pH-Bereich der Streifen, wobei generell gilt, daß größere Probenmengen und engere pH-Bereiche der Streifen längere Fokussierzeiten benötigen. Folgende Standardprogramme wurden variiert, wenn z. B. Gele im pH-Bereich von 4,5-5,5 gestartet wurden.

Standardprogramm für analytische Fokussierungen (bis zu 150 µg Protein/Probe):

<u>Stufe</u>	<u>Einstellung</u>	<u>Dauer (h)</u>	<u>Dauer (Vhr)</u>	<u>Spannung(V)</u>
1-Rehydrierung	konstant	12		20
2	konstant	1		200
3	konstant	1		500
4	konstant		1000	1000
5	Gradient	1		8000
6	konstant		40000	8000

Standardprogramm für präparative Fokussierungen (bis zu 1 mg Protein/Probe):

<u>Stufe</u>	<u>Einstellung</u>	<u>Dauer (h)</u>	<u>Dauer (Vhr)</u>	<u>Spannung(V)</u>
1-Rehydrierung	konstant	12		20
2	konstant	2		150
3	konstant	1		200
4	konstant	1		500
5	konstant		1000	1000
6	Gradient	1		8000
7	konstant		60000	8000

Nach Durchlauf des Programmes konnten die Streifen direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bei -70 °C in Plastikfolie eingeschweißt aufbewahrt werden.

### 2.15.3 Equilibrierung

Während der Equilibrierung wurden die IPG-Streifen an das Puffersystem der nachfolgenden SDS-Gelelektrophorese angepaßt. Nach Einschweißen der Streifen in Plastikfolie wurden diese mit je 10 ml Equilibrierungslösung versetzt und 15 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Auf einen zweiten Equilibrierungsschritt mit

Iodacetamid wurde weitgehend verzichtet. Vergleiche hatten ergeben, daß ein zusätzlicher Equilibrierungsschritt zum Entfernen des überschüssigen DTT und Verhindern der Reoxidation während der Elektrophorese keinen Effekt auf das Aussehen der Gele hatte.

#### Equilibrierungslösung

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	50 mM	6,7 ml
Harnstoff	6 M	72,07 g
Glycerol 87 % (v/v)	30 % (v/v)	69 ml
SDS	2 % (w/v)	4,0 g
Bromphenolblau	wenige	Körner
MilliQ-Wasser		ad 200 ml

Die Equilibrierungslösung wurde in 10 ml Aliquots gelagert und unmittelbar vor Gebrauch mit je 100 mg DTT versetzt.

#### **2.15.4 SDS-Gelelektrophorese als 2. Dimension**

Zur weiteren Auftrennung der isofokussierten Proteine in Abhängigkeit ihrer Massen wurde eine SDS-Gelelektrophorese in einem vertikalen System durchgeführt. Die Gele wurden mit Hilfe einer Gießapparatur nach Angaben des Herstellers angefertigt. Nach Equilibrierung der IPG-Streifen wurden diese auf mit Wasser getränktes Filterpapier gelegt, um überschüssigen Equilibrierungspuffer zu entfernen. Die Streifen wurden dann einmal durch den SDS-Laufpuffer gezogen, mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig auf die Oberfläche des auspolymerisierten SDS-Gels gelegt und mit einem flachen Spatel ebenmäßig auf die Oberfläche gedrückt. Bei Bedarf konnten die Plastikenden der Streifen abgeschnitten werden, um so noch genügend Platz zur Auftragung eines Markers zur Verfügung zu haben. Als Gelkammer diente die PROTEAN<sup>®</sup> II xi-Cell von BioRad<sup>®</sup>.

Die Laufzeit bei zwei gleichzeitig laufenden Gelen betrug 5 h bei 60 mA oder 15 h bei 20 mA. Der Laufpuffer wurde immer frisch angesetzt.

Für ein 12 %-iges Gel mit einer Größe von 20 x 20 cm und einer Dicke von 1 mm wurden folgende Komponenten benötigt.

<u>Trenngel (12 %)</u>		<u>Sammelgel (4%)</u>	
AA (siehe 2.13)	20 ml	AA (siehe 2.13)	1,33 ml
Trenngelpuffer (siehe 2.13)	12,5 ml	Sammelgelpuffer (siehe 2.13)	2,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	16,75 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	6,1 ml
SDS 10 % (w/v)	500 µl	SDS 10 % (w/v)	100 µl
APS 10 % (w/v)	200 µl	APS 10 % (w/v)	50 µl
TEMED	50 µl	TEMED	10 µl
Σ	50 ml	Σ	10 ml

Laufpuffer: siehe 2.13.

Nach Durchlauf der Gele und Herauslösen aus der Apparatur erfolgte die Färbung. Gele, die mit bis zu 150 µg Protein in der ersten Dimension beladen wurden, wurden einer Silberfärbung (2.16.2) unterzogen. Wurden die Gele als Probenmaterial für die MALDI-TOF-MS angefertigt, wurde 1 mg Proteinlösung aufgetragen und mit Coomassie (2.16.1) gefärbt.

## 2.16 Probenpräparation für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der regulierten Proteine wurde eine MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt (*matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight*). Dazu schnitt man zunächst die entsprechenden Coomassie-gefärbten Proteinspots mit Hilfe eines sauberen Skalpellens aus dem Gel aus und unterzog sie einem Trypsinverdau.

Durchführung:

- Vorwaschen der E-Cups mit 500 µl 0,1 % TFA/60 % CH<sub>3</sub>CN
- Ausgeschnittenes Gelstück kleinschneiden und in vorgewaschenes E-Cup transferieren
- Ein ungefärbtes Stück des Gels zur Herstellung eines Hintergrundes für die Messung ebenso behandeln
- Zugabe von 250 µl 50 % H<sub>2</sub>O/50 % CH<sub>3</sub>CN auf ein E-Cup und 5 min waschen
- Entfernen des Waschpuffers und Zugabe von 250 µl 50 % CH<sub>3</sub>CN/ 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> zu allen Proben
- 30 min bei RT unter Schütteln waschen; Entfernen des Waschpuffers

- Zugabe von 250 µl 50 % CH<sub>3</sub>CN/10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und bei RT 30 min waschen
- Entfernen des Waschpuffers und in der Vakuumzentrifuge trocknen
- Zugabe von 0,1 µg modifiziertem Trypsin (Promega) pro 15 mm<sup>3</sup> Gelfläche in 15 µl 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> zu allen Proben und zur Hintergrund-Probe  
Achtung: Trypsin muß vorher zur Aktivierung in saurem Puffer aufgenommen werden: 200 µl des mitgelieferten Puffers (50 mM Essigsäure) wurden auf 1 E-Cup Trypsin (20 µg) gegeben, aliquotiert und vor Gebrauch bei 30 °C 10-15 min aktiviert.
- 1 µl des aktivierten Trypsins mit 15 µl 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> auf alle Proben geben
- 5-10 min stehen lassen
- Zugabe von 20 µl 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ohne Enzym
- Inkubation für 24 h bei 37 °C
- Aufbewahren der Proben bis zur Messung bei 4 °C

Die Proben wurden vor der Analyse mit Ultraschall behandelt, um die Peptide aus der Gelmatrix herauszulösen. Als Matrix bei der Massenspektrometrie dienen im allgemeinen leichte organische Säuren. Im folgenden wurde  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure verwendet. Das Probenmaterial wurde 1:1 mit der Matrix vermischt und 2 µl des Gemisches auf eine Probenträgerplatte mit eingravierten Ringen zur Markierung der Probenposition pipettiert. Durch Hitze (Föhn) konnte die Kristallisation gefördert werden. Eine Probe wurde dreimal auf dieselbe Stelle aufgetragen. Der Probenträger wurde in das Gerät gegeben (MALDI-TOF, mit Reflektor (RETOF); Bruker Reflex II) und jede einzelne Probenposition konnte mit dem Laser angesteuert werden. Der Laser wurde auf ein Kristall gerichtet, welches über einen Monitor überprüft werden konnte, und mit dem Laser pro Messung 20 mal beschossen. Dann wählte man von derselben Probe 3-4 weitere Kristalle und verfuhr genauso. Die gemessenen Massenpeaks einer Probe wurden übereinandergelegt. Zur Kalibrierung wurden die Massen dreier bekannter Peptide bestimmt.

## 2.17 Färbung von Proteinen

### 2.17.1 Coomassie-Färbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele mit Coomassie-Blau-Färbelösung versetzt und 30-60 min lang darin leicht geschüttelt. Entfärbt wurden die Gele mit einer Entfärbelösung, die mehrmals gewechselt wurde, solange bis der Hintergrund

der Gele nahezu farblos war. Die Gele wurden in Folie eingeschweißt und bei 4 °C aufbewahrt oder bis zum Trocknen mit dem BioRad® Geltrockner in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufbewahrt.

#### Färbelösung

Coomassie-Brilliant-Blau R-250	1,2 g
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	1,2 g
Methanol	455 ml
Eisessig	80 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

#### Entfärberlösung

Methanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

### **2.17.2 Silberfärbung (Blum et al., 1987, mod.)**

Die unspezifische Färbung von Proteinen mit Silber wird unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler durchgeführt. Die Inkubationen und das Waschen erfolgten nach folgender Anleitung:

- Mind. 1 h Inkubation des Gels in Fixierlösung; bei länger andauerndem Fixieren zum Beispiel über Nacht (bis max. 24 h) vor weiteren Schritten das Gel für 30 min in frische Fixierlösung legen
- 3 x 10 –20 min in 50 %-igem Ethanol inkubieren
- 60 s Thiosulfatlösung
- Waschen 3 x 20 s in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- 20 min in Imprägnierlösung inkubieren
- 2 x 20 s in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> waschen
- Schwenken in Entwicklerlösung bis Proteinbanden bzw. *Spots* gut erkennbar sind
- Kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> spülen und 15 min in Stopplösung aufbewahren
- Zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> spülen und in Wasser oder 10 %-iger Glycerinlösung (v/v) bis zum Trocknen aufbewahren

Fixierlösung

Methanol	50 ml
Eisessig	12 ml
Formaldehyd 37% (v/v)	0,1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Entwicklerlösung

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3,4 g
Formaldehyd 37% (v/v)	50 µ
Thiosulfatlösung	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Imprägnierlösung

AgNO <sub>3</sub>	0,2 g
Formaldehyd 37% (v/v)	75 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Thiosulfatlösung

Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O	20 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Stoplösung

EDTA	1,86 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml
pH 7,5	

Zur Färbung zweier 20 x 20 cm großen SDS-Gele im Rahmen der 2D-Gelelektrophorese wurden je 300 ml aller Lösungen frisch angesetzt.

## 2.18 Proteinaufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die überexprimierten SurE- und Pcm-Proteine konnten aufgrund der 6 N-terminalen Histidinreste durch Nickel-NTA Metall-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die 6 Histidinreste haben eine hohe Affinität zu den immobilisierten Nickelionen der Matrix, wodurch die Proteine an das Säulenmaterial gebunden wird.

Nach Anzucht, Induktion und Zellernte wurde versucht, die Proteine sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen anzureichern. Bei beiden Verfahren wurde das Zell-Lysat mit einer Ni-NTA-Matrix inkubiert, ungebundene Proteine ausgewaschen und die gebundenen Proteine eluiert.

### 2.18.1 Zellaufschluß und Aufreinigung unter nativen Bedingungen

Vorgehensweise:

- Frisch geerntete oder auf Eis aufgetaute Zellen in Lysepuffer aufnehmen, wobei die Menge sich nach dem Naßgewicht der Zellen richtet (3 ml Lysepuffer/g Naßgewicht)



- Das Gemisch in eine leere 10 ml Säule überführen und nach Sedimentation der Matrixpartikel zweimal mit 4 ml Puffer C waschen
- Elution mit Elutionspuffern verschiedener pH-Werte D und E, (4 x 0,5 ml von jedem Puffer)

#### Puffer B,C,D,und E

Harnstoff	8 M	Puffer B	pH 8,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M	Puffer C	pH 6,3
Tris-HCl	0,01 M	Puffer D	pH 5,9
		Puffer E	pH 4,5

Die Puffer B,C,D und E unterschieden sich nur durch ihre pH-Werte, die aufgrund der Eigendissoziation von Harnstoff unmittelbar vor Gebrauch der Puffer mit HCl eingestellt wurden.

## **2.19 $\beta$ -Glucuronidase-Messungen**

Die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase wurde in einem fluorimetrischen Test bestimmt, in dem die Umsetzung des Substrates 4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) zu 4-Methyl-umbelliferon (MU) verfolgt wurde (Jefferson et al., 1986).

Durchführung:

- 100  $\mu$ l zu untersuchende Bakterienkultur, bzw. entsprechend verdünnte Aliquots, mit 900  $\mu$ l *gusA*-Extraktionspuffer für 2 min bei 37 °C vorinkubieren
- Zugabe von 100  $\mu$ l Substratlösung im Abstand von 15 s und Inkubation für 20 min bei 37 °C
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 200  $\mu$ l Stoppuffer im Abstand von 15 s
- Messen der Fluoreszenz mit dem Fluorimeter (Minifluorimeter TKO 100, Firma Hofer) nach Bestimmung des Leerwertes (Reaktionspuffer, Medium und Substratlösung)

Die Glucuronidaseaktivitäten wurden als relative Einheiten bestimmt. Dazu wurde die Fluoreszenz von 100  $\mu$ l Kultur bzw. verdünnter Kultur nach oben angegebener Methode bestimmt. Verdünnt wurden Kulturen mit hoher optischer Dichte oder Kulturen von denen Vorversuche gezeigt hatten, daß Meßwerte außerhalb des Meßbereiches zu erwarten sind.

Diese Fluoreszenz-Meßwerte wurden zur Standardisierung unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Kulturen auf die optischen Dichte bezogen ( $OD_{600}=1$ ).

<u>gusA-Extraktionspuffer</u>		<u>Substratlösung</u>	
0,5 M $(Na)_x(H)_yPO_4$ -Puffer pH 7,5	5 ml	4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ - D-Glucuronid (MUG)	11 mg
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,07 ml	gusA-Extraktionspuffer	ad 20 ml
0,5 M $Na_2EDTA$	2 ml		
5 % N-Lauryl-Sarkosin (w/v)	2 ml		
10 % Triton-X-100	1 ml		
$H_2O_{bidest}$	ad 100 ml		

#### Stoppuffer

(0,2 M)  $Na_2CO_3$

## 2.20 Dünnschichtchromatographie

Zur Isolierung von Acyl-Homoserinlactonen wurden jeweils 25 ml *S. meliloti*-Kulturen abzentrifugiert und der Überstand dreimal mit einem Volumen Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatfraktionen wurden gesammelt und bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Ethylacetat aufgenommen, erneut evakuiert, mit 100  $\mu$ l desselben Lösungsmittels versetzt und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ C$  aufbewahrt. Aliquots (2  $\mu$ l) wurden auf eine RP-18W Dünnschichtplatte aufgetragen (Firma Macherey und Nagel) und mit 60% Methanol: 40 %  $H_2O$  (v/v) als Laufmittel in zwei Durchgängen aufgetrennt. Nach Trocknen der Dünnschichtplatten erfolgte die Überschichtung mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Reporterstamm NTL4 und Inkubation bei  $30^\circ C$ . Die Isolierung der Homoserinlactone aus dem Überstand von *A. tumefaciens* KYC6, ein Stamm der die Autoinduktoren in hohem Maße produziert und als Positivkontrolle diente, erfolgte nach der gleichen Methode.

## 2.21 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Anorganische Salze wurden von den Firmen Roth, Sigma oder Merck bezogen.

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad®/ Roth
Agar	Merck/ Oxoid
Agarose	Biozym/ Gibco BRL
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
BCIP	Biomol
Blocking Reagenz	Boehringer
Biotin	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie-Blau R-250/G-250	Serva
Chloroform	Merck
Eisessig	Merck
Essigsäure	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ethanol	Merck
EDTA	Merck
Ficoll 400	Sigma-Aldrich
Glucose	Merck/ Fluka
Glycin	Merck
Glycerol	Fluka
Harnstoff	Serva
Hefeextrakt	Oxoid
Isopropanol	Merck
IPTG	Sigma
Kanamycin	Sigma
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
$\alpha$ -Naphthyl-Phosphat	Sigma
NBT	Biomol
p-Nitrophenyl-Phosphat	Simga

Pefabloc	Merck
Pharmalyte	Amersham Pharmacia
Phenol	Merck
PIPES	Sigma
Saccharose	Merck
Salzsäure	Merck
SDS	Fluka
Streptomycin	Sigma
TEMED	Biomol/ BioRad®
Tris-HCl	Sigma
Trypsin	Promega
Trypton	Oxoid
Tween-20	Serva
X-Gal/ X-Gluc	Sigma

<u>Enzyme und Puffer</u>	<u>Hersteller</u>
Klenow-Fragment	Boehringer
Lysozym	Serva
ProteinaseK	Sigma
Restriktionsenzyme/	Pharmacia/ MBI/
<i>One-Phor-All</i> -Spaltungspuffer	New England Biolabs/ Boehringer
RNaseA	Boehringer
<i>Shrimp</i> alkalische Phosphatase	Boehringer
T4-Ligase/ T4-Ligase-Puffer	Boehringer
<i>Taq</i> -Polymerase/ <i>Taq</i> -Puffer	Boehringer/ Qiagen/ Eigenherstellung
<i>Pfu</i> -Polymerase/ <i>Pfu</i> -Puffer	Stratagene

## 2.22 Geräte, Kits und andere Materialien

Sofern unter Material und Methoden nicht anders angegeben wurden folgende Geräte, Kits und andere Materialien verwendet.

---

DNA-Gelextraktionskit, Qiaquick-Gel-Extraktion-Kit	Qiagen
DNA-Größenstandard	Gibco BRL/ MBI
Filtermembran	Schleicher & Schuell
Gelkammern/ Agarosegelelektrophorese	BioRad®
Geltrockner	BioRad®
Kamera/ Geldokumentationsanlage	BioRad®
Ni-NTA-Matrix	Qiagen
Nitrocellulosemembran	Sartorius
Nylonmembran	Schleicher & Schuell/ (Hybond-N, Amersham Pharmacia)
PCR-Maschine	Perkin Elmer/ MWG Biotech
Fotometer	Ameraham Pharmacia Ultrospec 3000
Plasmid-Isolationskit	Qiagen
Proteinbestimmungs-Reagenz	BioRad®
Protein-Größenstandard	Sigma, Novex
SDS-Gelelektrophoresekammer	BioRad®
Zentrifugen	Sorvall Instruments (Du Pont)/ Biofuge Heraeus

### 3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Leguminosen exsudieren Biotin in signifikanten Mengen über die Wurzel und dieses Vitamin übernimmt eine Schlüsselfunktion bei der Besiedlung der Rhizosphäre durch *S. meliloti*. In Rhizosphärentests und auch bei Anzucht unter Laborbedingungen konnte bereits die Abhängigkeit des rhizobiellen Wachstums durch exogenes Biotin demonstriert werden (Streit et al., 1996; Watson et al., 2001; Entcheva et al., 2002). Da die endogene Biotinbiosynthese des Mikrosymbionten limitierend ist, stellt pflanzenexsudiertes Biotin im natürlichen Habitat die wichtigste Quelle für dieses Vitamin dar und könnte möglicherweise daran beteiligt sein, *S. meliloti* die Anwesenheit eines potentiellen Symbiosepartners zu signalisieren. Welche Prozesse auf physiologischer Ebene an der Wahrnehmung von exogenem Biotin involviert sind und letztlich dazu führen, Wachstum in Abhängigkeit von Biotin wieder aufzunehmen, ist weitgehend unbekannt. Bisher wurden erst zwei Gene in *S. meliloti* charakterisiert (*bioS* und *bdhA*), deren Expression direkt oder indirekt durch Biotin beeinflusst wird. Daher war es Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe unterschiedlicher Methoden weitere Biotin-regulierte Gene zu identifizieren und so den Einfluß von exogenem Biotin auf rhizobielles Wachstum zu analysieren.

i) Als zentrale Methode wurde die 2D-Gelelektrophorese gewählt. Dabei wurden die Proteinmuster von *S. meliloti* 1021-Zellen, die zunächst unter Biotin-limitierenden Bedingungen inkubiert wurden, mit den Proteinmustern von Zellen verglichen, die nach Inkubation unter Biotin-limitierenden Bedingungen mit Biotin supplementiert wurden. Ausgewählte Proteine, deren Expression nach Biotinzugabe deutlich erhöht war, wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert.

ii) In einem zweiten Ansatz wurden gezielt Gene aus Datenbanken ausgewählt und deren Expression in Abhängigkeit von Biotin im Medium durch Promotoraktivitätsmessungen bestimmt. Dadurch wurde der potentielle regulatorische Einfluß von Biotin auf Gene, die an Prozessen wie Nodulation, Phospholipidsynthese oder Autoinduktion beteiligt sind, untersucht.

iii) In einem dritten Ansatz wurde durch Mutagenese die Bedeutung von Genen aus dem *Survival*-Locus für das Überleben in der stationären Wachstumsphase untersucht.

### 3.1 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, mehrere hundert bis tausend Proteine einer Zelle zu trennen und gleichzeitig auf einem Gel darzustellen. Dabei werden die Proteine in der ersten Dimension isoelektrisch fokussiert, d.h. aufgrund ihrer Ladung getrennt. In der zweiten Dimension erfolgt die Separation aufgrund der unterschiedlichen molekularen Massen im SDS-Polyacrylamidgel. Auf diese Weise können Proteinextrakte von Zellen, die unter verschiedenen Wachstumsparametern angezogen wurden oder Proteinextrakte von Mutanten und Wildtyp-Zellen miteinander verglichen werden. Durch diese sogenannte Proteomanalyse läßt sich die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt untersuchen. Interessante Proteine können nach Isolation aus dem Gel und proteolytischem Verdau massenspektrometrisch analysiert und identifiziert werden.

Ein Ziel der Arbeit war es, den Einfluß externen Biotins auf rhizobielles Wachstum zu untersuchen und Proteine zu identifizieren, deren Expression direkt oder indirekt durch Biotin induziert wird. Daher wurden die Proteinmuster von Zellen, die unter Biotin limitierenden Bedingungen angezogen worden waren mit denen verglichen, die nach Biotinsupplementation angefertigt wurden. Ausgewählte Proteine, die nach Biotinsupplementation im 2D-Gel reproduzierbar stärker exprimiert waren, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und einem Verdau durch Trypsin unterzogen. Die Peptidgemische wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert und die resultierenden Peptidmassen eines Proteins durch Datenbankanalysen identifiziert. In dieser Arbeit wurden 12 Proteine aus *S. meliloti* identifiziert, die eine erhöhte Expression nach Biotinzugabe zeigten.

#### 3.1.1 Vergleichende 2D-Gelanalyse von *S. meliloti* Proteinextrakten

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese sollten Proteine identifiziert werden, deren Expression in Abhängigkeit von Biotin induziert wird. Dazu mußte *S. meliloti* zunächst unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogen werden, was durch mehrere Passagen in nicht Biotin-supplementiertes GTS-Minimalmedium erreicht wurde. Da die vermutlich fehlende endogene Biotinbiosynthese limitierend auf rhizobielles Wachstum wirkt, führte der sukzessive Transfer von *S. meliloti* in frisches nicht Biotin-supplementiertes Medium zu einer Verarmung an Biotin im Medium und damit zu einem reduzierten Wachstum, meßbar durch geringere optische Dichten. Ein Aliquot einer solchen Biotin-limitierten

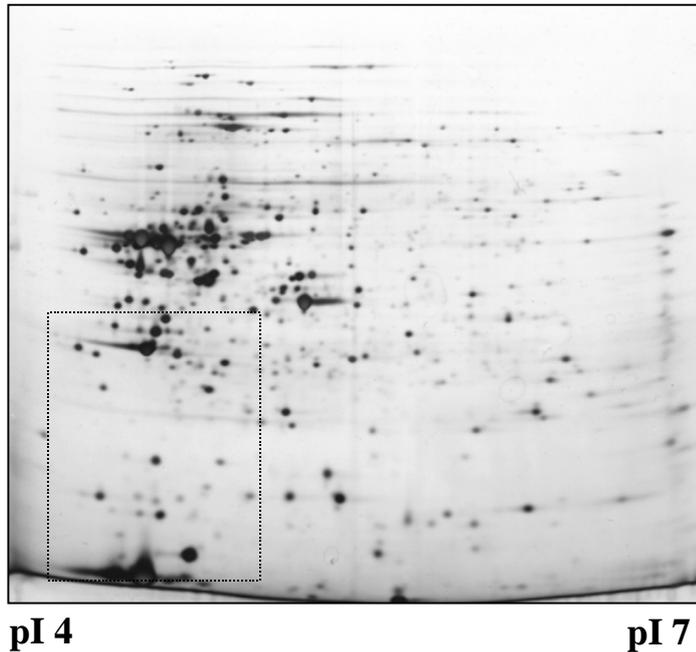
Kultur wurde abzentrifugiert und das Pellet bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die restliche Kultur wurde durch Biotinzugabe (40 nM Endkonzentration) komplementiert, bis zur Wiederaufnahme von Wachstum weiter inkubiert und in der logarithmischen Phase geerntet. Die Zellpellets der unter Biotinlimitierung angezogenen Kultur und der Biotin-supplementierten Kultur wurden parallel zur Herstellung des Proteinextraktes aufbearbeitet. Die isoelektrische Fokussierung, SDS-PAGE und die Färbung wurden für ein Probenpaar immer gleichzeitig durchgeführt.

In Vorversuchen wurden Zellen bereits sechs Stunden nach Biotinzugabe geerntet. Bei dieser Kultur wurde nach der kurzen Inkubationszeit nach Biotinsupplementation keine höhere  $\text{OD}_{600}$  gemessen, als vor Biotinsupplementation. Die Zellen wurden aufbearbeitet und mit den Proteinmustern der nicht supplementierten Biotinkultur verglichen. Es zeigte sich, daß unter diesen Versuchsbedingungen keine starken Änderungen auf Proteinebene in den 2D-Gelen zu sehen waren (nicht dargestellt). Daher wurden für die folgenden Versuche die Zellen nach deutlicher Wachstumszunahme geerntet, was abhängig von der Länge der vorangegangenen Inkubation unter Biotin-limitierenden Bedingungen war. Je älter die Biotin-limitierten *S. meliloti* Stationärphase-Kulturen waren, desto länger dauerte die *lag*-Phase nach Biotinsupplementation. Bei den im folgenden dargestellten Experimenten wurden die Zellen 32-37 Tage lang unter Biotin-limitierenden Bedingungen inkubiert. Die Zellernte erfolgte 64-90 h nach Biotinsupplementation.

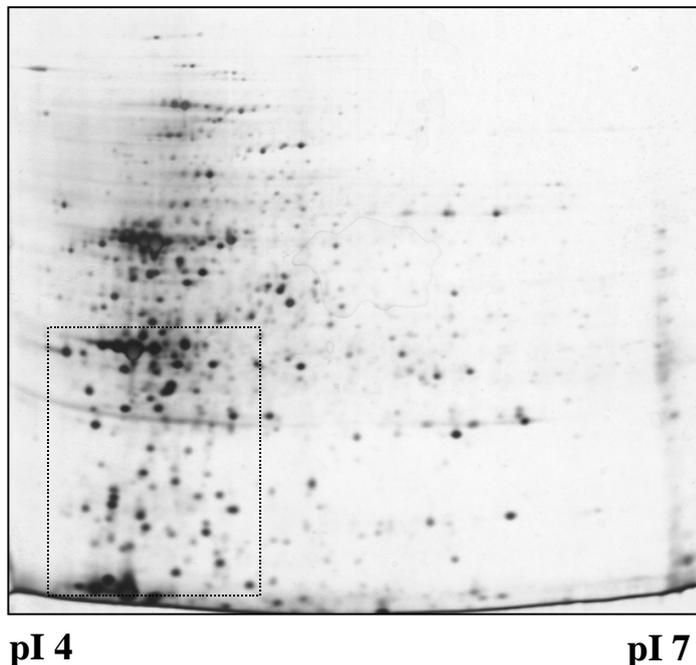
Wie auf den vergleichenden Gesamtansichten der Gele im pI-Bereich 4-7 zu sehen ist (Abb. 2), wurde ein Großteil der etwa 600 Proteine unter beiden Wachstumsbedingungen exprimiert. Manche Proteine lagen verstärkt exprimiert unter Biotin-limitierenden Bedingungen vor (etwa 50), andere zeigten eine erhöhte Expression nach Zugabe von Biotin (etwa 70). Während auf den Gelen der unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogenen Kulturen vor allem kleine Proteine im unteren pI-Bereich vermehrt zu beobachten waren, befanden sich auf den Gelen der Biotin-supplementierten Kulturen verstärkt Proteine mit großen Massen im pI-Bereich von 5,5-6,5. Da der Großteil der Proteine im pI-Bereich 4,5-5,5 lokalisiert war, wurden zur besseren Auflösung Isofokussierungen in diesem pI-Bereich durchgeführt (Abb. 3). Insgesamt wurden 18 Proteine, deren Expression reproduzierbar nach Biotinzugabe induziert oder deutlich erhöht war und deren Positionen auch im Coomassie gefärbten SDS-Gel eindeutig zuzuordnen war, massenspektrometrisch untersucht. 12 dieser 18 Proteine konnten eindeutig als *S. meliloti* Proteine identifiziert werden. Wie unter 2.16 angegeben, wurden die entsprechenden Proteinspots aus dem Gel herausgeschnitten und einem Trypsinverdau

unterzogen, bevor sie als Probenmaterial für die MALDI-TOF-MS Analyse eingesetzt werden konnten.

**a) Biotin 40 (nM)**

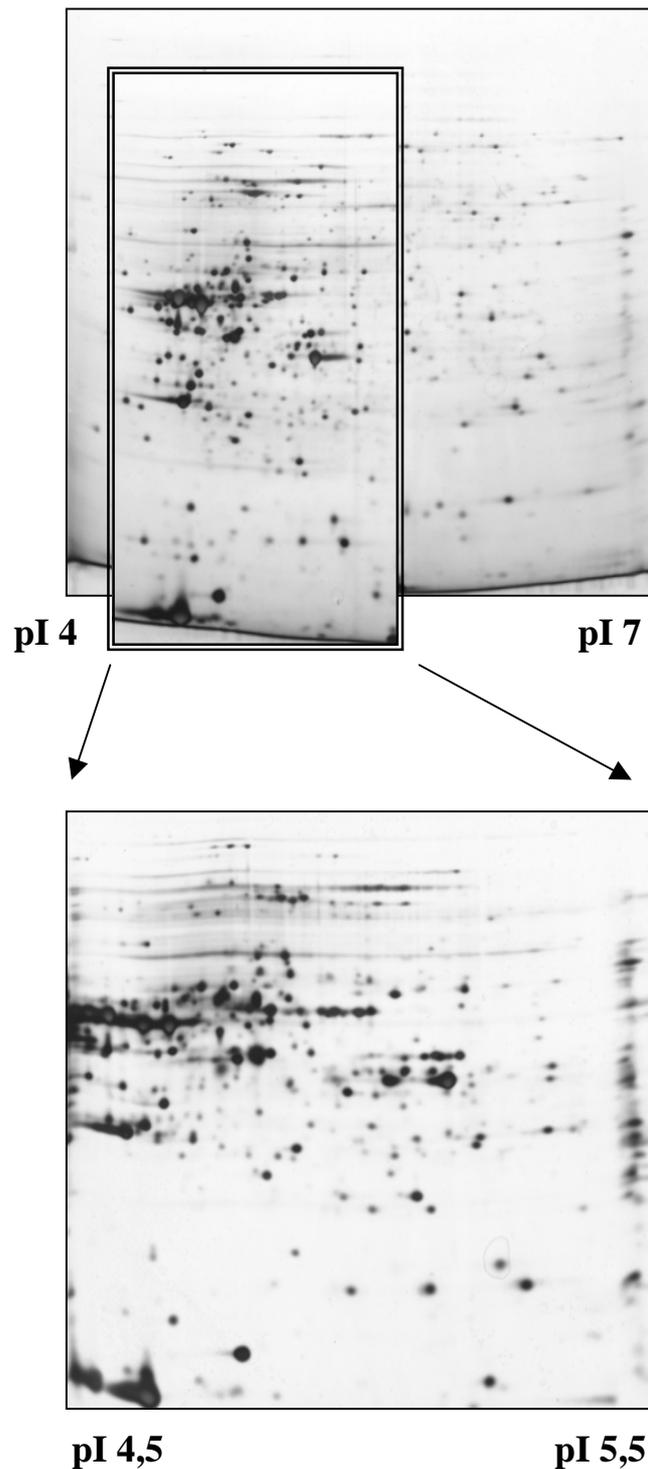


**b) Biotin-limitiert**



**Abb. 2 Vergleichende Gesamtansicht von *S. meliloti* Proteinextrakten**

Vor allem unter Biotin-limitierenden Bedingungen b) waren im unteren pI-Bereich viele kleine Proteine detektierbar, die unter Biotinsupplementation a) nicht zu sehen waren (siehe markierten Bereich). Es wurden jeweils 100 µg Protein für die Isofokussierung aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde in einem 12 %-igem (w/v) Gel durchgeführt, woran sich eine Silberfärbung anschloß.

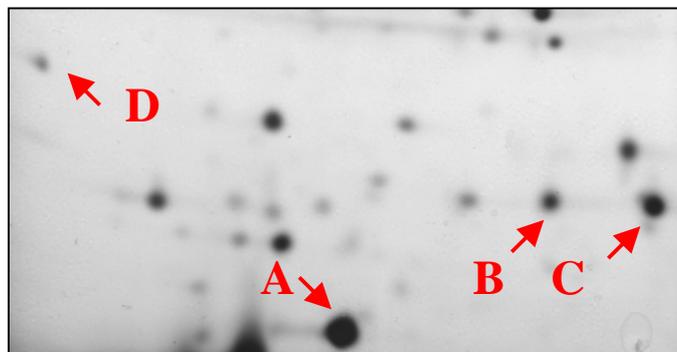


**Abb. 3 Darstellung der verbesserten Auflösung durch Verwendung von IPG-Streifen mit engerem pI-Bereich (4,5-5,5) für die Isokussierung**  
Bei beiden Gelen wurde als Probenmaterial Proteinextrakt Biotin-supplementierter Kulturen aufgetragen. Durch die Isokussierung im engeren pI-Bereich wurde eine bessere Auflösung für Regionen mit einer hohen Anzahl an Proteinen erreicht. Es wurden jeweils 100 µg Protein in der ersten Dimension aufgetragen und eine SDS-PAGE in einem 12 %-igem (w/v) Gel durchgeführt.

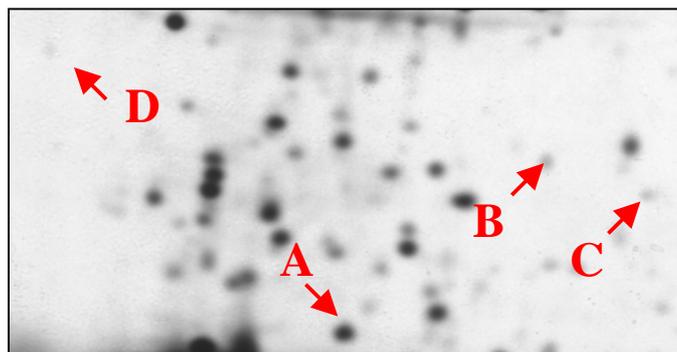
### 3.1.2 Ausgewählte Proteine mit erhöhter Expression nach Biotinsupplementation

Zur besseren Veranschaulichung der Proteine, die nach Biotinsupplementation eine erhöhte Expression aufwiesen und durch MALDI-TOF-MS identifiziert wurden, sind im folgenden Ausschnitte aus den entsprechenden 2D-Gelen dargestellt. Dabei werden die Gele, in denen Proteinextrakte Biotin-supplementierter Kulturen aufgetrennt wurden, den Gelen gegenübergestellt, die die Proteinextrakte der unter Biotinlimitierung inkubierten Kulturen zeigen. Regulierte Proteine werden durch Pfeile markiert. Die Bezeichnung der Proteine wird auf den Gelen durch Buchstaben angegeben. Anhand der entsprechenden Tabellen 7 und 8 kann ermittelt werden, um welche Proteine es sich dabei handelt.

#### a) Biotin (40 nM)



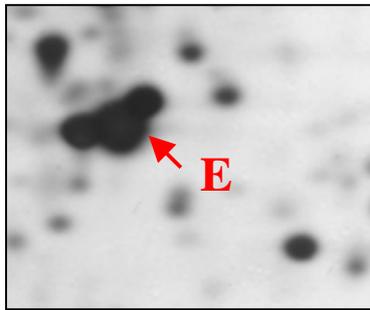
#### b) Biotin-limitiert



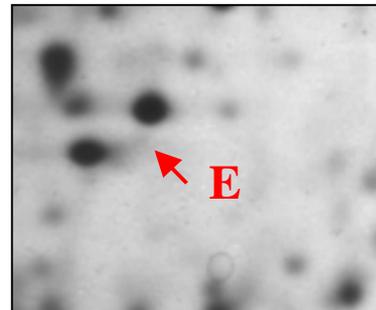
**Abb. 4** Ausschnittsvergrößerung aus Gelen des pI-Bereiches 4-7 zur Darstellung der Proteine A, B, C und D

Proteine, die nach Biotinsupplementation stärker exprimiert (Abb. 4 a) und massenspektrometrisch analysiert wurden, sind durch Pfeile und Buchstaben markiert. Bei Protein A handelte es sich um das 50S ribosomale Protein L7/L12 und bei Protein D um die Omega-Untereinheit der RNA-Polymerase. B und C wurden beide als CopC-Protein identifiziert, welches möglicherweise an der Resistenz gegenüber Kupfer beteiligt ist. Die Laufunterschiede sind auf Modifikationen zurückzuführen.

a) Biotin (40 nM)

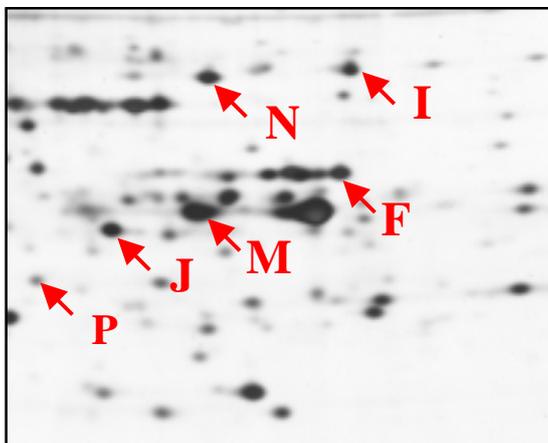


b) Biotin-limitiert

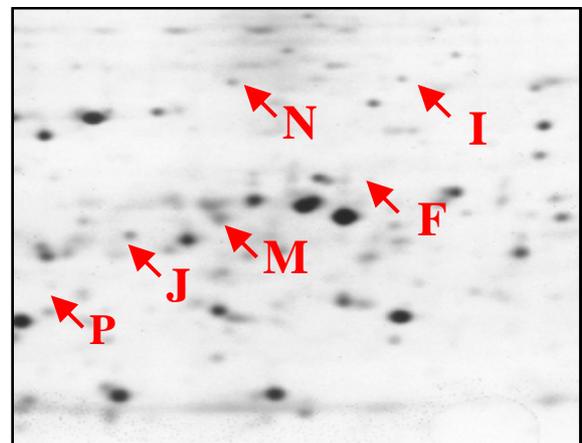


**Abb. 5** Ausschnittsvergrößerung zur vergleichenden Darstellung des Proteins E  
Die Ausschnitte stammen aus Gelen der Proteinextrakte Biotin-supplementierter Kulturen a) und Biotin-limitierter Kulturen b) des pI-Bereiches 4-7. Protein E wurde als ABC-Transporter-Bindeprotein für L-Aminosäuren identifiziert.

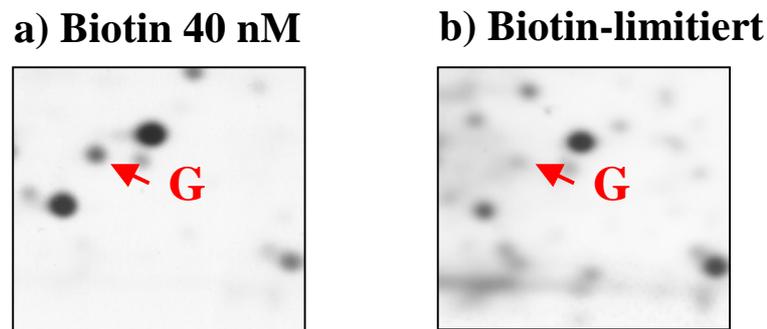
a) Biotin 40 nM



b) Biotin-limitiert

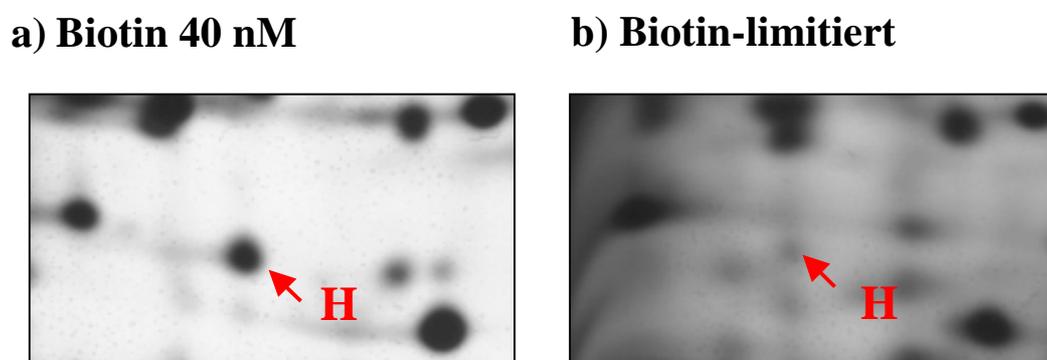


**Abb. 6** Ausschnittsvergrößerung zur Darstellung der Proteine F, I, J, M, N und P  
Die Ausschnitte sind aus den Gelen des pI-Bereiches 4,5-5,5 a) unter Biotinsupplementation und b) unter Biotinlimitierung. Bei Protein F handelte es sich um ein ABC-Transporter-Bindeprotein für Zucker, bei Protein I um ein ABC-Transporter-Bindeprotein für Glycerol-3-Phosphat und bei Protein J um ein konserviertes hypothetisches Protein. M zeigte Ähnlichkeiten zu einem ABC-Transporter-Bindeprotein aus *M. loti*. N und P konnten nicht identifiziert werden, zeigten aber Ähnlichkeiten zu einer Guanylat-Kinase bzw. zu einem Chromosomen-Trennungs-Protein (siehe Tab. 8).



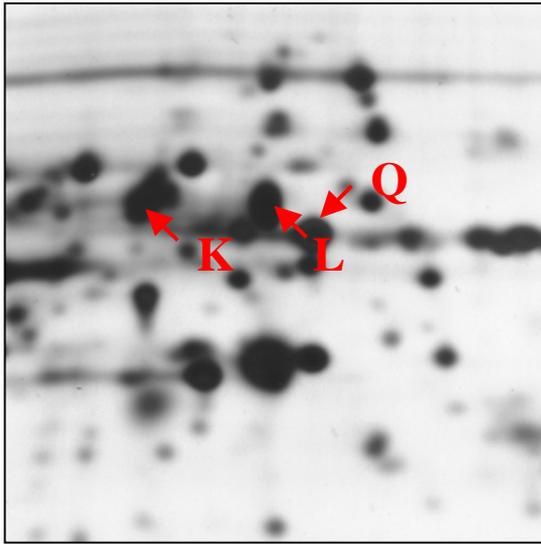
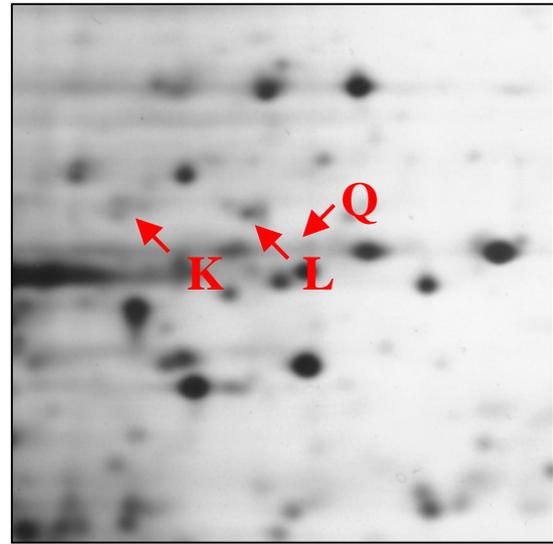
**Abb. 7 Ausschnittsvergrößerung zur vergleichenden Darstellung des Proteins G**

Die Ausschnitte sind aus den Gelen des pI-Bereiches 4,5-5,5 a) unter Biotinsupplementation und b) unter Biotinlimitierung. Bei G handelte es sich um eine Aldolase des 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weges, einem Schlüsselenzym des Entner-Doudoroff-Weges.

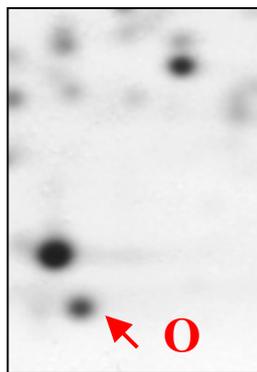
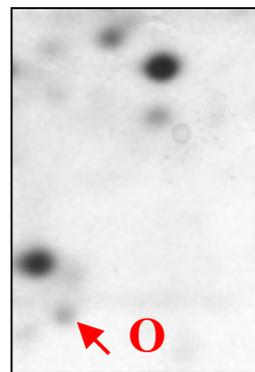


**Abb. 8 Ausschnittsvergrößerung zur Darstellung des Protein H**

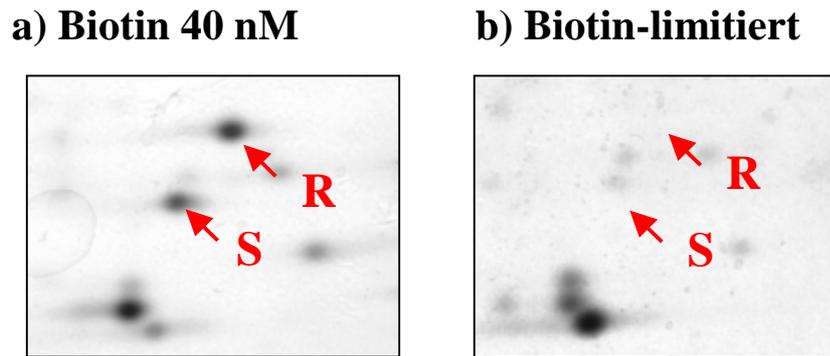
Die Ausschnitte stammen aus Gelen der Proteinextrakte Biotin-supplementierter Kulturen a) und Biotin-limitierter Kulturen b) des pI-Bereiches 4,5-5,5. Protein H wurde als ABC-Transporter-Bindeprotein identifiziert, wobei die Art des gebundenen Moleküls nicht näher spezifiziert werden konnte.

**a) Biotin 40 nM****b) Biotin-limitiert****Abb. 9 Ausschnittsvergrößerung zur vergleichenden Darstellung der Proteine K, L und Q**

Die Ausschnitte stammen aus Gelen der Proteinextrakte Biotin-supplementierter Kulturen a) und Biotin-limitierter Kulturen b) des pI-Bereiches 4,5-5,5. Die Proteine K und L wurden als Leucin spezifisches Bindeprotein identifiziert, zeigten etwa das gleiche Laufverhalten in der zweiten Dimension, unterschieden sich jedoch geringfügig durch den pI-Wert, was auf Modifikationen des Proteins schließen läßt. Protein Q konnte nicht identifiziert werden (siehe Tab. 8).

**a) Biotin 40 nM****b) Biotin-limitiert****Abb. 10 Ausschnittsvergrößerung zur Darstellung des Proteins O**

Die Ausschnitte stammen aus Gelen der Proteinextrakte Biotin-supplementierter Kulturen a) und Biotin-limitierter Kulturen b) des pI-Bereiches 4-7. Das Protein O konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden, zeigte aber Ähnlichkeiten zu einem Chromosomen-Trennungs-Protein aus *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (siehe Tab. 8).



**Abb. 11 Ausschnittsvergrößerung zur vergleichenden Darstellung der Proteine R und S**

Die Ausschnitte stammen aus Gelen der Proteinextrakte Biotin-supplementierter Kulturen a) und Biotin-limitierter Kulturen b) des pI-Bereiches 4,5-5,5. Beide Proteine konnten nicht identifiziert werden, zeigten aber Ähnlichkeiten zu einem Protein zur Initiation der Replikation des Plasmids aus *Bacillus subtilis* (Protein R) und zu einem hypothetischem Protein aus *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50 (Protein S)(siehe Tab. 8).

### 3.1.3 Auswertung der MALDI-TOF-MS-Analyse

Bei Aufnahme eines Massenspektrums erzeugt jedes detektierte Ion ein Ereignis an der Position im Spektrum, die seinem  $m/z$  Wert (Masse/Ladung) entspricht. Im Spektrum selbst ist die relative Intensität der aufsummierten Signale gegen das  $m/z$  Verhältnis aufgetragen. Aus den Peaks, die im Spektrum auftreten, können die Massen der Peptide abgelesen werden. Die Massen aller Peptide, die nach Analyse einer Proteinprobe auftreten, werden als *peptide mass fingerprint* (PMF) bezeichnet, was bedeutet, daß die Zusammensetzung der Peptidmassen eines bestimmten Proteins einem Fingerabdruck gleicht. Zur Identifikation der Proteine wurden die PMF mit Peptidmassen, die sich theoretisch bei einem Verdau der in Datenbanken gespeicherten Proteinsequenzen ergeben würden, verglichen. Die Datenbankanalyse erfolgte mit Hilfe des *Mascot*-Programmes ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). In die Suchmaske wurden dabei die beobachteten Massen in Form einer Peakliste einer Probe eingegeben. Die Standardeingabeparameter sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

**Tab. 6** Standardeingabeparameter des *Mascot*-Suchprogrammes

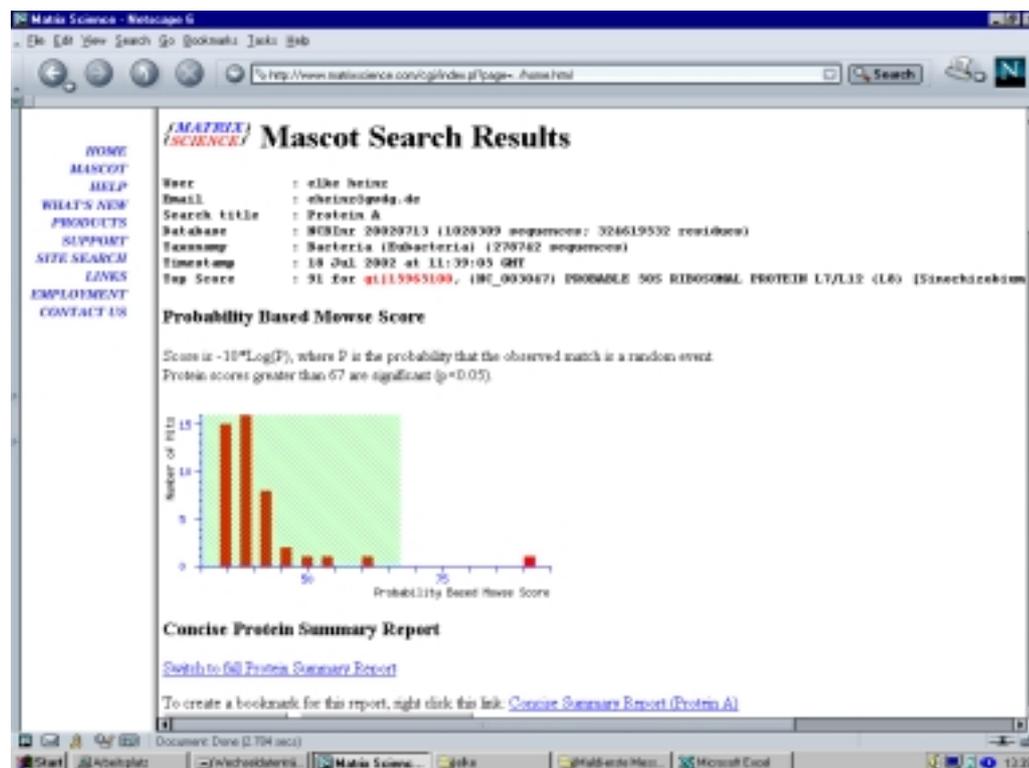
Parameter	Einstellung
Enzym	Trypsin
<i>missed cleavages</i> <sup>1</sup>	1
Suchart	PMF
Massenwerte	monoisotopisch
Peptidmassentoleranz	1 Da oder 0.5 %
Ladung des Peptides	MH <sup>+</sup>
fixierte und variable Modifizierungen	ohne
Datenbank	NCBIInr
Proteinmasse	nicht eingeschränkt

<sup>1</sup>maximale Anzahl zu erwartender ausgelassener Spaltungsstellen beim Verdau des Proteins

Peaks im vorderen Bereich des Spektrums bis 800 Da wurden aus den Peaklisten entfernt, da diese oft unspezifisch und die selteneren größeren Peptide für eine Identifizierung am aussagekräftigsten sind (Schrattenholz, 2001). In Tabelle 7 sind die Proteine aufgeführt, die nach Biotinzugabe eine erhöhte Expression zeigten und identifiziert werden konnten. Dabei wurden die Proteine als identifiziert eingestuft, wenn unter Standardbedingungen mit dem *Mascot*-Suchprogramm ein signifikanter *Score*-Wert erreicht wurde. Dieser lag bei den gewählten Suchbedingungen bei 66. Das entsprechende Protein wurde in der *S. meliloti* Datenbank (<http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti.html>) ermittelt, einem theoretischem tryptischen Verdau mit dem Programm *peptidemass* (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>) unterzogen und die entstehenden Peptidmassen mit den Peaklisten und den Spektren verglichen. Außerdem wurden die theoretischen Massen und pI-Werte, der nach dem Suchprozeß erhaltenen Proteine, mit der Position des zugehörigen Proteinspots im Gel verglichen. Desweiteren wurden Proteine mit einem Scorewert unter 66 als identifiziert eingestuft (Proteine D, G, I und J), wenn unter Standard-suchbedingungen als erster Treffer ein *S. meliloti* Protein gefunden wurde und die Peptidmassen des theoretisch tryptisch verdauten Proteins in den Spektren auftraten. So war beispielsweise das Spektrum von Protein G durch Hintergrundpeaks gekennzeichnet, die möglicherweise durch Verunreinigungen des Probenmaterials verursacht wurden. Das Suchprogramm differenziert nicht zwischen großen Peaks und Hintergrundpeaks. Das bedeutet, daß die zugehörigen Peptidmassen der großen Peaks und der kleinen

Hintergrundpeaks den gleichen Stellenwert bekommen und Hintergrundpeaks daher die Signifikanz eines Suchergebnisses erniedrigen. So wurde für das Protein G kein signifikanter Treffer gefunden. Betrachtet man jedoch die herausragenden großen Peaks des Spektrums, so tauchten die zugehörigen Peptidmassen alle im theoretisch tryptisch verdauten Protein G auf.

In Abb. 12 ist das Ergebnis einer mit dem *Mascot*-Programm durchgeführten Suche exemplarisch für Protein-*Spot* A dargestellt. Balken im linken Teil des Bildes geben die Proteine wieder, die zwar Ähnlichkeiten zu den eingegebenen Proteindaten haben, aber nicht signifikant ähnlich sind. Je höher die Balken sind, desto mehr Proteine wurden gefunden. Balken, die nicht farbig hinterlegt sind, zeigen die Proteine auf, die als signifikant eingestuft wurden. Da nur ein Protein im signifikanten Bereich gefunden wurde ist dieser Balken niedrig.



**Abb. 12** Darstellung eines Suchresultates des *Mascot*-Programmes

Die Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis der *Mascot*-Analyse für das Protein A. Nach Eingabe der Peptidmassen in die Suchmaske wurde ein Protein –das ribosomale Protein L7/L12 aus *S. meliloti*- mit einem *Score*-Wert von 91 signifikant identifiziert. Nicht signifikante Proteine sind farblich hinterlegt.

### 3.1.4 Identifizierte Proteine aus *S. meliloti* mit erhöhter Expression nach Biotinsupplementation

In ihrer Expression durch Biotin regulierte Proteine sind in Tabelle 7 unter Angabe der theoretisch berechneten Massen und pI-Werte zusammengefaßt. Angegeben wurden die entsprechende Bezeichnung der Proteine oder der *ORF*-Nummern.

Bei Protein A handelte es sich das um 50S ribosomales Protein L7/L12. Dies deutet darauf hin, daß die Proteinsynthese nach Biotinsupplementation erhöht war.

Die Proteine B und C wurden beide als *ORF* [SMc02283] identifiziert. *Blast*-Analysen der Proteinsequenz zeigten, daß dieser *ORF* Ähnlichkeiten zu CopC aus *Agrobacterium tumefaciens* C58 (64 % identische Aminosäuren und 81 % ähnliche Aminosäuren) und *Aeromonas veronii* (37 % identische AS und 51 % ähnliche AS) aufweist. CopC-Proteine sind Kupfer bindende Proteine, die zusammen mit anderen Genprodukten mikrobieller *cop-operons* an der Resistenz gegenüber Kupfer beteiligt sind und auch Kupfer transportieren (Cooksey, 1994). (Promotoraktivitätsmessungen des *copC*-Gens siehe unter 3.2.6). Beide Proteine zeigten im SDS-Gel dieselbe Masse und einen schwach voneinander abweichenden pI-Wert, was auf eine natürliche oder durch die Aufbearbeitung artifizielle Modifikation hindeutet, durch die der pI-Wert des Proteins geändert wurde (z.B. Phosphorylierung). Durch *Scan-Prositate*-Analyse wurden mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen durch Proteinkinasen gefunden ([www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite](http://www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite)). Bei Protein D handelte es sich um das RpoZ-Protein (EC 2.7.7.6), der Omega-Untereinheit der RNA-Polymerase. Dies zeigt, daß die Transkription nach Biotinsupplementation verstärkt wird. Die Proteine E, F, H, und I wurden als Komponenten von ABC-Transportern identifiziert. Es handelte sich bei allen vier Proteinen um Bindeproteine für verschiedene Moleküle wie L-Aminosäuren oder Zucker. Protein G wurde als 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase, einem Schlüsselenzym des Entner-Doudoroff Weges, identifiziert. Es katalysiert die Spaltung von 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Protein J konnte als konserviertes hypothetisches Protein identifiziert werden. *Blast*-Analysen zeigten, daß das Protein aus *S. meliloti* 77 % Identität zu einem Protein aus *Agrobacterium tumefaciens* und 53 % Identität zu einem Protein aus *Agrobacterium vitis* hat. Bei diesen beiden Organismen ist die Funktion des Proteins bisher ebenso unbekannt wie bei *S. meliloti*. Proteine K und L wurden beide als Leucin spezifisches Bindeprotein (Vorläufer) LivK identifiziert. Wie auch bei den Proteinen B und C beobachtet, liefen Proteine K und L auf gleicher Höhe im SDS-Gel und unterschieden sich durch den pI-Wert (siehe Abb. 9),

was auf Modifikationen schließen läßt. Auch in der Proteinsequenz des LivK Proteins konnten durch *Scan-Prosites*-Analyse potentielle Phosphorylierungsstellen gefunden werden. LivK gehört zu den bakteriellen Aminosäuren bindenden Proteine und ist am spezifischen Transport verzweigter Aminosäuren beteiligt.

**Tab. 7 Proteine aus *S. meliloti*, deren Expression durch Zugabe von 40 nM Biotin signifikant erhöht wurde**

Protein	Identifikation ORF/Bezeichnung	Funktion	Score -Wert <sup>2</sup>	pI/ Mr [Da] <sup>3</sup>
A	50S ribosomales Protein L7/L12, [SMc01318/RpIL]	Translation	91	4,79/12827
B/C	CopC, [SMc02283] Anmerkung: Im SDS-Gel B und C mit gleichen Massen; pI-Wert verschieden; Modifikation	Kupfer- bindendes Protein	88/80	5,30/17182
D	$\omega$ -UE DNA-abhängige RNA-Polymerase, [SMc02408/RpoZ]	Transkription	63	4,19/14893
E	generelles ABC-Transporter-Bindeprotein für L- Aminosäuren, periplasmatisch, [SMc02118/AapJ]	Transport	70	5,00/36833
F	ABC-Transporter-Bindeprotein für Zucker, periplasmatisch, [SMb20484]	Transport	87	5,40/34865
G	KHG-KDPG Aldolase, [SMc03153/Eda2]	Hexose- Abbau	56	4,73/21626
H	ABC-Transporter-Bindeprotein, periplasmatisch, [SMc02774]	Transport	67	5,06/34010
I	ABC-Transporter-Bindeprotein für Glycerol-3-Phosphat, periplasmatisch (Vorläufer), [SMb20416/UgpB]	Transport	60	5,20/46612
J	konserviertes hypothetisches Protein, [SMb20025]	unbekannt	54	5,34/34080
K/L	Leucin-spezifisches Bindeprotein (Vorläufer), [SMc01946/LivK] Anmerkung: Im SDS-Gel K und L mit gleichen Massen pI-Wert verschieden; Modifikation	Transport	74/76	5,00/39024

<sup>1</sup>*S. meliloti* Kulturen wurden 64-90 h nach Biotinsupplementation geerntet

<sup>2</sup>unter Standard-Eingabeparameter ermittelter *Score*-Wert; *Score*-Werte ab 66 gelten als signifikant (vgl. Erläuterung im Text)

<sup>3</sup>anhand der Proteinsequenz theoretisch berechnete pI-und Mr-Werte, die mit der Position der Protein-*Spots* im Gel verglichen wurden

Desweiteren wurden 3 Proteine massenspektrometrisch analysiert und identifiziert, deren Expression unter den getesteten Versuchsbedingungen nicht signifikant verändert war. Es handelte sich um das Chaperonin A [GroES oder SMc00912], einer Nukleosid-Diphosphat-Kinase [SMc00595], und einem 5'-Nukleotidase-Vorläufer-Protein [SMc01228]. Diese Proteine dienen als interne Markerproteine zur Größen- und pI-Wert-Bestimmung. Zwei dieser Proteine konnten bereits durch andere Arbeitsgruppen identifiziert werden (GroES-Protein und Nukleosid-Diphosphat-Kinase; Guerreiro et al., 1999). Einige Proteine, die eine erhöhte Expression nach Biotinzugabe aufwiesen, wurden durch MALDI-TOF-MS bisher nicht eindeutig als *S. meliloti* Proteine identifiziert. Bei den in der Tabelle 8 zusammengefaßten Proteinen konnte kein signifikanter *Score*-Wert erreicht werden. Die ersten drei als nicht signifikant eingestuften Proteine der Liste, bzw. Proteine aus nahe verwandten Organismen wie *Agrobacterium tumefaciens* oder *M. loti*, die das Suchprogramm als Ergebnis lieferte, wurden dennoch daraufhin überprüft, ob es entsprechende Proteine in *S. meliloti* gab. Traten in der *S. meliloti* Datenbank keine entsprechenden Proteine dem Namen nach auf, wurde mit Hilfe des *blastp*-Programmes nach ähnlichen Proteinen gesucht und die Position im Gel überprüft. In der folgenden Tabelle sind jeweils nur die Proteine aufgeführt, die an erster Stelle nach Analyse mit dem *Mascot*-Suchprogramm in der Liste der besten aber nicht signifikanten Treffer angezeigt wurden.

**Tab. 8 Proteine, mit erhöhter Expression nach Biotinzugabe, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten**

Protein	beste Übereinstimmung zu	Vergleich mit <i>S. meliloti</i> Datenbank <sup>1</sup>	Score- Wert <sup>2</sup>
M	ABC-Transporter-Bindeprotein [ <i>M. loti</i> ]	44 % Identität/ 61 % Ähnlichkeit zu LEU/ILE/VAL-bindendes Protein aus <i>S. meliloti</i> [SMc00078 oder LivJ]	46
N	Guanylat Kinase [ <i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS]	43 % Identität/ 62 % Ähnlichkeit zur Guanylat-Kinase aus <i>S. meliloti</i> ,	50
O	Chromosomen-Trennungs-Protein [ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ]	34 % Identität/ 58 % Ähnlichkeit zu [SMc02801 oder ParB]	53
P	Malat-Dehydrogenase [ <i>E. coli</i> ]	30 % Identität/ 49 % Ähnlichkeit zur Malat-Dehydrogenase aus <i>S. meliloti</i>	48
Q	MucB-Protein [ <i>Salmonella typhimurium</i> ]	kein homologes Protein in <i>S. meliloti</i> vorhanden	53
R	Protein zur Initiation der Plasmidreplikation [ <i>Bacillus subtilis</i> ]	kein homologes Protein in <i>S. meliloti</i> vorhanden	46
S	hypothetisches Protein [ <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ]	kein homologes Protein in <i>S. meliloti</i> vorhanden	56

<sup>1</sup>nicht angegeben wurden die theoretisch berechneten pI-Werte und Molekularen Massen, da bei den hier aufgeführten *S. meliloti* Proteinen keiner der beiden Parameter oder nur einer mit der Position des Proteins im Gel übereinstimmten

<sup>2</sup>unter Standard-Eingabeparameter ermittelter Score-Wert; Score-Werte ab 66 gelten als signifikant

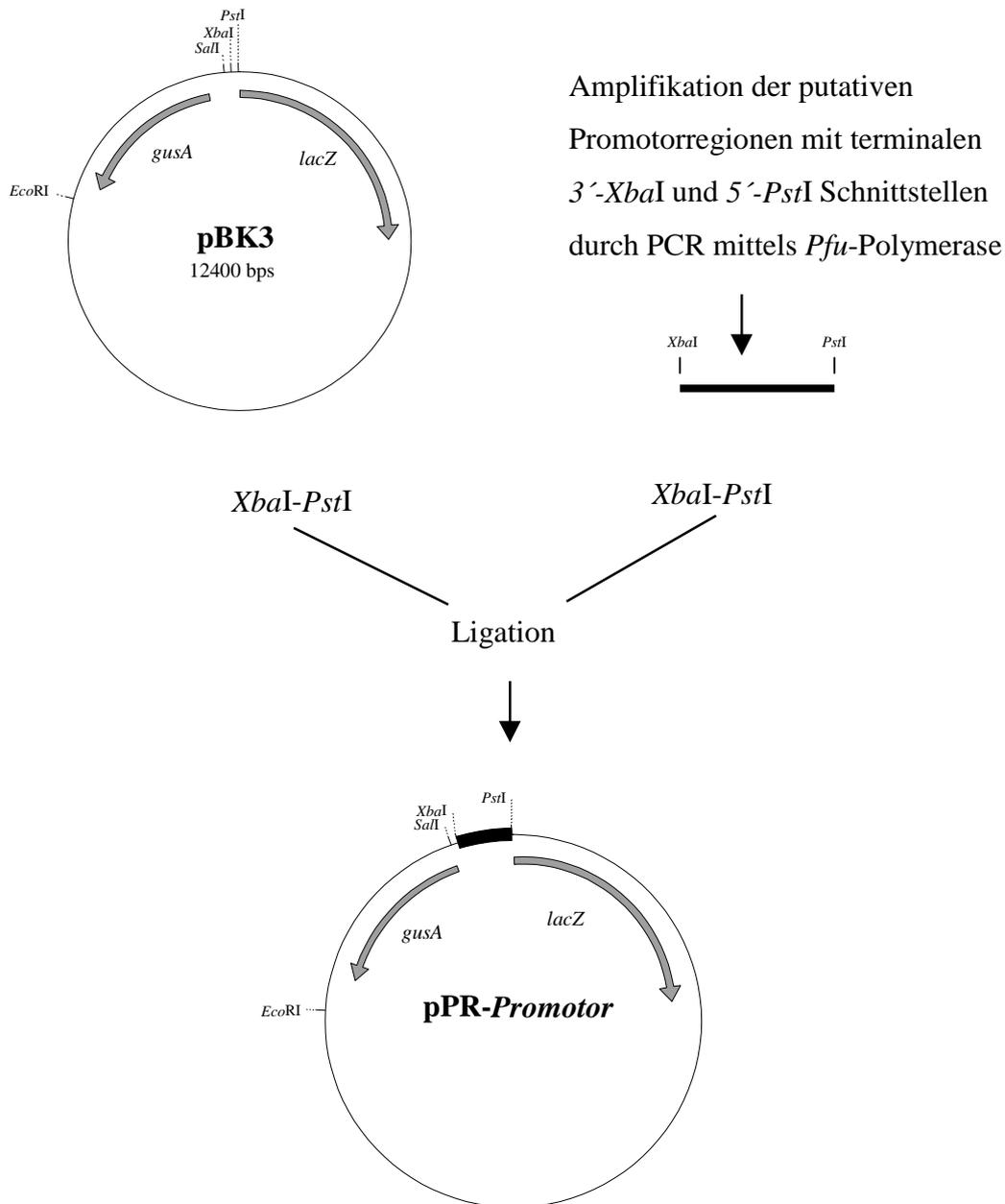
### 3.2 Konstruktion von Reportergenfusionen

Neben der Analyse Biotin-regulierter Proteine durch 2D-Gelelektrophorese wurden zur Identifikation von weiteren Genen, deren Expression durch Biotin beeinflusst wird, in diesem Teil der Arbeit Promotoraktivitäten ausgewählter Gene in An- oder Abwesenheit von Biotin untersucht. Dabei wurden 8 Gene anhand der vorliegenden Genomsequenz ausgesucht. Entscheidend bei der Auswahl war die Beteiligung dieser Gene in verschiedenen Bereichen des Stoffwechsels und der Regulation, nämlich bei der Phospholipidsynthese, der Nodulation und Autoinduktion. Die Sequenzen der Gene wurden aus den *S. meliloti* Datenbanken erhalten (<http://sequence.toulouse.inra.fr>) und die Transkriptionsrichtung ermittelt. Die stromaufwärts liegenden Bereiche der verschiedenen *ORFs* mit den putativen Promotorregionen wurden durch PCR unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Dabei enthielten die Fragmente auch den 5'-Bereich des zu untersuchenden Gens und den 3'-Bereich des unmittelbar stromaufwärts gelegenen Gens. Die Primer wurden so gewählt, daß an das 5'-Ende der putativen Promotorregion eine *PstI*-Schnittstelle und an das 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle eingefügt wurde. Diese *XbaI-PstI*-Fragmente wurden in den ebenso geschnittenen Vektor pBK3 inseriert, so daß die putativen verschiedenen Promotorregionen unmittelbar stromaufwärts einer *gusA*-Reportergenkassette lokalisiert waren (Abb. 13). Bei den hergestellten Reportergenfusionen handelte es sich um Transkriptionsfusionen, da das *gusA*-Gen eine eigene ribosomale Bindestelle besitzt. Nach Mobilisation der Konstrukte nach *S. meliloti* durch den Donorstamm *E. coli* S17-1 wurden die relativen *gusA*-Aktivitäten nach Anzucht unter Biotin-limitierenden Bedingungen und Biotinsupplementation (40 nM) bestimmt (siehe 2.19). Dabei wurden jeweils 3 Parallelkulturen in den verschiedenen Medien angezogen und während verschiedener Wachstumsphasen gemessen. Als Vorkultur diente eine bereits unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogene Kultur.

In der Tabelle 9 sind alle getesteten putativen Promotorregionen zusammengefaßt. Um auszuschließen, daß der leere pBK3 Vektor bereits eine von der Biotinkonzentration im Medium abhängige Grundaktivität besitzt, wurde das Plasmid ohne inserierte Promotorregion nach *S. meliloti* mobilisiert und die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivitäten zur Kontrolle bestimmt. Die Mittelwerte dieser Messungen lagen mit 398 rel.  $\beta$ -Glucuronidaseeinheiten für die Biotin-supplementierten Kulturen im selben Bereich wie die der Biotin-limitierten Kulturen (387 rel.  $\beta$ -Glucuronidaseeinheiten).

**Tab. 9 Übersicht über die untersuchten putativen Promotorregionen**

Promotorregion (Gen/ <i>ORF</i> )	Funktion	Fragmentgröße (bp)
<i>nodD1</i>	übergeordneter Transkriptionsregulator Nodulation	324
<i>nodD3</i> -kurz/ <i>nodD3</i> -lang	übergeordneter Transkriptionsregulator Nodulation	867/1190
<i>sinI</i>	Autoinduktor-Synthase	267
<i>sinR</i>	HSL-abhängiger Transkriptionsregulator	401
<i>plsX</i>	Phospholipid Biosynthese	273
<i>bioM</i> [SMc00962]	putativer ABC-Transporter <i>bioM</i> aus dem <i>bioMNB</i> -Operon	333
SMc04882	putativer Transkriptionsregulator	176
<i>copC</i> [SMc02283]	Kupfer bindendes Protein/ Kupfer- Resistenz	253



**Abb. 13** Darstellung der generellen Klonierungsstrategie zur Konstruktion von Promotorfusionen der in Tabelle 9 aufgeführten Gene im Replikon pBK3. Die putativen Promotorregionen wurden als *XbaI-PstI*-Fragmente nach PCR-Amplifikation in 5'-Richtung des *gusA*-Reportergens des Vektors pBK3 kloniert. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

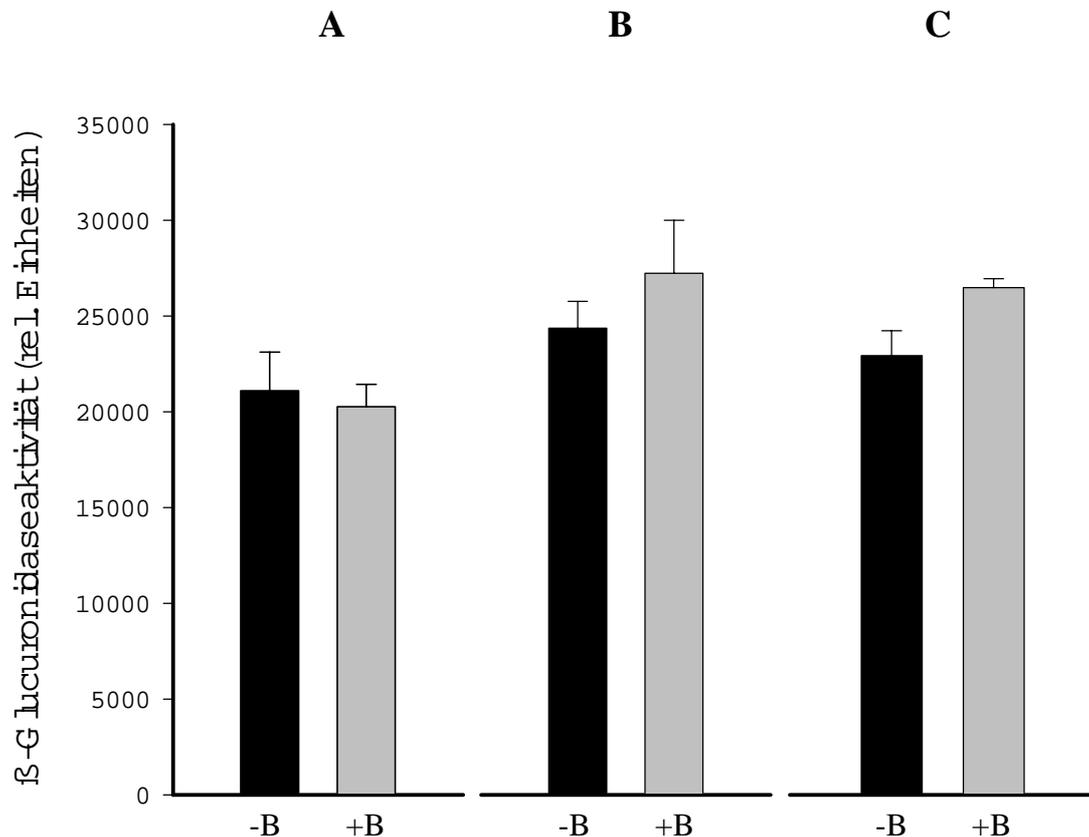
### 3.2.1 Aktivitätsmessungen der *nodD1*- und *nodD3*-Promotorregionen

Rhizobielle *nod*-Genprodukte sind an der Bildung des Nod-Faktors (Nodulationsfaktor) beteiligt, der die frühe Antwort der Wirtspflanze während der Etablierung der Symbiose induziert. Die Expression der *nod*-Gene ist nicht nur von Flavonoiden und anderen von der Wirtspflanze sekretierten Komponenten abhängig, sondern wird auch durch NodD induziert, einem Regulatorprotein aus der Familie der LysR-Typ-Transkriptionsaktivatoren. In *S. meliloti* 1021 gibt es drei NodD Proteine, NodD1, NodD2 und NodD3. Während NodD1 und NodD2 die Expression der Nodulationsgene in Anwesenheit eines pflanzlichen Induktors aktivieren, erfolgt die Expression der *nod*-Gene durch NodD3 unabhängig davon. Auch Biotin ist eine der Verbindungen, welche die Pflanze über die Wurzel in den Boden abgibt und die Wachstum von *S. meliloti* in der Rhizosphäre fördert. Daher sollte analysiert werden, ob das Vorhandensein von Biotin möglicherweise einen Einfluß auf die Expression der Regulatorproteine NodD1 und NodD3 ausübt und somit auch an der frühen Entwicklung der Symbiose beteiligt ist. Es wurde untersucht, ob die Expression der Transkriptionsregulatoren auch unter Biotinlimitierung möglich ist.

Für die Analyse des *nodD1*-Promotors wurde ein 324 bp umfassendes stromaufwärts gelegenes und den 5'-Bereich des *nodD1*-Gens überlappendes Fragment amplifiziert und in den Vektor pBK3 kloniert (siehe Primer Tab. 3). Das resultierende Plasmid wurde als pPR-*nodD1* bezeichnet. Da bereits bekannt war, daß das *nodD3*-Gen zwei Transkriptionsstartpunkte besitzt, wurden zwei verschieden lange Fragmente amplifiziert und kloniert. In pPR-*nodD3*-kurz war ein 867 bp Fragment mit dem ersten Transkriptionsstartpunkt inseriert worden, und in pPR-*nodD3*-lang ein 1189 bp großes Fragment mit beiden Transkriptionsstartpunkten (siehe Primer Tab. 3). Zusätzlich zur Bestimmung der rel.  $\beta$ -Glucuronidaseeinheiten in Abhängigkeit von Biotin im Medium wurden auch Messungen durchgeführt, bei denen der pflanzliche Induktor Luteolin (Endkonzentration 3,5 nM) zu den Kulturen gegeben wurde.

Abb. 14 zeigt die Meßwerte für pPR-*nodD1*. Unter den getesteten Bedingungen war der Promotor immer auf relativ hohem Niveau angeschaltet. Gegenüber der logarithmischen Wachstumsphase waren die Werte, die in der stationären Wachstumsphase gemessen wurden, leicht erhöht. Unter Biotin-limitierenden Bedingungen (schwarze Balken) oder Biotinsuffizienz (graue Balken) waren die *gusA*-Aktivitäten in keiner Wachstumsphase signifikant verschieden. Nach Messungen der *gusA*-Aktivität in der Stationärphase wurde Luteolin zu den Kulturen hinzugefügt, für weitere 45 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und erneut gemessen. Eine signifikante Zu- oder Abnahme konnte hier nicht

gemessen werden (Abb. 14). Auch Zugabe von Luteolin beim Animpfen der Zellen oder zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase hatte keinen Effekt auf die Aktivität (nicht gezeigt).

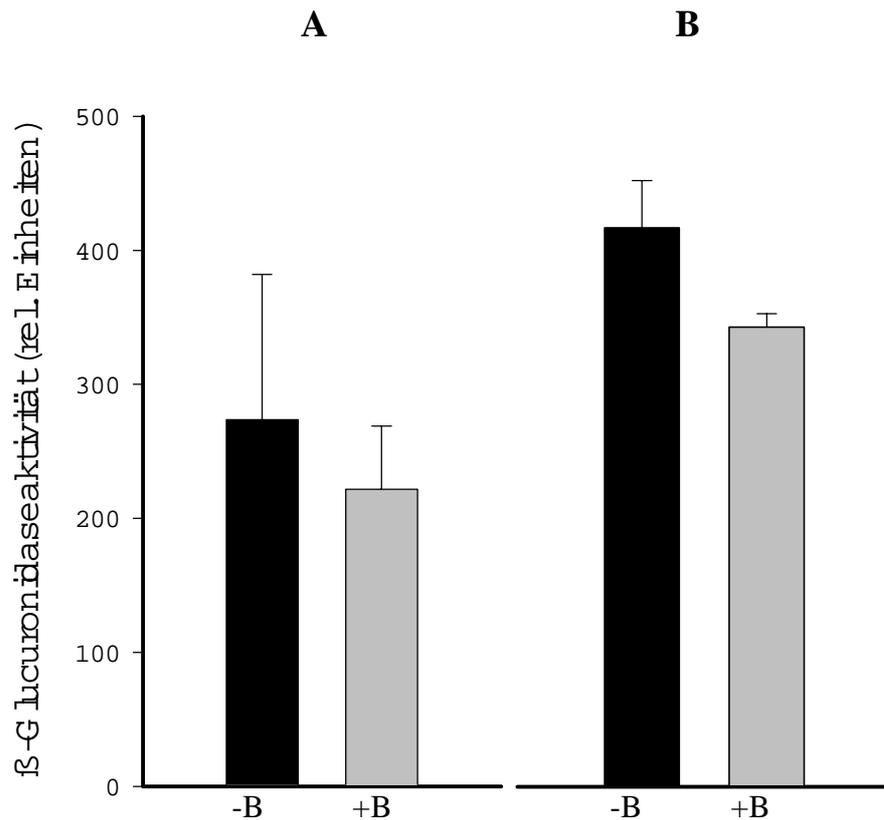


**Abb. 14** Darstellung der relativen  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*nodD1* Konstruktes in *S. meliloti* 1021

Unter **A** sind die Meßwerte der logarithmischen Wachstumsphase und unter **B** der stationären Wachstumsphase dargestellt. **C** zeigt die Ergebnisse der Messungen, die nach 45 minütiger Inkubation von Stationärphasezellen nach Luteolinzugabe angefertigt wurden. Alle Werte stellen Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen dar. -B: Kulturen wurden unter Biotinlimitierung angezogen; +B: Kulturmedium enthielt Biotin in einer Endkonzentration von 40 nM.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des *nodD3*-Promotors sind in Abb. 15 dargestellt. Die durchschnittlichen Aktivitäten in der stationären Wachstumsphase lagen bei pPR-*nodD3*-lang sowohl unter Biotin-limitierenden Bedingungen (417 zu 274) als auch bei Biotinsuffizienz (363 zu 222) leicht über denen des kurzen Promotorabschnittes. Unter

Berücksichtigung der Hintergrundaktivität des leeren pBK3 Vektors von 387 (-Biotin) und 389 (+Biotin) ist jedoch davon auszugehen, daß beide Konstrukte unter den getesteten Bedingungen, wie auch in der logarithmischen Wachstumsphase nicht oder nur schwach induziert waren. Zugabe von Luteolin zu Kulturen, die sich in unterschiedlichen Wachstumsphasen befanden, bewirkte keine signifikante Änderung der Expression (nicht gezeigt).



**Abb. 15 Darstellung der relativen β-Glucuronidaseaktivität der pPR-*nodD3*-kurz (A) und pPR-*nodD3*-lang (B) Konstrukte in *S. meliloti* 1021**

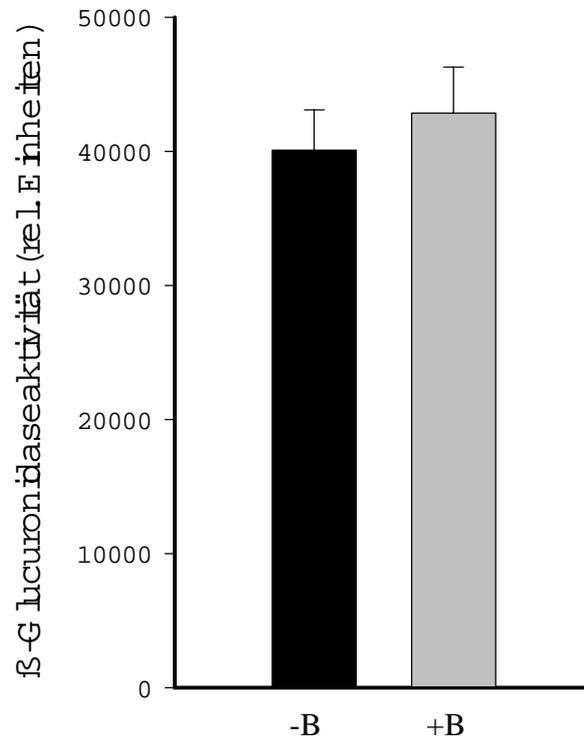
Die Messungen wurden in der stationären Wachstumsphase durchgeführt. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen dar. -B: Kulturen wurden unter Biotinlimitierung angezogen; +B: Kulturmedium enthielt Biotin in einer Endkonzentration von 40 nM.

### 3.2.2 Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion von *ORF* SMc04882, eines möglichen LysR-Typ-Transkriptionsregulators

In früheren Arbeiten wurde in *S. meliloti* das *bioS*-Gen identifiziert, dessen Expression in der stationären Wachstumsphase durch Biotin induziert wird (Streit und Phillips, 1997).

Biotinbindestudien zeigten, daß das heterolog in *E. coli* überexprimierte BioS-Protein nicht direkt Biotin bindet. Auf der Suche nach einem übergeordneten Regulator des *bioS*-Gens wurde eine Transposonmutagenese in der *bioS*-Mutante Rm1021-B5 durchgeführt und auf die veränderte Expression des *bioS*-Gens selektioniert. Bei einer der Transposonmutanten war das Transposon in den *ORF* SMc04882 gesprungen und das *bioS*-Gen wurde unter allen getesteten Bedingungen exprimiert, unabhängig vom Biotingehalt des Mediums. Zur Charakterisierung des Gens SMc04882, das Ähnlichkeit zu einem Transkriptionsregulator zeigt, wurde die putative Promotorregion vor die *gusA*-Reportergen-kassette des Vektors pBK3 kloniert (Primer siehe Tab. 3). Die Größe des inserierten Fragmentes betrug 176 bp. Die *gusA*-Aktivität wurde in Abhängigkeit der Biotinkonzentration im Medium gemessen, um zu untersuchen, ob die Expression des putativen Regulators durch Biotin induziert oder reprimiert werden kann.

Wie Abb. 16 zeigt, wird die Expression nicht durch das Vorhandensein von Biotin im Medium beeinflusst, weder wie hier dargestellt in der stationären Wachstumsphase noch in anderen Phasen des Wachstums (nicht gezeigt). Die Expression des putativen Transkriptionsregulators erfolgte unter den getesteten Bedingungen konstitutiv.



**Abb. 16 Darstellung der relativen Glucuronidaseaktivität des pPR-tr4882-Konstruktes in *S. meliloti* 1021**

Sowohl unter Biotin-limitierenden Bedingungen (-B; schwarzer Balken) als auch unter Biotinsuffizienz (+B; grauer Balken) wurden sehr hohe rel. *gusA*-Werte gemessen, die nicht signifikant verschieden waren. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen dar.

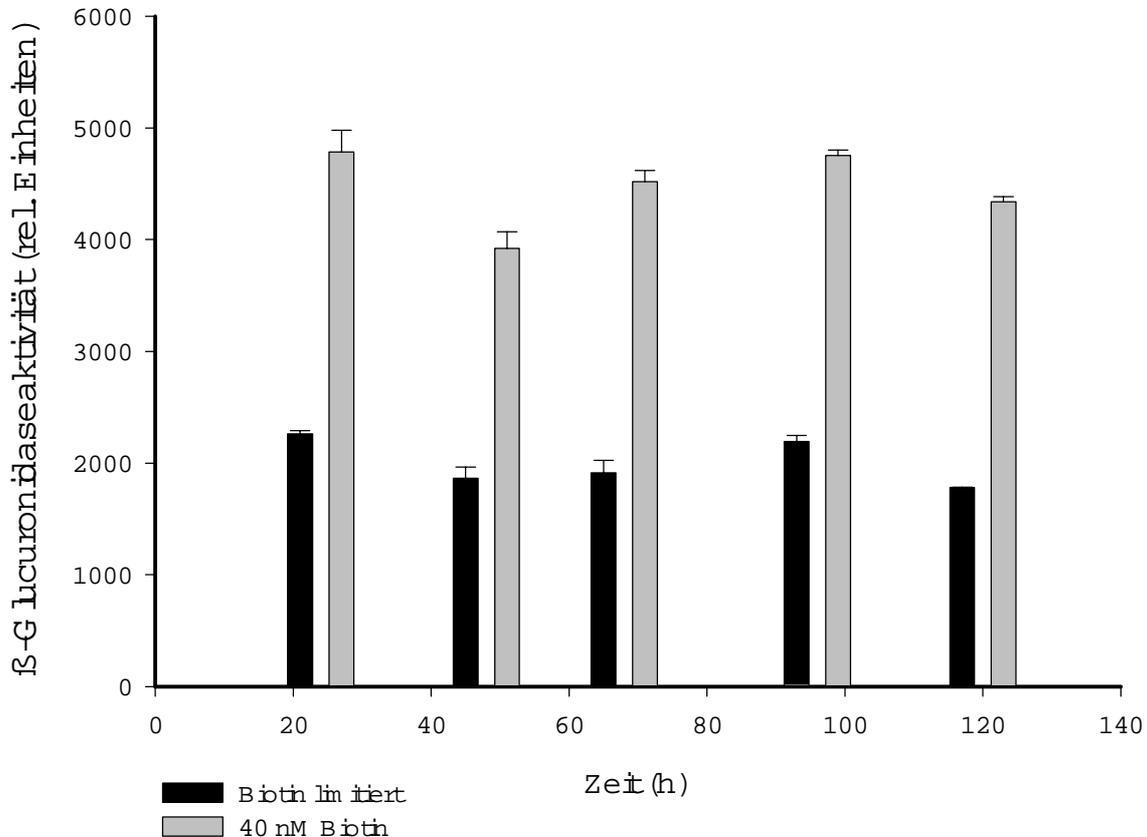
### 3.2.3 Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion des *bioM*-Operons

Mit Hilfe von Transposonmutagenese war in früheren Arbeiten eine *S. meliloti*-Mutante isoliert worden, die phänotypisch durch stark eingeschränktes Wachstum im nicht Biotin-supplementierten Minimalmedium gekennzeichnet war. Dagegen war bei Anzucht im Biotin-haltigen Minimalmedium kein Unterschied im Wachstumsverhalten zum Wildtyp festzustellen. Bei dieser Mutante (Rm1021-*bioM*) war das Transposon Tn5B30 in einen *ORF* inseriert, der als *bioM* bezeichnet wurde. Sequenzanalysen ergaben, daß BioM Ähnlichkeiten zu ATP-bindenden Proteinen zeigt, die zu der Familie der ABC-Transporter gehören und am Transport von Kobalt beteiligt sind. Neuere Arbeiten zeigten, daß *bioM*-Mutanten zwar  $^{14}\text{C}$ -Biotin im gleichen Maße in die Zelle aufnehmen wie der Wildtyp, jedoch das Biotin schlechter in der Zelle halten können (Entcheva et al., 2002).

Stromabwärts des *bioM*-Gens liegt ein weiteres ABC-Transporter-Protein [SMc00963] unmittelbar gefolgt von einem *ORF* [SMc00964], der Ähnlichkeiten zu dem *bioB*-Biotin-Biosynthesegen aus *Agrobacterium tumefaciens* zeigt. Das BioB-Protein katalysiert bei Gram-negativen Bakterien den letzten Schritt der Biotinsynthese vom Dethiobiotin zum Biotin. In 3'-Richtung von *bioB* liegt ein Gen, welches möglicherweise für eine Acetyl-CoA-Acetyltransferase codiert.

Zur weiteren Charakterisierung des *bioM*-Gens wurde die putative Promotorregion in 5'-Richtung der *gusA*-Reportergen-kassette des Vektors pBK3 kloniert, um so die Abhängigkeit der Expression von Biotin im Anzuchtmedium zu messen. Das klonierte Fragment war 333 bp lang (Primer siehe Tab. 3).

In Abb. 17 sind die relativen  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivitäten dreier Parallelkulturen des pPR-*bioM* Konstruktes unter den beiden Bedingungen dargestellt. Die Messungen wurden in verschiedenen Wachstumsphasen durchgeführt und der Zeitpunkt des Überimpfen aus einer nicht Biotin-supplementierten Vorkultur als 0 gesetzt. In Anwesenheit von 40 nM Biotin im Medium wurde eine 2,1-fach (nach 48 h) bis 2,4-fach (nach 120 h) höhere Aktivität gemessen, als unter Biotin-limitierenden Bedingungen. Daher ist davon auszugehen, daß die Expression des *bioM*-Gens in Anwesenheit von Biotin im Medium leicht induziert wurde.



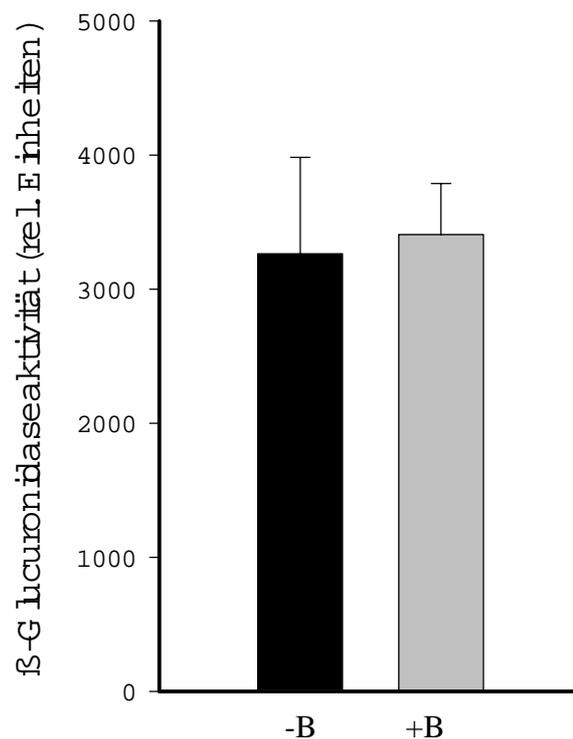
**Abb. 17 Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*bioM*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021**

Gemessen wurde nach Anzucht unter Biotin-limitierenden Bedingungen (schwarzer Balken) und Biotinsuffizienz (grauer Balken). Wachstum in Anwesenheit von 40 nM Biotin führte zu einer 2,1-2,4-fach erhöhten Expression der Promotorfusion.

### 3.2.4 Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion des *plsX*-Gens

Das *plsX*-Gen codiert für ein Protein, welches eine Rolle in der Phospholipid-Biosynthese spielt. Welche genaue Funktion es dabei übernimmt und wie es reguliert wird, ist bisher unbekannt (Kutchma et al., 1999). Während das *plsX*-Gen bei *E. coli* das erste Gen des *fab*-Clusters (*fatty acid biosynthesis*) ist, das für mehrere Schlüsselenzyme der Fettsäuresynthese codiert (Zhang und Cronan, 1998), liegt es bei *S. meliloti* anders angeordnet vor. Hier ist es unmittelbar stromaufwärts des *fabH*-Gens lokalisiert, das für eine  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl-Carrier Protein Synthase codiert. Interessanterweise hat dieses Protein Ähnlichkeiten zu dem Protein BioZ aus *Mesorhizobium* sp. R7A, welches an der Synthese des Biotin-Vorläufers Pimeoyl-CoA beteiligt ist. Unter diesen Voraussetzungen

schien es möglich, daß Biotin eine regulatorische Funktion auf die Expression des *plsX*-Gens ausübt. Deshalb wurde die putative Promotorregion als 273 bp langes Fragment vor das *gusA*-Reporter-gen des Vektors pBK3 kloniert und die Expression des resultierenden Konstruktes pPR-*plsX* in *S. meliloti* gemessen. Die rel.  $\beta$ -Glucuronidaseeinheiten, die nach Inkubation der Kulturen im Biotin-limitierten und im Biotin-haltigen Medium in der logarithmischen Wachstumsphase gemessen wurden, sind in Abb. 18 dargestellt. Biotin hatte unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluß auf die Expression der putativen *plsX*-Promotorregion. Auch Messungen, die in der frühen stationären Wachstumsphase durchgeführt wurden, zeigten keine veränderte *gusA*-Aktivitäten im Vergleich zu denen der logarithmischen Wachstumsphase. Die Expression erfolgte unter den getesteten Bedingungen konstitutiv.



**Abb. 18** Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*plsX*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021

Dargestellt sind die *gusA*-Aktivitäten, die in der logarithmischen Wachstumsphase nach Anzucht im Biotin-limitierten Medium (-B) und Biotin-supplementierten Medium (+B) gemessen wurden. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen dar.

### 3.2.5 Promotoraktivitätsmessungen einer Autoinduktor Synthase und eines Acyl-Homoserin-Lacton-abhängigen Transkriptionsregulators

Viele Bakterien können mit Hilfe kleiner Signalmoleküle kommunizieren und ihre Aktivität auf diese Weise koordinieren. Gram-negative Bakterien setzen verschiedene Signalstoffe ein. Gut untersucht sind die Systeme, in denen Acyl-Homoserin-Lactone (Acyl-HSL) synthetisiert werden. Diese als Autoinduktoren bezeichneten Signalmoleküle werden durch die Aktivität eines Enzyms katalysiert, welches als Substrate S-Adenosyl-methionin und Intermediate der Fettsäure-Biosynthese verwendet und zur Familie der LuxI-Acyl-HSL Synthasen gehört. Die Acyl-HSL der unterschiedlichen Bakterien variieren in der Länge und Substitution der Acyl-Seitenkette. In der Regel diffundiert der Autoinduktor ins Medium, akkumuliert während des Wachstums und kann nach Überschreiten eines Schwellenwertes an einen spezifischen Rezeptor binden, der zur Familie der LuxR-Transkriptionsregulatoren gehört. Durch die Bindung des Acyl-HSL wird dieser Regulator aktiviert, welches die Repression oder Induktion verschiedener Zielgene zur Folge hat.

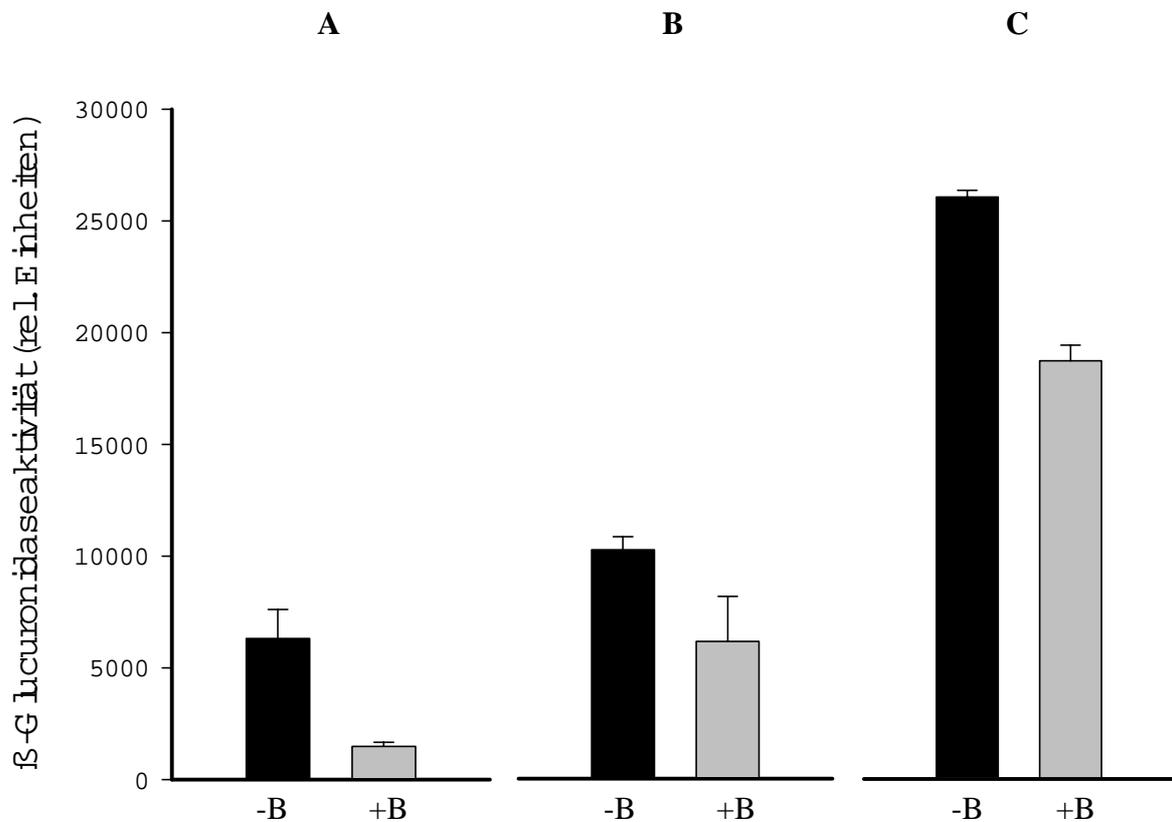
Allgemein tritt diese Art der Acyl-HSL-abhängigen Zellkommunikation bei solchen Gram-negativen Bakterien auf, die in Assoziation mit höheren Organismen wie Pflanzen oder dem menschlichen Organismus stehen. Dabei können die Mikroorganismen pathogen sein oder symbiontisch mit dem Wirtsorganismus leben.

Während bereits seit längerem bekannt ist, daß *S. meliloti* L5-30, *S. meliloti* 1021 und *S. meliloti* YA2 ein Acyl-HSL-Molekül produzieren (Shaw, 1997; Gray et al., 1997; Cha et al., 1998), zeigten neuere Arbeiten, daß bis zu sieben verschiedene Autoinduktoren durch *S. meliloti* 1021 synthetisiert werden (Marketon und Gonzales, 2002). Die durch die Acyl-HSL regulierten Zielgene und damit die Funktion dieser Moleküle ist bisher noch nicht aufgeklärt. In *S. meliloti* 1021 wurden die Gene, welche für die Autoinduktor-Synthase und den HSL-abhängigen Transkriptionsregulator codieren, als *sinI* und *sinR* bezeichnet.

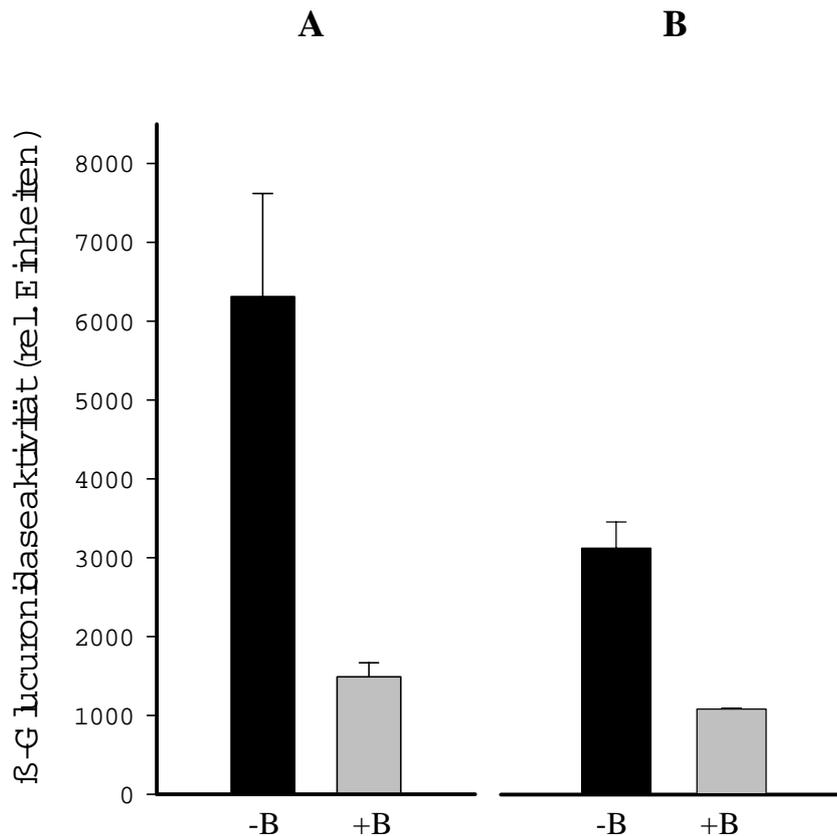
In der Regel ist die Autoinduktion ein Phänomen, welches in Abhängigkeit von zunehmender Populationsdichte steht. In *E. coli* wurde jedoch beobachtet, daß Homoserinlactone auch unter Nährstoffmangel unabhängig von einer hohen optischen Dichte im Medium gebildet werden und möglicherweise als intrazelluläre Signale von Bedeutung sind. Bei *Vibrio harveyi* kontrolliert das LuxR Regulator Protein die Synthese des Speicherstoffes Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrat (PHB) (Miyamoto et al., 1998). Durch Versuche in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß *S. meliloti* bei Anzucht unter Biotinmangel im Medium große Mengen des Reservepolysaccharids PHB bildet. Da

Biotinmangel auch limitierend auf rhizobielles Wachstum wirkt und zur Bildung von PHB führt, schien es interessant, den Einfluß von Biotinmangel auf die Expression der Autoinduktor Synthase und des Transkriptionsregulators in *S. meliloti* zu untersuchen. Diese mögliche Beteiligung sollte mit Hilfe von Promotoraktivitätsmessungen analysiert werden. Daher wurden die beiden putativen Promotorregionen des *sinI*- und *sinR*-Gens in den pBK3 Vektor stromaufwärts des  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens kloniert, wobei das *sinI*-Promotorfragment 267 bp und das *sinR*-Promotorfragment 401 bp groß war (Primer siehe Tab. 3). Die beiden Konstrukte wurden als pPR-*sinI* und pPR-*sinR* bezeichnet und nach *S. meliloti* mobilisiert. Nach Anzucht unter Biotin-limitierenden Bedingungen und unter Biotinsuffizienz in Minimalmedium wurden die relativen  $\beta$ -Glucuronidaseaktivitäten bestimmt. Als Kohlenstoffquelle enthielt das Anzuchtmedium entweder Succinat (9,6 mM) und Glucose (10,1 mM) oder nur Succinat in verschiedenen Konzentrationen.

In Abb. 19 sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der relativen *gusA*-Aktivitäten dreier Parallelkulturen dargestellt, die nach Anzucht von *S. meliloti* 1021-pPR-*sinI* unter Biotin-limitierenden Bedingungen und Biotinsuffizienz in Minimalmedium mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle in verschiedenen Wachstumsphasen gemessen wurden. Es konnte gezeigt werden, daß unter Biotin-limitierenden Bedingungen die rel. *gusA*-Aktivität während der verschiedenen Messpunkte höher war als unter Biotinsuffizienz; dabei war dieser Effekt in der frühen Wachstumsphase am deutlichsten. 48 h nach Anzucht aus einer unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogenen Vorkultur war die Expression des Reportergens in den Biotin-limitierten Kulturen um das 4,3-fache höher als in den entsprechenden Kulturen, die 40 nM Biotin enthielten, nach 72 h 1,7-fach und nach 120 h 1,4-fach höher. Generell nahm mit zunehmender Inkubationsdauer die Expression der Gene zu. Ebenso ließ sich bei Anwesenheit von Glucose und Succinat im Medium beobachten, daß Biotinlimitierung zu einer erhöhten Promotoraktivität führte, jedoch war dieser Effekt nicht so gravierend wie im Medium, das nur Succinat als C-Quelle enthielt (Abb. 20). Nach 48 h Wachstum war die rel. *gusA*-Aktivität, die in den Biotin-limitierten Kulturen gemessen wurde, um den Faktor 2,9 höher gegenüber den Werten, die für die Biotin-supplementierten Kulturen bestimmt wurden. Insgesamt waren die rel. *gusA*-Aktivitäten im Minimalmedium, welches beide C-Quellen enthielt, geringer als in Medium welches nur Succinat enthielt.



**Abb. 19** Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*sinI*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021 nach Anzucht in Minimalmedium mit Succinat als C-Quelle  
Biotinlimitierung (-B) führte bis zu einer 4,3-fach erhöhten  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität im Vergleich zu Kulturen, die unter Biotinsuffizienz (+B) angezogen worden waren. Dargestellt sind die Mittelwerte inklusive ihrer Standardabweichungen der Meßwerte aus jeweils drei Parallelkulturen nach (A) 48 h, (B) 72 h und (C) 120 h Anzucht in Minimalmedium mit Succinat als einziger Kohlenstoff-Quelle.

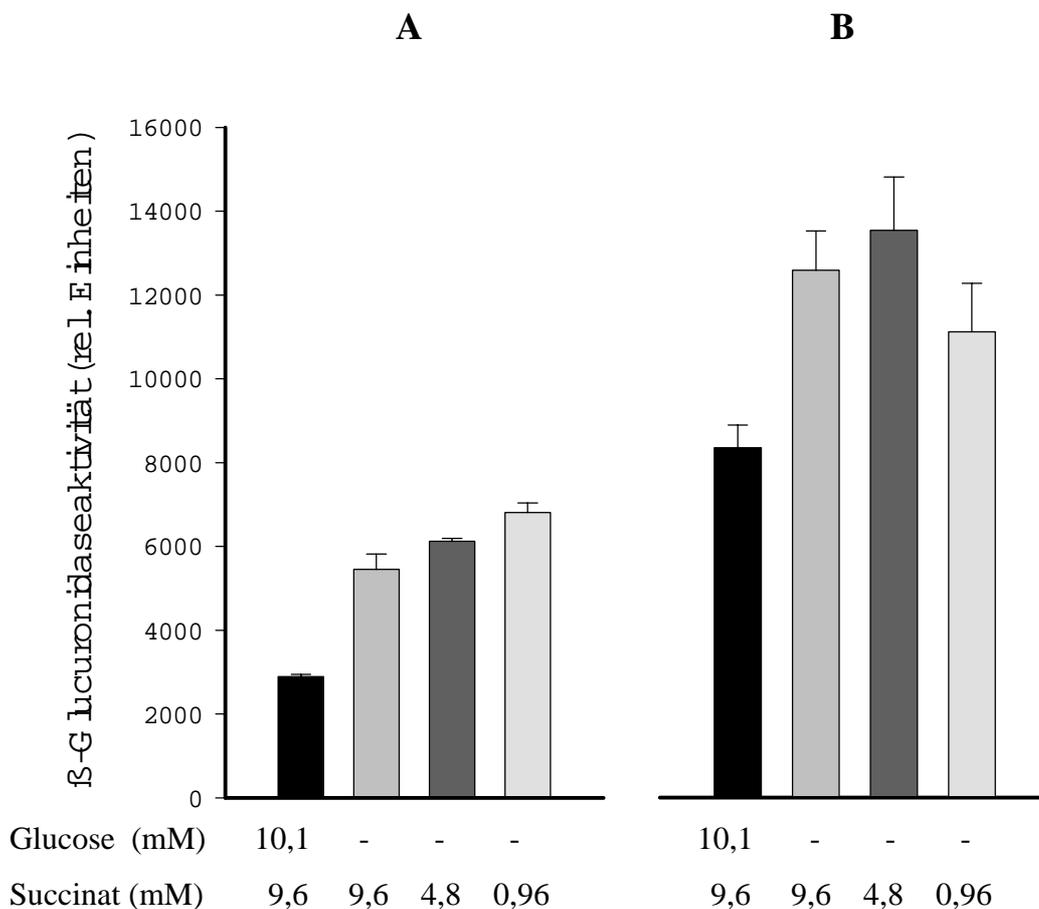


**Abb. 20** Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*sinI*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021 nach Anzucht in Minimalmedium mit (A) Succinat als C-Quelle und (B) Succinat und Glucose als C-Quellen

Anzucht von *S. meliloti* unter Biotin-limitierenden Bedingungen (-B) führte in beiden Medien zu einer erhöhten  $\beta$ -Glucuronidasaktivität im Vergleich zu Kulturen, die unter Biotinsuffizienz (+B) angezogen wurden. Unter Biotinlimitierung mit Succinat als einziger C-Quelle (A) konnte eine 4,3-erhöhte Aktivität und mit Succinat und Glucose als C-Quellen (B) eine 2,9-fach erhöhte Aktivität gegenüber den entsprechenden Biotin-supplementierten Kulturen gemessen werden. Die Werte stellen Daten aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen nach 48 h Wachstum dar.

Um den Einfluß der Konzentration der C-Quelle im Medium auf die Aktivität des Promotors des *sinI*-Gens weiter zu charakterisieren, wurden Messungen unter Biotin-limitierenden Bedingungen nach 48 und 72 h Wachstumszeit in GTS-Medium mit Glucose (10,1 mM) und Succinat (9,6 mM) (Abb. 21, schwarze Balken) und in GTS-Medium mit verschiedenen Succinatkonzentrationen (9,6 mM; 4,8 mM; 0,96 mM) durchgeführt (Abb 21). Dabei zeigte sich, daß mit abnehmender Succinatkonzentration im Medium in der Regel die Aktivität des *sinI*-Promotors anstieg. Lediglich nach 72 h Wachstumszeit waren nach Anzucht in GTS-Medium mit nur 0,96 mM Succinat verringerte *gusA*-Aktivitäten im

Vergleich zu den zwei anderen nur Succinat-haltigen Medien meßbar (durchschnittlich 11200 rel. *gusA*-Einheiten), was möglicherweise an dem wiederholten sehr schlechten Wachstum dieser Kulturen lag. Die durchschnittliche OD<sub>600</sub> dreier Parallelkulturen betrug 0,21 in Anwesenheit von 0,96 mM Succinat, während die Durchschnittswerte der unter den anderen Bedingungen angewachsenen Kulturen höher waren (10,1 mM Glucose/ 9,6 mM Succinat: OD<sub>600</sub> =0,44; 9,6 mM Succinat: OD<sub>600</sub> =0,43; 4,8 mM Succinat: OD<sub>600</sub> =0,41). Nach 48 h Wachstumszeit dagegen waren noch keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen optischen Dichten der verschiedenen Kulturen beobachtbar.

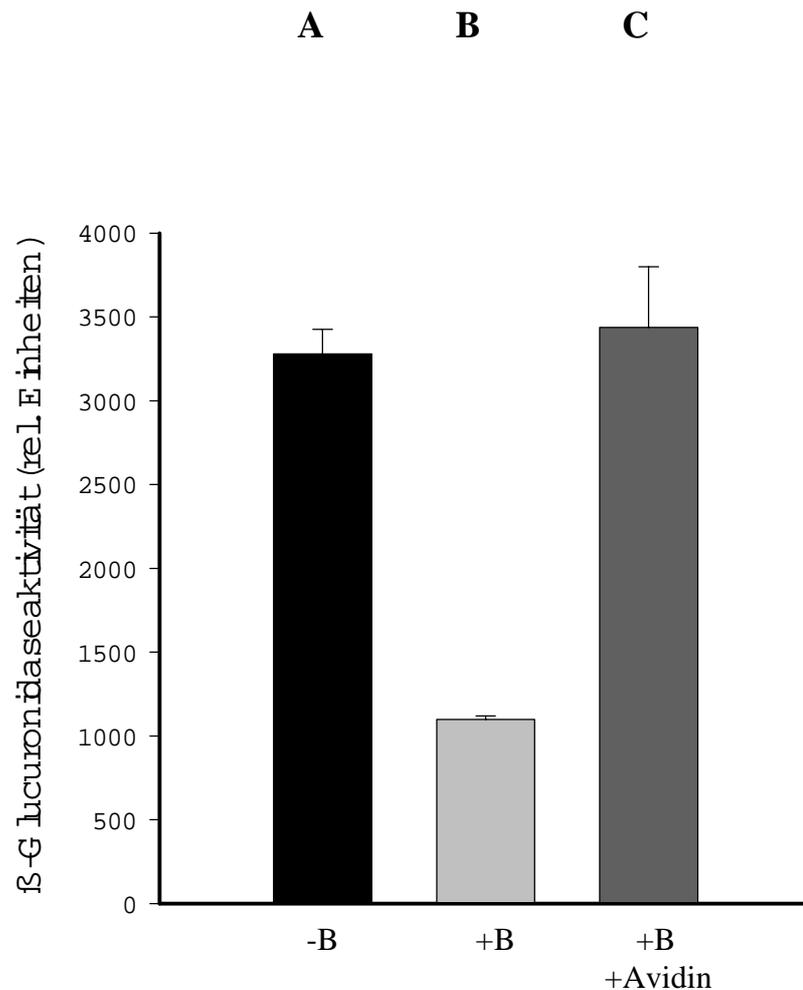


**Abb. 21** Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*sinI*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021 nach Anzucht in Minimalmedium mit unterschiedlichen C-Quellen unter Biotin-limitierenden Bedingungen nach (A) 48 h und (B) 72 h

Je geringer der C-Quellen-Anteil des Mediums war, desto höhere *gusA*-Aktivitäten wurden bestimmt (Ausnahme siehe Text). Die Daten stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus je drei Parallelkulturen dar. Der Gehalt der jeweiligen C-Quelle im Medium wurde unterhalb der Balken aufgeführt; (-) =keine Glucose im Medium.

In einem weiteren Ansatz wurde der Effekt von Avidin, welches spezifisch an Biotin bindet, im Anzuchtmedium untersucht. Dazu wurde eine 48 h alte Vorkultur von *S. meliloti*-pPR-*sinI* abzentrifugiert, dreimal mit GTS-Medium ohne supplementiertes Biotin gewaschen und resuspendiert. Mit diesen resuspendierten Zellen wurden je drei Parallelkulturen GTS-Minimalmedium ohne Biotin (Abb. 22 A), mit 40 nM Biotin (B) und mit 40 nM Biotin und Avidin (C) ( $0,61 \text{ Units/ml}^{-1}$ ) angeimpft, welche Glucose und Succinat als C-Quellen enthielten. Die Aktivitäten des *sinI*-Promotors in den Biotin-limitierten Kulturen waren mit durchschnittlich 3280 rel. Einheiten vergleichbar mit denen der Biotin und Avidin supplementierten Kulturen (3438 rel. Einheiten). Durch das zugegebene Avidin wurde das Biotin im Medium gebunden und stand den Zellen nicht mehr zur Verfügung, so daß Biotin auch in diesem Medium limitierend war. In den Biotin-supplementierten Kulturen waren die Aktivitäten erwartungsgemäß mit durchschnittlich 1099 rel. Einheiten um den Faktor 3 bzw. 3,1 geringer.

Diese Untersuchungen mit der *sinI*-Promotorfusion zeigten, daß Wachstum unter Biotin-limitierenden Bedingungen im Vergleich zu Wachstum unter Biotinsuffizienz bis zu einer 4,3-fach erhöhten Expression der Autoinduktor-Synthase in *S. meliloti* führten. Ebenso ließ die zunehmende Limitierung von C-Quellen im Medium die Promotoraktivität ansteigen.

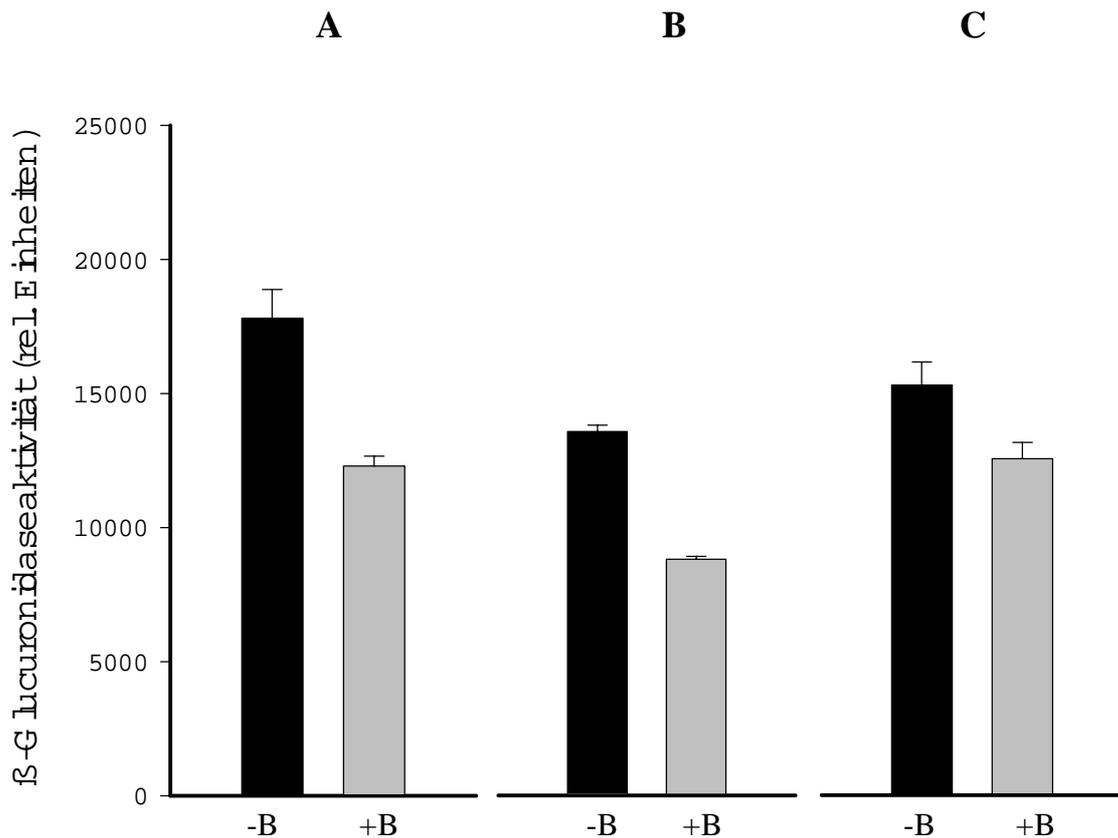


**Abb. 22 Relative  $\beta$ -Glucuronidaseeinheiten des pPR-*sinI*-Konstruktes in *S. meliloti* in Gegenwart von Avidin im Medium**

Wachstum im Biotin-haltigen Medium (**B**) (40 nM) führte zu einer verminderten Aktivität des *sinI*-Promotors im Vergleich zu Wachstum in Biotin-supplementierten Kulturen (**A**). Bei Zugabe von spezifisch an Biotin-bindendes Avidin zum Anzuchtmedium (0,61 Units/ml<sup>-1</sup>), entsprachen die relativen *gusA*-Werte denen der Biotin-limitierten Kulturen (**C**). Die Abbildung zeigt Daten dreier Parallelkulturen je Anzuchtmedium mit den entsprechenden Standardabweichungen.

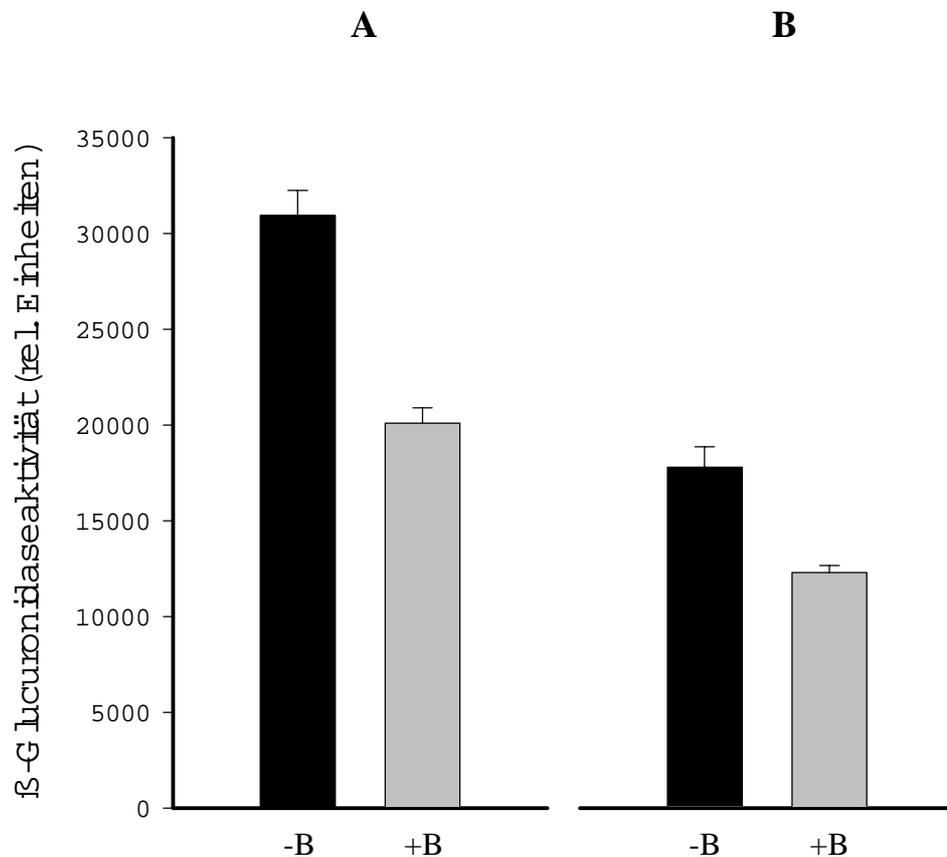
Die relativen  $\beta$ -Glucuronidaseaktivitäten des pPR-*sinR*-Konstruktes in *S. meliloti* sind in Abb. 23 und 24 dargestellt. Insgesamt waren die gemessenen Werte höher als bei dem *sinI*-Promotorkonstrukt, jedoch war die Expression weniger abhängig von der Biotinkonzentration im Medium. Nach 48 h Inkubation waren die Werte der Kulturen, die unter Biotinlimitierung angezogen worden waren, um den Faktor 1,4 erhöht gegenüber denen der Biotin-supplementierten Kulturen, nach 54 h um den Faktor 1,5 und nach 72 h um den Faktor 1,2. Dabei waren die Bakterien in Minimalmedium angezogen worden, das Succinat und Glucose als Kohlenstoffquelle enthielt. Wie in Abb. 24 dargestellt, wurde

sowohl in Biotin-limitierten als auch in Biotin-supplementierten Kulturen die Aktivität durch Inkubation von *S. meliloti* pPR-*sinR* in GTS-Minimalmedium mit Succinat als einziger C-Quelle (9,6 mM) erhöht. Unter Biotinlimitierung waren die Werte nach 48 h Wachstum in Minimalmedium mit Succinat als C-Quelle 1,5-fach höher als unter Biotinsuffizienz.



**Abb. 23** Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*sinR*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021

In Biotin-limitierten Kulturen (-B) konnte im Vergleich zu den Biotin-supplementierten Kulturen (+B). Zu allen drei Zeitpunkten (A) 48 h, (B) 54 h und (C) 72 h der Messung eine erhöhte *gusA*-Aktivität beobachtet werden. Die Werte stellen Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen dar.



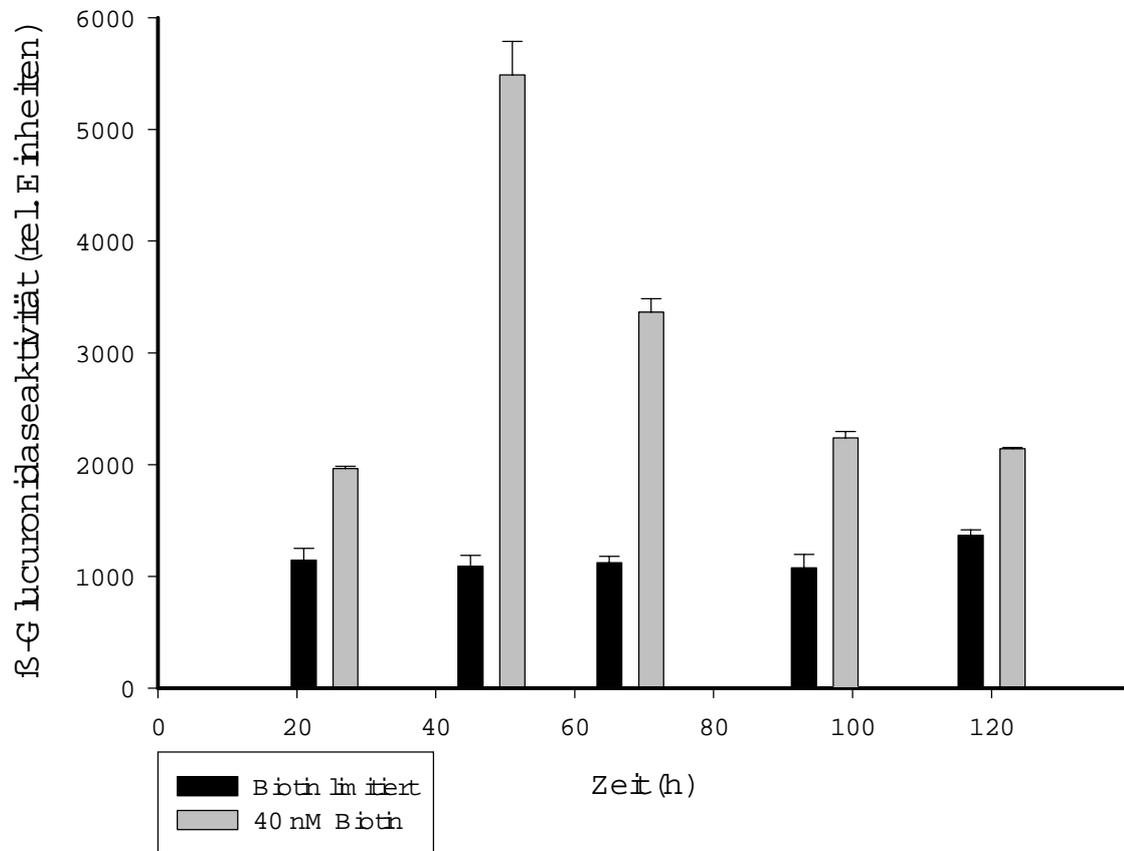
**Abb. 24** Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*sinR*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021 nach Anzucht in Minimalmedium mit (A) Succinat als C-Quelle und (B) Succinat und Glucose als C-Quellen

Wurden die Konstrukte in Minimalmedium mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle angezogen (A), konnten die Aktivitäten nach 48 h Wachstum gegenüber denen des Glucose und Succinat haltigen Mediums (B) gesteigert werden. In beiden Fällen führte Biotinlimitierung zu einer erhöhten Expression der putativen *sinR*-Promotorregion. Die Werte stellen Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen dar.

### 3.2.6 Aktivitätsmessungen der putativen Promotorregion des *copC*-Gens

Eines der Proteine, welches in dieser Arbeit mit Hilfe der Proteomanalyse als Biotin-reguliert identifiziert werden konnte, war das CopC-Protein. Supplementation des Mediums mit Biotin führte zu einer erhöhten Expression von CopC (Tab. 7). In *Pseudomonas syringae* ist das Kupfer bindende CopC-Protein Teil des *cop*-Operons,

welches an der Resistenz des Organismus gegenüber Kupfer aber auch am Transport von Kupfer in die Zelle beteiligt ist. In *S. meliloti* wurde *copC* bisher nicht charakterisiert. Die erhöhte Expression des CopC-Proteins nach Biotinsupplementation des Anzuchtmediums sollte mit Hilfe von Promotoraktivitätsmessungen überprüft werden. Die putative Promotorregion des *copC*-Gens wurde als 253 bp langes PCR Produkt mit terminalen *XbaI* und *PstI* Schnittstellen in den Vektor pBK3 kloniert. Nach Mobilisierung des resultierenden Plasmides pPR-*copC* nach *S. meliloti* 1021 wurde die *gusA*-Reportergenaktivität in An- oder Abwesenheit von Biotin im Medium gemessen. Dazu wurden jeweils drei Parallelkulturen mit Biotin-supplementiertem und nicht supplementiertem GTS-Minimalmedium mit einer unter Biotin-limitierenden Bedingungen gewachsenen Vorkultur angeimpft, inkubiert und die *gusA*-Aktivitäten bestimmt. Der Zeitpunkt des Überimpfens wurde als 0 gesetzt. Wie in Abb. 25 dargestellt, zeigten die unter Biotinsuffizienz angezogenen Zellen eine gegenüber den unter Biotinlimitation inkubierten Zellen eine 1,5- bis 5-fach erhöhte relative *gusA*-Aktivität. In einem weiteren Experiment erfolgte die Anzucht der *S. meliloti*-pPR-*copC* Kulturen analog zu den gewählten Anzuchtbedingungen der 2D-Gelelektrophorese. Nach 35 Tage andauernder Inkubation unter Biotin-limitierenden Bedingungen und Bestimmung der *gusA*-Aktivität wurden die Zellen mit 40 nM Biotin versetzt, weiter inkubiert und die *gusA*-Aktivität nach 72 h erneut gemessen. Auch hier zeigte sich nach Biotinzugabe eine 18-fach erhöhte *gusA*-Aktivität (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse bestätigten, daß *copC* im Biotin-supplementierten Medium verstärkt exprimiert wird, wie es bereits mit Hilfe der 2D-Gelanalyse beobachtet worden war.



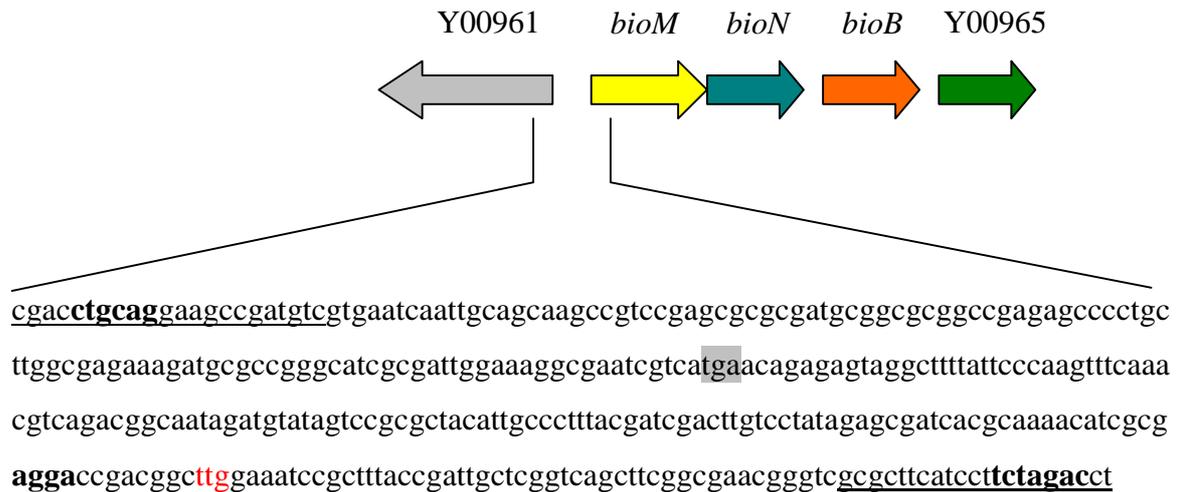
**Abb. 25** Relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität des pPR-*copC*-Konstruktes in *S. meliloti* 1021

Unter Biotin-limitierenden Bedingungen (schwarze Balken) waren die rel.  $\beta$ -Glucuronidaseaktivitäten in den getesteten Wachstumsphasen nahezu konstant, während die Aktivitäten in Biotin-supplementiertem Medium (graue Balken) in der logarithmischen Wachstumsphase anstiegen und bis zu 5,0-fach gegenüber denen der Biotin-limitierten Kulturen erhöht waren. Die Daten stellen Mittelwerte aus jeweils drei Parallelkulturen inklusive der Standardabweichungen dar.

### 3.2.7 Sequenzanalyse von Biotin-regulierten Promotoren

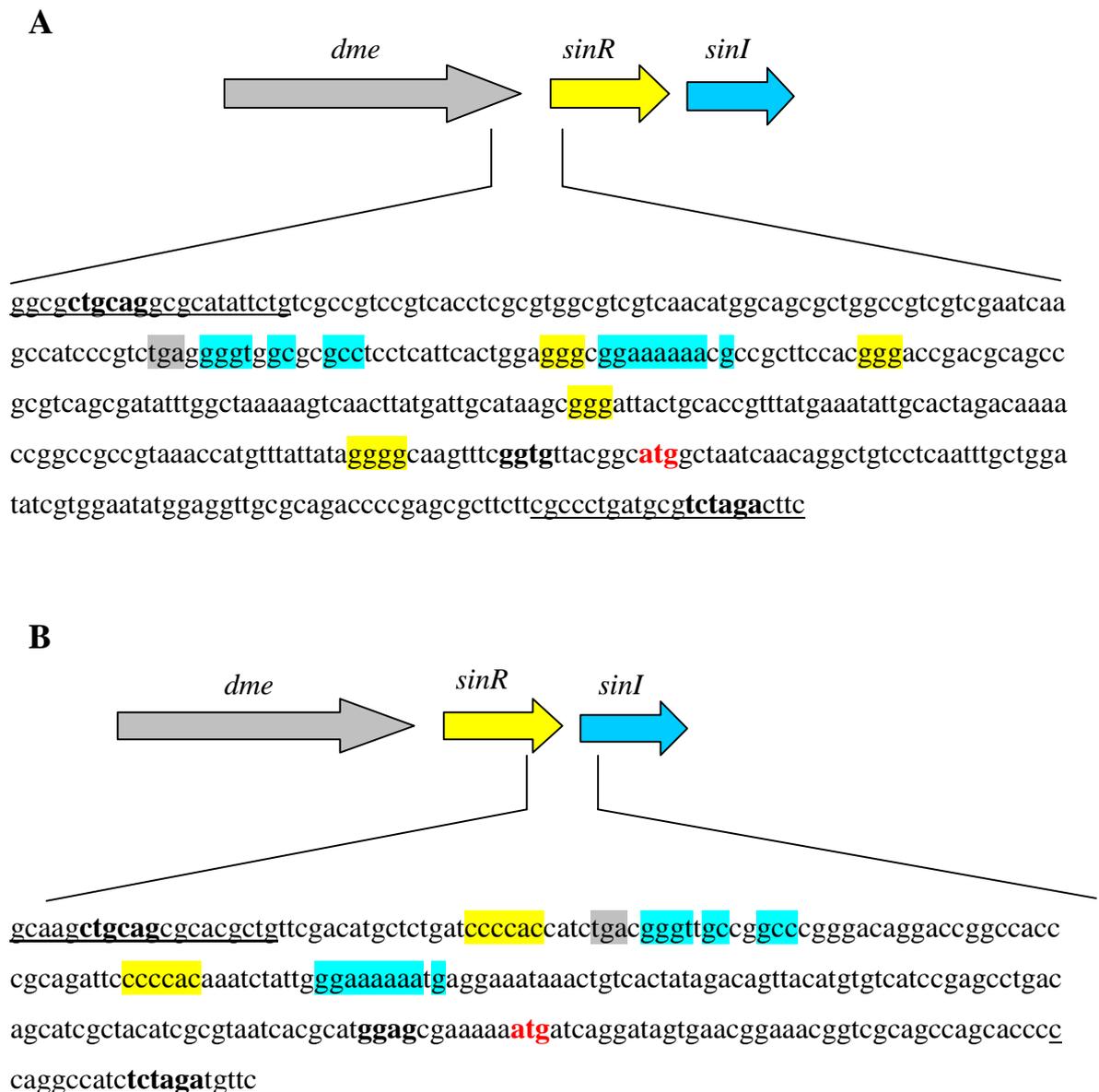
Durch Promotoraktivitätsmessungen konnten drei Gene *sinI*, *sinR* und *bioM* identifiziert werden, deren Expression durch das Vorhandensein von Biotin im Medium beeinflusst wurde. Desweiteren wurden mit Hilfe dieser Methode die Ergebnisse der Proteomanalyse, nämlich eine erhöhte Expression des CopC-Proteins unter Biotinsuffizienz im Medium, bestätigt. Im folgenden wird die physikalische Anordnung der als Biotin-reguliert

identifizierten Gene innerhalb des *S. meliloti* Genoms und die Sequenz der klonierten Bereiche dargestellt. Sequenzen, welche in der Promotorregion des *sinI*-Gens und des *sinR*-Gens zu finden sind und deren Bedeutung bisher nicht untersucht wurde, sind blau hinterlegt. Weitere mögliche regulatorische Motive sind gelb hinterlegt.



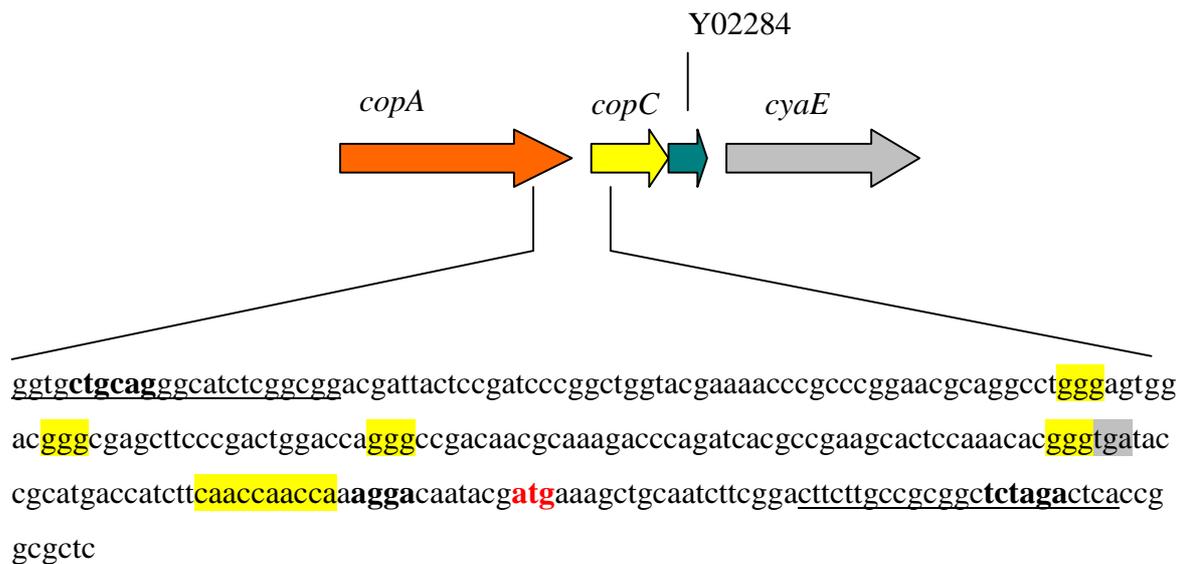
**Abb. 26 Physikalische Anordnung des *bioM*-Gens und schematische Darstellung des Promotorbereiches**

Dargestellt wurde die für die Klonierung des *bioM*-Promotorbereiches amplifizierte Region. Unterstrichene Sequenzen: Bindestellen der Primer, in denen durch PCR eingefügte Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *PstI* bzw. *XbaI* hervorgehoben wurden; grau unterlegte Sequenzen: Stopcodons der stromaufwärts liegenden Gene; rot markierte Sequenzen: Startcodons; Unmittelbar stromaufwärts der Startcodons wurde die putative Shine-Dalgarno-Sequenz hervorgehoben.



**Abb. 27** Physikalische Anordnung des *sinI*- bzw. *sinR*-Gens und schematische Darstellung der klonierten Promotorregionen

Die abgebildeten Sequenzen geben die für die Klonierung der Promotorregionen amplifizierten Bereiche wieder. **A:** Promotorregion des *sinI*-Gens. Promotoraktivitätsmessungen zeigten eine bis zu 4,3-fach erhöhte Expression unter Biotin-limitierenden Bedingungen. **B:** Promotorregion des *sinR*-Gens, dessen Expression unter Biotin-limitierenden Bedingungen leicht erhöht war (bis 1,7-fach). Unterstrichene Sequenzen: Bindestellen der Primer, in denen durch PCR eingefügte Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *PstI* bzw. *XbaI* hervorgehoben wurden; grau unterlegte Sequenzen: Stopcodons der stromaufwärts liegenden Gene; rot markierte Sequenzen: Startcodons; Unmittelbar stromaufwärts der Startcodons wurden die putativen Shine-Dalgarno-Sequenzen hervorgehoben. Mögliche konservierte Motive sind gelb hinterlegt. Sequenzen, die in beiden Promotorbereichen auftreten, deren Bedeutung aber nicht untersucht wurde, sind hellblau hinterlegt.



**Abb. 28** Physikalische Anordnung des *copC*-Gens und schematische Darstellung des Promotorbereiches

Das für die Klonierung des *copC*-Promotorbereiches amplifizierte 253 bp-Fragment, dessen Genprodukt möglicherweise an der Resistenz gegenüber Kupfer beteiligt ist, wurde hier dargestellt. Stromaufwärts des *copC*-Gens liegt das *copA*-Gen, welches in anderen Mikroorganismen an der Translokation von Kupfer beteiligt ist. Die Binderegionen der verwendeten Primer wurden unterstrichen und die eingefügten Schnittstellen markiert.

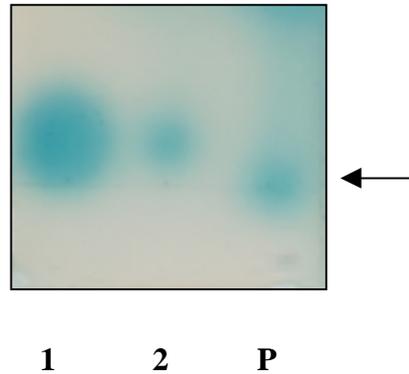
grau unterlegte Sequenzen: Stopcodon des stromaufwärts liegenden Gens; rot markierte Sequenz: Startcodon; unmittelbar stromaufwärts der Startcodons wurde die putative Shine-Dalgarno-Sequenz hervorgehoben. Gelb markierte Sequenzen: potentielle regulatorisch wichtige Sequenzen.

### 3.2.8 Detektion von *S. meliloti* 1021 Acyl-HSL durch Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe der *sinI*-Promotorfusion konnte gezeigt werden, daß die Expression der Autoinduktor-Synthase bei Anzucht von *S. meliloti*-pPR-*sinI* unter Biotin-limitierenden Bedingungen bis um das 4,3-fache erhöht gegenüber Wachstum im Biotin-supplementierten Medium war. Daher wurde untersucht, ob sich aus einer definierten Menge Zellüberstand von *S. meliloti* 1021-Kulturen, die unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogen worden waren, auch eine größere Menge an Acyl-HSL isolieren und detektieren ließ, als aus einem Zellüberstand Biotin-supplementierter Rhizobien. Zum Nachweis von langkettigen Acyl-Homoserinlactonen aus dem Überstand verschiedener Mikroorganismen eignet sich der Reporterstamm *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372), der durch eine Deletion der endogenen Autoinduktor-Synthase (*traI*) und einer plasmidcodierten *traI-lacZ* Fusion gekennzeichnet ist. Dieser Stamm kann selbst

keine Acyl-HSL bilden, jedoch können externe Acyl-HSL-Moleküle mit dem Transkriptionsregulator TraR interagieren, der die Expression der *traI-lacZ* Fusion induziert. Die Acyl-HSL wurden aus dem Überstand der unter den verschiedenen Bedingungen angezogenen Kulturen extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (siehe 2.20). Die Platten wurden dann mit agarhaltigem *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) Kulturmedium überschichtet und inkubiert. Durch die Aktivität des *traI-lacZ*-Konstruktes erfolgte die Umsetzung des im Agar enthaltenen Substrates X-Gal an den Stellen der Dünnschichtchromatographie-Platte, an denen sich die extrahierten *S. meliloti* HSL-Moleküle befanden. In Abb. 29 ist das Ergebnis einer Dünnschichtchromatographie dargestellt. In Spur 1 wurden 2 µl eines Extraktes aufgetragen, der aus dem Zellüberstand unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogenen Kulturen stammt und unter 2 dieselbe Menge eines Extraktes, der aus dem Zellüberstand Biotin-supplementierter Kulturen gewonnen wurde. Beide Kulturen hatten etwa dieselbe optische Dichte (OD<sub>600</sub>: -Biotin 0,29 und + Biotin 0,30) wurden aber nach verschieden langer Wachstumszeit zur Herstellung der Extrakte geerntet (-Biotin 48 h; +Biotin 28 h nach Animpfen). Wie in Abb. 29 dargestellt, trat in Spur 1 eine stärkere Blaufärbung des überschichteten Agars als in Spur 2 auf. Offensichtlich ließ sich aus dem Überstand Biotin-limitierter Kulturen eine größere Menge an Autoinduktoren extrahieren als aus dem Überstand Biotin-supplementierter Kulturen mit annähernd identischer optischer Dichte, was darauf hindeutet, daß Autoinduktion nicht nur ein Phänomen der Populationsdichte darstellt. Erfolgte die Extraktion der Autoinduktoren aus dem Überstand Biotin-supplementierter Kulturen, die ebenfalls nach 48 h geerntet wurden und damit auch eine höhere optische Dichte hatten (OD<sub>600</sub>: 0,84), war die Intensität dieser Proben im Test höher als von Biotin-limitierten Kulturen mit gleich langer Wachstumszeit (nicht gezeigt). Da keine Acyl-Homoserin-Lacton-Moleküle als Standard zur Verfügung standen, wurde als Positivkontrolle (Spur P) Extrakte des Zellüberstandes von *A. tumefaciens* KYC6 aufgetragen, der Autoinduktoren im hohen Maße produziert. Laufunterschiede der Autoinduktoren sind im allgemeinen auf verschieden lange Acyl-Seitenketten und Art der Substitutionen am C3-Atom der Acylseitenkette zurückzuführen. Dabei haben langkettige und unsubstituierte Seitenketten die geringsten R<sub>f</sub>-Werte. Da unbekannt ist, um welches Acyl-HSL Molekül es sich in der Positivkontrolle handelte, konnten die Signale von *S. meliloti* 1021 nicht exakt eingeordnet werden. Die detaillierte Struktur des *S. meliloti* 1021 Autoinduktors wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Durch einen *Chromobacterium violaceum* Reporterstamm, der im allgemeinen zum Nachweis von Acyl-HSL Molekülen

mit kürzeren Seitenketten eingesetzt wird, konnten keine Autoinduktoren von *S. meliloti* 1021 detektiert werden (nicht dargestellt).



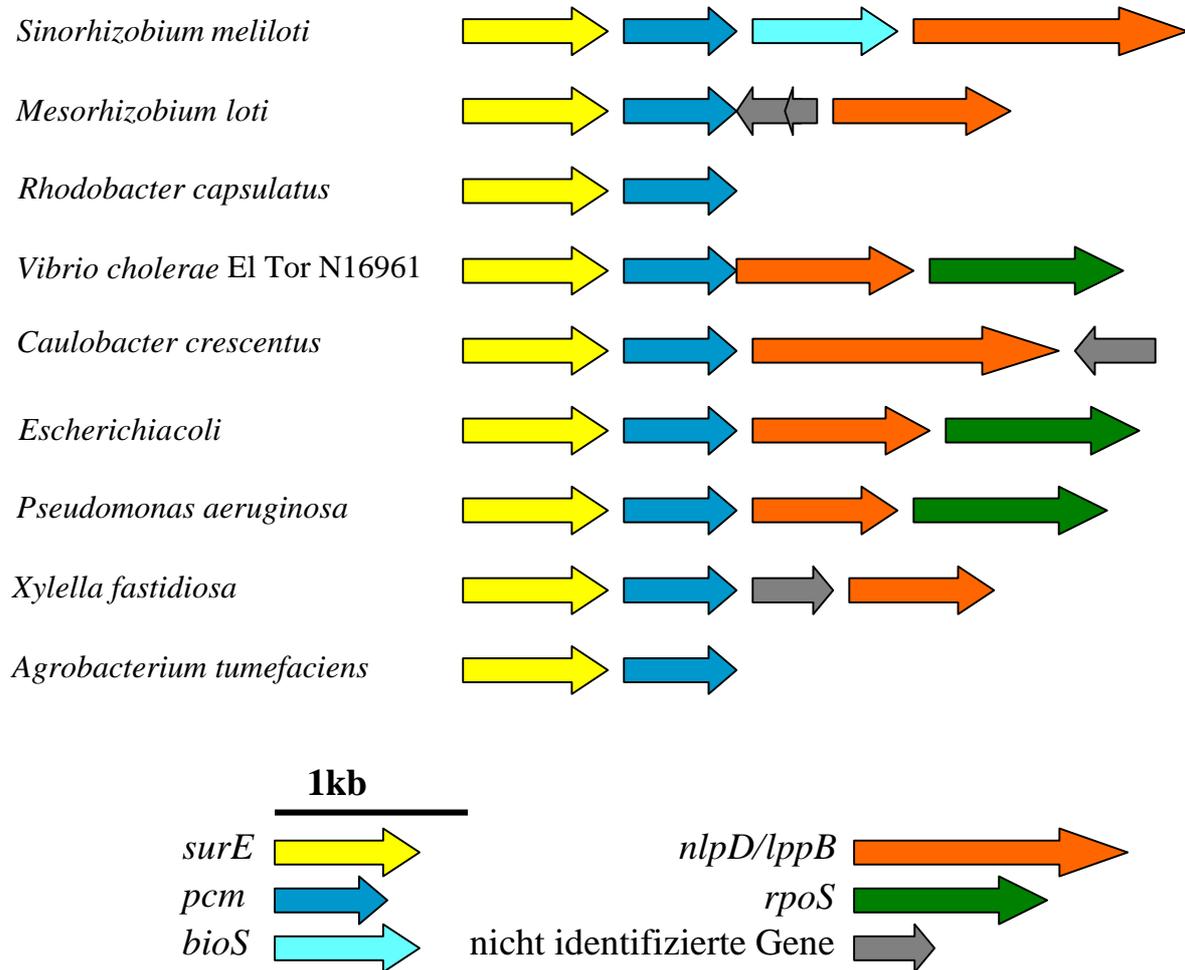
**Abb. 29 Detektion von Autoinduktoren aus *S. meliloti* durch Dünnschichtchromatographie**

Die Proben wurden auf eine RP-18W Dünnschichtplatte aufgetragen und mit 60% Methanol: 40 % H<sub>2</sub>O (v/v) als Laufmittel chromatographiert. Acyl-HSL wurden durch Überschichtung mit dem Reporterstamm *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) sichtbar gemacht. Aufgetragen wurden jeweils 2 µl Probe, welche aus der Extraktion von Überständen Biotin-limitierter Kulturen (Spur 1) bzw. Biotin-supplementierter Kulturen (Spur 2) gewonnen wurde. Zur Extraktion wurde dasselbe Kulturvolumen eingesetzt und die optische Dichte der Kulturen war nahezu identisch. Spur 3: Positivkontrolle; Der Pfeil markiert die Auftragungslinie.

### 3.3 Charakterisierung des *surE*- und *pcm*-Gens aus *S. meliloti*

Das *pcm*-Gen, das *surE*-Gen und auch das schon in Vorarbeiten charakterisierte *nlpD*-Gen (Streit et al., 2000) sind weit verbreitet und ihre Anordnung ist bei vielen Mikroorganismen konserviert (siehe Abb. 30). Bei einigen Bakterien wie *E. coli* liegt in 3'-Richtung dieser Gene das *rpoS*-Gen, welches für den Stationärphase-Sigmafaktor codiert. Man nimmt an, daß die genannten Gene beim Überleben in der Stationärphase von Bedeutung sind, daher wurde die gesamte Region als *survival operon* bezeichnet. Das besondere des *S. meliloti survival operons* ist das *bioS*-Gen (Abb. 30). Es wird durch Biotin in der Stationärphase induziert und Mutanten zeigen eine verlängerte *lag*-Phase nach Biotinsupplementation zu einer Biotin-limitierten Stationärphasekultur. Dieses Gen war bereits wie das *nlpD*-Gen in Vorarbeiten charakterisiert worden und daher sollten in dieser Arbeit die beiden anderen Gene des *survival operons* untersucht werden (Heinz et al., 1999; Streit et al., 2000). Die Proteine wurden zunächst kloniert, überexprimiert und aufgereinigt. Durch Erzeugung von Mutanten der beiden Gene sollte anhand von

Wachstumsversuchen die Bedeutung der Proteine für das Überleben in der stationären Wachstumsphase untersucht werden.



**Abb. 30 Anordnung von Genen im *survival operon***

Die Anordnung der *surE*-, *pcm*- und *nlpD/lppB*-Gene ist in vielen Organismen konserviert. Bei einigen Bakterien, wie z.B. hier dargestellt bei *V. cholerae*, *E. coli*, oder *P. aeruginosa* befindet sich im 3'-Bereich des *nlpD/lppB*-Gens das *rpoS*-Gen, welches für den Stationärphase-Sigmafaktor codiert. Das Biotin-regulierte *bioS* Gen findet man nur bei *S. meliloti*.

Das *pcm*-Gen codiert für eine L-Isoaspartyl-Protein-Carboxymethyltransferase (EC 2.1.1.77), ein Reparaturenzym für degenerierte Proteine. Durch spontane Deamidierung können in Proteinen aus Asparaginresten oder L-Aspartatresten L-Isoaspartylreste entstehen. Die Methyltransferase bindet spezifisch an L-Isoaspartylreste und methyliert das C-Atom der neu gebildeten Seitenkette, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donor dient. Über einen L-Isoaspartylmethylester entsteht dann ein Zwischenprodukt, welches durch hydrolytische Spaltung wieder zu Aspartyl oder Isoaspartyl umgesetzt werden kann.

Da unter Mangelbedingungen wie auch in der stationären Wachstumsphase die Proteinsynthese limitiert ist, erscheint es offensichtlich, daß Proteinerhaltung und Reparatur wichtig sind, um lange Perioden unter solchen limitierenden Bedingungen zu überdauern. Welche Bedeutung dabei das *pcm*-Gen für das Überleben von *S. meliloti* hat, ein Organismus der in der Lage ist in seinem natürlichen Habitat lange Perioden unter limitierenden Bedingungen zu überleben, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Stromaufwärts des *pcm*-Gens liegt das *surE*-Gen (*sur*=*survival*), dessen physiologische Funktion bisher noch nicht aufgeklärt wurde. Zwar konnte gezeigt werden, daß das SurE Protein aus *Thermotoga maritima* eine Magnesium-abhängige Phosphataseaktivität besitzt, jedoch ist bisher unbekannt, welche Substrate das Enzym in der Zelle verwendet (Zhang et al., 2001; Lee et al., 2001). Aufgrund der Lokalisation wird spekuliert, daß das Genprodukt auch an Prozessen beteiligt ist, die eine Anpassung an ein Leben unter limitierenden Bedingungen erlauben. Daher schien es interessant auch dieses Gen zu untersuchen. Nach Klonierung, Überexpression und Aufreinigung wurde eine *surE*-Mutante generiert, um mit Hilfe von Wachstumsversuchen die Bedeutung des Gens für das rhizobielle Überleben zu untersuchen.

### **3.3.1 Klonierung und heterologe Überexpression der *surE*- und *pcm*-Gene von *S. meliloti* und Aufreinigung der Genprodukte**

Das *surE*-Gen wurde als *surE-pcm*-Fragment mit terminalen *NdeI*-Schnittstellen (Primer *surE-NdeI-fw* und *pcm-NdeI-rev*, Tab. 3) unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zunächst mit glatten Enden in den mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pBluescriptII SK(+) ligiert, der eine Blau-Weiß-Selektion ermöglichte. Das resultierende Plasmid wurde als pSK::*surE/pcm* bezeichnet. Nach *NdeI*-Verdau dieses Konstruktes wurde das *surE-pcm*-Fragment in den ebenso verdauten Überexpressionsvektor pET19b ligiert, wobei das resultierende Plasmid mit pEH25 bezeichnet wurde. Letzteres ist in Abb. 31 dargestellt.

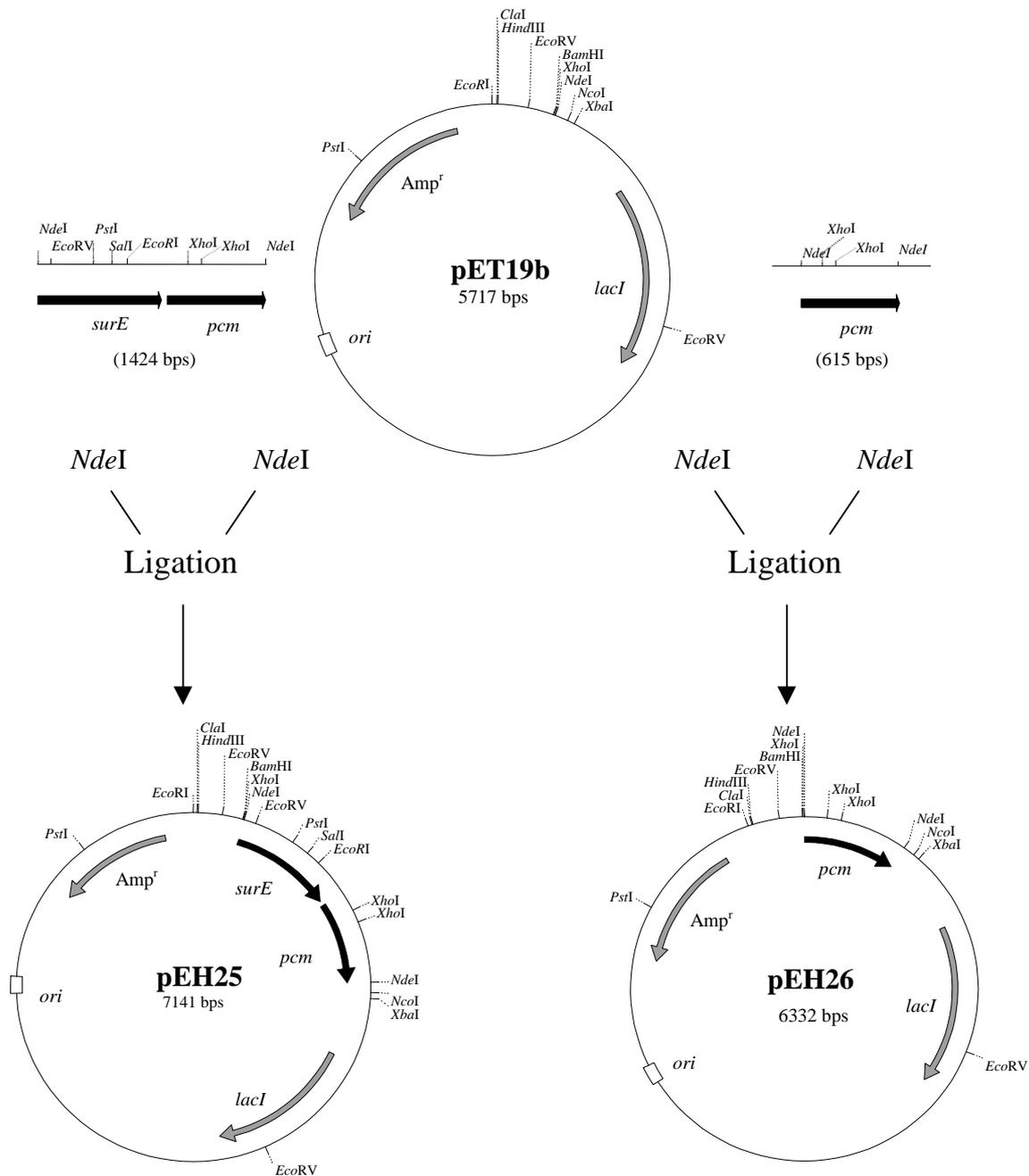
Die Klonierung von pEH26, dem Überexpressionsvektor für das *pcm*-Gen, wurde nach dem gleichen Verfahren durchgeführt (Abb. 31). Für die Amplifikation des *pcm*-Fragmentes wurden die Primer *pcm-NdeI-fw* und *pcm-NdeI-rev* eingesetzt (Tab. 3).

Die Klonierung der Gene in den Überexpressionsvektor pET19b ermöglichte es an den N-Terminus der zu exprimierenden Proteine 10 Histidinreste anzuhängen, was die Aufreinigung durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie erlaubte. Die Überexpression erfolgte mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems. Die Plasmide pEH25 und

pEH26 wurden in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert, der durch ein chromosomales T7-RNA-Polymerase-Gen gekennzeichnet ist, das unter Kontrolle eines durch IPTG induzierbaren *lacUV5* Promotors steht. Die Aufreinigung der Proteine wurde nach Induktion mit 1 mM IPTG und anschließender weiterer drei-stündiger Inkubation durchgeführt.

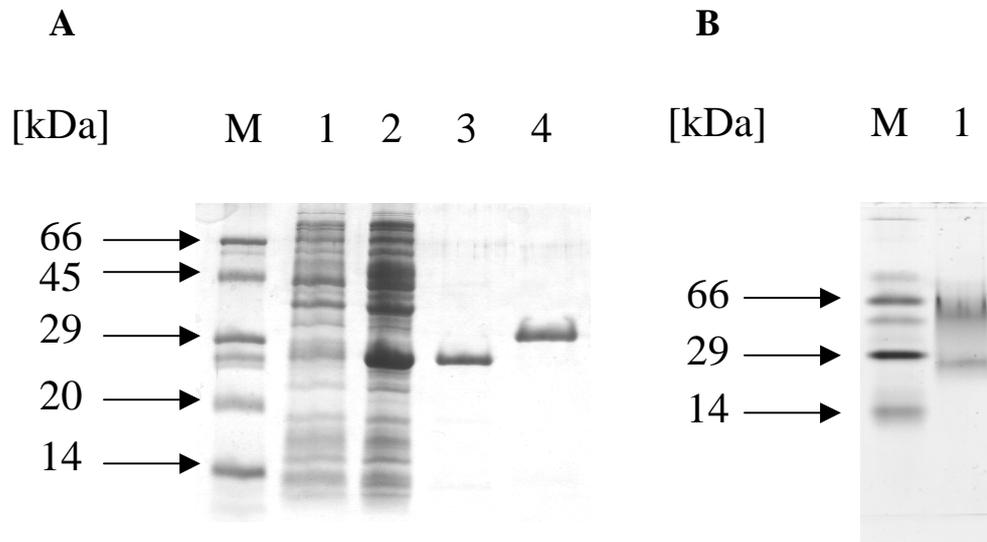
Das überexprimierte SurE-Protein ließ sich sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen aufreinigen und zeigte im SDS-Polyacrylamidgel eine Größe von etwa 28 kDa, was der anhand der Aminosäuresequenz berechneten Größe von 27,7 kDa zuzüglich des N-terminal fusionierten Vektoranteils und den Histidinresten entsprach. Bei Analyse des nativ aufgereinigten SurE-Proteins im Nativ-PAGE war eine zusätzliche Bande bei etwa 60 kDa zu sehen (Abb. 32 B), was auf eine Dimerisierung unter nativen Bedingungen schließen läßt.

Das Pcm-Protein sollte eine Größe von 24,9 kDa haben (errechnete Größe: 22,4 kDa + 2,5 kDa Vektoranteil), was mit der Proteinbande im SDS-Polyacrylamidgel übereinstimmte (Abb. 32 A). Unter nativen Bedingungen konnte das Pcm-Protein nicht aufgereinigt werden, da das Protein offensichtlich in *inclusion bodies* vorlag. Daher konnten auch keine Tests zum Nachweis der Methyltransferase-Aktivität des Pcm-Proteins durchgeführt werden.



**Abb. 31** Darstellung der Klonierungsstrategie zur Überexpression der *surE*- und *pcm*-Gene

Die Gene wurden durch PCR amplifiziert, *blunt end* in den Vektor pBluscriptII SK(+) kloniert (nicht dargestellt) und nach *NdeI*-Verdau in den entsprechend geschnittenen Überexpressionsvektor pET19b kloniert. Die resultierenden Konstrukte wurden als pEH25 und pEH26 bezeichnet.



**Abb. 32 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der heterolog in *E. coli* überexprimierten SurE- und Pcm-Proteine**

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Proteine SurE und Pcm in einem 12 %-igem (w/v) SDS-Polyacrylamidgel.

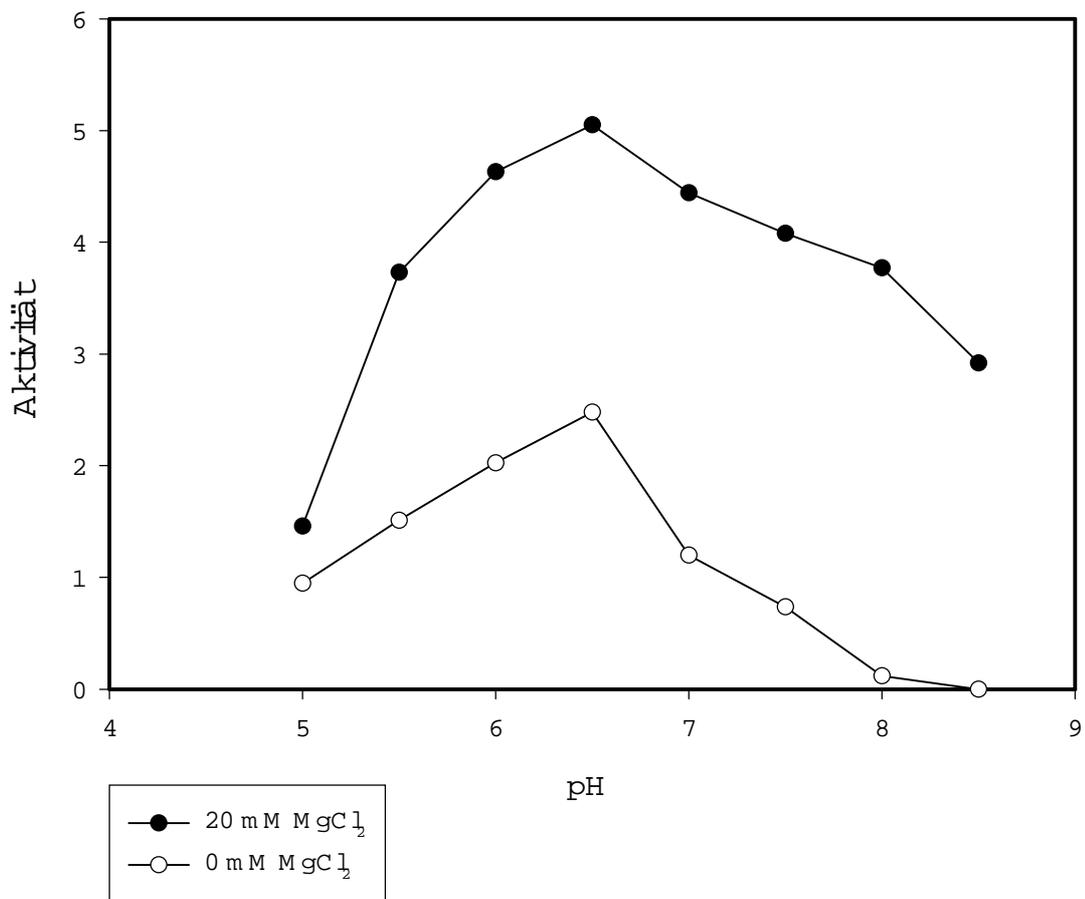
M: Marker; 1: pEH26 in BL21(DE3) vor Induktion; 2: pEH26 in BL21(DE3) nach 3h Induktion mit IPTG (1 mM Endkonzentration); 3: aufgereinigtes Pcm-Protein (2  $\mu$ g); 4: aufgereinigtes SurE-Protein (2  $\mu$ g)

(B) Nativ-PAGE (12 %-iges Gel) des nativ aufgereinigten SurE-Proteins. Unter diesen Bedingungen konnte eine zweite Bande, neben der bereits im SDS-Gel zu sehenden Bande bei 28 kDa, mit einer Größe von etwa 60 kDa beobachtet werden. M: Nativ-Marker; 1: nativ aufgereinigtes SurE-Protein (2  $\mu$ g)

### 3.3.2 Phosphataseaktivität des SurE-Proteins

Untersuchungen von SurE aus *T. maritima* zeigten, daß das Protein eine von divalenten Metallionen abhängige Phosphataseaktivität besitzt und eine neue Familie von Phosphatasen repräsentiert. Die Struktur wurde aufgeklärt und die Bindestellen der divalenten Metallionen innerhalb des Proteins bestimmt (Lee et al., 2001; Zhang et al., 2001). Mit dem heterolog überexprimierten SurE-Protein, welches am N-Terminus noch die Histidinreste des Vektoranteils trug, wurden daher Aktivitätsmessungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Protein ebenfalls Phosphataseaktivität besitzt. In Abb. 33 ist die Enzymaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes des Reaktionsansatzes dargestellt. Es wurde nur das pH-Optimum bestimmt. Im pH-Bereich 5,0-6,5 wurde in 50 mM Bis-Tris Puffer und im pH-Bereich 6,5-8,5 in 50 mM Tris-Puffer gemessen. Als Substrat diente p-Nitrophenyl-Phosphat, was in einer Endkonzentration von 6 mM im Ansatz enthalten war.

Alle Reaktionsansätze wurden bei 37 °C inkubiert. In Anwesenheit von 20 mM MgCl<sub>2</sub> konnte eine maximale Enzymaktivität von 5,05 μmol\* min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup> bei pH 6,5 gemessen werden. Ohne MgCl<sub>2</sub> wurden geringere Enzymaktivitäten ermittelt (max. 2,48 μmol\* min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup> bei pH 6,5). Die Rate der Hydrolyse war proportional zur Inkubationszeit und Enzymkonzentration (nicht dargestellt). Auch das Substrat α-Naphtyl-Phosphat wurde durch SurE umgesetzt, wobei die Menge nicht quantifiziert wurde (nicht dargestellt).



**Abb. 33 SurE-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes in Gegenwart von 20 mM MgCl<sub>2</sub> und ohne MgCl<sub>2</sub> im Reaktionsansatz**

Die höchsten Aktivitäten wurden bei pH 6,5 gemessen. MgCl<sub>2</sub> führte zu einer Steigerung der Enzymaktivität. Als Substrat diente p-Nitrophenyl-Phosphat (6 mM). Die Daten stellen Mittelwerte aus Messungen dreier paralleler Reaktionsansätze dar.

### 3.3.3 Konstruktion der *pcm*-Mutante Rm1021-EH45 und der *surE*-Mutante Rm1021-EH47

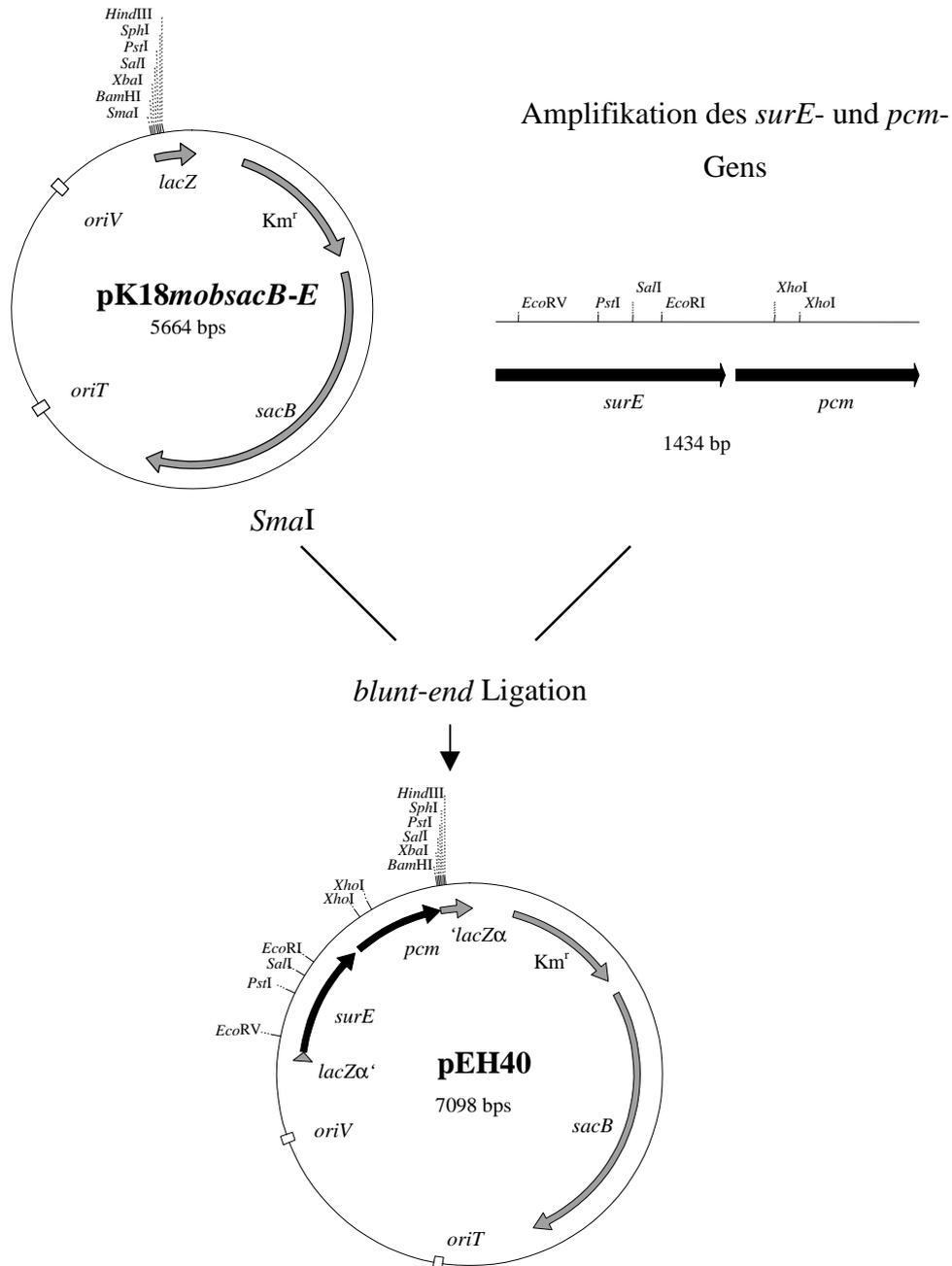
Die Mutagenese des *pcm*-Gens und des *surE*-Gens erfolgte mit Hilfe des *sacB*-Systems (siehe 2.9). Die Mutante Rm1021-EH45 zeichnet sich durch die Insertion eines promotorlosen *gusA*-Reportergens in das *pcm*-Gen aus. Da die Insertion eines *gusA*-Gens in das *surE*-Gen aus unbekanntem Gründen nicht erfolgreich war, wurde die Mutante Rm1021-EH47 durch die Insertion einer promotorlosen *gfp*-Kassette (grün fluoreszierendes Protein) in das *surE*-Gen konstruiert. Bei beiden Konstrukten handelt es sich um transkriptionale Fusionen.

#### 3.3.3.1 Konstruktion von pEH40

Zur Konstruktion der Mutanten wurden die Gene *surE* und *pcm* durch PCR unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase und den Primern *surE-NdeI-fw* und *pcm-NdeI-rev* mit *S. meliloti* 1021 Gesamt-DNA als *template* amplifiziert. Das resultierende 1434 bp große Produkt wurde *blunt-end* in die *SmaI*-Schnittstelle des mobilisierbaren Vektors *pk18mobsacB-E* kloniert. Dieser Vektor entspricht dem Vektor *pk18mobsacB* mit der Ausnahme, daß die *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb der Multiklonierungsstelle, die bei der Insertion der *gfp*-Kassette in die *EcoRI*-Schnittstelle des *surE*-Gens gestört hätte, durch Restriktion mit *EcoRI*, Auffüllung mit dem Klenow-Fragment und Ligation entfernt wurde. Das so entstandene Konstrukt wurde als pEH40 bezeichnet (Abb. 34).

#### 3.3.3.2 Konstruktion von pEH40-6

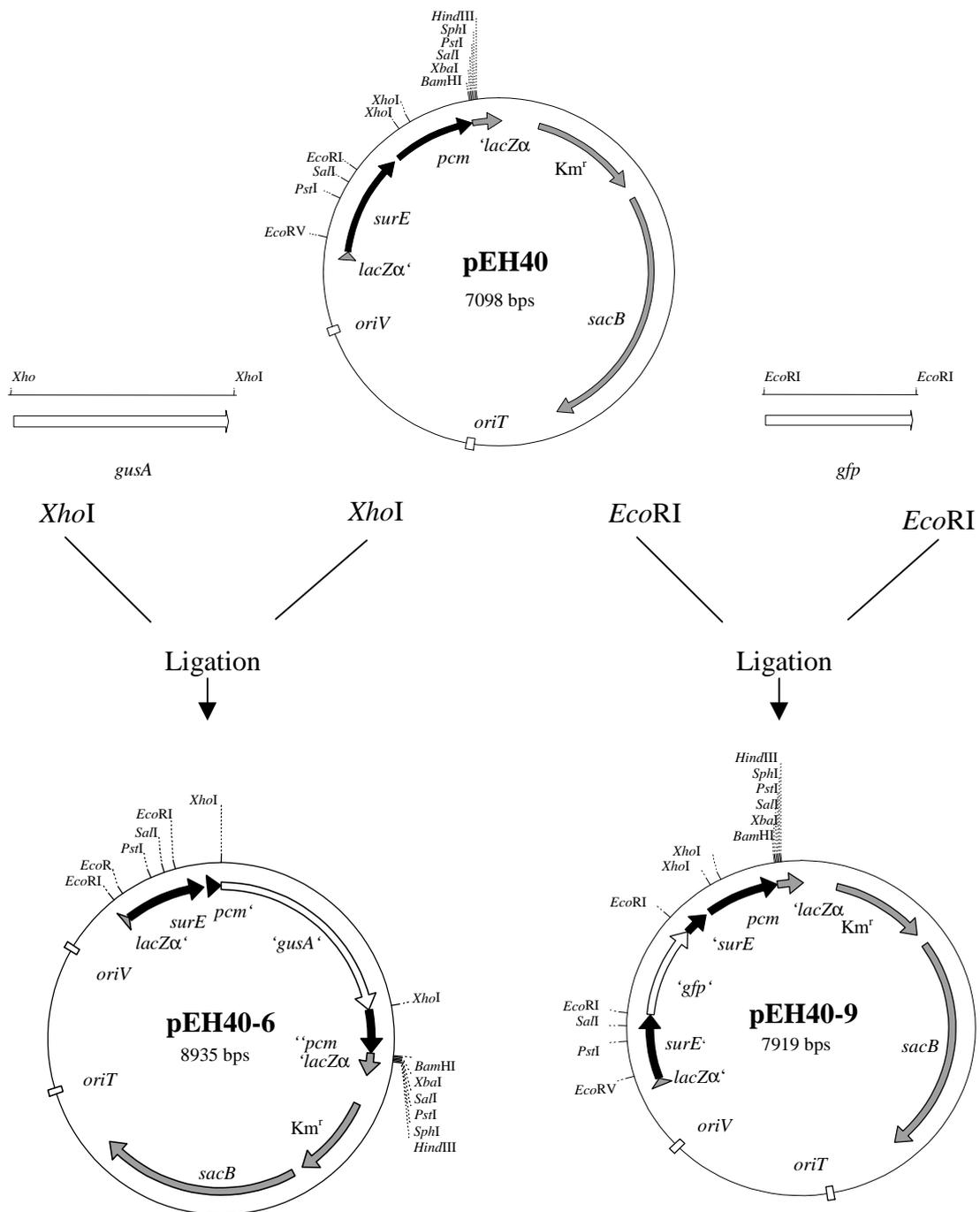
Die *gusA*-Kassette wurde mittels PCR amplifiziert, wobei das Plasmid pCam140 als *template* diente, welches das Reportergen aus *E. coli* enthält. Mit Hilfe der Primer wurde an das 5'- und 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Außerdem war der 5'-Primer so gewählt, daß die Sequenz der ribosomalen Bindestelle und ihr Abstand zum ATG-Startcodon unverändert zur Originalsequenz in *E. coli* blieb. Die Klonierung des *gusA*-Gens erfolgte als *XhoI*-Fragment in den Vektor pEH40 in die erste *XhoI*-Schnittstelle des *pcm*-Gens, die sich an Basenpaarposition 129 befindet. Da es noch eine weitere *XhoI*-Schnittstelle an Basenpaarposition 213 im *pcm*-Gen gibt, wurde das Zwischenstück von 84 bp während der Klonierung deletiert. Die Orientierung des inserierten *gusA*-Gens in Leserichtung des *pcm*-Gens wurde durch PCR unter Verwendung der Primer *surE-NdeI-fw* und *gusA-181-rev* untersucht.



**Abb. 34** Klonierung des *surE*- und *pcm*-Gens in den Vektor *pk18mobsacB-E*  
 Das *surE*- und *pcm*-Gen wurde mit Hilfe von PCR unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase amplifiziert und *blunt-end* in den *SmaI* geschnittenen Vektor *pk18mobsacB-E* ligiert. Das Produkt wurde als *pEH40* bezeichnet.

### 3.3.3.3 Konstruktion von pEH40-9

Das *gfp*-Gen wurde durch *Eco*RI-Verdau aus dem Vektor pEN322 geschnitten und in den *Eco*RI verdauten Vektor pEH40 in das *surE*-Gen ligiert. In 5'-Richtung vor dem ATG-Startcodon des *gfp*-Gens befinden sich translationale Stoppsignale in allen drei Leserahmen und eine ribosomale Bindestelle. Die Orientierung der *gfp*-Kassette in Leserichtung des *surE*-Gens wurde durch PCR überprüft. Desweiteren wurden die beiden Plasmide pEH40-6 und pEH40-9 durch Sequenzierungsreaktionen überprüft und nach Transformation in den *E. coli* Stamm S17-1 nach *S. meliloti* mobilisiert. Mittels Selektion durch das *sacB*-System konnten die Mutanten Rm1021-EH45 und Rm1021-EH47 isoliert werden, bei denen durch doppelt homologe Rekombination die WT-Gene durch die mutierten Abschnitte ausgetauscht worden waren. Die Klone wurden wiederum durch PCR-Analysen und durch Southern-Hybridisierungen, bei denen das *surE*- bzw. das *pcm*-Gen als Sonde eingesetzt wurden, überprüft.



**Abb. 35** Darstellung der Klonierungsstrategie zur Insertion der Reportergene *gusA* und *gfp* in den Vektor **pEH40**

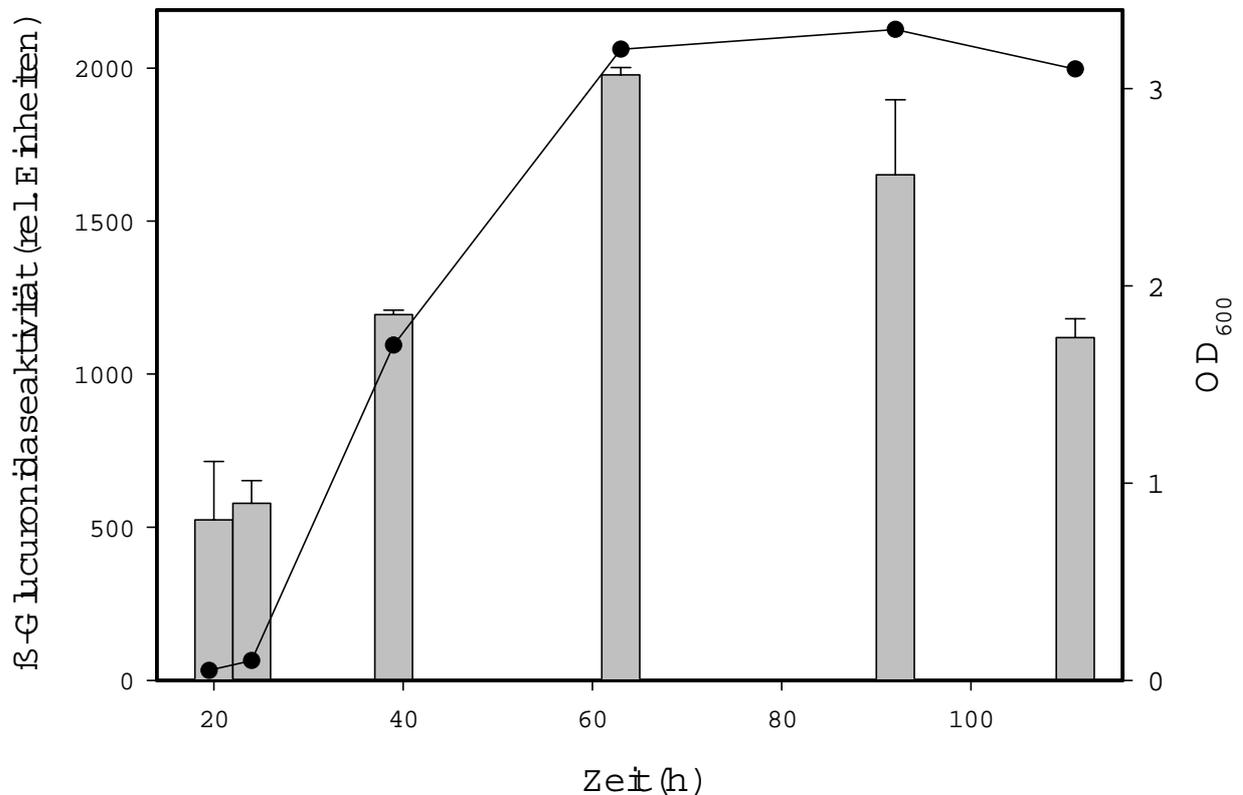
Das *gusA*-Gen wurde als *XhoI*-Fragment in die 5'-*XhoI*-Schnittstelle des *pcm*-Gens und das *gfp*-Gen als *EcoRI*-Fragment in die *EcoRI*-Schnittstelle des *surE*-Gens kloniert. Die erhaltenen Produkte wurden als **pEH40-6** und **pEH40-9** bezeichnet.

### 3.3.3.4 Expression des *surE*-Gens

In der Mutante Rm1021-EH47 war ein *gfp*-Reporter gen inseriert worden, welches eine eigene ribosomale Bindestelle besitzt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzphotometers wurde die Fluoreszenz während verschiedener Wachstumsphasen in TY-Vollmedium und GTS-Minimalmedium bestimmt. Da die Zellen selber auch fluoreszierten, wurden die zu messenden Kulturen immer bis zu einer maximalen optischen Dichte  $OD_{600}$  von 0,1 verdünnt. Unter den getesteten Bedingungen konnte für Rm1021-EH47 keine Fluoreszenz bestimmt werden, die sich signifikant von der der Negativkontrolle (Wildtyp) unterschied. Auch Variation der Emissions- und Excitations-Wellenlängen führte zu keiner meßbaren erhöhten Fluoreszenz bei der Mutante. Mit Hilfe der *surE-gfp*-Reporter genfusion konnte daher nicht ermittelt werden, unter welchen Bedingungen das *surE*-Gen exprimiert wird.

### 3.3.3.5 Transkriptionsanalyse des *pcm*-Gens in TY-Vollmedium

Mit Hilfe des *gusA*-Reporter gens, welches in das *pcm*-Gen inseriert wurde, konnte die Expression des *pcm*-Gens quantitativ als relative  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität unter verschiedenen Bedingungen bestimmt werden (siehe 2.19). Messungen, die nach Anzucht von Rm1021-EH45 in TY-Vollmedium durchgeführt wurden, zeigten, daß die Expression mit Beginn der stationären Wachstumsphase am höchsten war und daß sie mit durchschnittlichen relativen  $\beta$ -Glucuronidase-Werten von 1979 um den Faktor 3,8 gegenüber den Werten der frühen logarithmischen Phase erhöht waren (siehe Abb 36).



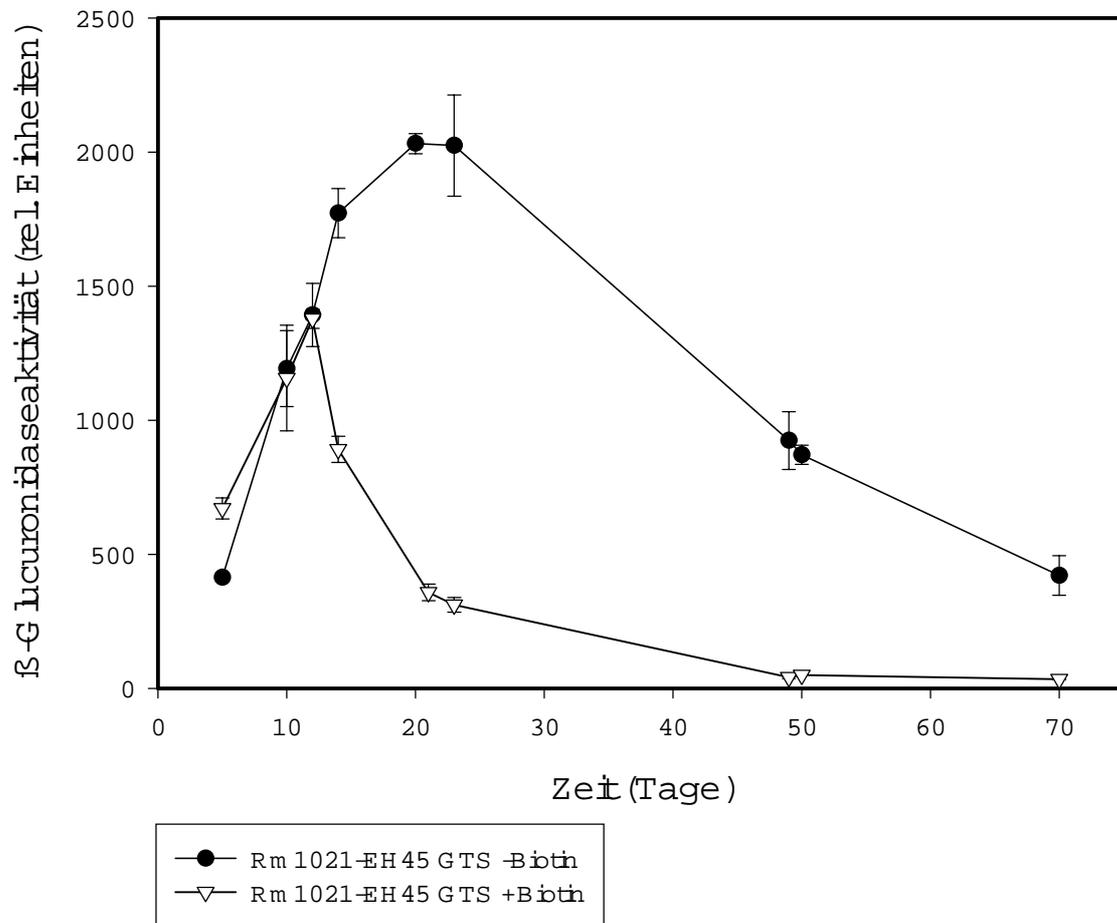
**Abb. 36 Expression des *pcm*-Gens in TY-Vollmedium**

Dargestellt wurden die rel.  $\beta$ -Glucuronidaseaktivitäten (graue Balken) und die optischen Dichten ( $OD_{600}$ ; Kurve) der Kulturen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit (Bestimmung der relativen  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität siehe 2.19) Die Expression des *pcm-gusA*-Konstruktes war in der frühen stationären Wachstumsphase am höchsten.

**3.3.3.6 Transkriptionsanalyse des *pcm*-Gens in GTS-Minimalmedium**

Da das *pcm*-Gen unmittelbar stromaufwärts des Biotin-regulierten *bioS*-Gens lokalisiert ist, sollte auch die Abhängigkeit der Expression des *pcm*-Gens durch Biotin untersucht werden. Rm1021-45 wurde durch zwei Passagen im nicht Biotin-supplementierten GTS-Medium ausgehungert und eine solche Biotin-limitierte Kultur diente dann als Vorkultur mit der jeweils drei Kulturgefäße GTS-Minimalmedium ohne Biotin und GTS-Minimalmedium mit 40 nM Biotin beimpft wurden. Wie in Abb. 37 dargestellt ist, nahm die *pcm-gusA*-Transkription in GTS Medium mit Biotin in den ersten Tagen der Inkubation zu und fiel dann auf ein niedrigeres Niveau zurück. Nach 49, 50 bzw. 70 Tagen Inkubation im Biotin-supplementierten GTS-Medium war nahezu keine Aktivität mehr meßbar.

Auch die *pcm-gusA*-Transkription der unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogenen Kulturen stieg zunächst an. Messungen, die am 10. und 12. Tag der Inkubation durchgeführt wurden, zeigten noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Anzuchtbedingungen. Nach 14 Tagen fielen die Aktivitäten der Biotin-supplementierten Kulturen ab während die der Biotin-limitierten Kulturen noch weiter anstiegen und mit Werten von durchschnittlich 2029 rel. *gusA*-Einheiten nach 20 Tagen Inkubation ihren Maximalwert erreichten. Danach fielen die Werte ab, blieben aber immer deutlich über denen der Biotin-supplementierten Kulturen. Nach 14 Tagen war die *gusA*-Aktivität der Biotin-limitierten Kulturen um den Faktor 2,2, nach 20 Tagen um den Faktor 5,5, und nach 70 Tagen Inkubation um den Faktor 13,6 erhöht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität des Reportergens und damit auch die Transkription des *pcm*-Gens durch die Anwesenheit von Biotin im Medium beeinflußt wurden.



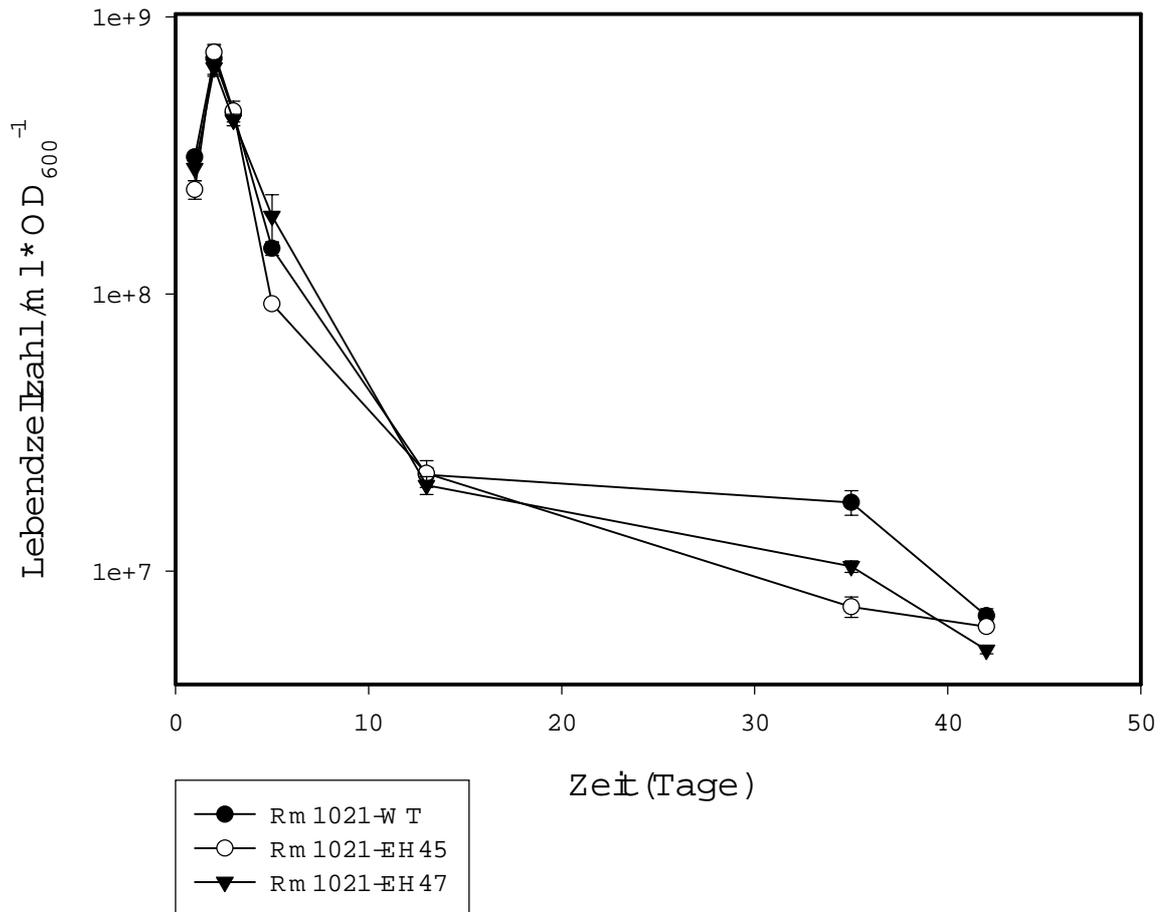
**Abb. 37** Transkriptionsanalyse des *pcm*-Gens in GTS-Minimalmedium mit und ohne Biotin

Dargestellt wurden die rel.  $\beta$ -Glucuronidaseeinheiten (siehe 2.19), die in der *pcm-gusA*-Mutante Rm1021-EH45 nach Anzucht im Biotin-supplementierten und Biotin-limitierten GTS-Minimalmedium gemessen wurden. Die Werte stellen Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen mit Standardabweichungen dar.

### 3.3.3.7 Überleben von Rm1021-EH45, Rm1021-EH47 und Rm1021 in TY-Vollmedium

Mit Hilfe von Wachstumsstudien wurde überprüft, ob die Mutanten Rm1021-EH45 und Rm1021-EH47 eine verminderte Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp haben. Dazu wurden die Mutanten und der WT in TY-Medium in jeweils drei Parallelkulturen angezogen, nach verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot der Kultur entnommen und die optische Dichte bestimmt. Nach Anlegen von Verdünnungsreihen wurden verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert, inkubiert und ausgezählt. Wie in Abbildung 38 dargestellt,

zeigten die beiden Mutanten keine signifikante Einschränkung in der Wachstumsfähigkeit. Daher ist davon auszugehen, daß die mutierten Gene unter den getesteten Bedingungen keine Bedeutung für das Überleben weder in der logarithmischen noch in der stationären Wachstumsphase für *S. meliloti* haben.



**Abb. 38 Überleben von Rm1021, Rm1021-EH45 und Rm-EH47 in TY-Vollmedium**  
 Dargestellt ist die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten/ml bezogen auf die optische Dichte der Kulturen nach Ausplattierung nach verschieden langen Wachstumszeiten. Dabei zeigten die Mutanten Rm1021-EH45 und Rm1021-EH47 keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt wurden die Mittelwerte dreier Parallelkulturen inklusive Standardabweichung.

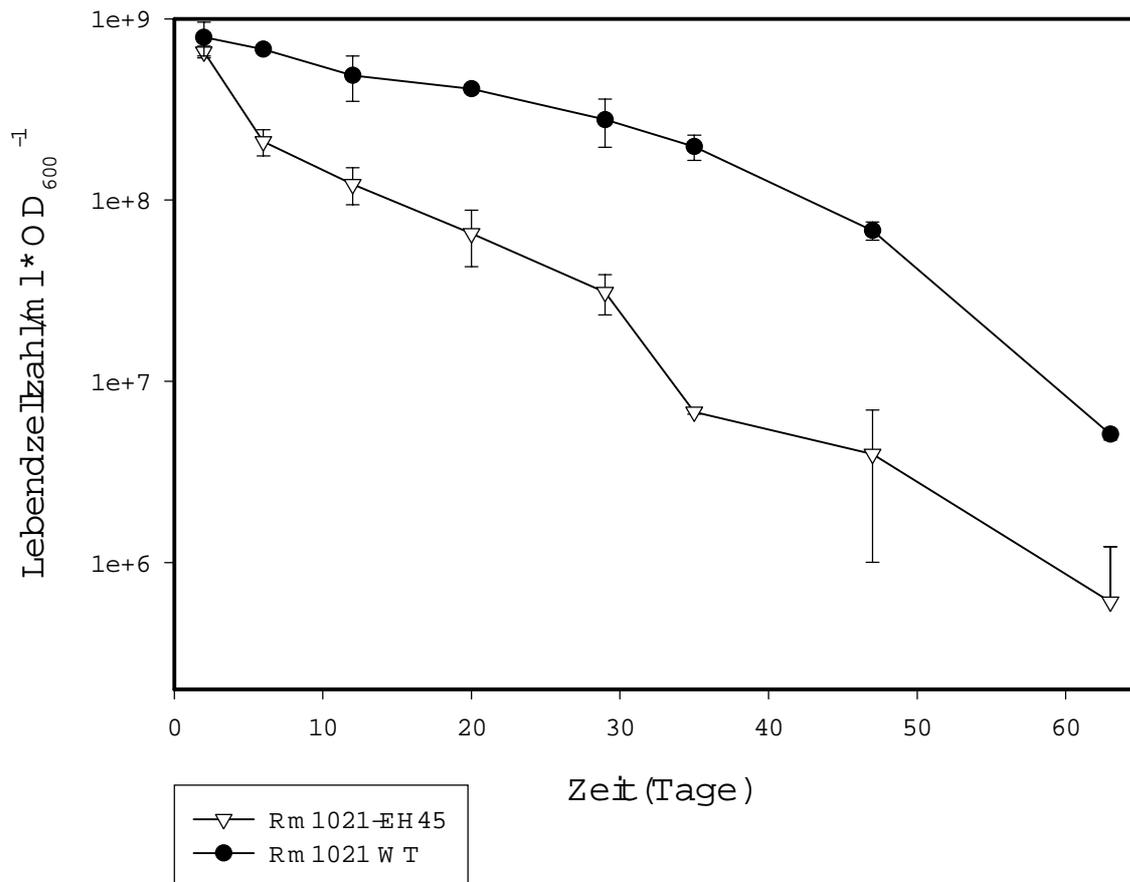
### 3.3.3.8 Wachstumsversuche der *pcm*-Mutante Rm1021-EH45, der *surE*-Mutante Rm-EH47 und Rm1021 in GTS-Minimalmedium

Analog zu den Wachstumsversuchen in TY-Vollmedium wurden auch Überlebensstudien in GTS-Minimalmedium durchgeführt. Da die Expression des *pcm-gusA*-Konstruktes unter Biotin-limitierenden Bedingungen in GTS-Minimalmedium um ein Vielfaches erhöht war, gegenüber den Werten, die für die Biotin-supplementierten Kulturen gemessen wurden, erschien es interessant, das Überleben unter Biotin-limitierenden Bedingungen zu untersuchen. Erste Wachstumsstudien hatten gezeigt, daß die *pcm*-Mutante im Gegensatz zu der *surE*-Mutante Rm1021-EH47 und der ebenfalls untersuchten *bioS*-Mutante Rm1021-B5 einen Überlebensphänotyp zeigte. Daher wurden für Langzeitexperimente nur noch die *pcm*-Mutante Rm1021-EH45 und der Wildtyp detaillierter untersucht. Nach Anzucht der Vorkulturen von Rm1021-EH45 und des Wildtyps Rm1021 unter Biotin-limitierenden Bedingungen wurden je drei 2 l-Erlenmeyerkolben mit 200 ml GTS-Minimalmedium ohne und mit Biotinsupplementation (40 nM) beimpft und auf dem Rundschtüttler bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung des Titers erfolgte durch Anlegen von Verdünnungsreihen und Ausplattierung auf GTS-Agarplatten. Diese wurden ohne Zugabe von Biotin angesetzt, jedoch ist nicht auszuschließen, daß der zugegebene Agar Biotinkontaminationen enthielt. Durch Kolonie-PCR wurde stichprobenartig die Stabilität der *pcm*-Mutante überprüft, um auszuschließen, daß es zu Reversionen oder Kontaminationen während der langen Versuchsdauer kam.

In Abb. 39 sind die Ergebnisse der Überlebensversuche dargestellt. Die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten pro ml Medium wurden bestimmt, die Werte auf  $OD_{600}=1$  umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Dabei zeigte sich, daß die *pcm*-Mutante Rm1021-EH45 nach 2 Tagen Inkubation einen nicht signifikant unterschiedlichen Titer im Vergleich zum Wildtyp hatte. Nach 6 Tagen Inkubation dagegen, lag der Titer der Mutante um den Faktor 3,7 unter dem des Wildtyps, nach 12 Tagen um den Faktor 3,9 und nach 20 Tagen Inkubation um den Faktor 6,2. Die größte Diskrepanz wurde nach 35 Tagen gemessen, als der Durchschnittswert des Titers des Wildtyps bei  $1,97 \cdot 10^8$  Lebendzellzahl/ml  $\cdot OD_{600}^{-1}$  und der der Mutante bei  $6,71 \cdot 10^6$  Lebendzellzahl/ml  $\cdot OD_{600}^{-1}$  lag. Die Titer der Kulturen nahmen bei beiden Stämmen im Laufe der Inkubationszeit ab, jedoch konnte bei der Mutante in der Stationärphase eine verminderte Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Mutation des *pcm*-Gens zu einem Überlebensphänotyp führte und das

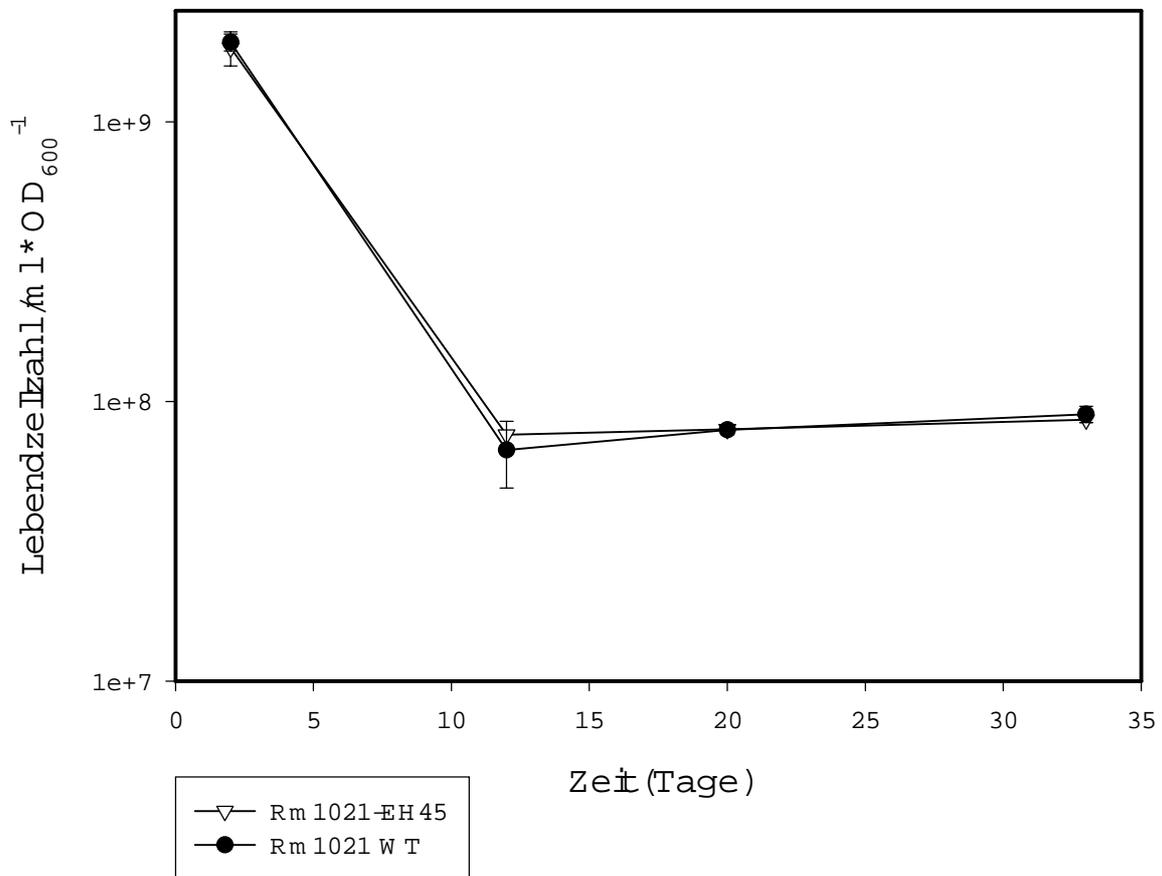
*pcm*-Gen eine Rolle beim Überleben in der stationären Wachstumsphase unter Biotin-limitierenden Bedingungen spielt.

Wurden der Wildtyp und die Mutante Rm1021-EH45 im Biotin-supplementierten GTS-Minimalmedium inkubiert, konnten dagegen nach bis zu 33 Tagen andauernder Inkubation keine voneinander signifikant abweichenden Titer bestimmt werden.



**Abb. 39 Überleben von Rm1021-EH45 und Rm1021 in GTS-Minimalmedium unter Biotin-limitierenden Bedingungen**

Dargestellt ist die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten pro ml Kultur bezogen auf die optische Dichte der Kulturen nach Ausplattierung nach verschiedenen langen Inkubationszeiten. Dargestellt wurden die Mittelwerte dreier Parallelkulturen inklusive Standardabweichung. Die *pcm*-Mutante Rm1021-EH45 zeigte dabei bereits nach 6 Tagen Wachstum in GTS-Minimalmedium ohne Biotin gegenüber dem Wildtyp eine verminderte Fähigkeit, Kolonien zu bilden.



**Abb. 40 Überleben von Rm1021-EH45 und Rm1021 im Biotin-supplementierten GTS-Minimalmedium**

Unter diesen Versuchsbedingungen war das Überleben der *pcm*-Mutante Rm1021-EH45 im Vergleich zum WT Rm1021 nicht eingeschränkt.

### 3.3.3.9 Komplementation der *pcm*-Mutante Rm1021-EH45

Mit der Komplementation der *pcm*-Mutante durch das *S. meliloti pcm*-Gen sollte überprüft werden, ob der beobachtete Phänotyp durch eine intakte Version des Gens aufgehoben werden kann. Das *pcm*-Gen wurde als 859 bp *EcoRI*-Fragment aus pSK::*surE/pcm* herausgeschnitten. Die 5'-Schnittstelle befand sich an Basenpaar-Position 556 des *surE*-Gens und die 3'-Schnittstelle im Vektoranteil. Das intakte *pcm*-Gen wurde in den *EcoRI* geschnittenen Vektor pBBRMCS1 kloniert und das resultierende Konstrukt mit *E. coli* S17-1 als Donorstamm nach Rm1021-EH45 mobilisiert. Der Vektor pBBRMCS1 trägt eine Kanamycinresistenz und ist replizierbar in *S. meliloti*. Mit dem

Komplementationsstamm Rm1021-K-EH45, der Mutante Rm1021-EH45 und dem Wildtyp Rm1021 wurden Wachstumsversuche unter Biotin-limitierenden Bedingungen durchgeführt. Die Mutante und der Wildtyp zeigten nach 12 Tagen Inkubation und Ausplattierung ein den Erwartungen entsprechendes Wachstumsverhalten ( $Rm1021=4,98 * 10^8$  und  $Rm1021-EH45=9,7 * 10^7$  Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$ ) der Komplementationsstamm dagegen wuchs schlechter ( $3,02 * 10^7$  Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$ ). Um zu überprüfen, ob die zusätzliche Kopie des *pcm*-Gens oder das Vorhandensein des Plasmids selbst zu vermindertem Wachstum führten, wurde das Plasmid pBBRMCS1 in den WT Rm1021 mobilisiert und in drei Parallelkulturen unter Biotin-limitierenden Bedingungen inkubiert. Analog dazu wurden auch die *pcm*-Mutante und der Komplementationsstamm mitgeführt. Erneut wurde nach 12 Tagen ausplattiert und die Lebendzellzahlen bestimmt. Der Komplementationsstamm wuchs wieder sehr schlecht ( $1,41 * 10^7$  Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$ ) und auch der Wildtyp zeigte mit  $9,6 * 10^7$  Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$  eine um den Faktor 5,07 bzw. 5,19 verminderte Zellzahl gegenüber vorangegangenen Untersuchungen ( $4,87$  und  $4,98 * 10^8$  Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$ ). Das heißt, daß das Vorhandensein des Plasmids pBBRMCS1 unter den genannten Wachstumsbedingungen zu einer verminderten Lebendzellzahl führte. Für die *pcm*-Mutante wurde ein Wert von  $1,92 * 10^8$  Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$  bestimmt, der leicht über dem vorangegangener Werte lag ( $1,22 * 10^8$  und  $9,7 * 10^7$  Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$ ). Bei allen Werten handelt es sich um Mittelwerte dreier Parallelkulturen.

Durch Mobilisation des in das Plasmid pBBRMCS1 inserierten *pcm*-Gens in die Mutante Rm1021-EH45 konnte der Überlebensphänotyp der Mutante nicht komplementiert werden, da das Vorhandensein des Plasmids selbst offensichtlich zu verminderter Wachstumsfähigkeit führte, wie hier für den WT gezeigt wurde.

### **3.3.3.10 Wachstumsversuche von Rm1021-EH45, Rm1021-EH47 und Rm1021 unter verschiedenen Streßbedingungen**

In *E. coli* wurde bereits gezeigt, daß *pcm*-Mutanten, die in der stationären Wachstumsphase mit 0,5 % (v/v) Methanol oder 0,1 mg/ml Paraquat (Oxidationsmittel) versetzt werden, eine verminderte Überlebensfähigkeit zeigen (Visick und Clarke, 1998). Auch bei Pflanzen wird die Methyltransferaseaktivität in Abhängigkeit von Dehydrierung und anderen Streßbedingungen aktiviert. Da das *pcm*-Gen in der Stationärphase induziert wird und unter Biotin-limitierenden Bedingungen, offensichtlich auch eine Streßsituation

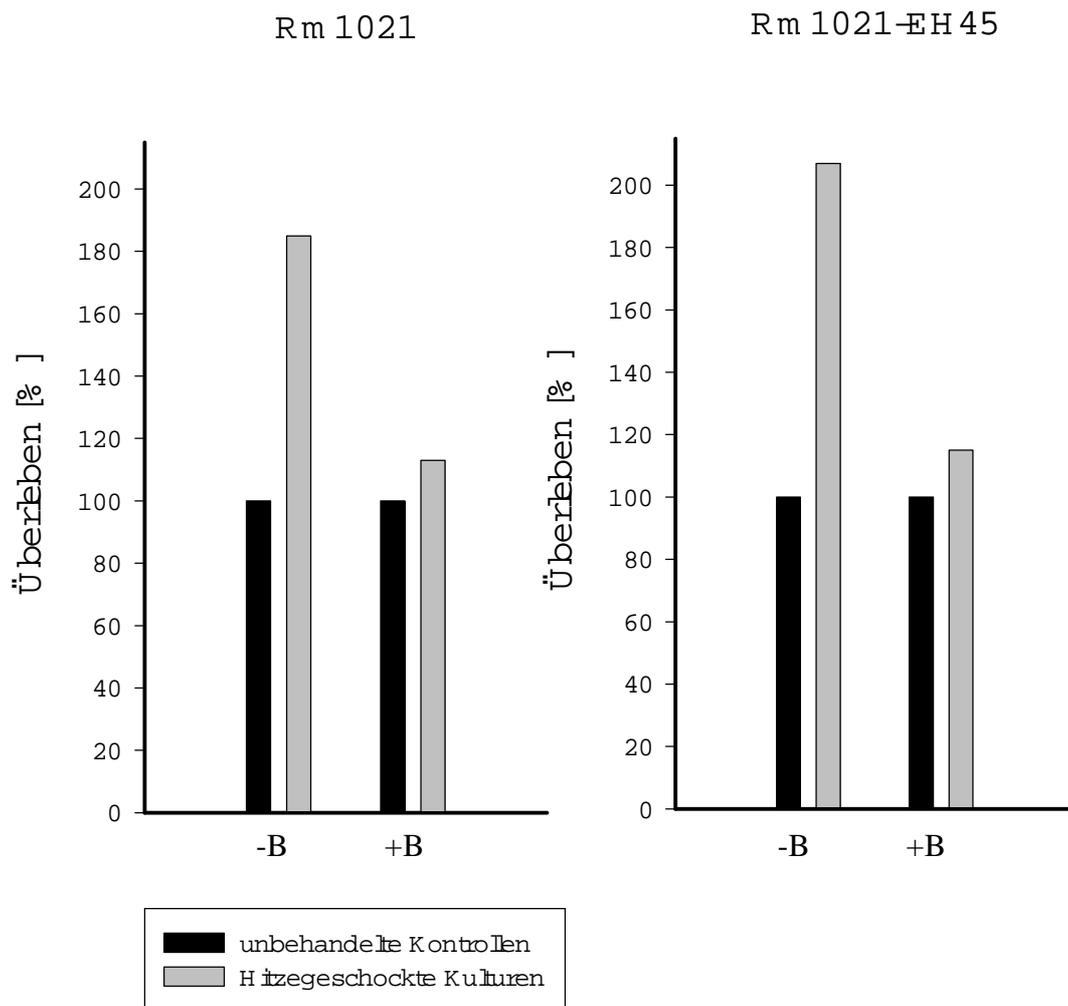
für die Rhizobien, ein vermindertes Überleben beobachtet wurde, sollte in diesem Teil der Arbeit der Einfluß von anderen potentiellen Streßfaktoren untersucht werden.

In ersten Versuchen wurden die Mutanten Rm1021-EH45, Rm1021-EH47 und der Wildtyp in TY-Medium angezogen und jeweils drei 5 ml Parallelkulturen in der stationären Wachstumsphase (4 Tage Inkubation) mit MeOH (Endkonzentration 0,5 % (v/v)) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Endkonzentration 27 mM) versetzt oder 2 min lang bei 38 °C bzw. 41 °C inkubiert. Die Bestimmung der Titer durch Ausplattierung 2,5 h bis 7 Tage nach Zugabe der Agenzien bzw. Hitzeinkubation zeigte keine signifikante Abnahme der Zellzahl der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Auch die Verdopplung der zugegebenen MeOH bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration zeigten keine Veränderungen. Dieselben Versuche wurden ebenfalls im Biotin-supplementierten GTS-Minimalmedium mit 4 Tage alten Stationärphasekulturen durchgeführt. Auch hier war kein Phänotyp zu beobachten. Schließlich wurden die Mutanten und der Wildtyp in GTS und TY-Medium mit verschiedenen Mengen an NaCl inkubiert. Während in TY-Medium mit 0,2 M NaCl alle drei Stämme uneingeschränkt wachsen konnten, war das Wachstum im Biotin-haltigen GTS-Medium nur bis zu einer Salzkonzentration von 0,1 M möglich.

In weiteren Versuchen wurden der Wildtyp und die *pcm*-Mutante über zwei Passagen im nicht Biotin-supplementierten GTS-Medium inkubiert. Mit einer solchen Biotin-limitierten Vorkultur wurden jeweils sechs nicht Biotin-supplementierte und sechs GTS-Röhrchen mit 40 nM Biotin je Stamm angeimpft und bei 30 °C inkubiert. 72 h nach Animpfen der Kulturen wurden je drei supplementierte und nicht supplementierte Kulturen 20 min bei 39 °C inkubiert und unmittelbar danach, zusammen mit den unbehandelten Kontrollen, ausplattiert. Die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten bezogen auf die OD<sub>600</sub> wurde durch Auszählen ermittelt. Dabei zeigte sich, daß sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante Rm1021-EH45 in den hitzegeschockten Biotin-limitierten Kulturen wesentlich besser anwachsen als die unbehandelten Kontrollen (siehe Abb. 41).

Der Mittelwert der Titer, die für die Kontrollen bestimmt wurde, wurde als 100 % festgesetzt, so daß für den Wildtyp nach Hitzeschock unter Biotin-limitierenden Wachstumsbedingungen ein durchschnittlicher Titer von 185 % und für die *pcm*-Mutante von 207 % bestimmt werden konnte. In den Biotin-supplementierten Kulturen wurden nach Hitzebehandlung leicht erhöhte Titer bestimmt, diese waren aber weniger stark von den Kontrollen abweichend (113 % bei Rm1021 und 115 % Rm1021-EH45). Für die gewählten Streßbedingungen konnte für Rm1021-EH45 kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp gefunden werden. Interessant ist aber, daß Hitzestreß, der unter Biotin-

limitierenden Bedingungen erfolgte, in *S. meliloti* zu einem deutlich besseren Überleben führte, als das für Kulturen zu beobachten war, welche im Biotin-haltigen Medium angezogen worden waren.



**Abb. 41 Überleben von Rm1021 und Rm1021-EH45 nach Anzucht in GTS-Minimalmedium mit und ohne Biotin nach Hitzeschock**

Der Mittelwert der Titer der unbehandelten drei Kontrollen unter jeder Bedingung wurde jeweils für den Wildtyp und die *pcm*-Mutante Rm1021-EH45 als 100 % festgesetzt. Sowohl beim WT als auch bei der Mutante konnte unter Biotin-limitierenden Bedingungen (-B) nach Hitzeschock eine starke Zunahme der Titer beobachtet werden, während unter Biotinsuffizienz (+B) der Titer nur leicht anstieg.

## 4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien verfolgt, um weitere Biotin-regulierte Gene in *S. meliloti* 1021 zu identifizieren. Dazu zählten die 2D-Gelelektrophorese und die Expressionsanalyse von gezielt aus den Datenbanken ausgewählten Genen, welche an Prozessen wie der Nodulation, Autoinduktion oder Phospholipidbiosynthese involviert sind. Desweiteren wurden die *surE*- und *pcm*-Gene aus dem *Survival-Locus* charakterisiert und deren Bedeutung für das Überleben in der stationären Wachstumsphase untersucht.

Die 2D-Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit unter verschiedenen Bedingungen die Proteinexpression eines Organismus oder Gewebes zu analysieren. Zur Identifizierung von Biotin-induzierbaren Genen bzw. Genprodukten in *S. meliloti* 1021 wurde in dieser Arbeit die vergleichende Proteomanalyse durchgeführt. Dabei wurde das Proteinmuster von zunächst unter Biotinlimitierung inkubierten Rhizobien mit dem Proteinmuster Biotin-supplementierter Kulturen verglichen. Durch den wiederholten Transfer von *S. meliloti* in nicht Biotin-supplementiertes GTS-Minimalmedium erreichten die Kulturen nur geringe optische Dichten und durch die lange Inkubation unter diesen Bedingungen (32-37 Tage) befanden sich die Bakterien stets in der stationären Wachstumsphase. Durch die Zugabe von 40 nM Biotin kam es nach einer *lag*-Phase, deren Dauer vom Alter der unter Biotinlimitierung inkubierten Kulturen abhing, zu erneutem Wachstum. Die optische Dichte der Kulturen nahm zu und die Kulturen wurden in der exponentiellen Phase geerntet.

Die 2D-Gel Analyse ergab, daß ein Großteil der etwa 600 Protein-*Spots* unter beiden Bedingungen zu sehen war. Unter Biotin-limitierenden Bedingung traten etwa 50 zusätzliche *Spots* auf, die nach Biotinsupplementation nicht oder kaum zu sehen waren. Diese befanden sich vor allem im niedermolekularen Bereich bei relativ geringen pI-Werten (siehe Abb. 2). Biotinsupplementation führte zur Induktion von etwa 70 Proteinen. 18 Proteine, die nach Biotinsupplementation verstärkt exprimiert wurden und auch im Coomassie gefärbten Gel eindeutig zuzuordnen waren, wurden massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurden 12 Proteine identifiziert.

In mehreren Studien wurden bereits früher bei verschiedenen Rhizobien mit Hilfe der vergleichenden Proteom-Analyse Proteine identifiziert, die unter definierten Bedingungen induziert oder reprimiert waren. Natera et al. (2000) verglichen unter anderem die Proteinmuster von nicht pflanzenassoziierten *S. meliloti* 1021-Zellen, die in Flüssigkultur

in der frühen exponentiellen Phase geerntet wurden, mit denen von Bacteroiden. In den Bacteroiden waren 130 Proteine verstärkt exprimiert oder induziert und mindestens 350 Proteine in ihrer Expression vermindert oder überhaupt nicht vorhanden. Von den in den freilebenden Rhizobien erhöht exprimierten Proteinen konnten insgesamt 27 identifiziert werden, darunter das SurE-Protein, periplasmatische Bindeproteine für Sorbitol und Dipeptide und ein periplasmatisches Bindeprotein eines ABC-Transporters, welcher nicht näher definiert wurde. In den Bacteroiden wurden u.a. die Enzyme der PHB-Synthese herunterreguliert. Die vergleichende Proteomanalyse von *S. meliloti* 1021-Zellen aus der frühen exponentiellen Phase ( $OD_{600}=0,3$ ) und der späten exponentiellen Phase ( $OD_{600}=1,2$ ) ergab, daß mindestens 52 Proteine mit verändertem Expressionsniveau in den 2D-Gelen zu sehen waren. Letztlich wurden davon nur zwei Proteine mit erhöhter Expression in der späten exponentiellen Phase identifiziert. Desweiteren wurde das Proteinmuster von Zellen analysiert, die mit dem pflanzlichen Induktor Luteolin versetzt wurden. Sechs und 17 Stunden nach Luteolinsupplementation konnten keine Veränderungen im Proteom beobachtet werden (Guerreiro et al., 1999). Dagegen zeigten Versuche in *R. leguminosarum*, daß die Zugabe des pflanzlichen Induktors Dihydroxyflavon zwar auch nicht die generelle Expression der Proteine beeinflusste, aber zumindest 4 Proteine neu induziert waren. Zwei dieser Proteine konnten identifiziert werden (Guerreiro et al., 1997). Proteomanalysen dieser Arbeit demonstrierten, daß sechs Stunden nach Biotinzugabe noch keine eindeutig reproduzierbaren neuen *Spots* auf den 2D-Gelen auftraten. Dies kann viele Ursachen haben. Unwahrscheinlich ist, daß die Zellen das Biotin aus der Umgebung noch nicht wahrgenommen haben. Vermutlich führen eher technische Probleme der Proteinaufarbeitung und Visualisierung dazu, daß keine Veränderungen in der Expression auf den 2D-Gelen sichtbar sind. Generell werden während der Proteinaufarbeitung Proteine verloren, darunter vor allem hydrophobe Proteine wie Membranproteine aufgrund der schlechten Löslichkeit im Probenpuffer oder Präzipitation in der ersten Dimension. Desweiteren ist die Kopienzahl der Proteine innerhalb der Zelle ein limitierender Faktor. In analytischen Gelen sind nach Silberfärbung nur die Proteine sichtbar, die in einer Anzahl von mindestens mehreren tausend Kopien pro Zelle vorhanden sind (Wilkins et al., 1998). Dabei gingen die Forscher davon aus, daß 100 µg Protein pro Gel geladen werden, einer Menge, die auch bei den Gelen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Nur bei Beladung des Gels mit 5 mg könne man auch Proteine nach Silberfärbung sehen, die in einer Anzahl von 1000 Kopien pro Zelle vorhanden sind. Gerade aber Regulatorproteine, die an der Wahrnehmung des exogenen Biotins und Weiterleitung und Verarbeitung des „Biotin-

Signals“ beteiligt sein könnten, sind vermutlich in einer geringeren Kopienzahl in der Zelle vorhanden und daher auf den Gelen nicht detektierbar.

#### **4.1 *S. meliloti* 1021-Proteine mit erhöhter Expression nach Biotin-supplementation des Mediums**

Insgesamt wurden 18 Proteine mit erhöhter Expression nach Biotinsupplementation aus den Gelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. 12 Proteine konnten dabei eindeutig identifiziert werden (siehe Tab. 7). Im folgenden wird auf die Rolle dieser Proteine eingegangen.

**Protein A:** Protein A, welches unter Biotin-limitierenden Bedingungen im geringen Maße und nach Biotinsupplementation stark induziert wird, ist das 50S ribosomale Protein L7/L12, welches durch das *rplL*-Gen codiert wird. Generell gibt es eine Korrelation zwischen der Ribosomenkonzentration und der Wachstumsrate in *E. coli* (Nomura, 1999). In anderen Studien wurde die Genexpression der ribosomalen Proteine in *Streptomyces coelicolor* während verschiedener Wachstumsphasen mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese untersucht (Blanco et al., 1994). Man konnte zeigen, daß die meisten ribosomalen Proteine in allen Wachstumsphasen synthetisiert werden, in frühen Wachstumsphasen ist die Syntheserate jedoch erhöht. Interessanterweise gibt es auch ribosomale Proteine, deren Expression nach 20-24 h Inkubation zu Beginn der stationären Wachstumsphase stark abnimmt und die nach 28 h und 48 h Wachstum nicht mehr detektierbar sind. Dabei handelt es sich um L7/L12 und L10. Bisher konnte nicht geklärt werden, warum dieser Effekt nur bei diesen ribosomalen Proteinen auftritt. In *S. meliloti* ist die Expression von L7/L12 auch unter Biotin-limitierenden Bedingungen in der Stationärphase herunterreguliert und wird mit Wachstumsbeginn offensichtlich induziert. Generell wird die ribosomale Proteinsynthese durch ppGpp im Rahmen der stringenten Kontrolle reguliert. Allgemein geht man davon aus, daß die Regulation durch ppGpp einer der Faktoren ist, der es Bakterien erlaubt sich an limitierende Nährstoffbedingungen (*starvation*) anzupassen. In *E. coli* und *Vibrio angustum* wurde nachgewiesen, daß nach Fettsäure (FS)-Aushungerung eine SpoT (SpoT=ppGpp-Synthetase und ppGpp-Hydrolase) vermittelte ppGpp-Akkumulation auftritt und man spekulierte, daß SpoT ein Signal wahrnimmt, welches im FS-Stoffwechsel eine Rolle spielt, um die Verfügbarkeit von C-Quellen zu erfassen (Gong et al., 2002). Damit einhergehend sind Beobachtungen von Seyfzadeh und Mitarbeitern (1993). *E. coli* Zellen mit einer Mutation des *accD*-Gens,

welches für eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase codiert, einem Schlüsselenzym der FS-Synthese, zeigen unter anderem eine veränderte ppGpp Akkumulation und den Verlust der Fähigkeit schnell auf die Zugabe von Nährstoffen zu reagieren. Das ist insofern interessant, als daß Biotin als Cofaktor für dieses Enzym benötigt wird. Somit läßt sich vermuten, daß es durch Biotinlimitation in *S. meliloti* zu einer Inhibierung der Fettsäuresynthese kommt. Ob dies letztlich auch ein Signal ist, die ppGpp-Synthese in *S. meliloti* zu stimulieren und damit die stringente Kontrolle einzuleiten, wodurch beispielsweise die verringerte Expression von L7/L12 unter Biotin-limitierenden Bedingungen verursacht werden könnte, muß noch geklärt werden. Während man zunächst annahm, daß in *Rhizobium* sp. die ppGpp-Synthese nur durch C-Quellen-Mangel induziert werden kann, zeigten neuere Arbeiten, daß in *S. meliloti* 1021, im Gegensatz zu zwei weiteren Rhizobienstämmen, auch Aminosäuren- und Ammonium-Mangel die Akkumulation von ppGpp stimuliert (Howorth und England, 1999). In *S. meliloti* gibt es nur ein RelA/SpoT-Protein [SMc02659] (RelA=ppGpp-Synthetase) und die stringente Kontrolle spielt eine Rolle bei der Knöllchenbildung und der Bildung des Exopolysaccharides Succinoglycan (Wells und Long, 2002).

Letztlich führt Biotinlimitierung zu vermindertem Wachstum, damit einhergehend offensichtlich zu einer eingeschränkten Proteinsynthese, was sich in verringerter Expression ribosomaler Proteine widerspiegelt.

**Proteine B/C:** Beide Proteine wurden als CopC-Protein bestimmt und waren leicht unter Biotinlimitierung und stark nach Biotinsupplementation induziert (siehe Abb. 4). *CopC*-Gene sind Teile von *cop*-Operons, welche in vielen pflanzenpathogenen Bakterien zu finden sind und an der Resistenz gegenüber Kupfer aber auch an der Akkumulation von Kupfer involviert sind. In diesen Organismen codiert *copC* für ein periplasmatisches Kupfer-bindendes Protein, welches möglicherweise am Transport des Kupfers in die Zelle beteiligt ist, um somit genug Kupfer für Kupfer-abhängige Enzyme in die Zelle zu transportieren (Cooksey, 1994). Die Expression des *cop*-operons ist durch Kupfer induzierbar und wird durch die Regulatorproteine CopR und CopS kontrolliert, die selber konstitutiv exprimiert werden. CopC wurde bisher in *S. meliloti* 1021 noch nicht charakterisiert. Durch Analyse der Proteinsequenz (Scan-prosite: [www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite](http://www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite)) wurde in dieser Arbeit eine Multi-Kupfer-Oxidase-Signatur identifiziert, welche sich an Position 134-154 des Peptides befindet (konservierte Aminosäuresequenz: G-x-[F]-x-[I]-x(8)-G-[M]-x(3)-[V]) und welche auch in anderen Cop-Proteinen wie CopA vorkommt. Desweiteren findet man durch Sequenzanalyse im N-Terminus ein

Signalpeptid, welches als Indiz für die Sekretion des CopC-Proteins in das Periplasma bewertet werden kann (iPSORT-prediction: <http://hypothesiscreator.net/ipsort/predict.cgi>). Das *copC*-Gen ist in *S. meliloti* im 3'-Bereich von *copA* lokalisiert, jedoch befinden sich stromabwärts der beiden Gene keine weiteren *cop*-Gene wie in *Pseudomonas* spp. (*copB*, *copD*, *copR* und *copS*). Da *copB* aus *Enterococcus hirae* *copA* aus *E. coli* komplementiert kann man vermuten, daß nicht alle *cop*-Gene für die Funktionalität des Resistenz- oder Transport-Systems essentiell sind. CopR und CopS aus *Pseudomonas* spp. zeigen Ähnlichkeit zu einem Transkriptionsregulator und einer Sensor-Histidin-Kinase aus *S. meliloti*. Dabei handelt es sich um ORF SMC02366 (45 % identische AS und 61 % ähnliche AS zu *copR* aus *Pseudomonas fluorescens*) und dem unmittelbar stromabwärts gelegenen ORF SMC02367 (27 % identische AS und 46 % ähnliche AS zu *copS* aus *P. fluorescens*). Für *copB* und *copD* wurden keine homologen Gene durch *blast*-Analysen des *S. meliloti*-Genoms gefunden. Letztlich muß die Organisation und detaillierte Funktion der *cop*-Gene in *S. meliloti* noch aufgeklärt werden.

Promotoraktivitätsmessungen des *copC*-Gens zeigten, daß sich die durch 2D-Gel-Analyse gemachten Beobachtungen bestätigen lassen (siehe Abb. 25). Im Biotin-supplementierten Medium wurden 1,5- bis 5,0-fach erhöhte relative *gusA*-Aktivitäten einer Promotor-Reporterfusion in *S. meliloti* gemessen. Wird *S. meliloti* analog zu den Anzuchtbedingung für die Proteomanalyse inkubiert, kann nach 35-tägiger Inkubation unter Biotinlimitierung und anschließender Biotinsupplementation eine 18-fach erhöhte Expression bestimmt werden. Vermutlich handelt es sich bei der verstärkten Expression des *copC*-Gens nach Biotinsupplementation um einen sekundären Effekt im Rahmen des wiederaufgenommenen Wachstums, um die Zelle vor Kupfer aus dem Medium zu schützen oder den Kupfer-Bedarf Kupfer enthaltender Enzyme zu sichern.

Offensichtlich handelt es sich bei B und C um isoforme Proteine, die in ihrer Masse annähernd identisch sind und sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden, so daß ein anderes Laufverhalten in der ersten Dimension beobachtet werden konnte. Isoforme Proteine können Produkte posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierung, Glycosylierung oder Acetylierung sein. Sogenanntes „Protein-Stottern“, also das Auftreten mehrerer Protein-*Spots* nebeneinander, kann aber auch durch den fehlerhaften Einbau von Aminosäuren in das Protein verursacht werden. Eine verminderte Translationsgenauigkeit tritt z. B. in *E. coli* Zellen auf, die aufgrund C-Quellen-Limitierung nicht mehr teilungsfähig sind (Ballesteros et al., 2001). Man schätzt, daß 18 % der Proteine aus *E. coli* als isoforme Proteine vorliegen (Link et al., 1997). In *S. meliloti* lagen von 400

untersuchten Proteinen 10 % als isoforme Proteine vor. Unter diesen isoformen Proteinen war das PII-Protein, GroEL mit jeweils zwei Isoformen oder auch NifH, von dem es im Bacteroid vier Formen gab, obwohl es nur durch ein Gen codiert wird (Natera et al., 2000).

**Protein D:** Dieses Protein wurde als Omega-Untereinheit der RNA-Polymerase (RpoZ) identifiziert. Sigma-Faktoren sind generell für die Sequenzspezifität bakterieller RNA-Polymerasen essentiell. Die Funktion des RpoZ-Proteins in *S. meliloti* und damit auch Gene, die in Abhängigkeit dieses Sigma-Faktors reguliert werden, wurden bisher nicht charakterisiert. In *R. leguminosarum* befindet sich *rpoZ* in 3'-Richtung eines Operons, welches an der Aufnahme von Haemen als Eisenquelle beteiligt ist. RpoZ hat keinen Einfluß auf die Expression dieses Transporters, wird aber für seine eigene Transkription benötigt. Mutationen von *rpoZ* führen zu keiner veränderten symbiontischen Stickstoff-Fixierung in *Vicia* sp. und bisher konnten keine regulierten Zielgene identifiziert werden (Wexler et al., 2001). Da *rpoZ* in *E. coli* im selben Operon lokalisiert ist wie *spoT*, ging man zunächst davon aus, daß RpoZ eine Rolle bei der stringenten Kontrolle übernimmt. Weitere Arbeiten zeigten aber, daß RpoZ *in vivo* nicht für die stringente Kontrolle essentiell ist (Gentry et al., 1991). In *S. meliloti* liegt *rpoZ* auch unmittelbar stromaufwärts des *relA/spoT*-Gens. Das RpoZ-Protein aus *E. coli* bindet an die  $\beta'$ -UE der RNA-Polymerase, die Funktion ist bisher ebenfalls unbekannt (Traviglia, 1999). In dem Gram-positiven Bakterium *Streptomyces aureofaciens* ist RpoZ der sporulationsspezifische Sigmafaktor, welcher Sporulationsgene aktiviert (Kormanec et al., 1999). In welcher Weise die Induktion des *rpoZ*-Gens durch Biotin erfolgt ist unklar. Denkbar wäre auch hier, daß im Rahmen des aufgenommenen Wachstums die Transkription generell gesteigert wird und daß für die Transkription bisher unbekannter Gene die Omega-Untereinheit der RNA-Polymerase benötigt wird.

**Proteine E, F, H, I, K, L:** Da die sechs Proteine als periplasmatische ABC-Transporter-Bindeproteine identifiziert wurden, werden sie im folgenden zusammen diskutiert. Protein E ist ein generelles Bindeprotein für Aminosäuren (AapJ) und die Proteine K/L sind isoforme Proteine (siehe oben) des Vorläufers eines Leucin-spezifischen Bindeproteins. Bei Protein I handelt es sich um das Vorläufer-Bindeprotein für Glycerol-3-Phosphat UgpB. Glycerol-3-Phosphat kann als Vorstufe in der Phospholipidsynthese dienen. Für die Proteine F und H wird die Art des Substrates in der *S. meliloti* Datenbank nicht näher spezifiziert (F=Bindeprotein für Zucker, H=Bindeprotein). Zusätzliche *Blast*-Analysen der Proteinsequenzen zeigten, daß beide Proteine Homologien zu D-Ribose-Bindeproteinen

aus verschiedenen Organismen wie *E. coli*, *Salmonella typhimurium* oder *Bacillus subtilis* haben, wobei Protein H mit 107 höhere *Score*-Werte erreicht als Protein F mit 79.

In Bakterien bestehen ABC-Transporter aus einem Bindeprotein für das Substrat, zwei integralen Membranproteinen und zwei membranassoziierten ATP-Bindekassetten. Die Translokation des Substrates über die Cytoplasmamembran wird mit der Hydrolyse von ATP gekoppelt und die Substratspezifität wird durch die Bindproteine determiniert. Wichtig sind die Bindeproteine auch für die Signalerkennung bei der Chemotaxis (Ehrmann et al., 1998). Bisher wurden die Transportsysteme für Ribose oder Glycerol-3-Phosphat und deren Regulation in *S. meliloti* nicht charakterisiert. Andere periplasmatische Bindeproteine wie AgpA aus *S. meliloti*, welches  $\alpha$ -Galactoside bindet, werden durch ihr Substrat induziert. Glucose, Succinat und das Regulatorprotein SyrA, welches besonders stark während der Symbiose exprimiert wird, reprimieren die Expression des *agpA*-Gens (Gage und Long, 1998). Das Bindeprotein ThuE aus *S. meliloti* 1021 ist am Transport von Trehalose, Maltose und Sucrose beteiligt. *ThuE-lacZ*-Fusionen werden nur durch Trehalose und nicht durch Cellobiose, Glucose, Maltose, Mannitol oder Sucrose induziert. Das *aglEFGAK* Operon aus *S. meliloti* 1021 transportiert dieselben Zucker, wird aber primär durch Sucrose und nur schwach durch Trehalose induziert (Jensen et al., 2002). Da das hier verwendete GTS-Minimalmedium nur Glucose und Succinat als C-Quellen enthält, ist es fraglich, ob diese Moleküle die Expression von Ribose- und Glycerol-3-Phosphat-Transportern regulieren, da Ribose und Glycerol-3-Phosphat als Induktoren nicht vorhanden sind. Möglicherweise sind die beiden C-Quellen Glucose und Succinat nach der langen Inkubationsdauer der Kulturen und erneutem Wachstum bis zur exponentiellen Phase nach Biotinsupplementation nur noch in geringen Mengen im Medium vorhanden. Daher liegt es nahe, daß andere Zucker transportierende Proteine synthetisiert werden, um potentielle weitere C-Quellen des Mediums auszuschöpfen. In Proteomanalysen von *E. coli* wurden die Proteinmuster von Zellen verglichen, die nach Anzucht unter Glucose-Suffizienz (0,5-1,0 g/l) in Medium transferiert wurden, welches nur 0,1 g/l Glucose enthielt. Unter diesen limitierenden Bedingungen werden zwölf Proteine verstärkt exprimiert. Interessanterweise sind acht dieser Proteine periplasmatische Bindeproteine von ABC-Transportern, darunter auch UgpB (siehe Protein I), RbsB, ein periplasmatisches Bindeprotein für D-Ribose (siehe Proteine F und H) und LivJ (Bindeprotein für Leucin, Isoleucin und Valin; siehe Proteine K/L=LivK). Obwohl Glucose die einzige Energie- und C-Quelle des Mediums war, wurden auch Bindeproteine anderer Transportsysteme induziert, die nicht am Transport von Glucose beteiligt sind (Wick et al., 2001). Auch

ältere Studien in *E. coli* zeigten, daß C-Quellen-Limitierung zur Induktion von Zucker- und Peptid bindenden Proteinen und Transportsystemen führt, darunter *rbsB* (periplasmatisches Ribose-Bindeprotein; siehe Proteine F und H), ein Glycerol-3-Phosphat Transportsystem (siehe Protein I) oder *cstA*, welches an der Peptidaufnahme beteiligt ist (Alexander et al., 1993; Su et al., 1991; Schultz und Matin, 1991). Dabei werden die Gene für den Transport alternativer C-Quellen durch steigende Konzentrationen von cAMP induziert (Alexander et al., 1993). Zyklisches AMP erreicht bereits relativ hohe Konzentrationen und wirkt regulatorisch, bevor die C-Quelle im Medium auf ein Minimum reduziert ist und bevor die Wachstumsraten sinken (Notley-McRobb et al., 1997). Es interagiert mit dem Rezeptorprotein Crp (cAMP-Rezeptor-Protein) und aktiviert so die Promotoren des *crp*-Regulons. Biotinsupplementation von Biotin-limitierten *S. meliloti*-Kulturen führt zur Wachstumsaufnahme und damit zu einem Verbrauch von C-Quellen des Mediums, welches möglicherweise analog zu *E. coli* zu erhöhter cAMP Konzentration führt. Dies könnte die Induktion verschiedener periplasmatischer Bindeproteine verursachen. Analysen des *S. meliloti* Genoms zeigten, daß *ORF* [SMa1245] für einen Crp/Fnr-ähnlichen Transkriptionsregulator codiert, der 23 % identische und 49 % ähnliche AS enthält wie Crp aus *E. coli*, und daß weitere nicht klassifizierte Proteine mit Homologie zu Crp vorhanden sind (<http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti.html>). In der Literatur wurde bisher nicht über Crp oder die Rolle von cAMP in *S. meliloti* berichtet. Daß in *S. meliloti* unter den Versuchsbedingungen auch Bindeproteine für Aminosäuren induziert werden, kann damit zusammenhängen, daß diese ebenfalls als C- oder N-Quelle genutzt werden. Rhizobien können auf einer Reihe von Aminosäuren als alleiniger C- oder N-Quelle wachsen (Kahn et al., 1998). In *Brucella melitensis* wird die Expression des AapJ-Proteins nach Hitzeschock, aber nicht nach Oxidationsstreß oder niedrigem pH-Wert induziert (Teixeira-Gomes et al., 2001). Zwei der identifizierten Proteine wurden als Vorläufer-Bindeproteine (isoforme K/L und I) identifiziert. Auch in *E. coli* sind nach Glucoselimitation zwei der acht induzierten Bindeproteine als Vorläuferproteine identifiziert worden. Die Autoren gehen davon aus, daß es aufgrund der vielen zu exportierenden Bindeproteine zur Konkurrenz um die Signalpeptidase kommt und daher auch Vorläuferproteine im 2D-Gel auftauchen (Wick et al., 2001).

**Protein G:** Protein G wurde als 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase identifiziert (EC 4.1.3.16). Dieses Enzym, welches durch das *eda2*-Gen codiert wird, ist neben der 6-Phosphogluconat-Dehydratase ein Schlüsselenzym des Entner-Doudoroff-Weges. Der Entner-Doudoroff-Weg gilt als Hauptabbauweg von Kohlenstoffverbindungen

in Rhizobien (Kahn et al., 1998). Nach Biotinsupplementation kommt es zum Wachstum der *S. meliloti* 1021-Kulturen und damit zum Verbrauch der C-Quellen aus dem Medium und der Mobilisierung von PHB. Daß unter diesen Bedingungen Enzyme exprimiert werden, die an der Degradation der Zucker beteiligt sind, entspricht den Erwartungen. Obwohl die Expression der verschiedenen Bindeproteine darauf hinweist, daß Glucose zum Zeitpunkt der Zellernte limitierend ist (siehe oben), zeigt die Expression von *eda2*, daß offensichtlich noch Glucose –wenn auch möglicherweise schon in geringen Mengen– abgebaut wird.

**Protein J:** Protein J ist ein konserviertes Protein mit bisher unbekannter Funktion. *Blast*-Analysen zeigten, daß das Protein aus *S. meliloti* 77 % Identität zu einem Protein aus *Agrobacterium tumefaciens* und 53 % Identität zu einem Protein aus *Agrobacterium vitis* hat. Beide Proteine wurden in diesen Organismen nicht charakterisiert.

Durch Zugabe von Biotin zu Biotin-limitierten Stationärphasekulturen kommt es zu einer Induktion von etwa 70 Proteinen. Die Kulturen nehmen wieder Wachstum auf, was sich auch in der Expression von Proteinen widerspiegelt, welche an grundlegenden Funktionen wie der Transkription (RpoZ) oder der Translation (L7/L8) beteiligt sind. Beim Wachstum verbrauchen die Bakterien die C-Quellen des Mediums (KDPG-Aldolase), was dazu führt, daß die Konzentration dieses Nährstoffes abnimmt. Dies verursacht möglicherweise die erhöhte Expression verschiedener Bindeproteine, um potentielle andere C-Quellen des Mediums ausnutzen zu können.

## 4.2 Expressionsanalysen

### 4.2.1 Erhöhte Expression von *sinI* und *sinR* unter Biotin-limitierenden Bedingungen

Wachstum von *S. meliloti* 1021 ist unter Biotin-limitierenden Bedingungen eingeschränkt und nur bis zu geringen Populationsdichten möglich. Da Biotinmangel im Medium bei *S. meliloti* zur Synthese des Reservepolysaccharides PHB führt (Hofmann et al., 2000) und das LuxR-Regulatorprotein aus *Vibrio harveyi* die Synthese von PHB kontrolliert (Miyamoto et al., 1998), wurde untersucht, ob in *S. meliloti* die Biotinkonzentration des Anzuchtmediums einen Einfluß auf die Expression der Autoinduktor-Synthase und den entsprechenden Transkriptionsregulator hat. Datenbankanalysen des *S. meliloti* Genoms zeigten, daß ein chromosomaler *ORF* SMc00168 Homologien zu Autoinduktor-Synthasen der LuxI-Familie anderer Mikroorganismen wie *Agrobacterium tumefaciens* aufweist. Unmittelbar stromaufwärts von SMc00168 ist ein *ORF* mit Homologien zu HSL-

abhängigen Transkriptionsregulatoren lokalisiert (SMc00170). Erst kürzlich wurden diese beiden Gene in Anlehnung der *luxI*- und *luxR*-Gene als *sinI* und *sinR* bezeichnet (Marketon und Gonzales, 2002). Während bereits seit längerem bekannt war, daß *S. meliloti* 1021 ein Autoinduktor-Molekül produziert (Gray et al., 1996; Cha et al., 1998), ergaben neuere Untersuchungen, daß bis zu sieben verschiedene Autoinduktoren in *S. meliloti* 1021 vorhanden sind (Marketon und Gonzales, 2002). Ihre chemische Struktur wurde bisher nicht aufgeklärt und auch über die Rolle von Acyl-Homoserinlactonen, den regulierten Zielgenen und damit auch der Funktion der Autoinduktion in *S. meliloti* 1021 ist bisher nichts bekannt.

Zur Charakterisierung der *sinI*- und *sinR*-Gene und zur Untersuchung ob es eine Verbindung zwischen Biotinlimitation und Autoinduktion gibt, wurde die Expression der *S. meliloti sinI*- und *sinR*-Gene mit Hilfe von Promotoraktivitätsmessungen in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsbedingungen, wie An- oder Abwesenheit von Biotin und Variation der C-Quellen im Medium, untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß unter Biotin-limitierenden Bedingungen die Expression des *sinI*-Gens um den Faktor 2,9 gegenüber Wachstum bei Biotinsuffizienz höher war, sofern Glucose und Succinat im Medium als C-Quellen vorhanden waren. Mit Succinat als alleiniger C-Quelle im Anzuchtmedium stieg die Expression insgesamt an und unter Biotin-limitierenden Bedingungen war eine 4,3-fach erhöhte Aktivität als unter Biotinsuffizienz meßbar (Abb. 19 und 20). Erwartungsgemäß stiegen die rel. *gusA*-Aktivitäten mit zunehmender Populationsdichte und damit auch mit zunehmender Inkubationsdauer der Kulturen an (Abb. 19), jedoch waren zu jedem Zeitpunkt der Messung die rel. *gusA*-Aktivitäten der Biotin-limitierten Kulturen höher als die der unter Biotinsuffizienz angezogenen Kulturen. Auch eine weitere Reduktion von Succinat im Anzuchtmedium führte zu einer verstärkten Expression des *sinI-gusA*-Konstruktes (siehe Abb. 21).

Die Expression der Transkriptionsregulators SinR dagegen wurde weniger stark von Biotin im Medium beeinflusst. In Biotin-limitierten Kulturen konnte nur eine bis zu 1,5-fach erhöhte Expression des Reportergens bestimmt werden als unter Biotinsuffizienz. Auch hier wurden höhere Aktivitäten gemessen, sofern die Anzucht der Kulturen mit Succinat als alleiniger C-Quelle erfolgte (Abb. 24). Während die *sinI*-Expression mit zunehmender Inkubationsdauer der Kulturen in allen getesteten Medien anstieg, war die Expression von *sinR* weniger stark Wachstumsphasen-abhängig. Lediglich in der frühen Wachstumsphase konnte eine leicht erhöhte Aktivität unter Biotin-limitierenden Bedingungen beobachtet werden, als zu anderen Zeitpunkten der Messungen (Abb. 23).

Da Anzucht unter Biotin-limitierenden Bedingungen zu einer erhöhten Expression des *sinI*-Gens führten, ist davon auszugehen, daß eine erhöhte Autoinduktor-Synthase Expression auch zu einer vermehrten Bildung des Autoinduktor-Moleküls selbst führen. Daher wurde untersucht, ob sich aus einer definierten Menge Überstand einer Biotin-limitierten Kultur mehr Autoinduktoren extrahieren ließen als aus dem Überstand Biotin-supplementierter Kulturen (siehe 3.3.8). Nach Extraktion der Autoinduktoren aus dem Überstand verschiedener Kulturen, Chromatographie und Detektion durch einen *Agrobacterium tumefaciens*-Reporterstamm, konnte bei den Extrakten der Biotin-limitierten Kulturen ein intensiveres Signal beobachtet werden, als bei den Extrakten der Biotin-supplementierten Kultur gleicher OD (vgl. Abb. 29). In anderen Studien wurde ermittelt, daß die Intensität des Signals proportional zur Menge der chromatographierten Autoinduktor-Moleküle ist (Shaw et al., 1997). Daher kann man die Aussage treffen, daß sich aus einer definierten Menge Überstand einer unter Biotinlimitierung angezogenen *S. meliloti* 1021-Kultur mehr Autoinduktor-Moleküle isolieren ließen, als aus demselben Volumen einer Biotin-supplementierter Kultur gleicher optischer Dichte. Die Expression der SinI-Autoinduktor Synthase ist in *S. meliloti* 1021 daher nicht nur eine Funktion der optischen Dichte der Kulturen. Wurden Extrakte Biotin-limitierter und Biotin-supplementierter Kulturen mit gleicher Wachstumszeit verglichen (siehe 3.3.8), trat das intensivere Signal bei den Kulturen mit den höheren optischen Dichten, nämlich den Biotin-supplementierten Kulturen, auf. Das heißt, daß unter diesen Bedingungen in den Biotin-supplementierten Kulturen die Konzentration der Autoinduktoren im Überstand höher war. Dies scheint auf den ersten Blick den Expressionsdaten des *sinI*-Gens zu widersprechen. Es muß aber angemerkt werden, daß bei der Berechnung der rel. *gusA*-Aktivitäten die optischen Dichten der Kulturen berücksichtigt werden, während dies bei der Extraktion der Autoinduktoren nicht möglich ist. Zum einen hängt das Phänomen der Autoinduktion in *S. meliloti* 1021 in Übereinstimmung mit anderen Organismen von der Zelldichte der Kulturen ab. Andererseits weisen die Expressionsdaten des *sinI*-Gens und auch das intensivere Signal der Extrakte Biotin-limitierter Kulturen bei vergleichbarer OD<sub>600</sub> darauf hin, daß Biotinlimitierung zu einer vermehrten Produktion von Autoinduktoren führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, daß Wachstum unter suboptimalen Bedingungen zu einer vermehrten Produktion von Acyl-HSL-Molekülen auch schon bei relativ geringen Populationsdichten führt.

In der Regel tritt Autoinduktion und damit die Expression spezifischer Gene in Abhängigkeit der Zelldichte bei verschiedenen Bakterien auf, darunter viele, die in Assoziation mit höheren Organismen stehen. Entdeckt wurde dieses Phänomen bei *Photobacterium fischeri*, welches über das LuxI/LuxR-System Biolumineszenzgene induziert. Diese werden aber nur dann aktiviert, wenn die Bakterien hohe Zelldichten erreichen, wie in Assoziation mit dem Wirtsorganismus innerhalb des Lichtorgans (Gray und Greenberg, 1992; Meighen, 1991). Viele pathogene Bakterien regulieren Virulenzfaktoren oder die Synthese von Antibiotika über Autoinduktion. Dazu gehören pflanzenpathogene Organismen wie *Erwinia carotovora* oder auch Humanpathogene wie *Pseudomonas aeruginosa*. Bei *Agrobacterium tumefaciens* wird der Transfer des Tumor induzierenden Plasmides durch TraI und TraR reguliert. Auch das freilebende Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* verfügt über *quorum sensing*. Wird das System durch Mutation der Autoinduktor-Synthase *cerI* gestört, führt das zur Bildung großer Zellaggregate in Flüssigkultur und schleimigen Kolonien bei Anzucht auf Agar (Puskas et al., 1997).

Vielfältig und noch nicht vollständig aufgeklärt ist Funktion von Acyl-HSL-Molekülen bei anderen Rhizobien, wie beispielsweise bei *R. leguminosarum* bv. *viciae*. In diesem Organismus existieren verschiedene Regulatoren vom LuxR-Typ. RhiR beispielsweise aktiviert einerseits ein Operon von Genen, die in der Rhizosphäre exprimiert werden (*rhiABC*), welche eine noch nicht definierte Rolle bei der Nodulation spielen (Cubo et al., 1992; Wisniewski-Dye et al., 2002) und andererseits aktiviert RhiR noch nicht identifizierte Gene auf dem Sym-Plasmid pRL1JI, was zur Inhibierung von Wachstum und zu einem frühen Beginn der stationären Wachstumsphase in *R. leguminosarum*-Kulturen mit dem symbiontischen Plasmid pRL1JI führt (Gray et al., 1996). Auch das Produkt von CinI inhibiert Wachstum von manchen *R. leguminosarum* bv. *viciae* Stämmen und ist auch unter dem Namen *small bacteriocin* bekannt (Hirsch, 1979; Wisniewski-Dye et al., 2002). Ein dritter dem CinI/R-System untergeordneter Regulator RaiR spielt möglicherweise eine Funktion bei der Anpassung von *R. leguminosarum* an verschiedene Umweltbedingungen. Regulierte Zielgene von RaiR wurden noch nicht identifiziert (Wisniewski-Dye et al., 2002). Neuere Arbeiten identifizierten weitere LuxR-Typ Regulatorproteine (BisR und TriR) in *R. leguminosarum*, welche für den Plasmidtransfer benötigt werden (Wilkinson et al., 2002). Das Überleben von *R. leguminosarum* unter C-Quellen und N-Quellen Mangel im Medium ist abhängig von der Zelldichte beim Eintreten in die stationäre Wachstumsphase. Werden nur geringe optische Dichten beim Eintreten in die Stationärphase erreicht, ist das Überleben schlechter als in Kulturen, welche beim

Eintreten in die Stationärphase hohe optische Dichten aufweisen. Die Autoren gehen davon aus, daß Acyl-HSL-Moleküle die Anpassung an die stationäre Wachstumsphase ermöglichen, welche bei geringen Populationsdichten noch keine Schwellenkonzentration zur Aktivierung bisher unbekannter Zielgene ermöglichen. Die Überlebensfähigkeit von Kulturen mit geringer Populationsdichte konnte durch die Zugabe von Acyl-HSL zum Medium erhöht werden (Thorne und Williams, 1999). Daß Homoserin-Lactone möglicherweise eine Funktion bei der Anpassung von Bakterien an limitierende Bedingungen übernehmen (*starvation response*) und nicht unbedingt immer direkt an Prozessen der Bakterien-Wirt Interaktion beteiligt sein müssen, zeigen auch weitere Beispiele aus der Literatur. In *E. coli* werden nicht acetylierte Homoserin-Lactone als Reaktion auf limitierende Wachstumsbedingungen synthetisiert. Diese sich anhäufenden *starvation*-Signale können dann über den Stationärphase-Sigmafaktor und unabhängig von der Zelldichte weitere Stationärphasegene aktivieren (Huisman und Kolter, 1994; Salmond et al., 1995). Desweiteren ist *quorum sensing* in *E. coli* an der Inhibierung der chromosomalen Replikation involviert und man vermutet allgemein eine Beteiligung dieses Systems beim Zellteilungs-Zyklus unter Streß und limitierenden Wachstumsbedingungen, allerdings bewirkt Glucoseapplikation dort eine Erhöhung der Produktion des Autoinduktors AI-2 (Withers und Nordström, 1998; DeLisa et al., 2001). Bei *Vibrio* sp. 14 werden als Antwort auf C-Quellen Limitierung verschiedene Proteine verstärkt produziert, sogenannte *carbon starvation* induzierte Proteine. Durch Zugabe von Überstand aus Stationärphase-Kulturen zu logarithmisch wachsenden Zellen, werden ebenfalls dieselben Proteine induziert, wobei extrazelluläre Signalmoleküle an dieser Antwort beteiligt sind und man vermutet, daß es sich um Acyl-HSL-Moleküle handelt (Srinivasan et al., 1998).

In *Vibrio fischeri* führt Zugabe von Glucose zum Medium einerseits zu einem schnelleren Wachstum, gleichzeitig aber auch zu einer Verzögerung der Autoinduktion der Lumineszenz. Limitierung von Eisen führt dagegen zu langsamerem Wachstum und einer früheren Autoinduktion bei bereits geringeren Zelldichten (Dunlap und Kuo, 1992; Haygood und Nealson, 1985). Dies entspricht den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, da Glucose im Medium zu einer verminderten *sinI* Expression führte und schlechtes Wachstum durch Biotinlimitierung zu einer induzierten Expression bei bereits geringen Zelldichten. In *Ralstonia solanacearum* ist die Produktion der Acyl-HSL-Signalmoleküle von einem dem Stationärphase-Sigmafaktor homologen Protein abhängig, welches selbst maximale Aktivität unter limitierenden Wachstumsbedingungen hat (Flavier

et al., 1998). In *Pseudomonas aeruginosa* dagegen aktiviert das *rhl quorum sensing*-System, welches an der Rhamno-Lipid-Synthese beteiligt ist, die Expression des Stationärphase-Sigmafaktors (Latifi et al., 1996). Van Delden und Mitarbeiter (2001) vermuten, daß in *P. aeruginosa* die stringente Kontrolle beide *quorum sensing*-Systeme aktivieren kann, unabhängig von der Zelldichte der Kulturen. Letztlich sprechen viele Daten dafür, daß in einigen Bakterien Acyl-Homoserinlactone auch den Übergang in die stationäre Wachstumsphase regulieren und daß bei der Regulation dieses Überganges Autoinduktoren nicht nur bei hohen Populationsdichten von Bedeutung sind. Über Autoinduktion werden auch Gene in Kulturen reguliert, die unter limitierenden Bedingungen geringere optischen Dichten erreichen, so daß eine Anpassung an die Stationärphase ermöglicht wird (Lazizzera, 2000). Desweiteren wird spekuliert, daß die Zelldichte, bei der *quorum sensing* maximal exprimiert wird, das Wachstumspotential der Umwelt widerspiegelt. Dieses Wachstumspotential ist unter limitierenden Bedingungen eher ausgeschöpft, was durch geringe Populationsdichten deutlich wird. Auch die unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogenen *S. meliloti* 1021-Kulturen erreichen nur geringe optische Dichten. Biotinlimitierung führt möglicherweise über die erhöhte Expression des *sinI*-Gens zu einer Aktivierung von unbekannt Genen, die eine Anpassung der Rhizobien an die gegebenen schlechten Umwelt- und Wachstumsbedingungen erlauben. Möglicherweise signalisieren Autoinduktoren auch in *S. meliloti*, daß das Wachstumspotential der Umwelt, wie zum Beispiel während der Anzucht im Biotin-limitierten Medium, ausgeschöpft ist. Zusätzliche Limitierung durch geringere Konzentrationen an C-Quellen im Medium, erhöhen die *sinI* Expression, was ebenfalls ein Hinweis darauf ist, daß Autoinduktoren in *S. meliloti* an der Vermittlung von schlechten Wachstumsbedingungen beteiligt sein könnten. Da die Sequenzierung des Genoms gezeigt hat, daß es in *S. meliloti* 1021 keinen dem *rpoS*-Gen homologen Stationärphase-Sigmafaktor gibt, und bisher nicht bekannt ist, ob andere Sigmafaktoren seine Funktion übernehmen können, könnten alternativ über den Mechanismus der Autoinduktion Gene aktiviert werden, die den Eintritt in die stationäre Wachstumsphase erlauben.

Beim Nachweis der aus dem Überstand von *S. meliloti* 1021 extrahierten Autoinduktoren durch den Reporterstamm *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) konnte in dieser Arbeit nur ein Signal detektiert werden. Die geringe Mobilität läßt auf ein stark hydrophobes Autoinduktor-Molekül schließen, welches vermutlich einen langkettigen Acylrest besitzt. Dies ist vergleichbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die im Überstand von *S. meliloti* 1021 ebenfalls nur ein Autoinduktor-Molekül mit geringer

Mobilität isolierten (Cha et al., 1998). Auch Shaw und Mitarbeiter (1997) konnten durch andere *A. tumefaciens*-Reporterstämme nur einen Autoinduktor mit geringer Mobilität im Überstand von *S. meliloti* L5-30 und *S. meliloti* YA2 detektieren. *Sinorhizobium meliloti* AK631 dagegen produziert mindestens neun verschiedene Acyl-HSL-Moleküle und in neueren Untersuchungen konnten im Überstand von *S. meliloti* 1021 sechs verschiedene Acyl-HSL-Moleküle durch einen *A. tumefaciens* Reporterstamm und ein Autoinduktor-Molekül durch einen *C. violacearum* Reporterstamm identifiziert werden (Marketon und Gonzales, 2002). Allerdings wurden bei diesen Experimenten Überstand von *S. meliloti*-Kulturen verwendet, die bis zur Sättigung gewachsen waren. Die Extraktion der in Abb. 29 dargestellten Autoinduktoren erfolgte aus Überstand von Zellen mit einer optischen Dichte von etwa 0,3. Außerdem wurden bei Marketon und Gonzales größere Mengen chromatographiert (etwa 20-fache Menge). Fraglich ist, ob diese zusätzlichen Signale auch durch die Aktivität von SinI produziert werden. In *S. meliloti* AK631 findet man neben dem *sinI/sinR*-Locus auch eine Autoinduktor Synthase vom TraM-Typ, welche für die Produktion der zusätzlichen Autoinduktoren verantwortlich gemacht wird und in *S. meliloti* 1021 nicht vorhanden ist (Marketon und Gonzales, 2002). Auch bei anderen Organismen wie *R. leguminosarum* und *P. aeruginosa* existieren mehrere Regulationssysteme nebeneinander oder auch in übergeordneter Weise und man spricht man von einem *quorum sensing* Netzwerk oder einer *quorum sensing* Regulationskaskade. Dabei kann die Expression eines Autoinduktor-Systems weitere LuxI/LuxR-ähnliche Systeme unter verschiedenen Bedingungen aktivieren (Wisniewski-Dye et al., 2002; Parsek und Greenberg, 2000; Blosser-Middleton und Gray, 2001). Denkbar ist daher, daß es bei *S. meliloti* 1021 weitere Proteine gibt, die für die Synthese der durch Marketon und Gonzales detektierten Autoinduktoren in Frage kommen, die aber unter den in dieser Arbeit dargestellten Bedingungen nicht oder nur sehr wenig aktiv waren. Weitere Synthesen wären vermutlich nicht vom *luxI*-Typ, da Analysen zeigten, daß es im Genom von *S. meliloti* 1021 nur eine Autoinduktor Synthase vom *luxI*-Typ gibt, während mehrere Gene vom *luxR*-Typ vorhanden sind (Wisniewsky-Dye et al., 2002; Sourjik et al., 2000). Es bleibt noch zu klären, ob *S. meliloti* weitere Autoinduktor Synthesen vom LuxM-Typ oder HtdS-Typ besitzt, von denen letztere bei *Pseudomonas fluorescens* identifiziert werden konnten (Laue et al., 2000).

#### 4.2.2 Expression der *nodD1*- und *nodD3*-Reporterfusion

Flavonoide wie Luteolin werden von Leguminosen in den Boden exsudiert. Diese aktivieren zusammen mit bakteriellen NodD-Proteinen die Expression der *nod*-Gene, deren Genprodukte den *nod*-Faktor synthetisieren. Ob die Expression der NodD-Regulatoren selbst auch unter Biotin-limitierenden Bedingungen, einer Umweltbedingung, die einen Aspekt der Abwesenheit einer Pflanze unter Laborbedingungen simulieren könnte, möglich ist, wurde bisher noch nicht dokumentiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Expression der *nodD3*- und *nodD1*-Gene von der Biotinkonzentration des Mediums unbeeinflusst ist. Der *nodD1*-Promotor war unter allen getesteten Bedingungen auf relativ hohem Niveau aktiv, unverändert von der Verfügbarkeit von Biotin oder dem Flavonoid Luteolin. Andere Studien zeigten ebenso, daß das *nodD1*-Gen selbst konstitutiv exprimiert wird und NodD1 in Anwesenheit von pflanzlichen Induktoren wie Luteolin und 4,4'-Hydroxy-6-Methoxychalcon *nod*-Gene aktiviert, (Dusha et al., 1989; Mulligan und Long, 1989; Schlaman et al., 1992). Neuere Arbeiten weisen darauf hin, daß NodD1 nicht aber NodD3 in Anwesenheit von Luteolin und dem GroESL-Chaperonin-System verbesserte DNA-Bindeigenschaften an die *nod*-box des *nodF*-Gens zeigt. Inwieweit die Aktivität des *nodD1*-Promotors selbst durch Luteolin und GroESL beeinflusst wird, wurde nicht präsentiert (Yeh et al., 2002). Im natürlichen System verhindert das Repressorprotein NolR eine Überexpression der *nodD1*- und *nodD2*- Gene (Kondorosi et al., 1991).

Der *nodD3*-Promotor war unter den getesteten Bedingungen nicht aktiv. Die gemessenen  $\beta$ -Glucuronidaseaktivitäten der pPR-*nodD3*-kurz- (mit einem Transkriptionsstartpunkt) und pRP-*nodD3*-lang-Konstrukte (mit beiden Transkriptionsstartpunkten) entsprachen denen des leeren Vektors und wurden nicht durch Zugabe von Luteolin zum Anzuchtmedium erhöht. In der Literatur wird die Regulation des *nodD3*-Gens unterschiedlich diskutiert. Bekannt ist, daß das *nodD3*-Genprodukt auch in Abwesenheit von pflanzlichen Induktoren die Expression der *nod*-Gene aktiviert (Mulligan und Long, 1989). Das *nodD3*-Gen selbst soll aber nicht wie *nodD1* konstitutiv exprimiert werden, sondern durch das Flavonoid Luteolin induzierbar sein (Dusha et al., 1989). Andere Studien belegten, daß die *nodD3*-Expression durch den Transkriptionsregulator SyrM aktiviert wird und daß NodD3 wiederum *syrM*-Expression fördert, während der Effekt von pflanzlichen Induktoren auf diesen Regelkreis minimal ist (Swanson et al., 1993; Maillet et al., 1990). Neuere Arbeiten zeigten, daß zwei verschieden lange Transkripte in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen synthetisiert werden. Das längere Transkript wird nur bei einem günstigen Stickstoffstatus in der Zelle und unabhängig von

Luteolin gebildet, während das kurze Transkript unter Stickstoffmangel und wahrscheinlich in Abhängigkeit von  $\sigma^{54}$  synthetisiert wird. Von diesem Transkriptionsstartpunkt soll auch eine Luteolin induzierbare und durch NodD1 verstärkte Expression stattfinden, wobei der Mechanismus noch unklar ist (Dusha et al., 1999). Unter den in dieser Arbeit durchgeführten Anzuchtbedingungen, konnte *nodD3* nicht induziert werden.

#### 4.2.3 Expression des *bioM*-Operons

Das *bioM*-Gen wurde bereits in früheren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe untersucht (Entcheva et al., 2002). BioM ist möglicherweise ein ATP bindendes Protein aus der Familie der ABC-Transporter. In Biotinaufnahmestudien mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Biotin konnte festgestellt werden, daß die Aufnahme von markiertem Biotin im Wildtyp und der *bioM*-Mutante zunächst zwar in identischer Weise verlaufen, mit zunehmender Meßdauer aber die Mutantenzellen weniger Biotin enthalten als der Wildtyp. Dies legt die Vermutung nahe, daß BioM daran beteiligt ist, den zellulären Bestand an Biotin zu erhalten. Stromabwärts von BioM liegt BioN, ebenfalls ein möglicher Bestandteil eines ABC-Transporters. Unmittelbar in 3'-Richtung der beiden Gene ist *bioB* lokalisiert, dessen Genprodukt den letzten Schritt der Biotinsynthese vom Desthiobiotin zu Biotin katalysiert. Exogenes Desthiobiotin fördert Wachstum von *S. meliloti* 1021, nicht aber von der *bioM*-Mutante Rm1021-B3 oder der *bioN*-Mutante 1021-B6. Offensichtlich haben die Mutationen polare Effekte auf *bioB*. Liegt *bioB* extrachromosomal vor, können auch die *bioM*- und die *bioN*-Mutante auf Desthiobiotin gut wachsen. Dies läßt darauf schließen, daß *bioB* mit *bioM* und *bioN* cotranskribiert wird (Entcheva et al., 2002). Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Promotoraktivitätsmessungen des *bioM*-Gens wurde untersucht, ob Biotin im Anzuchtmedium einen Einfluß auf die Expression des *bioM*-Gens hat. Die Messungen zeigten, daß unter Biotinsupplementation die Expression des *bioM*-Gens zu allen Zeitpunkten um das 2,1 bis 2,4-fache erhöht waren. Biotin im Anzuchtmedium induzierte folglich die Expression des *bioM*-Gens. Allerdings ist fraglich, ob diese relativ schwache Induktion ein direkter Effekt des Biotin selbst ist oder indirekt durch verbessertes Wachstum von *S. meliloti* und damit durch allgemein erhöhte Stoffwechselaktivitäten verursacht wurde. Wenn BioM daran beteiligt ist, den intrazellulären Biotinbestand zu erhalten scheint es plausibel, daß Biotin die Expression dieses Gens aktiviert. Geht man aber davon aus, daß *bioB* mit *bioM* und *bioN* cotranskribiert wird, bleibt es eher unerklärlich, warum Biotin und damit das Produkt der

*bioB*-Aktivität letztlich die Expression der Biotinsynthese induziert. Wenn genug Biotin in der Zelle vorhanden ist, scheint die Expression des *bioB*-Gens nicht essentiell zu sein, um mehr Biotin zu synthetisieren. Dies und die letztlich schwache Induktion des *bioM*-Promotors legen die Vermutung nahe, daß die erhöhte Expression eher eine Folge erhöhter physiologischer Aktivität unter Biotinsupplementation ist und nicht ein unmittelbarer Effekt des Biotins.

### 4.3 Charakterisierung des *surE*- und *pcm*-Gens aus *S. meliloti* 1021

*SurE*-, *pcm*- und *nlpD/lppB*-Gene sind weit verbreitet und ihre Anordnung ist in vielen Gram-negativen Mikroorganismen konserviert (siehe Abb. 30). Einzig in *S. meliloti* und *Rhizobium* NGR234 befindet sich in 3'-Richtung des *pcm*-Gens das Biotin-regulierte Stationärphasegen *bioS*. Mutationen des *bioS*-Gens führen zu einer verlängerten *lag*-Phase von Zellen, die nach Inkubation unter Biotin-limitierenden Bedingungen mit Biotin supplementiert werden. BioS ist offensichtlich ein Regulatorprotein, welches möglicherweise daran beteiligt ist, exogenes Biotin wahrzunehmen (Heinz et al., 1999).

#### 4.3.1 *SurE*- und *pcm*-Gene und ihre Funktion

Proteine können durch spontane Konformationsänderungen und kovalente chemische Veränderungen Schaden nehmen und so ihre Funktionalität verlieren. Die Rate dieser schädigenden Reaktionen wird durch Streß wie Hitze, oxidative Agenzien oder pH-Wert Änderungen erhöht (Visick und Clarke, 1995). Als Antwort auf diese Veränderungen kann die Zelle *de novo* Proteine synthetisieren, geschädigten Proteine reparieren oder abbauen. Da in der stationären Wachstumsphase und unter limitierenden Bedingungen die generelle Proteinsynthese -oft nach einer initialen Induktion von verschiedenen Streß- und Stationärphase-Proteinen- reduziert ist, sind verschiedene Reparatursysteme daran beteiligt, Proteine zu erhalten, welches letztlich zu einem besseren Überleben führen kann (Östling et al., 1993; Weichart et al., 1993; Herbert und Foster, 2001).

Eine spontane Veränderung in Proteinen ist die Bildung von L-Isoaspartylresten direkt aus Aspartat oder nach Deamidierung von Asparagin. Die Peptidkette bekommt durch Bildung von L-Isoaspartylresten einen „Knick“, da nun ein bisheriges Seitenketten C-Atom an der neuen Peptidbindung beteiligt ist. Außerdem wird die Ladung eines Proteins verändert, wenn aus einem neutralen Asparaginrest ein saurer Aspartyl- oder Isoaspartyl-Rest entsteht. Enzyme mit L-Isoaspartylresten können eine verringerte Aktivität haben (Visick

und Clarke, 1995). *Pcm*-Gene sind ubiquitär und codieren für eine L-Isoaspartyl-Protein-Carboxymethyltransferase (EC 2.2.2.77), welche spezifisch an L-Isoaspartylreste bindet und das C-Atom der Seitenkette methyliert. Die Methylierung erleichtert die Bildung eines Succinimid-Intermediates, welches hydrolytisch zwar wieder zu L-Isoaspartat umgewandelt aber in signifikanten Mengen auch zu L-Aspartat gespalten werden kann (Visick und Clarke, 1995). Mutationen dieses sehr weit verbreiteten Reparaturenzyms führen in *E. coli* unter Streß (siehe unten) und auch in Nematoden zu einer verminderten Überlebensfähigkeit (Visick et al., 1998; Kagan et al., 1997). In den Nematoden häufen sich im Larvenstadium in *pcm*-Mutanten zweifach mehr geschädigte Proteine an als im Wildtyp (Niewmierzycka und Clarke, 1999). In *pcmt*-knockout-Mäusen (*pcmt* entspricht *pcm*) wies man in verschiedenen Gewebetypen eine 2-6-fach höhere Menge an L-Isoaspartylresten in den Proteinen nach und die Mäuse sind unter anderem kleiner und sterben früher als gesunde Tiere (Kim et al., 1997). Transgene Mäuse, in denen ein *pcmt1*-Gen unter Kontrolle eines Neuronen spezifischen Promotors eingeführt wurde, akkumulierten in Proteinen des Gehirns 50 % weniger geschädigte Isoaspartylreste (Lowenson et al., 2001). Überexpression dieses Reparaturenzyms in *Drosophila melanogaster* resultiert in einer temperaturabhängigen Verlängerung der Lebensdauer um bis zu 39 % (Chavous et al., 2001).

*SurE*-Gene findet man bei vielen Eubakterien und Archaeen aber bisher konnte die physiologische Funktion innerhalb der Zelle nicht genau aufgeklärt werden. Erste Hinweise auf die Funktion gaben Experimente von Treton und Mitarbeitern (1992), in denen festgestellt wurde, daß ein dem *surE* homologes Gen aus *Yarrowia lipolytica* einen *Saccharomyces cerevisiae* Stamm komplementieren kann, in dem zwei saure Phosphatasen mutiert vorlagen. Annähernd zeitgleich klärten unlängst zwei Arbeitsgruppen die Struktur des SurE-Proteins aus *Thermotoga maritima* auf und wiesen eine Magnesium-abhängige Phosphataseaktivität nach (Lee et al., 2001; Zhang et al., 2001). Daß die *surE*- und *pcm*-Gene eine Rolle bei der Streßantwort spielt, implizieren auch Daten aus *E. coli* Bc251. Die Bakterien wurden 2000 Generationen lang unter hohen Temperaturen inkubiert, was zu mehreren Genduplikationen führte, darunter auch die der *surE*- und *pcm*-Gene (Riehle et al., 2001). Dabei ist Genduplikation in Bakterien ein verbreiteter Prozeß, um auf verschiedene Selektionsdrücke zu reagieren.

### 4.3.2 Expressionsanalyse des *pcm*-Gens

Reporteranalysen in dieser Arbeit zeigten, daß das *pcm*-Gen aus *S. meliloti* 1021 in TY-Vollmedium mit Beginn der stationären Wachstumsphase am stärksten exprimiert wurde. Die relativen  $\beta$ -Glucuronidaseaktivitäten erreichten in dieser Phase einen durchschnittlichen Wert von 1979, welcher 3,8-fach über dem Wert der frühen exponentiellen Phase und 1,9-fach über dem Wert der mittleren exponentiellen Wachstumsphase lag. In GTS-Minimalmedium war die Expression des *pcm*-Gens in den ersten 14 Tagen der Inkubation unter Biotin-limitierenden Bedingungen und unter Biotinsupplementation annähernd identisch (siehe Abb. 37). In den Biotin-supplementierten Kulturen fiel die Aktivität danach deutlich ab, während unter Biotin-limitierenden Bedingungen das Maximum mit durchschnittlich 2031 und 2024 rel. Einheiten erst nach 21 bzw. 23 Tagen Inkubation erreicht wurde. Die Expressionsstudien in allen Medien zeigten, daß das *pcm*-Gen aus *S. meliloti* maximal in der Stationärphase induziert wurde. Interessanterweise war die Expression unter Biotin-limitierenden Bedingungen in Langzeitexperimenten (bis 70 Tage) signifikant höher als unter Biotinsupplementation (siehe Abb. 37). Bisher wurde für kein *pcm*-Gen eine Abhängigkeit der Expression vom Biotingehalt des Mediums beschrieben, was möglicherweise eine Besonderheit des *S. meliloti pcm*-Gens ist und mit seiner Lokalisation unmittelbar vor dem Biotin-induzierbaren *bioS*-Gen zusammenhängt, obwohl *bioS* im Gegensatz zu *pcm* durch Biotin in der Stationärphase induziert wird. Allerdings sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob diese Beobachtungen auch unter anderen limitierenden Wachstumsbedingungen gemacht werden können. In *E. coli* wird das *pcm*-Gen auch in der stationären Wachstumsphase maximal exprimiert, wobei im Minimalmedium geringere Gesamtaktivitäten erreicht werden. Die Induktion in der Stationärphase ist im Vollmedium 12-15-fach und im Minimalmedium 3,5-5,0-fach (Li et al., 1997). Die Aktivität des Pcm-Proteins ist in der Stationärphase um den Faktor 1,7 höher als in der exponentiellen Wachstumsphase (Li und Clarke, 1992b). Nicht untersucht wurde in *E. coli* die Expression unter limitierenden Anzuchtbedingungen.

### 4.3.3 Überleben der *pcm*- und *surE*-Mutante Rm1021-EH45 und Rm1021-EH47

Die Überlebensfähigkeit der *pcm*-Mutante Rm1021-EH45 und der *surE*-Mutante Rm1021-EH47 wurde unter verschiedenen Anzuchtbedingungen untersucht. Die Ausplattierung der Kulturen erfolgte nach verschiedenen langen Inkubationszeiten. Durch Auszählung der Platten wurde der Titer unter Berücksichtigung der optischen Dichte der Kulturen zur

besseren Vergleichsmöglichkeit als Lebendzellzahl/ml \* OD<sub>600</sub><sup>-1</sup> bestimmt und als Maß für die Überlebensfähigkeit betrachtet.

Die *surE*-Mutante zeigte unter allen getesteten Bedingungen das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp, was darauf schließen läßt, daß das Gen für das Überleben in der stationären Wachstumsphase keine Bedeutung hat. Bei der *pcm*-Mutante Rm 1021-EH45 wurde unter Biotin-limitierenden Bedingungen in GTS-Minimalmedium eine verringerte Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp beobachtet, sofern es sich um mindestens 6 Tage alte Stationärphasekulturen handelte (Abb. 39). Der größte Unterschied trat dabei nach 35 Tagen Inkubationszeit auf. Die *pcm*-Mutante hatte eine 29-fach schlechtere Überlebensfähigkeit als der Wildtyp. Daher läßt sich folgern, daß das Überleben (*survival*), welches als die Erhaltung der Lebensfähigkeit definiert wird (Barer und Harwood, 1999), in *S. meliloti* 1021 durch ein nicht funktionales *pcm*-Gen eingeschränkt ist. Während der über zwei Monate andauernden Inkubation des Wildtyps und der *pcm*-Mutante in GTS-Minimalmedium verringerten sich die optischen Dichten der Kulturen nur leicht und es war auch keine stärkere Abnahme bei der *pcm*-Mutante beobachtbar, so daß nicht davon auszugehen ist, daß die Zellen signifikant schneller lysierten und aus diesem Grund eine verminderte Überlebensfähigkeit gemessen wurde. In diesem Zusammenhang zeigten auch stichprobenartig durchgeführte Bestimmungen des Titers mit Hilfe einer Zählkammer keine signifikante Abnahme der Zellzahlen während der langen Inkubationsdauer beim Wildtyp und der Mutante. Desweiteren wurden auch keine wesentlichen Unterschiede in der Zellzahl bei gegebener optischer Dichte zwischen dem Wildtyp und der Mutante Rm1021-EH45 beobachtet. Die durch die Zählkammer bestimmten Titer lagen jedoch beim WT und der Mutante in der Regel über denen der durch Ausplattierung bestimmten Titer und zwar stieg die Diskrepanz zwischen den beiden Titern mit zunehmendem Alter der Kulturen an. Während Titer, die durch Auszählen bestimmt worden waren bis zu fünf Monate nahezu konstant blieben, verringerten sich die durch Ausplattierung ermittelten Titer im selben Zeitraum erheblich. Die Titerbestimmung mit Hilfe der Zählkammer lieferte bis zu 2600-fach höhere Werte als die Titerbestimmung nach Ausplattierung. Generell wird die Fähigkeit einer Bakterienpopulation Kolonien zu bilden als zuverlässiges Maß betrachtet, die Lebensfähigkeit zu bestimmen. Andererseits muß eine Bakterienzelle, die keine Kolonie auf Agarplatten bilden kann, nicht zwangsläufig tot sein, da solche Zellen trotzdem Metabolite aufnehmen und verstoffwechseln können (Siegele et al., 1993; Nyström, 2001).

Offensichtlich führt die Mutation des *pcm*-Gens nicht zu einem generell schlechterem Wachstum oder schnellerer Lyse der Zellen, sondern zu einem verringerten Überleben. Möglicherweise häufen sich in *S. meliloti* über diesen langen Inkubationszeitraum Proteine mit L-Isoaspartylresten an, die durch ein nicht funktionales Pcm-Protein nicht repariert werden können. Es stand kein rekombinantes Pcm-Protein zur Verfügung mit dem man erhöhte Isoaspartylmengen hätte nachweisen können. Da die Proteinsynthese in der Stationärphase wie auch unter limitierenden Bedingungen eingeschränkt ist, ist die Reparatur von degenerierten L-Isoaspartylresten ein Mechanismus, um Proteine biologisch aktiv zu halten. Fehlt dieses Reparatursystem könnten auch Proteine geschädigt sein, die eine Wiederaufnahme des Wachstums ermöglichen. Warum der Phänotyp nur nach Anzucht unter Biotin-limitierenden Bedingungen auftrat ist unklar, könnte aber mit den geringen Populationsdichten und damit einer anderen Zusammensetzung der limitierten Kulturen zusammenhängen ( $OD_{600} < 0,8$ ; unterschiedlicher Nährstoffgehalt, An- oder Abwesenheit verschiedener Signalmoleküle etc.). Im TY-Vollmedium und im Biotin-supplementierten GTS-Minimalmedium erreichten die Kulturen hohe optische Dichten, was eventuell andere Regelkreise und damit andere Wege der Proteinerhaltung induziert. Sicherlich setzt die Inkubation unter Biotin-limitierenden Bedingungen Mechanismen in Gang, die es der Zelle ermöglichen, Gene zu aktivieren, die eine bessere Anpassung an die vorherrschenden Wachstumsbedingungen erlauben, darunter zum Beispiel eine verstärkte Expression von Reparaturenzymen, wie das Pcm-Protein. Dies würde auch die Hypothese stützen, daß die Abwesenheit von Biotin möglicherweise einer der Faktoren ist, der die Abwesenheit des Symbiosepartners signalisiert. Im unbepflanzten Boden kann *S. meliloti* lange unter limitierenden Bedingungen überleben und eine erhöhte Expression von Reparaturenzymen könnte dabei die zellulären Proteine schützen.

#### 4.3.4 Überleben unter Streß

Streßapplikationen führten zu keiner verminderten Überlebensfähigkeit der *S. meliloti pcm*-Mutante oder der *surE*-Mutante. In früheren Arbeiten wurde zunächst vermutet, daß in *E. coli pcm*- und auch *surE*-Mutationen zu einer verminderten Überlebensfähigkeit unter diversen Streßbedingungen führten (Li und Clarke, 1992b). Neuere Ergebnisse sprechen dafür, daß die beobachteten Phänotypen auf eine zweite Mutation im Stationärphase-Sigmafaktor-Gen zurückzuführen waren (Visick und Clarke, 1997) und eine neu konstruierte *pcm*-Mutante zeigte auch keinen Überlebensphänotyp nach Hitzeinkubation. Lediglich Zugabe von 0,5 % (v/v) Methanol zu Stationärphasezellen oder Inkubation von

Kulturen in Anwesenheit von 0,1 mg/ml Paraquat führte zu einem verminderten Überleben bis auf 20–40 % des Wildtypniveaus. Eine *E. coli surE*-Mutante zeigte unter keinen Bedingungen einen Überlebensphänotyp und bisher wurde auch in keinem Organismus über einen Phänotyp einer *surE*-Mutation berichtet. Die Genduplikation des *surE*-Gens in *E. coli* unter Temperaturstress, deutet dennoch auf eine Beteiligung des *surE*-Gens an einer Stressantwort hin (Riehle et al., 2001). Außerdem kompensiert eine *surE-pcm*-Doppelmutante den Phänotyp der *pcm*-Mutante in *E. coli*. Erstaunlich dabei ist, daß zwar in 10 Tage alten Stationärphasezellen von *E. coli* erhöhte Mengen an L-Isoaspartylresten im Vergleich zu 24 h alten Zellen auftreten, die Menge der angehäuften Reste jeweils in der *pcm*- und in der *surE*-Mutante nicht erhöht ist, wohl aber in der *surE-pcm*-Doppelmutante (Visick et al., 1998).

Daß bei verschiedenen Stressapplikationen kein Phänotyp zu beobachten war, könnte auch daran liegen, daß es in *S. meliloti* weitere *pcm*-Gene gibt, die möglicherweise unter anderen Bedingungen als das *pcm*-Gen aus dem *survival operon* induziert werden und Reparaturfunktionen übernehmen. Blast-Analysen mit der *pcm*-Sequenz aus dem *survival operon* lassen auf die Existenz von mindestens zwei weiteren *pcm*-Genen schließen. Dabei handelt es sich um ORF SMa1547 (26 % identische AS und 47 % ähnliche AS) und ORF SMc02083 (27 % identische AS und 44 % ähnliche AS), die bisher nicht charakterisiert wurden, aber als potentielle Protein-L-Isoaspartat-Methyltransferase (EC 2.2.2.77) und als Transmembrane Methyltransferase (*pcm-like*) (EC 2.1.1.-) annotiert wurden (<http://sequence.toulouse.inra.fr>).

#### 4.3.5 Phosphataseaktivität des SurE-Proteins

Da man schon lange vermutete, daß SurE-Proteine Phosphataseaktivitäten haben und dieses auch kürzlich für das rekombinante SurE-Protein aus *T. maritima* nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob das rekombinante *S. meliloti* SurE-Protein, welches noch an die Histidinreste des Vektoranteiles fusioniert war, ebenfalls diese Enzymaktivität besitzt. Es konnte gezeigt werden, daß SurE aus *S. meliloti* p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) und  $\alpha$ -Naphthyl-Phosphat ( $\alpha$ -NP) hydrolysiert und somit Phosphataseaktivität besitzt. In dieser Arbeit wurde keine detaillierte Analyse des SurE-Proteins durchgeführt, sondern nur das pH-Optimum bestimmt. Es lag in Anwesenheit von 20 mM MgCl<sub>2</sub> und 6 mM p-Nitrophenyl-Phosphat im Reaktionsansatz bei pH 6,5. Alle Reaktionen wurden bei 37 °C durchgeführt. Die Enzymaktivität lag unter diesen Bedingungen bei 5,05  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , wurde aber nicht im Substratoptimum bestimmt. In Abwesenheit von MgCl<sub>2</sub>



<i>S. meliloti</i>	LADDVTYSGTVAGAI <sup>*</sup> EGTLOGIRSI <sup>*</sup> ALSQAYQH <sup>*</sup> AVG-RDVPWDVAETHAP	145
<i>M. loti</i>	IADDVTYSGTVAGAMEGALLGIRSI <sup>*</sup> ALSQGYSYVGEDRIVPYETTEALAP	146
<i>T. maritima</i>	MGM <sup>*</sup> DILHSGTVSGAMEGAMNIP <sup>*</sup> SI <sup>*</sup> AISS-----ANYESP <sup>*</sup> DFEGAARFLI	144
<i>E. coli</i>	LGD <sup>*</sup> DVIYSGTVAAAMEGRHLGFPALAVSL-----DG--HKHYDTAAAVTC	139
<i>P. aeruginosa</i>	LGD <sup>*</sup> DVLYSGTVAAAAIEGRFLKGP <sup>*</sup> AF <sup>*</sup> AFSL-----VSRLTDNLP <sup>*</sup> TAMHFAR	140
<i>X. fastidiosa</i>	LGD <sup>*</sup> DVIYSGTVSAAMEGRFLGLPAVAVSLV <sup>*</sup> TLYREGQQAPQYETA <sup>*</sup> AHAAI	146
Clustal Consensus	: . * : :****: . * : ** : . * . *	66
<i>S. meliloti</i>	ALIR <sup>*</sup> TLMGVDLPDGT <sup>*</sup> LINLNFPNCAVD <sup>*</sup> AVAGVEVTSQ <sup>*</sup> GKLEFGLSIDERT	195
<i>M. loti</i>	ALLK <sup>*</sup> KLVA <sup>*</sup> TPLPDGVLLNVNFPNCLPEEVVGT <sup>*</sup> VVTMQGKLVHSLWVDERR	196
<i>T. maritima</i>	DFL <sup>*</sup> KEFD <sup>*</sup> FSLLDPFTMLNINVP---AGEIKGWR <sup>*</sup> FTRQ <sup>*</sup> RRRWNDYFEERV	191
<i>E. coli</i>	SILRALCKE <sup>*</sup> PLRTGRILNINVPDL <sup>*</sup> LDQIKGIRVTRCGTRHPADQVI <sup>*</sup> PQQ	189
<i>P. aeruginosa</i>	LLVSAHERLAVPPRTVLN <sup>*</sup> INIPNLPLDRVGIQLTRLGHRARAAAPVKV <sup>*</sup> V	190
<i>X. fastidiosa</i>	NIVAQLKTDPLPADTILN <sup>*</sup> VNVPDVTWQQMRGFKV <sup>*</sup> TRLGNRHSAPCLTQT	196
Clustal Consensus	:: : : : : * : * . * .	78
<i>S. meliloti</i>	DGRGFPYFWLRFGERAGDFRSGTDIRALRDNRI <sup>*</sup> SVTP <sup>*</sup> LKLDMTD <sup>*</sup> HAAQER	245
<i>M. loti</i>	DGRGLPYWLRFGREPVEGKQGTDLHALRNRLVSVTP <sup>*</sup> LQLDLTAHEIRDQ	246
<i>T. maritima</i>	SPFGEKYYWMMGEVIEDDDRDDVDYKAVREGYVSIT <sup>*</sup> PIHPFLTNEQCLKK	241
<i>E. coli</i>	DPRGNTLYWIGPPGGKCDAGPGTDFAAVDEGYVSIT <sup>*</sup> PLHVDLTAHSAQDV	239
<i>P. aeruginosa</i>	NPRGKEGYWIAAAGDAEDGGPGTDFHAVMQGYVSIT <sup>*</sup> PLQLDRTFHEAFGG	240
<i>X. fastidiosa</i>	DPRGHTIYWIGPAGPEQDAGPGTDFDAVRNTYISIT <sup>*</sup> PIHVDLTRYQALEN	246
Clustal Consensus	. * : * : : . * * : : : * : * : *	95
<i>S. meliloti</i>	IAQALREGSVA-----	256
<i>M. loti</i>	LKALA-----	252
<i>T. maritima</i>	LRVYD-----	247
<i>E. coli</i>	VSDWLN <sup>*</sup> SVGVGTQW--	253
<i>P. aeruginosa</i>	LDEWLGG <sup>*</sup> LT-----	249
<i>X. fastidiosa</i>	VTRWTDRLTAHMDWPT	262
Clustal Consensus	:	96

#### Abb. 42 CLUSTALW-alignment von SurE-Aminosäuresequenzen

Aminosäure-Sequenzvergleiche von SurE-Proteinen aus *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Thermotoga maritima*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Xylella fastidiosa* mit dem Programm CLUSTALW. Mit Sternchen unterlegt sind identische, mit zwei Punkten unterlegt sehr ähnliche und mit einem Punkt unterlegt sind leicht ähnliche Aminosäuren.

#### 4.3.6 Wachstum von *S. meliloti* unter Biotin-limitierenden Bedingungen

Nach 20 minütiger Inkubation der *S. meliloti* Kulturen bei 39 °C fiel auf, daß die unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogenen und gestreßten Kulturen relativ gesehen eine bessere Überlebensfähigkeit hatten, als die Kulturen, welche in Minimalmedium mit 40 nM Biotin angezogen wurden (Abb. 41). Setzte man den Titer der unbehandelten Kulturen als 100 %, so zeigten die hitzestressierten und Biotin-limitierten WT-Kulturen eine Überlebensfähigkeit von 185 % und die gestreßten Biotin-supplementierten Kulturen eine Überlebensfähigkeit von 113 %. Die Biotin-limitierten Kulturen waren offensichtlich besser in der Lage, mit zusätzlichem Streß umzugehen. In *Vibrio* sp. wird unter limitierenden Wachstumsbedingungen eine allgemeine Streßresistenz gegenüber Hitze,

UV-Bestrahlung und Cadmium-Chlorid beobachtet (Nyström et al., 1992). Generell sind viele Bakterien in der stationären Wachstumsphase resistenter gegenüber schädigenden Umweltbedingungen als in anderen Wachstumsphasen (Hengge-Aronis, 1993). Möglicherweise führt Biotinlimitierung zu einer Aktivierung von Genen, die es der Zelle ermöglichen, schnell auf zusätzliche schlechte Umweltbedingungen zu reagieren. Außerdem konnte schon in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden, daß Biotin-supplementierte Zellen relativ gesehen schneller absterben als Biotin-limitierte Zellen (Belling, 1998). Diese Beobachtungen wurden durch Daten dieser Arbeit unterstützt. So zeigten die Wachstumsversuche in GTS-Minimalmedium mit supplementiertem Biotin, daß vom 2. bis zum 12. Tag der Inkubation beim WT der durchschnittliche Titer (als Lebendzellzahl/ml \*  $OD_{600}^{-1}$ ) von  $2,18 * 10^9$  auf  $7,60 * 10^7$  zurückging. Das heißt, daß vom 2. bis 12. Tag der Inkubation der Titer um 96,5 % zurückging. Bei der *pcm*-Mutante waren die Werte im Biotin-supplementierten Medium über den gleichen Zeitraum vergleichbar (Rückgang um 96,6 %).

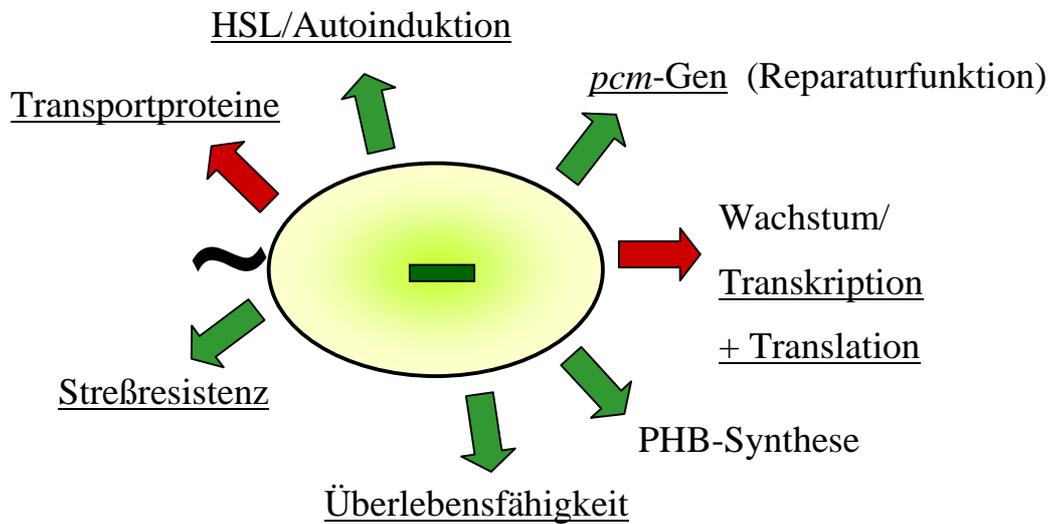
Unter Biotin-limitierenden Bedingungen gingen die Titer im gleichen Zeitraum weniger stark zurück, beim Wildtyp auf 61 % und bei der *pcm*-Mutante, bei der eine verringerte Überlebensfähigkeit unter Biotinlimitierung festzustellen war, auf 18,5 %.

#### **4.4 Biotinlimitierung als ein spezielles Streß-Signal für *S. meliloti* ?**

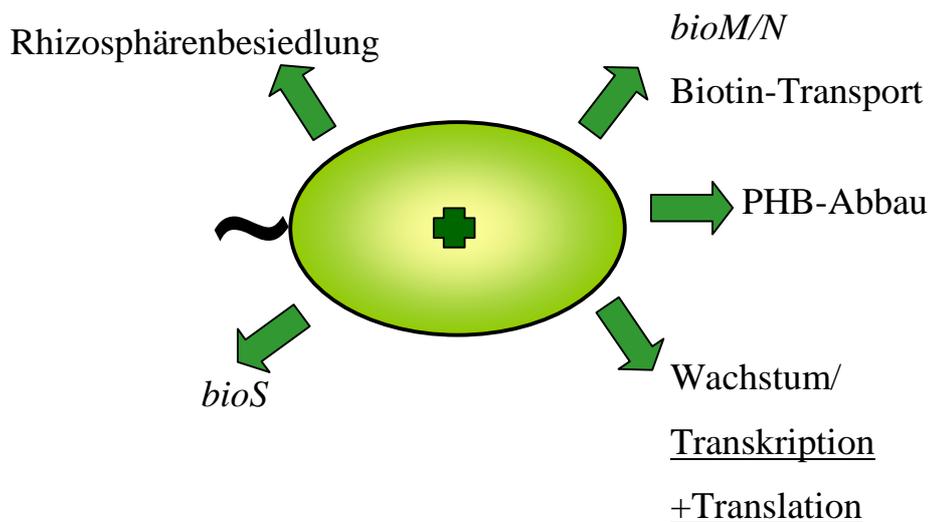
Exogenes Biotin stimuliert rhizobielles Wachstum und spielt eine Schlüsselfunktion bei der Besiedlung der Rhizosphäre durch den Mikrosymbionten (Watson et al., 2001; Streit et al., 1996). Obwohl im Genom von *S. meliloti* verschiedene Biotinbiosynthesegene vorliegen, konnte die Funktionalität von einigen dieser Gene bisher nicht nachgewiesen werden, so daß davon auszugehen ist, daß die endogene Biotinsynthese limitierend auf rhizobielles Wachstum wirkt (Entcheva et al., 2002). Wie der rhizobielle Stoffwechsel auf molekularer Ebene auf Biotinlimitierung und Biotinsupplementation reagiert, wurde bisher wenig untersucht. Erste Hinweise darauf, daß es in *S. meliloti* spezielle Anpassungsmechanismen an die Verfügbarkeit von exogenem Biotin gibt, lieferte die Identifizierung des Biotin-regulierten Stationärphasegens *bioS* aus dem *Survival-Locus*, die Synthese von PHB unter Biotinlimitierung oder das Vorhandensein von extrem affinen Aufnahmemechanismen für Biotin (Heinz et al., 1999; Entcheva et al., 2002; Hofmann et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß in Abhängigkeit der Biotinkonzentration des Mediums eine Reihe von Veränderungen im Stoffwechsel von *S. meliloti* auftreten, wobei letztendlich noch zu klären bleibt, ob diese direkt oder indirekt durch Biotin reguliert werden. Aufgrund der Vielfältigkeit dieser Prozesse kann man von einem Biotin-regulatorischen Netzwerk in *S. meliloti* sprechen. Unter Biotin-limitierenden Bedingungen kommt es zu einer erhöhten Expression der Autoinduktor-Synthase SinI und des Acyl-Homoserin-Lacton-abhängigen Transkriptionsregulators SinR und damit zu einer vermehrten Bildung eines langkettigen Acyl-Homoserin-Lactons. Es ist bekannt, daß in verschiedenen Mikroorganismen über die Autoinduktion der Übergang in die stationäre Wachstumsphase reguliert werden kann (Lazazzera, 2000). Offensichtlich führt Biotinlimitierung in *S. meliloti* zur Aktivierung von Mechanismen, die es den Bakterien ermöglichen in die stationäre Wachstumsphase überzugehen, um so im unbepflanzten Boden und damit auch unter Biotinlimitierung überlebensfähig zu bleiben. Dies könnte erklären, warum *S. meliloti* auch in Laborkulturen eine bessere relative Überlebensfähigkeit unter Biotin-limitierenden Bedingungen als unter Biotinsuffizienz hat und warum Biotin-limitierte Kulturen eine erhöhte Überlebensfähigkeit nach Hitzestress aufweisen. Die erhöhte Expression des Pcm-Reparaturenzyms unter Biotinlimitation in der stationären Wachstumsphase spricht ebenfalls für eine weitere Anpassung an das Überleben unter Biotinmangel. Biotinmangel könnte daher ein spezielles Stresssignal sein, das eine Anpassung an Hungerzustände im Boden erlaubt, um in Abwesenheit eines potentiellen Symbiosepartners besser zu überdauern. Nach Biotinsupplementation nehmen die Zellen wieder Wachstum auf, was sich in einer erhöhten Expression von Proteinen zeigt, welche an der Transkription, der Translation, dem katabolen Stoffwechsel oder dem Transport von verschiedenen potentiellen Nährstoff-Quellen beteiligt sind. Welche Prozesse unter Biotinlimitierung und Biotinsuffizienz in *S. meliloti* 1021 eine Rolle spielen ist in Abb. 43 zusammengefaßt. Dabei sind Vorgänge, die durch experimentelle Daten dieser Arbeit unterstützt werden, unterstrichen. Grüne Pfeile symbolisieren aktivierende Funktionen, während rote Pfeile inhibierende Funktionen darstellen.

A



B



**Abb. 43 Zusammenfassende Darstellung von Biotin-abhängigen Prozessen in *S. meliloti* 1021**

Diese Abbildung zeigt die Prozesse, welche im Biotin-regulatorischen Netzwerk von Bedeutung sind. Unter **A** sind Vorgänge dargestellt, die unter Biotinlimitierung eine Rolle spielen und unter **B** solche, die unter Biotinsuffizienz von Bedeutung sind. Aktivierende Effekte sind durch grüne Pfeile markiert, inhibierende Effekte durch rote Pfeile. Prozesse, welche durch experimentelle Daten dieser Arbeit unterstützt werden, sind unterstrichen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Bakterien der Gattung *Sinorhizobium* sind nicht in der Lage Biotin selbst zu synthetisieren. Daher führt Biotinlimitierung zu einer deutlichen Reduktion von Stoffwechselaktivitäten, wohingegen Biotinsuffizienz einen allgemein positiven Einfluß auf Wachstum und Proteinbiosynthese nimmt.

Ziel dieser Arbeit war es mit molekularen Methoden mögliche regulatorische Phänomene zu identifizieren, die an der Wahrnehmung von Biotin, welches sowohl Biotinlimitierung und Biotinsuffizienz umfaßt, beteiligt sein könnten. Dazu wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt:

- (i) 2D-Gelanalyse und MALDI-TOF-MS
- (ii) Promotoraktivitätsmessungen mit Hilfe von Reportergenen
- (iii) Mutagenese und molekulare Charakterisierung von Genen aus dem *Survival-Locus*

(i) Durch vergleichende Proteomanalyse konnte gezeigt werden, daß die Expression von etwa 70 Proteinen im pI-Bereich 4-7 nach Biotinsupplementation des Mediums induziert wurde. Durch massenspektrometrische Analyse wurden 12 von 18 untersuchten Protein-*Spots* mit erhöhter Expression eindeutig identifiziert. Zu diesen zählten das ribosomale Protein L7/L12, das CopC-Protein, welches möglicherweise an der Resistenz gegenüber Kupfer beteiligt ist, die Omega-Untereinheit der RNA-Polymerase, ein konserviertes Protein mit unbekannter Funktion und mehrere Bindeproteine von ABC-Transportern mit unterschiedlicher Substratspezifität.

(ii) Mit Hilfe von Reportergenen erfolgte die Expressionsanalyse von Genen, die gezielt aus den Datenbanken ausgewählt wurden, in Abhängigkeit vom Biotingehalt des Anzuchtmediums. Leicht aktivierend wirkte Biotin auf die Expression des *bioM*-Gens, welches an der Aufrechterhaltung des intrazellulären Biotin-*Pools* beteiligt ist (2,4-fach erhöhte Expression). Promotoraktivitätsmessungen des *copC*-Gens, welches bereits durch die 2D-Gelelektrophorese als Biotin-induziert identifiziert werden konnte, zeigten, daß die Expression in Anwesenheit von Biotin bis zu 5-fach erhöht war. Nach andauernder Inkubation unter Biotin-limitierenden Bedingungen, analog zu den Versuchsbedingungen der 2D-Gelelektrophorese, bewirkte Biotinzugabe eine 18-fach erhöhte Expression dieses Gens.

Unter Biotin-limitierenden Bedingungen konnte eine bis zu 4,3-fach erhöhte Expression des *sinI*-Promotors und eine bis zu 1,7-fach erhöhte Expression des *sinR*-Promotors gemessen werden. Erhöht wurden die Promotoraktivitäten zusätzlich durch Verringerung der Kohlenstoff-Quellen des Mediums. Die *sinI*- und *sinR*-Gene codieren für eine Autoinduktor-Synthase bzw. einen Acyl-Homoserin-Lacton-abhängigen Transkriptionsregulator des LuxI- bzw. LuxR-Typs.

Diese Expressionsdaten wurden durch weitere Experimente bestätigt. Aus dem Überstand von unter Biotin-limitierenden Bedingungen angezogener Kulturen ließen sich größere Mengen eines Acyl-Homoserin-Lactons extrahieren und nach Dünnschichtchromatographie durch einen Reporterstamm nachweisen, als aus dem Überstand Biotin-supplementierter Kulturen mit vergleichbaren optischen Dichten. Dabei handelte es sich um einen Autoinduktor mit geringer Mobilität. In *S. meliloti* ist Autoinduktion daher nicht nur abhängig von der Populationsdichte, sondern auch vom Biotingehalt des Mediums.

(iii) Die Analyse von Genen aus dem *Survival-Locus* von *S. meliloti* zeigte, daß die Mutation des *surE*-Gens unter keiner getesteten Bedingungen zu einer reduzierten Überlebensfähigkeit führte. Das rekombinante SurE-Protein hatte eine Magnesium-abhängige Phosphataseaktivität mit einem pH-Optimum von 6,5. Die Mutation des *pcm*-Gens, welches für das Reparaturenzym L-Isoaspartyl-Protein-Carboxymethyltransferase codiert, resultierte in einer verminderten Überlebensfähigkeit von *S. meliloti* unter Biotin-limitierenden Bedingungen in der stationären Wachstumsphase. Durch Hitze, Methanol und Oxidationsmittel gestreßte *pcm*-Mutanten zeigten keinen Phänotyp. Das *pcm*-Gen wurde unter Biotin-limitierenden Bedingungen maximal exprimiert, wobei die Meßwerte bis zu 13,6-fach über denen von Biotin supplementierten Kulturen lagen. Dies deutet somit auf eine Biotin-abhängige Expression hin.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Ballesteros, M., Fredriksson, A., Henriksson, J., Nyström, T.** (2001): Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes, *EMBO J.* **20**: 5280-5289

**Barer, M. R., Harwood, C. R.** (1999): Bacterial viability and culturability, *Advances in microbiological physiology*, **41**: 93-137

**Barnett, M. J., Fisher, R. F., Jones, T., Komp, C., Abola, A. P., Barloy-Hubler, F. et al.**, (2001): Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9883-9888

**Belling, G.** (1998): Untersuchungen zum Biotin-abhängigen Wachstum und Überleben von *Sinorhizobium meliloti*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld

**Birnboim, H., Doly, J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1518

**Bjellqvist, B., Ek, K., Rhigetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W.** (1982): Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications, *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**: 317-339

**Blanco, G., Rodicio, M. R., Puglia, A. M., Mendez, C., Thompson, C. J., Salas, J. A.** (1994): Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*, *Mol. Microbiol.* **12**: 375-385

**Blosser-Middleton, R. S., Gray, K. M.** (2001): Multiple N-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern, *J. Bacteriol.* **183**: 6771-6777

**Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.** (1987): Improved silver staining method of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **8**: 93-99

**Bottomley, P. J., Maggard S. P.** (1992): Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 533-540

**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

**Bullock, W., Fernandez, J., Short, J.** (1987): XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection, *Bio Techniques* **5**: 376-378

**Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J. et al.** (2001): Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9877-9882

**Cha, C., Gao, P., Chen, Y-C., Shaw, P. D., Farrand, S. K.** (1998): Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant associated bacteria, *Molec. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1119-1129

**Chatterji, D., Ojha, A. K.** (2001): Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling, *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 160-165

**Chavous, D. A., Jackson, F. R., O'Connor, C. M.** (2001): Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:14814-14818

**Chester, N., Marshak, D. R.** (1993): Dimethyl sulfoxide-mediated primer T<sub>m</sub> reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* **209**: 284-290

**Cooksey, D. A.** (1994): Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 381-386

**Cubo, M. T., Economou, A., Murphy, G., Johnston, A. W., Downie, J. A.** (1992): Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABC* that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *J. Bacteriol.* **174**: 4026-4035

**Davey, M. E., de Bruijn, F. J.** (2000): A homologue of the tryptophan-rich sensory protein TspO and FixL regulates novel nutrient deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* locus, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5353-5359

**DeLisa, M. P., Vades, J. J., Bentley, W. E.** (2001): Mapping stress-induced changes in Autoinducer AI-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* **183**: 2918-2928

**Dunlap, P. V., Kuo, A.** (1992): Cell density-dependent modulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system in the absence of autoinducer and LuxR protein, *J. Bacteriol.* **174**: 2440-2448

**Dunn, M. F., Araiza, G., Finan, T. M.** (2001): Cloning and characterization of pyruvate carboxylase from *Rhizobium* strain 1021, *Arch. Microbiol.* **176**: 355-363

**Dunn, M. F., Araiza, G., Cevallos, M. A., Mora, J.** (1997): Regulation of pyruvate carboxylase in *Rhizobium etli*, *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 301-306

**Dusha, I., Austin, S., Dixon, R.** (1999): The upstream region of the *nodD3* gene of *Sinorhizobium meliloti* carries enhancer sequences for the transcriptional activator NtrC. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 491-499

**Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F. J., Schell, J.** (1989): The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium, *Mol. Gen. Genet.* **219**: 89-96

- Egener, T., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B.** (1998): Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 71-75
- Ehrmann, M., Ehrle, R., Hofmann, E., Boos, W., Schlosser, A.** (1998): The ABC maltose transporter, *Mol. Microbiol.* **29**: 685-694
- Entcheva, P., Phillips, D. A., Streit, W. R.** (2002): Functional analysis of *Sinorhizobium meliloti* genes involved in biotin synthesis and transport, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2843-2848
- Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P. et al.** (2001): The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9889-9894
- Finkel, S. E., Kolter, R.** (1999): Evolution of microbial diversity during prolonged starvation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4023-4027
- Flavier, A. B., Schell, M. A., Denny, T. P.** (1998): A RpoS ( $\sigma^S$ ) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction of *Ralstonia solanacearum*, *Mol. Microbiol.* **28**: 475-486
- Fuqua, W. C., Winans, S. C.** (1996): A LuxI-LuxR type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite, *J. Bacteriol.* **178**: 2796-2806
- Gage, D. J., Long, S. R.** (1998) alpha-Galactoside uptake in *Rhizobium meliloti*: isolation and characterization of *agpA*, a gene encoding a periplasmic binding protein required for melibiose and raffinose utilization, *J. Bacteriol.* **180**: 5739-5748
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J. A.** (1983): Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **153**: 1424-1431
- Gentry, D., Xiao, H., Burgess, R., Cashel, M.** (1991): The omega subunit of *Escherichia coli* K-12 RNA polymerase is not required for stringent RNA control *in vivo*, *J. Bacteriol.* **173**: 3901-3903
- Gong, L., Takayama, K., Kjelleberg, S.** (2002): Role of *spoT*-dependent ppGpp accumulation in the survival of light-exposed starved bacteria, *Microbiology* **148**: 559-570
- Gonzales, J. E., York, G. M., Walker, G. C.** (1996): *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function, *Gene* **179**: 141-146
- Gray, K. M., Greenberg, E. P.** (1992): Physical and functional maps of the luminescence gene cluster in an autoinducer-deficient *Vibrio fischeri* strain isolated from a squid light organ, *J. Bacteriol.* **174**: 4384-4390

**Gray, K. M., Pearson, J. P., Downie, J. A., Boboye, B. E., Greenberg, E. P.** (1996): Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: Autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes, *J. Bacteriol.* **178**: 372-376

**Guerreiro, N., Djordjevic, M. A., Rolfe, B. G.** (1999): Proteome analysis of the model microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*: Isolation and characterization of novel proteins, *Electrophoresis* **20**: 818-825

**Guerreiro, N., Redmond, J. W., Rolfe, B. G., Djordjevic, M. A.** (1997): New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 506-516

**Haygood, M. G., Neilson, K. H.** (1985): Mechanisms of iron regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*, *J. Bacteriol.* **162**: 209-216

**Heinz, E., Phillips, D. A., Streit, W. S.** (1999): *BioS*, a biotin-induced stationary phase and possible LysR-type regulator in *Sinorhizobium meliloti*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 803-812

**Hengge-Aronis, R.** (1993): The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli* K12, In: Starvation in bacteria, Kjelleberg (ed.), pp: 171-194, ISBN 0-306-44430-5, Plenum Press, New York

**Hengge-Aronis, R.** (1999): Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 148-152

**Herbert, K. C., Foster, S. J.** (2001): Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components, *Microbiology* **147**: 2275-2284

**Hirsch, P. R.** (1979): Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*, *J. Gen. Microbiol.* **113**: 219-228

**Hofmann, K., Heinz, E. B., Charles, T. C., Hoppert, M., Liebl, W., Streit, W. R.** (2000): *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 *bioS* and *bdhA* gene transcription are both affected by biotin available in defined medium, *FEMS Microbiol. Lett.* **182**: 41-44

**Honeycutt, R.J., McClelland, M., Sobral, B. W.** (1993): Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021, *J. Bacteriol.* **175**: 6945-6952

**Howorth, S. M., England, R. R.** (1999): Accumulation of ppGpp in symbiotic and free-living nitrogen-fixing bacteria following amino acid starvation, *Arch. Microbiol.* **171**: 131-134

**Huisman, G. W., Kolter, R.** (1994): Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*, *Science* **5171**: 537-539

- Jäger, W., Schäfer, A., Kalinowski, J., Pühler, A.** (1995): Isolation of insertion elements from Gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Rhodococcus* strains used in the *Bacillus subtilis sacB* gene as a positive selection marker, FEMS Microbiol. Lett. **126**: 1-6
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M., Hirsch, D.** (1986):  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 8447-8451
- Jensen, J. B., Peters, N. K., Bhuvanewari, T. V.** (2002): Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*, J. Bacteriol. **184**: 2978-2986
- Kagan, R. M., Niewmierzycka, A., Clarke, S.** (1997): Targeted gene disruption of the *Caenorhabditis elegans* L-isoaspartyl protein repair methyltransferase impairs survival of dauer stage nematodes, Arch. Biochem. Biophys. **348**: 320-328
- Kahn, M. L., McDermott, T. R., Udvardi, M. K.** (1998): Carbon and nitrogen metabolism in Rhizobia. In: The *Rhizobiaceae*, Molecular biology of model plant-associated bacteria, Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J., (eds.) 1<sup>st</sup> ed; pp. 461-485, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Kim, E., Lowenson, J. D., MacLaren, D. C., Clarke, S. Young, S. G.** (1997): Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 6132-6137
- Kiss, G.B., Vincze, E., Kalman, Z., Forrai, T., Kondorosi, A.** (1979): Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*, J. Gen. Microbiol. **113**: 105-118
- Kondorosi, E., Buire, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B., Kondorosi, A.** (1991): Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host, Mol. Microbiol. **5**: 3035-3048
- Kormanec, J., Homerova, D., Barak, I., Sevcikova, B.** (1999): A new gene, *sigG*, encoding a putative alternative sigma factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2), FEMS Microbiol. Lett. **172**: 153-158
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. 2nd, Peterson, K. M.** (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes, Gene **166**: 175-176
- Kusian, B., Bednarski, R., Husemann, M., Bowien, B.** (1995): Characterization of the duplicate ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase genes and *cbb* promoters of *Alcaligenes eutrophus*, J. Bacteriol. **177**: 4442-4450
- Kutchma, A. J., Hoang, T. T., Schweizer, H. P.** (1999): Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A:ACP transacylase (FabD), J. Bacteriol. **181**: 5498-5504

**Kvint, K., Farewell, A., Nyström, T.** (2000): RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of  $\sigma^S$ , *J. Biol. Chem.* **275**: 14795-14798

**Lange, R., Hengge-Aronis, R.** (1991): Growth phase regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor  $\sigma^S$ , *J. Bacteriol.* **173**: 4474-4481

**Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lanzdunski, A.** (1996): A hierarchical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activator LasR and Rhl (VsmR) to expression of the stationary phase sigma factor RpoS, *Mol. Microbiol.* **21**: 1137-1146

**Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F., Williams, P.** (2000): The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase, *Microbiology* **146**: 2469-2480

**Lazazzera, B. A.** (2000): Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase, *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 177-182

**Lee, J. Y., Kwak, J. E., Moee, J., Eom, S. H., Liang, E. C., Pedelacq, J.-D., Berendzen, J., Suh, S. W.** (2001): Crystal structure and functional analysis of the SurE protein identify a novel phosphatase family, *Nat. Struct. Biol.* **8**: 789-794

**Li, C., Clarke, S.** (1992b): A protein methyltransferase specific for altered aspartyl residues is important in *Escherichia coli* stationary-phase survival and heat-shock resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9885-9889

**Li, C., Wu, P.-Y., Hsieh, M.** (1997): Growth-phase dependent transcriptional regulation of the *pcm* and *surE* genes required for stationary-phase survival of *Escherichia coli*, *Microbiology* **143**: 3513-3520

**Link, A. J., Robinson, K., Church, G. M.** (1997): Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12, *Electrophoresis* **18**: 1259-1313

**Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J., Sparling, R.** (1998): Regulation of the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*, *Can. J. Microbiol.* **44**: 707-717

**Lowenson, J. D., Kim, E., Young, S. G., Clarke, S.** (2001): Limited accumulation of damaged proteins in L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase-deficient mice, *J. Biol. Chem.* **276**: 20695-20702

**Maillet, F., Debelle, F., Denarie, J.** (1990): Role of the *nodD* and *syrM* genes in the activation of the regulatory gene *nodD3*, and of the common and host-specific *nod* genes of *Rhizobium meliloti*, *Mol. Microbiol.* **4**: 1975-1984

**Marketon, M. M., Gonzales J. E.** (2002): Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*, *J. Bacteriol.* **184**: 3466-3475

**Marquard, R.** (2000): Stickstoffassimilation und die Symbiose mit Knöllchenbakterien. [www.bibd.uni-giessen.de/gdoc/2000/uni/p00003/sticksto.htm](http://www.bibd.uni-giessen.de/gdoc/2000/uni/p00003/sticksto.htm)

**Matin, A., Auger, A., Blum, P. H., Schultz, J. E.** (1989): Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 293-316:

**Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, E. E., Ausubel, F. M.** (1982): Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced transposon Tn5 mutagenesis, *J. Bacteriol.* **149**: 114-122

**Meighen, E. A.** (1991): Molecular biology of bacterial bioluminescence, *Microbiol. Rev.* **55**: 123-142

**Milcamps, A., de Bruijn, F. J.** (1999): Identification of a novel nutrient-deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* gene (*hmgA*) involved in the degradation of tyrosine, *Microbiology* **145**: 935-947

**Miyamoto, C. M., Sun, W., Meighen, E. A.** (1998): The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*, *Biochim. Biophys. Acta* **1384**: 356-364

**Mulligan, J. T., Long, S. R.** (1989): A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes, *Genetics* **122**: 7-18

**Natera, S. H., Guerreiro, N., Djordjevic, M. A.** (2000): Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 995-1009

**Niewmierzycka, A., Clarke, S.** (1999): Do damaged proteins accumulate in *Caenorhabditis elegans* L-isoaspartate methyltransferase (*pcm-1*) deletion mutants ? *Arch. Biochem. Biophys.* **364**: 209-218

**Nomura, M.** (1999): Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and common principles, *J. Bacteriol.* **181**: 6857-6864

**Notley-McRobb, L., Death, A., Ferenci, T.** (1997): The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase, *Microbiology* **143**: 1909-1918

**Nyström, T.** (2001): Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death, *Arch. Microbiol.* **176**: 159-164

**O'-Farell, P.H.** (1975): High resolutional two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021

**Östling, J., Holmquist, L., Flärdh, K., Svenblad, B., Jouper-Jaan, A., Kjelleberg, S.** (1993): Starvation and recovery of *Vibrio*; In: Starvation in bacteria, Kjelleberg (ed.), pp: 103-123, ISBN 0-306-44430-5, Plenum Press, New York

- Parsek, M.R., Greenberg, E. P.** (2000): Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8789-8793
- Peoples, M. B., Herridge, D. F., Ladha, J. K.** (1995): Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production, *Plant soil* **174**: 3-28
- Peters, N. K., Frost, J. W., Long, S. R.** (1986): A plant flavone luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes, *Science* **233**: 977-980
- Phillips, D. A., Streit, W. R.** (1996): Legume signals to rhizobial symbionts: A new approach for defining rhizosphere colonization. In: G. Stacey, N. Keen (eds.), *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. Chapman & Hall, New York, 236-271
- Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S., Schaefer, A.L.** (1997): A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Bacteriol.* **179**: 7530-7537
- Riehle, M. M., Bennett, A. F., Long, A. D.** (2001): Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 525-530
- Rovira, A. D., Harris, J. R.** (1961): Plant root excretions in relations to the rhizosphere effect.V. The excretion of B-group vitamins, *Plant Soil* **14**: 199-214
- Sadowsky, M. J., Graham, P. H.** (1998): Soil biology of the *Rhizobiaceae*. In: *The Rhizobiaceae*, Molecular biology of model plant-associated bacteria, Spink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J., (eds.) 1<sup>st</sup> ed; pp. 155-172, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., Williams, P.** (1995): The bacterial „enigma“: cracking the code of cell-cell communication, *Mol. Microbiol.* **16**: 615-624
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A.** (1994): Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*, *Gene* **145**: 69-73
- Schlaman, H. R. M., Okker, R. J. H., Lugtenberg, B. J. J.** (1992): Regulation of nodulation gene expression by NodD in *Rhizobia*, *J. Bacteriol.* **174**: 5177-5182
- Schmeißer, C.** (2001): Molekulare Charakterisierung von *birS*, einer potentiellen Sensor-Kinase aus *Sinorhizobium meliloti*, Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen
- Schrattenholz, A.** (2001): *Methoden der Proteomforschung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin

**Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizer, H., Glushka, J. N., Endre, G., Gero, S. D., Kondorosi, A.** (1992): *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 192-196

**Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E. Jr, Rinehart, K. L., Farrand, S. K.** (1997): Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 6036-6041

**Siegele, D. A., Almiron, M., Kolter, R.** (1993): Approaches to the study of survival and death in stationary-phase *Escherichia coli*, In: Starvation in bacteria, Kjelleberg (ed.), pp: 151-167, ISBN 0-306-44430-5, Plenum Press, New York

**Simon, R., Priefer, U., Pühler, A.** (1983): A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria, Bio/Technology **1**: 784-791

**Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., Schmitt, R.** (2000): VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*, J. Bacteriol. **182**: 782-788

**Southern, E. M.** (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol. **98**: 503-517

**Spector, M. P.** (1998): The starvation stress response (SSR) of *Salmonella*, Adv. Microb. Physiol. **40**: 233-279

**Srinivasan, S., Östling, J., Charlton, T., de Nys, R., Takayama, K., Kjelleberg, S.** (1998): Extracellular signal molecule(s) involved in the carbon starvation response of marine *Vibrio* sp. strain S14, J. Bacteriol. **180**: 201-209

**Streit, W. R., Hofmann, K., Liebl, W.** (2000): Molecular characterization of the *Sinorhizobium meliloti nlpD* gene, Arch. Microbiol. **174**: 292-295

**Streit, W. R., Joseph, M. C., Phillips, D. A.** (1996): Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021, Mol. Plant-Microbe Interact. **9**: 330-338

**Streit, W. R., Phillips, D. A.** (1997): A biotin regulated DNA locus (*bioS*) in a possible survival operon of *Rhizobium meliloti* strain 1021. Mol. Plant-Microbe Interact. **10**: 933-937

**Swanson, J. A., Mulligan, J. T., Long, S. R.** (1993): Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*, Genetics **134**: 435-444

**Teixeira-Gomes, A. P., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S.** (2001): Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*, Infect. Immun. **68**: 2954-2961

- Thorne, S. H., Williams, H. D.** (1997): Adaption to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: analysis of survival, stress resistance and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase, *J. Bacteriol.* **179**: 6894-6901
- Thorne, S. H., Williams, H. D.** (1999): Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: identification of the role of N-acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival, *J. Bacteriol.* **198**: 981-990
- Traviglia, S. L., Datwyler, S. A., Yan, D., Ishihama, A., Meares, C. F.** (1999): Targeted protein footprinting: where different transcription factors bind to RNA polymerase, *Biochemistry* **38**: 15774-15778
- Treton, B. Y., Le Dall, M. T., Gaillardin, C. M.** (1992): Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase mutation by a genomic sequence from the yeast *Yarrowia lipolytica* identifies a new phosphatase, *Curr. Genet.* **22**: 345-355
- Uhde, C., Schmitt, R., Jording, D., Selbitschka, W., Pühler, A.** (1997): Stationary-phase mutants of *Sinorhizobium meliloti* are impaired in stationary-phase survival or in recovery to logarithmic growth, *J. Bacteriol.* **179**: 6432-6440
- van Delden, C., Comte, R., Bally, A. M.** (2001): Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **83**: 5376-5384
- Vance, C. P.** (1998): Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: *The Rhizobiaceae*, Molecular biology of model plant-associated bacteria, Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J., (eds.) 1<sup>st</sup> ed; pp. 509-530, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Visick, J. E., Clarke, S.** (1997): RpoS and OxyR-independent induction of HPI catalase at stationary phase in *Escherichia coli* and identification of *rpoS* mutations in common laboratory strains, *J. Bacteriol.* **179**: 4158-4163
- Visick, J. E., Cai, H., Clarke, S.** (1998): The L-isoaspartyl protein repair methyltransferase enhances survival of aging *Escherichia coli* subjected to secondary environmental stresses, *J. Bacteriol.* **180**: 2623-2629
- Visick, J. E., Clarke, S.** (1995): Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins, *Mol. Microbiol.* **16**: 835-845
- Visick, J. E., Ichikawa, J. K., Clarke, S.** (1998): Mutations in the *Escherichia coli surE* gene increase isoaspartyl accumulation in a strain lacking the *pcm* repair methyltransferase but suppress stress-survival phenotypes, *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 19-25
- Wai, S. N., Mizunoe, Y., Yoshida, S.** (1999): How *Vibrio cholerae* survive during starvation, *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 123-131
- Wei, X., Bauer, W. D.** (1998): Starvation-induced changes in motility, chemotaxis and flagellation of *Rhizobium meliloti*, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3767-3770

**Weichart, D., Lange, R., Henneberg, N., Hengge-Aronis, R.** (1993): Identification and characterization of stationary phase-inducible genes in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* **10**: 407-420

**Wells, D. H., Long, S. R.** (2002): The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis, *Mol. Microbiol.* **43**: 1115-1127

**Wexler, M., Yeoman, K. H., Stevens, J. B., de Luca, N. G., Sawers, G., Johnston, A. W.** (2001): The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron, *Mol. Microbiol.* **41**: 801-816

**Wick, L. M., Quadroni, M., Egli, T.** (2001): Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and *vice versa*, *Environ. Microbiol.* **3**: 588-599

**Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Sanchez, J. C., Bairoch, A., Hochstrasser, D. F.** (1998): Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number, *Electrophoresis* **19**: 1501-1505

**Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J. K., Downie, J. A.** (2002): N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer, *J. Bacteriol.* **184**: 4510-4519

**Wilson, K. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K., Akkermans, A. D. L., Jefferson, R. A.** (1995):  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria, *Microbiology* **141**: 1691-1705

**Wisniewski-Dye, F., Jones, J., Chhabra, S. R., Downie, J. A.** (2002): *rai* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*, *J. Bacteriol.* **184**: 1597-1606

**Withers, H. L., Nordström, K.** (1998) *Quorum-sensing* acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15694-15699

**Yeh, K. C., Peck, M. C., Long, S. R.** (2002): Luteolin and GroESL modulate *in vitro* activity of NodD, *J. Bacteriol.* **184**: 525-530

**Yildiz, F. H., Schoolnik, G. K.** (1998): Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*, *J. Bacteriol.* **180**: 773-784

**Zhang, Y., Cronan, J. E. Jr.** (1998): Transcriptional analysis of essential genes of the *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis gene cluster by functional replacement with the analogous *Salmonella typhimurium* gene cluster, *J. Bacteriol.* **180**: 3295-3303

**Zhang, R.-G., Skarina, T., Katz, J. E., Beasley, S., Khachatryan, A., Vyas, S., Arrowsmith, C. H., Clarke, S., Edwards, A., Joachimiak, A., Savchenko, A.** (2001): Structure of the *Thermotoga maritima* stationary phase survival protein SurE: A novel acid phosphatase, *Structure* **9**: 1095-1106

## DANKSAGUNGEN

Prof. Dr. Wolfgang Liebl danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Gottschalk möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats meiner Arbeit bedanken.

Als Betreuer meiner Arbeit möchte ich PD Dr. Wolfgang Streit für die Überlassung des Themas und die Bereitschaft, jederzeit für Fragen zur Verfügung zu stehen, danken.

Ganz herzlich danke ich allen ehemaligen und jetzigen Labormitgliedern Cati, Christel, Mladen, Moni, Julia, Kai, Nina, Manuela, Jörg, Christian, Maike, Alex, Birgit, Sonja, Plamena, Patrick, Angel, Kiki, Krassi, Arnim, Katrin und Schmul für die gute Atmosphäre im Labor 37/44. Besonders möchte ich mich bei Ute bedanken, für ihre sehr nette Art und die kleinen Gespräche an der Laborbank, bei Martin, für das tiefgehende Verständnis in Gesprächen über den schönen Laboralltag, bei Meike, als würdige Nachfolgerin im Geschicklichkeitsbereich und für die guten Filmempfehlungen, bei unserem „Chemiker“ Volker, für seine Hilfsbereitschaft, bei Ole, für die freundliche Aufnahme in Göttingen und die Fähigkeit die Dinge optimistischer zu betrachten und andere mit dieser Sichtweise (manchmal) anstecken zu können und natürlich bei Carsten, für die Organisation des Sportprogramms innerhalb und außerhalb des Labors, für den Spaß, für das Korrekturlesen und für seine „Weisheiten, die die Welt nicht braucht“.

Danken möchte ich auch Nicole, Bianca und Gunnar, dafür, daß Ihr mich nicht im „Exil“ vergessen habt.

Bei Marc-Oliver Luther bedanke ich mich für die Einführung in die Welt der Massenspektrometrie.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Werkstatt-Crew, für die Lösung aller Probleme mechanischer und elektronischer Natur und bei allen weiteren Mitgliedern des Instituts, die mir mit Rat und Tat behilflich waren.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Freund Tom, für die Unterstützung, die kleinen Aufmunterungen zwischendurch und für den monatelangen Verzicht auf seinen Computer.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und Großeltern danken, die mich während der Studien- und Promotionszeit ideell und finanziell unterstützt haben.

## LEBENS LAUF

14/09/1972	Geburt in Arad/Rumänien
1979-1983	Besuch der Grundschule in Bielefeld
1983-1989	Besuch der Marienschule der Ursulinen in Bielefeld
1989-1992	Besuch des Bavink-Gymnasiums in Bielefeld
06/1992	Abitur
10/92	Immatrikulation an der Universität Bielefeld im Studiengang Biologie (Diplom)
11/93, 04/94, 10/94	Vordiplom in den Fächern Chemie, Physik, Neurophysiologie und Tierphysiologie
12/96, 5/97, 11/97	Diplomprüfungen in den Fächern Chemie, Tierphysiologie, Pflanzenphysiologie und Genetik
11/97-11/98	Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. A. Pühler und Dr. W. Streit mit dem Titel: Überexpression, Reinigung und immunologischer Nachweis von BioS1, einem Biotin-abhängigen LysR-Typ Rezeptor in <i>Rhizobium meliloti</i> 1021
01/99	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation