

Elektrostatische Kraftübertragung und Kontrolle der Chemokinesis im Flagellenmotor von *Sinorhizobium meliloti*

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



vorgelegt von
URSULA ATTMANNSPACHER
aus Regensburg

Regensburg, Februar 2004

Promotionsgesuch eingereicht am: 5. Februar 2004

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Günter Hauska

Erstgutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schmitt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Thomm

Dritter Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material	13
2.1. Bakterien und Plasmide	13
2.2. Verwendete Oligonukleotide	19
2.3. Chemikalien und Enzyme	23
2.4. Nährmedien und Antibiotika	24
2.4.1. Medien für die Anzucht von <i>E.coli</i>	24
2.4.2. Medien für die Anzucht von <i>S.meliloti</i>	25
2.5. Puffer und Lösungen	26
2.5.1. Lösungen für Mini- / Midi-Plasmidisolierung	26
2.5.2. Lösungen für genomische DNA-Isolierung aus <i>S.meliloti</i>	26
2.5.3. Lösungen für DNA-Auf trennung (Agarosegelektrophorese)	27
2.5.4. Lösungen für DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung	27
2.5.5. Lösungen zur Auf trennung von Proteinen	27
2.5.6. Lösungen zum Transfer von Proteinen	28
3. Methoden	29
3.1. Kultivierung von Bakterien	29
3.1.2. Anzucht und Lagerung von <i>E.coli</i>	29
3.1.3. Anzucht und Lagerung von <i>S.meliloti</i>	29
3.2. Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	30
3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen (Mini-Plasmid-isolierung)	30
3.2.2. Midi-Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> -Zellen	30
3.2.3. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S.meliloti</i> -Zellen	31
3.2.4. Auf trennung von DNA durch Agarosegelektrophorese	31
3.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Reinigung	31

3.3. Enzymatische Modifizierung von DNA	32
3.3.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	32
3.3.2. Ligieren von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA	32
3.4. Transformation von <i>E.coli</i>	33
3.5. <i>Plasmid rescue</i>	33
3.6. PCR-Methoden	34
3.6.1. PCR aus einer <i>S.meliloti</i> -Einzelkolonie	35
3.6.2. Herstellung von AS-Austausch-Mutanten und Einführen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR-Mutagenese (<i>overlap extension</i>)	35
3.7. DNA-Sequenzanalysen und Auswertung	37
3.8. Konjugativer Plasmidtransfer von <i>E.coli</i> nach <i>S.meliloti</i>	37
3.9. Nukleinsäuretransfer und Hybridisierung	39
3.9.1. Nukleinsäuretransfer	39
3.9.2. Markierung von Sonden	39
3.9.3. Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion	39
3.10. Immunchemische Methoden	40
3.10.1. Gewinnung von denaturierten Proteinproben	40
3.10.2. Auf trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	40
3.10.3. Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrocellulose-Membran (<i>Western blot</i>)	40
3.10.4. Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz	41
3.11. Physiologische Untersuchung von <i>S.meliloti</i> und <i>E.coli</i>	41
3.11.1. Schwärmtests von <i>S.meliloti</i> -Mutanten	41
3.11.2. Bestimmung der Geschwindigkeit freischwimmender <i>S.meliloti</i> - Zellen	42
3.11.3. Geschwindigkeitsmessungen bei unterschiedlichen äußereren pH-Werten	42

4. Ergebnisse	44
4.1. Vergleichende Genkartierung unter Herausstellung konservierter Motor-komponenten	45
4.1.1. Sequenzierung von <i>motC</i> , <i>motA</i> und <i>fliG</i> aus <i>Rhizobium lupini</i> H13-3	45
4.1.2. Vergleichende Genkartierung der <i>flagellar regulon</i> -Cluster von vier α -Proteobakterien	48
4.2. Untersuchungen zur Charakterisierung des Motilitätsproteins MotC	50
4.2.1. Stabilität der verkürzten Proteine in <i>motC</i> -Deletionsmutanten	50
4.2.2. Schwimmgeschwindigkeiten von <i>S.meliloti</i> und <i>E.coli</i> bei erhöhten pH-Werten	56
4.3. Analyse der MotA-FliG-Wechselwirkung mittels gezielter Mutagenese	58
4.3.1. Einführung	58
4.3.2. Sequenzvergleiche	59
4.3.3. Methodischer Ansatz	60
4.3.4. Mutanten mit Aminosäure-Substitutionen in MotA oder FliG und Kombinationen	61
a) Schwärmtests	61
b) Messungen der Schwimmgeschwindigkeit	64
4.3.5. Zur <i>in vivo</i> Stabilität mutierter FliG-Proteine	73
4.4. Herstellung und Charakterisierung einer <i>fliF-fliG</i> -Fusionsmutante	75
5. Diskussion	80
5.1. Orthologe Gene von <i>Rhizobium lupini</i> H13-3 und ihre Anordnung im <i>flagellar regulon</i>	80
5.2. Domänen und Funktionen von MotC	82
5.3. Wechselwirkungen an der Stator-Rotor-Kontaktfläche	84
5.3.1. Natur der Wechselwirkungen	84
5.3.2. Chemokinesis	85
5.3.3. Abschirmungseffekte	85
5.3.4. Modell: Die variable Rotationsgeschwindigkeit wird an der MotA-FliG-Kontaktfläche reguliert	86

6. Zusammenfassung	88
7. Literaturverzeichnis	90
Anhang	96
A1. Genomische Sequenzen von <i>orf38</i> , <i>motB</i> und <i>motC</i> aus <i>Rhizobium lupini</i> H13-3	97
A2. Genomische Sequenzen von <i>motA</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliG</i> , <i>flhB</i> und <i>orf14</i> aus <i>Rhizobium lupini</i> H13-3	103
A3. Vergleich der abgeleiteten Sequenzen von MotA, MotB, MotC, FliM, FliN und FliG von <i>S.meliloti</i> und <i>R.lupini</i> H13-3	113

Abkürzungen

abs.	absolut
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
<i>ccw</i>	<i>counterclockwise</i> , gegen den Uhrzeigersinn
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
<i>cw</i>	<i>clockwise</i> , im Uhrzeigersinn
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphate
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
GET	Glucose-EDTA-Tris
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
β-ME	β-Mercaptoethanol
kb	Kilobasenpaare
MCP	Methyl-akzeptierendes Chemotaxis-Protein
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
Nm	Neomycin
Nm ^R	Neomycin-Resistenz
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD _X	Optische Dichte der Zellen bei einer Wellenlänge von X nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>pmf</i>	<i>proton motive force</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese
Sm	Streptomycin
Sm ^R	Streptomycin-Resistenz
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1. Einleitung

Bereits phylogenetisch sehr alte *Bacteria* besitzen die Fähigkeit zu einer einfachen Sensorik und zur aktiven Fortbewegung durch rotierende Flagellen. Sie sind damit in der Lage, aus eigener Kraft für sie günstige Lebensbedingungen aufzusuchen und vor ungünstigen zu flüchten. Diese Fähigkeit wird ihren Beitrag dazu geleistet haben, daß diese Mikroorganismen im Lauf der Evolution die unterschiedlichsten Habitate besiedelten. Die Vielfalt an Lebensräumen stellte ihrerseits Anforderungen an die Adaptation. So entstanden nicht nur neue Bakterienspezies, sondern auch Unterschiede in den sensorischen und Antriebssystemen. Ausführlich untersucht ist die Beweglichkeit von *Escherichia coli*, das den Dünndarm des Menschen besiedelt und leicht zu kultivieren ist. Bei Colibakterien handelt es sich um Vertreter der *Enterobacteriaceae* innerhalb der γ -Subgruppe der Proteobakterien. Eine Übersicht über die Domäne der *Bacteria* ist in Abb.1 gezeigt.

Mittlerweile sind auch andere Bakterienarten hinsichtlich ihrer Beweglichkeit in das wissenschaftliche Interesse gerückt, vor allem Vertreter der α -Subgruppe der Proteobakterien. Untersuchungen an diesen haben gezeigt, daß deutliche Unterschiede zum enterobakteriellen System bestehen (Armitage & Schmitt, 1997; Scharf & Schmitt, 2003; Schmitt, 2002).

Voraussetzungen für das gezielte Aufsuchen günstiger Faktoren ist ein empfindliches System der Wahrnehmung und Verarbeitung von Reizen (Lock- bzw. Schreckstoffen) sowie Organelle der Bewegung. *E.coli*-Zellen zeigen in einem Milieu ohne Lock- oder Schreckstoffe geradlinige Läufe, die immer wieder durch „Taumeln“ und damit verbundenen Richtungswechseln unterbrochen werden (Berg, 2000); dieses Lauf-Taumel-Verhalten wird auch als *random walk* bezeichnet (Berg & Brown, 1972). Setzt man Lockstoffe, z.B. Aminosäuren oder Zucker hinzu, so verlängert das Bakterium geradlinige Läufe und unterdrückt die Taumelphasen (Macnab & Koshland, 1972). Dieses, im Lockstoffgradienten gerichtete Laufverhalten wird als *biased random walk* bezeichnet (Berg & Brown, 1972).

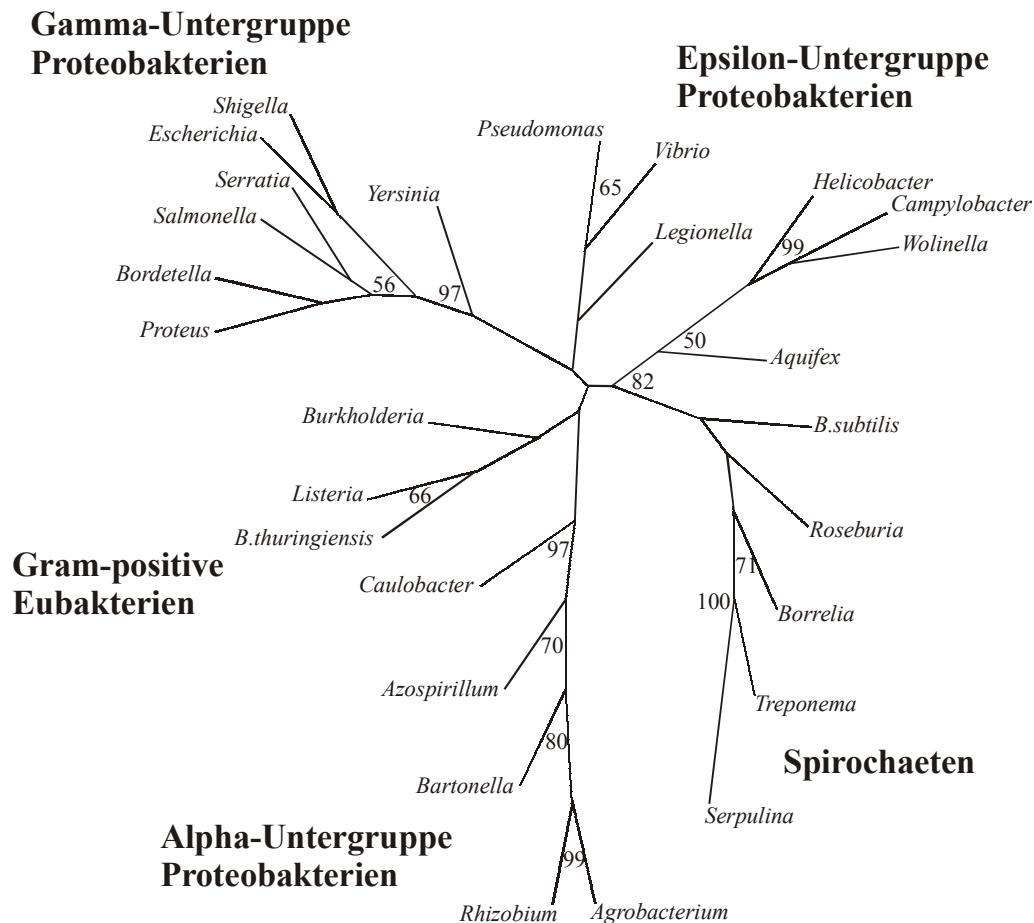


Abb.1.Phylogenetischer Baum der *Bacteria*. Die Zahlen bezeichnen die relativen Abstände zueinander (nach Ochman & Wilson, 1987).

Die schwimmende *E.coli*-Zelle besitzt für ihren Antrieb durch das Medium vier bis sechs peritrich insertierte, rotierende Flagellen. Diese einzigartigen, rotierenden Bewegungsorganelle werden in drei morphologische Abschnitte gegliedert: a) das helikale Filament und b) den Haken, die außerhalb der Zelle liegen, und c) den Basalkörper, der die äußere Membran, die Peptidoglycanschicht und die Cytoplasmamembran durchspannt. Der proximale Teil des Basalkörpers ist der Flagellenmotor, dessen Rotation durch den Protonengradienten über die Cytoplasma-Membran (*proton motive force; pmf*) energetisiert wird. Die Rotation wird über einen Schaft (gehalten von zwei Lagern in der Zellhülle) auf den flexiblen Haken übertragen und von da auf das helikale Filament. Das rotierende Geißelfilament ist der Effektor, der die Zelle nach dem hydrodynamischen Prinzip einer Schiffsschraube vorantreibt. Die Filamente können Längen von 5 bis 10 µm erreichen und sind damit drei- bis fünfmal so lang wie die Zelle. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigen die schraubenförmigen Filamente von Enterobakterien eine schwach strukturierte Oberfläche mit 11 longitudinalen Helixlinien; die Filamente werden auch als „glatt“

bezeichnet (Schmitt *et al.*, 1974). Sie sind aus identischen Flagellinuntereinheiten aufgebaut, deren einzelne Monomere (FliC) mehrere Konformationen einnehmen können, wobei die L- und die R-Form die beiden Extreme darstellen (Samatey *et al.*, 2001). Bei Rotation des linkshändig-helikalen Filaments gegen den Uhrzeigersinn (*ccw*) nehmen die Monomere die L-Form ein, entsprechend der Linkshändigkeit der Filamente. Mehrere helikale Filamente lagern sich zu einem gemeinsamen Bündel zusammen und treiben die Zelle voran. Kehrt sich die Rotationsrichtung einzelner Geißeln, ausgehend von der Basis, um (*cw*), wechseln die Monomeren sukzessive in die R-Form und es bilden sich partiell rechtshändige Filamente. Einzelne Filamente nehmen eine *semicoiled* Struktur an, das Bündel fällt auseinander. Die Zelle taumelt und orientiert sich neu im dreidimensionalen Raum. Nach ca. 0,1s setzt die *ccw*-Rotation wieder ein, die Filamente gehen in linkshändige Helices über und bilden wieder ein Bündel aus, das die Zelle geradlinig vorantreibt (ca. 1s). Schwimmuster und *ccw-cw* Geißelrotation einer *E.coli*-Zelle sind in Abb.2 schematisch dargestellt.

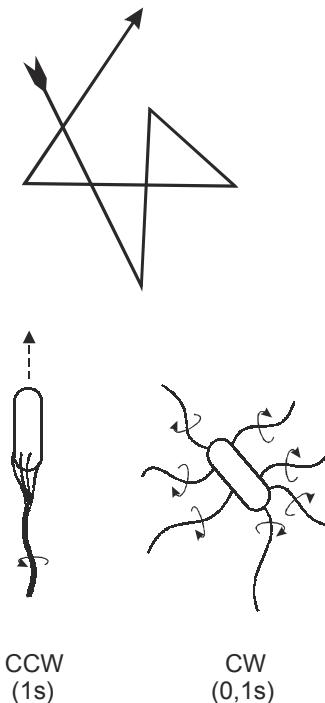


Abb.2: Schwimmuster (oben) und Flagellenrotation (unten) einer *E.coli*-Zelle. Bei *E.coli* werden Richtungsänderungen durch Wechseln des Rotationssinns von *ccw* nach *cw* erreicht: *ccw*-Rotation: Lauf; *cw*-Rotation: Taumeln.

Über den flexiblen Haken (*universal joint*) ist das rotierende, helikale Filament (*propeller*) mit dem in der Zellhülle verankerten Basalkörper verbunden. Dieser enthält den rotierenden Teil des für die Drehbewegung entscheidenden Geißelmotors (*drive*). Der

Basalkörper besteht aus zwei Ringen, die als Lager die Durchführung des zentralen rotierenden Schafts durch Peptidoglycan und äußere Membran sichern. Der Flagellenmotor aus MS- (Membran) und C-Ring (Cytoplasma) ist fest mit dem Schaft verbunden. Der Motor bezieht seine Energie (Drehmoment) aus der *pmf* über ringförmig in der Membran angeordnete Protonenkanäle (MotA-MotB). Der gesamte Aufbau eines Flagellums nach elektronenmikroskopischer Analyse ist in Abb.3 zusammengefaßt.

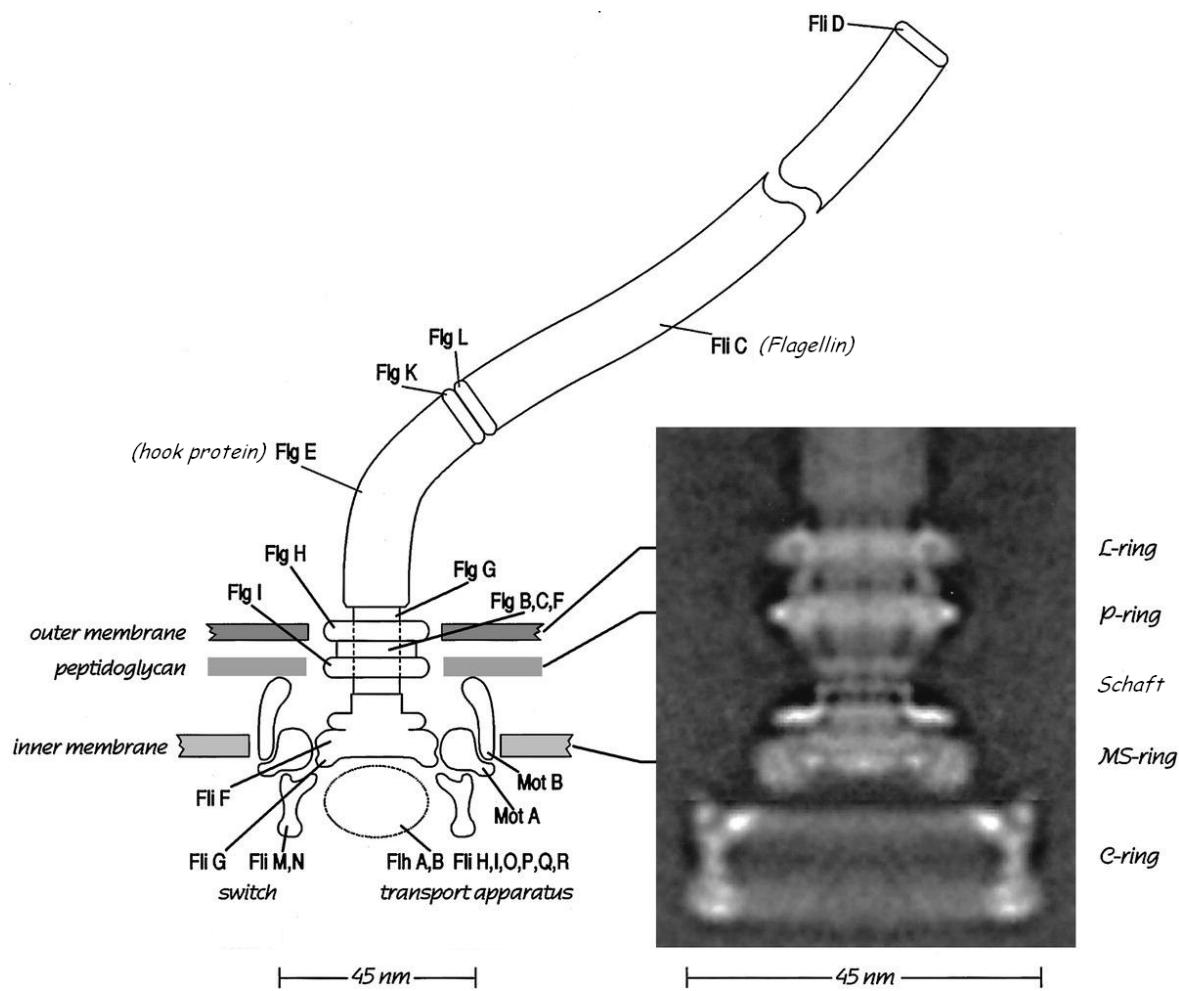


Abb.3. Links: Schnitt durch ein *E.coli*-Flagellum mit Basalkörper, Haken und Filament. Rechts: Optische Rekonstruktion des proximalen Teils eines Flagellums aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Thomas et al., 2001). Bezeichnung beteiligter Komponenten: L- und P-Ring: Verankerung des Basalkörpers in der Lipopolysaccharid- und Peptidoglycanschicht (*outer membrane, peptidoglycane*); MS-Ring: in der Cytoplasma-Membran (*inner membrane*) lokalisiert (*supramembrane*), und FliG, mit Schaf verbunden; C-Ring: cytoplasmatischer *switch* Komplex aus FliM- und FliN-Multimeren; MotA, MotB: Motilitätsproteine (H^+ -Kanal); Flh-, Fli-Gene: Transportapparat für Proteinexport; FlgB,C,F,G,H,I: Komponenten der Ringe und des Schafts; FlgE: Haken; FlgK,L: Verbindung zwischen Haken und Filament; FliC: Filament; FliD: Kappe (nach Berg, 2003).

Der L-Ring (FlgH), in der Lipopolysaccharidschicht lokalisiert, und der P-Ring (FlgI) in der Peptidoglycanschicht bilden Lager für den rotierenden Schaft (FlgB, FlgC, FlgF). Im Gegensatz dazu sind MS-Ring und C-Ring fest mit dem Schaft verbunden. Der MS-Ring, aus 26 FliF-Monomeren gebildet, an die 26 FliG-Monomere fest angegliedert sind, ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Auf der cytoplasmatischen Seite an den MS-Ring assoziiert ist der C-Ring oder *switch* Komplex, bestehend aus Multimeren der Proteine FliM und FliN. Aufgabe von FliG ist die energetische Kopplung des FliG-Rotors an die Protonenkanäle zur Drehmomenterzeugung, die Drehrichtung wird über den C-Ring (*switch* Komplex) kontrolliert. Die Protonenkanäle stellen den fest mit der Zelle verankerten Teil des Motors dar (Stator). Sie bestehen aus den Transmembran-Proteinen MotA und MotB und stellen dem Motor die elektrochemische Energie für die Rotation (Drehmoment) zur Verfügung (Dean *et al.*, 1984; Stoltz & Berg, 1991). In elektronenmikroskopischen Gefrierbruch-Aufnahmen sind in der Draufsicht auf die Cytoplasmamembran ca. zehn nagelkopfartige Strukturen zu erkennen, die den Basalkörper radial umgeben und als die beschriebenen Protonenkanäle interpretiert wurden (Khan *et al.*, 1988). MotA durchspannt die Cytoplasmamembran mit vier (Dean *et al.*, 1984; Zhou *et al.*, 1995), MotB mit einer transmembranen Helix (Chun & Parkinson, 1988). MotB besitzt eine große periplasmatische Domäne mit einem konservierten Sequenzmotiv im C-terminalen Anteil mit der Funktion eines Peptidoglycanankers (DeMot & Vanderleyden, 1994; McCarter, 1994; Koebnik, 1995). Die B-Komponente ist jener Bestandteil des Motors, welcher die Ionenspezifität des Motors festlegt (Asai *et al.*, 2000), hier für Protonen, bei anderen Bakterien, wie z.B. *Vibrio*, für Na^+ -Ionen (Hirota *et al.*, 1981). Die Kopplung des Flagellenmotors an die energetisierenden Protonenkanäle erfolgt vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäureresten (Zhou *et al.*, 1998). Dies ist ein zentraler Aspekt, der in dieser Arbeit umfassend untersucht wird. Die sensorische Reizwahrnehmung und die Signalübertragung wird durch das ubiquitäre System der Histidin-Autokinase-Signalkette mit assoziiertem Responsregulator verwirklicht, wie in Abb.4 schematisch dargestellt. (Stock & Surette, 1996; Eisenbach, 1996).



Abb.4. Schema der Histidin-Autokinase-Signalkette. Erläuterungen im Text.

Die Reizaufnahme erfolgt durch spezifische Transmembranrezeptoren, den methylierbaren Chemotaxisproteinen (MCPs). Die Monomeren bestehen aus drei Domänen: einer periplasmatischen Rezeptordomäne, zwei Transmembranhlices und einer cytoplasmatischen Signaldomäne. Die cytoplasmatische Domäne steht über CheW mit der Histidinkinase CheA in Kontakt. Ein vorhandener Reiz inaktiviert die Autophosphorylierung von CheA, die Abwesenheit eines Reizes führt zur Aktivierung der Autophosphorylierung. Die Phosphatgruppe wird auf den Responsregulator CheY übertragen. Der phosphorylierte Responsregulator CheY~P diffundiert im Cytoplasma und bindet an das Motorprotein FliM (Untereinheit des C-Rings). Infolge dieser Bindung kommt es zu einer kurzzeitigen Änderung der Drehrichtung (*switch*) des Motors von *ccw* nach *cw* (Borkovich & Simon, 1990). Dieses Umschalten führt zu einer kurzen Taumelbewegung, die Zelle ändert ihre Richtung. CheY~P zerfällt spontan mit einer Halbwertszeit von etwa 10 s; dieser Vorgang wird durch die Phosphatase CheZ 10-fach beschleunigt (Hess *et al.*, 1988; Silversmith *et al.*, 2003). Dieser Mechanismus ermöglicht es, die Umorientierung der Zelle effektiv zu regulieren (Scharf *et al.*, 1998).

Bei konstanter Reizkonzentration muß das Signal zurückgestellt werden (Adaptation). Die Empfindlichkeit der Chemorezeptoren wird mittels Methylierung von spezifischen Glutamatresten in der cytoplasmatischen Domäne, durch eine Methyltransferase, CheR, reguliert (Terwilliger & Koshland, 1984; Danielson *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001). Der Rezeptor wird mittels Demethylierung durch die aktivierte Methylesterase, CheB~P, empfindlicher gestellt. CheB erhält die Phosphatgruppe, genau wie CheY, von der Histidinkinase, CheA. Der Mechanismus ist als Schema in Abb.5 dargestellt.

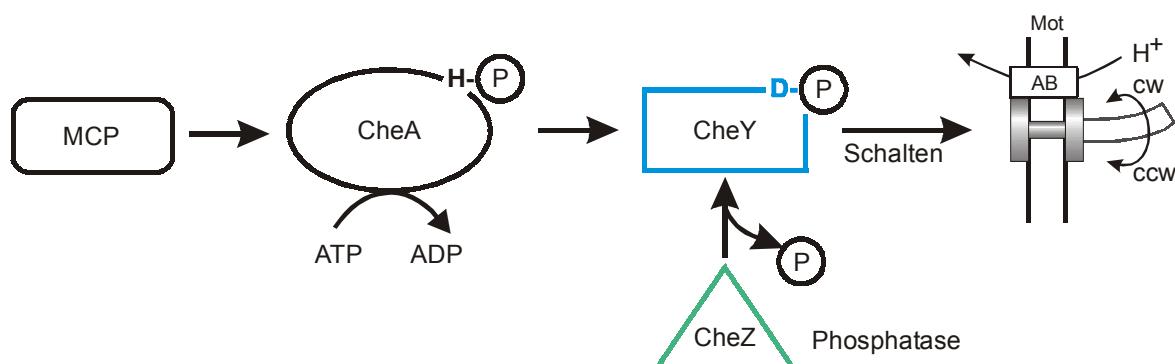


Abb.5. Schematische Übersicht der zentralen Komponenten der chemotaktischen Signaltransduktionskette von *E.coli* (Schmitt, 2002). Abkürzungen: MCP: methylierbares Chemotaxisprotein; CheA: Histidinkinase CheA; CheY: Respons-Regulator CheY; CheZ: Phosphatase CheZ; D: Aspartat; H: Histidin; P: Phosphat; MotA,B: Motilitätsproteine MotA, MotB (Erläuterungen im Text).

Untersuchungen an anderen Bakterien haben gezeigt, daß das enterobakterielle Modellsystem keineswegs allgemeingültig ist. In den letzten Jahren war vor allem das Verhalten hinsichtlich Chemotaxis und Schwimmen von Vertretern der α -Subgruppe der Proteobakterien Gegenstand intensiver Forschung (Armitage & Schmitt, 1997; Scharf & Schmitt, 2003). Der phylogenetische Abstand der α - zu den γ -Proteobakterien liegt bei mindestens 500 Millionen Jahren (Ochman & Wilson, 1987). Mitglieder der α -Subgruppe sind Bodenbakterien, wie z.B. *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens* oder *Sinorhizobium meliloti*. *S.meliloti* ist ein Vertreter der symbiotischen Rhizobiaceen, die in Wurzelknöllchen von Leguminosen wie *Medicago sativa* (Luzerne), *Melilotus officinalis* (Steinklee) und *Trigonella foenum-graecum* (Bockshornklee) molekularen Luftstickstoff fixieren können. Die Besiedlung und Bewegung im Boden und in der Wurzelsphäre von Pflanzen stellt neue Anforderungen an die Anpassungsfähigkeit. Dementsprechend verfügt *S.meliloti* über eine größere metabolische Flexibilität als *E.coli* und zeigt deutliche Unterschiede in den Mechanismen der Chemotaxis und Motilität (Schmitt, 2002). *S.meliloti* besitzt vier bis sechs peritrich insertierte, rechtshändig helikale Geißeln, die sich in ihrem Aufbau deutlich von der *E.coli*-Geißel unterscheiden. Im Elektronenmikroskop ist eine prominente Struktur aus drei helikalen Bändern zu erkennen (Schmitt *et al.*, 1974; Trachtenberg *et al.*, 1986; Cohen-Krausz & Trachtenberg, 1998). Diese „komplexen“ Geißeln erleichtern das Schwimmen in viskosen Medien (Götz *et al.*, 1982). Die Filamente sind aus vier ähnlichen Flagellin-Monomeren FlaA, FlaB, FlaC und einem kleineren FlaD aufgebaut (Pleier, 1988; Platzer *et al.*, 1997; Sourjik *et al.*, 1998; Scharf *et al.*, 2001). Wahrscheinlich bilden sich Heterodimere aus FlaA einerseits und FlaB-, FlaC- oder FlaD-Monomeren andererseits, die zu einer rechtshändigen Helix assemblieren. Komplexe Geißeln sind rigider als die flexiblen, glatten Geißeln der Enterobakterien und können keine polymorphen Transitionen zu einer Helix gegenläufiger Händigkeit vollziehen. Entsprechend rotieren die Flagellen von *S.meliloti* nur im Uhrzeigersinn (*cw*), ihre Drehrichtung verändern sie nicht. Hydrodynamisch kann nun eine rechtshändige Schraube bei *cw-Rotation* einen Vorwärtsantrieb ausüben. Wie aber kommt es zu Richtungswechseln der schwimmenden Zelle? In unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, daß die Flagellen dazu ihre Rotationsgeschwindigkeit verlangsamen (Platzer *et al.*, 1997; Schmitt, 2002). Das rechtshändige, *cw* rotierende Geißelbündel treibt schwimmende Bakterien geradlinig voran. Die Variation der Rotationsgeschwindigkeit einzelner Geißeln führt zu asynchroner Reaktion und zum Zerfallen des Geißelbündels: die Zelle ändert ihre

Schwimmrichtung (Scharf, 2002). Schwimmuster und Geißelrotation einer *S.meliloti*-Zelle sind in Abb.6 schematisch dargestellt.

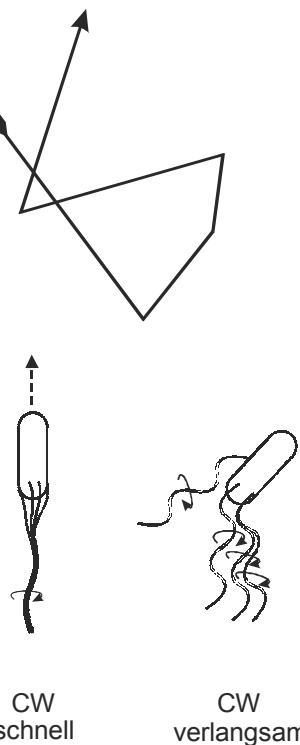


Abb.6. Schwimmuster (oben) und Flagellenrotation (unten) einer *S.meliloti*-Zelle. Die Geißeln von *S.meliloti* rotieren immer *cw*, asynchrones Abbremsen der Flagellen führt zum Auseinanderfallen des Bündels und zu einer Richtungsänderung der Zelle.

Nach Lockstoffzugabe erhöht sich die Rotationsgeschwindigkeit der Geißeln, bei Entfernen des Lockstoffs fällt die Geschwindigkeit kurzzeitig unter das Ausgangsniveau, wie *tethering* Experimente gezeigt hatten (Sourjik & Schmitt, 1996). Die Zunahme der Rotations- und damit der Schwimmgeschwindigkeit, die Chemokinesis, ist demnach eine wesentliche Eigenschaft der Reaktion von *S.meliloti* auf chemische Reize. Dieser grundsätzlich andere Mechanismus der Flagellenrotation bei *S.meliloti* sollte eine molekulare Basis haben: Davon wird ein zentraler Aspekt – die Wechselwirkungen zwischen Stator und Rotor an der MotA-FliG-Kontaktfläche – in dieser Arbeit untersucht. Weitere Unterschiede betreffen drei neue zusätzliche Motilitäts (Mot)-Proteine, MotC, MotD und MotE, sowie das Phosphat-Relais zwischen Kinase (CheA) und zwei Responsregulatoren, CheY1 und CheY2. Das sensorische System von *S.meliloti* ist in Abb.7 gezeigt (Schmitt, 2002).

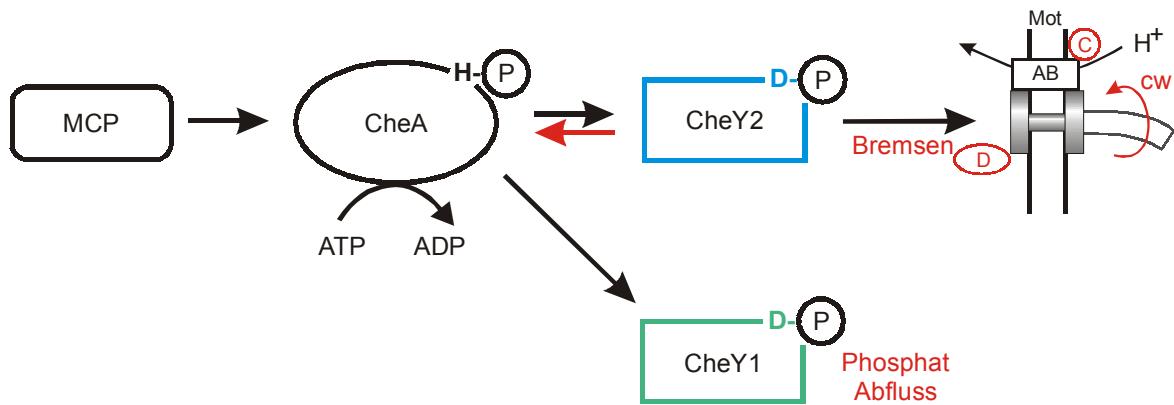


Abb.7. Schematische Übersicht der zentralen Komponenten der chemotaktischen Signaltransduktionskette von *S.meliloti* (Schmitt, 2002). Abkürzungen: MCP: methylierbares Chemotaxisprotein; CheA: Histidinkinase CheA; CheY1,2: Respons-Regulatoren CheY1, CheY2; CheZ: Phosphatase CheZ; P: Phosphat; MotA,B,C,D: Motilitätsproteine MotA, MotB, MotC, MotD (Erläuterungen im Text).

Auf die neuen molekularen und dynamischen Verhältnisse bei *S.meliloti* (als Prototyp für viele verwandte Spezies) soll hier kurz eingegangen werden. Im Gegensatz zu *E.coli* mit nur einem Responsregulator besitzt *S.meliloti* zwei Responsregulatoren, CheY1 und CheY2, aber keine Phosphatase, CheZ (Greck *et al.*, 1995; Sourjik & Schmitt, 1996). CheY2~P bindet als dominanter Responsregulator an den Motor und reduziert so die Rotationsgeschwindigkeit des Flagellums. Zur Dephosphorylierung und daraus resultierenden schnellen Inaktivierung von CheY2~P benutzt *S.meliloti* das Prinzip der Retroporphosphorylierung von CheA; von dort wird Phosphat auf CheY1 übertragen. CheY1~P fungiert somit als „Abfluß“ für Phosphatgruppen und übernimmt damit formal die Rolle von CheZ bei *E.coli*. Die neuen Eigenschaften des *S.meliloti*-Motors – konsequente cw-Rotation und Geschwindigkeits-Variation – lassen molekulare Unterschiede im Motoraufbau vermuten. Tatsächlich wurden veränderte und neue Motorkomponenten entdeckt, die im folgenden kurz beschrieben werden. Die zentralen Komponenten der Umwandlung von elektrochemischer in mechanische Energie, MotA, MotB und FliG, wurden auch bei *S.meliloti* gefunden (Sterr, 1995; Platzer, 1996; Platzer *et al.*, 1997; Sourjik *et al.*, 1998). Zusätzlich wurden neue Motorkomponenten identifiziert, nämlich MotC, MotD und MotE. Das Fehlen eines dieser Proteine führt zum paralysierten Phänotyp. MotD ist im Cytoplasma lokalisiert und tritt mit FliM (und CheY2?) in Wechselwirkung. Es wurde postuliert, daß MotD als Gegenspieler zur „Bremse“ CheY2~P wirkt (Schmitt, 2002).

Die reifen Proteine MotC und MotE liegen im Periplasma; MotE dient als spezifisches Chaperon für MotC im Periplasma (Eggenhofer *et al.*, 2004). MotC bindet an MotB, das im N-terminalen Bereich um eine Extradomäne von etwa 100 AS-Resten verlängert ist (Platzer *et al.*, 1997; Haslbeck, 1997; Halbach, 2003). MotB verfügt wie das *E.coli*-Protein über einen C-terminalen Peptidoglycananker und eine N-terminale membrandurchspannende Helix mit dem für die Protonenübertragung essentiellen Asp32 (Blair *et al.*, 1991). Durch seine (stöchiometrische) Bindung an MotB ermöglicht MotC erst den Protonenfluß durch den MotA-MotB-Kanal (Halbach, 2003). Es ist denkbar, daß MotC den Protonenfluß „bündelt“ und so auch bei hohem pH noch die Motorrotation ermöglicht; seine Bindung an die Cytoplasmamembran hat zu der These geführt, daß MotC das Membranpotential mißt und die Motoraktivität entsprechend steuert (Halbach, 2003; R.Schmitt, pers. Mitt.). Systematische Deletionsanalysen von MotC wiesen darauf hin, daß die C-terminale Domäne (90 AS-Reste) teilweise, der zentrale Bereich jedoch essentiell für die Motoraktivität waren. Über weitere Experimente dazu wird in dieser Arbeit berichtet. Zur Identifizierung funktionell wichtiger Reste und Domänen, vor allem bei neu entdeckten Genen, ist es hilfreich, die orthologen Sequenzen mehrerer verwandter Spezies zu vergleichen, um konservierte Bereiche festlegen zu können. In den Genomen der *S.meliloti*-verwandten α -Proteobakterien *A.tumefaciens* und *Mesorhizobium loti* wurden MotC, MotD und MotE ebenfalls gefunden (Goodner *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2000). MotC wies konservierte Domänen v.a. im N-terminalen und zentralen Bereich auf, MotD verfügte über konservierte Reste vor allem im zentralen und C-terminalen Bereich (Eggenhofer, 2001).

Während diese Zusatzkomponenten zweifellos wichtige Teilstufen ausüben, liegt doch das zentrale Problem der Motorfunktion in der Frage nach dem Mechanismus der Umwandlung der elektrochemischen Energie des Protonengradienten in mechanische Arbeit. Einen Teil der Antwort dürfte jede Lösung des Energietransfermechanismus vom Stator zum Rotor beitragen, also die Struktur und wirkenden Kräfte an der Stator (MotA-MotB)-Rotor (FliG)-Kontaktfläche. Experiment-gestützte Modelle von Kojima & Blair (2001) und Schmitt (2003) postulieren, daß die eigentliche Energieumwandlung im Stator (H^+ -Kanal) stattfindet und daß die resultierenden Konformationsänderungen als „power strokes“ vom Stator auf den Rotor übertragen werden. Vieles spricht dafür, daß die Kraftübertragung per Coulomb-Kräften zwischen Ladungsantipoden erfolgt. Nach dem Helix-Rotations-Modell (Schmitt, 2003) würden über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäureresten in der cytoplasmatischen Schleife von MotA und in

der C-terminalen Domäne von FliG kurze Rotationsbewegungen auf den Rotor übertragen. Auf der MotA-Seite sind die konservierten Reste Arg90 und Glu98, bei FliG die Reste Arg281, Asp288 und Asp289 essentiell (Zhou & Blair, 1997), Lys264 und Arg297 sind von nachrangiger Bedeutung (Lloyd & Blair, 1997; Zhou *et al.*, 1998). Die Anordnung der geladenen Aminosäurereste an der Kontaktfläche sowie der orthologen Reste von *S.meliloti* ist im Schema von Abb.8 gezeigt.

Bezüglich der Erzeugung des Drehmoments am bakteriellen Motor wurden zahlreiche Modelle aufgestellt (Meister *et al.*, 1989; Berry, 1993; Elston & Oster, 1997; Berg, 2000; Schmitt, 2003). Biochemische Daten legen nahe, daß der Durchfluß eines Protons durch einen Protonenkanal des Stators eine Konformationsänderung verursacht, welche als Kraft auf den Rotor wirkt und ihn um einen kleinen Teil einer Umdrehung vorantreibt (Kojima & Blair, 2001; Blair, 2003).

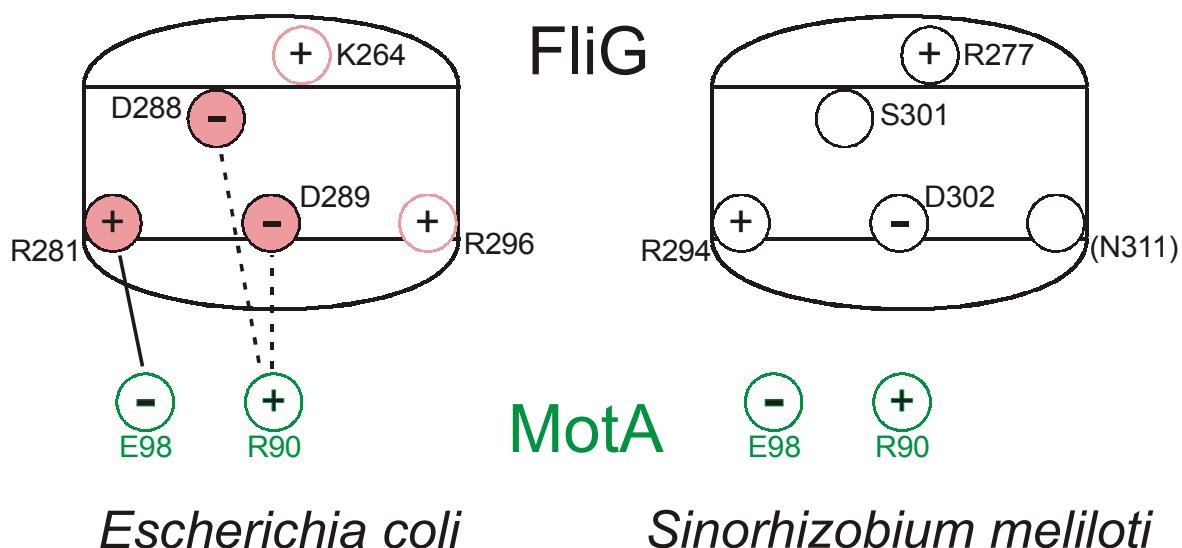


Abb.8. Modell der Anordnung wichtiger geladener Reste im Flagellenmotor von *E.coli* und orthologer Reste von *S.meliloti*. MotA-Reste sind durch grüne Kreise symbolisiert, wichtige FliG-Reste durch schwarze. Für die Kraftübertragung essentielle Reste sind rosa markiert Weniger wichtige FliG-Reste sind durch rosa umrandete Kreise symbolisiert. Wichtige Interaktionen bei *E.coli* werden mittels durchgezogener Linien dargestellt, weniger wichtige mittels unterbrochener Linien (U. Attmannspacher, B. Scharf, R. Schmitt, in Vorber.).

Nach dem neuesten Modell von Schmitt (2003) liegen in einem Statorkomplex zwei symmetrisch angeordnete Protonenkanäle vor. Der Durchfluß von Protonen verursacht reversible Helixdrehungen der Statorelemente; diese Drehungen werden über Coulombkräfte auf FliG-Elemente der Rotoroberfläche übertragen. Die Protonenkanäle schwingen

synchron vor und zurück, jedoch ist bei jeder Rotation nur ein Kanal des Zwillings mit dem Rotor „in Phase“, die Kraftübertragung erfolgt daher stufenweise. Die geladenen Reste der Rotorseite können derart umgeklappt werden, daß sie während der Rückwärtsschwingung anstatt während der Vorwärtsschwingung mit dem Stator interagieren; auf diese Weise wird eine Umkehr der Rotationsrichtung ermöglicht. Eine elastische Feder im Stator „glättet“ die Rotationsbewegung und verlängert die Zeit, die das drehmomenterzeugende Element mit dem Rotor interagiert (*high duty ratio*; Schmitt, 2003).

Anders als der reversibel rotierende *E.coli*-Motor, ändert der Geißelmotor von *S.meliloti* niemals seine Rotationsrichtung, wohl aber seine Rotationsgeschwindigkeit. Dies deutet auf unterschiedliche Wechselwirkungen an seiner Rotor-Stator-Kontaktfläche im Vergleich zum enterobakteriellen System hin: Der Motor muß über eine „Bremse“ statt eines „Rückwärtsgangs“ verfügen. Deshalb war es zentrales Thema dieser Arbeit, wie weit sich die kritischen, geladenen Reste an der MotA-FliG-Kontaktfläche gleichen und wo die möglichen Unterschiede liegen.

Ausgehend von dieser Situation, wurden folgende Arbeitsziele formuliert:

- Sequenzierung der Gene *motC*, *motA* und *fliG* des verwandten *Rhizobium lupini* H13-3 und Analyse konservierter Bereiche
- Überprüfung der Stabilität von seriellen Deletionen von MotC zur möglichen Erklärung von Funktionsausfällen
- Substitutionsanalyse der konservierten (geladenen) Aminosäurereste von MotA und FliG bei *S.meliloti* und funktionelle Charakterisierung der resultierenden Mutantenstämme
- Kombination mehrerer Substitutionen in den MotA- und FliG-Proteinen und Funktionsanalyse
- Erstellung und Charakterisierung einer *S.meliloti*-FliF-FliG-Fusionsmutante und Funktionsvergleiche

Die Ergebnisse sollten zu einer Modellvorstellung des variabel *cw* rotierenden *S.meliloti*-Flagellenmotors führen.

2. Material

2.1. Bakterien und Plasmide

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

Tab.1. Bakterienstämme

Stamm	Marker ¹⁾	Herkunft / Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	<i>F araD139 Δ(ara leu)7697 ΔlacX74 galU galK mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS-mcrBC) rpsL decR380 ΔlacZ ΔM15 endA1 nupGrecA1</i>	Bethesda Research Laboratories
RP437	<i>F thi thr leu his met eda rpsL</i> (Wildtyp für Chemotaxis)	Parkinson, 1978
S17-1	<i>recA1 endA1 thi hsdR RP4-2-Tc::Mu::Tn7 Tp^R Sm^R</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Rhizobium lupini H13-3</i>		
RU12/001	<i>Sm^R; spontan Streptomycin-resistente Derivat von H13-3 (Wildtyp)</i>	Schuster-Wolff-Bühring, 1999
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
RU11/001	<i>Sm^R; spontan Streptomycin-resistente Derivat von RU10/406 (Wildtyp)</i>	Krupski <i>et al.</i> , 1985
Derivate von RU11/001:²⁾		
RU11/211	<i>Sm^R ΔmotC</i>	Platzer <i>et al.</i> , 1997
RU11/901	<i>Sm^R ΔmotC21</i>	Attmannspacher, 1999
RU11/902	<i>Sm^R ΔmotC201</i>	Attmannspacher, 1999

RU11/903	$\text{Sm}^R \Delta motC19$	Attmannspacher, 1999
RU11/904	$\text{Sm}^R \Delta motC18$	Attmannspacher, 1999
RU11/905	$\text{Sm}^R \Delta motC17$	Attmannspacher, 1999
RU11/906	$\text{Sm}^R \Delta motC16$	Attmannspacher, 1999
RU11/907	$\text{Sm}^R \Delta motC15$	Attmannspacher, 1999
RU11/908	$\text{Sm}^R \Delta motC14$	Attmannspacher, 1999
RU11/909	$\text{Sm}^R \Delta motC13$	Attmannspacher, 1999
RU11/910	$\text{Sm}^R \Delta motC12$	Attmannspacher, 1999
RU11/911	$\text{Sm}^R \Delta motC11$	Attmannspacher, 1999
RU11/912	$\text{Sm}^R \Delta motC10$	Attmannspacher, 1999
RU11/913	$\text{Sm}^R \Delta motC9$	Attmannspacher, 1999
RU11/914	$\text{Sm}^R \Delta motC8$	Attmannspacher, 1999
RU11/915	$\text{Sm}^R \Delta motC7$	Attmannspacher, 1999
RU11/916	$\text{Sm}^R \Delta motC6$	Attmannspacher, 1999
RU11/917	$\text{Sm}^R \Delta motC5$	Attmannspacher, 1999
RU11/918	$\text{Sm}^R \Delta motC4$	Attmannspacher, 1999
RU11/919	$\text{Sm}^R \Delta motC3$	Attmannspacher, 1999
RU11/920	$\text{Sm}^R \Delta motC2$	Attmannspacher, 1999
RU11/921	$\text{Sm}^R \Delta motC1$	Attmannspacher, 1999
RU11/922	$\text{Sm}^R \Delta motC21N$	Attmannspacher, 1999
RU11/923	$\text{Sm}^R \Delta motC17C$	Attmannspacher, 1999
RU11/924	$\text{Sm}^R \Delta motC18-20$	Attmannspacher, 1999
RU13/054	$\text{Sm}^R \Delta fliG$	Scharf, 2003
RU11/925	$\text{Sm}^R motA R90A$	diese Arbeit
RU11/926	$\text{Sm}^R motA R90K$	diese Arbeit
RU11/927	$\text{Sm}^R motA R90E$	diese Arbeit
RU11/928	$\text{Sm}^R motA E98Q$	diese Arbeit
RU11/929	$\text{Sm}^R motA E98D$	diese Arbeit
RU11/930	$\text{Sm}^R motA E98K$	diese Arbeit
RU11/931	$\text{Sm}^R motA R90A E98Q$	diese Arbeit
RU11/932	$\text{Sm}^R motA R90K E98Q$	diese Arbeit
RU11/933	$\text{Sm}^R motA R90A E98D$	diese Arbeit
RU11/934	$\text{Sm}^R fliG R277A$	diese Arbeit

RU11/935	$\text{Sm}^R fliG$ R277E	diese Arbeit
RU11/936	$\text{Sm}^R fliG$ R294A	diese Arbeit
RU11/937	$\text{Sm}^R fliG$ R294D	diese Arbeit
RU11/938	$\text{Sm}^R fliG$ R294K	diese Arbeit
RU11/939	$\text{Sm}^R fliG$ R294V	diese Arbeit
RU11/940	$\text{Sm}^R fliG$ E300A	diese Arbeit
RU11/941	$\text{Sm}^R fliG$ E300R	diese Arbeit
RU11/942	$\text{Sm}^R fliG$ S301A	diese Arbeit
RU11/943	$\text{Sm}^R fliG$ S301C	diese Arbeit
RU11/944	$\text{Sm}^R fliG$ S301D	diese Arbeit
RU11/945	$\text{Sm}^R fliG$ S301K	diese Arbeit
RU11/946	$\text{Sm}^R fliG$ S301R	diese Arbeit
RU11/947	$\text{Sm}^R fliG$ S301T	diese Arbeit
RU11/948	$\text{Sm}^R fliG$ D302A	diese Arbeit
RU11/949	$\text{Sm}^R fliG$ D302E	diese Arbeit
RU11/950	$\text{Sm}^R fliG$ D302K	diese Arbeit
RU11/951	$\text{Sm}^R fliG$ N311R	diese Arbeit
RU11/952	$\text{Sm}^R fliG$ D314A	diese Arbeit
RU11/953	$\text{Sm}^R fliG$ D314R	diese Arbeit
RU11/954	$\text{Sm}^R fliG$ R294A S301D	diese Arbeit
RU11/955	$\text{Sm}^R fliG$ R294A D302A	diese Arbeit
RU11/956	$\text{Sm}^R fliG$ E300A S301D	diese Arbeit
RU11/957	$\text{Sm}^R fliG$ E300A S301R	diese Arbeit
RU11/958	$\text{Sm}^R fliG$ E300R S301D	diese Arbeit
RU11/959	$\text{Sm}^R fliG$ E300R S301R	diese Arbeit
RU11/960	$\text{Sm}^R fliG$ S301D D302A	diese Arbeit
RU11/961	$\text{Sm}^R fliG$ S301D D302K	diese Arbeit
RU11/962	$\text{Sm}^R motA$ R90A $fliG$ R277A	diese Arbeit
RU11/963	$\text{Sm}^R motA$ R90A $fliG$ R277E	diese Arbeit
RU11/964	$\text{Sm}^R motA$ R90A $fliG$ R294A	diese Arbeit
RU11/965	$\text{Sm}^R motA$ R90A $fliG$ E300A	diese Arbeit
RU11/966	$\text{Sm}^R motA$ R90A $fliG$ S301A	diese Arbeit
RU11/967	$\text{Sm}^R motA$ R90A $fliG$ S301D	diese Arbeit
RU11/968	$\text{Sm}^R motA$ R90A $fliG$ S301R	diese Arbeit

RU11/969	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90A $fliG$ D302K	diese Arbeit
RU11/970	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90A $fliG$ N311R	diese Arbeit
RU11/971	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ R294D	diese Arbeit
RU11/972	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ S301A	diese Arbeit
RU11/973	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ S301C	diese Arbeit
RU11/974	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ S301K	diese Arbeit
RU11/975	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ S301T	diese Arbeit
RU11/976	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ D302A	diese Arbeit
RU11/977	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ D302K	diese Arbeit
RU11/978	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ N311R	diese Arbeit
RU11/979	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98Q $fliG$ R277E	diese Arbeit
RU11/980	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98Q $fliG$ R294A	diese Arbeit
RU11/981	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98Q $fliG$ S301D	diese Arbeit
RU11/982	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98K $fliG$ R277E	diese Arbeit
RU11/983	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98K $fliG$ R294A	diese Arbeit
RU11/984	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98K $fliG$ R294V	diese Arbeit
RU11/985	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90A $fliG$ E300A S301D	diese Arbeit
RU11/986	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90A $fliG$ E300A S301R	diese Arbeit
RU11/987	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ E300A S301D	diese Arbeit
RU11/988	$\text{Sm}^R \text{motA}$ R90E $fliG$ E300A S301R	diese Arbeit
RU11/989	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98Q $fliG$ E300A S301D	diese Arbeit
RU11/990	$\text{Sm}^R \text{motA}$ E98Q $fliG$ E300A S301R	diese Arbeit
RU11/991	$\text{Sm}^R fliF$ - $fliG$ -Fusion	diese Arbeit

¹⁾ gemäß der Nomenklatur nach Bachmann, 1990

Tab.2. Plasmide

Plasmid	Marker/Codonsubstitution²⁾	Herkunft / Referenz
pK18mobsacB	Km ^R lacZ mob	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pRU 2350	Km ^R , Tc ^R , 2,5 kb PstI-Fragment aus <i>R.lupini</i> H13-3	Schuster-Wolff-Bühring, 1999
pRU 2352	Km ^R , Tc ^R , 8,9 kb HindIII/PstI-Fragment aus <i>R.lupini</i> H13-3	Schuster-Wolff-Bühring, 1999
<i>in vitro</i> Rekombinanten eines 588 bp-EcoRI/HindIII– <i>motA</i> -Fragments mit pK18mobsacB		
pRU2475	<i>motA</i> AGG → GCA (R90A)	diese Arbeit
pRU2476	<i>motA</i> AGG → AAG (R90K)	diese Arbeit
pRU2477	<i>motA</i> AGG → GAG (R90E)	diese Arbeit
pRU2478	<i>motA</i> GAG → CAG (E98Q)	diese Arbeit
pRU2479	<i>motA</i> GAG → GAC (E98D)	diese Arbeit
pRU2480	<i>motA</i> GAG → AAG (E98K)	diese Arbeit
pRU2481	<i>motA</i> AGG/GAG → GCA/CAG (R90A E98Q)	diese Arbeit
pRU2482	<i>motA</i> AGG/GAG → AAG/CAG (R90K E98Q)	diese Arbeit
pRU2483	<i>motA</i> AGG/GAG → GCA/GAC (R90A E98D)	diese Arbeit
<i>in vitro</i> Rekombinanten eines 620 bp-HindIII/EcoRI– <i>fliG</i> -Fragments mit pK18mobsacB		
pRU2650	<i>fliG</i> AGA → GCG (R277A)	diese Arbeit
pRU2651	<i>fliG</i> AGA → GAA (R277E)	diese Arbeit
pRU2652	<i>fliG</i> CGC → GCC (R294A)	diese Arbeit
pRU2653	<i>fliG</i> CGC → GAC (R294D)	diese Arbeit
pRU2654	<i>fliG</i> CGC → AAG (R294K)	diese Arbeit
pRU2655	<i>fliG</i> CGC → GTC (R294V)	diese Arbeit
pRU2656	<i>fliG</i> GAA → GCC (E300A)	diese Arbeit
pRU2657	<i>fliG</i> GAA → CGC (E300R)	diese Arbeit
pRU2658	<i>fliG</i> TCG → GCC (S301A)	diese Arbeit
pRU2659	<i>fliG</i> TCG → TGC (S301C)	diese Arbeit
pRU2660	<i>fliG</i> TCG → GAC (S301D)	diese Arbeit
pRU2661	<i>fliG</i> TCG → AAG (S301K)	diese Arbeit
pRU2662	<i>fliG</i> TCG → CGC (S301R)	diese Arbeit

pRU2663	<i>fliG</i> TCG → ACG (S301T)	diese Arbeit
pRU2664	<i>fliG</i> GAC → GCC (D302A)	diese Arbeit
pRU2665	<i>fliG</i> GAC → GAG (D302E)	diese Arbeit
pRU2666	<i>fliG</i> GAC → AAG (D302K)	diese Arbeit
pRU2667	<i>fliG</i> AAT → CGC (N311R)	diese Arbeit
pRU2668	<i>fliG</i> GAT → GCG (D314A)	diese Arbeit
pRU2669	<i>fliG</i> GAT → CGC (D314R)	diese Arbeit
pRU2670	<i>fliG</i> CGC/TCG → GCC/GAC (R294A S301D)	diese Arbeit
pRU2671	<i>fliG</i> CGC/GAC → GCC/GCC (R294A D302A)	diese Arbeit
pRU2672	<i>fliG</i> GAA/TCG → GCC/GAC (E300A S301D)	diese Arbeit
pRU2673	<i>fliG</i> GAA/TCG → GCC/CGC (E300A S301R)	diese Arbeit
pRU2674	<i>fliG</i> GAA/TCG → CGC/GAC (E300R S301D)	diese Arbeit
pRU2675	<i>fliG</i> GAA/TCG → CGC/CGC (E300R S301R)	diese Arbeit
pRU2676	<i>fliG</i> TCG/GAC → GAC/GCC (S301D D302A)	diese Arbeit
pRU2677	<i>fliG</i> TCG/GAC → GAC/AAG (S301D D302K)	diese Arbeit

Plasmide für die Erzeugung einer *fliF-fliG*-Fusionsmutante

pRU2678	Km ^R ; 608 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment von RU11/001 <i>fliF</i> (eingeführte <i>BamHI</i> / <i>XbaI</i> -Restriktionsschnittstellen) in pK18mobsacB	diese Arbeit (s.Abb.25)
pRU2679	Ap ^R ; 1063 bp <i>BamHI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment von RU11/001 <i>fliG</i> in pUCBM20	diese Arbeit (s.Abb.25)
pRU2680	Km ^R ; 1650 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment in pK18mobsacB; Derivat von pRU2674 mit <i>BamHI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment aus pRU2675	diese Arbeit (s.Abb.25)

Plasmide für *plasmid rescue tags* und gewonnene Sequenzen

pRU2681	Km ^R ; Tc ^R ; 524 bp <i>PstI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment von <i>R.lupini</i> . in pK18mobsacB, 1. <i>rescue tag</i>	diese Arbeit
pRU2682	Km ^R ; Tc ^R ; 1,5 kb <i>PstI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment von <i>R.lupini</i> in pK18mobsacB, 1. <i>rescue Produkt</i>	diese Arbeit
pRU2683	Km ^R ; Tc ^R ; 484 bp <i>HindIII</i> / <i>PstI</i> -Fragment von <i>R.lupini</i> in pK18mobsacB, 2. <i>rescue tag</i>	diese Arbeit

pRU2684 Km^R; Tc^R; 1,4 kb *HindIII / PstI* -Fragment von diese Arbeit
R.lupini in pK18mobsacB, 2. rescue Produkt

²⁾ gemäß der Nomenklatur nach Novick *et al.*, 1976

2.2. Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen Metabion, Biomers und Qiagen bezogen. Die für PCR-Mutagenese und Sequenzierungen verwendeten Primer sind in Tab.3 zusammengestellt.

Tab. 3. Primer für PCR-Mutagenese und Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
RlupPstI	GTA CAC TGC AGG TGA AGA TCA CAC GTG	Herstellung eines tag (1. <i>plasmid rescue R.l. H13-3</i>)
RldownHindIII	GAC TCA AGC TTG AAC TGG CGT CCA TC	Herstellung eines tag (1. <i>plasmid rescue R.l. H13-3</i>)
Rescue2up	CAT GCA AGC TTC ACG CTC GAA TTG CTC GTC	Herstellung eines tag (2. <i>plasmid rescue R.l. H13-3</i>)
Rescue2down	CTA GAC TGC AGC GGC CGC ACG CGT CCA TCA TGG CG	Herstellung eines tag (2. <i>plasmid rescue R.l. H13-3</i>)
RLCSeqN	CAC ATC CCG CGC GAC GAG	Sequenzierung von pRU2682
Rlc1	CCG CTG CTG CGG CAC CAC	Sequenzierung von pRU2350
Rlc2	GCC CTC TTC CTT GTC CAC	Sequenzierung von pRU2350
Rlc3	CTT TGA AGA AGA GAC GAT G	Sequenzierung von pRU2350
Rlc4	CCG TTG GCG GAT GTC GAC	Sequenzierung von pRU2350
Rlc5	CAT AGC GCC TAT TAC ATG	Sequenzierung von pRU2682
Rlc6	CTC ATC CTC AGC CTT GTG	Sequenzierung von pRU2684
Rlc7	ACG CAG CCT TAG CGA CAG	Sequenzierung von pRU2350
3HPF1seq	AAT TCG GAA GGC GCA ATG	Sequenzierung von pRU2352
3HPM1seq	GAC GAT CTC ATG TTC ATG	Sequenzierung von pRU2352
3HPF2	ACT ATC GAT CGA GAC TTG	Sequenzierung von pRU2352
3HPM2	TCC CGC GAG GTG CCG ATC	Sequenzierung von pRU2352
3,5HPF1seq	CAC TGT TCG GGC GTG GTC	Sequenzierung von pRU2352
3,5HPM1seq	GTA CTC ATT ACT TCA ATC	Sequenzierung von pRU2352
3,5HPF2	CAC CAC CAT GGG CGA TTC	Sequenzierung von pRU2352
3,5HPM2	CTT CGT AGC CAT GCG CTG	Sequenzierung von pRU2352
R2352seq	CTT CAT GCG GAC TGT CAC	Sequenzierung von pRU2352

2352seq1	TGT GCG AAA CTG GCT GC	Sequenzierung von pRU2352
RII1	CAT GTT TCG TTT CAG AAC	Sequenzierung von pRU2352
RII2	TCG CAC GCT CCA TGT TTG	Sequenzierung von pRU2352
RII3	CCT TCA GCT GAA TCT GAC	Sequenzierung von pRU2352
R1	CTG AAC CAG CAC GTC CAG	Sequenzierung von pRU2352
R2	GAT ATA TTC GAC GTC TAT C	Sequenzierung von pRU2352
R3	GAG GTC CGA TTC GAT CAT G	Sequenzierung von pRU2352
R4	GGC CAT GGA CGT GCC GAG	Sequenzierung von pRU2352
F1	CTA CAG CGA ATT CCT GCC	Sequenzierung von pRU2352
F2	CTG CTC AAG ACC TCC ATC	Sequenzierung von pRU2352
F3	GAG CTC GAC CAG GCT ATC	Sequenzierung von pRU2352
F4	CAC GCA GCA CGA ATT GCA G	Sequenzierung von pRU2352
F5	AGT CTC ATC GAC CTG ATG	Sequenzierung von pRU2352
F6	TAG CTG AGC TCG TTC ATC	Sequenzierung von pRU2352
F7	CCT TGC CTG AAG CGT GTC	Sequenzierung von pRU2352
FliGMutC	GAC TCG AAT TCG CGA GGG AAT CGT G	Außenprimer für Aminosäure-Austausch-Mutanten <i>fliG</i>
FliGMutN	ATC ATC AAG CTT CGG GTG ATC GAA ATC ATC	Außenprimer für Aminosäure-Austausch-Mutanten <i>fliG</i>
FliG R277A	CAT GGC GCT CGC GGG TTC TG	Innenprimer für <i>fliG</i> R277A
FliGR277E	CAT GGC GCT CGA AGG TTC TG	Innenprimer für <i>fliG</i> R277E
FliGR277Eanti	CAG AAC CTT CGA GCG CCA TG	Innenprimer für <i>fliG</i> R277E
FliG R294A	CAT CGG CGC CGC CCA GCG GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294A
294 overlap	CGC CGC TGG GCG GCG CCG ATG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294A
FliGR294D	CAT CGG CGC CGA CCA GCG GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294D
FliGR294Danti	CGC CGC TGG TCG GCG CCG ATG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294D
R294K	CAT CGG CGC CAA GCA GCG GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294K
R294Kanti	CGC CGC TGC TTG GCG CCG ATG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294K
FliGR294V	CAT CGG CGC CGT CCA GCG GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294V
FliGR294Vanti	CGC CGC TGG ACG GCG CCG ATG	Innenprimer für <i>fliG</i> R294V
FliG E300A	CGC ATG ATC GCC TCG GAC CTC	Innenprimer für <i>fliG</i> E300A
E300R	CGC ATG ATC CGC TCG GAC CTC	Innenprimer für <i>fliG</i> E300R
E300Ranti	GAG GTC CGA GCG GAT CAT GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> E300R
FliG S301A	CAT GAT CGA AGC CGA CCT CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> S301A
S301C	CAT GAT CGA ATG CGA CCT CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> S301C
S301Canti	GGC GAG GTC GCA TTC GAT CAT G	Innenprimer für <i>fliG</i> S301C
FliG S301D	CAT GAT CGA AGA CGA CCT CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> S301D
301D overlap	GGC GAG GTC GTC TTC GAT CAT G	Innenprimer für <i>fliG</i> S301D
S301K	CAT GAT CGA AAA GGA CCT CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> S301K
S301Kanti	GGC GAG GTC CTT TTC GAT CAT G	Innenprimer für <i>fliG</i> S301K

FliGS301R	CAT GAT CGA ACG CGA CCT CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> S301R
FliGS301Ranti	GGC GAG GTC GCG TTC GAT CAT G	Innenprimer für <i>fliG</i> S301R
S301T	CAT GAT CGA AAC GGA CCT CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> S301T
S301Tanti	GGC GAG GTC CGT TTC GAT CAT G	Innenprimer für <i>fliG</i> S301T
FliGD302A	GAT CGA ATC GGC CCT CGC CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> D302A
302A overlap	GGC GGC GAG GGC CGA TTC GAT C	Innenprimer für <i>fliG</i> D302A
D302E	GAT CGA ATC GGA GCT CGC CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> D302E
D302E anti	GGC GGC GAG CTC CGA TTC GAT C	Innenprimer für <i>fliG</i> D302E
FliGD302K	GAT CGA ATC GAA GCT CGC CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> D302K
FliGD302Kanti	GGC GGC GAG CTT CGA TTC GAT C	Innenprimer für <i>fliG</i> D302K
FliG N311R	CGG CAT CCG CCC CCG CGA TAT C	Innenprimer für <i>fliG</i> N311R
D314A	CAA TCC CCG CGC GAT CGC GAT C	Innenprimer für <i>fliG</i> D314A
D314A anti	GAT CGC GAT CGC GCG GGG ATT G	Innenprimer für <i>fliG</i> D314A
D314R	CAA TCC CCG CCG CAT CGC GAT C	Innenprimer für <i>fliG</i> D314R
D314R anti	GAT CGC GAT GCG GCG GGG ATT G	Innenprimer für <i>fliG</i> D314R
E0A/S1D	CGC ATG ATC GCC GAC GAC CTC GCC	Innenprimer für <i>fliG</i> E300A/S301D
E0A/S1Danti	GGC GAG GTC GTC GGC GAT CAT GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> E300A/S301D
E300A/S301R	CGC ATG ATC GCC CGC GAC CTC GCC	Innenprimer für <i>fliG</i> E300A/S301R
E300A/S301R anti	GGC GAG GTC GCG GGC GAT CAT GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> E300A/S301R
E300R/S301D	CGC ATG ATC CGC GAC GAC CTC GCC	Innenprimer für <i>fliG</i> E300R/S301D
E300R/S301D anti	GGC GAG GTC GTC GCG GAT CAT GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> E300R/S301D
E300R/S301R	CGC ATG ATC CGC CGC GAC CTC GCC	Innenprimer für <i>fliG</i> E300R/S301R
E300R/S301R anti	GGC GAG GTC GCG GCG GAT CAT GCG	Innenprimer für <i>fliG</i> E300R/S301R
S301D/D302A	CAT GAT CGA AGA CGC CCT CGC CGC C	Innenprimer für <i>fliG</i> S301D/D302A
S301D/D302A anti	GGC GGC GAG GGC GTC TTC GAT CAT G	Innenprimer für <i>fliG</i> S301D/D302A
MotACMut	TCA CAT AAG CTT GAT GAC GCC GAG AAC	Außenprimer für Aminosäure-Austausch-Mutanten <i>motA</i>
MotANMut	CGG ATT GAA TTC ACG ATC GCG ACA G	Außenprimer für Aminosäure-Austausch-Mutanten <i>motA</i>
MotAR90A	GCG ACC TGG CAA CAA AAT C	Innenprimer für <i>motA</i> R90A

MotAR90Aanti	GAT TTT GTT GCC AGG TCG C	Innenprimer für <i>motA</i> R90A
MotAR90E	GCG ACC TGG AGA CAA AAT C	Innenprimer für <i>motA</i> R90E
MotAR90Eanti	GAT TTT GTC TCC AGG TCG C	Innenprimer für <i>motA</i> R90E
R90K	GCG ACC TGA AGA CAA AAT C	Innenprimer für <i>motA</i> R90K
R90K anti	GAT TTT GTC TTC AGG TCG C	Innenprimer für <i>motA</i> R90K
MotAE98Q	CGA GAT CCA GAG CCA CAT C	Innenprimer für <i>motA</i> E98Q
MotAE98Qanti	GAT GTG GCT CTG GAT CTC G	Innenprimer für <i>motA</i> E98Q
MotAE98K	CGA GAT CAA GAG CCA CAT C	Innenprimer für <i>motA</i> E98K
MotAE98Kanti	GAT GTG GCT CTT GAT CTC G	Innenprimer für <i>motA</i> E98K
E98D	CGA GAT CGA CAG CCA CAT C	Innenprimer für <i>motA</i> E98D
E98D anti	GAT GTG GCT GTC GAT CTC G	Innenprimer für <i>motA</i> E98D
FNfus	CCG CTT GGA ATT CAG CTG GGC TTC GGC GGA C	Fusion <i>fliF-fliG</i>
FCfus	GAA GAT AAA GCT TAA TGC AAC TCC GGA AC	Fusion <i>fliF-fliG</i>
Fdown	GAT CCA AGA TGC CGT CTA GAA CCT GAA TTG GAA	Fusion <i>fliF-fliG</i>
Fup	CTA GAC GGC ATC TTG GAT CCC GCT CGG TCG ACT	Fusion <i>fliF-fliG</i>
GNfus	CGG GGA TGG ATC CAT GAC	Fusion <i>fliF-fliG</i>
GCfus	CAA ACG CGA TCT AGA GGC AGG CTG GAG GCG TC	Fusion <i>fliF-fliG</i>
G74	CTG TTG AAA TTC TTC AC	Sequenzierung des Fusionskonstrukts
G65	TTT CCT TGA GCT CGA G	Sequenzierung des Fusionskonstrukts

2.3. Chemikalien und Enzyme

In Tab.4 sind die verwendeten Chemikalien, Enzyme und kommerzielle Quellen aufgeführt.

Tab.4. Herkunft von Chemikalien und Enzymen

Chemikalie / Enzym	Quelle
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Amresco (Solon, OH, USA)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
<i>Bacto Agar</i>	BD (Heidelberg)
<i>Bacto Yeast Extract</i>	BD (Heidelberg)
Biotin	Sigma (München)
Bromphenolblau	Sigma (München)
BSA	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Cellulose-Acetat-Filter (Porengröße 0,45 µm)	Sartorius AG (Göttingen)
CHES	AppliChem (Darmstadt)
Desoxynucleotidtriphosphate	Roth (Karlsruhe)
<i>DNA Isolation Kit</i>	AppliChem (Darmstadt)
ECL (<i>enhanced chemoluminescence detection</i>) <i>direct nucleic acid labelling and detection system</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
ECL (<i>enhanced chemoluminescence detection</i>) <i>Western blotting kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
GFX PCR (<i>DNA and gel band purification kit</i>)	Amersham (New York)
Hyperfilm™ ECL <i>High performance chemiluminescence film</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycin	Serva (Heidelberg)
Neomycin	Sigma (München)
<i>Nucleo Spin Plasmid Kit</i>	Macherey Nagel (Düren)
Phenol	AppliChem (Darmstadt)
Proteinase K	Sigma (München)
<i>QIAEX Gel Extraction Kit II</i>	Qiagen (Hilden)

Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
RNaseA	Roche (Basel)
SDS	Serva (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
TEMED	Sigma (München)
Tetracyclin	Roche (Basel)
Tris	USB (Cleveland, OH, USA)
<i>Tryptone Peptone</i>	BD (Heidelberg)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
<i>Vent DNA Polymerase</i>	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman (Wiesloch)
<i>X-Gal</i>	AppliChem (Darmstadt)
Xylencyanol	SERVA (Heidelberg)

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

2.4. Nährmedien und Antibiotika

2.4.1. Medien für die Anzucht von *E.coli*

LB₀ (Luria broth)

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

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

TB (Tryptone broth)

<i>Tryptone Peptone</i>	10 g
<i>Yeast Extract</i>	1 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l

Eingesetzte Endkonzentrationen von Antibiotika (*E.coli*)

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

2.4.2. Medien für die Anzucht von *S.meliloti*Bromfield-Medium

<i>Tryptone Peptone</i>	400 mg
<i>Yeast Extract</i>	100 mg
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg
H ₂ O	ad 1 l
für Bromfield-Platten:	15 g Agar
für Bromfield-Schwärmpfatten:	3 g Agar
für Selektion auf Fehlen von <i>sacB</i> :	100 g Saccharose

TYC (Tryptone Yeast Extract / Calcium)

<i>Tryptone Peptone</i>	5 g
<i>Yeast Extract</i>	3 g
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	1,3 g
H ₂ O	ad 1 l
für TYC-Platten:	15 g Agar

RB (*Rhizobium* Basal Medium)

		Stammlösung	Endkonzentration
NaCl	0,1 ml	1 M	0,1 mM
Na ₂ MoO ₄	0,1 ml	100 mM	0,01 mM
K ₂ HPO ₄	6,1 ml	1 M	6,1 mM
KH ₂ PO ₄	3,9 ml	1 M	1,0 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 ml	1 M	1,0 mM
FeSO ₄ in 1 N HCl	0,01 ml	100 mM	0,001 mM
für Prolin-Schwärmpfatten:			2,7 g Agar
H ₂ O	ad 990 ml		
autoklavieren, danach zugeben:			
MgSO ₄	1,0 ml	1 M	1,0 mM
CaCl ₂	0,1 ml	1 M	0,1 mM
Biotin	1,0 ml	2 mg/ml	2 µg/ml
H ₂ O	ad 1 l		
für Prolin-Schwärmpfatten:			
Prolin	0,1 ml	1 M	0,1 mM

Eingesetzte Endkonzentrationen von Antibiotika (*S.meliloti*)

Neomycin	120 µg/ml
Streptomycin	600 µg/ml

2.5. Puffer und Lösungen**2.5.1. Lösungen für Mini-/Midi-Plasmidisolierung**

- GET:
Glucose 50 mM
Tris/HCl pH 7,0 25 mM
EDTA 10 mM
RNase A 250 µg/ml
- Lyse-Lösung:
NaOH 0,2 M
SDS 1 % (w/v)
- 7,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{Ac}$
- 70 % EtOH
- EtOH abs.
- 3M NaAc
- Phenol/Chloroform 1:1

2.5.2. Lösungen für genomische DNA-Isolierung aus *S.meliloti*

- 5 % Natrium-N-Laurylsarcosin
- 3 M NaAc
- Chloroform/Isoamylalkohol 24:1
- 25 mM EDTA
- TE 10.1:
Tris/HCl pH 8,0 10 mM
EDTA pH 8,0 1 mM

2.5.3. Lösungen für DNA-Auf trennung (Agarosegelektrophorese)

• TAE (50 x):	Tris/Acetat pH 8,0 EDTA pH 8,0	2 M 50 mM
• DNA Gel – Ladepuffer:	Glycerin EDTA Bromphenolblau Xylencyanol TAE	50 % 10 mM 0,2 % 0,2 % 1 x

2.5.4. Lösungen für DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung

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

2.5.5. Lösungen zur Auf trennung von Proteinen

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

• Laufpuffer (5 x):	Tris	30,2 g
	Glycin	188 g
	10 % SDS	100 ml
	H ₂ O	ad 2 l
• Probenpuffer (2 x):	1,5 M Tris pH 6,8	1,4 ml
	87 % Glycerin	23 ml
	10 % SDS	0,5 ml
	H ₂ O	35 ml
• SDS-Ladepuffer:	10 % SDS	4 ml
	Probenpuffer (2 x)	5,3 ml
	0,5 % Bromphenolblau	250 µl

2.5.6. Lösungen zum Transfer von Proteinen:

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

3. Methoden

3.1. Kultivierung von Bakterien

3.1.2. Anzucht und Lagerung von *E.coli*

Ausgehend von einer Einzelkolonie, wurden *E.coli*-Zellen in LB-Flüssigmedium (unter selektiven Bedingungen mit geeigneten Antibiotika wie Ampicillin, Kanamycin oder Tetracyclin) bei 37°C angezogen. Das Wachstum wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Die Anzucht auf Agarplatten erfolgte aerob bei 37°C im Brutschrank (Memmert, Schwabach). Motile RP437-Zellen zur Untersuchung des Schwimmverhaltens wurden gewonnen, indem ein Erlenmeyerkolben mit 40 ml TB-Medium mit 200 µl stationärer ÜN-Kultur beimpft und für etwa 4 h im Schüttelwasserbad bei 30°C inkubiert wurde.

Zum Anlegen von Glycerinkulturen wurden aus einer frischen ÜN-Kultur 750 µl der Bakteriensuspension entnommen, mit 250 µl 60 % Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Anzucht und Lagerung von *S. meliloti*

Zellen zur DNA-Isolierung wurden in TYC_{Sm}-Vollmedium bei 30°C über 2 Tage angezogen. Die Anzucht motiler Zellen für die Untersuchung des Schwimmverhaltens erfolgte auf Bromfield-Agarplatten, die mit 10 ml RB-Flüssigmedium überschichtet wurden. Das Flüssigmedium auf den Platten wurde mit 50 µl aus einer stationären TYC_{Sm}-Kultur angeimpft. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 14-18 Stunden bei 30°C im Brutschrank. So erhielt man einen sehr hohen Anteil motiler Zellen bei einer OD_{600} von 0,1 bis 0,2 (entsprechend 1,2 - 2,3 x 10⁸ Zellen/ml).

Für Selektionszwecke erfolgte die Anzucht auf TYC-Agarplatten, die mit Neomycin und Streptomycin supplementiert waren.

Das Anlegen von Glycerinkulturen wurde, wie bei *E.coli* beschrieben, aus einer stationären 2 Tage-Kultur in Vollmedium durchgeführt.

3.2. Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen (Mini-Plasmidisolierung)

Plasmid-DNA in Mengen bis zu 100 µg wurden durch alkalische Lyse nach der Methode von Li & Schweizer (1993) mit folgenden Modifikationen gewonnen. Es wurden 1,5 ml einer frischen ÜN-Kultur 1 min in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 200 µl GET aufgenommen, mit 400 µl frischer Lyse-Lösung versetzt und mehrmals geschüttelt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden 300 µl einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung zugesetzt, gemischt, erneut 10 min auf Eis inkubiert und in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4°C 10 min sedimentiert. Der klare Überstand wurde zur Fällung der DNA in 500 µl eisgekühltes Isopropanol überführt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 5 min zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 Upm, 4°C), das DNA-Präzipitat mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl H₂O gelöst. Um DNA mit hohem Reinheitsgrad für Sequenzanalysen zu erhalten, wurde der *NucleoSpin plus Kit* (MACHEREY-NAGEL, Düren) nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

3.2.2. Midi-Plasmidisolierung aus *E.coli*-Zellen

Bakterien aus einer 100 ml-ÜN-Kultur wurden 10 min bei 4°C durch Zentrifugation bei 7.000 Upm (GSA-Rotor, Sorvall-Kühlzentrifuge) sedimentiert und in 3 ml GET resuspendiert. Nach Zugabe von 8 ml Lyse-Lösung wurde 10 min auf Eis inkubiert, 4,5 ml 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung hinzugegeben und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch 15 min Zentrifugation bei 4°C und 18.000 Upm abgetrennt (SS34-Rotor, Sorvall-Kühlzentrifuge). Nach Waschen in 5 ml 70 % Ethanol und Trocknen wurde das DNA-Sediment in 4 ml TE gelöst, mit 4 ml Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut gemischt und 10 min bei RT und 5.000 Upm in einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die klare obere Phase wurde abpipettiert, mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 M Volumen Ethanol abs. versetzt, gemischt und 20 min bei 4°C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 10 min bei RT und 5000 Upm sedimentiert (Hettich) und in 400 µl TE gelöst. Durch Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat und 800 µl Ethanol abs. wurde die DNA erneut 20 min bei 4°C gefällt, dann

10 min bei 4°C und 14.000 Upm in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert und in 400 µl H₂O aufgenommen.

3.2.3. Isolierung chromosomaler DNA aus *S.meliloti*-Zellen

Zur Gewinnung chromosomaler DNA wurden 4 ml einer 2 d-Kultur 8 min bei RT und 5.000 Upm zentrifugiert, und das Zellsediment in 25 mM EDTA pH 8,0 aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 400 µl 20 % Saccharose / 10.1. TE 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 55°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 100 µl 3 M Natriumacetat versetzt und zweimal mit 1 Volumen Phenol und einmal mit 1 Volumen CIA 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 50 µl TE gelöst.

3.2.4. Auftrennung von DNA durch Agarosegelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 1 bis 1,2 %-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE. Die Elekrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V. Durch Zugabe von Ethidiumbromid zur Gel-Lösung (1 µg/ml Endkonz.) konnten die DNA-Fragmente im Gel auf einem UV-Leuchtschirm betrachtet werden. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen diente ein mitaufgetragener Längenstandard.

3.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Reinigung

Unter UV-Licht wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Isolierung der DNA in ein ERG überführt. Die Reinigung erfolgte mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden), dem *AppliChem DNA Isolation Kit* (AppliChem, Darmstadt) für anschließende Klonierungen

oder dem *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham, New York) für anschließende direkte Sequenzierungen nach den Angaben der Hersteller.

3.3. Enzymatische Modifizierung von DNA

3.3.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Für die Restriktion von DNA wurden zwischen 0,1 µg bis 30 µg DNA mit dem entsprechenden Enzym im zugehörigen Puffer der Firma NEB für 1-3 h bei 37 °C verdaut. In der Regel wurden für 0,5 µg DNA drei Einheiten des Enzyms verwendet. Zusätzlich wurde 1 µg/ml BSA (Endkonz.) eingesetzt.

3.3.2. Ligieren von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Für die Ligierung wurde folgender Standardansatz verwendet:

5-10 µl	Fragment-DNA (100-500 ng)
0,5-2 µl	Vektor-DNA (50-100 ng)
4 µl	5 x Ligase-Puffer
1,5 µl	T4-Ligase
ad 20 µl	mit H ₂ O

Der Ansatz wurde bei RT 3 h oder bei 10-12°C ÜN inkubiert und anschließend direkt zur Transformation verwendet.

3.4. Transformation von *E.coli*

Kompetente Zellen von *E.coli* DH10B und S17-1 wurden nach der Vorschrift von Maniatis *et al.* (1982) hergestellt.

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 10 µl Ligierungsansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock-Schritt für 90 sec bei 42°C. Der Ansatz wurde 1 min auf Eis abgekühlt, die Zellen in 3 ml LB ohne Antibiotikum überführt und 90 min im Roller bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei RT und 5.000 Upm zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl Medium aufgenommen und auf Agaroseplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Falls das verwendete Plasmid eine Blau-Weiß-Selektion ermöglichte, wurden die Platten für *E.coli* DH10B mit 40 µl X-Gal (20 mg/ml) und 8 µl 200 mM IPTG supplementiert.

3.5. Plasmid rescue

Die Methode des *Plasmid rescue* diente zur Isolierung unbekannter DNA-Sequenzen mit Hilfe bekannter flankierender Sequenzen. Dazu wurde zunächst die flankierende Sequenz mittels PCR amplifiziert und so modifiziert, daß das amplifizierte Fragment an einem Ende eine *PstI*-Schnittstelle trägt, am anderen Ende eine *HindIII*-Schnittstelle. Mit Hilfe dieser Schnittstellen wurde das amplifizierte Fragment in den *rescue* Vektor kloniert. Dieser besteht aus dem Vektor pK18mobsacB, in den eine Tetracyclinkassette mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* kloniert wurde. Die Tetracyclinkassette vermittelt in *E.coli* Tetracyclinresistenz. *E.coli* DH10B wurde mit dem Konstrukt aus *rescue* Vektor und amplifiziertem Fragment transformiert. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung überprüft, dann wurde *E.coli* S17-1 damit transformiert; Transformanten wurden für den konjugativen Transfer des Plasmids mit *R.lupini* H13-3 (RU 12/001) konjugiert. Alle Transkonjuganten, die auf TYC_{SmNm}-Platten wuchsen, hatten das Plasmid in ihr Genom integriert, Rekombination erfolgte an der homologen Sequenz, die dadurch verdoppelt wurde. Die angrenzenden, unbekannten Gene wurden isoliert, indem genomische DNA dieser Transkonjuganten mit einem geeigneten Restriktionsenzym (je

nach gewünschter Leserichtung *PstI* oder *HindIII*) geschnitten, religiert, und *E.coli* DH10B mit dem Religationsansatz transformiert wurde. Die Selektion erfolgte auf LB_{Tet}, so daß nur Transformanten wachsen konnten, die das Plasmid pK18mobsacB mit Tetracyclinekassette und angrenzender genomischer *R.lupini*-DNA enthielten.

3.6. PCR-Methoden

Die Amplifizierung von DNA durch PCR (Saiki *et al.*, 1986) diente zur raschen Gewinnung von DNA-Fragmenten zu Analysezwecken oder Klonierungen. Als Matrizen-DNA wurden genomische *S.meliloti*-DNA oder Plasmide, die subklonierte, genomische DNA-Fragmente aus *S.meliloti* enthielten, verwendet. Für die Herstellung von Fragmenten für die PCR-Allelenaustauschmutagenese und zur Überprüfung von Kreuzungen wurde die *Vent* DNA Polymerase verwendet, die eine *proof reading* Aktivität besitzt und sich damit durch eine Reduktion der Fehlerrate auszeichnet.

Die erforderlichen Primer wurden so gewählt, daß der hybridisierende Bereich jeweils ca. 18 Nukleotide betrug.

PCR-Reaktionen wurden in einem *Thermal Cycler TC 480* (PERKIN ELMER, Weiterstadt) durchgeführt, als Reaktionsgefäß dienten ultradünne *PCR tubes* (BIOZYM, Hess. Oldendorf).

Folgender Standardansatz wurde verwendet:

Ansatz A		Ansatz B
Template DNA	1 µl (1 pg – 100 ng)	10 x Puffer (+ MgSO ₄)
2 mM dNTPs	5 µl	<i>upstream</i> Primer
H ₂ O	ad 40 µl	<i>downstream</i> Primer
Überschichten mit steriles Paraffinöl		Polymerase
		H ₂ O
		ad 10 µl

Die Amplifizierungsreaktion wurde nach der *hotstart* Methode durchgeführt. Der Ansatz 1 wurde dabei zuerst auf 95°C erhitzt und erst nach Erreichen dieser Temperatur der

Ansatz 2 hinzupipettiert. Dadurch verminderte sich die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte, und die Ausbeute an PCR-Produkt wurde erhöht.

Der komplette Ansatz wurde anschließend unter folgenden Standardbedingungen inkubiert:

95°C	60 sec (Denaturierung)
52° - 64°C	60 sec (Primer – Annealing)
72°C	30 – 90 sec (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 35 mal wiederholt, gefolgt von einer konstanten 72°C-Phase (15 min), um begonnene Elongationsprodukte zu vervollständigen. Die Reaktionsprodukte wurden auf 4°C abgekühlt, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt (s. 3.2.4., 3.2.5.).

3.6.1. PCR aus einer *S.meliloti*-Einzelkolonie

PCR-vermittelte DNA-Amplifizierungen konnten direkt aus *S.meliloti*-Zellen durchgeführt werden. Hierzu wurde eine Einzelkolonie von einer Agaroseplatte mit einem sterilen Zahnstocher in ein PCR-Gefäß überführt, das bereits den Ansatz 1 ohne DNA enthielt. Nach Suspension der Zellen wurde der Ansatz für 15 min auf 95°C erhitzt, um die DNA aus den Zellen freizusetzen. Nach sofortiger Kühlung auf Eis konnte der Ansatz für die PCR-Reaktion verwendet werden.

3.6.2. Herstellung von AS-Austausch-Mutanten und Einführen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR-Mutagenese (*overlap extension*)

Die Herstellung von Codonsubstitutionen in den *S.meliloti*-Genen *motA* und *fliG* sowie das Einfügen von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme erfolgte mittels *in vitro* PCR-Mutagenese. 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 (Abb.9).

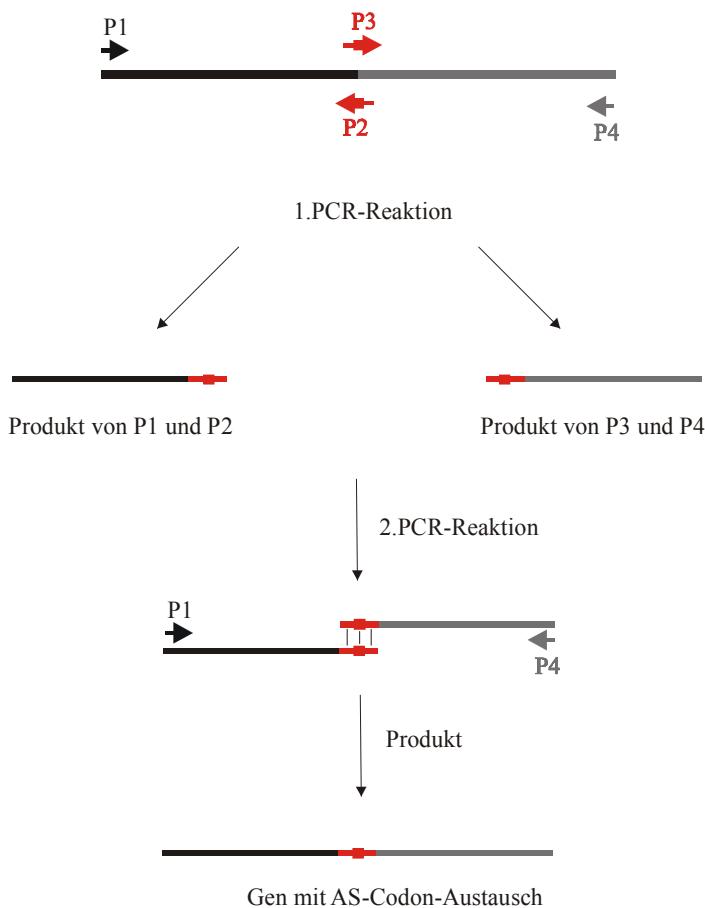


Abb.9: Schema der PCR – Mutagenese. P1 und P4: Außenprimer; P2 und P3: komplementäre Innenprimer mit gewünschten Basenaustauschen; schwarz: Matrize und Produkt der PCR mit den Primern P1 und P2; grau: Matrize und Produkt der PCR mit den Primern P3 und P4; rot: Region mit den neu eingeführten Basenaustauschen.

Die Außenprimer P1 und P4 lagen ca. 250 bp *upstream* bzw. *downstream* von der jeweiligen 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, nämlich eines mit ca. 250 bp oberhalb der Mutation gelegener Sequenz sowie eines mit ca. 250 bp unterhalb der Mutation gelegener Sequenz. Als Matrizen-DNA diente ein Plasmid, das die zu amplifizierende *S.meliloti*-Teilsequenz enthielt. Beide Fragmente wurden über Agarosegel-Elektrophorese isoliert und gereinigt. Die zueinander komplementären Innenprimer P2 und P3 konnten Wasserstoffbrücken ausbilden und ermöglichten so eine überlappende Bindung der beiden PCR-Produkte aus der ersten PCR-Runde. In einer zweiten PCR-Runde wurden die beiden Fragmente aus der ersten PCR-Runde als Matrizen-DNA eingesetzt. Die Einzelstränge der beiden Fragmente konnten während der ersten *annealing*-Phase aufgrund ihrer komplementären Bereiche

aneinander binden und, von den 3'-Enden ausgehend, durch die Polymerase zum Doppelstrang vervollständigt werden. In den folgenden Zyklen entstand mit den Außenprimern P1 und P4 als Produkt ein Fragment, das in seiner Mitte das mutierte Aminosäurecodon enthielt. Das Produkt aus der zweiten PCR-Runde wurde ebenfalls über Agarosegelektrophorese gereinigt. Die beiden Außenprimer enthielten geeignete Restriktionsschnittstellen als Anhang, die zur gerichteten Klonierung in Vektor-DNA benötigt wurden.

Alternativ zur *overlap extension* PCR wurden einige Aminosäureaustausch-Mutanten mit Hilfe der Megaprimer-PCR gewonnen. Hierbei wurden in einer ersten PCR-Runde ein Innenprimer und der gegenläufige Außenprimer verwendet und das gereinigte Produkt als Megaprimer zusammen mit dem zweiten Außenprimer für die zweite PCR-Runde eingesetzt.

3.7. DNA-Sequenzanalysen und Auswertung

Die Sequenzen aller DNA-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 (Madison, Wisconsin, 1999) bearbeitet (Suche nach Restriktionsschnittstellen, Ähnlichkeit von Polypeptidsequenzen). Ergänzende Analysen der Nukleinsäure- und Proteindaten wurden mit Programmen im Internet durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.8. Konjugativer Plasmidtransfer von *E.coli* nach *S.meliloti*

Die Einführung von Aminosäurecodon-Substitutionen in das Genom von *S.meliloti* erfolgte durch homologe Rekombination zwischen mutierten Sequenzen und Wildtyp-Sequenzen. Zu diesem Zweck wurde der mobilisierbare *suicide*-Vektor pK18mobsacB verwendet, der einen Replikations-Origin für *E.coli* besitzt, jedoch keinen für *S. meliloti*

(Schäfer *et al.*, 1994). Nach Klonieren der veränderten 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 OD₆₀₀ von 0,1 (*E.coli*: 5 x 10⁷ Zellen / ml; *S.meliloti*: 1 x 10⁸ Zellen / ml) verdünnt und im Schüttelwasserbad bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,4 inkubiert. Es wurden 250 µl Donorzellen (*E.coli* S17-1 der Zelldichte von 1 x 10⁸ Zellen / ml) und 500 µl Rezipientenzellen (*S.meliloti* RU11/001 der Zelldichte von 2 x 10⁸ Zellen / ml) in ein ERG überführt und 2 min bei 6000 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_{SmNm} vereinzelt. Von einer Einzelkolonie ausgehend, wurden die Zellen 2 Tage ohne Selektion auf das Plasmid in TYC_{Sm}-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 synthetisierten mit Hilfe von SacB, der Levan-Saccharase, aus Saccharose Levane, die von *S.meliloti* nicht verwertet werden konnten. Die Levane häufen sich im Periplasma an, was zum Platzen der Zellen führt. Ca. 50 % der Zellen, die auf den Saccharose-Platten anwuchsen, hatten das Plasmid und die damit vermittelte Antibiotikaresistenz durch das zweite Rekombinationsereignis verloren. Von diesen Zellen hatten ca. 50 % die Wildtypsequenz durch die mutierte Sequenz ausgetauscht. Die homologe Rekombination wurde durch PCR und anschließende Sequenzierung nachgewiesen.

3.9. Nukleinsäuretransfer und Hybridisierung (*Southern blot*)

3.9.1. Nukleinsäuretransfer

Genomische DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente geschnitten (3.3.1.) und auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt (3.2.4.). 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⁺) übertragen werden. Durch UV-Belichtung (Stratagene UV crosslinker, Stratagene) wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden.

3.9.2. 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.

3.9.3. 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/cm² Gold-Hybridisierungspuffer, 0,5 M NaCl und 5 % *blocking agent*. 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 die 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 primärem Waschpuffer und 2 x 5 min mit sekundärem Waschpuffer 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 2) inkubiert. Die abgetropfte Membran wurde in Frischhaltefolie gepackt und in eine lichtdichte Kassette gelegt. Die Lichtsignale der Oxidationsreaktion konnten mit Hyperfilm™ ECL *High performance chemiluminescence film* (Amersham, Buckinghamshire) nach 10 min bis 1 h Expositionszeit bei RT detektiert werden.

3.10. Immunchemische Methoden

3.10.1. Gewinnung von denaturierten Proteinproben

Zur Gewinnung von denaturierten Proteinproben für *Western blot* Analysen wurden 1 ml Zellen einer OD₆₀₀ von 0,3 für 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert und in 30 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Ansätze wurden anschließend 10 min aufgekocht und die gesamte Menge auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

3.10.2. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden in einem 8,5 cm x 9,0 cm großen und 1 mm breiten Gel aufgetrennt (10 Spuren), das aus einem Sammelgel (5 % Acrylamid) und einem Trenngel (10 % Acrylamid) zusammengesetzt war (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde mit 1 x SDS-Laupuffer in einer Biometra-Gelelektrophorese-Apparatur vertikal bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt.

3.10.3. Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrocellulose-Membran (*Western blot*)

Nach Auftrennung der Proteinproben im SDS-Gel wurden diese mit einer *tank blot* Apparatur (Biological Laboratories, Harvard University) elektrophoretisch auf eine

Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 500 mA mit Blot-Puffer.

3.10.4. Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz

Die Nitrocellulose-Membran mit den Proteinen wurde ÜN bei 18°C in PBS / 0,1 % Tween / 5 % Magermilch geschwenkt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Anschließend wurde zu einer frischen PBS / 0,1 % Tween / 5 % Magermilch-Lösung der primäre gereinigte Antikörper (E.Eggenhofer, B.Scharf, pers. Mitteilung) in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt und 2 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach 4 x 10 min Waschen mit PBS / 0,1 % Tween wurde der mit Meerrettichperoxidase markierte sekundäre Antikörper in eine Verdünnung von 1:2500 in PBS / 0,1 % Tween / 5 % Magermilch-Lösung zugegeben und für 1 h 30 min inkubiert. Vor Detektion wurde die Membran erneut 4 x 10 min mit PBS / 0,1 % Tween gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem *ECL Western blotting kit*. Dazu wurden die Lösungen 1 und 2, welche Luminol und chemische Verstärker enthalten, im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran 1 min darin geschwenkt. Nach Einwickeln der Membran in Frischhaltefolie wurde diese in eine lichtdichte Kassette gelegt und die Signale mit Hyperfilm™ ECL (Amersham, Buckinghamshire) nach 1 min bis 2 h Exposition bei RT detektiert.

Densitometrische Auswertungen zur quantitativen Bestimmung von Mutantenproteinen wurden mit dem Programm *Scion Image* durchgeführt. Dieses Protein integriert Intensität und Fläche der Proteinbanden. Als Referenz dient die Stärke der Wildtyp-Bande.

3.11. Physiologische Untersuchung von *S.meliloti* und *E.coli*

3.11.1. Schwärmtests von *S.meliloti*-Mutanten

Qualitative Messungen der Schwärmfähigkeit wurden auf Bromfield-Schwärmpalten durchgeführt. Drei µl einer stationären Bakterienkultur (2 Tage bei 30°C) wurden punktförmig auf eine Bromfield-Schwärplatte aufgetragen. Nach drei Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Platten ausgewertet. Ringbildung um den Auftragspunkt zeigte

positive Chemotaxis und Motilität an. Der Durchmesser der Schwärmlinge ist ein Maß für die Effizienz der taktischen Reaktion.

3.11.2. Bestimmung der Geschwindigkeit freischwimmender *S.meliloti*-Zellen

Motile *S.meliloti*-Zellen wurden in RB auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,3 verdünnt und 50 µl-Proben in eine vorbereitete Probenkammer pipettiert. Die Kammer wurde hergestellt, indem zwei Deckgläschchen mit Exsikkatorfett so auf einem Objekträger befestigt wurden, daß ein drittes Deckgläschchen darauf angebracht werden konnte. Damit war eine ausreichende Tiefe der Kammer gewährleistet. Die Zellen wurden unter einem Mikroskop (Zeiss Standard 14 Phasenkontrast-Mikroskop) bei RT untersucht. Die qualitative Bestimmung des Schwimmusters erfolgte durch Beobachtung, quantitative Messungen an freischwimmenden Zellen wurden mittels Hobson *Bactracker* (Hobson Tracking Systems Ltd., Sheffield, UK) bestimmt. Mit Hilfe dieses Computerprogramms können die Läufe einzelner schwimmender Zellen oder der Mittelwert vieler schwimmender Zellen dokumentiert werden. Es wurde die absolute Geschwindigkeit (CVS; *curvilinear speed*) bestimmt, welche die mittlere Geschwindigkeit einer Zelle während eines gemessenen Laufes darstellt. Zudem wurde die relative Geschwindigkeit ermittelt. Hier wurde der lineare Abstand von Anfangs- und Endpunkten eines Laufes gemessen und auf die dafür benötigte Zeit bezogen (VSL; *straightline velocity*). Aus dem Quotienten VSL/CVS läßt sich die Geradlinigkeit bzw. Kurvenhäufigkeit der Läufe ermitteln. Für eine Messung wurde der Mittelwert aus 200 Läufen bestimmt. Es wurden für jeden Stamm fünf unabhängige Messungen durchgeführt. Der Effekt eines Lockstoffes auf das Schwimmverhalten von Wildtyp- und Mutanten-Zellen wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen des Lockstoffes Prolin (Endkonz. 10⁻² M) zum Probenansatz und erneuter Schwimmgeschwindigkeits-Bestimmung ermittelt.

3.11.3. Geschwindigkeitsmessungen bei unterschiedlichen äußeren pH-Werten

Es wurden 0,5 ml 1 M Tris-Puffer des pH-Werts 7,3 , 8,0 , 8,5 oder 9,0 zu 4,5 ml Bakteriensuspension gegeben bzw. 1 ml 0,5 M CHES-Puffer des pH-Werts 9,0 , 9,5 oder 10,0 zu 4 ml Suspension, so daß die Endkonzentration 100 mM betrug. Nach ½ h

Gewöhnungsphase wurde die Schwimmgeschwindigkeit der Bakterien bestimmt (s. 3.11.2.).

4. Ergebnisse

Sinorhizobium meliloti weist einen von den Enterobakterien differierenden Modus der Motorrotation auf. Diese Tatsache findet ihre genetische Entsprechung in der Existenz dreier neuer Gene, *motC*, *motD* und *motE*.

Diese neuen Gene von *S.meliloti* wurden von unserer Arbeitsgruppe untersucht; *motC* war u.a. Gegenstand dieser Arbeit. Das MotC-Protein wurde im Periplasma von *S.meliloti* lokalisiert (Platzer *et al.*, 1997), seine Interaktion mit MotB, einer Komponente des Protonenkanals, wurde nachgewiesen (Haslbeck, 1997; Halbach, 2003). Eine MotB:MotC-Stöchiometrie von ~1:1 wurde durch quantitative Immunoblots bestätigt (Halbach, 2003). Ferner wurde gezeigt, daß MotE als Chaperon und „Zielfinder“ für MotC im Periplasma fungiert (Eggenhofer *et al.*, 2004). Schließlich bindet MotD an FliM, die proximale Komponente des C-Rings (E.Eggenhofer, pers. Mitt.), und sorgt für maximale Rotationsgeschwindigkeit. MotA ist neben MotB ein konserviertes Transmembranprotein des Protonenkanals; MotA steht in Wechselwirkung mit dem Rotorprotein FliG. Bei *E.coli* wurden MotA und FliG als die Interaktionspartner an der Kontaktfläche zwischen Stator und Rotor im Flagellenmotor identifiziert (Garza *et al.*, 1995). Sie generieren das Drehmoment, das die Flagellenrotation ermöglicht. Aufgrund des unterschiedlichen Bewegungsmodus von *S.meliloti*-Zellen (einsinnige cw-Rotation, Geschwindigkeits-Variation) waren jedoch im Zusammenspiel dieser beiden Proteine Unterschiede zu erwarten, deren Funktionsanalyse zentrales Thema dieser Untersuchung ist. Im folgenden Ergebnisteil werden vier Aspekte der Struktur und Funktion des *S.meliloti*-Flagellenmotors behandelt, nämlich:

- (4.1) Vergleichende Genkartierung unter Herausstellung konservierter Motorkomponenten
- (4.2) Stabilität und Funktionalität von MotC
- (4.3) Analyse elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen MotA und FliG
- (4.4) Herstellung einer FliF-FliG-Fusionsmutante und Funktionsanalysen

4.1. Vergleichende Genkartierung unter Herausstellung konservierter Motorkomponenten

4.1.1. Sequenzierung von *motC*, *motA* und *fliG* aus *Rhizobium lupini* H13-3

Ein wichtiges Hilfsmittel für Funktionsanalysen konservierter neuer Motorproteine bei *S.meliloti* ist die Identifizierung konservierter Domänen durch Vergleich mit den orthologen Gensequenzen bei verwandten α -Proteobakterien. Zwar sind die *flagellar regulon*-Cluster mehrerer α -Proteobakterien bereits publiziert, wie z.B. die von *Rhodobacter sphaeroides* (Ward *et al.*, 1995) oder *Zymomonas mobilis* (Um & Kang, 1999; NCBI-Ac.No. AF124349), die typischen *mot*-Gene *motC*, *motD* und *motE* treten jedoch in ihren Genomen nicht auf. Dagegen bieten die Genome von *A.tumefaciens* (Goodner *et al.*, 2001) und *M.loti* (Kaneko *et al.*, 2000) Möglichkeiten für Vergleiche. Ferner ist *R.lupini* H13-3 ein naher Verwandter, von dem die Sequenzen der Flagellingene *flaA*, *flaB* und *flaD* (Scharf *et al.*, 2001), des *orf38*-Homologen und von *motB* bekannt sind (Schuster-Wolff-Bühring, 1999). *R.lupini* H13-3 wurde aus der Wurzelsphäre von Lupinen isoliert und daher so benannt (R.Schmitt, pers. Mitt.). Jedoch ließen Sequenzvergleiche der Flagellingene eine verwandtschaftliche Nähe zu *A.tumefaciens* vermuten, was durch Analyse der 16S rRNA bestätigt wurde (B.Scharf, pers. Mitt.). Bis zur endgültigen Einordnung im Stammbaum wird der ursprüngliche Name beibehalten. Es lag daher nahe, die noch unbekannten, hier relevanten Motorgene zu sequenzieren und zu kartieren. Zur Sequenzanalyse von *motC* wurde von der bekannten *motB*-Sequenz aus ein *plasmid rescue* mittels *HindIII* durchgeführt (3.5.) und das religierte Plasmid sequenziert. Das Schema des *rescue* ist in Abb.10 dargestellt.

Da in diesem nicht die gesamte *motC*-Sequenz enthalten war, wurde eine Teilsequenz des *plasmid rescue* als *tag* verwendet und ein zweiter *rescue* mittels *PstI* durchgeführt. Ferner wurden die bereits bekannten Sequenzen von *orf38* und *motB* noch einmal überprüft. Diese DNA-Sequenzen und die abgeleiteten Peptidsequenzen sind im Anhang unter A1 aufgeführt, ebenso ein Vergleich der Proteinsequenzen mit den entsprechenden aus *S.meliloti* (A3). Das *R.lupini* H13-3 *motD*-Gen wurde bereits sequenziert (Eggenhofer, 2001).

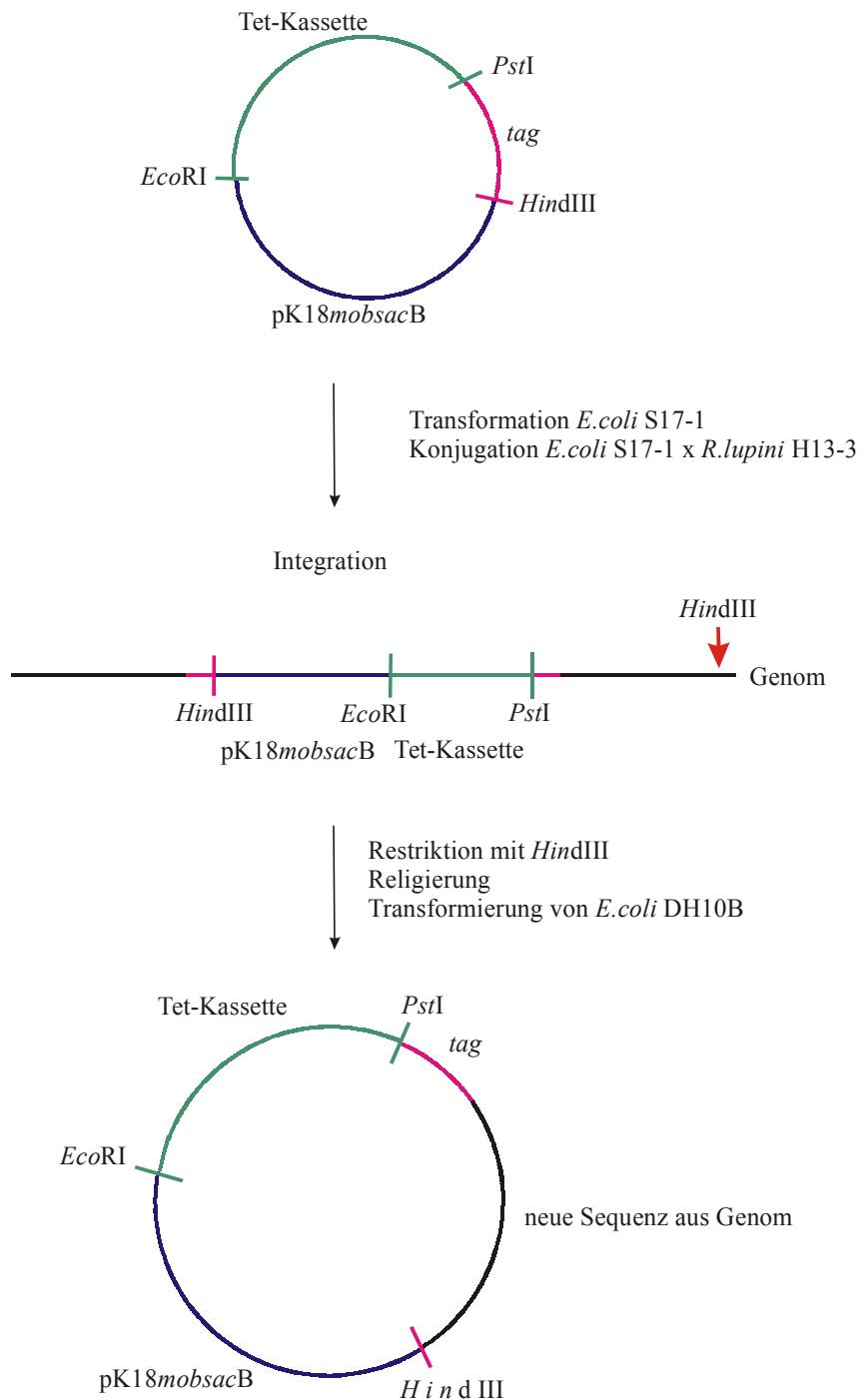


Abb.10. Fließdiagramm des mit *HindIII* durchgeföhrten *plasmid rescue*. Tet-Kassette = Tetracyclin-Kassette (grün); pK18mobsacB (blau); tag = 500 bp PCR-Fragment der 3'-Region von *R.lupini* H13-3 (rot); Genom (schwarz)

Ferner waren die Sequenzen der *R.lupini*-Gene *motA* und *fliG* hier von Interesse. Es stand das Plasmid pRU2352 zur Verfügung, das H.Schuster-Wolff-Bühring (1999) bereits aus dem *R.lupini*-Genom mittels *plasmid rescue* gewonnen hatte. Dieses Plasmid mit *motA* und *fliG* wurde im Rahmen dieser Arbeit sequenziert. Die Sequenzinformationen sind im Anhang zusammengestellt (A2). Die abgeleiteten offenen Leseraster wurden auf Ähnlich-

keiten zu den *S.meliloti*-Orthologen hin untersucht; die Aminosäure-Sequenzvergleiche sind ebenfalls im Anhang zu finden (A3). Identitäten und Ähnlichkeiten abgeleiteter, hier relevanter *R.lupini* H13-3 Motorproteine im Vergleich zu *S.meliloti*, *M.lotii* und *E.coli* sind in Tab.5 aufgelistet.

Tab.5. Vergleiche von neuen abgeleiteten Motorproteinen zwischen *R.lupini*, *M.lotii* und *E.coli* mit *S.meliloti* (100 %)¹⁾

Protein	Identität (%)				Ähnlichkeit (%)			
	<i>A.tume-faciens</i>	<i>R.lupini</i>	<i>M.lotii</i>	<i>E.coli</i>	<i>A.tume-faciens</i>	<i>R.lupini</i>	<i>M.lotii</i>	<i>E.coli</i>
MotA	84	83	70	43	89	89	79	53
MotB	63	62	51	34	71	71	59	43
MotC	50	50	40	- ²⁾	59	58	49	- ²⁾
MotE	56	nb ³⁾	49	- ²⁾	63	nb ³⁾	57	- ²⁾
FliG	67	67	43	23	77	77	54	36
FliM	47	44	31	23	56	54	40	31
FliN	68	69	45	34	74	73	54	46

¹⁾Vergleiche mittels GCG-Programm (Wisconsin Package); ²⁾ im *E.coli*-Genom nicht vorhanden; ³⁾ nicht bekannt

Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, daß die Identität der *S.meliloti*-Proteine MotA, MotB, FliG, FliM und FliN mit den Orthologen der anderen α -Proteobakterien (31-84 %) größer ist als im Vergleich zu *E.coli* (23-43 %). MotC, MotD und MotD sind exklusiv nur in α -Proteobakterien vorhanden. Auf der Seite des Stators ist MotA am stärksten konserviert (43 % Identität zu *E.coli*, 70-84 % innerhalb der α -Proteobakterien), MotB, MotC, MotD und MotE sind dagegen nur zu 40-63 % identisch. Die MotB-Proteine der α -Proteobakterien sind gegenüber ihrem *E.coli*-Paralogen um eine Extradomäne von ~100 AS-Resten verlängert. Auf der Seite des Rotors sind FliG, FliM und FliN innerhalb der α -Proteobakterien zu 31-69 % identisch, zu *E.coli* zu 23-34 %. Es ist auffällig, daß MotA stärker konserviert ist als die anderen untersuchten Proteine. Der hohe Anteil identischer und ähnlicher Reste in ihren Peptidsequenzen findet seine Entsprechung in der Rolle, die MotA im Motor spielt. Es ist Bestandteil des MotA-MotB-Protonenkanals, und es kommt ihm die zentrale Aufgabe der Kraftübertragung vom Stator auf den Rotor zu.

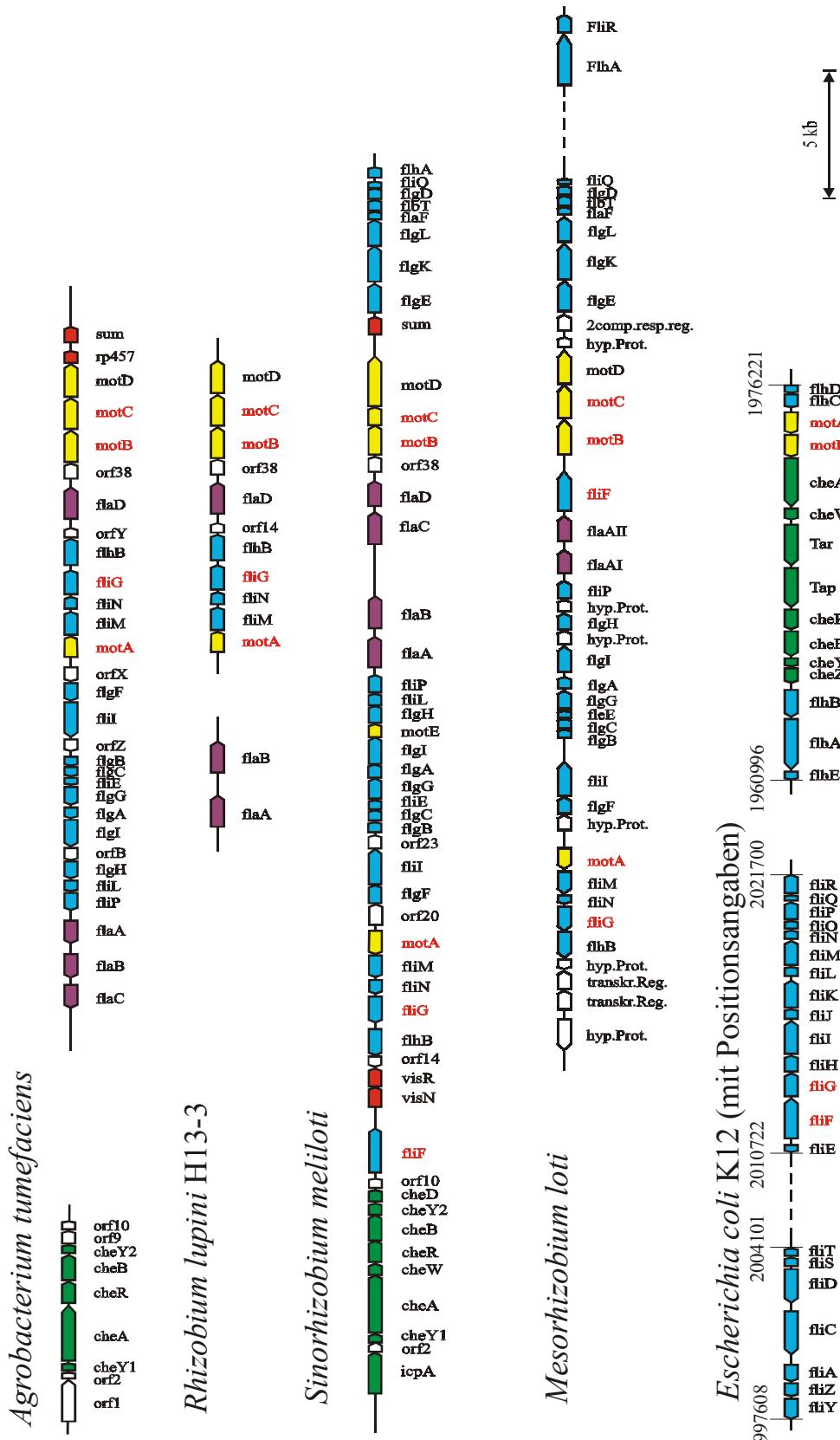
4.1.2. Vergleichende Genkartierung der *flagellar regulon*-Cluster von vier α -Proteobakterien

Bei *S.meliloti* sind alle *che*-, *fla*- und *mot*-Gene in einem einzigen, ~50kb großen Regulon zusammengefaßt. Das Regulon läßt sich in ~12 Transkriptionseinheiten (Operons) unterteilen, in denen Gene entdeckt wurden, die z.T. noch in keinem anderen Organismus gefunden worden waren. Die verschiedenen Operons sind in drei Hierarchie-Regulationsklassen organisiert (Sourjik *et al.*, 2000). Das bereits bekannte *flagellar regulon* von *S.meliloti* wurde hier mit den neu bestimmten Sequenzen aus *R.lupini* H13-3 sowie mit den Regulons anderer α -Proteobakterien verglichen, deren Genome in jüngerer Zeit veröffentlicht worden waren. Es war festzustellen, ob die verwandten Spezies über eine ähnliche Anordnung ihrer Chemotaxis-, Flagellen- und Motilitätsgene verfügten.

Anhand hier gewonnener Sequenzdaten von *R.lupini* H13-3 und der veröffentlichten Genomsequenzen von *M.loti* (Kaneko *et al.*, 2000), *A.tumefaciens* (Goodner *et al.*, 2001) wurden Genkarten des *flagellar regulon* aufgestellt und mit der von *S.meliloti* verglichen (Abb.11). Zum Vergleich sind entsprechende *E.coli* K12-Gene (Blattner *et al.*, 1997), die in drei isolierten Genclustern kartiert, gezeigt.

Beim Vergleich der Genkarten fällt auf, daß tatsächlich alle aufgeführten α -Proteobakterien mit komplexen Flagellen und einsinnigem Rotationssinn über *motC* und *motD*-Gene verfügen und diese gekoppelt mit *motB* vorliegen. Dagegen kartiert *motA*, im Gegensatz zu seinem *E.coli*-Homologen, von *motB* getrennt und zwar im selben Operon wie die Rotorproteine *fliM*, *fliN* und *fliG*. Andererseits besteht keine Genkopplung zwischen *fliF* und *fliG* (wie bei *E.coli* K12).

Man kann daraus folgern, daß, anders als bei *E.coli*, keine strikte Stöchiometrie zwischen MotA und MotB (4:2) oder FliF und FliG (1:1) herrscht, oder aber, daß die Mengen über die Stärke der Genexpression strikt kontrolliert werden.



(Abb. 11). Genkarten der Flagellen- und Motilitätsgene von *A. tumefaciens*, *R. lupini*, *M. loti*, und *E. coli*. Gene sind maßstabsgetreu durch farbige Boxen markiert, deren Polarität die Transkriptionsrichtung anzeigt. Grün markiert sind Chemosensorgene, gelb Mototaxisgene, violett Flagellengene, blau Gene für die Flagellensynthese und rot Regulatorgene. Weiße Boxen zeigen offene Leserahmen an, deren Funktionen noch nicht aufgeklärt sind (Godner *et al.*, 2001; Scharf *et al.*, 2001; Soukij *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2000; Blattner *et al.*, 1997). Hier relevante Gene sind durch Markierung hervorgehoben. Die neuen Sequenzen des *R. lupini* H13-3-Genomes wurden bei NCBI unter Accession No.AY177143 und No AY5333375 abgelegt.

4.2. Untersuchungen zur Charakterisierung des Motilitätsproteins MotC

4.2.1. Stabilität der verkürzten Proteine in *motC*-Deletionsmutanten

Das Protein MotC ist eine neue periplasmatische Komponente des Motors von *S.meliloti*, die eine essentielle Rolle bei der Flagellenrotation spielt. Möglicherweise reguliert sie den Protonenfluß durch den Protonenkanal, der von MotA und MotB gebildet wird (Platzer *et al.*, 1997). Hinweise auf eine Wechselwirkung des C-terminalen Bereichs mit einer periplasmatischen Extradomäne von MotB ergaben sich durch *two-hybrid* Analysen (Haslbeck, 1997). Weitere Informationen über die Domänenstruktur von MotC könnten weiterführende Schlüsse auf seine neuartige Funktion erlauben. Hilfreich für Aussagen über eine Domänenstruktur sind Vergleiche mit den Sequenzen orthologer Proteine. Für *motC* sind die Sequenzen von *R.lupini*, *A.tumefaciens* und *M.loti* bekannt (s. 1.). Ein Vergleich der vier Sequenzen ist in Abb.12 gezeigt. *M.loti*-MotC ist nach den Daten von Kaneko *et al.* (2000) stark verkürzt. Nimmt man ein 3' gelegenes ATG als Startcodon und damit einen früheren Translationsstart an, führt dies zu einem 457 AS-Reste großen Protein (*S.meliloti*-MotC: 434 AS-Reste).

Weitere Informationen über wichtige und weniger wichtige Bereiche eines Proteins lassen sich mit Hilfe von Deletionsanalysen und anschließender Charakterisierung der resultierenden Phänotypen gewinnen. Eine derartige Analyse habe ich systematisch, ausgehend vom C-Terminus, in Schritten von 20 AS-Resten, im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt (Attmannspacher, 1999). Das Schema der eingeführten MotC-Deletionen ist in Abb.12 eingezeichnet.

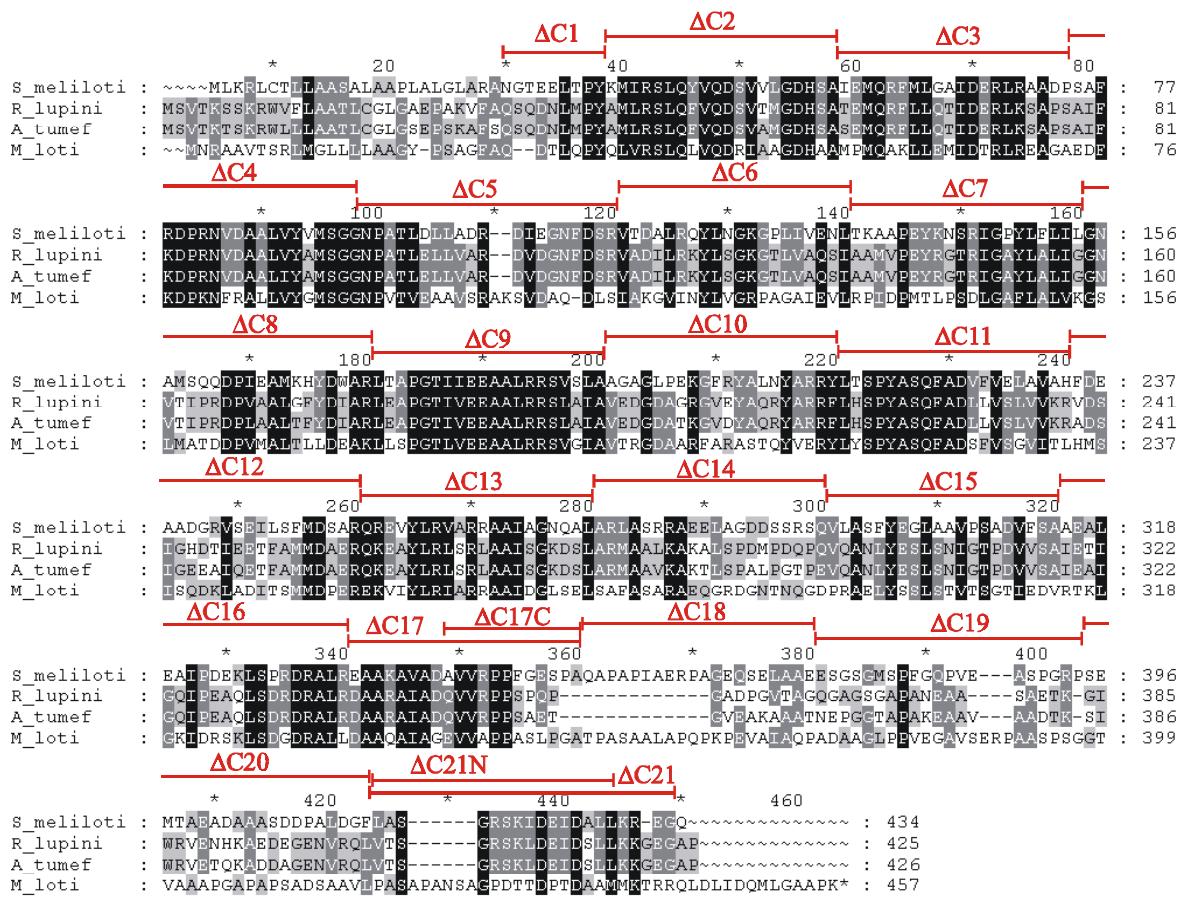


Abb.12. Alignment (GeneDoc-Programm) und Vergleich der MotC-Proteine von *S.meliloti*, *R.lupini*, *A.tumefaciens* (*A_tumef*) und *M.loti* (Platzer *et al.*, 1997; Goodner *et al.*, 2001, nach Kaneko *et al.*, 2000). Schwarz markiert sind in allen vier Sequenzen identische und ähnliche Reste, dunkelgrau in drei Sequenzen konservierte Reste und hellgrau in zwei Sequenzen konservierte Reste. Die schwarzen Zahlen geben die jeweiligen AS-Positionen an, mit roten Buchstaben und Balken sind die in der Diplomarbeit deletierten Bereiche (Attmannspacher, 1999).

Das Ergebnis der Mutantenanalyse war jedoch im Fall von *motC* wenig informativ, weil nur Mutanten, denen einige terminale Reste fehlten, noch motile Phänotypen zeigten. Nachdem mehr über die aufwendige Faltung von MotC mittels eines spezifischen Chaperons, MotE bekannt ist (Eggenhofer *et al.*, 2004), kam die Vermutung auf, daß Deletionen dieses stark konformationsabhängige Protein destabilisieren könnten. Dem wurde anhand von *Western blot* Analysen der Mutantenproteine mit einem inzwischen verfügbaren anti-MotC-Antikörper nachgegangen. Zellextrakte des Wildtyps und aller 24 Mutanten wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran übertragen und mit dem Antikörper inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb.13 gezeigt.



Abb.13. *Western blot* zum quantitativen Nachweis der Expression der verkürzten MotC-Proteine. Gleiche Mengen an Zellextrakten (3.9.1.) wurden in einem 10 % Acrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit einem anti-MotC-Antikörper inkubiert. Die Mutanten $\Delta C21$ bis $\Delta C1$ sind in absteigender Reihenfolge aufgetragen, ferner $\Delta C17C$ (17C), $\Delta C21N$ (21N) und $\Delta C18-20$ (18-20) sowie als Kontrolle der Wildtyp (001) und die Gesamt-Deletionsmutante RU11/211 (211); St.: Größenstandard.

Die Ergebnisse der Abb.13 zeigen bereits bei visueller Inspektion, daß die MotC-Mutanten sehr unterschiedliche Stabilität besitzen. Dies wurde auch quantitativ nachgewiesen (3.10.4.). Die Mutanten lassen sich folglich in drei Gruppen einteilen: Mutationen $\Delta C1$ bis $\Delta C12$ sowie die C-terminale Mutante $\Delta C21$ weisen sehr geringe Stabilität auf (weniger als 20 % der Wildtypmenge). Die Mutanten $\Delta C13$ bis $\Delta C17$ sowie $\Delta C20$ nehmen eine Mittelstellung ein (25-60 %), und der MotC-Spiegel in den Mutanten $\Delta C18$ und $\Delta C19$ erreicht fast Wildtypniveau, ebenso $\Delta C17C$. Diese Befunde sind in Tab.6 bzw. Abb.14 zusammengefaßt.

Die im Rahmen der Diplomarbeit erhaltenen Stämme waren auf ihre Schwärmm- und Schwimmfähigkeit hin untersucht worden. Es ergaben sich drei Typen von Phänotypen: (1) solche, die quasi-normale Motilität zeigten, (2) solche, deren Bewegungsfähigkeit eingeschränkt war und (3) solche, die vollständig paralysiert waren. Zur ersten Klasse der wildtypähnlichen Stämme zählten die MotC-Deletionsstämme $\Delta C18$ und $\Delta C19$, zur zweiten die Mutanten $\Delta C1$, $\Delta C12$, $\Delta C13$, $\Delta C14$, $\Delta C15$, $\Delta C16$, $\Delta C17$, $\Delta C20$ und $\Delta C21$, alle anderen ($\Delta C2$, $\Delta C3$, $\Delta C4$, $\Delta C5$, $\Delta C6$, $\Delta C7$, $\Delta C8$, $\Delta C9$, $\Delta C10$ und $\Delta C11$) zur dritten Klasse paralysierter Stämme. Die Schwimmfähigkeit aller MotC-Deletionsmutanten ist nochmals in Abb.15 gezeigt.

Tab. 6. Relative Intensitäten der MotC-Banden im *Western blot*, bezogen auf den Wildtyp

Mutante	Intensität* (%)
ΔC1	11,8 ± 5,8
ΔC2	11,0 ± 3,5
ΔC3	2,3 ± 3,3
ΔC4	4,3 ± 6,0
ΔC5	1,6 ± 2,2
ΔC6	13,1 ± 7,4
ΔC7	6,3 ± 0,6
ΔC8	2,1 ± 2,9
ΔC9	1 ± 1,4
ΔC10	5,8 ± 3,3
ΔC11	7,9 ± 3,5
ΔC12	8,3 ± 3,9
ΔC13	24,4 ± 4,1
ΔC14	33,9 ± 7,4
ΔC15	59,7 ± 55,2
ΔC16	57,2 ± 22,1
ΔC17	55,1 ± 12,9
ΔC17C	88,2 ± 35,9
ΔC18	85,9 ± 36,8
ΔC19	116,1 ± 8,1
ΔC20	65,0 ± 16,5
ΔC18-20	7,9 ± 10,8
ΔC21	9,3 ± 5,0
ΔC21N	3,0 ± 1,3

*Mittel aus zwei unabhängigen Experimenten nach Auswertung im *Scion Image* Programm

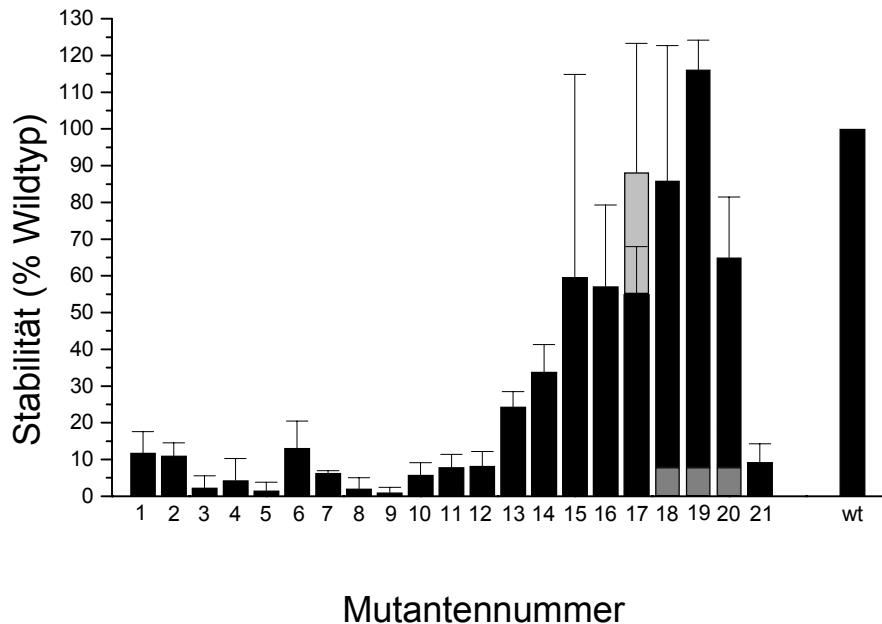


Abb. 14. Histogramm der relativen Intensitäten (% Wildtyp) der MotC-Banden im *Western blot* aller *motC*-Deletionsmutanten (entspricht Tab.6). Die prozentualen Intensitäten sind gegen die fortlaufenden Nummern der Mutanten aufgetragen. Grauwerte entsprechen den Mutanten $\Delta C17C$ und $\Delta C18-20$.

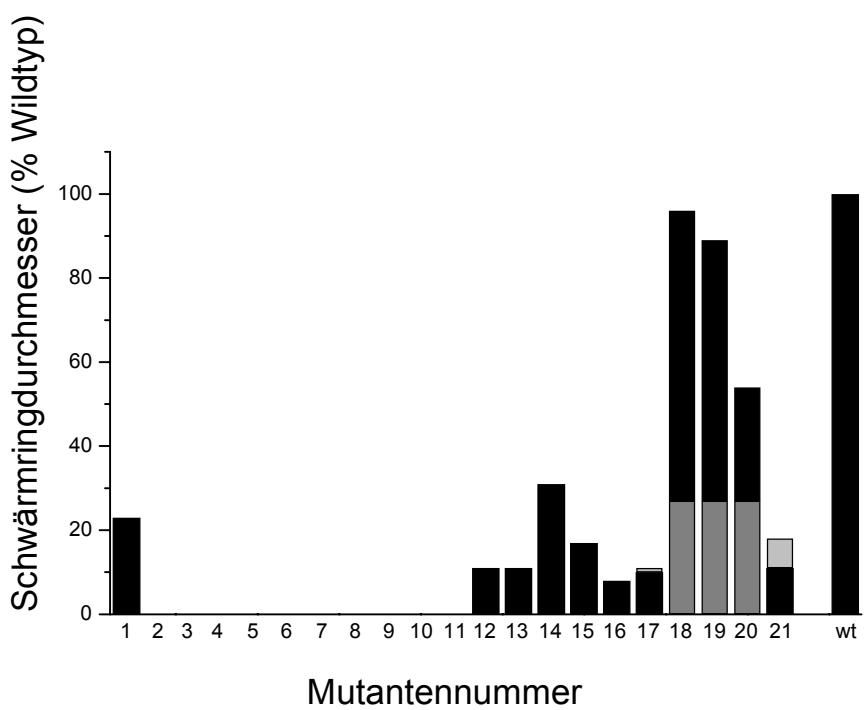


Abb.15. Histogramm der relativen Schwärmingdurchmesser (%Wildtyp) aller *motC*-Deletionsmutanten. Die prozentualen Schwärmingdurchmesser sind gegen die fortlaufenden Nummern der Mutanten aufgetragen. Grauwerte geben Aktivitäten von $\Delta C17C$ bzw. $\Delta C21N$ an. Der Durchmesser der 180bp-Deletion $\Delta C18-20$ ist in den Säulen der Einzelmutanten grau mit eingezzeichnet (Attmannspacher, 1999).

Geht man davon aus, daß die gemessenen Intensitäten der anti-MotC-Addukte den vorhandenen MotC-Konzentrationen in motilen, exponentiell wachsenden *S.meliloti*-Zellen entsprechen, so ergibt sich eine Korrelation zwischen Schwärmaktivität und MotC-Stabilität. Dies wird beim Vergleich der Histogramme in Abb.14 und Abb.15 besonders deutlich.

Ein Vergleich zwischen Bereichen hoher und geringer Konservierung der MotC-Proteine (Abb.12) mit der Schwärmfähigkeit der untersuchten Mutanten zeigt, daß nur die Deletionen im nichtkonservierten Bereich der AS-Reste 355-414 keine oder nur geringe Auswirkungen auf den Phänotyp hatten, alle anderen dagegen zum beinahe oder vollständig paralysierten Phänotyp führten. Es wurde bisher angenommen, daß die Deletion konservierter Teilbereiche von MotC die Bindung an MotB abschwächt oder verhindert. Nun scheint es so, als würde die Proteinmenge nicht ausreichen und so eine verminderte Beweglichkeit zur Folge haben. Dafür spricht auch, daß die gemessene Stöchiometrie von MotC:MotB bei ~0,74:1 liegt (Halbach, 2003) und geringere MotC-Mengen für die H⁺-Kanalfunktion abträglich sind (Platzer *et al.*, 1997). Ein mögliches Modell der MotC-MotB-Wechselwirkung wird im Lichte dieser und folgender Befunde in der Diskussion erörtert.

Die immotilen Mutanten ΔC2 bis ΔC11 verfügen kaum über MotC-Protein (maximal ca. 10 % der Wildtypmenge). Es steht kein MotC für die Wechselwirkung mit MotB zur Verfügung, daher gleicht der Phänotyp dem der MotC-Deletionsmutante RU11/211. Die Mutanten ΔC12, ΔC13 und diejenigen, deren *motC* in den Randbereichen des Gens deletiert sind, ΔC1 und ΔC21, weisen geringe Mengen (9-24 %) an MotC auf und können keine Schwärmlinge bilden.

Eine Ausnahme von der Kongruenz von Schwärmfähigkeit und Proteinstabilität stellen die Mutanten ΔC15, ΔC16 und ΔC17, vor allem aber ΔC17C dar. Die Proteinmenge erreicht zwar 60 % des Wildtypspiegels, im Falle von ΔC17C sogar 90 %, jedoch beträgt das Schwärmlingvermögen bei allen drei Mutanten weniger als 20 %. Diese Diskrepanz läßt darauf schließen, daß jene verkürzten Proteine fehlerhaft an den Motor assoziieren, so daß die Motorfunktion schwerwiegend gestört ist. Hier könnte es sich in der Tat um Defektmutanten im Sinne des Wortes handeln. Dafür sprechen *two-hybrid* Analysen, die zeigten, daß die C-terminale Domäne von MotC an die Extradomäne des Kanalproteins MotB bindet. Es handelt sich dabei um die AS-Reste 343 bis 434 (Haslbeck, 1997). Die schlechte Motilität der Mutante ΔC17C, welcher die ersten zwölf AS-Reste der C-

terminalen Domäne fehlen, ließe sich daher mit dem Fehlen von wichtigen Bereichen für die MotB-Bindung erklären.

Affinitäts-Western blots mit MotB und einem verkürzten MotC-Protein, dem die AS-Reste 343 bis 434 fehlen, hatten ergeben, daß auch dieses verkürzte MotC noch an MotB bindet. Deshalb nehmen wir an, daß die MotC-Domäne, die mit MotB interagiert, über den im two-hybrid System festgelegten Bereich von 434-343 in N-terminale Richtung hinausreicht (Halbach, 2003).

Die Ergebnisse resultieren also in einer neuen Erklärung der meisten MotC-Defekte, nämlich, daß mangelnde MotC-Stabilität die empfindliche MotB-MotC-Stöchiometrie aus dem Gleichgewicht bringt und dadurch den Protonenfluß durch den MotA-MotB-Kanal mindert oder ganz verhindert.

4.2.2. Schwimmgeschwindigkeiten von *S.meliloti* und *E.coli* bei erhöhten pH-Werten

S.meliloti lebt in neutralen bis alkalischen Böden. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß die für den Antrieb des Motors erforderliche Protonenkonzentration in der Umgebung der Bakterien häufig suboptimal ist. Das könnte für MotC eine Funktion als Protonenfänger oder pmf-Sensor bedeuten. Es ist folglich denkbar, daß *S.meliloti* in Bezug auf die Motilität steigenden pH-Werten gegenüber toleranter ist als z.B. *E.coli*-Zellen, die nicht über eine MotC-Komponente verfügen. Eine Negativkontrolle innerhalb der Art *S.meliloti* ist nicht möglich, da die Deletion des Gens ja auch bei neutralem pH zum paralysierten Phänotyp führte.

Daher wurden motil angezogene *S.meliloti* RU11/001 und *E.coli* RP 437 (beide Wildtyp in Bezug auf Motilität) in gepufferten Medien mit stufenweise erhöhtem pH inkubiert und auf ihre Schwimmgeschwindigkeit hin untersucht. Für die pH-Werte 7,3 bis 9,0 besaß Tris die besten Puffereigenschaften, bei noch stärker alkalischem pH war CHES optimal. Da direkte Einflüsse der Pufferkomponenten auf das Schwimmverhalten der Bakterien nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden bei pH 9,0 Messungen mit beiden Puffern durchgeführt. Wie Tab.7 und Abb.16 zeigen, führte der Pufferwechsel nur zu einer geringfügigen Verschiebung.

Tab. 7. Schwimmgeschwindigkeiten von *S.meliloti* und *E.coli* in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums

pH Tris-Puffer*	Schwimmgeschwindigkeit ($\mu\text{m/sec}$)	
	<i>S.meliloti</i>	<i>E.coli</i>
7,3	42,0 \pm 2,4	19,1 \pm 3,4
8,0	39,5 \pm 2,5	19,7 \pm 3,5
8,5	39,8 \pm 3,3	20,8 \pm 3,1
9,0	34,4 \pm 3,9	19,6 \pm 2,7
pH CHES-Puffer*		
9,0	30,7 \pm 1,6	20,3 \pm 3,1
9,5	23,2 \pm 2,1	0
10,0	0	0

*Suspension mit motilen Zellen, mit Tris- bzw. CHES-Puffer (Endkonzentration 100 mM) des gewünschten pH-Werts versetzt. Die angegebenen Werte wurden aus drei unabhängigen Messungen gemittelt.

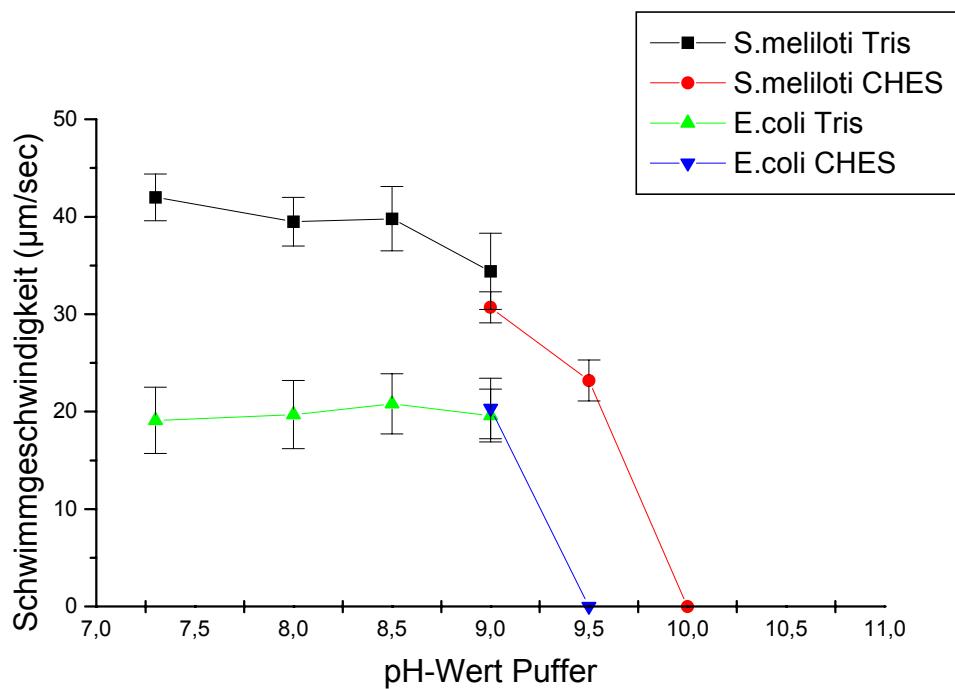


Abb. 16. Schwimmgeschwindigkeit von *S.meliloti* und *E.coli* in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums (gemäß Tab. 7). Die Geschwindigkeit in $\mu\text{m/sec}$ ist gegen den pH-Wert des verwendeten Puffers (im Bereich pH7-9 Tris, im Bereich pH9-10 CHES) aufgetragen. Die vertikalen Linien bezeichnen die Fehlerbalken nach drei Messungen.

Die maximale Schwimmgeschwindigkeit im Bereich von pH 7,3, der dem pH-Wert der routinemäßig verwendeten Medien entspricht, bleibt bis pH 9,0 bei beiden Spezies konstant, allerdings erreichen *E.coli*-Zellen nur die halbe Geschwindigkeit von *S.meliloti*. Bei pH 9,5 sind *E.coli*-Zellen paralysiert, *S.meliloti*-Zellen zeigen etwa 55 % (25 µm/s) der maximalen Geschwindigkeit. Wurde *S.meliloti* bei pH 10,0 inkubiert, so wurden auch diese Zellen unbeweglich. Es zeigte sich, daß *S.meliloti*, wie vermutet, gegenüber höheren pH-Werten toleranter ist als *E.coli*. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß *E.coli* für die Energieversorgung seines Motors bei pH 9,5 nicht genügend Protonen zur Verfügung stehen, während *S.meliloti* bei diesem pH-Wert ausreichend versorgt ist. Diese Interpretation der MotC-Funktion ist interessant und wird zusammen mit Alternativ-Erklärungen später diskutiert (5.2.).

4.3. Analyse der MotA-FliG-Wechselwirkung mittels gezielter Mutation

genese

4.3.1. Einführung

Die zentrale Frage zum Mechanismus der Flagellenrotation betrifft die Umsetzung elektrochemischer Energie (*protonmotive force, pmf*) in mechanische Arbeit (Drehmoment). Die neuesten Modellvorstellungen (Kojima & Blair, 2001; Schmitt, 2003; Blair, 2003) gehen davon aus, daß der Protonendurchfluß auf den Stator beschränkt ist, auch die Energieumwandlung (Protonengradient in Konformationsänderung) bereits im Protonenkanal selbst erfolgt und daß diese Konformationsänderungen vom Stator auf den Rotor übertragen werden. Systematische Mutationsexperimente von Lloyd *et al.* (1997) und Zhou *et al.* (1998) ließen eine Kraftübertragung vom Stator (MotA-MotB) auf den Rotor (FliG) durch elektrostatische (Coulomb-) Wechselwirkungen am plausibelsten erscheinen. Dieses Konzept ist im *helix rotation model* (Schmitt, 2003) konsequent in eine Gesamtvorstellung der Funktionsweise und Dynamik des bakteriellen Flagellenmotors umgesetzt worden.

Alle früheren derartigen Untersuchungen wurden am Modellorganismus *E.coli* durchgeführt; dessen Flagellen zeichnen sich durch Wechsel der Rotationsrichtung zwischen *ccw* und *cw* aus. Der *S.meliloti*-Flagellenmotor rotiert einsinnig *cw*, die Rotationsgeschwindigkeit wird jedoch variiert. Deshalb wurden in diesem Teil der Arbeit drei Fragen untersucht:

- (1) Sind auch im *S.meliloti*-System konservierte geladene Reste für den Energietransfer zwischen Stator und Rotor verantwortlich?
- (2) Wenn ja: Sind diese gleichartig oder unterschiedlich zum *E.coli*-Motor angeordnet?
- (3) Kann man aus der Analyse von „Ladungsmutanten“ Rückschlüsse auf die Funktionsweise des *S.meliloti*-Motors ziehen?

4.3.2. Sequenzvergleiche

Den nächstliegenden Zugang zur ersten Frage bieten Vergleiche der fraglichen Teilesequenzen von MotA und FliG mit den entsprechenden von *E.coli* und *T.maritima*. Ein Vertreter der thermophilen Thermotogales (mit konservierter FliG-Sequenz) wurde wegen der einfacheren Kristallisierbarkeit der relevanten C-terminalen Domäne (Reste 235 bis 335) des FliG-Proteins von Lloyd *et al.* (1999) für eine topologische Analyse des Rotor-„Randes“ herangezogen. Auf der Stator-Seite nimmt die große cytoplasmatische Schleife von MotA (Reste 51 bis 171) zwischen den Transmembranhelices TM2 und TM3 an den Wechselwirkungen teil. Die Sequenzvergleiche dieser Domänen von MotA und FliG sind in Abb.17 zusammengestellt.

MotA

<i>E.coli</i>	51	GKAIGTLKALPLLFRRSKYTKAMYMDLLALLYRLMAKS	RQMGMFSL	E RDien	103		
<i>T.maritima</i>	54	DKAFKIVNIMLSTL	---	KEPKLDHVSLIQTMVVFSEKA	R REGLLSLE	E NLES	102
<i>S.meliloti</i>	51	MKVVKDTGKALGEAFRKVPKEREYLDLGVLYSLMRDL	RT KS	RNEI	E SHIDN	103	
<i>E.coli</i>	104	PRESEIFASYPRILADSVMLDFIVDYLRLI	I	SGHMNTFEIEALMDEE	IETHES	156	
<i>T.maritima</i>	103	IED	-----	PFMKKALGLVVDGTDPDL	-LRNMMETEMELFEE	137	
<i>S.meliloti</i>	104	PEESSIFQSAPTVLQNKELTAFICDYVRLIIIGNARSYE	I	EALMDEE	IQTITH	137	
<i>E.coli</i>	157	EAEPANSLALVGDS	171				
<i>T.maritima</i>	138	ELDGERAVLESAGAY	152				
<i>S.meliloti</i>	157	DKMKCYHAMTTMGDA	171				

FliG

<i>E.coli</i>	257	ESLLIAL	K GAEQPLREKF	LNMSQR	A ADIL	RDD LANR	-GPV	R L	SQVENEQK	306
<i>T.maritima</i>	259	RDLALAL	K GASDELKEKIF	KNMSK	R AAALL	KDE LEYM	-GPV	R L	DVEEAQQ	308
<i>S.meliloti</i>	270	DVITMAL	R GSAAELRESI	LASIGA	Q RRMI	ESD LAAGDAGIN	P RDIA	I ARR		320

Abb. 17. Vergleich der Domänen von MotA FliG aus *E.coli*, *T.maritima* und *S.meliloti*, die für die Wechselwirkung mit dem jeweils anderen Protein essentiell sind. E.c.: *Escherichia coli*; Tm: *Thermotoga maritima*; Sm: *Sinorhizobium meliloti*. Zahlen geben die Sequenzpositionen der begrenzenden Reste des alignment an. Konservierte und hier relevante Reste sind rot hervorgehoben.

Die Vergleiche zeigen, daß das *S.meliloti*-FliG konservierte Ladungen an den Positionen Arg277 (+), Arg294 (+) und Asp302 (-) besitzt, jedoch nicht an den Positionen Ser301 und Asn311 (ein neuer geladener Rest Glu300 wurde hier markiert). Die MotA-Reste Arg90 (+) und Glu98 (-) sind voll konserviert. Diese Ladungsverhältnisse und ihre ungefähre Lage im C-terminalen Bereich von FliG (Sektor aus dem Rotor-Rand; Lloyd *et al.*, 1999) und in der MotA-Schleife werden schematisch in Abb. 18 zwischen *E.coli* und *S.meliloti* verglichen. Sie bilden die Grundlage für die folgenden gezielten Mutationen geladener Reste und der Analyse ihrer Auswirkungen auf Chemotaxis und Schwimmgeschwindigkeit von *S.meliloti*-Zellen.

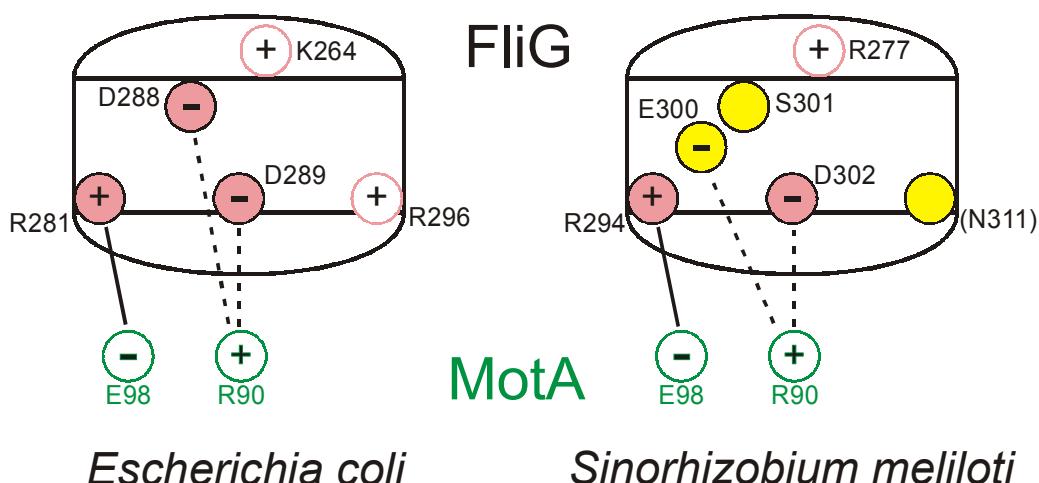


Abb. 18. Modell der Anordnung wichtiger geladener Reste im Flagellenmotor von *E.coli* und orthologer Reste von *S.meliloti*. MotA-Reste sind durch grüne Kreise symbolisiert, wichtige FliG-Reste durch schwarze. Für die Kraftübertragung essentielle Reste sind rosa markiert, bei *S.meliloti* nicht konservierte gelb. Weniger wichtige FliG-Reste sind durch rosa umrandete Kreise symbolisiert. Wichtige Interaktionen bei *E.coli* werden mittels durchgezogener Linien dargestellt, weniger wichtige mittels unterbrochener Linien (U. Attmannspacher, B. Scharf, R. Schmitt, in Vorber.).

4.3.3. Methodischer Ansatz

Zu mutierende Gensegmente von *S.meliloti* RU11/001 wurden mittels *overlap extension* PCR gezielt verändert und in einen geeigneten Vektor kloniert (3.6.2.). Die Plasmide wurden durch Transformation in *E.coli* S17-1 eingebracht und von da per konjugativem Austausch nach *S.meliloti* RU11/001 übertragen. Die Integration der mutationstragenden Fragmente in den nativen Genlocus (homologe Rekombination durch doppeltes crossover) wurde durch Doppelselektion gesichert (3.8.). Jede Mutante wurde mittels PCR und Sequenzanalyse überprüft (3.6.1., 3.7.).

Schwärmlplatten bieten eine Schnellmethode zum *screening* von Funktionsausfällen bei diesen Mutanten (3.11.1.). Allerdings erfaßt das Verfahren die Beweglichkeit der Zellen nur indirekt, weil der gebildete Lockstoffgradient primär auf die Fähigkeit zur chemotaktischen Antwort selektiert. Doch gibt der Vergleich mit dem wt-Schwärmlring-Durchmesser einen verlässlichen Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des Flagellenmotors. Diese kann direkt durch Messungen der Geschwindigkeit freischwimmender Zellen mit Hilfe des *Hobson tracker* festgestellt werden (3.11.2.). Außer der Bestimmung der Grundgeschwindigkeit ist der Grad der Beschleunigung bei Lockstoff-Zusatz (Chemo-kinese) ein entscheidendes Kriterium für das Funktionieren des *S.meliloti*-Flagellenmotors. Daher müssen die Grundgeschwindigkeiten und die Grade der Geschwindigkeitserhöhung bei Zugabe von Lockstoff stets mit den wt-Werten verglichen werden.

4.3.4. Mutanten mit Aminosäure-Substitutionen in MotA oder FliG und Kombinationen

Die Bedeutung der konservierten geladenen Reste in den interagierenden Domänen von MotA und FliG (Abb.17 und Abb.18) wurde zunächst durch Einzel- und Doppelmutanten in jedem der Proteine untersucht. Auf diese Weise konnte ihre Rolle für die Motorfunktion unmittelbar abgeschätzt werden. Erst danach wurden Kombinationen von MotA- und FliG-Mutationen analysiert, um so Aussagen über MotA-FliG-Wechselwirkungen treffen zu können.

a) Schwärmtests

Schwärmtests von drei MotA-, vier FliG- und drei MotA/FliG-Mutanten sind mit den wt-Kontrollen in Abb.19 exemplarisch gezeigt.

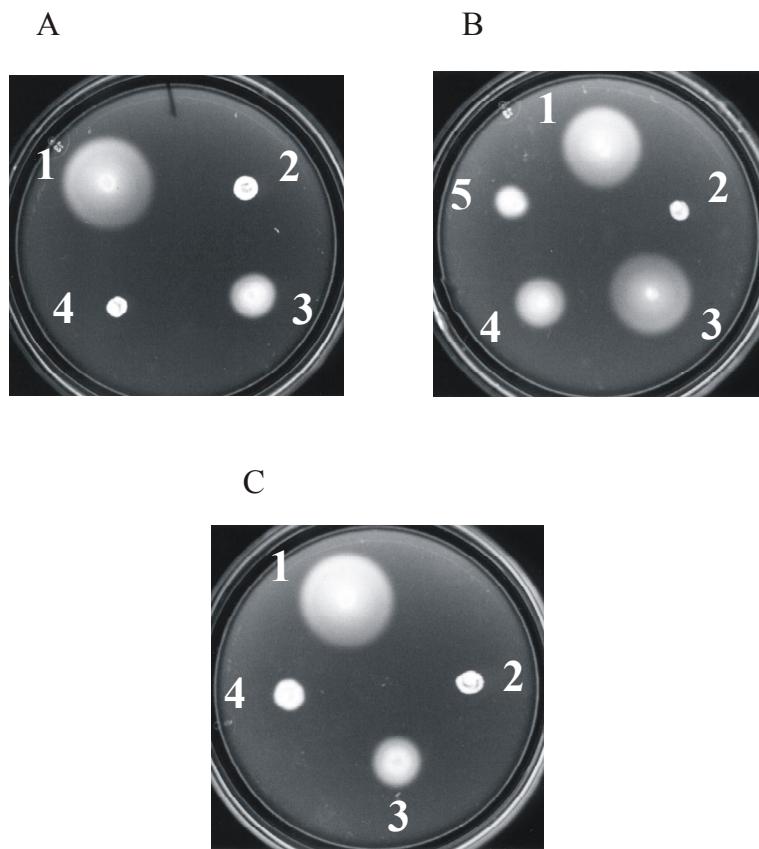


Abb.19. A: Schwärmtests von Wildtyp und drei MotA-Mutanten. 1, Wildtyp (RU11/001); 2, MotA E98K; 3, MotA R90A; 4, MotA R90A/E98Q. B: Schwärmtests von Wildtyp und vier FliG-Mutanten. 1, Wildtyp; 2, FliG R294D; 3, FliG S301D; 4, FliG D302K; 5, E300R/S301R. C: Schwärmtests von Wildtyp und drei MotA-/FliG-Doppelmutanten: 1, Wildtyp; 2, MotA-R90A/FliG-S301D; 3, MotA-R90A/FliG-S301R; 4, MotA-R90E/FliG-D302K. $3\mu\text{l}$ der untersuchten Stämme wurden mit der Mikropipette auf Bromfield-Schwärmpfatten aufgebracht und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Es ist ohne weiteres zu erkennen, daß all diese Mutationen einzeln oder in Kombination die Schwärmfähigkeit von *S.melliloti* deutlich beeinträchtigen (bis auf FliG/S301D; Abb. 19, B3). Quantitative Daten wurden durch Messungen der Schwarmhof-Durchmesser und ihre Tabellierung im Verhältnis zum wt-Schwarmhof ($=1,0$) gewonnen. Diese sind umfassend in Tab.8 zusammengestellt.

Tab. 8. Schwärzraten* der *motA*- und *fliG*-Einzel- und Doppelmutanten in *S.meliloti*, relativ zum Wildtyp gemessen

MotA-Mutation							
FliG-Mutation	WT	R90A	R90K	R90E	E98D	E98Q	E98K
WT	1,00	0,29	0,46	0,17	0,29	0,32	0,00
R277A	1,02	0,29					
R277E	0,86	0,23				0,24	0,00
R294A	0,56	0,00				0,00	0,00
R294D	0,00			0,00			
R294K	0,89						
R294V	0,00						0,00
E300A	0,94	0,35					
E300R	0,88						
S301A	1,04	0,31		0,16			
S301C	1,01			0,19			
S301D	0,99						0,08
S301K	0,97			0,18			
S301R	0,91	0,34					
S301T	1,06			0,13			
D302A	0,86			0,11			
D302E	0,97						
D302K	0,62	0,24		0,09			
N311R	1,03	0,33		0,17			
D314A	1,03						
D314R	1,01						
R294A/S301D	0,00						
R294A/D302A	0,05						
E300A/S301D	1,05	0,10		0,00		0,34	
E300A/S301R	0,81	0,29		0,25		0,24	
E300R/S301D	0,98						
E300R/S301R	0,07	0,08		0,08		0,00	0,00
S301D/D302A	0,85						
S301D/D302K	0,48						
MotA-Doppelmutanten							
R90A/E98Q	0,00						
R90A/E98D	0,18						
R90K/E98Q	0,23						

*Bromfield-Platten mit 0,3 % Agar wurden mit 3 µl einer stationären Bakterienkultur beimpft und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Der Schwärzringdurchmesser wurde bestimmt und nach Subtraktion des Animpfpunkts (7mm) auf den des Wildtyps bezogen. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte von mindestens drei Experimenten.

Die Werte geben bereits relative Hinweise auf die Schwere des jeweiligen Defekts; bei 0-Werten hat die Motorfunktion ausgesetzt (z.B. MotA/E98K; FliG/R294D oder FliG/R294A-S301D). Auch Synergismen, d.h. Verstärkungen des Defekts durch Kombination, wie im Fall von MotA/R90A-FliG/R294A, geben wichtige Hinweise. In diesen Fällen handelt es sich zweifellos um funktionell zentrale Aminosäurereste bzw. Kombinationen. Die Schwärmpfattentests waren für schnelle Mutanten-Zuordnungen gut geeignet. Jedoch mußten für genauere Aussagen zur Motorfunktion direkte Messungen der Schwimmgeschwindigkeit ohne und mit Lockstoff durchgeführt werden. Daraus waren Maße für die Rotationsgeschwindigkeit der Geißel und die Chemokinese direkt zu erhalten.

b) Messungen der Schwimmgeschwindigkeit

Dieselben Einzel- und Doppelmutationen sowie Kombinationen (Tab.8) wurden in einem zweiten Durchgang unter standardisierten Kulturbedingungen zur Motilität angezogen und im *Hobson tracker* ohne und mit Lockstoff (10 mM Prolin) auf die *instant velocity* freischwimmender Zellen hin analysiert (3.11.2.). Alle Tests wurden mit jeweils fünf Populationen schwimmender Zellen durchgeführt; es wurden jeweils 1000 Zellen erfaßt und die gemittelten Geschwindigkeiten angegeben. Die meisten Standard-Abweichungen lagen bei $\pm 5\%$, womit die Zuverlässigkeit der Werte für insgesamt 27 Einzelmutationen, 11 Doppelmutationen und 31 MotA/FliG-Kombinationen gesichert war (Tab.9).

Die Bedeutung einzelner Mutationen für die Motorfunktion ist offenbar umso größer, je stärker die Schwimmgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt wird. Das bedeutet in der aktuellen Modellvorstellung (Schmitt, 2003; Blair, 2003), daß die elektrostatische Kraftübertragung vom Stator zum Rotor durch die Mutation getroffen wurde. Die Chemokinese – und somit die Funktionsfähigkeit beim chemotaktischen Respons – wurde über die relative Geschwindigkeitserhöhung bei Lockstoffzusatz gemessen.

Tab.9. Schwimmgeschwindigkeiten ($\mu\text{m/sec}$) von *motA*- und *fliG*-Einzel- und Doppelmutanten in *S.meliloti* in Abwesenheit und Anwesenheit des Lockstoffs Prolin*

MotA-Mutation							
FliG-Mutation	WT	R90A	R90K	R90E	E98D	E98Q	E98K
WT	38,5 \pm 2,5 41,4 \pm 2,4	42,9 \pm 2,4 43,5 \pm 2,6	41,0 \pm 2,3 43,3 \pm 2,8	36,5 \pm 1,5 37,7 \pm 1,9	42,0 \pm 2,9 43,0 \pm 3,1	41,1 \pm 2,6 41,3 \pm 2,6	0,0
R277A		37,5 \pm 2,3 39,7 \pm 2,0	39,3 \pm 2,9 39,9 \pm 3,0				
R277E		35,6 \pm 2,3 38,3 \pm 2,1	37,3 \pm 2,4 38,6 \pm 1,5			38,4 \pm 1,8 39,7 \pm 2,4	0,0
R294A		28,5 \pm 1,1 31,7 \pm 1,2	0,0			0,0	0,0
R294D		0,0			0,0		
R294K		36,0 \pm 2,3 38,0 \pm 2,5					
R294V		0,0					
E300A		39,0 \pm 2,6 40,8 \pm 2,0	42,5 \pm 2,4 43,5 \pm 2,3				
E300R		34,1 \pm 1,7 36,0 \pm 2,1					
S301A		37,7 \pm 2,0 40,6 \pm 1,7	40,4 \pm 2,6 41,5 \pm 3,0		36,7 \pm 1,7 37,6 \pm 1,9		
S301C		35,9 \pm 1,7 38,5 \pm 2,0			36,0 \pm 2,3 37,0 \pm 1,8		
S301D		36,2 \pm 1,9 39,0 \pm 2,4				20,9 \pm 1,1 21,5 \pm 1,5	
S301K		34,4 \pm 2,0 37,9 \pm 1,6			36,0 \pm 2,8 38,0 \pm 3,1		
S301R		35,7 \pm 2,6 37,9 \pm 2,3	39,2 \pm 2,4 40,5 \pm 2,2				

*Fußnote auf S.63

FliG-Mutation	MotA-Mutation						E98K
	WT	R90A	R90K	R90E	E98D	E98Q	
S301T	35,5 ± 1,6 38,2 ± 1,9			35,8 ± 2,3 37,3 ± 1,7			
D302A	37,6 ± 2,0 40,0 ± 2,1				33,0 ± 1,5 34,3 ± 1,2		
D302E	38,1 ± 1,8 40,6 ± 1,8						
D302K	35,1 ± 2,2 35,9 ± 2,5	36,8 ± 2,6 37,0 ± 3,4			31,2 ± 1,6 32,5 ± 1,7		
N311R	35,8 ± 2,3 39,6 ± 2,3	41,7 ± 3,2 43,1 ± 2,6			36,3 ± 2,7 37,7 ± 1,7		
D314A	37,5 ± 2,1 40,5 ± 2,0						
D314R	38,9 ± 2,9 41,1 ± 2,1						
R294A/S301D	0,0						
R294A/D302A	21,0 ± 1,4 23,0 ± 1,1						
E300A/S301D	37,2 ± 1,4 39,8 ± 1,8	31,5 ± 1,7 34,0 ± 2,1			0,0		29,4 ± 1,6 30,5 ± 1,5
E300A/S301R	33,0 ± 1,4 35,7 ± 2,0	36,4 ± 1,8 37,9 ± 1,5			36,9 ± 3,5 40,2 ± 3,6		32,9 ± 2,3 35,0 ± 3,0
E300R/S301D	37,4 ± 1,1 39,9 ± 1,6						
E300R/S301R	23,1 ± 1,1 24,1 ± 1,1	24,9 ± 1,4 24,3 ± 1,2			28,1 ± 1,7 28,8 ± 1,7		0,0
S301D/D302A	34,0 ± 1,7 36,8 ± 1,6						
S301D/D302K	27,6 ± 1,0 30,3 ± 1,1						

*Fußnote auf S.63

MotA-Doppel-Mutanten

R90A/E98Q	$22,6 \pm 1,9$
	$22,2 \pm 1,7$
R90K/E98Q	$42,7 \pm 2,2$
	$43,0 \pm 2,2$
R90A/E98D	$42,5 \pm 1,7$
	$43,8 \pm 1,6$

*Mittlere Schwimmgeschwindigkeit. Durchschnittswerte von 1000 einzelnen gemessenen Bakterienspuren wurden in jeder Probe durch computergestützte Bewegungsanalyse bestimmt und wurden für mindestens fünf unabhängige Zellpopulationen gemittelt. Die zweite Zeile bei jeder Mutante gibt die Schwimmgeschwindigkeit in Anwesenheit von 10^{-2} M Prolin als Lockstoff an. Beispiele für Synergismen sind durch Fettdruck hervorgehoben, Beispiele für Suppression durch Fett- und Kursivdruck.

Im folgenden werden die Daten der Tab.9 nach vier Gesichtspunkten ausgewählt und besprochen:

- a) Essentielle Reste von MotA und FliG für die Kraftübertragung
- b) Neue Reste des *S.meliloti*-Motors für die Kraftübertragung
- c) Suppression durch Ladungsumkehr zwischen MotA und FliG
- d) Reste für die Chemokinese

Zu a)

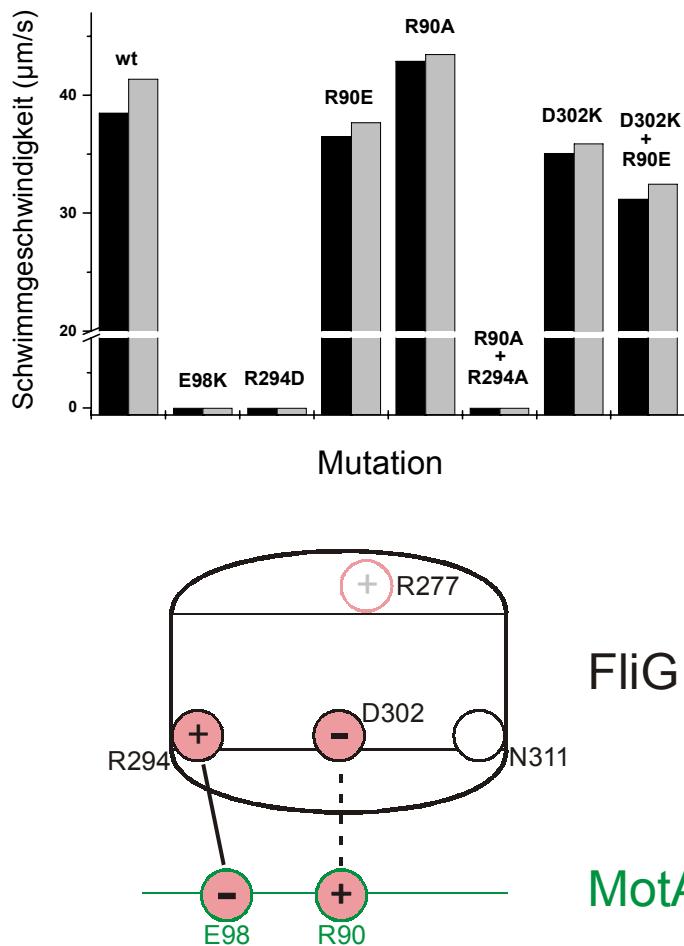


Abb.20. Oben: Histogramm der Schwimmgeschwindigkeiten ausgewählter MotA- und FliG-Mutanten. Schwarze Balken zeigen die Grundgeschwindigkeit an, graue die Schwimmgeschwindigkeit nach Lockstoffzugabe. Die fettgedruckten Zahlen und Buchstaben bezeichnen die AS-Austausche in FliG (R294A, R294D, D302K) und MotA (R90A, R90E, E98K). Unten: Modell der Interaktionen zwischen den oben erwähnten AS-Resten. Farbcode wie in Abb.19.

Coulomb-Kräfte werden durch die Wechselwirkung antagonistischer Ladungen vermittelt. Deshalb ist jede Ladungsumkehr eines fraglichen Rests ein besonders empfindlicher Test auf seine Rolle im Kraft-Transfer. Nach diesem Kriterium sind die Reste MotA/E98K und FliG/R294D am stärksten betroffen, und stellen damit das wichtigste Ladungspaar dar. Deutlich schwächere „Spieler“ sind danach MotA/R90E mit 5 % Geschwindigkeitseinbuße und D302K (FliG) mit 9 % Geschwindigkeitsreduktion (Tab.9). Die Bedeutung dieser Reste wird erst durch doppelte Ladungsumkehr MotA/R90E-FliG/D302K mit 19 % Reduktion oder in der Kombination der ungeladenen Varianten MotA/R90A-FliG/R294A deutlich (100 % Reduktion). Offenbar haben diese beiden positiven Reste auch eine

„abschirmende“ Funktion: ihr Ausfall lässt nur sich abstoßende negative Ladungen zurück (MotA/E98 und FliG/D302), was zum Stillstand führt.

Von den konservierten Ladungspartnern (die entsprechend bei *E.coli* und *T.maritima* auftreten) sind demnach für die Kraftübertragung MotA/E98 und FliG/R294 das dominante Paar. Die Ladungsträger MotA/R90 und FliG/D302 spielen eine sekundäre Rolle; sie sind aber für die Abschirmung antagonistischer Ladungen von wesentlicher Bedeutung.

Zu b)

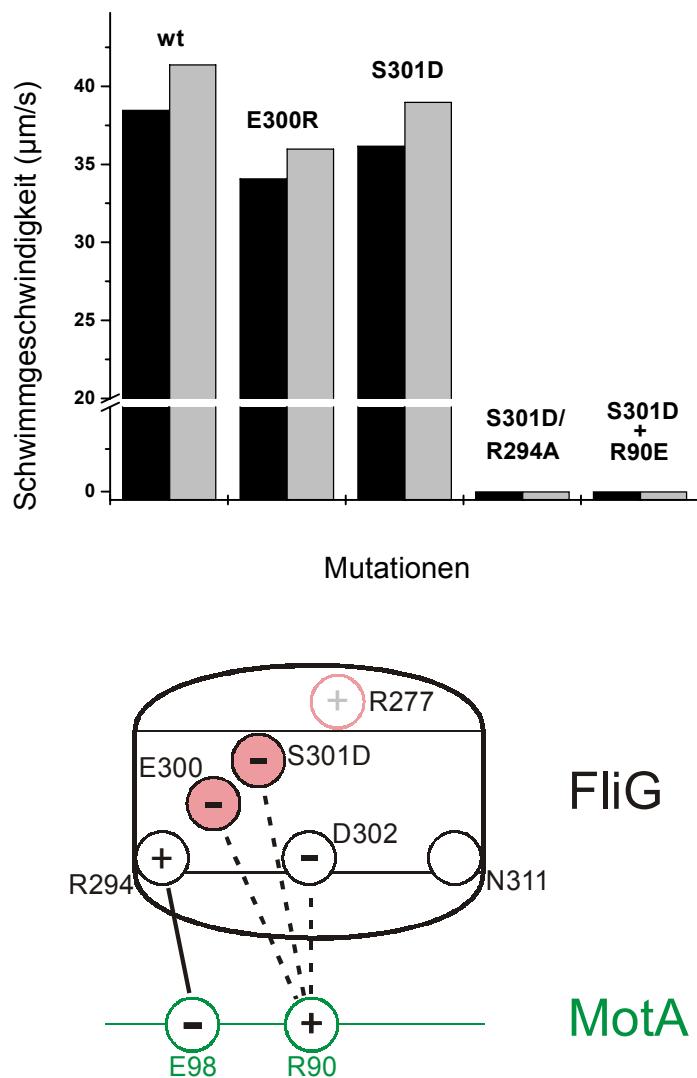


Abb.21. Oben: Histogramm der Schwimmgeschwindigkeiten ausgewählter MotA- und FliG-Mutanten. Schattierungen wie in Abb.20. Die fettgedruckten Zahlen und Buchstaben bezeichnen die AS-Austausche in FliG (R294A, E300R, S301D) und MotA (R90E). Unten: Modell der Interaktionen zwischen den genannten AS-Resten. Farbcode wie in Abb.19.

Die Rotorkomponente FliG von *S.meliloti* weist an zwei Positionen, die bei Enterobakterien geladen sind, neutrale Reste auf: S301 statt D, N311 statt R, dafür aber eine bei allen verwandten Spezies konservierte Position E300 (bei *E.coli*-ähnlichen Spezies R oder K). Bei Einführung einer *E.coli*-analogen negativen Ladung (S301D) trat eine 6 %-ige Geschwindigkeitsreduktion ein, jedoch wurde in den Kombinationen FliG/R294A/S301D bzw. FliG/S301D-MotA/R90E vollständiger Motorstillstand registriert. In beiden Fällen dürfte die Dominanz negativer Ladungen und deren abstoßende Wirkung zum Funktionsverlust führen. FliG/S301 hat folglich auch bei *S.meliloti* eine Position an der Kontaktfläche zwischen MotA und FliG inne.

Die Bedeutung des *S.meliloti*-spezifischen negativ geladenen Restes FliG/E300 wurde zunächst durch Ladungsumkehr E300R sichtbar gemacht. Es trat eine 12 %-ige Geschwindigkeitsreduktion ein (Tab.9). Die Rolle dieses neuen Restes bei Suppression und Chemokinesis wird unter c) und d) erläutert. Schließlich bleibt als Novität die Neutralisierung des bei *E.coli* geladenen Restes an der Position FliG/N311. Die Wiedereinführung einer positiven Ladung (N311R) an dieser Stelle reduzierte die Geschwindigkeit nur um 7 %, aber die Chemokinese wurde von 7 % (wt) auf 10 % verstärkt. Möglicherweise resultiert eine schwach abstoßende Wechselwirkung von FliG/N311R und MotA/R90 in einer Verlangsamung der Grundgeschwindigkeit.

Zu c)

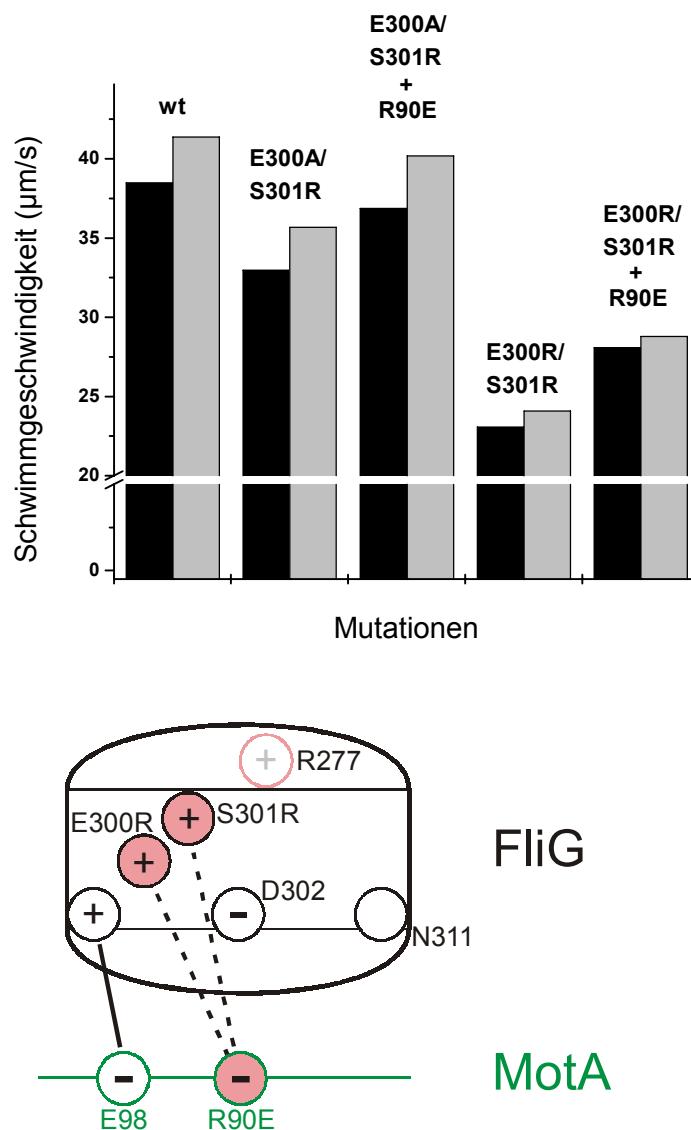


Abb.22. Oben: Histogramm der Schwimmgeschwindigkeiten ausgewählter MotA- und FliG-Mutanten. Schattierungen wie in Abb.20. Die fettgedruckten Zahlen und Buchstaben bezeichnen die AS-Austausche in FliG (E300A, E300R, S301R) und MotA (R90E). Unten: Modell der Interaktionen zwischen den oben erwähnten AS-Resten. Farbcode wie in Abb.19.

Suppression, d.h. die (teilweise) Aufhebung eines genetischen Defekts durch einen zweiten weist auf ihre mögliche Funktion hin. Zwei MotA/FliG-Mutations-Kombinationen resultieren tatsächlich in Suppression (Tab.9): Die Kombination von FliG/E300A/S301R mit MotA/R90E führt zu einer Erhöhung der Grundgeschwindigkeit um 11 %. Ein ähnliches Resultat von 12 % Geschwindigkeitszunahme (bei deutlich erniedriger Grundgeschwindigkeit) wird bei Kombination von FliG/E300R/S301R mit MotA/R90E erzielt. In beiden Fällen wurden durch Umkehr der Ladungen in Rotor und Stator Effekte

der Einzelmutationen teilweise aufgehoben. Daraus ist zu folgern, daß MotA/R90 und FliG/E300/S301 in Wechselwirkung stehen und daß es sich bei diesen um eine elektrostatische Interaktion handelt.

Zu d)

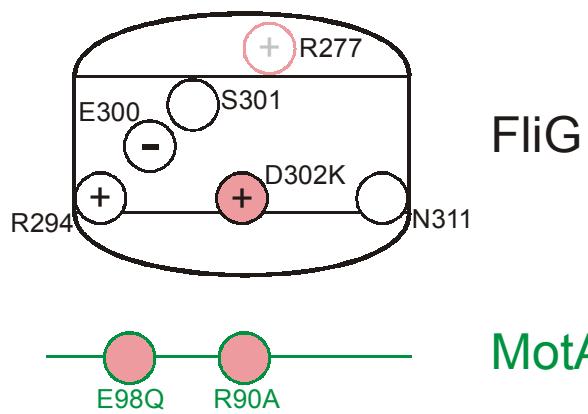
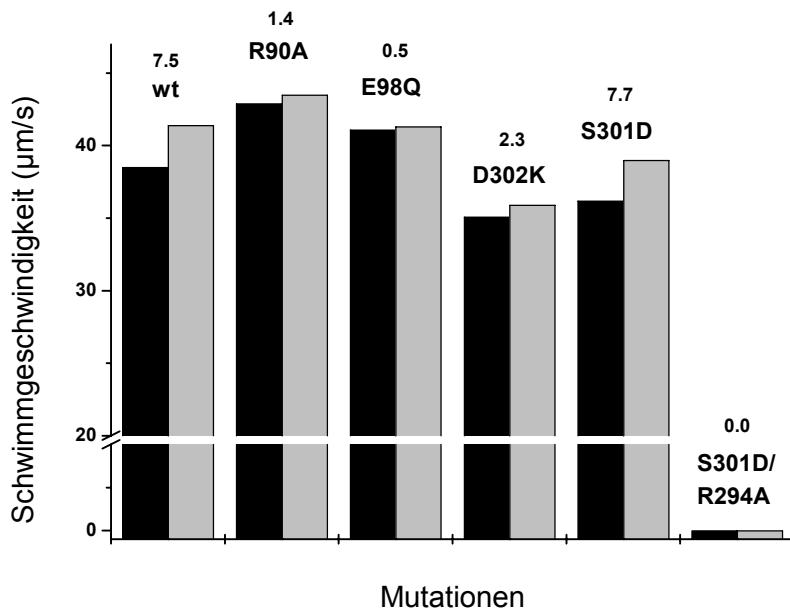


Abb.23. Oben. Histogramm der Schwimmgeschwindigkeiten ausgewählter MotA- und FliG-Mutanten. Schattierungen wie in Abb.20. Die Zahlen bezeichnen die prozentuale Geschwindigkeitszunahme nach Lockstoffzugabe. Die fettgedruckten Zahlen und Buchstaben bezeichnen die AS-Austausche in FliG (R294A, S301D, D302K) und MotA (R90A, E98Q). Unten: Modell der aufgrund der Mutationen aufgehobenen Interaktionen zwischen den oben erwähnten AS-Resten. Farocode wie in Abb.19.

Chemokinesis, d.h. Geschwindigkeitserhöhung der rotierenden Flagellen bei Lockstoffzusatz, ist eine Besonderheit des einsinnig rotierenden *S.meliloti*-Motors. Mutationen, die diesen Respons auf ein positives Signal aufheben, sollten Hinweise auf den Mechanismus der kontrollierten Geschwindigkeitsvariation geben. Solche Mutationen gibt es sowohl auf Seiten des Stators (MotA) als auch auf Seiten des Rotors (FliG). Eine weitgehende Aufhebung der Chemokinesis trat auf bei Mutationen, die eine der beiden konservierten Ladungen von MotA neutralisieren: R90A (Geschwindigkeit-Differenz 1,4 statt 7,5 % beim wt) und E98Q (Geschwindigkeitsdifferenz 0,5 %). Beide Mutanten „liefen“ auf maximaler Geschwindigkeit.

Daraus folgt, daß von den zwei geladenen MotA-Resten R90 und E98 einer für den Antrieb reicht, aber beide Reste für die Variation der Rotationsgeschwindigkeit (Bremse) gebraucht werden.

Auf Seiten von FliG spielte der negativ geladene Rest D302 eine vergleichbare Rolle. Die Mutante D302K wies eine Geschwindigkeitsvariation von nur 2 % auf. Daraus wurde ein Konzept abgeleitet, das die kombinierte Wirkung von anziehenden und abstoßenden elektrostatischen Interaktionen für das Abbremsen der Flagellenrotation postuliert, während zwei Paare entgegengesetzter (sich anziehender) Ladungen, oder auch ein Paar alleine, zur vollen Rotationsgeschwindigkeit führen. Auf welche Weise diese alternativen Kombinationen an der MotA-FliG-Kontaktfläche miteinander wechselwirkenden Coulomb-Kräfte durch Konformationswechsel von FliG miteinander in Kontakt kommen können, wird im Diskussionsteil (5.) erörtert.

4.3.5. Zur *in vivo*-Stabilität mutierter FliG-Proteine

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß der Austausch einzelner AS-Reste die Struktur von FliG verzerren könnte und verändertes Protein abgebaut wird. Daher wurden diejenigen Mutanten, die einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zeigten, auf die vorhandenen FliG-Mengen getestet. Sobald ein anti-FliG-Antikörper verfügbar war (B.Scharf, pers. Mitt.), wurden *Western blot* Analysen der Mutantenproteine durchgeführt. Zellextrakte des Wildtyps und von 14 FliG-Einzel- und Doppelmutanten, die eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Schwarm- und Schwimmfähigkeit aufwiesen, wurden

elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran übertragen und mit dem Antikörper inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb.24 gezeigt.

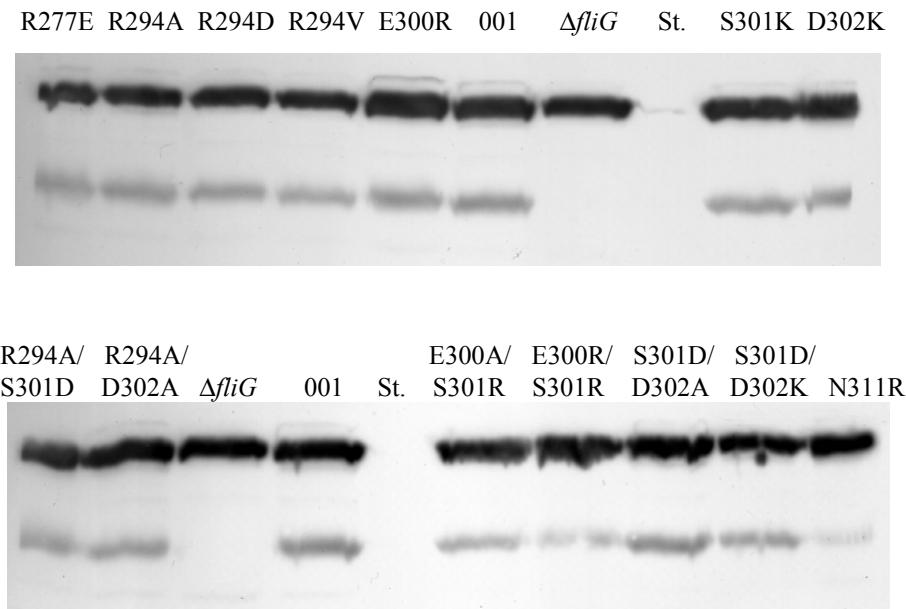


Abb.24. *Western blot* zum quantitativen Nachweis der Expression der veränderten FliG-Proteine. Gleiche Mengen an Zellextrakten (3.9.1.) wurden in einem 10 % Acrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit einem anti-FliG-Antikörper inkubiert. Diejenigen Mutanten, die gegenüber dem Wildtyp einen veränderten Phänotyp aufweisen, sind mit diesem und der Gesamt-Deletionsmutante $\Delta fliG$ (RU13/054) aufgetragen. St.: Größenstandard.

Die langsamer laufende Bande röhrt von einer unspezifischen Kreuzreaktion her, die schnell-laufende ist das von FliG hervorgerufene Signal. Es war zu erkennen, daß fast alle getesteten Mutanten FliG-Mengen ähnlich denen des Wildtyps aufwiesen. Lediglich die Mutante E300A/S301R wies geringfügig weniger FliG, die Mutante E300R/S301R wesentlich weniger FliG als der Wildtyp auf. Die FliG/E300/S301-Mutanten sind jedoch durch Mutationen in MotA supprimierbar, so daß der Effekt der Mutationen zumindest nicht alleine durch ein Mengenproblem begründet werden kann. Die Mutante FliG/N311R wies einen gegenüber dem Wildtyp geringfügig veränderten Phänotyp auf, der möglicherweise durch eine Unterversorgung der Flagelle mit FliG-Molekülen verursacht wurde.

4.4. Herstellung und Charakterisierung einer *fliF-fliG*-Fusionsmutante

Es ist durch Arbeiten mit den *E.coli*-Motorproteinen FliG und FliF bekannt, daß

- sie in 1:1 Stöchometrie im Flagellenmotor mit 26 ± 2 Kopien auftreten (Jones & Macnab, 1990; Sosinsky *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1999);
- die beiden Proteine in enger Assoziation stehen (MS-Ring-/C-Ring-Verbindung; Francis *et al.*, 1992) und
- bestimmte FliF-FliG-Fusionsmutanten noch eingeschränkt funktionieren (Thomas *et al.*, 2001).

Bei *E.coli* zeigte eine FliF-FliG-Fusionsmutante, welcher die fünf C-terminalen AS-Reste von FliF fehlten, die aber ein zusätzlich eingefügtes Isoleucin enthielt, ein nach *cw* verschobenes Rotationsmuster. Eine Fusionsmutante, welcher 56 C-terminale FliF-Reste und 94 N-terminale FliG-Reste fehlten, zeigte ein nach *ccw* verschobenes Rotationsverhalten (Francis *et al.*, 1992). Die Domänenanordnung von FliG hat offenbar durch die Fusion mit FliF ihre notwendige Beweglichkeit eingebüßt.

Andererseits sind Konformationsänderungen der C-terminalen Domäne von FliG für den „switch“ des Rotationssinns bei *E.coli* und vermutlich für die Chemotaxis bei *S.meliloti* (s. 4.3.) erforderlich. Bindet eine N-terminale Fusion FliG so eng an FliF, daß diese Konformationswechsel nicht mehr (oder nur eingeschränkt) möglich sind? Zur möglichen experimentellen Klärung dieser Frage wurde hier eine Fusion der 3'-Region von *fliF* mit *fliG* (*tail to head*) von *S.meliloti* rekombinant hergestellt und in den natürlichen Genlocus von *fliF* einer $\Delta fliG$ -Mutante rekombiniert. Das Vorgehen ist in Abb.25 dargestellt.

Mit Hilfe des mobilisierbaren Vektors pK18mobsacB wurde das Fusionskonstrukt in die *fliG*-Deletionsmutante eingebracht, die 3'-Region mittels Allelenaustausch durch nachfolgendes *fliF* ersetzt. Einen Hinweis auf erfolgreiche Integration von *fliG* lieferte die Beobachtung des Schwärm- und Schwimmverhaltens; einige potentielle Mutanten waren im Gegensatz zur *fliG*-Deletionsmutante in der Lage, Schwärmlinge auszubilden. Mögliche Kandidaten wurden mittels *Southern blot* auf Vorhandensein und Größe einer mit der *fliG*-Sequenz hybridisierenden Bande getestet. Die Ergebnisse sind in Abb.26 gezeigt. Die Mutanten 2/13, 2/17, 3/3 und 3/11, die noch beweglich waren, enthielten das mit der *fliG*-Sonde hybridisierende *fliF-fliG*-Restriktionsfragment in der für die Fusion errechneten Größe von 5,1kb.

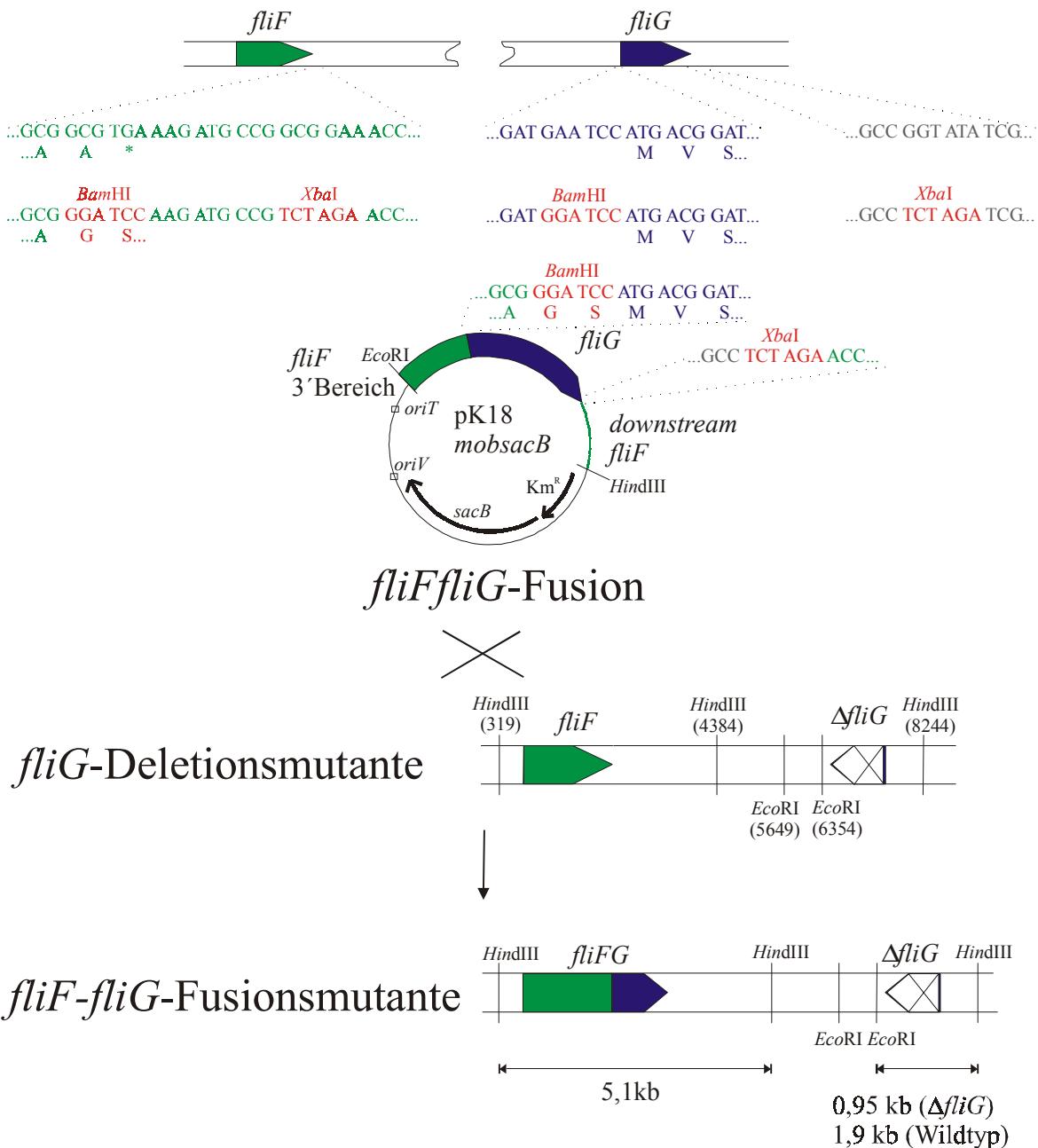


Abb.25. Herstellung einer *fliF-fliG*-Fusionsmutante. Oben: Relevante Teile der Originalsequenz des Wildtyps, darunter die im PCR-Konstrukt veränderten Nukleotide und die abgeleiteten AS-Folgen. Die eingeführten *BamHI*- und *XbaI*-Schnittstellen sind rot markiert. Grüne bzw. blaue Pfeile symbolisieren jeweils *fliF*- und *fliG*-Sequenzen. Das PCR-Konstrukt wurde über die markierten *EcoRI-HindIII*-Restriktionsschnittstellen in den mobilisierbaren Vektor pK18mobsacB eingebracht. Abkürzungen: *Km^R*: Kanamycin-Resistenz; *sacB*: Levan-Saccharase-Gen; *oriV*: vegetativer Replikationsstartpunkt; *oriT*: Replikationsstartpunkt bei der konjugativen Übertragung. Das Plasmid wurde in die *fliG*-Deletionsmutante eingebracht, symbolisiert durch ein Schrägkreuz. Die Genorte von *fliF* und *ΔfliG* in der Deletionsmutante sind durch einen grünen Pfeil bzw. durch einen Pfeil mit einem Kreuz als Symbol für die Deletion dargestellt. Die Positionen der angegebenen *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen sind auf die Sequenz nach Platzer *et al.* (1997) bezogen. In der schematischen Übersicht der Fusionsmutante ist das gekoppelte *fliF-fliG*-Gen durch einen grün-blauen Pfeil dargestellt. Die Größe der zu erwartenen, mit einer *fliG*-Sonde im *Southern blot* hybridisierenden Bande ist durch horizontale Linien gekennzeichnet.

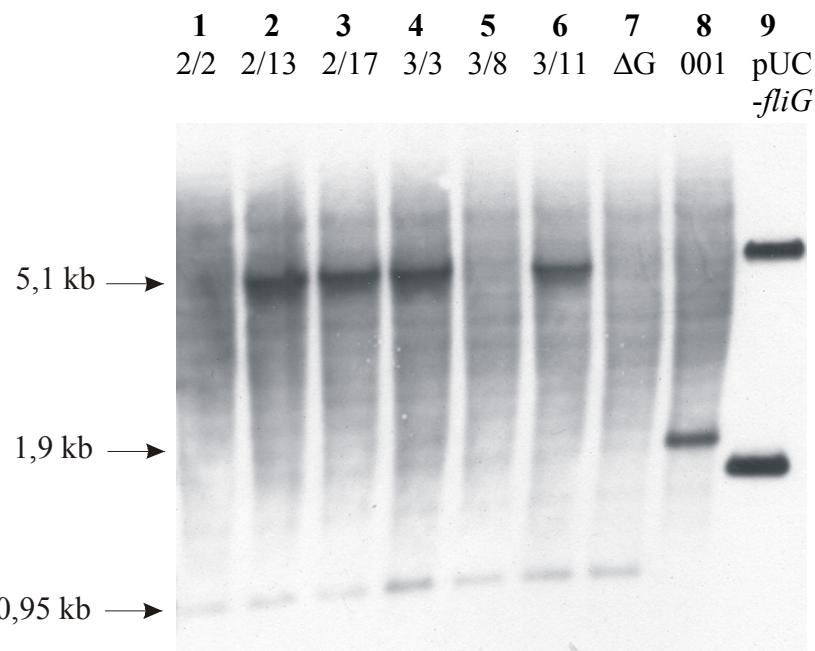


Abb.26. *Southern blot* zum Nachweis der *fliF-fliG*-Fusion. Es wurde ein *Eco*RI / *Hind*III Doppelverdau der genomischen DNA durchgeführt, als Sonde wurde *fliG* verwendet. Spuren 1-6: potentielle Mutanten; 7, Deletionsmutante $\Delta fliG$; 8, Wildtyp RU11/001; 9, Plasmid pUCBM20 mit *fliG* (pRU2679).

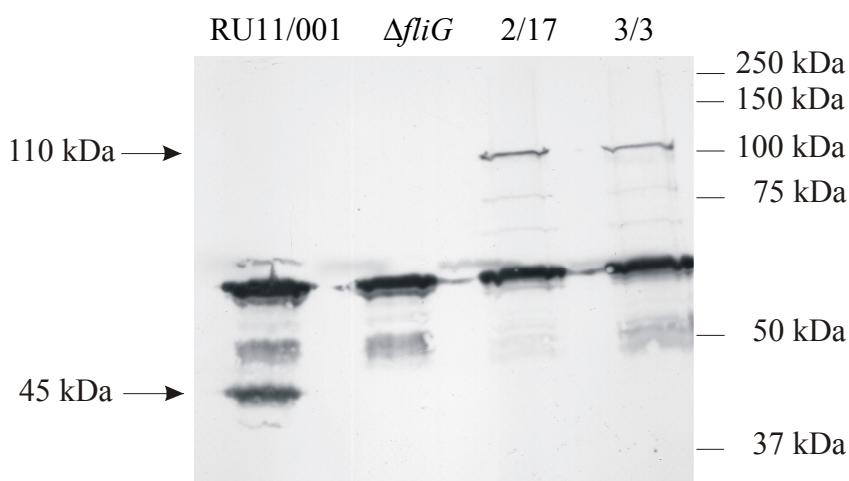


Abb.27. *Western blot* zum Nachweis der Expression des FliF-FliG-Fusionsproteins. Gleiche Mengen an Zellextrakten wurden in einem 7,5 % Acrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit einem anti-FliG-Antikörper inkubiert.

Diese Stämme zeigen die Randbereiche des deletierten *fliG* (0,95 kb) und zusätzlich eine 5,1 kb-Bande, welche die erfolgreiche Fusion der Gene *fliF* und *fliG* dokumentiert, RU11/001 zeigt die Bande von wt-*fliG* bei 1,9 kb.

Ferner war zu verifizieren, daß das Fusionsprotein korrekt synthetisiert wurde und nicht eine Reinitiation der Translation am erhaltenen gebliebenen Methionin-Startcodon von FliG erfolgte, oder daß das Protein durch eine Protease gespalten wird. Daher wurden zwei der isolierten Klone, 2/17 und 3/3, per *Western blot* überprüft. Das Ergebnis ist in Abb.27 zu sehen.

FliG wurde im Wildtyp mit einem apparenten Molekulargewicht von 45 kDa (theoretisch 38 kDa) detektiert. Diese Bande fehlte in der Fusionsmutante, statt dessen war eine Bande von etwa 110 kDa zu sehen, als deutliches Indiz für die Präsenz des Fusionsproteins. FliF besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 61 kDa; es war daher davon auszugehen, daß das Signal (61 + „45“ kDa) auf dem Röntgenfilm von dem FliF-FliG-Fusionsprotein stammte. Die schwache Intensität der Bande im Vergleich zum wt-FliG ist vermutlich eine Folge der schlechteren Übertragung des größeren Proteins auf die Nitrocellulosemembran. Die Mutante 3/3 wurde weiter charakterisiert. Der Schwärmring auf Bromfield-Platten war im Durchmesser gegenüber dem des Wildtyps um 14 % reduziert (Abb.28).

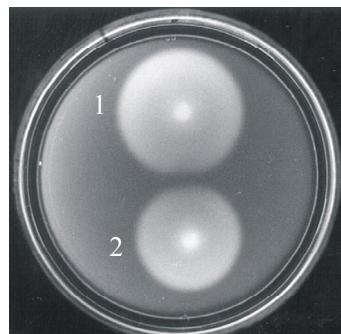


Abb.28: Phänotyp der *fliF-fliG*-Fusionsmutante. 1, Wildtyp; 2, *fliF-fliG*-Fusionsmutante. Untersuchte Stämme wurden mit der Mikropipette auf Bromfield-Schwärmlatten aufgebracht und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Tab.10. Schwärmringdurchmesser und Schwimmgeschwindigkeit der *fliF-fliG*-Fusionsmutante im Vergleich zum Wildtyp:

Stamm	Schwärmring-durchmesser (%) ¹	Schwimmgeschwin-digkeit ohne Prolin ($\mu\text{m}/\text{s}$) ²	Schwimmgeschwin-digkeit mit Prolin ($\mu\text{m}/\text{s}$) ²
RU11/001	100	$38,5 \pm 2,5$	$41,4 \pm 2,4$
<i>fliF-fliG</i> -Fusions-mutante (RU11/991)	86 ± 6	$37,7 \pm 1,2$	$39,4 \pm 2,8$

¹ Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten

² Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten

Ferner wurden Messungen der Schwimmgeschwindigkeit (3.11.2.) durchgeführt. Wie Tab.10 zeigt, wurden eine 2 %-ige Abnahme der (gebremsten) Grundgeschwindigkeit und eine 4,8 %-ige Reduktion der Lockstoff-stimulierten Schwimmgeschwindigkeit festgestellt. Mit anderen Worten: Die Geschwindigkeits-Varianz (Chemokinesis) wurde von 7,5 % (wt) auf 4,8 % (*fliF-fliG*-Fusion) reduziert. Daraus ist (auch bei N-terminaler Fusion) auf eine verringerte Fähigkeit der C-terminalen Domäne von FliG zum vollständigen Konformationswechsel bei Stimulation zu schließen.

5. Diskussion

Anders als beim bekannten enterobakteriellen Modell – (Rotationsumkehr des Flagellenmotors) rotieren die Flagellen von *Sinorhizobium meliloti* – als Prototyp für viele α-Proteobakterien – ausschließlich im Uhrzeigersinn. Richtungsänderungen schwimmender Zellen werden durch asynchrone Verlangsamung einzelner rotierender Geißeln erreicht, wodurch das geordnete Geißelbündel auseinanderfliegt (Schmitt, 2002; Scharf, 2002). Die Fähigkeit zur Chemokinesis wird durch den Responsregulator CheY2, die neuen Motilitätsproteine MotC, MotD und MotE, sowie letztlich durch die Art und Weise reguliert, in der Ladungen an der Kontaktfläche von MotA und FliG elektrostatisch miteinander wechselwirken. Eigenschaften des MotC-Proteins und vor allem die Ladungsinteraktionen wurden hier ausgiebig analysiert und die Ergebnisse zu einem Modell verdichtet.

5.1. Orthologe Gene von *Rhizobium lupini* H13-3 und ihre Anordnung im *flagellar regulon*

Neuisolierte Gene von *R.lupini* H13-3 wurden sequenziert und mit vorhandenen Daten der NCBI-Genbank verglichen. Es zeigte sich, daß die Anordnung der Gesamtsequenz von *motA* bis *motD* (Abb.11) identisch war mit der von *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner *et al.*, 2001). Die Reihenfolge der Gene *motA*, *fliM*, *fliN*, *fliG*, *fliB* und *orf14* ist identisch mit jener von *S.meliloti*, bei beiden Bakterienarten folgen auch *orf38*, *motB*, *motC* und *motD* aufeinander. Im Vergleich zu *S.meliloti* und *M.loti* (Kaneko *et al.*, 2000) fand eine Translokation und Inversion der Gene *motA*, *fliM*, *fliN*, *fliG*, *fliB* und *orf14* statt; die Promotoren blieben bei der Umstrukturierung erhalten (Scharf *et al.*, 2001; Abb.11).

Bereits der Sequenzvergleich der Flagellingene hatte auf eine verwandtschaftliche Einordnung von *R.lupini* näher bei *A.tumefaciens* als bei *S.meliloti* hingedeutet (Scharf *et al.*, 2001). Vergleiche von MotC, MotA und FliG von *R.lupini* H13-3 mit den orthologen Sequenzen von *S.meliloti* und *A.tumefaciens* (Tab.11) bestätigt diese Einschätzung.

Tab.11. Vergleich¹⁾ der MotC, MotA und FliG-Gene von *R.lupini* H13-3 (100 %) mit den orthologen Genen von *S.meliloti* und *A.tumefaciens*

	Identität (%)		Ähnlichkeit (%)	
	<i>S.meliloti</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>S.meliloti</i>	<i>A.tumefaciens</i>
<i>R.lupini</i>				
MotC	50	88	58	91
MotA	83	99	89	100
FliG	67	98	77	99

¹⁾ Vergleiche mittels GCG-Programm (Wisconsin Package)

Der Vergleich zeigt eine 88-98 %-ige Identität der *R.lupini*-Proteine zu denen von *A.tumefaciens*, aber nur 50-83 %-ige Identität zu denen von *S.meliloti*. Der Stammbaum (GCG-Programm, Wisconsin Package) gibt für alle drei Proteine eine verwandtschaftliche Mittelstellung für *A.tumefaciens* zwischen *R.lupini* und *S.meliloti* an, mit einer engeren Verwandtschaft zwischen *A.tumefaciens* und *R.lupini*. Dem entspricht die Klassifizierung anhand von 16S rRNA-Sequenzvergleichen (B.Scharf, pers. Mitt.).

Die Variabilität in den Sequenzen von *S.meliloti* einerseits und *A.tumefaciens* und *R.lupini* andererseits, und auch von *M.loti* (Tab.5), ist bei ähnlichem Antriebsmodus hilfreich zur Auffindung konservierter Bereiche. Entsprechende Genregionen können mutiert werden, der Phänotyp der resultierenden Mutantenstämme kann untersucht und mit dem des Wildtyps verglichen werden; dies kann die Zuordnung von Funktionen erleichtern.

Zu *E.coli* mit einem phylogenetischen Abstand von mehr als 500 Millionen Jahren (Ochman & Wilson, 1987) bestehen dagegen deutliche Unterschiede in der Genanordnung. Gene, die bei der einen Gruppe aneinander gekoppelt vorliegen, sind bei der anderen weit voneinander entfernt lokalisiert. Es ist denkbar, daß der unterschiedliche Bewegungsmodus eine andere relative Stöchiometrie von beteiligten Komponenten erfordert – z.B. liegen *motA* und *motB* im selben Operon, während sie bei *S.meliloti* getrennt transkribiert werden. Dagegen ist *motB* mit den neuen Genen *motC* und *motD* genetisch und translational gekoppelt, was deren Bedeutung für die variable Rotationsgeschwindigkeit unterstreicht.

5.2. Domänen und Funktionen von MotC

Dem MotC-Protein wird eine Rolle bei der Regulation der variablen Geißelrotation zugeschrieben (Platzer *et al.*, 1997; Attmannspacher, 1999). Das stöchiometrische Verhältnis von MotC zu MotB von ~1:1 (Halbach, 2003) ist offenbar entscheidend für die Funktion des Kanals. Eine Mutation, die zur reduzierten MotC-Produktion führte, hatte massiven Einfluß auf die Geißelrotation: diese drehten langsam und asynchron (Platzer *et al.*, 1997). MotC könnte daher den Protonenfluß und damit die Energieversorgung regulieren (Platzer *et al.*, 1997). Warum wird MotC essentiell gebraucht? Denkbar wäre seine Funktion als Protonenfänger für den MotA-MotB-Protonenkanal. Tatsächlich ist *S.meliloti* bei erhöhtem pH im Medium gegenüber *E.coli*-Zellen im Vorteil (4.2.2.); *S.meliloti*-Zellen sind bei pH 9,5 noch motil, *E.coli*-Zellen nur bis pH 9,0.

Die Assoziation von MotC mit der Cytoplasmamembran (Halbach, 2003) spricht für eine mögliche Funktion als Sensor von *pmf* oder des Membranpotentials ($\Delta\psi$). Diesen Überlegungen wird jetzt mit gezielten Substitutionen in MotC nachgegangen. Eine Beeinträchtigung der Motilität bei pH-Erhöhung könnte auch in der unterschiedlichen Struktur der Flagellenfilamente von *E.coli* und *S.meliloti* begründet liegen. Untersuchungen mit *R.lupini* H13-3 haben gezeigt, daß die Flagellen bei pH 8-10 die *semicoiled* Konformation einnahmen, bei pH 11 dann eine *straight* Konformation (Scharf, 2002). Derartige Konformationsänderungen haben zweifelohne eine Verlangsamung der Schwimmgescheindigkeit zur Folge. Diesem Einwand könnte man mittels *tethering* Experimenten begegnen, welche die Motorrotation einzelner Flagellen direkt messen (Silverman & Simon, 1974).

In der Struktur des MotC-Proteins konnte durch Sequenzvergleiche eine grobe Domäneneinteilung erkannt werden. Diese ist in Abb.29 veranschaulicht. Eine N-terminale Domäne (~AS-Reste 35-254) ist wichtig für die Interaktion mit dem Chaperon MotE. Zwei in der C-terminalen Region gelegene Bereiche wechselwirken mit dem Kanalprotein MotB (~AS-Reste 295-354 und 415-433). Zwischen den beiden MotB-Bindestellen befindet sich ein flexibler Linker (~AS-Reste 355-414).

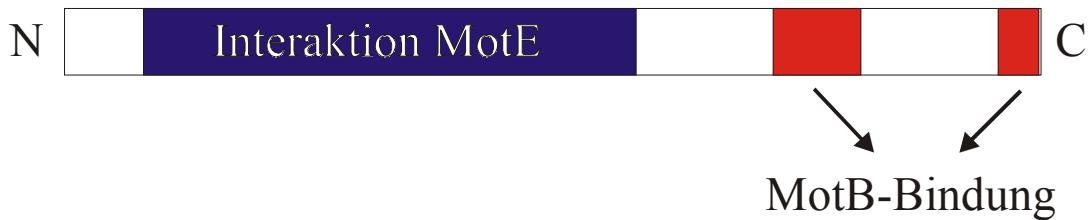


Abb.29. Postulierte Domäneneinteilung für das MotC-Protein. N, C: N- und C-terminales Ende. Blau: für die Interaktion mit dem Chaperon MotE wichtiger Bereich. Rot: MotB-Bindedomänen.

MotC ist als periplasmatisches Protein sehr empfindlich gegenüber Abbau. Die Deletion von *motE* führt zum Verlust von MotC im Periplasma (Eggenhofer *et al.*, 2004). Die Deletionsanalyse von MotC ergab, daß MotC-Proteine, die im N-terminalen Bereich (AS-Reste 35-254) um jeweils 20 AS-Reste verkürzt sind, instabil waren (Abb.14) und zum beinahe oder vollständig paralysierten Phänotyp führten (Abb.15). Die N-terminale Region wird daher als wichtig für die Interaktion mit dem Chaperon angenommen.

Essentiell für die Motorfunktion ist die MotC-Wechselwirkung mit dem Kanalprotein MotB (Platzer *et al.*, 1997). *Two-hybrid* Analysen hatten eine Bindung der C-terminalen AS-Reste 343 bis 434 an MotB gezeigt (Haslbeck, 1997). Ein rekombinant exprimiertes MotC-Protein, dem diese C-terminalen Region fehlte, konnte in Affinitätsblots aber noch mit MotB interagieren (Halbach, 2003). Verkürzungen um je 20 AS-Reste in den Bereichen der Positionen 315 bis 354 und 415 bis 433 hatten eine Reduktion der Schwimmgeschwindigkeit um 40-60 % zur Folge, die Proteine sind aber, zumindest bei Deletionen im Bereich der Positionen 315 bis 354, relativ stabil (~55 % im Vergleich zum Wildtyp, Abb.14). Die veränderten Proteine sind zwar im Periplasma vorhanden, können dort aber offenbar nicht an den Protonenkanal assoziieren.

Das MotC-Protein ist gegenüber Verkürzungen um 20 AS-Reste im Bereich 355 bis 414 tolerant, die Mutanten weisen eine Reduktion der Schwimmgeschwindigkeit maximal um 15 % auf. Eine Verkürzung um alle 60 AS-Reste führt zu einer Reduktion der Schwimmgeschwindigkeit um 26 % (Attmannspacher, 1999). Diese Region ist als einzige neben dem Signalpeptid bei den MotC-Proteinen von *S.meliloti*, *R.lupini*, *A.tumefaciens* und *M.loti* wenig konserviert, auch die Länge ist variabel (Abb.12). Sie wird daher als flexible Verbindung zwischen den beiden MotB-Bindebereichen angesehen.

Es müssen weitere genetische und biochemische Tests durchgeführt werden, um Struktur und Funktion dieses neuartigen Proteins genauer aufklären zu können.

5.3. Wechselwirkungen an der Stator-Rotor-Kontaktfläche

Aktuelle Modellvorstellungen gehen davon aus, daß die Umwandlung der elektrochemischen in kinetische Energie bereits im Stator erfolgt. Das *helix rotation model* von Schmitt (2003) postuliert, daß der Protonenfluß reversible Rotationsbewegungen der fünf Transmembranhelices der Kanalproteine MotA und MotB verursacht und daß diese über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ladungsantipoden in MotA und FliG auf den Rotor übertragen werden.

Die Bedeutung geladener Reste an der MotA-FliG-Kontaktfläche von *S.meliloti* wurde durch AS-Austausche im Statorprotein MotA und dem Rotorprotein FliG analysiert. Im Vergleich mit *E.coli* sind bei *S.meliloti* die beiden MotA-Reste Arg90 und Glu98 konserviert, ferner die FliG-Reste Arg294 und Asp302 (Abb.18). Zusätzlich zu diesen auch im orthologen *E.coli*-Protein konservierten Resten wurde Glu300 (FliG) mutiert.

5.3.1. Natur der Wechselwirkungen

Von den fünf relevanten geladenen Resten von *E.coli*-FliG sind bei *S.meliloti* drei analoge Reste essentiell für die Motorrotation (Arg283, Asp290 und Glu291), zwei weitere (Lys266 und Arg299) sind von nachrangiger Bedeutung (Lloyd & Blair, 1997; Zhou *et al.*, 1998). Röntgen-Strukturdaten der C-terminalen Domäne von FliG von *Thermotoga maritima* wiesen auf die Anordnung dieser geladenen Reste, die mit MotA wechselwirken, in der Kontaktfläche hin. Es wurde postuliert, daß zwei verschieden orientierte Subgruppen geladener AS-Reste separat mit MotA interagieren und so den Rotor *ccw* bzw. *cw* rotieren lassen (Abb.18; Lloyd *et al.*, 1999). Die entsprechende Konfiguration im FliG-Protein von *S.meliloti* enthält Arg294 und Asp302, jedoch das ungeladene Ser301 (statt Asp) in der zweiten Konfiguration. Man kann vermuten, daß dies die „Schiene“ für den (nicht existenten) reversen Rotationsmodus wäre.

Das Auftreten von Suppressormutanten bei Ladungsinversion in einem Ladungspaar ist ein starkes Indiz für elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen AS-Resten als Medium der Kraftübertragung vom Stator auf den Rotor. Die Mutante FliG/E300A/S301R weist eine Schwimmgeschwindigkeit von 33 $\mu\text{m}/\text{s}$ auf, die Tripelmutante FliG/

E300A/S301R-MotA/R90E zeigt jedoch mit 37 $\mu\text{m/s}$ eine gegenüber der FliG-Doppelmutante um 12 % erhöhte Schwimmgeschwindigkeit.

Auch die deutlich in ihrer Bewegungsfähigkeit eingeschränkte Doppelmutante FliG/E300R/S301R (23 $\mu\text{m/s}$) ließ sich durch MotA/R90E supprimieren (Schwimmgeschwindigkeit der Tripelmutante um 22 % erhöht; 28 $\mu\text{m/s}$). Diese Suppressormutanten zeigen, daß wie bei *E.coli*, auch bei *S.meliloti*, die Kraft vom Stator auf den Rotor mittels elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen geladenen AS-Resten übertragen wird.

Die wichtigsten Partner für den Transfer der Kraft sind FliG/R294 und MotA/E98 (Abb.20). Die Wechselwirkung zwischen diesen Resten ist offenbar sehr stark und wegen des nötigen geringen Abstands ($\leq 4,8 \text{ \AA}$) der Ladungspartner auch von der exakten Struktur und „Einpassung“ der AS-Reste abhängig. Schon ein Austausch Arg294Val führt zum Stillstand, genau wie eine Ladungsumkehr dieses Restes (Arg294Asp; Tab.9).

5.3.2. Chemokinesis

Die Geißeln von *S.meliloti* rotieren nur im Uhrzeigersinn, die Rotationsgeschwindigkeit kann als Reaktion auf chemische Reize variiert werden (Chemokinesis). Das gleichzeitige Vorhandensein **beider** untersuchter MotA-Reste, Arg90 und Glu98, ist für die Chemokinesis entscheidend (Abb.23). Die Neutralisierung eines der beiden Reste führt bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit zum beinahe vollständigen Verlust der Chemokinese. Während beim Wildtyp nach Lockstoffzugabe die Schwimmgeschwindigkeit um 7,5 % zunimmt, sinkt dieser Wert bei MotA/Arg90Ala auf 1,4 % und bei Glu98Gln auf 0,5 % (Tab.9). Auch Mutationen an einer der beiden Positionen, bei denen die Ladung erhalten blieb, zeigten bei hoher Geschwindigkeit geringere Chemokinesis: Arg90Lys 5,6 %, Glu98Asp 2,4 %). Die Länge der Seitenketten muß auch hier genau passen, wenn die Oberfläche des Interaktionspartners FliG „abgetastet“ wird.

5.3.3. Abschirmungseffekte

Das exakte Wechselspiel zwischen positiv und negativ geladenen Resten ist für die Kraftübertragung und Variation der Geschwindigkeit entscheidend. Das Einführen einer negativen Ladung in Position Ser301 entsprechend dem AS-Rest bei *E.coli* (Asp) alleine

führt zu keiner nennenswerten Veränderung des Phänotyps gegenüber dem des Wildtyps, ebenso wie die Neutralisierung der Position Arg294 (Ala). Die Kombination der beiden Mutationen führte jedoch zum Stillstand (Abb.21).

Die plausibelste Erklärung besagt, daß der positive Rest Arg294 die negativen Glu300 und Asp302 (alle FliG) gegen Glu98 (MotA) abschirmten. Ohne die positive Ladung von Arg294 dominiert die abstoßende Kraft zwischen Glu300/Asp301 und Glu98 und führt zum Stillstand.

5.3.4. Modell: Die variable Rotationsgeschwindigkeit wird an der MotA-FliG-Kontaktfläche reguliert

Die Ergebnisse der verschiedenen Kombinationen geladener Reste an den MotA- und FliG-Kontaktflächen führten zur Aufstellung eines Modells, das die Rotationsgeschwindigkeits-Variation (4.3.4) im *S.meliloti*-Motor erklärt.



Abb.30. Konzept unterschiedlicher Ladungswechselwirkungen bei schneller und langsamer Rotation. Links: anziehende Coulombkräfte (—) zwischen gegensätzlichen (+/-) Ladungen führen zu **schneller** Rotation. Rechts: eine Kombination sich abstoßender (<--->) und sich anziehender (---) Coulombkräfte führt zu **langsamer** Rotation (U. Attmannspacher, B. Scharf, R. Schmitt, in Vorber.).

Im fallenden Lockstoffgradienten wird die CheA-Kinase aktiviert, die CheY2 phosphoryliert. CheY2-P signalisiert dem Flagellenmotor „langsamer rotieren“. In Analogie zum *E.coli*-System wird der Kontakt von CheY2-P und FliM (evtl. über MotD) im C-Ring von *S.meliloti* eine Konformationsänderung induzieren (Brown *et al.*, 2002), die sich als relative Verschiebung der FliG-MotA-Kontaktfläche manifestiert.

Der Rotor kann gegenüber dem Stator zwei Konformationen einnehmen. Die sich anziehenden Coulomb-Kräfte zwischen MotA/Glu98 und FliG/Arg294 sowie zwischen

MotA/Arg90 und FliG/Glu300/Asp302 wirken in der ersten Konformation (Abb.30 links) und resultieren in schneller Rotation des Flagellums. In der zweiten Konformation (Abb.30 rechts) wird die Kombination anziehender und abstoßender Kräfte wirksam. MotA/Arg90 und FliG/Asp302 ziehen sich an, MotA/Glu98 und FliG/Glu300/Asp302 stoßen sich ab.

Die Kombination sich anziehender und abstoßender Ladungspaare bremsen die Rotation der Flagelle ab.

Die Tatsache, daß im Rahmen dieser Arbeit mit Asp302Lys nur eine *fliG*-Mutation gefunden wurde, bei der die Chemokinese teilweise aufgehoben wird (2,3 % statt 7,5 %), spricht dafür, daß auf der Rotorseite möglicherweise eine Kombination mehrerer geladener Reste an der Geschwindigkeitsvariation beteiligt sind.

Das Modell eines Flagellenmotors, in dem einzelne Statorelemente kurze Rotationsinkremente auf einzelne (FliG)-Segmente des Rotors übertragen (Schmitt, 2003), erlaubt es auch, den beobachteten graduellen Anstieg oder Abfall der Rotationsgeschwindigkeit zu erklären. Geht man von 26 ± 2 FliM- und FliG-Segmenten im C-Ring aus (Thomas *et al.*, 1999; Schmitt, 2003), so verursacht jedes CheY~P-Molekül, das an FliM „andockt“, eine partielle Reduktion der Drehgeschwindigkeit; aber nur bei vollständiger Besetzung aller Segmente kommt der Motor zum Stillstand. Diese Interpretation wird auch durch Beobachtungen der FliF-FliG-Fusion gestützt (4.4.). Wenn man davon ausgeht, daß die Fusion den Übergang zwischen den beiden FliG-Konformationen (Abb.30) in **allen** FliG-Segmenten des Rotors einschränkt, wird die verringerte Fähigkeit zur Chemokinesis (4,5 % statt 7,5 %) sofort verständlich.

Die Identifizierung und Mutagenese von funktional wichtigen Resten auf Rotor- und Statorseite, die miteinander wechselwirken, ist ohne weitergehende Strukturdaten von FliG und MotA der beste Weg, um die Regulation der Geschwindigkeit im Flagellenmotor von *S.meliloti* aufzuklären. Der (gentechnische) Austausch interagierender Komponenten des Stators (MotA,MotB) und des Rotors (FliG, FliM, FliN) zwischen den Motoren von *S.meliloti* (einsinnige Rotation, H⁺-Kanal), *E.coli* (reversible Rotation, H⁺-Kanal) und *Vibrio alginolyticus* (reversible Rotation, Na⁺-Kanal) könnte zum Konzept eines universellen Flagellenmotors führen. Darüber hinaus müssen aber die Molekularstrukturen von Stator und Rotor aufgeklärt werden, damit Modellvorstellungen zur Energiekonversion (elektrochemisch nach mechanisch), Kraftübertragung und Generierung des Drehmoments falsifiziert oder bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

Die Flagellen von *Sinorhizobium meliloti* rotieren im Gegensatz zu *Escherichia coli*-Geißeln nur im Uhrzeigersinn. Richtungsänderungen der schwimmenden Zelle werden durch Variation der Rotationsgeschwindigkeit einzelner Flagellen und eine daraus resultierende Auflösung des geordneten Geißelbündels erreicht.

Der Flagellenmotor von *S.meliloti* enthält konservierte Komponenten, wie MotA, MotB, FliM, FliN und FliG. Darüber hinaus wurden neue Mot-Proteine, MotC, MotD und MotE identifiziert, die essentielle Spezifika des *S.meliloti*-Flagellenmotors (und verwandter) darstellen (Sourjik *et al.*, 1998). Von diesen wurde hier das MotC-Protein analysiert.

Es stellte sich aber heraus, daß die Verhältnisse bestimmter geladener AS-Reste an der Kontaktfläche von Protonenkanal (MotA) und Rotor (FliG) für das Rotationsmuster und folglich die Bewegung schwimmender *S.meliloti*-Zellen entscheidende Bedeutung haben. Deshalb wurde hier auf die genetische, protein-biochemische und funktionelle Untersuchung dieser Reste und ihre Wirkung besonderer Wert gelegt.

Die wichtigsten Ergebnisse und Schlußfolgerungen dieser Arbeiten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Die unbekannten *motA*, *motC* und *fliG*-Sequenzen von *Rhizobium lupini* H13-3 wurden erschlossen, mit den bekannten Orthologen von *S.meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* und *Mesorhizobium loti* verglichen und auf diese Weise konservierte Domänen definiert.
- (2) Die periplasmatische MotC-Komponente stellt durch Bindung an das MotB-(Kanal-) Protein die Funktionsfähigkeit des energetisierenden Protonenkanals sicher. MotC dient möglicherweise als „Protonenfalle“ oder „pmf-Sensor“, weil *S.meliloti*-Zellen bei höheren pH-Werten (bis pH 9,5) noch schwimmen als *E.coli*-Zellen (bis pH 9,0). Bereits früher identifizierte, im zentralen Bereich von MotC durch Deletionen hervorgerufene Funktionsdefekte wurden hier weitgehend auf die Instabilität der Mutantenproteine zurückgeführt. Deshalb müssen weitere Untersuchungen mit (stabilen) Substitutionen einzelner Reste im MotC-Protein durchgeführt werden.
- (3) Durch gezielte Mutagenese wurden 68 Einzel-, Doppel und Dreifachaustausche der konservierten geladenen Reste Arg90 und Glu98 (MotA) bzw. Arg294, Glu300,

Ser301 und Asp302 (FliG) generiert und die Schwärm- und Schwimmfähigkeit der resultierenden Mutanten bestimmt. Aus den Resultaten lassen sich drei Mutantenklassen ableiten:

- a) Reste, die für die Flagellenrotation essentiell sind, weil ihr Ausfall die Aufhebung oder eine deutliche Reduktion der Rotationsgeschwindigkeit hervorruft. In dieser Kategorie sind Glu98 und Arg294 absolut notwendige geladene Reste, Arg90 und Asp302 haben geringeres Gewicht, ebenso die „neuen“ (*S.meliloti*-spezifischen) Reste Glu300 und Ser301.
 - b) Ladungsumkehr zwischen bestimmten Resten kompensiert die Defekte der Einzelmutationen (Suppression). Dies trifft für die Kombinationen Glu300Arg/Ser301Ala-Arg90Glu und Glu300Arg/Ser301Arg-Arg90Glu zu. Die Ergebnisse zeigen, daß elektrostatische (Coulomb-) Wechselwirkungen zwischen antagonistischen Ladungen entscheidend für die Kraftübertragung vom Stator (MotA) auf den Rotor (FliG) sind.
 - c) Reste, welche die Chemokinesis (Geschwindigkeitserhöhung bei taktischer Stimulation) betreffen. Die Neutralisation der MotA-Reste Arg90 (Ala) und Glu98 (Gln) führte zum Verlust der Chemokinesis, teilweise auch eine Ladungsumkehr des FliG-Rests Asp302 (Lys). Folglich reicht eine MotA-FliG Coulomb-Wechselwirkung für die Aufrechterhaltung der Rotation mit hoher Geschwindigkeit aus, die Kombination von zwei wechselwirkenden Ladungspaaren ist aber für die Geschwindigkeitsvariation („Bremse“) entscheidend.
- (4) Eine C-terminale Fusion von FliG mit dem MS-Ring (FliF) resultierte in reduzierter Geschwindigkeit und Chemokinesis. Dieser Befund wird als Beleg für eine eingeschränkte Fähigkeit von FliG zur Konformationsänderung interpretiert, die als Voraussetzung für die Geschwindigkeitsvariation gilt.
- (5) Aus den Daten wurde ein Funktionsmodell des *S.meliloti*-Motors etabliert, in dem die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen MotA und FliG die entscheidende Rolle bei Rotation und Chemokinesis spielen.

7. Literaturverzeichnis

- Armitage, J.P. and Schmitt, R. (1997).** Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* – variations on a theme? *Microbiol* **143**: 3671-3682
- Asai, Y., Kawagishi, I., Sockett, R.E. and Homma, M. (2000).** Coupling ion specificity of chimeras between H⁺- and Na⁺-driven motor proteins, MotB and PomB, in *Vibrio* polar flagella. *EMBO J* **19**: 3639-3648
- Attmannspacher, U. (1999).** Deletionsanalyse von mot-Genen bei *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Bachmann, B.J. (1990).** Linkage map of *Escherichia coli* K12, edition 8. *Microbiol Rev* **54**: 130-197
- Berg, H.C. (2000).** Motile behavior of bacteria. *Physics Today* Jan 2000: 24-29
- Berg, H. C. (2003).** The rotary motor of bacterial flagella. *Ann Rev Biochem* **72**: 19-54
- Berg, H.C. and Brown, D.A. (1972).** Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* **239**: 500-504
- Berry, R.M. (1993).** Torque and switching in the bacterial flagellar motor. An electrostatic model. *Biophys J* **64**: 961-973
- Blair, D.F. (2003).** Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Letters* **545**: 86-95
- Blair, D.F., Kim, D.J. and Berg, H.C. (1991).** Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 4049-4055
- Borkovich, K.A. and Simon, M.I. (1990).** The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis. *Cell* **63**: 1339-1348
- Brown, P.N., Hill, C.P., Blair, D.F., (2002).** Crystal structure of the middle and C-terminal domains of the flagellar rotor protein FliG. *EMBO J* **21**: 3225-3234
- Cohen-Krausz, S. and Trachtenberg, S (1998).** Helical perturbations of the flagellar filament: rhizobium lupini H13-3 at 13 Å resolution. *J Struct Biol* **122**:267-282.
- Chun, S.Y. and Parkinson, J.S. (1988).** Bacterial motility – Membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**: 276-278
- Danielson, M.A., Bass, R.B. and Falke, J.J. (1997).** Cysteine and disulfide scanning reveals a regulatory alpha-helix in the cytoplasmic domain of the aspartate receptor. *J Biol Chem* **272**: 32878-32888
- Dean, G.D., Macnab, R.M., Stader, J., Matsumura, P. and Burks, C. (1984).** Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **159**: 991-999

DeMot, R. and Vanderleyden, J. (1994). The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both Gram-positive and Gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol Microbiol* **12**: 333-334

Eggenhofer, E. (2001). Molekulare Charakterisierung von zwei essentiellen Komponenten der Motorfunktion bei *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg

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*, in Druck

Eisenbach (1996). Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* **20**: 903-910

Elston, T.C. and Oster, G. (1997). Protein turbines. I: The bacterial flagellar motor. *Biophys J* **73**:703-721

Francis, N.R., Irikura, V.M., Yamaguchi, S., DeRosier, DJ., and Macnab, R.M. (1992). Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6304-6308

Garza A.G., Harris-Haller, L.W., Stoebner, R.A. and Manson, M.D. (1995). Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1970-1974

Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quroollo, B., Goldman, B.S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., Slater, S. (2001). Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2323-2328

Götz, R, Limmer, N., Ober, K. and Schmitt, R. (1982). Motility and chemotaxis on two strains of *Rhizobium* with complex flagella. *J Gen Microbiol* **128**: 789-798

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

Haslbeck, M. (1997). Two-Hybrid Analysen von Wechselwirkungen zwischen Motorproteinen in *Rhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg

Hess, J.F., Bourret, R.B., Oosawa, K., Matsumura, P. and Simon, M.I. (1988). Protein phosphorylation and bacterial chemotaxis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **53**: 41-48

Hirota, N., Kitada, M. and Imae, Y. (1981). Flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* are powered by an electrochemical potential gradient of Na^+ . *FEBS Lett* **132**: 278-280

- Jones, C.J. and Macnab, R.M. (1990).** Flagellar Assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**: 1327-1339
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. (2000).** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**: 331-338
- Khan 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
- Kim, C., Jackson, M., Lux, R., Khan, S. (2001).** Determinants of chemotactic signal amplification in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **307**: 119-135
- Koebnik, R. (1995).** Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins. *Mol Microbiol* **16**: 1269-1270
- Kojima, S and Blair, D.F. (2001).** Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**:13041-13050.
- 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
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Li, M. and Schweizer, H.P. (1993).** Resolution of common DNA sequencing ambiguities of GC rich DNA templates by terminal deoxynucleotidyl transferase without dGTP analogues. *FOCUS* **14/15**: 19-20
- Lloyd, S.A. and Blair, D.F. (1997).** Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **266**:733-744
- Lloyd, S.A., Whitby, F.G., Blair, D.F. and Hill, C.P. (1999).** Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature* **400**: 472-475
- Macnab, R.M. and Koshland, D.E. Jr. (1972).** The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 2509-2512
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- McCarter, L.L. (1994).** MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. *J Bacteriol* **176**: 4219-4225
- Meister, M., Caplan, S.R., Berg, H.C. (1989).** Dynamics of a tightly coupled mechanism for flagellar rotation. Bacterial motility, chemiosmotic coupling, protonmotive force. *Biophys J* **55**: 905-914

- 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 Evol* **26**: 74-86
- Parkinson, J.S. (1978).** Complementation analysis and deletion mapping of *Escherichia coli* mutants defective in chemotaxis. *J Bacteriol* **135**: 45-53
- Platzer, J. (1996).** Struktur- und Funktionsanalyse von *fla*- und *mot*-Genen aus *Rhizobium meliloti*. Dissertation, Universität Regensburg
- 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
- Pleier, E. (1988).** Identifizierung und Analyse zweier Flagellin-Strukturgene von *Rhizobium meliloti*. Dissertation, Universität Regensburg
- 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
- Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1986).** Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**: 163-166
- Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumazaka, T., Yamamoto, M. and Namba, K. (2001).** Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**: 331-337
- 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
- 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.E., Fahrner, K.A., Turner, L., Berg, H.C. (1998).** Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 201-206
- Scharf, B. and Schmitt, R. (2003).** Sensory transduction and motion control in *Sinorhizobium meliloti*. In: Regulatory networks in Prokaryotes (Dürre, P. and Friedrich, B., eds.), Horizon Press, Norfolk, UK, 13-16
- 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

- Schmitt, R. (2002).** Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiol* **148**: 627-631
- Schmitt, R. (2003).** Helix rotation model of the flagellar rotary motor. *Biophys J* **85**: 843-852
- Schmitt, R., Raska, I. and Mayer, F. (1974).** Plain and complex flagella of *Pseudomonas rhodos*: analysis of fine structure and composition. *J Bacteriol* **117**: 844-857
- Schuster-Wolff-Bühring, H. (1999).** Strukturanalyse und immunchemische Detektion von Flagellin-Monomeren der komplexen Flagellen von *Rhizobium lupini* und *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Selbitschka, W., Niemann, S. and Pühler, A. (1993).** Construction of gene replacement vectors for gram⁻ bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as positive selection marker. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**: 615-618
- Silverman, M. and Simon, M. (1974).** Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* **249**: 73-74
- Silversmith, R.E., Guanga, G.P., Betts, L., Chu, C., Zhao, R. and Bourret, R.B. (2003).** CheZ-mediated dephosphorylation of the *Escherichia coli* chemotaxis response regulator CheY: role for CheY glutamate 89. *J Bacteriol* **185**: 1495-1502
- 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*
- Sosinsky, G.E., Francis, N.R., DeRosier, D.J., Wall, J.S., Simon, M.N. and Hainfeld, J. (1992).** Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4801-4805
- 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
- Sourjik, V. and Schmitt, R. (1996).** Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Molecular Microbiol* **22**: 427-436
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M. and Schmitt, R. (1998).** Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* **223**: 283-90
- Sterr, W. (1995).** Analyse des *motA* Gens von *Rhizobium meliloti* und der Funktion des Genprodukt. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Stock, J.B. and Surette, M.G. (1996).** Chemotaxis. In: *Escherichia coli* and *Salmonella* (Neidhardt, F., Curtiss, R. III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H.E., eds.), ASM Press, Washington, D.C., 1103-1129

Stolz, B. and Berg, H.C. (1991). Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 7033-7037

Terwilliger, T.C. and Koshland, D.E.J. (1984). Sites of methyl esterification and deamination on the aspartate receptor involved in chemotaxis. *J Biol Chem* **259**: 7719-7725

Thomas, D.R., Morgan, D.G. and DeRosier, D.J. (1999). Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:10134-10139

Thomas, D., Morgan, D.G. and DeRosier, D.J. (2001). Structures of Bacterial Flagellar Motors from Two FliF-FliG Gene Fusion Mutants. *J Bacteriol* **183**: 6404-6412

Trachtenberg, S., DeRosier, D.J., Aizawa, S.J. and Macnab, R.M. (1986). Pairwise perturbation of flagellin subunits. The structural basis for the difference between plain and complex flagellar filaments. *J Mol Biol* **195**: 569-576

Ward, M.J., Bell, A.W., Hamblin, P.A., Packer, H.L. and Armitage, J.P. (1995). Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **17**: 357-366

Zhou, J. and Blair, D.F. (1997). Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* **273**: 428-439

Zhou, J., Fazzio, R.T. and Blair, D.F. (1995). Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **251**: 237-242

Zhou, J., Lloyd, S.A. and Blair, D.F. (1998). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6436-6441

Anhang

Im Anhang sind folgende Nukleotid- und Peptidsequenzen sowie *alignments* aufgeführt:

- A1. Genomische Sequenzen von *orf38*, *motB* und *motC* aus *Rhizobium lupini* H13-3 (Accession No. AY117143)
- A2. Genomische Sequenzen von *motA*, *fliM*, *fliN*, *fliG*, *fliH* und *orf14* aus *Rhizobium lupini* H13-3 (Accession No. AY533375)
- A3. Vergleiche der abgeleiteten Sequenzen von MotA, MotB, MotC, FliM, FliN und FliG von *S.meliloti* und *R.lupini* H13-3

A1. Genomische Sequenzen von *orf38*, *motB* und *motC* aus *Rhizobium lupini* H13-3

TAAACCGGCGTCGGTCCGGCGGGTTGGGGAGTTGGTTCAAGGTTCTGAAAACGGGG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 ATTTGGCCGCAGCCAGGCCGCCAAGCCCCCTCAACCAACGTTCAAAGACTTTGCC

 CCCGCCTTCATCCTCGACAAGTTGAACACCTAACGTGGGGCAATATCGGGGGATCG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 GGGCGGAAGTAGGAGCGTGTCAAACCTGTGGATTGCAGCCCCGTTAGGCCACCTAGC

 CATGGCGTGTACCGGCGGGAAACAATTGAAGAGACGGCAGGGTAGCAAGGATGACGGTG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 GTACCGCACTAGGCCGGCTTGTAACTTCTGCCCCATCGTCCCTACTGCCAC

 GTGCCGCCAACGGCTTGTACCGCAGGAAACATGTCTCGCCCCCTTGGCCTGTT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CACGGCGGTTGCCAAACTAGCGTCCGTTGTACAGAGCGGGAAACCGGACAAA

 TGCGGGGGCGGGCATGAGCGCGTCCATTGCAAGATATCTCAAGGATTCGGTGACGTGC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 ACGGCCCGCCGTACTCGCGCAGGTAACGTTCTATAGAGTTCTAAAGCCACTGCACG

orf38 M S A S I A R Y L K D F G D V Q -

 AGCCCGGGACTGACGTTGGCGAACCGTTGGCGATGTCGACGGCATTCCGGTTTG
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 TCGGGGCCCTGACTGCAAGCCGTTGGCAACCGCCTACAGCTGCCGTAAAGGCCAAAC

 P A G L T F G E P L A D V D G I S G F G -

 GCGATATTGCGTCCGGTTTCGATGAATTGAGCCGCTCGACGTCGAAAGCGAAAAACAGG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 CGCTATAACGCAGGCCAAAGCTACTTAAGCTCGCGAGCTGCAGCTTCGCTTTGTCC

 D I A S G F D E F E P L D V E S E K Q A -

 CCGCCTATGCCGTGGTCACGAGGATGCGACCGCGAGATCACGGAGAAAATGCAGGCC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 GGCGGATACGGGACCAGTGCTCCTACGCTGGCGCTAGTGCCTCTTACGTCCGGC

 A Y A R G H E D A T R E I T E K M Q A E -

 AGCGCGAGGAGCTTCTGCTGCTCATGCCGAGAACCTGAAGGCTTACGTTCCGTCTATC
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 TCGCGCTCCTCGAAGAACGACGAGTACGGCGTCTTGAGCTCCGAATGCAAGGCAGATAG

 R E E L L A A H A A E L E G L R S V Y L -

 TGGAAGAAATTGCCGTTTCCTGTCGCTAAGGCTGCGTAAGGCATCGATGCGATCGCGA
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 ACCTTCTTAACGGAAAAGGACAGCGATTCCGACGCACTTCCGTAGCTACGCTAGCGCT

 E E I A V F L S L R L R E G I D A I A T -

 CCAATCTAGCGAACAGACCGCCAATATCCTTGCCCCGGTTCTGACCGAAGAGCTGTCG
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 GGTTAGAGTCGCTTGTCTGGCGGTTAGGAACGGGCCAAGACTGGCTCTCGACAGCG

 N L S E Q T A N I L A P V L T E E L S L -

TGAAGGCCGTTTCGGCGCTTGCAGATGTCGTTGCGCTTCCATGCCGGATGGCGAGGCCG
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 ACTTCCGCCAAAGCCCGAACGCCCTACAGCAAGCGCAAGGTACGGCCTACCGCTCCGC
 K A V S A L A D V V R A S M P D G E A V -

 TGACCCTTGTGAAAGGCCGAAAGATTGTTGAGCAGCTGAAGACGCAGCCGGCT
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 ACTGGAACAGCACTTCCGGCTTCTAACAAACTCGTCGACTTCTGCGTCGGCCGA
 T L V V K G P K D L F E Q L K T Q P G F -

 TTGAAGAAGAGACGATGAAATTATCGAGACGGCAGATATCGACCTCTCCGTTGAGTTGG
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AACCTCTCTGCTACTTTAAATAGCTCTGCCGTATAGCTGGAGAGGCAACTCAACC
 E E E T M K F I E T A D I D L S V E L G -

 GTGAAAGCGTGTGTCACGCGCATGTCGCCCTGGCGTCCAGTCTCGCAAGGTGATGA
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 CACTTCGACAAGCAGTGCACGTACAGGGGACCCGCAGGTAGAACAGCCTTCACTACT
 E S V F V T R M S A W A S S L R K V M K -

motB
 AATGAGTGAAGGCAGAAATCACCAACCACGGCAAGAACGAGATCATCATCGTCAAACGCCA
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 TTACTCACTTCCGCTTTAGTGGTGGTGCCGTTCTGCTCTAGTAGCAGTTGCGGT
 M S E G E N H H H G K N E I I I V K R H -
 *

 CAAGGGCGGGCACGATGGCGCCATGGCGCGCGTGGAAAGATCGCTTATGCCACTTCAT
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 GTTCCCGCCCGTGTACCGCGGGTACCGCCGACCTCTAGCGAATACGGCTGAAGTA
 K G G H D G A H G G A W K I A Y A D F M -

 GACGGCCATGATGGCGTTCTCCTCGTCATGTGGCTGGTCAATGCCGAAACGAGGAAAC
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 CTGCCGGTACTACCGCAAGAAGGAGCAGTACACCGACCAGTTACGGCGTTGCTCCTTTG
 T A M M A F F L V M W L V N A A N E E T -

 CAAGGCCTCGGTGCCAGCTATTCAATCCGATAAAGCTGTCCGATGAAAAACCTTCGTC
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 GTTCCCGAGCCAGCGGTGATCAAAGTTAGGCTATTGACAGGCTACTTTGGAGCAG
 K A S V A S Y F N P I K L S D E K P S S -

 CAAGGGCTGGAAAAACCGTGGACAAGGAAGAGGGCGTCGAGAAGAAAGACCAGTCAA
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 GTTCCCGACCTTTGGGCACCTGTTCTCCCGCAGCTCTTCTGGTCAGGTT
 K G L E K P V D K E E G V E K K D Q S N -

CATAAAGGCGAAAAGGTACCCAGGGCTGGCGTGCACAGGTGAAGACCTGACCTC
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 GTATTTCCGCCTTCCAGTGGTCCCAGGCCGGCACGCTGCCACTTCTGGACTGGAG
 I K A E K V T Q G S A A A T G E D L T S -

GCAGACCGGGGAGCAGTCGAACCTCTCCGAAGCGGACTTTTGAGAATCCCTATTCCGT
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 CGTCTGGCCCCTCGTCAGCTGAAGAGGCTTCGCTGAAAAAGCTCTTAGGGATAAGGCA
 Q T G E Q S N F S E A D F F E N P Y S V -

TCTGGCGAAATTGCCAGCAGGTGGCAGCAGGCCAATGTCAGCGCCAAGGGCGAAGG
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 AGACCGCCTTAACGGTCTCGTCCAGCCGTCGTCGGTTACAGTCGCGGTTCCGCTTCC
 L A E I A Q Q V G Q Q A N V S A K G E G -

TGGTGCTGCCGATTCCGGCCGGCGACGGTGCAGCGGCGGTGAGGCTTACCGCGATCC
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 ACCACGACGGCTAACGGCGGGCGCTGCCACGCTCGCCGCACTCCGAATGGCGCTAGG
 G A A D S G P A T G A S G G E A Y R D P -

CTTCGATCCGATTCTGGACCCAGCAGGTGAAGATCACACGTGCGGACCAGCAGCAAAA
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 GAAGCTAGGGCTAAAGACCTGGTCTCCACTTCTAGTGTGCACGCCCTGGTCGTTTT
 F D P D F W T Q Q V K I T R A D Q Q Q N -

TCCGGTCAACAGCAACAATCTGCCGAGAACAGCAGCAGGACCCGCCAAGGATAATGA
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 AGGCCAGCTTGTCTGGTTAGACGGCTCTGTCGTCCTGGACGGTCCATTACT
 P V E Q Q S A E N K Q Q D P A K D N E -

AGCGGTTGCGGCTAAATCGTCTCAGCAGCCAGTCGATGGTGCAGATCACGGCAAGGCCAT
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 TCGCCAACGCCGATTAGCAGAGTCGTCGGTCAGCTACCACGTCTAGTGCCGTTCCGGTA
 A V A A K S S Q Q P V D G A D H G K A M -

GGAAATGCCGCCGTGGTGCCGCAGCAGCGGCCGGTGCCGCCAGCAGGCAGCACTTAC
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 CCTTTAGCGGCGGCACCACGGCGTCGTCGCCGCCACGGCGGCTCGTCCGTGAATG
 E I A A V V P Q Q R P G A A E Q A A L T -

GCAGCCTCAGCCGGAGCAGCAGCAAGGTACTGCTGCGCAGAAGGAAGAGGCTAAAGA
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 CGTCGGAGTCGGCCTCGTCGTCGTTCCATGACGACGCGTCTCCTCTCCGATTCT
 Q P Q P E Q Q Q G T A A Q K E E A K E -

GCTGCGCGAAGAGATCGAGAACAGATATCCGGCATCAGCGCAAGCTCGCCGAAGGTCT
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 CGACGCGCTCTAGCTCTCGTCTAGGCCGTAGTCGCCGTCAGCGGGCTTCCAGA
 L R E E I E K Q I S G I S G K L A E G L -

GGTGGTGACGCCGCCGAAGGCGGATTGCTGTTGACCATTCCGACCAGACGGAAACGCC
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 CCACCACTGCGGGCGGCTTCCGCCTAACGACAACGGTAAAGGCTGGTCTGCCTTGCGG
 V V T P A E G G L L L T I S D Q T E T P -

 GATGTTCAATGTCGGATCGGCTGTGCCCCCGCGAATGGTTTGGCCATGGAGAAGAT
 1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 CTACAAGTTACAGCCTAGCGACACGGGGCGCCGTTACCAAAACCGGTACCTCTCTA
 M F N V G S A V P R G E M V L A M E K I -

 CGGCAAGTTGCTTCAGGAGCGTGGCGGCAGCGTGGTATCCGCGGCCATACCGATGGACG
 1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
 GCCGTTCAACGAAGTCCTCGCACCGCGTCGCACCACTAGGCGCCGGTATGGCTACCTGC
 G K L L Q E R G G S V V I R G H T D G R -

 CCAGTTCAAGGGTGAGGCCAATGACAATTGGCGGCTTCCATGGACCGCGCATAGCGC
 1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
 GGTCAAGTTCCCCTCCGGTTACTGTTAACCGCCGAAAGGTACCTGGCGCGGTATCGCG
 Q F K G E A N D N W R L S M D R A H S A -

 CTATTACATGCTGGTCGCGGCCGTGCGGAAGAGCGGGTGAAACAGGTTGGGTTT
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 GATAATGTACGACCAAGCGCCCGGACAGCCTCTGCCACTTGTCCAAGGCCAAA
 Y Y M L V R G G L S E E R V K Q V S G F -

 TGCGGATCGCAGATTGCAGGTGCCGGCAGACCGCTGGCGAATGCGAACGCCGTATCGA
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 ACGCCTAGCGTCTAACGTCCACGGCGTCTGGCGACCGCTTACGCTTGGCGCATAGCT
 A D R R L Q V P A D P L A N A N R R I E -

 AATCCTGCTTGAGGCCATGGGGGTGAGTGTGACGAAATCCTCGAAACGTTGGTTTT
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
 TTAGGACGAACTCCGGCTAGCCCCACTCACACTGCTTAGGAGCTTGCAACCCAAAAA
 motC M S V T K S S K R W V F -
 I L L E A D R G *

 CTTGCGCGACACTGTGTTGGTCTCGGTGCCAACCGCGAAGGTTTTCGCAATCGCAA
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
 GAACGCCGCTGTGACACACCAGAGCCACGGCTTGGCGCTTCCAAAACGCGTTAGCGTT
 L A A T L C G L G A E P A K V F A Q S Q -

 GACAACCTCATGCCCTATGCCATGTTGCGCTCCCTGCAGTCGTGCAGGATTCCGTCACC
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 CTGTTGGAGTACGGGATACGGTACAACGCGAGGGACGTCAAGCACGTCTAAGGCAGTGG
 D N L M P Y A M L R S L Q F V Q D S V T -

 ATGGGAGACCATTGGCAACCGAAATGCAGCGGTTCTGCTCCAGACGATCGACGAGCGG
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 TACCCCTCTGGTAAGCCGTTGGCTTACGTGCGCAAAGACGAGGTCTGCTAGCTGCTCGCC
 M G D H S A T E M Q R F L L Q T I D E R -

CTTAAGAGCGCACCTCGCGATCTCAAGGATCCGCGCAATGTTGATGCCGGCTTGTC
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
 GAATTCTCGCGTGGAAAGCCGCTAGAACGTTAGGCGCGTTACAACACTACGCCCGAACAG
 L K S A P S A I F K D P R N V D A A L V -

 TACCGCATGAGCGCGGCAATCCGCCACGCTCGAATTGCTCGCGCGGGATGTGGAC
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
 ATGCGCTACTCGCCGCCGTTAGGCCGGTGCAGCTAACGAGCAGCGCGCCCTACACCTG
 Y A M S G G N P A T L E L L V A R D V D -

 GGCAATTCGACAGCCCGTCCGATATTCTCGCAAATATCTGCCGGCAAGGAAACG
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
 CCGTTAAAGCTGTCCGGCGCAGCGGCTATAAGACCGCTTATAGACAGGCCGTTCCCTTGC
 G N F D S R V A D I L R K Y L S G K G T -

 CTGGTCGCCAGAGCATCGCGGCCATGGTCCCCGAGTATCGCGCACGAGAATTGGCGCC
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 GACCAGCGGGTCTCGTAGCGCCGGTACACCGGGCTATAGCGCCGTGCTCTAACCGCGG
 L V A Q S I A A M V P E Y R G T R I G A -

 TATCTTGCACTGATCGCGGCAATGTGACGATCCCCCGCATCCGGTGGCTGCCCTCGGT
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
 ATAGAACGTGACTAGCCGCCGTTACACTGCTAGGGGGCGTAGGCCACCGACGGGAGCCA
 Y L A L I G G N V T I P R D P V A A L G -

 TTCTATGACATAGCCGGCTCGAACGCGCCGGTACCATCGTGGAGGGAGGCTGCACTCCGC
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
 AAGATACTGTATCGGGCGAGCTTCGCGGCCATGGTAGCACCTCCGACGTGAGGCG
 F Y D I A R L E A P G T I V E E A A L R -

 CGCTCGTTGCTATCGCCGTTGAAGACGGCGATGCCGGCGTGGCGTCAATATGCACAG
 2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
 GCGAGCGAACGATAGCGGCAACTTCTGCCGTACGGCCCGCACCGCAGCTTATACGTGTC
 R S L A I A V E D G D A G R G V E Y A Q -

 CGTTACGCGCGGCGGTTCTGCATTGCCCTATGCCAGCCAGTTCGCGGACCTCTGGTC
 2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
 GCAATGCGCGCCGCAAGGACGTAAGCGGGATACGGTCGGTCAAGCGCCTGGAAGACAG
 R Y A R R F L H S P Y A S Q F A D L L V -

 TCACTGGTGGTCAAACGTGTCATTCCATCGGCACGACAGATAGAGGAAACATTGCC
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
 AGTGACCACCAGTTGCACAGCTAAGGTAGCCGTGCTGTGCTATCTCCTTGTAAAGCGG
 S L V V K R V D S I G H D T I E E T F A -

 ATGATGGACGCGGAGAGGCAGAACAGGAAGGCTTATCTGCCGTGCCCCGTCTCGCGGCGATC
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
 TACTACCTCGCGCCTCTCCGTCTCCTTCGAATAGACCGGGACAGGGCAGAGGCCGCTAG
 M M D A E R Q K E A Y L R L S R L A A I -

AGCGGCAAGGATTCGCTGGCGCATGGCGGCGTTGAAGGCAGACGCTGTCGCCGGAT
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
 TCGCCGTTCTAACCGCACCGCGTACCGCCGCAACTCCGTTTCGCGACAGCGGCATA
 S G K D S L A R M A A L K A K A L S P D -

 ATGCCGACCAGCCCAAGTTCAAGGCAAATCTATATGAAAGCCTTCCAATATCGGCACG
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
 TACGGCCTGGTCGGCGTTCAAGTCCGTTAGATATACTTCGGAAAGGTTAGCCGTGC
 M P D Q P Q V Q A N L Y E S L S N I G T -

 CCCGATGTGGTGAGCGCGATTGAAACAATCGGCAAATTCCGAGGCCAGCTTCGGAT
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
 GGGCTACACCACTCGCGCTAACCTTGTAGCCGTTAAGGGCTCCGGGTCGAAAGCCTA
 P D V V S A I E T I G Q I P E A Q L S D -

 CGCGACAGGGCCCTGCGGGACGCGCAAGGGCAATGCCGACCAGGTGGTCGTCCGCCT
 3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
 GCGCTGTCCCAGGACGCCCTGCGCGTCCGTTAGCGGCTGGTCCACCAAGCAGGCGGA
 R D R A L R D A A R A I A D Q V V R P P -

 TCCCCGCAGCCTGGCGCCGATCCGGTGTACGGCAGGGCAGGGGGCCGGTCGGCGCG
 3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
 AGGGGCGTCGGACCGCGGCTAGGGCACAGTGCCGTCCGTCCCCGGCCCAGCCCGC
 S P Q P G A D P G V T A G Q G A G S G A -

 CCCCGAATGAGGGGGCCAGTGCCGAGACCAAGGGATATGGAGAGTTGAAAACCACAAG
 3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
 GGGCGCTTAECTCCGCCGGTCACGGCTCTGGTCCGTACCTCTCAACTTTGGTGTTC
 P A N E A A S A E T K G I W R V E N H K -

 GCTGAGGATGAGGGCGAGAACGTCCGGCAACTCGTGACGAGCGCCGAGTAAGCTCGAT
 3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
 CGACTCCTACTCCCGCTTTGCAGGCCGTTGAGCACTGCTCGCCGGCGTACCGAGCTA
 A E D E G E N V R Q L V T S G R S K L D -

 GAAATCGACAGCCTTTGAAGAAAGCGAGGGGGCACCATGATCGACGCAACCATCAACG
 3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
 CTTTAGCTGCGAAAATTCTTCCGCTCCCGTGGTACTAGCTCGCGTTGGTAGTTGC
 E I D S L L K K G E G A P *
 motD M I D A T I N A -

 CGATAGTGAATGCCCATATAAC
 3481 -----+-----+--- 3503
 GCTATCACTTACGCGGTATATTG
 I V N A P Y N -

A2. Genomische Sequenzen von *motA*, *fliM*, *fliN*, *fliG*, *fliB* und *orf14* aus *Rhizobium lupini* H13-3

AAGCTTGGCGAAGGCCTTCGCGCCGTGCCTCGGTACGCCATGGGATGAA
 1 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TTCGAACAACCGCTCCGCAAGAACAGCCGGCACGGAAAGCCAGTCGTGGAACGCCACTTT

 GGCTTTCGCATAGGCCATGTCCTCGAGGCCGTTAGCTTCAGCGCATAATTGTAAAGACG
 61 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CCGAAAGCGTATCCGGTACAGGAGCTCCGCAATCGAAAGTCGCGTATTAACATTCTGC

 GGTATCGGCCATGAAGTCGTCACGGATTTCACGCTGCCGATCTCGACCGGTAAATTTC
 121 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 CCATAGCCGGTACTTCAGCAGCTGCCTAAAGTGCGACGGCTAGAAGCTGGCCATTATAAG

 GGTTTCGCGGCCACGTCGGGTGCTTCGACACACGCTCAAGCGATTGCCGATGTCCTG
 181 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CCAAAGCGCGGGTGCAGCCAACGAAGCTGTGCGAGTTCGCTAAACGGCTACAGGAC

 ACTGATCAGTCTGTAGCTGGTAGGTGAAGTCACTGAACCGCCGCTCTCGTTGATCC
 241 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TGACTAGTCAGACATCGACCACATCCACCTTCAGTGACTTGGCGGCGAGAGCAAAGTAGG

 CGATACCAAGGCGCACGTCCGCCCTTGCTCGGGATAATGCCGGATGTTGCTTGCGAAC
 301 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 GCTATGGTCCCGCTGCAGGGAAACAGCCCTATTACGGCCTACACGAACACGCTTTG

 TGGCTCGGGCGACGAGGGAAAGAGGCCCTCGGGACAGGTTCACGCAAGGCCACATTTCTA
 361 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 ACCGACGCCGCTGCTCCCTTCTCGGAGCGCTGTCCAAGTGCCTCGGTAAAAGAT

 GAGATGGCGGCATGGAACACTGTTGGCGTGGTCGATCAATGAATATTGTAATTGGACT
 421 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 CTCTACCGCGTACCTTGTGACAAGCCGACCAGCTAGTTACTTATAACATTAACCTGA

motA	M	N	I	V	I	G	L	-
TATAATCACCTTCGGCTGCATCATCGCGCCTACATGGCGATGGCGGCCATCTGGACGT								

481 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 ATATTAGTGGAAAGCCGACGTAGTAGCCGCGATGTACCGCTACCGCCGGTAGACCTGCA

I	I	T	F	G	C	I	I	G	G	Y	M	A	M	G	G	H	L	D	V	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

GCTGGTCAGCCGTTGAAATTGTTGATTATCGGCGGTGCCGGCCTCGCGGCTTCATCAT
 541 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 CGACCAAGTCGGCAAGCTAACAACTAATAGCCGCCAGGGCGAGCCGCGAAGTAGTA

L	V	Q	P	F	E	L	L	I	I	G	G	A	G	L	G	G	F	I	M	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

GGCGAACCGATGAAGGTCGTGAAGGATTGGCAAGGCGCTCGCGAGGCCTCAAGCA
 601 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 CCGCTTGGGCTACTTCCAGCAGCTTAAGCCGTTCCCGAGCCGCTCCGGAAGTTCGT

A	N	P	M	K	V	V	K	D	S	G	K	A	L	G	E	A	F	K	H	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

CTCGGTCCCAGAGGAGCGCAACTATCTCGACGTACTCGCGTACTTATTGCTGATGCG
 661 -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 GAGCCAGGGCTTCCTCGCGTTGATAGAGCTGCATGAGCCGATGAAATAAGCGACTACGC

S	V	P	K	E	R	N	Y	L	D	V	L	G	V	L	Y	S	L	M	R	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

CGACCTGCGCACGAAATCGCGAACGAGATCGAGGCATATCGACAATCCGAAGAATC
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 GCTGGACGCGTGCTTAGCGCGTTGCTCTAGCTCCGCGTATAGCTGTTAGGCCTCTAG
 D L R T K S R N E I E A H I D N P E E S -

 CTCGATCTTCAGAGCGCACCCCTCGGTGCTGAAAAACAAGGAGCTGACGTCGTTCATCTG
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 GAGCTAGAAGGTCTCGCGTGGAGCCACGACTTTTGTTCCTCGACTGCAGCAAGTAGAC
 S I F Q S A P S V L K N K E L T S F I C -

 TGACTACGTCCGCCATCATCATCGGCAACGCGGGAGCCACGAAATCGAAGCGCTGAT
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 ACTGATGCAGCGGGAGTAGTAGCTAGCCGTTGCGCGCTCGGTGCTTAGCTTCGCGACTA
 D Y V R L I I G N A R S H E I E A L M -

 GGACGAGGAAATCGAGACCATCCTGCACGACAAGCTGAAACCTTACCA CGCGATCAC
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 CCTGCTCCTTAGCTCTGGTAGGACGTGCTGTTGACTTGGATGGTGCCTAGTGGTG
 D E E I E T I L H D K L K P Y H A I T T -

 CATGGCGATTCTCCCCGCATCGGTATCGTCGCGCGTTCTCGCGTCATCAAGGC
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 GTACCCGCTAAGGAAGGGCGGTAGCCATAGCAGCGCCCAAGAGCCGCAGTAGTTCCG
 M G D S F P A I G I V A A V L G V I K A -

 CATGGGCAAGATCAACGAATCACCGAAGTGCTGGGTGGCCTCATCGCGCCGACTGGT
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 GTACCCGTTCTAGTTGCTTAGTGGCTTCACGACCCACCGGAGTAGCCGCGGTGACCA
 M G K I N E S P E V L G G L I G A A L V -

 GGGCACCATGCTCGCATCATCCTGCTATTGATCTGCAACCCGCTCGCTCGCAGGT
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 CCCGTGGTACGAGCCGTAGTAGGACAGGATAAGCTAGACGTTGGCGAGCGAAGCGTCCA
 G T M L G I I L S Y S I C N P L A S Q V -

 CAAGATCGTCCGCACCAAGCAGCACCGCCTTACATCATCGTAAGCAGACGCTGATCGC
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 GTTCTAGCAGCGTGGTCTCGTGGCGAGATGTAGTAGCAGTTCTCGACTAGCG
 K I V R T K Q H R L Y I I V K Q T L I A -

 CTACATGAACGGCTCGGTGCCGCAGGTCGCGCTTGAATACGGCGCAAGACCATTCAA
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 GATGTACTTGCGAGCCACGGCGTCCAGCGCGACTTATGCCCGCTCTGGTAAAGGTT
 Y M N G S V P Q V A L E Y G R K T I S N -

 TTACGAGCGTCCGTCATCGACGCCGTCGAACAGGAGATGATGAACCCGGCGGCGAAA
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 AATGCTCGCAGGCAGGTAGCTCGGGCAGCTGCTACTACTTGGGCCGCGCTTTT
 Y E R P S I D A V E Q E M M N P G G E N -

CAAGGCGGCATGACCATGGCTAAAGCTGCACAGCAAAGAGCACCCGTATCGACACGTCG
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 GTTCCGCCGTACTGGTACCGATTTCGACGTGTCGTTCTCGTGGCAGTAGCTGTGCAGC

flim M T M A K A A Q Q R A P V I D T S -
 K A A *

CTGCTCGCAGAACCTTACCGGCGGGCTTCCGACCGAAGACAATCGCGAAGGTCGGCTCC
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 GACGAGCGCTTGATGGCCGCCGAAAGGCTGGCGTCTGTTAGCGCTTCCAGCCGAGG

L L A K L T G G L S D R K T I A K V G S -

GATATCGGCCATCTCTACAGCGAATTCCCTGCCTGATATCTTCACAGCGAGACCGGCATT
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 CTATAGCCGGTAGAGATGTCGCTTAAGGACGGACTATAGAAAGTGTGCGCTGGCCGTAA

D I G H L Y S E F L P D I F H S E T G I -

GCGATAGACGTCGAATATATCGGCTCCGAATCGGGCTGATGACCGATCTCATGCCAAT
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 CGCTATCTGCAGCTTATAGCCGAGGCTAGCCCCGACTACTGGCTAGAGTAGCGGTTA

A I D V E Y I G S E S G L M T D L I A N -

ATCGGCGCAATTCTCGGTTGCGGATTGTTCTGCGCAACTGGTGCCCCAATTCATG
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 TAGCCGCCGTTAAAGAGCCAACGCCATAACAAGAGACGCGTTGACCACGGGTTAAAGTAC

I G G N F S V A D C S L R N W C P N F M -

ATGGCGGTGGCAACGGCTTCGTCATCGCGCTCATGGAGCGCATGCTGGCGCCGCC
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 TACCGCCAGCCGTTGCCGAAGCAGTAGCGCGAGTACCTCGCGTACGACCCGCGGCCGG

M A V G N G F V I A L M E R M L G A A A -

GACACCATCGCGAGCCGGACGAGCGCAGCCTGTCCCACATCGAACCTGGCGGCC
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 CTGTGGTAGCCGCTGGCCTGCTCGCGTGGACAGGGTAGCTTGAGCTGGACCGCCGG

D T I G E P D E R S L S H I E L D L A A -

ATGGTTCTGGCGCATGGGGGTGTCCTGCGTCGGCGTCAACCGCGCCGGCGTTTC
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 TACCAAGAGCCCGCGTAGCCCCACAGGACGCCAGCCCGAGTTGCGCGGCCAAAG

M V L G R I G G V L R S G V N A P G G F -

GAGGCGACGATCGACCTGCCCTTACGGCCAATGGAAAAGCGCCTCGAGGAGATGATC
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 CTCCGCTGCTAGCTGGACGGAAATGCCGGTACCTTTTCGCGGAAGCTCCTACTAG

E A T I D L P F T A N G K S A F E E M I -

GCCGGCCTCTACGGCGTGACAGTCCGATGAAGATGCCATGGCAAGGTTCTCGGAA
 1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 CGGCCGGAGATGCCGACTGTCAGGCGTACTCTAGCGGTAGCCGTTCAAAGAACGCTT

A G L Y G V T V R M K I A I G K V S S E -

1921 TTCGCGCTGATCGTGCCGCAGCGGCCCTGCTCAAGACCTCCATGCCGCTCCAAGGCT
 1980 AAGCGCGACTAGCACGGCGTCGCCGGGACGAGTTCTGGAGGTAGCGGCAGGGTTCCGA
 F A L I V P Q R P L L K T S I A A P K A -

 1981 TCAGCCCAGGCCTGAAGAACAGCGGAATGGGTGGATTGATCTCTGAGCAGGTGAAG
 2040 AGTCGGTCCCGACTTCTCGTCCGCCTACCCACCTAAACTAGAGACTCGTCCACTTC
 S A Q A L K K Q A E W V D L I S E Q V K -

 2041 AGATCGCAGGTAACGCTTGAGGCAGCATCAAGCTGAAACCTGACCCGACGATC
 2100 TCTAGCGTCCATTGCGAATCAGCGCGTAGTCGAGCTTGGAACTGGACGCCGTGCTAG
 R S Q V T L E A R I K L E T L T L R T I -

 2101 TCCAGGCTGGTGGCCGGGACGTCATTCCGTTTCAGGATCTGAAGCAGGACATCGGT
 2160 AGGTCCGACCACCGCCGCTGCAGTAAGGCAAAGTCCTAGACTTCGTCTGCTGTAGCCA
 S R L V A G D V I P F Q D L K Q D D I G -

 2161 GTCGAGGTCAGCGCAACGGCTCCAAGCTCTATAATTGTGAATTGGCAAGTCCGGCGAC
 2220 CAGCTCCAGTCGCGGTTGCCGAGGTTGAGATATTAACACTTAAGCCGTTAGGCCGCTG
 V E V S A N G S K L Y N C E F G K S G D -

 2221 CGCTACATGGTTGGTAAAGAACAAATGTCAGCACGGACGAGATCTTGCACATCTG
 2280 GCGATGTACCAAGCCCATTCTTGTACAGTCGTGCCTGCTAGAACGCTGTAGAC
 R Y M V R V K N N V S T D D E I L R H L -

 2281 ATGGGTAAAACCTGTCCACCTTTGGTTCTGGGAGGCTGACGCAAGTTCAAAGG
 2340 TACCCAATTTGGACAGGTGGAAAAAACCAAGACCCGTCGACTGCGTTCAAAGTTCC
 M G *

 2341 GAATAATCAGCGC**ATGG**TACGAAGAAAACACCTGTGACCGATGATGGCGCTGCCGTC
 2400 CTTATTAGTCGCGTACCGATGCTTGTGGACACTGGCTACTATACCGCAGGGCAG
flin M A T K K T P V T D D M A L P S -

 2401 GCTTGAAGATGGCGGTGAGCTCGACCAGGCTATGGCGATCTGCGTGGCGTCTCAAGAC
 2460 CGAACTTCTACCGCCACTCGAGCTGGTCCGATAGCCGCTAGACGCACCGCAGGAGTTCTG
 L E D G G E L D Q A I G D L R G V L K T -

 2461 GGATGCGGAAGGTTCGCTGTCCGACTTGGCGACTTCGGGGATTTCGGGAGCGTTGACGA
 2520 CCTACGCCCTCCAAGCGACAGGCTGAACCCGCTAAAGCCCTCGCAACTGCT
 D A E G S L S D F G D F G D F G S V D D -

CGCTTCGCGACAGCGACCTTCCGCTTCGATGGCGAGCGGGCGATTTGCTATGAA
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
 GCGAAGGCGGCTGTCGCTGGAAAGGCAGCTACCGCCTCGCCCGCTAAAACGATACTT
 A S A D S D L S A F D G G A G D F A M N -

CGATTTCGCGGCCACCCCCACAGGTGCGGGCATCAAGGCGCCGCTCGGCAGTGGCCTGTC
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 GCTAAAGCGCCGGTGGGTGTCAGCGCCCGTAGTTCGCGCGAGCCGTACCCGGACAG
 D F A A T P Q V A G I K A P L G S G L S -

CGACAATATGGACCTGATCATGGATATCCGATCGATGTCCAGATCGTCTCGGCACCAG
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
 GCTGTTATACCTGGACTAGTACCTATAGGGCTAGCTACAGGTCTAGCAAGAGCCGTGGTC
 D N M D L I M D I P I D V Q I V L G T S -

CCGCATGCTCGTCTGGGTCTGATGAGCCTGAAGAGGGTGCAACGATCGCGCTTGACCG
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
 GGCGTACGAGCAGAGCCCAGACTACTCGAACCTCTCCACGTTGCTAGCGCGAAGTGGC
 R M L V S G L M S L E E G A T I A L D R -

CAAGATCGGTGAACCGGTCGAGATCATGGTAATGGCCGCCGTATTGCGCGGGTGAAAT
 2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
 GTTCTAGCCACTTGGCCAGCTCTAGTACCACTTACCGGCCATAACGCGGCCACTTTA
 K I G E P V E I M V N G R R I A R G E I -

AACGGTACTTGAAGACGACGATACCGCTTCGGCGTAAATTGATTGAAGTAATGAGTAC
 2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
 TTGCCATGAACCTCTGCTATGCGCAAGCCGATTTAACTAACCTCATTACTCATG
 T V L E D D D T R F G V K L I E V M S T -

GAGAAAAGCCTGATCCCTGTGGGACGGAGAGGAAAGACCATGATGGACTTCGAGGATT
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
 CTCTTTCGGACTAGGGACACCCCTGCCTCTCCTTCTGGTACTACCTGAAGCTCCTAAA
 R K A * *fliG* M M D F E D F -

CGGTAACCGCTGGCAGGGAAAGCCGGTGTCTCAGGCCACAAGGCGGCCGCGGTGCTTCT
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
 GCCATTGGCGACCGTCCCTCGCAACAGAGTCGGCTGTTCCGCCGGCACGAAGA
 G N P L A G K P L S Q A D K A A A V L L -

TGCCATGGCAAGGGCGTCGCCGGCAAGCTGCTGAAATTTCACGCAGCACGAATTGCA
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
 ACGGTACCCGTTCCCGCAGCGGCCGTTGACGACTTAAAGTGCCTGCTTAACGT
 A M G K G V A G K L L K F F T Q H E L Q -

GATGATCATTCCCTCGGCCAGACGCTGCGTGTCAATTCCCCCTGACGAACCTGCCAGAT
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
 CTACTAGTAAAGGAGCCGGTCTGCGACGCACAGTAAGGGGACTGCTTGAGCGGGTCTA
 M I I S S A Q T L R V I P P D E L A Q I -

CGTGGCGGAGTCGAAGACCTGTTACGGAAGGAACGGGTCTGATGGACAATGCCAAGGC
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
 GCACCGCCTCAAGCTCTGGACAAGTGCCTCCCTGCCAGACTACCTGTTACGGTTCCG
 V A E F E D L F T E G T G L M D N A K A -

 GATCGAAAGCATTCTCGAACAGAGGGCCTGACACCGGAGGGTGGACAGCCTCTCGGCCG
 3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
 CTAGCTTCGTAAGAGCTCTCCGGACTGTGGCCTCTCACCTGTCGGAAGAGCCGGC
 I E S I L E E G L T P E E V D S L L G R -

 TCGTGCAGCCTCCAGGCCTATGAAGCGTCGATCTGGATCGCCTGCAGGAAGCGGAGCC
 3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
 AGCACGTCGGAAGGTCCGGATACTTCGCGACTAGACCCCTAGCGGACGTCCTCGCCTCGG
 R A A F Q A Y E A S I W D R L Q E A E P -

 GGAATTCTCGGCAAATTCTGCTGCGCGAGCATCCCCAGACCATCGGTATATCCTCTC
 3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
 CCTTAAGCAGCGCTTAAGGACGACGCGCTCGTAGGGCTCTGGTAGCGCATATAGGAGAG
 E F V G K F L L R E H P Q T I A Y I L S -

 CATGCTGCCCTCGTCCTCGGTGCCAAGGTCTCTGACCATTCCGAAGAGCAGCGC
 3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
 GTACGACGGGAGCAGGAAGCCACGGTCCAGGAAGACTGGTAAGGGCTCTCGTCGCGC
 M L P S S F G A K V L L T I P E E Q R A -

 CGATATCATGAACCGCACGGTAAACATGAAGGAAGTCAGCCCCACGGCTGCGCAGATCAT
 3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
 GCTATAGTACTTGGCGTGCCACTTGTACTTCCTCAGTCGGGTGCCACGCGCTAGTA
 D I M N R T V N M K E V S P T A A Q I I -

 CGAGAACGCGTGTGGTCAACCTCATCAACGAGATCGAACAGAGCGCAATGCCGGCTC
 3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
 GCTCTTCGACACCAAGTTGGAGTAGTTGCTCTAGCTCGTCTCGCGTTACGCCGCCAG
 E K R V V N L I N E I E A E R N A G G S -

 CACGAAGGTTGCCGACCTGATGAACGAAATGGAAAAGCCGCAGGTCGATACGCTGCTCAG
 3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
 GTGCTTCCAACGGCTGGACTACTGCTTACCTTCCGGCGTCCAGCTATGCGACGAGTC
 T K V A D L M N E M E K P Q V D T L L S -

 CTCGCTCGAACGCTCAGCAAGGAAGCTGCCAACAGGTCAAGCCGAAGATCTCCTCTT
 3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
 GAGCGAGCTTGCAGTCGTTCCCGACGGTTGTTCAAGTCCGGCTCTAGAAGGAGAA
 S L E T L S K E A A N K V K P K I F L F -

 CGACGATCTCATGTTCATGCCGCAGCGCAGCCGCGTCTGCTCAACGATGTCCTCGGC
 3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
 GCTGCTAGAGTACAAGTACGGCGTCCGGCGAGGACAACGAGTTGCTACAGAGCCG
 D D L M F M P Q R S R V L L N D V S A -

GGACGTTCTCACCATGGCGCTGCGTGGCGAACCATGAAATCAAGGAATGTGTGCTGTC
 3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
 CCTGCAAGAGTGGTACCGCGACGCACCGCGTTGGTACCTTAGTTAGTCCTTACACAGACAG
 D V L T M A L R G A T M E I K E C V L S -
 CAGCATCAGTCCGCCAGCGCCGATGATCGAATCGAACCTCGCCGTGCCGAGGCTTC
 3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
 GTCGTAGTCAGGCGCGTCCGGCGTACTAGCTTAGCTGGAGCGGCACGGCGTCCGAAG
 S I S P R Q R R M I E S D L A V P Q A S -
 TATCAACACCCCGCGAAGTGGCGATTGCACGCCGCGCCGTGGCGCAGGAAGCGATCCGGCT
 3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
 ATAGTTGTGGCGCTTCACCGCTAACGTGCGCGCGACCACCGCGTCCCGCTAGGCCGA
 I N T R E V A I A R R A V A Q E A I R L -
 GGCCAATTCCGGTCAGATTAGCTGAAGGAAGCCTCACAGAGGAACAATCCGCAGCAGC
 3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
 CCGGTTAAGGCCAGTCTAACGTGACTTCCTCGGAGGTGTCTCCTGTTAGCGTCGTCG
 A N S G Q I Q L K E A S T E E Q S A A A -
 CTGAGCGGAAGCCGGTTGATAACCCGCCTTACAGGTAATGCCGCCATTGCGATGGCTGG
 3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
 GACTCGCCTTCGGCAACTATTGGCGGAATGTCCATTACGGCCGGTAACGCTACCGACC
 *
 TCTCGGGCGCTAGTTCGGAATGACTGCC**T**GCGCGATCGCGGGCTTTTATCCCG
 4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
 AGAGCCCGCGATCAAAGCCTTACTGACGGACGGCGTAGCCGCCGGAAAAAAATAGGGC
f1hB M P R S A G L F L S R -
 GGAACGTGCCTTGGCAGACGATCAGGACAAGGACAGTAAAACAGAAAGACCCAACGGAGAA
 4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
 CCTTGACGGAACCGTCTGCTAGTCCTGTCATTTGTCTGGTTGCCTCTT
 E R A L A D D Q D K D S K T E D P T E K -
 AAAACTCCGTGATGCGCGGAAAGGGCAATCTCCCTTTCCCGCGAGGTGCCGATCTT
 4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
 TTTTGAGGCACTACGCCCTTCCGTTAGAAGGGAAAGGGCGCTCACGGCTAGAA
 K L R D A A E K G N L P F S R E V P I F -
 TGCTTCGTCACTGCCCTTTACTGCTATCTGGTTCTTTGCCGACGGCGCCGGTCG
 4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
 ACGAAGCAGTGAGCGGAAATGACGATAGACCAAAAGAAAACGGGCTGCCGCGGCCAGC
 A S S L A F Y C Y L V F F L P D G A G R -
 CCTCGGCCTAACGCTGAAGGACCTGTTGCCAGCCCCAACATGGAACCTCAGCACCAAG
 4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
 GGAGCCGCATTGCGACTTCCTGGACAAGCCGGCTGGTTACCTGGAGTCGTGGTC
 L G V T L K D L F G Q P E Q W N L S T R -

GCCGGATGCCCTGTCGCTGCTTATTCTCGGCACGTCCATGGCCTATCTGCTCATGCC
 4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4380
 CGGCCTACGGGACAGCGACGAAATAAAGGAGCGTGCAAGGTACCGGATAGACCGAGTACGG
 P D A L S L L Y F L G T S M A Y L L M P -

 GGCCATGATCATGTTCATCGTCTTCGGCCTTGCCTCCTCGTTCCAGAACCTGCCGTC
 4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4440
 CCGGTACTAGTACAAGTAGCAGAACGGAGCAAAAGGTCTTGGACGGCAG
 A M I M F I V F G L A S S F F Q N L P S -

 GCCCGTGTCTTGAGAGGGTGCCTCGCAATGGTCGCGCATCTGCCCGCAAAGGGGTTCGG
 4441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4500
 CGGGCACGAACTCTCCCACGCAGGCCTTACCGCGTAGAGCGGGCTTCCCCAAGCC
 P V L E R V R P Q W S R I S P A K G F G -

 CCGCATCTACAGCAAGCAGGGATTGTGAAATTGGCAAATCGCTGTTCAAGATCTTGAT
 4501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4560
 GGCGTAGATGTCGTTCTAAACACCTTAAGCCGTTAGCGACAAGTCTAGAACTA
 R I Y S K Q G F V E F G K S L F K I L I -

 CGTTTCGATCATCATGTTCTGTCTCGCGCGATTCTACAGTCTCATCGACCTGAT
 4561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4620
 GCAAAGCTAGTAGTACAAGGACAGAGACGCGCGCTAAAGATGTCAGAGTAGCTGGACTA
 V S I I M F L S L R G D F Y S L I D L M -

 GTTCTCGACCCGAGGTCAATTCTGTCAGGGTTGTCGAGCTCACCAAAAGATGATGGT
 4621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4680
 CAAGAGGCTGGCGTCCAGTAAAGCAGTCCAACAGCTCGAGTGGTTTCTACTACCA
 F S D P Q V I F V R V V E L T K K M M V -

 CGTGATTCTTTGACCGCGCTGCTTGGCGCTCGACCTTTGTGGACCGGCCACCA
 4681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4740
 GCACTAAGAGAAAAGCTGGCGACGAACGGCGCAGCTGGAAAACACCTGCGCGGTGG
 V I L F S T A L L A A V D L L W T R H H -

 CTGGTTCAGCCAGCTGAAAATGACGAAGCATGAGGTGAAGGAAGAGTACAAGCAATCGCA
 4741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4800
 GACCAAGTCGGTCACTTTACTGCTTCGACTCCACTTCCTCATGTTCGTTAGCGT
 W F S Q L K M T K H E V K E E Y K Q S Q -

 GGGCGACCCAGTGGTCAAAGCCGTAGCGTTGGTCGCCGTGACCGCGCCGCC
 4801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4860
 CCCGCTGGTCACCAGTTGGCAGTCGCAAGCCAGCGGGCACTGGCGCGGCG
 G D P V V K A R Q R S V A R D R A R R R -

 CATGATCGACAATGTGCCCGCGCGACACTGGTGATTGCCAACCGACACACTTGCAGT
 4861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4920
 GTACTAGCTGTTACACGGCGCGCTGTGACCAACTACGGTTGGCTGTGAAACGTCA
 M I D N V P R A T L V I A N P T H F A V -

GGC GTT CGTT AC GTT CGCG AAGA AGGCGAC GCGC TGT CGT GCAAGGGTCAGGA
 4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
 CCG CAACG CAAT GCAAG CGCTT CTT CGCT GCG CGGAC AGC AGCAAC GGTT CCCAG TCCT
 A L R Y V R E E G D A P V V V A K G Q D -

 CCTT AT CGC ATT GAAA ATCC CGAG ATT GCGG AGAAAA ATAAT ATCCC GTTT GAAGA
 4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
 GGAATAGCGTAAC TTTAGGC GCTCTAAC GCCTCTTT ATTATA GGGG CAAA ACTT CT
 L I A L K I R E I A E K N N I P V F E D -

 TCCGCC GCTCGCAC GCTCCATGTT GCGCAAGTCTCGATCGATAGTGTGATTCCACCAGC
 5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100
 AGGCGGGGAGCGTGCGAGGTACAACGCGTTAGAGCTAGCTATCACACTAAAGGTGGTCG
 P P L A R S M F A Q V S I D S V I P P A -

 TTTT ACAAGGCTGTAGCTGAGCTCGTTCATGGGTTACGCCATGAAGTCATCGAAAAT
 5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5160
 AAAAATGTTCCGACATCGACTCGAGCAAGTAGGCCAATGCGGTACTTCAGTAGCTTTA
 F Y K A V A E L V H R V Y A M K S S K I -

 ACGGGTTCAATAAACCA**ATGAAAAAATCCGCTATTCTGAAAAGCGGGAAATGATCGTC**
 5161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5220
 TGCCCAAGTTATTTGGTTACTTTTTAGGCGGATAAGACTTTGCCCTTACTAGCAG
orfY M K K S A Y S E K R E M I V -
 R V Q *

 GCAGAGGCGATCAACCGATGCCACCGA ACTGCGCTGCTCGATCCGGCCGACCTGATT
 5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280
 CGTCTCCGCTAGTGGGCTAGCGGTGGCTGACGCGGACGAGCTAGGCCGGCTGGACTAA
 A E A I N P I A T E L R L L D P A D L I -

 TCATTGCTCAGATT CGAGTGCTACGGCAGCATTGCCACCTCGTCTCGT CGGCCGGAG
 5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340
 AGTAACGAGTCTAAGCTCACGATGCCGCTAACGGCTGGAGCAGAGCAGGCCGGCGCCTC
 S L L R F E C Y G S I A D L L V S S A A E -

 CTTTATTATCATCCGGCACGATCAATT CGGTGCCGGTGGCGAATACAGGCTCGAATGG
 5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400
 GAAATAATAGTAGGCCCGT GCTAGTTAAAGCCACGGCCACCGCTTATGTCCGAGCTTACC
 L Y Y H P G T I N F G A G G E Y R L E W -

 GAAGGGCGCCGGAGATCGT CCTCGATCTCGA ACTGAAACCGCACGGCGCGACGGTTAT
 5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460
 CTTCCCCGCGGCCTCTAGCAGGAGCTAGAGCTT GACTTGGCGT GCGCGCTGCCAAATA
 E G A P E I V L D L E L K P H G A T V Y -

 GCGCAATTGATTCTGGCCAACGAGCACGCTGCGGTGAGATCAATCATGTT CGTT CAG
 5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520
 CGCGTTAACTAAGACCGGTTGCTCGT GCGACGCCAGCTCTAGTTAGTACAAGCAAAGTC
 A Q L I L A N E H A A V E I N H V S F Q -

AACCCTCGAAAATCCGGACGAGAACACCGAATTCTCCGTAGAGCCTGACGGCTGCC
 5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5580
 TTGGGAAGCCTTTAGGCCTGCTCTGGCTTAAGAGGGCAGTCGGACTGCCGACGG
 N P S E N P D E N T E F L R Q S L T A A -
 CGATTCTGTGCGCCGCCAGGGCGAAGCGGCCTGAGCCAGTCCAGCGGACATTTCGTA
 5581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5640
 GCTAACGACAGCCGGCGTCCGCTTCGCCGACTCGTCAGGTCGCCGTAAAGCAT
 R F V S A R Q G E A A *
 TATTATCCATTGCGCCCTCCGAATTGCGGGCGCGATGGCTTCATTGCCGTTTTCA
 5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
 ATAATAGGTAAACGGAAAGGCTTAAGCGCCCGCTACCGAAGTAAGCCGCAAAAAAGT
 CCCGACCTTGCCGTAAAGCGTGTGGTTATGCAAACCGGTGTAAAGGCAAGGAACGCC
 5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
 GGGCTGGAACGGACTTCGACAGCAAATACGTTTGCCACACTTCGTTCCCTGCGG
 TTGCAAATCAGCGTTGTTGGTACCTATCGAATTAAACGATTGTTAACGAACGGCAG
 5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5820
 AACGTTAGTCGAAACAACAAACCATGGATAGCTTAATTGCTAAACAATTGCTGCCGTC
 GTCGCGGTGGCTTTTACCATCGCTGATGCGCATGATGCCCTGCTCGTTCGCGC
 5821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5880
 CAGCGCCACCGAGAAAATGGTAGCGACTACGCGTACTACGGAGACGAGCAAAGCCGCG
 AGCGCCGGATTTCCGACAGTACCAATTGGGTGGACCCAATGACCAGCATTGACCA
 5881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5940
 TCGCGGCCCTAAAAGGGCTGTCATGGTAACCCACCTGGTTACTGGTCGTAAGACTGGT
flaD M T S I L T N -
 ATGCGGGCGATGGCCGCGCTGCAAACCTTGCATGATCGACAAGAAATCTGAGACGA
 5941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6000
 TACGCCGCCGCTACCGGCGCACGTTGGAACCGTACTAGCTGTTAGAGCTCTGCT
 A A A M A A L Q T L R M I D K N L E T T -
 CGCAGGGCGGTGTGCGTCCGGCTACCGTGTGAAACGGCGCGACAATGCCGCTACT
 6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6060
 GCGTCCCGCACACAGCAGGCCGATGGCACAGCTTGGCCGCCGCTGTTACGGCGGATGA
 Q A R V S S G Y R V E T A A D N A A Y W -
 GGTCTATCTCCACAACCATGCGCTCCGACAATGCAGCGCTCTGGCGTGCAGGATGCAT
 6061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6120
 CCAGATAGAGGTGTTGGTACCGCGAGGCTGTTACGTCGAGAGGCCGACGTCCTACGTA
 S I S T T M R S D N A A L S A V Q D A L -
 TGGGACTGGCGCCCAAGGTTGATACGGCTATGACGCTTGCAGACTCGATCGAGG
 6121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6180
 ACCCTGACCCGCGGGTCCAACATGCCGGATACTGCGAGAACGCTTGAGCTAGCTCC
 G L G A A K V D T A Y D A L A N S I E V -
 TCGTCAAGAAAATCAAGGAAAAGCTT
 6181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6206
 AGCAGTTCTTTAGTTCCCTTCGAA
 V K K I K E K L -

A3. Vergleiche der abgeleiteten Sequenzen von MotA, MotB, MotC, FliM, FliN und FliG von *S.meliloti* und *R.lupini* H13-3

MotA

<i>S. meliloti</i>	1	MNIIIGLLVTFGCILGGYMAMGGHLEVNLNPQFELMIIGGAGIGGFIMANS	50
		: : : : : : :	
<i>R. lupini</i>	1	MNIVIGLIITFGCIIGGYMAMGGHLDVLVQPFELLIIGGAGLGGFIMANP	50
		. : . .	
<i>S. meliloti</i>	51	MKVVKDTGKALGEAFRHKVPKEREYLDLGVLYSLMRDLRTKSRNEIESH	100
		. : . .	
<i>R. lupini</i>	51	MKVVKDSGKALGEAFKHHSVPKERNYLDLGVLYSLMRDLRTKSRNEIEAH	100
		. : . .	
<i>S. meliloti</i>	101	IDNPPEESSIFQSAPTVLQNKELTAFICDYVRLIIIGNARSYEIBALMDEE	150
		. : . . . : :	
<i>R. lupini</i>	101	IDNPPEESSIFQSAPSVLKNKELTSFICDYVRLIIIGNARSHEIEALMDEE	150
		. : . . . : . .	
<i>S. meliloti</i>	151	IQTITHDKMKCYHAMTTMGDALPAIGIVAAVLGVVIKAMGAISEAPEVLGA	200
		: : 	
<i>R. lupini</i>	151	IETILHDKLKPYHAITTMGDSFPAIGIVAAVLGVVIKAMGKINESPEVLGG	200
		: : 	
<i>S. meliloti</i>	201	KIAAALVGTLGVFLSYSIVGPLVANIKSVREKQNRLYIVVKQTLIAYMN	250
		: : : . .: . : :	
<i>R. lupini</i>	201	LIGAALVGTMGLIILSYSICNPLASQVKIVRTKQHRLYIVVKQTLIAYMN	250
		: : : . . .	
<i>S. meliloti</i>	251	GSVPQVALEYGRKTISAYERPSIDAVEQEEMMNPGGGSESKAA	292
		: : . . .	
<i>R. lupini</i>	251	GSVPQVALEYGRKTISNYERPSIDAVEQEEMNPAGG..ENKAA	290
		: : . . .	

MotB

MotC

<i>S. meliloti</i>	1	MLKRLCTLLAASALAAPLALGLARANGTEELTPYKMRISLQVQDS	46
	:	. : : :	
<i>R. lupini</i>	1	MSVTKSSKRWVFLAATLCGLGAEPAKVFAQSQDNLMPYAMLRSLQFVQDS	50
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	47	VVLGDHSAIEMQRFMLGAIDERLRAADPSAFRDPRNVDAAALVYVMSGGNP	96
	: : .. . :		
<i>R. lupini</i>	51	VTMGDHSATEMQRFLQLQTIDERLKSAPSIAFKDPRNVDAALVYAMSGGNP	100
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	97	ATLDLLADRDIEGNFDSRVTDALRQYLNGKGPLIVENLTKAAPEYKNSRI	146
	: : . . : . : . : .		
<i>R. lupini</i>	101	ATLELLVARDVDGNFDSRVADILRKYLSKGKGTLLVAQSIAMVPEYRGTRI	150
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	147	GPYLFLILGNAMSQQDPIEAMKHYDWARLTAPGTIIEEAALRRSVSILAAG	196
	. : : : . . .		
<i>R. lupini</i>	151	GAYLALIGGNVTIPRDPVAALGFYDIARLEAPGTIVEEAALRRSLAIAVE	200
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	197	AGLPEKGFRYALNYARRYLTSPYASQFADVFVELAVAHFDEAADGRVSEI	246
	: : . :		
<i>R. lupini</i>	201	DGDAGRGEVYAQRYARRFLHSPYASQFADLLVSLVVKRVDSIGHDTIEET	250
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	247	LSFMDSARQREVYLRVARRAAIAGNQALARLASSRRAEELAGDDSSRSQVL	296
	. . : . . . : . : . .		
<i>R. lupini</i>	251	FAMMDAERQKEAYLRLSRLAAISGKDSLARMAALKAKALSPDMPDQPQVQ	300
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	297	ASFYEGLAAPVPSADVSAEALEAIPDEKLSPRDALREAAKAVADAVR	346
	. . : : : . : :		
<i>R. lupini</i>	301	ANLYESLSNIGTPDVSAIETIGQIPEAQLSDRDRDALRDAARAIADQVVR	350
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	347	PPFGESPAQAPAPIAERPAGEQSELAAEESGSGMSPFQGPVEASPGRPSE	396
	. : : . : : . :		
<i>R. lupini</i>	351	PP...SP.....QPGADPGVTAGQGAGSG.APANE..AASAETKGI	385
	.	.	
<i>S. meliloti</i>	397	MTAEADAAAASDDPALDGFLASGRSKIDEIDALLKR.EGQ.	434
	: . . : . :		
<i>R. lupini</i>	386	WRVENHKAEDEGENVRQLVTSGRSKLDIEDSSLKKGEGAP	425

FliM

<i>S. meliloti</i>	1 ..MSTSTASNVHAFDRRLIARMT GALGDDK VIGRTALELAQVFDELLPGV	48
	. . : : : . : . :	
<i>R. lupini</i>	1 MTMAKAAQQRAPVIDTSLLAKLTGGLSDRKTIAKVGSDIGHLYSEFLPDI	50
	.	.
<i>S. meliloti</i>	49 LQSETGCDVTIAYAGFRTGLRNDLIAALGDGVLLGDFSLRNWCADFQVGC	98
	: : . : . . .	
<i>R. lupini</i>	51 FHSETGIAIDVEYIGSESGLMTDLIANIGGNFSVADCSLRNWCNPNFMMAV	100
	.	.
<i>S. meliloti</i>	99 DSPVLIALVEALLGAEPTSIEEPAPRSLSKIEIDVALPVFHGIAEVRLTA	148
	. . . : . : . .	
<i>R. lupini</i>	101 GNGFVIALMERMLGAAADTIGEPDERSLSHIELDLAAMVLGRIGGVRLSG	150
	.	.
<i>S. meliloti</i>	149 VNAPGGFEPVVGRPYNSAERA KPD PVLEDVFAASIDMTI GLGPVLSTFSV	198
	: : . : . : . : . : : ..	
<i>R. lupini</i>	151 VNAPGGFEATIDL PFTANGKSAFEEMIAGLYGVTVRMKIAIGKVSEFAL	200
	.	.
<i>S. meliloti</i>	199 IVPQSTLLKTRIVSRKGAGEDRNAKTEWTEQLEEQVRSAVLEARIRLE	248
	. . : . : : :	
<i>R. lupini</i>	201 IVPQRPLLKTSIAAPKASAQALKQAEWVDLISEQVKRSQVTLEARIKLE	250
	.	.
<i>S. meliloti</i>	249 SLTLDTLSRLQAGDVIPFHD..GQDVRVEVSANGRDLYVCEFGRSGSRYT	296
	. : : :	
<i>R. lupini</i>	251 TLTLRTISRLVAGDVIPFQDLKQDDIGVEVSANGSKLYNCEFGKSGDRYM	300
	.	.
<i>S. meliloti</i>	297 VRVKDTHGSEQDILRHIMS	315
	. . . : :	
<i>R. lupini</i>	301 VRVKNNVSTDDEILRHLMG	319

FliN

FliG

<i>S. meliloti</i>	1	MTDFGSFEAQAAQALA.QPLSQTEKAAAVALMAGKSIAGKLLKFFTQSELQ	49
	. : :		
<i>R. lupini</i>	1	MMDFEDF...GNPLAGKPLSQADKAAAVLLAMGKGVAGKLLKFFTQHELQ	47
<i>S. meliloti</i>	50	AIIAAAQSLRAVPPHELEALVNEFDLFTEGAGLMDNAKAMESILEEGLT	99
	. . : :		
<i>R. lupini</i>	48	MISSAQTLRVIPPDELAQIVAEFEDLFTEGTGLMDNAKAIESTILEEGLT	97
	.	.	.
<i>S. meliloti</i>	100	PDEVGDLLGRRATFQSYEASIWDRLMDCDPVIIAQLLAREHPQTIAVLS	149
	: . : : : .		
<i>R. lupini</i>	98	PEEVDSLLGRRAAFQAYEASIWDRLQEAEPEFVGKFLLREHPQTIAVILS	147
<i>S. meliloti</i>	150	MMPSSFGAKVLLQLSDKQRPEILNRAVNICKVNPKAIIIEARVIEIIIE	199
	: : . : .		
<i>R. lupini</i>	148	MLPSSFGAKVLLTIPEEQRADIMRNKVEVSPAAQIIEKRVVNLIN	197
<i>S. meliloti</i>	200	MEADRNSPGPAKIAEVNNELEKPQVDTLLASLETISTDSVKKVRPKIFLF	249
	. : . : .		
<i>R. lupini</i>	198	IEAERNAGGSTKVADLMNEMEKPQVDTLLSSLETLSKEAANKVKPKIFLF	247
	.	.	.
<i>S. meliloti</i>	250	DDILFMPQRSRVQLFNDVSTDVTITMALRGSAELRESILASIGARQRRMI	299
	:		
<i>R. lupini</i>	248	DDLMFMPQRSRVLLINDVSADVLTALRGATMEIKECVLSSISPRQRRMI	297
	.	.	.
<i>S. meliloti</i>	300	ESDLAAGDAGINPRDIAIARRSITQEAIRLSASGQLELKEPEAA....	345
<i>R. lupini</i>	298	ESDLAVPQASINTREVIAIRRVAQEAIRLANSGQIQQLKEASTEEQSAAA	347

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schmitt dafür, daß ich am Lehrstuhl für Genetik dieses faszinierende Thema bearbeiten durfte. Außerdem bedanke ich mich für viele spannende Diskussionen und zahlreiche Anregungen, nicht zuletzt beim Zu-Papier-Bringen dieser Dissertation.

Besonders danke ich Frau PD Dr. Birgit Scharf für ihren Ansporn, die Durchsicht meiner Arbeit, die Bereitstellung des FliG-Antikörpers und dafür, daß sie immer ein offenes Ohr für auftretende Probleme hat.

Dr. Patrick Babinger bin ich für tatkräftige Unterstützung bei der ständigen Herausforderung Computer und seine Geduld zu großem Dank verpflichtet.

Meiner Labornachbarin Karin Babinger danke ich für die zuverlässigen Enzym- und Oligonukleotid-Bestellungen sowie für zahlreiche „grenzüberschreitende“ Diskussionen.

Herzlich bedanke ich mich bei Elke Eggenhofer für die Bereitstellung des MotC-Antikörpers und für die engagierte Mitbetreuung meines Praktikumsversuchs, bei Andrea Brinnich für die exzellente Kursvorbereitung.

Sabine Schneider danke ich für die gute Versorgung mit den notwendigen Büromaterialien und für weitreichende Gespräche während unserer Mittagspausen.

Allen übrigen Lehrstuhlmitgliedern sei für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima gedankt.

Dank auch an Dr. Frank Pfannenschmid für die zügige Sequenzierarbeit.

Vor allem aber bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht haben und die immer für mich da sind.

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

Ursula Attmannspacher