

**Funktionsanalyse und zelluläre Lokalisierung  
der neun Chemorezeptoren  
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  
**VERONIKA M. MEIER**  
aus Niederpörling

Regensburg, April 2007

Promotionsgesuch eingereicht am:	24. April 2007
Die Arbeit wurde angeleitet von:	PD Dr. Birgit Scharf
Prüfungsausschuss:	
Vorsitzender:	Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Erstgutachter:	PD Dr. Birgit Scharf
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
Dritter Prüfer:	Prof. Dr. Reinhard Sterner

Gott gebe mir

die Gelassenheit,  
Dinge hinzunehmen,  
die ich nicht ändern kann,

den Mut,  
Dinge zu ändern,  
die ich ändern kann,

und die Weisheit,  
das eine vom anderen zu unterscheiden.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Material .....	14
2.1	Bakterien und Plasmide .....	14
2.2	Oligonukleotide .....	21
2.3	Chemikalien und Enzyme .....	26
2.4	Nährmedien und Antibiotika .....	28
2.4.1	Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	28
2.4.2	Medien zur Anzucht von <i>S. meliloti</i> .....	29
2.4.3	Medium zur Anzucht von <i>Medicago sativa</i> .....	31
2.5	Puffer und Lösungen .....	31
2.5.1	Lösungen für Mini-, Midi- und Maxiplasmidisolierung .....	31
2.5.2	Lösungen für genomische DNA-Isolierung .....	32
2.5.3	Lösungen für die DNA-Auftrennung (Agarosegelelektrophorese) .....	32
2.5.4	Lösungen für <i>Southern</i> -Hybridisierung .....	33
2.5.5	Lösungen für die Auftrennung von Proteinen .....	34
2.5.6	Lösungen zum Transfer von Proteinen .....	35
2.5.7	Lösungen für die Expression und Reinigung von Proteinen .....	35
2.5.7.1	Lösungen für die Proteinreinigung mittels IMPACT .....	35
2.5.7.2	Lösungen für die Proteinreinigung aus <i>inclusion bodies</i> .....	36
2.5.8	Lösungen für die Antikörperreinigung .....	37
2.5.9	Lösungen für Reportergergen-Analysen (ONPG-Test) .....	37
2.5.10	Lösungen für die Nodulations-Experimente .....	37
3	Methoden .....	38
3.1	Kultivierung von Bakterien .....	38
3.1.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	38
3.1.2	Anzucht und Lagerung von <i>S. meliloti</i> .....	38
3.2	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren .....	39
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	39
3.2.1.1	Mini-Plasmidisolierung .....	39
3.2.1.2	Midi-Plasmidisolierung .....	39
3.2.1.3	Maxi-Plasmidisolierung .....	40
3.2.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. meliloti</i> .....	40
3.2.3	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese .....	41
3.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	41
3.3	Enzymatische Modifizierung von DNA .....	42
3.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	42
3.3.2	Alkalische Phosphatase-Behandlung .....	42
3.4	DNA-Techniken .....	42
3.4.1	Ligieren von DNA-Fragmenten mit Vektoren .....	42
3.4.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	43
3.5	PCR-Methoden .....	43
3.5.1	Amplifikation von DNA .....	43
3.5.2	PCR von DNA aus einer <i>S. meliloti</i> -Einzelkolonie .....	45
3.5.3	Konstruktion der <i>gfp</i> -Fusionsplasmide .....	45
3.5.4	PCR-Mutagenese ( <i>overlap extension</i> ) .....	47
3.5.4.1	Herstellung von <i>in frame</i> -Deletionen .....	47
3.5.4.2	Erzeugung chromosomaler Rezeptor- <i>gfp</i> -Fusionen .....	48
3.5.4.3	Erzeugung der chromosomalen <i>cheA-mrfp</i> -Fusion .....	49

3.6	DNA-Sequenzanalysen und Auswertungsverfahren.....	51
3.7	Konjugativer Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>S. meliloti</i> .....	51
3.8	Nukleinsäuretransfer und Hybridisierung ( <i>Southern blot</i> ).....	52
3.8.1	Nukleinsäuretransfer .....	52
3.8.2	Markierung von Sonden .....	53
3.8.3	Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion .....	53
3.9	Reporter-Gen-Analysen (ONPG-Test oder <i>Miller Assay</i> ) .....	54
3.10	Isolierung rekombinanter Proteine .....	55
3.10.1	Das IMPACT <sup>TM</sup> -CN-System.....	55
3.10.2	Isolierung von McpY und IcpA aus <i>inclusion bodies</i> .....	57
3.11	Dialyse von Proteinlösungen.....	58
3.12	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	58
3.13	N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen durch Edman-Abbau .....	59
3.14	Proteinchemische Methoden .....	59
3.14.1	Gewinnung von denaturierten Proteinproben .....	59
3.14.2	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese .....	60
3.14.3	Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen ( <i>Western blot</i> ) .....	60
3.14.4	Affinitätsreinigung von Antikörperproben.....	60
3.14.5	Immunochemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz .....	61
3.14.5.1	ECL <i>Western blotting kit</i> .....	61
3.14.5.2	<i>SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Western blotting kit</i> .....	61
3.14.5.3	Semiquantitative Bestimmung von <i>S. meliloti</i> -Proteinen im Zellextrakt .....	62
3.15	Auftrennung von <i>S. meliloti</i> -Zellfragmenten .....	63
3.16	Fluoreszenzmikroskopie.....	63
3.17	Analyse des Schwärmverhaltens motiler <i>S. meliloti</i> -Zellen.....	64
3.18	Analyse der Schwimmggeschwindigkeit motiler <i>S. meliloti</i> -Zellen.....	65
3.19	Analyse der Reaktion auf Lockstoffe motiler <i>S. meliloti</i> -Zellen im Kapillartest.....	65
3.20	Nodulations-Experimente.....	67
3.20.1	Anzucht der Keimlinge von <i>Medicago sativa</i> .....	67
3.20.2	Infektivitäts-Test .....	68
3.20.3	Kompetitivitäts-Test.....	69
3.20.4	Färbung der Knöllchen.....	69
4	Ergebnisse .....	70
4.1	Identifizierung von acht <i>mcp</i> -Genen und einem <i>mcp</i> -ähnlichen Rezeptorgen im Genom von <i>S. meliloti</i> .....	70
4.2	Konstruktion von <i>S. meliloti</i> -Mutanten.....	71
4.2.1	Deletion von Rezeptorgen in verschiedenen Stämmen .....	71
4.2.2	Bereitstellung von Kontrollstämmen .....	73
4.2.2.1	Deletion des putativen zweiten <i>cheA</i> -Gens und phänotypische Charakterisierung der resultierenden Mutante .....	73
4.2.2.2	Deletion verschiedener <i>cheW</i> -Gene und phänotypische Charakterisierung der resultierenden Mutanten .....	76
4.2.3	Erzeugung von chromosomalen Rezeptor-GFP-Fusionen.....	77
4.3	Computergestützte Sekundärstrukturanalysen .....	78
4.4	Phänotypische Charakterisierung der neun putativen Chemorezeptoren von <i>S. meliloti</i> .....	82
4.4.1	Bestimmung der Schwärmfähigkeit der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Bromfield-Schwärmplatten .....	82

4.4.2	Reaktion der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Zucker, Aminosäuren und organische Säuren .....	84
4.4.2.1	Vortest zur Identifizierung geeigneter Lockstoffe .....	84
4.4.2.2	Untersuchung der Lockstoff-Qualität.....	85
4.4.2.3	Schwärmfähigkeit von Rezeptor-Deletionsmutanten auf RB-Schwärmpfatten mit nur einer einzigen Kohlenstoffquelle.....	86
4.4.3	Bestimmung der Schwimmgeschwindigkeit und der Chemokinese von Rezeptor-Deletionsmutanten.....	89
4.4.4	Reaktion der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Lockstoffe im Kapillartest..	92
4.4.5	Wahrnehmung von Energie, Sauerstoff und Licht – Energietaxis.....	96
4.4.5.1	Untersuchungen zur Energietaxis von <i>S. meliloti</i> .....	96
4.4.5.2	McpY – eine Sensor für Energie, Sauerstoff oder Licht? .....	98
4.5	Komplementationsanalysen .....	99
4.6	Untersuchungen zur Symbiosefähigkeit von Rezeptor-Deletionsmutanten mit der Wirtspflanze <i>Medicago sativa</i> .....	101
4.6.1	Reaktion der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Samenexsudat im Kapillartest .....	102
4.6.2	Symbiosefähigkeit der Rezeptor-Deletionsmutanten.....	104
4.6.2.1	Infektivitäts-Test .....	104
4.6.2.2	Kompetitivitäts-Test.....	106
4.7	Untersuchungen zur Expression der Rezeptorgene.....	108
4.7.1	Translationale <i>lacZ</i> -Fusionen der Rezeptor-Promotoren .....	108
4.7.2	Expressionsniveau der Rezeptorgene.....	109
4.7.3	Wachstumsabhängige Aktivität der Rezeptor-Promotoren.....	110
4.7.4	Sind die Rezeptorgene Klasse III-Gene? .....	113
4.7.5	Expression der Rezeptorgene in Wurzelknöllchen .....	116
4.8	<i>In vivo</i> -Lokalisierung der Chemorezeptoren.....	118
4.8.1	Stabilität der Rezeptor-GFP-Fusionen .....	121
4.8.2	<i>In vivo</i> -Lokalisierung der Rezeptoren in <i>S. meliloti</i> -Wildtypzellen.....	124
4.8.3	Lokalisierung einzelner Rezeptoren während der Zellteilung .....	128
4.8.4	Abhängigkeit der Rezeptor-Lokalisierung von anderen Chemotaxisproteinen.....	130
4.8.5	Sind die cytoplasmatischen Rezeptoren McpY und IcpA membranständig? .....	135
4.8.6	Kolokalisierungsstudien von Rezeptoren und CheA .....	136
5	Diskussion.....	139
5.1	Rolle der Rezeptoren bei der Chemotaxis.....	140
5.2	Rolle der Rezeptoren bei der Symbiose .....	143
5.3	Einordnung der Rezeptoren in die Hierarchie des <i>flagellar regulon</i> .....	145
5.4	Lokalisierung der Rezeptoren von <i>S. meliloti</i> .....	147
5.5	Ausblick .....	150
6	Zusammenfassung.....	153
7	Literaturverzeichnis.....	156

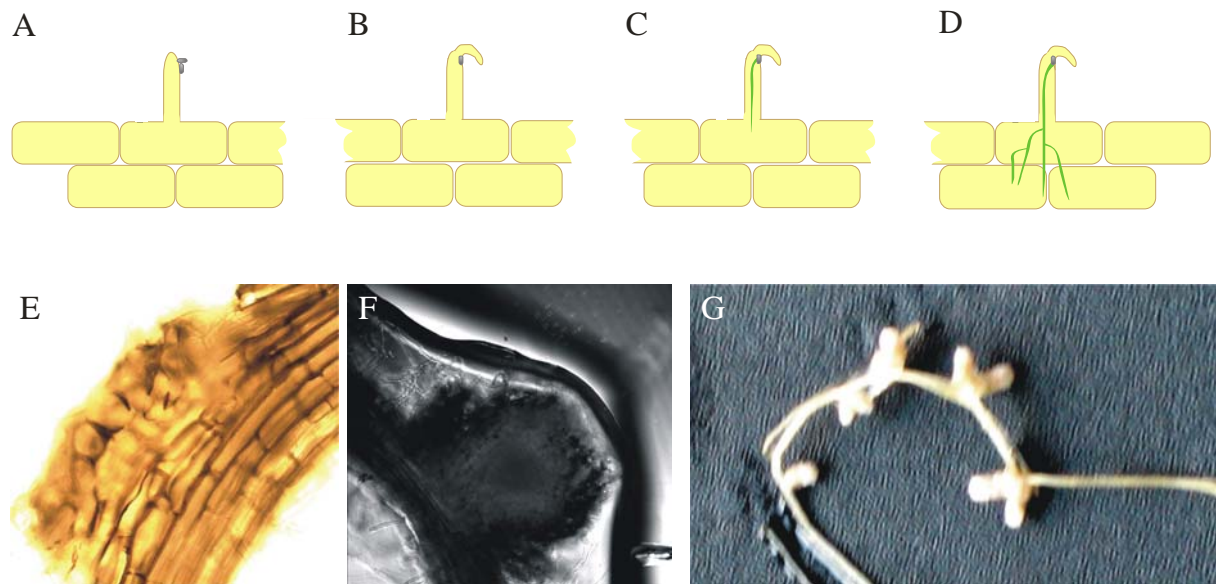
## Abkürzungen

AA	Acrylamid
AK	Antikörper
Ap	Ampicillin
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinder-Serumalbumin)
ccw	counterclockwise
cw	clockwise
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
GFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
Km <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i> (monomeres rot fluoreszierendes Protein)
NaAc	Natriumacetat
Nm	Neomycin
Nm <sup>R</sup>	Neomycin-Resistenz
NP-40	Nonidet-P40
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sm	Streptomycin
Sm <sup>R</sup>	Streptomycin-Resistenz
Tc	Tetracyclin
Tc <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
TEMED	Tetramethylethylaminomethan
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glukuronid-Cyclohexylammonium-Salz

# 1 Einleitung

Die Symbiose zwischen Leguminosen (Hülsenfrüchtler) und den gram-negativen Rhizobien ist von enormer Bedeutung für die Landwirtschaft. Denn zu den Leguminosen gehören landwirtschaftliche Nutz- und Futterpflanzen, wie Sojabohne (*Glycine sp.*), Erbse (*Pisum sp.*), Bohne (*Phaseolus sp.*), Klee (*Trifolium sp.*) und Luzerne (*Medicago sativa*). Aufgrund ihres hohen Eiweißgehaltes sind die Leguminosen ein weltweit wichtiges Nahrungsmittel. Durch die Symbiose mit Rhizobien erhalten Leguminosen eine optimale Versorgung mit Stickstoff. Weder Rhizobien noch Leguminosen können allein atmosphärischen Stickstoff durch Reduktion zu Ammoniak fixieren. Dies ist erst in der symbiotischen Gemeinschaft möglich (Fischer, 1994; Ludwig *et al.*, 2003; Oke & Long, 1999). Rhizobien werden durch Substanzen angelockt, die die Leguminosenwurzeln in den Boden abgeben (Abb. 1A; Rovira, 1965; Uren, 2001). Als spezifische Signalmoleküle werden unter anderem Flavonoide in den Boden sekretiert (Rovira, 1965; Uren, 2001), die von den Rhizobien aufgenommen werden und daraufhin die Expression bakterieller Nodulationsgene aktivieren (*nod*-Gene; Oke & Long, 1999). Die Nod-Faktoren, Genprodukte der *nod*-Gene, verursachen bei der Wirtspflanze die Krümmung und Deformation der Wurzelhaare und lösen Zellteilungen und -morphogenese aus, die zur Bildung von Wurzelknöllchen (*nodule*) führen (Abb. 1B, E-G; Übersichtsartikel siehe Brewin, 1991; Gage, 2004; Hadri *et al.* 1998). An den deformierten Wurzelhaaren dringen die Rhizobien über Endocytose in die Pflanzenzellen und wandern über den gebildeten Infektionsschlauch in die entstehenden Wurzelknöllchen (Abb. 1B und C). Hierin differenzieren sie zu verdickten und verzweigten Zellen, den Bakteroiden, die von der Pflanze mit Nährstoffen und Energie versorgt werden. Durch die sauerstoffempfindliche Nitrogenase wandeln die Bakterioide den atmosphärischen Stickstoff in Ammoniak um, der sofort zu Glutamin und Asparagin umgesetzt wird (Ammoniak-Assimilation).



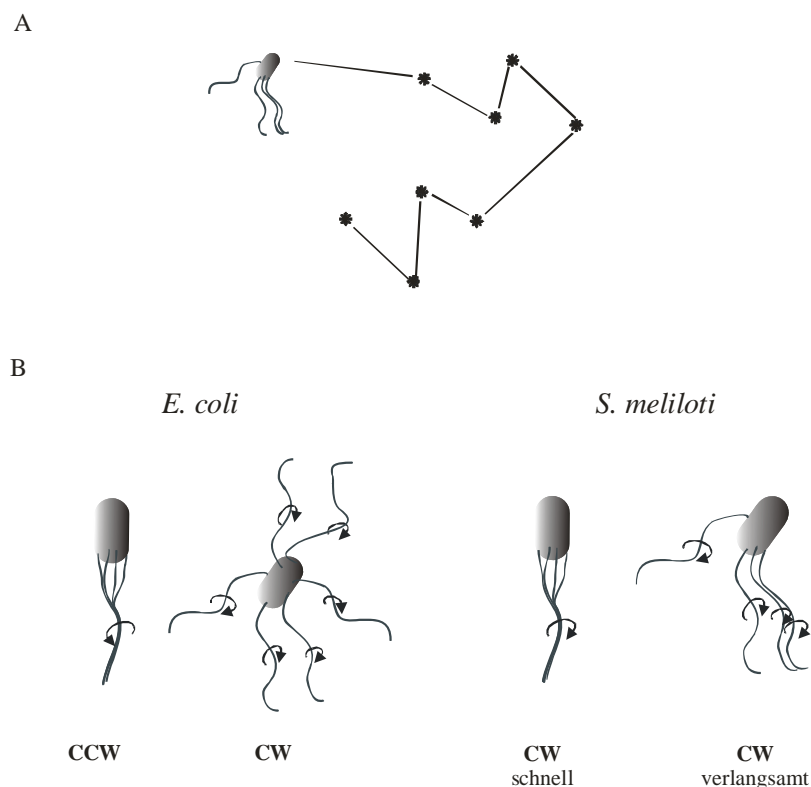


**Abb. 1.** Verschiedene Ansichten und Stadien der Knöllchenbildung von *M. sativa*, die durch die Symbiose mit *S. meliloti* induziert wurde. A: Anheftung von Rhizobien an die Wurzelhaare von *M. sativa*. B: Exkretion von Nod-Faktoren durch die Rhizobien verursacht Krümmung der Wurzelhaare. C: Eindringen der Rhizobien in eine Wurzelhaarzelle und Wanderung innerhalb des Infektionsschlauchs. D: Wachstum des Infektionsschlauchs in tiefere Gewebeschichten. E: Lichtmikroskopische Aufnahme des veränderten Wurzelgewebes durch ein entstehendes Wurzelknöllchens fünf Tage nach der Infektion. F: Lichtmikroskopische Aufnahme eines etwa fünf Tage alten Wurzelknöllchens von *M. sativa*. G: Wurzelknöllchen von *M. sativa* 14 Tage nach der Infektion mit *S. meliloti*. A-D: verändert nach Brock Mikrobiologie. Die Bilder E-F wurden am konfokalen *laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) aufgenommen.

*Sinorhizobium meliloti* und Luzerne dienen als Modellsysteme für Untersuchungen symbiontischer Interaktionen zwischen Rhizobien und Leguminosen. Die hohe Wirtsspezifität wird durch die Nod-Faktoren gewährleistet (Dénarié *et al.*, 1996; Young *et al.*, 2003). Die *nod*-Gene liegen, neben anderen, für Symbiose und Stickstofffixierung essentiellen Genen, auf zwei Megaplasmiden, pSymA und pSymB (Barnett *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001). Die Erkennung spezifischer, von der Pflanzenwurzel sekretierter Signalmoleküle durch die Nod-Faktoren löst die Transkription weiterer *nod*-Gene und somit die Etablierung der spezifischen Symbiose aus.

Zur Orientierung von *S. meliloti* im Boden und zum Auffinden der Wurzelhärchen von *M. sativa* sind Motilität und die Wahrnehmung der von der Pflanze sezernierten Signalmoleküle essentielle Voraussetzungen (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Die Fähigkeit, derartige chemische Signale zu erkennen und in eine gerichtete Bewegung umzusetzen, wird als Chemotaxis bezeichnet.

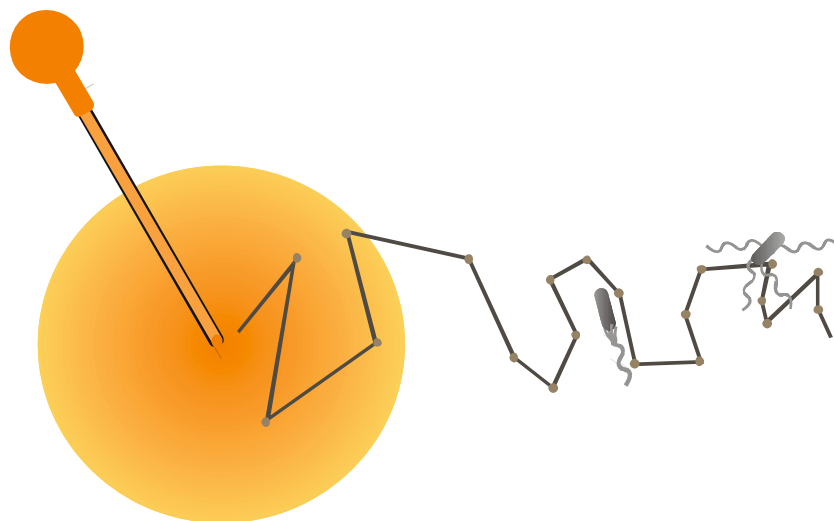
Darüberhinaus können Bakterien chemotaktisch gesteuert ein nährstoffreiches und schadstoffarmes Milieu aufsuchen, wobei sie auf Veränderungen in der Konzentration von chemischen Lock- bzw. Schreckstoffen reagieren. Da Bakterien zu klein sind um einen chemischen Gradienten entlang ihres „Körpers“ zu messen, müssen sie während der Bewegung die Konzentration von Signalmolekülen zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander vergleichen, d. h. sie reagieren auf einen temporären Gradienten der Signalmoleküle in ihrer Umgebung. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Wahrnehmung von Lock- bzw. Schreckstoffen wurde für die Enterobakterien *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, die zur  $\gamma$ -Untergruppe der Proteobakterien gehören, am besten untersucht (Falke & Hazelbauer, 2001; Stock & Surette, 1996). In der Abwesenheit eines Lockstoffes schwimmen die Bakterien in einer zufälligen Suchbewegung umher (*random walk*; Berg & Brown, 1972). Wie Abb. 2A zeigt, wechseln sich dabei geradlinige Läufe und Taumelbewegungen, bei denen das Bakterium abrupt die Schwimmrichtung ändert, ab.



**Abb. 2. Schwimmuster (A) und Flagellenrotation (B) von *E. coli* und *S. meliloti*. A: Geradlinige Läufe werden durch Linien, Taumelbewegungen und daraus resultierende Richtungsänderungen durch Sterne markiert. CCW: *counterclockwise*; CW: *clockwise*. Nach Scharf & Schmitt, 2002.**

Auch die seit den 90er Jahren verstärkt untersuchten Vertreter der  $\alpha$ -Untergruppe der Proteobakterien, wie beispielsweise *S. meliloti*, zeigen dieses Schwimmmuster. Aber es wird durch verschiedene Mechanismen verursacht, die eine Konsequenz des phylogenetischen Abstands zwischen *E. coli* und *S. meliloti* (ca. 500 Millionen Jahre; Ochman & Wilson, 1987) und der Anpassung an unterschiedliche Lebensbedingungen (Scharf & Schmitt, 2001) sind.

Während geradliniger Läufe bilden die rotierenden Flagellen ein Bündel, das die Zelle wie eine Schiffsschraube vorwärtsschiebt. Bei *E. coli* wird die Taumelbewegung durch eine Umkehrung der Flagellenrotation von *ccw* (*counterclockwise*) nach *cw* (*clockwise*) ausgelöst (Abb. 2B). Dabei fällt das Flagellenbündel auseinander und die Zelle taumelt (Berg, 2000; Berg & Brown, 1972). Im Gegensatz dazu rotieren die Flagellen von *S. meliloti* nur in einer Richtung (*cw*), wobei sie aber ihre Rotationsgeschwindigkeit variieren können (Abb. 2B). Durch eine asynchrone Verlangsamung der Rotation einzelner Flagellen wird ebenfalls ein Auseinanderfallen des Flagellenbündels ausgelöst, das in einer zufälligen Neuorientierung des Bakteriums resultiert (Götz & Schmitt, 1987; Platzer *et al.*, 1997; Scharf, 2002; Schmitt, 2002). Im Anschluss an die Taumelbewegung bilden die Flagellen erneut ein Bündel und die Zelle schwimmt wieder geradlinig weiter. So bewegt sich die Zelle zufällig und ungerichtet in ihrer Umgebung. In Anwesenheit eines Lockstoffes wird diese Zufallsbewegung gerichtet (Abb. 3). Die Läufe in Richtung des Lockstoffes werden länger und Taumelbewegungen unterdrückt, so dass sich die Zelle entlang des Lockstoffgradienten bewegt (*biased random walk*, Berg, 2000; Berg & Brown, 1972).



**Abb. 3. Schwimmmuster einer Bakterienzelle in einem Lockstoffgradienten. In Richtung der zunehmenden Lockstoffkonzentration werden die geradlinigen Läufe verlängert und Taumelbewegungen unterdrückt.**

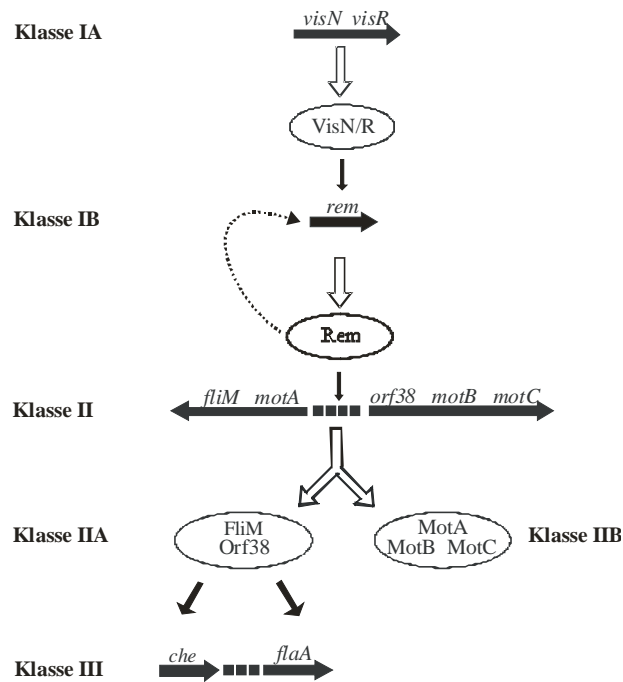
Die Ursachen für die unterschiedlichen Rotationsmodi der Flagellen von Enterobakterien und *S. meliloti* finden sich sowohl im molekularen Aufbau der Flagellen selbst, als auch in der Motorstruktur. *E. coli* besitzt sechs bis acht peritrich insertierte Flagellen. Ein Flagellum gliedert sich in drei morphologische Abschnitte, ein langes helikales Filament und einen flexiblen Haken als externe Komponenten, sowie den Basalkörper. Das Filament besteht aus einer helikalen Schraube aus mehreren 1000 Kopien eines Proteins, dem Flagellin (FliC; Samatey *et al.*, 2001). Aufgrund der schwach strukturierten Oberfläche, die sich im Elektronenmikroskop zeigte, wurden diese Filamente als glatte Filamente bezeichnet (Schmitt *et al.*, 1974). Glatte Filamente können mehrere Konformationen einnehmen, von denen die rechts- (R-) und die linkshändig-helikale (L-) Form die extremsten sind. Geradlinige Läufe werden durch eine Rotation des Motors gegen den Uhrzeigersinn erreicht. Dabei nehmen die Filamente die linkshändig-helikale Form (L-Form) ein und die Flagellen bilden ein Bündel. Bei der Rotationsumkehr werden die Filamente in die rechtshändig-helikale Form gezwungen, wodurch das Flagellenbündel auseinanderfällt und die Zelle taumelt. Die Umlagerung in verschiedene helicale Formen wird als polymorphe Transition bezeichnet (Hotani *et al.*, 1980). Das Filament ist über einen 55 nm langen flexiblen Haken (Hirano *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1996), der aus 120 FlgE-Monomeren aufgebaut ist, mit dem Basalkörperkomplex verbunden.

Der Basalkörperkomplex besteht aus einem zentralen, rotierenden Schaft und vier aufgesetzten Ringsystemen. Die beiden äußeren Ringe, der L- und der P-Ring, befinden sich in der Zellwand und bilden das Drehlager des Flagellenmotors (Francis *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2001). Der MS-Ring und der C-Ring in der Cytoplasmamembran bilden den Rotor. Der C-Ring aus FliG-, FliM- und FliN-Monomeren wird auch als *switch*-Komplex bezeichnet und kontrolliert die Rotationsrichtung (Yamaguchi *et al.*, 1986). Der zentrale Teil des Basalkörpers bildet den Flagellenmotor, der das Drehmoment generiert. Die für die Rotation nötige Energie wird durch den Protonenfluss durch radiär angeordnete Protonenkanäle aus MotA- und MotB-Untereinheiten gewonnen (Kahn *et al.*, 1988). Durch die Verankerung von MotB in der Cytoplasmamembran bildet der Protonenkanal den Stator des Flagellenmotors.

Die Flagellen von *S. meliloti* unterscheiden sich aufgrund ihrer Morphologie von denen der Enterobakterien. Sie bestehen aus vier verschiedenen Flagellin-Untereinheiten FlaA, FlaB, FlaC und FlaD, wobei FlaA das Hauptflagellin ist und mit einem der drei anderen Monomere ein Heterodimer bildet (Pleier & Schmitt, 1989; Scharf *et al.*, 2001). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten rechtshändige Filamente mit einer Struktur aus drei

helikalen Bändern, die als „komplexe Flagellen“ bezeichnet werden (Krupski *et al.*, 1985; Trachtenberg *et al.*, 1987). Diese komplexen Flagellen, die das Schwimmen in viskosen Medien begünstigen (Götz *et al.*, 1982; Scharf, 2002), sind nicht in der Lage polymorphe Transitionen durchzuführen und somit in ihrer Rechtshändigkeit fixiert. Die Rechtshändigkeit korreliert auch mit der ausschließlichen Rotationsrichtung (cw). Außerdem wurden bei *S. meliloti* zusätzliche Motorkomponenten identifiziert, MotC und MotE, die vermutlich für die einseitige Motorrotation verantwortlich sind. MotC interagiert mit einer großen periplasmatischen Extradomäne von MotB und ist an die Cytoplasmamembran assoziiert (Halbach, 2003; Jäckel, 2004). MotC ist für die Funktionalität von MotB essentiell, aber die genaue Funktion konnte bisher nicht geklärt werden. MotE ist ein periplasmatisches Chaperon für MotC und für dessen Stabilisierung und korrekte Positionierung verantwortlich (Eggenhofer *et al.*, 2004).

Diese komplexen Vorgänge, beginnend mit der aufeinanderfolgenden Synthese des Basalkörperkomplexes, der Flagellen und der Chemotaxis-Komponenten bis hin zur Regulation, beruhen auf einer hierarchisch kontrollierten Expression von mehr als 50 Genen. Für motile Bakterien ist diese zeitliche Kopplung der Genexpression und des koordinierten Aufbaus des Flagellen- und des Taxissystems von entscheidender Bedeutung (Chilcott & Hughes, 2000). Dies wird durch eine strikte Organisation der Flagellen-, Motor- und Chemotaxisgene in einem *flagellar regulon* gewährleistet (Sourjik *et al.*, 1998). Fast alle diese Gene sind in sieben Operons und sechs Transkriptionseinheiten gegliedert und befinden sich in einer zusammenhängenden 45 kb-großen Region des *S. meliloti*-Chromosoms (Sourjik *et al.*, 2000). Die Expression so vieler Gene benötigt sehr viel Energie (Soutourina & Bertin, 2003). Eine Gliederung dieser Gene in hierarchisch-regulierte Genklassen und eine kontrollierte Expression garantieren einen zielgerichteten Energieaufwand. Bei *S. meliloti* ist diese sukzessive Genexpression entsprechend der in Abb. 4 dargestellten Hierarchie-Kaskade geregelt.

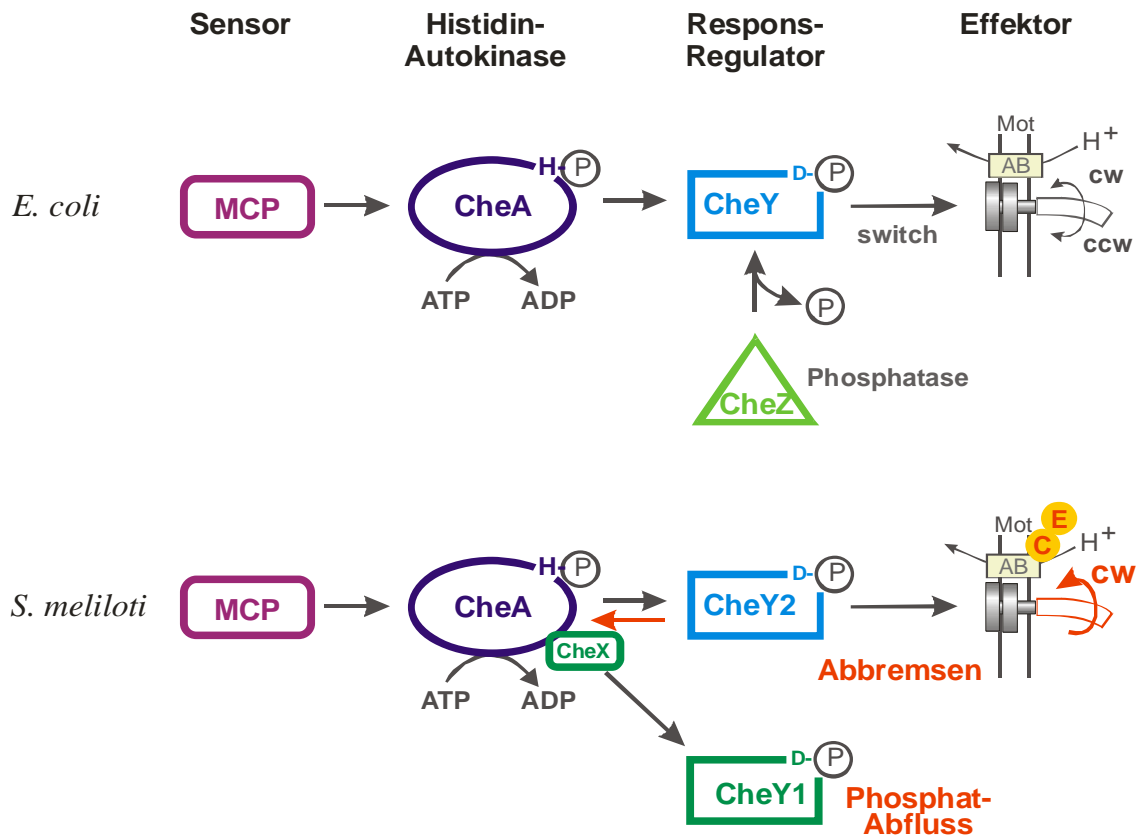


**Abb. 4. Modellvorstellung zur Regulation des *flagellar regulon* von *S. meliloti*. Die Einteilung in vier hierarchische Genklassen erfolgte nach Sourjik *et al.* (2000) und Rotter *et al.* (2006). Horizontale Pfeile: Operons; Ellipsen: Proteine; weiße Pfeile: Translation zu Proteinen; schwarze Pfeile: positive Regulation; gestrichelter Pfeil: Autoregulation der *rem*-Transkription.**

Die Regulation erfolgt über vier Hierarchie-Klassen, IA, IB, II und III (Abb. 4; Rotter *et al.*, 2006; Sourjik *et al.*, 2000). Nur wenn Gene der übergeordneten Regulationsklassen transkribiert werden, werden auch niedrige Hierarchiestufen exprimiert. *VisN* und *VisR* (Klasse IA) sind LuxR-ähnliche Regulatoren mit konservierten DNA-Bindedomänen, die konstitutiv exprimiert werden (Rotter *et al.*, 2006; Sourjik *et al.*, 2000). Motilität und Chemotaxis sind bei *S. meliloti* aber an die exponentielle Wachstumsphase gekoppelt (Rotter *et al.*, 2006). Der Klasse IB-Regulator *Rem* wird während der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert und aktiviert die Transkription von Genen für Flagellenassemblierung und Motilität (Klasse II; Rotter *et al.*, 2006). Zur untersten Hierarchieklasse (Klasse III) gehören Flagelline und Chemotaxis-Gene (Scharf *et al.*, 2001; Sourjik *et al.*, 1998). Ihre Expression ist abhängig von den Klasse IIA-Genprodukten, Proteinen des Basalkörpers und des Flagellinexports, nicht aber von Klasse IIB-Proteinen, den Motor- und den Protonenkanalkomponenten (Rotter *et al.*, 2006; Sourjik *et al.*, 2000).

Auf molekularer Ebene wird die Flagellenrotation durch ein Zwei-Komponenten-System reguliert. Dieses ist das zentrale Element der Signaltransduktionskette in der bakteriellen Chemotaxis und besteht aus einer Histidin-Autokinase und einem Responsregulator. Die

chemotaktische Signaltransduktionskette von *E. coli* und *S. meliloti* ist in Abb. 5 im Vergleich dargestellt. Chemische Reize werden durch Sensorproteine bzw. Rezeptoren wahrgenommen. Bei *E. coli* sind methylierbare Chemotaxisproteine (MCPs) die Sensoren. Der Wegfall eines Reizes oder die Bindung eines Schreckstoffs verursacht eine Konformationsänderung der Rezeptoren, die zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung an His48 in der P1-Domäne der Histidinkinase CheA führt.



**Abb. 5. Vergleich der sensorischen Signaltransduktionskette von *E. coli* und *S. meliloti*. Funktionell analoge Komponenten sind in gleicher Farbe dargestellt. Rote Symbole markieren neue Komponenten oder Reaktionsschritte in *S. meliloti*. MCP: methylierbares Chemotaxisprotein (methylaccepting chemotaxis protein); CheA: Histidinkinase; CheY, CheY1, CheY2: Responsregulatoren; CheX: cytoplasmatisches CheA-assoziiertes Chemotaxisprotein; CheZ: Phosphatase; H-P: Histidylphosphat; D-P: Aspartylphosphat; H<sup>+</sup>: Protonen(fluss); MotA, MotB, MotC, MotE: Motorproteine. Verändert nach Schmitt, 2002.**

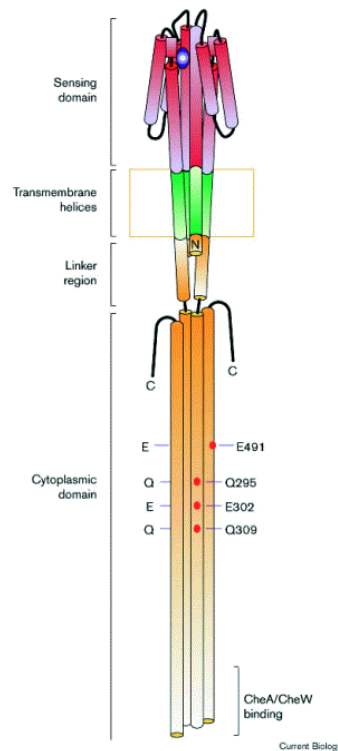
Die Phosphatgruppe wird von CheA-P auf den konservierten Asp57-Rest des Responsregulators CheY übertragen (Abb. 5). Aktiviertes CheY-P bindet über Flim an den Flagellenmotor und verursacht eine Umkehr der Rotationsrichtung von ccw nach cw (Welch *et al.*, 1994). Zur schnellen Reaktion auf veränderte Umweltreize muss eine prompte Inaktivierung des Responsregulators gewährleistet werden. Die Halbwertszeit für den

Spontanzerfall von CheY-P beträgt 10 s und ist damit viel zu langsam (Lukat *et al.*, 1992). Die Inaktivierung von CheY-P erfolgt durch eine spezifische Phosphatase, CheZ, die eine 10fach beschleunigte Dephosphorylierung des Responsregulators ermöglicht (Hess *et al.*, 1988).

*S. meliloti* besitzt im Gegensatz zum enterobakteriellen System zwei Responsregulatoren, CheY1 und CheY2, aber keine Phosphatase CheZ (Abb. 5). Die Phosphatgruppe wird durch CheA-P auf den Haupt-Responsregulator CheY2 übertragen. Die Bindung des aktivierten CheY2-P an den Motor löst eine Verlangsamung der Motorrotation aus. Die Dephosphorylierung von CheY2-P erfolgt hier durch eine Retrophosphorylierung zurück auf CheA. Die Phosphatgruppe wird anschließend auf CheY1 übertragen, das als Phosphatabfluss dient und so CheZ ersetzt (Sourjik & Schmitt, 1998). Trotz eines 10fachen Überschusses von CheY1 zu CheA in der Zelle reicht der Spontanzerfall von CheY1-P nicht aus, um das zurück transferierte Phosphat aufzunehmen (Halbwertszeit: 10 s; Sourjik & Schmitt, 1998). Die Assoziation des 10 kDa-Proteins CheX an CheA beschleunigt den Phosphatfluss von CheY1-P auf noch unbekannte Weise (Purschke, 2007).

Die Wahrnehmung von chemischen Signalen aus der Umgebung erfolgt mit Hilfe von Chemorezeptoren. *E. coli* besitzt vier MCPs und den membranassoziierten Rezeptor Aer als Sauerstoffsensoren. Die klassischen MCPs von *E. coli* zeigen eine hohe Spezifität für bestimmte Substanzen. Tar ist der Sensor für Aspartat und Maltose, Tsr für Serin, Trg für Ribose und Galaktose und Tap für Dipeptide (Bibikov *et al.*, 1997; Falke & Hazelbauer, 2001). Die MCPs sind Transmembranrezeptoren mit einer charakteristischen Struktur (Abb. 6). Sie bilden Dimere aus zwei identischen monomeren Untereinheiten. Jedes Monomer gliedert sich in vier Bereiche, die periplasmatische Sensordomäne, zwei transmembrane Helices, eine *linker*-Region und eine hochkonservierte cytoplasmatische Signaldomäne (Abb. 6; Falke & Hazelbauer, 2001; Stock & Levit, 2000). Letztere besitzt eine Bindedomäne für das Adapterprotein CheW, welches wiederum an CheA bindet, und zwei methylierbare Helices MH1 und MH2 (Stock & Surette, 1996).



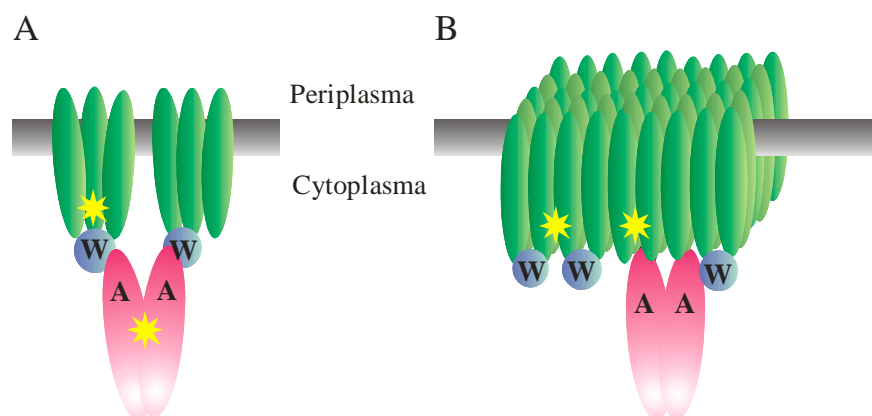


**Abb. 6. Schematische Darstellung eines MCP-Dimeren. Die periplasmatische Sensordomäne ist über zwei transmembrane Helices und die linker-Region mit der hochkonservierten MCP-Signaldomäne im Cytoplasma verbunden. Die cytoplasmatische Domäne enthält die methylierbaren Reste (E und Q) und die Bindestelle für CheW und CheA. Aus Stock & Levit, 2000.**

Um eine hohe Sensitivität gegenüber einem breiten Spektrum von Lockstoff-Konzentrationen zu gewährleisten, werden die MCPs adaptiv modifiziert. Die Modifizierung findet an vier bis sechs spezifischen Glutamat- und Glutamin-Resten in MH1 und MH2 statt (Abb. 6). Glutamin-Reste werden zunächst durch CheB deamidiert. Die Methylgruppen werden von S-Adenosylmethionin durch die Methyltransferase CheR auf die Glutamat-Reste übertragen. Die Demethylierung wird durch die phosphorylierbare Methylsterase CheB katalysiert (Hess *et al.*, 1988; Stock & Koshland, 1978). CheB wird durch Phosphorylierung von CheA aktiviert (Hess *et al.*, 1988; Stock & Koshland, 1978). Die Bindung eines Lockstoffes verursacht eine Helixrotation innerhalb des Rezeptormoleküls, wodurch die Glutamat-Reste für CheR besser zugänglich werden. Bei einer hohen Lockstoffkonzentration nimmt die Methylierung der Rezeptoren zu, weil CheA und somit auch CheB unphosphoryliert sind (Okumura *et al.*, 1998; Stock & Levit, 2000). Vollständig methylierte Rezeptoren können nicht mehr auf einen Reiz reagieren, so dass CheA wieder phosphoryliert wird und die Zelle zu taumeln beginnt. Gleichzeitig wird CheB aktiviert und demethyliert die Rezeptoren. Dadurch werden die Rezeptoren quasi auf Null zurückgestellt, so dass sie wieder Lockstoffe wahrnehmen können. So wird eine Anpassung an eine konstante Reizstärke erreicht.

Als Bindestelle für CheR und CheB an den Rezeptoren wurde eine konservierte Pentapeptid-Sequenz, NWETF, identifiziert (Barnakov *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996). Sie befindet sich am C-Terminus der Hauptrezeptoren, Tar und Tsr, (*high abundance*-Rezeptoren) die 90 % der Rezeptorpopulation in einer Zelle ausmachen (Li & Hazelbauer, 2004). Eine adaptive Modifikation der *low abundance*-Rezeptoren, Trg, Tap und Aer, ist nur durch einen *cross talk* der beiden Rezeptorgruppen untereinander gewährleistet (Antommattei *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 1999; Weerasuriya *et al.*, 1998)

Die Chemorezeptoren von *E. coli* bilden in der Zellmembran polare und laterale *cluster*, die aus mehreren 1000 Signaleinheiten bestehen (Li & Hazelbauer, 2004; Maddock & Shapiro, 1993; Sourjik & Berg, 2000). Kristallstrukturanalysen von Tsr zeigten eine *trimer of dimer*-Anordnung der Rezeptoren (Ames *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1999; Parkinson, 1995), die mit zwei CheW-Molekülen und einem CheA-Dimer den ternären Komplex bilden (Abb. 7A; Gegner *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 2000).

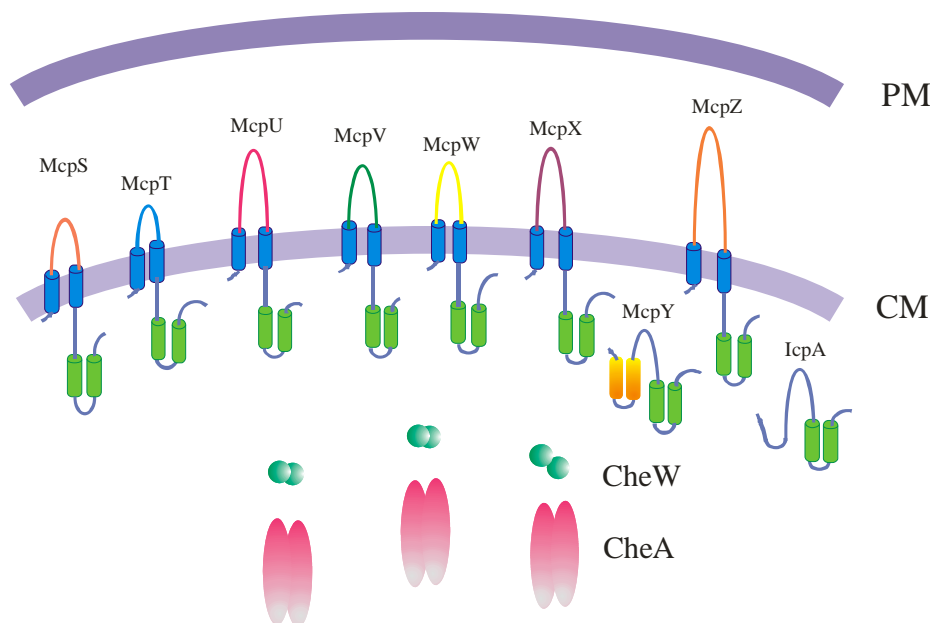


**Abb. 7. Modellvorstellungen zur Organisation der Chemorezeptor-*cluster*. Entscheidende Interaktionen sind mit einem gelben Stern markiert. A: CheA-Dimer, das über CheW mit den *trimer-of-dimer*-Anordnungen der Rezeptoren interagiert, stabilisiert das *cluster*. B: Rezeptoren bilden zweidimensionales Netzwerk durch laterale Interaktionen ihrer cytoplasmatischen Domänen. CheW und CheA binden in variabler Stöchiometrie und stabilisieren das *cluster*. Verändert nach Kentner & Sourjik, 2006.**

Diese Signalkomplexe dienen der Integration und Amplifikation von chemotaktischen Signalen (Studdert & Parkinson, 2004). Die Aktivität von CheA kann in solchen Komplexen um das 100fache gesteigert werden. *In vivo* bilden diese Komplexe durch die Interaktion der cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren untereinander große zweidimensionale Netzwerke (Abb. 7B; Ames *et al.*, 2002; Kentner *et al.*, 2006; Skidmore *et al.*, 2000), an die auch alle anderen cytoplasmatischen Proteine, die an der Chemotaxis beteiligt sind, wie CheR, CheB,

CheY und CheZ, lokalisieren, wodurch die Signalweiterleitung verbessert wird (Banno *et al.*, 2004; Cantwell *et al.*, 2003; Shiomi *et al.*, 2002; Sourjik, 2004; Sourjik & Berg, 2000).

Das Genom von *S. meliloti* enthält acht *mcp*-Gene, die in alphabetischer Reihenfolge *mcpS* bis *mcpZ* benannt wurden, und ein Gen für ein MCP-ähnliches Protein, IcpA (*internal chemotaxis protein A*; Galibert *et al.*, 2001; Meier *et al.*, 2007; Muschler, 2000). Die sieben Rezeptoren McpS, McpT, McpU, McpV, McpW, McpX und McpZ zeigen die für MCPs charakteristische Struktur. Sie besitzen zwei Transmembrandomänen, die die Cytoplasma-Membran durchspannen, und die konservierte MCP-Signaldomäne mit den methylierbaren Helices (Abb. 8).



**Abb. 8. Schematische Darstellung der Chemorezeptoren von *S. meliloti*. Die acht MCPs, McpS-McpZ, und das interne Chemotaxis-Protein, IcpA, besitzen die hochkonservierte MCP-Signaldomäne (grüne Zylinder) und interagieren mit CheW und CheA. Blaue Zylinder: Transmembrane Helices der MCPs. Gelbe Zylinder: PAS-Domänen; CM: Cytoplasma-Membran; PM: Periplasma-Membran. Die unterschiedlichen Sensordomänen sind in verschiedenen Farben dargestellt.**

Die beiden anderen Rezeptoren, McpY und IcpA, unterscheiden sich vor allem durch das Fehlen dieser Transmembrandomänen von den typischen MCPs (Abb. 8; Meier *et al.*, 2007). Eine Besonderheit von McpY sind zwei PAS-Domänen in der N-terminalen Region des Proteins, die häufig als Sensoren für Sauerstoff, Licht und Redospotential fungieren (Taylor & Zhulin, 1999). IcpA besitzt nur geringe Ähnlichkeit zu den anderen Rezeptoren. Jedoch weist die konservierte MCP-Signaldomäne auf eine Funktion von IcpA bei der Chemotaxis von *S. meliloti* hin.

Über Funktion, Expression, Regulation und Lokalisierung dieser Rezeptoren war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig bekannt. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die einzelnen Chemorezeptoren von *S. meliloti* mit genetischen und physiologischen Methoden umfassend zu charakterisieren und mit Hilfe von GFP-Fusionen die Lokalisierung der Rezeptoren *in vivo* zu untersuchen.

Ausgehend von dieser Situation, wurden folgende Ziele formuliert:

- Phänotypische Charakterisierung von Rezeptor-Deletionsmutanten durch Schwärmlatten- und Schwimmggeschwindigkeits-Analysen,
- Identifizierung von spezifischen Liganden oder Ligandklassen für die einzelnen Rezeptoren durch Schwärmlattenanalysen und Kapillartests,
- Charakterisierung der cytoplasmatischen Rezeptoren, McpY und IcpA, die aufgrund ihrer Domänenstruktur eine Besonderheit darstellen. Untersuchungen zu Aerotaxis und Energietaxis könnten Aufschluss über die Funktion von McpY in der Chemotaxis von *S. meliloti* bringen und gleichzeitig die Bedeutung der beiden PAS-Domänen in McpY klären,
- Etablierung und Durchführung von Nodulationsexperimenten zur Untersuchung der Rolle einzelner Chemorezeptoren bei der Symbiose,
- Bestimmung der Expressionsmengen einzelner Rezeptorgene durch Reporteragen-Analysen,
- Untersuchung der Regulation der Rezeptorgen-Expression und Einordnung in die Hierarchieklassen des *flagellar regulon*,
- *In vivo*-Lokalisierung der Chemorezeptoren von *S. meliloti* mittels Fluoreszenzmarkierung,
- Untersuchungen zur Abhängigkeit der Rezeptorlokalisierung von anderen Chemotaxisproteinen,
- Kollokalisierungsstudien von Rezeptoren und anderen Chemotaxisproteinen.

## 2 Material

### 2.1 Bakterien und Plasmide

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

**Tab. 1: Stämme**

Stamm	Marker / Genotyp <sup>1)</sup>	Herkunft	
<i>E. coli</i>	<b>DH10B</b>	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara leu</i> )7697 $\Delta$ <i>lacX74 galU galK mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> <sup>-</sup> <i>hsdRMS-mcrBC</i> ) <i>rpsL decR</i> 380 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>endA1 nupG recA1</i>	Bethesda Research Laboratories
	<b>S17-1</b>	<i>recA1 endA1 thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu::Tn7 Tp <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	Simon <i>et al.</i> , 1983
	<b>ER2566</b>	F <sup>-</sup> $\lambda$ <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ</i> ::T7 <i>gene1 gal sulA11</i> $\Delta$ ( <i>mcrC-mrr</i> )114 ::IS10R( <i>mcr73</i> ::miniTn10-TetS)2R ( <i>zgb-210</i> ::Tn10)(TetS) <i>endA1 [dcm]</i>	New England BioLabs
	<b>SCS110</b>	<i>rpsL</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>thr leu thi-1 lacY galK</i> <i>al Tara tonA tsx dam dcm supE44</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [F <sup>-</sup> <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> 12 $\Delta$ M15] <i>endA</i> <sup>-</sup>	Stratagene
	<b>BL21DE3</b>	F <sup>-</sup> <i>ompTlon</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> )	Studier & Moffat, 1986
	<b>RP437</b>	Wildtyp für Chemotaxis	Parkinson, 1995
<i>S. meliloti</i>	<b>RU11/001</b>	Sm <sup>R</sup> , spontan streptomycinresistentes Derivat von RU10/406	Krupski <i>et al.</i> , 1985
	<b>RU11/310</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>cheA</i>	Sourjik & Schmitt, 1996
	<b>RU11/418</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>cheW</i>	Muschler, 2000
	<b>RU11/555</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rem</i>	Rotter <i>et al.</i> , 2006
	<b>RU11/800</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>fliM</i>	Scharf <i>et al.</i> , 2001
	<b>RU11/803</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>mcpW</i>	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU11/804</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>mcpY</i>	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU11/805</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>mcpX</i>	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU11/808</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>mcpW</i> , $\Delta$ <i>mcpY</i>	Scharf, 1999
	<b>RU11/809</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>mcpX</i> , $\Delta$ <i>mcpY</i>	Scharf, 1999
	<b>RU11/810</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>mcpW</i> , $\Delta$ <i>mcpX</i>	Scharf, 1999
	<b>RU11/811</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>cheW2</i>	Scharf, 1999
	<b>RU11/812</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>cheW</i> , $\Delta$ <i>cheW2</i>	Scharf, 1999
	<b>RU11/813</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>mcpW</i> , $\Delta$ <i>mcpX</i> , $\Delta$ <i>mcpY</i>	Scharf, 1999
	<b>RU11/814</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>visN</i> , $\Delta$ <i>visR</i>	Rotter <i>et al.</i> , 2006
<b>RU11/815</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>icpA</i> (früher $\Delta$ <i>orf1</i> , $\Delta$ <i>tlpA</i> , $\Delta$ <i>mcpE</i> )	Meier <i>et al.</i> , 2007	

<i>S. meliloti</i>	<b>RU11/818</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpZ$	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU11/819</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$	Scharf, 1999
	<b>RU11/828</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpU$	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU11/829</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpU$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$	Scharf, 1999
	<b>RU11/830</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpV$	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU11/831</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpU$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$	Scharf, 1999
	<b>RU11/838</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpT$ (früher $\Delta mcpA$ )	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU11/839</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpT$ , $\Delta mcpU$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$	Scharf, 1999
	<b>RU11/840</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpT$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$ , $\Delta mcpU$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta icpA = \Delta 8(mcpS)$	Scharf, 1999
	<b>RU13/031</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001(pRU2706)	Klinger, 2003
	<b>RU13/047</b>	Sm <sup>R</sup> , AS-Reste-Austausch McpY-K282A	Meier, 2003
	<b>RU13/049</b>	Sm <sup>R</sup> , AS-Reste-Deletion McpY- $\Delta$ PAS1 ( $\Delta$ AS 22-123)	Meier, 2003
	<b>RU13/106</b>	Sm <sup>R</sup> , AS-Reste-Deletion McpY- $\Delta$ PAS2 ( $\Delta$ AS 143-244)	Diese Arbeit
	<b>RU13/107</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpY$ , $\Delta icpA$	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU13/110</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta flbT$	Scharf, 2003
	<b>RU13/143</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpW-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpW</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/144</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpX-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpX</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/146</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta cheA2$	Diese Arbeit
	<b>RU13/147</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta cheA$ , $\Delta cheA2$	Diese Arbeit
	<b>RU13/148</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpS$ ( $\Delta$ Sma1556)	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU13/149</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpS$ ( $\Delta$ Sma1556), $\Delta mcpT$ , $\Delta mcpU$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$ , $\Delta icpA = \Delta 9$	Meier <i>et al.</i> , 2007
	<b>RU13/200</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpT$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$ , $\Delta icpA$ ( <i>mcpU</i> -Rückkreuzung in $\Delta 8$ )!	Diese Arbeit
	<b>RU13/212</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpV-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpV</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/237</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta pilA1$	Scharf, 2005
	<b>RU13/238</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta pilA2$	Scharf, 2005
		Sm <sup>R</sup> , $\Delta pilA1$ , $\Delta pilA2$	Scharf, 2005
	<b>RU13/241</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpZ-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpZ</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/242</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpS-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpS</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/243</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>cheA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/244</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
<b>RU13/245</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpV-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpV</i> im Chromosom	Diese Arbeit	
<b>RU13/246</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpW-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpW</i> im Chromosom	Diese Arbeit	
<b>RU13/249</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/839 mit <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit	

S. meliloti	<b>RU13/285</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpS$ ( $\Delta Sma1556$ ), $\Delta mcpT$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$ , $\Delta icpA$ ( $\Delta 8/mcpU$ )	Diese Arbeit
	<b>RU13/286</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpS$ ( $\Delta Sma1556$ ), $\Delta mcpT$ , $\Delta mcpU$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpZ$ , $\Delta icpA$ ( $\Delta 8/mcpY$ )	Diese Arbeit
	<b>RU13/287</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta mcpS$ ( $\Delta Sma1556$ ), $\Delta mcpT$ , $\Delta mcpU$ , $\Delta mcpV$ , $\Delta mcpW$ , $\Delta mcpX$ , $\Delta mcpY$ , $\Delta mcpZ$ ( $\Delta 8/icpA$ )	Diese Arbeit
	<b>RU13/288</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta cheW3$	Diese Arbeit
	<b>RU13/289</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta cheW1$ , $\Delta cheW2$ , $\Delta cheW3$	Diese Arbeit
	<b>RU13/290</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/291</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpV-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpV</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/292</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpW-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpW</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/293</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpX-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpX</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/295</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpZ-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpZ</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/296</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/297</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpX-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpX</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/298</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpZ-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpZ</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/299</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpS-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpS</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/300</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpT-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpT</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/301</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/302</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpY-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpY</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/303</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/304</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpY-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpY</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/305</b>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta cheW1$ mit <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/306</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/840 mit <i>mcpW-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpW</i> im Chromosom	Diese Arbeit
<b>RU13/307</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/149 mit <i>mcpW-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpW</i> im Chromosom	Diese Arbeit	
<b>RU13/308</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/200 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit	
<b>RU13/309</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpY-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpY</i> im Chromosom	Diese Arbeit	
<b>RU13/310</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/840 mit <i>cheA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> im Chromosom	Diese Arbeit	

S. meliloti	<b>RU13/311</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>cheA-mrfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/312</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>cheA-mrfp</i> - und <i>mcpX-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> bzw. WT- <i>mcpX</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/313</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>cheA-mrfp</i> - und <i>mcpZ-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> bzw. WT- <i>mcpZ</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/314</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>cheA-mrfp</i> - und <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> bzw. WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/315</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpX-mrfp</i> - und <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpX</i> bzw. WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/316</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpX-mrfp</i> - und <i>mcpY-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpX</i> bzw. WT- <i>mcpY</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/317</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpX-mrfp</i> - und <i>mcpZ-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpX</i> bzw. WT- <i>mcpZ</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/318</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>mcpX-mrfp</i> - und <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpX</i> bzw. WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/319</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/811 mit <i>mcpW-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpW</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/320</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/321</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/418 mit <i>cheA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/322</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/001 mit <i>cheA-mrfp</i> - und <i>mcpV-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> bzw. WT- <i>mcpV</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/323</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/324</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/325</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/310 mit <i>mcpT-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpT</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/326</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>mcpT-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpT</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/327</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/308 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/328</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/211 ( <i>mcpU-gfp</i> ) mit $\Delta icpA$	Diese Arbeit
	<b>RU13/329</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/302 ( <i>mcpY-gfp</i> ) mit $\Delta icpA$	Diese Arbeit
	<b>RU13/330</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/243 ( <i>cheA-gfp</i> ) mit $\Delta icpA$	Diese Arbeit
	<b>RU13/331</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/285 mit <i>mcpU-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpU</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/332</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/286 mit <i>mcpY-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>mcpY</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/333</b>	Sm <sup>R</sup> , RU13/287 mit <i>icpA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>icpA</i> im Chromosom	Diese Arbeit
	<b>RU13/334</b>	Sm <sup>R</sup> , RU11/812 mit <i>cheA-gfp</i> -Fusion anstelle von WT- <i>cheA</i> im Chromosom	Diese Arbeit



Tab. 2: Plasmide

Plasmid	Marker <sup>1)</sup>	Herkunft/Referenz
pBBR1MCS2	Km <sup>R</sup> , <i>lac</i> <sup>P</sup> , <i>mob</i> , <i>rep</i> , 5,1 kb	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBG1052	Tc <sup>R</sup> , = pRO1052, pMP220 mit 346 bp <i>Sph</i> I-Fragment des <i>expEI</i> -Promotors als <i>lacZ</i> -Fusion	Lloret <i>et al.</i> , 1998
pEGFP-N1	Km <sup>R</sup> , GFPmut1-Chromophor, 4,7 kb	Clontech
pEYFP	Ap <sup>R</sup> , YFP-Chromophor, 4,7 kb	Clontech
pGUS3	Km <sup>R</sup> , <i>nfeD-gusA</i> -Fusion	García-Rodríguez & Toro, 2000
pHT28	Ap <sup>R</sup> , Expressionsvektor	Tang, 1993
pK18 <i>mobsacB</i>	Km <sup>R</sup> , <i>lacZ</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> , 5,7 kb	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pTYB1	Ap <sup>R</sup> , Expressionsvektor (C-terminale Fusion), 7,5 kb	NEB
pTYB11	Ap <sup>R</sup> , Expressionsvektor (N-terminale Fusion), 7,4 kb	NEB
pPHU234 <sup>2)</sup>	Tc <sup>R</sup> , promotorlose <i>lacZ</i> -Fusion	Hübner <i>et al.</i> , 1991
pmRFP	Ap <sup>R</sup> , pVT100U-mRFP (pVT100U-GFP, ohne GFP, mit mRFP + GAGAlinker + terminator)	Grossmann <i>et al.</i> , 2007
pRU1970	Km <sup>R</sup> , <i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (600 bp) für Gen-Deletion, $\Delta$ <i>icpA</i> ( $\Delta$ <i>tlpA</i> ) in pK18 <i>mobsacB</i>	Muschler, 2000
pRU1990	Km <sup>R</sup> , <i>Hind</i> III- <i>Pst</i> I PCR-Fragment (800 bp) für Gen-Deletion, $\Delta$ <i>mcpY</i> in pK18 <i>mobsacB</i>	Muschler, 2000
pRU2250	Tc <sup>R</sup> , 1974 bp <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I-Fragment aus pRU1221 zur <i>icpA-lacZ</i> -Fusion in pPHU235	Sourjik <i>et al.</i> , 2000
pRU2283	Tc <sup>R</sup> , 456 bp <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I-Fragment zur <i>mcpU-lacZ</i> -Fusion in pPHU235	Meier <i>et al.</i> , 2007
pRU2706	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Expressionsvektor, <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I-Fragment in pBBR1MCS2	Klinger, 2003
pRU2720	Km <sup>R</sup> , <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I PCR-Fragment (540 bp) für AS-Reste-Deletion, <i>McpY</i> - $\Delta$ PAS1 in pK18 <i>mobsacB</i>	Meier, 2003
pRU2721	Ap <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>McpY</i> , <i>Sap</i> I- <i>Xho</i> I PCR-Fragment (1779 bp) in pTYB11	Meier, 2003
pRU2725	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpY</i> , <i>Hind</i> III- <i>Sma</i> I PCR-Fragment in pEGFP-N1	Meier, 2003
pRU2726	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>icpA</i> , <i>Hind</i> III- <i>Sma</i> I PCR-Fragment in pEGFP-N1	Meier, 2003
pRU2727	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpW</i> , <i>Kpn</i> I- <i>Sma</i> I PCR-Fragment in pEGFP-N1	Meier, 2003
pRU2728	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpY-gfp</i> , <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Meier, 2003
pRU2729	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>icpA-gfp</i> , <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Meier, 2003
pRU2730	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpW-gfp</i> , <i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Meier, 2003
pRU2731	Km <sup>R</sup> , Überexpressionsvektor für <i>mcpY</i> , <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Meier, 2003
pRU2732	Ap <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>icpA-gfp</i> , <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I PCR-Fragment in pBBR1MCS4	Meier, 2003
pRU2763	Km <sup>R</sup> , <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I PCR-Fragment (540 bp) für AS-Reste-Deletion, <i>McpY</i> - $\Delta$ PAS2 in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit

<b>pRU2764</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpT</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR-Fragment in pEGFP-N1	Diese Arbeit
<b>pRU2765</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpV</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR-Fragment in pEGFP-N1	Diese Arbeit
<b>pRU2766</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpU</i> , <i>HindIII-KpnI</i> PCR-Fragment in pEGFP-N1	Diese Arbeit
<b>pRU2767</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpX</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR-Fragment in pEGFP-N1	Diese Arbeit
<b>pRU2768</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpZ</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR-Fragment in pEGFP-N1	Diese Arbeit
<b>pRU2769</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>cheA</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR-Fragment in pEGFP-N1	Diese Arbeit
<b>pRU2770</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpT-gfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2771</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpV-gfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2772</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpU-gfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2773</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpX-gfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2774</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpZ-gfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2775</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>cheA-gfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2776</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpT</i> , <i>EcoRI-PstI</i> PCR-Fragment (320 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2777</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpV</i> , <i>EcoRI-PstI</i> PCR-Fragment (415 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2778</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpW</i> , <i>EcoRI-PstI</i> PCR-Fragment (303 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2779</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpX</i> , <i>EcoRI-PstI</i> PCR-Fragment (372 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2780</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpY</i> , <i>EcoRI-XbaI</i> PCR-Fragment (430 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2781</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpZ</i> , <i>KpnI-PstI</i> PCR-Fragment (409 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2782</b>	Tc <sup>R</sup> , 320 bp <i>EcoRI-PstI</i> -Fragment aus pRU2776 zur <i>mcpT-lacZ</i> -Fusion in pPHU235	Meier <i>et al.</i> , 2007
<b>pRU2783</b>	Tc <sup>R</sup> , 415 bp <i>EcoRI-PstI</i> -Fragment aus pRU2777 zur <i>mcpV-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Meier <i>et al.</i> , 2007
<b>pRU2784</b>	Tc <sup>R</sup> , 303 bp <i>EcoRI-PstI</i> -Fragment aus pRU2778 zur <i>mcpW-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Meier <i>et al.</i> , 2007
<b>pRU2785</b>	Tc <sup>R</sup> , 372 bp <i>EcoRI-PstI</i> -Fragment aus pRU2779 zur <i>mcpX-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Diese Arbeit
<b>pRU2786</b>	Tc <sup>R</sup> , 430 bp <i>EcoRI-XbaI</i> -Fragment aus pRU2780 zur <i>mcpY-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Diese Arbeit
<b>pRU2787</b>	Tc <sup>R</sup> , 409 bp <i>KpnI-PstI</i> -Fragment aus pRU2781 zur <i>mcpZ-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Meier <i>et al.</i> , 2007
<b>pRU2790</b>	Ap <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>McpY</i> , <i>KpnI-NdeI</i> PCR-Fragment (1779 bp) in pHT28	Diese Arbeit

<b>pRU2879</b>	Km <sup>R</sup> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment (630 bp) für Gen-Deletion, $\Delta mcpS$ ( $\Delta SmaI556$ ) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU2880</b>	Km <sup>R</sup> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment (500 bp) für Gen-Deletion, $\Delta cheA2$ in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU2882</b>	Km <sup>R</sup> , <i>EcoRI-HindIII</i> PCR-Fragment (2120 bp) für Gen-Wiedereinführung, <i>mcpU</i> <sub>Rückkreuzung</sub> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU2883</b>	Ap <sup>R</sup> , <i>yfp</i> -Fusionsvektor für <i>cheA</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR-Fragment in pEYFP	Diese Arbeit
<b>pRU2884</b>	Km <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>cheA-yfp</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fusions-Fragment in pBBRMCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2886</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusionsvektor für <i>mcpS</i> , <i>HindIII-SmaI</i> PCR-Fragment in pEGFP-N1	Diese Arbeit
<b>pRU2887</b>	Km <sup>R</sup> , <i>gfp</i> -Fusions-Expressionsvektor für <i>mcpS</i> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR- Fragment in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
<b>pRU2888</b>	Km <sup>R</sup> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment (1156 bp) für chromosomale <i>gfp</i> -Fusion von <i>mcpV</i> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU2889</b>	Km <sup>R</sup> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment (1308 bp) für chromosomale <i>gfp</i> -Fusion von <i>mcpU</i> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU2890</b>	Km <sup>R</sup> , <i>HindIII-XbaI</i> PCR-Fragment (1280 bp) für chromosomale <i>gfp</i> -Fusion von <i>icpA</i> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU2894</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpY<sub>lang</sub></i> , <i>EcoRI-XbaI</i> PCR-Fragment (786 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2895</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>che2</i> -Operon, <i>KpnI-PstI</i> PCR-Fragment (869 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2898</b>	Tc <sup>R</sup> , 786 bp <i>EcoRI-XbaI</i> -Fragment aus pRU2894 zur <i>mcpY<sub>lang</sub>-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Meier <i>et al.</i> , 2007
<b>pRU2899</b>	Tc <sup>R</sup> , 869 bp <i>KpnI-PstI</i> -Fragment aus pRU2895 zur <i>che-Operon2-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Meier <i>et al.</i> , 2007
<b>pRU2986</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpX<sub>lang</sub></i> , <i>EcoRI-PstI</i> PCR-Fragment (590 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2988</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpV<sub>lang</sub></i> , <i>XbaI-PstI</i> PCR-Fragment (926 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2989</b>	Ap <sup>R</sup> , Promotor von <i>mcpV<sub>2TM</sub></i> , <i>XbaI-PstI</i> PCR-Fragment (1845 bp) in pUCBM20	Diese Arbeit
<b>pRU2991</b>	Tc <sup>R</sup> , 926 bp <i>XbaI-PstI</i> -Fragment aus pRU2988 zur <i>mcpV<sub>lang</sub>-lacZ</i> -Fusion in pPHU234	Diese Arbeit
<b>pRU2992</b>	Tc <sup>R</sup> , 1845 bp <i>XbaI-PstI</i> -Fragment aus pRU2989 zur <i>mcpV<sub>2TM</sub>-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Diese Arbeit
<b>pRU2994</b>	Tc <sup>R</sup> , 590 bp <i>XbaI-PstI</i> -Fragment aus pRU2986 zur <i>mcpX<sub>lang</sub>-lacZ</i> -Fusion in pPHU236	Meier <i>et al.</i> , 2007
<b>pRU3000</b>	Km <sup>R</sup> , <i>XbaI-HindIII</i> PCR-Fragment (2120 bp) für Gen-Wiedereinführung, <i>mcpY</i> <sub>Rückkreuzung</sub> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU3001</b>	Km <sup>R</sup> , <i>XbaI-HindIII</i> PCR-Fragment (1150 bp) für chromosomale <i>mrfp</i> -Fusion von <i>cheA</i> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU3002</b>	Km <sup>R</sup> , <i>XbaI-HindIII</i> PCR-Fragment (1150 bp) für chromosomale <i>mrfp</i> -Fusion von <i>mcpX</i> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU3014</b>	Km <sup>R</sup> , <i>XbaI-HindIII</i> PCR-Fragment (1239 bp) für chromosomale <i>mcpW-gfp</i> -Fusion in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU3015</b>	Km <sup>R</sup> , <i>XbaI-HindIII</i> PCR-Fragment (1244 bp) für chromosomale <i>mcpX-gfp</i> -Fusion in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit

<b>pRU3017</b>	Km <sup>R</sup> , <i>XbaI-HindIII</i> PCR-Fragment (1233 bp) für chromosomale <i>mcpZ-gfp</i> -Fusion in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU3019</b>	Km <sup>R</sup> , <i>XbaI-HindIII</i> PCR-Fragment (1225 bp) für chromosomale <i>cheA-gfp</i> -Fusion in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
<b>pRU3020</b>	Km <sup>R</sup> , <i>HindIII-EcoRI</i> PCR-Fragment (627 bp) für Gen-Deletion, $\Delta$ <i>cheW3</i> in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit

## 2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers, Qiagen, Operon und Metabion bezogen. Die für PCR-Mutagenese, Sequenzierungen und Überprüfungs-PCRs verwendeten Primer sind in Tab. 3 aufgelistet.

**Tab. 3: Primer für PCR-Mutagenese, Sequenzierungen und Überprüfungs-PCRs**

	Name	Sequenz (5' → 3') <sup>1)</sup>	Bemerkung
Primer für <i>gfp</i> - bzw. <i>mrfp</i> -Fusionen	EE 94	ATC AAG GAG TTC ATG CGG TTC AAG GTG CGC	Anfang <i>mrfp</i> , for
	M125	GAT GAA GCT TCC GAT GAG CTG TGT CGT CTT G	$\Delta$ <i>icpA</i> , rev, <i>HindIII</i> , B. Scharf
	M 179	GGT GAA GCT TGC GGC CAC GCG TCA AC	$\Delta$ <i>mcpV</i> , rev, <i>HindIII</i> , B. Scharf
	M 202	CTT GAG AAT TCA CCC CCC GAA C	$\Delta$ <i>mcpT</i> , rev, <i>EcoRI</i> , B. Scharf
	VM 31	GAG CTC AAG CTT ATG AGA AGA ATT CGG	<i>mcpV</i> in pEGFP-N1, for, <i>HindIII</i>
	VM 32	TAC CGC CCC GGG TCG CTG CCC TGC CAT AGG	<i>mcpV</i> in pEGFP-N1, rev, <i>SmaI</i>
	VM 33	GAG CTC AAG CTT ATG TTC AAG TTC CAA GCC	<i>mcpX</i> in pEGFP-N1, for, <i>HindIII</i>
	VM 34	TAC CGC CCC GGG TAA ATT CTT CCC AAT TGT CC	<i>mcpX</i> in pEGFP-N1, rev, <i>SmaI</i>
	VM 35	GAG CTC AAG CCT ATG CCG CCT CTT TCA GGG	<i>mcpU</i> in pEGFP-N1, for, <i>HindIII</i> (VM 77)
	VM 36	CGG GGT ACC GCG GCT GCA CGG CGG CGG	<i>mcpU</i> in pEGFP-N1, rev, <i>KpnI</i> (VM 78)
	VM 37	GAG CTC AAG CTT ATG TTC ATC GAC AGG	<i>mcpZ</i> in pEGFP-N1, for, <i>HindIII</i>
	VM 38	TAC CGC CCC GGG TGG CCG CCC GGT AGC	<i>mcpZ</i> in pEGFP-N1, rev, <i>SmaI</i>
VM 39	GAG CTC AAG CTT ATG GAT ATG AAC GAA ATC	<i>cheA</i> in pEGFP-N1, for, <i>HindIII</i>	

Primer für <i>gfp</i> - bzw. <i>mrfp</i> -Fusionen	VM 40	TAC CGC <u>CCC GGG</u> TTC CGG CTG CAG CAA GAG	<i>cheA</i> in pEGFP-N1, rev, <i>SmaI</i>
	VM 77	GAG CTC <u>AAG CTT</u> ATG CCG CCT CTT TCA GGG AGC CCC	(= VM 35 neu) <i>mcpU</i> in pEGFP-N1, for, <i>HindIII</i>
	VM 78	CGT <u>GGT ACC</u> TCG GCT GCA CGG CGG CGG CTC GTG GCC	(= VM 36 neu) <i>mcpU</i> in pEGFP-N1, rev, <i>KpnI</i>
	VM 87	GAG CTC <u>AAG CTT</u> ATG AGC AGA TCA CCG CCA GCG	<i>mcpS</i> in pEGFP-N1 for, <i>HindIII</i>
	VM 88	GAC TCC <u>CCC GGG</u> TGG TGT TAT CAT GTT CGT TGC C	<i>mcpS</i> in pEGFP-N1 rev, <i>SmaI</i>
	VM 92	GC <u>TCT AGA</u> GCA ACC TCG GAG ATC GGC	<i>icpA</i> , 250 nt vor stopp, for, <i>XbaI</i> ,
	VM 93	<b>CCC TCG CTT GAA ATG CTC TAC CTT</b> GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>icpA-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>
	VM 94	<b>GTA GAG CAT TTC AAG CGA GGG AAA</b> AAT GGC	Fusionsprimer <i>icpA-gfp</i> , for <sup>3)</sup>
	VM 95	GC <u>TCT AGA</u> GCG CTG ATG GAG ATC GAT GC	<i>mcpV</i> , 1543 for, <i>XbaI</i>
	VM 96	<b>CGC TAC GCT TGC TGT TAT CGT CTT</b> GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpV-gfp</i> , rev, <sup>2)</sup>
	VM 97	<b>ACG ATA ACA GCA AGC GTA GCG GCG</b> ACA AGG	Fusionsprimer <i>mcpV-gfp</i> , for <sup>3)</sup>
	VM 98	GC <u>TCT AGA</u> CTG CAG GCG ATC GTC GCC	<i>mcpU</i> , 250nt vor stopp, for, <i>XbaI</i>
	VM 99	<b>GC ACA TTT TTC TTC GAA TTG CCG</b> CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpU-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>
	VM 100	<b>CGG CAA TTC CAA GAA AAA TGT GCA</b> GCG	Fusionsprimer <i>mcpU-gfp</i> , for <sup>3)</sup>
	VM 101	GGT <u>AAG CTT</u> CCG CCC CGC GCC GGC GCC	$\Delta$ <i>mcpU</i> , 250 nt nach stopp, rev, <i>HindIII</i>
	VM 102	GC <u>TCT AGA</u> GCG ATG GAT CAG ACG ACG	<i>mcpY</i> , 250nt vor stopp, for, <i>XbaI</i>
	VM 103	<b>GCG CGC GTG GGC GTG CGG CTT GTA</b> CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpY-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>
	VM 104	<b>CCG CAC GCC CAC CCG CGC</b>	Fusionsprimer <i>mcpY-gfp</i> , for <sup>3)</sup>
	VM 105	GGT <u>AAG CTT</u> GAG CCG CGC ATG CGC CGC	<i>mcpY</i> , 250 nt nach stopp, rev, <i>HindIII</i>
	VM 106	GC <u>TCT AGA</u> GAT CAG GTC ACC CAG CGC	<i>mcpT</i> , 250 nt vor stopp, for, <i>XbaI</i>
	VM 107	<b>GCA GCG CTG CAG CAG GCC CCC CTT</b> GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpT-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>
VM 108	<b>GGG GGC CTG CTG CAG CGC TGC</b>	Fusionsprimer <i>mcpT-gfp</i> , for <sup>3)</sup>	
VM 109	GC <u>TCT AGA</u> CGC GAG ACG GCG ATC CGC	<i>mcpW</i> , 250 nt vor stopp, for, <i>XbaI</i>	
VM 110	<b>GCT TGA TTG CGT TGC TCA TGA CTT</b> GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpW-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>	
VM 111	<b>TCA TGA GCA ACG CAA TCA AGC</b>	Fusionsprimer <i>mcpW-gfp</i> , for <sup>2)</sup>	

Primer für <i>gfp</i> - bzw. <i>mrfp</i> -Fusionen	VM 112	GGT <u>AAG CTT</u> CGG TGA CGA TGA TGG CGG	<i>mcpW</i> , 250 nt nach stopp, rev, <i>HindIII</i>
	VM 113	GC <u>TCT AGA</u> GCG CTG AAC GAC GAG GCC CGC	<i>mcpX</i> , 250 nt vor stopp, for, <i>XbaI</i>
	VM 114	<b>GGA GCA GAA CGT TTC AGG CTT GTA</b> CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpX-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>
	VM 115	<b>CCT GAA ACG TTC TGC TCC</b>	Fusionsprimer <i>mcpX-gfp</i> , for <sup>3)</sup>
	VM 116	GGT <u>AAG CTT</u> GGA GCT CTT CAC AGG GCG	<i>mcpX</i> , 250 nt nach stopp, rev, <i>HindIII</i>
	VM 117	GC <u>TCT AGA</u> CTC GTC AAG GAA ACG GGC GCG	<i>mcpZ</i> , 250 nt vor stopp, for, <i>XbaI</i>
	VM 118	<b>GCA GCG TTT TGA ATC CGA CTT GTA</b> CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpZ-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>
	VM 119	<b>TCG GAT TCA AAA CGC TGC</b>	Fusionsprimer <i>mcpZ-gfp</i> , for <sup>3)</sup>
	VM 120	GGT <u>AAG CTT</u> CCT CGA GGA ACC GTC CCT GGG	<i>mcpZ</i> , 250nt nach stopp, rev, <i>HindIII</i>
	VM 121	GC <u>TCT AGA</u> AAC CCG GTC GAA GGC GTG GCG	<i>cheA</i> , 250nt vor stopp, for, <i>XbaI</i>
	VM 122	<b>CGG CAT TGG TCA TGG GAA CTT GTA</b> CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>cheA-gfp</i> , rev <sup>1)</sup>
	VM 123	<b>TTC CCA TGA CCA ATG CCG</b>	Fusionsprimer <i>cheA-gfp</i> , for <sup>2)</sup>
	VM 124	GGT <u>AAG CTT</u> CCC TGC TCT TGA CCT GCG	<i>cheA</i> , 250nt nach stopp, rev, <i>HindIII</i>
	VM 126	<b>GTC AAT AAG CCG GGG TCG AGT TCT</b> CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Fusionsprimer <i>mcpS-gfp</i> , rev <sup>2)</sup>
	VM 127	<b>AGA ACT CGA CCC CGG CTT ATT GAC</b>	Fusionsprimer <i>mcpS-gfp</i> , for <sup>3)</sup>
	VM 128	<b>GCG CAT GAA CTC CTT GAT TCC GGC</b> TGC AGC AAG AGA	Fusionsprimer <i>cheA-mrfp</i> , rev <sup>4)</sup>
	VM 129	<b>CGG CAT TGG TCA TGG GAA TTA GGC</b> <b>GCC GGT GGA GTG</b>	Fusionsprimer <i>mrfp</i> + Sequenz nach <i>cheA</i> , rev <sup>5)</sup>
VM 134	GC <u>TCT AGA</u> GAC AAG CAG AAG AAC GGC	<i>gfp</i> , 1150 for, <i>XbaI</i>	
VM 135	TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	<i>gfp</i> , rev	
VM 145	<b>GCG CAT GAA CTC CTT GAT AAA TTC</b> TTC CCA ATT GTC CTG CGC	Fusionsprimer <i>mcpX-mrfp</i> , rev <sup>4)</sup>	
VM 146	GGA GCA GAA CGT TTC AGG <b>TCA GGC</b> <b>GCC GGT GGA GTG</b>	Fusionsprimer <i>mrfp</i> + Sequenz nach <i>mcpX</i> , rev <sup>5)</sup>	

1) Unterstreichungen markieren die angegebenen Restriktionsschnittstellen.

2) Fusionsprimer *mcp-gfp*, rev enthält Nukleotidsequenz der letzten sieben Codons von *gfp* und der ersten sechs bis neun Codons der Sequenz nach dem *mcp*. Fettgedruckt die komplementäre Sequenz nach dem *mcp*.

3) Fusionsprimer *mcp-gfp*, for enthält die komplementäre Nukleotidsequenz der ersten sechs bis neun Codons nach dem *mcp*. Fettgedruckt die komplementäre Sequenz nach dem *mcp*.

4) Fusionsprimer *mrfp*, rev (P2 in Abb. 12) enthält Nukleotidsequenz der letzten sechs Codons von *cheA* bzw. *mcpX* und der ersten sechs Codons der Sequenz von *mrfp*. Fettgedruckt die komplementäre Sequenz von *mrfp*.

5) Fusionsprimer *mrfp*, rev (P4 in Abb. 12) enthält Nukleotidsequenz der letzten sechs Codons von *mrfp* und der ersten sechs Codons der Sequenz von *cheA* bzw. *mcpX*. Fettgedruckt die komplementäre Sequenz von *mrfp*.

	Name	Sequenz (5' → 3') <sup>1)</sup>	Bemerkung
Primer für Gendelektionen	VM 60	CGG TAA CGT CTG TCG CGA CTC GAT CAT CGC CTG CG	Deletion PAS2 in McpY, rev
	VM 61	CG CGA CAG ACG TTA CCG	Deletion PAS2 in McpY, for
	VM 62	GAG TCT <u>AAG CTT</u> CGG TCA GCG AAG CGG GCG	$\Delta$ cheA2, Außenprimer, for, HindIII
	VM 63	CCT CGT CCC TCA AAC GAC AGG TGT TAT CAT GTT CGT TGC	$\Delta$ cheA2, Innenprimer, rev
	VM 64	GTC GTT TGA GGG ACG AGG	$\Delta$ cheA2, Innenprimer, for
	VM 65	CCG <u>TCT AGA</u> CGC TTC GAG TGC CCG CGC	$\Delta$ cheA2, Außenprimer, rev, XbaI
	VM 66	GAG TCT <u>AAG CTT</u> CCT GTG GCG TTT ACG ACC	$\Delta$ mcpS, Außenprimer, for, HindIII
	VM 67	CG AGT TCT TCA GGT GTT ATG TGA TCT GCT CAT CCT CAA GAA AGA AGC	$\Delta$ mcpS, Innenprimer, rev
	VM 68	CCG <u>TCT AGA</u> GCC GCG TCC CTG ATT GCG	$\Delta$ mcpS, Außenprimer, rev, XbaI
	VM 69	CAT AAC ACC TGA AGA ACT CG	$\Delta$ mcpS, Innenprimer, for
	VM 130	GAG TCT <u>AAG CTT</u> CCC TCG ATG TCG TCG AGC	$\Delta$ cheW3, Außenprimer, for, HindIII
	VM 131	CGC TCT AGA TGC GCA GGC TCA GGC CGT GCT TGT CAT CGA AGG TCC	$\Delta$ cheW3, Innenprimer, rev
	VM 132	GCG GCC TGA GCC TGC GCA TCT AGA GCG	$\Delta$ cheW3, Innenprimer, for
	VM 133	GGT <u>GAA TTC</u> GGT GCC GGA ACT CAA AGC CGG	$\Delta$ cheW3, Außenprimer, rev, EcoRI

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

	Name	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
Sequenzierprimer	for-40	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA	pK18mobsacB, pUCBM20, for
	M31	GCT CGT ATG TTG TGT GGA ATT G	pK18mobsacB, pUCBM20, rev
	VM 41	GAC CGC AAC GGA AAT ATC	mcpX 427-for
	VM 42	GCG CCG GTC CGC GAT CAG	mcpX 931-for
	VM 43	CAC TCC GTC GTC AAT ATC	mcpX 1431-for
	VM 44	GCC GGG ATC GGT GCC GCC	mcpT 547-for
	VM 45	GGC CAG TTC CAG GGC GCC	mcpT 988-for
	VM 46	CGG CCC ATC GAA AAG CTG	mcpV 640-for
	VM 47	CGT CTG GCG GCC GAA CAG	mcpZ 463-for
	VM 48	CTG ACC GCG ACA CGC AGG	mcpZ 937-for
	VM 49	CTG GCG GAC GGC GCG CTC	mcpZ 1417-for
	VM 50	GCG CAC GAG GCG AAC CAG	mcpZ 1933-for

	Name	Sequenz (5' → 3') <sup>1)</sup>	Bemerkung
Primer zur Klonierung von Promotorkonstrukten	VM 51	GGT <u>GTC TAG AAA</u> ACA TGA TCC CCT CTG	<i>PmcpY</i> , rev in pPHU236, <i>XbaI</i> (M226 neu)
	VM 52	GGT <u>GGG TAC CGA</u> ACG AAT TGA CGG C	<i>PmcpZ</i> , for in pPHU236, <i>KpnI</i>
	VM 53	GGT <u>GCT GCA GAA</u> CAT GGA AAA CAC CTT GGC	<i>PmcpZ</i> , rev in pPHU236, <i>PstI</i>
	VM 54	GGT <u>GGA ATT CGC</u> CCG GCT CTA GGG C	<i>PmcpX</i> , for in pPHU236, <i>EcoRI</i>
	VM 55	GGT <u>GCT GCA GAA</u> CAT GAA ATC CTC ACG	<i>PmcpX</i> , rev in pPHU236, <i>PstI</i>
	VM 56	GGT <u>GGA ATT CGG</u> CGA GGG CGA AGA TCA GGG	<i>PmcpW</i> , for in pPHU236, <i>EcoRI</i>
	VM 57	GGT <u>GCT GCA GTT</u> CAT CGA TAT GGC AGT CC	<i>PmcpW</i> , rev in pPHU236, <i>PstI</i>
	VM 79	GGT <u>GCT GCA GGC</u> CAT CGT CAA AAG CGC AAA CGC	<i>PmcpV</i> , rev in pPHU236, <i>PstI</i> ,
	VM 80	CCG <u>GAA TTC TTG</u> AGC GTC ATC GAC GTC CGC C	<i>PmcpV</i> , for in pPHU236, <i>EcoRI</i> ,
	VM 81	CCG <u>GAA TTC TGC</u> CAT TTG CGG AAC CCT CGG G	<i>PmcpY</i> , for in pPHU236, <i>EcoRI</i> ,
	VM 82	TGC <u>TCT AGA CTG</u> CGA TTT GGA CAA GGC GTC G	<i>PmcpY</i> , rev in pPHU236, <i>XbaI</i>
	VM 83	GGT <u>GCT GCA GAC</u> GCC CGA	<i>PmcpX</i> <sub>lang</sub> , rev in pPHU236, <i>PstI</i>
	VM 84	GGT <u>GGA ATT CGT</u> GGC GAT TCA CGA AGG C	<i>PmcpX</i> , for in pPHU236, <i>EcoRI</i>
	VM 85	GGT <u>GGG TAC CGT</u> AAT GAA TGC CTC AGG C	<i>Pche2</i> -Operon, for in pPHU236, <i>KpnI</i>
	VM 86	GGT <u>GCT GCA GGC</u> GAG CTC CAG CGA CGG GCC	<i>Pche2</i> -Operon, rev in pPHU236, <i>PstI</i>
	VM 125	CG <u>TCT AGA TTG</u> AGC GTC ATC GAC GTC CGC C	<i>PmcpV</i> <sub>lang</sub> , for in pPHU236, <i>XbaI</i>
VM 144	CGT <u>CTA GAT TCG</u> AGC GTC GTC GGG AAG AGG	<i>PmcpV</i> <sub>900bp</sub> , for, in pPHU236, <i>XbaI</i>	
VM 147	GGT <u>GCT GCA GTG</u> CCA GCC GCT CGT CGA GCG CGG	<i>PmcpV</i> <sub>2TM</sub> , rev, in pPHU236, <i>PstI</i>	

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



## 2.3 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien, Enzyme und ihre Herkunft sind in Tab. 4 erfasst.

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

<b>Chemikalien / Enzyme</b>	<b>Herkunft</b>
Acrylamid	Boehringer (Mannheim)
Agarose	Amresco (Solon, OH, USA) bzw. Peqlab
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics bzw. Fermentas
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
<i>anti-rabbit-Ig, horseradish-peroxidase conjugated, complete antibody (from donkey)</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Antiseren gegen <i>S.meliloti</i> -Proteine (aus Kaninchen)	Pineda (Berlin)
L(+)-Arabinose	Sigma (Deisenhofen)
Bacto <sup>TM</sup> Agar	BD (Le Pont de Claix, France)
Bacto <sup>TM</sup> Tryptone	BD (Le Pont de Claix, France)
Bacto <sup>TM</sup> Yeast Extract	BD (Le Pont de Claix, France)
Biotin	Sigma (Deisenhofen)
Bradford Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (Krefeld)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
BSA	New England Biolabs (Schwalbach)
L-Canavaninsulfat-Salz	Sigma (Deisenhofen)
Cephalexinhydrat	Sigma (Deisenhofen)
<i>Chitin-Agarose Beads</i>	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Coomassie Brilliant Blue 250R</i>	Serva (Heidelberg)
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
Dialyseschläuche <i>Spectra/Por</i>	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA)
1 kb DNA-Leiter peqGOLD	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
DNA-Leitermix peqGOLD	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
DNaseI	Sigma (Deisenhofen)
ECL ( <i>enhanced chemoluminescence detection</i> ) Western blotting kit	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
EDTA	Sigma (Deisenhofen)
EDTA-Fe	Sigma (Deisenhofen)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Fumarat	Sigma (Deisenhofen)
Genistein, 98 % HPLC	Sigma (Deisenhofen)
Gentamycin	Sigma (Deisenhofen)

$\alpha$ -GFP Antikörper	Sigma (Deisenhofen) und ABCAM
GFX DNA and gel band purification kit	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
L(-)-Glutamat	Sigma (Deisenhofen)
L(-)-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
High Range Rainbow Markers	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
L(-)-Histidin	Sigma (Deisenhofen)
Hybond ECL Nitrozellulose-Membran und Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
Hydroxypropylmethylcellulose	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
L(-)-Isoleucin	Sigma (Deisenhofen)
Itaconsäure	Fluka (Neu-Ulm)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
Lanolin	Sigma (Deisenhofen)
L(-)-Leucin	Sigma (Deisenhofen)
Luteolin	Sigma (Deisenhofen)
L(-)-Lysin	Sigma (Deisenhofen)
Magermilchpulver Sucofin	Trade Service International
Maleinsäure (Malat)	Sigma (Deisenhofen)
Mannose	Sigma (Deisenhofen)
Melibiose	Sigma (Deisenhofen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem (Darmstadt)
Methyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid	Fluka (Neu-Ulm)
Naringenin	Fluka (Neu-Ulm)
Natrium-N-Laurylsarcosin	Sigma (Deisenhofen)
Neomycin	Sigma (Deisenhofen)
Nucleo Spin Plasmid Kit	Macherey Nagel (Düren)
Noble Agar	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
NP-40 (Nonidet-P40)	Sigma (Deisenhofen)
ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid)	Sigma (Deisenhofen)
Phenol	AppliChem (Darmstadt)
PMSF	Sigma (Deisenhofen)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
Precision Plus Dual Color Protein Standard	Bio-Rad Laboratories (Krefeld)
ProofStart DNA-Polymerase	Quiagen (Hilden)
Sequi-Blot PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories (Krefeld)
QuiaexII Gel Extraction Kit	Quiagen (Hilden)
Rapid T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs (Schwalbach)
D(-)-Ribose	Sigma (Deisenhofen)
RNaseA	Boehringer (Mannheim)
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Serva (Heidelberg)
Sterilfilter	Nalgene
Strep-Tactin Superflow	IBA
Strep-tag II spec. monoclonal antibody	IBA

Succinat	Sigma (Deisenhofen)
<i>SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Pierce
T4-DNA-Ligase	Promega (Madison, USA)
Taq-DNA-Polymerase	Quiagen (Hilden)
TEMED	Sigma (Deisenhofen)
Tetracyclin	Boehringer (Mannheim)
Tris	USB (Cleveland, OH, USA)
Triton X-100	AppliChem (Darmstadt)
Tween 20	Bio-Rad Laboratories (Krefeld)
<i>Ultrafiltration membranes</i>	Millipore
VENT-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman (Wiesloch)
X-Gal	AppliChem (Darmstadt)
X-Gluc (X-Glucuro CHA-Salz)	AppliChem (Darmstadt)
Zelluloseacetatfilter	Sartorius (Göttingen) bzw. Schleicher & Schüll (Dassel)

Chemikalien, die nicht in der Tabelle aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

## 2.4 Nährmedien und Antibiotika

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

#### LB (Luria broth)

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

pH 7,2 mit 1N NaOH einstellen

LB<sub>0</sub>-Platten 15 g Agar

LB-X-Gal-Indikatorplatten

(Blauweiß-*screening*) 20 µg/ml X-Gal, 25 mM IPTG

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

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

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

### **Bromfield**

Bacto <i>Tryptone</i>	400 mg
Bacto <i>Yeast Extract</i>	100 mg
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	67 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Bromfield-Platten	15 g Agar
Bromfield-Schwärmplatten	3 g Agar
Bromfield-Sucrose-Platten	100 g Saccharose

(Selektion auf Ausschluss des *sacB*-Markers)

### **TY** (*T*ryptone *Y*east extract)

Bacto <i>Tryptone</i>	5 g
Bacto <i>Yeast Extract</i>	3 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### **TYC** (*T*ryptone *Y*east extract/*C*alcium)

Bacto <i>Tryptone</i>	5 g
Bacto <i>Yeast Extract</i>	3 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,87 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
TYC-Platten	15 g Agar

**RB (*Rhizobium Basal*)-Medium**

Chemikalien	Volumen	Stammlösung	Endkonzentration
NaCl	0,1 ml	1,0 M	0,1 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1 ml	0,1 M	0,01 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,1 ml	1,0 M	6,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,9 ml	1,0 M	3,9 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 ml	1,0 M	1,0 mM
FeSO <sub>4</sub> in 1 N HCl	0,01 ml	0,1 M	0,001 mM
H <sub>2</sub> O	ad 990 ml		

## Zugabe nach dem Autoklavieren

MgSO <sub>4</sub>	1,0 ml	1,0 M	1,0 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml	1,0 M	0,1 mM
Biotin	1,0 ml	2 mg/l (+ 2 ml 2 M NaOH)	2 µg/l
H <sub>2</sub> O	ad 1 l		

RB-Schwärmplatten

2,7 g Agar  
10<sup>-4</sup> M C-Quelle**SMM (*Sinorhizobium-Motilitätsmedium*; Beringer, 1974; Götz *et al.*, 1982)**

RB-Medium

TY	2 %
Mannitol	0,2 %

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Neomycin	120 µg/ml
Streptomycin	600 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

### 2.4.3 Medium zur Anzucht von *Medicago sativa*

#### Hydroponisches Wachstumsmedium für Pflanzen (HPM)

Substanz	Stammlösung (100x)	Volumen	Menge
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17,4 g/l	10 ml/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g/l	10 ml/l	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,4 g/l	10 ml/l	
Mineralsalze		1 ml/l	
MgSO <sub>4</sub> <sup>1)</sup>	12,3 g/l	10 ml/l	
CaSO <sub>4</sub> <sup>1)</sup>			0,120 g/l
EDTA-Fe <sup>1)</sup>			0,050 g/l

<sup>1)</sup> Zugabe nach dem Autoklavieren

pH 7,5 mit KOH einstellen!

#### Mineralsalze

Chemikalien	Molekulargewicht	Stammlösung (1000x)	Anteil (ppm)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	206,00 g/mol	0,110 g/l	0,500
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83 g/mol	2,850 g/l	0,500
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	249,54 g/mol	0,200 g/l	0,050
ZnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	287,54 g/mol	0,550 g/l	0,126
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	169,02 g/mol	3,070 g/l	1,000

## 2.5 Puffer und Lösungen

### 2.5.1 Lösungen für Mini-, Midi- und Maxi-plasmidisolierung

- GET:
 

50 mM	Glucose
25 mM	Tris/HCl (pH 7,0)
10 mM	EDTA (pH 8,0)

- Lyselösung:
 

200 mM	NaOH
1 % (w/v)	SDS
- Ammoniumacetat (7,5 M)
- Ethanol (70 % und abs.)
- Natriumacetat (3 M)
- Phenol/Chloroform 1:1
- TE:
 

10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)
10 mg/ml	RNaseA
- Kaliumacetat (3 M, pH 4,8):
 

600 ml	Kaliumacetat (5 M)
115 ml	Essigsäure
ad. 1 l	H <sub>2</sub> O

### 2.5.2 Lösungen für genomische DNA-Isolierung

- Saccharose 20%
- Natrium-N-Laurylsarcosin 5 %
- Natriumacetat 3 M
- Chloroform/Isoamylalkohol (CIA) 24:1
- EDTA (pH8,0) 0,25 M

### 2.5.3 Lösungen für die DNA-Auftrennung (Agarosegelelektrophorese)

- TAE (50 x):
 

2 M	Tris/Acetate (pH 8,0)
50 mM	EDTA (pH 8,0)
- DNA-Gel-Ladepuffer:
 

50 %	Glycerin
10 mM	EDTA (pH 8,0)
0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
0,2 % (w/v)	Xylen-Cyanol
1 x	TAE
ad 50 ml	H <sub>2</sub> O

#### 2.5.4 Lösungen für *Southern*-Hybridisierung

- Vorbereitungslösung: 0,25 N HCl
- Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl  
0,5 N NaOH
- Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)  
1,5 M NaCl
- SSC (20 x): 175,3 g NaCl  
88,2 g Na<sub>3</sub>Citrat x 2 H<sub>2</sub>O  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
pH 7,0 einstellen, autoklavieren
- Hybridisierungslösung: 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Goldpuffer  
5 % *Blocking*-Reagenz  
0,5 M NaCl
- *Labeling*-Lösung: 10 µl DNA-Lösung  
10 µl *Labeling*-Reagenz  
10 µl Glutaraldehyd
- Waschpuffer 1: 0,4 % SDS  
0,5 x SSC
- Waschpuffer 2: 2 x SSC



## 2.5.5 Lösungen für die Auftrennung von Proteinen

### SDS-Polyacrylamidgel

	Trenngel (10 %)	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	3,75 ml	3,15 ml
38 % Acrylamid / 2 % Bisacrylamid	1,88 ml	450 µl
1,5 % Tris/HCl	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)
 

30,2 g	Tris
188 g	Glycin
100 ml	10 % SDS
ad 2 l	H <sub>2</sub> O      pH → 8,8
- Probenpuffer (2 x)
 

1,4 ml	1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
23 ml	87 % Glycerin
0,5 ml	10 % SDS
35 ml	H <sub>2</sub> O
- SDS-Ladepuffer (2 x)
 

4,0 ml	10 % SDS
5,3 ml	Probenpuffer (2 x)
0,7 ml	Bromphenolblau
- Färbelösung
 

2,5 g	<i>Coomassie Brilliant Blue 250R</i>
90 ml	Essigsäure
450 ml	EtOH
460 ml	H <sub>2</sub> O
- Entfärbelösung
 

70 ml	Essigsäure
50 ml	EtOH
ad 1 l	H <sub>2</sub> O

## 2.5.6 Lösungen zum Transfer von Proteinen

- PBS:

5,84 g	NaCl
14,24 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
2,76 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
ad 1 l	H <sub>2</sub> O
	auf pH 7,5 einstellen
  
- *Blot*-Puffer:

11,65 g	Tris
5,86 g	Glycin
400 ml	Methanol
ad 1 l	H <sub>2</sub> O

## 2.5.7 Lösungen für die Expression und Reinigung von Proteinen

### 2.5.7.1 Lösungen für die Proteinreinigung mittels IMPACT

- Säulenpuffer (IMPACT):

20 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)
500 mM	NaCl
1 mM	PMSF (optional)
0,1 - 0,5 %	Triton X-100 (optional)
  
- Spaltpuffer (IMPACT):

	Säulenpuffer (IMPACT)
50 mM	DTT
  
- Dialysepuffer:

50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)
5 mM	DTT
10 %	Glycerin



### 2.5.8 Lösungen für die Antikörperreinigung

- Ponceau S
- PBS (2.5.6)
- 0,1 % BSA, 0,1 % NP-40 in PBS (optional)
- 0,2 M Glycin/HCl (pH 2,5)
- 1 M  $K_2PO_4$  (pH 9,0)

### 2.5.9 Lösungen für Reporteragen-Analysen (ONPG-Test)

- Z-Puffer:
 

60 mM	$Na_2HPO_4$
40 mM	$NaH_2PO_4$
10 mM	KCl
50 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
1 mM	$MgSO_4$
ad 1 l	$H_2O$
	pH soll 7,0 sein
- ONPG-Lösung:
 

4 mg/ml	ONPG in Z-Puffer
---------	------------------
- Stopp-Lösung
 

1 M	$Na_2CO_3$
-----	------------

### 2.5.10 Lösungen für die Nodulations-Experimente

- Sterilisierungs-Lösung
 

2,5 %	$HgCl_2$
-------	----------
- Färbelösung (50 mM X-Gluc-Lösung, pH 7,0, 1 % SDS)

$Na_2HPO_4$ (100 mM)	$NaH_2PO_4$ (100 mM)	SDS (10 %)	X-Gluc	$H_2O$
5,77 ml	4,23 ml	2 ml	10,50 mg	ad 20 ml
8,66 ml	6,34 ml	3 ml	15,75 mg	ad 30 ml
14,43 ml	10,57 ml	5 ml	26,25 mg	ad 50 ml

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung von Bakterien

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

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte aerob auf LB-Agarplatten (2.4.1) bei 37 °C im Brutschrank (Memmert). Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium (2.4.1) mit einer Einzelkolonie des Reinigungsausstriches beimpft. Enthielt ein *E. coli*-Stamm ein Plasmid, das eine Antibiotika-Resistenz aufwies, so erfolgte die Selektion auf dieses Plasmid durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C im Reagenzglas-Roller (Heidolph), im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) oder im Trockenschüttler (G76, New Brunswick Scientific) je nach Ansatzvolumen inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels NovaspecII Visible Spectrophotometer verfolgt. Ausgehend von einer 3 ml üN-Kultur, wurden 750 µl stationäre Zellen mit 250 µl 60 % Glycerin gemischt, 30 min bei RT inkubiert, um die *E. coli*-Stämme langfristig bei -20 °C bzw. -80 °C zu lagern.

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

*S. meliloti*-Kulturen wurden, ausgehend von einer Einzelkolonie, in TYC<sub>Sm</sub>-Vollmedium (2.4.2) zwei Tage bei 30 °C im Reagenzglas-Roller (Heidolph), im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) oder im Trockenschüttler (G76, New Brunswick Scientific) angezogen. Für die Selektion wurden TYC-Flüssigmedien sowie TYC-Agarplatten (2.4.2) mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt. Um motile Zellen zu erhalten, wurden Bromfield-Agarplatten (2.4.2) mit RB-Minimalmedium (2.4.2) überschichtet und mit entsprechenden Mengen stationärer *S. meliloti*-Kulturen beimpft. Die Inkubation erfolgte üN bei 30 °C im Brutschrank. Motile Zellen für Wachstumsphasen-abhängige Analysen wurden in *Sinorhizobium*-Motilitätsmedium SMM (2.4.2) angezogen. Die dafür verwendeten Erlenmeyerkolben wurden 24 h mit Chromschwefelsäure behandelt und dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

gespült, um möglichst viele motile Zellen zu erhalten (Rotter *et al.*, 2006). Für die dauerhafte Aufbewahrung wurden die Zellen ebenso präpariert, wie für *E. coli* beschrieben.

## 3.2 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

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

#### 3.2.1.1 Mini-Plasmidisolierung

Nach der Methode von Li & Schweitzer (1993) wurde mit einigen Modifikationen bis zu 100 µg Plasmid-DNA gewonnen. Dazu wurden 3 ml einer ÜN-Kultur in zwei Schritten bei 14000 Upm jeweils 30 s lang in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und das Sediment in 100 µl GET-Lösung (2.5.1) mit 1 µl RNaseA (10mg/ml, Tab. 4) aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl frischer Lyse-Lösung (2.5.1) wurde der Ansatz mit 150 µl 7,5 M Ammoniumacetat versetzt und 10 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 0,6 Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt und erneut 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl Wasser durch Schütteln gelöst.

Bei der DNA-Isolierung für Sequenzanalysen wurde der *NucleoSpin Plasmid Kit* von Macherey-Nagel (Düren) nach Vorschrift der Hersteller verwendet.

#### 3.2.1.2 Midi-Plasmidisolierung

Für Midi-Plasmidisolierungen wurden Bakterien aus einer 100 ml ÜN-Kultur in einer Sorvall-Kühlzentrifuge 10 min mit 6000 Upm (4 °C) sedimentiert und in 3 ml GET-Lösung (2.5.1) resuspendiert. Der Ansatz wurde in SS34-Röhrchen überführt und mit 30 µl RNaseA (10 mg/ml; Tab. 4) versetzt. Nach Zugabe von 8 ml frischer Lyse-Lösung (2.5.1) wurde der Ansatz 10 min auf Eis gestellt, um den Aufschluss zu verbessern. Vor einer weiteren 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden 4,5 ml 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung zugegeben. Die gefällten Bestandteile wurden bei 18000 Upm (4 °C) in der Sorvall-Zentrifuge 15 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur Fällung der DNA in 10 ml eiskaltes Isopropanol überführt, 15 min bei RT inkubiert und erneut 15 min bei 18000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Um

Salze aus der DNA-Präparation zu entfernen wurde diese mit gekühltem 70 %igem EtOH gewaschen und getrocknet. Das Sediment wurde in 4 ml TE-Lösung (2.5.1) aufgenommen, in ein 15 ml-Sarstedt-Röhrchen überführt, mit Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut gemischt und 5 min mit 5000 Upm bei RT in einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der wässrige, von Proteinen gereinigte, Überstand wurde in ein neues Sarstedt-Röhrchen überführt und mit 400 µl 3 M Natriumacetat, sowie 8 ml kaltem EtOH abs. versetzt. Die DNA wurde bei 4 °C 20 min gefällt, 10 min bei RT sedimentiert und in 400 µl Wasser aufgenommen. Zur Verbesserung der Reinigung wurde die DNA nochmals mit 800 µl EtOH abs. und 40 µl 3 M Natriumacetat 20 min bei 4 °C gefällt, abzentrifugiert und anschließend durch schütteln in 400 µl Wasser gelöst.

### **3.2.1.3 Maxi-Plasmidisolierung**

Bakterien aus 500 bis 1000 ml ÜN-Kultur wurden in einer Sorvall-Kühlzentrifuge 10 min mit 6000 Upm (4 °C) sedimentiert und in 60 ml GET-Lösung (2.5.1) mit 90 µl RNaseA (10 mg/ml; Tab. 4) aufgenommen. Zum Aufschluss der Zellen wurden 60 ml frische Lyselösung (2.5.1) zugegeben und der Ansatz sanft gemischt. Nach Zugabe von 30 ml 3 M Kaliumacetat-Lösung pH 4,8 (2.5.1) wurde die Suspension erneut sanft gemischt und 10 min mit 9000 Upm zentrifugiert. Zur Entfernung von Zellbestandteilen wurde der klare Überstand durch ein Mulltuch in neue GSA-Becher filtriert und zur Fällung der DNA in 90 ml eiskaltes Isopropanol überführt. Die gefällte DNA wurde 20 min mit 9000 Upm sedimentiert, mit gekühltem EtOH abs. von Salzen gereinigt, in 8 ml TE (2.5.1) aufgenommen und in ein SS34-Röhrchen überführt, mit 8 ml Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut gemischt und 5 min mit 7000 Upm zentrifugiert. Der von Proteinen gereinigte Überstand wurde in ein neues SS34-Röhrchen überführt, mit 16 ml EtOH abs. sowie 800 µl 3 M Natriumacetat versehen und zur Fällung der DNA üN bei 4 °C inkubiert. Nach Sedimentation der gefällten DNA für 10 min bei 7000 Upm wurde diese in 800 µl Wasser aufgenommen und zur Verbesserung der Reinigung erneut mit 1,6 ml EtOH abs. und 80 µl 3 M Natriumacetat 2 h bei 4 °C gefällt, abzentrifugiert und durch schütteln in 400 µl Wasser gelöst.

### **3.2.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. meliloti***

Zur Isolierung chromosomaler DNA wurden 4 ml Kultur nach 36 h bei 30 °C 8 min mit 5000 Upm abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µl 25 mM EDTA (pH 8,0)

aufgenommen, mit 400 µl 20 % Saccharose in TE (2.5.1) versetzt und für 30 min bei - 20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 20 µl RNaseA (10 mg/ml; Tab. 4) und 40 mg/ml Lysozym (Tab. 4) zugesetzt und der Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inkubation üN bei 50 °C wurden 150 µl 5 % Natrium-N-Laurylsarcosin (2.5.2) und 400 µg/ml Proteinase K (2.5.2) beigemischt. Für eine bessere Fällung der DNA wurden 100 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 (2.5.2) zugegeben und die klare Lösung anschließend zweimal mit 1 Volumen Phenol und einmal mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zur Fällung wurde der Überstand in 1 Volumen eiskaltes Isopropanol überführt, 5 min bei RT inkubiert und 5 min mit 14000 Upm zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 70 % EtOH gewaschen und in 100 µl TE gelöst.

### 3.2.3 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8 - 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit 1 x TAE (2.5.3) als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V. Die DNA wurde durch die Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml) zur Gellösung gefärbt, so dass anschließend die DNA-Banden bei Betrachtung auf einem UV-Schirm (Vilber Lourmat TF20M) detektiert werden konnten. Zur Bestimmung der genauen Bandengröße wurde ein Größenstandard (peqGOLD DNA-Leitermix bzw. peqGOLD 1 kb DNA-Leiter, Peqlab) mit aufgetragen.

### 3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Banden der gesuchten Größe wurden unter UV-Licht (UV-Schirm Chromato-Vue Transilluminator C60, Ultra Violet Products Inc.) mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mittels *Quiaex II Gel Extraction Kit* (Quiagen) bzw. *GFX PCR and gel band purification kit* (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt.



### 3.3 Enzymatische Modifizierung von DNA

#### 3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

DNA wurde in der Regel mit Restriktionsenzymen der Firma NEB gespalten. Zum Einstellen der optimalen Pufferbedingungen wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet, wobei DNA-Mengen zwischen 0,5 µg und 2 µg für analytische und bis zu 10 µg für präparative Anwendungen eingesetzt wurden. In der Regel wurden drei Einheiten des Restriktionsenzym pro 0,5 µg DNA verwendet. Eine „Einheit“ entspricht der Enzymaktivität, die 1µg Lambda-DNA bei entsprechender Temperatur in 1 h vollständig spaltet. Plasmid-DNA wurde ein bis drei Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur geschnitten.

#### 3.3.2 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (AP, Tab. 4) war bei Vektoren erforderlich, die nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, um eine Religierung zu vermeiden. Die alkalische Phosphatase entfernt die Phosphatgruppe am 5'-Ende geschnittener DNA. Nach dem enzymatischen Verdau wurde der Vektor 30 min bei 25 °C bzw. 37 °C mit 2-4 U alkalischer Phosphatase behandelt. Anschließend wurde der Ansatz mit dem *Quiaex II Gel Extraction Kit* (Quiagen) bzw. dem *GFX PCR and gel band purification kit* (Amersham Biosciences) gereinigt.

### 3.4 DNA-Techniken

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

Zur stabilen Vermehrung von DNA-Fragmenten müssen diese vor der Transformation in geeignete Vektoren kloniert werden. Als Vektoren wurden pBBR1MCS2, pEGFP-N1, pHT28, pK18*mobsacB*, pPHU234 und seine Derivate pPHU235 und pPHU236 (Hübner *et al.*, 1991), pTYB1 und pTYB11 verwendet (Tab. 2). Die Ligationsansätze hatten ein Volumen von 20 µl.

Die erforderlichen Pufferbedingungen wurden mit Hilfe der jeweiligen Ligase-Puffer eingestellt. Fragment und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 5:1 bis 10:1 eingesetzt. Der Ansatz wurde mit zwei Einheiten T4-DNA-Ligase versetzt, mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und 1 h bei 37 °C (*Rapid* T4-DNA-Ligase, Fermentas) oder üN bei 10-12 °C (T4-DNA-Ligase, Promega) inkubiert.

### 3.4.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente Zellen von *E. coli* BL21DE3, DH10B, ER2566, RP437, S17-1 und SCS110 wurden nach einer Vorschrift von Maniatis und Kollegen (1982) hergestellt. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20 µl Ligationsansatz (3.4.1) bzw. 2 µl Plasmid-DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 90 s auf 42 °C erwärmt (Hitzeschock), wobei die kompetenten Zellen das Plasmid aufnehmen. Bei Ligationsansätze mit pPHU234 und seinen Derivaten wurde der Hitzeschock 2 min durchgeführt. Zur Regeneration wurden die Zellen 1 h bzw. 2 h (pPHU234, pPHU235, pPHU236) in 3 ml LB-Medium (2.4.1) im Reagenzglasroller bei 37 °C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 Upm (Hettich Tischzentrifuge) wurde das Sediment im Rücklauf resuspendiert und davon 10 µl bzw. 90 µl auf die entsprechenden Selektions-Agarplatten (2.4.1) ausplattiert, die gegebenenfalls mit 40 µl X-Gal und 8 µl IPTG versehen waren, um Blauweiß-*screening* durchführen zu können.

## 3.5 PCR-Methoden

### 3.5.1 Amplifikation von DNA

Zur raschen Gewinnung von DNA-Fragmenten für Analysezwecke oder Klonierungen wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt (Mullis, 1986). Als Matritze dienten 100 ng genomische DNA aus *S. meliloti* oder Plasmide. Für die Herstellung von DNA-Fragmenten für die *overlap-extension* PCR und zur Überprüfung von Klonierungen wurden sowohl die Taq-, als auch die *ProofStart*<sup>TM</sup>-Polymerase verwendet. Die *ProofStart*<sup>TM</sup>-Polymerase zeichnet sich durch eine reduzierte Fehlerrate aus, weil durch chemische Modifizierungen die Polymerase- und *proofreading*-Aktivität temporär blockiert wurde. Dadurch werden der Abbau der Primer

und deren unspezifische Bindung an die Matrizen-DNA zu Beginn der PCR-Reaktion verhindert. Durch eine 5 minütige Inkubation des PCR-Ansatzes bei 95 °C wird diese Inaktivierung vollständig aufgehoben. Durch Zugabe von *Q-Solution* kann die PCR von „schwierigen“ Fragmenten verbessert werden. Nach Möglichkeit wurden die Primer (Tab. 3) so gewählt, dass ihre Schmelztemperaturen ähnlich waren. Die *annealing*-Temperaturen richteten sich nach den Schmelztemperaturen der Primer, die Synthesezeit nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments (ca. 1 min pro kb). Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Biometra Thermocycler (UNO II) durchgeführt, als Reaktionsgefäße dienten ultradünne PCR *tubes* (Biozym, Hess. Oldendorf).

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

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

1 min Denaturierung bei 95 °C

1 min *Annealing* bei 52-58 °C

1 min Elongation bei 72 °C

Nach Beendigung der 35 Zyklen wurde der Ansatz noch 15 min bei 72 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend bei 4 °C gestoppt, die erhaltenen DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese (3.2.3) aufgetrennt und mit dem QuiaexII *Gel Extraction Kit* bzw. mit dem GFX-*Kit* (3.2.4) gereinigt.

Zur Amplifikation größerer DNA-Fragmente (> 2 kb), die insbesondere für die *gfp*-Fusionen der Rezeptorgene (3.5.3) benötigt wurden, wurde ein Protokoll mit einer Kombination aus Taq- und *ProofStart*<sup>TM</sup>-Polymerase verwendet.

<b>PCR-Ansatz mit Taq- und <i>ProofStart</i><sup>TM</sup>-Polymerase</b>	
Matritzen-DNA	1 µl (15 ng)
10 x Puffer	5 µl
5 x <i>Q-Solution</i>	10 µl
10 mM dNTPs	1,5 µl
Primer 1	0,25 µl (25 pmol)
Primer 2	0,25 µl (25 pmol)
<i>ProofStart</i> <sup>TM</sup> -Polymerase	1 µl (1:24 in Puffer, 0,2 U)
Taq-Polymerase	1 µl (5 U)
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Zur Aktivierung der *ProofStart*<sup>TM</sup>-Polymerase und Aufschmelzung der Matritzen-DNA wurde der Ansatz 10 min bei 95 °C inkubiert. Es folgten 35 Zyklen der Abfolge:

10 s	Denaturierung bei 95 °C
1 min 30 s	<i>Annealing</i> bei 56-66 °C
2 min 50 s	Elongation bei 68 °C

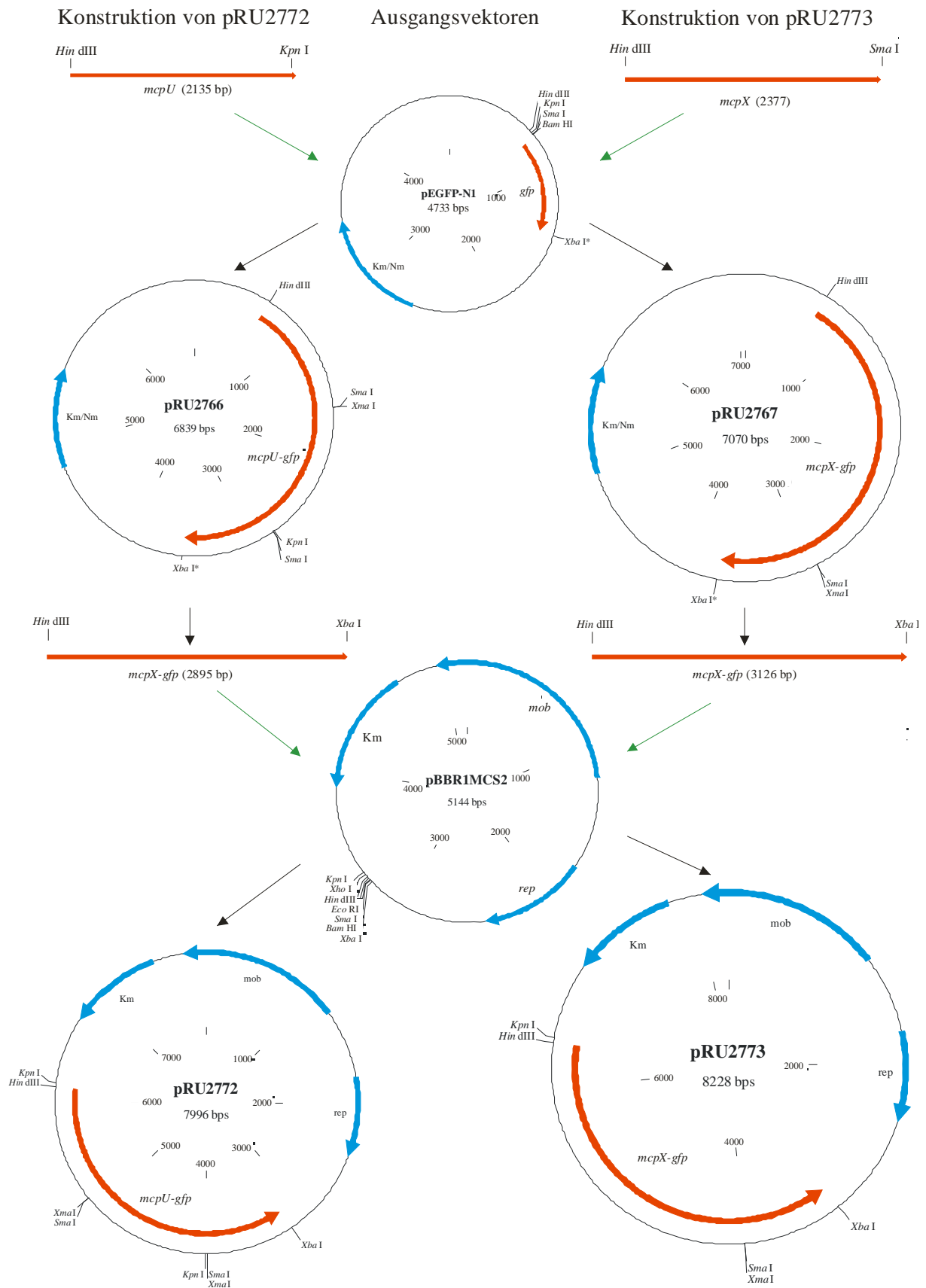
Nach Beendigung der 35 Zyklen wurde der Ansatz noch 10 min bei 68 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend bei 4 °C gestoppt, die erhaltenen DNA-Fragmente wie oben beschrieben weiter verwendet.

### 3.5.2 PCR von DNA aus einer *S. meliloti*-Einzelkolonie

Die PCR-vermittelte Amplifikation von DNA-Fragmenten (3.5.1) konnte auch direkt aus einer *S. meliloti*-Einzelkolonie erfolgen. Mittels eines sterilen Zahnstochers wurden Zellen einer Einzelkolonie von einer Agarplatte gepickt, in Wasser und 10 x Puffer resuspendiert und 15 min bei 95 °C aufgeköcht, um die DNA aus den Zellen freizusetzen. Nach 5 minütiger Abkühlung auf Eis wurde der Ansatz in die PCR-Reaktion eingesetzt.

### 3.5.3 Konstruktion der *gfp*-Fusionsplasmide

Für die C-terminale Fusion der Rezeptoren mit GFP wurden die Rezeptorgene mittels PCR aus dem *S. meliloti*-Genom amplifiziert (3.5.1) und in den *gfp*-Fusionsvektor pEGFP-N1 kloniert (3.4.1).



**Abb. 9.** Fließschema zur Klonierung von *mcpU* bzw. *mcpX* in pEGFP-N1 (pRU2766 und pRU2767) und zur Umklonierung von *mcpU*- bzw. *mcpX-gfp* in pBBR1MCS2 (pRU2772 und pRU2773). Erläuterungen im Text. Vertikale Pfeile: Restriktionsverdau; Grüne Pfeile: Ligationen; Schwarze Pfeile: Ligationsprodukte.

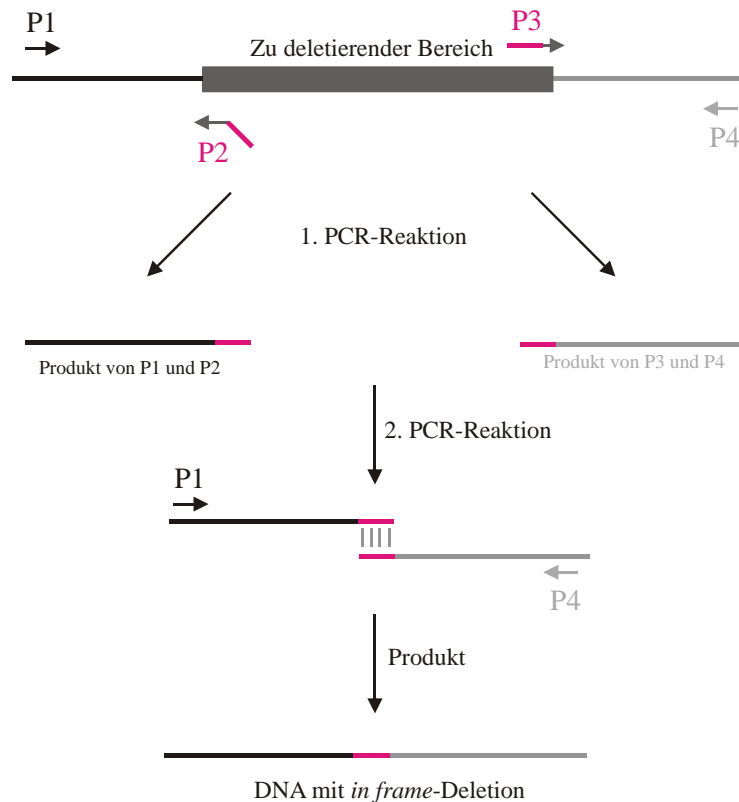
Aufgrund der Klonierungen wurden alle Gene, mit Ausnahme von *mcpU* (9 AS), über einen sechs AS langen *linker* mit *gfp* fusioniert. Exemplarisch für alle Rezeptoren sind die Klonierungen für die *gfp*-Fusion von *mcpU* und *mcpX* in Abb. 9 dargestellt. Da pEGFP-N1 keinen *ori* für Rhizobien besitzt, wurden die Fusionskonstrukte zur Expression in das *broad host range*-Plasmid pBBR1MCS2 umkloniert. Die Umklonierung erfolgte in fast allen Fällen durch einen Restriktionsverdau mit *HindIII* und *XbaI* (für *mcpW-gfp* mit *KpnI* und *XbaI*). Um den methylase-sensitiven *XbaI*\*-Schnitt verwenden zu können, mussten die entstandenen Plasmide (Tab. 2; in Abb. 9 pRU2766 und pRU2767) zuerst in den *dam*-Methylase-defizienten *E. coli*-Stamm SCS110 transformiert (3.4.2) und erneut isoliert (3.2.1.2) werden. Anschließend konnten die Rezeptorgen-*gfp*-Fusionskonstrukte isoliert und in pBBR1MCS2 ligiert werden (3.4.1).

### 3.5.4 PCR-Mutagenese (*overlap extension*)

#### 3.5.4.1 Herstellung von *in frame*-Deletionen

*In frame*-Deletionen wurden mittels *in vitro* PCR-Mutagenese nach einem modifizierten Protokoll von Higuchi (1989) eingeführt.

Die gewünschte *in frame*-Deletion in einer DNA-Sequenz wurde in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen mit Hilfe von vier geeigneten Primern erzeugt. Als Matritze diente chromosomale DNA aus *S. meliloti* (3.2.2). Das Verfahren ist in Abb. 10 als Fließschema dargestellt. Die Außenprimer P1 und P4 lagen ca. 250 bp *upstream* bzw. *downstream* des zu deletierenden Bereichs. Die Innenprimer P2 und P3, die eine Deletion des gewünschten Sequenzbereiches ermöglichten, waren komplementär zueinander und zu einer die Deletion flankierenden Sequenz. Zunächst wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen jeweils ein 250 bp großes DNA-Fragment *upstream* bzw. *downstream* der Deletion gelegenen Sequenz erzeugt. In der darauf folgenden PCR-Reaktion wurden die gereinigten Fragmente (3.2.4), die aufgrund ihrer komplementären Sequenz Wasserstoffbrückenbindungen eingehen konnten, als Matritze eingesetzt. In dieser PCR wurde mit den Außenprimern P1 und P4 ein Fragment als Produkt erzeugt, das zentral die Sequenz vor und nach der Deletion im richtigen Leserahmen (*in frame*) enthielt. Die Außenprimer enthielten geeignete Restriktionsschnittstellen, die eine gerichtete Klonierung in den Selektionsvektor pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) ermöglichten.

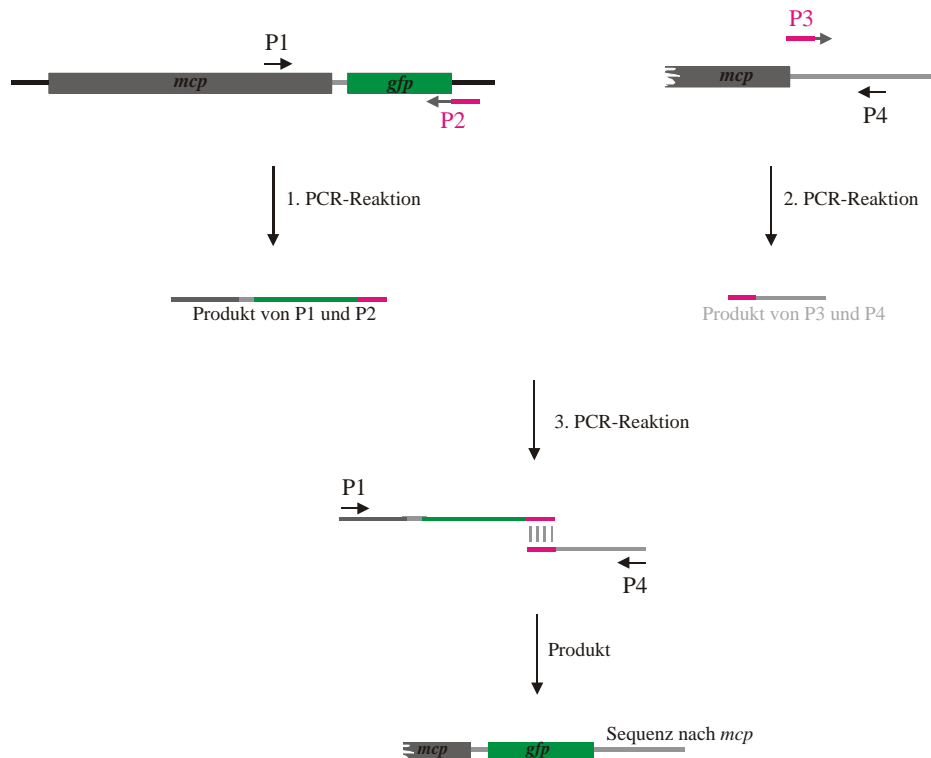


**Abb. 10. Fließschema einer PCR-Mutagenese. P1 und P4: Außenprimer; P2 und P3: komplementäre Innenprimer; schwarz: Matritze und Produkt der PCR mit den Primern P1 und P2; grau: Matritze und Produkt der PCR mit den Primern P3 und P4; magenta: komplementäre Bereiche mit neu eingeführter Deletion. Erläuterungen im Text.**

### 3.5.4.2 Erzeugung chromosomaler Rezeptor-*gfp*-Fusionen

Die chromosomalen *gfp*-Fusionen wurden in modifizierter Form ebenfalls mittels *overlap extension* PCR (3.5.4.1) hergestellt. Das Prinzip entsprach dem Schema in Abb. 11.

Abweichend zur *in frame*-Deletion trugen hier die Innenprimer P2 und P3 die ersten sechs Anticodons nach dem entsprechenden Rezeptorgen. Als Matritze für die erste PCR-Reaktion wurde die bereits bestehende Rezeptor-*gfp*-Fusion in pBBR1MCS2 (Abb. 9, 3.5.3) verwendet. Das entstehende DNA-Fragment bestand aus den letzten 250 bp des Rezeptorgens ohne Stopp-Codon, der *linker*-Region und der *in frame* liegenden *gfp*-Sequenz, an die mit einem Stopp-Codon die ersten 18 bp der Rezeptorgen-nachfolgenden Sequenz anschlossen. In der zweiten PCR-Reaktion wurde mit chromosomaler DNA (3.2.2) als Matritze die 250 bp-Sequenz nach dem Rezeptorgen amplifiziert.



**Abb. 11. Fließschema zur Klonierung eines Rezeptor-*gfp*-Fusionskonstrukts für chromosomale Insertionen. P1 und P4: Außenprimer; P2 und P3: Innenprimer; hellgrau: Sequenz nach *mcp*; magenta: komplementäre Sequenz der Innenprimer. Erläuterungen im Text.**

Die entstandenen Fragmente konnten in der dritten PCR-Reaktion mit den Primern P1 und P4 zu einem Fusionskonstrukt aus Rezeptorgen-, *gfp*- und der *downstream*-Sequenz des Rezeptorgens verbunden werden, wobei auf die Erhaltung des Leserahmens (*in frame*) geachtet wurde. Die Außenprimer enthielten geeignete Restriktionsschnittstellen, die eine gerichtete Klonierung in den Selektionsvektor pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) ermöglichten.

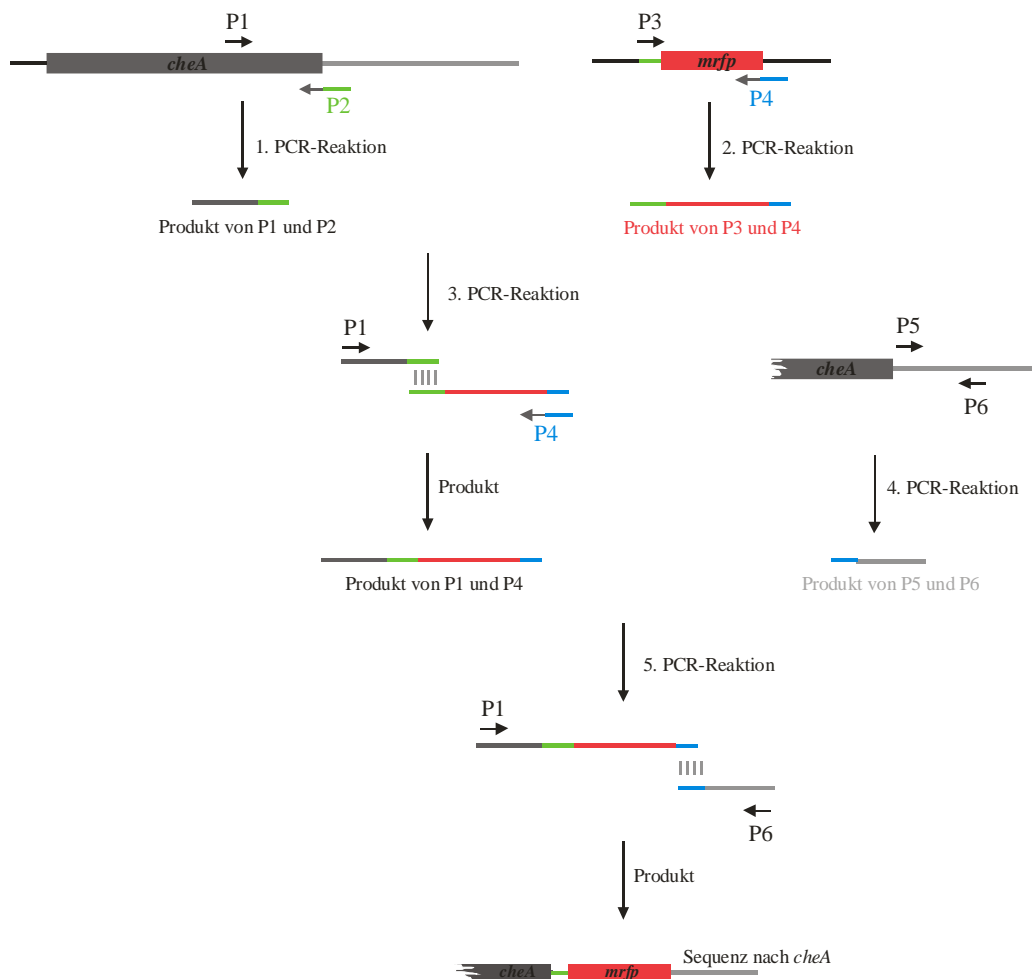
### 3.5.4.3 Erzeugung der chromosomalen *cheA*-*mrfp*-Fusion

Die chromosomale *mrfp*-Fusion von *cheA* wurde ebenfalls in modifizierter Form mit Hilfe der *overlap extension* PCR (3.5.4.1) hergestellt. Das Prinzip entsprach dem Schema in Abb. 12.

Abweichend zu den chromosomalen Rezeptor-*gfp*-Fusionen waren hier fünf PCR-Reaktionen nötig. Diese komplizierte Strategie war erforderlich, weil das zugrunde liegende pmRFP-Plasmid (Tab. 2) keine geeigneten Schnittstellen für eine Fusion von *cheA* mit *mrfp* besaß. Zunächst wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen die letzten 300 bp von *cheA* ohne Stopp-Codon mit der *in frame* anschließenden sechs Codons langen *linker*-Region von *mrfp* (Abb. 12, 1. PCR-Reaktion) und *mrfp* einschließlich des Stopp-Codons mit der Sequenz der



ersten sechs Codons nach *cheA* im Anschluss (Abb. 12, 2. PCR-Reaktion) amplifiziert. In der ersten *overlap extension* PCR-Reaktion entstand ein DNA-Fragment aus den letzten 250 bp des *cheA*-Genes ohne Stopp-Codon, der *linker*-Region und der *in frame* liegenden *mrfp*-Sequenz, an die die ersten 18 bp der *cheA*-nachfolgenden Sequenz anschlossen (Abb. 12, 3. PCR-Reaktion). In der vierten PCR-Reaktion wurde mit chromosomaler DNA (3.2.2) als Matritze die 250 bp-Sequenz nach dem *cheA*-Gen amplifiziert. Die entstandenen Fragmente konnten in einer zweiten *overlap extension* PCR-Reaktion mit den Primern P1 und P6 zu einem Fusionskonstrukt aus *cheA*, *linker*, *mrfp* und der *downstream*-Sequenz von *cheA* verbunden werden, wobei auf die Erhaltung des Leserrahmens (*in frame*) geachtet wurde. Die Außenprimer enthielten geeignete Restriktionsschnittstellen, die eine gerichtete Klonierung in den Selektionsvektor pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) ermöglichten.



**Abb. 12. Fließschema zur Erzeugung eines *cheA-mrfp*-Fusionskonstrukts zur chromosomalen Insertion. P1 und P6: Außenprimer mit geeigneten Restriktionsschnitten; P2, P3, P4 und P5: Innenprimer; hellgrau: Sequenz nach *cheA*; rot: Sequenz von *mrfp*; grün: komplementäre Sequenz des Innenprimers P2 zu der *linker*-Region vor der *mrfp*-Sequenz; blau: komplementäre Sequenz des Innenprimers P4 zu den ersten sechs Codons in der Sequenz nach *cheA*. Erläuterungen im Text.**

### 3.6 DNA-Sequenzanalysen und Auswertungsverfahren

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

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

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

*In frame*-Deletionen, Rezeptor-*gfp*- und *cheA-mrfp*-Fusionen wurden durch homologe Rekombination zwischen den *in vitro* veränderten Sequenzen und Wildtypsequenzen in das Genom von *S. meliloti* eingeführt. Dazu wurde der mobilisierbare *suicide*-Vektor pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) verwendet, der einen Replikationsursprung für *E. coli*, nicht aber für *S. meliloti* besitzt. Das einzuführende Fragment wurde in den Vektor kloniert (3.4.1) und mit dem entstandenen rekombinanten Plasmid *E. coli* S17-1 transformiert (Simon *et al.*, 1983). Der konjugative Plasmidtransfer von *E. coli* S17-1 nach *S. meliloti* wurde, nach einer Vorschrift von Simon *et al.*, 1983, auf Membranfiltern durchgeführt. Stationäre ÜN-Kulturen von *S. meliloti* (Rezipient) und *E. coli* (Donor) wurden in einer 10 ml-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 (*E. coli*: 5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml; *S. meliloti*: 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) verdünnt und im Schüttelwasserbad bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,4 inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> wurden 500 µl *S. meliloti*-Zellen (2 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) und 250 µl *E. coli*-Zellen (1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) vermischt, zwei Minuten mit 6000 Upm in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert und in 100 µl TYC-Medium (2.4.2) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde auf sterile Zelluloseacetat-Filter übertragen, die auf vorgewärmte TYC-Platten (2.4.2) aufgelegt waren, und 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml

TYC-Medium vom Filter gespült und Verdünnungen auf Platten mit Selektion auf das Plasmid und den Rezipientenstamm (*S. meliloti*) ausplattiert (TYC<sub>SmNm</sub>), so dass nur Zellen mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Die Integration erfolgte durch ein einfaches Rekombinationsereignis in das Genom. Von den gewachsenen Zellen wurden vier Kolonien auf TYC<sub>SmNm</sub>-Platten vereinzelt. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden die Zellen 2 d ohne Selektion auf das Plasmid in TYC<sub>Sm</sub>-Medium angezogen. Während dieser Zeit sollte das zweite Rekombinationsereignis stattfinden. Mit Hilfe des *sacB*-Gens konnte auf dieses Rekombinationsereignis selektiert werden (Ried & Collmer, 1987; Schäfer *et al.*, 1994; Selbitschka *et al.*, 1993). Von den Kulturen wurden Verdünnungen erstellt und diese auf Bromfield-Platten mit 10 % Saccharose (2.4.2) ausplattiert. Alle Zellen, die das Plasmid noch enthielten, sollten abgetötet werden. Diese Zellen wandelten mit Hilfe der Levansaccharase SacB Saccharose in Levane um, die von *S. meliloti* nicht verwertet werden können. Levane häufen sich im Periplasma an, bis die Zellen platzen. Die anschließende indirekte Selektion auf TYC<sub>Sm</sub>- und TYC<sub>SmNm</sub>-Platten zeigte, dass etwa 50 % der Zellen, die auf den Bromfield-Saccharose-Platten wuchsen, das Plasmid und somit die Antibiotikaresistenz durch ein zweites Rekombinationsereignis verloren hatten. 10-50 % dieser Zellen besaßen die mutierte Sequenz anstelle der Wildtypsequenz im Genom. Mutationen wurden durch PCR (3.5.2) und anschließende Sequenzierung (3.6), Deletionen auch durch *Southern blot*-Analysen (3.8) überprüft.

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

Die Einführung von *in frame*-Deletionen ins Genom von *S. meliloti* (3.7) wurde mit Hilfe der *Southern blot*-Hybridisierung nachgewiesen. Dazu wurde eine spezifische markierte Sonde an die genomische DNA hybridisiert und die Größe des gebundenen DNA-Fragments analysiert.

#### 3.8.1 Nukleinsäuretransfer

Genomische DNA (3.2.2) wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente geschnitten (3.3.1) und während einer dreistündigen Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (3.2.3). Nach photographischer Dokumentation wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 N HCl-Lösung zur Depurinierung der DNA geschwenkt. Anschließend wurde die DNA

durch eine 30 minütige Inkubation in einer 0,5 N NaOH- 1,5 M NaCl-Lösung (2.5.4) denaturiert und schließlich 30 min mit 0,5 M Tris pH 7,5 und 1,5 M NaCl (2.5.4) neutralisiert. Anschließend wurde die DNA mittels Kapillarkraft  $\mu$ N auf eine Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Tab. 4) übertragen und durch UV-Belichtung (Stratagene *UV crosslinker*, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

### 3.8.2 Markierung von Sonden

Die Markierung der Chemolumineszenz-Sonden erfolgte mit dem ECL (*enhanced chemoluminescence*) *Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems Kit* (Amersham Biosciences) nach Vorschrift des Herstellers. 100 ng DNA wurden mit Meerrettich-Peroxidase (2.5.4) markiert und als Sonde umgehend zur prähybridisierten Membran (3.8.3) gegeben.

### 3.8.3 Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der markierten Sonde an die Nylonmembran wurde eine Prähybridisierung durchgeführt. Die Prähybridisierungslösung bestand aus 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Gold-Hybridisierungspuffer, 0,5 M NaCl und 5 % *blocking reagent* (2.5.4). Die Membran wurde mit der Lösung in Haushaltsfolie eingeschweißt und 2 h bei 42 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe der mit Meerrettich-Peroxidase markierten Sonde (3.8.2) zur Membran erfolgte die Hybridisierung  $\mu$ N bei 42 °C im Schüttelwasserbad. Nicht gebundene Sonde wurde durch 2 x 10 min Waschen mit Waschpuffer 1 (2.5.4) bei 52 °C und 2 x 5 min mit Waschpuffer 2 (2.5.4) bei RT entfernt. Zur Detektion wurde die Membran 90 sec mit der Detektionslösung aus Luminol und chemischen Verstärkern (1:1-Mischung von Lösung 1 und Lösung 2, *ECL-Kit*) inkubiert. Die Membran wurde zwischen zwei klare Kopierfolien in eine lichtdichte Filmkassette gelegt. Die Lichtsignale der Oxidationsreaktion konnten mit Hyperfilm<sup>TM</sup> *ECL High performance chemiluminescence film* (Amersham, Buckinghamshire) nach 10 min bis 1 h Expositionszeit bei RT detektiert werden.

### 3.9 Reportergergen-Analysen (ONPG-Test oder *Miller Assay*)

Die Aktivität der *mcp*-Promotoren und der Promotorbereiche der beiden *che*-Operons in *S. meliloti* wurde durch Reportergergen-Analysen (Miller, 1972) bestimmt. Als Vektoren für die translationalen *lacZ*-Fusionen der entsprechenden Promotoren dienten das *broad-host-range* Plasmid pPHU234 und seine Derivate pPHU235 und pPHU236, die ein promotorloses *lacZ*-Gen in den verschiedenen Leserahmen tragen (Hübner *et al.*, 1991). Die resultierenden *lacZ*-Fusionsplasmide wurden durch Konjugation (3.7) in die zu untersuchenden *S. meliloti*-Stämme eingebracht und durch Doppelselektion mit Streptomycin und Tetracyclin etabliert (Labes *et al.*, 1990). Das in den Vektoren enthaltene *lacZ*-Gen kodiert für die *E. coli*- $\beta$ -Galaktosidase, die das in den Reportergergen-Analysen eingesetzte Substrat o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid (ONPG) zu Galaktose und o-Nitrophenolat hydrolysiert. Letzteres besitzt ein Absorptionsmaximum bei 420 nm.

*S. meliloti*-Kulturen, die das *lacZ*-Fusionsplasmid enthielten, wurden motil auf überschichteten Platten (3.1.2) angezogen und ihre Zelldichte photometrisch ( $OD_{600}$ ; NovaspecII, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die Menge an eingesetzter Zellkultur richtete sich nach dem erwarteten Umsatz an ONPG und lag überwiegend bei 0,5 ml. Die Proben wurden mit Z-Puffer (2.5.9) auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt, mit einem Tropfen Toluol versetzt, um die Membran für kleine Moleküle wie ONPG permeabel zu machen, und 45 min bei 37 °C inkubiert. Die eigentliche Reaktion lief bei 28 °C im Schüttelwasserbad ab. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer) wurde die Reaktion nach fünfminütiger Adaptation gestartet. Bei ausreichender Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 0,5 ml 1 M  $Na_2CO_3$ -Lösung beendet und die Reaktionszeit protokolliert. Durch Zentrifugation (5 min, 14 000 Upm, Eppendorf-Zentrifuge) wurden die Zellen entfernt. Die Absorption des Überstandes bei 420 nm entsprach der Menge des freigesetzten o-Nitrophenolats. Für die wachstumsphasen-abhängigen Reportergergen-Analysen wurden die Zellen in SMM (2.4.2) zur Motilität angezogen. Die Probenentnahme erfolgte alle 2 h über einen Zeitraum von 64 h. Nach Bestimmung der  $OD_{600}$  wurden die Zellen 1:1 in Z-Puffer (2.5.9) verdünnt und wie oben beschrieben untersucht.

Die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wird in Einheiten pro mg Protein gemessen. Eine Einheit  $\beta$ -Galaktosidase ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 nmol ONPG pro Minute bei 28 °C hydrolysiert.

Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde nach folgender Formel berechnet:

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

- OD<sub>600</sub>: Die optische Dichte bei 600 nm ist ein Maß für die Zelldichte  
OD<sub>420</sub>: Die optische Dichte bei 420 nm entspricht der o-Nitrophenolatabsorption  
t: Reaktionszeit in min  
v: Volumen der eingesetzten Zellsuspension in ml

Zur Untersuchung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Wurzelknöllchen, wurden die Knöllchen von bis zu zehn Pflanzen verwendet. Dazu wurden Keimlinge aus oberflächen-sterilisierten Samen gezogen (3.20.1). Nach sieben Tagen Wachstum in Flüssigmedium wurden die Pflänzchen mit den Testkulturen, die die Promotorkonstrukte auf Plasmid trugen, beimpft (3.20.2). Zehn Tage nach der Inokulation wurden die Knöllchen geerntet und nach einem Protokoll von Wang *et al.* (1989) für die Reporteragen-Analysen vorbereitet. Dazu wurden die Knöllchen von fünf bis 10 Pflanzen in 1 ml gekühlte Lösung von 0,25 M Mannitol und 0,05 M Tris / HCl (pH 7,8) aufgenommen. Die Knöllchen wurden mit einem Glasstab zerquetscht. Nach dem Absetzen der Pflanzenrückstände wurden Aliquots (0,5 ml) der Bakteroiden-Lösung abgenommen, die OD<sub>600</sub> bestimmt und sofort in den  $\beta$ -Galaktosidase-Test nach Miller, 1972 eingesetzt (s. o.).

## 3.10 Isolierung rekombinanter Proteine

### 3.10.1 Das IMPACT™-CN-System

Proteine wurden mit Hilfe des IMPACT™-CN-Systems (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) von New England BioLabs exprimiert und gereinigt. Als Expressionsvektoren wurden die pTYB-Vektoren des IMPACT-Systems mit den jeweiligen Genen verwendet. Die mittels PCR amplifizierte *S. meliloti*-Gene (3.5) wurden über geeignete Schnittstellen in den pTYB1- bzw. pTYB11-Vektor kloniert (Tab. 5), wodurch eine N- bzw. C-

terminale Fusion des gewünschten Proteins mit dem *Intein-Tag* erfolgte, ohne dass zusätzliche Aminosäuren eingefügt wurden.

**Tab. 5: Verwendete IMPACT-Vektoren**

<b>Gen</b>	<b>Plasmid</b>	<b>IMPACT-Vektor</b>	<b>Fusion</b>	<b>Klonierungs-Schnittstellen</b>	<b>Referenz</b>
<i>cheA</i>	pRU2326	pTYB1	C-terminal	<i>NdeI</i> / <i>SapI</i>	Scharf, 2000
<i>cheW</i>	pRU2551	pTYB1	C-terminal	<i>NdeI</i> / <i>SapI</i>	Süß, 2001
<i>icpA</i>	pRU2550	pTYB11	N-terminal	<i>SapI</i> / <i>SmaI</i>	Süß, 2001

Die pTYB-Vektoren enthalten einen T7-Promotor, sowie eine Kopie des *lacI*-Gens, das für den Lac-Repressor kodiert, um eine stringente Kontrolle über die Expression des Zielgenes zu erhalten. Der Lac-Repressor bindet an die Operator Sequenz, die unmittelbar *downstream* des T7-Promotors liegt. Ohne Induktion durch IPTG wird die Expression des fusionierten Gens unterdrückt. Der *E. coli*-Expressionsstamm ER2566 wurde mit den entsprechenden Plasmiden (Tab. 5) transformiert (3.4.2). *E. coli* ER2566 trägt chromosomal im *lacZ*-Gen eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, wodurch dieses Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors steht. Ohne IPTG-Induktion wird die Expression der T7-RNA-Polymerase durch die Bindung des LacI-Repressors an den *lac*-Promotor unterdrückt.

Zur Isolierung des rekombinanten Proteins wurden zwei bis sechs 1 l-Kulturen in LB<sub>Ap</sub> (2.4.1) mit je 5 ml ÜN-Kulturen beimpft und im Trockenschüttler (G76, New Brunswick Scientific) bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 angezogen. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Die Expressionsdauer und -temperatur wurde den Erfordernissen des jeweiligen Proteins angepasst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall, GSA-Rotor, 6000 Upm, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Für den Zellaufschluss mit der French Press wurden die Zellen aus 2 l-Kulturen in 20 ml Aufschlusspuffer (2.5.7.1) aufgenommen. Nach drei French Press-Passagen (900 psi, 40 ml Maxizelle, vorgekühlt) wurde der Ansatz mit 10 µg/ml DnaseI versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und erneut dreimal über die French Press gegeben. Zellreste und Membranen wurden durch Zentrifugation (Sorvall, SS34-Rotor, 20000 Upm, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Der klare Überstand (Cytosol) wurde mit einer Flussrate von max. 0,5 ml/min auf eine Chitin-Agarose-Säule aufgetragen, wobei das rekombinante Fusionsprotein über die Chitin-Binde-Domäne an das Säulenmaterial bindet. Nach dem

Waschen mit fünf Volumen Säulenpuffer (2.5.7.1) wurden zwei Volumen Säulenpuffer mit 50 mM DTT mit maximaler Flussrate über die Säule gegeben. Der verwendete *Intein-Tag* führt eine Selbstspaltungsreaktion aus, so dass das Zielprotein freigesetzt wird, der *Intein-Tag* aber an die Chitin-Agarose-*Beads* gebunden bleibt. Dann erfolgte die Elution des Proteins mit Säulenpuffer (2.5.7.1). Die gesammelten Fraktionen (2 – 3 ml) wurden über SDS-Gelelektrophorese (3.14.2) analysiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und gegen den für weitere Experimente benötigten Puffer dialysiert (3.11). Nach der Dialyse wurde das Protein durch Gelfiltration an einer Superdex 200 HR30/10-Säule (Amersham, Buckinghamshire, GB) weiter aufgereinigt.

### 3.10.2 Isolierung von McpY und IcpA aus *inclusion bodies*

Bei der Reinigung von McpY mit dem IMPACT<sup>TM</sup>-CN-Systems (3.10.1) trat eine zusätzlich Bande bei 70 kDa auf. Diese Bande konnte durch N-terminale Sequenzanalyse (3.13) als GroEL identifiziert werden. Um die Koreinigung dieser beiden Proteine zu unterbinden wurde McpY unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Dazu wurde das *mcpY*-Gen in den pT7-Vektor pHT28 (Tab. 2) kloniert (3.4.1). Nach Transformation kompetenter *E. coli* BL21DE3 mit pHT28-*mcpY* (pRU2790) erfolgte die Selektion positiver Transformanten durch Kultivierung auf LB<sub>Ap</sub>-Platten. Das Wachstum der 1 l-Hauptkultur wurde photometrisch bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,7 verfolgt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Durch das Wachstum der Zellen bei 37 °C wurde die Bildung von *inclusion bodies* gefördert. Die Koreinigung von GroEL konnte durch eine Schüttelfrequenz von 300 Upm und einer dadurch erhöhten Sauerstoffsättigung der Kultur unterdrückt werden. Nach 4 h wurden die Zellen in einer Sorvall-Kühlzentrifuge 10 min bei 8000 Upm sedimentiert (GSA-Rotor, 4 °C), in 15 ml Aufschlusspuffer (2.5.7.2) aufgenommen und zweimal in drei Durchgängen mit der French Press (900 psi, 40 ml Maxizelle, vorgekühlt) aufgeschlossen. Während der 15-minütigen Inkubation auf Eis zwischen den zwei Runden wurde zum Abbau von DNA DNaseI (2 µg/ml) zugesetzt. Die *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation (Sorvall, SS34-Rotor, 20000 Upm, 30 min, 4 °C) von den löslichen Bestandteilen abgetrennt. Das Sediment wurde zweimal mit einem manuellen Homogenisator in 5 ml Waschpuffer (2.5.7.2) homogenisiert. Durch den anschließenden Zentrifugationsschritt (Sorvall, SS34-Rotor, 15000 Upm, 20 min, 4 °C) wurden Verunreinigungen wie Zell- und Membranbestandteile entfernt. Die Aufnahme des gereinigten Sediments in Denaturierungspuffer (2.5.7.2) führte zur Auflösung der *inclusion bodies*. Das denaturierte



McpY, das nun löslich im Überstand vorlag, wurde durch Gelfiltration weiter aufgereingt. Für die Reinigung wurde die Superdex 200 HR30/10-Säule (Amersham, Buckinghamshire, GB) verwendet. Als Laufpuffer diente der Denaturierungspuffer (2.5.7.2). Pro Lauf wurde 1 ml der McpY-Lösung auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. Das Elutionsprofil wurde photometrisch bei 280 nm und einer Sensitivität (*range*) von 0,5 bis 2,0 verfolgt. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden auf das Vorhandensein von McpY getestet und entsprechend vereinigt. Das gereinigte Protein wurde durch sequentielle Dialyse (3.11) im 30-50fachen Volumen (je 24 h, 4 °C) mit den Renaturierungspuffern 1-3 (2.5.7.2) renaturiert.

### 3.11 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Entfernung von niedermolekularen Verbindungen und kleinen Proteine aus der Proteinlösung wurde diese in Dialyseschläuche (*cut off* 12 – 14 kDa) überführt. Die Dialyse erfolgte gegen das 30-50 fache Volumen Dialysepuffer (2.5.7) zunächst für 2 h, dann mit Pufferwechsel zweimal 12 h bei 4 °C.

### 3.12 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration wurde nach der Vorschrift von Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurde mit BSA-Lösungen (2 µg/ml bis 16 µg/ml) und einer proteinfreien Referenz eine Eichkurve erstellt. Eine Probe setzte sich aus 800 µl BSA-Lösung in Wasser und 200 µl Testlösung zusammen. Nach 5 min Inkubation des Ansatzes bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Bei den zu untersuchenden Proteinproben wurde ebenso verfahren. Die entsprechende Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve ermittelt.

### 3.13 N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen durch Edman-Abbau

Zur Identifizierung von Proteinen wurde die Probe mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.14.2) und mit einer *Tank Blot* Apparatur (Biological Laboratories, Harvard University) elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Biorad) übertragen (3.14.3). Der Transfer erfolgte 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 500 mA mit *Blot*-Puffer (2.5.6), der mit 0,1 % SDS versetzt wurde, um den Proteintransfer zu verbessern. Die Membran wurde kurz in einer Coomassie-Färbelösung (2.5.5) mit Methanol gefärbt und mit einer Entfärbelösung (2.5.5) mit 50 % Methanol entfärbt. Die Banden wurden ausgeschnitten und zur N-terminalen Sequenzierung nach Edman an die Proteinanalyse-Abteilung der NWF III, Universität Regensburg (Prof. Deutzmann) gegeben.

### 3.14 Proteinchemische Methoden

#### 3.14.1 Gewinnung von denaturierten Proteinproben

Zur Gewinnung von denaturierten Proteinproben für *Western blot*-Analysen (3.14.3) wurden 1 ml Zellen einer  $OD_{600} = 0,3$  für 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge mit 10000 Upm sedimentiert, in 30  $\mu$ l SDS-Ladepuffer (2.5.5) aufgenommen, 15 min aufgekocht und entweder direkt auf das SDS-Polyacrylamid-Gel (3.14.2) aufgetragen oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Denaturierte Proben von Proteinen in verdünnter Lösung, wie z. B. bei der Zellfraktionierung (3.15), wurden zur Ankonzentrierung einer TCA-Fällung unterzogen: 100  $\mu$ l Probe wurde mit 2,5  $\mu$ l Na-Deoxycholatlösung (2%, pH 8,4) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Zugabe von 4,8  $\mu$ l 50 % TCA-Lösung initiierte die Fällung der enthaltenen Proteine (Niederschlagsbildung). Nach weiteren 15 min auf Eis wurde der Niederschlag sedimentiert (5 min, 10000 Upm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand abgezogen und das Sediment mit 100  $\mu$ l kaltem Aceton ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Nach einer Wiederholung des Waschschrittes wurde das Sediment in 30  $\mu$ l SDS-Ladepuffer (2.5.5) aufgenommen und 15 min aufgekocht.

### 3.14.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einem 8,5 cm x 9 cm großen und 1 mm dicken SDS-Gel (2.5.5) aufgetrennt, das aus Sammelgel (5 % Acrylamid) und Trenngel (10 % Acrylamid) zusammengesetzt war (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde mit 1 x SDS-Laufpuffer (2.5.5) in einer Biometra-Gelelektrophoreseapparatur vertikal bei einer konstanten Stromstärke (Sammelgel: 25 mA, Trenngel: 50 mA) durchgeführt. Mit Hilfe von Standardmarkern (*Low Molecular Weight Marker*, Amersham Pharmacia) wurden die Molekularmassen der Proteine nach *Coomassie-Färbung* (2.5.5) ermittelt.

### 3.14.3 Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (*Western blot*)

Nach Auftrennung der Proteinproben im SDS-Gel wurden diese mit einer *Tank-Blot*-Apparatur (Biological Laboratories, Harvard University) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte über 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 500 mA in *Blot*-Puffer (2.5.6).

### 3.14.4 Affinitätsreinigung von Antikörperrohsereen

Die Reinigung der Antikörper aus den Rohseren erfolgte nach Scharf *et al.* (2001) mit kleineren Modifikationen. Insgesamt wurden 100 µg gereinigtes Protein auf ein SDS-Gel (2.5.5) aufgetragen und aufgetrennt (3.14.2). Das Protein wurde auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (3.14.3) und die Membran mit Ponceau S (2.5.8) angefärbt. Die Proteinbande wurde exakt ausgeschnitten, mit PBS-Lösung (2.5.6) entfärbt und in kleine Stückchen geschnitten. Diese wurden in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) mit 2 ml Rohserum üN bei 4 °C mit einem RS 60-Tube Rotator (MS Laborgeräte) bei halbmaximaler Geschwindigkeit inkubiert. Für die Reinigung des anti-McpY-Antikörpers wurden die Membranstückchen 5 x 5 min mit 1 x PBS, 0,1 % BSA und 0,1 % NP-40 (2.5.8), für die des anti-IcpA-Antikörpers 5 x 5 min in 1 x PBS (2.5.6) gewaschen. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden durch eine schnelle und kurze Absenkung des pH-Wertes von ihren Epitopen abgelöst. Dazu wurden 750 µl 0,2 M Glycin/HCl-Lösung pH 2,5 (2.5.8) zu den

Membranstückchen pipettiert und diese zur Ablösung der Antikörper 1 min manuell geschüttelt. Die Lösung mit den von der Membran abgelösten Antikörpern wurde dann in 375 µl 1 M KPO<sub>4</sub>-Lösung, pH 9,0 (2.5.8), die in 1,5 ml-ERGs vorgelegt worden war, zur Neutralisierung überführt. Der Vorgang wurde wiederholt, die Eluate vereinigt und mit 1 mg/ml BSA versetzt. Nach dreimaliger Dialyse gegen 1 x PBS (30faches Volumen, je 12 h, 4 °C; 3.11) wurde die Antikörperlösung mit 0,02 % Natriumazid versetzt und in 100 µl-Portionen bei -80 °C gelagert. Die Reinigung wurde durch *Western blot*-Analyse (3.14.5) überprüft.

### **3.14.5 Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz**

#### **3.14.5.1 ECL *Western blotting kit***

Zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen des Antikörpers wurde die Nitrozellulose-Membran üN bei RT in PBS (2.5.6), 0,1 % Tween20 und 5 % Magermilch geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung erneuert und Rohserum oder gereinigter Antikörper (3.14.4) in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:100 zugesetzt und 2 h unter schütteln bei RT inkubiert. Nach 4 x 10 min waschen mit PBS, 0,1 % Tween20 wurde der mit Meerrettich-Peroxidase markierte sekundäre Antikörper (Amersham Biosciences) in einer Verdünnung von 1:4000 in PBS, 0,1 % Tween20 und 5 % Magermilch zugesetzt und 90 min inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran erneut 4 x 10 min mit PBS, 0,1 % Tween20 gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL *Western blotting kit* (Amersham Biosciences). Dazu wurden die Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt (Endvolumen 5 ml) und die Membran 90 s darin geschwenkt. Die Membran wurde zwischen zwei klare Kopierfolien in eine lichtdichte Kassette gelegt und die Signale mit Hyperbond-ECL-Filmen (Amersham Biosciences) nach 1 min bis üN Exposition detektiert.

#### **3.14.5.2 *SuperSignal*<sup>®</sup> *West Pico Western blotting kit***

Zur Detektion sehr schwacher Signale, insbesondere von McpY, IcpA und den chromosomalen Rezeptor-GFP-Fusionsproteinen aus Zellextrakten wurde das *SuperSignal*<sup>®</sup> *West Pico Chemiluminescent Substrate* von Pierce verwendet. Grundsätzlich erfolgte die Durchführung wie oben beschrieben, nur mit veränderten Inkubationszeiten und Detektionslösungen. Die

Membran wurde 1 h bei RT in PBS (2.5.6), 0,1 % Tween20 und 5 % Magermilch blockiert und üN mit gereinigtem polyclonalen primären Antikörper (3.14.4) in einer 1:100-Verdünnung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS, 0,1 % Tween20 (je 10 min) wurde der sekundäre Antikörper (Amersham Biosciences) in einer Verdünnung von 1:2500 in PBS, 0,1 % Tween20 und 5 % Magermilch zugesetzt und 90 min inkubiert. Die Membran wurde vor der Detektion viermal mit PBS, 0,1 % Tween20 (je 10 min) gewaschen. Zur Detektion wurde die Detektionslösung mit verstärkter Chemoluminescence (*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce) nach Angaben des Herstellers und Hyperbond-ECL-Filme (Amersham Biosciences) mit verschiedenen Expositionszeiten verwendet.

### 3.14.5.3 Semiquantitative Bestimmung von *S. meliloti*-Proteinen im Zellextrakt

Die Konzentration von IcpA wurde anhand der Bradford-Methode (3.12) bestimmt und eine Eichkurve in 5 ng-Schritten erstellt. Für die Eichkurve wurde IcpA Zellextrakten des *icpA*-Deletionsstammes (RU11/815) mit einer Zelldichte entsprechend 1 ml einer motilen Kultur einer  $OD_{600} = 0,3$  zugesetzt, um ein gleiches Lauf- und Detektionsverhalten zu gewährleisten. Von der zu untersuchenden Kultur wurden ebenfalls 1 ml Zellen der  $OD_{600} = 0,3$  eingesetzt und gemeinsam mit den Standardproteinen, wie unter 3.14.1 beschrieben, präpariert. Nach SDS-Gelelektrophorese, *Western blot*-Transfer und Signaldetektion wurden die Filme mit einem Epson Perfection 1640SU Scanner eingescannt. Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm Scion Image 0.4.0.2 durchgeführt. Durch Vergleich der Intensitätswerte der Proben mit denen der Eichkurve wurden die IcpA-Mengen aus 1 ml Zellen der  $OD_{600} = 0,3$  ermittelt. Die Molekülzahlen pro Zelle wurden unter Einbeziehung bekannter Größen anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{Moleküle Protein/Zelle} = \frac{N_A \cdot X}{MW \cdot 3,5 \cdot 10^8}$$

$N_A$ : Avogadrokonstante ( $6,022 \cdot 10^{23}$  l/mol)

$X$ : gemessener Wert (ng Protein/1 ml Zellen einer  $OD_{600}=0,3$ )

MW: Molekulargewicht des Proteins

### 3.15 Auftrennung von *S. meliloti*-Zellfragmenten

300 ml motile *S. meliloti*-Zellen ( $OD_{600} = 0,3$ ) wurden zentrifugiert (Sorvall, GSA) und in 3 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 3 mM EDTA resuspendiert. Nach dreimaliger French Press Passage bei 20000 psi wurden nicht aufgeschlossene Zellen durch Zentrifugation (2000 x g, 2 min) entfernt. Aufgeschlossenen Zellen wurden zentrifugiert (20000 Upm, SS34-Rotor, 4 °C, 30 min), wobei der resultierende Überstand die cytoplasmatische Fraktion und das Sediment die Membranfraktion darstellen. Um evtl. mitgezogene Membranen zu entfernen wurde die cytoplasmatische Fraktion erneut zentrifugiert (20000 Upm, SS34-Rotor, 4 °C, 30 min). Zur Abtrennung membranständiger Proteine wurde das Sediment in 3 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 3 mM EDTA und 0,1 % Triton resuspendiert und anschließend zentrifugiert (20000 Upm, SS34-Rotor, 4 °C, 30 min). Im Überstand befinden sich nun die membranassoziierten Proteine und im Sediment die Membranen. Die Membranen wurden in 3 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 3 mM EDTA resuspendiert. Vor der Aufnahme in den SDS-Ladepuffer wurden die cytoplasmatische Fraktion, die membranassoziierten Proteine und die Membranen mit TCA gefällt (3.14.1).

### 3.16 Fluoreszenzmikroskopie

Die *in vivo*-Lokalisierung der Chemorezeptoren von *S. meliloti* erfolgte mittels Rezeptor-GFP-Fusionen. Dazu wurden die Fusionsproteine sowohl vom *broad host range*-Plasmid pBBR1MCS2 (3.5.3), als auch direkt vom Chromosom exprimiert (3.5.4.2). Die Lokalisierung der Rezeptoren wurde sowohl im WT (RU11/001), als auch in verschiedenen Mutantenstämmen untersucht. Zur Anzucht wurden Bromfield-Platten (2.4.2) mit 10 ml RB-Medium (2.4.2) überschichtet, mit 500 µl stationärer *S. meliloti*-Kultur angeimpft und 15 h bei 30 °C inkubiert. Zur korrekten Faltung des GFPs wurden die Zellen weitere 6 - 8 h bei 16 °C bzw. 2 h bei 4 °C inkubiert (Heim *et al.*, 1994). Die Zellen wurden bis zur Mikroskopie dunkel gehalten, um ein Ausbleichen des GFP-Proteins zu vermeiden. Für die Mikroskopie wurde ein Kunststoff-Objekträger verwendet, der zentral eine 1,5 x 1,5 cm große Aussparung aufwies. Darüber wurde ein Deckgläschen befestigt, auf dem 5 µl Bakteriensuspension mit einem 2 mm dicken Agaroseblöckchen (1 % in Wasser) fixiert wurden. Die Lokalisierung der GFP-

Fluoreszenz in der Zelle erfolgte an einem LSM 510-Meta konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) mit einem 100 x PlanApochromat Objektiv (N. A. = 1.4). Die Fluoreszenz-Signale von GFP wurden nach Anregung durch einen Argon-Laser (Wellenlänge: 488 nm) mit der Emissionswellenlänge von 507 nm detektiert. Dabei wurde ein 505-550 nm *band-pass* Emissionsfilter verwendet.

Für die Kolokalisierung von Rezeptor-GFP-Fusionsproteinen mit CheA wurde durch homologe Rekombination ein *cheA-mrfp*-Fusionskonstrukt (pRU3001) ins *S. meliloti*-Genom (3.5.4.2) eingeführt. Die Anregung der CheA-mRFP-Fluoreszenz erfolgte mit einem HeNe-Laser (Wellenlänge: 543 nm). Zur Detektion wurde ein 560 nm *long-pass* Emissionsfilter verwendet. Die Bearbeitung der entstandenen Bilder erfolgte mit Hilfe der LSM-5 *Image Browser*-Software von Zeiss und mit Paint Shop Pro7 (Jasc Software).

Für Lokalisierungsstudien während der Zellteilung von *S. meliloti* wurden die Zellen mit 0,8 %iger Agarose in RB-Medium fixiert, die in einer Schichtdicke von 2 mm auf einen Objektträger aufgebracht wurde. Anschließend wurden 5 µl Kultur auf der Agarose verteilt und ein Deckglas darüber gelegt. Nach dem Entfernen überstehender Agarose wurden die Ränder des Agarosefeldes unter dem Deckglas mit einer auf 60 °C erwärmten 1:1:1-Mischung aus Lanolin, Paraffin und Vaseline versiegelt, so dass die Agarose nicht austrocknen konnte. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von bis zu 12 h mit dem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) analysiert.

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

Für die Analyse des Schwärmverhaltens motiler *S. meliloti*-Zellen wurden sowohl Bromfield-Schwärmplatten (2.4.2) mit 0,3 % Agar, als auch RB-Schwärmplatten (2.4.2) mit 0,27 % Agar verwendet. Den RB-Schwärmplatten wurden einzelne Substanzen in Konzentrationen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-3}$  M als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die Schwärmplatten wurden mit 3 µl stationärer *S. meliloti*-Kultur zentral angeimpft und bei 30 °C inkubiert. Nach drei bis vier Tagen wurden die Schwärmringdurchmesser ausgemessen und 7 mm für das Wachstum eines immotilen Kontrollstamms abgezogen.

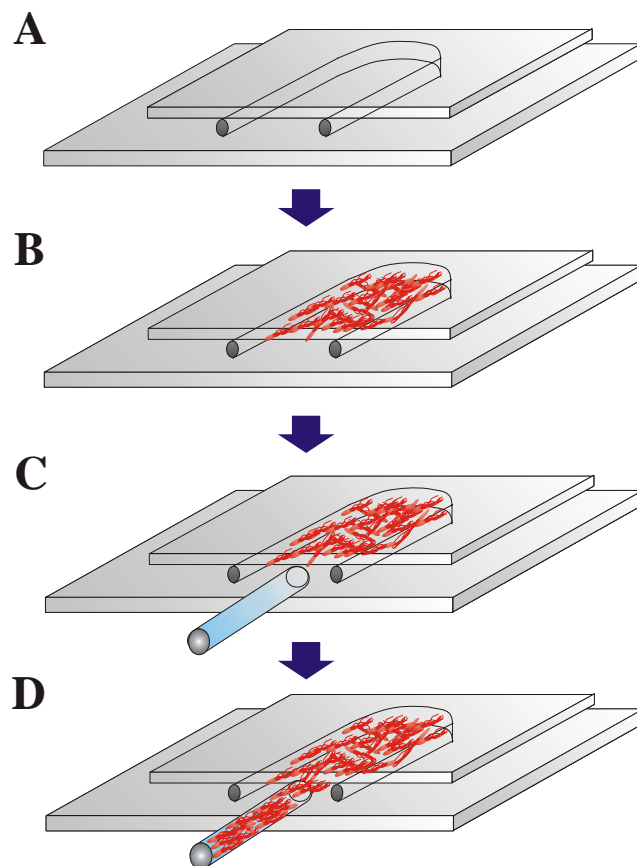
### 3.18 Analyse der Schwimmgeschwindigkeit motiler *S. meliloti*-Zellen

Die Schwimmgeschwindigkeit freischwimmender *S. meliloti*-Zellen wurde mit Hilfe des computergestützten *Hobson Backtracker*-Systems (*Hobson Tracking System*, Sheffield, UK) gemessen (Sourjik & Schmitt, 1996). Mit 10 ml RB-Medium (2.4.2) überschichtete Bromfieldplatten (2.4.2) wurden mit 20 und 50  $\mu$ l einer *S. meliloti*-Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,08 bis 0,12 angeimpft und 15 h bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 inkubiert. Die Zellen wurden 30 min an eine konstante RT von 22 °C adaptiert und anschließend mit einem Zeiss Standard 14 Phasenkontrast-Mikroskop (400 x Vergrößerung) mikroskopiert. Für jeden Stamm wurden fünf unabhängige Messungen an fünf verschiedenen Tagen durchgeführt. Dabei wurde jede Probe fünfmal untersucht, wobei jeweils 200 Schwimmspuren ausgewertet wurden, und der Mittelwert dieser fünf Messungen ermittelt. Zur Untersuchung der Chemokinese-Fähigkeit einzelner Stämme wurde die Schwimmgeschwindigkeit der Bakterien durch Zugabe von Lockstoffen stimuliert. Der Effekt der Substanzen auf das Schwimmverhalten der Bakterien wurde innerhalb von 20 s nach ihrer Zugabe ermittelt. Als Standard-Lockstoff wurde Prolin mit einer Endkonzentration von 10 mM eingesetzt. Andere Lockstoffe (Tab. 7) wurden mit einer Konzentration von 0,1 mM verwendet.

### 3.19 Analyse der Reaktion auf Lockstoffe motiler *S. meliloti*-Zellen im Kapillartest

Die Kapillartests wurden grundsätzlich nach der Vorschrift von Adler (1973), mit geringfügigen Modifikationen nach Götz *et al.* (1982) und Meier *et al.* (2007) durchgeführt. Motile Zellen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,10 bis 0,13 wurden 5 min mit 3000 Upm bei RT abzentrifugiert, in RB-Medium (2.4.2) aufgenommen und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt. 20  $\mu$ l-Kapillaren (65 mm *micropipettes*, Drummond Scientific Co., Broomall, Pennsylvania, USA) wurden an den Enden zugeschmolzen und U-förmig gebogen.





**Abb. 13. Ablaufschema eines Kapillartest. A: U-förmig gebogene Kapillaren werden zwischen zwei Glasplatten gelegt; B: 0,4 ml einer Bakteriensuspension der  $OD_{600} = 0,1$  werden eingefüllt; C: eine mit Lockstoff gefüllte Kapillare wird in die Suspension gelegt; D: nach 2 h Inkubation bei 30 °C befinden sich Bakterien in der Kapillare.**

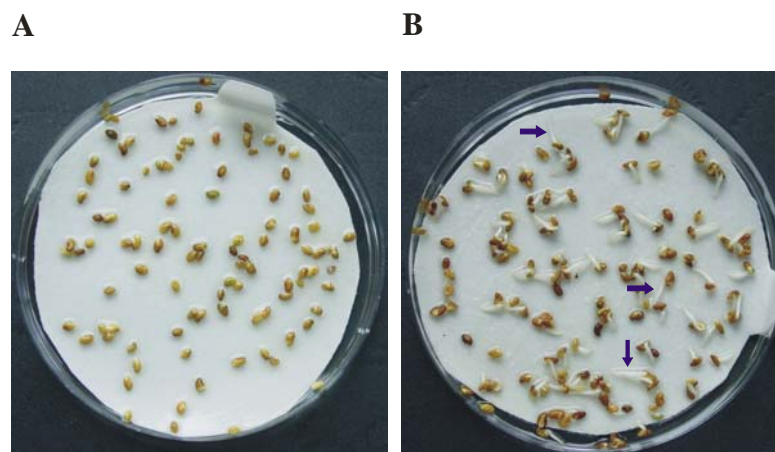
Diese Kapillaren wurden zwischen zwei Glasplatten gelegt (Abb. 13A) und mit 0,4 ml der Zellsuspension gefüllt (Abb. 13B). Glaskapillaren (1  $\mu$ l *disposable micropipettes*, DESAGA GmbH, Wiesloch, Germany) wurden an einem Ende zugeschmolzen und im Vakuumexsikator mit in RB-Medium gelösten Lockstoff in unterschiedlichen Konzentrationen gefüllt. Die Kapillaren wurden mit dem offenen Ende in die Bakteriensuspension gelegt (Abb. 13C) und zwei Stunden bei 30 °C in einer Thermostatkammer inkubiert (Abb. 13D). Dann wurden die Kapillaren wieder herausgenommen, das verschlossene Ende abgebrochen und der gesamte Inhalt in 1 ml RB-Medium überführt. 50  $\mu$ l der entsprechenden Verdünnungen wurden doppelt auf TYC<sub>Sm</sub>-Platten (2.4.2) ausplattiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt.

## 3.20 Nodulations-Experimente

### 3.20.1 Anzucht der Keimlinge von *Medicago sativa*

Zur Sterilisation wurden Samen von *Medicago sativa Beda ZS* (Bayerische Futtersaatbau, Plattling) in ein 50 ml Sarstedt-Röhrchen eingefüllt. Nach Zugabe von 40 ml 2,5 % HgCl<sub>2</sub>-Lösung erfolgte die Inkubation für 9 min 30 sec in einem RS 60-Tube Rotator (MS Laborgeräte) bei 20 Upm Geschwindigkeit. Zur Entfernung des Quecksilberchlorides wurden die Samen fünfmal (je 5 min) mit sterilem Wasser gewaschen (Olivares *et al.*, 1980).

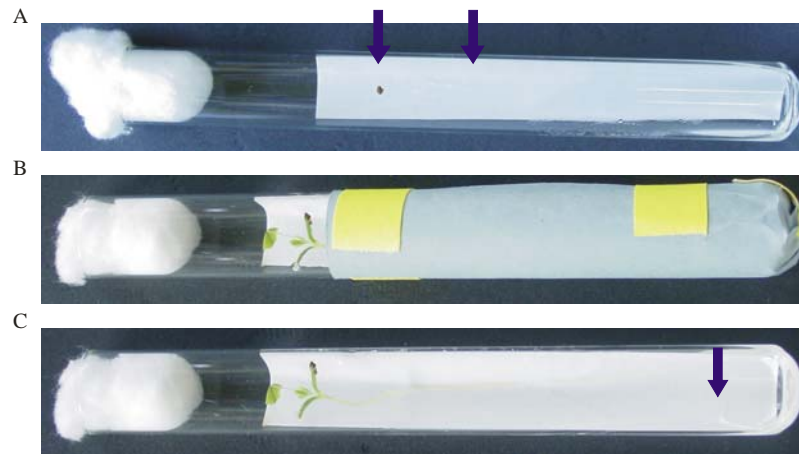
Die Oberflächen-sterilisierten Samen konnten durch Inkubation in 40 ml Wasser für 90 min im RS 60-Tube Rotator bei 10 Upm aufquellen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Samen mit einer sterilen Impföse in Petrischalen mit sterilen feuchten Whatman-Papieren ausgespreitet (Abb. 14A). Pro 1 g Samen werden vier Petrischalen benötigt. Zur Keimung wurden die Samen im Dunkeln bei 30 °C 18 h im Brutschrank inkubiert. Für eine optimale Wasserversorgung der Samen wurden die Petrischalen schräg gestellt (Olivares *et al.*, 1980).



**Abb. 14. Keimung von Oberflächen-sterilisierten Samen. A: Ausgespreitete Samen auf befeuchtetem Whatman-Papier in optimaler Verteilung. B: Keimlinge von *Medicago sativa* nach 18 h Inkubation bei 30 °C im Dunkeln. Blaue Pfeile markieren Keimlinge mit ca. 1 cm langen geraden Wurzeln, die für die weiteren Experimente optimal sind.**

Die Anzucht der Keimlinge im Flüssigmedium erfolgte in Reagenzgläsern (22 cm, Ø 2 cm), die Streifen aus Whatman-Papier (1 cm x 14 cm) enthielten, mit 10 ml hydroponischem Pflanzen-Medium (HP-Medium, 2.4.3) befüllt und mit Wattestopfen verschlossen waren. Keimlinge mit einer ca. 1 cm langen geraden Wurzel (Abb. 14B) wurden vorsichtig ca. 1 cm unterhalb des

oberen Randes des Whatman-Papiers in die Reagenzgläser eingelegt (Abb. 15A). Die Keimung erfolgte für 2 d bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die unteren zwei Drittel der Reagenzgläser mit einer Schutzhülle abgedunkelt (Abb. 15B) und 7 d in der Klimakammer inkubiert.



**Abb. 15. Wachstum der Keimlinge im Flüssigmedium. A: Einlegen der Keimlinge in die vorbereiteten Reagenzgläser. Pfeile markieren die Position des Keimlings. B: Für das optimale Wachstum der Pflanze wird die Wurzel mit einer Schutzhülle abgedunkelt. C: Keimling nach 7 d Wachstum in der Klimakammer. Der Pfeil markiert die Wurzelspitze.**

In der Klimakammer wurden optimale Wachstumsbedingungen durch einen Hell-Dunkel-Zyklus von 16 h Licht, mit einer Lichtstärke von 500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ , und 8 h Dunkelheit erreicht. Während der Lichtphase betrug die Temperatur 24 °C, bei Dunkelheit 16 °C. Die Luftfeuchtigkeit von 50 % wurde mit Hilfe der Feuchtestrumpf-Methode eingestellt (Olivares *et al.*, 1980). Einen Tag vor Beginn des Experiments wurden solche Pflänzchen aussortiert, deren Wurzeln weiter als 1 cm vom Medium entfernt waren.

### 3.20.2 Infektivitäts-Test

Für den Infektivitäts-Test im Flüssigmedium wurden *S. meliloti*-Kulturen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,80 ( $\pm 0,02$ ) wachsen gelassen. Pro Experiment wurden 24 Pflanzen (3.20.1) mit je 1 ml einer 1:100-Verdünnung der Bakterien in 30 ml Wasser beimpft. Dazu wurde die Kultur vorsichtig an der dem Whatman-Papier-Streifen gegenüberliegenden Seite in das Pflanzenmedium pipettiert, ohne die Pflanze oder die Wurzel zu berühren. Die beimpften Pflanzen wurden wieder in die Klimakammer gebracht. Ab dem dritten Tag nach der Beimpfung konnten die

entstehenden Knöllchen gezählt werden. Das Zählen der Knöllchen wurde über einen Zeitraum von ungefähr drei Wochen fortgesetzt. Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellsuspensionen entsprechend verdünnt und in einer Zweifachbestimmung auf TYC<sub>Sm</sub>-Agarplatten ausplattiert.

### 3.20.3 Kompetitivitäts-Test

Im Kompetitivitäts-Test wurde die Knöllchenbildung eines Teststammes und des Referenzstammes RU11/001(pGUS3) (Tab. 2) an der gleichen Pflanze verglichen (Soto *et al.*, 2002). Die zu untersuchenden Stämme wurden, wie unter 3.20.2 beschrieben, vorbereitet. Der Test- und der Referenzstamm RU11/001(pGUS3) (Tab. 2) wurden jeweils 1:100 in 20 ml Wasser verdünnt. Pro Teststamm wurden zwölf Pflanzen (3.20.1) mit je 1 ml der Bakteriensuspension, wie unter 3.20.2 beschrieben, beimpft. Nach weiteren 14 Tagen Inkubation in der Klimakammer wurden die Wurzeln isoliert und die Blätter abgeschnitten. Zur Entfernung von an den Wurzeln haftenden Bakterien wurden die Wurzeln mehrmals mit Wasser gewaschen. Bis zur Färbung (3.20.4) wurden die Wurzeln in Wasser gelagert, damit die Knöllchen nicht austrocknen.

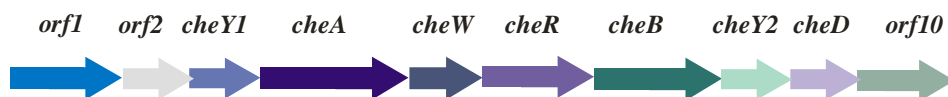
### 3.20.4 Färbung der Knöllchen

Nach dem Abschneiden der Blätter der Pflänzchen wurden die Wurzeln eines Stammes zu 5 ml Färbelösung (2.5.10) in ein Reagenzglas gegeben, so dass die Wurzeln vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Diese wurden mit Parafilm verschlossen und mit Alufolie abgedunkelt. Die Färbung fand bei 37 °C üN statt. Um ein Austrocknen der Knöllchen zu vermeiden, wurden die Wurzeln in Wasser gelagert, bis die Knöllchen pro Pflanze ausgezählt waren.

## 4 Ergebnisse

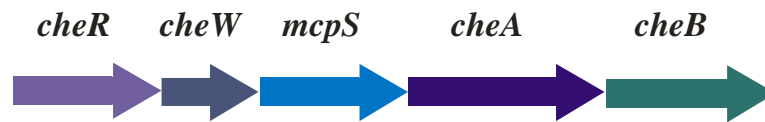
### 4.1 Identifizierung von acht *mcp*-Genen und einem *mcp*-ähnlichem Rezeptorgen im Genom von *S. meliloti*

Das Chemotaxis-Operon (*che*-Operon) von *S. meliloti* besteht aus den Genen *orf1 orf2 cheY1 cheA cheW cheR cheB cheY2 cheD* und *orf10* (Greck *et al.*, 1995; Sourjik *et al.*, 1998), deren Genprodukte alle an der Signalaufnahme, -verarbeitung und -weiterleitung bei der Chemotaxis beteiligt sind.



**Abb. 16.** Genkarte des *che*-Operons von *S. meliloti*. Gene sind maßstabsgetreu durch farbige Pfeile dargestellt, deren Polarität die Transkriptionsrichtung anzeigt.

Aufgrund der vorhandenen MCP-Signaldomäne, die zu den *E. coli*-MCPs (*methyl-accepting chemotaxis proteins*; Falke & Hazelbauer, 2001; Scharf & Schmitt, 2002) homolog ist, wurde das Genprodukt von *orf1* als *transducer*-ähnliches Protein eingeordnet. In der Genbank des *S. meliloti*-Stammes 1021 ist *orf1* als *mcpE* eingetragen. Allerdings gaben sowohl die fehlenden Glutamat- oder Glutamin-Reste, die für eine Methylierung des Proteins erforderlich wären, als auch der Mangel an hydrophoben Transmembran- und periplasmatischen Rezeptor-Domänen, Anlass, diesen ungewöhnlichen Chemorezeptor als IcpA (*internal chemotaxis protein*; Scharf & Schmitt, 2002) zu klassifizieren. Durch PCR-Analysen mit degenerierten Primern, die die konservierte MCP-Signaldomäne amplifizierten, *Southern blot*-Hybridisierungen und *plasmid rescue*-Versuchen konnten weitere sieben Chemorezeptorgene im Genom von *S. meliloti* identifiziert werden (Klose, 1996; Muschler, 2000; B. Scharf, pers. Mitteilung). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den *E. coli*-MCPs wurden sie in alphabetischer Reihenfolge *mcpT* (früher *mcpA*), *mcpU*, *mcpV*, *mcpW*, *mcpX*, *mcpY* und *mcpZ* genannt. Alle diese Gene liegen verstreut im Genom vor. Mit Ausnahme von *mcpW*, das mit einem putativen *cheW* ko-transkribiert wird, sind diese Gene monocistronisch organisiert (Meier *et al.*, 2007).



**Abb. 17. Genkarte des putativen zweiten Chemotaxis-Operons (*che2*-Operon) von *S. meliloti* auf dem SymA-Plasmid. Gene sind maßstabsgetreu durch farbige Pfeile dargestellt, deren Polarität die Transkriptionsrichtung anzeigt.**

Ein weiteres putatives *mcp*-Gen, *mcpS*, wurde im Rahmen der Genom-Sequenzierung des *S. meliloti*-Stammes 1021 identifiziert (Galibert *et al.*, 2001). Es befindet sich als einziges Rezeptorgen nicht auf dem Chromosom, sondern auf dem SymA-Plasmid. *McpS* ist das dritte Gen in einem putativen zweiten Chemotaxis-Operon (*che2*-Operon; Abb. 17), das aus *cheR*, *cheW*, *mcpS*, *cheA* und *cheB* besteht (Barnett *et al.*, 2001).

## 4.2 Konstruktion von *S. meliloti*-Mutanten

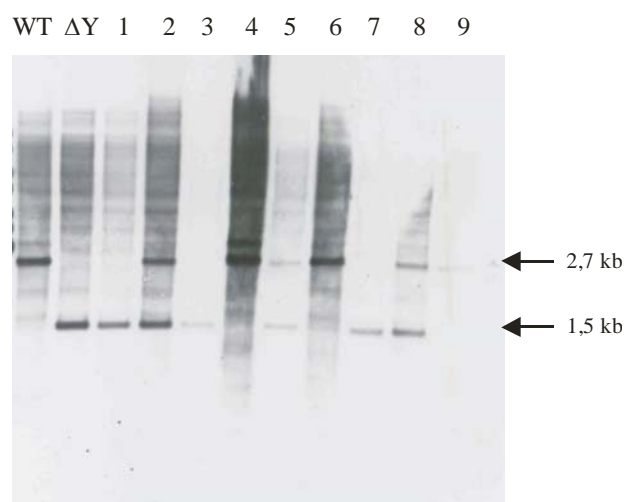
Ein Ziel dieser Arbeit war die Funktion einzelner Chemorezeptoren bei der Chemotaxis und Symbiose von *S. meliloti* zu analysieren. Derartige Analysen wurden mit Rezeptor-Einfach- und Mehrfach-Deletionsmutanten durchgeführt. Obwohl auf eine Vielzahl von Rezeptor-Deletionsmutanten zurückgegriffen werden konnte (Scharf 1999-2003, Tab. 1), war die Konstruktion neuer Mutanten dennoch erforderlich. Zusätzlich wurden für die phänotypische Charakterisierung der Rezeptor-Deletionsmutanten und auch für die Lokalisierungsstudien der Rezeptoren Kontrollstämme benötigt, die zunächst erstellt und charakterisiert werden mussten. Für die *in vivo*-Lokalisierungsstudien der Chemorezeptoren von *S. meliloti* wurden chromosomale Fusionen der Rezeptorgene mit dem grün fluoreszierenden Protein, GFP, erstellt.

### 4.2.1 Deletion von Rezeptorgen in verschiedenen Stämmen

Zu Beginn dieser Arbeit waren fast alle Rezeptor-Deletionsmutanten vorhanden (Scharf 1999-2003, Tab. 1). Außerdem existierte ein *S. meliloti*-Stamm, in dem alle Chemorezeptorgene durch sukzessive Gendeletionen zerstört wurden. Auf diese Weise entstand der Stamm RU11/840 (=  $\Delta 8$ , Tab. 1), dem die acht Rezeptorgene *mcpT* bis *mcpZ* und *icpA* fehlen.

Zur Untersuchung des zuletzt identifizierten *mcpS*-Gens, das als drittes Gen in einem putativen zweiten Chemotaxis-Operon auf dem SymA-Plasmid lokalisiert ist (Abb. 17), wurden zwei weitere Deletionsmutanten erstellt. Dazu wurde das Gen sowohl im *S. meliloti*-Wildtyp (RU11/001), als auch im Stamm RU11/840 deletiert. Das Deletionskonstrukt des *mcpS*-Gens wurde über PCR-Mutagenese erzeugt (3.5.4.1) und über Konjugation und homologe Rekombination in das Genom der beiden *S. meliloti*-Stämme RU11/001 und RU11/840 überführt (3.7). Nach der Selektion wurden jeweils zehn potentielle *mcpS*-Mutanten in RU11/001 und in RU11/840 mittels *Southern blot* auf Austausch des WT-Allels gegen das mutierte Gen überprüft (3.8). Die bestätigten Mutanten  $\Delta mcpS$  (RU13/148) und  $\Delta mcpSTUVWXYZicpA$  (RU13/149) wurden für phänotypische Analysen verwendet (Meier *et al.*, 2007). Der Stamm RU13/149 wird im Folgenden als  $\Delta 9$ -Stamm bezeichnet, da ihm alle neun Rezeptorgene fehlen.

Ein besonderes Augenmerk meiner Untersuchungen lag auf den cytoplasmatischen Rezeptoren, McpY und IcpA, da sie aufgrund ihrer Domänenstruktur und der fehlenden Transmembrandomänen (Abb. 22) außergewöhnliche Rezeptoren darstellen. Zur Analyse des Einflusses der beiden cytoplasmatischen Rezeptoren auf die Chemotaxis wurde eine *mcpYicpA*-Doppeldelentionsmutante erstellt. Abb. 18 zeigt die *Southern blot*-Analyse putativer *mcpY*-Deletionen in der  $\Delta icpA$ -Mutante (RU11/815).



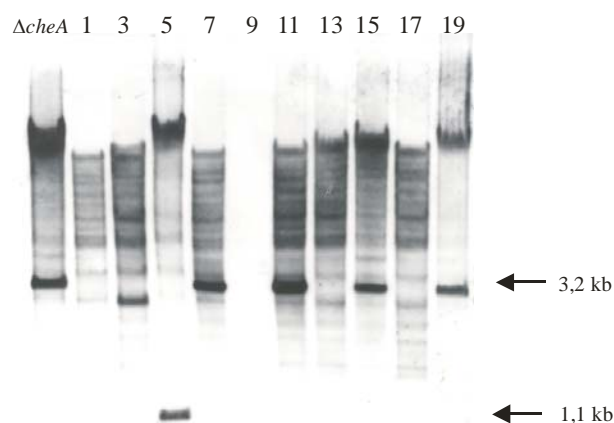
**Abb. 18.** *Southern blot* zur Überprüfung der *mcpY*-Deletion in  $\Delta icpA$  (RU11/815). Potentielle Mutanten sind numeriert. Es wurde ein *PstI*-Verdau genomischer DNA durchgeführt. Als Sonde wurde ein 700 bp *HindIII-PstI*-Fragment aus pRU1990 verwendet. Die erwarteten Banden für WT (2,7 kb) und  $\Delta mcpY$  (1,5 kb) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Deletion von *mcpY* wurde wie für die Deletion von *mcpS* beschrieben in die  $\Delta icpA$ -Mutante (RU11/815) eingebracht. Jeweils drei der untersuchten potentiellen Mutanten zeigten ein mit der Sonde hybridisierendes Konstrukt der Größe 2,7 kb, das dem WT-Allel entspricht (4, 6 und 9), bzw. zwei Banden bei 2,7 kb und 1,5 kb, die beiden Allelen in ihrem Genom entsprechen (2, 5 und 8). Die anderen drei Stämme (1, 3 und 7) wiesen eine Bande bei 1,5 kb auf, die einen erfolgreichen Allelen-Austausch dokumentiert. Davon wurde die *mcpYicpA*-Doppeldeletionsmutante 1 (RU13/107) für weitere Charakterisierungen ausgewählt.

## 4.2.2 Bereitstellung von Kontrollstämmen

### 4.2.2.1 Deletion des putativen zweiten *cheA*-Gens und phänotypische Charakterisierung der resultierenden Mutante

Die zentrale Komponente der Signaltransduktionskette von *S. meliloti*, die Histidin-Autokinase CheA, ist für die Chemotaxis essentiell. Der Verlust von CheA resultiert in einem chemotaktisch inaktiven Phänotyp (Sourjik & Schmitt, 1996). Für die phänotypische Charakterisierung von Chemotaxismutanten kann eine *cheA*-Deletionsmutante als Negativkontrolle herangezogen werden. Das Genom von *S. meliloti* enthält jedoch ein zweites Chemotaxis-Operon, mit einem *cheA*-Gen (Abb. 17). Nun galt es zu überprüfen, ob auch CheA2 an der Chemotaxis von *S. meliloti* beteiligt ist.

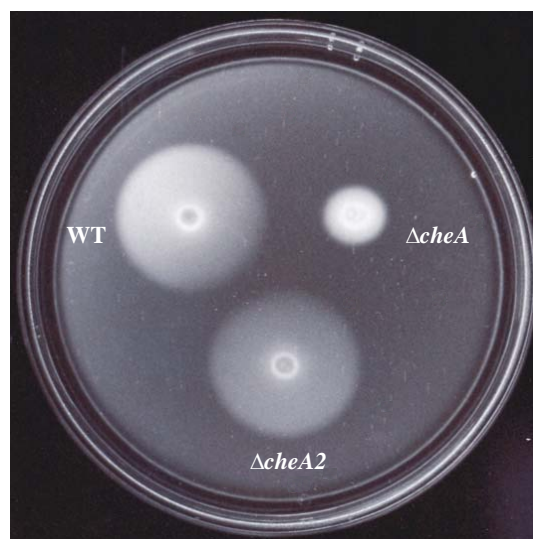


**Abb. 19.** *Southern blot* zur Überprüfung der *cheA2*-Deletion. Potentielle Mutanten sind numeriert. Es wurde ein *Bam*HI-Verdau genomischer DNA durchgeführt. Als Sonde wurde ein 500 bp *Hind*III-*Xba*I-Fragment aus pRU2880 verwendet. Die erwarteten Banden für WT (3,2 kb) und  $\Delta cheA2$  (1,1 kb) sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Das über PCR-Mutagenese (3.5.4.1) erzeugte *cheA2*-Deletionskonstrukt in pK18*mobsacB*, pRU2880 (Tab. 2), wurde über Konjugation und homologe Rekombination in das Genom des *S. meliloti*-Stammes RU11/001 eingeführt (3.7). Die in Abb. 19 dargestellte *Southern blot*-Analyse (3.8) der *cheA2*-Deletion zeigt, dass von den potentiellen Deletionsmutanten nur der Stamm 5 eine mit der Sonde hybridisierende Bande der richtigen Größe von 1,1 kb besaß.

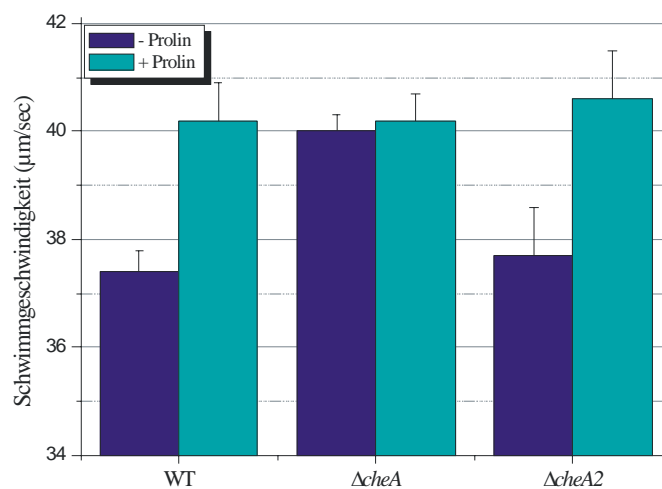
Die resultierende  $\Delta cheA2$ -Mutante (RU13/146) wurde anhand von Schwärmplatten- und Schwimmgeschwindigkeits-Analysen charakterisiert. Bei Schwärmplatten-Analysen gelten unterschiedliche Durchmesser der gebildeten Schwärminge als Maß für die Motilität und die chemotaktischen Fähigkeiten der Mutante. Bromfield-Schwärmplatten enthalten sehr geringe Nährstoff- und Agarkonzentrationen (2.4.2). Durch den Verbrauch der Nährstoffe am Animpfpunkt entsteht ein Nährstoffgradient, dem die Bakterien folgen. Das Schwärmvermögen der Deletionsmutanten  $\Delta cheA$  (RU11/310) und  $\Delta cheA2$  (RU13/146) wurde auf Bromfield-Schwärmplatten im Vergleich zum WT (RU11/001) analysiert (3.17). Die  $\Delta cheA$ -Mutante (RU11/310) erreichte noch 30 % des WT-Schwärminges (Abb. 20). Die Deletion von *cheA2* führte zu keiner Veränderung des Schwärmvermögens im Vergleich zum WT (Abb. 20).



**Abb. 20.** Vergleich der Schwärmfähigkeit der  $\Delta cheA$ - (RU11/310) und der  $\Delta cheA2$ -Mutante (RU13/146) mit dem WT-Stamm (RU11/001). Es wurden jeweils 3  $\mu$ l stationäre Flüssigkultur auf die Bromfield-Schwärmplatten aufgetragen und die Platte zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Schwärminge geben Auskunft über die motilen und chemotaktischen Fähigkeiten der untersuchten Stämme.

Ein genaueres Bild zum Beitrag von CheA2 zur Signaltransduktion lieferte die Untersuchung der Schwimmgeschwindigkeit mit dem *Hobson backtracker*-System (3.18). Die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit des WT betrug 37,4  $\mu$ m/sec, während die Deletion

von *cheA* (RU11/310) zu einer Zunahme der Schwimmgeschwindigkeit um 7,0 % führte (Abb. 21). Aufgrund der fehlenden Kinaseaktivität wird kein phosphorylierter Responsregulator (CheY2-P) gebildet, der an den Motor binden und dessen Rotation verlangsamen könnte (Abb. 5). Dadurch werden Taumelbewegungen unterdrückt und die Zellen schwimmen schneller (Sourjik & Schmitt, 1996). Im Gegensatz dazu war für  $\Delta cheA2$  (RU13/146) im Vergleich zum WT (RU11/001) nur eine geringfügige Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit um 0,8 % zu beobachten (Abb. 21).



**Abb. 21. Schwimmgeschwindigkeiten von verschiedenen *cheA*-Mutanten vor und nach Stimulierung mit 10 mM Prolin. Für die Stämme WT (RU11/001),  $\Delta cheA$  (RU11/310) und  $\Delta cheA2$  (RU13/146) wurden jeweils 1000 Einzelspuren in fünf unabhängigen Experimenten mit dem *Hobson bactracker*-System analysiert.**

Als Reaktion auf die Zugabe eines Lockstoffes erhöhen *S. meliloti*-Zellen ihre Schwimmgeschwindigkeit. Dieses Phänomen wird als Chemokinese bezeichnet (Attmannspacher *et al.*, 2005; Sourjik & Schmitt, 1996). Abb. 21 zeigt, dass der WT durch die Zugabe von 10 mM Prolin um 7,5 % schneller schwimmt. Die Deletion von *cheA* führte zu einem fast vollständigen Verlust der Chemokinese-Fähigkeit (0,5 %). Die *cheA2*-Deletionsmutante zeigte mit einer Stimulierung der Schwimmgeschwindigkeit um 7,7 % vergleichbare Chemokinese-Effekte wie der WT (Abb. 21). Somit spielt CheA2 bei der Signaltransduktion keine Rolle. Diese Daten belegen eine frühere Hypothese (Sourjik & Schmitt, 1996), nach der keine weiteren Kinasen als CheA und keine weiteren Responsregulatoren als CheY1 und CheY2 an der Regulation der Motorrotation von *S. meliloti* beteiligt sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das zweite *che*-Operon durch spezifische pflanzliche Lockstoffe induziert wird, vergleichbar mit der Induktion der Nod-Faktoren. Unter den hier verwendeten Bedingungen hat CheA2 offensichtlich keine Bedeutung. Daher konnte

für weitere Analysen der  $\Delta cheA$ -Stamm (RU11/310) als chemotaxis-defizienter Referenzstamm verwendet werden.

#### **4.2.2.2 Deletion verschiedener *cheW*-Gene und phänotypische Charakterisierung der resultierenden Mutanten**

Die Deletion von *cheW* führt bei *E. coli* zu einem chemotaktisch inaktiven Phänotyp (Liu & Parkinson, 1989). Im Genom von *S. meliloti* konnten drei *cheW*-Gene und ein putatives *cheW*-ähnliches Gen identifiziert werden. *CheW* ist das fünfte Gen des Chemotaxis-Operons (Abb. 16; Muschler, 2000), *cheW2* wird mit *mcpW* ko-transkribiert (4.1), *cheW3* ist ein monocistronisches Gen, das in der Nähe von *mcpY* lokalisiert ist und das putative *cheW*-ähnliche Gen befindet sich im zweiten Chemotaxis-Operon auf dem SymA-Plasmid (Abb. 17). Zunächst wurden Einzel-Deletionsmutanten erstellt, um die Beiträge der verschiedenen CheW-Proteine zur Chemotaxis von *S. meliloti* zu untersuchen. Benötigt wurden die *cheW*-Deletionsmutanten für Lokalisierungsstudien, in denen die Abhängigkeit der Rezeptorlokalisierung von CheW untersucht wurde. Falls mehrere CheW-Proteine einen Einfluss auf die Chemotaxis von *S. meliloti* haben, müsste dies bei der Versuchsplanung entsprechend berücksichtigt werden.

Die *cheW*- und die *cheW2*-Deletionsmutanten (RU11/418 und RU11/811) und die Doppeldeletionsmutante (RU11/812) lagen bereits vor (Tab. 1). Darüberhinaus wurde *cheW3* mit Hilfe des Deletionskonstrukts in pK18*mobsacB*, pRU3020 (Tab. 2), wie vorher beschrieben, deletiert und überprüft (4.2.1). Auf die Deletion des putativen *cheW*-ähnlichen Proteins wurde verzichtet, weil es mit *cheA2* in einem Operon liegt (Abb. 17) und dessen Deletion keinen Einfluss auf die Chemotaxis hatte (4.2.2.1).

Die Bedeutung der einzelnen CheW-Proteine für die Chemotaxis von *S. meliloti* wurde ebenfalls mit Hilfe von Schwärmlatten-Analysen untersucht (3.17). Wie in Tab. 6 aufgeführt, ist das Schwärmvermögen der  $\Delta cheW$ -Mutante (RU11/811) im Vergleich zum WT (RU11/001) drastisch reduziert. Es beträgt nur noch 15 %. Die Deletion von *cheW2* reduziert das Schwärmvermögen der Mutante um 50 % im Vergleich zum WT, somit ist auch CheW2 ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktionskette bei der Chemotaxis von *S. meliloti*.

**Tab. 6. Schwärmvermögen von verschiedenen *cheW*-Mutanten im Vergleich zum WT**

Stamm	Genotyp	Schwärmvermögen <sup>1)</sup> (%)
RU11/001	WT	100
RU11/418	$\Delta cheW$	15
RU11/811	$\Delta cheW2$	50
RU13/288	$\Delta cheW3$	106
RU11/812	$\Delta cheW\Delta cheW2$	15

<sup>1)</sup> Das Schwärmvermögen entspricht dem Mittelwert in Prozent des WT-Schwärmring-Durchmessers von 15 Platten (nach Abzug des 7 mm-Durchmessers einer immotilen *fla*-Mutante). Die Standardabweichungen der einzelnen Werte lagen zwischen 4 – 7 %.

Nur CheW3 scheint keinen Einfluss auf die Signaltransduktion bei der Chemotaxis zu haben, da die Deletion von *cheW3* das Schwärmvermögen der Mutante nicht beeinträchtigt (Tab. 6). Betrachtet man die Doppeldeletion von *cheW* und *cheW2*, so scheint CheW dominant zu sein, denn die Doppeldeletionsmutante hat das gleiche Schwärmvermögen wie die  $\Delta cheW$ -Mutante. Die Dominanz von CheW wurde auch durch Schwimmgeschwindigkeits-Analysen mit dem *Hobson backtracker*-System bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde für die Lokalisierungsstudien der Rezeptor-GFP-Fusionen die *cheWcheW2*-Doppeldeletionsmutante verwendet.

#### 4.2.3 Erzeugung von chromosomalen Rezeptor-GFP-Fusionen

Nachdem erste Untersuchungen darauf hinwiesen, dass einige der Rezeptoren am Pol der *S. meliloti*-Zelle lokalisieren (Meier, 2003), sollte in dieser Arbeit die Lokalisierung aller Rezeptoren untersucht werden. Dazu wurden C-terminale Fusionen der Rezeptoren mit eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) verwendet, das im Weiteren immer als GFP bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um eine GFPmut1-Variante des ursprünglichen Proteins aus *Aequorea victoria*, die aufgrund von AS-Austauschen eine verbesserte Fluoreszenzintensität bei einer gleichzeitigen Verschiebung des Excitations- (395 nach 488 nm) und des Emissionsmaximums (508 nach 507 nm) besitzt (Cormack *et al.*, 1996). In allen Fällen wurde zwischen Rezeptor und GFP ein kurzer *linker* aus sechs bzw. neun Aminosäureresten eingefügt (3.5.3).

Ausgehend von GFP-Fusionen der Rezeptoren im Überexpressionsvektor pBBR1MCS2 (3.5.3) wurden chromosomale *gfp*-Insertionen in den entsprechenden Rezeptorgenlokus erstellt

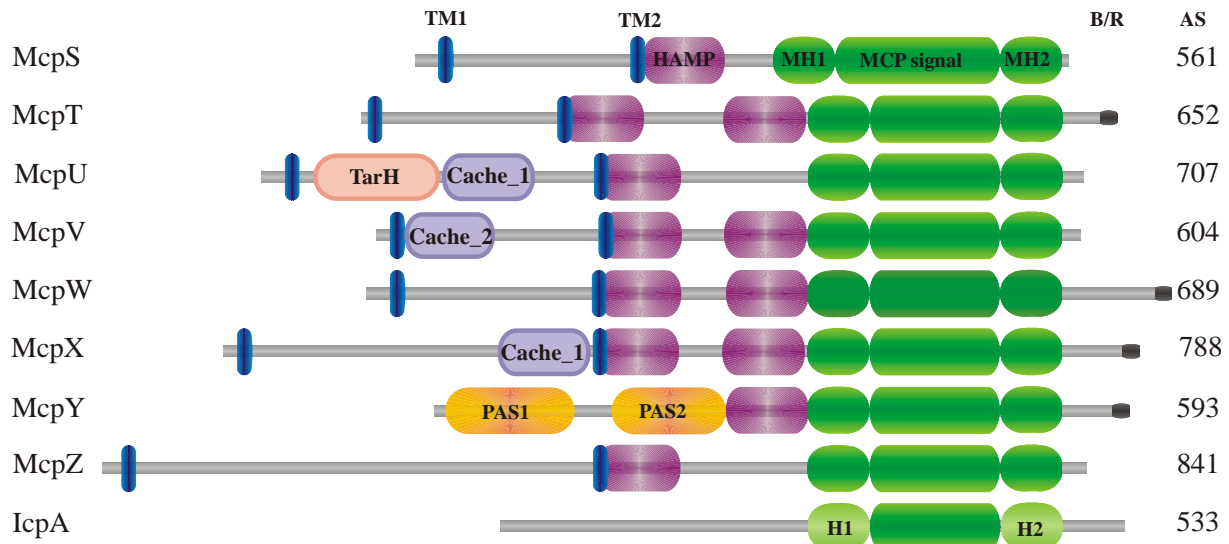
(3.5.4.2). Mit den Überexpressionsplasmiden als Matritze wurden über PCR-Mutagenese Fusionskonstrukte in pK18*mobsacB* erzeugt (3.5.4.2; Abb. 11), die über Konjugation und homologe Rekombination in das Genom des *S. meliloti*-Wildtyp (RU11/001) und von verschiedenen Mutantenstämmen integriert wurden (3.7). Nach der Selektion wurden die potentiellen Rezeptor-*gfp*-Stämme mittels PCR-Analysen auf Fusion des Rezeptorgens mit *gfp* überprüft (3.5.2). Da das resultierende Fusionsfragment wesentlich größer ist als das WT-Fragment, spielt eine Begünstigung von kleineren Fragmenten in der PCR-Reaktion keine Rolle. Auf *Southern blot*-Analysen konnte so verzichtet werden. Die entstandenen Stämme sind unter anderen in Tab. 1 aufgeführt.

Zur Untersuchung der Kolo-kalisierung von Rezeptoren und CheA wurden beide Proteine mit zwei verschiedenen Fluoreszenzproteinen markiert. Bei den Rezeptoren wurde auf die bestehenden chromosomalen GFP-Fusionen zurückgegriffen, während CheA mit dem monomeren rot fluoreszierenden Protein, mRFP, fusioniert wurde (Campbell *et al.*, 2002). Das Fusionskonstrukt in pK18*mobsacB* wurde, wie in Abb. 12 dargestellt, über PCR-Mutagenese erzeugt und über Konjugation und homologe Rekombination in das Genom von IcpA-GFP (RU13/303), McpU-GFP (RU13/301), McpV-GFP (RU13/212), McpX-GFP (RU13/144) und McpZ-GFP (RU13/241) integriert (3.7). Die Überprüfung der selektionierten Mutantenstämmen erfolgte mittels PCR-Analyse (3.5.2). Die erzeugten Stämme tragen somit sowohl eine chromosomale Rezeptorgen-*gfp*-, als auch eine *cheA-mrfp*-Fusion (Tab. 1). Zur Untersuchung der Kolo-kalisierung verschiedener Rezeptoren wurde ein ebenso erzeugtes *mcpX-mrfp*-Fusionskonstrukt in das Genom von IcpA-GFP (RU13/303), McpU-GFP (RU13/301), McpY-GFP (RU13/309) und McpZ-GFP (RU13/241) integriert (3.7). Somit tragen die resultierenden Stämme sowohl eine chromosomale Rezeptorgen-*gfp*- als auch eine *mcpX-mrfp*-Fusion im Genom. Die Lokalisierung wurde in den erzeugten Stämmen mit dem KLM konfokalen *laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) analysiert (4.8).

### 4.3 Computergestützte Sekundärstrukturanalysen

Die neun Rezeptorgene von *S. meliloti* kodieren für Polypeptidketten mit einer Länge von 533 bis 841 AS. Das Molekulargewicht der entsprechenden Rezeptoren liegt zwischen 58 kDa und 90 kDa. Für die Analyse ihrer Domänenstruktur wurden mehrere Datenbanken herangezogen, da nicht alle Domänen durch eine Datenbank angezeigt wurden. Dabei handelte es sich um folgende Analyseprogramme: MiST (*Microbial Signal Transduction*; Ulrich *et al.*,

2005), Pfam (*protein families database of alignments*; Bateman *et al.*, 2004), PSORTb (*prediction of protein sorting signals and localization sites in amino acid sequences*; Gardy *et al.*, 2005) und SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*; Letunic *et al.*, 2006). Die vollständige Domänenstruktur aller neun Chemorezeptoren ist in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 22.** Domänenstruktur der Chemorezeptor-Proteine von *S. meliloti*, entsprechend den Datenbanken MiST (Ulrich *et al.*, 2005), Pfam (Bateman *et al.*, 2004) und SMART (Letunic *et al.*, 2006). Konservierte Domänen sind durch identische Farben dargestellt. TM1, TM2: Transmembrandomäne 1 und 2; HAMP: konservierte Signaltransduktions-Domäne in Histidinkinasen, Adenylatcyclasen, MCPS und Phosphatasen (Aravind & Ponting, 1999); MH1, MH2: Methylierungshelix 1 und 2; H1, H2: Helix 1 und 2 ohne die konservierten methylierbaren Reste in IcpA; MCP signal: MCP-Signaldomäne, Interaktionsdomäne mit CheW und CheA; B/R: Interaktionsbereich mit CheB und CheR; AS: Anzahl der Aminosäurereste der Polypeptidketten; Tar H: *four-helix, ligand-binding domain* (Ulrich & Zhulin, 2005); Cache: Acronym aus den ersten Proteinen, die diese Domäne aufweisen: *animal Ca<sup>2+</sup>-channel subunits and prokaryotic chemotaxis receptors* (Anantharaman & Aravind, 2000); PAS: Acronym aus Proteinen, in denen diese Sequenzen entdeckt wurden: *Drosophila period clock protein* (PER), *vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), und *Drosophila single-minded protein* (SIM; Nambu *et al.*, 1991; Ponting & Aravind, 1997).

Acht der Rezeptoren wurden aufgrund der hochkonservierten Region in der cytoplasmatischen Domäne, die allen Chemotaxis-Rezeptoren innerhalb der Bakterien und der Archaeen gemeinsam ist, als MCPs klassifiziert. Diese Region besteht aus einer methylierbaren Helix, MH1, der zentralen MCP-Signaldomäne und einer zweiten methylierbaren Helix, MH2 (Stock & Surette, 1996). Aufgrund der Domänenstruktur kann man zwischen Transmembran-Rezeptoren und löslichen Rezeptoren unterscheiden. Sieben Rezeptorproteine besitzen zwei hydrophobe Transmembrandomänen (TM), die die Cytoplasmamembran durchspannen. Die

Sensordomäne, die zwischen den beiden Transmembrandomänen liegt, befindet sich im Periplasma, während die hochkonservierte Signaldomäne im Cytoplasma liegt. Die Größe der periplasmatischen Ligandenbindedomäne von McpS, McpT, McpV und McpW ist vergleichbar mit der der *E. coli*-Rezeptoren Tar und Tsr, die aus etwa 160 Aminosäureresten besteht. Dagegen weisen McpU, McpX und McpZ eine stark verlängerte Sensordomäne mit 250 bis 390 Aminosäureresten auf. Mit Ausnahme von IcpA besitzen alle Rezeptoren mindestens eine HAMP-Domäne. Dabei handelt es sich um eine weitverbreitete konservierte Domäne in Histidinkinasen, Adenylatcyclasen, methylierbaren Chemotaxisproteinen und Phosphatasen (Aravind & Ponting, 1999), die an der Signalübertragung von der Sensordomäne zur Signaldomäne innerhalb des Rezeptors beteiligt ist (Bordignon *et al.*, 2005). In allen Transmembranrezeptoren befindet sich die erste HAMP-Domäne direkt im Anschluss an die zweite Transmembranregion. Die zusätzliche HAMP-Domäne in fünf MCPs liegt vor der ersten methylierbaren Helix (MH1, Abb. 22). Hier befindet sich auch die HAMP-Domäne des cytoplasmatischen Rezeptors McpY. Eine weitere konservierte Signaldomäne, die Cache-Domäne, wurde mit Hilfe der Pfam-Datenbank in der periplasmatischen Region von McpU, McpV und McpX identifiziert. Cache-Domänen, ein Acronym für die Proteine, in denen sie zuerst gefunden wurden (*animal Ca<sup>2+</sup>-channel subunits* und *procaryotic chemotaxis receptors*), binden kleine Moleküle wie Aminosäuren (Anantharaman & Aravind, 2000). McpU besitzt in der periplasmatischen Region noch eine weitere konservierte Domäne, TarH. TarH ist dem Vier-Helix-Bündel der Ligandenbinde-Domäne von *E. coli*-MCPs homolog (Ulrich & Zhulin, 2005). Auch sie ist an der Bindung von externen Signalmolekülen beteiligt.

Als Besonderheit besitzt *S. meliloti* zusätzlich zu den Transmembranrezeptoren zwei Rezeptoren, McpY und IcpA, denen laut den verwendeten Datenbanken jegliche hydrophobe membrandurchspannende Bereiche fehlen. Aufgrund dieser Vorhersagen lässt sich annehmen, dass diese Rezeptoren im Cytoplasma lokalisiert sind. Der N-terminale Bereich von McpY weist zwei PAS-Domänen auf. Diese können als Sensoren für Sauerstoff, Energie und Licht dienen (Taylor & Zhulin, 1999). Die MCP-Signaldomäne, die methylierbaren Helices, MH1 und MH2, einschließlich der Position der methylierbaren Reste, sind in McpY hochkonserviert (Abb. 23). Dagegen sind in IcpA nur die MCP-Signaldomäne, nicht aber die methylierbaren Helices konserviert, was aber dennoch eine Klassifizierung von IcpA als Rezeptorprotein für Chemotaxis zulässt. Interessanterweise fehlen in den beiden Helices (H1 und H2) von IcpA die methylierbaren Reste (Abb. 23), die normalerweise charakteristisch für MCPs sind. Auch die methylierbaren Helices von McpS zeigen einige Abweichungen zur Konsensussequenz, aber die methylierbaren Reste sind erhalten (Abb. 23). Die MCP-Signaldomäne von McpS ist durch

das Vorhandensein zusätzlicher Aminosäurereste zwischen MH1 und der Signaldomäne und zwischen der Signaldomäne und MH2 um ca. 10 % verlängert (Abb. 22 und Abb. 23).

Tar	DLAQSVSHMQ	RSFDTVTWH	REGSDAIYAG	TREIAAGNTD	LSRTEQQA*	ALEETAASME	QLTATVKQNA	DNFRQASQLA	QSASDTNQHG	GKIVDGVVKT	348	
Tsr	QLAESLRHMQ	GELMRTVGDV	RNGANAITYG	ASEIATGNND	LSRTEQQA*	SLEETAASME	QLTATVKQNA	ENRQASHLA	LSASETQRG	GKVDNVVQT	350	
McpS	GMIDNERGSR	ERLEKLLATI	SETAQLHSSS	AAEILAGTTQ	QVEGMRBOSS	AVAQTVTSVD	EVLQISEQAA	QRAQHVAASY	DNAVKISNEG	RRALDDTVQV	361	
McpT	ELQTNVNDTL	QTLQKTLREV	RMTTDSINGN	STELRSAADD	LKRTEQQA*	ALEETSALD	EITTAVRNST	ERAQEATVMV	TEAKDSAAES	ASVVRNAIDA	437	
McpU	REREDFNNSV	AKLHNTLCAV	GANARADAG	ATEIRSAADD	LARRTEQQA*	SVEETAALAE	EITTVVRDSA	HRAEEVGVALV	ARTRAGAEEKS	GEVVQNAVEA	523	
McpV	KLKDDFNATV	AALRDVIGAI	SRSTEIVHGS	AADISEAANN	LSRTEQQA*	ALEETAALD	EITSTVVRHAS	GRALEARDMV	DETKASAAPS	GDIVRNAIDA	424	
McpW	ALRRDFNDTV	ERLSQVLSVV	KENTASTESN	GRQMRSAADD	LARRTEQQA*	SLEQTSAALE	EITTVVKTAT	ERAEASHMV	DETRINAAPS	GRIVGEAIAA	433	
McpX	QLRRDFNATM	ESLSEETLRT	NHSVVNIGSG	TSEISGAAND	LSRTEQQA*	SLEETAALD	ELTSCVNASA	ENAKVPAKSV	EVASSDAEVS	GEVVQNAVEA	556	
McpY	MVRKDFNEAL	VRECRAMQTV	GENASALAGG	AREIRSAADD	LKRTEQQA*	SVEETAALD	EITTVVAVSS	RRAEERGNLV	AKTKDGAERS	GLVVKSAIGA	378	
McpZ	QRLDFNGSL	FRLQDTLQAI	RANAQAQQG	GADMHRSADE	LKRTEQQA*	SLEETAALD	QITVTVRSSA	ERAHEANQAV	SHTKRSADSS	ATVVTNAVA*	661	
IcpA	PVAVAGLNTAL	GOIRDALLAA	DKRATAAEAI	VSDLPGSAAE	FGNAGAAEK*	AIDQHLASLG	TVMERIRTGA	IRIGTEAQA	SRTRIAVERS	GETAGQAIS*	325	
Tar	MHEIAD----	SSKKIADIIS	VIDGIAFQTN	ILALNAAVEA	ARAGEQGRGF	AVVAGEVRNL	ASRSAQAAKE	IKALTEDSVS	-----	424		
Tsr	MRIIST----	SSQKIADIIS	VIDGIAFQTN	ILALNAAVEA	ARAGEQGRGF	AVVAGEVRNL	AQRSAQAARE	IKSLIEDSVG	-----	426		
McpS	MNAVSAETET	IAADLILSLAE	NSLEIGELVS	VVAELADQTN	LLALNAGIEA	SRAGEHGRGF	NVVAEIRITL	ADQSKSNITR	VRRLIMEIQK	STNSAVIGAE	461	
McpT	MGRIEQ----	ASSETGQITN	VIDEIAFQTN	LLALNAGIEA	ARAGDAGKGF	AVVAQEVREL	AQRAASAARD	IKSLISKSGG	-----	513		
McpU	MHALBK----	SSGELSNIEG	VIDDIAFQTN	LLALNAGVEA	ARAGEAGKGF	AVVAQEVREL	AQRSANAAKE	IKALITTSGE	-----	599		
McpV	MGRIEA----	SSSRIISQIEG	VIDEIAFQTN	LLALNAGVEA	ARAGEAGRGF	AVVAQEVREL	AQRSAGAAKE	IKALIGTSVK	-----	500		
McpW	MARIEG----	ASSETGKIID	VIDEIAFQTN	LLALNAGVEA	ARAGEAGKGF	AVVAQEVREL	AQRAGAARD	IKALVSRSGN	-----	509		
McpX	MQIEIQ----	SSHEVSRIIEG	VIDEIAFQTN	LLALNAGVEA	ARAGDAGKGF	AVVAQEVREL	AQRSANAAKE	IKTLINTSAG	-----	632		
McpY	MGLIEQ----	SSREISNIEG	VIDDIAFQTN	LLALNAGVEA	ARAGEAGKGF	AVVAQEVREL	AQRSASAARD	IKTLITASGE	-----	454		
McpZ	MGRIEA----	ASRIEQIEIE	VIDDIAFQTN	LLALNAGIEA	ARAGEAGKGF	AVVAQEVREL	AQRSAAARE	IKGLDKSTQ	-----	737		
IcpA	MADIEA----	SAEKIGQIEG	VIDEIAFQTN	LLALNAGIEA	ARAGESRGRF	AVVAQEVREL	AQRSQAARE	IKQIVTGTGK	-----	401		
Tar	---RVDGCS	VLVESAGETM	NNIVNAVTRV	TDIMGEIASA	SDEQSRGIDQ	VALAVSEMDR	VTOQNASLVO	*ESAAAAALE	*EQASRLTQAV	SAFR-----	514	
Tsr	---KVDVGS	TLVESAGETM	AETVSAVTRV	TDIMGEIASA	SDEQSRGIDQ	VGLAVAEMDR	VTOQNAALVE	ESAAAAALE	EQASRLTEAV	AVFR-----	516	
McpS	DGSKSVSRAL	ETVSEAGETI	RQLEAIVADS	ARSAVQIAAS	AGQORAGMKQ	IHEAMHYIEQ	TSSONLSAIR	QAEEAAKDLN	ELGSRKEMKL	TDHG-----	555	
McpT	---EVATGV	KLVQATGAAL	QGETRVLKI	NHHSIHLATA	AREQSTGLGE	VSTAVNQMDQ	VTOQNAAMVE	EANAATHKLS	AEADNLANLI	AYFK--VER	606	
McpU	---QVHSSV	TLVGDTEGAL	QAVVVEVQEI	NKHVSAIVTA	TREQSTGLQE	INTAVANTMQ	GTQONAAAMVE	QQTAAHSHGLA	SEAAIANALL	AQVILG----	691	
McpV	---EVGAGV	ELVRSSTEDAL	MEDDALNVRV	NEQVAALATA	AREQATGLQE	VNTAVNSMDQ	MTQONAAAMVE	ETTAASQTLA	QESREKALL	EQFR-----	590	
McpW	---EVRTGV	RLVQSTEDAL	GRIGAKVACI	NEHMSSTVMA	AREQSTGLRE	INTAVAQLDQ	MTQONAAAMVE	QTNAASHTLA	QDEKLESEIV	GQFRHQQARE	605	
McpX	---QVREGV	DLVKGAGGAL	EKIAEQVVQI	NGLIRQISS	ASEQAVGLKE	INSAVNQMDQ	VTOQNAAMVE	ETTAASMALN	DEARALSELV	ARFQIAPQAA	728	
McpY	---HVRNGV	SLVQGTETAL	ETLILAQVET	NHNVSALVEA	AREQSTGLKE	INQAVNAMDO	TTOQNAAMVE	ESTAAASHRMS	QBADALHALL	ROFRIG----	546	
McpZ	---EVSSEGS	RLVKETGAVL	ASISAEIVTV	SQHVEMILATA	SRDQAALNNE	VNGSVNQMDQ	MTQONASMVE	EATGTSRALA	NQADTLMMLV	EQFR-----	827	
IcpA	---QVAVGV	ELVGRTOHAL	SSIAEQVSVI	NEAVTGLARE	AREQVNDLAS	ATSEIGGVAC	AMNRSALLAG	AALASTDHLH	GVIVEIGETV	RRHLDR---	494	
Tar	-----	-----	-----	-----	-----	LAASP	LTKPKQTPSR	PASEQPPAQP	RLRIAEQDP	<b>NWETF</b>	553	
Tsr	-----	-----	-----	-----	-----	IQQ--	QQRETSAV	VKTVTPAAPR	KMAVADSE	<b>NWETF</b>	551	
McpS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	NEHDNT	-----	-----	-----	561	
McpT	EAVRTVVP--	-----	-----	-----	-----	AKDASRPVA	SPARRMMGTV	ARAFGNG---	SAAVARD	<b>DWEEF</b>	652	
McpU	-----	-----	-----	-----	-----	E	TQAASYQATS	RRRAA	-----	-----	707	
McpV	-----	-----	-----	-----	-----	LEE	RGAQPAYGRA	A	-----	-----	604	
McpW	TAIRTAAIQP	PGRAGSATAS	APARAATATA	AAPVSLRKP*	AQSQSTRPAP	SPAKALMGKL	AGAFGNRPGS	TPSVTASGEN	<b>NWEEF</b>	-----	689	
McpX	QAQASAEML-	-----	-----	RGTAERMRA*	APAEINRPAQ*	PRSAAYSNST	QRVLAKTSGA	N---	ALAQD	<b>NWEEF</b>	788	
McpY	-----	-----	-----	-----	-----	RDA	SPASDNRMEA	PHSPTRLHAT	AKTLRSGTRS	NLALAPAAD	<b>DWENF</b>	593
McpZ	-----	-----	-----	-----	-----	LEP	VAAADHSYRA	A	-----	-----	841	
IcpA	-----	-----	-----	-----	-----	QARSAA	SFAPRMRIEA	PEDETTSPPFG	EVTSERHLAGWRR	-----	533	

Abb. 23. Sequenzvergleich der konservierten MCP-Signaldomäne und der Methylierungshelices MH1 und MH2 von Tar und Tsr aus *E. coli*, und McpS, McpT, McpV, McpW, McpX, McpY, McpZ und IcpA aus *S. meliloti* mit Hilfe des Clustal W Multiple Alignment Programmes (Thompson *et al.*, 1994). Hell- und dunkelgraue Unterlegung entspricht 70 % ähnliche oder identische Reste. Die Nummern am Ende jeder Zeile entsprechen den Positionen der AS-Reste, Striche stehen für Lücken. Blaue Sterne markieren putative Methylierungsstellen, entsprechend den *E. coli*-Rezeptoren Tar und Tsr (Nowlin *et al.*, 1987; Rice & Dahlquist, 1991). Die konservierte Pentapeptid-Sequenz (NWETF in *E. coli*) am C-Terminus, die für die Interaktion mit CheB und CheR notwendig ist (Barnakov *et al.*, 200; Barnakov *et al.*, 2002), ist durch rote Buchstaben hervorgehoben.

Die high-abundance Rezeptoren von *E. coli*, Tar and Tsr, unterscheiden sich von den low-abundance Rezeptoren, Tap und Trg, durch die konservierte Pentapeptid-Sequenz NWETF am C-Terminus des Proteins. Die Anwesenheit dieses Motivs erhöht die adaptive kovalente Modifizierung des Rezeptors durch CheB und vor allem CheR (Barnakov *et al.*, 2000; Barnakov *et al.*, 2002). Vier der *S. meliloti* Rezeptoren besitzen ein solches Motiv, nämlich



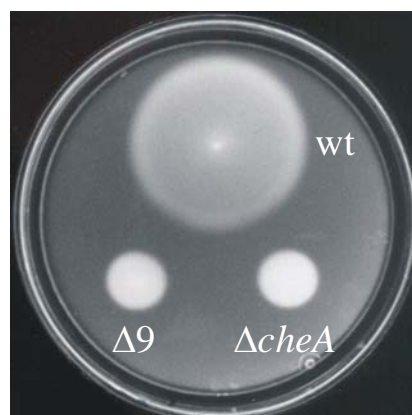
McpT, McpW, McpX und McpY, wenn auch in etwas modifizierter Form (Abb. 23). Aufgrund der Pentapeptid-Sequenzen von McpT (DWEEF), McpW (NWEEF), McpX (NWEEF) und McpY (DWENF) ergibt sich folgendes Konsensus-Motiv: (N/D)WEEF. Für die Bindung von CheR sind die Reste W in der zweiten und F in der fünften Position essentiell (Shiomi *et al.*, 2000). Diese Reste sind auch in der modifizierten Sequenz von *S. meliloti* konserviert.

#### 4.4 Phänotypische Charakterisierung der neun putativen Chemorezeptoren von *S. meliloti*

Zur Analyse der Funktion einzelner Chemorezeptoren bei der Chemotaxis von *S. meliloti* wurde mit Hilfe von verschiedenen Untersuchungsmethoden, wie Schwärm- und Schwimmgeschwindigkeits-Analysen, sowie Kapillartests, die Reaktion auf verschiedene Lockstoffe getestet. Derartige Analysen wurden mit Rezeptor-Deletionsmutanten durchgeführt. Ein Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung spezifischer Liganden oder Ligandklassen für einzelne Rezeptoren.

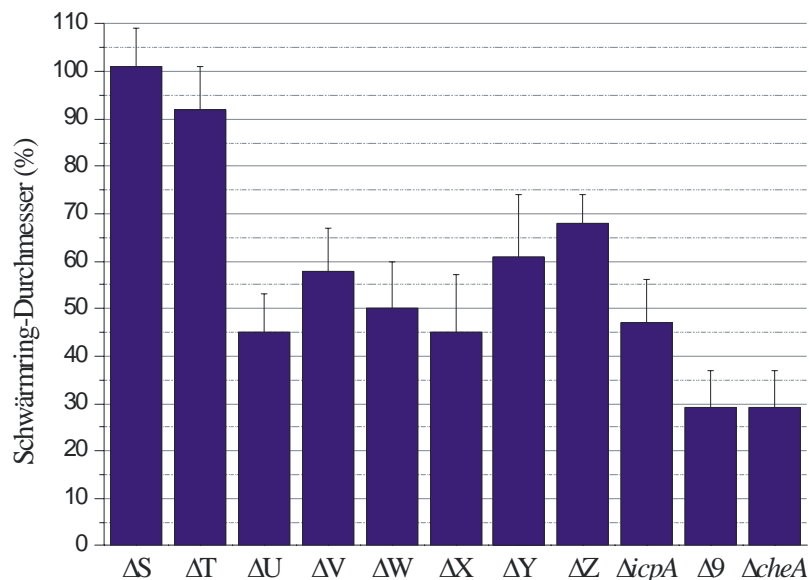
##### 4.4.1 Bestimmung der Schwärmfähigkeit der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Bromfield-Schwärmplatten

Die Bestimmung des Schwärmvermögens von Rezeptor-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Standard auf Bromfield-Schwärmplatten (2.4.2) ermöglicht eine erste Beurteilung der Motilität und der chemotaktischen Fähigkeiten einer Mutante.



**Abb. 24.** Vergleich der Schwärmfähigkeit der  $\Delta 9$ - (RU13/149) und der  $\Delta cheA$ -Mutante (RU11/310) mit dem WT-Stamm (RU11/001). Es wurden jeweils 3  $\mu$ l stationäre Flüssigkultur auf die Bromfield-Schwärmplatte aufgetragen und die Platte zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Wie bereits in Abb. 20 gezeigt, beträgt der Schwärmring-Durchmesser des *cheA*-Deletionsstamms (RU11/310), der chemotaktisch inaktiv ist, nur ungefähr 30 % des WT-Wertes. Auch das Schwärmvermögen des rezeptorlosen  $\Delta 9$ -Stammes (RU13/149; 4.2.1), der somit keine Lockstoffe mehr wahrnehmen kann, ist im Vergleich zum WT um 70% reduziert (Abb. 24). Dadurch kann auch der  $\Delta 9$ -Stamm als chemotaktisch inaktiv betrachtet werden.



**Abb. 25. Diagramm der relativen Schwärmring-Durchmesser auf Bromfield-Schwärmplatten von 11 Deletionsmutanten im Vergleich zum WT-Stamm. Bezeichnung der Stämme:  $\Delta S$  -  $\Delta Z$ , Einzeldelationen von *mcpS* (RU13/148), *mcpT* (RU11/838), *mcpU* (RU11/828), *mcpV* (RU11/830), *mcpW* (RU11/803), *mcpX* (RU11/805), *mcpY* (RU11/804), *mcpZ* (RU11/818);  $\Delta icpA$ , Deletion des *icpA*-Gens (RU11/815);  $\Delta 9$  (RU13/149);  $\Delta cheA$ , Deletion von *cheA* (RU11/310). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent des WT-Schwärmring-Durchmessers von 15 Platten (7 mm-Durchmessers einer immotilen *fla*-Mutante).**

Die Untersuchung des Schwärmvermögens der Rezeptor-Deletionsmutanten zeigte, dass die *mcpS*-Deletion keine und die *mcpT*-Deletion nur eine Reduzierung des Schwärmring-Durchmessers um 8 % hervorruft (Abb. 25). Die Schwärminge der drei Mutanten  $\Delta mcpV$ ,  $\Delta mcpY$  und  $\Delta mcpZ$  betragen noch zwischen 55 % und 70 % des WT-Wertes. Die stärkste Beeinträchtigung des Schwärmvermögens wurde durch die Deletion der Rezeptorgene *mcpU*, *mcpW*, *mcpX* und *icpA* verursacht (Abb. 25), und führte zu Schwärmring-Durchmessern, die im Vergleich zum WT um mehr als 50 % vermindert waren (Meier *et al.*, 2007). Dass das Fehlen einzelner Rezeptorgene solche gravierenden Effekte auf das Schwärmvermögen hat, indiziert die Bedeutung eines ausgewogenen Verhältnisses der Rezeptoren für eine optimale Reizantwort.

#### **4.4.2 Reaktion der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Zucker, Aminosäuren und organische Säuren**

Bodenbakterien werden durch organische Substanzen angezogen, die von den Pflanzen in den Boden abgegeben werden, und die sie als Kohlenstoffquellen nutzen können (Uren, 2000). Zu diesen Substanzen gehören zahlreiche Zucker, Aminosäuren und organische Säuren. Für *S. meliloti*-Zellen sind besonders Verbindungen attraktiv, die von ihren symbiontischen Wirtspflanzen, Luzerne und Steinklee, sekretiert werden. Frühere Studien berichten von einer positiven Chemotaxis von *S. meliloti* auf zahlreiche organische Substrate (Burg *et al.*, 1982; Götz *et al.*, 1982; Malek, 1989; Robinson & Bauer, 1993).

##### **4.4.2.1 Vortest zur Identifizierung geeigneter Lockstoffe**

Zur Bestimmung von geeigneten organischen Verbindungen für die Untersuchung des Verhaltens der Rezeptor-Mutanten wurden RB-Minimalmedium-Schwärmplatten verwendet (2.4.2). Diese wurden mit der jeweiligen Substanz in verschiedenen Konzentrationen als einzige Kohlenstoffquelle versetzt und zunächst das Schwärmvermögen des *S. meliloti*-WT (RU11/001) getestet (3.17). Dabei musste sowohl das Wachstum der Zellen auf dieser Kohlenstoffquelle, als auch die Schwärmfähigkeit in Betracht gezogen werden. Dieser Vortest war notwendig, da es für den in unserem Labor verwendeten *S. meliloti*-Stamm keine Literaturangaben bezüglich geeigneter Kohlenstoffquellen gibt. Es wurden alle 20 L-Aminosäuren, zahlreiche D-Zucker und einige organische Säuren getestet. Als optimale Konzentration für die Lockstoffe ergab sich überwiegend  $10^{-4}$  M, während sich höhere Konzentrationen häufig negativ auf das Schwärmvermögen auswirkten. Einige Substanzen, wie Aspartat, Asparagin, Cystein, Methionin, Phenylalanin Threonin, Tryptophan, Ribose und Pyruvat waren als einzige Kohlenstoffquelle offenbar ungeeignet, denn es war kein Wachstum der Bakterien zu beobachten. Als gute Kohlenstoffquellen und auch Lockstoffe erwiesen sich die organischen Säuren des Citronensäure-Zyklus (Citrat, Malat, Succinat und Fumarat). Von den getesteten L-Aminosäuren konnten nur auf den mit Glutamat, Glutamin, Histidin, Lysin und Prolin versetzten Schwärmplatten deutliche Schwärmringe beobachtet werden (Meier *et al.*, 2007). Die besten Kohlenstoffquellen und Lockstoffe waren bei diesem Versuchsansatz die getesteten Zucker und ein Zuckeralkohol (Meier *et al.*, 2007). Dabei handelte es sich um

Fruktose, Galaktose, Maltose, Saccharose und Mannitol. So konnten 14 Substanzen ermittelt werden, die sich für weiterführende Analysen eigneten.

#### 4.4.2.2 Untersuchung der Lockstoff-Qualität

Der unter 4.4.2.1 geschilderte Vorversuch, die Reaktion des *S. meliloti*-WT auf Lockstoffe in RB-Schwärmplatten (2.4.2) zu testen, lieferte unterschiedlich große Schwärmring-Durchmesser für die verschiedenen Substanzen. Diese Werte können aber nicht als direktes Maß für die Qualität eines Lockstoffes gesehen werden, da bei Schwärmplatten auch das Wachstum auf der als Kohlenstoffquelle verwendeten Substanz eine Rolle spielt (Meier *et al.*, 2007). Eine bessere Beurteilung über die Qualität eines Lockstoffes ermöglicht die Analyse der Chemokinese als Reaktion auf verschiedene organische Verbindungen (Attmannspacher *et al.*, 2005; Sourjik & Schmitt, 1996). In Tab. 7 sind die mit Hilfe des computergestützten *Hobson Backtracker*-Systems (*Hobson Tracking System*, Sheffield, UK) ermittelten Schwimmggeschwindigkeiten des *S. meliloti*-WT (RU11/001) vor und nach Stimulierung mit den Aminosäuren, Zuckern und organischen Säuren aufgelistet (3.18). Die Stimulierung der Schwimmggeschwindigkeit durch organische Säuren betrug, mit Ausnahme von Succinat, einheitlich 4 %. Somit sind Citrat, Malat und Fumarat gute Lockstoffe für *S. meliloti*, während Succinat eine 25 % schwächere Reizantwort auslöst. Die Reaktion auf Aminosäuren hingegen war sehr unterschiedlich, was aber auf die unterschiedliche Natur der einzelnen Aminosäuren zurückgeführt werden kann. Glutamat und Glutamin waren im Vergleich die schwächsten Lockstoffe, während Histidin, Lysin und Prolin einen stärkeren Chemokinese-Effekt auslösten als die organischen Säuren. Wie auch im Vorversuch (4.4.2.1), gehörten die getesteten Zucker zu den qualitativ stärksten Lockstoffen für *S. meliloti* (Meier *et al.*, 2007). Sie verursachten eine Erhöhung der Schwimmggeschwindigkeit von 4,0 bis 6,8 %. Die besten Stimulanzen waren dabei Maltose (6,5 %) und Saccharose (6,8 %). Dieses Ergebnis stimmt mit einer früheren Untersuchung von Malek (1989) überein, nach der zusammengesetzte Zucker bessere Lockstoffe als Aminosäuren sind.

**Tab. 7. Schwimmgeschwindigkeit des *S. meliloti*-WT (RU11/001) vor und nach Stimulierung mit verschiedenen Lockstoffen**

Lockstoff <sup>1)</sup>	Schwimm- geschwindigkeit ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) <sup>2)</sup>	Chemokinese (%) <sup>3)</sup>
Ohne	36,9	
Citrat	38,5	4,3
Fumarat	38,4	4,3
Malat	38,4	4,1
Succinat	38,0	2,9
Glutamat	37,7	2,2
Glutamin	37,6	1,9
Histidin	39,0	5,7
Lysin	39,7	5,6
Prolin	38,5	4,3
Fruktose	38,7	4,9
Galaktose	39,1	6,0
Maltose	39,4	6,8
Mannitol	38,3	3,8
Saccharose	39,3	6,5

<sup>1)</sup> Lockstoffe wurden mit RB-Medium (2.4.2) aus einer konzentrierten Stammlösung verdünnt und mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gepuffert. Als Referenz (ohne) wurde nur RB-Medium zur Stimulierung der Schwimmgeschwindigkeit eingesetzt.

<sup>2)</sup> Schwimmgeschwindigkeit vor und nach Stimulierung mit einem Lockstoff ( $10^{-4}$  M). Für jeden Wert wurden 1000 Einzelspuren aus fünf unabhängigen Experimenten mit dem *Hobson bactracker*-System analysiert.

<sup>3)</sup> Die Chemokinese entspricht dem Anstieg der Schwimmgeschwindigkeit nach Stimulierung mit einem Lockstoff in Prozent.

Somit kann festgehalten werden, dass Disaccharide die besten Lockstoffe für *S. meliloti* sind, wohingegen Aminosäuren, abhängig von ihrer Natur, sehr unterschiedliche Reizantworten auslösen. Außerdem stellen die Zwischenprodukte des Citronensäure-Zyklus gute Reizquellen für *S. meliloti* dar.

#### 4.4.2.3 Schwärmfähigkeit von Rezeptor-Deletionsmutanten auf RB-Schwärmpatten mit nur einer einzigen Kohlenstoffquelle

Zur Untersuchung der Bedeutung einzelner Chemorezeptoren bei der Wahrnehmung von Lockstoffen wurde das Schwärmvermögen der neun Rezeptor-Deletionsmutanten und des  $\Delta 9$ -Stammes (RU13/149) auf RB-Schwärmpatten (2.4.2) analysiert (3.17). Die Schwärmring-Durchmesser der Mutanten auf Zuckern (Abb. 26A), organischen Säuren (Abb. 26B) und

Aminosäuren (Abb. 26C) als einziger Kohlenstoffquelle sind in Abb. 26 im Vergleich zum WT dargestellt. Wie auch bei den Analysen auf Bromfield-Schwärmplatten (4.4.1) wurde der Chemotaxis-defiziente  $\Delta cheA$ -Stamm (RU11/310) als Negativkontrolle mit untersucht. Sowohl die *cheA*-Deletionsmutante als auch der  $\Delta 9$ -Stamm waren noch in der Lage, Schwärmringe mit 30 bis 50 % des WT-Schwärmring-Durchmessers zu bilden, was vergleichbar mit dem Verhalten auf Bromfield-Schwärmplatten ist (Abb. 25; Meier *et al.*, 2007).

Die Schwärmringe auf den Platten mit Zuckern als Lockstoffe waren am besten auszuwerten, da sie sehr ausgeprägte Ränder besaßen. Die Auswertung der anderen Platten wurde durch die eher diffusen Umrisse der Schwärmringe erschwert. Die sehr einheitlichen Schwärmring-Durchmesser auf den mit Zuckern versetzten Schwärmplatten lagen für fast alle Mutanten zwischen 85 und 100 %. Nur für die Stämme mit Deletionen von *mcpU*, *mcpW*, *mcpX* und *icpA* waren sie auf 70-80 % des Wildtyp-Schwärmrings reduziert (Abb. 26A).

Auf Schwärmplatten mit den vier organischen Säuren als Kohlenstoffquelle ergab sich im Großen und Ganzen das gleiche Bild wie auf den Zucker-Schwärmplatten. Die Schwärmringe hatten 80-100 % des WT-Durchmessers und die von  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpW$ ,  $\Delta mcpX$  und  $\Delta icpA$  70-80 % (Abb. 26B). Am auffälligsten war die Größe der Schwärmringe auf den Aminosäure-Schwärmplatten. Denn sie waren sehr unterschiedlich in ihren Durchmessern und auch stärker reduziert im Vergleich zu den Schwärmplatten mit Zuckern oder organischen Säuren. Mit Ausnahme von  $\Delta mcpX$  und  $\Delta mcpZ$  war der Schwärmring-Durchmesser jedes Stammes für mindestens eine Substanz um 30 % reduziert. Das Schwärmvermögen der *mcpU*-, *mcpW*-, *mcpY*- und *icpA*-Deletionsmutanten betrug nur noch 30-75 % des Wildtyps (Abb. 26C). Auf Histidinplatten waren die Schwärmring-Durchmesser von  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpW$ ,  $\Delta mcpY$  und  $\Delta icpA$  um mehr als 40 % reduziert. Für den Lockstoff Prolin waren starke Schwankungen in den Durchmessern zu beobachten. Die Stämme mit Deletionen von *mcpS*, *mcpT*, *mcpX* und *mcpZ* waren um weniger als 20 % vermindert,  $\Delta mcpV$ ,  $\Delta mcpW$ ,  $\Delta mcpY$  und  $\Delta icpA$  um 20 bis 40 % und  $\Delta mcpU$  sogar um über 60 %. Interessanterweise war der Schwärmring-Durchmesser von  $\Delta mcpU$  auf den Histidin-, Lysin- und Prolin-Schwärmplatten kaum größer als der des  $\Delta 9$ -Stammes, was darauf hinweisen könnte, dass McpU ein wichtiger Rezeptor für diese drei Substanzen ist (Meier *et al.*, 2007).

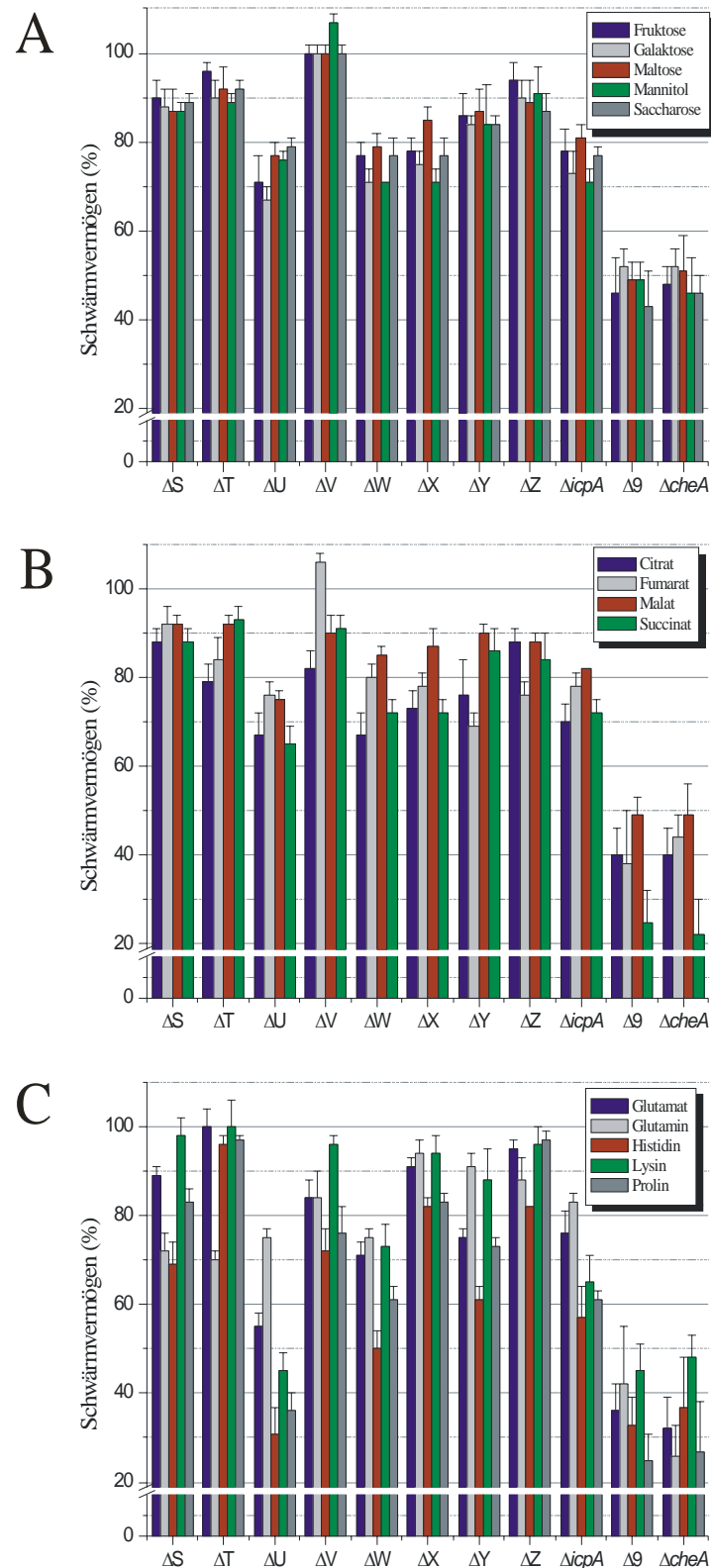


Abb. 26. Diagramm der relativen Schwärmring-Durchmesser von elf Chemotaxismutanten im Vergleich zum WT. Benennung der Stämme wie in Abb. 25. A: Schwärmverhalten auf Zuckern in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M. B: Schwärmverhalten auf organische Säuren in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M. C: Schwärmverhalten auf Aminosäuren in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent des WT-Schwärmring-Durchmesser auf RB-Schwärmplatten mit 0,27 % Agar von sechs Platten.

Generell kann festgestellt werden, dass das Schwärmvermögen der meisten Deletionsmutanten auf allen untersuchten Substanzen zumindest leicht beeinträchtigt ist. Allerdings scheinen McpS, McpT, McpV und McpZ nicht so wichtig für die Wahrnehmung der getesteten Lockstoffe zu sein. Mit Ausnahme von  $\Delta mcpU$ , hat keine der Mutanten einen vollständigen Verlust des Schwärmvermögens gezeigt. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass zum einen jeder Rezeptor mehrere organische Verbindungen wahrnehmen kann und zum anderen jede untersuchte Substanz von mehr als einem Rezeptor als Lockstoff erkannt wird.

#### 4.4.3 Bestimmung der Schwimgeschwindigkeit und der Chemokinese von Rezeptor-Deletionsmutanten

Das Schwärmvermögen eines Stammes liefert erste Hinweise auf die Beeinträchtigung von Motilität und Chemotaxis. Eine bessere Beurteilung der zugrunde liegenden Störung ermöglichen Schwimgeschwindigkeits-Analysen mit dem *Hobson-Bactracker*-System (3.18). Da die Rezeptoren sowohl ohne als auch in Anwesenheit von Lockstoffen regulierend auf die Kinaseaktivität von CheA einwirken können (Abb. 5), wurde die Schwimgeschwindigkeit vor und nach Stimulierung mit Prolin gemessen (Tab. 8). Prolin wurde verwendet, weil es ein guter Lockstoff für *S. meliloti* ist (Tab. 7), was auch schon in einer früheren Arbeit festgestellt wurde (Götz *et al.*, 1982). Seit dem wurde bei den Schwimgeschwindigkeits-Analysen Prolin als Lockstoff verwendet, um verschiedene Messreihen besser miteinander vergleichen zu können. Die durchschnittliche Schwimgeschwindigkeit des WT betrug 37,4  $\mu\text{m}/\text{sec}$ , während die Deletion aller neun Rezeptorgene ( $\Delta 9$ , RU13/149) zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit um 10 % führte. Dieser Effekt ist mit dem der Deletion der Histidinkinase *cheA* (RU11/310) vergleichbar (Abb. 21) und auf eine Unterdrückung der Taumelbewegungen durch die fehlende Stimulierung der Kinaseaktivität durch die Rezeptoren erklärbar. Das Ergebnis steht in Einklang mit dem eines *E. coli*-Stammes, dem die beiden *high-abundance* Rezeptoren, Tar und Tsr, fehlen. Diese Zellen schwimmen geradlinig, weil die Flagellenmotoren aufgrund der geringen CheA-Aktivität ausschließlich gegen den Uhrzeigersinn (ccw) rotieren (Borkovich & Simon, 1990; Feng *et al.*, 1999; Krikos *et al.*, 1985). Rezeptor-Einzeldelentionsmutanten von *S. meliloti* sind am besten mit *E. coli*-Stämmen vergleichbar, die entweder Tar oder Tsr als einzigen Rezeptor exprimieren. Diese Mutanten besitzen in *E. coli* ein ausgeglichenes Verhältnis der Rotationsrichtungen der Flagellen (ccw : cw) und somit ein normales Lauf-Taumel-Verhalten (Feng *et al.*, 1999; Krikos *et al.*, 1985). Darum wurde erwartet, dass sich die



Schwimmgeschwindigkeiten der Rezeptor-Deletionsmutanten im Vergleich zum WT nur geringfügig ändern.

**Tab. 8. Schwimmgeschwindigkeit des *S. meliloti*-WT und von 12 Chemotaxismutanten ohne und mit Stimulierung durch Prolin**

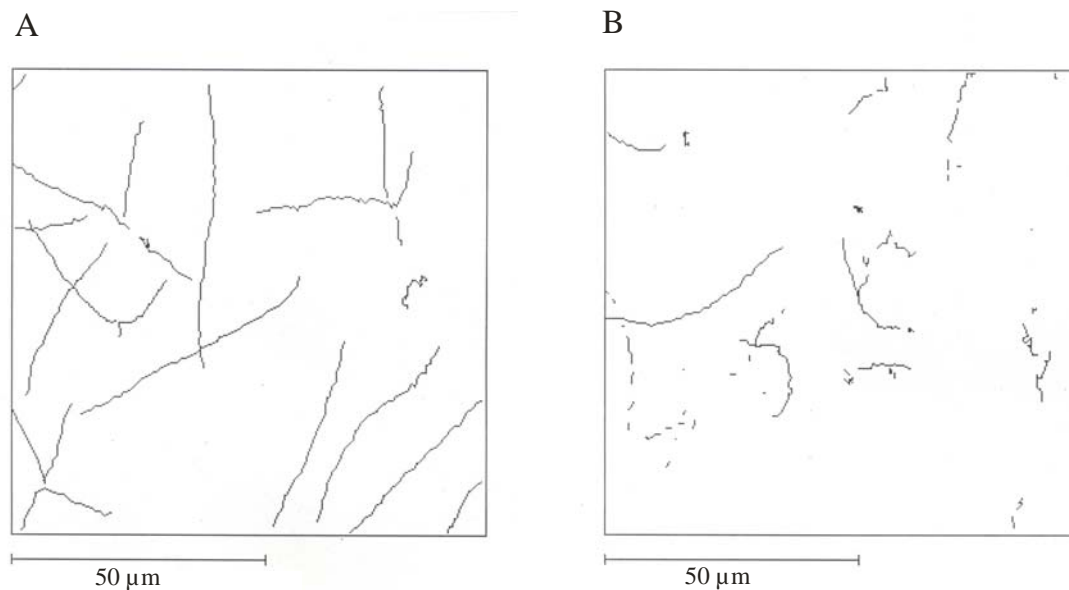
Stamm	Genotyp	Schwimmgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) <sup>1)</sup>		Chemokinese (%) <sup>2)</sup>
			+ 10 mM Prolin	
RU11/001	WT	37,4	40,2	7,5
RU13/148	$\Delta mcpS$	37,5	40,2	7,2
RU11/838	$\Delta mcpT$	40,1	42,7	6,5
RU11/828	$\Delta mcpU$	33,9	36,7	8,3
RU11/830	$\Delta mcpV$	38,2	40,6	6,3
RU11/803	$\Delta mcpW$	37,9	40,1	5,8
RU11/805	$\Delta mcpX$	38,0	41,4	8,9
RU11/804	$\Delta mcpY$	36,5	37,4	2,5
RU11/818	$\Delta mcpZ$	37,1	40,0	7,8
RU11/815	$\Delta icpA$	38,5	39,8	3,4
RU13/107	$\Delta mcpY \Delta icpA$	38,1	38,8	1,8
RU13/149	$\Delta 9$ ( <i>STUVWXYZicpA</i> )	40,6	40,9	0,7
RU11/310	$\Delta cheA$	40,0	40,2	0,5

<sup>1)</sup> Schwimmgeschwindigkeit vor und nach Stimulierung mit 10 mM Prolin. Für jeden Stamm wurden 1000 Einzelspuren aus fünf unabhängigen Experimenten mit dem *Hobson backtracker*-System analysiert.

<sup>2)</sup> Die Chemokinese entspricht dem Anstieg der Schwimmgeschwindigkeit nach Stimulierung mit Prolin in Prozent.

Diese Erwartung bestätigte sich für die Stämme  $\Delta mcpS$ ,  $\Delta mcpV$ ,  $\Delta mcpW$  und  $\Delta mcpX$  (Tab. 8). Die Schwimmgeschwindigkeit dieser Mutanten war leicht erhöht (0,1 – 0,8  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ), was auf den Wegfall der stimulierenden Wirkung auf die Kinaseaktivität durch McpS, McpV, McpW und McpX zurückzuführen ist. Hinsichtlich der Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit zeigte die Deletion von *mcpT* den stärksten Effekt. Die  $\Delta mcpT$ -Mutante schwamm um 7 % schneller als der WT (Tab. 8). Interessanterweise gab es auch Stämme, deren Schwimmgeschwindigkeit im Vergleich zu der des WT reduziert war.  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpY$  und  $\Delta mcpZ$  schwammen um 0,3 bis 3,5  $\mu\text{m}/\text{sec}$  langsamer als der WT (Tab. 8). Am Auffälligsten war der Deletionsstamm  $\Delta mcpU$ , der um 9% langsamer schwamm. Diese Verlangsamung ist auf eine erhöhte Taumelfrequenz der Mutante im Vergleich zum WT zurückzuführen. Wie Abb. 27 zeigt, sind die Läufe beim WT wesentlich länger und geradliniger als bei  $\Delta mcpU$  (RU11/828). Die Mutante zeigt aufgrund der erhöhten Taumelfrequenz mehr Richtungswechsel (Abb. 27B) und schwimmt

langsamer als der WT. Auf molekularer Ebene kann dieses Verhalten durch eine Hemmung der Kinaseaktivität durch McpU erklärt werden.



**Abb. 27. Vergleich der Schwimmpuren des *S. meliloti* WT (RU11/001) (A) und von  $\Delta mcpU$  (RU11/828) (B). Die Aufnahmezeit mit dem *Hobson-bactracker*-System betrug 1 sec.**

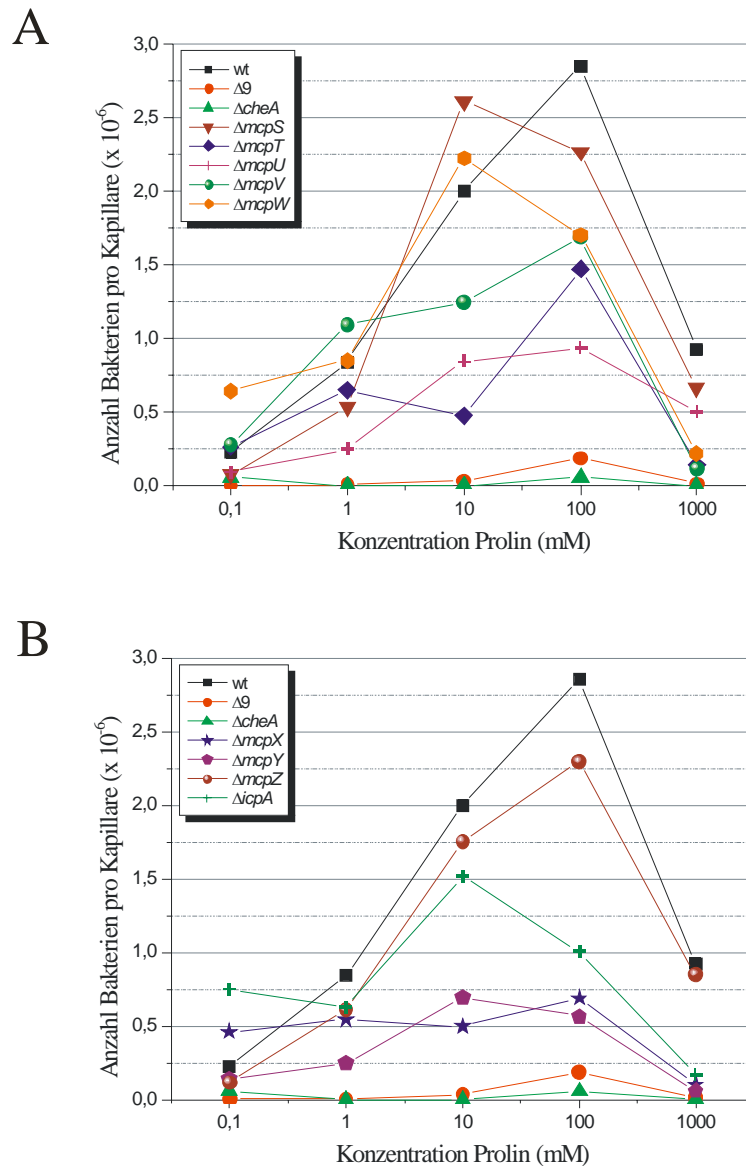
Im Folgenden wird die Chemokinese der Mutanten im Vergleich zum WT untersucht. Durch die Zugabe von Prolin als Lockstoff erhöht sich die Schwimmgeschwindigkeit des WT-Stammes um 7,5 %. Die Deletion aller Rezeptorgene im  $\Delta 9$ -Stamm resultiert, vergleichbar mit einer Deletion von *cheA* (Abb. 21), in einem fast vollständigen Verlust der Chemokinese. Beide Stämme schwammen nur um 0,5 % bzw. 0,7 % schneller als vor der Lockstoffzugabe, was weniger als 10 % der WT-Reaktion entspricht. Für die Rezeptor-Deletionsmutanten ist eine reduzierte Chemokinese zu erwarten, wenn die Rezeptoren Prolin wahrnehmen. Aber für  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpX$  und  $\Delta mcpZ$  war das Gegenteil der Fall (Tab. 8). Ihre Reaktion auf die Lockstoff-Zugabe war um 4 % bis 19 % stärker als beim WT. Die anderen sechs Rezeptor-Mutanten zeigten die erwartete verringerte Antwort auf die Prolin-Zugabe. Der größte Verlust der Chemokinese-Fähigkeit wurde durch die Deletion der internen Rezeptoren *mcpY* und *icpA*, mit einer Reduzierung um 66 % bzw. 55 %, ausgelöst. Zusätzlich wurde in diesem Versuch auch die Doppel-Deletionsmutante  $\Delta mcpY\Delta icpA$  (RU13/107, Abb. 18; 4.2.1) untersucht, der beide cytoplasmatische Rezeptoren fehlen. Ihre Schwimmgeschwindigkeit lag mit 38,1  $\mu\text{m}/\text{sec}$  zwischen denen der Einzelmutanten. Der Verlust beider Gene gleichzeitig erniedrigt die Chemokinese-Reaktion auf Prolin um 74 %.

Wie kann das Verhalten der Rezeptormutanten auf Schwärmplatten mit den Ergebnissen der Schwimmgeschwindigkeits-Analysen verglichen und v. a. interpretiert werden? Ein Vergleich von Schwärmvermögen und absoluter Schwimmgeschwindigkeit der Mutanten (Abb. 25 und Tab. 8) erlaubt die Schlussfolgerung, dass eine geringe Schwimmgeschwindigkeit auch zu einem erniedrigten Schwärmvermögen führt ( $\Delta mcpU$ ), während „schnelle Schwimmer“ auch relativ gut schwärmen können ( $\Delta mcpT$ ). Allerdings ist für ein gutes Schwärmvermögen auch eine ausgeglichene Chemokinese wichtig. Denn Mutanten, wie  $\Delta icpA$  oder  $\Delta mcpX$ , mit einer extrem schwachen oder einer extrem starken Reizantwort, bilden auch geringere Schwärmring-Durchmesser als Stämme mit einer Reizantwort vergleichbar mit dem WT, wie  $\Delta mcpS$  und  $\Delta mcpZ$ .

#### 4.4.4 Reaktion der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Lockstoffe im Kapillartest

Der Kapillartest, die „Goldmethode“ für quantitative Chemotaxis-Untersuchungen (P. Matsumura, pers. Mitteilung), wurde von Adler etabliert (1973). Wie in Abb. 13 dargestellt, wird im Kapillartest die Anzahl der Bakterien bestimmt, die in eine mit Lockstoff gefüllte Kapillare schwimmen (3.19). Als Lockstoff wurde Prolin verwendet, da es sich auch in vorhergehenden Analysen als sehr gute Reizquelle ausgezeichnet hat (Tab. 7; Götz *et al.*, 1982). Untersucht wurde die Reaktion des WT, der  $\Delta 9$ -, der  $\Delta cheA$ -Mutante und der neun Rezeptor-Deletionsmutanten auf unterschiedliche Prolinkonzentrationen in den Kapillaren (von 0,1 mM bis 1 M). Die Reaktionskurven sind in Abb. 28 gezeigt. WT-Bakterien sammelten sich bei einer Konzentration von 0,1 mM in signifikanter Anzahl in der Kapillare (ca. 250000). Die Zahl der Bakterien pro Kapillare stieg bis zu einer Konzentration von 100 mM Prolin auf ein Maximum von über 3,5 Millionen stark an. Befand sich 1 M Prolin in der Kapillare, fiel die Zahl der Bakterien drastisch auf weniger als 30 % des Maximalwerts. Abweichend davon war die maximale Antwort von  $\Delta mcpS$ ,  $\Delta mcpW$  und  $\Delta icpA$  zu einer niedrigeren Konzentration (10 mM) hin verschoben. Zudem war der Rückgang der Bakterienzahl bei der nächsthöheren Prolin-Konzentration nicht so drastisch wie beim WT. Die Kurven der beiden chemotaxisdefizienten Stämme,  $\Delta 9$  und  $\Delta cheA$ , verlaufen im Vergleich zur WT-Kurve nahezu bei Null, was einer fehlenden Reaktion auf Prolin gleichkommt (Abb. 28A und B). Insgesamt war die Reaktion von  $\Delta mcpS$ ,  $\Delta mcpW$  und  $\Delta mcpZ$  etwa um 10 – 20 % schwächer als beim WT. Für Stämme mit Deletionen von  $mcpT$ ,  $mcpV$  und  $icpA$  sammelten sich 40 bis 50 % weniger Bakterien als bei der WT-Kontrolle in den Kapillaren. Während die Kurve von  $\Delta mcpT$  bis zu

10 mM Prolin einen relativ flachen Verlauf zeigt, der dann von einem starken Maximum mit 1,5 Millionen auf weniger als 200000 Bakterien pro Kapillare zurückgeht, steigt die Kurve von  $\Delta mcpV$  schnell auf über 1 Million (1 mM) bis zu einem Maximum von 1,7 Millionen (100 mM) an und fällt dann auch schnell ab.



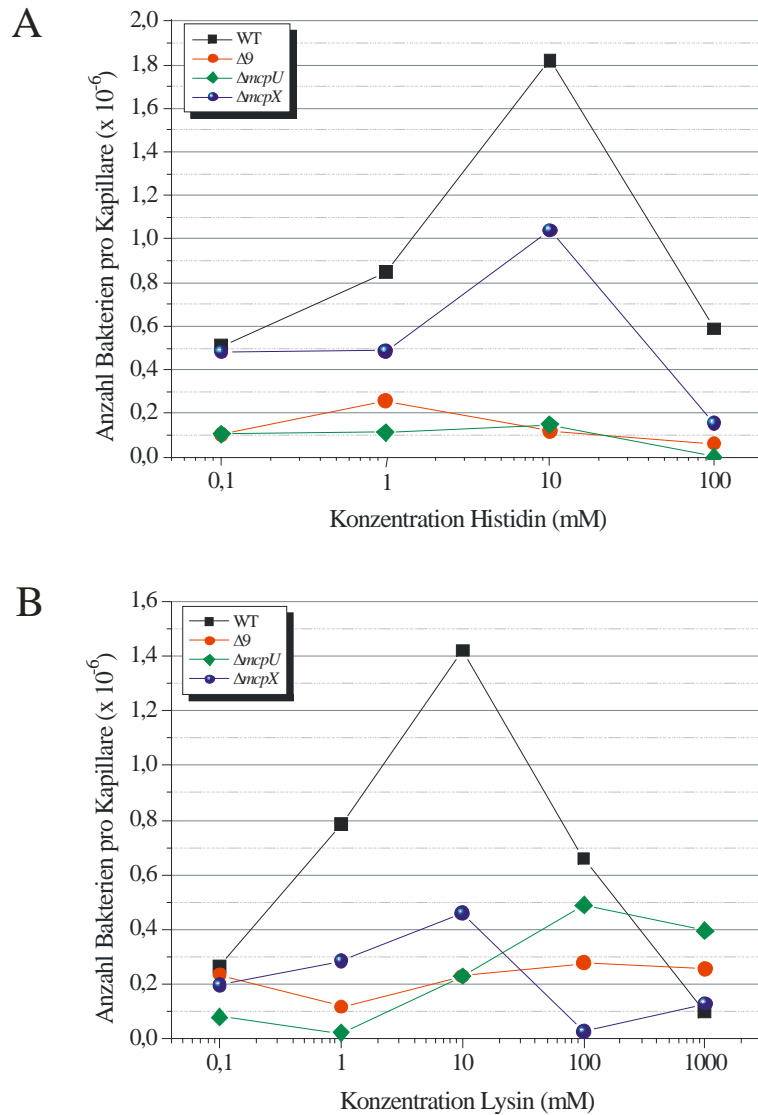
**Abb. 28. Reaktionskurven von WT und 12 Chemotaxismutanten im Kapillartest auf Prolin.** WT (RU11/001),  $\Delta 9$  (RU13/149) und  $\Delta cheA$  (RU11/310) sind in beiden Diagrammen als Referenz gezeigt. **A:** Kurven von  $\Delta mcpS$  (RU13/148),  $\Delta mcpT$  (RU11/838),  $\Delta mcpU$  (RU11/828),  $\Delta mcpV$  (RU11/830) und  $\Delta mcpW$  (RU11/803). **B:** Kurven von  $\Delta mcpX$  (RU11/805),  $\Delta mcpY$  (RU11/804),  $\Delta mcpZ$  (RU11/818) und  $\Delta icpA$  (RU11/815). Jede Kurve stellt den Mittelwert aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Kapillaren, nach Abzug des Hintergrunds ( $0,4 - 2,3 \times 10^5$  Bakterien in Puffer-gefüllten Kapillaren), dar.

Die schwächste Reaktion auf Prolin zeigten die Stämme  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpX$  und  $\Delta mcpY$ . Ihre Antwort war um 65 – 75 % reduziert. Auffällig war die Kurve des  $mcpX$ -Deletionsstammes, denn sie schwankte zwischen 0,1 mM und 100 mM Prolin immer um etwa 500000 Bakterien pro Kapillare ohne ein richtiges Maximum zu erreichen und fiel dann stark ab. Dagegen war der Verlauf der Reaktionskurven von  $\Delta mcpU$  und  $\Delta mcpY$  mit dem des WT vergleichbar, wenn auch viel flacher und mit einem sehr schwachen Maximum.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass auch der Kapillartest die entscheidende Rolle von McpU als Prolin-Sensor bestätigt (Meier *et al.*, 2007). Zusätzlich hebt er auch die Bedeutung von McpY und McpX als wichtige Rezeptoren für die Prolin-Chemotaxis hervor (Abb. 28B). Die Bedeutung von McpY für die Wahrnehmung von Prolin hat sich bereits bei der schwachen Chemokinese-Reaktion des  $\Delta mcpY$ -Stammes gezeigt (Tab. 8). Für  $\Delta mcpX$  war die schwache Reaktion auf Prolin im Kapillartest eher unerwartet, da dieser Stamm chemokinetisch auf Prolin reagiert (Tab. 8).

Da der Kapillartest die Bedeutung einzelner Rezeptoren für die Prolin-Chemotaxis quantitativ bestätigt hat, sollte auch die Rolle von McpU und McpX bei der Wahrnehmung von Histidin und Lysin genauer untersucht werden. Während die Schwärmplatten-Analyse McpU als wichtigen Sensor für Prolin, Histidin und Lysin auswies, war das Schwärmvermögen der  $\Delta mcpX$ -Mutante im Vergleich zum WT nur um 20 % vermindert (Abb. 26). Allerdings stellte sich McpX im Kapillartest als wichtiger Rezeptor für die Prolin-Taxis heraus (Abb. 28B), so dass nun auch die Reaktion der  $\Delta mcpX$ -Mutante auf Histidin und Lysin im Kapillartest untersucht werden sollte. Somit wurde die Reaktion des WT, der  $\Delta 9$ -, der  $\Delta mcpU$ - und der  $\Delta mcpX$ -Mutante auf unterschiedliche Konzentrationen von Histidin (von 0,1 mM bis 100 mM) und Lysin (von 0,1 mM bis 1 M) in den Kapillaren analysiert. Die Reaktionskurven dieser vier Stämme auf Histidin und Lysin sind in Abb. 29 dargestellt. Bei einer Konzentration von 0,1 mM Histidin befanden sich ca. 500000 WT-Bakterien in der Kapillare. Die Zahl der Bakterien pro Kapillare stieg bis zu einer Konzentration von 10 mM Histidin auf ein Maximum von knapp zwei Millionen stark an. Befanden sich 100 mM Histidin in der Kapillare, fiel die Zahl der Bakterien drastisch auf weniger als 30 % des Maximalwertes ab (Abb. 29A). Die Reaktionskurve des  $\Delta 9$ -Stammes verlief im Vergleich zur WT-Kurve nahezu bei Null. Es sammelten sich maximal 200000 Bakterien in den Kapillaren (1 mM Histidin). Somit reagiert der  $\Delta 9$ -Stamm nicht mehr auf Histidin (Abb. 29A). Die  $\Delta mcpX$ -Mutante zeigte ein ähnliches Kurvenprofil wie der WT, aber die maximale Antwort auf Histidin war, mit einer Million

Bakterien pro Kapillare, um 45 % niedriger als beim Wildtyp. Die Reaktionskurve der  $\Delta mcpU$ -Mutante verlief fast identisch mit der des  $\Delta 9$ -Stammes, was einer fehlenden Reaktion dieser Mutante auf Histidin gleichkommt (Abb. 29A).



**Abb. 29. Reaktionskurven von WT (RU11/001),  $\Delta 9$  (RU13/149),  $\Delta mcpU$  (RU11/828) und  $\Delta mcpX$  (RU11/805) im Kapillartest auf Histidin (A) und Lysin (B). Jede Kurve stellt den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Kapillaren, nach Abzug des Hintergrunds ( $1,4 - 2,7 \times 10^5$  Bakterien in Puffer-gefüllten Kapillaren), dar.**

Bei der Reaktion auf Lysin zeigte der WT ein sehr spitzes Kurvenprofil (Abb. 29B). Ab einer Konzentration von 0,1 mM Lysin sammelten sich WT-Bakterien in signifikanter Anzahl in den Kapillaren (ca. 250000). Die Zahl der Bakterien pro Kapillare stieg bis zu einer Konzentration von 10 mM auf ein Maximum von 1,4 Millionen stark an und fiel bei höheren Lysin-Konzentrationen genauso schnell wieder ab (Abb. 29B). Die Reaktionskurve der  $\Delta 9$ -Mutante

verlief sehr flach (Abb. 29B). Die Reizantwort betrug maximal 20 % der WT-Reaktion. Somit zeigt der  $\Delta 9$ -Stamm auch keine Reaktion auf Lysin. Die Reaktionskurven der *mcpU*- und der *mcpX*-Deletionsmutanten schwankten um die Kurve der  $\Delta 9$ -Mutante. Die maximale Antwort der  $\Delta mcpU$ -Mutante war im Vergleich zum WT zu einer höheren Lysinkonzentration (100 mM) hin verschoben und betrug nur 36 % der WT-Antwort (Abb. 29B). Auch die maximale Antwort der  $\Delta mcpX$ -Mutante erreichte nur 35 % der WT-Antwort, aber sie lag wie beim WT bei 10 mM Lysin.

Die durchgeführten Kapillartests mit Histidin, Lysin und Prolin heben die entscheidende Bedeutung von McpU als Sensor für diese Aminosäuren hervor (Abb. 28 und Abb. 29). Ob McpU generell ein Sensor für Aminosäuren ist, muss in weiteren Kapillartest überprüft werden. Zusätzlich unterstreichen diese Kapillartests die wichtige Rolle von McpX als Sensor für Prolin und Lysin, nicht aber für Histidin.

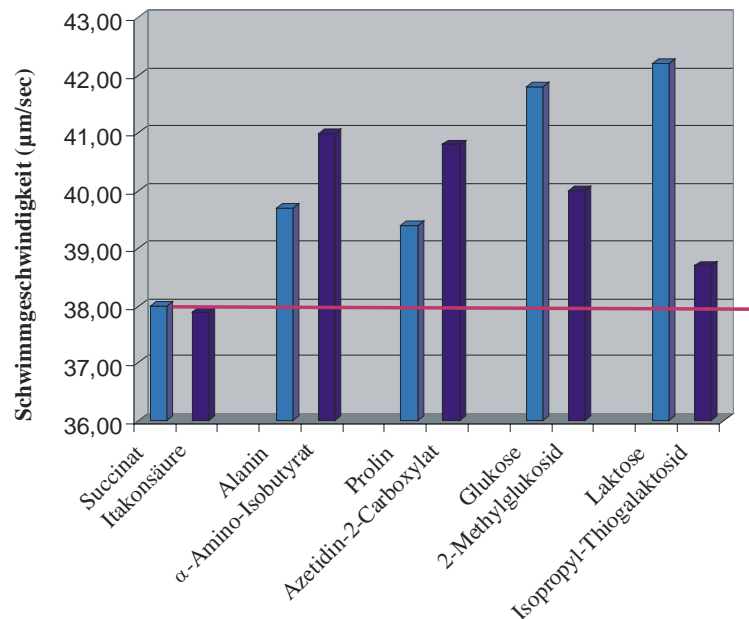
Sicherlich kann man jetzt anmerken, dass der Kapillartest definitiv die bessere Methode für die Charakterisierung der Rezeptoren ist als die Schwärmplatten-Analyse (4.4.2.3). Aber der Kapillartest ist sehr aufwändig, wodurch die Untersuchung aller Rezeptor-Deletionsmutanten auf alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit unmöglich war. Für die Analyse einer einzigen Substanz im Kapillartest mit allen neun Rezeptor-Deletionsmutanten und den drei Kontrollstämmen werden etwa 1000 TYC<sub>sm</sub>-Platten und etwa vier Wochen Vorbereitungs- und Auswertungszeit benötigt. Im gleichen Zeitraum und mit einer vergleichbaren Anzahl an RB-Schwärmplatten konnte die Schwärmplatten-Analyse für alle 14 untersuchten Substanzen mit allen Rezeptormutanten-Stämmen durchgeführt werden. Die Schwärmplatten-Analyse ermöglicht eine erste Auswahl geeigneter Substanzen. Ebenso können Rezeptor-Deletionsmutanten anhand der Schwärmplatten-Analyse beurteilt und für quantitative Analysen ausgewählt werden.

#### **4.4.5 Wahrnehmung von Energie, Sauerstoff und Licht – Energietaxis**

##### **4.4.5.1 Untersuchungen zur Energietaxis von *S. meliloti***

Die Antwort auf einen Chemoeffektor ist bei der Energietaxis von dessen Verstoffwechslung abhängig. Die Reaktion auf einen Lockstoff wird dabei durch eine Veränderung des Elektronenniveaus im Elektronentransportsystem verursacht und nicht durch den Lockstoff

selbst. Bei *Azospirillum brasilense*, einem nah verwandtem  $\alpha$ -Proteobakterium, ist die Energietaxis für nahezu alle chemischen Substanzen der entscheidende Faktor bei der Reizantwort (Alexandre *et al.*, 2000). Eine Möglichkeit, den Einfluss der Energietaxis auf die Chemotaxis generell zu untersuchen, ist der Vergleich der Chemokinese verschiedener Substanzen mit der ihrer nicht-verstoffwechselbaren Analoga (Abb. 30).



**Abb. 30. Einfluss von Substanzen und ihrer nichtverstoffwechselbaren Analoga auf die Schwimmgeschwindigkeit des *S. meliloti*-WT. Die Substanzen wurden mit RB-Medium auf eine Konzentration von  $10^{-4}$  M verdünnt und mit 10 mM Phosphat pH 7,0 gepuffert. Die horizontale Linie markiert die Schwimmgeschwindigkeit des WT-Stammes nach Zugabe von RB-Medium. Für jede Substanz wurden 1000 Einzelspuren in fünf unabhängigen Messungen mit dem *Hobson backtracker*-System analysiert.**

Energietaxis liegt dann vor, wenn die Reaktion auf das nicht-verstoffwechselbare Analoge deutlich schlechter ausfällt als auf das eigentliche Substrat. Auch in diesem Experiment wurde die Reaktion des *S. meliloti*-WT auf eine organische Säure, zwei Aminosäuren und zwei Zucker und deren Analoge getestet. Die Reaktion der Zellen auf Succinat und Itakonsäure, dem nicht-verstoffwechselbaren Analogen, war sehr schwach und nahezu identisch. Die beiden Aminosäuren, Alanin und Prolin, erzeugten sogar etwas schwächere Chemokinese-Effekte als ihre Analoga  $\alpha$ -Amino-Isobutyrat und Azetidin-2-Carboxylat. Beide Analoga riefen einen Anstieg der Schwimmgeschwindigkeit von mehr als 8 % hervor und stellten somit sehr gute Lockstoffe für *S. meliloti* dar. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Arbeiten überein, die Itakonsäure als Lockstoff im Kapillartest einsetzten (Robinson & Bauer, 1993). Die beiden



getesteten Zucker, Glukose und Laktose, riefen mit einer Erhöhung der Schwimgeschwindigkeit über 11 % eine sehr starke Reizantwort hervor. Die Chemokinese-Reaktion auf die beiden Zuckeranaloga, 2-Methylglukosid (6,5 %) und Isopropylthiogalaktosid (3 %), war deutlich schwächer, aber dennoch vorhanden. Diese Untersuchungen sprechen eindeutig gegen einen Beitrag von Aminosäuren und organischen Säuren zur Energietaxis von *S. meliloti*. Eine Beteiligung von Zuckern kann nicht komplett ausgeschlossen werden. Messungen des Membranpotentials oder der Atmungsrate nach der Zugabe von Zuckern könnten Aufschluss über die Verstoffwechslung des Lockstoffs bringen und so eine Beteiligung der Energietaxis bei der Reizantwort auf Zucker klären (Alexandre *et al.*, 2000).

#### 4.4.5.2 McpY – eine Sensor für Energie, Sauerstoff oder Licht?

Die durch computergestützte Sekundärstrukturanalysen identifizierten PAS-Domänen in McpY (Abb. 22; Taylor & Zhulin, 1999), warfen die Frage auf, ob McpY bei der Wahrnehmung des metabolischen Zustands der Zelle eine Rolle spielt. Ein erster Einblick in die Bedeutung der PAS-Domänen für die Funktion von McpY sollte durch die Deletion beider Bereiche gewonnen werden. Während eine Deletion der ersten PAS-Domäne bereits in einer vorangehenden Arbeit analysiert wurde (Meier, 2003), wurde eine Deletion der zweiten PAS-Domäne wie vorher beschrieben erzeugt (4.2.1). Die *mcpY*-Mutanten, *mcpY*- $\Delta$ PAS1 (RU13/049; Meier, 2003) und *mcpY*- $\Delta$ PAS2 (RU13/106), wurden im Vergleich zu WT und  $\Delta$ *mcpY* (RU11/804) auf Defizite im Schwärmvermögen und der Schwimgeschwindigkeit untersucht.

**Tab. 9. Schwärmplatten-Analyse von *mcpY*-Mutantenstämmen**

Stamm	Genotyp	Schwärmvermögen <sup>1)</sup> (%)
RU11/001	WT	100
RU11/804	$\Delta$ <i>mcpY</i>	61
RU13/049	<i>mcpY</i> - $\Delta$ PAS1	94 <sup>2)</sup>
RU13/106	<i>mcpY</i> - $\Delta$ PAS2	99

<sup>1)</sup> Das Schwärmvermögen entspricht dem Mittelwert in Prozent des WT-Schwärmring-Durchmessers von 15 Platten (3.17). Die Standardabweichungen der einzelnen Werte lagen zwischen 2 – 5 %.

<sup>2)</sup> Wert aus Meier (2003).

Tab. 9 zeigt, dass die Deletion keiner der beiden PAS-Domänen einen Einfluss auf das Schwärmvermögen der Stämme hat, obwohl jeweils große Bereiche von McpY ( $\Delta$ PAS1 bzw.  $\Delta$ PAS2: jeweils  $\Delta$ 100 AS) entfernt wurden.

Obwohl für *S. meliloti*-Wildtypzellen eine positive Aerotaxis nachgewiesen wurde und eine Beteiligung von McpY aufgrund der vorhandenen PAS-Domänen nahe liegend gewesen wäre, ist McpY nicht der Aerotaxis-Sensor (G. Alexandre, pers. Mitteilung). Allerdings ist das Vorkommen von PAS-Domänen, die keine Liganden zur sensorischen Wahrnehmung binden, bekannt (I. Zhulin, pers. Mitteilung). McpY könnte dennoch als ein Sensor für Redoxpotential oder für den allgemeinen metabolischen Zustand der Zellen dienen. Die mögliche Beteiligung von McpY bei der Wahrnehmung des internen Energiestatus der Zelle wird zur Zeit in Zusammenarbeit mit G. Alexandre (University of Knoxville, TN, USA) untersucht.

## 4.5 Komplementationsanalysen

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Funktion der Chemorezeptoren von *S. meliloti* zu charakterisieren und gegebenenfalls spezifische Substrate einzelner Rezeptoren zu identifizieren. Neben der Charakterisierung von Rezeptor-Deletionsmutanten, wie sie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, sollte die Funktion eines einzelnen Rezeptors in einem *S. meliloti*-Stamm untersucht werden. Aus diesem Grund wurde durch die sukzessive Deletion aller Rezeptorgene ein  $\Delta$ 9-Stamm (RU13/149) erstellt (4.2.1). Einzelne Rezeptorgene wurden zum einen plasmid-kodiert wieder in den  $\Delta$ 9-Stamm eingebracht, zum anderen wurde das Wildtyp-Allel durch homologe Rekombination im  $\Delta$ 9-Stamm wieder hergestellt. Zunächst sollte die Komplementationsfähigkeit der plasmid-kodierten Rezeptoren in Einzeldelentionsstämmen untersucht werden. Es wurde das *broad-host-range*-Plasmid pBBR1MCS2 (Tab. 2) für die Komplementationsanalysen verwendet, bei dem die Gene unter Kontrolle des *lac*-Promotors von *E. coli* stehen. Dabei wird eine Überexpression der entsprechenden Gene erreicht, wie *Western blot*-Analysen bestätigten. Die ersten Komplementationsanalysen wurden überwiegend mit dem cytoplasmatischen McpY durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pBBR1MCS2-*mcpY* (pRU2731; Tab. 2) in verschiedene Rezeptor-Deletionsstämmen eingeführt (3.7) und das Schwärmvermögen (3.17) der resultierenden Stämme untersucht (Tab. 10).

**Tab. 10. Schwärmvermögen von McpY-Komplementationsstämmen.**

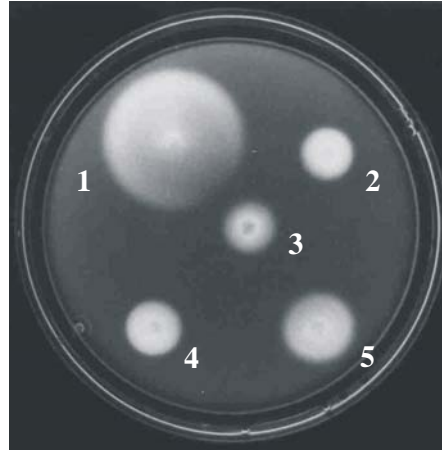
Stamm	Merkmale	Schwärmvermögen (%) <sup>1)</sup>
RU11/001(pBBR1MCS2)	WT	100
RU11/804	$\Delta mcpY$	61 <sup>2)</sup>
RU11/804(pRU2731)	$\Delta mcpY$ (pBBR1MCS2- <i>mcpY</i> )	51 <sup>2)</sup>
RU13/149	$\Delta 9$	29
RU13/149(pRU2731)	$\Delta 9$ (pBBR1MCS2- <i>mcpY</i> )	20
RU13/107	$\Delta mcpY\Delta icpA$	48
RU13/107(pRU2731)	$\Delta mcpY\Delta icpA$ (pBBR1MCS2- <i>mcpY</i> )	34

<sup>1)</sup> Das Schwärmvermögen entspricht dem Mittelwert in Prozent des WT-Schwärmring-Durchmessers von 15 Platten (3.17). Die Standardabweichungen der einzelnen Werte lagen zwischen 2 – 5 %.

<sup>2)</sup> Wert aus Meier (2003).

Wie Tab. 10 zeigt, konnte das plasmid-kodierte *mcpY*-Gen die Deletion von *mcpY* auf Bromfield-Schwärmplatten nicht komplementieren (Meier, 2003). Es wurde ein Schwärmringdurchmesser von nur 51 % des WT-Wertes erreicht. Dieses Verhalten wird vermutlich durch die Expression von McpY weit über Wildtypniveau verursacht, die das ausgewogene Verhältnis der Rezeptoren negativ beeinträchtigt. Dieses Ergebnis korreliert mit Studien an *E. coli*, nach denen die Überexpression von MCPs aufgrund eines gestörten Gleichgewichts der interagierenden Proteine einen negativen Einfluss auf die Chemotaxis von *E. coli* hat (Liu & Parkinson, 1989; Sanders *et al.*, 1989). Ausgewogene Stöchiometrien von CheA, CheW und den Rezeptoren sind wichtig für die Bildung funktioneller Chemorezeptorkomplexe (Li & Hazelbauer, 2004). Wäre nur die Gesamtmenge an Rezeptor-Molekülen in der Zelle wichtig für deren Funktion, könnte pBBR1MCS2-*mcpY* möglicherweise Rezeptor-Mehrfachdeletionsmutanten komplementieren, indem es die Gesamtmenge wieder auf WT-Niveau anhebt. Doch auch in verschiedenen Rezeptor-Doppel- und einer -Dreifach-Deletionsmutante war keine Komplementation des Schwärmvermögens feststellbar. Im Gegenteil, das Schwärmvermögen wurde durch die erhöhte McpY-Menge in der Zelle verringert (Tab. 10; Daten nicht gezeigt).

Für *S. meliloti* gibt es keine etablierten Vektor-Systeme mit regulierbaren Promotoren. Zur Vermeidung einer störenden Überexpression wurden zur Charakterisierung einzelner Rezeptoren solche Stämme verwendet, die nur ein Rezeptorgen im Genom enthielten. Bisher wurden drei Stämme erzeugt, denen acht Rezeptorgene fehlen und die entweder *mcpU*, *mcpY* oder *icpA* exprimieren.



**Abb. 31. Schwärmvermögen von Stämmen mit jeweils nur einem Rezeptorgen. Die Bromfield-Schwärmplatten wurden mit je 3  $\mu$ l einer stationären *S. meliloti*-Kultur beimpft und zwei Tage bei 30 °C inkubiert. 1: WT (RU11/001); 2:  $\Delta 9$  (RU13/149); 3:  $\Delta 8/mcpU$  (RU13/285); 4:  $\Delta 8/mcpY$  (RU13/286) und 5:  $\Delta 8/icpA$  (RU13/284).**

In Abb. 31 ist das Schwärmvermögen dieser drei Stämme im Vergleich zum WT gezeigt. Weder McpU noch McpY sind in der Lage das Schwärmvermögen im Vergleich zum  $\Delta 9$ -Stamm zu verbessern. Einzig die alleinige Expression von IcpA führte zu einer Zunahme des Schwärmvermögens um knapp 20 % auf etwa 40 % des WT-Schwärmvermögens. Wie auch bei den Komplementationsanalysen ist ein ausgewogenes Verhältnis der Rezeptoren für eine optimale Chemotaxis nötig. Somit stellt es sich als schwierig dar die Funktion einzelner Rezeptoren von *S. meliloti* zu charakterisieren. Dennoch wäre eine Untersuchung dieser Mutanten im Kapillartest interessant.

#### **4.6 Untersuchungen zur Symbiosefähigkeit von Rezeptor-Deletionsmutanten mit der Wirtspflanze *Medicago sativa***

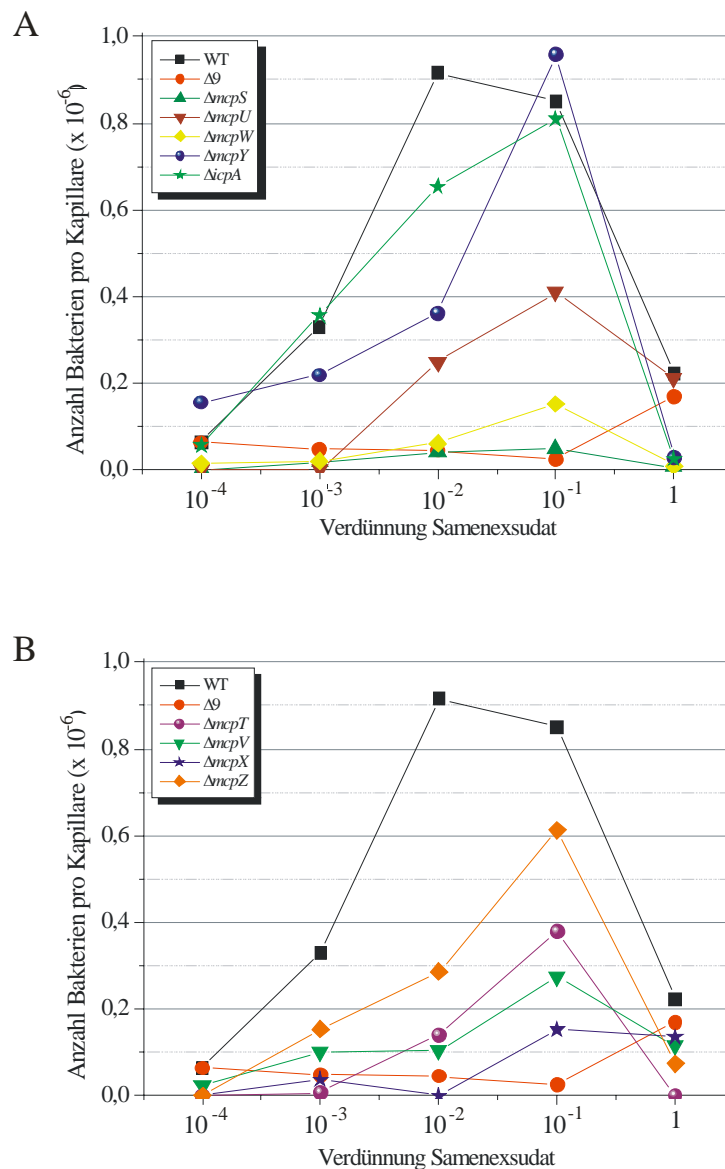
*S. meliloti* kann in Symbiose mit Steinklee (*Melilotus*), Bockshornklee (*Trigonella sp.*) und Luzerne (*Medicago sativa*) leben und induziert in den Wurzeln dieser Pflanzen die Bildung von Wurzelknöllchen (*nodules*). Die Symbiose zwischen verschiedenen Rhizobien-Arten und den unterschiedlichen Leguminosen-Arten ist extrem spezifisch (Oke & Long, 1999). Somit ist das Vorhandensein spezifischer Mechanismen zum gezielten Auffinden der Wirtspflanzenwurzeln zu vermuten und eine Beteiligung des Chemotaxissystems ist wahrscheinlich. Insbesondere sollten die Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung von spezifischen, pflanzlichen Lockstoffen spielen.

Wie kann die Bedeutung einzelner Rezeptoren bei der Symbiose analysiert werden? Dazu wurden zwei Methoden eingesetzt, nämlich der Infektivitäts- und der Kompetitivitäts-Test. Die Durchführung dieser Analysen habe ich im Labor von María José Soto Misffut am Dpt. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC in Granada (Spanien) erlernt und anschließend in Regensburg etabliert. Auf beide Analysemethoden wird im Folgenden genauer eingegangen. Zusätzlich wurde die Reaktion einzelner Rezeptor-Mutanten auf Samenexsudat (SE) im Kapillartest untersucht (3.19).

#### **4.6.1 Reaktion der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Samenexsudat im Kapillartest**

Sowohl von den Wurzeln als auch von den Samen von Leguminosen werden zahlreiche Substanzen in den Boden abgesondert, die von Bodenbakterien als Kohlenstoffquelle verwendet werden können (Uren, 2000). Literaturangaben über die Zusammensetzung der Exsudate variieren sehr stark (Dakora *et al.*, 1993; Hartwig *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1989; Uren, 2001), aber sie bestehen zu großen Teilen aus phenolischen Verbindungen, sowie aus Aminosäuren und Zuckern. Wichtige Verbindungen sind außerdem Flavone, Flavonoide und verwandte Verbindungen. Sie stellen sehr gute Lockstoffe für *S. meliloti* dar und so wurde die Reaktion der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Samenexsudat im Kapillartest untersucht (Barbour *et al.*, 1991).

Zunächst wurde die Reaktion des WT (RU11/001) auf Samenexsudat in Verdünnungsstufen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  getestet, um die optimalen Konzentrationen zu bestimmen. Bei Verdünnungen von  $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  betrug die Bakterienzahl in den Kapillaren zwischen 50000 und 100000, erst bei der  $10^{-4}$ -Verdünnung nahm die Zahl an Bakterien pro Kapillare signifikant zu (Daten nicht gezeigt). Für die Charakterisierung der Rezeptor-Mutanten wurden daher die  $10^{-4}$  bis  $10^{-1}$ -Verdünnungen, sowie das unverdünnte Samenexsudat verwendet. Ein Einfluss des Verdünnungsmittels auf die Reizantwort wurde ausgeschlossen, indem mit 50 % Ethanol gefüllte Kapillaren im Test eingesetzt wurden. Dieser stellte aber keine Reizquelle für die Rhizobien dar (Daten nicht gezeigt). In Abb. 32 sind die Reaktionskurven des WT, der  $\Delta 9$ -Mutante und der Rezeptor-Deletionsmutanten auf Samenexsudat dargestellt.



**Abb. 32. Reaktionskurven von WT und 10 Rezeptor-Deletionsmutanten im Kapillartest auf Samenexsudat. WT und  $\Delta 9$  sind in beiden Diagrammen als Referenz gezeigt. A: Kurven von  $\Delta mcpS$ ,  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpW$ ,  $\Delta mcpY$  und  $\Delta icpA$ . B: Kurven von  $\Delta mcpT$ ,  $\Delta mcpV$ ,  $\Delta mcpX$  und  $\Delta mcpZ$ . Jede Kurve stellt den Mittelwert aus mind. zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Kapillaren, nach Abzug des Hintergrunds ( $1,4 - 2,5 \times 10^5$  Bakterien in mit RB-Medium gefüllten Kapillaren), dar.**

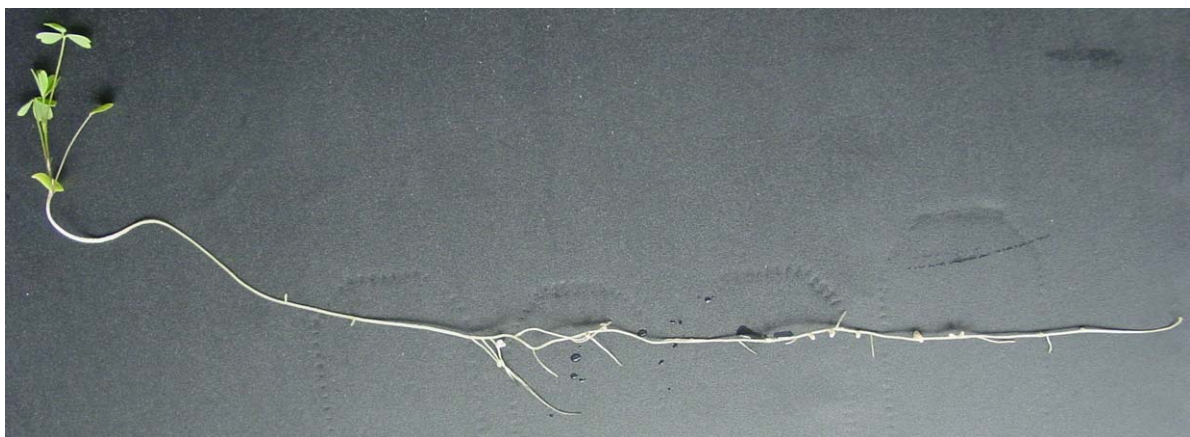
Die meisten WT-Bakterien (ca. 900000 Bakterien pro Kapillare) schwammen bei den  $10^{-2}$ - und  $10^{-1}$ -Verdünnungen des Samenexsudats in die Kapillaren. Befand sich unverdünntes oder noch stärker verdünntes Samenexsudat in den Kapillaren, sank die Anzahl an Bakterien pro Kapillare auf weniger als 40 % des Maximalwertes. Die Kurve des chemotaxisdefizienten  $\Delta 9$ -Stammes verlief im Vergleich zur WT-Kurve nahezu bei Null, was einer fehlenden Reaktion auf Samenexsudat gleichkommt (Abb. 32A und B). Die maximale Antwort aller Mutantenstämme wurde bei der  $10^{-1}$ -Verdünnung des Samenexsudats erreicht. Die

Reaktionsprofile von  $\Delta mcpT$ ,  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpV$ ,  $\Delta mcpW$ ,  $\Delta mcpZ$  und  $\Delta icpA$  verliefen relativ ähnlich: Die Anzahl der Bakterien in einer Kapillare nahm bei niedrigen Lockstoffkonzentrationen langsam zu, erreichte dann ein starkes Maximum und nahm bei unverdünntem Samenexsudat als Lockstoff sehr stark ab (Abb. 32). Die Reaktion von  $\Delta mcpS$ ,  $\Delta mcpW$  und  $\Delta mcpX$  war sehr schwach und lag unter 20 % der WT-Antwort. Besonders die Deletion von  $mcpS$  führte zu einem vollständigen Verlust der Reaktion auf Samenexsudat (Abb. 32A). Interessanterweise hatte die Deletion der beiden löslichen Rezeptoren,  $mcpY$  und  $icpA$ , keinen Einfluss auf die Wahrnehmung des Samenexsudats (Abb. 32A). Die Reaktionskurven waren fast wie die Kurve des WT. Anhand dieser Ergebnisse kann man folgern, dass besonders McpS, McpW und McpX für die Wahrnehmung von Samenexsudat wichtig sind, während die cytoplasmatischen Rezeptoren, McpY und IcpA, kaum beteiligt sind.

## 4.6.2 Symbiosefähigkeit der Rezeptor-Deletionsmutanten

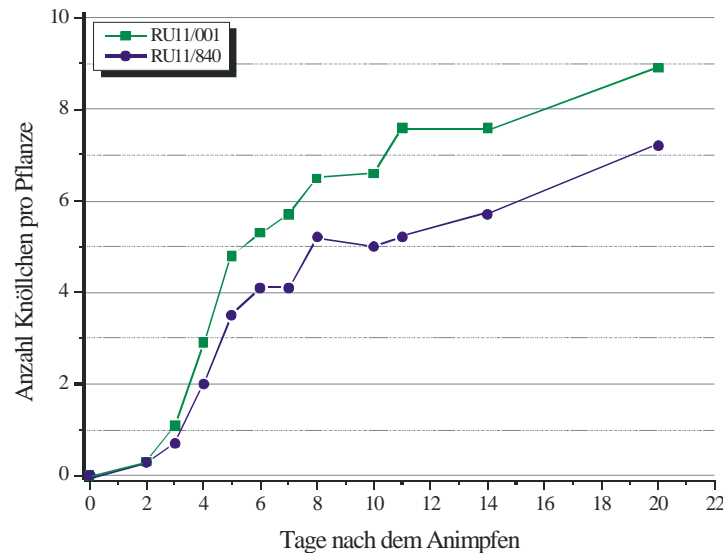
### 4.6.2.1 Infektivitäts-Test

Beim Infektivitäts-Test wurde die Effizienz eines Stammes ermittelt, die Ausbildung von Wurzelknöllchen (Nodulation) zu induzieren. Dazu wurden die gebildeten Knöllchen pro Tag und Pflanze ausgezählt. Abb. 33 zeigt ein drei Wochen altes Pflänzchen der Art *Medicago sativa* Beda ZS mit Wurzelknöllchen, zwei Wochen nach der Beimpfung mit Rhizobien (3.20.2).



**Abb. 33. *Medicago sativa*-Pflänzchen mit Wurzelknöllchen 14 Tage nach dem Beimpfen mit einer *S. meliloti*-Kultur. Die Pflanze wurde im hydroponischen Pflanzenmedium in der Klimakammer unter konstanten Bedingungen kultiviert.**

Für eine quantitative Analyse wurde die Kinetik der Knöllchenbildung, induziert durch WT-Bakterien (RU11/001) und durch Bakterien eines  $\Delta 8$ -Stammes (RU11/840,  $\Delta mcpTUVWXYZicpA$ ), verglichen. Abb. 34 zeigt die Kinetik der durch die zwei Bakterienstämme induzierten Knöllchenbildung pro Tag und Pflanze.



**Abb. 34. Infektivitäts-Test von WT (RU11/001) und eines  $\Delta 8$ -Stammes (RU11/840,  $\Delta mcpTUVWXYZicpA$ ) im Flüssigmedium. Nach 7 Tagen Wachstum wurden pro Stamm 24 Pflanzen mit 1 ml Bakterien-Kultur einer  $OD_{600} = 0,8$  beimpft. Ab dem dritten Tag nach der Beimpfung konnten gebildete Wurzelknöllchen gezählt werden. Die dargestellten Kurven stellen die Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten dar. (Die Abweichungen zwischen den verschiedenen Experimenten betrug teilweise bis zu zwei Knöllchen pro Tag und Pflanze).**

Ab dem dritten Tag konnten die ersten Knöllchen identifiziert werden. Durch den WT wurde in den ersten fünf Tagen schnell die Bildung von bis zu fünf Knöllchen pro Pflanze induziert. Ab dem fünften Tag verlief die Induktion neuer Knöllchen deutlich langsamer, so dass bis zum 20. Tag nach der Infektion neun Knöllchen pro Pflanze gezählt werden konnten. Durch die  $\Delta 8$ -Mutante wurde von Beginn an eine geringere Knöllchenbildung induziert. Nach fünf Tagen wurden durchschnittlich 3 Knöllchen pro Pflanze gezählt. 20 Tage nach der Infektion betrug die Knöllchenzahl, die durch die  $\Delta 8$ -Mutante induziert wurde, mit sieben Knöllchen pro Pflanze, 75 % des Wildtyp-Wertes.

Somit lieferte der Infektivitäts-Test einen ersten Hinweis auf die Relevanz der Chemorezeptoren von *S. meliloti* für die Symbiose mit *M. sativa* Beda ZS.



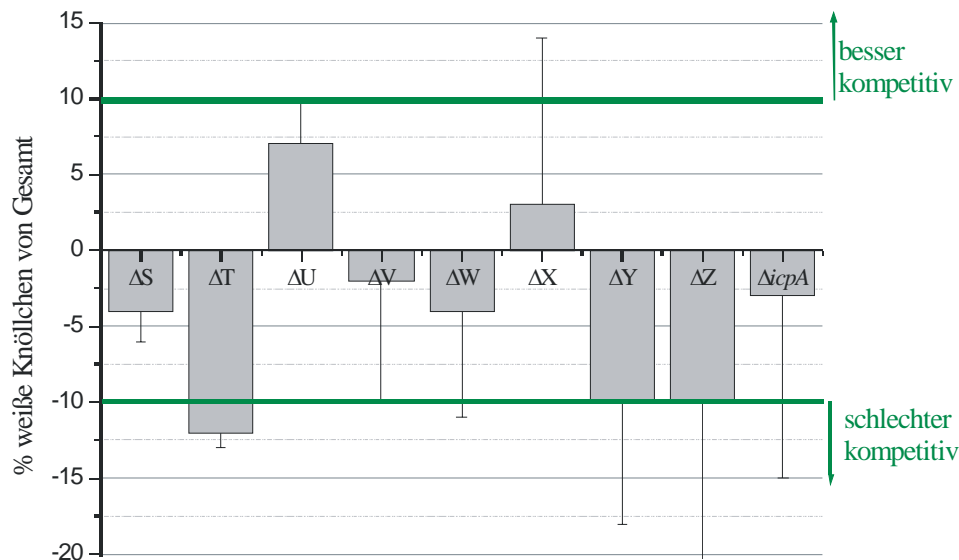
#### 4.6.2.2 Kompetitivitäts-Test

Im Kompetitivitäts-Test wurde die Knöllchenbildung des WT mit der einer Mutante an einer Pflanze verglichen, d. h. die Bakterien konkurrieren direkt miteinander (Soto *et al.*, 2002). Zur Unterscheidung zwischen von WT und von Mutanten okkupierten Knöllchen, wurde das  $\beta$ -Glucuronidase-exprimierende Plasmid, pGUS3 (Tab. 2), in den WT eingeführt (3.7). Nach Färbung der Knöllchen mit X-Gluc-Lösung (3.20.4) färbten sich durch die Enzymaktivität der  $\beta$ -Glucuronidase von WT-Bakterien besetzte Knöllchen blau, während die mit Mutanten infizierten Knöllchen weiß blieben (Abb. 35). Der Kompetitivitäts-Test lieferte einen besseren Vergleich der symbiontischen Fähigkeiten von WT und Mutanten, da die Knöllchenbildung direkt an einer Pflanze verglichen wird und die Bakterien so eine identische Ausgangssituation haben.



**Abb. 35. Wurzel von *M. sativa Beda ZS* mit Wurzelknöllchen nach der Färbung mit X-Gluc-Lösung (pH 7,0; 1 % SDS). Blaue Knöllchen wurden durch WT-Bakterien, weiße durch einen Mutantenstamm induziert. Die Pflanze wurde nach dem Beimpfen mit den Bakterien 14 Tage im hydroponischen Pflanzenmedium in der Klimakammer unter konstanten Bedingungen kultiviert.**

In diesem Test wurden die symbiontischen Fähigkeiten aller Rezeptor-Deletionsmutanten untersucht. Das Ergebnis von vier bis sechs gemittelten Experimenten ist in Abb. 36 dargestellt. Zur Berücksichtigung der physiologischen Begünstigung von Bakterien ohne Plasmid, wurde als Referenz ein Experiment mit einer 1:1-Mischung von WT-Bakterien mit und ohne pGUS3-Plasmid durchgeführt. Die Anzahl an weißen und blauen Knöllchen sollte hier annähernd gleich sein. Der in diesem Experiment ermittelte Prozentwert an weißen Knöllchen diente als Nullwert für den Vergleich mit den Mutantenstämmen.



**Abb. 36. Kompetitivitäts-Test von neun Chemotaxismutanten im hydroponischen Flüssigmedium im Vergleich zum WT. Bezeichnung der Stämme: ΔS - ΔZ, Einzeldelationen von *mcpS* (RU13/148), *mcpT* (RU11/838), *mcpU* (RU11/828), *mcpV* (RU11/830), *mcpW* (RU11/803), *mcpX* (RU11/805), *mcpY* (RU11/804), *mcpZ* (RU11/818); *ΔicpA*, Deletion des *icpA*-Gens (RU11/815). Als Referenz wurden Experimente mit WT-Bakterien mit und ohne pGUS3-Plasmid durchgeführt. Die Ergebnisse stehen in Relation zum WT-Niveau. Die Werte stellen Mittelwerte von vier bis sechs unabhängigen Experimenten dar.**

Ein negativer Wert bedeutet, dass durch die Mutante die Bildung von weniger Wurzelknöllchen induziert wurde als durch den WT. Somit ist die Mutante weniger kompetitiv als der WT. Ein positiver Wert steht für eine erhöhte Knöllcheninduktion und somit für einen Vorteil in der Symbiose durch die Mutante. Die Rezeptormutanten zeigten unterschiedliche kompetitive Fähigkeiten im Vergleich zum WT. Die Deletion von *mcpS*, *mcpV*, *mcpW*, *mcpX* und *icpA* hatte keine oder nur geringe Auswirkungen auf die symbiontischen Fähigkeiten der Mutanten. Sie bildeten eine mit dem WT vergleichbare Anzahl an Knöllchen. Die Deletion der meisten Rezeptorgene führte zu einer geringeren Knöllchenbildung als beim WT und somit zu einem Nachteil in der Symbiose. Signifikant war dieser Effekt allerdings nur bei Deletionen von *mcpT*, *mcpY* und *mcpZ*. Diese Deletionsstämme bildeten um 10 % weniger Knöllchen als der WT-Kontrollstamm.

An dieser Stelle sollte vermerkt werden, dass mit dieser Methode zwar durchaus Tendenzen, aber keine eindeutigen Aussagen über die Symbiosefähigkeit der Rezeptor-Mutanten getroffen werden konnten. Die Chemotaxis ist offensichtlich nicht essentiell für das Auffinden der Pflanzenwurzel, und die Einflüsse der Rezeptoren zu gering, um sie mit diesem Versuchsansatz nachzuweisen. In einem Kontrollexperiment konnten eindeutig in der Symbiose benachteiligte Mutanten, wie *ΔpilA1* (Typ IV-Pili defizient) bzw. *ΔsinI* (Autoinducer-Synthase defizient),

signifikant weniger Knöllchen (< 20 %) induzieren (Daten nicht gezeigt). Gegen Ende dieser Arbeit wurde eine Publikation veröffentlicht, die einen anderen Versuchsansatz zur Analyse der Symbiosefähigkeit von Chemotaxismutaten verwendete. Für derartige Effekte scheinen Versuche mit Vermiculit-Ansätzen besser geeignet zu sein (Miller *et al.*, 2007).

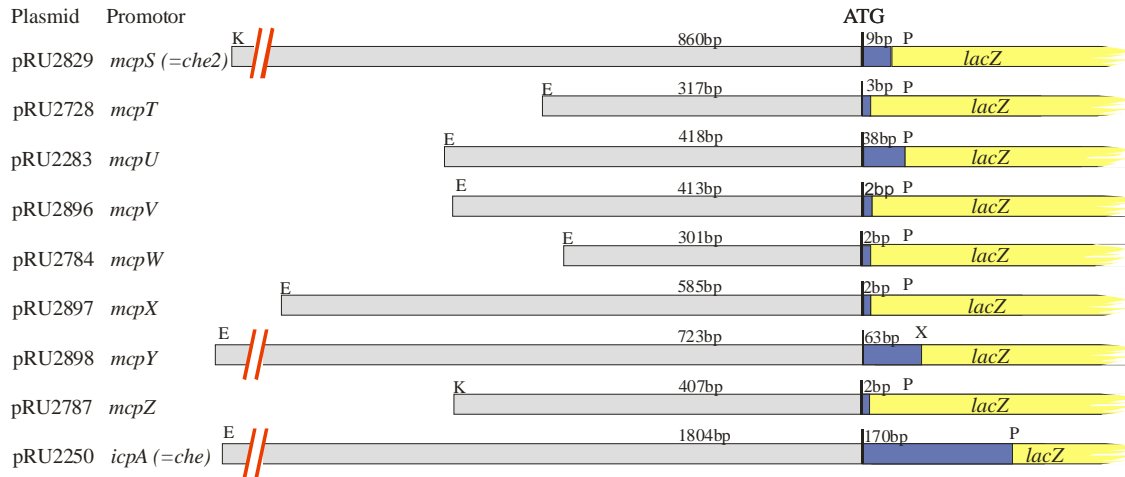
## 4.7 Untersuchungen zur Expression der Rezeptorgene

Bei *E. coli* unterscheidet man zwischen den *high-abundance* Rezeptoren, Tar und Tsr, und den *low-abundance* Rezeptoren, Trg, Tap und Aer. Tar und Tsr machen über 90 % der Rezeptoren in der Zelle aus. Die *high-abundance* Rezeptoren zeichnen sich durch das NWETF-Motiv am C-Terminus aus, das für die Interaktion mit CheB und CheR erforderlich ist (Barnakov *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996). Dieses NWETF-Motiv kommt in etwas modifizierter Form auch bei den Rezeptoren von *S. meliloti* vor (Abb. 23), wobei die für die Interaktion mit CheB und CheR erforderlichen Reste konserviert sind (Meier *et al.*, 2007; Shiomi *et al.*, 2000). Rezeptoren, die dieses modifizierte (N/D)WEEF-Motiv tragen, sind McpT, McpW, McpX und McpY (Meier *et al.*, 2007). Ausgehend von *E. coli* würde man für diese vier *S. meliloti*-Rezeptoren ein hohes Expressionsniveau erwarten.

### 4.7.1 Translationale *lacZ*-Fusionen der Rezeptor-Promotoren

Die Expressionsstärke einzelner Rezeptoren wurde durch Reporter-gen-Analysen untersucht (3.9). Dazu wurden translationale *lacZ*-Fusionen der *upstream*-Bereiche der Rezeptorgene im *broad-host-range* Plasmid pPHU234 und seinen Derivaten pPHU235 und pPHU236 (Tab. 2 und Tab. 11) erstellt. Die Größe der Bereiche und die Lage des Startcodons sind in Abb. 37 dargestellt. Die gewählten Bereiche für die meisten Fusionen (*mcpT*, *mcpU*, *mcpW* und *mcpZ*) lagen zwischen 300 bp und 400 bp *upstream* des Startcodons. Die Konstrukte von *mcpX* (pRU2785; Tab. 2) und *mcpY* (pRU2786; Tab. 2) mit einer Länge von ca. 400 bp zeigten keine Aktivität, erst eine Verlängerung der Bereiche auf fast 600 bp für *mcpX* (pRU2897) bzw. über 700 bp für *mcpY* (pRU2898) führte zu einem messbaren Umsatz an  $\beta$ -Galaktosidase. Das bedeutet, dass die Promotoren für diese beiden Gene mind. 400 bp *upstream* des Startcodons liegen. Das *mcpV*-Konstrukt (pRU2896; Tab. 2) zeigte ebenfalls keine Aktivität, aber in diesem Fall brachte auch eine Erweiterung des *upstream*-Bereichs auf 900 bp (pRU2991 und

pRU2992; Tab. 2) keinen Erfolg. Mögliche Erklärungen für die fehlende Aktivität sind: 1) Der Promotor liegt noch weiter *upstream* als bisher untersucht; 2) Das Startcodon liegt weiter *downstream* als das Vorhergesagte.

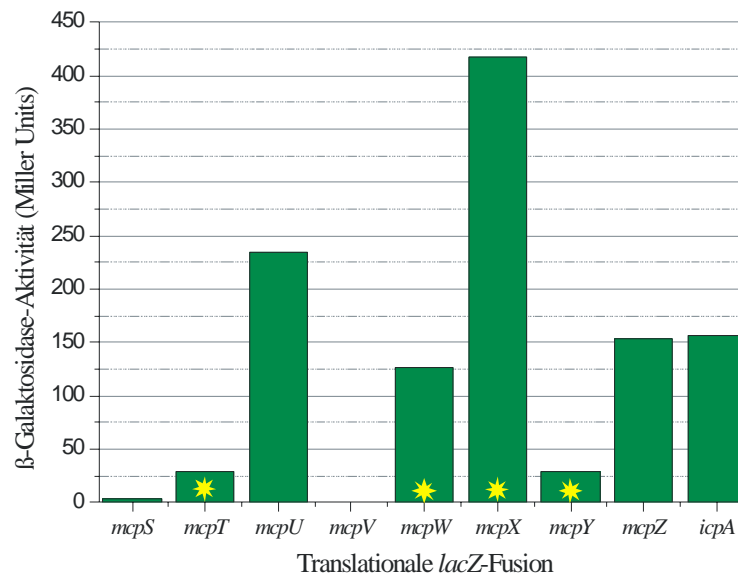


**Abb. 37. Klonierte Promotorbereiche der einzelnen Rezeptorgene.** Dargestellt sind die Längen der *up-* und *downstream* vom Startcodon gelegenen Promotorbereiche der einzelnen Rezeptorgene und die zum ATG *in frame*-liegende *lacZ*-Fusion. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet: K: *KpnI*; E: *EcoRI*; P: *PstI* und X: *XbaI*. ATG kennzeichnet die Lage des Startcodons. Die Plasmide pRU2250 und pRU2283 wurden für eine vorangehende Arbeit erstellt (Muschler, 2000).

#### 4.7.2 Expressionsniveau der Rezeptorgene

Die Promotoraktivitäten der einzelnen Rezeptorgene im WT (RU11/001) sind in Abb. 38 dargestellt. Das Expressionsprofil ermöglicht keine eindeutige Unterteilung in *high-* und *low-abundance* Rezeptoren, sondern in schwach-, mittel- und stark-exprimierte Rezeptoren (Meier *et al.*, 2007).

Mit Ausnahme des *mcpV*-Promotorkonstrukts (pRU2896), zeigten alle Rezeptor-Promotoren eine messbare Aktivität. Allerdings war die Aktivität des *mcpS*-Konstruktes mit vier Miller Units nur minimal. Die Expression von *McpT* und *McpY* war vergleichsweise niedrig und lag bei 30 Miller Units. Die Aktivität der Promotoren von *mcpW*, *mcpZ* und *icpA* lag mit 120 bis 160 Miller Units im mittleren Bereich. Bei *McpU* und *McpX* handelt es sich um die Hauptrezeptoren von *S. meliloti*, denn ihre Promotoraktivität beträgt zusammen fast 60 % der Gesamtaktivität, wobei fast doppelt soviel *McpX* wie *McpU* exprimiert wird. Damit lassen sich eventuell auch die starken Chemotaxis-Defekte der *mcpU*- und *mcpX*-Deletionsmutanten erklären (4.4.1 und 4.4.4).

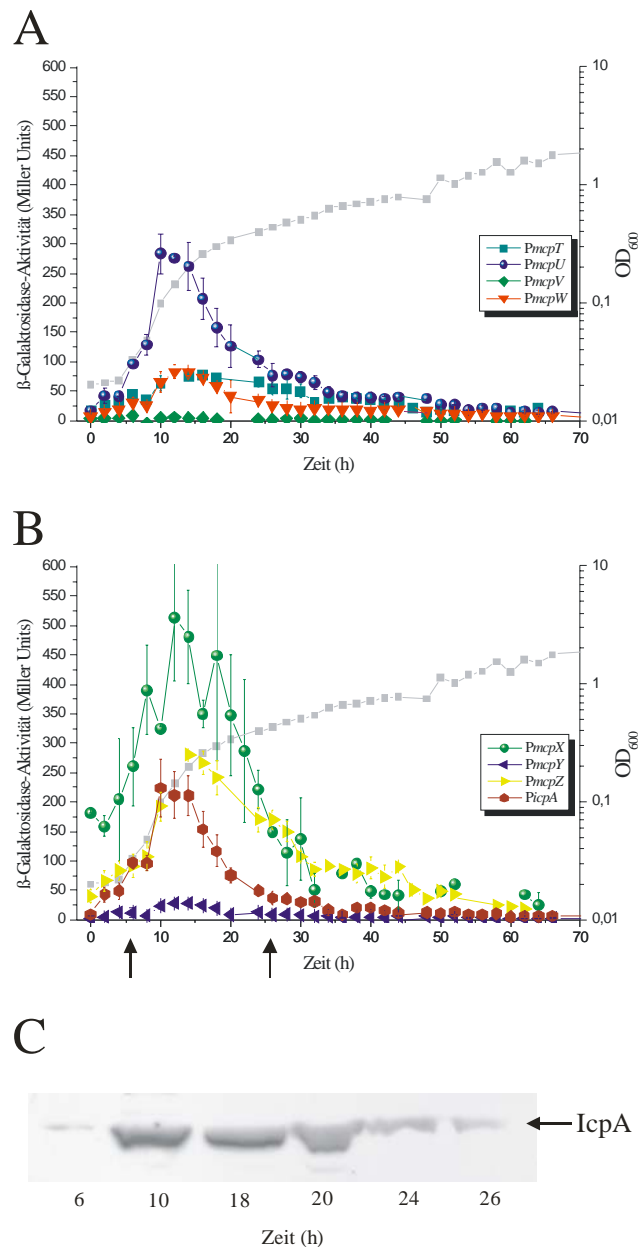


**Abb. 38. Reporter-gen-Analysen der Promotor-*lacZ*-Fusionen der einzelnen Rezeptorgene im *S. meliloti*-WT (RU11/001). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde in fünf unabhängigen Experimenten bestimmt und gemittelt (Miller, 1972). Die Standardabweichung lag zwischen zwei und 20 Miller Units. Gelbe Sterne kennzeichnen Rezeptoren mit (N/D)WEEF-Motiv.**

Eine Korrelation zwischen hoher Expressionsstärke und dem Vorhandensein des (N/D)WEEF-Motivs gab es bei *S. meliloti* nicht (Abb. 38; Meier *et al.*, 2007).

#### 4.7.3 Wachstumsabhängige Aktivität der Rezeptor-Promotoren

Da die motile Phase von *S. meliloti* WT-Zellen eng an die exponentielle Wachstumsphase gekoppelt ist (Rotter *et al.*, 2006), wäre auch eine Abhängigkeit der Expression der Chemorezeptoren vom exponentiellen Wachstum vorstellbar. Daher wurden *S. meliloti* WT-Zellen mit den entsprechenden Rezeptor-Reporter-genkonstrukten in SM-Medium (2.4.2) über einen Zeitraum von 64 Stunden wachsen gelassen und alle zwei Stunden Proben entnommen, die dann auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität untersucht wurden (3.9). Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch verfolgt ( $OD_{600}$ ) und ist in Abb. 39 logarithmisch dargestellt. Nach 6 h setzte in der Kultur exponentielles Wachstum ein, das über 14 h andauerte und nach etwa 20 h langsam in die stationäre Phase überging.



**Abb. 39. Kinetik der Rezeptorgenexpression im *S. meliloti*-Wildtyp über einen Zeitraum von 64 Stunden. Dargestellt sind die gemittelte Wachstumskurve in hellgrau ( $OD_{600}$ ) und die Promotoraktivitäten (in Miller Units) bestimmt durch *lacZ*-Reportergenkonstrukte. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten und die Balken geben die Standardabweichung an. A: Reportergenanalysen von *mcpT*, *mcpU*, *mcpV* und *mcpW*. B: Reportergenanalysen von *mcpX*, *mcpY*, *mcpZ* und *icpA*. Die Pfeile markieren den Zeitraum der unten dargestellten *Western blot*-Analyse. C: *Western blot*-Analyse der IcpA-Proteinmenge. 1 ml WT-Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3 wurden zu den angegebenen Zeitpunkten als Proben genommen (3.14.1), im SDS-Gel aufgetrennt (3.14.2), auf Nitrozellulose-Membranen geblottet (3.14.3) und mit  $\alpha$ -IcpA-Antikörper (1:100) detektiert (3.14.5.2).**

Wie Abb. 39A und B zeigen, gibt es einen klaren Zusammenhang zwischen der exponentiellen Wachstumsphase und den Promotoraktivitäten der Rezeptorgene. Die Promotoraktivitäten

stiegen kurz vor Beginn der exponentiellen Phase (bei 2 - 4 h) stark an, erreichten in der mittleren exponentiellen Phase (10 - 16 h) ein Maximum, um dann mit Beginn der stationären Phase (bei 20 - 30 h) wieder abzufallen. Nach einem Zeitraum von 48 h bis 54 h sank die Aktivität auf unter 10 % der Maximalaktivität.

Unter den Promotorkonstrukten gab es diverse Abweichungen bezüglich des Zeitpunkts der maximalen Aktivität und der Stärke der Ab- bzw. Zunahme der Promotoraktivitäten. Beispielsweise zeigten die Promotoren von *mcpT* und *mcpW* einen verzögerten Beginn der Aktivität bei 10 h und eine sehr langsame Abnahme (Abb. 39A). Dagegen stieg die Aktivität der *mcpU*- und *icpA*-Promotoren bereits nach 6 h sehr schnell an, um dann nach einem etwa sechsständigen Maximum genauso schnell wieder abzunehmen. Auffällig war auch die verzögerte Zunahme der *mcpZ*-Promotoraktivität (Abb. 39B) und die sofort an das Maximum anschließende langsame Abnahme. Das Gegenteil war für den *mcpX*-Promotor zu sehen. Dieser zeigte bereits sehr früh (2 h) eine hohe Aktivität, die dann in eine lange Plateauphase von 10 h überging und dann innerhalb von 10 h nahezu gegen Null ging (Abb. 39B). Auffallend war der Verlauf der *mcpY*-Promotor-Aktivität. Die Kurve verlief sehr flach und hatte nur einen leichten Anstieg zwischen 10 h und 18 h (Abb. 39B), so dass man fast von einer konstitutiven Expression sprechen könnte.

Auch während des exponentiellen Wachstums konnte das unterschiedliche Expressionsniveau (Abb. 38) der einzelnen Promotoren beobachtet werden. Die maximale Aktivität der starken Promotoren von *mcpU*, *mcpX*, *mcpZ* und *icpA* lag über 200 Miller Units, während schwache Promotoren, wie von *mcpT*, *mcpW* und *mcpY* eine Aktivität unter 100 Miller Units hatten.

Zusätzlich sollte die Korrelation zwischen der zeitlich regulierten Transkription der Rezeptorgene und der in der Zelle vorhandenen Proteinmenge untersucht werden. Dazu wurde eine *Western blot*-Analyse (3.14) mit affinitätsgereinigtem polyklonalen Antikörper gegen das IcpA-Protein (3.14.4) durchgeführt. Durch die Verwendung des *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* von Pierce (3.14.5.2) konnte IcpA, trotz der sehr geringen Proteinmenge in der Zelle und des niedrig-affinen Antikörpers, gut detektiert werden. Eine semi-quantitative *Western blot*-Analyse ermittelte eine Gesamtmenge von nur etwa 150 Molekülen IcpA pro Zelle (3.14.5.3, Daten nicht gezeigt).

Die in Abb. 39C gezeigte *Western blot*-Analyse stellt die zelluläre IcpA-Proteinmenge während der exponentiellen Wachstumsphase des *S. meliloti*-WT dar. Die IcpA-Konzentration in der Zelle stimmt mit der Transkriptionskinetik des *icpA*-Promotors überein. Erst kurz nach Beginn der IcpA-Transkription (6 h) konnte auch eine IcpA-Bande im *Western blot* detektiert werden.

Die Bandenintensität erreichte zwischen 10 h und 20 h ein Maximum und sank dann schnell und parallel zur Transkriptionrate ab (Abb. 39B).

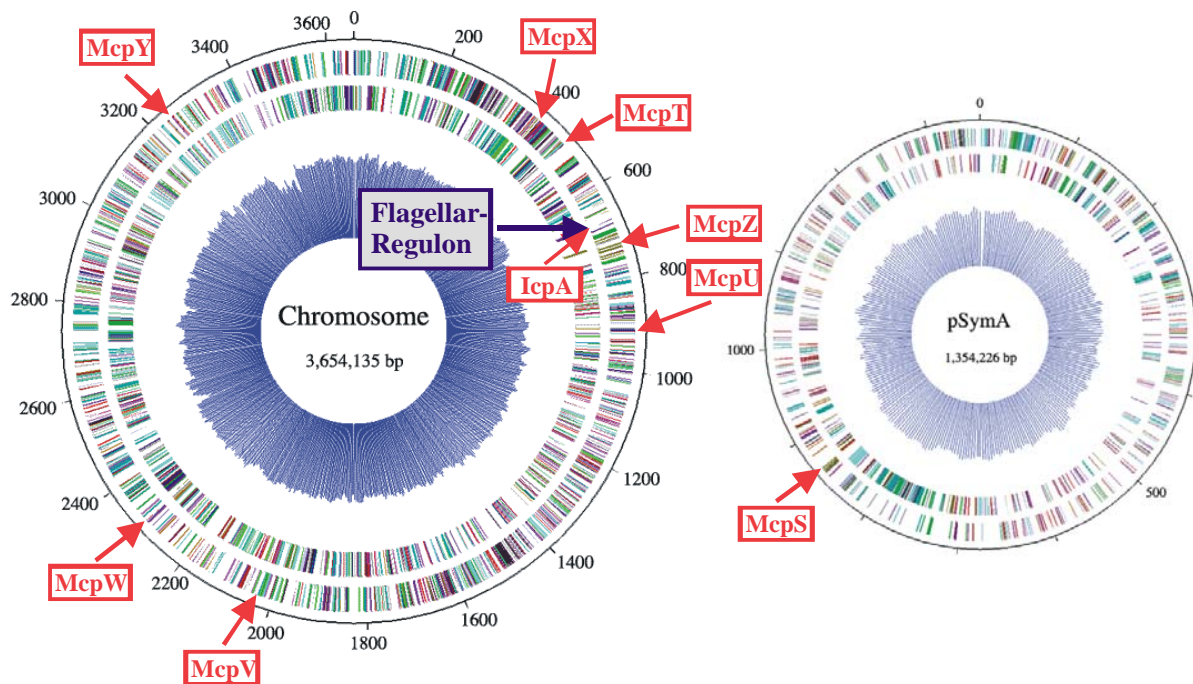
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression der Rezeptorgene von *S. meliloti* auf die exponentielle Wachstumsphase beschränkt und somit an die Motilität der Bakterien gebunden ist.

#### 4.7.4 Sind die Rezeptorgene Klasse III-Gene?

Die an Motilität, Flagellierung und Chemotaxis beteiligten Gene von *S. meliloti* unterliegen dem hierarchischen Regulationsschema des *flagellar regulon* (Abb. 4). Fast alle diese Gene sind in sieben Operons und sechs Transkriptionseinheiten organisiert und befinden sich in einer zusammenhängenden 45 kb-großen Region des *S. meliloti*-Chromosoms (Sourjik *et al.*, 2000). Wie es für Bakterien mit vielen Rezeptorgen üblich ist, sind die meisten (sieben von neun) Rezeptorgene von *S. meliloti* nicht in den beiden Chemotaxis-Operons organisiert (Bardy & Maddock, 2005; Greck *et al.*, 1995; Sourjik *et al.*, 1998). Sechs dieser sieben Rezeptorgene liegen monocistronisch im Genom von *S. meliloti* vor, nur *mcpW* wird mit *cheW2* ko-transkribiert. Acht der neun Rezeptorgene von *S. meliloti* befinden sich auf dem Chromosom, wobei eine Häufung der Rezeptorgene zwischen 400000 und 900000 bp zu beobachten ist (Abb. 40). Dort befinden sich die *loci* für *mcpT*, *mcpU*, *mcpX*, *mcpZ* und *icpA*. Einzig *mcpS*, das dritte Gen des putativen zweiten Chemotaxis-Operons (Abb. 17), befindet sich nicht auf dem Chromosom, sondern auf dem SymA-Plasmid (Galibert *et al.*, 2001; Meier *et al.*, 2007).

Es stellte sich nun die Frage, ob die Rezeptorgene auch durch die Masterregulatoren des *flagellar regulon*, VisN, VisR und Rem kontrolliert werden (Abb. 4; Sourjik *et al.*, 2000; Rotter *et al.*, 2006)? Einen ersten Hinweis auf die Abhängigkeit der Genexpression einzelner Rezeptorgene von Rem lieferten DNA-Chip-Analysen, bei denen *mcpU*, *mcpX*, *mcpZ* und *icpA* in der  $\Delta rem$ -Mutante (RU11/555) signifikant reduziert transkribiert wurden (Rotter, 2005). Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Rezeptorgene als Klasse III-Gene eingeordnet werden können (Abb. 4).





**Abb. 40. Genomverteilung der Rezeptorgene von *S. meliloti*. Dargestellt sind das Chromosom und das SymA-Plasmid. Zahlen geben die Genomposition in 1000 bp an. Rote Pfeile markieren die Position der entsprechenden Rezeptorgene maßstabsgetreu. Nach RhizoBase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/rhizobase/>).**

Daher wurden die Promotoraktivitäten der Rezeptorgene im genetischen Hintergrund von exemplarischen Regulator-Deletionsmutanten jeder Hierarchiekategorie des *flagellar regulon* ermittelt. Ausgewählt wurden  $\Delta visN/R$  (RU11/814) und  $\Delta rem$  (RU11/555) als Vertreter von Klasse IA und Klasse IB, den obersten Regulatoren, sowie  $\Delta fliM$  (RU11/800) und  $\Delta flbT$  (RU13/110). FlbT ist ein positiver Regulator für Klasse III-Gene und wurde als Vertreter der Klasse IIA ausgewählt. Bei *Caulobacter crescentus* führt die Deletion von *flbT* zu einer erhöhten Flagellin-Synthese (Schönlein & Ely, 1989). FlbT ist somit ein negativer Regulator für die Flagellin-Expression (Llewellyn *et al.*, 2005). Für *S. meliloti* zeigte sich der gegenteilige Effekt. Durch Reporter- und *Western blot*-Analysen konnte in der  $\Delta flbT$ -Mutante eine signifikant reduzierte Flagellinexpression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde mit *fliM* noch ein Strukturgen ausgewählt, dessen Fehlen ebenfalls die Transkription der Klasse III-Gene blockiert. Die Promotoraktivitäten der Rezeptorgene in den verschiedenen Stämmen sind in Tab. 11 zusammengefasst. Für sieben der neun untersuchten Promotorkonstrukte war in  $\Delta visN/R$  (RU11/814) und  $\Delta rem$  (RU11/555) keine Aktivität messbar. Auch die Promotoraktivitäten der anderen beiden Rezeptorgene waren signifikant reduziert, sie lagen für *mcpT* bei 17 % und für *mcpY* bei 40 % der im WT (RU11/001) gemessenen Aktivität. Dieses Ergebnis belegt, dass die Transkription aller Rezeptorgene durch

die Masterregulatoren des *flagellar regulon* kontrolliert wird, auch wenn sie monocistronisch im *S. meliloti*-Genom vorliegen.

**Tab. 11. *In vivo*-Promotoraktivität der Rezeptorgene**

Plasmid	Eigenschaften <sup>1)</sup>	β-Galaktosidase-Aktivität (Miller Units) <sup>2)</sup>				
		RU11/001 <sup>3)</sup>	RU11/814	RU11/555	RU11/800	RU13/110
pRU2829	<i>che2::lacZ</i>	4	0	0	4	3
pRU2728	<i>mcpT::lacZ</i>	42	7	7	7	35
pRU2283	<i>mcpU::lacZ</i>	235	0	0	49	4
pRU2896	<i>mcpV::lacZ</i>	0	0	0	7	0
pRU2784	<i>mcpW::lacZ</i>	127	0	0	32	6
pRU2897	<i>mcpX::lacZ</i>	417	0	0	25	6
pRU2898	<i>mcpY::lacZ</i>	29	13	12	16	23
pRU2787	<i>mcpZ::lacZ</i>	154	0	0	13	17
pRU2250	<i>che::lacZ</i>	156	0	0	0	25

<sup>1)</sup> Translationale *lacZ*-Fusionen der neun Rezeptor-Promotoren im *broad-host-range* Plasmid pPHU234 und seinen Derivaten pPHU235 und pPHU236 (Tab. 2). Das *che*-Operon (*che*) besteht aus den Genen *icpA orf2 cheY1 cheA cheW cheR cheB cheY2 cheD orf10* (Sourjik *et al.*, 1998). Das zweite *che*-Operon (*che2*) befindet sich auf dem SymA-Plasmid und besteht aus *cheR cheW mcpS cheA cheB* (Barnett *et al.*, 2001)

<sup>2)</sup> Die β-Galaktosidase-Aktivität (Miller, 1972) der *mcp*-Promotorregionen wurde im WT (RU11/001), in  $\Delta$ *visNR* (RU11/814), in  $\Delta$ *rem* (RU11/555), in  $\Delta$ *fliM* (RU11/800) und in  $\Delta$ *flbT* (RU13/110) während der exponentiellen Wachstumsphase untersucht (3.9). Die Daten wurden aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Standardabweichungen lagen zwischen 0,5 und 6 %.

<sup>3)</sup> Werte aus Meier *et al.* (2007).

Für die Promotoraktivitäten der Rezeptorgene in  $\Delta$ *fliM* (RU11/800) und  $\Delta$ *flbT* (RU13/110) zeigte sich ein ähnliches Bild, wie in  $\Delta$ *visN/R* (RU11/814) und  $\Delta$ *rem* (RU11/555). Die Aktivitäten sanken im Vergleich zu den im WT gemessenen Werten deutlich, wenn auch nicht vollständig. In  $\Delta$ *fliM* (RU11/800) betragen die Promotoraktivitäten von *mcpT*, *mcpU* und *mcpW* noch zwischen 15 % und 25 %, die von *mcpX*, *mcpZ* und *icpA* weniger als 10 % der WT-Aktivität. Einzige Ausnahme war hier die Aktivität des *mcpY*-Promotors, sie lag bei über 50 % der im WT bestimmten Aktivität. Auch in  $\Delta$ *flbT* (RU13/110) lagen die gemessenen Promotoraktivitäten überwiegend unter 20 % (*mcpZ* und *icpA*) bzw. 10 % (*mcpU*, *mcpW* und *mcpX*) der im WT ermittelten Werte. Auffällig war, dass die Aktivitäten des *mcpT*- und des *mcpY*-Promotors in  $\Delta$ *flbT* (RU13/110) noch etwa 80 % der WT-Aktivität betragen. Allerdings handelt es sich hierbei um ohnehin schwach exprimierte Rezeptorgene. Zusammenfassend lässt

sich sagen, dass die Transkription aller Rezeptorgene unter der Kontrolle von VisN/R und Rem liegt. Mit Ausnahme der schwach exprimierten Gene, *mcpT* und *mcpY*, werden alle Rezeptorgene durch FlbT, dem positiven Regulator für Klasse III-Gene, reguliert und können eindeutig als Klasse III-Gene eingestuft werden.

#### 4.7.5 Expression der Rezeptorgene in Wurzelknöllchen

Die ersten Schritte in der Ausbildung von Wurzelknöllchen durch Rhizobien werden durch Chemotaxis und Motilität der Bakterien begünstigt (Ames & Bergmann, 1981; Bauer & Caetano-Anollés, 1990; Caetano-Anollés *et al.*, 1988; Yost *et al.*, 1998). Aber sobald die Infektion stattgefunden hat, werden Motilität und Chemotaxis nicht mehr benötigt (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass während der Knöllchenbildung und auch in den Knöllchen, die Transkription aller Gene, die nicht für die Symbiose und Stickstofffixierung gebraucht werden, herabreguliert wird (Ampe *et al.*, 2003; de Maagd *et al.*, 1992; Natera *et al.*, 2000; Roest *et al.*, 1995). Das Gleiche gilt auch für Chemotaxis- und Motilitätsgene, denn die Aufrechterhaltung dieser Systeme benötigt sehr viel Energie (Macnab, 1996; Soutourina & Bertin, 2003). *Microarray*-Untersuchungen lieferten Hinweise, dass bei *Mesorhizobium loti* die Flagellin-Synthese unter symbiontischen Bedingungen erniedrigt ist (Uchiumi *et al.*, 2004). Bei *S. meliloti* 1021 wird ebenfalls ein Großteil der an Chemotaxis und Motilität beteiligten Gene, basierend auf *Microarray*-Analysen von 23 Genen, in Bakteroiden reduziert transkribiert (Becker *et al.*, 2004). Bei *S. meliloti* gehören zu diesen Genen neben *cheY1*, *cheA* und *flaA* auch die Rezeptorgene *mcpT*, *mcpX* und *icpA* (Becker *et al.*, 2004).

Aufgrund der Hinweise aus den *Microarray*-Daten (Becker *et al.*, 2004) und der Tatsache, dass die Expression von drei der 26 *mcp*-Gene in *Rhizobium leguminosarum*, nämlich *mcpB*, *mcpC* und *mcpD*, in Bakteroiden deutlich reduziert wird (Yost *et al.*, 2004), war es nahe liegend, auch die Expression von *S. meliloti*-Rezeptorgenen in Wurzelknöllchen zu quantifizieren. Die Präparation der Knöllchen für die Reporter-gen-Analysen erfolgte nach einem Protokoll von Wang *et al.* (1989). Anschließend wurde die Aktivität von sechs Rezeptor-Promotoren ermittelt (Miller, 1972). Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in Tab. 12 dargestellt.

**Tab. 12. Aktivitäten einzelner *mcp*-Promotoren in Wurzelknöllchen**

Plasmid	Eigenschaften <sup>1)</sup>	β-Galaktosidase-Aktivität (Miller Units) <sup>2)</sup>		% der Expression <sup>4)</sup>
		Motilitätsmedium	Knöllchen <sup>3)</sup>	Knöllchen versa MM
pRU2728	<i>mcpT::lacZ</i>	29	8	28
pRU2283	<i>mcpU::lacZ</i>	235	4	2
pRU2784	<i>mcpW::lacZ</i>	127	4	3
pRU2898	<i>mcpY::lacZ</i>	29	12	41
pRU2787	<i>mcpZ::lacZ</i>	154	7	5
pRU2250	<i>che::lacZ</i>	156	4	3

<sup>1)</sup> Translationale *lacZ*-Fusionen von Rezeptor-Promotoren im *broad-host-range* Plasmid pPHU234 und seinen Derivaten pPHU235 und pPHU236 (Tab. 2). Das *che*-Operon (*che*) besteht aus den Genen *icpA orf2 cheY1 cheA cheW cheR cheB cheY2 cheD orf10* (Sourjik *et al.*, 1998).

<sup>2)</sup> Die β-Galaktosidase-Aktivität (Miller, 1972) der Rezeptor-Promotorregionen wurde im WT (RU11/001) in freischwimmenden Zellen und in Knöllchen untersucht (3.9). Die Daten wurden aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten gemittelt.

<sup>3)</sup> Zehn Tage nach der Inokulation wurden die Knöllchen von zehn Pflanzen isoliert, in 1 ml 0,25 M Mannitol und 0,05 M Tris/HCl (pH 7,8) aufgenommen und mit einem Glasstab zerquetscht. Nach Absetzen von Pflanzenrückständen wurden 0,5 ml-Aliquots in den ONPG-Test nach Miller (1972) eingesetzt.

<sup>4)</sup> MM: Motilitätsmedium (Bromfield-Platten mit 15 ml RB-Medium überschichtet).

Die ermittelten Promotor-Aktivitäten lagen zwischen vier und zwölf Miller Units und somit deutlich unter der Aktivität von motilen *S. meliloti*-Zellen (Abb. 38). Für die Promotoren von *mcpU*, *mcpW*, *mcpZ* und *icpA* betrug sie weniger als 5 %, von *mcpT* 28 % und von *mcpY* noch 41 %. Dieses Ergebnis belegt, dass die Expression der Rezeptorgene, bis auf *mcpT* und *mcpY*, in den Wurzelknöllchen abgeschaltet wird. Das ist insofern interessant, da die Aktivität dieser beiden Promotorkonstrukte auch in Abwesenheit der Regulatoren des *flagellar regulon* weniger stark herabgesetzt ist als die der anderen Promotoren (Tab. 11). Die noch vorhandene Aktivität des *mcpT*- und *mcpY*-Promotors ist ein unerwarteter Befund, der sich durch zusätzliche, bislang nicht identifizierte Regulationsmechanismen erklären lässt und der in weiterführenden Studien untersucht werden sollte.

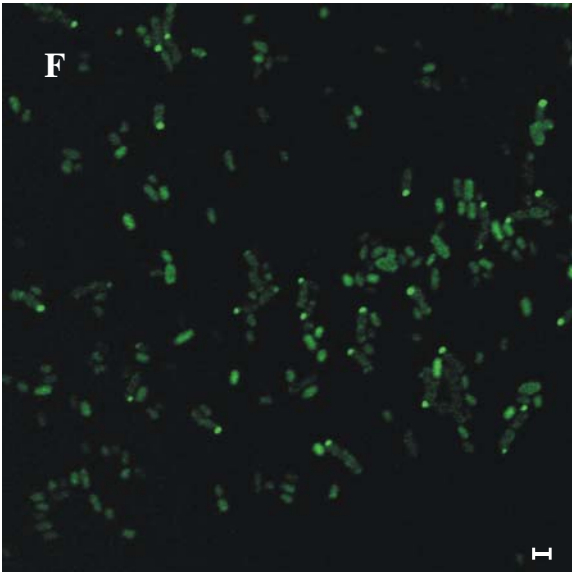
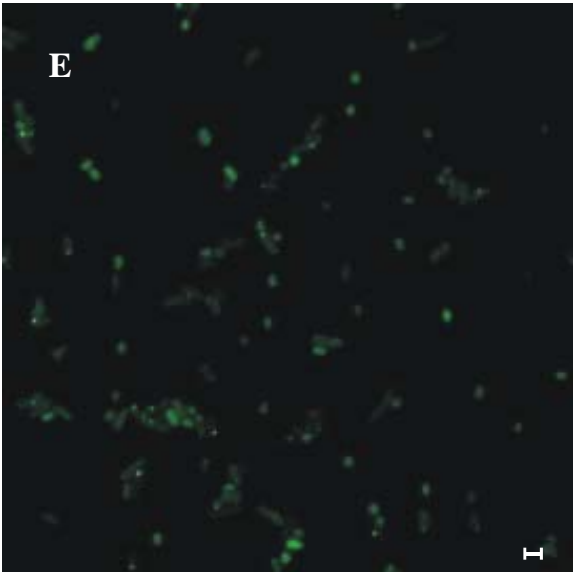
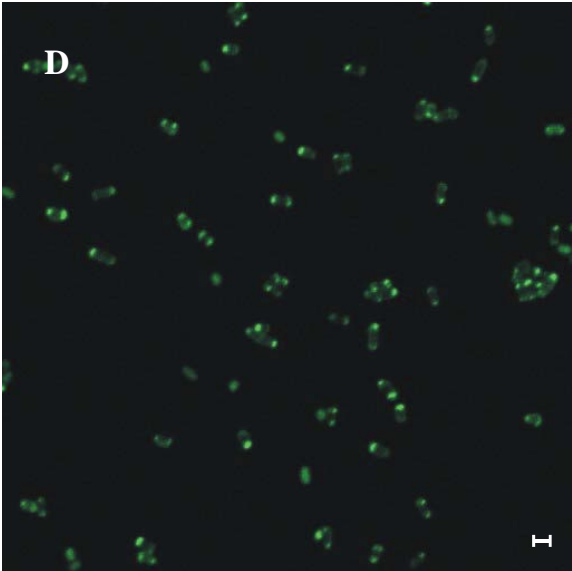
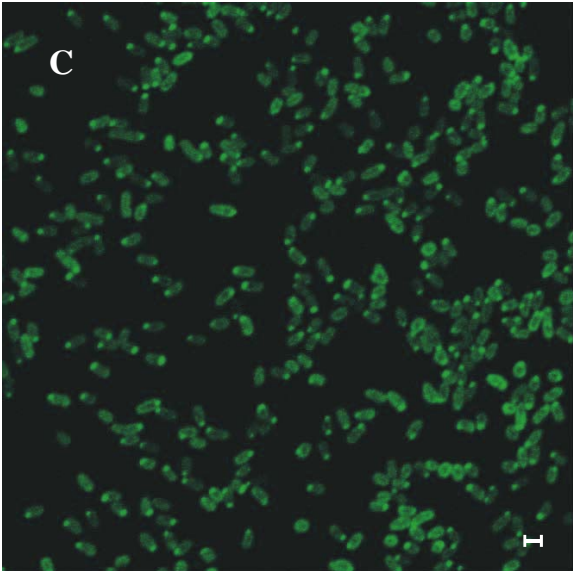
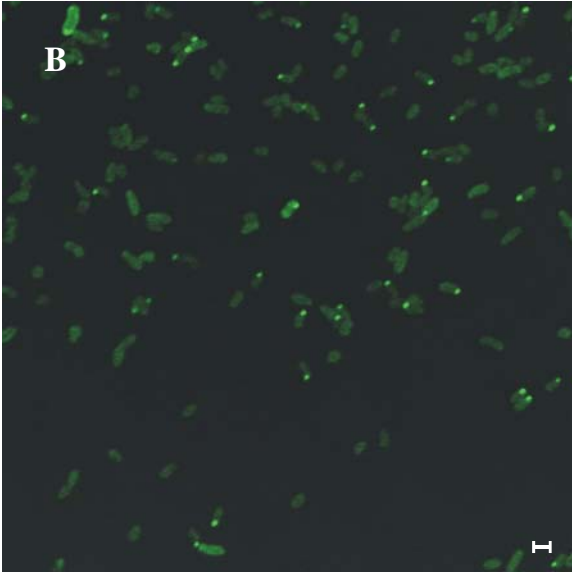
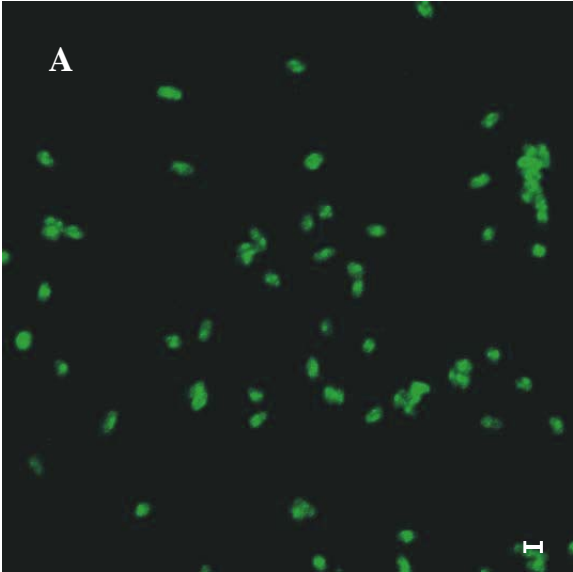
## 4.8 *In vivo*-Lokalisierung der Chemorezeptoren

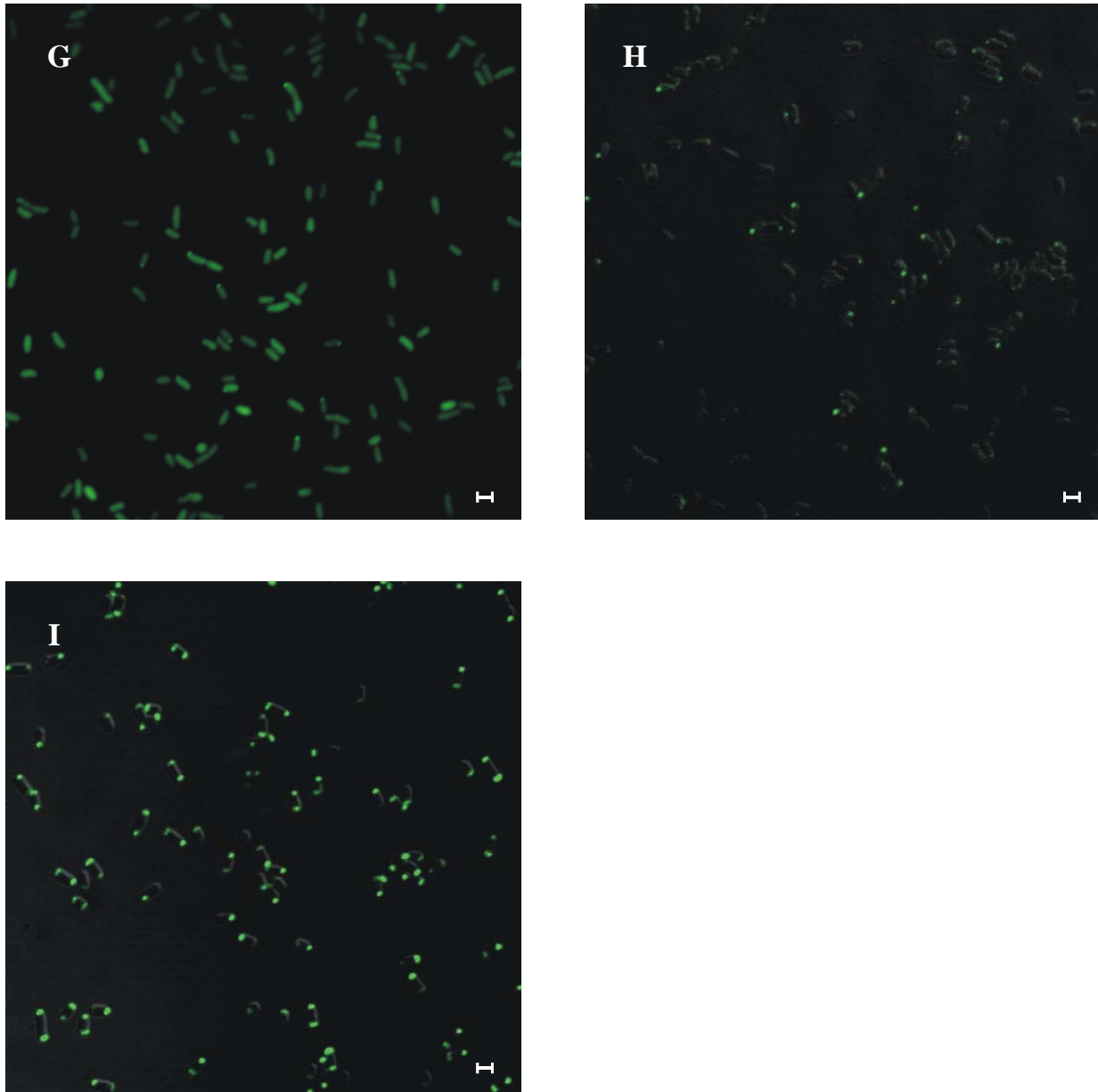
Die spezifische Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zelle ist oft für ihre optimale Funktion und für die Interaktion mit anderen Proteinen essentiell (Lybarger & Maddock, 2001). Bereits vor über 10 Jahren wurde festgestellt, dass die vier membran-durchspannenden MCPs des Modellorganismus *E. coli* überwiegend polar lokalisiert sind und dort *cluster* bilden (Maddock & Shapiro, 1993). Seitdem wurde für alle bisher untersuchten Bakterien und Archaeen eine *cluster*-Bildung der Chemorezeptoren gezeigt (Gestwicki *et al.*, 2000). Die Komponenten des ternären Komplexes, CheA und CheW, sind für eine optimale *cluster*-Bildung der Rezeptoren erforderlich (Maddock & Shapiro, 1993; Skidmore *et al.*, 2000; Sourjik *et al.*, 2000). Bei manchen Bakterien, wie *Rhodobacter sphaeroides* und *Pseudomonas aeruginosa* bilden Chemorezeptoren sowohl polar als auch intern *cluster*. Insbesondere die cytoplasmatischen Rezeptoren, also Rezeptoren ohne Transmembrandomänen, lokalisieren an unterschiedlichen Positionen in der Zelle. Bei *R. sphaeroides* bilden membran-durchspannende MCPs *cluster* am Zellpol, während cytoplasmatische Rezeptoren *cluster* in der Mitte der Zelle bilden (Harrison *et al.*, 1999; Wadhams *et al.*, 2000; Wadhams *et al.*, 2003). Drei der 26 Chemorezeptoren von *P. aeruginosa* besitzen keine Transmembrandomänen (<http://www.Pseudomonas.com>). Abweichend von den löslichen *Rhodobacter*-Rezeptoren lokalisiert einer davon, nämlich McpS, nicht in einem internen *cluster*, sondern am Zellpol (Bardy & Maddock, 2005). Somit wurden innerhalb von drei verschiedenen Bakterienarten drei unterschiedliche Lokalisierungsmuster für Rezeptoren ohne Transmembrandomänen gefunden. Daraus ergaben sich folgende Fragen: 1) Bilden die membran-durchspannenden MCPs von *S. meliloti* auch polare *cluster*? 2) Wo lokalisieren die beiden löslichen Rezeptoren, McpY und IcpA? 3) Ist die Lokalisierung der Rezeptoren von anderen Chemotaxisproteinen abhängig?

Für Lokalisierungsstudien von Proteinen wurden bisher sehr häufig die Immunoelektronen- und die Immunofluoreszenz-Mikroskopie verwendet (Maddock & Shapiro, 1993). In den letzten Jahren sind vor allem Fusionen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und diversen Mutantenformen zur Detektion von Proteinen *in vivo* eingesetzt worden (Margolin, 2000). Erste Untersuchungen mit drei plasmid-kodierten Rezeptor-*gfp*-Fusionen haben bereits darauf hingewiesen, dass die *S. meliloti*-Rezeptoren am Pol der Bakterienzelle lokalisieren (Meier, 2003).

In dieser Arbeit wurde die Lokalisierung aller Rezeptoren von *S. meliloti* im Wildtyp und in verschiedenen Mutantenstämmen untersucht. Für die Lokalisierungsstudien wurden für jeden Rezeptor zwei Konstrukte mit einer C-terminalen GFP-Fusion hergestellt, eines im Überexpressionsvektor pBBR1MCS2 (3.5.3) und das andere für eine chromosomale Insertion in den entsprechenden Rezeptorgenloкус (4.2.3). Die Fusionsgene stehen im *broad-host-range*-Vektor pBBR1MCS2 unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven *lac*-Promotors (*E. coli*), der zur Überexpression der Proteine führt. Die entstandenen Plasmide (Tab. 2; 3.5.3) wurden in verschiedene *S. meliloti*-Stämme überführt (3.7) und die Lokalisierung der Rezeptoren mit dem LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) untersucht (3.16).

Bei plasmid-kodierter Überexpression der Rezeptor-GFP-Fusionen zeigten alle Rezeptoren, außer McpS, eine polare Lokalisierung (Abb. 41; Meier, 2003). McpS-GFP verursachte eine starke Fluoreszenz der ganzen Zelle, die ungleichmäßig verteilt war (Abb. 41A). Bei Expression der übrigen Rezeptoren fluoreszierten zusätzlich zur polaren Fluoreszenz, meist die ganzen Zellen in unterschiedlicher Stärke (Abb. 41B-H). Nur für IcpA-GFP konnten ausschließlich die stark fluoreszierenden *cluster* am Zellpol beobachtet werden (Abb. 41I). Auffällig war, dass sowohl McpV als auch IcpA häufig an beiden Zellpolen *cluster* bildeten (Abb. 41D, I). Besonders schwache Signale am Pol, wie von McpW- und McpY-GFP hervorgerufen, waren aufgrund der starken Fluoreszenz in der ganzen Zelle sehr schwer zu erkennen (Abb. 41E und G). Da McpY ein cytoplasmatischer Rezeptor ist, wäre eine freie Verteilung durchaus vorstellbar. Ob dies tatsächlich der Fall ist, oder ob es sich bei der starken Fluoreszenz der ganzen Zelle um proteolytisch freigesetztes GFP handelt, wurde mit Hilfe von *Western blot*-Analysen untersucht (4.8.1).



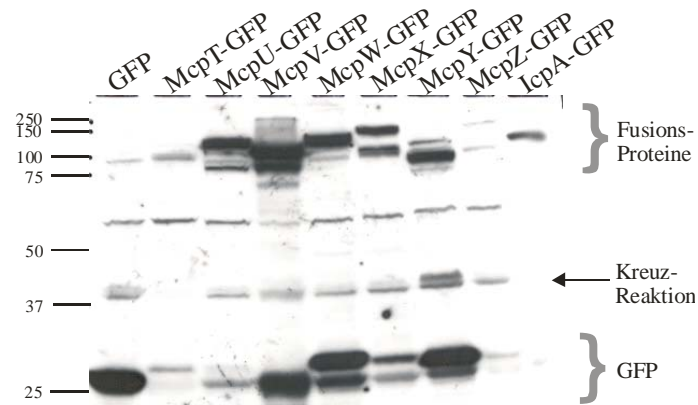


**Abb. 41.** Lokalisierung von plasmid-kodierten Rezeptor-GFP-Fusionen im WT von *S. meliloti*. A: McpS-GFP; B: McpT-GFP; C: McpU-GFP; D: McpV-GFP; E: McpW-GFP; F: McpX-GFP; G: McpY-GFP; H: McpZ-GFP; I: IcpA-GFP. Die repräsentativen Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop aufgenommen. Die weißen Balken entsprechen 1  $\mu\text{m}$ . Die Lokalisierung von McpW-, McpY- und IcpA-GFP wurde auch in einer vorangehenden Arbeit untersucht (Meier, 2003).

#### 4.8.1 Stabilität der Rezeptor-GFP-Fusionen

Zur Überprüfung, ob die beobachtete Fluoreszenz der gesamten Zelle auf die Überexpression der Rezeptor-GFP-Fusionen oder auf freies GFP zurückzuführen ist, wurde die Stabilität der Fusionsproteine durch *Western blot*-Analysen untersucht (3.14.5).





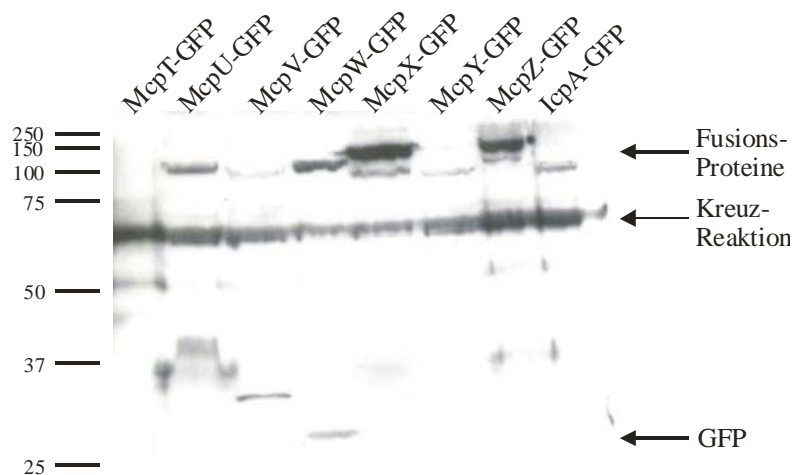
**Abb. 42. Western blot-Analyse zur Überprüfung der Stabilität von plasmid-kodierten GFP-Fusionsproteinen. Aufgetragen wurden Extrakte aus 1 ml Zellen der  $OD_{600} = 0,3$ . Verwendet wurde ein anti-GFP-Antikörper von Sigma, Verdünnung (1:1000). Die Größe der Standardproteine (in kDa) ist links angegeben.**

Als Kontrolle wurde RU13/031 (RU11/001(pRU2706); Klinger, 2003) verwendet, ein Stamm der GFP allein unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *lac*-Promotors exprimiert. In fast allen Proben konnte zusätzlich zum intakten Fusionsprotein auch freies GFP (30 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 42). Die in fast allen Proben zusätzlich auftretende Bande bei 40 kDa ist vermutlich auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen, die bei 60 kDa auf ein GFP-Dimeres. Mögliche Erklärungen für das Vorhandensein von mehreren Banden der Fusionsproteine McpU-, McpV-, McpW-, McpX-, McpY- und McpZ-GFP sind wahrscheinlich unterschiedlich starke Methylierungen der Rezeptoren. Die zunehmende Methylierung der Rezeptoren ist eine Folge der adaptiven Modifizierung der MCPs durch CheR (Okumura *et al.*, 1998; Stock & Levit, 2000). Die unterschiedlichen Methylierungszustände der Rezeptoren könnten mit Hilfe von *in vitro*-Methylierungstests nachgewiesen werden. Allein IcpA-GFP läuft im Gel als eine Bande (88 kDa), weil die methylierbaren Glutamat- und Glutamin-Reste fehlen. In den Proben mit McpU- und McpX-GFP konnte fünf- bzw. zweimal mehr Fusionsprotein als freies GFP nachgewiesen werden (Abb. 42). Das Überwiegen von Fusionsprotein gegenüber freiem GFP spiegelt sich auch in den deutlichen Signalen am Pol wider, die trotz der starken Fluoreszenz der ganzen Zelle sehr gut zu erkennen sind (Abb. 41C und F). Das gleiche gilt für die Fluoreszenz-Aufnahmen von McpT- und McpZ-GFP (Abb. 41B und H), wobei hier die Fusionsproteine in gleicher Menge zu freiem GFP vorliegen (Abb. 42). In den Proben mit McpW- und McpY-GFP konnte ein Verhältnis von Fusionsprotein zu abgespaltenem GFP von etwa 1:5 nachgewiesen werden (Abb. 42), das mit den schwachen

Fluoreszenzsignalen am Pol und der starken Fluoreszenz der ganzen Zelle korreliert (Abb. 41E und G).

Es gab ausserdem deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke der Fusionsproteine. McpT- (100 kDa) und McpZ-GFP (120 kDa) waren im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinen nur sehr schwach exprimiert (Abb. 42). Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, da die Expression aller Fusionsproteine unter der Kontrolle des gleichen Promotors steht. Die wahrscheinlichste Erklärung für die unterschiedlichen Expressionsmengen ist, dass die Fusionsproteine nicht korrekt gefaltet und anschließend proteolytisch abgebaut wurden.

Ein Problem, das bei plasmid-kodierten GFP-Fusionen sehr häufig auftritt, ist die Ablagerung von überschüssigen Proteinen in *inclusion bodies*. Zur Vermeidung dieses Problems wurden für alle Rezeptorgene chromosomale *gfp*-Insertionen im Wildtyp (RU11/001) von *S. meliloti* erstellt (3.5.4.2). Dies erlaubte außerdem eine Expression unter möglichst natürlichen Bedingungen bezüglich Menge und Zeitpunkt der Expression. Die Überprüfung dieser Fusionsproteine im *Western blot* gestaltete sich zunächst als relativ schwierig, da unter Kontrolle ihrer natürlichen, schwachen Promotoren nur eine geringe Proteinmenge synthetisiert wird (4.7.2). Nach einigen Veränderungen des Standard-Protokolls und der Verwendung des *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* von Pierce konnten aber für alle Fusionsproteine Banden im *Western blot* detektiert werden (3.14.5.2).

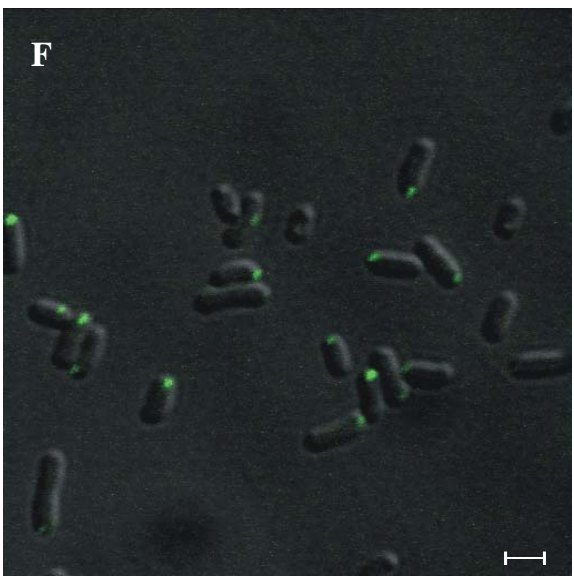
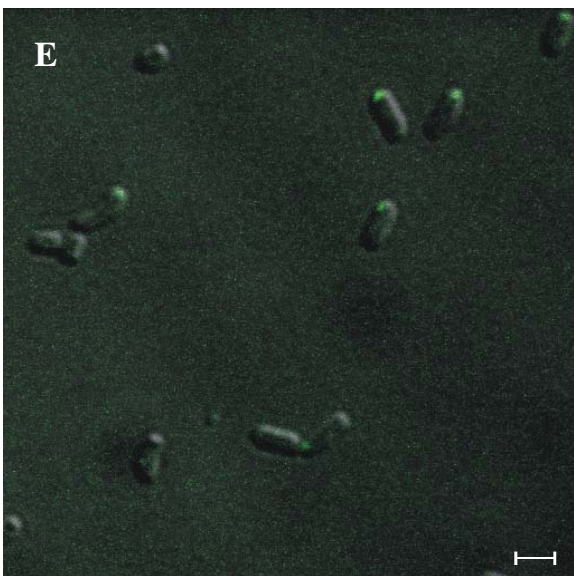
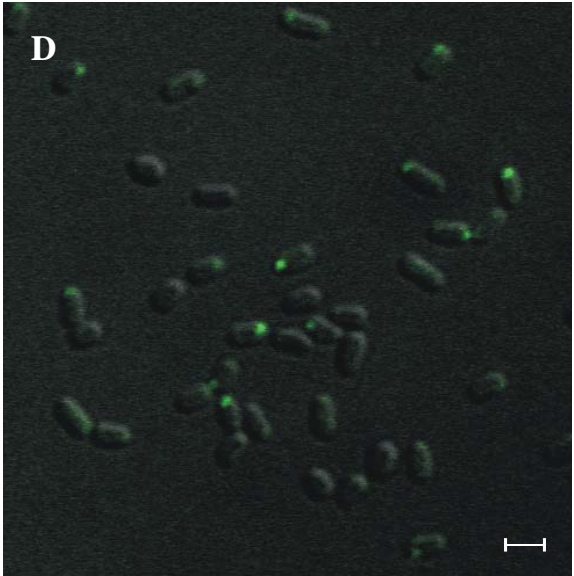
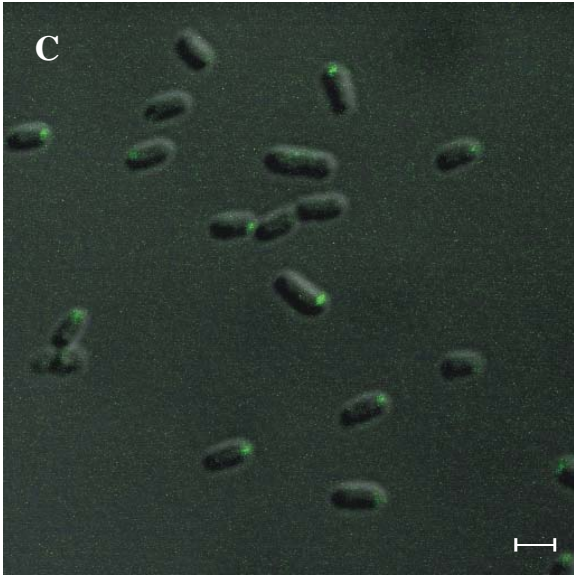
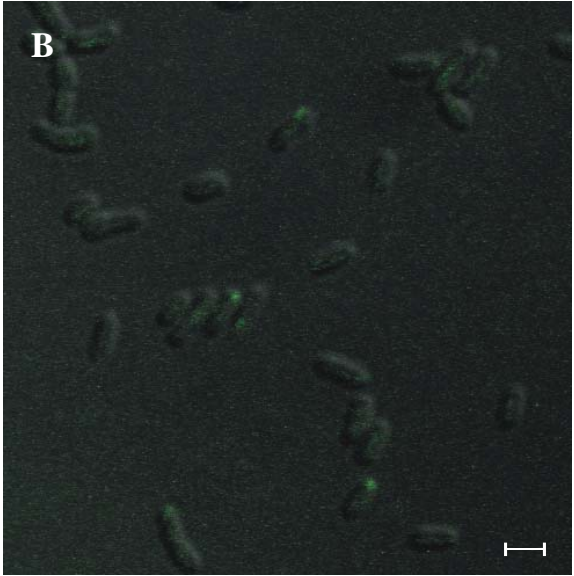
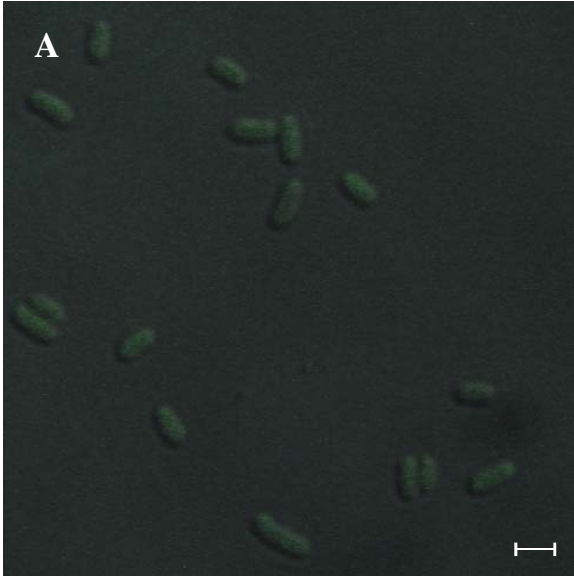


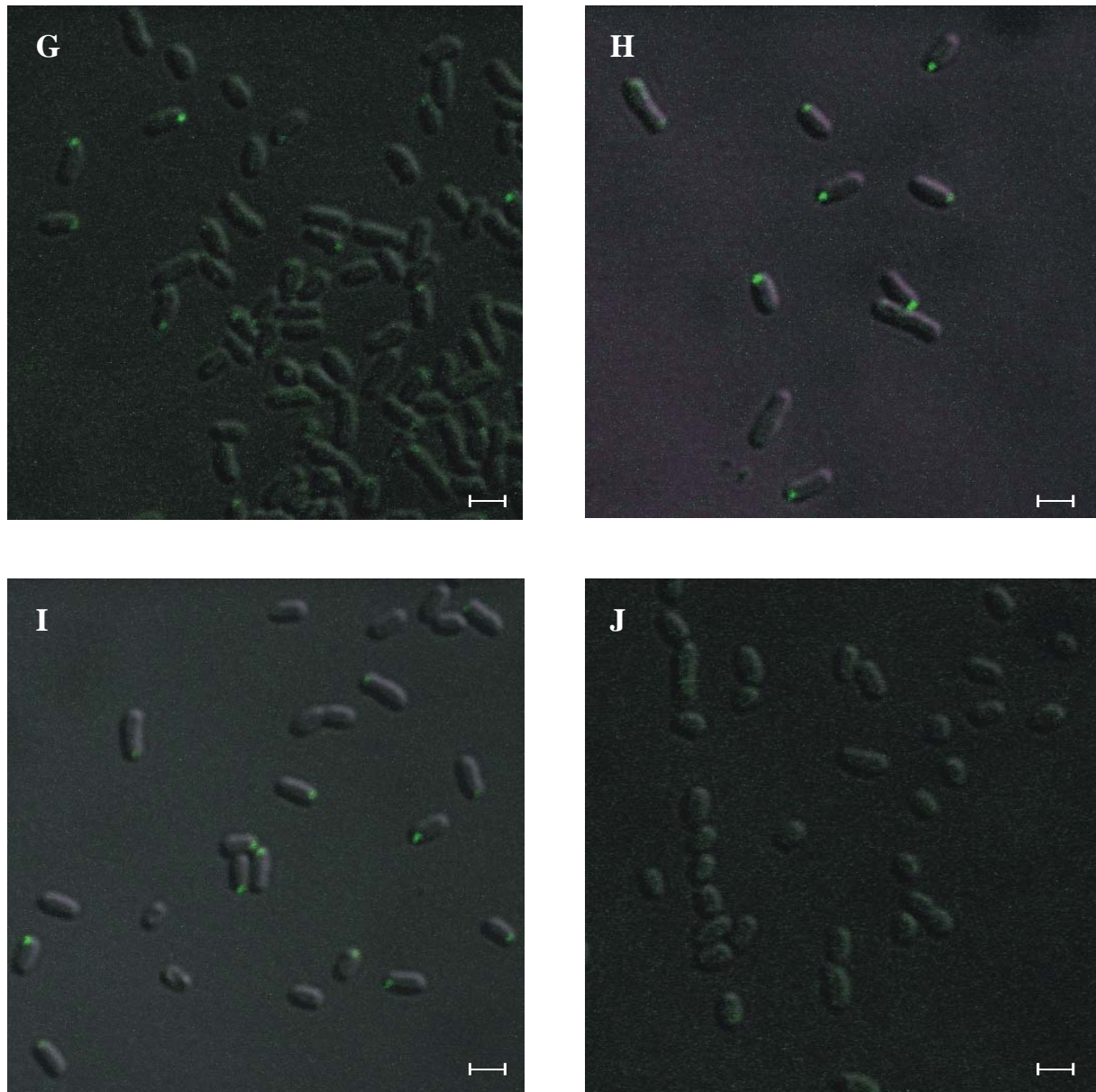
**Abb. 43.** *Western blot*-Analyse zur Überprüfung der Stabilität der Rezeptor-GFP-Fusionsproteine. Aufgetragen wurden Extrakte aus 1 ml Zellen der  $OD_{600} = 0,3$ . Verwendet wurde ein anti-GFP-Antikörper von ABCAM (Verdünnung 1:100). Die Größe der Standardproteine (in kDa) ist links angegeben.

Durch die Expression der Rezeptor-GFP-Fusionen unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors konnte die Menge an Spaltprodukten signifikant reduziert werden. Nur im Fall von McpW-GFP wurde neben dem Fusionsprotein (100 kDa) auch freies GFP (30 kDa) detektiert, das aber im Vergleich zur Menge an McpW-GFP nur etwa 10 % beträgt (Abb. 43). In allen anderen Proben war kein abgespaltenes, freies GFP nachweisbar. Die Expression von McpT- (100 kDa; Bande in Abb. 43 nicht erkennbar), McpV- (95 kDa) und McpY-GFP (94 kDa) war vergleichsweise schwach, was auch mit der niedrigen Promotoraktivität von *mcpT* und *mcpY* korreliert (Abb. 38). Obwohl der *mcpV*-Promotor keine Aktivität zeigte (Abb. 38), konnte eine Bande auf Höhe von 95 kDa detektiert werden, die dem berechneten Molekulargewicht von McpV-GFP entspricht (Abb. 43). Somit war das Promotorkonstrukt offensichtlich inaktiv, wie in 4.7.1. diskutiert. Sehr stark exprimiert wurden McpX- (114 kDa) und McpZ-GFP (120 kDa), was auch mit den Aktivitäten der entsprechenden Promotoren korreliert (Abb. 38). Diese Korrelation zwischen Expressionsstärke und Promotoraktivität war nicht unbedingt zu erwarten, da die Fusion mit GFP auch Einfluss auf Faltung und Stabilität des Fusionsproteins ausüben könnte. Die Mengen an McpU- (104 kDa), McpW- (103 kDa)- und IcpA-GFP (88 kDa) waren niedriger als an McpX- und McpZ-GFP, aber deutlich höher als die der anderen Rezeptoren.

#### 4.8.2 *In vivo*-Lokalisierung der Rezeptoren in *S. meliloti*-Wildtypzellen

Durch die Expression der Rezeptor-GFP-Fusionen unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors konnte die Fluoreszenz der ganzen Zelle in allen Fällen stark reduziert werden, so dass eine Lokalisierung der Rezeptoren gut möglich war. Mit Ausnahme von McpS, konnte für alle Rezeptoren eine polare Lokalisierung beobachtet werden (Abb. 44). Die *cluster* befanden sich nicht zentriert am Zellpol, sondern seitlich leicht versetzt (Abb. 44). Die Fluoreszenzintensität in den polaren *cluster* war für die einzelnen Rezeptor-GFP-Fusionen sehr unterschiedlich. McpS-GFP verursachte eine kaum nachweisbare, sehr schwache Fluoreszenz der ganzen Zelle (Abb. 44A). Besonders schwach fluoreszierten auch McpT- und McpY-GFP (Abb. 44B und G). In beiden Stämmen konnten nur für weniger als 20 % der Zellen *cluster* an einem Pol registriert werden. Die Fluoreszenz von McpU-, McpV- und McpW-GFP war deutlich stärker und die Lokalisierung gut zu analysieren (Abb. 44C-E). *Cluster*, die durch McpX- (Abb. 44F), McpZ- (Abb. 44H) und IcpA-GFP (Abb. 44I) gebildet wurden, waren am deutlichsten zu erkennen. Hier besaßen über 30% der betrachteten Zellen *cluster* an einem Pol.





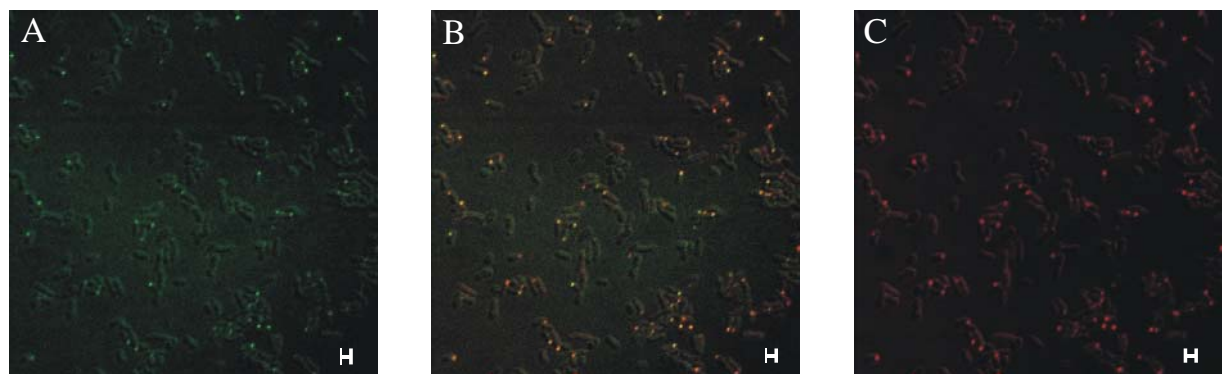
**Abb. 44. Lokalisierung der GFP-Fusionen von verschiedenen Rezeptoren im WT von *S. meliloti*. A: McpS-GFP (RU13/299); B: McpT-GFP (RU13/300); C: McpU-GFP (RU13/301); D: McpV-GFP (RU13/212); E: McpW-GFP (RU13/143); F: McpX-GFP (RU13/144); G: McpY-GFP (RU13/302); H: McpZ-GFP (RU13/241); I: IcpA-GFP (RU13/303); J: McpZ-GFP (RU13/241), stationär gewachsen. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop aufgenommen. Die weißen Balken entsprechen 1  $\mu\text{m}$ . Die Bilder A-I wurden von motilen Kulturen gemacht. Für Bild J wurde eine stationär gewachsene Kultur verwendet.**

Ein Grund für die allgemein geringen Zellzahlen mit polaren Lokalisierungen der Rezeptor-GFP-Fusionen war die seitliche Position der *cluster*, so dass diese häufig nicht im Focus lagen und somit nicht sichtbar waren. Zudem ist die starke Heterogenität bezüglich *cluster*-Anzahl und -Größe innerhalb einer genetisch identischen Zellpopulation mit einer natürlichen interzellulären Variation der exprimierten Proteinmenge erklärbar (Kollmann *et al.*, 2005).

Zellen aus stationär gewachsenen Kulturen fluoreszierten nicht, wie beispielhaft für McpZ-GFP gezeigt (Abb. 44J). Dieses Ergebnis korreliert mit der Untersuchung der Expressionskinetik der Rezeptorgene, deren Promotor-Aktivität mit Beginn der stationären Wachstumsphase signifikant abnahm (Abb. 39A und B).

Interessanterweise lokalisierten auch die beiden cytoplasmatischen Rezeptoren, McpY und IcpA, eindeutig am Pol (Abb. 44G und I), vergleichbar mit den membran-durchspannenden MCPs. Im Fall von McpY lag eine deutlich geringere Zahl an Zellen mit einer polaren Lokalisierung vor, als bei den meisten anderen Rezeptoren. Außerdem waren die *cluster* überwiegend weniger kompakt und wirkten eher diffus.

Befinden sich diese Rezeptor-*cluster* für alle Rezeptoren am gleichen Pol oder bilden verschiedene Rezeptoren *cluster* an verschiedenen Polen? Zur Untersuchung dieser Frage wurden zwei Rezeptoren mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen markiert. Dazu wurde in bestehenden Rezeptor-GFP-Fusionsstämmen, nämlich McpU-, McpY-, McpZ- und IcpA-GFP, McpX mit mRFP fusioniert (4.2.3). Die erzeugten Stämme tragen somit sowohl chromosomale Rezeptor-*gfp*-, als auch eine *mcpX-mrfp*-Fusion (Tab. 1). Die zusätzliche Anregung des mRFP-Proteins erfolgte mit einem HeNe-Laser bei 543 nm (3.16).



**Abb. 45. Lokalisierung einer McpU-GFP- und McpX-mRFP-Fusion in RU13/315. A: Anregung von McpU-GFP. B: Überlagerung der GFP- und RFP-Anregung. C: Anregung von McpX-mRFP. Die Bilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop aufgenommen. Weiße Balken entsprechen 1  $\mu$ m.**

Für alle untersuchten Rezeptor-GFP-Fusionen konnte eine Kolokalisierung der Rezeptoren mit McpX-mRFP gezeigt werden. In Abb. 45 ist sie beispielhaft für McpU-GFP und McpX-mRFP dargestellt. Beide Rezeptoren bilden in allen betrachteten Zellen ein gemeinsames *cluster* an einem Pol der Zelle.

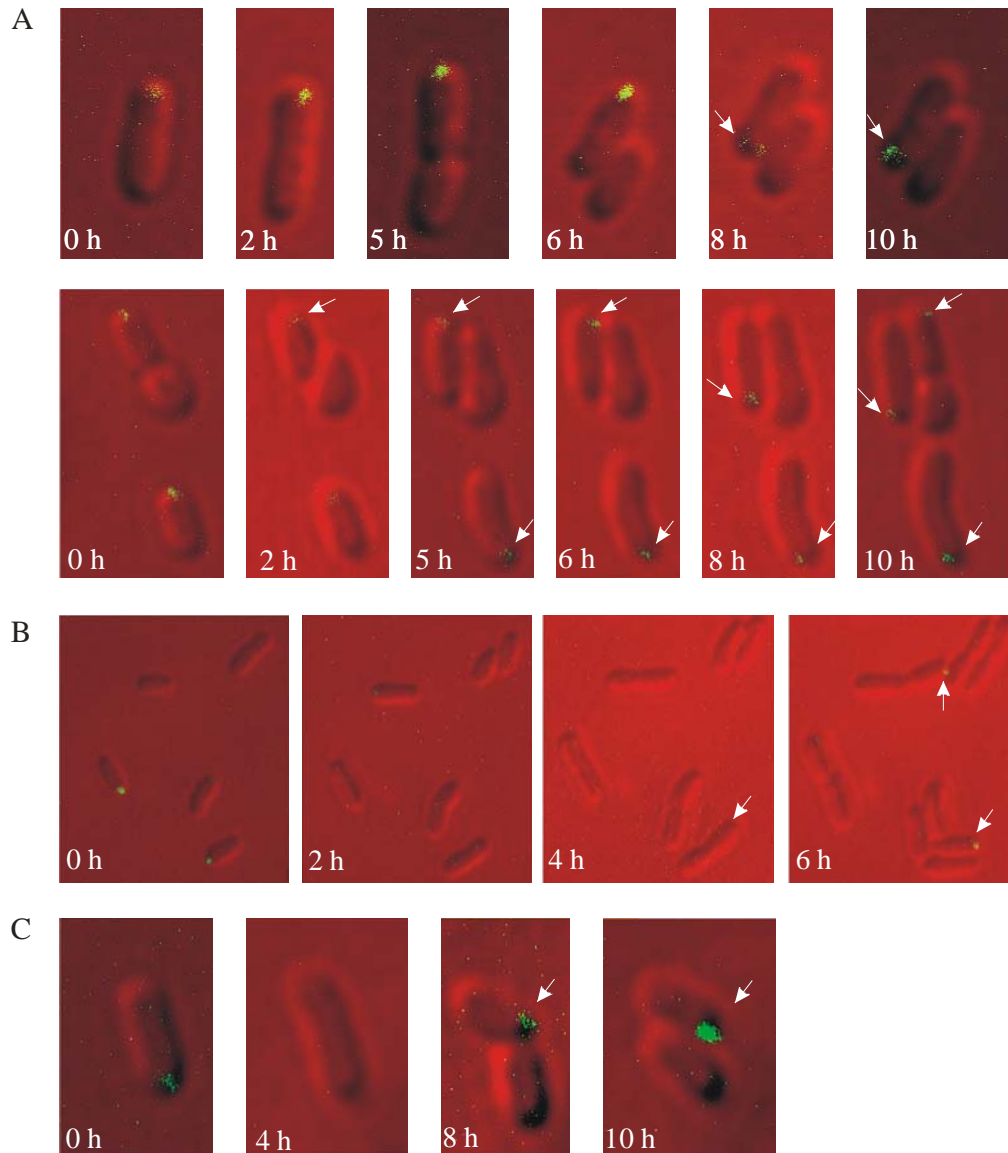
Es lässt sich zusammenfassen, dass, mit Ausnahme von McpS, alle Rezeptoren von *S. meliloti*, sowohl Transmembran- als auch cytoplasmatische Rezeptoren, polar lokalisiert sind. Sie bilden gemeinsam an einem Pol der Zelle ein *cluster*, das die Signalweiterleitung zu CheA begünstigt.

### 4.8.3 Lokalisierung einzelner Rezeptoren während der Zellteilung

Die Beobachtung, dass sich bei elongierten, kurz vor der Zellteilung stehenden Zellen häufig am gegenüberliegenden Pol ein neues *cluster* bildete, initiierte eine Studie zur Lokalisierung der Rezeptoren während der Zellteilung. Bei *E. coli* entstehen zunächst kleine laterale *cluster* aus neu gebildeten Rezeptoren (Thiem *et al.*, 2007), die über die gesamte Zellhülle in die Cytoplasma-Membran integriert werden (Shiomi *et al.*, 2006). Diese lateralen *cluster* werden dann durch die Zellteilung zu einem meist polaren *cluster* (Thiem *et al.*, 2007). Beim cytoplasmatischen TlpT-*cluster* von *R. sphaeroides* kommt es zu einer Aufteilung in zwei *cluster* vor der Zellteilung, so dass beide Tochterzellen jeweils ein neues cytoplasmatisches *cluster* besitzen (Thompson *et al.*, 2006).

Für Lokalisierungsstudien während der Zellteilung von *S. meliloti* wurden die Zellen mit 0,8 %iger Agarose in RB-Medium fixiert. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden mit dem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) analysiert. In den meisten Fällen war ein „Verschwinden“ der polaren *cluster* während der Zellelongation zu beobachten (Abb. 46). Dieses vermeintliche Auflösen des Rezeptor-*cluster* ist vermutlich auf ein Ausbleichen des GFP-Fluorophors zurückzuführen. Durch die wiederholte Anregung mit Licht verliert GFP zunehmend die Fähigkeit zu fluoreszieren, was als Ausbleichen oder *photobleaching* bezeichnet wird. Für Lokalisierungsstudien während der Zellteilung wurden alle 60 Minuten Bilder aufgenommen, so dass es durch die wiederholte Belichtung zu einem Verlust der Fluoreszenz kommt. Bei sehr schwachen Signalen, wie beispielsweise durch McpY-GFP erzeugt, trat dieser Effekt sehr schnell ein (Abb. 46B).

Sehr gut zu beobachten war die Lokalisierung von IcpA-GFP während der Zellteilung (Abb. 46A). Mit zunehmendem Wachstum der Zelle wurde ein neues *cluster* von IcpA-GFP am gegenüberliegenden Pol sichtbar, dessen Intensität nach der Teilung zunahm (Abb. 46A, oben). Bei McpY-GFP war dieses *cluster* erst nach der Teilung zu erkennen (Abb. 46B), was aber vermutlich auf die deutlich geringere Expression von McpY zurückzuführen ist (Abb. 43). Die Analyse von plasmid-kodiertem McpY-GFP ließ neue *cluster* teilweise vor oder zumindest zeitgleich mit der Zellteilung beobachten (Daten nicht gezeigt).



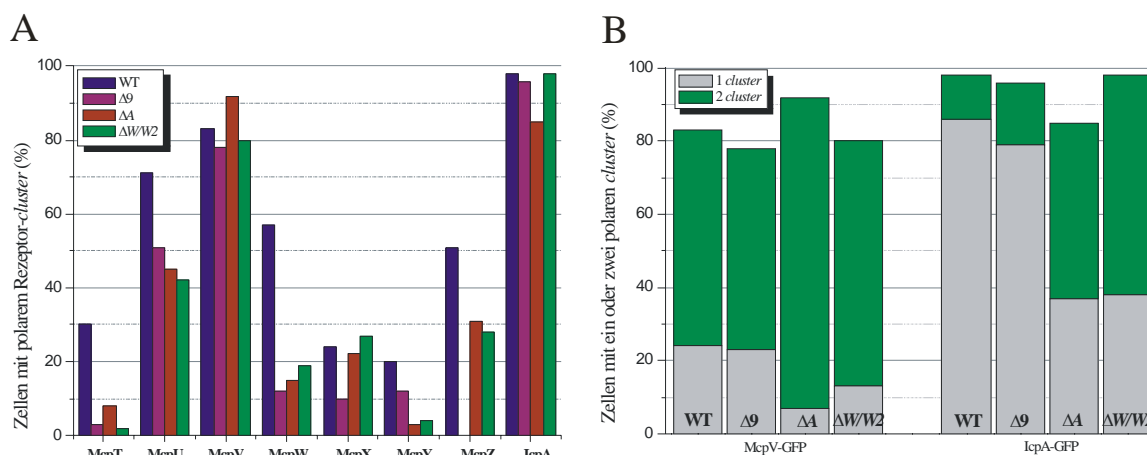
**Abb. 46. Lokalisierung von IcpA-GFP (A), McpY-GFP (B) und McpV-GFP (C) während der Zellteilung. Die Zellen wurden mit 0,8 %iger Agarose in RB-Medium (2.4.2) fixiert. Es wurden alle 60 Minuten Bilder mit dem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) aufgenommen, die mit Paint Shop Pro 7 (Jasc Software) bearbeitet wurden. Weiße Pfeile markieren entstehende Rezeptor-*cluster*.**

Im Fall von McpV-GFP bildete sich das neue *cluster* nicht am gegenüberliegenden Pol der Zelle, sondern überwiegend am Septum der neuen Tochterzellen (Abb. 46C). Dieses Verhalten ist ein interessanter und unerwarteter Befund, dessen Ursachen in weiterführenden Studien näher untersucht werden sollten.



#### 4.8.4 Abhängigkeit der Rezeptor-Lokalisierung von anderen Chemotaxisproteinen

In früheren Lokalisierungsstudien von Chemorezeptoren, insbesondere bei *E. coli*, wurde eine Abhängigkeit der *cluster*-Bildung der MCPs von CheA und CheW nachgewiesen (Maddock & Shapiro, 1993; Lybarger & Maddock, 1999; Skidmore *et al.*, 2000; Sourjik & Berg, 2000). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die beiden Chemotaxisproteine besonders für die Stabilisierung und somit für die Kompaktheit der Rezeptor-*cluster* wichtig sind (Kentner *et al.*, 2006). Für *S. meliloti* wurde die Abhängigkeit der polaren Lokalisierung von McpW- und McpY-GFP von CheA und CheW bereits in einer vorangehenden Arbeit gezeigt (Meier, 2003). Die Lokalisierung der Rezeptor-GFP-Fusionen in verschiedenen Mutantenstämmen von *S. meliloti* wurde zunächst in *cheA*- und *cheWcheW2*-Deletionsmutanten (RU11/310 bzw. RU11/812) untersucht, die die Genfusionen vom Expressionsplasmid pBBR1MCS2 kodierten. Für die meisten Fusionsproteine, nämlich McpT-, McpU-, McpW-, McpY und McpZ-GFP, war ein signifikanter Rückgang der Zellzahl mit einer polaren Rezeptor-Lokalisierung zu beobachten (Abb. 47A; Meier, 2003). Dagegen lagen McpV-, McpX- und IcpA-GFP bei beiden Mutantenstämmen in vergleichbar vielen Zellen im polaren *cluster* vor wie im WT. Ähnlich verhielt es sich mit der Lokalisierung der plasmid-kodierten GFP-Fusionsproteine im  $\Delta 9$ -Stamm (RU13/149). Hier ging die Zahl der Zellen mit einer polaren Lokalisierung der Rezeptoren ebenfalls deutlich zurück, nur für McpV- und IcpA-GFP blieb sie im Vergleich zum WT wiederum konstant (Abb. 47A). Interessanterweise nahm sowohl für McpV- als auch für IcpA-GFP in den  $\Delta cheA$ - und  $\Delta cheWcheW2$ -Mutanten die Anzahl an Zellen mit *cluster* an beiden Polen stark zu (Abb. 47B). Während McpV-GFP bereits im WT in 60 % der Zellen an beiden Polen *cluster* bildete, deren Anteil für die zwei Deletionsmutanten auf über 80 % anstieg, nahm für IcpA-GFP die Zahl von 10 % auf über 50 % zu. Für die  $\Delta 9$ -Mutante blieb die Zellzahl mit zwei polaren *cluster* für beide GFP-Fusionen vergleichbar zum WT (Abb. 47B).



**Abb. 47. A. Diagramm der relativen Zellzahlen mit einem polaren *cluster* plasmid-kodierter Rezeptor-GFP-Fusionen im WT (RU11/001), in  $\Delta cheA$  (RU11/310),  $\Delta cheWcheW2$  (RU11/812) und im  $\Delta 9$ -Stamm (RU13/149). B. Diagramm der relativen Zellzahlen mit einem oder zwei polaren *cluster* von McpV- und IcpA-GFP. Für jeden Stamm und jede GFP-Fusion wurden jeweils ungefähr 1000 Zellen aus drei bis fünf unabhängigen Analysen ausgewertet.  $\Delta A$ :  $\Delta cheA$ ;  $\Delta W/W2$ :  $\Delta cheWcheW2$ .**

Die von CheA- und CheW-unabhängige Lokalisierung von McpV-, McpX- und IcpA-GFP am Zellpol war unerwartet. Daher wurde die Lokalisierung dieser drei Rezeptorkonstrukte nach chromosomaler Expression unter Kontrolle ihres natürlichen Promotors in Abwesenheit von CheA und CheW untersucht. Durch die native Expression der Fusionsproteine wurde eine möglichst natürliche Lokalisierung gewährleistet. Für alle drei Rezeptoren war die Anzahl an Zellen mit einer polaren Lokalisierung in beiden Mutantenstämmen vergleichbar zum WT (Tab. 13). Diese Ergebnisse bestätigen die CheA- und CheW-unabhängige polare Lokalisierung von McpV, McpX und IcpA.

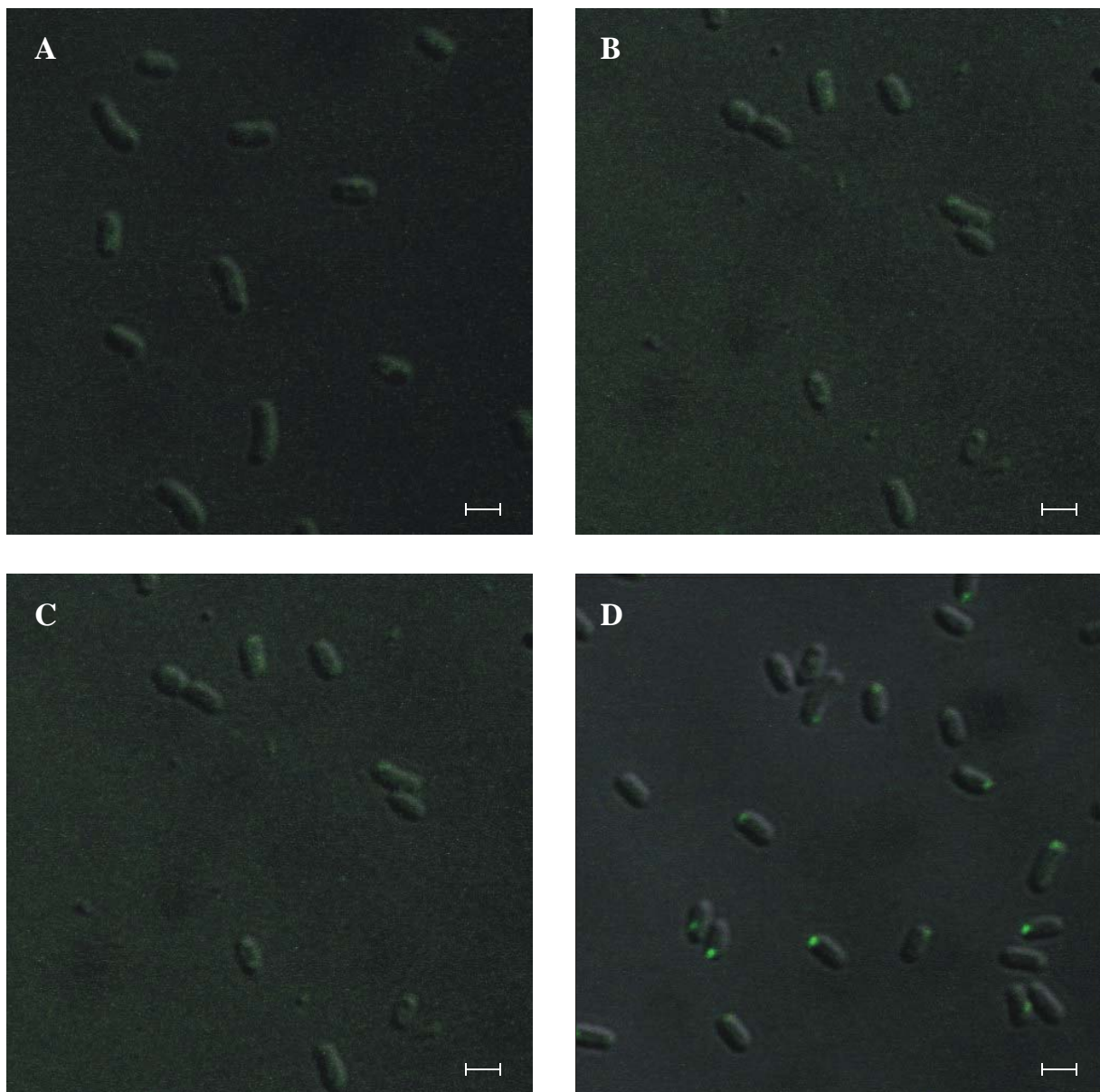
**Tab. 13. Lokalisierung der chromosomalen Rezeptor-GFP-Fusionen im WT (RU11/001), in  $\Delta cheA$  (RU11/310) und in  $\Delta cheWcheW2$  (RU11/812)**

Fusion <sup>1)</sup>	Lokalisierung der MCPs in einem polaren <i>cluster</i> <sup>2)</sup>		
	WT	$\Delta cheA$	$\Delta cheW/cheW2$
<i>mcpV-gfp</i>	33 % ± 15	40 % ± 5	41 % ± 5
<i>mcpX-gfp</i>	31 % ± 11	26 % ± 8	30 % ± 10
<i>icpA-gfp</i>	33 % ± 10	44 % ± 4	40 % ± 4

<sup>1)</sup> Chromosomale Insertion von *gfp* in den entsprechenden *mcp*-Genlokus.

<sup>2)</sup> Relative Anzahl an Zellen mit einem polaren *cluster*. Ausgezählt wurden jeweils über 1000 Zellen des WT und über 500 Zellen der Mutantenstämmen aus fünf unabhängigen Analysen.

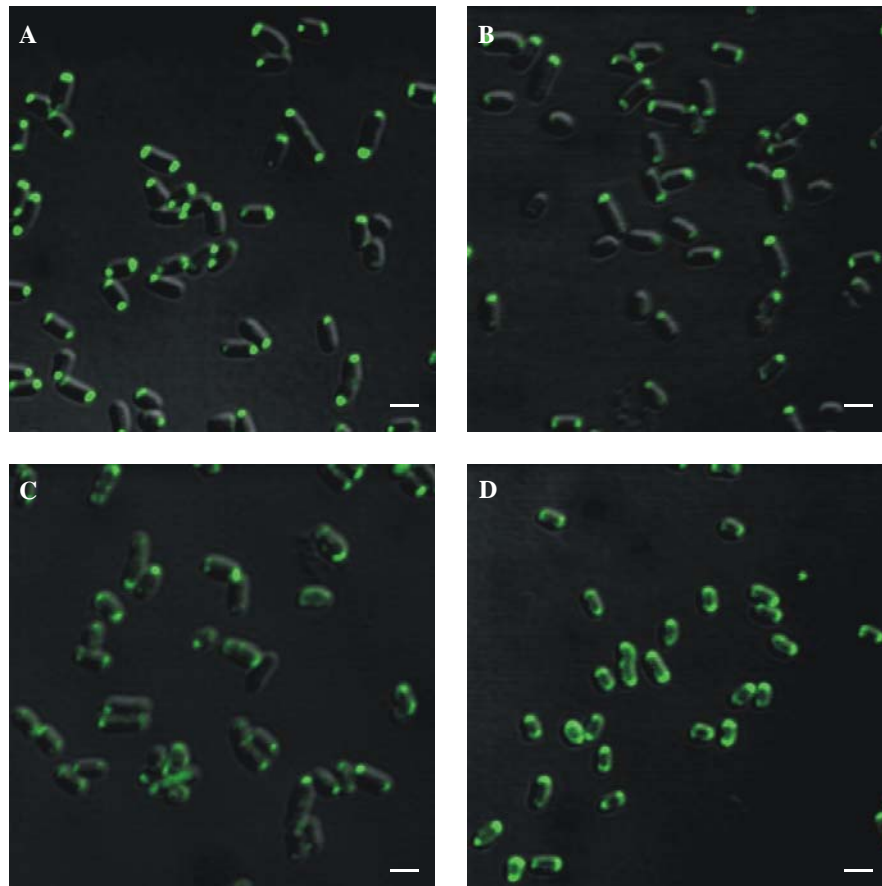
Aufgrund der deutlicheren Ergebnisse der chromosomal-exprimierten Rezeptor-GFP-Fusionen stellte sich die Frage, ob sich die polare Lokalisierung der Rezeptoren im  $\Delta 9$ -Stamm unter natürlichen Expressionsbedingungen auf Null reduziert? Von besonderem Interesse war die „Sonderstellung“, also die unabhängige Lokalisierung, von IcpA. Kann sie auch unter natürlichen Bedingungen bestätigt werden? Zur Klärung dieser Fragen wurde stellvertretend die Lokalisierung von vier Rezeptor-GFP-Fusionen in einem ansonsten rezeptorlosen Stamm untersucht.



**Abb. 48.** Lokalisierung der GFP-Fusionen von verschiedenen Rezeptoren in einem sonst rezeptorlosen Stamm von *S. meliloti* („ $\Delta 8$ “). A:  $\Delta 8$ /McpU-GFP (RU13/331); B:  $\Delta 8$ /McpW-GFP (RU13/307); C:  $\Delta 8$ /McpY-GFP (RU13/332); D:  $\Delta 8$ /IcpA-GFP (RU13/333). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop aufgenommen. Weiße Balken entsprechen 1  $\mu\text{m}$ .

Interessanterweise waren weder McpU-, noch McpW- oder McpY-GFP am Zellpol lokalisiert (Abb. 48A-C). In allen drei Fällen fluoreszierte die ganze Zelle schwach. Dies bestätigt vorherige Daten, nach denen die Lokalisierung dieser Rezeptoren von anderen Rezeptoren abhängig ist (Abb. 47A). Dagegen bildet IcpA-GFP, wie bereits bei der plasmid-kodierten GFP-Fusion angedeutet, auch als einziger Rezeptor in der Zelle *cluster* am Pol (Abb. 48D) und das in vergleichbar vielen Zellen wie im WT (Tab. 13). Die polare Lokalisierung von IcpA ist somit unabhängig von CheA, CheW und den anderen Rezeptoren.

Mit diesen Ergebnissen konnte für die meisten Rezeptoren von *S. meliloti* eine Abhängigkeit der Lokalisierung von CheA, CheW und den anderen Rezeptoren gezeigt werden. Die Rezeptoren bilden einen ternären Komplex mit CheW und CheA, wodurch das *cluster* am Zellpol zusammengehalten wird. Fehlen diese Komponenten kommt es zu einer Delokalisierung der Rezeptoren. Nur McpV, McpX und IcpA scheinen von den anderen Chemotaxisproteinen unabhängig am Pol zu lokalisieren (Tab. 13). Allerdings hatte für McpV und IcpA das Fehlen von CheA und CheW die Lokalisierung der *cluster* an beiden Polen zur Folge (Abb. 47B). Zur generellen Untersuchung der Lokalisierung von IcpA und McpV in Abhängigkeit von anderen Chemotaxis- und Motilitätsproteinen, wurden die Überexpressionsplasmide pBBR1MCS2-*icpA-gfp* (pRU2729) bzw. pBBR1MCS2-*mcpV-gfp* (pRU2771) in  $\Delta visN/R$  (RU11/814) eingeführt (3.7). Aufgrund der fehlenden Masterregulatoren VisN und VisR exprimiert dieser Stamm weder an der Chemotaxis noch an der Motilität und Flagellierung beteiligte Proteine (Rotter *et al.*, 2006; Sourjik *et al.*, 2000). Die Lokalisierung von McpV- und IcpA-GFP im WT und in  $\Delta visN/R$  ist in Abb. 49 vergleichend dargestellt. Während IcpA-GFP auch in  $\Delta visN/R$  noch eindeutige *cluster* an den Zellpolen bildete (Abb. 49B; Meier, 2003), wurde für McpV-GFP zwar eine polare Lokalisierung beobachtet, die aber nicht mehr als kompaktes *cluster* auftrat (Abb. 49D). Somit führte das Fehlen von Chemotaxis- und Motilitätsproteinen zu einer Delokalisierung von McpV, die sich als „polare Kappe“ darstellt.



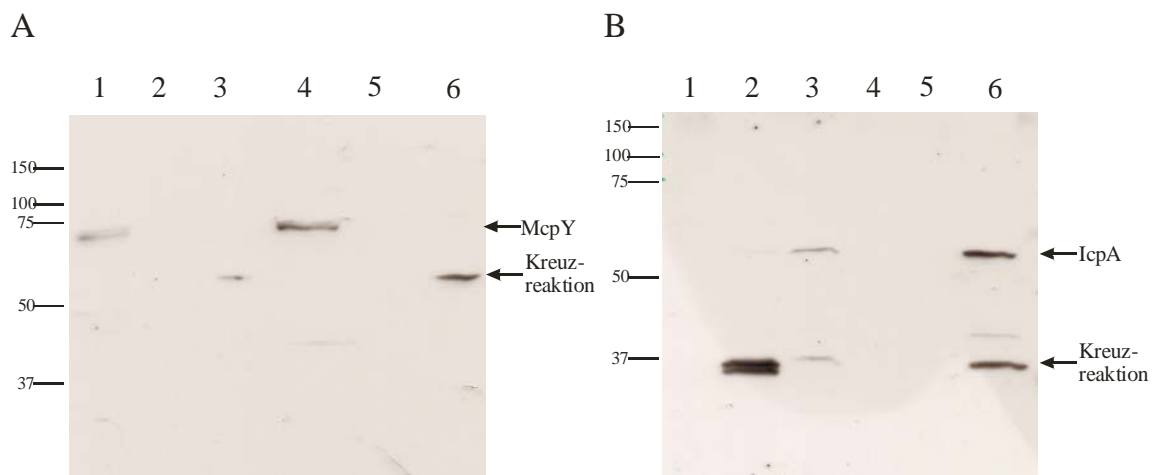
**Abb. 49. Lokalisierung von plasmid-kodiertem IcpA- und McpV-GFP im WT (RU11/001) und in  $\Delta visN/R$  (RU11/814). A: WT(pBBR1MCS2-*icpA-gfp*) (RU11/001(pRU2729)); B:  $\Delta visN/R$ (pBBR1MCS2-*icpA-gfp*) (RU11/814(pRU2729)); C: WT(pBBR1MCS2-*mcpV-gfp*) (RU11/001(pRU2771)); D:  $\Delta visN/R$ (pBBR1MCS2-*mcpV-gfp*) (RU11/814(pRU2771)). Die Lokalisierung von IcpA-GFP in  $\Delta visN/R$  wurde auch in einer vorangehenden Arbeit untersucht (Meier, 2003). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop aufgenommen. Weiße Balken entsprechen 1  $\mu$ m.**

Da IcpA unabhängig von anderen Chemotaxisproteinen am Zellpol positioniert wird ließe sich im Umkehrschluss die Hypothese aufstellen, dass IcpA dort als „Anker“ für die anderen Rezeptoren am Pol dient. Wäre IcpA entscheidend für die polare Lokalisierung der anderen Rezeptoren in *S. meliloti*, sollte dessen Fehlen zu einer Delokalisierung der anderen Rezeptoren am Zellpol führen. Zur Untersuchung dieser Hypothese, wurde das *icpA*-Gen in verschiedenen GFP-Fusionsstämmen deletiert. Dazu wurde mit Hilfe von pRU1970 (Tab. 2; Muschler, 2000) eine *in-frame*-Deletion des *icpA*-Gens in das Genom von McpU- (RU13/211), McpY- (RU13/302) und CheA-GFP (RU13/243) eingeführt (3.7). Bei Betrachtung der resultierenden Stämme McpU-GFP( $\Delta icpA$ ) (RU13/328), McpY-GFP( $\Delta icpA$ ) (RU13/329) und CheA-GFP( $\Delta icpA$ ) (RU13/330) konnten für alle drei Fusionsproteine polare *cluster* in den Zellen

beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit scheint IcpA alleine nicht ausschlaggebend für die Lokalisierung der übrigen Rezeptoren zu sein.

#### 4.8.5 Sind die cytoplasmatischen Rezeptoren McpY und IcpA membranständig?

Die Fluoreszenzbilder von McpY-GFP und IcpA-GFP lassen keine Aussage über die zelluläre Lokalisierung dieser beiden Rezeptoren zu. Sie befinden sich zwar wie die membran-durchspannenden Rezeptoren am Pol der Zelle, aber sind sie nun cytoplasmatische oder membranassoziierte Proteine? Um diese Frage zu klären, wurden *S. meliloti*-Zellen fraktioniert (3.15) und auf das Vorhandensein der beiden Proteine untersucht. Motile *S. meliloti*-Zellen (3.1.2) wurden mittels French-Press-Passage aufgeschlossen und der Extrakt durch differentielle Zentrifugation in lösliche (Überstand) und unlösliche Fraktionen (Membranen) getrennt (3.15). Zur Abtrennung membranassoziiierter Proteine von den Membranen wurden diese mit 0,1 % Triton X-100 behandelt (3.15). In Abb. 50 sind die *Western blot*-Analysen zur Lokalisierung von McpY und IcpA dargestellt.



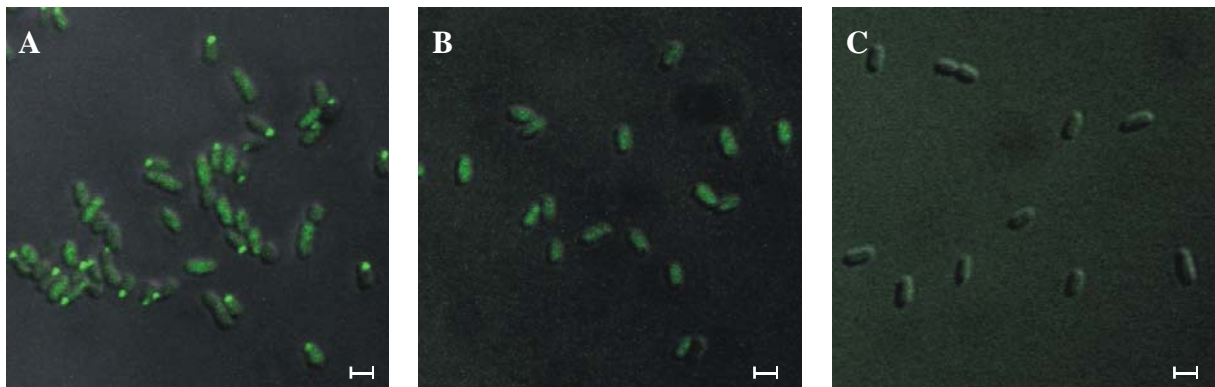
**Abb. 50. Western blot-Analyse zur Identifizierung von McpY (A) und IcpA (B) im Cytoplasma (Spuren 1 und 4), in den Membranen (Spuren 3 und 6) oder als membranassoziierte Proteine (Spuren 2 und 5) von *S. meliloti*-Zellen. Die Spuren 1 bis 3 stellen die Fraktionen von WT-Zellen, die Spuren 4 bis 6 von  $\Delta cheA$ -Zellen dar. Aufgetragen wurden die entsprechend behandelten Extrakte von 300 ml motilen *S. meliloti*-Zellen einer  $OD_{600} = 0,3$ . A: Detektion mit anti-McpY-Antikörper (1:100); B: Detektion mit anti-IcpA-Antikörper (1:100). Die Größe der Standardproteine (in kDa) ist links angegeben.**

Der anti-McpY-Antikörper weist eine dominante Bande bei 70 kDa in der cytoplasmatischen Fraktion nach (Abb. 50A, Spur 1). Diese Bande fehlt in der Fraktion der membranassoziierten Proteine und in der Membran-Fraktion vollständig (Abb. 50A, Spur 2 und 3). Die 60 kDa-Bande (Abb. 50A, Spur 3) ist vermutlich auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen. Im Gegensatz dazu konnte mit dem anti-IcpA-Antikörper in der Membranfraktion eine dominante Bande bei 60 kDa nachgewiesen werden (Abb. 50B, Spur 3), die sehr schwach auch in der Fraktion der membranassoziierten Proteine zu erkennen war (Abb. 50B, Spur 2), nicht jedoch in der cytoplasmatischen Fraktion (Abb. 50A, Spur 1). Die Bande bei 37 kDa ist vermutlich auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen. Zusätzlich zu den WT-Zellen wurden auch  $\Delta cheA$ -Zellen fraktioniert und die Fraktionen im *Western blot* auf das Vorhandensein von McpY und IcpA überprüft (Abb. 50A und B, Spuren 4 bis 6). Durch den Vergleich beider Stämme sollte eine mögliche Abhängigkeit der Rezeptorlokalisierung von CheA untersucht werden. Das Fraktionierungsmuster von McpY und IcpA war jedoch in beiden Stämmen identisch, so dass diese Rezeptoren unabhängig von CheA im Cytoplasma (McpY) bzw. an der Membran (IcpA) lokalisieren.

#### 4.8.6 Kolokalisierungsstudien von Rezeptoren und CheA

Zum Nachweis der Kolokalisierung von CheA und den Rezeptoren, wurden die beiden Proteine mit zwei verschiedenen Fluoreszenzproteinen markiert. Die Rezeptoren wurden mit GFP, CheA mit mRFP fusioniert (4.2.3).

Aber zunächst wurde die Lokalisierung von CheA mit Hilfe einer chromosomalen *cheA-gfp*-Fusion untersucht. Lokalisierungsstudien von Chemotaxisproteinen in *E. coli* zeigen, dass die Bildung des großen sensorischen Komplexes durch Wechselwirkungen zwischen CheA und den Rezeptoren begünstigt wird (Banno *et al.*, 2004; Cantwell *et al.*, 2003; Maddock & Shapiro, 1993; Shiomi *et al.*, 2002; Sourjik & Berg, 2000). Neuere Untersuchungen belegen, dass CheA nur in Anwesenheit von CheW mit den Rezeptoren lokalisiert, wohingegen CheW auch unabhängig von CheA mit den MCPs interagiert (Kentner *et al.*, 2006). Bei *S. meliloti* scheint dies ähnlich zu sein, denn CheA-GFP ist nur in Anwesenheit der Rezeptoren bzw. von CheW spezifisch am Pol der Zelle lokalisiert (Abb. 51; Riepl *et al.*, 2007). Fehlten die Rezeptoren oder CheW fluoreszierten die Zellen gleichmäßig (Abb. 51B und C), was auf eine vollständige Delokalisierung von CheA zurückzuführen ist. Die polare Lokalisierung von CheA ist somit von CheW und den Rezeptoren abhängig.

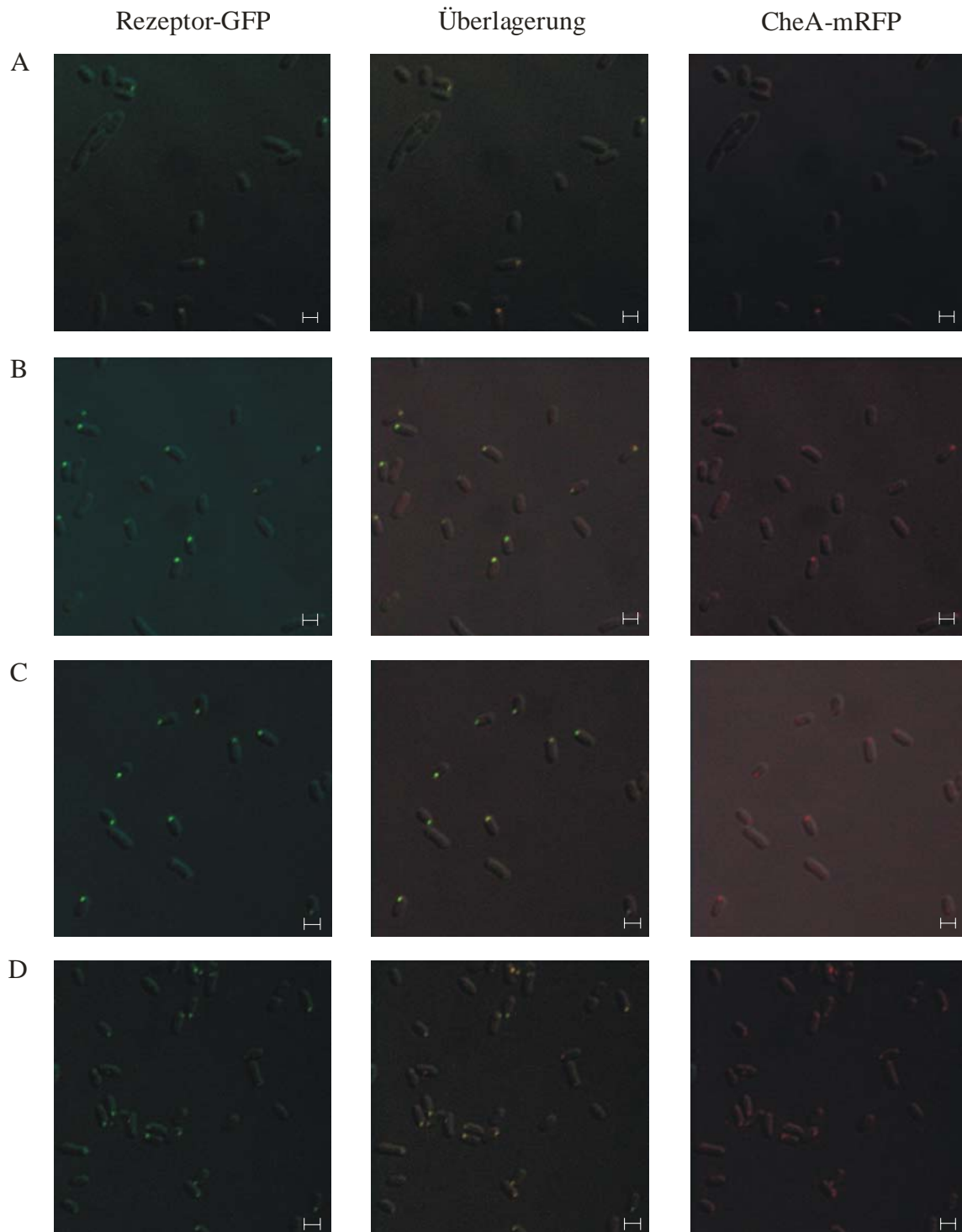


**Abb. 51. Lokalisierung der GFP-Fusion von CheA im WT, in einer  $\Delta 9$ - und einer  $\Delta cheW$ -Mutante von *S. meliloti*. A: CheA-GFP im WT (RU13/243); B: CheA-GFP in  $\Delta 9$  (RU13/310); C: CheA-GFP in  $\Delta cheW$  (RU13/321). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop aufgenommen. Weiße Balken entsprechen 1  $\mu$ m.**

Für die Kollokalisierungsstudien mit CheA-mRFP wurden IcpA als cytoplasmatischer, sowie McpV, McpX und McpZ als membran-durchspannende Rezeptoren ausgewählt. Die erzeugten Stämme tragen somit sowohl eine chromosomale Rezeptor-*gfp*-, als auch eine *cheA-mrfp*-Fusion (Tab. 1). Die zusätzliche Anregung des mRFP-Proteins erfolgte mit einem HeNe-Laser bei 543 nm (3.16). In Abb. 52 sind die Bilder mit nur GFP- bzw. nur mRFP-Anregung und ihre Überlagerungen dargestellt.

Für alle untersuchten Rezeptor-GFP-Fusionen konnte eine eindeutige Kollokalisierung mit CheA-mRFP gezeigt werden (Abb. 52). Sowohl die drei membran-durchspannenden Rezeptoren McpV (Abb. 52A), McpX (Abb. 52B) und McpZ (Abb. 52C), als auch der lösliche Rezeptor IcpA (Abb. 52D) sind gemeinsam mit CheA in einem *cluster* am Pol der Zelle lokalisiert. Außerdem wurde beobachtet, dass die *cluster* immer beide fluoreszenz-markierte Proteine enthielten. Zellen mit nur grün- oder nur rot-fluoreszierendem *cluster* traten nicht auf. Diese Untersuchung zeigt, dass die Rezeptoren mit CheA ein *cluster* bilden, so dass eine Signalweiterleitung von den Rezeptoren über CheA auf den Motor begünstigt wird.





**Abb. 52.** Lokalisierung von Rezeptor-GFP- und CheA-mRFP-Fusionen in *S. meliloti*. A: McpV-GFP CheA-mRFP (RU13/322); B: McpX-GFP CheA-mRFP (RU13/312); C: McpZ-GFP CheA-mRFP (RU13/313); D: IcpA-GFP CheA-mRFP (RU13/314). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *laser-scanning* Mikroskop aufgenommen. Weiße Balken entsprechen 1  $\mu\text{m}$ .

## 5 Diskussion

Die steigende Zahl der vollständig sequenzierten bakteriellen Genome in den letzten Jahren hat eine hohe Diversität und Komplexität der chemotaktischen Signaltransduktionsketten von Prokaryoten ans Licht gebracht. Im Gegensatz zu den gut untersuchten Enterobakterien *E. coli* und *S. enterica* serovar *typhimurium* besitzen viele motile Bakterienspezies zahlreiche homologe Chemotaxis- und Motilitäts-Gene. Unter anderem enthalten die meisten Bakteriengenome wesentlich mehr Chemorezeptorgene als das *E. coli*-Genom. Zum Beispiel haben Vertreter der  $\alpha$ -Untergruppe der Proteobakterien, wie *A. tumefaciens*, *C. crescentus*, *R. sphaeroides* und *R. leguminosarum* 20, 18, 13 bzw. sogar 26 MCPs oder MCP-ähnliche Proteine. Einige dieser Rezeptorproteine besitzen keine Transmembrandomänen und somit keine periplasmatische Domäne (Goodner *et al.*, 2001; Mackenzie *et al.*, 2001; Nierman *et al.*, 2001). Auch das *S. meliloti*-Genom, ein weiterer Vertreter der  $\alpha$ -Proteobakterien, enthält mehr Chemorezeptorgene als das Genom der Enterobakterien (Galibert *et al.*, 2001; Meier *et al.*, 2007; Muschler, 2000). Zusätzlich unterscheidet sich *S. meliloti* bezüglich seines Flagellenrotations-Modus und seiner Fähigkeit, die Schwimmgeschwindigkeit als eine Reaktion auf Lockstoffe zu erhöhen, vom enterobakteriellen Modellsystem (Attmannspacher *et al.*, 2005; Scharf, 2002; Sourjik & Schmitt, 1996). *S. meliloti* besitzt sieben Transmembran-Rezeptoren und zwei cytoplasmatische Rezeptoren, McpY und IcpA, die in dieser Arbeit von besonderem Interesse waren. McpY hat zwei PAS-Domänen (Abb. 22), die häufig an der Wahrnehmung von Redoxpotential, Sauerstoff und Licht beteiligt sind (Taylor & Zhulin, 1999), wohingegen IcpA keine besonderen Domänen aufweist, sich aber durch das Fehlen der hochkonservierten methylierbaren Reste auszeichnet (Abb. 23). Eine mögliche Funktion dieser beiden Rezeptoren wird später diskutiert.

Am C-Terminus von vier *S. meliloti*-MCPs befindet sich eine konservierte Pentapeptidsequenz, (N/D)WEEF, die homolog zu dem Motiv der *high abundance*-Rezeptoren von *E. coli* ist. Bei den *E. coli*-Rezeptoren dient dieses NWETF-Motiv als Bindestelle für CheR und CheB, die an der adaptiven Modifizierung der Rezeptoren beteiligt sind. Ob das auch für das (N/D)WEEF-Motiv von McpT, McpW, McpX und McpY bei *S. meliloti* der Fall ist, muss noch experimentell überprüft werden. Allerdings gibt es im Gegensatz zu *E. coli* für die *S. meliloti*-Rezeptoren keine Korrelation zwischen einem hohen Expressionsniveau und dem Vorhandensein dieser Sequenz (Abb. 38).

Ziel dieser Arbeit war, die einzelnen Rezeptoren von *S. meliloti* bezüglich ihrer Funktion bei der Chemotaxis und Symbiose zu analysieren und in die regulatorische Hierarchiekaskade des *flagellar regulon* von *S. meliloti* einzuordnen (Rotter *et al.*, 2006; Sourjik *et al.*, 2000). Außerdem wurde die Lokalisierung aller Rezeptoren, insbesondere die der beiden cytoplasmatischen Rezeptoren, McpY und IcpA, untersucht.

## 5.1 Rolle der Rezeptoren bei der Chemotaxis

Eine erste Einschätzung der Rolle einzelner Rezeptoren bei der Chemotaxis von *S. meliloti* erfolgte mit Hilfe von Schwärm-Analysen. Im Gegensatz zu chemotaktisch inaktiven *E. coli*-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind zu schwärmen, bilden derartige *S. meliloti*-Mutanten Schwärmringe mit einer Größe von 30 % des WT-Wertes (Abb. 24 – Abb. 26). Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Verhalten von *S. meliloti* liegt in der unterschiedlichen Rotationsregulation des Flagellenmotors. Bei *E. coli*-Zellen, die aufgrund der fehlenden Kinase-Aktivität chemotaktisch inaktiv sind, werden die Taumelbewegung unterdrückt, so dass sie nur geradlinige Läufe machen können (Abb. 2). Sie kollidieren mit dem Agar und werden im Agarnetz gefangen (Wolfe & Berg, 1989). Aufgrund der intrinsischen Geschwindigkeitsregulation des Flagellenmotors von *S. meliloti* können sich chemotaktisch inaktive Mutanten anscheinend wieder aus dem Agar befreien, so dass diese Zellen noch größere Schwärmringe bilden können. Aber auch die in diesen Mutanten noch minimal vorhandene Chemokinese-Aktivität (Tab. 8) kann als Ursache für dieses Verhalten nicht ausgeschlossen werden.

Über die Faktoren, die diese schwache Chemokinese-Reaktion der beiden Mutanten  $\Delta 9$  (RU13/149) und  $\Delta cheA$  (RU11/310) auslösen, kann nur spekuliert werden. Das Genom von *S. meliloti* enthält ein zweites *cheA*-Gen, *cheA2*, das im zweiten *che*-Operon lokalisiert ist (Abb. 17). Eine Beteiligung dieses CheA2-Proteins an der Chemotaxis kann jedoch ausgeschlossen werden, da die *cheA2*-Deletionsmutante den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp aufweist (Abb. 21). Mögliche Erklärungen sind zusätzliche Signaltransduktionswege: 1) Weitere Zwei-Komponenten-Systeme, die entweder direkt oder indirekt, durch Wechselwirkungen mit CheA und/oder CheY2, auf die Rotationsgeschwindigkeit des Flagellenmotors einwirken; 2) Fumarat und dessen Metabolite können direkt auf den Flagellenmotor einwirken. Fumarat wurde als Regulator der Rotationsrichtung des *E. coli*-Flagellenmotors beschrieben (Barak *et al.*, 1996; Montrone *et al.*, 1998).

Wenn kein Lockstoff an die *E. coli*-Rezeptoren gebunden ist, stimulieren diese die Aktivität der Kinase CheA, wodurch die Menge an phosphoryliertem CheY permanent ansteigt. Dies resultiert in einer erhöhten Taumelfrequenz. Die Deletion eines Rezeptorgens führt aufgrund der fehlenden Aktivierung der Kinase zu einer Verlängerung der geradlinigen Läufe. Für *S. meliloti* wurde ein vergleichbarer Effekt beobachtet. Eine Einzeldelation von sechs der neun Rezeptorgene führte zu einer Zunahme der Schwimgeschwindigkeit in verschiedenen Abstufungen (Tab. 8). Am stärksten war der Effekt bei der *mcpT*-Deletionsmutante. Überraschenderweise zeigten drei Deletionsmutanten eine Verlangsamung der Schwimgeschwindigkeit. Die  $\Delta mcpU$ -Mutante schwamm am langsamsten (Tab. 8). Vermutlich hemmt McpU die Kinaseaktivität von CheA, wenn kein Lockstoff vorhanden ist, wodurch die Schwimgeschwindigkeit zunimmt. Dieser Einfluss von McpU auf CheA könnte mit Hilfe von *in vitro*-Phosphorylierungstests geklärt werden.

McpU ist ein sehr wichtiger Rezeptor bei der Chemotaxis von *S. meliloti*, denn eine Deletion des *mcpU*-Gens führt zu einem fast vollständigen Verlust der Wahrnehmungsfähigkeit von Prolin, Histidin und Lysin (Abb. 28 und Abb. 29). Interessanterweise befinden sich in der periplasmatischen Domäne von McpU zwei kleinere Domänen, die für die Lockstofferkennung von Bedeutung sein könnten (Abb. 22). McpU besitzt sowohl eine TarH-Domäne, die der 4-Helix-Ligandenbindedomäne der *E. coli*-MCPs homolog ist, als auch eine Cache\_1-Domäne (Anantharaman & Aravind, 2000; Ulrich & Zhulin, 2005). Beide Domänen sind an der Erkennung und Bindung von kleinen Signalmolekülen beteiligt. Diese komplexe Domänenstruktur zeichnet McpU als einen besonderen Rezeptor aus. Die genaue Funktion der einzelnen Domänen muss noch untersucht werden. Mit Hilfe von Deletionen der entsprechenden Domänenbereiche könnte deren Beteiligung an der Lockstofferkennung und ggf. -bindung untersucht werden. Auch McpX besitzt eine Cache\_1-Domäne (Abb. 22) und hat sich interessanterweise als ein sehr wichtiger Rezeptor für die Wahrnehmung von Prolin und Lysin herausgestellt (Abb. 28 und Abb. 29). Es ist zu postulieren, dass die Cache\_1-Domäne an der Erkennung und Bindung dieser Klasse von Aminosäuren beteiligt ist. Die Rolle dieser Domäne bei der Lockstoffwahrnehmung könnte ebenfalls durch die Analyse einer entsprechenden Deletionsmutante im Kapillartest geklärt werden.

Die Chemorezeptoren von *S. meliloti* können ein breites Spektrum an chemischen Substanzen und auch Substanzklassen wahrnehmen (Abb. 26). Die Untersuchung auf Schwärmplatten zeigte, dass die Funktion der Rezeptoren von *S. meliloti* redundant ist. Somit kann jeder Rezeptor mehr als eine Substanz wahrnehmen und mehr als ein Rezeptor nimmt eine bestimmte Substanz wahr. Auch bei dieser Analyse wurde die Bedeutung von McpU

offensichtlich. Besonders die Wahrnehmung von Aminosäuren wird durch die Deletion des *mcpU*-Gens verschlechtert, d. h. McpU scheint für die Erkennung der bisher getesteten Aminosäuren essentiell zu sein. Ob sich dies auch für andere Aminosäureklassen bestätigt, werden zukünftige Untersuchungen zeigen. Aber auch die anderen Rezeptoren sind für eine optimale Reizantwort auf Aminosäuren notwendig. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschiedenen Rezeptoren alle zusammen arbeiten, um ein optimales gemeinschaftliches Signal zu generieren und um so die Funktionalität und Ausgewogenheit des Chemotaxis-Systems von *S. meliloti* gewährleisten zu können. Dafür sprechen auch die Komplementationsanalysen, denn bereits die Expression eines Rezeptors über Wildtyp-Niveau hinaus beeinträchtigt die Funktionalität des Chemotaxis-Systems (Tab. 10).

Mit Hilfe der Schwärmplatten-Analyse wurde ein qualitativer Überblick über die Beteiligung der einzelnen Rezeptoren an der Wahrnehmung vieler Substanzen gewonnen. Quantitativ genauere Aussagen liefert der Kapillartest. Allerdings ist die Untersuchung der Reaktion aller neun Rezeptormutanten und der entsprechenden Kontrollstämme auf nur eine Substanz im Kapillartest sehr arbeitsaufwändig, so dass ein erstes Screening immer auf Schwärmplatten durchgeführt wird. Zur Zeit wird für *E. coli* eine vereinfachte Kapillartest-Analyse mit fluoreszenz-markierten Zellen zur Quantifizierung erarbeitet (B. Scharf & H. Berg, pers. Mitteilung).

Offensichtlich sind die beiden cytoplasmatischen Rezeptoren, McpY und IcpA, sehr wichtig für die Chemokinese-Reaktion von *S. meliloti* (Tab. 8). Die Deletion keines anderen Rezeptors führt zu einem vergleichbaren Rückgang der Chemokinese. In einer Modellvorstellung könnten diese beiden Rezeptoren für die Wahrnehmung des metabolischen Zustandes der Zelle verantwortlich sein. Hinweise darauf würde die Untersuchung der Beteiligung von McpY und IcpA an der Chemokinese-Reaktion auf weitere Substanzen liefern. Interessant wäre auch eine Analyse der Reaktion der *mcpY*- und der *icpA*-Deletionsmutante auf Zucker und ihre nicht-verstoffwechselbaren Analoga, da für die Zuckerwahrnehmung eine Energietaxis bei *S. meliloti* nicht auszuschließen ist (Abb. 30). Aufgrund der cytoplasmatischen Lokalisierung von McpY und IcpA wäre eine Funktion bei der Messung des zellulären Energiehaushalts vorstellbar. Zur Klärung, ob es sich bei McpY und/oder IcpA um Sensoren des metabolischen Zustandes handelt, wurde eine Kooperation mit einer amerikanischen Arbeitsgruppe (G. Alexandre, University of Knoxville, TN, USA) begonnen. Durch Vergleiche der WT- und der Mutantenreaktion auf die Zugabe verschiedener Substanzen soll die Wahrnehmung des Energiestatus der Zelle durch die Rezeptoren untersucht werden. Dazu wird die

Beeinträchtigung des Elektronentransports durch die Atmungskette mit Hilfe von substituierten Quinonen, als eine Reaktion auf die Reizwahrnehmung, gemessen (Alexandre *et al.*, 2000).

## 5.2 Rolle der Rezeptoren bei der Symbiose

Nur wenn ein Bakterium in der Lage ist seine Wirtspflanze zu finden, kann es auch eine erfolgreiche Symbiose mit ihr eingehen. Für die Initiation der Symbiose sind die Wahrnehmung pflanzlicher Lockstoffe und das gezielte Aufsuchen der Wurzelhaare der Pflanze durch das Bakterium von entscheidender Bedeutung. Der Einfluss der Chemotaxis von *S. meliloti* für die Symbiose mit *M. sativa* wurde bereits in früheren Untersuchungen gezeigt. Chemotaxis- und/oder motilitätsdefiziente Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp bei der Etablierung der Symbiose benachteiligt (Ames & Bergmann, 1981; Brencic & Winans, 2005; Caetano-Anollés *et al.*, 1988; Hunter & Fahringer, 1980). Es ist nahe liegend, dass besonders die Rezeptoren eine spezifische Rolle beim Auffinden der Wirtspflanze spielen. Der Infektivitäts-Test mit dem rezeptorlosen  $\Delta 9$ -Stamm belegte diese Vermutung. Die Mutante bildete weniger Wurzelknöllchen als der Wildtyp (Abb. 34). Der Beitrag der einzelnen Rezeptoren zur Wahrnehmung der Wirtspflanze wurde im Kompetitivitäts-Test analysiert, da hier der direkte Vergleich zwischen WT und Mutante möglich ist. Die meisten Mutanten zeigten eine verminderte Konkurrenzfähigkeit im Vergleich zum WT, allerdings war diese nur für  $\Delta mcpT$ ,  $\Delta mcpY$  und  $\Delta mcpZ$  signifikant (Abb. 36). Dieses Ergebnis lieferte einen Hinweis auf die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren in den ersten Stadien der Symbiose. Allerdings wurden stärkere Effekte erwartet. Für *R. leguminosarum* wurde kürzlich eine eindeutige Benachteiligung von Chemotaxis-Mutanten im Kompetitivitäts-Test gezeigt (Miller *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung für die geringe Beeinträchtigung der *S. meliloti*-Mutanten ist der in dieser Arbeit verwendete Versuchsansatz. Für die Analysen der *R. leguminosarum*-Mutanten wurde zwar ebenfalls ein Kompetitivitätstest durchgeführt, aber unter anderen Versuchsbedingungen (Miller *et al.*, 2007). Die Wirtspflanzen wurden in Vermiculit-Festsubstraten angezogen, die wahrscheinlich die natürliche Situation im Boden besser simulieren, als das hier verwendete Flüssigmedium. Dadurch wird vermutlich die tatsächliche Konkurrenzsituation zwischen Wildtyp- und Mutanten-Stämmen im Boden besser dargestellt und der Einfluss von Chemotaxis und Motilität auf die Initiation der Symbiose kommt stärker zu tragen. Um die Funktion der Chemorezeptoren von *S. meliloti* bei der Initiation der Symbiose genauer zu analysieren, sollte der Kompetitivitätstest unter derartigen Bedingungen wiederholt werden.

Dennoch kann jetzt schon festgehalten werden, dass die Rezeptoren von *S. meliloti* für die Etablierung der Symbiose wichtig sind, weil sie den Bakterien in Konkurrenz mit anderen Bakterien einen Vorteil bei der Wirtsfindung verschaffen. Hat die Knöllchenbildung einmal begonnen und differenzieren die Bakterien zu Bakteroiden, werden Chemotaxis und Motilität nicht mehr benötigt und die Transkription der beteiligten Gene nimmt ab (Becker *et al.*, 2004; Yost *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte spezifisch eine Abnahme der Transkription der Rezeptorgene in den Wurzelknöllchen nachgewiesen werden (Tab. 12).

Das Genom von *S. meliloti* enthält zwei Chemotaxis-Operons (*che*-Operons; Abb. 16 und Abb. 17). Das erste Operon ist innerhalb des *flagellar regulon* auf dem Chromosom organisiert und ist essentiell für die Chemotaxis von *S. meliloti* (Sourjik *et al.*, 2000). Dagegen hat die Deletion von Komponenten des *che2*-Operons nur geringe Auswirkungen auf die Chemotaxis (Abb. 26 und Abb. 28). Auch ist die Aktivität des *che2*-Promotors unter den getesteten Bedingungen nur sehr gering (Abb. 38). Möglicherweise werden die Gene dieses Operons nur unter ganz spezifischen Bedingungen transkribiert. Eine attraktive Möglichkeit wäre eine Beteiligung bei der Symbiose, da sich dieses zweite Operon auf dem SymA-Plasmid befindet (Barnett *et al.*, 2001). So liegt direkt neben dem *che2*-Operon ein *pil*-Operon, dessen Genprodukte für die Anheftung der Rhizobien an die Wurzeln der Leguminosen benötigt werden. *P. aeruginosa* besitzt fünf *che*-Operons, von denen eines für die Regulation und Funktion der Typ IV-Pili verantwortlich ist (Whitchurch *et al.*, 2004). Eine vergleichbare Rolle wäre auch für das *che2*-Operon von *S. meliloti* vorstellbar. Tatsächlich zeigte die *mcpS*-Deletionsmutante in einem Kapillartest keine Reaktion mehr auf Samenexsudat (Abb. 32). Dieser erste Hinweis bedarf weiterer Untersuchungen, wie die Analyse der Promotoraktivitäten nach Stimulation mit pflanzlichen Lockstoffen, wie z. B. Flavonen.

Viele der Rezeptoren sind an der Wahrnehmung des Samenexsudats beteiligt, allerdings sind darin auch mehr als 200 verschiedene Substanzen enthalten. Hier müssen zukünftige Untersuchungen noch zwischen allgemeinen und pflanzenspezifischen Signalstoffen unterscheiden. Besonders wichtig scheinen neben McpS auch McpW und McpX zu sein. Auffällig ist die mangelnde Beteiligung der beiden cytoplasmatischen Rezeptoren an der Reaktion auf Samenexsudat (Abb. 32).

Die Funktionen der neun Chemorezeptoren bei der Chemotaxis und Symbiose von *S. meliloti* sind sehr vielfältig. Zur Gewinnung eines Überblicks über die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren sind in Tab. 14 die wesentlichen Eigenschaften zusammengefasst.

**Tab. 14. Übersicht über die Beteiligung einzelner Rezeptoren an Chemotaxis und Symbiose von *S. meliloti*.**

Rezeptor	Chemotaxis		Symbiose <sup>1)</sup>
	allgemeine Bedeutung <sup>1) 2)</sup>	Besonderheiten <sup>3)</sup>	(anhand von Abb. 36)
<b>McpS</b>	-	Samenexsudat	+
<b>McpT</b>	-		++
<b>McpU</b>	+++	Histidin, Lysin, Prolin	-
<b>McpV</b>	-		+
<b>McpW</b>	+	Samenexsudat	+
<b>McpX</b>	++	Lysin, Prolin, Samenexsudat	-
<b>McpY</b>	++	Prolin	++
<b>McpZ</b>	-		++
<b>IcpA</b>	++	Aerotaxis	+

<sup>1)</sup> Bedeutung der einzelnen Rezeptoren für Chemotaxis bzw. Symbiose:

+++ sehr wichtig; ++ wichtig; + beteiligt; - unwichtig;

<sup>2)</sup> Für die allgemeine Bedeutung der Rezeptoren wurden alle phänotypischen Untersuchungen zusammengefasst.

<sup>3)</sup> Besondere Beteiligung an der Wahrnehmung der entsprechenden Substanzen.

### 5.3 Einordnung der Rezeptoren in die Hierarchie des *flagellar regulon*

Die neun Chemorezeptorgene von *S. meliloti* liegen verstreut im Genom und sind überwiegend monocistronisch organisiert. Mit Ausnahme von *icpA* sind die anderen Rezeptorgene nicht in der 45 kb-Region des Chromosoms lokalisiert, die als *flagellar regulon* bezeichnet wird. Ob sie dennoch von den Regulatoren des *flagellar regulon*, VisN/R und Rem (Rotter *et al.*, 2006; Sourjik *et al.*, 2000) und dem Regulator der Flagellinsynthese, FlbT (Llewellyn *et al.*, 2005; Schönlein & Ely, 1989) kontrolliert werden, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von translationalen *lacZ*-Fusionen untersucht.

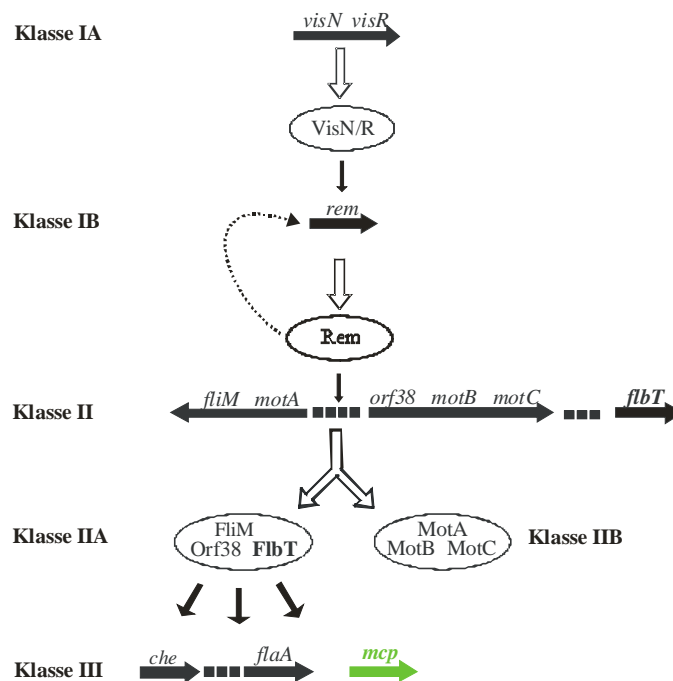


Für alle aktiven Rezeptor-Promotorkonstrukte wurde eine Korrelation der Proteinexpression mit der exponentiellen Wachstumsphase und somit mit der motilen Phase der Bakterien gezeigt (Abb. 39A und B). Diese konnte für IcpA auch durch *Western blot*-Analysen bestätigt werden (Abb. 39C). Die Aktivität der meisten Promotoren nahm mit Beginn des exponentiellen Wachstums drastisch zu, nur der *mcpY*-Promotor zeigte einen sehr schwachen Anstieg der Aktivität (Abb. 39). Die Abhängigkeit der Rezeptor-Expression von der motilen Phase der Bakterien legte die Vermutung nahe, dass die Rezeptorgene zum *flagellar regulon* gehören. Die fehlende oder stark verminderte Aktivität der meisten Rezeptor-Promotoren in den Regulator-Mutanten  $\Delta visN/R$  und  $\Delta rem$  zeigte, dass die Rezeptorgene von *S. meliloti* unter Kontrolle der Master-Regulatoren des *flagellar regulons* stehen (Tab. 11). Nur der *mcpY*-Promotor besitzt in  $\Delta visN/R$  und  $\Delta rem$  noch eine Aktivität von 50 % im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 11). Diese Tatsache wird später noch diskutiert.

Zusätzlich wurde die Aktivität der Rezeptor-Promotoren in einer  $\Delta flbT$ -Mutante untersucht. Bei *C. crescentus* ist FlbT ein negativer Regulator der Flagellin-Synthese (Llewellyn *et al.*, 2005; Schönlein & Ely, 1989). Reporter- und *Western blot*-Analysen zeigten, dass für *S. meliloti* das Gegenteil der Fall ist. Fehlt FlbT, werden keine Flagelline synthetisiert (B. Scharf, pers. Mitteilung). FlbT reguliert auch die Expression der Rezeptoren, denn die Aktivität der meisten Rezeptor-Promotoren sinkt signifikant in einem  $\Delta flbT$ -Stamm (Tab. 11). *Western blot*-Analysen mit dem anti-IcpA-Antikörper bestätigten das auch auf Proteinebene (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist, dass die Expression von McpY, und partiell von McpT, nicht durch FlbT reguliert wird.

Sowohl die schwache Regulation der Expression von McpY, als auch die wenig stringente Kopplung an die exponentielle Wachstumsphase, könnte für eine konstitutive Expression sprechen. Das würde auch mit einer Funktion von McpY als Sensor des metabolischen Zustandes korrelieren, da eine Überprüfung des Energiestatus einer Zelle unabhängig von der Wachstumsphase notwendig scheint. Andere Regulationsmechanismen, wie z. B. durch alternative  $\sigma$ -Faktoren, sind daher wahrscheinlich und sollten in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden. Das Genom von *S. meliloti* enthält insgesamt 13 Gene, die für  $\sigma$ -Faktoren kodieren (Galibert *et al.*, 2001). Davon konnte elf noch keine Funktion zugeordnet werden. Die Analyse der *mcpY*-Promotoraktivität in entsprechenden Deletionsmutanten könnte Aufschluss über einen derartigen Regulationsmechanismus bringen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können in einem erweiterten Schema der Regulationshierarchie des *flagellar regulon* von *S. meliloti* zusammengefasst werden (Abb. 53). Ein kürzlich erstelltes Schema (Rotter *et al.*, 2006) wird dabei durch die Einordnung der Rezeptorgene als Klasse III-

Gene und durch FlbT (Klasse IIA), einen positiven Regulator für die Klasse III-Gene, erweitert.



**Abb. 53. Modellvorstellung zur erweiterten Regulationshierarchie des *flagellar regulons* von *S. meliloti*, verändert nach Rotter *et al.*, 2006. Die Schrittweise Assemblierung der Flagellen wird durch die vierstufige Regulationskaskade widerspiegelt. Erklärung siehe Abb. 4. Fettgedruckt hervorgehoben die Einordnung von FlbT. Grün die Einordnung der Rezeptorgene.**

## 5.4 Lokalisierung der Rezeptoren von *S. meliloti*

Die Komponenten des Chemotaxissystems aller bisher untersuchten Bakterienspezies lokalisieren in großen spezifischen Komplexen. Die Bildung dieser Komplexe wird durch die Interaktion der Chemorezeptoren untereinander ausgelöst. Chemorezeptoren bilden große Netzwerke, an die andere Chemotaxisproteine binden. Bisher sind drei verschiedene Positionierungen beschrieben worden: 1) die polare Lokalisierung von Transmembranrezeptoren bei *E. coli* (Lybarger & Maddock, 2001; Maddock & Shapiro, 1993); 2) die Lokalisierung von Transmembranrezeptoren am Zellpol und von löslichen Rezeptoren ohne Transmembrandomänen in definierten Regionen im Cytoplasma bei *R. sphaeroides*

(Harrison *et al.*, 1999; Wadhams *et al.*, 2003); und 3) die polare Lokalisierung von Rezeptoren ohne Transmembrandomänen bei *P. aeruginosa* (Bardy & Maddock, 2005).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisierung der einzelnen Rezeptoren von *S. meliloti* zu untersuchen. Von besonderem Interesse war die Lokalisierung der beiden cytoplasmatischen Rezeptoren McpY und IcpA. Befinden sich diese am Zellpol oder im Cytoplasma? Ausgehend von den bisher untersuchten Bakterienspezies könnte man eine dem nah verwandten  $\alpha$ -Proteobakterium *R. sphaeroides* analoge Lokalisierung erwarten. Dort bildet TlpC, ein löslicher Rezeptor, *cluster* im Cytoplasma und ist dort für die korrekte Positionierung der anderen Chemotaxisproteine in diesem Komplex verantwortlich (Wadhams *et al.*, 2002; Wadhams *et al.*, 2003). Interessanterweise befinden sich bei *S. meliloti* sowohl IcpA, als auch McpY am Pol der Zelle (Abb. 44). Sie lokalisieren dort gemeinsam mit den anderen MCPs von *S. meliloti* (Abb. 44). Dieses Muster ist eher mit der Lokalisierung der Rezeptoren in *P. aeruginosa* zu vergleichen, obwohl *P. aeruginosa* als Vertreter der  $\gamma$ -Untergruppe der Proteobakterien phylogenetisch weiter von *S. meliloti* entfernt ist. Somit scheint die Positionierung cytoplasmatischer Rezeptoren nicht in einer phylogenetischen Gruppe entstanden und dann erhalten geblieben zu sein, sondern hat sich unabhängig entwickelt. Bei *R. sphaeroides* ist die cytoplasmatische TlpC-Lokalisierung abhängig von einem Protein-Positionierungsfaktor (PpfA), der zu ParA (TypI-DNA-Partitionierungsfaktor) homolog ist (Thompson *et al.*, 2006). Möglicherweise ist diese Lokalisierungs-Regulation eine Anpassung an die intracytoplasmatischen Membranen des Purpurbakteriums *R. sphaeroides*, in die Chlorophyll- und Carotinoidpigmente eingelagert sind.

Die gemeinsame Lokalisierung von McpY- und IcpA-GFP mit den anderen Rezeptoren in einem großen *cluster* am Pol der Zelle (Abb. 44) ließ die Frage offen, ob die beiden Proteine frei im Cytoplasma und lediglich durch die Interaktion mit anderen Rezeptoren polar vorliegen oder ob sie zusätzlich an die Membran assoziiert sind. Bei der *Western blot*-Analyse von fraktionierten *S. meliloti*-Zellextrakten konnte McpY im Cytoplasma und IcpA in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Abb. 50). Die Lokalisierung von McpY im Cytoplasma wird durch computergestützte Sekundärstrukturanalysen der McpY-Polypeptidsequenz mit SPLIT 4.0 (Juretic *et al.*, 2002) und SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) belegt, die keine hydrophoben Bereiche in McpY identifizieren konnten. Die Lokalisierung von McpY im Rezeptor-*cluster* am Pol der Zelle wird somit durch die Interaktion mit den anderen Rezeptoren bzw. mit CheA und/oder CheW verursacht. Dies wird durch zwei Experimente belegt: 1) McpY-GFP konnte nur in sehr wenigen Zellen (11 %) im *cluster* am Pol

nachgewiesen werden (Abb. 44; Abb. 47); 2) die Zahl der Zellen mit einer polaren Lokalisierung von McpY nimmt in Abwesenheit von CheA und CheW weiter ab (Abb. 47). In einem ansonsten rezeptorlosen Stamm konnte das chromosomal exprimierte Fusionsprotein gar nicht mehr in einem polaren *cluster* nachgewiesen werden (Abb. 48). Die Interaktionen zwischen McpY, CheA, CheW und anderen Rezeptoren sollte durch *crosslinking*-Experimente überprüft werden. Mit Hilfe von Immunogold-Studien könnte die Abhängigkeit der Lokalisierung im Rezeptor-*cluster* von anderen Komponenten genauer untersucht werden.

Wie wird IcpA in der Membran verankert? Der cytoplasmatische Rezeptor Aer aus *E. coli* ist über einen 38 AS großen hydrophoben Bereich in der Cytoplasmamembran verankert (Amin *et al.*, 2006). Vergleiche der Polypeptid-Sequenzen von IcpA und Aer aus *E. coli* lieferten keine entsprechenden Homologien und machten eine Verankerung von IcpA über einen entsprechenden hydrophoben Membrananker unwahrscheinlich. Computergestützte Sekundärstrukturanalysen der IcpA-Polypeptidsequenz mit SPLIT 4.0 (Juretic *et al.*, 2002) und SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) identifizierten ebenfalls keine Transmembran-Helices. Eine Interaktion über kleinere hydrophobe Bereiche kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Ob IcpA durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen an die Membran gebunden ist, muss noch untersucht werden, wobei Genprodukte des *flagellar regulon* ausgeschlossen werden können, da IcpA-GFP auch in Abwesenheit dieser Komponenten am Pol lokalisiert (Abb. 46). Mögliche Interaktionspartner wären Komponenten des Cytoskeletts oder Bestandteile der Cytoplasmamembran, wie z. B. Cardiolipin (Johnson *et al.*, 2004).

Diese Faktoren könnten auch eine spezifische Funktion bei der polaren Lokalisierung aller Chemorezeptoren haben. Bisher ist noch nicht verstanden, warum sich die Rezeptoren ausgerechnet am Zellpol zu einem *cluster* formieren, da für Signalamplifikation und -weiterleitung nur die Organisation in höher geordneten Komplexen per se essentiell ist, nicht aber die Lokalisierung am Pol (Bray *et al.*, 1998; Lybarger *et al.*, 2005). Es gibt verschiedene Modelle, die versuchen diesen Sachverhalt zu erklären: 1) Die Rezeptoren werden durch Einstülpungen der Membran in diese Position gedrängt (Lefman *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007); 2) Unterschiede in der Lipidkomposition der Membran verursachen ein optimales Milieu für die Anlagerung der Chemorezeptoren (Johnson *et al.*, 2004); 3) Spezielle, bisher nicht identifizierte, Faktoren des Cytoskeletts positionieren die Rezeptoren am Zellpol.

Eindeutig belegt ist jedoch, dass die Rezeptor-*cluster* von *E. coli* durch CheA und CheW stabilisiert werden (Kentner *et al.*, 2006; Lybarger & Maddock, 1999; Maddock & Shapiro, 1993; Skidmore *et al.*, 2000; Sourjik & Berg, 2000). Dies trifft auch auf die meisten Rezeptoren von *S. meliloti* zu (Abb. 47A). Nur McpV, McpX und IcpA lokalisieren

unabhängig von CheA und CheW am Pol der Zelle (Abb. 47A und Tab. 13). Möglicherweise wird diese CheA- und CheW-unabhängige Positionierung am Pol durch eine Interaktion der Rezeptoren untereinander begünstigt. Über mögliche weitere Interaktionspartner, wie Komponenten des Cytoskeletts oder der Cytoplasmamembran, wurde bereits bei der IcpA-Lokalisierung diskutiert. Die Interaktion der Rezeptoren untereinander könnte mit Hilfe von FRET-Messungen untersucht werden.

Die fehlende polare Lokalisierung von McpS könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die Komponenten, die McpS an den Pol binden oder in einem *cluster* stabilisieren, unter den entsprechenden Versuchsbedingungen nicht exprimiert werden. Vorstellbar wäre eine Induktion der Expression durch spezielle pflanzliche Lockstoffe, wie sie für die Wahrnehmung von Samenexsudat durch McpS diskutiert wurde (5.2). Diese Hypothese könnte durch die Untersuchung der McpS-Lokalisierung nach Stimulation mit pflanzlichen Lockstoffen überprüft werden.

Wird bei *S. meliloti* nur ein Transmembranrezeptor, gezeigt für McpU und McpW, exprimiert, bilden diese keine *cluster* mehr. Dagegen lokalisiert der cytoplasmatische Rezeptor IcpA als einziger Rezeptor immer noch am Pol (Abb. 49). Dieses Verhalten ist unabhängig von der Anwesenheit des NWETF-Motivs, das bei *E. coli* die Lokalisierung der Rezeptoren reguliert (Lybarger & Maddock, 2000).

Eine interessante Hypothese, nämlich die Rekrutierung anderer Rezeptoren und Chemotaxisproteine an den Zellpol, durch IcpA, konnte leider nicht bestätigt werden. Die untersuchten Rezeptoren McpU und McpY und auch die Histidinkinase CheA lokalisieren auch ohne IcpA am Pol der Zelle. IcpA ist daher nicht essentiell für die Etablierung des Rezeptor-*clusters*. Eingehende Untersuchungen der „Außenseiter“-Rolle von IcpA sind daher vonnöten.

## 5.5 Ausblick

Wie so üblich, wirft die Beantwortung von Fragen wieder neue Fragen auf:

- Welche Funktion haben die periplasmatischen Domänen Cache\_1 und TarH von McpU und McpX? Ist die Cache\_1-Domäne an der Bindung und Erkennung von Aminosäuren beteiligt? Die Funktion dieser Domänen könnte durch eine phänotypische Charakterisierung entsprechender Deletionsmutanten geklärt werden. Ein Vergleich der

Reaktionskurven dieser Mutanten auf Aminosäuren im Kapillartest mit denen der  $\Delta mcpU$ - bzw.  $\Delta mcpX$ -Mutante gäbe eine quantitative Antwort auf diese Frage.

- Welche Funktion haben die beiden cytoplasmatischen Rezeptoren McpY und IcpA?
  - Ob es sich bei McpY wirklich um einen Energie- oder Redoxsensor handelt, wird hoffentlich in Zusammenarbeit mit G. Alexandre (University of Knoxville, TN, USA) geklärt werden. Dazu werden Quinon-Assays durchgeführt, die durch Lockstoff-Zugabe verursachte Veränderungen des Redoxpotentials in der Zelle messen.
  - Für den *S. meliloti*-Wildtyp, aber auch für die  $\Delta mcpY$ -Mutante, konnte eine Aerotaxis-Reaktion nachgewiesen werden, die der  $\Delta 9$ -Mutante fehlt (G. Alexandre, pers. Mitteilung). Somit kann eine Beteiligung von McpY an der Aerotaxis-Antwort ausgeschlossen werden. Zur Klärung, ob IcpA für die Aerotaxis-Reaktion verantwortlich ist, sind Aerotaxis-Experimente mit der  $\Delta icpA$ -Mutante geplant (in Zusammenarbeit mit G. Alexandre, University of Knoxville, TN, USA).
- Diese Arbeit lieferte Hinweise auf eine Funktion der Rezeptoren für die Etablierung der Symbiose mit *M. sativa*. Eine Wiederholung der Kompetitivitäts-Tests unter anderen Bedingungen wäre wünschenswert. Als geeignet für *R. leguminosarum* haben sich Vermiculit-Ansätze erwiesen.
- Die Rolle von McpS bei der Wahrnehmung von der Pflanze sezernierter Lockstoffe muss noch genauer untersucht werden. In zukünftigen Arbeiten sollte die Reaktion auf Flavone und pflanzenspezifische Substanzen, wie Luteolin, das die Expression der Nod-Faktoren von *S. meliloti* induziert, getestet werden.
- Luteolin ist auch ein gutes Stichwort für einen möglichen Regulationsmechanismus des zweiten *che*-Operons. Da die *mcpS*-Deletionsmutante nicht mehr auf Samenexsudat reagiert, wäre eine Induzierung des zweiten *che*-Operons durch spezifische Pflanzenstoffe gut vorstellbar. Ein Vergleich der Promotor-Aktivitäten von Zellen, denen verschiedene spezifische Samenexsudats-Inhaltsstoffe, wie Luteolin und andere Flavone, zum Wachstumsmedium zugesetzt wurden, würde diese Hypothese verifizieren oder falsifizieren.

- 
- Auf welche Substanzen des Samenexsudats reagiert *S. meliloti* besonders gut? Eine Auftrennung einzelner Komponenten des Samenexsudats mittels HPLC und Analyse der Fraktionen im Kapillartest könnte die Identifizierung spezifischer Liganden für einzelne Rezeptoren erlauben.
  - Wie stellt sich die Interaktion der Rezeptoren untereinander und mit CheA und CheW dar? Nach Erzeugung hochspezifischer Antikörper gegen cytoplasmatische und Transmembranrezeptoren könnten Ko-Immunpräzipitationen Aufschluss über die Interaktionen geben. Auch die Durchführung von Plasmon-Resonanz-Analysen, ITC- oder FRET-Messungen könnte die Interaktionen verifizieren.
  - Wie bindet IcpA an die Cytoplasmamembran? Warum bilden die Rezeptoren *cluster* am Zellpol? Diese Fragen zu beantworten, wird noch viele Untersuchungen erfordern.

## 6 Zusammenfassung

Sieben der neun Chemorezeptoren von *S. meliloti*, nämlich McpS, McpT, McpU, McpV, McpW, McpX und McpZ, zeigen die für MCPs charakteristische Struktur. Die beiden anderen Rezeptoren McpY und IcpA unterscheiden sich vor allem durch das Fehlen der Transmembrandomänen von den klassischen MCPs. IcpA weist nur aufgrund der vorhandenen MCP-Signaldomäne, der allerdings die methylierbaren Reste fehlen, eine Ähnlichkeit zu den anderen Rezeptoren auf. Da bisher nur wenig über diese Rezeptoren bekannt war, wurde in der vorliegenden Arbeit der Beitrag der einzelnen Rezeptoren von *S. meliloti* zu Chemotaxis und Symbiose analysiert. Die Expression der Rezeptorgene wurde in die regulatorische Hierarchiekaskade des *flagellar regulon* von *S. meliloti* eingeordnet. Außerdem wurde die Lokalisierung aller Rezeptoren, insbesondere die der beiden cytoplasmatischen Rezeptoren, McpY und IcpA, untersucht.

Beitrag der Rezeptoren zur Chemotaxis:

- Deletionen einzelner Rezeptorgene führten zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Beeinträchtigung des Schwärmvermögens der Mutanten auf Bromfield-Schwärmplatten. Die kleinsten Schwärmringe wurden durch  $\Delta mcpU$ ,  $\Delta mcpX$  und  $\Delta icpA$  erzeugt, was den besonderen Anteil dieser Rezeptoren an der Chemotaxis von *S. meliloti* zeigt.
- McpU, McpY und McpZ hemmen, anders als die übrigen Rezeptoren, die Aktivität von CheA. Auffällig war auch die signifikant reduzierte Chemokinese-Reaktion von *mcpY*- und *icpA*-Deletionsmutanten. Es wird postuliert, dass McpY und IcpA als interne Sensoren des metabolischen Zustandes der Zelle dienen. Anders als beim nah verwandten  $\alpha$ -Proteobakterium *A. brasiliense*, kann für *S. meliloti* die Fähigkeit der Energietaxis auf Aminosäuren und organische Säuren ausgeschlossen werden.
- Im Gegensatz zu den spezifischen *E. coli*-MCPs, kann jeder Rezeptor von *S. meliloti* mehrere Substanzen und Substanzklassen wahrnehmen. Trotz dieser redundanten Funktion ist ein ausgewogenes Verhältnis der Rezeptoren entscheidend für eine optimale chemotaktische Reaktion.



- Sowohl Schwärmlatten-Analysen als auch Kapillartests definierten McpU als essentiellen Sensor für Histidin, Lysin und Prolin. McpX ist ein wichtiger Sensor für Lysin und Prolin, nicht aber für Histidin.

#### Beitrag der Rezeptoren zur Symbiose:

- An der Wahrnehmung von pflanzlichen Lockstoffen (Samenexsudat) sind alle Rezeptoren, außer McpY und IcpA, beteiligt. Besonders auffällig ist der Reaktionsverlust der  $\Delta mcpS$ -Mutante, die bei anderen getesteten Substanzen nur minimale Reizantworten zeigte.
- Der Infektivitätstest bestätigte die Beteiligung der Rezeptoren von *S. meliloti* an der Etablierung der Symbiose. Allerdings wurde lediglich für  $\Delta mcpT$ ,  $\Delta mcpY$  und  $\Delta mcpZ$  eine signifikant reduzierte Kompetitivität zum Wildtyp ermittelt. Für derartig niedrige Effekte scheint der verwendete Versuchsansatz nicht sensitiv genug zu sein.

#### Expression der Rezeptoren:

- Die Rezeptorgene von *S. meliloti* werden unterschiedlich stark exprimiert. Aufgrund von Reporter-gen-Analysen sind McpU und McpX die Hauptrezeptoren von *S. meliloti* (60 % der Gesamtaktivität). Eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein des (N/D)WEEF-Motivs und der Expressionsstärke der Rezeptoren gibt es, anders als bei *E. coli*, nicht.
- Die Expression der Rezeptorgene wird in der exponentiellen Wachstumsphase hoch- und in Wurzelknöllchen herabreguliert. Für die Kopplung der Expression an die Motilität der Bakterien sind die Masterregulatoren des *flagellar regulon* verantwortlich. Nur McpY und McpT scheinen zusätzlich durch andere Mechanismen reguliert zu werden. Alle Rezeptorgene können als Klasse III-Gene in das *flagellar regulon* integriert werden.

#### Lokalisierung der Rezeptoren:

- Mit Ausnahme von McpS sind alle Rezeptoren von *S. meliloti* am Zellpol lokalisiert. Kolo-kalisierungsstudien bestätigen, dass sich die Rezeptoren in einem *cluster* am Pol der Zelle befinden und dass auch CheA an diesen Pol rekrutiert wird. Die polare Lokalisierung von McpT, McpU, McpW, McpY und McpZ ist von CheA, CheW und den anderen Rezeptoren abhängig, während McpV, McpX und IcpA unabhängig von diesen Proteinen am Zellpol lokalisiert sind. IcpA lokalisiert zudem unabhängig von allen anderen Proteinen des *flagellar regulon* am Zellpol. Eine Funktion von IcpA als „Anker“ für die anderen Rezeptoren konnte jedoch nicht bestätigt werden.

- Die Lokalisierung der Rezeptoren während der Zellteilung wurde beispielhaft für die beiden cytoplasmatischen Rezeptoren McpY und IcpA und den Transmembranrezeptor McpV untersucht. Für fluoreszenzmarkiertes McpY und IcpA wurde während der Zellelongation am gegenüberliegenden Zellpol ein neues Rezeptor-*cluster* sichtbar, das nach der Teilung schnell größer wurde. Anders als für *E. coli*-MCPs, konnte das Entstehen eines neuen McpV-*cluster* am Septum beobachtet werden.
- *Western blot*-Analysen von fraktionierten *S. meliloti*-Zellen wiesen McpY im Cytoplasma nach, während IcpA in der Membranfraktion detektiert wurde. Im Unterschied zu den cytoplasmatischen *Rhodobacter*-Rezeptoren, die in der Mitte der Zelle lokalisiert sind, befinden sich McpY und IcpA gemeinsam mit den anderen Rezeptoren am Zellpol.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adler, J.** 1966. Chemotaxis in bacteria. *Science* **153**:708-716.
- Adler, J.** 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **74**:77-91.
- Alexandre, G., S. E. Greer, and I. B. Zhulin.** 2000. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **182**:6042-6048.
- Alexandre, G., S. Greer-Phillips, and I. B. Zhulin.** 2004. Ecological role of energy taxis in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:113–126.
- Alley, M. R., J. R. Maddock, and L. Shapiro.** 1992. Polar localization of a bacterial chemoreceptor. *Genes Dev.* **6**:825-836.
- Ames, P., and K. Bergman.** 1981. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **148**:728-729.
- Ames, P., C. A. Studdert, R. H. Reiser, and J. S. Parkinson.** 2002. Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:7060–7065.
- Amin, D. N., B. L. Taylor, and M. S. Johnson.** 2006. Topology and boundaries of the aerotaxis receptor Aer in the membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**:894-901.
- Ampe, F., E. Kiss, F. Sabourdy, and J. Batut.** 2003. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol.* **4**:R15.
- Anantharaman, V., and L. Aravind.** 2000. Cache - a signaling domain common to animal Ca(2<sup>+</sup>)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem. Sci.* **25**:535-537.
- Antommattei, F. M., J. B. Munzner, and R. M. Weis.** 2004. Ligand-specific activation of *Escherichia coli* chemoreceptor transmethylation. *J. Bacteriol.* **186**:7556-7563. Erratum in: *J. Bacteriol.* 2005. **187**:811.
- Aravind, L., and C. P. Ponting.** 1999. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**:111-116.
- Armitage, J. P.** 1999. Bacterial tactic responses. *Adv. Microb. Physiol.* **41**:229–289.
- Attmannspacher, U., B. Scharf, and R. Schmitt.** 2005. Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **56**:708-718.
- Baker, M. D., P. M. Wolanin, and J. B. Stock.** 2006. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays.* **28**:9-22.
- Banno, S., D. Shiomi, M. Homma, and I. Kawagishi.** 2004. Targeting of the chemotaxis methylesterase/deamidase CheB to the polar receptor-kinase cluster in an *Escherichia coli* cell. *Mol. Microbiol.* **53**:1051-1063.
- Barak, R., I. Giebel, and M. Eisenbach.** 1996. The specificity of fumarate as a switching factor of the bacterial flagellar motor. *Mol. Microbiol.* **19**:139-144.

- Barbour, W. M., D. Hattermann, and G. Stacey.** 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2635-2639.
- Bardy, S. L., and J. R. Maddock.** 2005. Polar localization of a soluble methyl-accepting Protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**:7840-7844.
- Barnakov, A. N., L. A. Barnakova, and G. L. Hazelbauer.** 1999. Efficient adaptational demethylation of chemoreceptors requires the same enzyme-docking site as efficient methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:10667-10672.
- Barnakov, A. N., L. A. Barnakova, and G. L. Hazelbauer.** 2001. Location of the receptor-interaction site on CheB, the methyl-esterase response regulator of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **276**:32984-32989.
- Barnakov, A. N., L. A. Barnakova, and G. L. Hazelbauer.** 2002. Allosteric enhancement of adaptational demethylation by a carboxyl-terminal sequence on chemoreceptors. *J. Biol. Chem.* **277**:42151-42156.
- Barnett, M. J., R. F. Fisher, T. Jones, C. Komp, A. P. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, M. Gurjal, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, C. Palm, M. C. Peck, R. Surzycki, D. H. Wells, K. C. Yeh, R. W. Davis, N. A. Federspiel, and S. R. Long.** 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9883-9888.
- Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E. L. Sonnhammer, D. J. Studholme, C. Yeats, and S. R. Eddy.** 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32**:D138-141.
- Bauer, W. D., and G. Caetano-Anollés.** 1990. Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. *Plant Soil.* **129**:45-52.
- Becker, A., H. Bergès, E. Krol, C. Bruand, S. Rüberg, D. Capela, E. Lauber, E. Meilhoc, F. Ampe, F. J. De Bruijn, J. Fourment, A. Francez-Charlot, D. Kahn, H. Küster, C. Liebe, A. Pühler, S. Weidner, and J. Batut.** 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **17**:292-303.
- Berg, H. C., and D. A. Brown.** 1972. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature.* **239**:500-504.
- Berg, H. C.** 2000. Constraints on models for the flagellar rotary motor. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**:491-501.
- Bergman, K., M. Gulash-Hoffee, R. E. Hovestadt, R. C. Larosiliere, P. G. Ronco 2nd, and L. Su.** 1988. Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. *J. Bacteriol.* **170**:3249-3254.
- Beringer, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**:188-198.
- Bibikov, S. I., R. Biran, K. E. Rudd, and J. S. Parkinson.** 1997. A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:4075-4079.
- Bibikov, S. I., A.C. Miller, K. K. Gosink, and J. S. Parkinson.** 2004. Methylation-independent aerotaxis mediated by the *Escherichia coli* Aer protein. *J. Bacteriol.* **186**:3730-3737.

- Bordignon, E., J. P. Klare, M. Doebber, A. A. Wegener, S. Martell, M. Engelhard, and H. J. Steinhoff.** 2005. Structural analysis of a HAMP domain: the linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II. *J. Biol. Chem.* **280**:38767-38775.
- Borkovich, K. A., and M. I. Simon.** 1990. The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis. *Cell* **63**:1339-1348.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Bray, D. F., M. D. Levin, and C. J. Morton-Firth.** 1998. Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature.* **393**:85-88.
- Brencic, A., and S. C. Winans.** 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:155-194.
- Brewin, N. J.** 1991. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:191-226.
- Burg, D., J. Guillaume, and R. Tailliez.** 1982. Chemotaxis by *Rhizobium meliloti*. *Microbiology* **133**:162-163.
- Caetano-Anollés, G., L. G. Wall, A. T. D. Micheli, E. M. Macchi, W. D. Bauer, and G. Favelukes.** 1988. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant. Physiol.* **86**:1228-1235.
- Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien.** 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:7877-7882.
- Cantwell B. J., R. R. Draheim, R. B. Weart, C. Nguyen, R. C. Stewart, M. D. Manson.** 2003. CheZ phosphatase localizes to chemoreceptor patches via CheA-short. *J. Bacteriol.* **185**:2354-2361.
- Chilcott, G. S., and K. T. Hughes.** 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:694-708. Review.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* **173**:33-38.
- Dakora, F. D., C. M. Joseph, and D. A. Phillips.** 1993. *Alfalfa* (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant. Physiol.* **101**:819-824.
- de Maagd, R. A., I. H. Mulders, H. C. Canter Cremers, and B. J. Lugtenberg.** 1992. Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a symbiotically repressed outer membrane protein. *J. Bacteriol.* **174**:214-221.
- Dénarié, J., F. Debelle, and J. C. Prome.** 1996. *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:503-535. Review.
- Dharmatilake, A. J., and W. D. Bauer.** 1992. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from *alfalfa* roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1153-1158.
- Eggenhofer, E., M. Haslbeck, and B. Scharf.** 2004. MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **52**:701-712.

- Ely, B., C. J. Gerardot, D. L. Fleming, S. L. Gomes, P. Frederikse, and L. Shapiro.** 1986. General nonchemotactic mutants of *Caulobacter crescentus*. *Genetics* **114**:717-730.
- Falke, J. J., and G. L. Hazelbauer.** 2001. Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem. Sci.* **26**:257-265.
- Feng, X., A. A. Lilly, and G. L. Hazelbauer.** 1999. Enhanced function conferred on low-abundance chemoreceptor Trg by a methyltransferase-docking site. *J. Bacteriol.* **181**:3164-3171.
- Fischer, H. M.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**:352-386. Review.
- Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas, and D. J. DeRossier.** 1994. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**:1261-1270.
- Gage, D. J.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:280-300.
- Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dreano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F. J. Vorholter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K. C. Yeh, and J. Batut.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668-672.
- García-Rodríguez, F. M., and N. Toro.** 2000. *Sinorhizobium meliloti nfe* (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **43**:583-591.
- Gardy, J. L., M. R. Laird, F. Chen, S. Rey, C. J. Walsh, M. Ester, and F. S. Brinkman.** 2005. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* **21**:617-623.
- Gaworzewska, E. T., and M. J. Carlile.** 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* **128**:1179-1188.
- Gegner, J. A., D. R. Graham, A. F. Roth, and F. W. Dahlquist.** Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell.* **70**:975-982.
- Gestwicki, J. E., A. C. Lamanna, R. M. Harshey, L. L. McCarter, L. L. Kiessling, and J. Adler.** 2000. Evolutionary conservation of methyl accepting chemotaxis protein location in Bacteria and Archaea. *J. Bacteriol.* **182**:6499-6502.
- González, J. E., and M.M. Marketon.** 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing *Rhizobia*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**:574-592.

- Goodner, B., G. Hinkle, S. Gattung, N. Miller, M. Blanchard, B. Quorollo, B. S. Goldman, Y. Cao, M. Askenazi, C. Halling, L. Mullin, K. Houmiel, J. Gordon, M. Vaudin, O. Iartchouk, A. Epp, F. Liu, C. Wollam, M. Allinger, D. Doughty, C. Scott, C. Lappas, B. Markelz, C. Flanagan, C. Crowell, J. Gurson, C. Lomo, C. Sear, G. Strub, C. Cielo, and S. Slater.** 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**:2323-2328.
- Götz, R., and R. Schmitt.** 1987. *Rhizobium meliloti* swims by unidirectional, intermittent rotation of right-handed flagellar helices. *J. Bacteriol.* **169**:3146-3150.
- Götz, R., N. Limmer, K. Ober, and R. Schmitt.** 1982. Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. *J. Gen. Microbiol.* **128**:789-798.
- Greck, M., J. Platzter, V. Sourjik, and R. Schmitt.** 1995. Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **15**:989-1000.
- Grossmann, G., M. Opekarova, J. Malinsky, I. Weig-Meckl, and W. Tanner.** 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* **26**:1-8.
- Gulash, M., P. Ames, R. C. Larosiliere, and K. Bergman.** 1984. *Rhizobia* are attracted to localized sites on legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:149-152.
- Hadri, A. E., H. P. Spaink, T. Bisseling, and N. J. Brewin.** 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In: *The Rhizobiaceae, the molecular biology of model plant-associated bacteria*. Dordrecht: Kluwer Acad. 347-360.
- Halbach, A.** 2003. Wechselwirkung des neuen Motorproteins MotC von *Sinorhizobium meliloti* mit MotB. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Harrison, D. M., J. Skidmore, J. P. Armitage, and J. R. Maddock.** 1999. Localization and environmental regulation of MCP-like proteins in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **31**:885-892.
- Hartwig, U. A., C. A. Maxwell, C. M. Joseph, and D. A. Phillips.** Chrysoeriol and luteolin released from *alfalfa* seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **92**:116-122.
- Heim, R., D. C. Prasher, and R. Y. Tsien.** 1994. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:12501-12504.
- Hess, J. F., R. B. Bourret, and M. I. Simon.** 1988. Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature.* **336**:139-143.
- Higuchi, R.** 1989. Using PCR to engineer DNA. p. 61-70. In H. A. Erlich (ed.), *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, N. Y. USA.
- Hirano, T., T. Minamino, K. Namba, and R. M. Macnab.** 2003. Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *J. Bacteriol.* **185**:2485-2492.
- Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, and S. Mitaku.** 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* **14**:378-379.
- Homma, M., D. Shiomi, M. Homma, and I. Kawagishi.** 2004. Attractant binding alters arrangement of chemoreceptor behavior within its cluster at a cell pole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**:3462-3467.
- Hotani, H.** 1980. Micro-video study of moving bacterial flagellar filaments. II. Polymorphic transition in alcohol. *Biosystems.* **12**:325-330.
- Hübner, P., J. C. Willison, P. M. Vignais, and T. A. Bickle.** 1991. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173**:2993-2999.

- Hulo N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, E. De Castro, P. S. Langendijk-Genevaux, M. Pagni, and C. J. A. Sigrist.** 2006. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* **34**:D227-D230.
- Hunter, W. J. And C. J. Fahring.** 1980. Movement by *Rhizobium* and nodulation of legumes. *Soil Biol. Biochem.* **12**:537-542.
- Jäckel, P.** 2004. Funktionsanalyse des periplasmatischen Motilitätsproteins MotC von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Johnson, A. S., S. van Horck, and P. J. Lewis.** 2004. Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **150**:2815-2824.
- Juretic, D., L. Zoranic, and D. Zucic.** 2002. Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **42**:620-632.
- Kahn, S., M. Dapice, and T. H. Reese.** 1988. Effects of *mot* gene expression on the structure of flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **202**:575-584.
- Kentner, D., and V. Sourjik.** 2006. Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Current Opinion in Microbiol.* **9**:619-624.
- Kentner, D., S. Thiem, M. Hildenbeutel, and V. Sourjik.** 2006. Determinants of chemoreceptor cluster formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **61**:407-417.
- Kim, K. K., H. Yokota, and S. H. Kim.** 1999. Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature.* **400**:787-792.
- Kim, S. H., W. Wang, and K. K. Kim.** 2002. Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: structural basis for signaling and high sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:11611-11615.
- Klinger, M.** 2003. Analyse des CheY1- und Orf2-vermittelten Phosphat-Transfers beim taktischen Respons von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Klose, R.** 1996. Chemotaxis-Kontrolle bei *Rhizobium meliloti* durch ein neues methylakzeptierendes Chemotaxis-Protein und Komponenten der Glykolyse. Doktorarbeit. Universität Regensburg.
- Kollmann, M., L. Lovdok, K. Bartholome, J. Timmer, and V. Sourjik.** 2005. Design principles of a bacterial signalling network. *Nature.* **438**:504-507
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* **166**:175-176.
- Krikos, A., M. P. Conley, A. Boyd, H. C. Berg, and M. I. Simon.** 1985. Chimeric chemosensory transducers of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1326-1330.
- Krupski, G., R. Götz, K. Ober, E. Pleier, and R. Schmitt.** 1985. Structure of complex flagellar filaments in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **162**:361-366.
- Labes, M., A. Puhler, and R. Simon.** 1990. A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for gram-negative bacteria. *Gene* **89**:37-46.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lai, W. C., and G. L. Hazelbauer.** 2005. Carboxyl-terminal extensions beyond the conserved pentapeptide reduce rates of chemoreceptor adaptational modification. *J. Bacteriol.* **187**:5115-5121.



- Lefman, J., P. Zhang, T. Hirai, R. M. Weis, J. Juliani, D. Bliss, M. Kessel, E. Bos, P. J. Peters, and S. Subramaniam.** 2004. Three-dimensional electron microscopic imaging of membrane invaginations in *Escherichia coli* overproducing the chemotaxis receptor Tsr. *J. Bacteriol.* **186**:5052-5061
- Letunic, I., R. R. Copley, B. Pils, S. Pinkert, J. Schultz, and P. Bork.** 2006. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.* **34**:D257-260.
- Levit, M. N., T. W. Grebe, and J. B. Stock.** 2002. Organization of the receptor-kinase signaling array that regulates *Escherichia coli* chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**:36748-36754.
- Li, M., and G. L. Hazelbauer.** 2004. Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signalling complex. *J. Bacteriol.* **186**:3687-3694.
- Li, X. and H. P. Schweitzer.** 1993. Resolution of common DNA sequencing ambiguities of GC-rich templates by terminal deoxynucleotidyl transferase without dGTP analogues. *Focus.* **14/15**:19-20.
- Liu, J., and J. S. Parkinson.** 1989. Role of CheW protein in coupling membrane receptors to the intracellular signalling system of bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:8703-8707.
- Llewellyn, M., R. J. Dutton, J. Easter, D. O'donnol, and J. W. Gober.** 2005. The conserved *flaF* gene has a critical role in coupling flagellin translation and assembly in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **57**:1127-1142.
- Lloret, J., B. B. Wulff, J. M. Rubio, J. A. Downie, I. Bonilla, and R. Rivilla.** 1998. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1024-1028.
- Lodwig, E. M., A. H. Hosie, A. Bourdes, K. Findlay, D. Allaway, R. Karunakaran, J. A. Downie, and P. S. Poole.** 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature.* **422**:722-6.
- Lukat, G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock, and J. B. Stock.** 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:718-722.
- Lybarger, S. R., and J. R. Maddock.** 1999. Clustering of the chemoreceptor complex in *Escherichia coli* is independent of the methyltransferase CheR and the methylesterase CheB. *J. Bacteriol.* **181**:5527-5529.
- Lybarger, S. R., and J. R. Maddock.** 2000. Differences in the polar clustering of the high- and low-abundance chemoreceptors of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:8057-8062
- Lybarger, S. R., and J. R. Maddock.** 2001. Polarity in action: asymmetrical protein localization in bacteria. *J. Bacteriol.* **183**:3261-3267.
- Lybarger, S. R., U. Nair, A. A. Lilly, G. L. Hazelbauer, and J. R. Maddock.** 2005. Clustering requires modified methyl-accepting sites in low abundance but not high abundance chemoreceptors of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**:1078-1086.
- Mackenzie, C., M. Choudhary, F. W. Larimer, P. F. Predki, S. Stilwagen, J. P. Armitage, R. D. Barber, T. J. Donohue, J. P. Hosler, J. E. Newman, J. P. Shapleigh, R. E. Sockett, J. Zeilstra-Ryalls, and S. Kaplan.** 2001. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth. Res.* **70**:19-41.

- Macnab, R. M.** 1996. Flagella and motility, p. 123-145. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2<sup>nd</sup> ed., ASM press, Washington, D. C., USA.
- Maddock, J. R., and L. Shapiro.** 1993. Polar localization of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**:1717-1723.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. USA.
- Malek, W.** 1989. Chemotaxis in *Rhizobium meliloti* strain L5.30. *Microbiology* **152**:611-612.
- Margolin, W.** 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:531-548. Review.
- Martin, A. C., G. H. Wadhams, and J. P. Armitage.** 2001. The roles of multiple CheW and CheA homologues in chemotaxis and in chemoreceptor localization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **40**:1261-1272.
- Maxwell, C. A., U. A. Hartwig, C. M. Joseph, and D. A. Phillips.** 1989. A chalcone and two related flavonoids released from *alfalfa* roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **91**:842-847.
- Meier, V.** 2003. Funktionsanalyse und zelluläre Lokalisierung genetisch definierter Chemotaxisrezeptoren von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Meier, V. M., P. Muschler, and B. E. Scharf.** 2007. Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **189**:1816-1826.
- Miller, L. D., C. K. Yost, M. F. Hynes, and G. Alexandre.** 2007. The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* is essential for competitive nodulation. *Mol. Microbiol.* **63**:348-62.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Montrone, M., M. Eisenbach, D. Oesterhelt, and W. Marwan.** 1998. Regulation of switching frequency and bias of the bacterial flagellar motor by CheY and fumarate. *J. Bacteriol.* **180**:3375-3380.
- Mowbray, S. L., and M. O. Sandgren.** 1998. Chemotaxis receptors: a progress report on structure and function. *J. Struct. Biol.* **124**:257-275.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**:263-273.
- Muschler, P.** 2000. Funktionsanalyse von Rezeptoren, Elementen der Signalkette und des Effektors der Chemotaxis bei *Sinorhizobium meliloti*. Doktorarbeit. Universität Regensburg.
- Nambu, J. R., J. O. Lewis, K. A. Wharton, Jr., and S. T. Crews.** 1991. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**:1157-1167.
- Natera, S. H., N. Guerreiro, and M. A. Djordjevic.** 2000. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **13**:995-1009.

- Nierman, W. C., T. V. Feldblyum, M. T. Laub, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, M. R. Alley, N. Ohta, J. R. Maddock, I. Potocka, W. C. Nelson, A. Newton, C. Stephens, N. D. Phadke, B. Ely, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. L. Gwinn, D. H. Haft, J. F. Kolonay, J. Smit, M. B. Craven, H. Khouri, J. Shetty, K. Berry, T. Utterback, K. Tran, A. Wolf, J. Vamathevan, M. Ermolaeva, O. White, S. L. Salzberg, J. C. Venter, L. Shapiro, and C. M. Fraser. 2001. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**:4136-4141.
- Nowlin, D. M., J. Bollinger, and G. L. Hazelbauer. 1987. Sites of covalent modification in Trg, a sensory transducer of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **262**, 6039-6045.
- Ochman, H., and A. C. Wilson. 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. J. Mol. Evol. **26**:74-86. Erratum in: J. Mol. Evol. **26**:377.
- Oke, V., and S. R. Long. 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Curr Opin Microbiol **2**:641-646.
- Okumura, H., S. Nishiyama, A. Sasaki, M. Homma, and I. Kawagishi. 1998. Chemotactic adaptation is altered by changes in the carboxy-terminal sequence conserved among the major methyl-accepting chemoreceptors. J. Bacteriol. **180**:1862-1868.
- Olivares, J., J. Casadesús, and E. J. Bedmar. 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. Appl. Environ. Microbiol. **39**:967-970.
- Ottemann, K. M., W. Xiao, Y. K. Shin, D. E. Koshland Jr. 1999. A piston model for transmembrane signalling of the aspartate receptor. Science. **285**:1751-1754.
- Platzer, J., W. Sterr, M. Hausmann, and R. Schmitt. 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., and R. Schmitt. 1989. Identification and sequence analysis of two related flagellin genes in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **171**:1467-1475.
- Ponting, C. P., and L. Aravind. 1997. PAS: a multifunctional domain family comes to light. Curr. Biol. **7**:R674-677.
- Porschke, F. 2007. Untersuchungen zur Funktion von CheX in der chemotaktischen Signalkette von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Rice, M. S., and F. W. Dahlquist. 1991. Sites of deamidation and methylation in Tsr, a bacterial chemotaxis sensory transducer. J. Biol. Chem. **266**, 9746-9753.
- Ried, J. L. and A. Collmer. 1987. An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. Gene. **57**:239-246.
- Riepl, H., T. Maurer, H. R. Kalbitzer, V. M. Meier, R. Schmitt, and B. Scharf. 2007. Interaction of CheY2 and CheY2-P with the cognate CheA kinase in the chemosensory-signaling chain of *Sinorhizobium meliloti*. Submitted for publication.
- Robinson, J. B., and W. D. Bauer. 1993. Relationships between C<sub>4</sub> dicarboxylic acid transport and chemotaxis in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **175**:2284-2291.
- Roest, H. P., C. J. Bloemendaal, C. A. Wijffelman, and B. J. Lugtenberg. 1995. Isolation and characterization of *ropA* homologous genes from *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae* and *trifolii*. J. Bacteriol. **177**:4985-4991.
- Rotter, C. 2005. Regulation von Motilität und Exopolysaccharid-Synthese bei *Sinorhizobium meliloti* durch den Transkriptionsfaktor Rem. Dissertation. Universität Regensburg.

- Rotter, C., S. Mühlbacher, R. Schmitt, and B. Scharf.** 2006. Rem, a new transcriptional regulator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**:6932-6942.
- Rovira, A. D.** 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **19**:241-266. Review.
- Samatey, F. A., .K Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba.** 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature.* **410**:331-337.
- Sanders, D. A., B. Mendez, and D. E. Koshland, Jr.** 1989. Role of the CheW protein in bacterial chemotaxis: overexpression is equivalent to absence. *J. Bacteriol.* **171**:6271-6278.
- Sar, N., L. McCarter, M. Simon, and M. Silverman.** 1990. Chemotactic control of the two flagellar systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **172**:334-41.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler.** 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., and R. Schmitt.** 2001. Das Rad – eine uralte Erfindung der Natur. Über die erstaunliche Motorik rotierender Bakteriengeißeln. *Blick in die Wissenschaft.* **13**:34-36.
- Scharf, B., and R. Schmitt.** 2002. Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**:183-186.
- Scharf, B. E., K. A. Fahrner, L. Turner, and H. C. Berg.** 1998. Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:201-206.
- Scharf, B., H. Schuster-Wolff-Bühning, R. Rachel, and R. Schmitt.** 2001. Mutational analysis of *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* **183**:5334-5342.
- Scharf, B.** 2002. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-induced polymorphic transitions. *J. Bacteriol.* **184**:5979-5986.
- Schmitt, R., I. Bamberger, G. Acker, and F. Mayer.** 1974. Feinstrukturanalyse der komplexen Geißeln von *Rhizobium lupini* H13-3. *Arch. Microbiol.* **100**:145-162.
- Schmitt, R.** 2002. Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology.* **148**:627-631.
- Schoenlein, P. V., and B. Ely.** 1989. Characterization of strains containing mutations in the contiguous *flaF*, *flbT*, or *flbA-flaG* transcription unit and identification of a novel *fla* phenotype in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **171**:1554-1561.
- Selbitschka, W., S. Niemann, and A. Pühler.** 1993. Construction of gene replacement vectors for gram-negative bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:615-618.
- Shimizu, T. S., N. Le Novère, M. D. Levin, A. J. Beavil, B. J. Sutton, and D. Bray.** 2000. Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis. *Nat. Cell. Biol.* **2**:792-796.
- Shiomi, D., H. Okumura, M. Homma, and I. Kawagishi.** 2000. The aspartate chemoreceptor Tar is effectively methylated by binding to the methyltransferase mainly through hydrophobic interaction. *Mol. Microbiol.* **36**:132-140.

- Shiomi, D., I. B. Zhulin, M. Homma, and I. Kawagishi.** 2002. Dual recognition of the bacterial chemoreceptor by chemotaxis-specific domains of the CheR methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**:42325-42333.
- Shiomi, D., M. Yoshimoto, M. Homma, and I. Kawagishi.** 2006. Helical distribution of the bacterial chemoreceptor via colocalization with the Sec protein translocation machinery. *Mol. Microbiol.* **60**:894-906.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilisation system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio-Technology.*
- Simon, R., M. O'Connell, M. Labes, and A. Pühler.** 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**:640-659.
- Skidmore, J. M., D. D. Ellefson, B. P. McNamara, M. M. Couto, A. J. Wolfe, and J. R. Maddock.** 2000. Polar clustering of the chemoreceptor complex in *Escherichia coli* occurs in the absence of complete CheA function. *J. Bacteriol.* **182**:967-973.
- Soto, M. J., M. Fernández-Pascual, J. Sanjuan, and J. Olivares.** 2002. A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on *alfalfa* roots. *Mol. Microbiol.* **43**:371-382.
- Sourjik, V., and H. C. Berg.** 2000. Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol. Microbiol.* **37**:740-751.
- Sourjik, V., and H. C. Berg.** 2002. Binding of the *Escherichia coli* response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:12669-12674.
- Sourjik, V., and H. C. Berg.** 2004. Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature.* **428**:437-441
- Sourjik, V., and R. Schmitt.** 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **22**:427-436.
- Sourjik, V., and R. Schmitt.** 1998. Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry.* **37**:2327-2335.
- Sourjik, V., W. Sterr, J. Platzer, I. Bos, M. Haslbeck, and R. Schmitt.** 1998. Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* **223**:283-290.
- Sourjik, V., P. Muschler, B. Scharf, and R. Schmitt.** 2000. VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J. Bacteriol.* **182**:782-788.
- Sourjik, V.** 2004. Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. *Trends Microbiol.* **12**:569-576. Review.
- Soutourina, O. A., and P. N. Bertin.** 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:505-523. Review.
- Stock, J. B., and D. E. Koshland Jr.** 1978. A protein methyltransferase involved in bacterial sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:3659-3663.
- Stock, J., and M. Levit.** 2000. Signal transduction: hair brains in bacterial chemotaxis. *Curr. Biol.* **10**:R11-14. Review.
- Stock, J. B., and M. G. Surette.** 1996. Chemotaxis, p. 1103-1129. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, vol. I. ASM Press, Washington, D. C. USA.

- Studdert, C. A. and J. S. Parkinson.** 2004. Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**:2117-2122.
- Taylor, B. L., and I. B. Zhulin.** 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:479-506.
- Taylor, B. L., I. B. Zhulin, and M. S. Johnson.** 1999. Aerotaxis and other energy-sensing behaviour in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:103-128. Review.
- Thiem, S., D. Kentner, and V. Sourjik.** 2007. Positioning of chemosensory clusters in *E. coli* and its relation to cell division. *EMBO J.* **26**:1615-1623.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Thompson, S. R., G. H. Wadhams, and J. P. Armitage.** 2006. The positioning of cytoplasmic protein clusters in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**:8209-8214.
- Trachtenberg, S., D. J. DeRosier, and R. M. Macnab.** Three-dimensional structure of the complex flagellar filament of *Rhizobium lupini* and its relation to the structure of the plain filament. *J. Mol. Biol.* **195**:603-620.
- Uchiumi, T., T. Ohwada, M. Itakura, H. Mitsui, N. Nukui, P. Dawadi, T. Kaneko, S. Tabata, T. Yokoyama, K. Tejima, K. Saeki, H. Omori, M. Hayashi, T. Maekawa, R. Sriprang, Y. Murooka, S. Tajima, K. Simomura, M. Nomura, A. Suzuki, Y. Shimoda, K. Sioya, M. Abe, and K. Minamisawa.** 2004. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* **186**:2439-2448.
- Ulrich, L. E., and I. B. Zhulin.** 2005. Four-helix bundle: a ubiquitous sensory module in prokaryotic signal transduction. *Bioinformatics* **21 Suppl 3**:iii45-iii48.
- Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin.** 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**:52-56.
- Uren, N. C.** 2000. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants, p. 19-40. In: R. Pinton, Z. Varanini, and P. Nannipiero (ed.), *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, N. Y., USA.
- Van Rhijn, P., and J. Vanderleyden.** 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124-142.
- Vande Broek, A., and J. Vanderleyden.** 1995. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **8**:800-810.
- Wadhams, G. H., A. C. Martin, and J. P. Armitage.** 2000. Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **36**:1222-1233.
- Wadhams, G. H., A. C. Martin, S. L. Porter, J. R. Maddock, J. C. Mantotta, H. M. King, and J. P. Armitage.** 2002. TlpC, a novel chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*, localizes to a discrete region in the cytoplasm. *Mol. Microbiol.* **46**:1211-1221.
- Wadhams, G. H., A. V. Warren, A. C. Martin, and J. P. Armitage.** 2003. Targeting of two signal transduction pathways to different regions of the bacterial cell. *Mol. Microbiol.* **50**:763-777.
- Wagner, V.** 2006. Funktions- und Lokalisierungsanalyse des Chemotaxisproteins CheX von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.

- Wang, Y. P., K. Birkenhead, B. Boesten, S. Manian, and F. O'Gara.** 1989. Genetic analysis and regulation of the *Rhizobium meliloti* genes controlling C4-dicarboxylic acid transport. *Gene*. **85**:135-144.
- Weerasuriya, S., B. M. Schneider, and M. D. Manson.** 1998. Chimeric chemoreceptors in *Escherichia coli*: signaling properties of Tar-Tap and Tap-Tar hybrids. *J. Bacteriol.* **180**:914-920.
- Welch, M., K. Oosawa, S. I. Aizawa, and M. Eisenbach.** 1994. Effects of phosphorylation, Mg<sup>2+</sup>, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry*. **33**:10470-10476.
- Williams, A. W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S. I. Aizawa, I. Kawagishi, and R. M. Macnab.** 1996. Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**:2960-2970.
- Whitchurch, C. B., A. J. Leech, M. D. Young, D. Kennedy, J. L. Sargent, J. J. Bertrand, A. B. Semmler, A. S. Mellick, P. R. Martin, R. A. Alm, M. Hobbs, S. A. Beatson, B. Huang, L. Nguyen, J. C. Commolli, J. N. Engel, A. Darzins, J. S. Mattick.** 2004. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **52**:873-893.
- Wolanin, P. M., M. D. Baker, N. R. Francis, D. R. Thomas, D. J. DeRosier, and J. B. Stock.** 2006. Self-assembly of receptor signaling complexes in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**:14313-14318.
- Wolfe, A. J., and H. C. Berg.** 1989. Migration of bacteria in semisolid agar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:6973-6977.
- Wu, J., J. Li, G. Li, D. G. Long, and R. M. Weis.** 1996. The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation. *Biochemistry*. **35**:4984-4993.
- Yamaguchi, S., H. Fujita, A. Ishihara, S. Aizawa, and R. M. Macnab.** 1986. Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching. *J. Bacteriol.* **166**:187-193.
- Yost, C. K., P. Rochepeau, M. F. Hynes.** 1998. *Rhizobium leguminosarum* contains a group of genes that appear to code for methyl-accepting chemotaxis proteins. *Microbiology*. **144**:1945-1956.
- Yost, C. K., K. L. Del Bel, J. Quandt, and M. F. Hynes.** 2004. *Rhizobium leguminosarum* methyl-accepting chemotaxis protein genes are down-regulated in the pea nodule. *Arch. Microbiol.* **182**:505-513.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada.** 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1689-1695.
- Zhang, P., C. M. Khursigara, L. M. Hartnell, and S. Subramaniam.** 2007. Direct visualization of *Escherichia coli* chemotaxis receptor arrays using cryo-electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**:3777-3781
- Zhulin, I. B., A. F. Lois, and B. L. Taylor.** 1995. Behavior of *Rhizobium meliloti* in oxygen gradients. *FEBS letters*. **367**: 180-182.

## Veröffentlichungen

### Posterpräsentationen

**V. Meier, R. Schmitt & B. Scharf**

Characterization of chemoreceptor function in *Sinorhizobium meliloti*.  
März 2004, VAAM-Jahrestagung, Braunschweig.

**V. Meier & B. Scharf**

Role of chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti* chemotaxis and symbiosis.  
Oktober 2006, ESF-EMBO Symposium: Conference on Bacterial Networks, Sant Feliu de Guixols (Spanien).

### Vorträge

**V. M. Meier**

Receptor function in chemotaxis and symbiosis of *Sinorhizobium meliloti*.  
März 2006, VAAM-Jahrestagung, Jena.

**V. M. Meier**

Receptor function in chemotaxis and symbiosis of *Sinorhizobium meliloti*.  
September 2006, Symposium on Mechanism of Gene Regulation, Königswinter.

## Veröffentlichungen

**V. M. Meier, P. Muschler & B. E. Scharf (2007).**

Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*.  
*J. Bacteriol.* **189**:1816-1826.

**V. M. Meier, & B. E. Scharf (2007).**

Chemoreceptor genes of *Sinorhizobium meliloti* are up-regulated during exponential growth and down-regulated in the *alfalfa* nodule.  
Zur Veröffentlichung eingereicht.

**H. Riepl, T. Maurer, H. R. Kalbitzer, V. M. Meier, R. Schmitt & B. Scharf (2007).**

Interaction of CheY2 and CheY2-P with the cognate CheA kinase in the chemosensory-signalling chain of *Sinorhizobium meliloti*.  
Zur Veröffentlichung eingereicht.



## Dankeschön!

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Birgit E. Scharf** für die Möglichkeit diese Dissertation anfertigen zu können und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Die anregenden Diskussionen und die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen waren mir eine große Hilfe. Außerdem danke ich Ihr sehr herzlich für die Gelegenheit auf den zahlreichen Tagungen Erfahrungen sammeln zu können und für die Vermittlung des Forschungsaufenthalts in Granada (Spanien).

Besonders bedanken möchte ich mich bei **Andrea Brinnich**, die mir die ganze Zeit mehr als eine gute Kollegin war und die mir als einziges Mitglied der Rhizobiengruppe erhalten blieb, so dass sie mir das Gefühl gab, nicht ganz verlassen zu sein.

**Dr. María José Soto Misffut** (Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada) danke ich für die gute Betreuung in Granada und die Einführung in die „Welt der Pflänzchen“.

Danken möchte ich auch Herrn **Prof. Dr. Widmar Tanner** für die Möglichkeit die Nodulations-Experimente in seiner Klimakammer durchführen zu können.

Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Seufert** danke ich für die Unterstützung.

**Guido Grossmann** möchte ich für die geduldige Hilfe und die zahlreichen guten Ratschläge bei der Fluoreszenzmikroskopie danken.

Den „Stuttgartern“ **Christine Geil, Heidi Bolay, Jörg Reißing, Dr. Michael Schwab** und **Nicole Diergart** möchte ich für das „Asyl“ in ihrer Arbeitsgruppe und die gute Kollegialität danken.

Allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, weil sie immer für mich da sind und mich immer unterstützen. Und weil sie (immer noch) die besten Eltern der Welt sind!

Und meinem Freund **Stefan** möchte ich dafür danken, dass er mich immer unterstützt hat und immer für mich da ist.

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

---

Veronika Meier