

# **Regulation von Motilität und Exopolysaccharid-Synthese bei *Sinorhizobium meliloti* durch den Transkriptionsfaktor Rem**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
**CHRISTINE ROTTER**  
aus Ingolstadt

Regensburg, Juli 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 6. Juli 2005  
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt  
Prüfungsausschuß:  
Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth  
Erstgutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Thomm  
Dritter Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material</b>	<b>13</b>
2.1. Bakterien und Plasmide.....	13
2.2. Verwendete Oligonukleotide .....	18
2.3. Chemikalien und Enzyme .....	21
2.4. Nährmedien und Antibiotika.....	24
2.4.1. Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	24
2.4.2. Medien zur Anzucht von <i>S. meliloti</i> .....	25
2.5. Puffer und Lösungen .....	26
2.5.1. Lösungen für Mini- und Midi-Plasmidisolierungen.....	26
2.5.2. Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus <i>S. meliloti</i> -Zellen..	26
2.5.3. Lösungen für die DNA-Auftrennung (Agarosegelektrophorese) .....	27
2.5.4. Lösungen für DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung .....	27
2.5.5. Lösungen zur Präparation radioaktiv markierter DNA-Sonden .....	27
2.5.6. Lösungen für DNaseI- <i>footprinting</i> .....	28
2.5.7. Lösungen für DNA-Chip-Analysen ( <i>Microarray</i> ) .....	29
2.5.7.1. Lösungen für Fluoreszenz-Markierung.....	29
2.5.7.2. Lösungen für DNA-Chip-Hybridisierungen .....	29
2.5.8. Lösungen zur Auftrennung von Proteinen.....	30
2.5.9. Lösungen zum Transfer von Proteinen.....	31
2.5.10. Lösungen für die Proteinexpression- und reinigung.....	31
2.5.10.1. Lösungen für die Proteinreinigung mittels IMPACT .....	31
2.5.10.2. Lösungen für die De- und Renaturierung .....	32
2.5.11. Lösungen für Reportergen-Analysen.....	32
<b>3. Methoden</b>	<b>33</b>
3.1. Kultivierung von Bakterien.....	33
3.1.1. Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	33

3.1.2. Kultivierung und Lagerung von <i>S. meliloti</i> .....	33
3.2. Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	34
3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	34
3.2.1.1. Mini-Plasmidisolierung.....	34
3.2.1.2. Midi-Plasmidisolierung.....	35
3.2.2. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. meliloti</i> -Zellen .....	35
3.2.3. Isolierung von RNA aus <i>S. meliloti</i> -Zellen.....	36
3.2.4. Auf trennung von DNA durch Agarosegelektrophorese .....	36
3.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
3.3. Enzymatische Modifizierung von DNA.....	37
3.3.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	37
3.3.2. Alkalische Phosphatase-Behandlung.....	37
3.4. DNA-Techniken.....	38
3.4.1. Ligieren von DNA-Fragmenten mit Vektoren.....	38
3.4.2. Transformation von <i>E. coli</i> .....	38
3.5. PCR-Methoden.....	38
3.5.1. PCR der DNA einer <i>S. meliloti</i> -Einzelkolonie .....	40
3.5.2. PCR-Mutagenese ( <i>overlap extension</i> ) .....	40
3.5.2.1. Herstellung von AS-Austausch-Mutanten .....	40
3.5.2.2. Herstellung von <i>in frame</i> -Deletionen.....	41
3.6. DNA-Sequenzanalysen und Auswertungsverfahren.....	42
3.7. Konjugativer Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>S. meliloti</i> .....	42
3.7.1. Einführung von Codon-Substitutionen und Deletionen in das <i>S. meliloti</i> -Genom .....	42
3.7.2. Einführung von <i>exp-lacZ</i> -Fusionen in das <i>S. meliloti</i> -Genom .....	43
3.8. Nukleinsäuretransfer und Hybridisierung ( <i>Southern blot</i> ).....	44
3.8.1. Nukleinsäuretransfer .....	44
3.8.2. Markierung von Sonden .....	45
3.8.3. Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion.....	45
3.9. Reportergen-Analysen ( <i>Miller Assays</i> ) .....	45
3.10. Sm6kPCR DNA-Chip-Analysen.....	47
3.10.1. Synthese von aminoallyl-modifizierter cDNA .....	47
3.10.2. Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an cDNA .....	48

3.10.3. Hybridisierung der Sm6kPCR DNA-Chips .....	48
3.10.4. Auswertung der Fluoreszenzdaten.....	49
3.11. DNaseI- <i>footprinting</i> .....	50
3.11.1. Präparation radioaktiv markierter DNA-Sonden .....	50
3.11.2. G+A-Sequenzierungsreaktion.....	51
3.11.3. DNaseI- <i>footprinting</i> .....	52
3.12. Rekombinante Expression und Reinigung von Rem, RemD45N und RemD45N/D47N .....	53
3.12.1. Das IMPACT-System .....	53
3.12.2. De- und Renaturierung von Rem.....	54
3.12.3. Dialyse von Proteinlösungen .....	54
3.12.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	55
3.12.5. Analytische Gelfiltration .....	55
3.13. Aufnahme eines CD-Spektrums zur Verifizierung der korrekten Faltung von Rem .....	55
3.14. Immunchemische Methoden .....	56
3.14.1. Gewinnung von denaturierten Proteinproben.....	56
3.14.2. Affinitätsreinigung spezifischer Antikörper aus Rohseren.....	57
3.14.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	57
3.14.4. Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembran ( <i>Western blot</i> ).....	58
3.14.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz	58
3.15. <i>In vitro</i> -Phosphorylierungstests mit [ <sup>32</sup> P]-Acetylphosphat .....	59
3.15.1. Synthese von [ <sup>32</sup> P]-Acetylphosphat .....	59
3.15.2. Phosphorylierung von Proteinen.....	59
3.16. Mini- <i>Tn5</i> -Mutagenese .....	60
3.16.1. Transposon-Insertion .....	60
3.16.2. Sequenzierung von Insertions-Mutanten .....	60
3.17. Fluoreszenzmikroskopie .....	61
3.18. Analyse des Schwärmtverhaltens motiler <i>S. meliloti</i> -Zellen .....	61
3.19. Analyse der Schwimmgeschwindigkeit von motilen <i>S. meliloti</i> -Zellen .....	62

**4. Ergebnisse 63**

4.1. Die Rolle von Rem in der Hierarchiekaskade der Genexpression des <i>flagellar regulon</i> .....	63
4.1.1. Computergestützte Sekundärstrukturanalyse.....	63
4.1.2. Lokalisierung von Rem.....	66
4.1.3. Oligomerisiert das Rem-Protein ? .....	67
4.1.4. Analyse der potentiellen <i>receiver</i> -Domäne von Rem.....	68
4.1.4.1. Phänotypische Charakterisierung von aspartyl-substituierten <i>rem</i> -Mutanten .....	69
4.1.4.2. Einfluß von aspartyl-substituierten Mutantenproteinen auf die Expression repräsentativer Gene des <i>flagellar regulon</i> .....	71
4.1.5. Wachstumsabhängige <i>rem</i> -Promotoraktivität in RU13/007 ( <i>remD45N</i> ) und RU13/009 ( <i>remD45N/D47N</i> ) .....	74
4.1.6. Proteinstabilität im Verlauf des Bakterienwachstums .....	76
4.1.6.1. Stabilität von Rem.....	76
4.1.6.2. Stabilität von RemD45N und RemD45N/D47N.....	77
4.1.7. Wird Rem durch Phosphorylierung aktiviert ? .....	78
4.1.7.1. Rekombinante Expression und Reinigung von Rem, RemD45N und RemD45N/D47N .....	78
4.1.7.2. Überprüfung der Faltung von Rem durch CD-Spektroskopie .79	79
4.1.7.3. Versuche zur <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von Rem durch [ <sup>32</sup> P]-Acetylphosphat.....	81
4.1.8. Aktivierung von Rem durch Acetylierung ? .....	82
4.1.8.1. <i>In vivo</i> -Reaktion.....	82
4.1.8.2. Deletionen der zwei <i>acs</i> -Gene im <i>S. meliloti</i> -Genom.....	83
4.1.8.3. Phänotypische Charakterisierung von RU13/227 und RU13/228 .....	84
4.1.9. Suche nach Aktivatoren der <i>rem</i> -Transkription durch Mini- <i>Tn5</i> -Mutagenese .....	85
4.1.10. Kontrollieren die Sigmafaktoren RpoE2 und RpoH2 die Transkription von <i>rem</i> ? .....	88
4.1.10.1. Deletion von <i>rpoH2</i> und <i>rpoE2</i> .....	88
4.1.10.2. Charakterisierung der <i>rpoE2</i> - und <i>rpoH2</i> -Deletionsmutanten	89

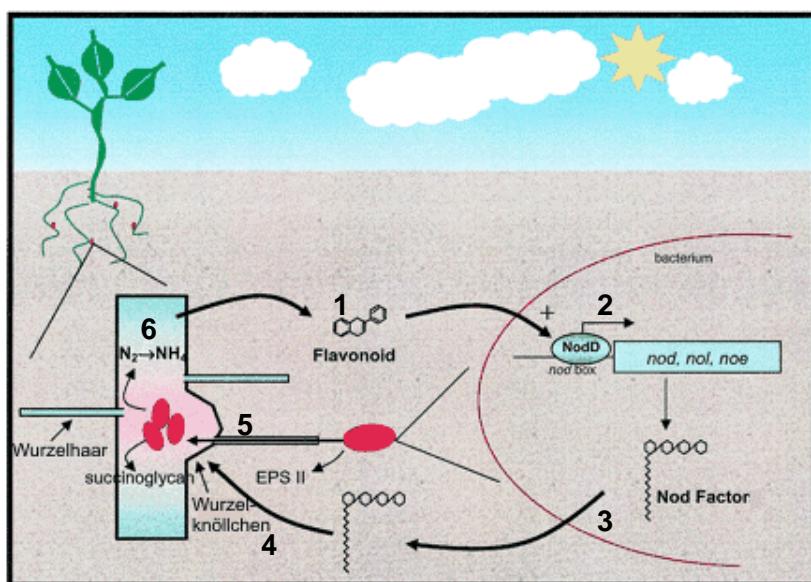
4.1.11. Überexpression und Komplementation von <i>rem</i> im Hintergrund von Wildtyp und vier Deletionsmutanten .....	91
4.1.11.1. Charakterisierung von Schwärm- und Schwimmfähigkeit .....	91
4.1.11.2. Immunchemische Studien .....	94
4.1.12. DNA-Bindestudien mit rekombinantem Rem-Protein ( <i>footprinting</i> ).....	97
4.1.12.1. Bindung von Rem an den <i>flgB</i> -Promotor.....	97
4.1.12.2. Bindung von Rem an den <i>fliF</i> -Promotor .....	100
4.1.12.3. Bindung von Rem an den <i>orf38</i> -Promotor.....	102
4.1.12.4. Bindung von Rem an den <i>rem</i> -Promotor .....	104
4.1.12.5. Bindet Rem über einen spezifischen Konsensus an die Promotor-DNA ? .....	107
4.1.13. Die Transkriptome von RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) .....	108
4.1.14. Promotoraktivitäten repräsentativer <i>exp</i> -Gene in <i>S. meliloti</i> -Wildtyp und drei Deletionsstämmen.....	116
<b>5. Diskussion</b>	<b>119</b>
5.1. Hierarchiekaskade der Genexpression bei <i>S. meliloti</i> .....	119
5.2. Aktivierung und Inaktivierung von Rem .....	121
5.3. Der Transkriptionsfaktor Rem bindet spezifisch an DNA .....	124
5.4. Zusammenhang von Motilität und Exopolysaccharid-Biosynthese.....	126
5.5. Ausblick .....	130
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>131</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>133</b>
<b>Anhang</b>	<b>144</b>

# Abkürzungen

aa-dUTP	aminoallyl-Desoxyuridin-Triphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>ccw</i>	<i>counterclockwise</i>
<i>cpm</i>	<i>counts per minute</i>
<i>cw</i>	<i>clockwise</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamin-Tetraessigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
Gen	Gentamycin
Gen <sup>R</sup>	Gentamycin-Resistenz
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
NaAc	Natriumacetat
NHS	N-hydroxysuccinimid
Neo	Neomycin
Neo <sup>R</sup>	Neomycin-Resistenz
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese
Str	Streptomycin
Str <sup>R</sup>	Streptomycin-Resistenz
TEMED	Tetramethylaminooethan
Tet	Tetracyclin
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

# 1. Einleitung

Die Symbiose zwischen Stickstoff-fixierenden Bodenbakterien und Leguminosen hat eine enorme landwirtschaftliche Bedeutung. Die symbiotische Stickstoff-Fixierung ermöglicht einen Gewinn an organisch gebundenem Stickstoff von 100 - 200 kg pro Hektar und Jahr (Schlegel, 1992). Schon vor 2500 Jahren betrieben die Römer zur Ertragssteigerung der Getreideernte Wechselwirtschaft mit Leguminosen. Während zu dieser Zeit derartiger Fruchtwechsel Resultat aufmerksamer Beobachtung war, sind inzwischen als Folge intensiver Forschung auch auf molekularer Ebene die Interaktionen zwischen den Bodenbakterien *Rhizobium spp.* und den Leguminosen weitgehend aufgeklärt (Abb. 1).



**Abb. 1.** Schematische Darstellung der Symbiose zwischen *Rhizobium spp.* und Leguminosen (nach González & Marketon, 2003). Von der Pflanze werden Flavonoide in den Boden sezerniert (1); diese induzieren eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors NodD (2); NodD aktiviert die Transkription der Nodulationsgene, die für die Synthese der Nod-Faktoren benötigt werden (3); die Nod-Faktoren induzieren die Bildung von Wurzelknöllchen (4); Rhizobien synthetisieren bakterielle Exopolysaccharide (EPS II, Succinoglycan) und dringen in die Wurzelknöllchen ein (5); die Bakterien differenzieren zu Stickstoff-fixierenden Bakteroiden (6).

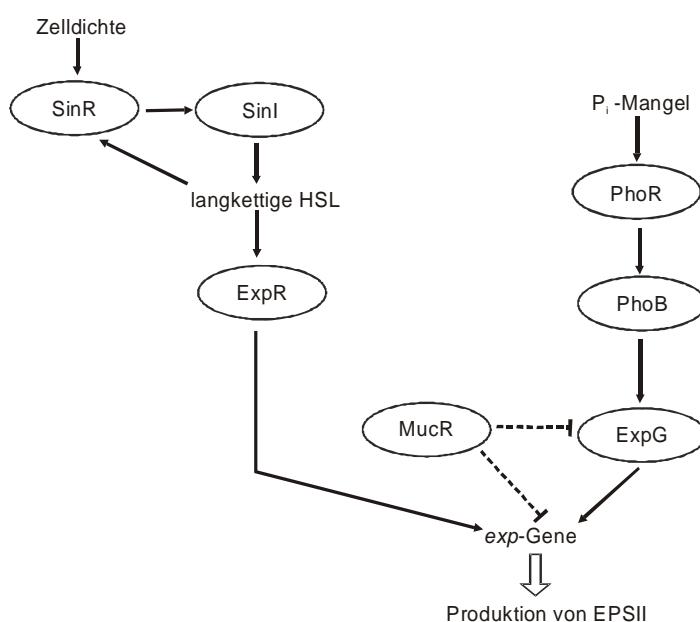
Rhizobien werden von der Wirtspflanze u. a. durch phenolische Signalstoffe, darunter Flavonoide oder Acetosyringone, chemotaktisch angelockt. Bisher wurden über 4000

derartige Substanzen identifiziert (Perret *et al.*, 2000). Flavonoide aktivieren auch die Synthese der bakteriellen Nodulations-Faktoren (Abb. 1), durch die eine Krümmung der Wurzelhaare um die Bakterienpopulation ausgelöst wird. Über einen Infektionsschlauch im Wurzelhaar gelangen die Rhizobien in das Cytoplasma der Wurzelzellen (Peng & Walker, 1998). Diese Infektion induziert in der Pflanze Zellteilungen und die Bildung von Wurzelknöllchen. Nach Besiedlung der Wurzelknöllchen differenzieren die Rhizobien zu Bakteroiden, die mittels Nitrogenase Luftstickstoff durch Reduktion zu biologisch verwendbarem Ammoniak fixieren können (Abb. 1).

Für zahlreiche Symbiosen zwischen Rhizobien und Leguminosen wurde gezeigt, daß eine Besiedlung der Wurzelknöllchen und folglich die Etablierung einer erfolgreichen Symbiose nur mittels bakterieller Exopolysaccharide stattfindet. Ein sehr gut charakterisiertes Beispiel diesbezüglich stellt die Symbiose zwischen *Sinorhizobium meliloti* und Luzerne (*Medicago sativa*) dar. Von *S. meliloti* können zwei unterschiedliche Exopolysaccharide, Succinoglycan (EPS I) und Galactoglucan (EPS II), synthetisiert werden (Glazebrook & Walker, 1989). Unter Standardbedingungen dominiert die Synthese von EPS I. Eine Oktasaccharid-Untereinheit dieses Polymers ist aus sieben Glucose- und einem Galactose-Rest aufgebaut und durch Succinyl-, Acetyl- und Pyruvylgruppen modifiziert (Cheng & Walker, 1998a). Nur die niedermolekulare Form von EPS I aus Trimeren der oktameren Untereinheit ist bei der Symbiose wirksam. Mittels der Glycanasen ExsH und ExoK wird das hochmolekulare Succinoglycan-Polymer zu den niedermolekularen Saccharid-Trimeren depolymerisiert (York & Walker, 1997; 1998). Über die Regulation der Expression der Succinoglycan-Biosynthesegene, die als 27 kb-Cluster auf einem der beiden Megaplasmide, nämlich pSymB, zu finden sind, ist nur wenig bekannt. Der aktivierende Einfluß eines Zwei-Komponenten-Systems aus der Histidinkinase ChvI und dem Responsregulator ExoS, und Repression durch einen bisher nicht weiter charakterisierten Faktor ExoR konnten zwar nachgewiesen werden (Cheng & Walker, 1998b), die Aufklärung definierter Regulationsmechanismen bleibt aber Aufgabe zukünftiger Forschung.

Auch die Biosynthesegene für Galactoglucan sind, als 30 kb *exp*-Gencluster, auf dem Megaplasmid pSymB lokalisiert. Der Einfluß verschiedener Regulatoren und äußerer Faktoren auf die EPS II-Synthese konnte nachgewiesen werden. In Abb. 2 ist dieses regulatorische Netzwerk veranschaulichend zusammengefaßt. Durch Phosphatmangel werden die Histidinkinase PhoR, der korrespondierende Responsregulator PhoB und der

Transkriptionsfaktor ExpG in einer Signaltransduktionskette aktiviert und die ExpG-vermittelte Expression der EPS II-Biosynthesegene induziert (Rüberg *et al.*, 1999; Mendrygal & González, 2000). Der Repressor MucR dagegen hemmt die Transkription der *exp*-Gene (Rüberg *et al.*, 1999; González *et al.*, 1996a). Desweiteren konnte eine von der Zelldichte abhängige Regulation der EPS II-Synthese durch den LuxR-homologen Faktor ExpR nachgewiesen werden (González *et al.*, 1996a; Pellock *et al.*, 2002). ExpR wird durch ein Quorum Sensing-System aus Autoinducer-Synthase SinI und Transkriptionsfaktor SinR kontrolliert. Palmitoleyl-Homoserinlacton ( $C_{16:1}$ -HL), ein Produkt von SinI, aktiviert ExpR, was in einer gesteigerten Galactoglucan-Produktion resultiert (Marketon *et al.*, 2003).



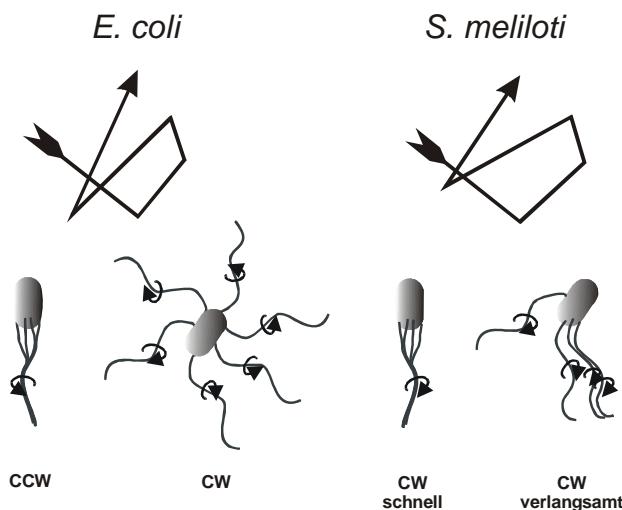
**Abb. 2.** Modellvorstellung der Regulation der Galactoglucan-Biosynthese bei *S. meliloti*. Ellipsen: Genprodukte; Pfeile: Positiv-Kontrolle; gestrichelte Linien: Negativ-Kontrolle; HSL: Homoserinlactone;  $P_i$ : Phosphatmangel.

Nur über diese ExpR-regulierte Synthese entsteht symbiotisch aktives EPS II (Pellock *et al.*, 2002). Die hochmolekulare Form von Galactoglucan ist ein Polymeres aus Disaccharid-Untereinheiten, deren Bausteine aus mit Acetyl- und Pyruvylgruppen modifizierten Glucose- und Galactosemonomeren bestehen. Die symbiotisch aktive niedermolekulare Form dagegen setzt sich aus 15 bis 20 derartiger Disaccharid-Untereinheiten zusammen (González *et al.*, 1996b).

Bevor *S. meliloti* überhaupt eine Symbiose mit *M. sativa* etablieren kann, muß das Bodenbakterium erst einmal zu der Pflanzenwurzel gelangen. Motilität und die Wahrnehmung von Lockstoffen sind essentielle Fähigkeiten, die der Symbiose mit *M. sativa* vorangestellt sind (Hunter & Fähring, 1980; Ames & Bergmann, 1981). Während die Gene für Symbiose und Stickstoff-Fixierung auf zwei Megaplasmiden, pSymB (1,68 Mb) und pSymA (1,35 Mb), lokalisiert sind, liegen alle wichtigen Gene für Motilität und Chemotaxis in einem großen Regulon (50 kb) auf dem Hauptchromosom (3,65 Mb) von *S. meliloti* vor (Sourjik *et al.*, 1998; Galibert *et al.*, 2001). Die Gene dieses *flagellar regulon* sind in 14 Transkriptionseinheiten unterteilt (Muschler, 2000).

Die Fähigkeit einen Lock- oder Schreckstoffgradienten zu erkennen und in gerichtete Bewegung umzusetzen, wird als Taxis bezeichnet. Handelt es sich bei den Signalstoffen um chemische Verbindungen, zum Beispiel ein von der Luzernenwurzel sezerniertes Flavonoid, Zucker oder Aminosäuren, so wird von „Chemotaxis“ gesprochen. Für eine gezielte Bewegungssteuerung sind Rezeptoren zur Reizaufnahme, die Signalübertragung und die daraus resultierende Regulation des Effektors (Flagellenmotor) zuständig. Motilität und (chemo-)taktisches Verhalten sind weit verbreitet unter Bakterien; sie verleihen einen deutlichen Selektionsvorteil, weil Habitate mit optimalem Milieu schnell erreicht und neue Biotope „erobert“ werden. Die best charakterisierten motilen Bakterien sind Enterobakterien, wie *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* ( $\gamma$ -Proteobakterien), deren chemotaktisches Verhalten seit den 60er Jahren untersucht wird (Adler, 1965). Erst seit den 90er Jahren wurden Mitglieder der  $\alpha$ -Subgruppe der Proteobakterien, wie *Caulobacter crescentus*, *Rhodobacter sphaeroides* und auch *S. meliloti*, als Modellorganismen für chemotaktische Studien herangezogen (Scharf & Schmitt, 2002). Der phylogenetische Abstand (ca. 500 Millionen Jahre; Ochman & Wilson, 1987) und die verschiedenen Biotope haben zu unterschiedlichen Mechanismen bei Signalübertragung und Bewegungssteuerung geführt, obwohl das prinzipielle Muster der Zufallsbewegung (*random walk*) beibehalten wird. Wie in Abb. 3 dargestellt, besteht dieses Bewegungsmuster sowohl bei *E. coli* ( $\gamma$ -Proteobakterium) als auch bei *S. meliloti* ( $\alpha$ -Proteobakterium) alternierend aus geradlinigen Läufen und kurzen Taumelsequenzen. Zum aufsteigenden Lockstoffgradienten werden die Läufe verlängert bzw. die Taumelbewegung unterdrückt (*biased random walk*; Berg & Brown, 1972; Berg, 2000). Zwar sind bei *E. coli* und *S. meliloti* die geradlinigen Läufe jeweils Resultat eines rotierenden Flagellenbündels, das die Zelle wie eine Schiffsschraube vorantreibt, der

Mechanismus der Taumelbewegung (Richtungsänderung) unterscheidet die beiden Systeme jedoch deutlich.

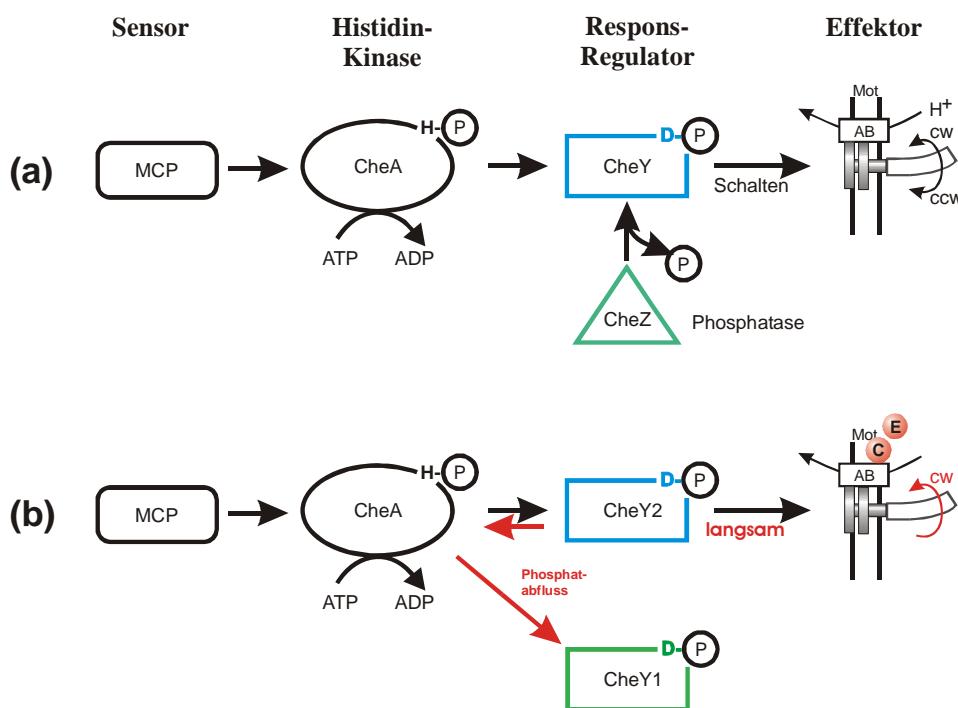


**Abb. 3.** Schwimmuster (oben) und Flagellenrotation (unten) von *E. coli* und *S. meliloti*. cw = clockwise, ccw = counterclockwise (nach Scharf and Schmitt, 2003).

Das Flagellenbündel von *E. coli* bildet sich bei Rotation gegen den Uhrzeigersinn (ccw), weil die Flagellen linkshändige Helices bilden. Durch die Umkehr der Flagellenrotation zum Uhrzeigersinn (cw) fällt das Flagellenbündel auseinander, die Zelle taumelt. Die vier bis sechs peritrich inserierten Flagellen von *S. meliloti* rotieren immer cw, können aber die Rotationsgeschwindigkeit (Drehmoment) variieren. Bei schneller, gleichmäßiger cw-Rotation aller rechtshändig helikalen Flagellen wird ein Bündel gebildet, das die Zelle geradlinig vorantreibt. Das Auseinanderfallen des Flagellenbündels wird durch eine asynchrone Verlangsamung der Rotationsgeschwindigkeiten einzelner Flagellen erreicht, die Zelle taumelt (Götz & Schmitt, 1987; Platzer *et al.*, 1997; Schmitt, 2002; Scharf, 2002).

Chemotaktisch aktive Bakterien detektieren externe Reize mittels spezifischer Transmembranproteine, den MCPs (*methyl-accepting chemotaxis protein*). Stimuli werden mit einer periplasmatischen Rezeptordomäne detektiert und in Signale an der cytoplasmatischen Domäne gewandelt. Diese werden über ein Zwei-Komponenten-System aus der Histidinkinase, CheA, und dem Responsregulator, CheY, (Stock & Surette, 1996) zum Motor übertragen. In Abb. 4a ist die sensorische Signaltransduktionskette von *E. coli* schematisch dargestellt. Ist kein Signalmolekül an

die Rezeptoren gebunden, wird CheA unter ATP-Verbrauch an His48 autophosphoryliert. CheA überträgt die Phosphatgruppe auf den Aspartyl-Rest an Position 57 von CheY. Das durch die Phosphorylierung aktivierte CheY interagiert mit FliM an der cytoplasmatischen Oberfläche des C-Rings (Bren & Eisenbach, 1998). Resultat ist eine Rotationsumkehr des Motors von *ccw* nach *cw* (Welch, 1994) und folglich eine Taumelbewegung des Bakteriums. Für die sehr kurze Dauer (0,1 s) der Taumelsequenzen ist eine schnelle Dephosphorylierung von CheY-P eine Voraussetzung, die mit einer Halbwertszeit des spontanen Zerfalls von CheY-P von ca. 10 s nicht erfüllt werden kann (Lukat *et al.*, 1992). Die Phosphatase CheZ beschleunigt die Dephosphorylierungsreaktion 10fach (Hess *et al.*, 1988). Lockstoffbindung hemmt die Autokinaseaktivität von CheA, die Phosphorylierung von CheY und die Rotationsumkehr des Motors bleiben aus und folglich schwimmt die Zelle weiter geradeaus.

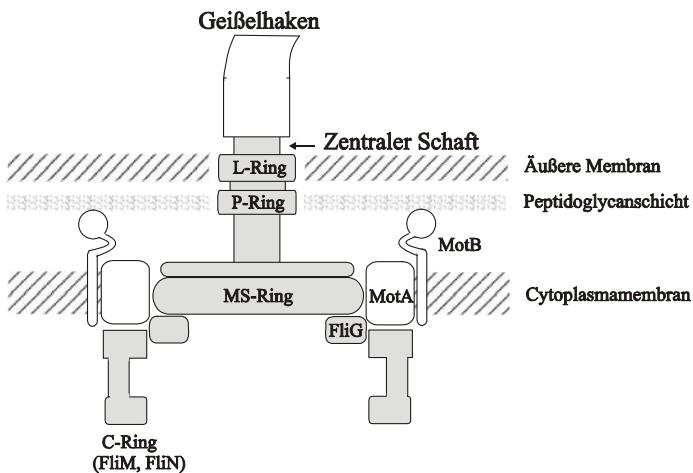


**Abb. 4.** Vergleich der chemotaktischen Signaltransduktionsketten von *E. coli*. und *S. meliloti*. Funktionell analoge Komponenten sind mit identischem Farbcodest dargestellt. Neue Komponenten und Reaktionsschritte der Signalkaskade bei *S. meliloti* sind rot markiert; MCP = *methyl-accepting chemotaxis protein*; CheA = Histidinkinase; CheY, CheY1, CheY2 = Responsregulatoren; CheZ = Phosphatase; D-P = Aspartylphosphat; Mot A, B, C, E = Motorproteine; cw = *clockwise*; ccw = *counterclockwise* (verändert nach Schmitt, 2002).

Zusätzlich zum andersartigen Rotationsmuster der Flagellen weist *S. meliloti* Unterschiede zum enterobakteriellen Paradigma in Signalkette und Motorkomponenten auf (Abb. 4b). Während *S. meliloti* MCP-analoge Rezeptoren und eine Histidinkinase CheA besitzt, stellt das Vorhandensein von zwei Responsregulatoren, CheY1 und CheY2, und das Fehlen einer CheZ-Phosphatase ein Novum dar (Greck *et al.*, 1995; Sourjik & Schmitt, 1996). Der dominante Responsregulator CheY2-P bremst die Rotation des Motors und löst somit die Taumelbewegungen bei *S. meliloti* aus (Sourjik & Schmitt, 1996). Durch einen neuartigen Mechanismus wird die Phosphatgruppe von CheY2-P auf CheA und dann weiter auf CheY1 übertragen (Retrophosphorylierung). CheY1 nimmt also die Rolle von CheZ ein. CheY1-P zerfällt aber spontan nur mit einer Halbwertszeit von 10 s (Sourjik & Schmitt, 1998). Obwohl CheY1 im Vergleich zu CheA in 10fachem Überschuß vorliegt, reicht der Spontanzerfall nicht, um die schnelle Kinetik der Retrophosphorylierung zu erklären. Die Demethylase CheB wird ebenfalls von CheA-P aktiviert und ist ein zusätzlicher Abfluß für Phosphat. Trotzdem wird noch weiter nach einer zusätzlichen Phosphatase gesucht.

Das zentrale Organell der bakteriellen Fortbewegung ist die rotierende Flagelle. Flagellen werden in drei morphologische Abschnitte gegliedert: a) das 5 - 10 µm lange helikale Filament, b) den flexiblen Haken (Hirano *et al.*, 2003), beides extrazelluläre Komponenten, und c) den Basalkörperkomplex, der von der äußeren Membran bis ins Cytoplasma reicht. Den proximalen Teil des Basalkörpers bildet der Flagellenmotor, dessen Rotation durch den Protonengradienten über die Cytoplasmamembran mittels radial ausgelegter MotA/MotB-Ionenkanäle energetisiert wird. Elektronenmikroskopische Studien von *E. coli*-Filamenten verdeutlichen die schwach strukturierte Oberfläche mit 11 helikalen Längsstreifen (Schmitt *et al.*, 1974), deren Baustein das Flagellinmonomer FliC ist. Die 11 Protofilamente existieren in einer L- und einer R-Konformation, in denen die Flagellinmonomere unterschiedlich dicht gepackt sind (Namba & Vonderviszt, 1997). Dies ermöglicht verschiedene polymorphe Konformationen des Filaments. Durch die Rotationsumkehr des Motors nach cw „versucht“ die linkshändige in eine rechtshändige Konformation umzuklappen: das Bündel fällt auseinander. Wie in Abb. 5 dargestellt, besteht der Basalkörperkomplex aus einem rotierenden Schaft mit vier aufgesetzten Ringen. Der in der Lipopolysaccharidschicht verankerte L-Ring bildet zusammen mit dem in der Peptidoglycanschicht verankerten P-Ring das Drehlager für den rotierenden Schaft (Francis *et al.*, 1994), über den das vom Motor generierte Drehmoment auf Haken und

Filament übertragen wird. Der in der Cytoplasmamembran lokalisierte MS-Ring bildet zusammen mit dem assoziierten C-Ring den Rotor, der fest mit dem Schaft verbundenen ist. Der C-Ring, aus FliG-, FiM- und FliN-Monomeren, wird auch als *switch*-Komplex bezeichnet (Yamaguchi *et al.*, 1986). Über den C-Ring wird der Wechsel der Drehrichtung kontrolliert.



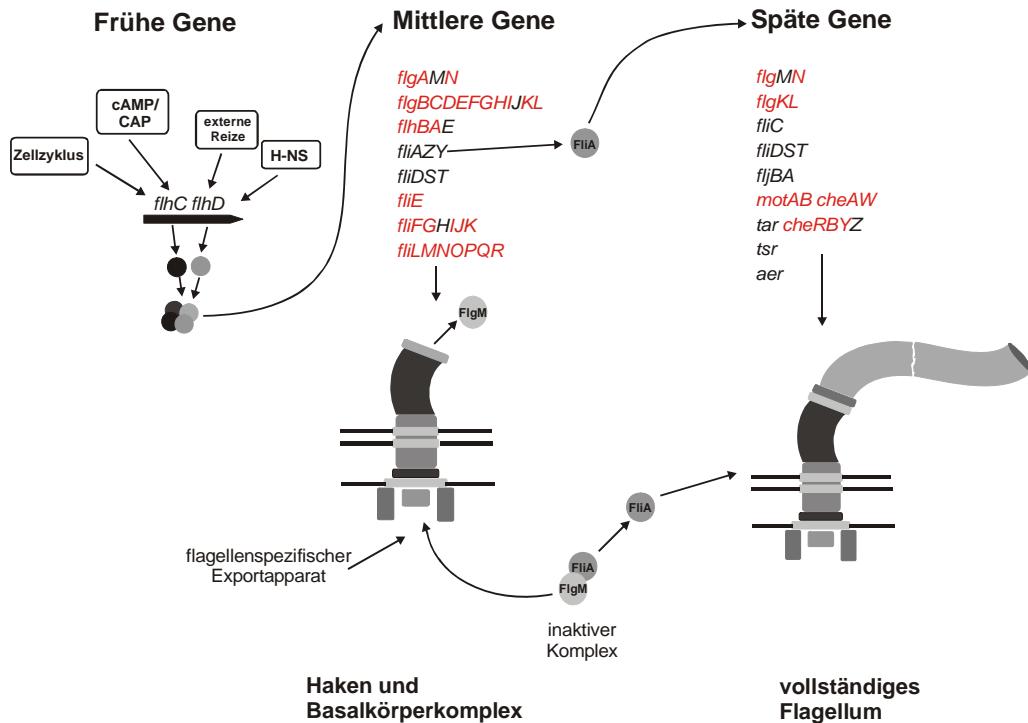
**Abb. 5.** Schnitt durch einen enterobakteriellen Geißelmotor (nach Namba & Vonderviszt, 1997) Bezeichnung der beteiligten Komponenten: L-Ring = Ring in Lipopolysaccharidschicht; P-Ring = Ring in Peptidoglycanschicht; MS-Ring = Ring in Cytoplasmamembran (*membran surface*); C-Ring = cytoplasmatischer Ring (*switch*-Komplex aus FliG-, FliM-, FliN-Monomeren); MotA/MotB = Motorproteine

Die Energie für den Motor liefern die MotA/MotB-Protonenkanäle. Weil MotB fest an der Peptidoglykanschicht verankert ist, bilden die Kanalproteine den Stator (Blair & Berg, 1988). Er hat die Stöchiometrie  $(\text{MotA})_4(\text{MotB})_2$  (Braun & Blair, 2001). Die elektrochemische Energie des Protonengradienten wird im Flagellenmotor in mechanische Energie des Drehmoments umgewandelt. Nach einem aktuellen Konzept würde die Umwandlung in Drehbewegung im MotA-MotB-Stator vollzogen und anschließend über Coulomb-Kräfte auf den Rotor übertragen (Schmitt, 2003).

Was unterscheidet die Flagellenmotoren von *E. coli* und *S. meliloti*? Im Vergleich zu *E. coli* rotiert der *S. meliloti*-Motor ausschließlich im Uhrzeigersinn, und Richtungsänderungen werden durch Variation der Rotationsgeschwindigkeit einzelner Flagellen statt durch Rotationsumkehr bewerkstelligt. Welche molekulare Unterschiede existieren zwischen den Systemen? Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten rechtshändige „komplexe“ Filamente mit einer prominenten Struktur aus drei helikalen Bändern

(Krupski *et al.*, 1985; Trachtenberg, 1986). Diese rigide Struktur lässt keine polymorphen Transitionen der rechtshändigen zur linkshändigen Helix zu. Die Filamente sind aus vier Flagellinmonomeren, FlaA, FlaB, FlaC und FlaD, aufgebaut (Scharf *et al.*, 2001). Zusätzlich wurden zwei neuen Komponenten des Flagellenmotors, MotC und MotE, und eine große periplasmatische Extradomäne von MotB, identifiziert. MotC bindet an die MotB-Extradomäne und ist für deren Funktionalität unbedingt erforderlich (Platzer *et al.*, 1997; Halbach, 2003; Jäckel, 2004). MotE ist ein periplasmatisches Chaperon, das für Faltung und Zielführung von MotC im Periplasma sorgt (Eggenhofer *et al.*, 2004; Eggenhofer, 2005). Diese Besonderheiten könnten für die Stärke des Drehmoments der *S. meliloti*-Flagellen zuständig sein. MotC könnte dabei als „Protonenfalle“ oder „Sensor des Membranpotentials“ fungieren. Die Variation des Drehmoments beruht vor allem auf der Topologie geladenener Aminosäurereste, die an der Stator-Rotor (MotA-FliG)-Grenzfläche als Antipoden für die Kraftübertragung von Stator auf den Rotor sorgen (Zhou *et al.*, 1998). Im MotA-Molekül (Stator) sorgt Glu150 primär für die Kraftübertragung, während Arg90 und Glu98 für die Geschwindigkeitsvariationen (Chemokinese) zuständig sind (Attmannspacher *et al.*, 2005).

Die Synthese des Basalkörperkomplexes, der Flagellen und der Chemotaxiskomponenten ist das Resultat einer hierarchisch regulierten Expression von ca. 50 Genen. Bei *E. coli* sind diese Gene auf vier große Regionen des bakteriellen Chromosoms verteilt und in 17 Transkriptionseinheiten gegliedert (Macnab, 1996). Die Expression der zahlreichen Gene ist ein hoch energieverbrauchender Vorgang, für den ca. 2 % des bakteriellen Energiehaushalts benötigt werden (Soutourina & Bertin, 2003). Gliederung der 50 Gene in drei hierarchische Genklassen und deren kontrollierte Expression garantiert minimalen Energieverbrauch. Des Weiteren ist die Genexpression zeitlich mit der Flagellenassemblierung gekoppelt (Chilcott & Hughes, 2000). Abb. 6 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen hierarchischer Genexpression und Flagellenassemblierung. An der Spitze der drei Hierarchieklassen befinden sich die zentralen Regulatoren FlhC und FlhD, die essentiell für die Expression der weiteren Gene des *flagellar regulon* sind. Die Expression des *flhDC*-Operons selbst ist Resultat eines komplexen regulatorischen Netzwerks. Pleiotropische Regulatoren wie der Komplex aus cAMP und dem CAP-Protein oder das Nukleoid-assoziierte Protein H-NS dienen als transkriptionelle Aktivatoren (Soutourina *et al.*, 1999). Auch milieubedingte Faktoren wie pH-Wert und Salzkonzentration beeinflussen die Transkription.

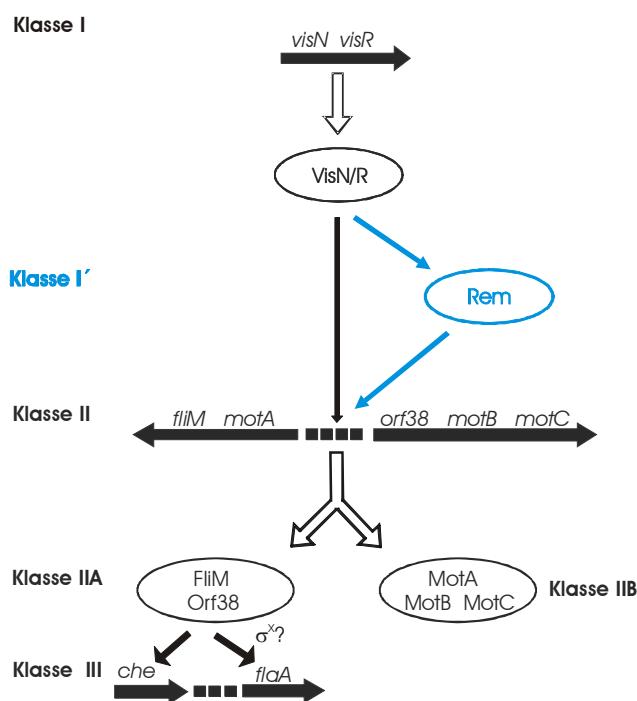


**Abb. 6.** Kopplung der Hierarchie der Genexpression des enterobakteriellen *flagellar regulon* mit der Flagellenassemblierung (nach Chilcott & Hughes, 2000). Die Einteilung in frühe, mittlere und späte Gene entspricht den drei hierarchischen Genklassen; verschiedene regulatorische Einflüsse auf das *flhCD*-Operon sind als Vierecke dargestellt; die vier Kugeln entsprechen dem *FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>*-Heterotetramer; c-AMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, CAP = *catabolite activator protein*, H-NS = *histone-like nucleoid-structuring protein*; rot = bei *S. meliloti* identifizierte, funktionell analoge Komponenten (Details im Text).

Das Heterotetramer *FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>* dient als direkter Transkriptionsaktivator der Klasse II-Gene, Komponenten des Basalkörpers (*flg*), des Hakens (*flg*), des Exportapparates (*flh*) und des flagellenspezifischen Sigma-Faktors FliA (Liu & Matsumura, 1994). Abhängig von FliA werden die Klasse III-Gene transkribiert. Resultat ist die Synthese der Flagellen (*fli*, *flj*), des Motors (*mot*) und sämtlicher Chemotaxiskomponenten (*che*). Durch die Interaktion von FliA mit dem korrespondierenden anti-Sigma-Faktor FlgM wird diese hierarchische Genexpression zeitlich mit der Flagellenassemblierung gekoppelt. Das *flgM*-Gen wird in Abhängigkeit von FliA über einen Klasse III-Promotor transkribiert. Zusätzlich aber kann das *flgA*-Transkript des benachbarten Klasse II-Gens bis über *flgM* und *flgN* hinaus verlängert werden (Gillen and Hughes, 1993). Folglich werden in der Zelle zeitgleich Sigma-Faktor und anti-Sigma-Faktor synthetisiert. FlgM bindet FliA und entzieht den flagellenspezifischen Sigma-Faktor der Transkriptionsmaschinerie. Erst wenn der Basalkörperkomplex fertiggestellt ist, wird FlgM durch den flagellenspezifischen

Exportapparat sezerniert und FliA somit aktiviert. Die Klasse III-Gene können jetzt transkribiert werden, funktionstüchtige Flagellen entstehen.

Im Gegensatz zu *E. coli* liegen auf dem *S. meliloti*-Hauptchromosom alle für Chemotaxis und Motilität erforderlichen Gene innerhalb eines 50 kb-*flagellar regulon* (Sourjik *et al.*, 1998). Auch bei *S. meliloti* werden diese Gene in drei hierarchischen Klassen exprimiert (Sourjik *et al.*, 2000).



**Abb. 7.** Hierarchie der Genexpression bei *S. meliloti* (modifiziert nach Sourjik *et al.*, 2000). Der zusätzlich identifizierte Regulator Rem ist blau markiert. Horizontale Pfeile: Operons; Ellipsen: Proteine; weiße Pfeile: Translation zu Proteinen; vertikale Pfeile: positive Transkriptionskontrolle;  $\sigma^x$ : spezifischer Sigma-Faktor.

An der Spitze der Hierarchiekaskade steht das *visNR*-Operon. Die VisN- und VisR-Genprodukte (Klasse I) regulieren direkt oder indirekt die Expression aller anderen Gene des *flagellar regulon*. VisN und VisR ähneln LuxR-Regulatoren mit konservierten C-terminalen DNA-Bindedomänen in Form von *helix-turn-helix*-Motiven (Sourjik *et al.*, 2000). Die Komponenten VisN und VisR bilden vermutlich Heterodimere, weil die Deletion in einer der beiden Untereinheiten zum Verlust der Motilität führt. Da das *visNvisR*-Operon im Gegensatz zum *fliDfliC*-Operon von *E. coli* während des gesamten Zellwachstums konstitutiv exprimiert wird, *S. meliloti*-Zellen aber nur in der exponentiellen Wachstumsphase motil sind, wurde eine Aktivierung des Heterodimeren

durch bisher nicht identifizierte Aktivatormoleküle postuliert (Sourjik *et al.*, 2000). Ein Großteil der Klasse II- und Klasse III-Gene von *E. coli* wurden auch bei *S. meliloti* identifiziert (Abb. 6, rote Farbcodierung). Abweichend von *E. coli* werden bei *S. meliloti* aber auch die Motilitäts-Gene zu den Klasse II-Genen gezählt, die hier zwei Subklassen bilden: Die Klasse IIA-Gene codieren für Basalkörperkomponenten wie FliM und Orf38 und regulieren die Expression der Klasse III-Gene (Chemotaxis- und Flagellingene) positiv. Die *mot*-Gene der Klasse IIB dagegen sind regulatorisch inaktiv (Sourjik *et al.*, 2000). Funktionelle Analoga zu dem flagellenspezifischen Sigma-Faktor FliA und dem korrespondierenden anti-Sigma-Faktor FlgM aus *E. coli* wurden bisher nicht identifiziert. Allerdings wird aufgrund einer konservierten Promotorsequenz der Flagellingene die Existenz eines flagellenspezifischen Sigma-Faktors postuliert (Scharf *et al.*, 2001). Das hierarchische Expressionsmuster von *S. meliloti* ist in Abb. 7 dargestellt.

Dieses Konzept wurde durch die genetische Analyse eines zusätzlichen Regulatorgens *rem* (*regulator of exponential growth motility*), dessen Genprodukt (Rem) die Motilität positiv kontrolliert, überholt (Mühlbacher, 2000). Defektmutationen von Rem resultieren im immotilen, flagellenlosen Phänotyp. Das *rem*-Gen ist den Klasse I-Regulatoren VisN und VisR untergeordnet, reguliert aber selbst die Expression der Klasse II- und Klasse III-Gene (Mühlbacher, 2000). Es könnte daher formal unterhalb von *visN* und *visR* in der Regulationskaskade (Abb. 7) stehen; doch war diese Positionierung noch experimentell zu belegen, eine Aufgabe, die in der vorliegenden Arbeit gelöst wurde. Ziel dieser Arbeit war es, Rem als zweiten globalen Regulator der Gene des *flagellar regulon* (neben VisN und VisR) mit genetischen und physiologischen Methoden umfassend zu charakterisieren. Zentrale Fragestellungen waren:

- Kann Rem als Responsregulator klassifiziert werden ?
- Existiert eine spezifische Transkriptions-Regulation von *rem* ?
- Wird Rem posttranslational aktiviert/inaktiviert ?
- Kann Rem die Funktion des Klasse I-Regulators VisNR ersetzen ?
- Ist Rem ein (positiver) Regulator der Transkription von Klasse II-Genen ?
- Welche weiteren Funktionen außerhalb von Flagellensynthese und Motilität werden durch Rem reguliert ?

## 2. Material

### 2.1. Bakterien und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1, die verwendeten Plasmide in Tab. 2 zusammengefaßt.

**Tab. 1.** Bakterienstämme

Stamm	Marker/Genotyp <sup>1)</sup>	Herkunft/Referenz
-------	------------------------------	-------------------

#### *E. coli*

DH10B	$F^-$ <i>araD 139Δ(ara leu)</i> <i>7697 ΔlacX74 galU galK</i> <i>mcrA Δ(mrr<sup>-</sup> hsdRMS-mcrBC)</i> <i>rpsL decR 380 ΔlacZ ΔM15 endA1</i> <i>nupG recA1</i>	Bethesda Research Laboratories
S17-1	<i>recA1 endA1 thi hsdR RP4-2-</i> <i>Tc::Mu::Tn7</i> <i>Tp<sup>R</sup> Str<sup>R</sup></i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
ER 2566	$F^- \lambda^- fhuA2 [Ion]$ <i>ompT lacZ::T7</i> <i>gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>	New England BioLabs
SCS110	<i>rpsL</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> ) <i>thr leu endA thi-1 lacY</i> <i>galK galT ara tonA tsx dam dcm</i> <i>supE44D (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Stratagene

***S. meliloti***

RU11/001	Str <sup>R</sup> , spontan streptomycin-resistentes Derivat von RU10/406	Krupski <i>et al.</i> , 1985
RU11/317	Str <sup>R</sup> , $\Delta visR$	Sourjik <i>et al.</i> , 2000
RU11/318	Str <sup>R</sup> , $\Delta visN$	Sourjik <i>et al.</i> , 2000
RU11/555	Str <sup>R</sup> , $\Delta rem$	Mühlbacher, 2000
RU11/557	Str <sup>R</sup> , <i>rem</i> D47N	Mühlbacher, 2000
RU11/814	Str <sup>R</sup> , $\Delta visN$ , $\Delta visR$	Scharf, 2000
RU13/006	Str <sup>R</sup> , <i>rem</i> D43N	Rotter, 2001
RU13/007	Str <sup>R</sup> , <i>rem</i> D45N	Rotter, 2001
RU13/009	Str <sup>R</sup> , <i>rem</i> D45N/D47N	Rotter, 2001
RU13/111	Str <sup>R</sup> , $\Delta expG$	Diese Arbeit
RU13/112	Str <sup>R</sup> , $\Delta rem$ , $\Delta expG$	Diese Arbeit
RU13/113	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , <i>expA1-lacZ-aacC1</i>	Diese Arbeit
RU13/114	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , <i>expE2-lacZ-aacC1</i>	Diese Arbeit
RU13/115	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , $\Delta rem$ , <i>expA1-lacZ-aacC1</i>	Diese Arbeit
RU13/116	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , $\Delta rem$ , <i>expE2-lacZ-aacC1</i>	Diese Arbeit
RU13/117	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , $\Delta expG$ , <i>expA1-lacZ-aacC1</i>	Diese Arbeit
RU13/118	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , $\Delta expG$ , <i>expE2-lacZ-aacC</i> )	Diese Arbeit
RU13/119	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , $\Delta rem$ , $\Delta expG$ , <i>expA1-lacZ-aacC1</i>	Diese Arbeit
RU13/120	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , $\Delta rem$ , $\Delta expG$ , <i>expE2-lacZ-aacC</i> )	Diese Arbeit
RU13/121	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , <i>expG-lacZ::exoP</i>	Diese Arbeit
RU13/122	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , $\Delta rem$ , <i>expG-lac::exoP</i>	Diese Arbeit
RU13/123	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , $\Delta expG$ , <i>expG-lac::exoP</i>	Diese Arbeit
RU13/124	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , $\Delta rem$ , $\Delta expG$ , <i>expG-lacZ::exoP</i>	Diese Arbeit
RU13/224	Str <sup>R</sup> , <i>rem</i> D43N/D45N/D47N	Diese Arbeit
RU13/225	Str <sup>R</sup> , <i>rem</i> D7K	Diese Arbeit

RU12/227	Str <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>acsA1</i>	Diese Arbeit
RU13/228	Str <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>acsA2</i>	Diese Arbeit
RU13/229	Str <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoH2</i>	Diese Arbeit
RU13/230	Str <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoE2</i>	Diese Arbeit
RU11/001 (pRU2250)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>PicpA-lac</i> <sup>2)</sup>	Muschler, 2000
RU11/001 (pRU2273)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>PflgB-lac</i>	Muschler, 2000
RU11/001 (pRU2274)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>PflaA-lac</i>	Muschler, 2000
RU11/001 (pRU2361)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>Prem-lac</i>	Mühlbacher, 2000
RU13/224 (pRU2250)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>rem D43N/D45N/D47N, PicpA-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/224 (pRU2273)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>rem D43N/D45N/D47N, PflgB-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/224 (pRU2274)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>rem D43N/D45N/D47N, PflaA-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/224 (pRU2361)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>rem D43N/D45N/D47N, Prem-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/229 (pRU2250)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoH2, PicpA-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/229 (pRU2273)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoH2, PflgB-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/229 (pRU2274)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoH2, PflaA-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/229 (pRU2361)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoH2, Prem-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/230 (pRU2250)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoE2, PicpA-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/230 (pRU2273)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoE2, PflgB-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/230 (pRU2274)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoE2, PflaA-lac</i>	Diese Arbeit
RU13/230 (pRU2361)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoE2, Prem-lac</i>	Diese Arbeit
RU11/555 (pRU2361)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> $\Delta$ <i>rem, Prem-lac</i> <sup>2)</sup>	Mühlbacher, 2000
RU13/007 (pRU2361)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>rem D45N, Prem-lac</i>	Rotter, 2001
RU13/009 (pRU2361)	Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>rem D45N/D47N, Prem-lac</i>	Rotter, 2001
RU11/001 (pRU2818)	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , <i>rem-pBBR1MCS-2</i>	Diese Arbeit
RU11/317 (pRU2818)	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>visR, rem-pBBR1MCS-2</i>	Diese Arbeit
RU11/318 (pRU2818)	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>visN, rem-pBBR1MCS-2</i>	Diese Arbeit

RU11/555 (pRU2818)	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , Δrem, rem-pBBR1MCS-2	Diese Arbeit
RU11/814 (pRU2818)	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , ΔvisN, ΔvisR, pBBR1MCS2-rem	Diese Arbeit

<sup>1)</sup> Nomenklatur nach Bachmann (1990) und Novick *et al.* (1976)

<sup>2)</sup> P<sub>xxx</sub>-lac = Promotor-lacZ Fusion

**Tab. 2.** Plasmide

Plasmid	Marker <sup>1)</sup>	Herkunft/Referenz
---------	----------------------	-------------------

pBBR1MCS-2	Kan <sup>R</sup> , lac <sup>P</sup> mob rep	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pEGFP-N1	Kan <sup>R</sup> , GFP mut1-Chromophor	Clontech
pK18mobsacB	Kan <sup>R</sup> lacZ mob sacB	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pSRPP18	Kan <sup>r</sup> ; lacZ Fusionsvektor, ohne Promotor	Quester & Becker, 2004
pTYB2	Amp <sup>R</sup>	New England BioLabs
pUCBM20	Amp <sup>R</sup> , lacZ'	Boehringer (Mannheim)
pBPboxG1G4	Kan <sup>r</sup> ; PexpG, KpnI-BamHI PCR- Fragment (158 bp) in pSRPP18	Quester & Becker, 2004
pexpA#1014	Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , lacZ-aacCI, 1,8 kb EcoRI-XhoI-Fragment aus pAB2001, kloniert über KpnI in expAI-pK18mob	Becker <i>et al.</i> , 1997
pexpE#1022	Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , lacZ-aacCI, 4,1 kb HindIII-KpnI-Fragment aus pAB2001, kloniert über EcoRI in expE2- pK18mobΔEcoRI	Becker <i>et al.</i> , 1997
pRU2005	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , 7,7 kb EcoRI-Fragment aus RU11/113 in pIC20R	Platzer, 1996
pRU2250	Tet <sup>R</sup> , icpA-lacZ Fusion	Sourjik <i>et al.</i> , 2000
pRU2266	Tet <sup>R</sup> , visN-lacZ Fusion	Muschler, 2000
pRU2273	Tet <sup>R</sup> , flgB-lacZ Fusion	Muschler, 2000

pRU2274	Tet <sup>R</sup> , <i>flaA-lacZ</i> Fusion	Sourjik <i>et al.</i> , 2000
pRU2361	Tet <sup>R</sup> , <i>rem-lacZ</i> Fusion	Mühlbacher, 2000
pRU2365	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>rem</i> , <i>NdeI-SmaI</i> PCR-Fragment (669bp) in pTYB2	Mühlbacher, 2000
pRU2570	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>rem</i> D45N, <i>NdeI-SmaI</i> PCR-Fragment (669bp) in pTYB2	Rotter, 2001
pRU2818	Kan <sup>R</sup> , Überexpressionsvektor für <i>rem</i> , <i>BamHI-HindIII</i> PCR-Fragment (672 bp) in pBBR1MCS-2	Diese Arbeit
pRU2905	Kan <sup>R</sup> , RemD43N/D45N/D47N AS- Substitution, <i>EcoRI-HindIII</i> PCR- Fragment (611 bp) in pK18mobsacB	Diese Arbeit
pRU2906	Kan <sup>R</sup> , RemD7K AS-Substitution, <i>EcoRI-HindIII</i> PCR-Fragment (611 bp) in pK18mobsacB	Diese Arbeit
pRU2907	Kan <sup>R</sup> , <i>rem</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR- Fragment (669 bp) in pEGFP-N1	Diese Arbeit
pRU2908	Kan <sup>R</sup> , <i>rem-egfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> - Fragment (1420 bp) in pBBR1MCS-2	Diese Arbeit
pRU2909	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>rem</i> D45N/D47N, <i>NdeI-SmaI</i> PCR- Fragment (669bp) in pTYB2	Diese Arbeit
pRU2910	Kan <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>acsA1</i> , <i>PstI-HindIII</i> PCR- Fragment (706 bp) in pK18mobsacB	Diese Arbeit
pRU2911	Kan <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>acsA2</i> , <i>EcoRI-HindIII</i> PCR- Fragment (865 bp) in pK18mobsacB	Diese Arbeit
pRU2912	Kan <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoH2</i> , <i>EcoRI-HindIII</i> PCR- Fragment (713 bp) in pK18mobsacB	Diese Arbeit
pRU2913	Kan <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rpoE2</i> , <i>EcoRI-HindIII</i> PCR- Fragment (799 bp) in pK18mobsacB	Diese Arbeit

pRU2914	Kan <sup>R</sup> , $\Delta expG$ , EcoRI-HindIII PCR- Fragment (802 bp) in pK18mobsacB	Diese Arbeit
pRU2915	Amp <sup>R</sup> , PflgB, EcoRI-PstI PCR- Fragment (376 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
pRU2916	Amp <sup>R</sup> , PflgB, EcoRI-PstI PCR- Fragment (216 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
pRU2917	Amp <sup>R</sup> , PflfF, EcoRI-HindIII PCR- Fragment (309 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
pRU2918	Amp <sup>R</sup> , Porf38, EcoRI-HindIII PCR- Fragment (252 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
pRU2919	Amp <sup>R</sup> , Prem, EcoRI-HindIII PCR- Fragment (338 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
pRU2920	Amp <sup>R</sup> , PflfF, EcoRI-HindIII PCR- Fragment (205 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
pUJ1287	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , mini-Tn5 in pUT	Lorenzo <i>et al.</i> , 1990

<sup>1)</sup> Nomenklatur nach Bachmann (1990) und Novick *et al.* (1976)

## 2.2. Verwendete Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Metabion und Qiagen bezogen. Die für PCR-Mutagenese und Sequenzierungen verwendeten Primer sind in Tab. 3 zusammengestellt.

**Tab. 3.** Primer für die PCR-Mutagenese und Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3' <sup>1)</sup>	Verwendung
CR1	G GTG <u>GAA TTC</u> AAC ATC ATG TTA GTG G <i>EcoRI</i>	Außenprimer Rem D43N/D45N/D47N, D7K, <i>forward</i>
CR2	G GTG <u>AAG CTT</u> ACT TCG CCG TTG ATC TCG <i>HindIII</i>	Außenprimer Rem D43N/D45N/D47N, D7K, <i>reverse</i>
CR11	G GTG <u>GAA TTC</u> GAG GCG AAG TAG CGT <i>EcoRI</i>	Amplifikation von PflgB 376 bp, <i>forward</i>

CR13	G GTG <u>GAA</u> TTC GCG TAT GTG AGC CAT GTC C <i>EcoRI</i>	Amplifikation von <i>PflgB</i> 216 bp, <i>forward</i>
CR14	G AAC <u>CTG</u> <u>CAG</u> CCA CTG GGC CTG CCG <i>PstI</i>	Amplifikation von <i>PflgB</i> 216 bp, 376 bp, <i>reverse</i>
CR17	GA TTC GGA GGC GGG <u>CAT</u> ATG ATC GTG GTG GTT G <i>NdeI</i>	Klonierung <i>remD45N/D47N</i> in <i>pTYB2, forward</i>
CR18	ATT CCA GTC GAT GCA GTA GCC	Klonierung <i>remD45N/D47N</i> in <i>pTYB2, reverse</i>
CR20	GTA AGC TCC GCC GCC <u>AAC</u> TCC AAC ATC AAC GCT G	Innenprimer <i>RemD43ND45N/D47N,</i> <i>forward</i>
CR21	C AGC GTT GAT GTT GGA <u>GTT</u> GGC GGC GGA GCT TAC	Innenprimer <i>RemD43ND45N/D47N,</i> <i>reverse</i>
CR29	G ATC GTG GTG GTT GAT <u>AAG</u> AGA GCT CTT GTG AAG G	Innenprimer <i>RemD7K,</i> <i>forward</i>
CR30	C CTT CAC AAG AGC TCT <u>CTT</u> ATC AAC CAC CAC GAT C	Innenprimer <i>RemD7K,</i> <i>reverse</i>
CR31	G GTG <u>GAA</u> <u>TTC</u> GAC CGT CAG ACC CGG CGA C <i>EcoRI</i>	Außenprimer <i>ΔrpoH2,</i> <i>forward</i>
CR32	GAC AGG CGT ATG ATC AAG ATT GCG CTG ACG GCG TCG	Innenprimer <i>ΔrpoH2,</i> <i>forward</i>
CR33	AAT CTT GAT CAT ACG CTT GTC	Innenprimer <i>ΔrpoH2,</i> <i>reverse</i>
CR34	G GCG <u>AAG</u> <u>CTT</u> GCG CGA GAA GCC GAG AGC <i>HindIII</i>	Außenprimer <i>ΔrpoH2,</i> <i>reverse</i>
CR36	C <u>AAG</u> <u>CTT</u> CAT TCG CCC GCC TCC GCC TCC GAA TCA <i>HindIII</i>	Amplifikation von <i>Prem, reverse</i>
CR38	CGC <u>GAA</u> <u>TTC</u> GCA AAC CTG GTC GCA ACC G <i>EcoRI</i>	Amplifikation von <i>Prem, forward</i>
CR41	GCT <u>GAA</u> <u>TTC</u> GGC GAT TGG GAG ATC AAG G <i>EcoRI</i>	Außenprimer <i>ΔacsA1,</i> <i>forward</i>
CR42	GGG AGG AAA ATT ATG GAC GTC AAG GCC AAT CGT CAG AAC CGC GCT TGA TG	Innenprimer <i>ΔacsA1,</i> <i>forward</i>
CR43	CTT GAC GTC CAT AAT TTT CCT CCC	Innenprimer <i>ΔacsA1,</i> <i>reverse</i>
CR44	GG <u>CTG</u> <u>CAG</u> CTT GCA GAA CTG CGC GAT CTG <i>PstI</i>	Außenprimer <i>ΔacsA1,</i> <i>reverse</i>

CR45	CGA <u>GAA</u> TTC GTC GAG CAT CCG CTC CAT CGT C <i>EcoRI</i>	Außenprimer $\Delta acsA2$ , <i>forward</i>
CR46	GCT CTT GAG TTC CTC GAG CCC TTC TGC TTG CAT GCT CTC CTC CAC	Innenprimer $\Delta acsA2$ , <i>reverse</i>
CR47	GGG CTC GAG GAA CTC AAG AGC	Innenprimer $\Delta acsA2$ , <i>reverse</i>
CR48	G AAG <u>AAG</u> CTT TCC GCG ACC ATC ATG CTG CGC <i>HindIII</i>	Außenprimer $\Delta acsA2$ , <i>reverse</i>
CR49	GGC <u>AAG</u> CTT ATG ATC GTG GTG GTT GAT G <i>HindIII</i>	Klonierung <i>rem</i> in pEGFP-N1, <i>forward</i>
CR50	TAT <u>CCC</u> <u>GGG</u> TAT TCC AGT CGA TGC AGT AG <i>SmaI</i>	Klonierung <i>rem</i> in pEGFP-N1, <i>reverse</i>
CR54	ACC <u>GAA</u> <u>TTC</u> TCC GGC ACG GCA GCC TGA AGG <i>EcoRI</i>	Außenprimer $\Delta rpoE2$ , <i>forward</i>
CR55	AGT AAG CGC CGG ATG TCA TCC GAA ACC TCG CGT GCC TTC GTT TCG TGA	Innenprimer $\Delta rpoE2$ , <i>reverse</i>
CR56	CTT <u>AGG</u> <u>CTT</u> CTC CAG AGG TCT GCG ACC CGG <i>HindIII</i>	Außenprimer $\Delta rpoE2$ , <i>reverse</i>
CR57	TTC GGA TGA CAT CCG GCG CTT ACT	Innenprimer $\Delta rpoE2$ , <i>forward</i>
CR63	GG <u>GAA</u> <u>TTC</u> ATG CAG GCG CTG AGC AGG <i>EcoRI</i>	Außenprimer $\Delta expG$ , <i>forward</i>
CR64	GG <u>AAG</u> <u>CTT</u> CCG CTA CCC TGT GTC CGA TCC <i>HindIII</i>	Außenprimer $\Delta expG$ , <i>reverse</i>
CR104	GG <u>GAA</u> <u>TTC</u> GCC AAG TTC GCG CAA GTT <i>EcoRI</i>	Amplifikation von <i>PfliF</i> 205 bp, <i>forward</i>
CR105	CG <u>AAG</u> <u>CTT</u> GAT CGA ACA GAT TCA TTC <i>HindIII</i>	Amplifikation von <i>PfliF</i> 309 bp und 205 bp, <i>reverse</i>
CR106	GC <u>GAA</u> <u>TTC</u> GCA CAA GTT TGA CCG GAT <i>EcoRI</i>	Amplifikation von <i>Porf38</i> 252 bp, <i>forward</i>
CR107	CC <u>AAG</u> <u>CTT</u> GAA GGC CGA TAT TGC CAG <i>HindIII</i>	Amplifikation von <i>Porf38</i> 252 bp, <i>reverse</i>
CR110	CG <u>GAA</u> <u>TTC</u> CAT GCG TCT TGT CCC TTC <i>EcoRI</i>	Amplifikation von <i>PfliF</i> 309 bp, <i>forward</i>
M55	TAA TAC GAC TCA CTA TAC GG	Sequenzierung pTYB2 <i>forward</i>

M56	ACC CAT GAC CTT ATT ACC AAC CTC	Sequenzierung pTYB2 <i>reverse</i>
M31	GCT CGT ATG TTG TGT GGA ATT G	Sequenzierung pK18 <i>mobsacB</i> , pUCBM20
forward-40	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA	Sequenzierung pK18 <i>mobsacB</i> , pUCBM20

<sup>1)</sup> Unterstreichungen markieren die angegebenen Restriktionsschnittstellen bzw.  
mutagenisierte Nukleotide

## 2.3. Chemikalien und Enzyme

In Tab. 4 sind die verwendeten Chemikalien und kommerziellen Quellen aufgeführt.

**Tab. 4.** Herkunft von Chemikalien und Enzymen

Chemikalien/Enzyme	Herkunft
Acrylamid (40%) Mix 19:1	AppliChem (Darmstadt)
Acrylamid (30%) Mix 37,5 :1	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Amresco (Solon, OH, USA)
Alkalische Phosphatase	Boehringer (Mannheim)
Ammoniumpersulfat	AppliChem (Darmstadt)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Antiseren gegen <i>S. meliloti</i> Proteine (aus Kaninchen)	Pineda (Berlin)
<i>anit-rabbit-Ig, horseradish-peroxidase conjugated, complete antibody (from donkey)</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Bacto Agar	Difco (Augsburg)
<i>Tryptone Peptone</i>	Difco (Augsburg)
<i>Bacto Yeast Extract</i>	Difco (Augsburg)
Biotin	Sigma (Deisenhofen)
Bradford Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (Krefeld)
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galacto- pyranosid ( <i>X-Gal</i> )	AGS GmbH (Heidelberg)

Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
BSA	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Chitin-Agarose Beads</i>	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Coomassie Blue 250R</i>	Serva (Heidelberg)
Cy3-NHS Ester	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Cy5-NHS Ester	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
<i>CyScribe GFX kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Desoxynukleosidtriphosphate	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Dialyseschlauch <i>Spectra/Por</i>	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA)
Diethylpyrocarbonat	Sigma (Deisenhofen)
<i>DIG Easy Hyb</i>	Roche (Mannheim)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
DNA peqGold-Leiter-Mix	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
DNaseI	Boehringer (Mannheim)
DnaseI, FPLCpure	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
ECL ( <i>enhanced chemoluminescence detection</i> )	Amersham Pharmacia Biotech
<i>Western blotting kit</i>	(Buckinghamshire)
EDTA	Boehringer (Mannheim)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Gentamycin	Sigma (Deisenhofen)
<i>High Range Rainbow Markers</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Hybond ECL Nitrozellulose-Membran und Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Hydroxylamin	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)

Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
L-Arginin (Hydrochlorid)	Sigma (Deisenhofen)
Lithiumhydroxid	Sigma (Deisenhofen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
Natriumbicarbonat	Sigma (Deisenhofen)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Neomycin	Sigma (Deisenhofen)
$\alpha$ -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (ONPG)	Sigma (Deisenhofen)
<i>Nucleo Spin Plasmid Kit</i>	Macherey Nagel (Düren)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Piperidin	Sigma (Deisenhofen)
Poly(dI-dC)· Poly(dI-dC)	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
$[^{32}P]orthophosphate$ in aqueous solution (HCl-free). Carrierfree	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
<i>ProofStart</i> -DNA-Polymerase	Qiagen (Hilden)
Pyridin	Sigma (Deisenhofen)
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Qia-quick PCR purification kit	Qiagen (Hilden)
Rapid T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Redivue adenosine 5'-[<math>\gamma</math><sup>32</sup>P]triphosphate, triethylammonium salt, 6000Ci/mmol</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Restriktionsenzyme und Puffer	Boehringer (Mannheim) New England BioLabs (Schwalbach)
RNaseA	Boehringer (Mannheim)
<i>RNase-free DNase Set</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Rneasy Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>sonicated salmon sperm DNA</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
SuperScript II Reverse Transkriptase	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
T4-DNA-Ligase	Gibco (Karlsruhe)

TEMED	Sigma (Deisenhofen)
Tris	USB (Cleveland, OH, USA)
tRNA ( <i>from baker's yeast</i> )	Roche (Mannheim)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Urea	Invitrogen (Karlsruhe)
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman (Wiesloch)
Zellulose-Acetat-Filter (Porengröße 0,45µm)	Sartorius AG (Göttingen)

Alle weiteren Chemikalien stammten von der Firma Merck (Darmstadt).

## 2.4. Nährmedien und Antibiotika

### 2.4.1. Medium zur Anzucht von *E. coli*

#### LB (Luria broth)

Bacto Tryptone	10 g
<i>Yeast extract</i>	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
pH 7,2 mit NaOH einstellen für LB <sub>0</sub> -Platten:	15 g Agar

LB-X-Gal-Indikatorplatten: (Blauweiß-screening)	20 µg/ml X-Gal 25 mM IPTG
--	------------------------------

#### Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
Gentamycin	10 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

## 2.4.2. Medien zur Anzucht von *S. meliloti*

### Bromfield

<i>Bacto Tryptone</i>	400 mg
<i>Yeast extract</i>	100 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	67 mg
$\text{H}_2\text{O}$	ad 1 l
Bromfield-Platten:	15 g Agar
Bromfield-Schwärmpfatten:	3 g Agar
Sucrose-Platten ( positive Selektion gegen von <i>sacB</i> ):	100 g Saccharose

### TYC (Tryptone Yeast Extract/Calcium)

<i>Bacto Tryptone</i>	5 g
<i>Yeast extract</i>	3 g
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,87 g
$\text{H}_2\text{O}$	ad 1 l
TYC-Platten:	15 g Agar

### RB (Rhizobium Basal Medium)

		Stammlösung	Endkonzentration
NaCl	0,1 ml	1 M	0,1 mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0,1 ml	100 mM	0,01 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	6,1 ml	1 M	6,1 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,9 ml	1 M	3,9 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 ml	1 M	1,0 mM
$\text{FeSO}_4$ in 1N HCl	0,01 ml	100 mM	0,001 mM
$\text{H}_2\text{O}$	ad 990 ml	-	-

Zugabe nach Autoklavieren:

$\text{MgSO}_4$	1,0 ml	1 M	1,0 mM
$\text{CaCl}_2$	0,1 ml	1 M	0,1 mM
Biotin	1,0 ml	2 mg/ml	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
$\text{H}_2\text{O}$	ad 1 l	-	-

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Gentamycin	40 µg/ml
Neomycin	120 µg/ml
Streptomycin	200 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

## 2.5. Puffer und Lösungen

### 2.5.1. Lösungen für Mini- und Midi-Plasmidisolierungen

• GET:	50 mM 25 mM 10 mM	Glucose Tris/HCl pH 7,0 EDTA
• Lyselösung:	0,2 M 1% (w/v)	NaOH SDS
• 7,5 M Ammoniumacetat		
• 70% und abs. Ethanol		
• 3 M Natriumacetat pH 5,2		
• Phenol/Chloroform 1:1		
• TE:	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0

### 2.5.2. Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus *S. meliloti*-Zellen

• 5 % Natrium-N-Laurylsarcosin		
• 3 M Natriumacetat pH 5,2		
• Chloroform/Isoamylalkohol 24 :1		
• 25 mM EDTA pH 8,0		
• TE :	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0

### 2.5.3. Lösungen für die DNA-Auf trennung (Agarosegelektrophorese)

- TAE (50×) :                    2 M                    Tris/Acetat pH 8,0  
                                      50 mM                    EDTA
- DNA Gel-Ladepuffer:            50%                    Glycerin  
                                      10 mM                    EDTA  
                                      0,2% (w/v)            Bromphenolblau  
                                      0,2% (w/v)            Xylen-Cyanol  
                                      1×                            TAE  
                                      ad 50 ml                    H<sub>2</sub>O

### 2.5.4. Lösungen für DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung

- 20 x SSC :                    175,3 g                    NaCl  
                                      88,2 g                    Na<sub>3</sub>-Citrat  
                                      ad 800 ml                    H<sub>2</sub>O  
                                      pH 7,0 mit NaOH einstellen
- Depurinierungslösung :        0,25 M                    HCl
- Denaturierungslösung :        1,5 M                    NaCl  
                                      0,5 M                    NaOH
- Neutralisierungslösung :      1,5 M                    NaCl  
                                      0,5 M                    Tris/HCl pH 7,5
- Primärer Waschpuffer :        0,4 %                    SDS  
                                      0,5 x                    SSC
- Sekundärer Waschpuffer        2 x                            SSC

### 2.5.5. Lösungen zur Präparation radioaktiv markierter DNA-Sonden

- Probenpuffer:                    45 %                    Saccharose  
                                      100 mM                    EDTA pH 8,0  
                                      0,1 % (w/v)            Bromphenolblau

• PA-Gel 4 %: (20 cm x 40 cm x 0,3 mm)	13,3 ml 5,0 ml 0,7 ml 0,1 ml 80,9 ml	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid 10 x TBE 10 % APS TEMED H <sub>2</sub> O
• 10 x TBE:	890 mM 890 mM 20 mM	Tris/HCl pH 8,0 Borsäure EDTA pH 8,0
• Elutionspuffer:	10 mM 1 mM 300 mM 0,2 %	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 NaAc pH 5,2 SDS
• 70% und abs. Ethanol		
• Phenol/Chloroform 1:1		

## 2.5.6. Lösungen für DNaseI-*footprinting*

• TE :	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0
• denaturierendes PA-Gel 10 % (20 cm x 40 cm x 0,3 mm)	24,0 g 16,7 ml 5,0 ml 0,2 ml 36,0 µl 28,0 ml	Harnstoff 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid 10 x TBE 10 % APS TEMED H <sub>2</sub> O
• 10 x TBE:	890 mM 890 mM 20 mM	Tris/HCl pH 8,0 Borsäure EDTA pH 8,0
• Formamid-Farbmarker:	0,3 % (w/v) 0,3 % (w/v) 97,5 % 10 mM	Bromphenolblau Xylen-Cyanol deionisiertes Formamid EDTA pH 8,0
• FP-Puffer 10x:	100 mM 1 M 20 mM 1 mM 100 mM 10 mM	Tris/HCl pH 8,0 NaCl MgCl <sub>2</sub> CaCl <sub>2</sub> KCl DTT

- Stopp-Puffer:                    192 mM                    NaAc pH 5,2  
    32 mM                    EDTA pH 8,0  
    0,14 %                    SDS  
    64 µg/ml                tRNA
- 70% und abs. Ethanol
- Phenol/Chloroform 1:1
- 50% Glycerin
- 1% SDS
- 1-Butanol
- 50 % Ameisensäure

## 2.5.7. Lösungen für DNA-Chip-Analysen (*Microarray*)

### 2.5.7.1. Lösungen für Fluoreszenz-Markierung

- 50 x dNTP (4 :1 aa-dUTP / dTTP)    25 mM dATP  
    25 mM dCTP  
    25 mM dGTP  
    5 mM dTTP  
    20 mM aa-dUTP
- 0,2 M NaOH
- 0,2 M HCl
- 4 M Hydroxylamin
- 1M Natriumcarbonat pH 9,0
- 80 % Ethanol
- Cy3-NHS-Ester in DMSO
- Cy5-NHS-Ester in DMSO

### 2.5.7.2. Lösungen für DNA-Chip-Hybridisierungen

- *DIG Easy Hyb*-Lösung
- 96 % Ethanol
- 10 % SDS
- SSC 20 x :                            175,3 g                    NaCl  
    88,2 g                    Na<sub>3</sub>-Citat  
    ad 800 ml                H<sub>2</sub>O  
    pH 7,0 mit NaOH einstellen
- Waschpuffer 1                            0,2 x SSC  
    0,1 % SDS
- Waschpuffer 2                            0,2 x SSC
- Waschpuffer 3                            0,1 x SSC

## 2.5.8. Lösungen zur Auf trennung von Proteinen

- SDS-Polyacrylamidgel:

	Trenngel		Sammelgel
	10%	15%	
H <sub>2</sub> O	3,75 ml	2,83 ml	3,15 ml
38% Acrylamid/	1,88 ml	2,8 ml	450 µl
2% Bisacrylamid			
1,5 M Tris	1,68 ml (pH 8,8)	1,68 ml (pH 8,8)	500 µl (pH 6,8)
10% SDS	75 µl	75 µl	40 µl
10% APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl

- |  |  |  |
|--|--|--|
| • Laufpuffer (5×):                             | 30,2 g<br>188 g<br>100 ml<br>ad 1 l<br>pH 8,8 mit HCl einstellen | Tris<br>Glycin<br>10% SDS<br>H <sub>2</sub> O                      |
| • Probenpuffer (2×):                           | 1,4 ml<br>23 ml<br>0,5 ml<br>35 ml                               | 1,5 M Tris pH 6,8<br>87% Glycerin<br>10% SDS<br>H <sub>2</sub> O   |
| • SDS-Ladepuffer:                              | 4 ml<br>5,3 ml<br>250 µl   | 10% SDS<br>Probenpuffer (2×)<br>0,5% Bromphenolblau                |
| • Färbelösung:                                 | 2,5 g<br>90 ml<br>450 ml   | Coomassie Blue 250 R<br>Essigsäure<br>EtOH                         |
| • Entfärbler:                                  | 70 ml<br>50 ml<br>ad 1 l   | Essigsäure<br>EtOH<br>H <sub>2</sub> O                             |
| • SDS-Ladepuffer für Phosphorylierungsversuche | 42 mM<br>100 mM<br>42%<br>3,3%<br>0,17%                          | Tris/HCl pH 8,0<br>EDTA<br>Glycerin<br>SDS<br>(w/v) Bromphenolblau |

## 2.5.9. Lösungen zum Transfer von Proteinen

• PBS:	5,84 g 14,24 g 2,76 g ad 1 l auf pH 7,5 einstellen	NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O
• Blot-Puffer:	11,65 g 5,86 g 400 ml ad 2 l	Tris Glycin Methanol H <sub>2</sub> O

## 2.5.10. Lösungen für die Proteinexpression und -reinigung

### 2.5.10.1. Lösungen für die Proteinreinigung mittels IMPACT

• Säulenpuffer:	20 mM 500 mM 1 mM	Tris/HCl pH 8,0 NaCl EDTA
• Dialysepuffer A:	20 mM 100 mM 0,1 mM 1 mM 20% 0,2 M	Tris/HCl pH 8,0 NaCl EDTA DTT Glycerin Arginin
• Dialysepuffer B:	250 mM 10 mM 1 mM 50 %	NaCl Tris/HCl pH 8,0 DTT Glycerin
• Dialysepuffer C:	30 mM 1mM 0,1 mM 150 mM 20%	KPi pH 8,0 DTT EDTA NaCl Glycerin

### 2.5.10.2. Lösungen für De- und Renaturierung

• Denaturierungspuffer:	8 M 50 mM 5 mM	Harnstoff Tris/HCl pH 8,0 DTT
• Renaturierungspuffer	30 mM 0,1 mM 1 mM 150 mM 20%	KPi pH 8,0 EDTA pH 8,0 DTT NaCl Glycerin

### 2.5.11. Lösungen für Reportergen-Analysen

• Z-Puffer:	16,1 g 5,5 g 0,75 g 0,246 g 2,7 ml ad 1 l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O KCl MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O β-Mercaptoethanol H <sub>2</sub> O
• ONPG-Lösung:	4 mg/ml	ONPG in Z-Puffer
• Stopplösung:	1 M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

## **3. Methoden**

### **3.1. Kultivierung von Bakterien**

#### **3.1.1. Kultivierung und Lagerung von *E. coli***

*E. coli*-Zellen wurden auf Agarplatten aerob im Brutschrank (Memmert) bei 37°C angezogen. Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium (2.4.1.) mit einer Einzelkolonie der Ausstrichkultur beimpft. Enthielt der *E. coli*-Stamm ein Plasmid, das eine Antibiotikaresistenz aufwies, so wurde durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums auf dieses Plasmid selektiert. Die Flüssigkultur wurde bei 37°C im Reagenzglas-Roller (Heidolph) bzw. Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei 600 nm mittels Bausch und Lomb-Photometer verfolgt. Zur langfristigen Lagerung der *E. coli*-Stämme wurden, ausgehend von einer 3 ml ÜN-Kultur, 750 µl stationäre Zellen mit 250 µl 60% Glycerin gemischt, 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **3.1.2. Kultivierung und Lagerung von *S. meliloti***

Von einer Einzelkolonie ausgehend, wurden *S. meliloti*-Stämme in TYC<sub>Str</sub>-Vollmedium (2.4.2.) zwei bzw. drei Tage bei 30°C im Reagenzglas-Roller (Heidolph) oder im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) angezogen. Zu Selektionszwecken wurden Flüssigmedien bzw. TYC-Agar-Platten (2.4.2.) verwendet, die mit entsprechenden Antibiotika (2.4.2.) supplementiert waren. Für die Anzucht motiler Zellen wurden Bromfield-Platten (2.4.2.) mit 10 ml RB-Minimalmedium (2.4.2.) überschichtet, mit 150 µl Zellsuspension einer stationären Kultur beimpft und ÜN im Brutschrank (Memmert) bei 30°C inkubiert. Zur Etablierung einer Wuchskurve (mit motilen *S. meliloti*-Zellen) wurden RB-Flüssigkulturen (2.4.2.) verwendet, die mit 0,2% Mannitol und 2% TY supplementiert waren. Enthielten die *S. meliloti*-Stämme ein Resistenzplasmid, so wurde das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugesetzt; auf die Selektion des chromosomalen Streptomycin-Resistenzmarkers wurde verzichtet. Die Erlenmeyerkolben für die Zellanzucht wurden einer speziellen Reinigung unterzogen, da geringfügige Detergensreste negative Auswirkungen auf Wachstum und Motilität der

Zellen hatten. Die Kolben wurden dazu 24 h im Chromschwefelsäurebad inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Eine 10 ml-Kultur (in einem 100 ml Erlenmeyerkolben) wurde mit Zellen einer stationären Kultur so beimpft, daß ihre Dichte einer OD<sub>600</sub> von 0,05 entsprach. Die Anzucht fand bei 30°C im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) statt. Für die RNA-Präparation aus motilen Zellen wurden ebenfalls mit 0,2 % Mannitol und 2% TY supplementierte RB-Flüssigkulturen (2.4.2) verwendet. Zellen einer stationären Bakterienkultur wurden in 10 ml frischem Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt und 14 h bei 30°C im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) bis zur OD<sub>600</sub> von 0,17-0,24 inkubiert. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden *S. meliloti*-Zellen nach dem gleichen Verfahren wie *E. coli*-Zellen in Glycerin-Suspension eingefroren (3.1.1.).

## 3.2. Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

### 3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

#### 3.2.1.1. Mini-Plasmidisolierung

Nach der Methode von Li & Schweizer (1993) wurde mit einigen Modifikationen Plasmid-DNA in Mengen bis zu 100 µg gewonnen. 3 ml einer ÜN-Kultur wurden in zwei Schritten bei 14.000 Upm jeweils 60 sec lang in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und das Sediment in 200 µl GET-Lösung mit 2 µl RNase (2.3.) aufgenommen. Nach Zugabe von 400 µl frischer Lyse-Lösung (2.5.1.) wurde der Ansatz mit 300 µl 7,5 M Ammoniumacetat versetzt und 10 min bei 14.000 Upm sedimentiert. Der klare Überstand wurde mit 500 µl eiskaltem Isopropanol gefällt und erneut 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl Wasser durch Schütteln gelöst. Bei der DNA-Präzipitation für Sequenzanalysen wurde der *NucleoSpin Plasmid Kit* von Macherey-Nagel (Düren) nach Vorschrift der Hersteller verwendet.

### 3.2.1.2. Midi-Plasmidisolierung

Bakterien aus einer 100 ml ÜN-Kultur wurden in einer Sorvall-Kühlzentrifuge 8 min mit 7.000 Upm bei 4°C sedimentiert und in 3 ml GET-Lösung (2.5.1.) resuspendiert. Die Suspension wurde in SS34-Röhrchen überführt und mit 30 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt. Zum Aufschluß der Zellen wurden 8 ml frische Lyselösung (2.5.1.) zugegeben, und der Ansatz 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4,5 ml 7,5 M Natriumacetat-Lösung und 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die gefällten Bestandteile in der Sorvall-Zentrifuge 15 min bei 18.000 Upm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur Fällung der DNA in 10 ml kaltes Isopropanol überführt, 15 min bei RT stehengelassen und erneut 15 min mit 18.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Zur Reinigung der DNA von Salzen wurde diese mit 5 ml 70% EtOH gewaschen und getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 4 ml TE-Lösung (2.5.1.) aufgenommen, in ein steriles Sarstedt-Röhrchen überführt, mit 4 ml Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut gemischt und 10 min mit 5.000 Upm bei RT in einer Baird & Tatlock-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der von Proteinen gereinigte Überstand wurde in ein frisches Sarstedt-Röhrchen überführt und mit 400 µl 3 M Natrium-Acetat sowie 8 ml EtOH<sub>abs.</sub> versehen. Die DNA wurde erneut 20 min bei 4°C gefällt, 10 min bei RT mit 5.000 Upm sedimentiert und in 400µl Wasser aufgenommen.

### 3.2.2. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. meliloti*-Zellen

Zur Gewinnung chromosomaler DNA wurden 4 ml einer 2 d-Kultur 8 min mit 6.000 Upm bei RT zentrifugiert und das Zellsediment in 25 mM EDTA pH 8,0 aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 400 µl 20 % Saccharose in TE (2.5.2.) für 30 min bei -20°C eingefroren. Der Ansatz wurde bei RT aufgetaut und mit 100 µg/ml RNase und 40 mg/ml Lysozym für 45 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 150 µl 5 % Natrium-N-Laurylsarcosin und 400 µg/ml Proteinase K zugesetzt und ÜN bei 50°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 100 µl 3 M Natriumacetat (2.5.2.) versetzt, zweimal mit 1 Volumen Phenol und einmal mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Der Überstand wurde zur Fällung der DNA mit 1 Volumen Isopropanol gemischt, 5 min bei RT inkubiert und 5 min bei RT abzentrifugiert. Nach Waschen des Präzipitats mit 1 ml 70 % Ethanol und Trocknen bei RT wurde die DNA in 100 µl TE gelöst.

### 3.2.3. Isolierung von RNA aus *S. meliloti*-Zellen

In Minimalmedium angezogene Bakterienkulturen der exponentiellen oder stationären Wachstumsphase (3.1.2.) wurden nach der Methode von Rüberg *et al.* (2003) in 1,5 ml-Portionen in ERGs 1 min mit 14.000 Upm bei 4°C zentrifugiert und die Zellsedimente anschließend sofort 10 min lang in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Sedimente wurden in je 53 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert und je 4 dieser Suspensionen in ein vorgekühltes, mit 700 µl RLT-Puffer (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen) befülltes *FastProtein tube* (Qbiogene) pipettiert. Die Zellen wurden 30 sec im Ribolyser (Hybaid) auf Stufe 6,5 aufgeschlossen. Nach Kühlung des Ansatzes für 3 min auf Eis wurde 3 min mit 14.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Je 450 µl des Überstands wurden mit 250 µl 98 % Ethanol gemischt. Zweimal 700 µl des mit Ethanol versetzten Überstands wurden nacheinander 30 sec mit 14.000 Upm bei RT durch ein *RNeasy*-Säulchen (Qiagen) zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulchen einmal mit 500 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen) gewaschen. Die Säulchen-Matrix wurde 2 min bei 14.000 Upm trocken zentrifugiert. Die RNA wurde durch zweimalige Inkubation des Säulchens mit 30 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei RT und anschließender einminütiger Zentrifugation bei 14.000 Upm eluiert. Zur vollständigen Entfernung verbleibender DNA-Fragmente aus der RNA-Präparation wurde die RNA mittels des *RNase-free DNase set* (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers weiter aufgereinigt.

### 3.2.4. Auftrennung von DNA durch Agarosegelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 1× TAE (2.5.3.) als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml) zur Gellösung gefärbt, so daß bei Betrachtung auf einem UV-Schirm (Vilber Lourmat TF20M) die Banden detektiert werden konnten. Die genauen Größen der Banden wurden durch Auftragen eines Größenstandards (peqGOLD Leiter-Mix, Peqlab) bestimmt.

### **3.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Banden wurden unter UV-Licht (UV-Schirm Chromato-Vue Transilluminator C60, Ultra Violet Products Inc.) mittels eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem *GFX PCR DNA and gel band purification kit* von Amersham Biosciences nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

## **3.3. Enzymatische Modifizierung von DNA**

### **3.3.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

DNA wurde mit Enzymen der Firma NEB gespalten. Zum Einstellen optimaler Pufferbedingungen wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet, wobei DNA-Mengen zwischen 0,5 µg und 2 µg für analytische Zwecke und bis zu 10 µg für präparative Anwendungen eingesetzt wurden. In der Regel wurden 3 Einheiten Restriktionsenzym pro 0,5 µg DNA verwendet. Eine Einheit entspricht der Enzymaktivität, die 1 µg Lambda-DNA bei entsprechender Temperatur in 1 h vollständig schneidet. Plasmid-DNA wurde 2 bis 3 h bei der für die jeweiligen Enzyme optimalen Temperatur verdaut.

### **3.3.2. Alkalische Phosphatase-Behandlung**

Eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase war bei Vektoren erforderlich, die mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, um eine Religierung zu verhindern. Die alkalische Phosphatase entfernt die Phosphatgruppe am 5'-Ende geschnittener DNA. Nach dem enzymatischen Verdau wurde der Vektor 45 min bei 37°C mit 4 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem *GFX PCR DNA and gel band purification kit* von Amersham Biosciences gereinigt.

## 3.4. DNA-Techniken

### 3.4.1. Ligieren von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Um DNA-Fragmente stabil vermehren zu können, müssen diese vor der Transformation in einen geeigneten Vektor kloniert werden. Als Vektoren wurden verwendet: pBBR1MCS-2, pEGFP-N1, pK18mobsacB, pTYB2 und pUCBM20. Ligierte wurde in der Regel in einem Volumen von 15 µl. Die benötigten Pufferbedingungen wurden mit Hilfe des 5 x Ligase-Puffers eingestellt. Fragment und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 2 Einheiten T4-Ligase versetzt, mit Wasser auf 15 µl aufgefüllt, und 3 h bei 37°C oder ÜN bei 10-12 °C inkubiert.

### 3.4.2. Transformation von *E. coli*

Kompetente Zellen von *E. coli* DH10B, S17-1 und ER2566 wurden nach einer Vorschrift von Maniatis *et al.* (1982) hergestellt. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 15 µl Ligierungsansatz (3.4.1.) bzw. 2 µl Plasmid-DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 90 sec bei 42°C inkubiert, wobei die kompetenten Zellen das Plasmid aufnehmen. Zur Regeneration wurden die Zellen 1 h in 3 ml LB-Medium (2.4.1.) im 37°C Reagenzglasroller inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, Baird & Tatlock) bei 5.000 Upm und Resuspension im Rücklauf wurden 1/10 und 9/10 auf die entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert, die gegebenenfalls mit 40 µl X-Gal und 8 µl IPTG für die Blau-Weiß-Selektion versehen waren.

## 3.5. PCR-Methoden

Zur raschen Gewinnung von DNA-Fragmenten zu Analysezwecken oder Klonierungen wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt (Mullis *et al.*, 1986). Als Matrizen-DNA wurden genomische *S. meliloti*-DNA oder Plasmide verwendet. Für die Herstellung von DNA-Fragmenten zur PCR-Mutagenese (3.5.2.) und zur Überprüfung von Klonierungen wurde *ProofStart*-Polymerase verwendet. Bei diesem Enzym ist durch

chemische Modifikation die Polymerase- und *proofreading*-Aktivität blockiert, wodurch der Abbau der Primer und deren unspezifische Bindung an die Matrizen-DNA zu Beginn der PCR-Reaktion verhindert werden. Durch eine 5minütige Inkubation des PCR-Ansatzes bei 95°C wird die Inaktivierung vollständig aufgehoben. Nach Möglichkeit wurden die Primer so gewählt, daß ihre Schmelztemperaturen ähnlich waren. Die *annealing*-Temperaturen richteten sich nach den Schmelztemperaturen der Primer, die Synthesezeit nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Biometra *T gradient* Thermocycler (UNOII) durchgeführt, als Reaktionsgefäße dienten ultradünne PCR *tubes* (Biozym, Hess. Oldendorf).

PCR Standard-Ansatz	
Matrizen-DNA	2 µl (100 ng)
10x Puffer	5 µl
5x Q-Solution	10 µl
2 mM dNTPs	7,5 µl
Primer 1	1 µl (100 pmol)
Primer 2	1 µl (100 pmol)
<i>ProofStart</i> -Polymerase	0,5 µl (1,25 U)
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde 5 min bei 95°C inkubiert, um die *ProofStart*-Polymerase zu aktivieren und die Matrizen-DNA aufzuschmelzen. Es folgten 35 Zyklen der Abfolge:

1 min Denaturierung bei 95 °C

1 min *annealing* bei 52-58°C

1 min Elongation bei 72°C

Nach Beendigung der 35 Zyklen wurde der Ansatz noch 15 min bei 72°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend bei 4°C gestoppt, die erhaltenen DNA-Fragmente über Agarosegelektrophorese aufgetrennt (3.2.4.) und mit dem GFX-Kit (3.2.5.) gereinigt.

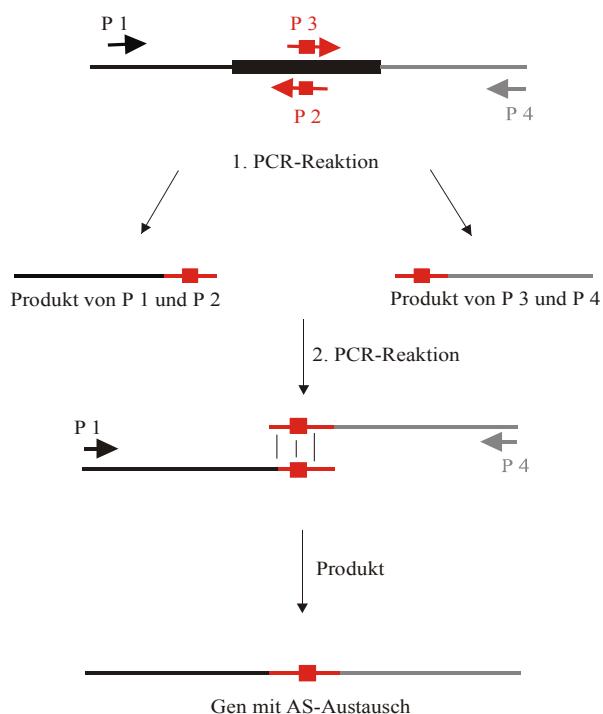
### 3.5.1. PCR der DNA einer *S. meliloti*-Einzelkolonie

PCR-vermittelte DNA-Amplifizierungen konnten direkt mit *S. meliloti*-Zellen durchgeführt werden. Mittels eines sterilen Zahnstochers wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte gepickt und zusammen mit H<sub>2</sub>O und Puffer 15 min auf 95°C erhitzt, um die DNA aus den Zellen freizusetzen. Nach rascher Kühlung auf Eis über 5 min wurde der Ansatz für die PCR-Reaktion verwendet.

### 3.5.2. PCR-Mutagenese (*overlap extension*)

#### 3.5.2.1. Herstellung von AS-Austausch-Mutanten

Gezielte Basensubstitutionen wurden mittels *in vitro* PCR-Mutagenese eingeführt (Higuchi, 1989).



**Abb. 8.** Fließschema einer PCR-Mutagenese. P1 und P4: Außenprimer; P2 und P3: komplemetäre Innenprimer mit gewünschten Basenaustauschen; schwarz: Matrize und Produkt der PCR mit den Primern P1 und P2; grau: Matrize und Produkt der PCR mit den Primern P3 und P4; rot: Region mit neu eingeführten Basenaustauschen.

Durch die Wahl von vier geeigneten Primern wurde in zwei PCR-Runden ein DNA-Fragment erzeugt, welches das gewünschte mutierte Codon für einen Aminosäurerest enthält. Als Matrize diente DNA des klonierten Gens oder Genfragments. Das Verfahren ist als Fließschema in Abb. 8 dargestellt. Die Außenprimer P1 und P4 lagen ca. 300 bp *upstream* bzw. *downstream* von der zu mutierenden Basenfolge. Die Innenprimer P2 und P3 waren komplementär zueinander und zu der die Substitution umgebenden Sequenz, sie enthielten zentral die gewünschten Mutationen. In einer ersten PCR-Runde entstanden in zwei getrennten PCR-Reaktionen jeweils ein Fragment mit 300 bp oberhalb, bzw. unterhalb der Mutation gelegenen Sequenz. In einer zweiten Runde wurden die gereinigten Fragmente als Matrizen-DNA eingesetzt. In den folgenden Zyklen entstand mit den Außenprimern P1 und P4 als Produkt ein Fragment, das zentral das mutierte Aminosäurecodon enthielt. Die beiden Außenprimer enthielten geeignete Restriktionsschnittstellen als Anhang, die zur gerichteten Klonierung in Vektor-DNA eingefügt wurden.

### 3.5.2.2. Herstellung von *in frame*-Deletionen

*In frame*-Deletionen wurden in etwas abgewandelter Form ebenfalls mittels *overlap extension* PCR (3.5.2.1.) eingeführt. Das Prinzip entsprach dem Schema in Abb. 8.



**Abb. 9.** Schema zur Einführung einer *in frame*-Deletion. P1 und P4: Außenprimer; P2 und P3: Innenprimer; schwarz: zu deletierender Bereich; rot: komplementäre Sequenz der Innenprimer

Abweichend war nur die Wahl der Innenprimer P2 und P3, die eine Deletion des Gens im Gegensatz zu einem Nukleotidaustausch im Gen ermöglichen (Abb. 9.). Die Innenprimer P2 und P3 waren komplementär zueinander und zu einer die Deletion flankierenden Sequenz. In der ersten PCR-Runde entstanden die DNA-Fragmente oberhalb bzw. unterhalb der Deletion, die in der zweiten Runde als Matrizen-DNA eingesetzt wurden.

Mit den Außenprimern P1 und P4 entstand ein Fragment, das zentral die Deletion enthielt, wobei auf die Erhaltung des Leserahmens (*in frame*) geachtet wurde.

### **3.6. DNA-Sequenzanalysen und Auswertungsverfahren**

Alle Sequenzierungen zur Überprüfung der Konstrukte wurden mit einem *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) überprüft. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem GCG-Programmpaket (*Genetics Computer Group*) der *Wisconsin Package* Version 10.0 (1999, Madison, Wisconsin) weiterbearbeitet. Ergänzende Analysen der Nukleinsäure- und Proteindaten wurden mit Programmen im Internet durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### **3.7. Konjugativer Plasmidtransfer von *E. coli* nach *S. meliloti***

Die Einführung von Fremd-DNA (Plasmide) in *S. meliloti*-Zellen ist effizient mittels Konjugation mit *E. coli* S17-1 möglich. Dieser Stamm enthält im Chromosom Gene für die Mobilisierung des *broad host range* P1-Plasmids und kann daher P1-Derivate, die als Vektor dienen, in gram-negative Bakterien als Rezipienten konjugativ übertragen (Simon *et al.*, 1983).

#### **3.7.1. Einführung von Codon-Substitutionen und Deletionen in das *S. meliloti*-Genom**

Codon-Substitutionen und Deletionen wurden durch homologe Rekombination zwischen mutierten Sequenzen und Wildtypsequenzen in das Genom von *S. meliloti* eingeführt. Zu diesem Zweck wurde der mobilisierbare *suicide*-Vektor pK18mobsacB verwendet, der einen Replikationsursprung für *E. coli* besitzt, jedoch keinen für *S. meliloti* (Schäfer *et al.*, 1994). Nach Klonieren der mutierten DNA-Sequenz in den Vektor wurde *E. coli* S17-1 mit dem rekombinanten Plasmid transformiert (Simon *et al.*, 1983). Kreuzungen zwischen *E. coli* S17-1 und *S. meliloti* wurden nach der Vorschrift von Simon *et al.* (1983) auf Membranfiltern durchgeführt. Donor und Rezipient aus stationär gewachsenen Kulturen

wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 (*E. coli*:  $5 \times 10^7$  Zellen / ml; *S. meliloti*:  $1 \times 10^8$  Zellen / ml) verdünnt und im Schüttelwasserbad bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,4 inkubiert. Es wurden 250 µl Donorzellen (*E. coli* S17-1 der Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen / ml) und 500 µl Rezipientenzellen (*S. meliloti* der Zelldichte von  $2 \times 10^8$  Zellen / ml) in ein ERG überführt und 2 min bei 6.000 Upm zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl TYC aufgenommen und auf sterile Celluloseacetat-Filter übertragen, die auf vorgewärmte TYC-Platten aufgelegt waren. Nach 20 h Inkubation bei 30°C wurden die Zellen mit 1 ml TYC-Medium von dem Filter gespült und Verdünnungen auf Platten mit Selektion auf das Plasmid und den Rezipientenstamm (*S. meliloti*) ausplattiert, so daß nur Zellen mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Vier dieser Kolonien wurden auf TYC<sub>StrNeo</sub> vereinzelt. Von einer Einzelkolonie ausgehend, wurden die Zellen 2 Tage ohne Selektion auf das Plasmid in TYC<sub>Str</sub>-Medium angezogen. Während dieser Zeit sollte das zweite Rekombinationsereignis stattfinden. Mit Hilfe des *sacB*-Gens konnte auf das zweite Rekombinationsereignis selektiert werden (Ried & Collmer, 1987; Selbitschka *et al.*, 1993; Schäfer *et al.*, 1994). Von den Zellkulturen wurden Verdünnungen hergestellt und diese auf Bromfield-Platten mit 10 % Saccharose ausplattiert. Alle Zellen, die das Plasmid noch enthielten, sollten abgetötet werden. Sie synthetisieren mit Hilfe der Levan-Saccharase SacB aus Saccharose Levane, die von *S. meliloti* nicht verwertet werden können. Die Levane häufen sich im Periplasma an, bis die Zellen platzen. Ca. 50 % der Zellen, die auf den Saccharose-Platten anwuchsen, hatten das Plasmid und die damit vermittelte Antibiotikaresistenz durch ein zweites Rekombinationsereignis verloren. Von diesen Zellen hatten 10–50 % die Wildtypsequenz durch die mutierte Sequenz ersetzt. Die Mutation wurde durch PCR und anschließende Sequenzierung nachgewiesen.

### 3.7.2. Einführung von *exp-lacZ*-Fusionen in das *S. meliloti*-Genom

Reportergenkonstrukte aus *expA1*-bzw. *expE2-lacZ*-Fusionen wurden durch Interposon Mutagenese ins *S. meliloti*-Genom eingeführt. Ein promotorloses *lacZ*-Gm Interposon (Becker *et al.*, 1995) und die entsprechende Region des *exp*-Gens wurden in den *suicide*-Vektor pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994) kloniert. Mit den aus der Klonierung resultierenden Hybrid-Plasmiden (Rüberg *et al.*, 1999) wurde *E. coli* S17-1 transformiert. Kreuzungen zwischen *E. coli* S17-1 und *S. meliloti* wurden wie zuvor (3.7.1.) durch-

geführt. Der *pK18mob* besitzt, vergleichbar mit dem *pK18mobsacB*, keinen Replikationsursprung für *S. meliloti*. Die Reportergenkonstrukte sollten durch homologe Rekombination zwischen den *exp*-Sequenzen ins *S. meliloti*-Genom integrieren. Durch Plattieren der Zellen auf TYC<sub>StrGen</sub> wurde direkt auf das zweite Rekombinationsereignis selektioniert. Nach der Selektion wurden 500 Kolonien auf TYC<sub>StrGen</sub> und TYC<sub>StrNeo</sub> übertragen. Zellen, die nur auf TYC<sub>StrGen</sub> wachsen konnten, hatten das Plasmid und die damit vermittelte Antibiotikaresistenz durch das zweite Rekombinationsereignis verloren. Das *expG-lacZ*-Reportergenkonstrukt wurde durch homologe Rekombination in das *exoP*-Gen in das *S. meliloti*-Genom integriert. Die *expG*-Promotorregion wurde in den Vektor pSRPP18 (Quester & Becker, 2004) vor ein promotorloses *lacZ*-Gen kloniert. *E. coli* S17-1 wurde mit dem endgültigen Plasmid pBPboxG (Quester & Becker, 2004) transformiert. Kreuzungen zwischen *S. meliloti* und *E. coli* S17-1 wurden nach der zuvor (3.7.1.) beschriebenen Methode durchgeführt. Der Vektor pSRPP18 trägt einen zum *exoP*-Gen homologen Bereich über den der Vektor ins *S. meliloti*-Genom integriert. Durch Selektion auf die plasmidvermittelte Neomycinresistenz wurde die Integration von pBPboxG ins *S. meliloti*-Genom überprüft.

## 3.8. Nukleinsäuretransfer und Hybridisierung (*Southern blot*)

### 3.8.1. Nukleinsäuretransfer

Genomische DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente geschnitten (3.3.1.) und auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt (3.2.3.). Nach fotografischer Dokumentation wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl-Lösung zur Depurinierung der DNA geschwenkt. Im Anschluß wurde die DNA durch 30 min Inkubation des Agarosegels mit 0,5 M NaOH- und 1,5 M NaCl-Lösung denaturiert und schließlich 30 min mit 0,5 M Tris pH 7,5 und 1,5 M NaCl neutralisiert. Die so vorbehandelte DNA konnte jetzt mittels Kapillarkraft ÜN mit 5 x SSC auf eine Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>) übertragen werden. Durch UV-Belichtung (Stratagene UV crosslinker, Stratagene) wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden.

### 3.8.2. Markierung von Sonden

Chemolumineszenz-Sonden wurden mit dem ECL-Kit (*enhanced chemoluminescence*) nach Vorschrift des Herstellers markiert. Dazu wurden 100 ng DNA in 10 µl Wasser 5 min zur Denaturierung aufgekocht und im Anschluß sofort für 5 min auf Eis abgekühlt. Zur denaturierten DNA wurden 10 µl *labelling reagent* (Meerrettich-Peroxidase) und 10 µl Glutaraldehyd-Lösung gegeben, kräftig gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die markierte Sonde wurde umgehend zur vorhybridisierten Membran gegeben.

### 3.8.3. Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion

Die Nylonmembran mit kovalent gebundener DNA wurde mit Prähybridisierungslösung behandelt, um unspezifische Bindung der markierten Sonde zu vermeiden. Die Prähybridisierungslösung bestand aus 0,125 ml / cm<sup>2</sup> Gold-Hybridisierungspuffer, 0,5 M NaCl und 5 % *blocking reagent*. Die in Haushaltsfolie eingeschweißte Membran wurde 2 h bei 42°C mit der Lösung inkubiert. Im Anschluß wurde die mit Meerrettichperoxidase markierte Sonde sofort zur Membran in Lösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 42°C im Schüttelwasserbad. Nicht gebundene Sonde wurde durch 2 x 5 min Waschen bei 55°C mit primären Waschpuffer und 2 x 5 min mit sekundärem Waschpuffer (2.5.4.) bei RT entfernt. Zur Detektion wurde die Membran 1 min mit der Detektionslösung aus Luminol und chemischen Verstärkern (1:1 Gemisch von Lösung 1 und Lösung 2) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gepackt und in eine lichtdichte Kassette gelegt. Die Lichtsignale der Oxidationsreduktion konnten mit Hyperfilm™ ECL *High performance chemiluminescence film* (Amersham, Buckinghamshire) nach 10 min bis 1 h Expositionszeit bei RT detektiert werden.

## 3.9. Reportergen-Analysen (*Miller Assays*)

Die Aktivität von diversen Promotoren in der *S.meliloti*-Zelle wurde durch Reportergen-Analysen (Miller, 1972) bestimmt. Hierzu wurden die mit dem promotorlosen lacZ-Gen der Vektoren pPHU234, pPHU235 oder pPHU236 (je nach benötigtem Leserahmen) (Hübner *et al.*, 1991) fusionierten Promotoren verschiedener Gene durch Konjugation in

die zu untersuchende *S. meliloti*-Zelle gebracht (3.7.1.). Das im Vektor enthaltene *lacZ*-Gen codiert für *E. coli*-β-Galactosidase, die das in den Reportergen-Analysen eingesetzte Substrat o-Nitrophenyl-β-D-Galactosid (ONPG) zu Galactose und o-Nitrophenolat hydrolysiert. Letzteres ist gelb und hat ein Absorptionsmaximum bei 420 nm. Die Reportergenkonstrukte zur Bestimmung der Aktivität von diversen *exp*-Promotoren wurden durch Interposon-Mutagenese oder homologe Rekombination direkt ins *S. meliloti*-Genom eingekreuzt (3.7.2.)

Zellen, die die Reportergenkonstrukte mit den Promotor-*lacZ* Fusionen enthielten, wurden bis zur Motilität angezogen (3.1.2.) und ihre Zelldichte photometrisch ( $OD_{600}$ ; UltrospecIII, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die Menge an eingesetzter Zellkultur richtete sich nach dem erwarteten Umsatz an ONPG und lag zwischen 0,2 ml und 0,5 ml. Die Proben wurden mit Z-Puffer (2.5.11.) auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt und mit einem Tropfen Toluol versetzt, um die Zellmembran für kleine Moleküle wie ONPG permeabel zu machen. Nach 1 h Inkubation bei 37°C lief die eigentliche Reaktion bei 28°C im Schüttelwasserbad (Certomat WR; B. Braun Melsungen AG) ab. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer gelöst) gestartet. Bei genügender Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M  $Na_2CO_3$ -Lösung beendet und die Reaktionszeit protokolliert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 14.000 Upm, Eppendorf-Zentrifuge) entfernt und die Absorption des freigesetzten o-Nitrophenolats bei 420 nm gemessen. Die Aktivität der β-Galactosidase wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{1000 \times OD_{420}}{t \times v \times OD_{600}} = \text{Einheiten der } \beta\text{-Galaktosidase (Miller Units)}$$

$OD_{600}$ : Die optische Dichte bei 600 nm ist ein Maß für die Zelldichte

$OD_{420}$ : Die optische Dichte bei 420 nm entspricht der o-Nitrophenolabsorption

t: Reaktionszeit in min

v: Volumen der eingesetzten Zellsuspension in ml

Die spezifische Aktivität der β-Galactosidase wird in Einheiten pro mg Protein gemessen.

Eine Einheit β-Galactosidase ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 nMol ONPG pro Minute bei 28°C hydrolysiert.

## 3.10. Sm6kPCR DNA-Chip-Analysen

### 3.10.1. Synthese von aminoallyl-modifizierter cDNA

Gesamt-RNA (3.2.3.) aus *S. meliloti* wurde mittels reverser Transkription in aminoallyl-modifizierte cDNA transkribiert. In einem 18 µl-Ansatz wurden 11 - 27 µg RNA zusammen mit 8 µg *random hexamer* Oligonukleotiden (Amersham, Buckinghamshire) 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Anschließend wurden dem RNA-Oligonukleotid-Gemisch die Komponenten für die reverse Transkription hinzugefügt.

Reverse Transkription-Ansatz	
5 x RT <i>first strand</i> Puffer	6,0 µl
0,1 M DTT	3,0 µl
RNase Inhibitor (40 U / µl)	0,5 µl
Superscript II Reverse Transkriptase (200 U / µl)	1,5 µl
50 x dNTP (2.5.7.1.)	0,6 µl
RNA-Oligonukleotid-Gemisch	11,6 µl

Nach 1 h reverser Transkription bei 42°C wurde zusätzlich 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase zu dem Reaktionsansatz pipettiert und nochmal für 1 h bei 42°C inkubiert. Nach beendet Transkription wurde die RNA durch Zugabe von 15 µl 0,2 M NaOH für 10 min bei 70°C hydrolysiert. Der Ansatz wurde mit 15 µl 0,2 M HCl neutralisiert und die aminoallyl-markierte cDNA aufgereinigt, um restliche Nukleotide und weitere niedermolekulare Moleküle mit Aminogruppen zu entfernen. Die neutralisierte cDNA wurde mit 450 µl *capture buffer* (*CyScribe* GFX kit, Amersham) versetzt, das Gemisch auf ein *CyScribe* GFX Säulchen pipettiert und 30 sec mit 13.000 Upm bei 20°C zentrifugiert. Das Säulchen wurde dreimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurden 60 µl 0,1 M Natriumcarbonat pH 9,0 auf die Säulchen-Matrix pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Durch einminütige Zentrifugation mit 13.000 Upm bei 20°C wurde die gereinigte cDNA von dem Säulchen eluiert.

### 3.10.2. Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an cDNA

Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe im Licht bleichen, wurde für die Versuchsdauer im abgedunkelten Raum gearbeitet; als zusätzlicher Schutz wurden braune, lichtundurchlässige ERGs verwendet. Nach der Methode von de Risi *et al.* (1997) wurde 1 µl Cy3- bzw. Cy5-NHS-Ester zu 60 µl aminoallyl-markierter cDNA pipettiert und das Gemisch für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit wurde der Farbstoff über eine Amidbindung an die Aminogruppe der aminoallyl-markierten cDNA gekoppelt, wobei der NHS-Ester abgespalten wurde. Restlicher, nicht gekoppelter Farbstoff wurde durch Zugabe von 4,5 µl 4 M Hydroxylamin und 15minütige Inkubation im Dunkeln blockiert, da der Farbstoff an die Aminogruppen des Hydroxylamins gekoppelt wurde. Die fluoreszenz-markierte cDNA wurde mit dem *Qia-qick PCR purification kit* (Qiagen) gereinigt. Die Cy5-markierte cDNA wurde mit 650 µl Puffer PB gemischt. Anschließend wurde die Cy3-markierte cDNA zu dem Ansatz pipettiert. Der Ansatz wurde 1 min bei 12.000 Upm durch ein *Qia-quick* Säulchen zentrifugiert. Das Säulchen wurde zweimal mit 750 µl Puffer PE gewaschen und zum Schluß 1 min bei 13.000 Upm trocken zentrifugiert. Zur Elution der fluoreszenzmarkierten cDNA wurde zweimal 30 µl Puffer EB auf die Säulchen-Matrix pipettiert, 3 min bei RT inkubiert und schließlich 1min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Zur Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung wurden 2 µl von der gereinigten Probe mit 4 µl 44 %igem Glycerin gemischt und auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach 20 min Gelelektrophorese bei 80 V wurde das Gel mit dem Typhoon Imager (Amersham) analysiert. Das Gel wurde mit 633 nm auf Cy5-markierte DNA, und mit 532 nm auf Cy3-markierte DNA analysiert.

### 3.10.3. Hybridisierung der Sm6kPCR DNA-Chips

Die Hybridisierung der Sm6kPCR DNA-Chips wurde am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld von PD Dr. Anke Becker nach der Vorschrift von Becker *et al.* (2004) durchgeführt. Die DNA-Chips wurden in 10 ml *DIG Easy Hyb* (Amersham) mit 5 µg / ml *sonicated salmon sperm DNA* (Amersham) für 45 min bei 42°C vorhybridisiert und anschließend für die Hybridisierung präpariert. Das Cy3 / Cy5-markierte cDNA-Gemisch wurde in der *Speed Vac* getrocknet, in 70 µl *DIG Easy Hyb* resuspendiert und mit 1 µl *salmon sperm DNA* versetzt. Nach 10 min Inkubation des Ansatzes bei 65°C

wurden die vorbehandelten DNA-Chips mit dem cDNA-Gemisch 14 - 18 h bei 42°C hybridisiert. Anschließend wurden die DNA-Chips zweimal 1 min mit Waschpuffer 1 (2.5.7.2.), zweimal 1 min mit Waschpuffer 2 und 10 sec mit Waschpuffer 3 inkubiert, um nicht hybridisierte cDNAs zu entfernen. Die DNA-Chips wurden getrocknet und mit dem *ScanArray4000* (Perkin Elmer; Boston, MA, USA) auf Cy5- und Cy3-Fluoreszenz analysiert.

### 3.10.4. Auswertung der Fluoreszenzdaten

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte nach der Vorschrift von Becker *et al.* (2004). Signalintensität und Hintergrundsignale wurden für jeden Hybridisierungspunkt des DNA-Chips mit dem *ImaGene 5.5*-Programmpaket (Biodiscovery Inc., Los Angeles, CA, USA) analysiert. Der  $\log_2$ -Wert des Intensitätsverhältnisses wurde für jeden Punkt mit nachfolgender Formel bestimmt:

$$M_i = \log_2(R_i/G_i)$$

$$R_i = I_{ch1_i} - Bg_{ch1_i}$$

$$G_i = I_{ch2_i} - Bg_{ch2_i}$$

$I_{ch1_i}$  = Intensität eines Punkts im Kanal 1

$I_{ch2_i}$  = Intensität eines Punkts im Kanal 2

$Bg_{ch1_i}$  = Intensität des Hintergrunds eines Punkts im Kanal 1

$Bg_{ch2_i}$  = Intensität des Hintergrunds eines Punkts im Kanal 2

Mit Hilfe der *EMMA 1. 1 microarray data analysis software* (Dondrup *et al.*, 2003; [www.genetik.uni-bielefeld.de/EMMA/](http://www.genetik.uni-bielefeld.de/EMMA/)) wurden die Daten normalisiert. Gene mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  und einem M-Wert  $\geq 1,00$  oder  $\leq 1,0$  wurden als unterschiedlich exprimiert gewertet.

## 3.11. DNaseI-footprinting

### 3.11.1. Präparation radioaktiv markierter DNA-Sonden

In *footprinting*-Experimenten wird die Bindung von Proteinen an DNA untersucht. Zu analysierende Promotorregionen wurden über zwei unterschiedliche Restriktionsschnittstellen in den Vektor pUCBM20 (2.1.) kloniert. Die Plasmid-DNA wurde mit einem der beiden Enzyme linearisiert und anschließend mit alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert (3.3.2.). Die dephosphorylierten 5'-Enden wurden durch den Einbau von [ $^{32}$ P]-Phosphat über 30 min bei 37°C radioaktiv markiert. Ein Standardansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

dephosphorylierte Vektor-DNA	7,0 µg
10 x PNK-Puffer	1,3 µl
T4-Polynukleotidkinase (10 U / µl)	1,0 µl
[ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (10 µCi / µl)	3,0 µl
H <sub>2</sub> O	ad 13,0 µl

Die Promotorregion wurde mit dem zweiten Restriktionsenzym aus dem Plasmid isoliert. Das Enzym und der entsprechende Restriktionspuffer wurden dem Kinase-Ansatz zugesetzt, das Volumen des Ansatzes mit Wasser auf 50 µl eingestellt und die Inkubation 2 h bei 37°C fortgesetzt. Durch Zugabe von 20 µl Probenpuffer (2.5.5.) wurde die Reaktion gestoppt. Überschüssiges [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP und die Vektor-DNA wurden durch Gelelektrophorese mit 1 x TBE bei 600 V über ein 4%iges Polyacrylamidgel (2.5.5.) von dem radioaktiv markierten DNA-Fragment abgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten vorsichtig von einander getrennt. Das an einer Platte haftende Gel wurde in Frischhaltefolie gewickelt und in eine Röntgenkassette gelegt. Nach einer Exposition von 10 min konnten die Banden der Plasmid-DNA und der DNA-Sonde auf dem Röntgenfilm (*Fuji medical X-ray film*) deutlich erkannt werden. Der Film wurde unter die Glasplatte mit dem Gel gelegt, um die DNA-Sonde zu lokalisieren. Die Sonde wurde ausgeschnitten und ÜN unter Schütteln bei 30°C in einem 15 ml Sarstedt-Röhrchen mit 4 ml Elutionspuffer (2.5.5.) eluiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abpipettiert und in 600 µl-Proben auf 6 ERGs verteilt. Die DNA wurde mit 1 Vol Phenol / Chloroform (1 :1) versetzt, gut gemischt und 10 min mit 14.000 Upm bei RT

zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue ERGs überführt, mit 2 Vol Ethanol abs. (eiskalt) gemischt und 30 min mit 14.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend mit 200 µl 70%igem Ethanol (eiskalt) gewaschen, 5 min mit 14.000 Upm bei 4°C sedimentiert und 15 min im Vakuum getrocknet. Die gesamte DNA wurde in 50 µl Wasser resuspendiert. Zur Bestimmung der Aktivität der Sonde wurde der radioaktive Zerfall einer 2 µl-Probe im *Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2900TR* (Packard) bestimmt.

### 3.11.2. G+A-Sequenzierungsreaktion

Als Längenstandard für die *footprinting*-Analyse wurde mit der entsprechenden DNA-Sonde parallel zum *Footprint* eine modifizierte G+A-Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert (1977) durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Sonde	150.000 cpm
poly[dIdC]	1 µl
50 % Ameisensäure	1 µl
TE-Puffer	ad 10 µl

Nach 6 min Inkubation bei 37°C wurden 150 µl 1 M Piperidin zum Reaktionsansatz gegeben. Anschließend wurde der Ansatz 30 min auf 90°C erhitzt und dann 5 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 3 µl tRNA (1 µg / µl) und 1,2 ml 1-Butanol wurde kräftig gemischt und 10 min mit 14.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Sediment wurden 150 µl 1 % SDS und 1,2 ml 1-Butanol pipettiert, kräftig gemischt und 10 min mit 14.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment noch zweimal mit 500 µl 1-Butanol gewaschen, 30 min im Vakuum getrocknet und in 5 µl Formamid-Farbmarker (2.5.6.) aufgenommen.

### 3.11.3. DNaseI-*footprinting*

Zur Untersuchung der Bindung des Proteins Rem an eine DNA-Sonde wurden 150.000 cpm der markierten Sonde (100 – 150 ng) nach einer Vorschrift von Dickneite *et al.* (1998) 20 min bei 25°C mit dem Protein inkubiert. Die Komponenten eines *footprinting*-Standardansatzes wurden auf Eis gemischt.

footprinting-Standardansatz	
DNA-Sonde	150.000 cpm
10 x <i>footprinting</i> -Puffer	5 µl
50 % Glycerin	20 µl
Rem	0 – 8 µg
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Gegen Dialysepuffer B (2.5.10.1.) dialysiertes Rem wurde erst kurz vor dem Experiment in 1 x *footprinting*-Puffer, der zusätzlich 20 % Glycerin enthielt, verdünnt und direkt vor dem 20minütigen Inkubationsschritt zum Reaktionsansatz pipettiert. Anschließend wurde pro Reaktionsansatz 1 U DNaseI (in 1 x *footprinting*-Puffer verdünnt) zugegeben und die Inkubation 1 min bei 25°C fortgesetzt. Der DNaseI-Verdau wurde durch Zugabe von 140 µl Stopp-Puffer (2.5.6.) beendet. Die DNA-Fragmente wurden mit Phenol / Chloroform (1:1) extrahiert und anschließend durch die Zugabe von 2 Vol. Ethanol abs. ausgefällt. Durch Zentrifugation für 20 min mit 14.000 Upm bei 4°C wurde die DNA sedimentiert. Nach Waschen mit 70 % Ethanol wurde das DNA-Sediment 15 min im Vakuum getrocknet und schließlich in 5 µl Formamid-Farbmarker (2.5.6.) resuspendiert. Die Sequenzierungsreaktion (3.11.2.) und die *footprinting*-Ansätze wurden zusammen 3 min auf 80°C erhitzt und anschließend auf ein 10 %iges Polyacrylamid-Harnstoffgel (2.5.6.) aufgetragen. Gelelektrophorese erfolgte mit 1 x TBE bei 1000 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf ein Whatmanpapier aufgezogen, in Frischhaltefolie gewickelt und in einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie auf einen Röntgenfilm (*Fuji medical X-ray film*) ÜN bei -20°C exponiert.

## 3.12. Rekombinante Expression und Reinigung von Rem, Rem D45N und RemD45N/D47N

### 3.12.1. Das IMPACT-System

Die Proteine Rem, Rem D45N und Rem D45N/D47N wurden mit Hilfe des IMPACT<sup>TM</sup>-CN (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*)-Systems von New England BioLabs gewonnen. Für die Klonierung des *rem*-Gens, sowie der Mutanten, wurde der Vektor pTYB2 verwendet. Das *S. meliloti*-Gen wurde mittels PCR amplifiziert (3.5.) und über die Schnittstellen *NdeI* und *SmaI* in den Vektor kloniert. Hierbei erfolgte eine C-terminale Fusion der Proteine mit dem *Intein tag* unter Einführung eines zusätzlichen Glycins. Der Vektor pTYB2 enthält einen T7-Promotor, sowie eine Kopie des *lacI*-Gens, das für den Lac-Repressor codiert, um eine stringente Kontrolle über die Expression des Zielgens ausüben zu können. Der Lac-Repressor bindet an die Operator-Sequenz, die unmittelbar stromabwärts des T7-Promotors liegt. Ohne Induktion durch IPTG wird die Expression des fusionierten Gens unterdrückt. Nach Überprüfung der Sequenzen wurde der Expressionsstamm *E. coli* ER2566 mit dem erstellten Plasmid transformiert (3.4.2.). *E. coli* ER2566 trägt chromosomal im *lacZ*-Gen eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, wodurch dieses Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors steht. Ohne IPTG-Induktion wird die Expression der T7-RNA-Polymerase durch die Bindung des LacI-Repressors an den *lac*-Promotor unterdrückt.

Optimale Bedingungen für die Expression wurden durch Vortests (20 ml Kultur in 100 ml Erlenmeyerkolben) ermittelt. Zur Isolierung von rekombinantem Protein wurden zweimal ein Liter LB<sub>Amp</sub>-Medium (je 1 l in einem 2 l Erlenmeyerkolben) mit je 5 ml ÜN-Kultur beimpft und im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,7 angezogen. Nach Induktion der Proteinexpression mit 0,3 mM IPTG wurden die Kulturen ÜN bei 16°C weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (Sorvall, GS3, 7.000 Upm, 10 min). Zum Aufschluß durch das French Press-Verfahren wurden die Zellen aus 2 l Medium in 20 ml Säulenpuffer (2.5.10.1.) aufgenommen. Nach zweimaliger French Press-Passage (800 psi) wurde der Ansatz mit 10 µg/ml DNaseI versetzt und 60 min auf Eis inkubiert. Zellreste und Membranen wurden durch 30 min Zentrifugation (Sorvall, SS34, 20.000 Upm, 4°C) entfernt. Der klare Überstand wurde bei 4°C mit einer Flußrate von 0,5 ml/min auf eine

Chitin-Agarose-Säule (Durchmesser = 2,6 cm; Länge = 5 cm; Volumen = 27 cm<sup>2</sup>) aufgetragen, wobei das rekombinante Fusionsprotein über die Chitin-Binde-Domäne an das Säulenmaterial bindet. Nach Waschen mit ca. 5 Vol Säulenpuffer (2.5.10.1.) wurden zwei Vol Säulenpuffer mit 50 mM DTT mit einer Flußrate von 2 ml/min über die Säule gegeben. Der verwendete *Intein tag* führt in Gegenwart von DTT (bei 4°C) an seinem N-terminalen Ende eine Selbstspaltungsreaktion aus, so daß das Zielprotein freigesetzt wird, der *Intein tag* selbst aber an die Chitin-Agarose-Perlen gebunden bleibt. Zum vollständigen Ablauf der Reaktion wurde die Säule ÜN bei 4°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Elution des Proteins mit Säulenpuffer (2.5.10.1.). Während des DTT-Auftrags und der Elution wurden 2 ml-Fraktionen mit einem Fraktionssammler (LKB, 7000 *Ultrorac Fraction Collector*) aufgefangen. Die gesammelten Fraktionen wurden über SDS-Gelelektrophorese analysiert (3.13.2.). Die Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

### 3.12.2. De- und Renaturierung von Rem

Rekombinant exprimierte, gegen Dialysepuffer A (2.5.10.1.) dialysiertes Rem (1mg/ml) wurde lyophilisiert und in Denaturierungspuffer (2.5.10.2.) resuspendiert. Das denaturierte Protein wurde mittels Gelfiltration (Superdex 200) weiter gereinigt. Als Laufpuffer diente weiterhin der Denaturierungspuffer. Pro Lauf wurde 1 ml der Protein-Lösung auf die Säule geladen, die Flussrate betrug 0,5 ml / min. Das Elutionsprofil wurde photometrisch bei 280 nm und einer Sensitivität (*range*) von 0,5 bis 2,0 verfolgt. Das fraktioniert gesammelte Eluat wurde auf das Vorhandensein von Rem getestet und entsprechend vereinigt. Mit Denaturierungspuffer wurde das Eluat auf eine Proteinkonzentration von 0,1 mg / ml eingestellt. Durch Dialyse mit Renaturierungspuffer (2.5.10.2.) wurde die Renaturierung von Rem ermöglicht.

### 3.12.3. Dialyse von Proteinlösungen

Die vereinigten Fraktionen wurden in Dialyseschläuche überführt (*cut off* 12-14 kDa), um niedermolekulare Verbindungen und kleine Proteine aus der eluierten Proteinlösung zu

entfernen. Die Proteinlösungen wurden zunächst für 2 h, dann, nach Pufferwechsel, ÜN gegen das ca. 40fache Volumen Dialysepuffer (2.5.10.1.) bei 4°C dialysiert.

### **3.12.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) mit Hilfe des Biorad *Protein Assays* bestimmt. Mit BSA-Lösungen (2 µg/ml bis 16 µg/ml) und einer Referenz ohne Protein wurde eine Eichkurve erstellt. Eine Probe bestand aus 800 µl der BSA-Lösung in Wasser und 200 µl Testlösung. Nach 5 min Inkubation des Ansatzes bei RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt. Bei den zu testenden Proteinproben wurde ebenso verfahren. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve ermittelt.

### **3.12.5. Analytische Gelfiltration**

Analytische Gelfiltrationsläufe (durchgeführt von Dr. Martin Haslbeck, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München) wurden zu Untersuchung des Assoziationsgrades des Rem-Proteins mit Hilfe einer Biosep 2000 Säule (Tosoh Biosep GmbH, Stuttgart, Deutschland) durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 100 µl (0,34 mg/ml), die Trennung wurde bei einer Flußrate von 0,75 ml/min in Dialysepuffer B (2.5.10.1.) durchgeführt (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland). Eluierendes Rem-Protein wurde durch Fluoreszenzemission bei 300 nm (Anregungswellenlänge = 280 nm) detektiert und mit der Borwin Chromatographie Software registriert und ausgewertet.

## **3.13. Aufnahme eines CD-Spektrums zur Verifizierung der korrekten Faltung von Rem**

Zirkulardichroismus (CD) beruht auf der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit optisch aktiven Chromophoren und wird zur Abschätzung der Sekundärstruktur von Proteinen eingesetzt. In Proteinen trägt besonders die Peptidbindung zum CD-Spektrum

des Makromoleküls bei. Der Anteil von alpha-Helices und beta-Faltblättern im untersuchten Protein wird aus einer Linearkombination von Referenz-CD-Spektren berechnet, die entweder aus Modell-Makromolekülen mit nur einer einzigen, definierten Sekundärstruktur (wie z. B. Poly-L-Lysin bei einem gegebenen pH-Wert) oder aus Spektren von Proteinen mit bekannter Struktur bestehen (z. B. mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt). Das Spektrum wird konventionsgemäß  $\Theta$  (theta) gegen die Wellenlänge dargestellt, wobei folgende Beziehung gilt:

$$\text{Elliptizität } \Theta = \frac{3300 \times \text{Ausschlag (mm)} \times \text{Verstärkung} \times \text{Molekulargewicht}}{\text{Konzentration (g / l)} \times \text{Schichtdicke}}$$

Die Far-UV-Circular Dichroismus (CD) Messungen wurden in einem J-715 Spectropolarimeter mit einer PTC343 Kühleinheit (Jasco, Grossumstadt) aufgenommen. Für die Messungen wurde de- und wieder renaturiertes Rem (0,3 mg / ml) in Renaturierungspuffer (2.5.10.2.) bereitgestellt. Rekombinant exprimierte Rem in Dialysepuffer A (2.5.10.1.) wurde gegen Renaturierungspuffer dialysiert und ebenfalls in einer Konzentration von 0,3 mg / ml mittels CD-Spektrum analysiert. Das Spektrum wurde bei einer Wellenlänge von 180 nm - 260 nm in 0,1 cm Quartz-Küvetten aufgenommen. Die Temperatur wurde konstant bei 20°C gehalten. Nach Basislinienkorrektur wurde die molare Elliptizität anhand des Molekulargewichts berechnet. Mittels der CD-Spektrum Dekonvolutions Software CDNN wurde die Sekundärstruktur kalkuliert.

## 3.14. Immunchemische Methoden

### 3.14.1. Gewinnung von denaturierten Proteinproben

Zur Gewinnung von denaturierten Proteinproben für *Western blot*-Analysen (3.14.4.) wurden 1 ml Zellen einer  $OD_{600} = 0,3$  8 min in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert und in 40 µl SDS-Ladepuffer (2.5.8.) aufgenommen. Die Ansätze wurden anschließend 15 min aufgekocht und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

### 3.14.2. Affinitätsreinigung spezifischer Antikörper aus Rohseren

Antikörper wurden nach Scharf *et al.* (2001) aus Rohseren gereinigt. Zur Isolierung der spezifischen Antikörper wurden auf ein SDS-Gel (2.5.8.) insgesamt 100 µg gereinigtes Protein aufgetragen und aufgetrennt (3.14.3.). Das Protein wurde auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) transferiert (3.14.4.) und die Membran mit Ponceau S angefärbt. Die deutliche Protein-Bande wurde exakt ausgeschnitten, mit PBS-Lösung (2.5.9.) entfärbt und in kleine Stückchen geschnitten. Diese wurden in einem 2 ml ERG mit 2 ml Rohserum ÜN bei 4°C geschüttelt. Danach wurden die Membranstückchen nach folgendem Schema gewaschen:

- 3 x 5 min mit 1 x PBS / 0,1 % BSA
- 2 x 5 min mit 1 x PBS / 0,1 % BSA / 0,1 % NP-40
- 3 x 5 min mit 1 x PBS / 0,1 % BSA

Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden durch eine kurze und schnelle Absenkung des pH-Wertes von ihren Epitopen abgelöst. Vorab wurden in 1,5 ml ERGs je 375 µl 1 M KPO<sub>4</sub>-Lösung pH 9,0 zur Neutralisierung vorpipettiert und auf Eis gestellt. Zu den Membranstückchen wurden 750 µl 0,2 M Glycin / HCl-Lösung (pH 2,5) pipettiert, zur Ablösung der Antikörper 1 min lang manuell geschüttelt und die Lösung mit den von der Membran abgelösten Antikörpern in eines der Neutralisierungs-ERGs überführt. Diese Elution wurde dreimal sukzessive wiederholt, die Eluate vereinigt und der Erfolg der Antikörperreinigung durch *Western blot*-Analyse (3.14.4.) überprüft.

### 3.14.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einem 8,5 cm × 9,0 cm großen und 1 mm dicken SDS-Gel (2.5.8.) aufgetrennt, das aus einem Sammelgel (5% Acrylamid) und einem Trengel (10% bzw. 15% Acrylamid) zusammengesetzt war (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde mit 1× SDS-Laupuffer (2.5.8.) in einer Biometra-Gelelektrophoreseapparatur vertikal bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Mit Hilfe von Standardmarkern (*Low Molecular Weight Marker*, Amersham Pharmacia) wurden die Molekularmassen der Testproteine nach *Coomassie*-Färbung (2.5.8.) ermittelt.

### **3.14.4. Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembran (Western blot)**

Nach Auftrennung von Proteinproben im SDS-Gel wurden diese mit einer *Tank Blot*-Apparatur (Biological Laboratories, Harvard University) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 500 mA mit Blot-Puffer (2.5.9.)

### **3.14.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemoslumineszenz**

Die Nitrozellulosemembran mit den Proteinen wurde ÜN bei RT in PBS / 0,1% (v/v) Tween 20 / 5% Magermilch (2.5.9.) geschwenkt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Anschließend wurde die Lösung erneuert und Rohserum oder gereinigter Antikörper (3.14.2.) in einer Verdünnung von 1:1.000 bis 1:50 zugesetzt und 2 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach 4 × 10 min Waschen mit PBS / 0,1% (v/v) Tween 20 wurde der mit Meerrettichperoxidase markierte sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:5.000 in PBS / 0,1% Tween 20 / 5% Magermilch-Lösung zugegeben und 90 min inkubiert. Die Membran wurde erneut 4 × 10 min mit PBS / 0,1% (v/v) Tween 20 gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem *ECL-Western blotting kit* (Amersham Biosciences). Dazu wurden die Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran 1 min 30 sec darin geschwenkt. Nach Einwickeln der Membran in Frischhaltefolie wurde diese in eine lichtdichte Kassette gelegt und die Signale mit *ECL Hyperfilm* (Amersham) je nach Intensität nach 1 min bis 2 h Exposition detektiert. Die Banden im *Western blot* wurden mit dem Computerprogramm *Scion Image* densitometrisch ausgewertet.

### **3.15. *In vitro*-Phosphorylierungstests mit [<sup>32</sup>P]-Acetylphosphat**

#### **3.15.1. Synthese von [<sup>32</sup>P]-Acetylphosphat**

[<sup>32</sup>P]-markiertes Acetylphosphat im mikromolekularen Maßstab wurde nach dem Syntheseverfahren nach McCleary und Stock (1994) hergestellt. In einem 1,5 ml ERG wurden 240 µl Pyridin, 63 µl 2M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 287 µl H<sub>2</sub>O und 150 µl (1,5 mCi) [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat unter Rühren auf Eis vermischt. Anschließend wurden 27,5 µl Essigsäureanhydrid tropfenweise zum Reaktionsansatz pipettiert und 2 min auf Eis gerührt. Nach der Zugabe von 216 µl 2 N LiOH wurde weitere 3 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde der Ansatz in 246 µl-Proben auf 4 ERGs aufgeteilt. Es wurden je ERG 1,44 ml Ethanol absolut (eiskalt) zupipettiert und 1 h auf Eis inkubiert, um das Acetylphosphat auszufällen. Das gewünschte Produkt war nach der einstündigen Inkubation des Reaktionsgemisches als weißer Niederschlag zu erkennen und wurde durch Zentrifugation bei 10.000 Upm (4°C, 15 min) sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen des Sediments mit je 1,25 ml kaltem Ethanol wurden die geöffneten ERGs zur Trocknung des [<sup>32</sup>P]-Acetylphosphat bei 4°C 2 – 3 Tage unter Vakuum gesetzt. Das radioaktiv markierte Produkt (Ausbeute ca. 22 mg, 40%) wurde in 400 µl Wasser gelöst, in 20 µl-Portionen aufgeteilt und bei –20°C eingefroren.

#### **3.15.2. Phosphorylierung von Proteinen**

Die Phosphorylierungsreaktionen wurden nach der Vorschrift von McCleary und Stock (1994) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz entsprach einem Volumen von 15 µl und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

20 – 40 µM Protein Dialysepuffer A (2.5.10.1.)

20 mM MgCl<sub>2</sub>

30 mM [<sup>32</sup>P]-Acetylphosphat (2,5 µCi/µl)

Die Phosphorylierungsreaktion lief in 10 min bis 4 h bei RT ab und wurde mit 6 µl SDS-Ladepuffer (+100 mM EDTA; 2.5.8.) gestoppt. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt und anschließend mit Hilfe von 15%igen Gelen über SDS-Gelelektrophorese analysiert (3.14.3.). Die Gele wurden 3 × 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen, in Frischhaltefolie

eingewickelt und in eine lichtdichte Kassette (Kodak, BioMax *Intensifying Screen*) gelegt. Die Signale wurden mit *Biomax MS imaging film* nach einem Tag Expositon bei –80°C detektiert.

## 3.16. Mini-*Tn5*-Mutagenese

### 3.16.1. Transposon-Insertion

Für die Mutagenese wurde das Plasmid pUJ1287 (2.1.) mittels *E. coli* S17-1 nach der Vorschrift von Simon *et al.* (1983) konjugativ nach *S. meliloti* Wildtyp transformiert. Das Plasmid enthält das Mini-*Tn5* Km (Lorenzo *et al.*, 1990). Dieses Transposon besteht aus einer von 19 bp-langen invertierenden Enden flankierten Kanamycinresistenz-Kassette und einem externen Transposase-Gen. Bei der Transposition kann nur die Kanamycin-Kassette ins Genom integriert werden, das Transposase-Gen *tnp* bleibt im Vektor zurück. Auf diese Weise wurden stabile Insertions-Mutanten erzeugt. Nach Inkubation über 20 h bei 30°C wurden die Zellen in 1 ml TYC resuspendiert und mit 1 ml *E.coli* S17-1 gemischt, die mit dem Plasmid pRU2361 (2.1.) transformiert worden waren. Die Zellen wurden 2 min bei 5.000 Upm sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 150 µl TYC aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf einen Zelluloseacetat-Filter auf eine TYC-Platte pipettiert und 20 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml TYC resuspendiert und in 70 µl-Proben auf TYC<sub>StrNeoTet</sub>-Platten plattiert, die mit IPTG und X-Gal vorbehandelt worden waren. Nach 3tägiger Inkubation bei 30°C wurden Einzelkolonien parallel auf TYC<sub>StrNeoTet</sub> und Schwärmlplatten (2.4.2.) gepickt und erneut für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

### 3.16.2. Sequenzierung von Insertions-Mutanten

Aus immotilen Insertions-Mutanten wurde chromosomal DNA (3.2.2.) präpariert. Die DNA wurde mit geeigneten Enzymen verdaut, mit dem *QIAEX II gel extraction kit* (Qiagen) gereinigt und mit dem Vektor pUCBM20 ligiert. Die mit dem Ligationsansatz transformierten *E. coli* DH10B wurden auf LB<sub>Kan</sub> (2.4.2.) plattiert. Hierbei wurde auf Kolonien selektiert, die Vektor-DNA mit einer intakten Kanamycin-Kassette und

flankierenden Sequenzen des *S. meliloti*-Genoms, in welche die Kassette integriert worden war, enthielten. Aus kanamycinresistenten Zellen wurde die Plasmid-DNA mittels des *Nucleo Spin Plasmids Kit* (Macherey Nagel) isoliert, durch einen Testverdau auf das Vorhandensein von nur einem Insert analysiert und das Insert anschließend sequenziert (3.6.).

### **3.17. Fluoreszenzmikroskopie**

Mit EGFP-fusioniertes Rem-Protein wurde vom Plasmid pRU2908 in trans im *rem*-Deletionsstamm exprimiert. Zur Anzucht wurden Bromfield-Platten (2.4.2.) mit 10 ml RB-Medium (2.4.2.) überschichtet und mit 200 – 500 µl *S. meliloti*-Zellen der stationären Phase angeimpft und 15 h bei 30°C inkubiert. Zur korrekten Faltung des EGFP wurden die Zellen weitere 4 – 8 h bei 16°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf einem Kunststoff-Objekträger fixiert, der zentral eine 1,5 x 1,5 cm Aussparung aufwies. Darüber wurde ein Deckgläschen mit 10 µl Bakteriensuspension und einem Agaroseblöckchen (1 %) befestigt. Die Lokalisierung der EGFP-Fluoreszenz in der Zelle erfolgte an einem LSM 510-Meta konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) mit einem 100 x PlanApochromat Objektiv (N. A. = 1.4). Die Fluoreszenz-Signale von EGFP wurden nach Anregung durch einen Argon-Laser (Wellenlänge: 488 nm) mit der Emissionswellenlänge 507 nm detektiert. Dabei wurde ein 505 – 550 nm Emissionsfilter verwendet. Die Bearbeitung der entstandenen Bilder erfolgte mittels LSM-5 *Image Browser*-Software von Zeiss.

### **3.18. Analyse des Schwärmverhaltens motiler *S. meliloti*-Zellen**

Motilität und chemotaktisches Potential von *S. meliloti* Wildtyp und diverser Mutanten wurden auf Bromfield-Schwärmlplatten (2.4.2.) getestet. Dazu wurden 3 µl einer TYC-Kultur stationärer *S. meliloti*-Zellen punktförmig auf eine Bromfield-Schwärmlplatte aufgetragen und nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C der Durchmesser des Schwärmlring ausgemessen. Die ermittelten Schwärmlring-Durchmesser wurden (abzüglich 5 mm

Animpfpunkt) in Relation zum Wildtyp gesetzt, der identisch mit den zu messenden Mutanten aufgetragen worden war.

### **3.19. Analyse der Schwimmgeschwindigkeit von motilen *S. meliloti*-Zellen**

Zur Bestimmung der Schwimmgeschwindigkeit von motilen Zellen wurden Bromfield-Agarplatten (2.4.2.) mit 10 ml RB-Minimalmedium (2.4.2.) überschichtet. Diese wurden mit 20 und 50 µl einer stationär gewachsenen *S. meliloti*-Kultur angeimpft und ÜN bis zur OD<sub>600</sub> von 0,1 bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden am nächsten Tag 1h an eine konstante RT von 22°C adaptiert und anschließend mikroskopisch (Standard 14 Phasenkontrast Mikroskop, Zeiss) auf Motilität untersucht. Die Schwimmgeschwindigkeit der im Medium frei beweglichen Zellen wurde mit Hilfe des computergestützten *Hobson Bactracker Systems* (*Hobson Tracking Systems Ltd.*, GB) gemessen. Zur Charakterisierung der Chemokineseeigenschaften wurden die Zellen mit 10 mM Prolin stimuliert und gleichfalls die Schwimmgeschwindigkeit bestimmt. Von jedem Stamm wurden fünf unabhängige Proben an fünf verschiedenen Tagen untersucht. Jede Probe wurde fünfmal vermessen, wobei jedes Ergebnis 200 Einzelpuren berücksichtigte und mittelte. Die Mittelwerte der fünf Messungen ergaben den Wert einer Probe. Für die Charakterisierung von Schwimmgeschwindigkeit und Chemokinese wurden die Mittelwerte der fünf Proben verwendet.

## 4. Ergebnisse

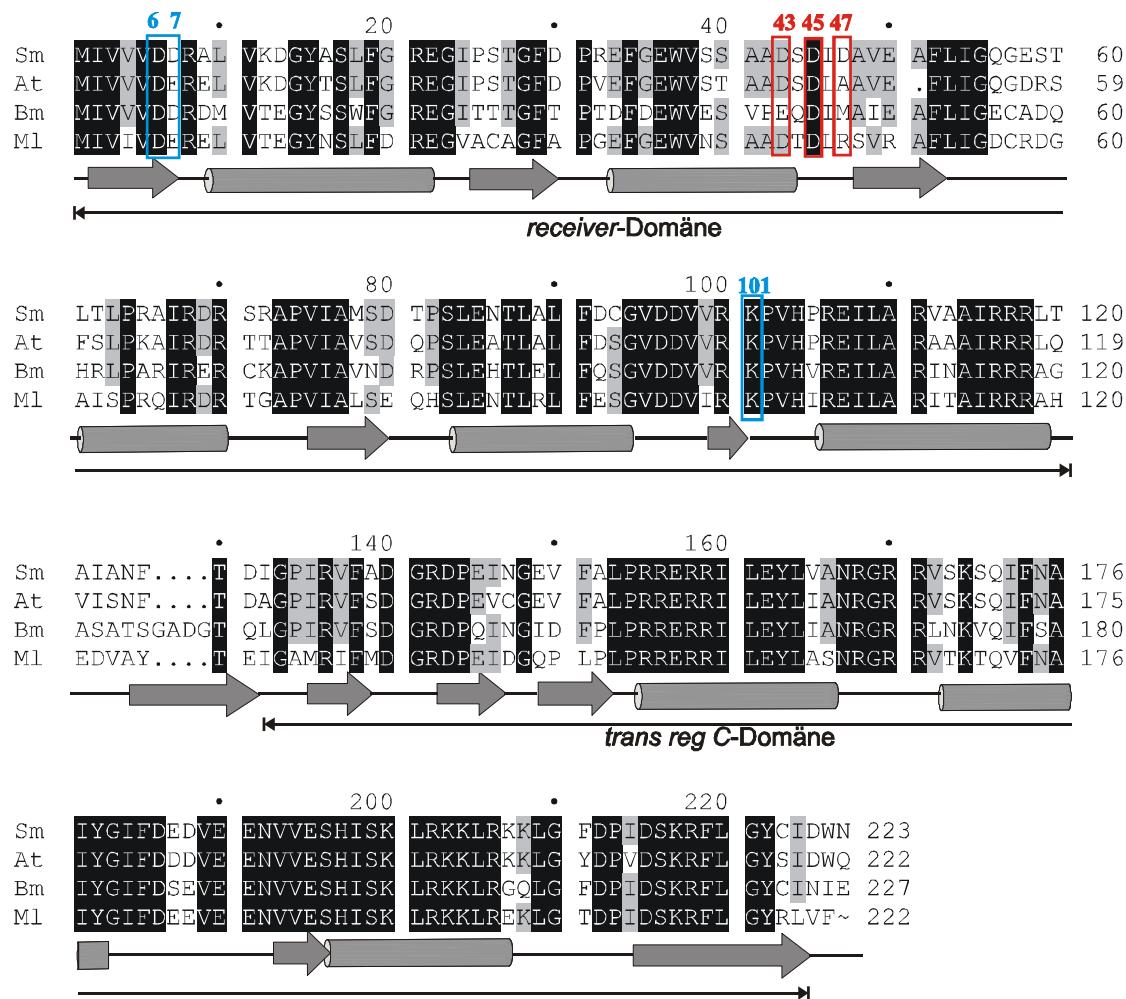
### 4.1. Die Rolle von Rem in der Hierarchiekaskade der Gen-expression des *flagellar regulon*

Das 669 bp lange *rem*-Gen (*regulator of exponential growth motility*) ist als autonome Transkriptionseinheit zwischen *fliK* und *flgE* im *flagellar regulon* lokalisiert (Genkarte des *flagellar regulon* im Anhang A1). Es codiert für ein 223 AS-Reste langes Protein, das Motilität und Flagellensynthese positiv kontrolliert (Mühlbacher, 2000). Rem wird ausschließlich in der exponentiellen Wachstumsphase transkribiert, seine Expression korreliert daher mit der auf diese Phase begrenzten Schwimmfähigkeit von *S. meliloti*-Zellen (Rotter, 2001). Die Transkription von *rem* wird von den globalen Regulatoren VisN und VisR positiv kontrolliert; gleichzeitig übt Rem eine Autoregulation auf die eigene Synthese aus. Die Einordnung in die hierarchische Genkaskade zwischen Klasse I- und Klasse II-Genen (Abb. 7) soll hier u. a. durch DNA-Bindestudien belegt werden. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob die auf die exponentielle Wachstumsphase begrenzte Aktivität von Rem durch spezifische transkriptionelle und posttranskriptionale Regulation kontrolliert wird.

#### 4.1.1. Computergestützte Sekundärstrukturanalyse

Orthologe von Rem wurden durch Datenbankanalysen bei drei weiteren Mitgliedern der  $\alpha$ -Proteobakterien, nämlich *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella melitensis* und *Mesorhizobium loti*, identifiziert. Auffällig ist die hohe Sequenzidentität dieser Proteine von 74 % (*A. tumefaciens*), 77 % (*B. melitensis*) und 60 % (*M. loti*) mit dem *S. meliloti*-Protein, was auf eine gemeinsame Evolution und analoge Funktion hindeutet. Ein Sequenzvergleich der vier orthologen Proteine ist in Abb. 10 dargestellt. Die errechnete Sekundärstruktur von Rem aus 23 % Faltblatt-, 38 % helikaler Struktur und 39 % *random coil* (PSIPRED V2.3) ist zusätzlich eingezeichnet. Ein Hydropathie-Plot (Kyte & Doolittle, 1982) offenbarte keine transmembranen Bereiche. Da auch keine N-terminale

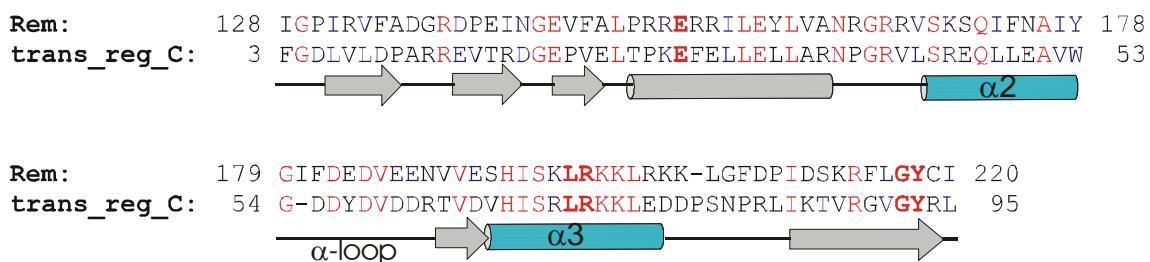
Signalsequenz für eine Sekretion ins Periplasma identifiziert wurde, konnte Rem als cytoplasmatisch lokalisiertes Protein eingeordnet werden.



**Abb. 10.** Vergleich der abgeleiteten Primärstrukturen des Rem-Proteins von *S. meliloti* (Sm), *Agrobacterium tumefaciens* (At), *Brucella melitensis* (Bm) und *Mesorhizobium loti* (Ml). Grau bzw. schwarz hinterlegt: Sequenzidentitäten zwischen drei bzw. vier Sequenzen.; rot: potentiell phosphorylierbare Aspartyl-Reste; blau: für Aktivierung und Phosphorylierung von Responsregulatoren essentielle AS-Reste. Die Numerierung bezieht sich auf die AS-Reste des *S. meliloti* Rem-Proteins. Prognostizierte Sekundärstruktur unten (PSIPRED V2.3): Zylinder:  $\alpha$ -Helices, Pfeile:  $\beta$ -Faltblätter, Linien: random coil-Bereiche. Receiver- und trans reg C-Domäne sind angegeben;

Mittels der Pfam-Datenbank (*Protein families database of alignments*) wurde das Rem-Protein auf auffällige Motive untersucht. Zwei klassische Motive von Responsregulatoren, die zusammen mit spezifischen Histidinkinasen Bestandteile von bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen sind, wurden dabei entdeckt. Der N-terminale

Bereich (Position 1 - 120) von Rem entspricht einer *receiver*-Domäne, auf die durch Phosphorylierung Signale von der korrespondierenden Histidinkinase übertragen werden können. Hochkonservierte Aspartyl- und Lysylreste dieser Domäne (Lukat *et al.*, 1991) sind in Abb. 10 farbig hervorgehoben. Die theoretische Sekundärstruktur von fünf alternierenden  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices entspricht der typischen Struktur der Signaldomäne bei Responsregulatoren (Volz, 1995). Der C-terminale Bereich (Position 128 - 220) zeigt signifikante Ähnlichkeit zum *trans-reg-C*-Motiv (*transcriptional regulatory protein, C-terminal*; Abb. 11). Diese DNA-bindende Domäne bildet häufig die Effektor domäne von Responsregulatoren.

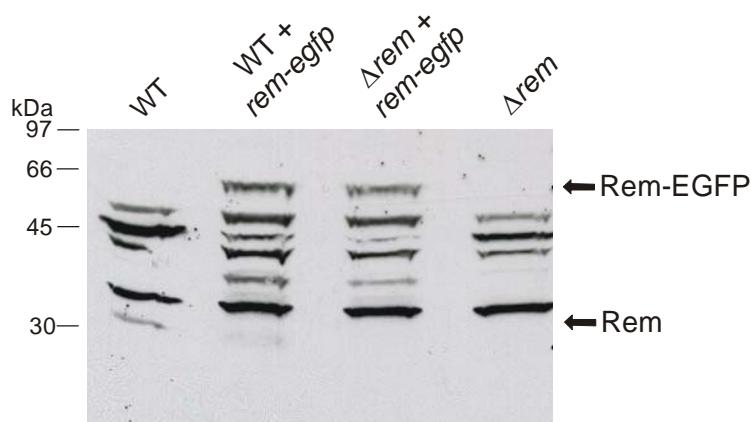


**Abb. 11.** Vergleich der abgeleiteten Peptidsequenz von Rem und der Konsensussequenz des *trans-reg-C*-Motivs (*transcriptional regulatory protein, C-terminal*; Bateman *et al.*, 2000). Rot: identische AS-Reste; blau: ähnliche AS-Reste; Fettdruck: hoch konservierte AS-Reste. Sekundärstruktur: Zylinder:  $\alpha$ -Helices; Pfeile:  $\beta$ -Faltblätter; Linien: *random coil*; blau: potentielles *helix-turn-helix*-Motiv;  $\alpha$ 2: *positioning*-Helix;  $\alpha$ 3: -Helix (Martinez-Hackert & Stock, 1997).

Mittels der Pfam-Datenbank wurde Rem der OmpR-Familie von Responsregulatoren zugeordnet. Eine C-terminale Sekundärstruktur aus drei zentralen  $\alpha$ -Helices, umgeben von  $\beta$ -Faltblättern, ist für diese Proteinfamilie charakteristisch. Den DNA-bindenden Bereich bildet das *helix-turn-helix*-Motiv aus Helix 2 (*positioning helix*), die über eine ungewöhnlich lange Schleife ( $\alpha$ -loop) mit Helix 3 (*recognition helix*) verbunden ist (Martinez-Hackert & Stock, 1997). Anhand dieser computergestützten Daten wurde eine Funktion von Rem als Transkriptionsfaktor vermutet, der durch Phosphorylierung aktiviert wird.

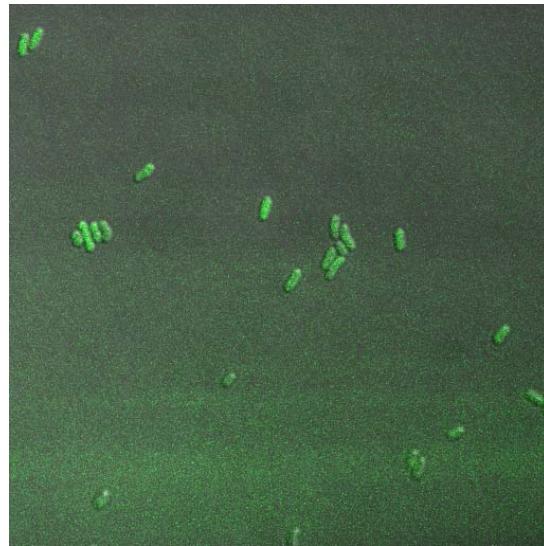
#### 4.1.2. Lokalisierung von Rem

Die postulierte Lokalisation von Rem im Cytoplasma (4.1.1.) wurde mittels Fluoreszenzanalyse überprüft. Das *rem*-Gen wurde am 3'-Ende mit dem *egfp*-Gen fusioniert und in den Überexpressionsvektor pBBR1MCS2 (2.1.) kloniert. Die *in vivo*-Stabilität des Hybrid-Proteins Rem-EGFP wurde durch *Western blot* mit anti-Rem-Antikörper überprüft. Abb. 12 zeigt das Ergebnis der Western-Analyse. Extrakte von RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) mit und ohne *rem-egfp*-Fusionkonstrukt wurden verglichen. Das Fusionprotein aus Rem (25 kDa) und EGFP (27 kDa) besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 52 kDa. Eine Bande im erwarteten Bereich von 52 kDa konnte nur in den Stämmen detektiert werden, die das *rem-egfp*-Fusionkonstrukt enthielten (Abb. 12). Das Rem-Protein blieb folglich *in vivo* stabil mit EGFP fusioniert, freies Rem trat nur als Produkt des Wildtyp-Gens auf.



**Abb. 12.** *Western blot* zum Nachweis des Rem-EGFP-Fusionsproteins. Extrakte von jeweils 1 ml Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3 wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und immunchemisch detektiert (3.14.). Polyklonaler anti-Rem-Antikörper wurde 1 : 100 verdünnt. Stämme (von links nach rechts): RU11/001, RU11/001(pRU2908), RU11/555(pRU2908), RU11/555.

Die Lokalisierung von Rem-EGFP wurde ferner im konfokalen *laser scanning*-Mikroskop in RU11/555 ( $\Delta rem$ ) und RU11/001 (WT) untersucht (3.17.). Abb. 13 zeigt exemplarisch den Nachweis von Rem-EGFP im *rem*-Deletionsstamm. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Fluoreszenz gleichmäßig in den *S. meliloti*-Zellen verteilt ist. Eine bevorzugte polare oder membranständige Lokalisation von Rem-EGFP konnte nicht festgestellt werden. Erwartungsgemäß ist das Regulatorprotein Rem im ganzen Cytoplasma verteilt.

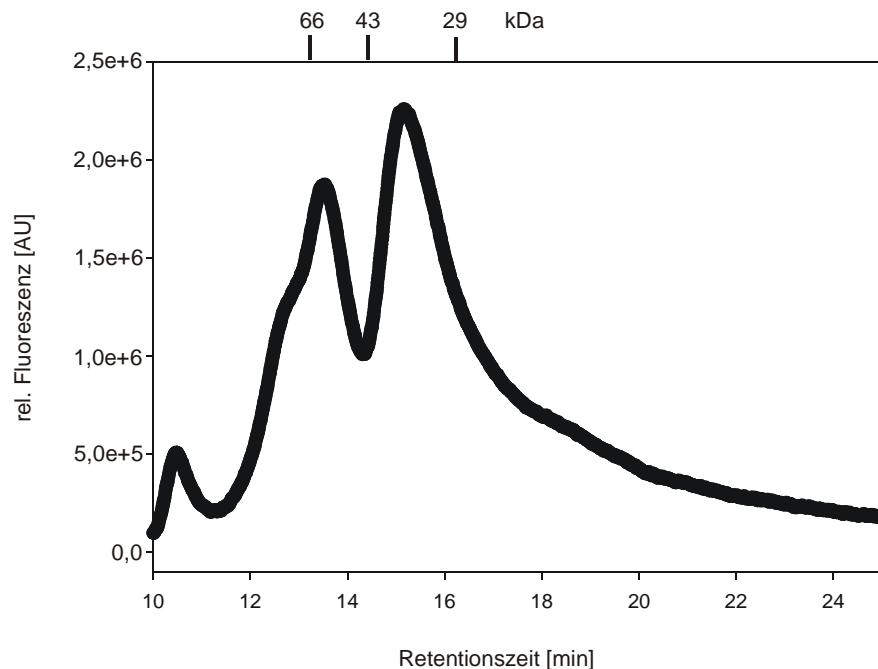


**Abb. 13.** Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Rem-EGFP in *S. meliloti* RU11/555 ( $\Delta rem$ ), komplementiert mit *rem-egfp* (exprimiert vom Plasmid pRU2908). Das repräsentative Fluoreszenzbild wurde an einem Zeiss LSM 510 konfokalen *LaserScanning* Mikroskop aufgenommen (Vergrößerung 100-fach).

#### 4.1.3. Oligomerisiert das Rem-Protein ?

Es ist bekannt, daß Vertreter der OmpR-Familie, zu der auch Rem zählt, als Dimer an eine spezifische Bindestelle in der DNA binden (Harlocker *et al.*, 1995). Auch für zahlreiche andere regulatorische Proteine trifft eine DNA-Bindung in oligomerer Form zu, besonders da, wo es sich um symmetrische Sequenzen - wie Palindrome - handelt. Folglich wurde eine mögliche Oligomerisierung des Rem-Proteins in Lösung durch analytische Gelfiltration (durchgeführt von Dr. M. Haslbeck, TU-München) bestimmt. Rem-Protein in Dialysepuffer B (2.5.10.1.) wurde in einer Endkonzentration von 0,31 mg/ml über eine Biosep 2000 Säule geschickt und das Elutionsprofil durch Fluoreszenzemission bei 300 nm detektiert. In Abb. 14 ist das Elutionsprofil des Rem-Proteins dargestellt. Rem eluierte in zwei Hauptfraktionen mit Retentionszeiten von 13,5 min entsprechend einer Molekularmasse von 60.000 und 15,5 min entsprechend einer Molekularmasse von 32.000. Die theoretische Molekularmasse von Rem entspricht 25.000, folglich spiegeln die Gelfiltrationsdaten ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht des Rem-Proteins in Lösung wieder. Dieses Gleichgewicht kann sich durch DNA-Bindung weiter zum Dimeren

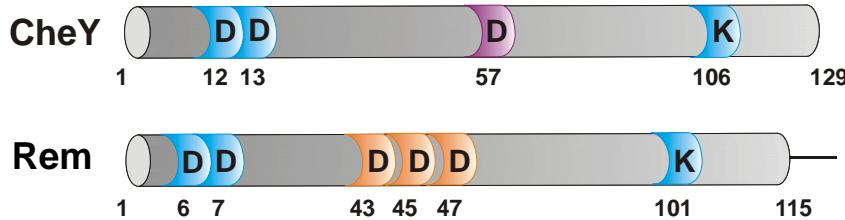
verschieben, könnte aber auch als Hinweis auf unterschiedliche regulatorische Funktionen von Monomer und Dimer interpretiert werden.



**Abb. 14.** Elutionsprofil von rekombinantem Rem nach Gelfiltrationschromatographie. Oben angegeben: Größe der Kalibrierungsproteine, 66 kDa, Rinderserum-Albumin; 43 kDa, Ovalbumin; 29 kDa, Chymotrypsin.

#### 4.1.4. Analyse der potentiellen *receiver*-Domäne von Rem

Der N-terminale Bereich von Rem weist starke Analogien zur *receiver*-Domäne von Responsregulatoren auf. Bestimmte konservierte Aspartyl- und Lysyl-Reste sind für diese Funktion maßgebend. Sie sind in Abb. 15 im Vergleich zu CheY von *E. coli* hervorgehoben. Die Aspartyl-Reste an den Positionen 12, 13 und 57 von CheY bilden zusammen eine saure Bindungstasche, in der Asp<sup>57</sup> phosphoryliert und dadurch CheY aktiviert wird. Mutation jedes dieser Reste resultiert im Funktionsverlust von CheY (Lukat *et al.*, 1991; Stock *et al.*, 1995).



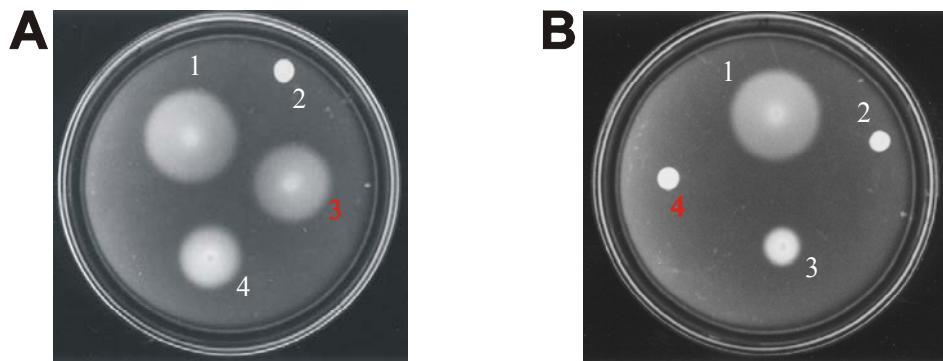
**Abb. 15.** Schematischer Vergleich des Responsregulators CheY (*E. coli*) mit der N-terminalen Domäne von Rem (*S. meliloti*). AS-Reste im Einbuchstabencode mit Positionen. Der phosphatakzeptierende Asp<sup>57</sup>-Rest von CheY ist lila gekennzeichnet, mögliche analoge AS-Reste von Rem sind orange markiert. Blau markierte Positionen repräsentieren für die Aktivierung des Responregulators essentielle AS-Reste.

In der N-terminalen Domäne von Rem wurden analoge Reste identifiziert, allerdings hatten *in vitro*-Experimente mit [<sup>32</sup>P]-Phosphoamidat keinen Hinweis auf eine Phosphorylierung eines dieser AS-Reste des Rem-Proteins gegeben (Rotter, 2001). Deshalb wurde ihre mögliche Rolle im Protein durch gezielte Mutagenese analysiert.

#### 4.1.4.1. Phänotypische Charakterisierung von aspartyl-substituierten *rem*-Mutanten

In Vorarbeiten war gezeigt worden, daß durch die Mutation eines der Aspartyl-Reste an Position 43, 45 oder 47 - im Gegensatz zum vollständigen Funktionsverlust typischer Responsregulatoren wie CheY, OmpR oder FixJ - nur eine teilweise Inaktivierung von Rem erzielt wurde (Mühlbacher, 2000; Rotter, 2001). Der Austausch von Asp<sup>45</sup> gegen Asn resultierte in einem 50 %igem Funktionsverlust von Rem (Abb. 16A), durch eine zusätzliche Asp<sup>47</sup>-Asn-Substitution wurde die Funktionalität von Rem um weitere 20 % reduziert (Abb. 16B; Rotter 2001). Hier wurde durch Substitution aller drei Aspartyl-Reste, Asp<sup>43</sup>, Asp<sup>45</sup> und Asp<sup>47</sup>, überprüft, ob ein weiterer Funktionsverlust von Rem eintritt. Zusätzlich war die Auswirkung des Austauschs von Asp<sup>7</sup> gegen Lysin zu untersuchen, weil eine entsprechende Substitution bei CheY (*E. coli*; D13K) in einem Dauerzustand des Responsregulators resultierte (Bourret *et al.*, 1990). Die entsprechenden Substituenten wurden über PCR-Mutagenese (3.5.2.1.) in das *rem*-Gen eingeführt. Über Konjugation und homologe Rekombination wurden die mutierten Sequenzen in den *S. meliloti*-Wildtyp überführt (3.7.1.) und nach Selektion auf ein homologes Rekombinationsereignis durch Sequenzierung verifiziert. Da Rem die Gene für Motilität, Flagellensynthese und Chemotaxis kontrolliert, kann der Einfluß der AS-Substitutionen

auf die Funktionalität von Rem durch Schwärmanalysen untersucht werden. Reduzierte Aktivität des Rem-Proteins sollte zu vergleichsweise kleineren Schwärmringen führen.



**Abb. 16.** Schwärmanalyse von *rem*-Mutantenstämmen. Es wurden jeweils 3 µl einer stationären *S. meliloti* TYC-Flüssigkultur auf Bromfield-Platten (2.4.2.) aufgetragen. Rote Farbcodierung kennzeichnet neu konstruierte Stämme. **A.** 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta rem$ ); 3; RU13/225 (*remD7K*); 4, RU13/007 (*remD45N*); **B.** 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta rem$ ); 3, RU13/009 (*remD45N/D47N*); 4, RU13/224 (*rem D43N/D45N/D47N*).

Der Austausch von drei Aspartyl-Resten an den Positionen 43, 45 und 47 gegen Asparagin resultierte in einem vollständigen Funktionsverlust von Rem, wie in Abb. 16 B erkennbar. Die dreifach substituierte *rem*-Mutante RU13/224 ist völlig immotil, vergleichbar mit einer *rem*-Deletionsmutante. Dagegen zeigt die Mutante RU13/225 (*remD7K*) einen geringen Effekt im Schwärmerhalten (Abb. 16 A). Eine abnorme Funktion des Rem-Proteins hätte sich vorraussichtlich in einem abweichenden Schwärmringdurchmesser bemerkbar gemacht. Die relativen Schwärmringdurchmesser der aspartyl-substituierten *rem*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sind in Tabelle 5 quantifiziert wiedergegeben. Trotz der ähnlichen Primärsequenzen der N-terminalen Domäne von Rem und der *receiver*-Domäne von Responsregulatoren, leisten die konservierten Aspartyl-Reste zur Aktivität des Rem-Proteins nur Teilbeiträge: keiner dieser Reste führt durch seine Phosphorylierung zur Aktivierung (Rotter, 2001) und die Reste Asp<sup>43</sup>, Asp<sup>45</sup> und Asp<sup>47</sup> sind nur synergistisch für die Funktionalität von Rem verantwortlich.

**Tab. 5.** Relative Schwärmfähigkeit von AS-substituierten *rem*-Mutantenstämmen (s. Abb. 16)

Stamm	Mutation	Relativer Schwärtringdurchmesser (% WT)
RU11/001	Wildtyp	100
RU13/007	<i>remD45N</i>	50
RU13/009	<i>remD45N/D47N</i>	29
RU13/224 <sup>1)</sup>	<i>remD43N/D45N/D47N</i>	0
RU13/225	<i>remD7K</i>	83

<sup>1)</sup> Rote Farbcodierung kennzeichnet neu konstruierte *rem*-Mutanten.

#### 4.1.4.2. Einfluß von aspartyl-substituierten Mutantenproteinen auf die Expression repräsentativer Gene des *flagellar regulon*

Rem ist ein globaler Regulator der Expression von Klasse II- und Klasse III-Genen des *flagellar regulon*, denn in einer *rem*-Deletionsmutante werden Gene dieser untergeordneten Hierarchieklassen gar nicht oder nur schwach exprimiert (Tab. 6; Abb. 17). Deswegen wurden die Effekte der aspartyl-substituierten Mutantenproteine auf die Expression repräsentativer Gene des *flagellar regulon* quantifiziert. Außerdem wurde die Stabilität der mutierten Rem-Proteine analysiert. Die prozentualen Promotoraktivitäten der untersuchten Gene sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Die Transkription des Klasse II-Gens *flgB* war in RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) partiell reduziert. Auch die Klasse III-Gene *flaA* und *icpA* wurden in den beiden *rem*-Mutantenstämmen mit verringriger Intensität transkribiert. Eine drastische Reduktion aller drei Promotoraktivitäten wurde in RU13/224 (*remD43N/D45N/D47N*) beobachtet. In dieser *rem*-Mutante wurde von allen drei Promotoren, *PflgB*, *PflaA* und *PicpA* - ähnlich zur *rem*-Deletion - nur noch mit 10 – 20 % des WT-Niveaus transkribiert. Interessanterweise wurde in der *rem*-Deletion eine leicht erhöhte Aktivität des *rem*-Promotors gemessen. Diese erhöhte Expression von Rem wurde durch die einfache (*remD45N*) und doppelte (*remD45N/D47N*) Substitution deutlich verstärkt. In der dreifach substituierten (*remD43N/D45N/D47N*) *rem*-Mutante wurde das *rem*-Gen im Vergleich zum Wildtyp sogar mit doppelter Intensität transkribiert.

**Tab.6.** Relative Promotoraktivitäten in RU13/007 (*remD45N*), RU13/009 (*remD45N/D47N*), RU13/224 (*remD43N/D45N/D47N*) und RU11/555 ( $\Delta rem$ )

Promotor <sup>1)</sup>	Prozentuale Promotoraktivität <sup>2)</sup>			
	RU13/007 (D45N) <sup>3)</sup>	RU13/009 (D45N/D47N) <sup>3)</sup>	RU13/224 (D43N/D45N/ D47N)	RU11/555 ( $\Delta rem$ ) <sup>4)</sup>
pRU2361 <i>rem</i> (I')	158	181	203	124
pRU2273 <i>flgB</i> (II)	71	59	14	0,3
pRU2274 <i>flaA</i> (III)	66	51	19	17
pRU2250 <i>icpA</i> (III)	43	48	11	3

<sup>1)</sup> Verwendete Promotor-*lacZ* Fusionsplasmide; römische Zahlen in Klammern ordnen die Promotoren den Genklassen des *flagellar regulon* zu.

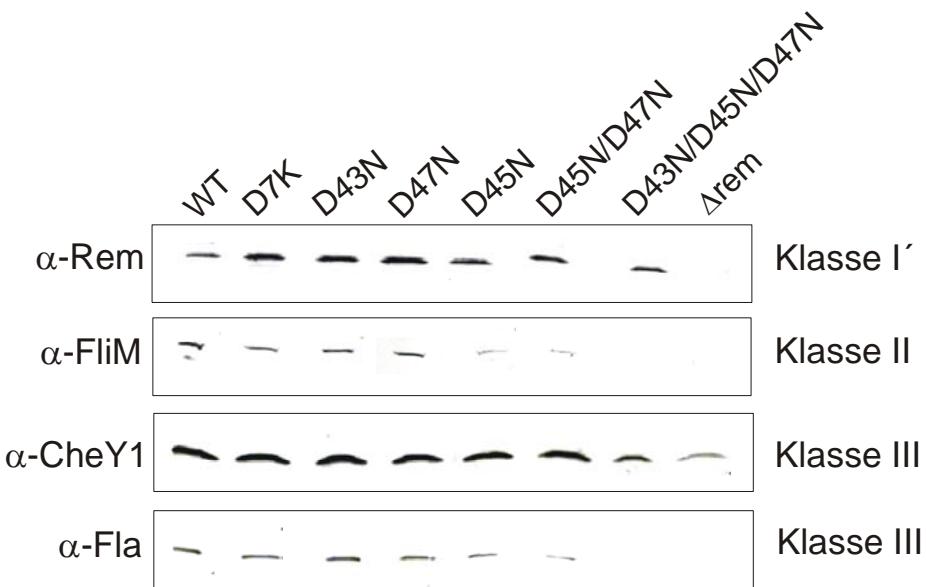
<sup>2)</sup> Prozentuales Verhältnis der Promotoraktivitäten von *rem*-Deletion bzw. -Mutante und WT; < 100 = Promotoraktivität unter WT-Niveau; >100 = Promotoraktivität über WT-Niveau. Promotoraktivitäten wurden im frühexponentiellen Wachstum von *S. meliloti* bei OD<sub>600</sub> 0,1 - 0,25 bestimmt.

<sup>3)</sup> nach Rotter, 2001.

<sup>4)</sup> nach Mühlbacher, 2000.

Neben den Promotoraktivitäten wurde auch das Expressionsniveau von vier repräsentativen Vertretern der Hierarchieklassen des *flagellar regulon*, *rem* (I'), *fliM* (II), *flaA* (III) und *icpA* (III), in aspartyl-substituierten *rem*-Mutanten mittels Western-Analysen (3.14.) bestimmt. Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, wurde in allen *rem*-Mutantenstämmen vergleichbare Mengen an Rem-Protein synthetisiert. Die Stabilität von Rem wurde auch nicht durch die parallele Substitution der drei benachbarten Aspartyl-Reste (D43N/D45N/D47N) beeinflußt. Trotz der erhöhten Promotoraktivitäten in RU13/007, RU13/009 und RU13/224 konnte keine gesteigerte Menge an Rem-Protein detektiert werden, möglicherweise Ursache einer spezifischen proteolytischen Kontrolle. In Korrelation zu den abnehmenden Klasse II-Promotoraktivitäten (Tab. 6), wurde auch eine reduzierte Expression des Klasse II-Genprodukts FliM in RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) beobachtet. In der dreifach aspartyl-substituierten *rem*-Mutante RU13/224 (*remD43N/D45N/D47N*) wurde - identisch zu RU11/555 ( $\Delta rem$ ) -

kein FliM mehr detektiert (Abb. 17). Dagegen entsprach die synthetisierte FliM-Menge in RU13/225 (*remD7K*) dem Wildtyp-Niveau.



**Abb. 17.** Western blot-Analyse von vier repräsentativen Chemotaxis-Proteinen in Extrakten von *rem*-Mutantenstämmen. Verwendet wurden polyklonale Antikörper, wie links angegeben. Verdünnung für anti-Rem- und anti-FliM-Antikörper 1 : 100, für anti-CheY1-Antikörper 1 : 1000 und für Flagellinantikörper 1 : 500. Elektrophorese und blotting von Zellextrakten aus 1 ml Zellen einer OD<sub>600</sub> von 0,3 (3.14.). Western-Analysen der Extrakte D47N, D45N und D45N/D47N nach Rotter (2001).

Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, hatten die Rem-Mutantenproteine auf die Expression des Klasse III-Genprodukts CheY1 einen deutlich schwächeren Einfluß, in RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) war die CheY1-Expression nur geringfügig reduziert. Eine deutlich geringere Menge an CheY1 wurde erst in der dreifach aspartyl-substituierten *rem*-Mutante RU13/224 (*remD43N/D45N/D47N*) detektiert. Auch in der *rem*-Deletion waren noch Spuren an CheY1 nachweisbar.

Da für die Flagellingene (Klasse III) ein Regulationsmechanismus über einen flagellenspezifischen Sigma-Faktor postuliert wird (Scharf *et al.*, 2001), wurde desweiteren der Einfluß der mutierten Rem-Proteine auf die Expression von Flagellin untersucht. Während in RU13/225 (*remD7K*) ein Wildtyp-Niveau an Flagellin nachgewiesen wurde, war in RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) die Flagellinmenge deutlich reduziert. Wie in Abb. 17 gezeigt ist, konnte in RU13/224 (*remD43N/D45N/D47N*) kein Flagellin mehr detektiert werden, was mit dem immotilen Phänotyp dieser *rem*-Mutante korreliert.

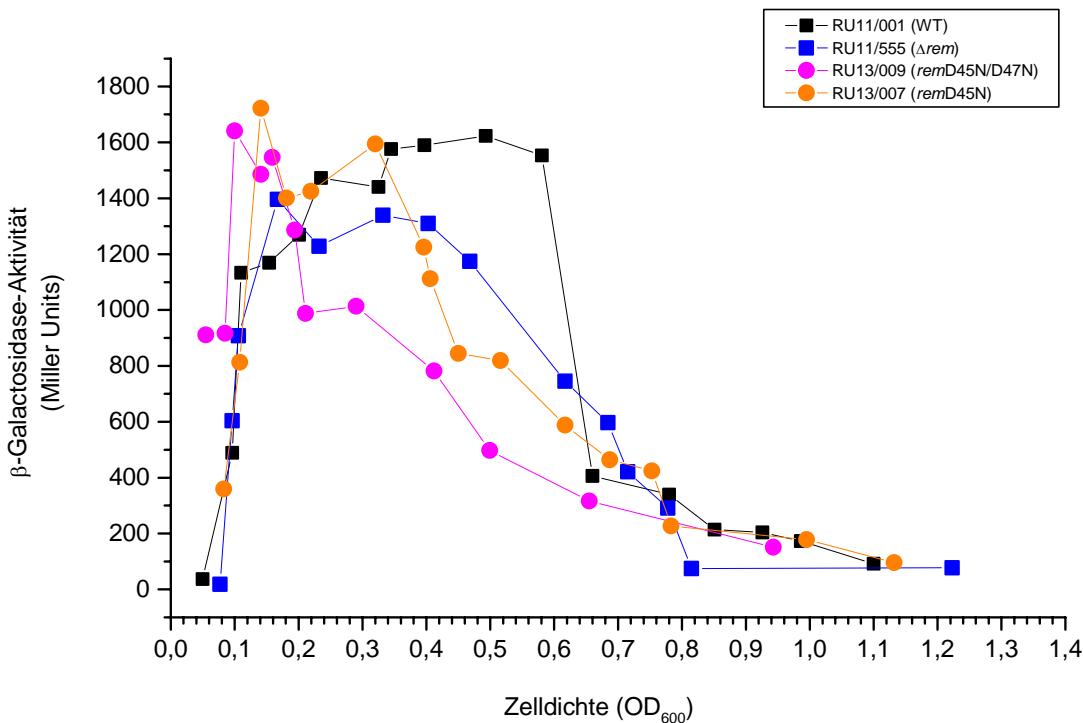
Die Ergebnisse der Tab. 6 und Abb. 17 lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- Die unterschiedlichen Auswirkungen der aspartyl-substituierten Rem-Proteine auf die Expression der Gene des *flagellar regulon* sind ausschließlich Resultat des Funktionsverlustes von Rem. Sämtliche mutierten Rem-Proteine sind in der Zelle stabil und werden auf Wildtyp-Niveau exprimiert.
- Eine vermehrte Synthese von Rem entsprechend der erhöhten Promotoraktivitäten in RU13/007 (*remD45N*), RU13/009 (*remD45N/D47N*) und RU13/224 (*remD43N/D45N/D47N*) konnte nicht festgestellt werden.
- Funktionelles Rem ist essentiell für die Expression der Klasse II-Gene.
- Die Klasse III-Gene werden vermutlich indirekt über die Klasse II-Gene durch Rem reguliert.
- Der Austausch von Asp<sup>7</sup> gegen Lysin hat keinen Einfluß auf die Funktionalität von Rem, da durch eine konstitutiv aktive Form des Rem-Proteins eine gesteigerte Synthese der Gene des *flagellar regulon* zu erwarten gewesen wäre.
- Die Substitutionen der drei benachbarten Aspartyl-Reste, Asp<sup>43</sup>, Asp<sup>45</sup> und Asp<sup>47</sup>, gegen Asparagin resultieren im vollständigen Funktionsverlust von Rem. Es ist denkbar, daß ihr Ersatz durch drei neutrale Reste zu einer Konformationsänderung führt, die mit einer Inaktivierung des Proteins einhergeht.
- Die Asp-Substitutionen beeinträchtigen die Funktionalität des Rem-Proteins zunehmend in der Reihenfolge D43N ≤ D47N ≤ D45N ≤ D45N/D47N ≤ D43N/D45N/D47N.

#### 4.1.5. Wachstumsabhängige *rem*-Promotoraktivität in RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*)

Das *rem*-Gen wird nur in der exponentiellen Wachstumsphase von *S. meliloti*, in der die Zellen motil sind, transkribiert (Rotter, 2001). Ein Vergleich der *rem*-Promotoraktivität in RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) zeigte, daß in der Mutante das Prem-Reporterkonstrukt pRU2361 (2.1.) in der frühexponentiellen Phase stärker (Tab.6; Abb. 18) und in der spätexponentiellen Wachstumsphase schwächer transkribiert wird (Abb. 18). Daraus läßt sich eine Autoregulation von Rem auf die *rem*-Transkription ableiten. In den aspartyl-substituierten *rem*-Mutanten RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) wurde ein partieller Funktionsverlust des Rem-Proteins und damit eine

deutlich verringerte Expression der hierarchisch untergeordneten Genklassen des *flagellar regulon* beobachtet (Tab. 6; Rotter, 2001). Deshalb wurde die Aktivität des *rem*-Promotors in RU13/007 und RU13/009 im Verlauf des Bakterienwachstums über 62 h bestimmt.



**Abb. 18.** Reportergen-Analyse der *rem*-Promotoraktivitäten in Wildtyp und drei *rem*-Mutanten (s. Legende) als Funktion der Zelldichte. Ordinate: *rem*-Transkription in *Miller Units* (3.9.); Abszisse: Optische Dichte der Bakterienkulturen bei 600 nm im Verlauf des Wachstums. Rote und orange Symbole kennzeichnen hier neu etablierte Kurven, schwarze und blaue Symbole repräsentieren Kinetiken nach Rotter (2001).

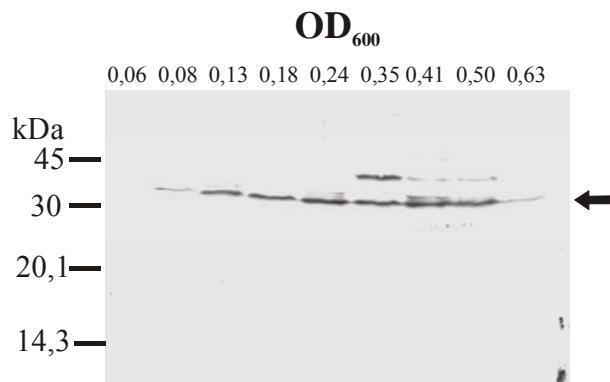
Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, stieg die Aktivität des *rem*-Promotors in RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) gleich zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase rapide an. In RU13/009 wurde bei einer OD<sub>600</sub> 0,1, in RU13/007 bei einer OD<sub>600</sub> 0,15 maximale Promotoraktivität erreicht. Mit einem Maximalwert von 1700 *Miller Units* lag die *rem*-Promotoraktivität in beiden *rem*-Mutanten anfangs um 40 % über der des WT (RU11/001). Wie aus Abb. 18 zu entnehmen, fielen die Promotoraktivitäten in den Mutanten RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) danach rapide ab und lagen bei OD<sub>600</sub> 0,5 nur noch bei 50% (*remD45N*) bzw. 30% (*remD45N/D47N*) des WT. Dieser Trend setzte sich anschließend

verlangsamt fort und zu Beginn der spätexponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,7$ ) war die *rem*-Promotoraktivität in allen untersuchten Stämmen auf etwa 100 *Miller Units* abgesunken; mit Erreichen der stationären Phase wurde in keinem Stamm *rem*-Promotoraktivität gemessen. Durch die aspartly-substituierten Mutantenproteine RemD45N und RemD45N/D47N wird also nicht nur die Transkription der Klasse II- und Klasse III-Gene des *flagellar regulon*, sondern auch die Autoregulation der *rem*-Transkription beeinflusst. Eine mögliche Interpretation der zunächst überschießenden und dann stark abfallenden *rem*-Transkription in den Punktmutanten wird unter 5.2. diskutiert.

#### 4.1.6. Proteinstabilität im Verlauf des Bakterienwachstums

##### 4.1.6.1. Stabilität von Rem

Durch Analyse der *rem*-Promotoraktivität während des Bakterienwachstums wurde gezeigt, daß das *rem*-Gen nur in der exponentiellen Wachstumsphase von *S. meliloti* transkribiert wird (Abb. 18). Als Nächstes stellte sich die Frage nach der *in vivo*-Stabilität des Rem-Proteins in der Zelle. Flagellin wurde in der stationären Wachstumsphase noch bei einer  $OD_{600}$  von 1,1 im WT detektiert, obwohl seine Synthese mit der exponentiellen Phase abbricht (Rotter, 2001). Ist das Regulatorprotein Rem ähnlich stabil oder wird es rasch abgebaut? In 2 h-Intervallen wurden jeweils  $4,7 \times 10^8$  Zellen für Western-Analysen entnommen, extrahiert und aufgetragen (3.14.). Das Ergebnis nach Detektion mit anti-Rem-Antikörper zeigt Abb. 19. Aus dieser Meßreihe geht hervor, daß Rem-Protein schon bei  $OD_{600}$  0,08 in der frühexponentiellen Phase auftritt, kurz nach beginnender Transkription des *rem*-Gens (Abb. 19). In Korrelation mit der *rem*-Promotoraktivität werden maximale Mengen an Rem ab  $OD_{600}$  0,24 synthetisiert. Die Doppelbande bei  $OD_{600}$  0,35 ist sehr wahrscheinlich Resultat einer Kreuzreaktion des anti-Rem-Antikörpers mit einem Protein, das ebenfalls nur zu einem bestimmten Zeitfenster des Bakterienwachstums exprimiert wird. Bereits bei  $OD_{600}$  0,63 - direkt nach beendeter Transkription – sind nur noch Spuren von Rem zu erkennen.



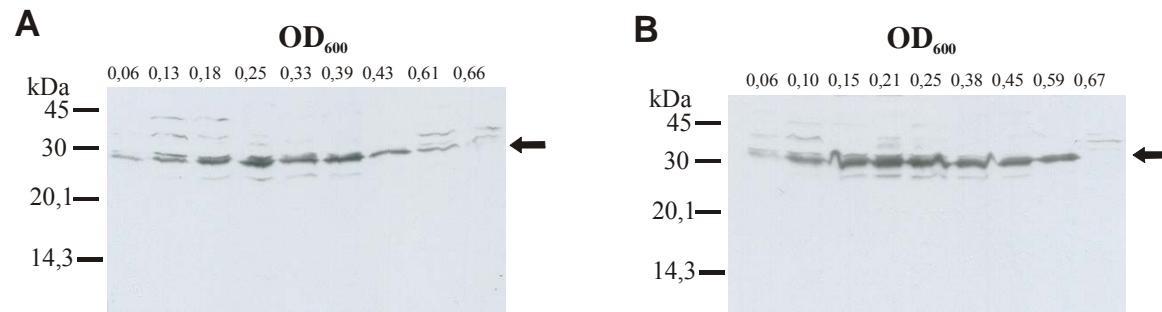
**Abb. 19.** Western blot zur Bestimmung der Proteinstabilität von Rem im Verlauf des Wachstum von Wildtyp-Zellen. Polyklonaler anti-Rem-AK wurde in der Verdünnung 1 : 100 eingesetzt. Extrakte von jeweils  $4,7 \times 10^8$  Zellen, die in 2 h-Intervallen aus einer Flüssigkultur motil angezogener Zellen entnommen wurden, wurden nach standardisierter Vorschrift analysiert (3.14.). Die korrespondierenden optischen Dichten ( $OD_{600}$ ) sind angegeben. Der Pfeil markiert die Rem-Bande.

Diese Beobachtung spricht dafür, daß Rem posttranslational durch schnellen proteolytischen Abbau eliminiert wird. Auf diese Weise wird das Zeitfenster für die Rem-Aktivität durch phasenabhängige Transkription und schnelle Proteolyse eingehalten.

#### 4.1.6.2. Stabilität von RemD45N und RemD45N/D47N

Die Präsenz von Rem in der Zelle korreliert also perfekt mit der Aktivität des *rem*-Promotors (Abb. 18 u. 19). Wie verhält es sich mit der Präsenz und Stabilität der Mutantenproteine RemD45N und RemD45N/D47N? Beide wurden mittels Western-Analysen analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dokumentiert. Sowohl RemD45N als auch RemD45N/D47N wurden bereits ab  $OD_{600} 0,06$ , also früher als das WT-Rem-Protein detektiert (Abb. 20 A, B). Diese frühe Expression von Rem am Beginn der exponentiellen Wachstumsphase korreliert mit der sehr hohen Aktivität des *rem*-Promotors im genetischen Hintergrund der *rem*-Mutanten (Abb. 18.) Ferner werden sowohl RemD45N als auch RemD45N/D47N bis zum spätexponentiellen Wachstum im Western blot detektiert, analog zum WT-Protein. Die mutierten Rem-Proteine sind folglich genauso stabil wie natives Rem. Die reduzierte Expression der Zielgene im *flagellar regulon* in RU13/007 (*remD45N*) und RU13/009 (*remD45N/D47N*) kann daher

plausibel durch einen Funktionsverlust des mutierten Rem-Proteins (in der Fähigkeit zur positiven Regulation) erklärt werden.



**Abb. 20.** *Western blot* zur Bestimmung der Proteininstabilität von RemD45N (**A**) und Rem D45N/D47N (**B**) im Verlauf des Wachstums. Extrakte aus *rem*-Mutantenzellen wurden wie bei Abb. 19 beschrieben analysiert.

#### 4.1.7. Wird Rem durch Phosphorylierung aktiviert ?

Responsregulatoren werden über Phosphorylierung an einem hoch konservierten Aspartyl-Rest aktiviert, dessen Substitution zum völligen Funktionsverlust führt (Stock *et al.*, 1995). Die Substitution von möglichen phosphorylierbaren Aspartyl-Resten im Rem-Protein blockierte dessen Funktionalität allerdings nur partiell (Rotter, 2001). Erst der Austausch von drei benachbarten Aspartyl-Resten, Asp<sup>43</sup>, Asp<sup>45</sup> und Asp<sup>47</sup>, resultierte in einem vollständigen Funktionsverlust von Rem (4.1.4.), ohne dabei die Stabilität des Proteins zu verändern (4.1.6.). Durch Phosphorylierung von nativem Rem, RemD45N und RemD45N/D47N *in vitro* sollte überprüft werden, ob dessen Aktivierung durch Phosphorylierung erfolgt und, wenn ja, ob das Zusammenspiel der benachbarten Aspartyl-Reste dabei eine entscheidende Rolle spielt.

##### 4.1.7.1. Rekombinante Expression und Reinigung von Rem, RemD45N und RemD45N/D47N

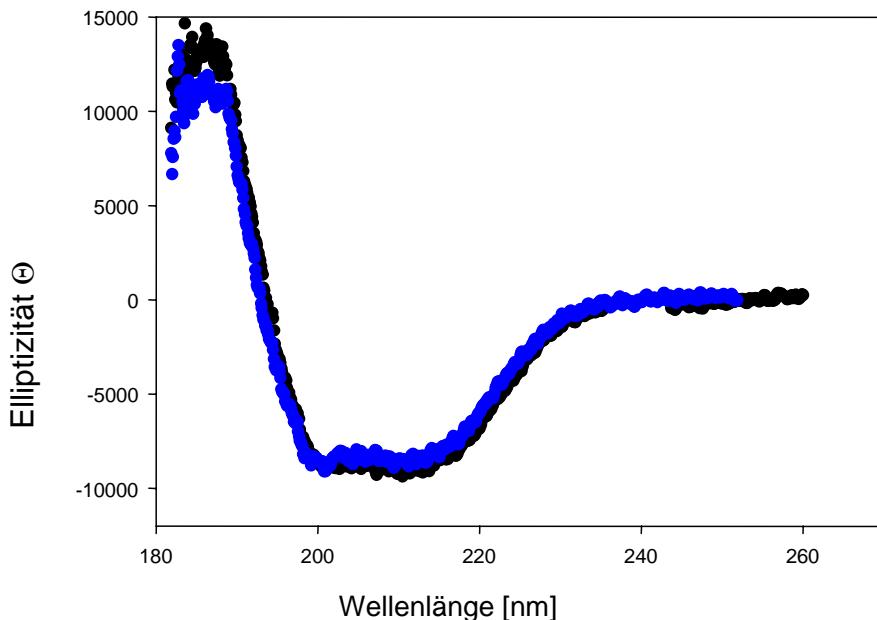
Rem-Protein und zwei Mutantenproteine wurden in *E. coli* ER2566 (2.1.) exprimiert und nach standardisierter Vorschrift über das IMPACT-System isoliert und gereinigt (3.12.1.).

Aus 2 l Bakterienkultur wurden etwa 10 mg Protein mit einer Reinheit von ~ 98 % isoliert. Die Expression von Rem und den beiden Mutantenproteinen RemD45N und RemD45N/D47N war problemlos durchzuführen und ergab gute Ausbeuten. Allerdings traten bei der Wahl eines geeigneten Aufbewahrungspuffer für Rem Probleme auf, weil das Protein in den anschließenden Dialyseversuchen präzipitierte. Hohe Salzkonzentration (500 mM) wirkte zwar stabilisierend, störte aber die Phosphorylierungsexperimente, wie Vorversuche mit dem Responsregulator CheY2 von *S. meliloti* zeigten (Rotter, 2001). Mit Dialysepuffer A mit 0,2 M Arginin (2.5.10.1.) wurde schließlich ein geeigneter Puffer gefunden, der die Stabilität von Rem gewährleistete und zugleich die Phosphorylierungsreaktion nicht beeinflußte. Gegen Dialysepuffer A dialysiertes Rem konnte in einer Amicon-Rührzelle (3 bar; Membran 10 kDa *cut-off*) bis auf 1,5 mg/ml konzentriert werden. Protein einer höheren Ausgangskonzentration konnte durch Zusatz von 50 % Glycerin in Dialysepuffer B (2.5.10.1.) in Konzentrationen bis zu 5 mg/ml stabil isoliert werden. Die Mutantenproteine RemD45N und RemD45N/D47N verhielten sich bezüglich ihrer Stabilität und Löslichkeit analog. Rekombinant exprimiertes, reines Rem-Protein wurde auch zur Gewinnung und Affinitätsreinigung des anti-Rem-Antikörpers aus Kaninchenrohserum (3.14.2.) und für DNA-Bindestudien (3.11.) eingesetzt.

#### **4.1.7.2. Überprüfung der Faltung von Rem durch CD-Spektroskopie**

Nach der Expression und Reinigung von rekombinantem Rem war es problematisch, geeignete Bedingungen zu finden, unter denen das Protein in Lösung blieb. Eine ungenügende Faltung des Rem-Proteins als Ursache für diese Instabilität sollte durch CD-Spektroskopie ausgeschlossen werden. Die spektroskopische Analyse der Sekundärstrukturzusammensetzung des Rem-Proteins wurde von Dr. M. Haslbeck (TU München) durchgeführt. Über das IMPACT-System gereinigtes Rem-Protein wurde gegen Dialysepuffer C (2.5.10.1.) dialysiert. Der Tris-Puffer wurde gegen Kaliumphosphatpuffer ausgetauscht, da die Aminogruppen von Tris das CD-Spektrum überlagern. Zusätzlich mußte die Salz- und Glycerinkonzentration im Vergleich zu Dialysepuffer B (2.5.10.1.) deutlich reduziert werden. Da für die Aufnahme des CD-Spektrums eine Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml ausreichend war, konnte

Dialysepuffer C verwendet werden. Als Referenz wurde zusätzlich de- und wieder renaturiertes Rem-Protein (3.12.2.) in Dialysepuffer C analysiert. Das Spektrum wurde zwischen 180 nm und 270 nm mit einem CD-Spektropolarimeter mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit (Jasco, Groß-Umstadt) bei 20°C aufgenommen.



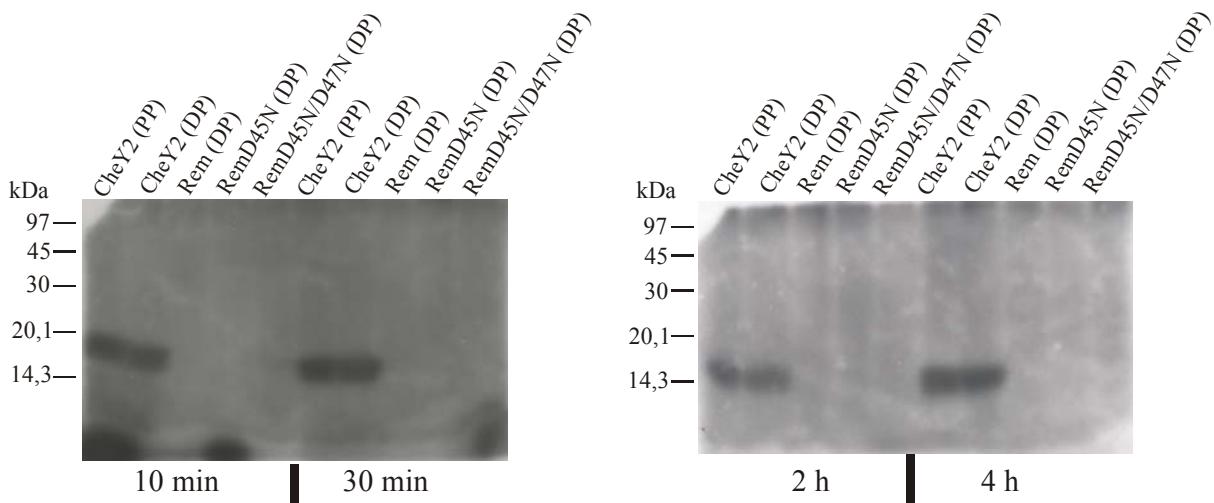
**Abb. 21.** CD-Spektrum von nativ gereingtem Rem-Protein im Vergleich zu de- und wieder renaturiertem Rem-Protein. Abszisse: Wellenlänge in nm (180 – 270); Ordinate Elliptizität  $\Theta$  = Unterschied der molaren Absorptionskoeffizienten ( $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ), ( $\epsilon_L$  = links zirkular polarisiertes Licht;  $\epsilon_R$  = rechts zirkular polarisiertes Licht). Schwarze Kurve: rekombinantes Rem-Protein; blaue Kurve: Rem-Protein nach De- und Renaturierung.

Abb. 21 zeigt die überlagerten CD-Spektren von Rem aus der IMPACT-Reinigung (schwarze Kurve) und de- und renaturiertem Rem (blaue Kurve). Da die beiden Spektren völlig kongruent waren, wurde die Faltung von rekombinantem Rem nach der IMPACT-Reinigung als nativ betrachtet. Das CD-Spektrum gab auch Hinweis auf die Sekundärstruktur des Rem-Proteins. Die anteilige Zusammensetzung von unbekannten Proteinen aus Sekundärstruktur-Elementen wird dabei durch Vergleich mit bekannten Modellproteinen berechnet. Für das Rem-Protein wurde ein Zusammensetzung aus 29 %  $\alpha$ -Helices, 36 %  $\beta$ -Faltblattstruktur und 35 % *random coil* berechnet. Diese Werte

korrelieren relativ gut mit der theoretischen Sekundärstrukturvorhersage von 38 %  $\alpha$ -Helices, 23 %  $\beta$ -Faltblattstruktur und 39 % *random coil*.

#### 4.1.7.3. Versuche zur *in vitro*-Phosphorylierung von Rem durch [ $^{32}\text{P}$ ]-Acetylphosphat

Responsregulatoren werden über eine korrespondierende Histidinkinase an einem spezifischen Aspartyl-Rest phosphoryliert. Ferner wurde eine Autophosphorylierung von Responsregulatoren durch kleine molekulare Phosphat-Donatoren wie Phosphoramidat, Carbamoylphosphat oder Acetylphosphat nachgewiesen (Lukat *et al.*, 1992; Buckler & Stock, 2000). Falls Rem überhaupt durch Phosphorylierung aktiviert wird, ist anzunehmen, daß Phosphorylierung durch kleine Phosphat-Donatoren *in vitro* möglich ist. In früheren Experimenten konnte eine Phosphorylierung durch Phosphoramidat allerdings nicht gezeigt werden (Rotter, 2001). Wegen einer bedingten Spezifität der kleinen Phosphat-Donatoren (Buckler & Stock, 2000), wurde hier geprüft, ob Rem durch Acetylphosphat zu phosphorylieren ist. Für diese Experimente wurde radioaktiv markiertes [ $^{32}\text{P}$ ]-Acetylphosphat nach der Vorschrift von McCleary & Stock (1994) synthetisiert (3.15.1.). Rekombinant exprimiertes Rem-Protein in Dialysepuffer A (2.5.10.1.) wurde zusammen mit  $\text{MgCl}_2$  und [ $^{32}\text{P}$ ]-Acetylphosphat zwischen zehn Minuten und vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Gelelektrophorese und Autoradiographie analysiert (3.15.2.). In analoger Weise wurden die rekombinant exprimierten Mutantenproteine RemD45N und RemD45N/D47N mit [ $^{32}\text{P}$ ]-Acetylphosphat behandelt. Als Positivkontrolle diente CheY2 aus *S. meliloti* in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris pH 8,5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl). Die Ergebnisse dieser Phosphorylierungsexperimente zeigt Abb. 22. Der Responsregulator CheY2 wurde sowohl in Phosphorylierungs- als auch in Dialysepuffer A von Acetylphosphat phosphoryliert. Phosphoryliertes Rem-Protein konnte auch nach vierstündiger Inkubation mit Acetylphosphat nicht detektiert werden (Abb. 22). Auch die substituierten Proteine RemD45N und RemD45N/D47N wiesen keine Modifikation mit radioaktivem Phosphat auf.



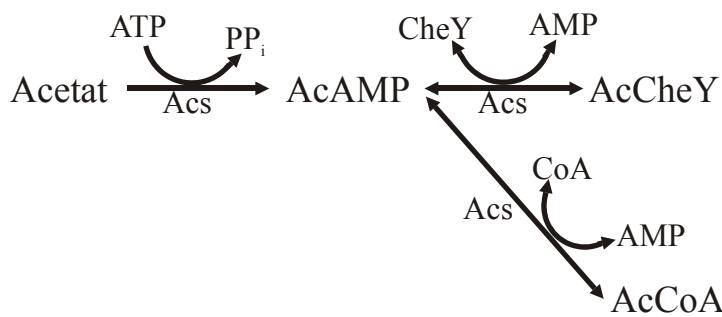
**Abb. 22.** *In vitro*-Phosphorylierungstests von rekombinanten nativen und aspartylsubstituierten Rem-Proteinen mit [ $^{32}$ P]-Acetylphosphat. Pro Spur wurden 10 µg Protein der bezeichneten Proben aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde CheY2 eingesetzt. PP = Phosphorylierungspuffer; DP = Dialysepuffer A. (2.5.10.1.). Die Inkubationszeiten der Reaktionsansätze von 10 min bis 4 h bei RT sind angegeben. Die Proben wurden elektrophoretisch über 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mittels *Biomax MS imaging film* detektiert (3.15.2.).

Diese Tests belegen, daß weder natives Rem noch seine aspartylsubstituierten Derivate *in vitro* phosphoryliert werden. Das Ergebnis unterstreicht die mit Phosphoramidat erhaltenen Daten und spricht deutlich dafür, daß Rem nicht durch Phosphorylierung aktiviert wird.

#### 4.1.8. Aktivierung von Rem durch Acetylierung?

##### 4.1.8.1. *In vivo*-Reaktion

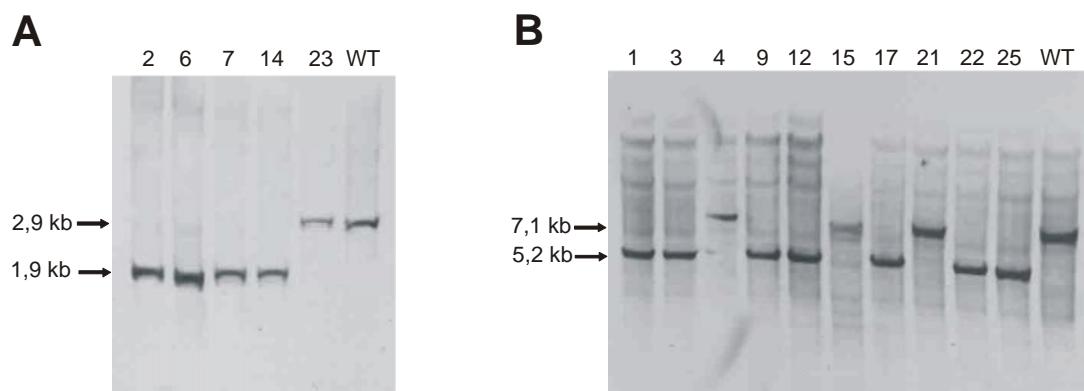
Außer der Modifikation durch Phosphorylierung wurde beim Responsregulator CheY von *E. coli* eine zusätzliche Modifikation von Lysyl-Resten durch Acetylierung gezeigt (Barak *et al.*, 2004). Die Synthese von Acetyladenylat (AcAMP) und die *in vivo*-Acetylierungsreaktion sind in Abb. 23 dargestellt. Das Enzym Acetyl-CoenzymA-Synthetase (Acs) katalysiert die Synthese des acetylierenden Zwischenprodukts AcAMP entweder aus Acetat und Adenosintriphosphat (ATP) oder Acetyl-CoenzymA (AcCoA) und Adenosinmonophosphat (AMP). Durch AcAMP wird CheY Acs-abhängig acetyliert (und aktiviert), während AMP freigesetzt wird.



**Abb. 23.** Reaktionen zur Acetylierung von CheY aus *E.coli*. Acs : AcetylcoenzymA Synthetase; AcAMP: Acetyladenylat; AcCoA: Acetyl-Coenzym A; AcCheY: acetyliertes CheY; ATP: Adenosintriphosphat; PP<sub>i</sub>: Pyrophosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; CoA: CoenzymA. (Erläuterungen im Text).

#### 4.1.8.2. Deletionen der zwei *acs*-Gene im *S. meliloti*-Genom

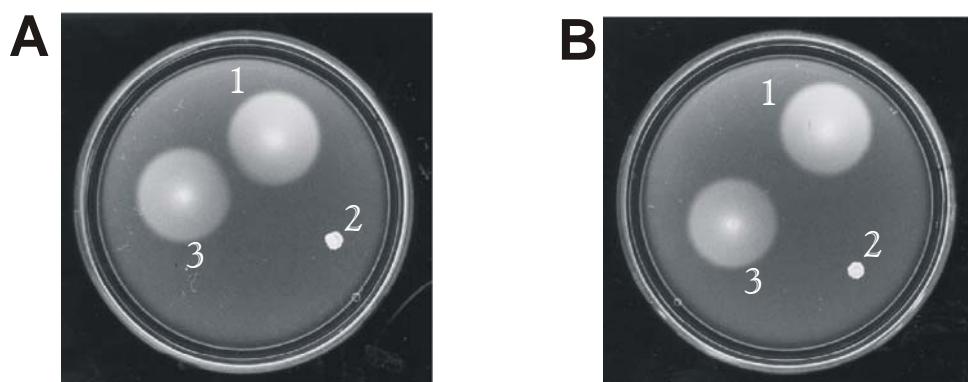
Eine Deletionsmutante des einzigen *acs*-Gens von *E. coli* führt zu reduzierter Sensitivität auf chemotaktische Reize (Barak & Eisenbach, 2001). Dieser Effekt wurde auf Acetylierung (und teilweise Inaktivierung) von CheY zurückgeführt. Durch Deletionen in den beiden *acs*-Genen des *S. meliloti*-Genoms sollte untersucht werden, ob ein entsprechender Phänotyp auftritt und - im positiven Falle - auch Rem auf Acetylierung getestet werden. Die Deletionen der beiden Gene *acsA1* und *acsA2* von *S. meliloti* wurden über PCR-Mutagenese erstellt (3.5.2.2.) und über Konjugation und homologe Rekombination in den *S. meliloti*-Wildtyp überführt (3.7.1.). Nach Selektion wurden fünf potentielle *acsA1*- und zehn potentielle *acsA2*-Mutanten über *Southern blot* auf Austausch des WT-Allels gegen das Mutantengen überprüft (3.8.). Abb. 24 zeigt die *Southern blot*-Analysen. Die *acsA1*-Deletionmutanten 2, 6, 7 und 14 enthielten ein mit der Sonde hybridisierendes Konstrukt auf der richtigen Größe von 1,9 kb (Abb. 24 A). In Stamm Nr. 23 wurde beim Rekombinationsereignis die Deletion gegen das WT-Allel ausgetauscht, daher entspricht die Läufhöhe der Bande Nr. 23 einer Größe von 2,9 kb, gemäß der WT-Kontrolle. Bezüglich der *acsA2*-Deletion enthielten die Stämme Nr. 1, 3, 9, 12, 17, 22 und 25 die Deletion, während den Stämmen Nr. 4, 15 und 21 das WT-Allel erhalten blieb (Abb. 24 B). Der Einfluß der *acsA1*-Deletionsmutante 7 (RU13/227) und der *acsA2*-Deletionsmutante 22 (RU13/228) auf die Chemotaxis von *S. meliloti* wurde im Folgenden untersucht.



**Abb. 24.** *Southern blot* zur Überprüfung eingeführter Deletionen in den Genen für *acsA1* (A) und *acsA2* (B). Potentielle Mutanten sind nummeriert; WT: RU11/001. A. Überprüfung von fünf potentiellen *acsA1*-Deletionsmutanten. *HindIII*-Verdau genomischer DNA. Als Sonde wurde ein 706 bp *PstI-HindIII*-Fragment aus pRU2910 verwendet. Die erwarteten Banden von WT (2,9 kb) und  $\Delta$ *acsA1* (1,9 kb) sind durch Pfeile gekennzeichnet. B. Überprüfung von zehn potentiellen *acsA2*-Deletionsmutanten. *EcoRI*-Verdau genomischer DNA. Als Sonde wurde ein 865 bp *EcoRI-HindIII*-Fragment aus pRU2911 verwendet. Die erwarteten Banden von WT (7,1 kb) und  $\Delta$ *acsA2* (5,2 kb) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

#### 4.1.8.3. Phänotypische Charakterisierung von RU13/227 und RU13/228

Eine *acs*-Deletion bei *E. coli* resultiert in einem ca. 40 % reduzierten Schwärmlerring (Barak & Eisenbach, 2001). Welchen Effekt hatten Deletionen von *acsA1* oder *acsA2* auf die Chemotaxis von *S. meliloti*? Das wurde anhand von Schwärmanalysen von WT und *acs*-Deletionsmutanten RU13/227 (*acsA1*) und RU13/228 (*acsA2*) untersucht.



**Abb. 25.** Schwärmanalyse von *acsA*-Deletionsstämmen. Es wurden jeweils 3 µl einer stationären *S. meliloti* TYC-Flüssigkultur aufgetragen. A. 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta$ *rem*); 3, RU12/227 ( $\Delta$ *acsA1*); B. 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta$ *rem*); 3, RU12/228 ( $\Delta$ *acsA2*).

Abb. 25 zeigt, daß sowohl RU13/227 ( $\Delta acsA1$ ) als auch RU13/228 ( $\Delta acsA2$ ) im Vergleich zum WT keine Reduktion der Schwärmfähigkeit aufweisen. Daraus wurde gefolgt, daß eine Acetylierung durch eine der beiden Acetyl-CoenzymA-Synthetasen keinen Einfluß auf Komponenten der *S. meliloti*-Chemotaxis - wie CheY oder Rem - hat. Allerdings bleibt offen, ob eine Doppeldeletion von *acsA1* und *acsA2* diesen Effekt hätte. Das wäre denkbar, wenn die beiden Enzyme sich gegenseitig ersetzen können (gleiche Spezifität). Die Möglichkeit wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

#### 4.1.9. Suche nach Aktivatoren der *rem*-Transkription durch Mini-*Tn5*-Mutagenese

Das Rem-Protein wird nur während des exponentiellen Wachstums entsprechend der Motilitätsphase von *S. meliloti* synthetisiert (Rotter, 2001; Abb. 18). Alle bisherigen Experimente sprechen dafür, daß Rem nicht durch posttranskriptionale Modifikation aktiviert wird, sondern das aktive Protein repräsentiert. Deshalb legt seine Transkription auch den Zeitpunkt seiner regulatorischen Aktivität fest. Was regelt die *rem*-Transkription? Regulation auf Transkriptionsebene findet häufig mittels spezifischer Sigmafaktoren statt, die die Expression einer Transkriptionseinheit unter bestimmten Konditionen ermöglichen (Wösten, 1998). Deshalb war es naheliegend, zunächst nach einem spezifischen Sigmafaktor für *rem* zu suchen. Prinzipiell war zu klären, ob es eine regelnde *upstream*-Komponente für Rem gibt. Die wurde mittels *Tn5*-Mutagenese und Blau-Weiß-Selektion von solchen Mutanten gesucht, die den *rem*-Promotor still legten und immotil waren. Insertionsmutanten von RU11/001 (WT) wurden mit Hilfe des Plasmids pUJ1287, in welches das Mini-*Tn5* kloniert worden war (Lorenzo *et al.*, 1990), erzeugt (3.16.1.). Zum Nachweis der *rem*-Transkription wurden die mutagenisierten Zellen mit dem Plasmid pRU2361 (*Prem-lacZ*-Reporterkonstrukt; 2.1.) transformiert. In den *S. meliloti*-Zellen, in denen das Mini-*Tn5* in ein Gen inserierte, dessen Genprodukt die Transkription des *rem*-Gens aktiviert, sollte der *rem*-Promotor stumm sein und zu weißen Kolonien führen. Bei der Blau-Weiß-Selektion blieb eine Kolonie aus fünf weiß. Diese weißen Kolonien wurden zusätzlich auf Immotilität untersucht in der Erwartung, daß Rem nicht exprimiert wird. Tab. 7 faßt das Ergebnis der Mini-*Tn5*-Mutagenese zusammen. Insgesamt wurden 6735 weiße Insertionsmutanten analysiert. Davon zeigten

98 % (6663) wildtypähnliches Schwärzverhalten, während 0,3 % (22) mindestens 70 %ige Reduktion in ihrer Schwärmfähigkeit aufwiesen. Insgesamt wurden 0,09 % (6) der mutagenisierten Zellen durch eine Transposon-Insertion komplett immotil.

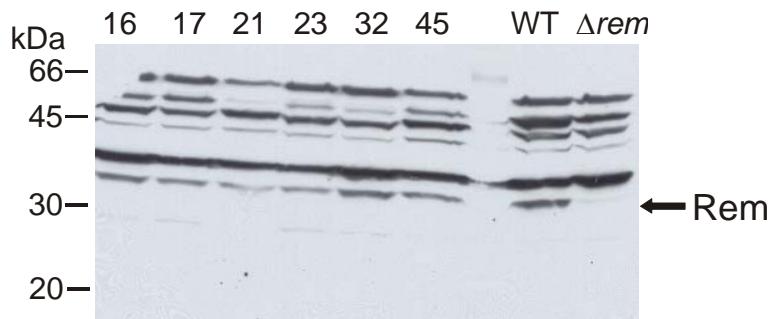
**Tab. 7.** Statistik der Mini-*Tn5*-Mutagenese von RU11/001(pRU2361)

Analyisierte Mini- <i>Tn5</i> - Insertionsmutanten <sup>1)</sup>	Immotil	Relativer Schwärmring- durchmesser <sup>2)</sup> > 30%	Relativer Schwärmring- durchmesser 30% – 90 %	Relativer Schwärmring- durchmesser 90% - 100%
6735	6	16	49	6663

<sup>1)</sup>Mutagenisierte Zellen wurden mittels des Reportergenkonstrukts pRU2361 auf einen inaktiven *rem*-Promotor vorselektiert.

<sup>2)</sup>Der relative Schwärmringdurchmesser gibt den prozentualen Wert der Wildtyp-Schwärmfähigkeit an.

Fehlende Aktivität des *rem*-Promotors in Kombination mit Immotilität bei sechs Mini-*Tn5*-Insertionsmutanten ließ vermuten, daß in diesen Mutanten durch die *Tn5*-Mutagenese ein spezifischer Aktivator der *rem*-Transkription inaktiviert wurde. Da ohne diesen spezifischen Aktivator das Rem-Protein nicht mehr synthetisiert werden sollte, wurde die Expression des Rem-Proteins in den sechs immotilen Insertionsmutanten durch *Western blot*-Analysen überprüft.



**Abb. 26.** *Western blot*-Analyse von sechs immotilen Mini-*Tn5*-Insertionsmutanten (Tab.7) und Kontrollen. Verdünnung des anti-Rem-Antikörpers 1 : 100. Extrakte aus *S. meliloti*-Zellen wurden nach etablierter Vorschrift analysiert (3.14.). Die Insertionsmutanten sind numeriert. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden die Extrakte von RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) aufgetragen.

Wie in Abb. 26 zu erkennen ist, wurde jedoch in allen sechs Insertionsmutanten Rem-Protein detektiert. Dieses Ergebnis widersprach der Theorie, daß die Immotilität der sechs Insertionsmutanten das Resultat mangelnder Aktivierung der *rem*-Transkription war. Durch Sequenzierung wurde untersucht, in welche Genloci das Mini-*Tn5* in den sechs immotilen *Tn5*-Mutanten jeweils inseriert war (3.16.2.). Es waren jeweils Strukturgene des *flagellar regulon* betroffen, und zwar die Gene *flgB*, *flgC*, *fliP* und *flaB* (Tab. 8). Eine Transposon-Insertion in einem für ein regulatorisch aktives Protein - wie zu Beispiel ein spezifischer Sigmafaktor – codierenden Genlocus konnte nicht lokalisiert werden. Der wahrscheinliche Grund für ein derartiges Ergebnis ist ein technisches Problem: Entsprechend der Blau-Weiß-Selektion wäre das Mini-*Tn5* mit einer Häufigkeit von  $2 \times 10^{-1}$  in Genloci inseriert, die für Transkriptionsaktivatoren des *rem*-Gens codieren. Die durchschnittliche Frequenz einer Transposoninsertion dagegen beträgt  $10^{-6}$ . Vermutlich ereigneten sich homologe Rekombinationen zwischen dem Mini-*Tn5* und dem Reporterplasmid pRU2361. Ein spezifisches Screening auf *rem*-aktivierende Transkriptionsfaktoren war mit diesem experimentellen Ansatz nicht möglich.

**Tab. 8.** Betroffene Genloci der Mini-*Tn5*-Mutagenese in sechs immotilen Mutanten (Tab.7)

Immotile Insertionsmutanten (Nr.)	Mini- <i>Tn5</i> -Insertion in Genlocus	Funktion des Genprodukts <sup>1)</sup>
16	<i>flgB</i>	Komponente des Schafts
17	<i>flgC</i>	Komponente des Schafts
21	<i>fliP</i>	Membranprotein (Basalkörpersynthese)
23	<i>fliP</i>	Membranprotein (Basalkörpersynthese)
32	<i>flaB</i>	sekundäre Flagellin- untereinheit
45	<i>flgC</i>	Komponente des Schafts

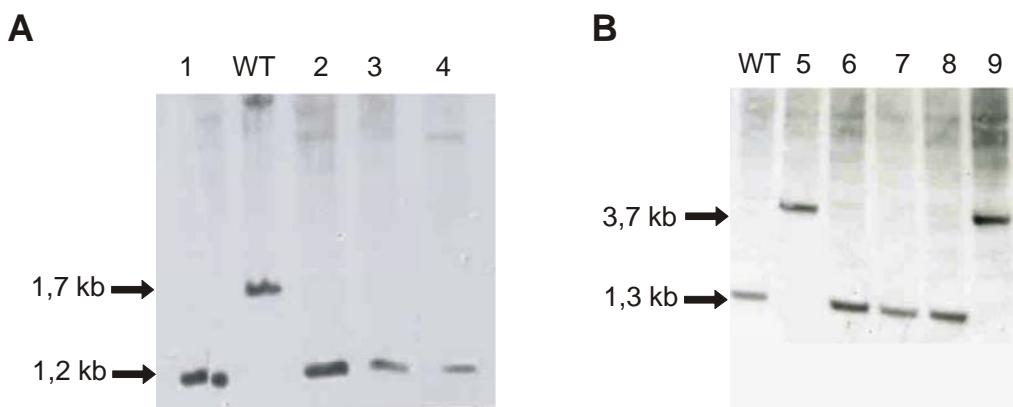
<sup>1)</sup> Nach Sourjik *et al.* (1998)

#### 4.1.10. Kontrollieren die Sigmafaktoren RpoE2 und RpoH2 die Transkription von *rem*?

Nachdem die Insertionsmutagenese mit *Tn5* keinen Transkriptions-Regulator von *rem* aufgedeckt hatte, lag es nahe, Sigmafaktoren als potentielle positive Kontrollelemente von *rem* zu testen. Dieser Zugang wurde durch die vollständige Sequenzierung des *S. meliloti*-Genoms ermöglicht (Galibert *et al.*, 2001). Allerdings enthält dieses insgesamt 14 Gene, die für Sigma-ähnliche Proteine codieren. Von diesen wurden zwei Kandidatengene (*rpoE2* und *rpoH2*) ausgewählt, die in der verwandten Spezies *Brucella melitensis* Gene des *flagellar regulon* kontrollieren (pers. Mitteilung J. J. Lettesson, Universität Namur, Belgien). Bei *B. melitensis* resultiert eine Deletion des *rpoH2*-Gens in einer deutlich geringeren Transkription des *flgE*-Gens, das für Hakenmonomere codiert. Eine *rpoE*-Deletionsmutante führt zu deutlich gesteigerter Promotoraktivität der Gene *flgE* und *fliF*, (codiert für Baustein des MS-Rings). Auf welche Weise diese beiden Sigmafaktoren interagieren, ist bisher noch nicht aufgeklärt. Orthologe des spezifischen Klasse II-Sigmafaktors FliA oder des Anti-Sigmafaktors FlgM von *E. coli* treten bei *S. meliloti* nicht auf. Deshalb wurde die Funktionsanalogie von RpoH2 und RpoE2 als mögliches Indiz für deren Rolle bei der Regulation der Motilität gewertet und die codierenden Gene, *rpoH2* bzw. *rpoE2*, durch Deletion ausgeschaltet.

##### 4.1.10.1. Deletion von *rpoH2* und *rpoE2*

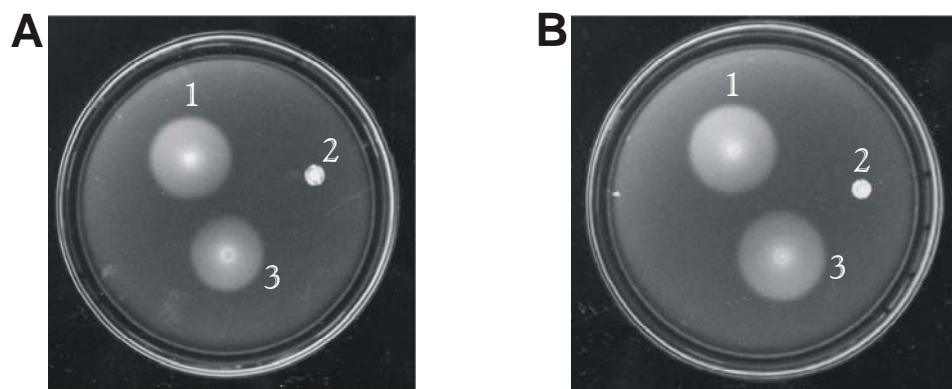
Deletionen der *S. meliloti*-Gene für die Orthologen RpoH2 und RpoE (*B. melitensis*) wurden mittels PCR-Mutagenese etabliert (3.5.2.2.) und mittels Konjugation und homologer Rekombination in das Genom des *S. meliloti*-Wildtyps integriert (3.7.1.). *Southern blot*-Analysen wurden zur Bestätigung der erfolgreichen Allelen-Austausche durchgeführt (Abb. 27). Alle vier untersuchten *rpoE2*-Deletionsmutanten und zwei von fünf analysierten *rpoH2*-Deletionsmutanten enthielten die gewünschte Deletion (Abb. 27). Die *rpoE2*-Deletionmutante 3 (RU13/230) und die *rpoH2*-Deletionsmutante 5 (RU13/229) wurden auf mögliche Veränderung ihrer Motilität und auf Transkription von *rem* untersucht.



**Abb. 27.** *Southern blot*-Analysen zum Nachweis von Deletionen in *rpoE2* und *rpoH2*. **A.** Überprüfung potentieller Deletionen im *rpoE2*-Gen (1 bis 4) im Vergleich zum WT RU11/001. *NcoI*-Verdau genomischer DNA aus *S. meliloti*. Als Sonde wurde ein 799 bp *EcoRI-HindIII*-Fragment von pRU2913 verwendet. Erwartete Banden der WT- (1,7 kb) und  $\Delta rpoE2$ -Fragmente (1,2 kb) sind durch Pfeile gekennzeichnet. **B.** Überprüfung potentieller Deletionen im *rpoH2*-Gen (5 bis 9). *XhoI*-Verdau genomischer DNA. Als Sonde wurde ein 713 bp *EcoRI-HindIII*-Fragment von pRU2912 verwendet. Erwartete Banden der WT- (1,3 kb) und  $\Delta rpoH2$ -Fragmente (3,7 kb) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

#### 4.1.10.2. Charakterisierung der *rpoE2*- und *rpoH2*-Deletionsmutanten

Die Mutanten RU13/230 ( $\Delta rpoE2$ ) und RU13/229 ( $\Delta rpoH2$ ) wurden auf Schwärmlatten auf Motilität und Chemotaxis geprüft (Abb. 28)



**Abb. 28.** Schwärmanalyse von *rpo*-Deletionsmutanten. Es wurden je 3 µl einer stationären *S. meliloti* TYC-Flüssigkultur aufgetragen. **A.** 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta rem$ ); 3, RU13/230 ( $\Delta rpoE2$ ). **B.** 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta rem$ ); 3, RU13/229 ( $\Delta rpoH2$ ).

Sowohl RU13/230 ( $\Delta rpoE2$ ) als auch RU13/229 ( $\Delta rpoH2$ ) hatten gleiche Schwärmlerringdurchmesser wie der WT RU11/001. Danach sollten weder RpoE2 noch RpoH2 an der Transkription des *rem*-Gens beteiligt sein. Diese Vermutung wurde direkt mittels Reportergenanalysen überprüft. Die Promotoraktivität von exemplarischen Vertretern jeder Hierarchiekategorie des *flagellar regulon* wurde im genetischen Hintergrund von RU11/001 (WT), RU13/230 ( $\Delta rpoE2$ ) und RU13/229 ( $\Delta rpoH2$ ) bestimmt. Die Resultate sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

**Tab. 9.** Reportergenanalysen von Promotor-*lacZ* Fusionen in *S. meliloti* RU11/001 (WT), RU13/229 ( $\Delta rpoH2$ ) und RU13/230 ( $\Delta rpoE2$ ).

<b>Promotor<sup>1)</sup></b>	<b><math>\beta</math>-Galactosidaseaktivität (Miller Units)<sup>2)</sup></b>		
	<b>RU11/001 (WT)</b>	<b>RU13/229 (<math>\Delta rpoH2</math>)</b>	<b>RU13/230 (<math>\Delta rpoE2</math>)</b>
pRU2266 <i>visN</i> (I)	239 ± 11	225 ± 7	201 ± 13
pRU2361 <i>rem</i> (I')	1555 ± 99	1571 ± 104	1624 ± 126
pRU2273 <i>flgB</i> (II)	1465 ± 88	1558 ± 95	1513 ± 92
pRU2274 <i>flaA</i> (III)	13225 ± 457	13652 ± 423	12853 ± 501
pRU2250 <i>icpA</i> (III)	173 ± 8	170 ± 7	196 ± 10

<sup>1)</sup> Verwendete Promotor-*lacZ* Fusionsplasmide; römische Zahlen in Klammern ordnen die Promotoren den Genklassen des *flagellar regulon* zu.

<sup>2)</sup>  $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten (nach Miller, 1972) wurden aus je fünf unabhängigen Experimenten bestimmt und gemittelt.

Die Promotoraktivitäten von *rem* (I'), *visN* (I), *flgB* (II), *flaA* (III) und *icpA* (III) zeigten keine signifikante Abweichung vom WT-Niveau. Obwohl der Einfluß der Sigmafaktoren RpoE und RpoH2 bei *B. melitensis* auf die Transkription von Genen des *flagellar regulon* nachgewiesen wurde, konnte in der nahe verwandten Spezies *S. meliloti* keine analoge Funktion von RpoE2 und RpoH2 gezeigt werden. Die Kontrolle der phasenabhängigen limitierten Transkription von *rem* bleibt daher bis auf weiteres ungelöst.

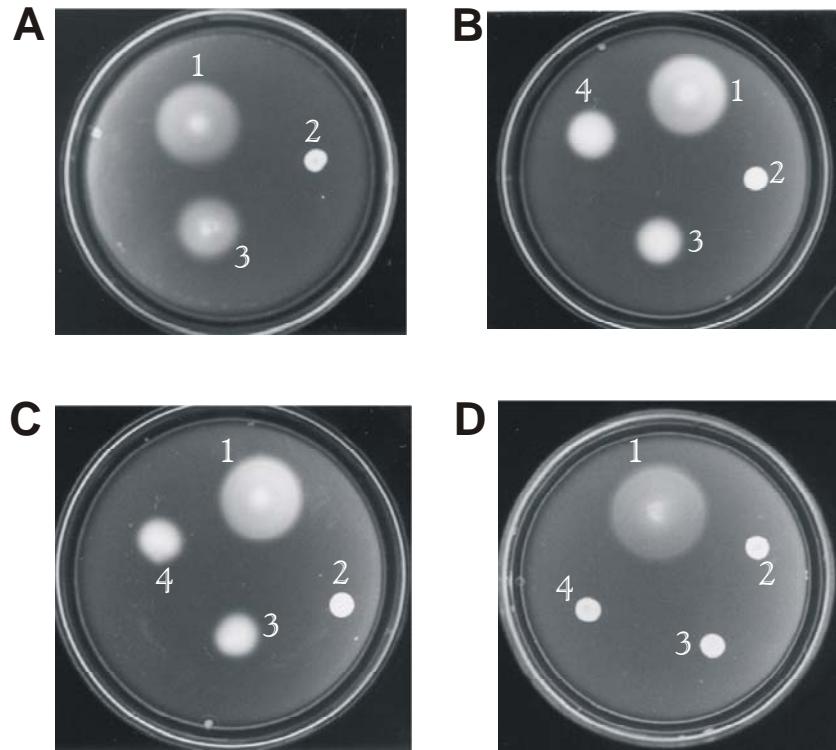
#### 4.1.11. Überexpression und Komplementation von *rem* im Hintergrund von Wildtyp und vier Deletionsmutanten

Western-Analysen haben gezeigt, daß Rem einem schnellen proteolytischen Abbau unterliegt (4.1.6.). Ob diese Proteolyse auch eine Überproduktion von Rem verhindert, war zu testen. Ferner galt es, die Komplementationsfähigkeit eines konstitutiv im Überschuß produzierten Rem-Proteins zu prüfen und seine Abhängigkeit/Unabhängigkeit von der globalen VisNR-Regulation zu untersuchen. Dieser letztere Aspekt ist bedeutsam für die Einordnung von Rem in die Regulationskaskade von Flagellen-, Motilitäts- und Chemotaxisgenen (Abb. 7). Für die Überexpressions- und Komplementationsanalysen wurde das *rem*-Gen unter die Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors in den Überexpressionsvektor pBBR1MCS2 (2.1.) kloniert und durch konjugativen Plasmid-Transfer (3.7.1.) in RU11/001 (WT), RU11/555 ( $\Delta rem$ ), RU11/318 ( $\Delta visN$ ), RU11/317 ( $\Delta visR$ ) und RU11/814 ( $\Delta visN\Delta visR$ ) überführt.

##### 4.1.11.1. Charakterisierung von Schwärm- und Schwimmfähigkeit

Kann Rem ein defektes *rem*-Gen in trans komplementieren und in welcher Beziehung steht es zum globalen VisNR-Regulator? Der Effekt von Überexpression bzw. Komplementation von *rem* wurde im WT, sowie im  $\Delta rem$ - und  $\Delta visNR$ -genetischen Hintergrund bestimmt. Dazu wurden Schwärmfähigkeit und Schwimmgeschwindigkeit untersucht (Abb. 29; Tab. 10). Aus den Schwärm- und Schwimmgeschwindigkeitsanalysen gingen folgende Resultate hervor:

- (1) Konstitutive Überexpression von *rem* unter Kontrolle des *Plac*-Fremdpromotors reduzierte den Schwärmhof auf 60 % des WT (Abb. 29 A). Die erhöhte Gendosis von *rem*, möglicherweise aber auch die „unnatürliche“ Expression vor und nach dem exponentiellen Wachstum, dürften zu diesem Effekt beitragen. Dafür spricht auch die geringere Schwimmgeschwindigkeit (-20 %; Tab. 10).
- (2) Ein plasmidcodiertes *rem*-Gen kann eine *rem*-Deletion teilweise komplementieren (Abb. 29B; Tab. 10). Die beobachtete Reduktion des Schwärtringdurchmessers auf 52 % und eine 20 %ige Einschränkung der Schwimmgeschwindigkeit legen die gleiche Erklärung wie beim WT (1) nahe.



**Abb. 29.** Rem-Überexpression und *rem*-Komplementation im Schwärmtest. Bromfield-Schwärmlplatten wurden mit je 3 µl einer stationären *S. meliloti*-Kultur beimpft und 3 Tage bei 30°C inkubiert. **A.** Rem-Überexpression im *S. meliloti*-Wildtyp; 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta rem$ ); 3, RU11/001 (pRU2818) (WT + pBBR-*rem*). **B.** *rem*-Komplementation in  $\Delta rem$  und  $\Delta visN\Delta visR$ ; 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta rem$ ); 3, RU11/555 (pRU2818) ( $\Delta rem$  + pBBR-*rem*); 4, RU11/814 (pRU2818) ( $\Delta visN\Delta visR$  + pBBR-*rem*). **C.** *rem*-Komplementation in  $\Delta visN$  und  $\Delta visR$ ; 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/555 ( $\Delta rem$ ); 3, RU11/318 (pRU2818) ( $\Delta visN$  + pBBR-*rem*); 4, RU11/317 (pRU2818) ( $\Delta visR$  + pBBR-*rem*). **D.** Negativkontrollen der *vis*-Stämme. 1, RU11/001 (WT); 2, RU11/318 ( $\Delta visN$ ); 3, RU11/317 ( $\Delta visR$ ); 4, RU11/814 ( $\Delta visN\Delta visR$ ).

(3) Das Fehlen der übergeordneten VisNR-Kontrolle - sowohl beider Komponenten ( $\Delta visN\Delta visR$ ; Abb. 22B) als auch der Einzelkomponenten  $\Delta visN$  oder  $\Delta visR$  (Abb. 22 C/D) - wurde vom plasmidcodierten *rem*-Gen ähnlich einer *rem*-Deletion zu 50 % kompensiert; auch die Schwimmgeschwindigkeit war um ca. 20 % reduziert (Tab. 10). Dieser Befund ist interessant, weil er die Autonomie von Rem in der (positiven) Regulation aller Mot-, Che-, und Fla-Funktionen demonstriert. Die Expression des nativen *rem*-Gens wird zwar von VisNR gesteuert, das Rem-Protein aber ist unabhängig von VisNR für die Regulation und Beschränkung der Motilität auf die exponentielle Phase zuständig.

**Tab. 10.** Schwärmfähigkeit und Schwimmgeschwindigkeiten von *rem*-Komplementationen- bzw. Rem-Überexpressionsstämmen.

<i>S. meliloti</i> -Stamm	Merkmale (Genmarker)	Relativer Schwärmeringdurchmesser (%WT) <sup>1)</sup>	Schwimmgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/\text{s}$ ) <sup>2)</sup>
RU11/001	WT	100	$38,1 \pm 2,0$
RU11/001 (pRU2818)	WT + pBBR- <i>rem</i>	60	$30,7 \pm 1,9$
RU11/555 (pRU2818)	$\Delta rem$ + pBBR- <i>rem</i>	52	$30,5 \pm 1,8$
RU11/555	$\Delta rem$	0	0
RU11/814 (pRU2818)	$\Delta visN\Delta visR$ + pBBR- <i>rem</i>	50	$30,2 \pm 1,5$
RU11/814	$\Delta visN\Delta visR$	0	0
RU11/317 (pRU2818)	$\Delta visR$ + pBBR- <i>rem</i>	51	$29,5 \pm 2,0$
RU11/317	$\Delta visR$	0	0
RU11/318 (pRU2818)	$\Delta visN$ + pBBR- <i>rem</i>	50	$29,9 \pm 1,9$
RU11/318	$\Delta visN$	0	0

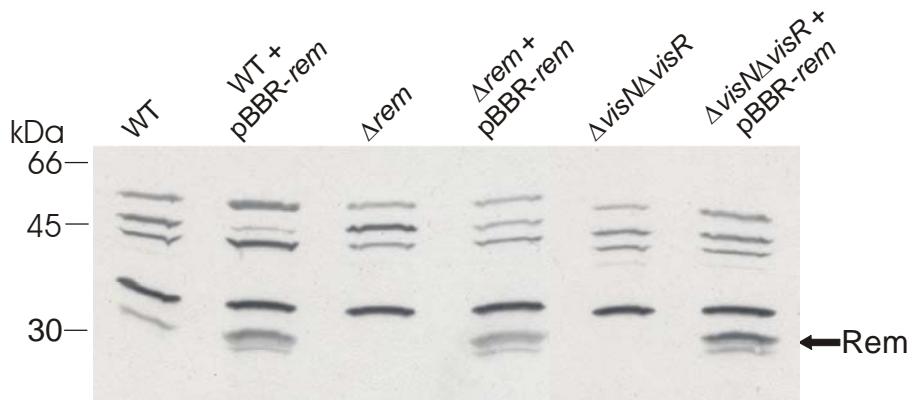
<sup>1)</sup> Der Schwärmeradius gibt den prozentualen Wert der Wildtyp-Schwärmfähigkeit an.

<sup>2)</sup> Mittlere Schwimmgeschwindigkeit. Durchschnittswerte von 1000 einzeln gemessenen Bakterienspuren wurden in jeder Probe durch computergestützte Bewegungsanalyse bestimmt und für mindestens fünf unabhängige Zellpopulationen gemittelt.

Rem steht danach in der Hierarchie der drei Expressionsklassen (Abb. 7) direkt unterhalb von VisNR, ist aber (weitgehend) autonom in seiner Funktion als Regulator der Klasse II- und Klasse III-Gene und bietet erstmals eine Erklärung für die Beschränkung der Motilität auf die exponentielle Wachstumsphase (s. auch Diskussion).

#### 4.1.11.2. Immunchemische Studien

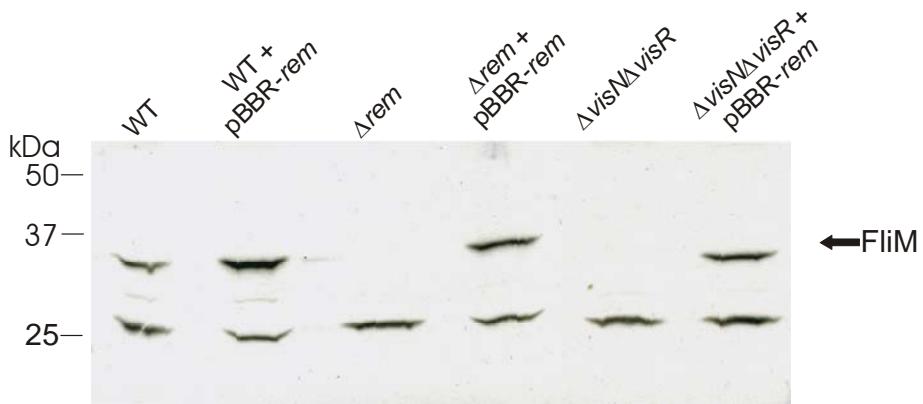
Wie wird die Expression von Klasse II- und Klasse III-Genen bei Überexpression bzw. Komplementation von *rem* beeinflußt? Promotoraktivitäten repräsentativer Gene dieser Klassen konnten mangels eines kompatiblen Reportergenplasmids nicht direkt untersucht werden. Deshalb wurde hier die Genexpression in RU11/001 (WT), RU11/555 ( $\Delta rem$ ) und RU11/814 ( $\Delta visN\Delta visR$ ) mit und ohne das Komplementationskonstrukt pRU2810 anhand von *Western*-Analysen überprüft. Schwarm- und Schwimmanalysen (4.1.11.1.) haben gezeigt, daß eine erhöhte, dauernd produzierte Menge an Rem-Protein die Motilität reduziert. Zunächst wurde nachgewiesen, daß Rem-Protein durch das Überexpressionskonstrukt pRU2818 synthetisiert wird (Abb. 30). In allen Stämmen mit pBBR-*rem* (wie auch weniger intensiv im WT) wurde Rem-Protein im *Western blot* durch anti-Rem-Antikörper detektiert. Die Intensität der Rem-Bande war bei Überexpression jeweils deutlich stärker als im WT (RU11/001) mit dem funktionellen, natürlichen *rem*-Gen.



**Abb. 30.** *Western blot* zur Analyse der Rem-Expression bei Komplementation bei verschiedenen genetischen Hintergrund. Bedingungen wie in Legende zu Abb. 12. Die Laufhöhe von Rem ist mit Pfeil gekennzeichnet. Stämme (von links nach rechts): RU11/001, RU11/001(pRU2818), RU11/555, RU11/555 (pRU2818), RU11/814, RU11/814 (pRU2818).

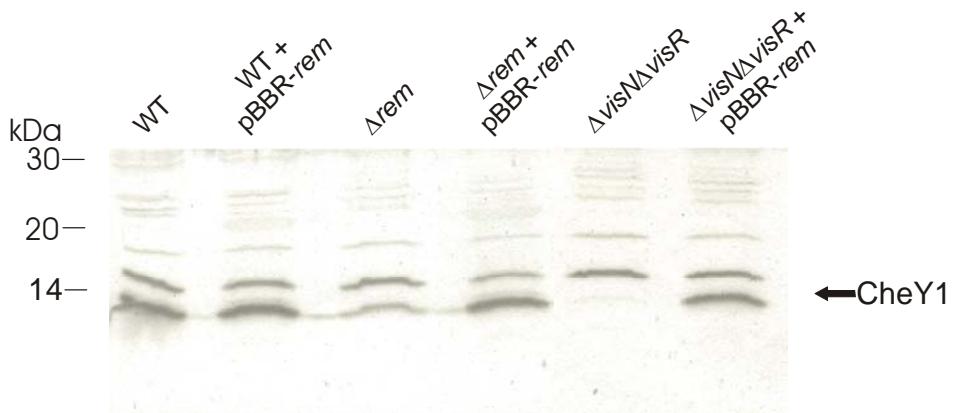
Da die positive Kontrolle der Klasse II-Genexpression durch Rem bekannt ist (Mühlbacher, 2000; Rotter, 2001), wurde der Einfluß von komplementierendem Rem in verschiedenem genetischen Hintergrund auf die FliM-Genexpression als typischen Vertreter dieser Genklasse untersucht. Wie Abb. 31 zeigt, wird FliM in den drei Stämmen

mit pBBR-*rem* Plasmid gut exprimiert, und zwar stärker als im WT. Durch überschüssiges Rem-Protein wurde folglich die FliM-Expression gesteigert.



**Abb. 31.** Western blot zur Analyse der FliM (Klasse II-Protein)-Expression bei Komplementation von *rem* in verschiedenem genetischen Hintergrund. Weitere Erklärung vgl. Legende zu Abb. 30.

FliM ist essentiell für die Expression der Klasse III-Gene des *flagellar regulon* (Sourjik *et al.*, 2000). Deshalb wurden die Auswirkungen der Komplementation von *rem* und *visNR* auf die Expression des Klasse III-Gens *cheY1* in einem weiteren Western blot untersucht.

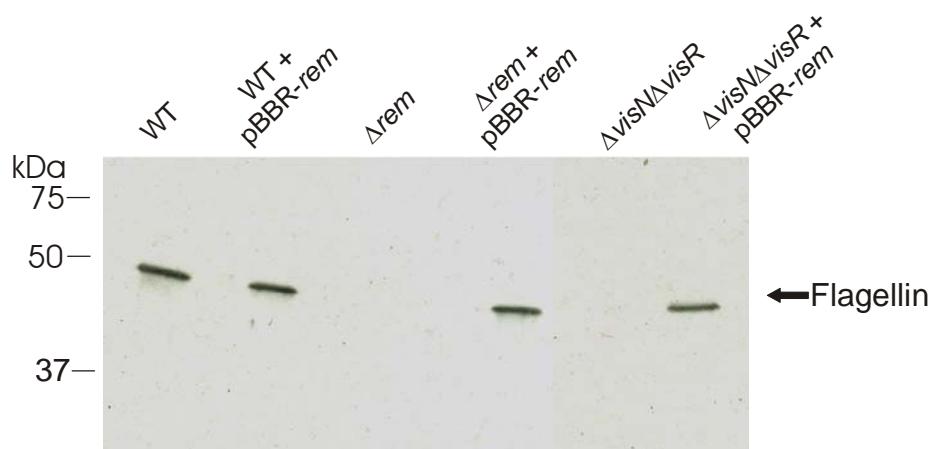


**Abb. 32.** Western blot zur Analyse der CheY1(Klasse III-Protein)-Expression bei Komplementation von *rem* in verschiedenem genetischen Hintergrund. Weitere Erklärung vgl. Legende zu Abb.30.

Wie Abb. 32 zeigt, werden etwa gleiche Mengen von CheY1 in WT und allen Stämmen mit pBBR-*rem* synthetisiert. Eine vermehrte Expression von CheY1 wurde durch diese Konstrukte nicht erreicht. Interessanterweise ist die CheY1-Synthese in einer *visNR*-Deletionsmutante vollständig aufgehoben, nicht jedoch bei Vorliegen einer *rem*-Deletionsmutante. Eine naheliegende Erklärung würde  $\Delta\text{visNR}$  als „stringent mutation“,

$\Delta rem$  als „leaky mutation“ einordnen. Dem widerspricht aber das völlige Ausbleiben von FliM im  $\Delta rem$ -Hintergrund (Abb. 31). Mit den bekannten Daten ist eine plausible Erklärung nicht möglich.

Als weiteres Klasse III-Gen wurde die Flagellenexpression immunochemisch analysiert. Der *Western blot* in Abb. 33 weist eine Flagellin-Expression auf Wildtyp-Niveau auf und entspricht damit den Befunden mit CheY1. Allerdings sind in diesem Falle - in Korrelation mit der Funktion von Rem als autonomer Regulator der Klasse II- und Klasse III-Gene - beide Kontrollen mit den Deletionen der *rem*- und *visNR*-Gene flagellenfrei.



**Abb. 33.** *Western blot* zur Analyse der Flagellin (Klasse III-Protein)-Expression bei Komplementation von *rem* in verschiedenem genetischen Hintergrund. Weitere Erklärung vgl. Legende zu Abb. 30.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Rem-Protein kann ein defektes  $\Delta rem$ -Gen *in trans* komplementieren.
- (2) Die Komplementation ist nicht vollständig (Schwärmefähigkeit, Schwimmgeschwindigkeit), vermutlich wegen einer erhöhten Gendosis und der „unnatürlichen“ Expression während aller Wuchsphasen.
- (3) Klasse II-Gene, wie FliM, werden von überexprimierten Rem positiv und in erhöhter Rate exprimiert.
- (4) Klasse III-Gene, wie CheY1 und Fla, werden ebenfalls (via Klasse II) positiv kontrolliert, aber ohne erhöhte Expression. Es ist denkbar, daß die Klasse II- Klasse III-Regulation qualitativ, aber konzentrationsunabhängig funktioniert.
- (5) In der Regulationskaskade steht folglich Rem direkt unter den globalen Regulatoren VisN und VisR.

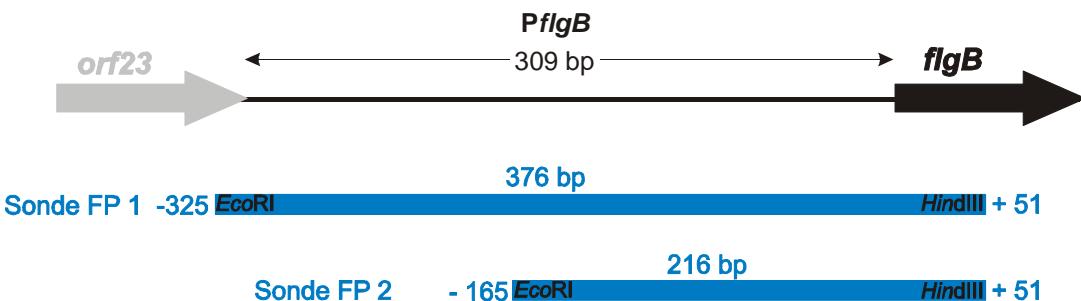
## 4.1.12. DNA-Bindestudien mit rekombinantem Rem-Protein (*footprinting*)

Die zentrale Funktion von Rem als positiver Regulator der Klasse II-Gene wurde bisher durch physiologische, gentechnische und immunchemische Analysen nachgewiesen. Ein direkter Beweis für die vermutete DNA-Bindung an regulatorische Elemente typischer Klasse II-Gene stand noch aus. Für eine solche DNA-Bindung sprachen computergestützte Sekundärstrukturanalysen der C-terminalen Domäne des Rem-Proteins, die ein *helix-turn-helix* Motiv identifizierten (Abb. 11.). Gelretardations-Experimente als Belege für eine solche Bindung hatten bisher nicht zum Ziel geführt (Mühlbacher, 2000; Rotter, unveröffentliche Daten). Deshalb wurden hier gezielt Experimente eingeleitet, die postulierte DNA-Bindung durch *footprinting* zu dokumentieren. Als DNA-Liganden für gereinigtes, rekombinantes Rem-Protein wurden die Promotorregionen der Klasse II-Gene *flgB*, *fliF* und *orf38* (Abb. A1 im Anhang) ausgewählt.

### 4.1.12.1. Bindung von Rem an den *flgB*-Promotor

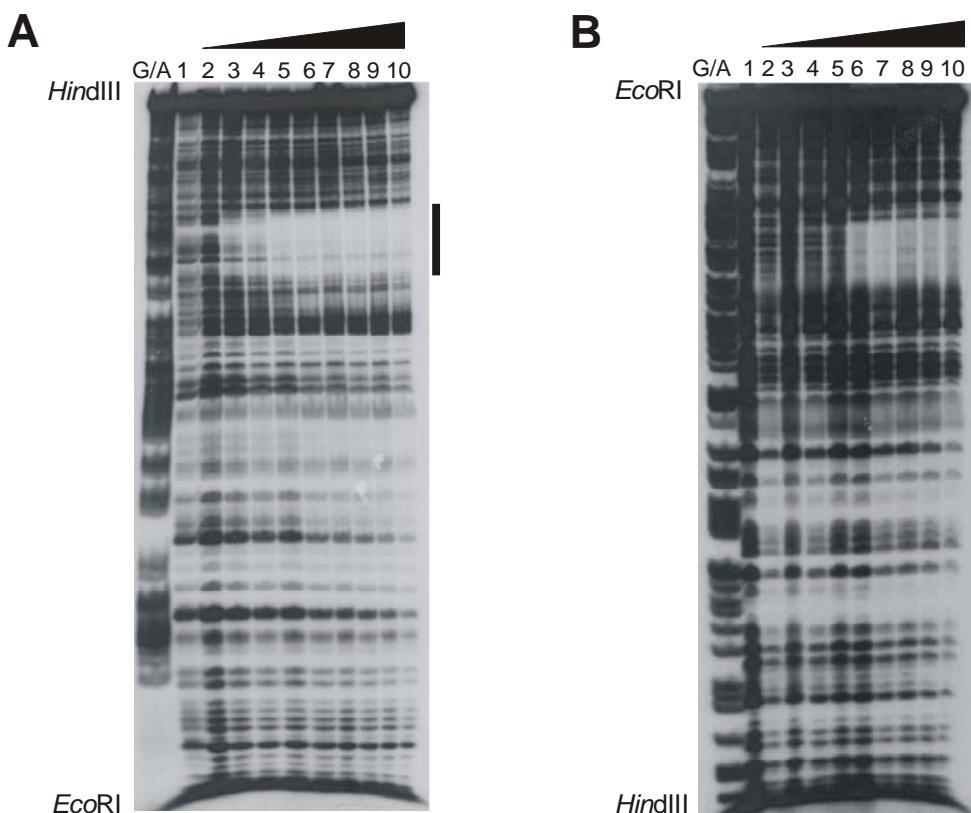
Nach Reportergen-Daten hat der *flgB*-Promotor von allen Klasse II-Genen die höchste Aktivität (Muschler, 2000). Der 309 bp nicht-codierende Bereich zwischen dem *flgB*-Gen (*flgB* codiert für ein 14 kDa Monomer des Flagellensafts; Sourjik *et al.*, 1998) und dem *upstream* liegenden *orf23*-Gen wurde für *footprinting*-Experimente ins Auge gefaßt. Um sicher zu gehen, wurde zunächst der komplette intercistronische Bereich plus 67 bp aus beiden Genen - insgesamt 367 bp - als Sonde FP 1 eingesetzt (Abb. 34). Diese Sonde wurde am 5'-Ende des *EcoRI*-Schnittes mit [<sup>32</sup>P] markiert (3.11.1.) und mit gereinigtem Rem-Protein in Dialysepuffer B (2.5.10.1.) in die *footprinting*-Experimente eingesetzt. 150 000 cpm der markierten DNA-Sonde wurde mit steigenden Konzentrationen von Rem inkubiert, anschließend mit DNaseI verdaut und die resultierenden DNA-Fragmente über ein Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt (3.11.3.). Eine Bindung von Rem an FP 1 lag sehr nahe am 3'-Ende der Sonde (*HindIII*-Schnitt) und konnte deshalb nicht exakt abgegrenzt werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde eine zweite, im 5'-Bereich um 160 bp verkürzte DNA-Sonde FP 2 hergestellt (Abb. 34). Es wurde bei der Wahl dieser

Sonde darauf geachtet, daß die DNA-Bindestelle des Rem-Proteins eine möglichst zentrale Position einnahm.



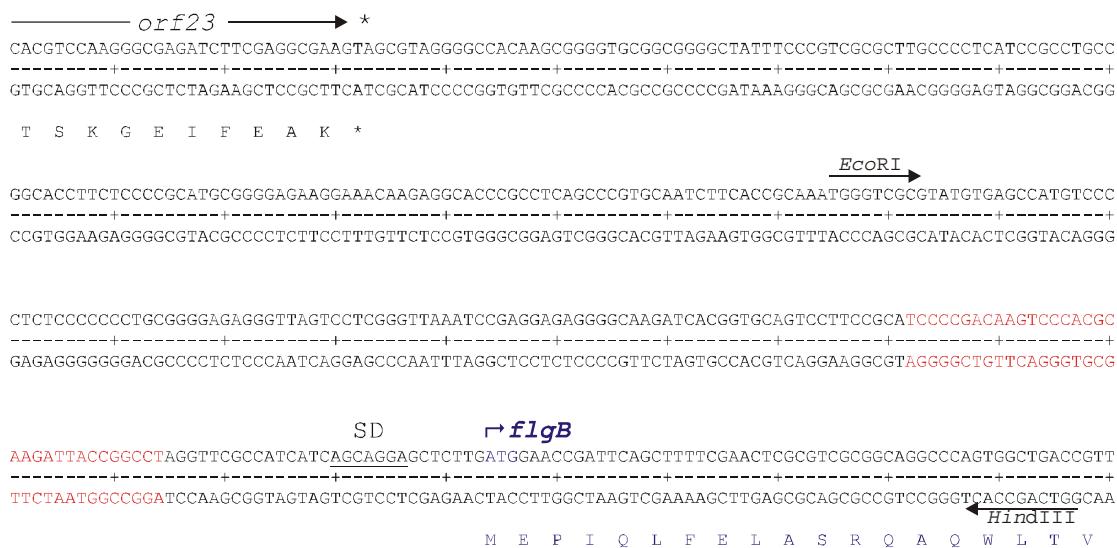
**Abb. 34.** Diagramm der Sonden FP 1 und FP 2 für die DNaseI-*footprinting*-Experimente am *flgB*-Promotor. Pfeile: Gene und Transkriptionspolarität; blau: DNA-Sonden. Numerierung der Sonden relativ zum *flgB*-Translationsstart. Länge (bp) der Sonden markiert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen der Sonden sind in schwarz angegeben.

Nach radioaktiver Markierung der DNA-Sonde wurde das *footprinting*-Experiment in gleicher Weise durchgeführt und zwar mit Sonden (FP 2), die entweder am *EcoRI*- oder am *HindIII*-Ende markiert waren. Die Ergebnisse nach DNase-Verdau der ungeschützten Regionen samt G+A-Sequenzstandards zeigt Abb. 35. Wie zu erkennen ist (Abb. 35 A), konnte schon bei Einsatz von 50 ng Rem-Protein eine teilweise Bindung an die *flgB*-Promotor-DNA detektiert werden. Bei 500 ng und mehr Rem (Abb. 35 A, Bahn 5) war die Bindestelle im *flgB*-Promotor komplett vor dem DNaseI-Verdau geschützt. Da die DNA-Bindung eines Proteins am Randbereich einer DNA-Sonde in *footprinting*-Experimenten eine schlechte Auflösung zeigt (Ulijasz *et al.*, 2004), wurde die *flgB*-Sonde FP 2 auch am 5'-Ende der *HindIII*-Schnitstelle [<sup>32</sup>P]-markiert und in ein *footprinting*-Experiment eingesetzt (Abb. 35 B). Auch bei dieser Umkehrung der Markierung (des nicht-codierenden DNA-Stranges) schützte Rem den analogen Teil des *flgB*-Promotors. In diesem Fall war die DNA ab einer Proteinkonzentration von 1000 ng (Abb. 35 B, Bahn 6) vor DNaseI-Verdau geschützt.



**Abb. 35.** DNaseI-footprinting von *PflgB*-DNA mit Rem-Protein. Ein 216 bp großes *EcoRI-HindIII*-Fragment (150 000 cpm) wurde mit zehn verschiedenen Konzentrationen von Rem-Protein inkubiert. Spur G/A: G + A – Sequenzreaktion der DNA-Sonde nach Maxam und Gilbert (3.11.2.); Spuren 1 – 10: Zusatz von 0, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 und 8000 ng Rem-Protein. Der schwarze Balken kennzeichnet den vor dem DNaseI-Verdau geschützten DNA - Bereich. **A.** Radioaktive Markierung der DNA-Sonde am 5'-*EcoRI*-Ende; **B.** Radioaktive Markierung der DNA-Sonde am 5'-*HindIII*-Ende (Details 3.11. und im Text).

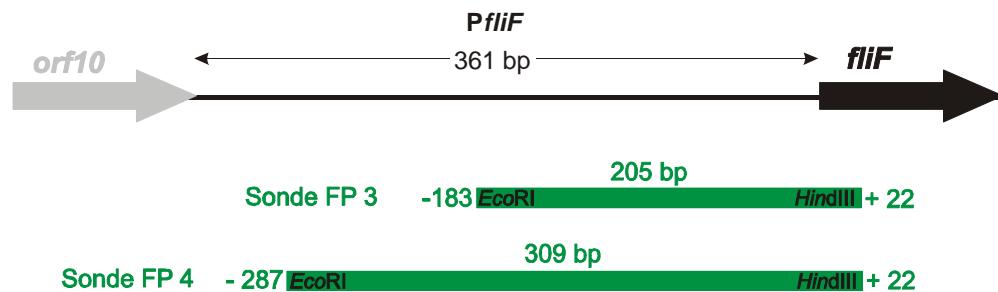
Die Lage der Bindestelle wurde mittels Sequenzstandard (Abb. 34, G+A) exakt lokalisiert. Es zeigte sich, daß die Sequenzen der Rem-Bindestellen bei verschiedener Markierung komplementär zueinander liegen. Das Rem-Protein bindet also an einen spezifischen Bereich des *flgB*-Promotors. Die intercistronische *orf23-flgB*-Region mit der identifizierten Rem-Bindestelle zeigt Abb. 36. Rem bindet an eine 33 bp lange Sequenz 28 bp aufwärts vom *flgB*-Translationsstart.



**Abb. 36.** Sequenzdiagramm der Rem-Bindestelle (rot) an *PflgB*-DNA (aus Abb. 35). Die C-terminalen AS-Reste von *orf 23* sind angegeben. Der *f1gB*-Translationsstart und die N-terminale AS-Sequenz von FlgB sind blau gekennzeichnet. Schnittstellen der Sonde FP 2 sind eingetragen. SD = Shine-Dalgarno-Sequenz.

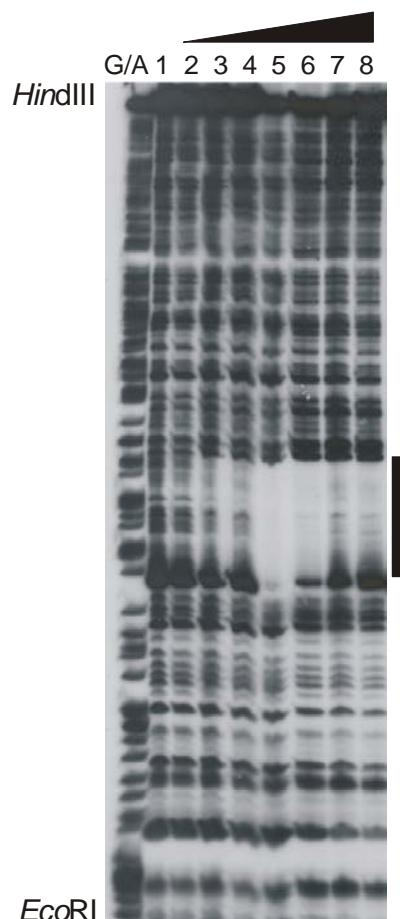
#### 4.1.12.2. Bindung von Rem an den *fliF*-Promotor

Ein weiterer Klasse II-Promotor kontrolliert die Transkription des *fliF*-Gens, das für ein 59 kDa Monomer des MS-Rings im Flagellenmotor codiert (Sourjik *et al.*, 1998) und von Rem reguliert wird. Zur Etablierung eines *footprints* wurde in gleicher Weise wie beim *f1gB*-Promotor verfahren (4.1.12.1.). Der intercistronische Bereich zwischen den Genen *orf10* und *fliF* hat eine Länge von 361 bp. Auf der Basis von Sequenzvergleichen mit der identifizierten Rem-Bindestelle im *f1gB*-Promotor (Abb. 36) wurde eine mögliche Rem-Bindestelle etwa 100 bp aufwärts vom *fliF*-Tranlsationsstart lokalisiert. Die DNA-Sonde FP 3 wurde dementsprechend auf 205 bp (von +22 bis -183 des *fliF*-Promotors relativ zum *fliF*-Translationsstart) beschränkt (Abb. 37). Die Sonde wurde am 5'-*EcoRI*-Ende radioaktiv markiert und in das *footprinting*-Experiment eingesetzt (3.11.). Die resultierende Rem-Bindestelle lag jedoch im Bereich der *EcoRI*-Schnittpunkt der Sonde FP 3 (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde eine 5'-verlängerte, 309 bp-Sonde FP 4 hergestellt und am neuen 5'-Ende (*EcoRI*) markiert (Abb. 37).



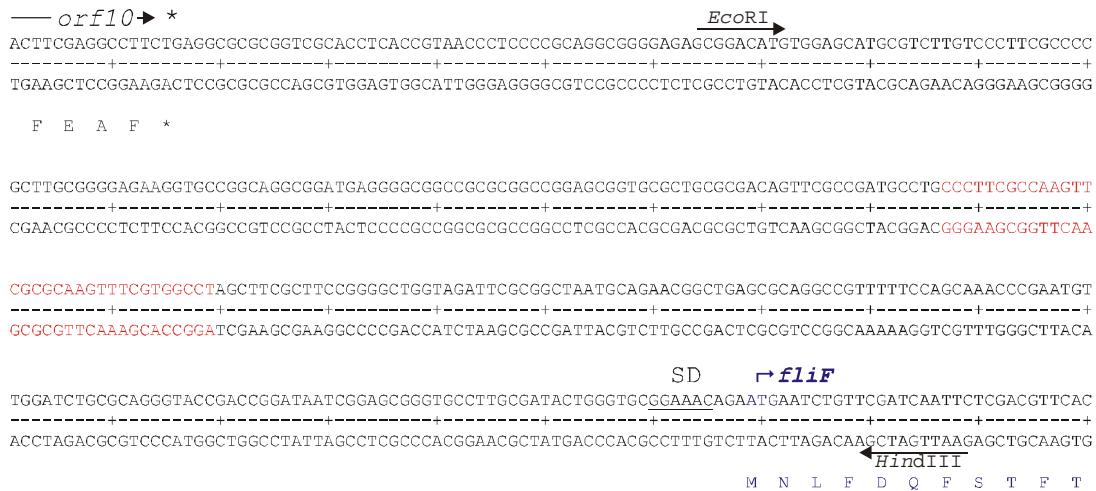
**Abb. 37.** Diagramm der Sonden FP 3 und FP 4 für die DNaseI-Footprint-Experimente am *fliF*-Promotor. Pfeile: Gene und Transkriptionspolarität; grün: DNA-Sonden. Numerierung der Sonde relativ zum *fliF*-Translationsstart. Länge (bp) der Sonden markiert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen der Sonden sind in schwarz angegeben.

Eine Bindung des Rem-Proteins an die *PfliF*-Sonde FP 4 ab bei einer Proteinmenge von 50 ng ist deutlich zu erkennen (Abb. 38). Eine weitere Rem-Bindestelle im *fliF*-Promotor wurde auch in der verlängerten DNA-Sonde FP 4 nicht identifiziert.



**Abb. 38.** DNaseI-footprinting von *PfliF*-DNA mit Rem-Protein. Ein 309 bp großes *EcoRI-HindIII*-Fragment (150 000 cpm) wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Rem-Protein inkubiert. Spur G/A: G + A – Sequenzreaktion der DNA-Sonde nach Maxam und Gilbert; Spuren 1 – 8: Zusatz von 0, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 und 4000 ng Rem-Protein. Der schwarze Balken kennzeichnet den vor dem DNaseI-Verdau geschützten DNA – Bereich; Radioaktive Markierung der DNA - Sonde am 5'-*EcoRI*-Ende (Details 3.11. und im Text).

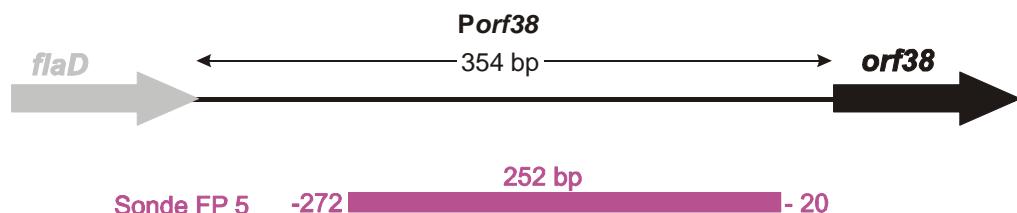
Dieses Ergebnis (rote Sequenz) ist anhand der intercistronischen *orf10-fliF*-Sequenz in Abb. 39 übersichtlich dargestellt. Die durch Rem-Bindung vor DNaseI-Verdau geschützte DNA-Sequenz umfaßte einen Bereich von 33 bp. Im Gegensatz zum *flgB*-Promotor liegt die Rem-Bindestelle im *fliF*-Promotor mit 149 bp deutlich weiter oberhalb des Translationsstarts.



**Abb. 39.** Sequenzdiagramm der Rem-Bindestelle (rot) an Pflf-DNA (aus Abb. 38). Die C-terminalen AS-Reste von *orf10* sind angegeben. Der *fliF*-Translationsstart und die N-terminale AS-Sequenz von FliF sind blau gekennzeichnet. Schnittstellen der Sonde FP 4 sind eingetragen. SD = Shine-Dalgarno-Sequenz.

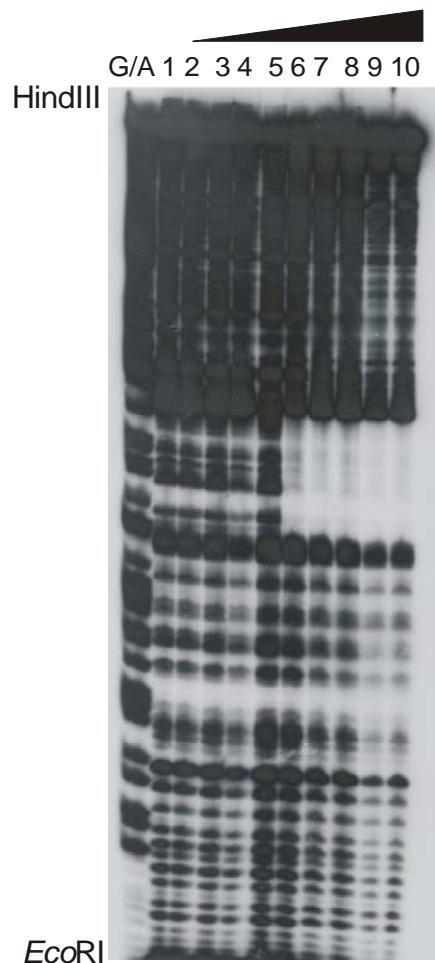
#### 4.1.12.3. Bindung von Rem an den *orf38*-Promotor

Ein weiteres *footprinting*-Experiment wurde mit dem Klasse II-Promotor des *orf38*-Gens durchgeführt. Je mehr verschiedene DNA-Bindesequenzen von Rem miteinander verglichen werden, desto sicherer kann eine Konsensussequenz der Rem-Bindestelle zugeordnet werden. Der intercistronische Sequenzbereich zwischen *flaD* und *orf38* von 354 bp wurde auch hier auf 252 bp verkürzt, um eine handliche Sonde FP 5 zu erhalten. Dabei dienten die bekannten Bindestellen im *flgB*- und *fliF*-Promotor als Orientierung (Abb. 40).



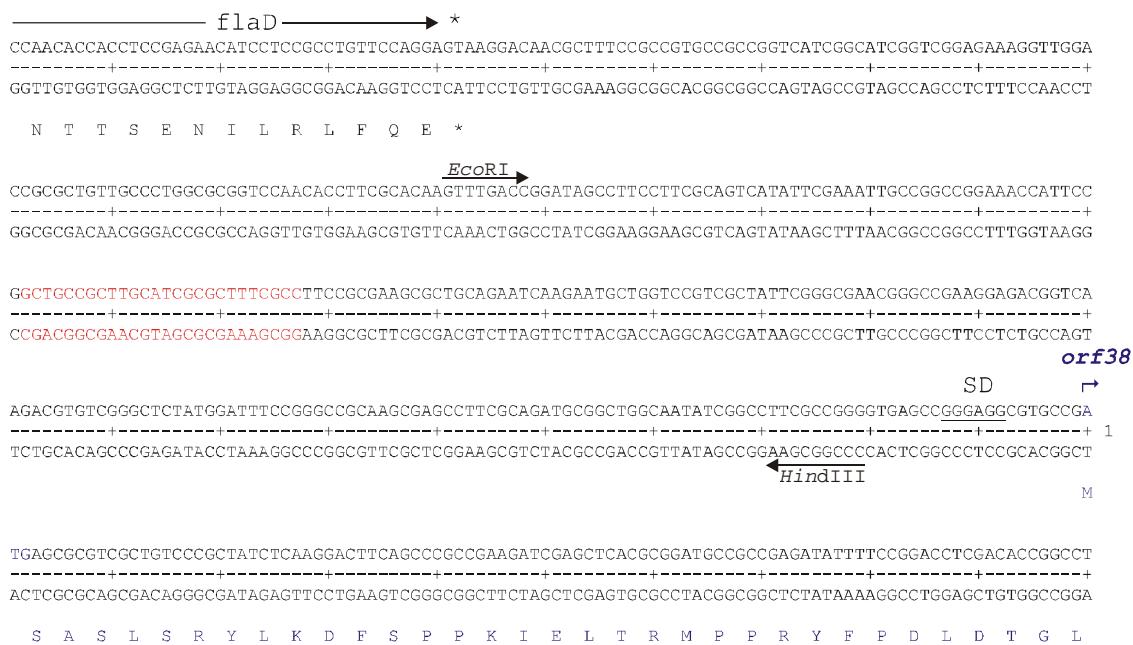
**Abb. 40.** Diagramm der Sonde FP 5 für das DNaseI-*footprinting*-Experiment am *orf38*-Promotor. Pfeile: Gene und Transkriptionspolarität; lila: DNA-Sonde. Numerierung der Sonde relativ zum *orf38*-Translationsstart. Länge (bp) der Sonde markiert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen der Sonde sind in schwarz angegeben.

Der Sinnstrang wurde am 5'-Ende der *EcoRI*-Schnittstelle [ $^{32}\text{P}$ ]-markiert (3.11.). Das Autoradiogramm (Abb. 41) zeigt deutlich einen 26 bp Sequenzbereich, der ab 1000 ng gebundenem Rem (Abb. 41, Bahn 6) vor DNaseI-Verdau geschützt ist.



**Abb. 41.** DNaseI-*footprinting* von *Porf38*-DNA mit Rem-Protein. Ein 252 bp großes *EcoRI*-*HindIII*-Fragment (150.000 cpm) wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Rem-Protein inkubiert. Spur G/A: G + A – Sequenzreaktion der DNA-Sonde nach Maxam und Gilbert; Spuren 1 – 10: Zusatz von 0, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 und 8000 ng Rem-Protein. Der schwarze Balken kennzeichnet den vor dem DNaseI-Verdau geschützten DNA – Bereich; Radioaktive Markierung der DNA - Sonde am 5'-*EcoRI*-Ende (Details 3.11. und im Text).

Mit einer Länge von 26 bp ist die Rem-Bindestelle im *orf38*-Promotor kürzer als die 33 bp langen Bindestellen von *PflgB* bzw. *PflfF*. Eine Übersicht über die *flaD-orf38*-intercistronische Region und die Lage der Rem-Bindestelle, 172 bp vor dem Translationsstart von *orf38*, zeigt Abb. 42.



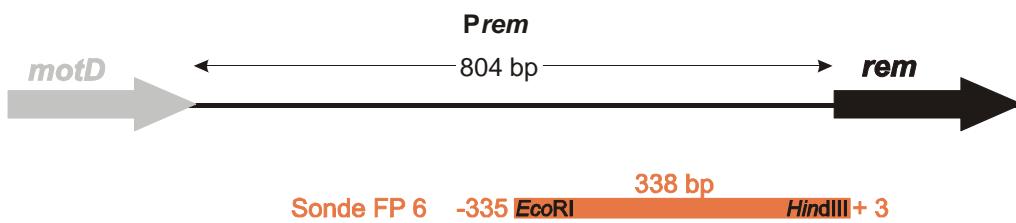
**Abb. 42.** Sequenzdiagramm der Rem-Bindestelle (rot) an *Porf38*-DNA (aus Abb. 41). Die C-terminalen AS-Reste von FlaD sind angegeben. Der *orf38*-Translationsstart und die N-terminale AS-Sequenz von Orf38 sind blau gekennzeichnet. Schnittstellen der Sonde FP 5 sind eingetragen. SD = Shine-Dalgarno-Sequenz.

Damit wurden in Übereinstimmung mit der positiven Kontrolle von *flgB*, *fliF* und *orf38* durch Rem (Reportergenanalysen; Mühlbacher, 2000) ca. 30 bp-Bindestellen in deren Promotorregionen identifiziert.

#### 4.1.12.4. Bindung von Rem an den *rem*-Promotor

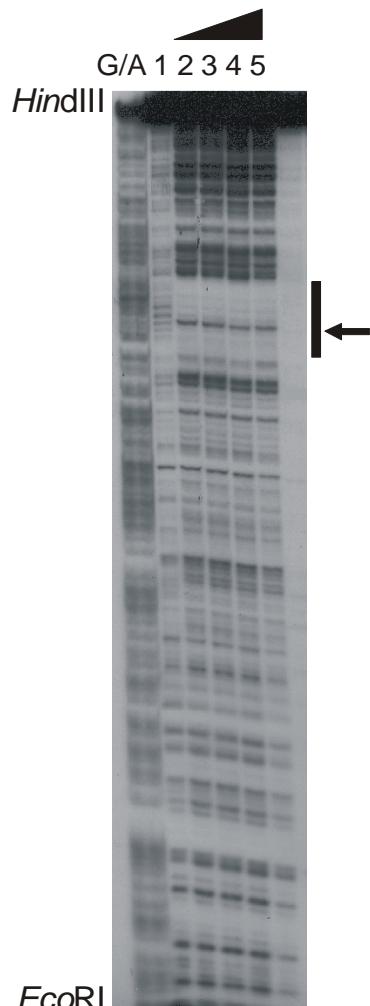
Durch *lacZ*-Reportergenanalyse wurde eine komplexe autoregulatorische Rolle von Rem festgestellt (Abb. 18; Tab. 6). Korreliert dieser Befund mit einer Bindung von Rem an den Promotorbereich des eigenen Gens? Autoregulation ist ein bekanntes Phänomen bei Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel bei HP1043 von *Helicobacter pylori* (Delany *et*

*al.*, 2002) oder bei CtrA von *Brucella abortus* (Bellefontaine *et al.*, 2002). Aufgrund der bisher ermittelten Rem-Bindestellen und Literaturrecherche über vergleichbare bakterielle Regulatoren, erschien eine DNA-Bindung des Rem-Proteins über 335 bp vor dem Translationsstart als unwahrscheinlich, obwohl der intercistronische Bereich zwischen den Genen *motD* und *rem* mit 804 bp relativ groß ist. Als DNA-Sonde wurde ein 338 bp Fragment gewählt (Abb. 43).

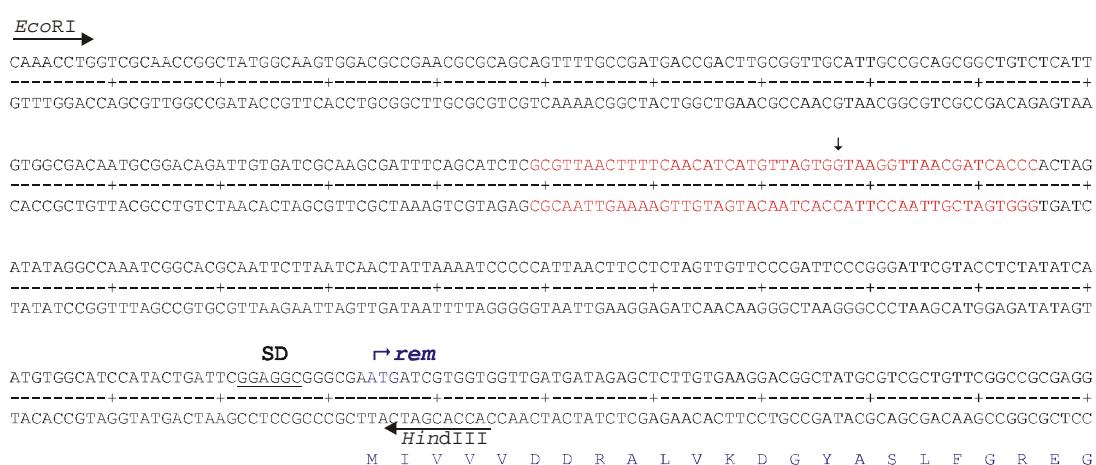


**Abb. 43.** Diagramm der Sonde FP 6 für das DNaseI-*footprinting*-Experiment am *rem*-Promotor. Pfeile: Gene und Transkriptionspolarität; orange: DNA-Sonde. Numerierung der Sonde relativ zum *rem*-Translationsstart. Länge (bp) der Sonde markiert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen der Sonde sind in schwarz angegeben.

Die DNA-Sonde FP 6 wurde wieder am 5'-Ende des *Eco*RI-Schnittes radioaktiv markiert, gereinigt und zusammen mit Rem-Protein in die *footprinting*-Experimente eingesetzt (3.11.). In Abb. 44 ist das Ergebnis des *footprinting*-Experiments wiedergegeben. Ab 500 ng Rem-Protein wurde eine schwache Bindung an den *rem*-Promotor detektiert. Eine hypersensitive Stelle, die in Abb. 44 mit einem Pfeil markiert ist, wurde zentral in der Rem-Bindestelle identifiziert: Durch die DNA-Bindung des Proteins werden wie hier innerhalb der Bindestelle frei zugängliche Nukleotide gespalten. Die Bindung an den *rem*-Promotor war im Vergleich zu den Klasse II-Promotoren, *flgB*, *fliF* und *orf38*, schwächer. Die beobachtete Autoregulation von *rem* (Abb. 18; Tab. 6) wirkt als Feinabstimmung der Transkription, während VisNR die übergeordnete Regulation übernimmt. Das macht eine geringere Affinität des *rem*-Promotors für die regulatorische Bindung von Rem plausibel. Die 47 bp Rem-Bindestelle wurde mit Hilfe der G + A- Reaktion (3.11.2.) 138 bp vor dem *rem*-Translationsstart lokalisiert; sie ist in der Sequenz des *rem*-Promotors durch rote Markierung hervorgehoben (Abb. 45).



**Abb. 44.** DNaseI-footprinting von *Prem*-DNA mit Rem-Protein. Ein 338 bp großes *Eco*RI-*Hind*III-Fragment (150.000 cpm) wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Rem-Protein inkubiert. Spur G/A: G + A – Sequenzreaktion der DNA-Sonde nach Maxam und Gilbert; Spuren 1 – 5: Zusatz von 0, 500, 1000, 2000 und 4000 ng Rem-Protein. Der schwarze Balken kennzeichnet den vor dem DNaseI-Verdau geschützten DNA – Bereich. Ein DNaseI-hypersensitiver Bereich ist mit einem Pfeil markiert. Radioaktive Markierung der DNA - Sonde am 5'-*Eco*RI-Ende (Details 3.11. und im Text).



**Abb. 45.** Sequenzdiagramm der Rem-Bindestelle (rot) an *Prem*-DNA (aus Abb. 44). Der *rem*-Translationsstart und die N-terminale AS-Sequenz von Rem sind blau gekennzeichnet. Schnittstellen der Sonde FP 6 sind eingetragen. Pfeil = hypersensitive Stelle; SD = Shine-Dalgarno-Sequenz.

#### 4.1.12.5. Bindet Rem über einen spezifischen Konsensus an die Promotor-DNA ?

Wie eben beschrieben, konnte die Bindung des Rem-Proteins an drei Klasse II-Promotoren, *flgB*, *fliF* und *orf38*, und den *rem*-Promotor in *footprinting*-Experimenten nachgewiesen werden. Es stellte sich die Frage, ob Rem über eine spezifische Konsensussequenz an die Promotor-DNA bindet. Mittels Sequenzvergleich der identifizierten Rem-Bindestellen konnte innerhalb der Klasse II-Promotoren eine unvollständige direkte Wiederholungssequenz von je sieben aufeinander folgenden Basen mit dem Konsensus CGSCWWG-N<sub>5</sub>-CGC.AAG identifiziert werden (Abb. 46). Die Bindung von Rem an die *motA*- und *orf20*-Promotoren der beiden verbleibenden Klasse II-Operons (Abb. A1, Anhang) wurde noch nicht in *footprinting*-Experimenten untersucht. Wie in Abb. 46 zu erkennen ist, befindet sich aber eine analoge Konsensussequenz auch in diesen Promotoren.



**Abb. 46.** Vergleich der DNA-Bindemotive von Rem-Protein. Rot: Identische Nukleotide; grau: ähnliche Nukleotide an identischen Positionen der sechs verglichenen Sequenzen. Unvollständige direkte Wiederholungssequenzen der Klasse II-Promotoren sind mit gestrichelter Linie umrandet. Die Konsensussequenz der mit Stern gekennzeichneten Promotoren wurden anhand von Sequenzvergleichen identifiziert. Pfeil markiert die Position der hypersensitiven Stelle im *rem*-Promotor.

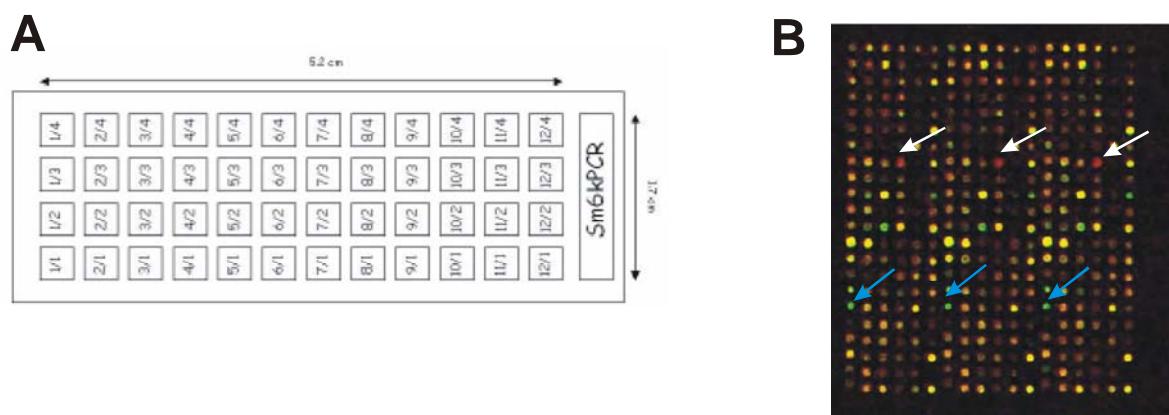
Im Vergleich zu P*flgB* und P*fliF* ist die Sequenz der Rem-Bindestelle im *orf38*-Promotor deutlich schwächer konserviert (Abb. 46). Diese Tatsache erklärt, warum in P*flgB*- und P*fliF*-*footprinting*-Experimenten schon ab 50 ng, in P*orf38*-*footprinting*-Experimenten jedoch erst ab 1000 ng Rem-Protein DNA-Bindung detektierbar war. Ein Zusammenhang zwischen den Expressionsstärken der Promotoren und dem Grad der Konserviertheit des Rem-Konsensus ist nicht zu erkennen, da für P*fliF* und P*orf38* identische Promotoraktivitäten von 200 *Miller Units* gemessen wurden (Muschler, 2000).

Innerhalb der Rem-Bindestelle des *rem*-Promotors konnten zwar einzelne Nukleotide der Konsensussequenz der Klasse II-Promotoren noch identifiziert werden, die direkte Wiederholungssequenz ist aber deutlich schlechter konserviert. Dieser Befund ist nicht weiter verwunderlich, da der autoregulatorische Einfluß von Rem - neben der primären Regulation durch VisNR - als zusätzliche Feinabstimmung zu betrachten ist (4.1.12.4.). Die relative Lage der vier Rem-Bindestellen zum jeweiligen Transkriptionsstart ist bisher unbekannt, da mittels *Primer Extension*-Analysen von keinem der hier untersuchten Promotoren ein eindeutiger Transkriptionsstart bestimmbar war. Mögliche Promotorelemente (Transkriptionsstart, -10-Box, -35-Box) sind jedoch Gegenstand der Diskussion (5.3.).

#### 4.1.13. Die Transkriptome von RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ )

Global regulatorisch aktive Proteine sind nicht selten in ein größeres Netzwerk verschiedener Signal- und Stoffwechselwege integriert. Deswegen lag es nahe zu testen, ob auch der globale Transkriptionsfaktor Rem von *S. meliloti* an der Regulation von Genen außerhalb des *flagellar regulon* beteiligt ist. DNA-Chip-Technologie (*microarray*) bietet die Möglichkeit, veränderte Expressionmuster des Gesamtgenoms eines Organismus in Abhängigkeit von verschiedenen Zuständen zu untersuchen. Hier wurden die Expressionsprofile von RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) in der exponentiellen Wachstumsphase von *S. meliloti* mittels DNA-Chip-Technologie verglichen, um auf diese Weise ein Spektrum der Rem-regulierten Gene des *S. meliloti*-Genoms zu erfassen. Die Analysen wurden am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld in Zusammenarbeit mit PD Dr. Anke Becker durchgeführt. Auf dem verwendeten DNA-Chip Sm6kPCR sind alle 6207 durch das *S. meliloti*-Genomprojekt identifizierten, protein-codierenden Leserahmen (Galibert *et al.*, 2001) durch Gensonden repräsentiert. Der Sm6kPCR-Chip ist ein Glasobjekträger, auf dem 48 Raster in einem 4 x 12 Muster angeordnet sind. Pro Raster können 24 x 18 Gensonden punktförmig aufgetragen werden (Rüberg *et al.*, 2003). Ein Schema der verwendeten Chips Sm6kPCR ist in Abb. 47 A dargestellt. Die 6207 Gensonden aus 6046 PCR-Fragmenten einer Länge von 80 bp bis 350 bp und 161 70meren Oligonukleotiden sind in dreifacher Wiederholung auf den DNA-Chip aufgetragen. Da durch die 6207 Gensonden das *S. meliloti*-Genom vollständig

repräsentiert ist, bleiben 705 Positionen in den Rastern frei, die nach Hybridisierung als Hintergrundabgleich verwendet werden. Des Weiteren werden drei PCR-Fragmente aufgetragen, die keine Sequenzhomologie zu irgendeiner bekannten bakteriellen oder pflanzlichen Sequenz aufweisen (*Spot Report Alien PCR product 1 bis 3, Stratagene, La Jolla, CA, USA*). Über diese DNA-Fragmente kann zusätzlich der Hintergrund der nichtspezifischen Hybridisierung abgeschätzt werden. Pro Gensonde werden ungefähr 250 pg DNA in 3x SSC / 1,5 M Betain maschinell auf den mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan beschichteten Objektträger aufgetragen und durch 3h Inkubation bei 80° C fixiert. Durch anschließende dreiminütige Inkubation des DNA-Chips bei 100° C werden die Gensonden denaturiert und können so mit cDNA hybridisiert werden.



**Abb. 47 A.** Schema eines DNA-Chips (Modell Sm6kPCR, Universität Bielefeld). Quadrate repräsentieren 48 auf dem Chip angeordnete Raster. Pro Raster wurden 24 x 18 Gensonden aufgetragen, die jeweils ca. 250 pg DNA enthalten. Jede Sonde liegt als Triplikat auf dem DNA-Chip vor. **B.** Vergrößerung eines Rasters nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter cDNA. Einzelne Punkte repräsentieren jeweils eine definierte Gensonde. Pfeile identischer Farbe heben jeweils ein Triplikat einer Gensonde hervor. Weiße Pfeile verdeutlichen einen Überschuß an Cy5-markierter cDNA, blaue Pfeile einen Überschuß an Cy3-markierter DNA.

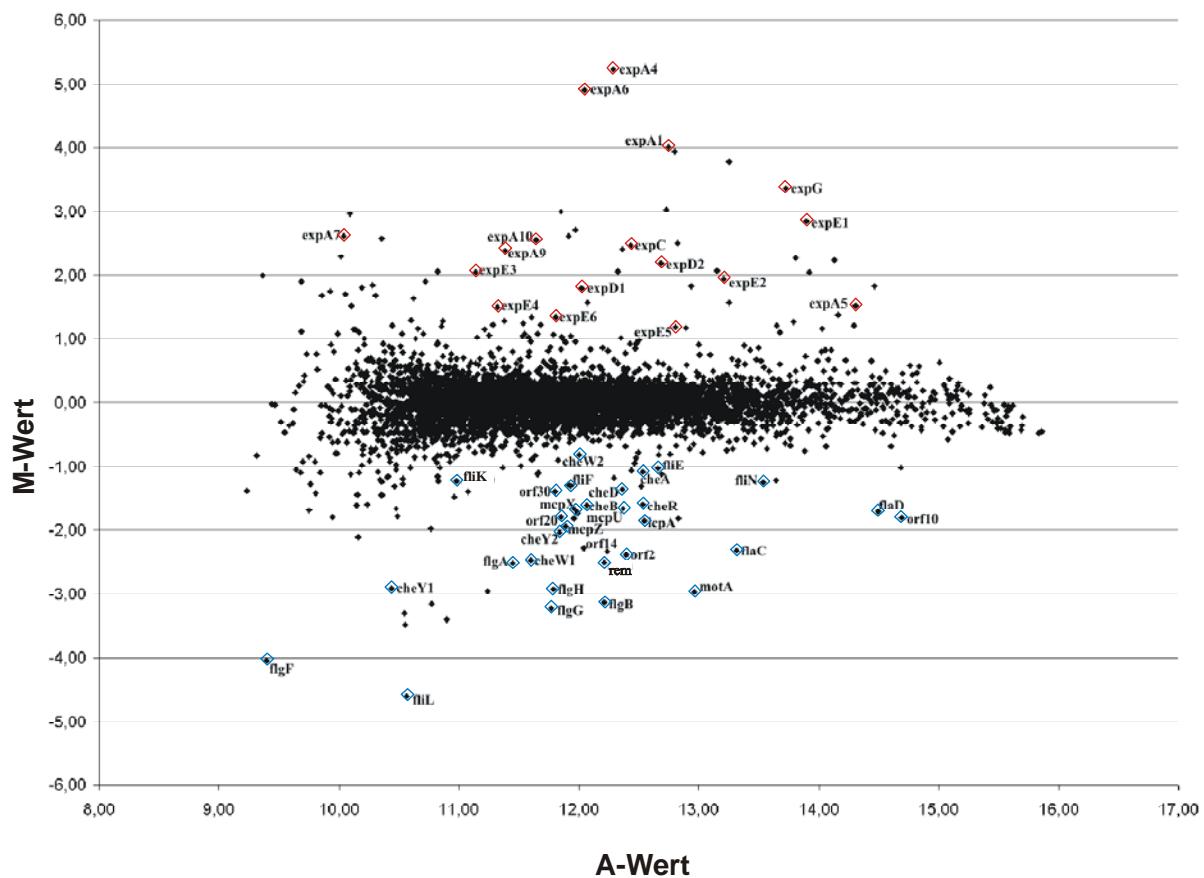
Die hier angewandte DNA-Chip-Technologie basiert auf folgendem Prinzip: Die zu vergleichenden Proben werden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Anschließend wird ein DNA-Chip mit diesen beiden Proben hybridisiert, was in einer Überlagerung der Signale aus den beiden Proben resultiert. Mittels Computeranalysen wird aus diesen Signalen ein vergleichendes Expressionsprofil der beiden Proben erstellt.

In dieser Arbeit wurden die Transkriptome von RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) in der exponentiellen Wachstumsphase (3.1.2.) verglichen. Im Detail wurde an die cDNA aus RU11/001 Cy3-Farbstoff, an die cDNA aus RU11/555 Cy5-Farbstoff gekoppelt (3.10.2.) und der DNA-Chip mit dem Gemisch aus Cy5- und Cy3-markierter cDNA hybridisiert (3.10.3.). Zur Visualisierung ist eines der 48 Raster eines DNA-Chips nach der Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten cDNA aus WT und *rem*-Deletionsmutante in Abb. 47 B vergrößert dargestellt. Eine rot fluoreszierende Gensonde auf dem DNA-Chip ist das Resultat einer verstärkten Hybridisierung mit Cy5-markierter cDNA (aus  $\Delta rem$ ). Folglich wurde in der *rem*-Deletionsmutante RU11/555 deutlich mehr des markierten Gens exprimiert als im WT RU11/001 (Überschuß an Cy5-markierter cDNA). Rem reprimiert danach die Transkription des in RU11/555 verstärkt transkribierten Gens. Grün fluoreszierende Gensonden repräsentieren dagegen einen Überschuß an Cy3-markierter cDNA, also eine gesteigerte Expression eines Gens im WT RU11/001 gegenüber RU11/555. In diesem Fall aktiviert Rem die Transkription des Gens. Gelb fluoreszierende Gensonden wiederum spiegeln ein Gleichgewicht an Cy5- und Cy3-markierter cDNA wieder, die Deletion des *rem*-Gens bewirkte bezüglich dieser Gene keine differentielle Expression.

Für den Vergleich der Transkriptome wurde von drei unabhängigen WT (RU11/001)- und  $\Delta rem$  (RU11/555)-Kulturen Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNA präpariert und anschließend jeweils ein cDNA-Gemisch mit einem DNA-Chip hybridisiert. Durch die Analyse der *rem*-abhängigen Genexpression in drei unabhängigen biologischen Replikaten wurden Artefakte erkannt und bei der Auswertung der Fluoreszenzdaten eliminiert. Zudem wurde jedes *S. meliloti*-Gen durch je ein Triplikat identischer Gensonden auf dem DNA-Chip repräsentiert, so daß jedes Gen insgesamt neunmal auf differentielle Expression in RU11/001 und RU11/555 untersucht wurde.

Durch computergestützte Auswertung der Fluoreszenzdaten wurden die in RU11/001 und RU11/555 differentiell exprimierten Gene identifiziert. Mit einem M-Wert  $\leq -0,98$  oder  $\geq 0,98$ , einem A-Wert  $\geq 9,0$  und einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurde ein Gen als signifikant unterschiedlich exprimiert betrachtet. Der M-Wert entspricht dem zweifachen Logarithmus des Verhältnis der Signalintensitäten der mit ein- und derselben Gensonde hybridisierten Cy5- und Cy3-markierten cDNA. Der A-Wert errechnet sich aus dem zweifachen Logarithmus der Gesamtsignalintensität einer mit fluoreszenzmarkierter cDNA hybridisierten Gensonde, durch den p-Wert wird die statistische

Wahrscheinlichkeit angegeben (3.10.4.). Da die Größe der 6206 auf einen DNA-Chip aufgetragenen DNA-Fragmente unterschiedlich ist und die Konzentrationen der aufgetragenen DNA-Lösungen variieren können, dürfen die erhaltenen Hybridisierungssignale nicht als Absolutwerte für die Stärke der Expression eines Gens betrachtet werden. In den hier durchgeführten DNA-Chip-Analysen konnte folglich nur untersucht werden, ob prinzipiell differentielle Genexpression zwischen den beiden Stämmen RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) stattfindet.



**Abb. 48.** Differentielle Transkription des *S. meliloti*-Gesamtgenoms ohne und mit *rem*-Deletion. Das Resultat des Gesamtgenom-Vergleichs in der exponentiellen Wachstumsphase mittels DNA-Chip-Analysen ist schematisch dargestellt. RNA aus RU11/001 (Wildtyp) wurde Cy3-markiert, RNA aus RU11/555 ( $\Delta rem$ ) wurde Cy5-markiert. M-Wert: Verhältnis der zweifachen logarithmischen Werte des Cy5- und Cy3-Signals; A-Wert: zweifacher logarithmischer Wert der Signalintensität. Unterschiedliche Expression der Gene mit M-Werten  $\geq 0,98$  oder  $\leq -0,98$ , A-Wert  $\geq 9,0$  und p-Wert (statistische Wahrscheinlichkeit)  $\leq 0,05$ . Gene mit positiven M-Werten wurden in der  $\Delta rem$ -Mutante aktiviert, Gene mit negativem M-Wert reprimiert. Blau: aktivierende Wirkung von Rem auf Gene des *flagellar regulon*. Rot: reprimierende Wirkung von Rem auf Gene des *exp*-Genclusters.

Es wurden 170 Gene identifiziert, die in RU11/001 und RU11/555 unterschiedlich exprimiert werden (Abb. 48). Von diesen zeigten 73 gesteigerte Expression in der *rem*-Deletionsmutante RU11/555, die Expression der restlichen 63 Gene nahm ab. Auffällig war vor allem die *rem*-abhängige Expression von zwei Genclustern. Diese betreffen die meisten Gene des *flagellar regulon* (reduziert) und Gene der Galactoglucan-Biosynthese (erhöht). Zur Veranschaulichung sind die differentiell exprimierten Gene dieser beiden auffälligen Gencluster im Diagramm der Transkriptionsanalyse in Abb. 48 blau bzw. rot hervorgehoben und in den Tabellen 11 und 12 zusammengefaßt. Erwartungsgemäß wurden 27 der 51 Gene des *flagellar regulon* in der *rem*-Deletionsmutante RU11/555 signifikant reduziert transkribiert (Tab. 11). Die 51 Gene des *flagellar regulon* sind in vierzehn Operons - sechs monocistronischen, zwei bicistronischen und sechs polycistronischen - organisiert (Abb. A1; Muschler, 2000). Die differentiell exprimierten Gene wurden zehn der vierzehn verschiedenen Operons zugeordnet. Diese sind der transkriptionellen Kontrolle von Rem untergeordnet. Ferner wurden drei Gene für Methyl-akzeptierende Chemotaxisproteine, *mcpZ*, *mcpU* und *mcpX*, als Rem-abhängig identifiziert. Auch die Transkription des *cheW2*-Gens, das zusammen mit *cheR*, *mcp*, *cheA* und *cheB* in einem zweiten *che*-Operon auf dem Megaplasmid pSymA lokalisiert ist, wurde durch die Anwesenheit des Rem-Proteins aktiviert.

**Tab. 11.** DNA-Chip-Analyse: Signifikant reduziert transkribierte Gene des *flagellar regulon* in RU11/555 ( $\Delta rem$ ) im Vergleich zu RU11/001 (WT)<sup>1)</sup>

Nomenklatur <sup>2)</sup>	Funktion des Genprodukts	M-Wert <sup>3)</sup>
<i>smc00765</i>	McpZ, methylierbarer Chemotaxisrezeptor	-1,80
<i>smc00975</i>	McpU, methylierbarer Chemotaxisrezeptor	-1,94
<i>smc01104</i>	McpX, methylierbarer Chemotaxisrezeptor	-1,68
<i>smc01468</i>	CheW2, Chemotaxisprotein	-1,74
<i>smc03004</i>	IcpA, cytoplasmatischer Rezeptor	-1,86
<i>smc03005</i>	Orf2, Chemotaxisprotein	-2,39
<i>smc03006</i>	CheY1, Responsregulator	-2,91
<i>smc03007</i>	CheA, Histidinkinase	-1,09
<i>smc03008</i>	CheW1, Chemotaxisprotein	-2,48

<i>smc03009</i>	CheR, Methyltransferase	-1,59
<i>smc03010</i>	CheB, Methylesterase	-1,61
<i>smc03011</i>	CheY2, Responsregulator	-2,04
<i>smc03012</i>	CheD, Chemotaxisprotein	-1,36
<i>smc03013</i>	Orf10, hypothetisches Protein	-1,82
<i>smc03014</i>	FliF, Komponente des MS-Rings	-1,30
<i>smc03017</i>	Orf14, hypothetisches Protein	-2,27
<i>smc03020</i>	FliN, Komponente des C-Rings	-1,26
<i>smc03022</i>	MotA, Komponente des Motors	-2,97
<i>smc03023</i>	Orf20, hypothetisches Protein	-1,82
<i>smc03024</i>	FlgF, Schaftprotein	-4,05
<i>smc03027</i>	FlgB, Schaftprotein	-3,14
<i>smc03029</i>	FliE, Schaftprotein	-1,03
<i>smc03030</i>	FlgG, Schaftprotein	-3,23
<i>smc03031</i>	FlgA, periplasmatisches Chaperon für P-Ring	-2,52
<i>smc03033</i>	MotE, periplasmatisches Chaperon für MotC	-0,99
<i>smc03034</i>	FlgH, Komponente des L-Rings	-2,92
<i>smc03035</i>	FliL, Transmembranprotein	-4,60
<i>smc03039</i>	FlaC, Flagellin	-1,82
<i>smc03040</i>	FlaD, Flagellin	-2,32
<i>smc03044</i>	FliK, Längenregulator des Hakens	-1,23
<i>smc03046</i>	Rem, Transkriptionssregulator	-2,50
<i>smc03056</i>	hypothetisches Protein	-1,10
<i>smc03057</i>	hypothetisches Transmembranprotein	-3,30
<i>smc03071</i>	hypothetisches Protein	-2,96
<i>smc03072</i>	hypothetisches Protein	-3,40

<sup>1)</sup> Kriterien für eine signifikante Repression waren: M-Wert  $\leq -0,98$ , P-Wert  $\leq 0,05$ , A-Wert  $\geq 9,0$ ; pro Gen mußten jeweils mindestens vier von neun analysierten Replikaten diese Ausschlußkriterien erfüllen, um in die Wertung miteinbezogen zu werden.

<sup>2)</sup> nach Galibert *et al.* (2001)

<sup>3)</sup> M-Wert = zweifacher logarithmischer Wert des Intensitätsverhältnisses von hybridisierter, Cy3- und Cy5-markierter cDNA aus RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) (3.10.4.)

Interessanterweise wurde durch die DNA-Chip-Analysen noch ein weiteres Gencluster des *S. meliloti*-Genoms als Rem-abhängig reguliert identifiziert. In RU11/555 ( $\Delta rem$ ) wurden 18 Gene des *exp*-Genclusters deutlich stärker als in RU11/001 (WT) transkribiert (Abb. 48; Tab. 12). Die insgesamt 25 *exp*-Gene sind in einem 30 kb Gencluster in fünf Operons auf dem Megaplasmid pSymB lokalisiert (Becker *et al.*, 1997). Dementsprechend wurden sieben Gene des *exp*-Genclusters nicht als differentiell exprimiert identifiziert. Dieses Ergebnis kann durch Verluste bei der RNA-Präparation oder der Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten cDNA erklärt werden. Alternativ können Teile der hybridisierten cDNA durch diverse Waschschritte wieder von den komplementären Gensonden auf dem DNA-Chip gelöst werden. Durch die 18 als Rem-abhängig identifizierten *exp*-Gene wurden alle fünf Operons des *exp*-Genclusters repräsentiert (Abb. A2). Somit hat der positive Regulator des *flagellar regulon*, Rem, eine weitere Funktion als Repressor der *exp*-Gene. Die *exp*-Gene werden für die Biosynthese des Exopolysaccharids Galactoglucan benötigt. Galactoglucan und ein weiteres Exopolysaccharid, Succinoglycan, sind für die Etablierung einer funktionellen Symbiose zwischen *S. meliloti* und *M. sativa* unabdingbar (Glazebrook & Walker, 1989). Die Expression der *exp*-Gene wird durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk kontrolliert (Abb. 2), das in der Einleitung detailliert erläutert wurde. Unter anderem wird die Transkription dieser Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte (Pellock *et al.*, 2002) oder unter Phosphatmangel über den positiven Regulator ExpG induziert (Rüberg *et al.*, 1999). Mittels DNA-Chip-Technologie wurde Rem als weiterer Regulator der *exp*-Gene identifiziert.

**Tab. 12.** DNA-Chip-Analysen: Signifikant erhöht transkribierte Gene der Exopolysaccharid-Biosynthese in RU11/555 ( $\Delta rem$ ) im Vergleich zu RU11/001 (WT)<sup>1)</sup>.

Nomenklatur <sup>2)</sup>	Funktion des Genprodukts	M-Wert <sup>3)</sup>
<i>smb20932</i>	ExsH, Endo-1,3-1,4-beta-Glycanase	2,41
<i>smb20951</i>	ExoI, periplasmatisches Protein	1,56
<i>smb20952</i>	hypothetisches Protein im <i>exo</i> -Operon	2,58
<i>smb20955</i>	ExoK, Endo-beta-1,3-1,4-Glycanase	1,08
<i>smb20957</i>	ExoA, Glucosyltransferase	1,33

<i>smb20960</i>	ExoN, UDP-Glucosepyrophosphorylase	1,51
<i>smb21308</i>	ExpE7, Glycosyltransferase	1,15
<i>smb21309</i>	ExpE6, Membranprotein	1,34
<i>smb21310</i>	ExpE5, Membranprotein	0,97
<i>smb21311</i>	ExpE4, Glycosyltransferase	1,49
<i>smb21312</i>	ExpE3, Mehtyltransferase	2,05
<i>smb21313</i>	ExpE2, bifunktionelle Glycosyltransferase	1,94
<i>smb21314</i>	ExpE1, sekretiertes Calcium-bindendes Protein	2,84
<i>smb21315</i>	ExpD2, Mitglied der HlyD-Familie; sekretiert ExpE1	2,18
<i>smb21316</i>	ExpD1, ABC-Transporter-protein; sekretiert ExpE1	1,80
<i>smb21317</i>	ExpG, Transkriptionsaktivator der MarR-Famillie für Exopolysaccharid II-Synthese	3,36
<i>smb21318</i>	ExpC, Glycosyltransferase	2,48
<i>smb21319</i>	ExpA1, Membranprotein	4,01
<i>smb21321</i>	ExpA4, Membranprotein	5,23
<i>smb21322</i>	ExpA5, Membranprotein	1,38
<i>smb21323</i>	ExpA6, Protein unbekannter Funktion	4,90
<i>smb21324</i>	ExpA7, Glucose-1-phosphatthymidyltransferase	2,62
<i>smb21326</i>	ExpA9, dTDP-D-Glucose 4, 6- dehydratase	2,38
<i>smb21327</i>	ExpA10, dTDP-4-Dehydrorhamnose-Reductase	2,56

<sup>1), 2), 3)</sup> vgl Tab. 11.

Desweiteren wurde durch das Rem-Protein noch die Transkription von sechs für die Biosynthese von Succinoglycan benötigten Gene reprimiert (Tab. 12), so daß Rem möglicherweise auch an der Regulation der Succinoglycan-Biosynthese - über die bisher nur wenig bekannt ist - beteiligt ist. Vier der reprimierten Gene, *exsH*, *exoK*, *exoA* und *exoN* codieren für Proteine mit enzymatischer Funktion, für die zwei anderen Gene *exoI* und *smb20952* ist bisher keine Funktion bekannt.

#### 4.1.14. Promotoraktivitäten repräsentativer *exp*-Gene in *S. meliloti*-Wildtyp und drei Deletionsstämmen

Als unerwartetes, hochinteressantes Ergebnis der DNA-Chip-Analyse wurde das Rem-Protein als Repressor der *exp*-Genexpression identifiziert. Dieses Ergebnis wurde mit dem *lacZ*-Reportergen für zwei repräsentative Strukturgene des *exp*-Genclusters, *expA1* (Membranprotein) und *expE2* (Glycosyltransferase), überprüft. Des Weiteren wurde der Einfluß von Rem auf das *expG*-Gen, das für den positiven Regulator der Transkription der *exp*-Gene, ExpG, codiert (Rüberg *et al.*, 1999; Bartels *et al.*, 2003), untersucht. Reporterkonstrukte aus mit dem *lacZ*-Gen fusionierten *expA1*-, *expE2*- und *expG*-Promotorfragmenten wurden ins Genom von RU11/001 (WT) und RU11/555 ( $\Delta rem$ ) integriert (3.7.2.) und die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität im Wildtyp RU11/001 und in der *rem*-Deletionsmutante RU11/555 bestimmt (3.9.). Zusätzlich stellte sich die Frage, auf welche Weise Rem die Expression der *exp*-Gene reprimiert. Neben der Transkription der Galactoglucan-Biosynthesegene war auch die Transkription des *expG*-Gens in RU11/555 ( $\Delta rem$ ) deutlich erhöht (Tab. 12). Dieses Ergebnis ließ eine Repression des Transkriptionsfaktors ExpG durch Rem vermuten. Durch Bestimmung der *expA1*-, *expE2*- und *expG*-Promotoraktivitäten in der *expG/rem*-Doppelmutante RU13/112 wurde untersucht, ob die reprimierende Wirkung von Rem tatsächlich über ExpG vermittelt wird. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich die *exp*-Promotoraktivitäten in RU13/111 ( $\Delta expG$ ) untersucht. Die Promotoraktivitäten der drei *exp*-Reporterkonstrukte in WT und den drei Deletionsstämmen sind in Tab. 13 zusammengefaßt.

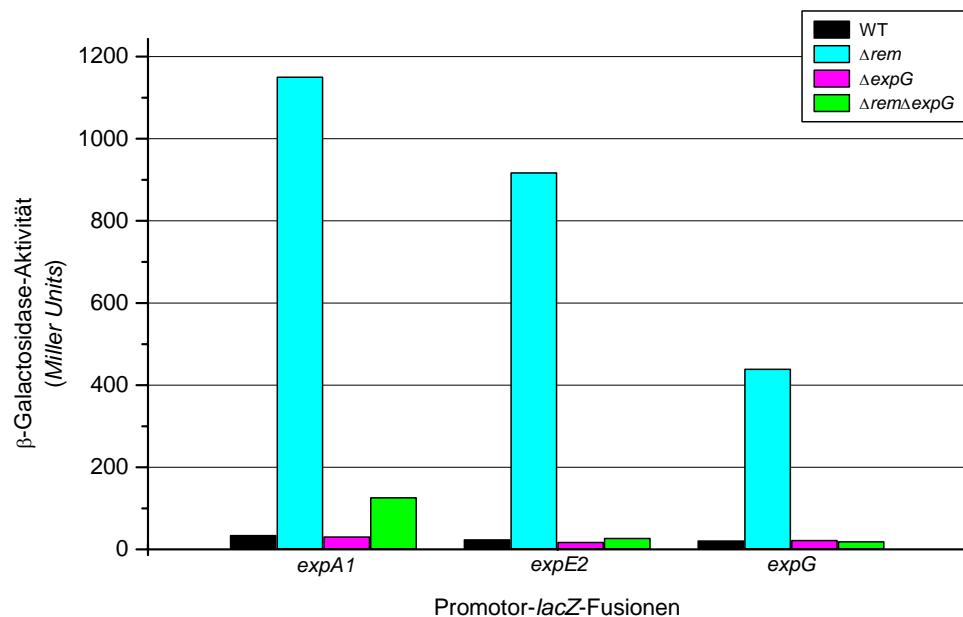
In RU11/001 (WT) wurde in Anwesenheit des Rem-Proteins kaum Aktivität der untersuchten *exp*-Promotoren gemessen. Dagegen erhöhte sich die Promotoraktivität bei allen *exp*-Promotoren in der *rem*-Deletionsmutante RU11/555 um das 20 bis 30fache (Tab. 13; Abb. 49). Der aus den DNA-Chip-Analysen gewonnene Hinweis auf eine Funktion von Rem als Repressor der *exp*-Gene konnte also durch die Promotoraktivitätsmessung bestätigt werden.

**Tab. 13.** Promotoraktivitäten der untersuchten *exp-lacZ* Fusionen in *S. meliloti* RU11/001 (WT), RU11/555 ( $\Delta rem$ ), RU13/111 ( $\Delta expG$ ) und RU13/112 ( $\Delta rem\Delta expG$ ).

<b>Promotor</b>	<b><math>\beta</math>-Galactosidaseaktivität (Miller Units)<sup>1)</sup></b>			
	<b>RU11/001 (WT)</b>	<b>RU11/555 (<math>\Delta rem</math>)</b>	<b>RU13/111 (<math>\Delta expG</math>)</b>	<b>RU13/112 (<math>\Delta rem\Delta expG</math>)</b>
pexpA#1014 ( <i>PexpA1</i> )	35 ± 1	1151 ± 160	31 ± 2	127 ± 11
pexpE#1022 ( <i>PexpE2</i> )	25 ± 1	919 ± 150	18 ± 2	28 ± 2
pBPboxG1G4 ( <i>PexpG</i> )	22 ± 1	440 ± 1	23 ± 2	20 ± 1

<sup>1)</sup>  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nach Miller (1972) wurde aus je fünf unabhängigen Experimenten bestimmt.

In Abwesenheit des positiven transkriptionellen Regulators ExpG war erwartungsgemäß bei allen drei untersuchten *exp*-Promotorkonstrukten kaum Aktivität meßbar (Tab. 13; Abb. 49).



**Abb. 49.** Histogramm der Reportergen-Aktivitäten von repräsentativen Promotoren der Exopolysaccharid-Biosynthese im *S. meliloti*-Wildtyp und drei Deletionsstämmen. Die Promotoraktivitäten wurden mittels Promotor-*lacZ* Fusionen bestimmt. Genetischer Hintergrund: Schwarz: RU11/001 (WT); blau: RU11/555 ( $\Delta rem$ ); rot: RU13/111 ( $\Delta expG$ ); grün: RU13/112 ( $\Delta rem\Delta expG$ ).

Falls Rem die Expression der *exp*-Gene auf einem von ExpG unabhängigem Weg reprimieren würde, so wären in RU13/112 ( $\Delta rem\Delta expG$ ) ähnlich hohe *exp*-Promotoraktivitäten zu erwarten wie in RU11/555 ( $\Delta rem$ ). Wie in Abb. 49 zu erkennen ist, war jedoch keine erhöhte  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in RU13/112 festzustellen, d. h. Rem reprimiert die Expression der *exp*-Gene tatsächlich durch Repression der ExpG-Expression. Rem wirkt wie ein Kippschalter, der in der exponentiellen Phase die Motilität an- und die Expression der Galactoglucanbiosynthese-Gene abstellt. Danach (und wenn die Zellen ihren Pflanzenwirt durch Chemotaxis gefunden haben) wird Rem abgebaut: Die Exopolysaccharide werden synthetisiert und sorgen für die Infektion der Wurzelhärchen.

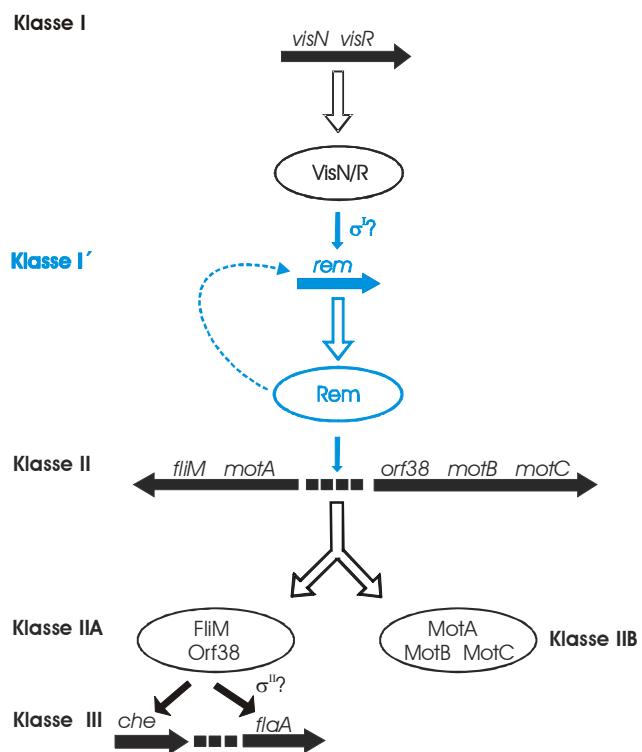
## 5. Diskussion

Die Charakterisierung des neuen Regulators Rem war zentraler Aspekt dieser Arbeit. Trotz der Analogie dieses Regulators zu typischen Responsregulatoren konnte eine posttranskriptionale Aktivierung von Rem durch Phosphorylierung nicht nachgewiesen werden. Da Rem nur in der exponentiellen Wachstumsphase von *S. meliloti* exprimiert wird, wird ein Rem-spezifischer, kurzlebiger Sigmafaktor postuliert, der aber bisher nicht identifiziert werden konnte. Außerdem wird Rem durch den globalen Klasse I-Regulator VisNR kontrolliert. Des Weiteren sprechen immunchemische Daten für einen schnellen proteolytischen Abbau von Rem. Es wurde gezeigt, daß Rem als DNA-bindender Transkriptionsfaktor autonom die Expression der Klasse II-Gene des *flagellar regulon* aktiviert. Interessanterweise wurde eine weitere regulatorische Funktion von Rem als Repressor der Galactoglucan (EPS II)-Biosynthesegene entdeckt. Der Faktor Rem wurde in ein komplexes regulatorisches Netzwerk, durch das Motilität und EPS-Synthese des symbiotisch aktiven Organismus *S. meliloti* kontrolliert werden, integriert.

### 5.1. Hierarchiekaskade der Genexpression bei *S. meliloti*

Die zeitliche Kopplung von Genexpression und Flagellenassemblierung bei motilen Bakterien garantiert den koordinierten Aufbau eines funktionellen Taxissystems (Chilcott & Hughes, 2000). Dabei ist die Einteilung der Gene eines *flagellar regulon* in verschiedene Hierarchieklassen und die systematische Genexpression entsprechend dieser Hierarchiekaskade Grundlage einer sinnvoll sukzessiven Synthese von Flagellen, der energetisierenden Protonenkanäle und der Sensorik. Wie in Abb. 50 dargestellt, können die Gene des *flagellar regulon* von *S. meliloti* den Hierarchieklassen I, I', II und III zugeordnet werden. An der Spitze dieser Hierarchiekaskade befinden sich die globalen Regulatoren VisN und VisR (Sourjik *et al.*, 2000), die für die Expression aller weiteren Komponenten des *flagellar regulon*, auch die des hier charakterisierten Regulators Rem, essentiell sind. Neben der positiven Kontrolle durch VisN und VisR wurde eine Autoregulation der *rem*-Transkription beobachtet (4.1.5.). Außerdem muß die *rem*-Transkription durch einen spezifischen Faktor ( $\sigma^I$  in Abb. 50) kontrolliert werden, da Rem selbst nur in der exponentiellen Wachstumsphase von *S. meliloti* exprimiert wird.

(Rotter, 2001), die übergeordneten Regulatoren VisN und VisR dagegen dauernd verfügbar sind (Sourjik *et al.*, 2000). Auch die positive Autoregulation der *rem*-Transkription allein kann die zeitlich limitierte Expression nicht erklären. Der Regulator Rem induziert, unabhängig von VisN und VisR, Motilität der *S. meliloti*-Zellen (4.1.11.) und wird somit als Klasse I'-Gen direkt unterhalb von *visN* und *visR* in das Hierarchieschema integriert. Rem aktiviert autonom die Transkription der Klasse II-Gene und aufgrund der Abhängigkeit der Klasse III-Gene von den Klasse IIA-Genen (Sourjik *et al.*, 2000) wird auch die Expression dieser untersten Hierarchiekategorie indirekt durch Rem kontrolliert. Zusätzlich wird die Regulation der Flagellingene (Klasse III) durch einen flagellenspezifischen Sigma-Faktor - vergleichbar mit FliA bei *E. coli* - postuliert (Scharf *et al.*, 2001; Abb. 50,  $\sigma^{II}$ ).



**Abb. 50.** Modellvorstellung zur Regulation des *flagellar regulon* von *S. meliloti*. Einteilung in drei hierarchische Genklassen nach Sourjik *et al.* (2000). Die Integration von *rem* als Klasse I'-Gen in das Hierarchieschema ist in blau hervorgehoben. Horizontale Pfeile: Operons; Ellipsen: Proteine; weiße Pfeile: Translation zu Proteinen; dünne Pfeile: Positiv-Kontrolle; gestrichelter Pfeil: Autoregulation der *rem*-Transkription;  $\sigma^I$ ,  $\sigma^{II}$ : spezifische Sigma-Faktoren.

Die Hierarchiekaskade des *flagellar regulon* von *S. meliloti* kann keinem der bisher beschriebenen Modellsysteme, wie dem der Enterobakterien *E. coli* und *S. typhimurium* (Macnab, 1996) oder dem der humanpathogenen Organismen *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa* (Prouty *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2003), eindeutig zugeordnet werden. Im Unterschied zu den Enterobakterien hat *S. meliloti* den zusätzlichen Regulator Rem. Außerdem unterscheiden sich die Klasse I-Regulatoren VisN und VisR mit ihrer LuxR-analogen Primärstruktur grundlegend von den globalen, enterobakteriellen Regulatoren FlhD und FlhC. Bei *P. aeruginosa* befindet sich ein einzelner Regulator, FleQ, an der Spitze der Hierarchiekaskade (Dasgupta *et al.*, 2003). Während FleQ in Kombination mit dem spezifischen Sigma-Faktor  $\sigma^{54}$  die Expression der untergeordneten Genklassen aktiviert, werden die beiden Klasse I-Regulatoren aus *S. meliloti*, VisN und VisR - im Gegensatz zu FleQ - nicht den  $\sigma^{54}$ -bindenden Regulatoren, sondern LuxR-ähnlichen Proteinen zugeordnet (Sourjik *et al.*, 2000). Ein Rem-analoger Regulator existiert bei *P. aeruginosa* nicht. Die regulatorische Hierarchiekaskade des *flagellar regulon* von *S. meliloti* (Abb. 50) unterscheidet sich - vor allem bezüglich der globalen Regulatoren VisNR und Rem - deutlich von den bisher beschriebenen Systemen motiler Bakterien, und repräsentiert somit ein neuartiges Regulationsmodell.

## 5.2. Aktivierung und Inaktivierung von Rem

Die Aktivität von Rem hängt von seiner Transkription und von einem schnellen proteolytischen Abbau ab. Eine posttranskriptionale Aktivierung durch Phosphorylierung konnte - trotz auffälliger Ähnlichkeit von Rem mit Responsregulatoren - nicht nachgewiesen werden. Gründe, die gegen eine Aktivierung von Rem durch Phosphorylierung sprechen sind (1), daß eine zentrale Asp-Phosphorylierungsposition für das Rem-Protein offenbar nicht existiert (4.1.4.), (2) eine *in vitro*-Phosphorylierung von Rem durch kleine molekulare Phosphodonoren nicht nachweisbar war (4.1.7.; Lukat *et al.*, 1992; Buckler & Stock, 2000) und (3) bisher keine korrespondierende Histidinkinase identifiziert werden konnte. Auch für die Regulatorproteine HP1043 und HP1021 von *H. pylori* wurde keine korrespondierende Histidinkinase identifiziert (Delany *et al.*, 2002; Schär *et al.*, 2005). Mutationen potentieller Phosphorylierungsstellen von HP1043 und HP1021 hatten keinen Einfluß auf die Aktivität der Proteine (Schär *et al.*, 2005).

Möglicherweise ist die N-terminale Domäne von Rem - wie bei HP1043 (Delany *et al.*, 2002) - für die Dimerisierung und damit Aktivierung des Proteins verantwortlich. Der sukzessive Austausch der Aspartyl-Reste Asp<sup>43</sup>, Asp<sup>45</sup>, und Asp<sup>47</sup> resultierte in einem zunehmenden und schließlich vollständigen Funktionsverlust von Rem, wobei die Stabilität des mutierten Proteins unbeeinflußt blieb (4.1.4.). Die Substitution von drei negativen Ladungen durch neutrale Asn-Reste könnte die Struktur des Rem-Proteins derart verändern, daß die vermutete aktive Dimerstruktur und somit die Funktionalität des Proteins blockiert wird.

Die - im Gegensatz zu VisN und VisR - auf die exponentielle Wachstumsphase von *S. meliloti* beschränkte Expression von Rem kann plausibel durch transkriptionelle Regulation mittels eines spezifischen, phasenabhängigen Sigma-Faktors erklärt werden (Abb. 50). Solche alternative Sigma-Faktoren kontrollieren grundsätzlich die Transkription eines Regulons in Abhängigkeit von spezifischen Konditionen (Wösten, 1998). Bei *Brucella melitensis*, einem phylogenetisch verwandtem Organismus von *S. meliloti*, beeinflußte die Deletion der alternativen Sigmafaktoren  $\sigma^E$  und  $\sigma^H$  die Expression von Genen des *flagellar regulon* (pers. Mitteilung J. J. Letesson, Universität Namur, Belgien). Allerdings konnte hier weder mittels Mini-Tn5-Mutagenese (4.1.9.), noch durch Deletionen der  $\sigma^E$ - und  $\sigma^H$ -homologen Faktoren in *S. meliloti* (4.1.10.) ein spezifischer Regulator der *rem*-Transkription identifiziert werden. Es existieren jedoch 11 weitere alternative Sigma-Faktoren im *S. meliloti*-Genom (Galibert *et al.* 2001), deren Funktion bisher noch nicht analysiert wurde.

Zusätzlich hat das Rem-Protein einen autoregulatorischen Einfluß auf die *rem*-Transkription (Abb. 50). Während Rem seine eigene Transkription zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase hemmt, hat es ab Mitte des exponentiellen Wachstums einen aktivierenden Einfluß (Abb. 18). Autoregulatorische Mechanismen sind für zahlreiche globale Regulatoren bekannt. Der FlhDC-Komplex von *S. typhimurium* reprimiert zunächst die Expression des *flhDC*-Operons. Mit zunehmender  $\sigma^{28}$ -Aktivität werden die beiden Klasse I-Regulatoren zu Aktivatoren der eigenen Transkription. Kustukake (1997) konzipierte zwei mögliche Arbeitsmodelle: Einerseits könnten FlhD und FlhC durch direkte Interaktion mit  $\sigma^{28}$  die eigene Transkription aktivieren, andererseits könnte  $\sigma^{28}$  die Expression eines zusätzlichen Faktors regulieren, der dann zusammen mit FlhD und FlhC die Transkription des *flhDC*-Operons aktiviert. Ein ähnlicher autoregulatorischer Mechanismus über einen zusätzlichen Faktor wäre auch für

die *rem*-Transkription denkbar. Durch einzelne Asp-Substitutionen in der N-terminalen Domäne und den daraus resultierenden partiellen Funktionsverlust des Rem-Proteins wurde die *rem*-Transkription im frühen exponentiellen Wachstum deutlich beschleunigt, aber bereits in der Mitte des exponentiellen Wachstums verringerte sich die Transkription rapide (4.1.5.). Eine durch die Mutationen veränderte Sekundärstruktur von Rem könnte eine Wechselwirkung mit diesem zusätzlichen Regulator verhindern. Das Rem-Mutantenprotein würde danach schon zu Beginn des exponentiellen Wachstums die *rem*-Transkription positiv regulieren. Im weiteren Verlauf des Bakterienwachstums verringert sich die Intensität der *rem*-Transkription aufgrund der fehlenden Interaktion des Rem-Proteins mit dem Regulator.

Die beobachtete positive Autoregulation der *rem*-Transkription bei erhöhter Rem-Konzentration (Abb. 18) ist auch durch eine aktive Dimer-Form des Proteins plausibel zu erklären. Vom paralogen HP1043-Regulator ist bekannt, daß die N-terminale Domäne für die Dimerisierung verantwortlich ist (Delany *et al.*, 2002). Durch die Aspartyl-Susbtitutionen, Asp<sup>43</sup>, Asp<sup>45</sup> und Asp<sup>47</sup>, würde eine Dimerisierung von Rem und damit die positive Aktivierung der *rem*-Transkription verhindert werden. Durch den noch fehlenden Nachweis einer Blockierung der Dimerisierung von RemD43N/D45N/D47N könnte diese Hypothese gestützt werden.

Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase von *S. meliloti* wurde mit abklingender Transkription des *rem*-Gens ein schneller Abbau von Rem beobachtet (4.1.6.). Eine (dauernd aktive) spezifische Protease dürfte hier die Oberhand gewinnen und restliches Rem schnell abbauen. Dafür gibt es Beispiele. Für die Klasse I-Regulatoren des *flagellar regulon* von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, FlhD und FlhC, wurde die Abhängigkeit der Proteinstabilität von der ClpXP-Protease nachgewiesen. Die Halbwertszeit von FlhC verlängerte sich in einem ClpXP-defizienten Stamm von 5 auf 30 Minuten (Tomoyasu *et al.*, 2002; 2003). Bei *Proteus mirabilis* wurde gezeigt, daß durch einen 10fachen Überschuß von FlhD und FlhC im Vergleich zum Wildtyp die Effizienz der abbauenden Lon-Protease überschritten wurde, wodurch die beiden Regulatoren länger stabil blieben (Claret & Hughes, 2000). Aufschluß über die postulierte proteolytische Regulation des Rem-Proteins hätte ein vergleichendes *pulse-chase*-Experiment in der Mitte und am Ende des exponentiellen Wachstums erbringen sollen. Die Durchführung scheiterte jedoch an technischen Problemen, weil nämlich die

Spezifität des polyklonalen anti-Rem-Antikörpers für die notwendige Immunpräzipitation nicht ausreichte.

Die Aktivierung von Rem könnte also auf Transkriptions-Ebene über einen spezifischen, wachstumsabhängigen Sigma-Faktor und auf Proteinebenen durch Rem-Dimerisierung reguliert werden. Ein (ständiger) proteolytischer Abbau kontrolliert nach diesem Modell die intrazelluläre Menge des Regulators Rem .

### 5. 3. Der Transkriptionsfaktor Rem bindet spezifisch an DNA

Während Rem durch den globalen Regulator VisNR reguliert wird, ist Rem selbst ein positiver Regulator der Klasse II-Gene des *flagellar regulon*. Des Weiteren wird die *rem*-Transkription durch Autoregulation beeinflußt (4.1.5.). Rem besitzt ein *helix-turn-helix*-Motiv in der C-terminalen Domäne (4.1.1.), was deutlich für seine Funktion als DNA-bindender Transkriptionsfaktor spricht, die zuvor aber nur indirekt durch Reportergenanalysen nachgewiesen wurde (Tab. 6; Rotter, 2001). Deshalb wurde hier die Bindung von Rem an drei exemplarische Klasse II-Promotoren und den *rem*-Promotor in *footprinting*-Experimenten untersucht und nachgewiesen (4.1.12). Durch den Sequenzvergleich der Rem-Bindestellen an *PflgB*, *PflF* und *Porf38* und der *motA*- und *orf20*-Promotor-DNA der zwei verbleibenden Klasse II-Operons wurde eine unvollständige direkte Wiederholungssequenz mit der *consensus*-Sequenz CGSCWWG-N<sub>5</sub>-CGC.AAG identifiziert (4.1.12.5.; Abb. 51). Dieses spezifische Rem-Bindemotiv ist auch in der *rem*-Promotorregion zu finden, allerdings weniger deutlich ausgeprägt, entsprechend der schwachen Autoregulation. Im Gegensatz zu fünf Klasse II-Promotoren konnte in Klasse III-Promotoren kein Rem-Bindemotiv entdeckt werden (GCG-Programmpaket, *Wisconsin Package* Version 10.0), was für die indirekte Regulation der Klasse III-Gene durch Rem spricht.

Bisher konnte durch *primer extension* kein eindeutiger Transkriptionsstart für Klasse II-Promotoren bestimmt werden, vermutlich wegen technischer Mängel. Von *S. meliloti* sind bisher nur die DNA-Bindemotive des Responsregulators FixJ (Ferrières et al., 2004) und der  $\sigma^{54}$ -regulierten Transkription (Dombrecht et al., 2002) gut charakterisiert, so daß für eine computergestützte Motivsuche von charakteristischen -35- und -10-Boxen keine Muster existierten. Mögliche Analogien der Klasse II-Promotoren zu den Sigma H-

regulierten Promotoren von *Bacillus subtilis* (Britton *et al.*, 2002) haben schließlich zum Postulat von -35- und -10-Boxen für Klasse II-Gene von *S. meliloti*-Promotoren geführt. Das ist in Abb. 51 dargestellt. Das Sigma H-Bindemotiv und das potentielle Motiv der *S. meliloti*-Promotoren ist angegeben. Während die -35-Boxen von *S. meliloti* gut mit dem Motiv aus *B. subtilis* übereinstimmen, sind bezüglich der -10-Boxen Abweichungen zu erkennen. Innerhalb der *S. meliloti*-Promotoren sind die Sequenzen der -10-Bereiche aber konserviert, ein mögliches Motiv ist in Abb. 51 blau gekennzeichnet. In *B. subtilis* reguliert Sigma H die Transkription von Genen, die für den Übergang zur Stationärphase benötigt werden (Britton *et al.*, 2002), während hier die Exponentialphase betroffen wäre. Es ist aber bekannt, daß Paralogien zu neuen Funktionsspezifitäten führen.

	-35	-10
<b>flgB</b>	.TCCCCG <b>GACAAAG</b> TCCCCA <b>CGC</b> . <b>AAGATT</b> .ACCGGCCTAGGTT. <b>CGC</b> CATCAC	
<b>fliF</b>	CCCTT <b>CGCCAAG</b> TT.CC <b>CGC</b> . <b>AAGTTT</b> .CGTGGCC.TAGCTTC <b>CGC</b> TTCCGG	
<b>orf38</b>	.GCTG <b>CCGCTTG</b> CATCG <b>CGC</b> . <b>...TTT</b> CGCCTTCCGCGAAG. <b>CGC</b> TGCGAA	
<b>motA</b>	.TCCG <b>GGGCCAG</b> CCTCA <b>CGC</b> . <b>AAGGAT</b> ..CGAACC.CTATTTC <b>CAT</b> CGGAGG	
<b>orf20</b>	.CCAT <b>CGCCATG</b> TAGC. <b>CGCCGAGGAT</b> ..ACAGCCGAAAGT. <b>CAC</b> AAGAAG	
<b>rem</b>	.TCAAC <b>CATCATG</b> TAAGT <b>GG</b> . <b>TAAGGTT</b> ....AACGATCACC. <b>CACTAGATA</b>	
<b>conBs</b>	<b>R-AGGATT</b> TT	<b>N<sub>11-12</sub></b>
<b>conSm</b>	<b>AAGRWT</b>	<b>N<sub>11</sub></b>
	<b>R--GAATTWW</b>	
	<b>R---CRC</b>	

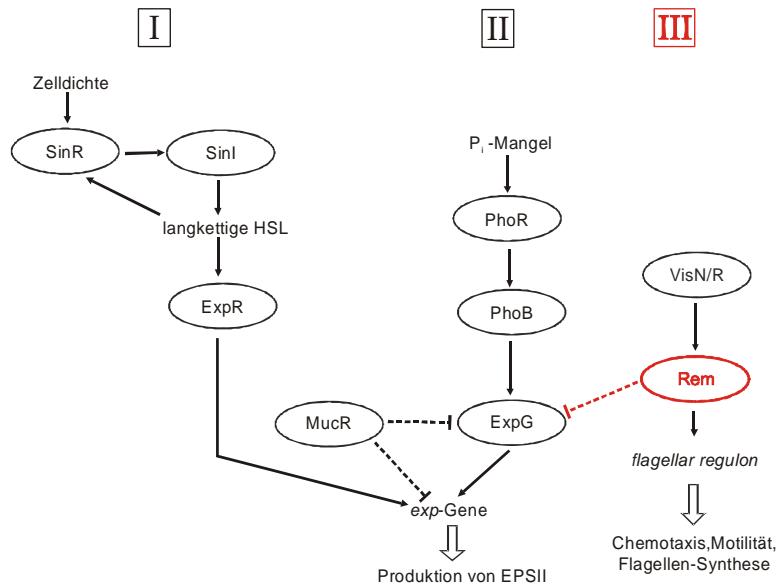
**Abb. 51.** Rem-Bindemotiv und Klasse II-Promotorboxen von *S. meliloti* im Vergleich mit den Sigma H-Bindemotiven von *B. subtilis*. Das Rem-Bindemotiv der sechs Promotoren ist durch Boxen markiert. Rot: identische Nukleotide; grau: ähnliche Nukleotide. Zahlen kennzeichnen potentielle -35- bzw. -10-Boxen der *S. meliloti*-Promotoren; -35- Boxen sind unterstrichen, auffällige Nukleotide der -10-Boxen sind blau markiert. conBs = RpoH-consensus bei *B. subtilis* (nach Britton *et al.*, 2002); conSm = postulierter consensus der *S. meliloti*-Promotoren; W = A oder T; R = A oder G.

Wie in Abb. 51 deutlich wird, überlappt die 3'-Sequenzwiederholung der Rem-Bindestelle mit der postulierten -35-Box des Promotors. Diese Überlappung ist bei positiv regulierenden Transkriptionsfaktoren üblich, weil häufig durch direkte Wechselwirkung mit dem σ-Faktor bzw. der C-terminalen Domäne einer α-Untereinheit der promotorgebundenen RNA-Polymerase (und DNA-bending) die Gentranskription aktiviert wird (Ishihama, 1993). Zum Beispiel induziert CAP durch Bindung an den *raf*-Promotor von *E. coli* eine Biegung der DNA um etwa 80° (Muiznieks *et al.*, 1999). Auch für PhoB und OmpR (*E. coli*) wurde DNA-Bindung über direkte Wiederholungs-

sequenzen nachgewiesen, die benachbart zu den -35-Boxen liegen oder mit diesen überlappen (Makino *et al.*, 1996; Harlocker *et al.*, 1995). Die jeweiligen Sequenzmotive werden von PhoB- bzw. OmpR-Dimeren erkannt, wobei je ein Dimer an eine Wiederholungssequenz bindet (Okamura *et al.*, 2000). Durch DNA-*bending* und Wechselwirkung mit dem Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  (PhoB) bzw. der C-terminalen Domäne einer  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase (OmpR) wird die Transkription initiiert (Makino *et al.*; 1996). Die postulierte Kombination von Rem-Bindungs- und Promotorelementen bietet deshalb eine einleuchtende Erklärung für die Aktivierung der Transkription durch Rem im *S. meliloti*-System.

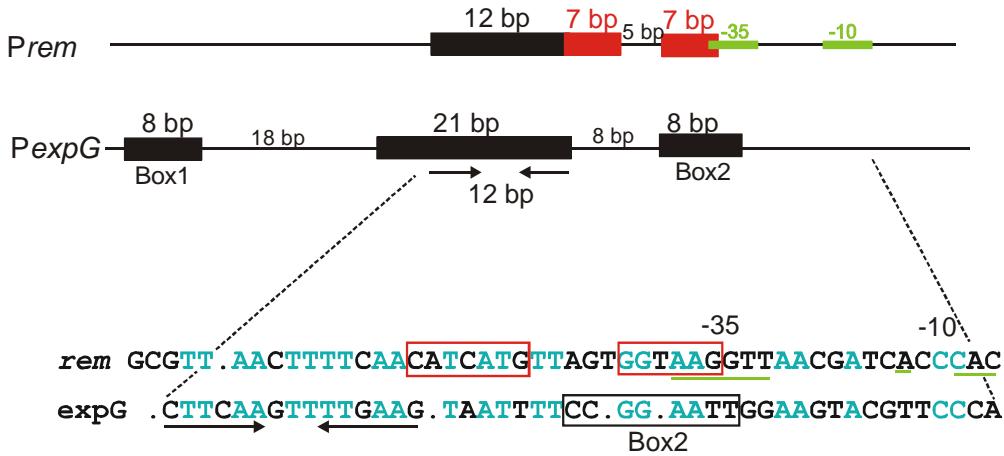
## 5.4. Zusammenhang von Motilität und Exopolysaccharid-Biosynthese

Durch DNA-Chip-Analysen wurden neben den Chemotaxis-, Flagellen- und Motilitätsgenen des *flagellar regulon* interessanterweise auch die Gene des *exp*-Clusters, deren Genprodukte für die Biosynthese von Galactoglucan (EPS II) zuständig sind, als Rem-reguliert identifiziert (4.1.13.). Die komplexe Regulation der Expression der *exp*-Gene in Abhängigkeit von dem Repressor MucR (Rüberg *et al.*, 1999), der Zelldichte (Marketon *et al.*, 2003; Pellock *et al.*, 2002) und der Phosphatkonzentration über den Transkriptionsaktivator ExpG (Rüberg *et al.*, 1999; Bartels *et al.*, 2003) wurde in der Einleitung detailliert beschrieben und ist in Abb. 52 zusammengefaßt (Weg I + II). Durch Reportergenanalysen wurde die (direkte oder indirekte) Repression der Transkription des Regulatorgens *expG* durch Rem nachgewiesen (3.14.). Dadurch wird die Expression der *exp*-Gene - außer durch Zelldichte und Phosphatmangel - komplementär zur und im Wechsel mit der Expression der Gene des *flagellar regulon* reguliert (Abb. 52, Weg III).



**Abb. 52.** Modellvorstellung der Regulation der Galactoglucan-Biosynthese bei *S. meliloti*. Römische Zahlen: regulatorische Pfade, über welche die Expression der *exp*-Gene kontrolliert wird; Rot: Verknüpfung von Motilität und Chemotaxis mit der Galactoglucan-Biosynthese durch den regulatorischen Faktor Rem; Ellipse: Genprodukt; Pfeile: Positiv-Kontrolle; gestrichelte Linien: Negativ-Kontrolle; HSL: Homoserinlactone.

Für die Promotoren der *exp*-Gene wurde eine 21 bp lange Konsensussequenz, die ein Palindrom aus 12 bp enthält, als ExpG-Bindestelle beschrieben. Zusätzlich wurde für zwei konservierte DNA-Bereiche, Box 1 und Box 2, eine Funktion für die vollständige Interaktion zwischen ExpG und Promotor-DNA postuliert (Baumgarth *et al.*, 2005). Die ExpG-Bindestelle wurde sowohl in den Promotoren der *exp*-Strukturgene, als auch im *expG*-Promotor, der außer durch PhoB auch autoregulatorisch kontrolliert wird, identifiziert. Durch einen Sequenzvergleich der Rem-Bindestelle des *rem*-Promotors mit dem *expG*-Promotor wurde ein Bereich mit auffälliger Sequenzidentität identifiziert (Abb. 53). Interessanterweise sind die Sequenzen von Palindrom und Box 2 des *expG*-Promotors und Rem-Bindestelle des *rem*-Promotors ähnlich. Die weiter im 5'-Bereich positionierte Box 1 und die restlichen 6 bp der ExpG-Bindestelle außerhalb des Palindroms wurden dagegen nicht im *rem*-Promotor identifiziert. Möglicherweise überschneiden sich ExpG-Bindestelle und Rem-Bindestelle. In diesem Fall würde Rem die Expression von ExpG direkt durch Bindung an den *expG*-Promotor hemmen.



**Abb. 53.** Vergleich der Rem-Bindestelle von *Prem* mit *PexpG*. Blau: Identische Nukleotide; Pfeile: Palindrom; schwarze Boxen: regulatorische Elemente von *PexpG*; rote Boxen: Rem-Bindestelle in *Prem*. Länge der regulatorischen Elemente und Abstände sind in bp angegeben. Postulierte -35- und -10-Boxen in der *Prem*-Sequenz sind grün markiert.

Die DNA-Chip-Analysen zeigten auch, daß sechs der 22 an der Biosynthese von Succinoglycan (EPS I) beteiligten Gene von Rem negativ kontrolliert werden (4.1.13.). Neben Galactoglucan (EPS II) wird Succinoglycan (EPS I) als weiteres Exopolysaccharid von *S. meliloti* synthetisiert. Für die Etablierung einer funktionellen Symbiose wird eine jeweils in Anpassung an das äußere Milieu spezifische Kombination der beiden Exopolysaccharide diskutiert (Marketon *et al.*, 2003; Pellock *et al.*, 2002). Interessanterweise zählten zu den sechs Rem-regulierten Genen des EPS I-Clusters die Gene *exoK* und *exsH*, die Glycanasen codieren. ExoK und ExsH sind essentiell für die Produktion von symbiotisch aktivem, niedermolekularem EPS I (York & Walker, 1997; 1998). Das Rem-Protein ist folglich an der Produktion von symbiotisch aktivem EPS regulierend beteiligt. Hier ist der Mechanismus der Kontrolle aber noch aufzuklären.

Die komplementäre Regulation von Motilität und EPS-Synthese ist unter anderem auch bei der Biofilmbildung des humanpathogenen Bakteriums *V. cholerae* bekannt. Zu Beginn der Biofilmbildung sind funktionelle Flagellen für die Anheftung an Oberflächen nötig, anschließend ermöglicht die EPS-Synthese die Bildung einer stabilen, „verklebenden“ EPS-Matrix (Watnick & Colter, 1999). Watnick *et al.* (2001) haben eine in Abwesenheit von Flagellin gesteigerte EPS-Produktion nachgewiesen. Als Folge der vermehrten EPS-Synthese wurde die Infektivität von *V. cholerae* deutlich eingeschränkt. Außerdem wurde gezeigt, daß der  $\text{Na}^+$ -Ionen getriebene, polare Flagellenmotor von *V. cholerae* als eine Art Mechanosensor der Regulation der EPS-Biosynthese fungiert

(Lauriano *et al.*, 2004). Motilität, EPS-Biosynthese und Virulenz werden also auch bei *V. cholerae* gemeinsam abgestimmt und reguliert.

Auch bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine regulatorische Kopplung von Motilität und EPS-Biosynthese entdeckt. Während bei *V. cholerae* die EPS-Biosynthese durch Komponenten des *flagellar regulon* reguliert wird, wird bei *P. aeruginosa* in umgekehrter Weise die Flagellinsynthese durch einen Regulator der Alginat-Biosynthese kontrolliert. Motilität ist eine essentielle Voraussetzung dieses humanpathogenen Organismus für eine erfolgreiche Infektion der Lunge (Feldmann *et al.*, 1998). Im weiteren Infektionsverlauf besitzen in *mucA*-defekte Stämme einen Selektionsvorteil; *mucA* codiert für einen anti- $\sigma^{22}$ -Faktor. Als Konsequenz wird in solchen Mutanten der spezifische Sigma-Faktor  $\sigma^{22}$  (AlgT) aktiviert, was die Produktion des EPS Alginat und somit einen mucoiden Phänotyp von *P. aeruginosa* zur Folge hat (Garrett *et al.*, 1999). Zugleich wird die Flagellinsynthese über einen  $\sigma^{22}$ -induzierten, bisher unbekannten Mechanismus reprimiert.

Welche übergeordnete Funktion erfüllt Rem für *S. meliloti*? Die Fähigkeit zu Motilität und Chemotaxis ermöglicht den symbiotischen *S. meliloti*-Zellen eine gezielte Bewegung zu den Wurzelhärrchen der Wirtspflanze (Hunter & Fahring, 1980; Ames & Bergmann, 1981). Nachdem ein Kontakt hergestellt ist, müssen für die Infektion der Wurzelhärrchen und die Etablierung der Symbiose EPS synthetisiert werden (González & Marketon, 2003). Folglich ist auch bei *S. meliloti* eine komplementäre Regulation von Motilität und EPS-Biosynthese vorteilhaft. Eine vorzeitige EPS-Synthese würde die Energieresourcen der Zelle unnötig belasten und die Motilität der Bakterien und Chemotaxis zu der Wirtspflanze einschränken. Rem ist nun in der exponentiellen Wachstumsphase aktiv und aktiviert die Transkription der Chemotaxis-, Motilitäts- und Flagellengene; gleichzeitig wird die EPS-Biosynthese durch Rem reprimiert. Solange Motilität und Chemotaxis aktiviert sind, kann das Bakterium die Wurzelhärrchen des Wirts erreichen. Durch Abschalten der Synthese des Rem-Proteins wird nun die EPS-Synthese ermöglicht.

Zwei neue Veröffentlichungen lassen das Modell der komplementären Regulation von Motilität und EPS-Biosynthese bei *S. meliloti* noch komplexer erscheinen. Zum einen wurde in Abwesenheit des Repressors der EPS I-Synthese, ExoR, wie auch in Anwesenheit der konstitutiv aktiven Histidinkinase ExoS die Flagellinsynthese (direkt oder indirekt) reprimiert (Yao *et al.*, 2004). Zum anderen wurde die Expression von Motilitäts- und Chemotaxisgenen in Abwesenheit der Autoinducer-Synthase SinI

aktiviert. Durch die parallele Deletion der Gene *sinI* und *expR*, deren Genprodukte positive Regulatoren der EPS II-Biosynthese sind, wurden für Flagellin und Basalkörperkomponenten codierende Gene reprimiert (Hoang *et al.*, 2004). Folglich kontrollieren - *vice versa* zu der Rem-abhängigen Regulation der EPS-Synthese - auch Regulatoren der EPS-Synthese die Expression von Genen des *flagellar regulon*. Zusammen mit dieser Erkenntnis weisen die hier gewonnenen Daten auf ein komplexes Netzwerk mit Rückkopplungs-Schleifen in der Regulation von Motilität und EPS-Biosynthese bei *S. meliloti* hin.

## 5.5. Ausblick

Die Lösung einiger Aspekte der Rem-Funktion wirft zugleich neue Fragestellungen auf:

- (1) Wird die Transkription von spezifischen Genen des *flagellar regulon* - wie zum Beispiel die der Flagellin-Gene oder die des *rem*-Gens - in Abhängigkeit von spezifischen Sigma-Faktoren reguliert ?

Die elf alternativen Sigma-Faktoren des *S. meliloti*-Genoms ohne Funktionszuordnung sollten einzeln deletiert werden und die Promotoraktivität repräsentativer Gene des *flagellar regulon* in jeder dieser Mutanten bestimmt werden.

- (2) Ist das Rem-Protein Substrat einer spezifischen Proteolyse ?

Die Synthese eines hoch-spezifischen anti-Rem-Antikörpers sollte Immunpräzipitation und damit *pulse-chase*-Experimente ermöglichen.

- (3) Wird der Wechsel zwischen positiver und negativer Kontrolle durch Rem tatsächlich durch ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht kontrolliert?

*Crosslinking*-Experimente und DNA-Bindestudien mit nativem und aspartyl-substituierten Rem-Proteinen könnten diese Hypothese belegen.

- (4) Sind die postulierten Positionen der Promotorboxen (relativ zur Rem-Bindestelle) in den Sequenzen der Klasse II-Promotoren korrekt ?

Der Transkriptionsstart sollte zusätzlich zu *primer extension*-Experimenten mittels 5'-RACE oder Nuklease S1-mapping festgelegt werden.

- (5) Ist Rem, wie postuliert, ein direkter Repressor der Expression von ExpG ?

Durch *footprinting*-Experimente kann wie zuvor festgestellt werden, ob und wenn ja, an welche Position, das Rem-Protein an den *expG*-Promotor bindet.

## 6. Zusammenfassung

Zellen von *S. meliloti* sind ausschließlich in der exponentiellen Phase des Wachstums motil und chemotaktisch aktiv. Der Transkriptionsfaktor Rem (*regulator of exponential growth motility*) ist ein positiver Regulator (Klasse I') von ca. 40 Flagellen- und Motilitätsgenen (Klasse II), die wiederum die Expression von 10 Chemotaxis- und vier Flagellingen (Klasse III) steuern. In dieser Hierarchie rangiert Rem unmittelbar unterhalb des globalen heterodimeren Regulators VisNR (*vital for swimming*; Klasse I). Anders als VisNR, ist Rem nur in der Exponentialphase stabil und deshalb der eigentliche Kandidat für die Regulation der begrenzten Motilität. Daher wurden in dieser Arbeit Struktur, Regulation und Funktionsweise von Rem ausführlich untersucht.

- (1) Das 25 kDa-Protein Rem (223 AS-Reste) entspricht mit seiner N-terminalen regulatorischen Domäne und seinem C-terminalen *helix-turn-helix*-Motiv einem Responsregulator der OmpR-Familie. Jedoch findet keine nachweisbare Aktivierung durch Phosphorylierung eines Aspartyl- oder Acetylierung eines Lysyl-Restes statt. Andererseits beeinträchtigt die sukzessive Substitution dreier konservierter Aspartyl-Reste, Asp<sup>43</sup>-Asp<sup>45</sup>-Asp<sup>47</sup>, durch Asn die Regulationsfunktion bis zur Inaktivität. Es wird postuliert, daß (wie beim verwandten HP1043 aus *H. pylori*) die nachgewiesene Dimerisierung von Rem-Monomeren über die N-terminale Domäne durch die nichtkonservativen Austausche massiv gestört bzw. verhindert wird.
- (2) Der Motilitätsausfall durch eine *rem*-Deletion oder durch eine Deletion der globalen Regulatorgene *visNvisR* wurde durch Rem komplementiert. Die erhöhte Gendosis des plasmidcodierten Rem-Proteins führte zur Überkompensation und fehlenden Feinregulation, und daher zur unvollständigen Komplementation. Dadurch wurde demonstriert, daß Rem autonom die Klasse II-Gene reguliert und selbst unter der positiven Kontrolle von VisNR (und seiner Autoregulation) steht.
- (3) Die Kinetik der *rem*-Transkription, gemessen mittels *lacZ*-Reporter, steigt am Beginn des exponentiellen Wachstums steil an und bricht beim Eintritt in die Stationärphase ebenso plötzlich ab. In einer *rem*-Deletionsmutante fällt die *rem*-Transkription unmittelbar nach dem steilen Abstieg ab; die Asp-Mutanten verhalten sich entsprechend. Das spricht für eine positive Autoregulation durch Rem (Dimere), die für die Aufrechterhaltung eines hohen Transkriptionsniveaus während der

Exponentialphase sorgt. Die Rem-Proteinkonzentration folgt der Transkriptionskinetik, was für einen schnellen proteolytischen Abbau von Rem spricht.

- (4) Die Promotorregionen von drei typischen Klasse II-Genen, *flgB*, *fliF* und *orf38*, wurden für *footprinting*-Experimente mit rekombinantem Rem herangezogen. In allen Fällen wurde eine 25 bp gut konservierte Sequenz mit dem *hepta repeat* CGSCWWG-N<sub>5</sub>-CGC.AAG identifiziert, die auch im Vorlauf von weiteren Klasse II-Genen gefunden wurde. Die zweite Sequenzwiederholung überlappt mit der vermutlichen -35-Box des Promotors, 11-12 bp oberhalb einer potentiellen -10-Box. Das Bindemotiv wurde auch in der *rem*-Promotorregion identifiziert, allerdings weniger stark ausgeprägt (schwache Autoregulation).
- (5) Mit DNA-Chip-Technologie (*Microarray*-Analysen) wurden die Transkriptome des Wildtyps und der *rem*-Deletionsmutante von *S. meliloti* verglichen. Es zeigte sich, daß außer den positiv regulierten Genen des *flagellar regulon* ein zweites Gencluster mit fünf Operons für die Synthese von Exopolysacchariden (*exp*-Gene für die Galactoglucan-Biosynthese) durch Rem negativ reguliert wird. Es wurde gezeigt, daß Rem die Transkription des *expG*-Gens, das den Transkriptionsaktivator ExpG des *exp*-Operons codiert, unterdrückt. Somit sorgt Rem für Motilität in der Exponentialphase und (indirekt) für die Synthese Symbiose-fördender Exopolysaccharide in der Stationärphase.

## 7. Literaturverzeichnis

**Adler, J. (1965).** Chemotaxis in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **30:** 289 – 292.

**Ames, P. and Bergman, K. (1981).** Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184:** 728-908.

**Attmannspacher, U., Scharf, B. and Schmitt, R. (2005).** Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **56:** 708 – 718.

**Bachmann, B. J. (1990).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54:** 130-197.

**Barak, R. and Eisenbach, M. (2001).** Acetylation of the response regulator, CheY, is involved in bacterial chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **40:** 731 – 743.

**Bartels, F. W., Baumgarth, B., Anselmetti, D., Ros, R. and Becker, A. (2003).** Specific binding of the regulatory protein ExpG to promotor regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of *Sinorhizobium meliloti* – a combined molecular biology and force spectroscopy investigation. *J. Struct. Biol.* **143:** 145 – 152.

**Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe, K. L. and Sonnhammer, E. L .L. (2000).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **28:** 263–266.

**Baumgarth, B., Bartels, F. W., Anselmetti, D., Becker, A. and Ros, R. (2005).** Detailed studies of the binding mechanism of the *Sinorhizobium meliloti* transcriptional activator ExpG to DNA. *Microbiology* **151:** 259 – 268.

**Becker, A., Schmidt, M., Jäger, W. and Pühler, A. (1995).** New gentamicin resistance and *lacZ* promotor probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162:** 37-39.

**Becker, A., Rüberg, S., Küster, H., Roxlau, A. A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H. P., Walker, G. C. and Pühler, A. (1997).** The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J. Bacteriol.* **179:** 1375-1384.

**Becker, A., Bergés, H., Krol, E., Bruan, C., Rüberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., Bruijn, F. J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Küster, H., Liebe, C., Pühler, A., Weidner, S. and Batut, J. (2004).** Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interactions* **17:** 292-303.

- Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J. J. and De Bolle, X. (2002).** Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol. Microbiol.* **43:** 945 – 960.
- Berg, H. C. and Brown, D. A. (1972).** Chemotaxis in *Escherichia coli* analyzed by three-dimensional tracking. *Nature* **239:** 500-504
- Berg, H. C. (2000).** Motile behavior of bacteria. *Physics Today* Jan. 2000: 24-29
- Blair, D. F. and Berg, H. C. (1988).** Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science* **242:** 1678 – 1681.
- Bourret, R. B., Hess, J. F. and Simon, M. I. (1990).** Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87:** 41 – 45.
- 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.
- Braun, T. F. and Blair, D. F. (2001).** Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of *Escherichia coli*: evidence for two H(+)channels in the stator complex. *Biochemistry* **40:** 13051 – 13059.
- Bren, A. and Eisenbach, M. (1998).** The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J. Mol. Biol.* **278:** 507 – 514.
- Britton, R. A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R. and Grossmann, A. D. (2002).** Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (Sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184:** 4881 – 4890.
- Buckler, D. R. and Stock, A. M. (2000).** Synthesis of [<sup>32</sup>P]phosphoramidate for use as a low molecular weight phosphodonor reagent. *Anal. Biochem.* **283:** 222 – 227.
- Cheng, H. P. and Walker, G. C. (1998a).** Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180:** 5183 – 5191.
- Cheng, H. P. and Walker, G. C. (1998b).** Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **180:** 20 – 26.
- Cheng, H. P. and Yao, S. Y. (2004).** The key *Sinorhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene *exoY* is expressed from two promoters. *FEMS Microbiol. Letters* **231:** 131 – 136.

- Chilcott, G. S. and Hughes, K. T. (2000).** Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64:** 694 – 708.
- Claret, L and Hughes, C. (2000).** Rapid turnover of FlhD and FlhC, the flagellar regulon transcriptional activator proteins, during *Proteus* swarming. *J. Bacteriol.* **182:** 833 – 836.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyoti, J., Lory, S. and Ramphal, R. (2003).** A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Mircobiol.* **50:** 809 – 824.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. and Scarlatto, V. (2002).** Growth phase-dependent regulation of target gene promotors for binding of the essential orphan response regulator HP1043 of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **184:** 4800 – 4810.
- De Risi, J. L., Iyer, V. R. and Brown, P. O. (1997).** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* **278:** 680-686.
- Dickneite, C., Böckmann, R., Spory, A., Goebel, W. and Sokolovic Z. (1998).** Differential interaction of the transcription factor PfrA and the PfrA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol. Microbiol.* **27:** 915-928.
- Dombrecht, B., Marchal, K., Vanderleyden, J. and Michiels, J. (2002).** Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely related species of the Rhizobiales. *Gen. Biol.* **3:** research0076.1 – 0076.11.
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczybra, A., Pühler, A. and Meyer F. (2003).** EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol.* **106:** 135-145.
- Eggenhofer, E., Haslbeck, M. and Scharf, B. (2004).** MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **52:** 701 – 712.
- Eggenhofer, E. (2005).** Funktionsanalyse von MotE und FliK, zwei neuen Proteinen im Flagellenmotor von ***Sinorhizobium meliloti***. Dissertation, Universität Regensburg.
- Feldmann, M., Bryan, S., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince A. (1998).** Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* **66:** 43- 51.
- Ferrières, L., Francez-Charlot, A., Gouzy, J., Rouillé, S. and Kahn, D. (2004).** FixJ-regulated genes evolved through promotor duplication in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology.* **150:** 2335 – 2345.
- Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D. and DeRosier, D. J. (1994).** Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235:** 1261 – 1270.

**Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dréano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F.-J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K.-C. and Batut, J. (2001).** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293:** 668-672.

**Garret, E. S., Perlegas, D. and Wozniak, D. J. (1999).** Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J. Bacteriol.* **23:** 7401 – 7404.

**Glazebrook, J., and Walker, G. C. (1989).** A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell.* **56:** 661-672.

**Gillen, K. L. and Hughes, K. T. (1993).** Transcription from two promotors and autoregulation contribute to the control of expression of the *Salmonella typhimurium* flagellar regulatory gene *flgM*. *J. Bacteriol.* **175:** 7006 – 7015.

**Götz, R. and Schmitt, R. (1987).** *Rhizobium* swims by unidirectional, intermittent rotation of righthanded flagellar helices. *J. Bacteriol.* **169:** 3146-3150

**González, J. E., Reuhs, B. L. and Walker, G. C. (1996a).** Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:** 8636-8641.

**González J. E., York, G. M. and Walker, G. C. (1996b).** *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene.* **179:** 141 – 146.

**González, J. E. and Marketon M. M. (2003).** Quorum sensing in nitrogen-fixing Rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76:** 574-592.

**Greck, M., Platzer, J., Sourjik, V. and Schmitt, R. (1995).** Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **15:** 989-1000

**Halbach, A. (2003).** Wechselwirkung des neuen Motorproteins MotC von *Sinorhizobium meliloti* mit MotB. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

**Harlocker, S. L., Bergstrom, L. and Inouye M.** Tandem binding of six OmpR proteins to the *ompF* upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270:** 26849 – 26856.

- Hess, S. L., Suchin, C. R. and Saltiel, A. R. (1991).** The specific protein phosphatase inhibitor okadaic acid differentially modulates insulin action. *J. Cell. Biochem.* **45:** 374 – 380.
- Higuchi, R. (1989).** Using PCR to engineer DNA, p. 61-70. In H. A. Erlich (ed.). PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. *Stockton Press, New York, N. Y.*
- Hirano, T., Minamino, T., Namba, K and Macnab, R. M. (2003).** Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *J. Bacteriol.* **185:** 2485 – 2492.
- Hoang, H. H., Becker, A. and González, J. E. (2004).** The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* **186:** 5460 – 5472.
- Hübner, P., Willison, J. C., Paulette, V M., and Bickle, T. A. (1991).** Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173:** 2993-2999
- Hunter, W. J. and Fahring, C. J. (1980).** Movement by *Rhizobium* and nodulation of legumes. *Soil. Biol. Biochem.* **12:** 537-542.
- Ishihama, A. (1993).** Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J. Bacteriol.* **175:** 2483 – 2489.
- Jäckel, P. (2004).** Funktionsanalyse des periplasmatischen Motilitätsprotein MotC von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Kahn, S. Dapice, M. and Reese, T. H. (1988).** Effects of *mot* gene expression on the structure of flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **202:** 575-584
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II. R. M. and Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166:** 175-176.
- Krupski, G., Götz, R., Ober, K., Pleier, E., and Schmitt, R. (1985).** Structure of complex flagellar filaments in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **162:** 361-366.
- Kutsukake, K. (1997).** Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **254:** 440 – 448.
- Kyte, J and Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157:** 105 – 132.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685

- Lauriano, C. M., Ghosh, C., Correa, N. E. and Klose, K. E. (2004).** The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **186:** 4864 – 4874.
- Li, M. and Schweizer, H. P. (1993).** Resolution of common DNA sequencing ambiguities of GC-rich templates by terminal deoxynucleotidyl transferase without dGTP analogues. *Focus* **14/15:** 19-20.
- Liu, X. and Matsumara, P. (1994).** The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* **176:** 7345-7351.
- Lorenzo de, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. (1990).** Mini-Tn5 transposon derivates for insertion mutagenesis, promotor probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative Eubacteria. *J. Bacteriol.* **172:** 6568-6572.
- Lukat, G. S., Lee, B. H., Mottonen, J. M., Stock, A. M. and Stock, J. B. (1991).** Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266:** 8348-8354.
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. and Stock, J. B. (1992).** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Biochemistry* **89:** 718-722
- Macnab, R.M. (1996).** Flagella and motility, p.123-145. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2<sup>nd</sup> ed. ASM press, Washington, D. C.
- Makino, K., Amemura, M., Kawamoto, T., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A. and Suzuki, M. (1996).** DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **259:** 15 – 26.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*
- Markteton, M. M., Glenn, S. A., Eberhard, A. and González, J. E. (2003).** Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **185:** 325 – 331.
- Martinez-Hackert, E. and Stock, A. M. (1997).** Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* **269:** 301 – 312.
- Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977).** A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74:** 560-564.
- McCleary, W. R. and Stock, J. B. (1994).** Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* **269:** 31567 – 31572.

- Mendrygal, K. E. and González, J. E. (2000).** Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **182:** 599 – 606.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics, p.352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Mühlbacher, S. (2000).** Kartierung zusätzlicher Flagellengene und Charakterisierung eines neuen globalen Kontrollgens (*sum*) der *Sinorhizobium meliloti*-Taxis. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 :** 263-273.
- Muiznieks, I., Rostoks, N. and Schmitt, R. (1999).** Efficient control of raf gene expression by CAP and two raf repressors that bend DNA in opposite directions. *Biol. Chem.* **380:** 19 – 29.
- Namba, K. and Vonderviszt, F. (1997).** Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quarterly reviews of Biophysics* **30:** 1-65.
- Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtis, R., Datta, N. and Falkow, S. (1976).** Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* **40:** 168-189.
- Ochman, H. and Wilson, A. C. (1987).** Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Ev.* **26:** 74-86
- Okamura, H., Hanaoka, S., Nagadoi, A., Makino, K and Nishimura, Y. (2000).** Structural comparison of the PhoB and OmpR DNA-binding/transactivation domains and the arrangement of PhoB molecules on the phosphate box. *J. Mol. Biol.* **295:** 1225 – 1236.
- Pellock, B. J., Teplitski, M., Boinay, R. P., Bauer, W. D. and Walker, G. C. (2002).** A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184:** 5067 – 5076.
- Peng, H.P. and Walker, G. C. (1998).** Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180:** 5183 – 5191.
- Perret, X., Stahelin, C., Broughton, W.J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64:** 180 – 201.
- Platzer, J., Sterr, W., Hausmann, M. and Schmitt, R. (1997).** Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **179:** 6391-6399

- Prouty, M. G., Correa, N. E. and Klose, K. E. (2001).** The novel  $\sigma^{54}$ - and  $\sigma^{28}$ -dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **39:** 1595 – 1609.
- Prüß, B. and Matsumura, P. (1996).** A regulator of the flagellar regulon of *Escherichia coli*, *flhD*, also affects cell division. *J. Bacteriol.* **178:** 668 – 674.
- Quester, I. and Becker, A. (2004).** Four promotors subject to regulation by ExoR and PhoB direct transcription of the *Sinorhizobium meliloti exoYFQ* operon involved in the biosynthesis of succinoglycan. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7:** 115-132.
- Ried, J. L. and Collmer, A. (1987).** An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* **57:** 239-246.
- Rotter, C. (2001).** *In vivo- und in vitro-Charakterisierung des globalen Regulators "Sum"* der Motilität und Chemotaxis von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Rüberg, S., Pühler, A. and Becker, A. (1999).** Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology*. **145:** 603-611
- Rüberg, S., Tian, Z. X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Pühler, A., Weidner, S. and Becker, A. (2003).** Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.* **106:** 255-268.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and 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.
- Schär, J., Sickmann, A. and Beier, D. (2005).** Phosphorylation-independent acitivity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **187:** 3100 – 3109.
- Scharf, B., Schuster-Wolff-Bühring, H., Rachel, R. and Schmitt, R. (2001).** Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: Importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* **183:** 5334-5342
- Scharf, B. (2002).** Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-induced polymorphic transitions. *J. Bacteriol.* **184:** 5979 – 5986.
- Scharf, B. and Schmitt, R. (2002).** Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4:** 183 – 186.

- Schlegel, H. G. (1992).** Allgemeine Mikrobiologie, S.427 – 432. Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York.
- Schmitt, R., Bamberger, I., Acker, G. and Mayer F. (1974).** Feinstrukturanalyse der komplexen Geißeln von *Rhizobium lupini* H13-3. *Arch. Microbiol.* **100:** 145 – 162.
- Schmitt, R. (2002).** Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology*, **148:** 627 – 631.
- Schmitt, R. (2003).** Helix rotation model of the flagellar rotary motor. *Biophys. J.* **85:** 843 – 852.
- Selbitschka, W., Niemann, S. and Pühler, A. (1993).** Construction of gene replacement vectors for gram-negative bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38:** 615-618.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*.
- Sourjik, V. and Schmitt, R. (1996).** Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **22:** 427-436
- Sourjik, V. and Schmitt, R. (1998).** Phosphotransfer between CheA, CheY1 and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry* **37:** 2327-2335
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Halsbeck, M. and Schmitt, R. (1998).** Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* **223:** 283-290.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B. and Schmitt, R. (2000).** VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J. Bacteriol.* **182:** 782-788.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A. and Bertin, P. (1999).** Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* **181:** 7500 – 7508.
- Soutourina, O. and Bertin, P. (2003).** Regulation cascade fo flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27:** 505 - 523.
- Stock, J. B., Surette, M. G., Levit, M. and Park, P. (1995).** Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis, p. 25-52. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two-component signal transduction. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Stock, J. B. and Surette, M. G. (1996).** Chemotaxis, p.1103-1129. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2<sup>nd</sup> ed. ASM press, Washington, D. C.
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Tokumitsu, A., Takaya, A., Suzuki, M., Sekiya, K., Matsui, H., Kutsukake, K and Yamamoto, T. (2002).** The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **184:** 645 – 653.
- Tomoyasu, T., Takaya, A., Isogai, E. and Yamamoto, T. (2003).** Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol. Microbiol.* **48:** 443 – 452.
- Trachtenberg, S., DeRosier, D. J., Aizawa, S. and Macnab, R. M. (1986).** Pairwise perturbation of flagellin subunits. The structural basis for the differences between plain an complex bacterial flagellar filaments. *J. Mol. Biol.* **190:** 569-576.
- Ulijasz, A. T., Andes, D. R., Glasner, J. D. and Weisblum, B. (2004).** Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J. Bacteriol.* **186:** 8123 – 8136.
- Volz, K. (1995).** Structural and functional conservation in response regulators, p.53-66. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two-component signal transduction. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Watnick, P. I. and Kolter, R. (1999).** Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. *Mol. Microbiol.* **34:** 586 – 595.
- Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L. and Kolter, R. (2001).** The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* **39:** 223 – 235.
- Welch, M., Osawa, K., Aizawa, S. I. and Eisenbach, M. (1994).** Effects of phosphorylation, Mg<sup>2+</sup>, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry.* **33:** 10470 – 10476.
- Wösten, M. M. S. M. (1998).** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22:** 127 – 150.
- Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S. I. and Macnab, R. M. (1986).** Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation and switching. *J. Bacteriol.* **166:** 187 – 193.
- Yao, S. Y., Luo, L., Har, K. J., Becker, A., Rüberg, S., Yu, G. Q., Zhu, J. B. and Cheng, H. P. (2004).** *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J. Bacteriol.* **186:** 6042 – 6049.

**York, G. M. and Walker, G. C. (1997).** The *Rhizobium meliloti* *exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. *Mol. Microbiol.* **25:** 117 – 134.

**York, G. M and Walker, G. C. (1998).** The *Rhizobium meliloti* ExoK and ExsH glycanases specifically depolymerize nascent succinoglycan chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95:** 4912 – 4917.

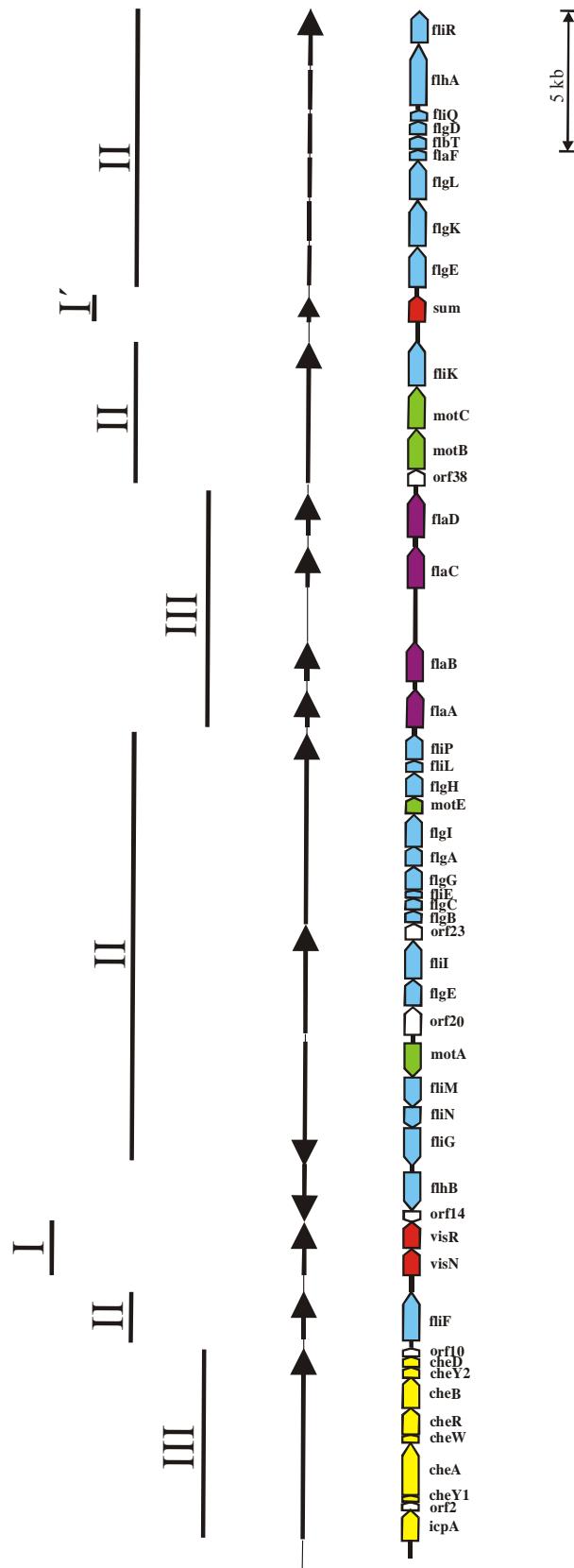
**Zhou, J., Fazzio, R. T. and Blair, D. F. (1998).** Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95:** 6436 – 6441.

# Anhang

Im Anhang sind folgende Abbildungen aufgeführt:

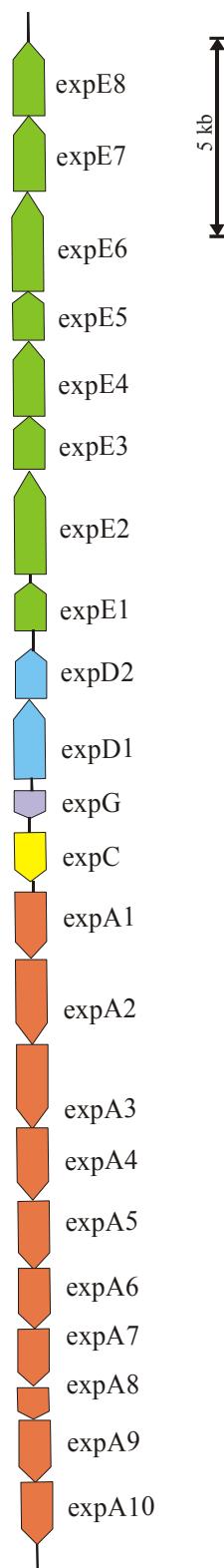
- **A1.** Genkarte des *flagellar regulon* von *S. meliloti*
- **A2.** Genkarte des *exp*-Genclusters von *S. meliloti*

## A1. Genkarte des *flagellar regulon* von *S. meliloti*



Gene sind maßstabsgereu durch farbige Boxen markiert, deren Polarität die Transkriptionsrichtung anzeigt. Gelb: Chemotaxisgene; grün: Motilitäsgene; violett: Flagellengene; blau: Gene für den Basalkörperkomplex; rot: Regulatorgene; weiß: offene Leserahmen (Sourjik *et al.*, 1998). Römische Zahlen ordnen die Gene des *flagellar regulon* den Hierarchieklassen der Genexpression zu (Sourjik *et al.*, 2000; Mühlbacher, 2000). Die einzelnen Operons sind durch Pfeile gekennzeichnet (Muschler, 2000). Neu identifizierte, nicht weiter charakterisierte Gene des *flagellar regulon* sind mit gestricheltem Pfeil markiert (Mühlbacher, 2000; Galibert *et al.*, 2001).

## A2. Genkarte des *exp*-Genclusters bei *S. meliloti*



Die Gene des *exp*-Genclusters sind in zwei polycistronischen (*expA*, *expE*), einem bicistronischen (*expD*) und zwei monocistronischen Operons (*expC*, *expG*) auf dem Megaplasmid pSymb lokalisiert. Die fünf Operons (Einteilung nach Becker *et al.*, 1997) sind mit unterschiedlichem Farocode markiert. Das *expG*-Gen codiert für den Transkriptionsaktivator ExpG der vier Operons mit *exp*-Strukturgenen. Des Weiteren zeigt ExpG autoregulatorischen Einfluß auf die *expG*-Transkription. Gene sind maßstabsgerecht als Pfeile abgebildet, deren Polarität die Transkriptionsrichtung anzeigt.

# **Veröffentlichungen**

## **Posterpräsentationen**

C. Rotter, B. Scharf, A. Becker and R. Schmitt  
Sum (Rem), a transcriptional regulator in the flagellar regulon of *Sinorhizobium meliloti*.  
März, 2004, VAAM-Jahrestagung, Braunschweig.

## **Publikationen**

C. Rotter, S. Mühlbacher, B. Scharf & Schmitt, R. (2005)  
Rem, a new transcriptional regulator of the flagellar regulon in *Sinorhizobium meliloti*.  
*(in preparation)*.

# Danksagung

Mein Dank gebührt an erster Stelle Herrn **Prof. Dr. Rüdiger Schmitt** für die Möglichkeit, die Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können, für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und nicht zuletzt für die Ratschläge und Anmerkungen während des Verfassens dieser Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit, in Bielefeld die *Microarray*-Analysen durchführen zu können.

Besonders bedanke ich mich bei Frau **PD Dr. Birgit Scharf** für die gute Zusammenarbeit und dafür, daß sie zu jeder Zeit für alles ein offenes Ohr hatte. Auch für die Möglichkeit, auf den Tagungen in Dresden und Braunschweig Erfahrungen zu sammeln und für die Vermittlung des Forschungsaufenthalts in Würzburg danke ich ihr herzlich.

**PD Dr. Anke Becker** (Universität Bielefeld) danke ich für die gute Betreuung in Bielefeld und die Einführung in die Welt der *Microarray*-Technologie.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Dagmar Beier** und Frau **Dr. Gabriele Gerlach** (Universität Würzburg) für die herzliche Aufnahme in Würzburg, die Vermittlung der DNaseI-*footprinting*-Technik und die Hilfe in allen praktischen und theoretischen Fragen weit über meinen Forschungsaufenthalt in Würzburg hinaus.

**Dr. Martin Haslbeck** (TU-München) danke ich für die Durchführung der CD-Spektroskopie und der Analytischen Gelfiltration.

Bei meinen Laborkollegen **Elke** (Summa summarum ein Super-Typ), **Veronika**, **Verena** und **Peter** (Achtung - ein Wernberger) möchte ich mich für das ungezwungene Arbeitsklima und die diversen außeruniversitären Aktivitäten bedanken.

Ein ganz spezieller Dank gilt der **Andrea** (und ihrem Fernsehbrettl), die eine richtig gute Freundin für mich geworden ist (wärst du auch ohne Fernsehbrettl!!!).

Ganz besonders möchte ich **meinen Eltern** (den besten Eltern von Welt) danken, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben und die immer für mich da sind.

Ein ganz dickes Danke gehört dem **Schnecko**, der sich auch in frustigen Zeiten nicht erschüttern ließ und mir jede Menge Kraft gegeben hat.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

---

**Christine Rotter**