

**Genomweite Analysen von Gen-Clustern zur
ABC-Transport-vermittelten Eisenaufnahme bei
Sinorhizobium meliloti Stamm Rm1021**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Jens Buhrmester

aus Detmold

Mai 2004

A	ZUSAMMENFASSUNG	1
B	EINLEITUNG	3
1	DER MIKROSYMBIONT <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i>	3
1.1	Die Rhizobien-Leguminosen Symbiose.....	3
1.2	<i>Sinorhizobium meliloti</i> – Objekt zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten.....	5
1.3	Das <i>S. meliloti</i> Rm1021 Genomprojekt.....	6
1.3.1	Struktur des Genoms.....	6
1.3.2	Sequenzierung des Genoms durch ein internationales Konsortium.....	6
1.3.3	Sequenzierung des Megaplasmids pSymB.....	7
1.3.4	Zusammenfassung der Annotation.....	9
2	ABC-TRANSPORTER ALS BAKTERIELLE TRANSPORTSYSTEME.....	10
2.1	Allgemeine Merkmale.....	10
2.2	Funktionsweise und Substratspezifität.....	13
2.3	Die bakterielle Eisen-Aufnahme.....	14
2.3.1	ABC-Transporter vermittelter Import von Eisen-Ionen und Eisen-Komplexen.....	14
2.3.2	Aufnahme von Fe ²⁺	16
2.3.3	Low-affinity Eisenaufnahme.....	17
3	DER BAKTERIELLE EISENMETABOLISMUS.....	17
3.1	Eisen als essentieller Wachstumsfaktor.....	17
3.2	Der Eisenmetabolismus bei Rhizobien.....	18
4	ZIELE DIESER ARBEIT.....	20
5	PUBLIKATIONEN.....	21
C	MATERIAL UND METHODEN	22
1	MATERIAL.....	22
1.1	Bakterienstämme.....	22
1.2	Plasmide.....	23
1.3	Oligonukleotide.....	23
1.4	Enzyme.....	25
1.5	Nährmedien und Zusätze.....	25
1.5.1	Nährmedien.....	25
1.5.2	Zusätze zu Nährmedien.....	27
1.6	Puffer und Lösungen.....	28
1.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	31
1.8	Software und Datenbanken.....	31
2	METHODEN.....	32
2.1	Kultivierung von Bakterienzellen.....	32
2.1.1	Bakterienanzucht.....	32
2.1.2	Bestimmung des Bakterientiters.....	32
2.1.3	Archivierung von Bakterienstämmen.....	33
2.1.4	Hogness-Freezing-Medium (HFM) (modifiziert nach Werner <i>et al.</i> , 1997).....	33

2.2	Isolierung und Darstellung von DNA	33
2.2.1	Gesamt-DNA-Isolierung aus <i>S. meliloti</i>	33
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
2.2.3	Isolierung von BAC-DNA aus <i>E. coli</i>	37
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.5	Eckhardt-Lyse (Eckhardt, 1978; modifiziert nach R. Simon).....	39
2.2.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	39
2.3	Restriktion und Modifikation von DNA	40
2.3.1	DNA-Restriktion mit TypII-Restriktionsendonucleasen	40
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.3.3	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	43
2.3.4	Gene Splicing by Overlap Extension (GeneSOEing, nach Horton <i>et al.</i> , 1990).....	43
2.3.5	Ligation	44
2.4	DNA-Transfertechniken.....	45
2.4.1	DNA-Transfer mittels Transformation	45
2.4.2	DNA-Transfer mittels Konjugation	46
2.4.3	DNA-Transfer mittels Elektroporation	47
2.5	Erstellung von <i>S. meliloti</i> Rm1021-Plasmidintegrationsmutanten	49
2.6	Erstellung von <i>S. meliloti</i> Rm1021-Deletionsmutanten.....	49
2.7	Nachweis der Siderophorproduktion anhand des CAS-Test	50
2.8	Ermittlung der Expressionsstärke durch <i>gusA</i> -Transkriptionsfusion	50
2.8.1	Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität bei <i>S. meliloti</i> (nach Reeve <i>et al.</i> , 1998).....	51
2.8.2	Messung der Farbreaktion mit dem BMG Fluostar	52
2.9	Pflanzentests (nach Rolfe <i>et al.</i> , 1980)	53
2.10	Phylogenetische Klassifizierung	53
2.11	Identifizierung orthologer Eisen-ABC-Transporter	54
2.12	Statistische Auswertung anhand des t-Tests.....	55
D	ERGEBNISSE.....	56
1	CHARAKTERISIERUNG UND PHYLOGENETISCHE KLASSIFIZIERUNG DER POTENTIELLEN <i>S. MELILOTI</i> RM1021 EISEN-ABC-TRANSPORTER.....	56
2	ORTHOLOGE DER POTENTIELLEN <i>S. MELILOTI</i> RM1021 EISEN-ABC-TRANSPORTER IN ANDEREN RHIZOBIACEAE-GENOMEN.....	63
3	DIE SIDEROPHOR-PRODUKTION VON <i>S. MELILOTI</i> RM1021 ALS INDIKATOR FÜR EISENMANGEL	64
3.1	Nachweis von Rhizobactin 1021 im Kulturüberstand mittels CAS-Test	65
3.2	Eisenmangel bewirkt ein reduziertes Wachstum und eine erhöhte Rhizobactin 1021- Sekretion	66
3.3	Die Aufnahme von Rhizobactin 1021 ist im Verhältnis zur Sekretion quantitativ untergeordnet.....	67
3.4	Die Produktion von Rhizobactin 1021 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	69
4	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON <i>S. MELILOTI</i> RM1021 EISEN-ABC-TRANSPORTERMUTANTEN	70
4.1	Erstellung von Deletionsmutanten	70

4.2	Wachstumstests unter verschiedenen Eisenbedingungen	72
4.3	Die <i>S. meliloti</i> Rm1021 Eisen-ABC-Transportermutanten weisen keine eingeschränkten Symbioseeeigenschaften auf	74
5	EXPRESSIONSANALYSEN DER EISEN-ABC-TRANSPORTER GEN-CLUSTER	76
5.1	Eisenmangel bewirkt eine verstärkte Expression der <i>Siderophore/Haem</i> -Typ Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster	77
5.2	Die <i>S. meliloti</i> Rm1021 Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster weisen ein substratspezifisches Expressionsprofil auf	78
5.3	In planta wird die Mehrheit der potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster von <i>S. meliloti</i> Rm1021 exprimiert	80
6	EISENMANGEL BEWIRKT EINE ERHÖHTE EXPRESSION DER GENE FÜR DIE RHIZOBACTIN 1021-ABHÄNGIGE EISENAUFNAHME VON <i>S. MELILOTI</i> RM1021	82
E	DISKUSSION	86
1	EINE VIELZAHL VON EISEN-ABC-TRANSPORTERN IST AN DER EISENVERSORGUNG VON <i>S. MELILOTI</i> RM1021 BETEILIGT	86
2	DIE BETEILIGUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN EISEN-ABC-TRANSPORTER AN DER EISENVERSORGUNG VON <i>S. MELILOTI</i> RM1021 IN SYMBIOSE	89
F	LITERATUR	94
G	ANHANG	109
1	ABKÜRZUNGEN	109
2	PLASMIDKARTEN	111
3	ROHDATEN DER ARRAY-EXPERIMENTE	114
4	ERKLÄRUNG	116
5	DANKSAGUNG	117

A Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine genomweite Analyse von *ATP-Binding-Cassette-* (ABC-) Transporter Gen-Clustern des symbiotischen Bodenbakteriums *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, die potentiell an der Aufnahme von Eisen beteiligt sein könnten. Hierzu wurden zunächst anhand eines Datensatzes von experimentell gut charakterisierten Eisen-ABC-Transportern, Homologievergleiche gegen alle abgeleiteten Aminosäuresequenzen des vollständig sequenziert vorliegenden Genoms von *S. meliloti* Rm1021 durchgeführt. Auf diese Weise wurden insgesamt acht Gen-Cluster identifiziert, die jeweils ein periplasmatisches Substratbindeprotein, eine Transmembran-Domäne sowie eine ATPase eines potentiellen Eisen-ABC-Transporters codieren. Drei dieser Gen-Cluster wurden auf dem Chromosom lokalisiert. Neben dem Chromosom besitzt *S. meliloti* Rm1021 die zwei Megaplasmitide pSymA und pSymB, auf denen ein bzw. vier Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster identifiziert wurden. Anhand von phylogenetischen Analysen, die auf der Sequenzanalyse der ATPasen basierten, konnten die potentiellen Eisen-ABC-Transporter in drei unterschiedliche Gruppen differenziert werden, sodass die acht identifizierten Transporter einen *Metal*-Typ, vier *Siderophore/Haem*-Typ und drei *Ferric*-Typ Eisen-ABC-Transporter repräsentieren.

Zur Analyse der möglichen Funktion wurden für sieben der acht potentiellen Eisen-ABC-Transporter Deletionsmutanten konstruiert. Anhand eines eisenabhängigen Wachstum-Phänotyps konnte die Beteiligung an der Eisenaufnahme von frei-lebenden *S. meliloti*-Zellen für vier potentielle Eisen-ABC-Transporter nachgewiesen werden. Hierbei scheint die Siderophor-abhängige Eisenaufnahme der bevorzugte Mechanismus zur Eisenversorgung zu sein, da, mit einer Ausnahme, alle *Metal*- und *Ferric*-Typ Transportermutanten nicht in ihrem Wachstum beeinflusst waren.

Zur Expressionsanalyse wurden die Promotorregionen aller acht potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster vor ein promotorloses *gusA*-Gen eines Promotor-Test-Vektors kloniert. Anhand dieser Reporter-gen-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass nur die Expression der *Siderophore/Haem*-Typ Gen-Cluster durch Eisenmangel induziert wurde. Neben der erhöhten Expression der *Siderophore/Haem*-Typ Gen-Cluster, bewirkte das Wachstum der Bakterien unter Eisenmangel eine erhöhte Produktion des Siderophors Rhizobactin 1021, die mit Hilfe des CAS-Tests nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls konnte mit Hilfe der Reporter-gen-Konstrukte gezeigt werden, dass die Supplementierung eines Minimalmediums mit den alleinigen Eisenquellen FeCl₃, FeSO₄, Haemin bzw. Haemoglobin die Expression spezifischer

putativer Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster von frei-lebenden *S. meliloti* Rm1021 Zellen bewirkte.

Die Auswertung zur Verfügung stehender Daten genomweiter Expressionsanalysen, die mit Hilfe eines Gesamt-Genom PCR-Microarrays durchgeführt wurden, bestätigte ebenfalls die Bedeutung der Siderophor-abhängigen Eisenaufnahme, da neben der erhöhten Expression einiger Gene der *Siderophore/Haem*-Typ Gen-Cluster, auch die Gene der Biosynthese des Siderophors Rhizobactin 1021, für den Rhizobactin 1021-spezifischen Rezeptor und für Komponenten des energieliefernden TonB-ExbB-ExbD-Systems unter Eisenmangel eine deutlich erhöhte Expression aufwiesen.

In planta Studien zeigten, dass, mit einer Ausnahme, im Luzerne-Knöllchen alle potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster exprimiert wurden. Die Expression war in allen Fällen auf die symbiotische Zone, in der die *S. meliloti* Rm1021 Bakterioide atmosphärischen Stickstoff fixieren, begrenzt. Jedoch ist keiner der potentiellen Eisen-ABC-Transporter essentiell für die Nodulation und Stickstofffixierung, da die getesteten Transportermutanten zum Wildtyp *S. meliloti* Rm1021 vergleichbare Symbioseigenschaften aufwiesen.

B Einleitung

1 Der Mikrosymbiont *Sinorhizobium meliloti*

1.1 Die Rhizobien-Leguminosen Symbiose

Endocytobiologische Verbindungen zwischen zwei Organismen sind in der Nature weit verbreitet. Hierzu gehören neben den Verbindungen von Algen und Invertebraten, Bakterien und Insekten auch die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Bakterien (Udvardi & Day, 1997). Zu den bestuntersuchten Verbindungen gehören hierbei die Symbiosen zwischen Leguminosen und stickstofffixierenden Bodenbakterien. In dieser Symbiose wandeln die Bakterien in einer komplexen Reaktion atmosphärischen Stickstoff zu für die Pflanze verwertbarem Ammonium um. Die Pflanze wiederum versorgt die Bakterien mit Kohlenstoffverbindungen, meist in Form von Dicarboxylaten, wie z.B. Succinat, Malat und Fumarat, die in den bakteriellen Stoffwechsel einfließen (Brewin, 1991; Lerouge *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1986). Somit weisen Leguminosen unter Stickstoffmangel gegenüber Pflanzen, die nicht zur endosymbiotischen Stickstofffixierung in der Lage sind einen entscheidenden Wachstumsvorteil auf (siehe Abbildung B1-C), der von entscheidender ökologischer und ökonomischer Bedeutung ist. So ist z.B. die Luzerne aufgrund der symbiotischen Stickstofffixierung in der Lage, pro Jahr und Hektar 250 kg Stickstoff zu fixieren (Werner, 1987).

Bakterien, die in einer Symbiose mit Leguminosen in der Lage sind molekularen Stickstoff zu fixieren, werden in der Gruppe der Rhizobien zusammengefasst und können in die Genera *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* und *Sinorhizobium* eingeteilt werden. Es handelt sich dabei durchgängig um streng aerobe, Gram-negative Stäbchen (siehe Abbildung B-1 A), die im Boden leben und sich chemoorganotroph ernähren. Sie sind im Allgemeinen subpolar oder (degeneriert) peritrich begeißelt. Alle Vertreter dieser Gruppe gehören zu der Familie der *Rhizobiaceae* aus der Unterabteilung der α -Proteobakterien. Außer der Fähigkeit zur endosymbiotischen Stickstofffixierung weisen die Rhizobien allerdings keine außerordentlich großen Verwandtschaftsgrade untereinander auf (Jordan, 1984; Van Berkum & Eardly, 1998). Innerhalb der Gruppe der Rhizobien variiert der Wirtsbereich

stark. Jedoch besitzt jede Rhizobien-Spezies ein spezifisches Wirtsspektrum. Einige Spezies, wie z.B. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, haben einen sehr engen Wirtsbereich, während andere wie z.B. *Rhizobium* sp. Stamm NGR234 einen sehr weites Wirtsspektrum aufweisen. *Sinorhizobium meliloti* geht mit den drei Leguminosen-Gattungen *Medicago*, *Melilotus* und *Trigonella* spp. Symbiosen ein (van Rhijn & Vanderleyden, 1995).

Untersuchungen der genetischen Grundlagen der Rhizobien-Leguminosen Wechselwirkungen zeigten, dass die *nod*-(*nodulation*) Gene der Rhizobien eine entscheidende Bedeutung für die Infektion der Leguminosen haben. In den Wurzelexudaten der Pflanze enthaltene Flavonoide induzieren einen Teil der bakteriellen *nod*-Gene (Fisher & Long, 1992). Die Bakterien produzieren von den *nod*-Genen codierte Lipopolysaccharide (Nod-Faktoren), die als Signalstoffe verschiedene Reaktionen und strukturelle Veränderungen in der Pflanzenwurzel auslösen (Dénarié *et al.*, 1992; Truchet *et al.*, 1991). Die Rhizobien binden an der Wurzeloberfläche besonders in Bereichen von noch jungen, wachsenden Wurzelhaaren (Smit *et al.*, 1992). Daraufhin kommt es zu einer Deformation und Krümmung der Wurzelhaare, sodass die Bakterienzellen eingeschlossen werden. Nachfolgend werden einzelne Zellwände der Wurzelhaare lysiert, und die Rhizobien dringen in die Wurzeln ein. Die Pflanze reagiert auf das Eindringen der Bakterienzellen mit der Produktion von neuem Zellmaterial um die Wundstelle und schließt die Bakterien ein (Turgeon & Bauer, 1985). Bei weiterem Fortschritt der Infektion kommt es zur Ausbildung von Infektionsschläuchen, die, mit proliferierenden Bakterienzellen

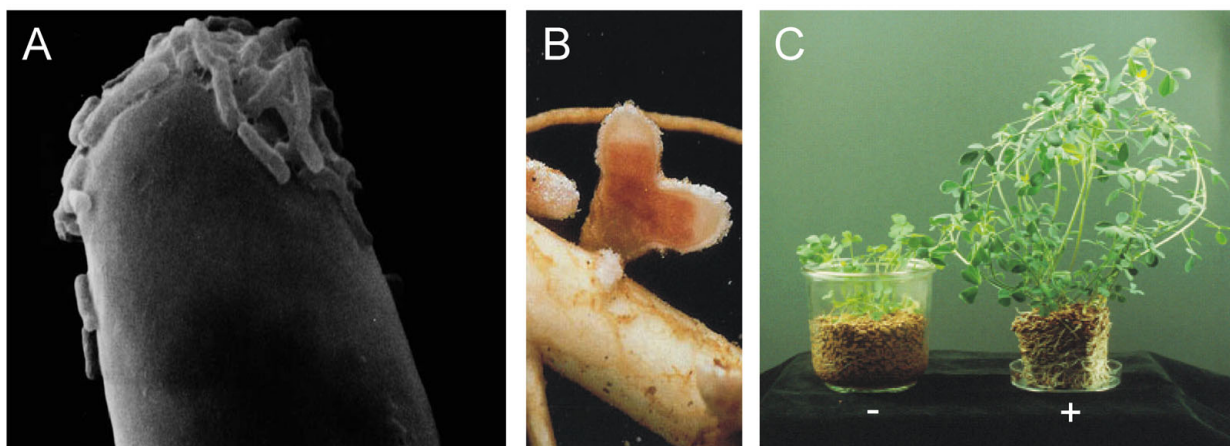


Abbildung B-1 A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Rhizobien auf einer Wurzelhaarspitze (Bild: Frank Dazzo, 1995). B) Von *S. meliloti* Rm1021 induziertes Wurzelknöllchen an einer *Medicago sativa*-Wurzel (Bild: Oklahoma State University). C) Einfluss der Rhizobien-Leguminosen Symbiose auf das Pflanzenwachstum. Das Foto zeigt gleich alte *M. sativa*-Pflanzen mit (+) und ohne (-) Inokulation durch *S. meliloti* Rm1021 (Bild: K. Niehaus, Uni-Bielefeld).

gefüllt, sich in das Innere der Wurzel erstrecken. Zeitgleich mit der Ausbildung der Infektionsschläuche bilden einige corticale Zellen Wurzelknöllchen. Die Infektionsschläuche richten ihr Wachstum zu den sich bildenden Knöllchen aus (Newcomb, 1981). Ausgehend von den Infektionsschläuchen werden die Pflanzenzellen in den Knöllchen (siehe Abbildung B-1 B) mit Bakterienzellen infiziert (Brewin, 1991), die sich vermehren und zu Bakteroiden differenzieren. Die stickstofffixierenden Bakterioide werden dabei einzeln oder zu mehreren von einer Peribakteroidmembran umhüllt. Peribakteroidmembran, Peribakteroidraum und die darin enthaltenen Bakterioide bilden gemeinsam das Symbiosom. Innerhalb eines Knöllchens können mit dem Meristem, der Infektionszone und der Stickstofffixierungszone verschiedene funktionelle Bereiche unterschieden werden.

1.2 *Sinorhizobium meliloti* – Objekt zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten

Aufgrund der ökologischen und ökonomischen Bedeutung der Rhizobien-Leguminosen Symbiose ist sie Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. Viele Arbeiten zielen hierbei auf die Aufklärung des Mechanismus der symbiotischen Stickstofffixierung, um durch gezielte Manipulationen anhand der gewonnenen Erkenntnisse eine Steigerung der Fixierungsrate zu erzielen (Castillo *et al.*, 1999). Aufgrund der Fülle der vorliegenden Arbeiten gilt hierbei die Symbiose zwischen *S. meliloti* und *M. sativa* bzw. *M. truncatula* als ein Modellsystem. Die molekulargenetische Charakterisierung von *S. meliloti* ist auch seit langem Bestandteil der Arbeiten am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld. So wurden unter anderem Methoden und Techniken zur molekulargenetischen Untersuchung etabliert (Becker *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 1986; Simon *et al.*, 1989). Weitere Arbeiten beschäftigten sich insbesondere mit der Synthese der Exopolysaccharide und deren Rolle für die Etablierung der Symbiose (Arnold *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1997; Buendia *et al.*, 1991; Engelke *et al.*, 1989). Weiterhin wurde im Rahmen eines Verbundprojektes vom Lehrstuhl für Genetik in Zusammenarbeit mit verschiedenen deutschen Forschungsinstituten die bisher einzige Freisetzung gentechnisch veränderter Bakterien in Deutschland durchgeführt. Im Rahmen dieses langfristig angelegten Überwachungsexperiments wurden zwei Derivate von *S. meliloti* 2011 an zwei unterschiedlichen Standorten ausgebracht (Dammann-Kalinowski *et al.*, 1996).

Die Arbeitsgruppe Rhizobien-Genomik des Lehrstuhls für Genetik war des Weiteren maßgeblich an der Sequenzierung und der Annotation des Genoms von *S. meliloti* Rm1021 beteiligt. Da die Erstellung der vollständigen Genomsequenz und seine Annotation Voraussetzung für diese Arbeit waren und im Vorfeld der Studien zur Charakterisierung der Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster durchgeführt wurden, soll im folgenden Abschnitt das *S. meliloti* Rm1021 Genomprojekt detaillierter beschreiben werden.

1.3 Das *S. meliloti* Rm1021 Genomprojekt

1.3.1 Struktur des Genoms

S. meliloti Rm1021 besitzt ähnlich wie andere Rhizobien, ein komplexes Genom, welches sich mit dem Chromosom sowie den zwei Megaplasmiden pSymA und pSymB in drei Replikons unterteilt (Burkhardt *et al.*, 1987; Huguet *et al.*, 1983). Nachdem bereits zirkuläre genetische Karten des Chromosoms (Casadeus & Olivares, 1979; Glazebrook *et al.*, 1992; Meade & Signer, 1977) und des Megaplasmids pSymB (Charles & Finan, 1990) erstellt waren, konnten Honeycutt *et al.* erstmals eine physikalische Karte der drei Replikons des *S. meliloti* Rm1021 Genoms vorstellen (Honeycutt *et al.*, 1993). Eine schematische Darstellung der physikalischen Karte der Replikons von *S. meliloti* zeigt Abbildung B-2.

1.3.2 Sequenzierung des Genoms durch ein internationales Konsortium

Das dreigeteilte Genom von *S. meliloti* Rm1021 wurde durch ein internationales Konsortium sequenziert und annotiert (Galibert *et al.*, 2001). So wurde die Sequenz des Chromosoms durch mehrere internationale Arbeitsgruppen unter der Koordination von F. Galibert erstellt (Capela *et al.*, 2001), während das Megaplasmid pSymA unter Leitung von S. Long (Barnett *et al.*, 2001), und das Megaplasmid pSymB in Kooperation des Lehrstuhls für Genetik der Uni Bielefeld mit der Arbeitsgruppe von T. Finan in Kanada sequenziert wurde (Finan *et al.*, 2001). Die angewandte Strategie (*ordered shotgun sequencing*) zur Sequenzierung aller drei Replikons basierte auf einer durch die Arbeitsgruppe von F. Galibert erstellten

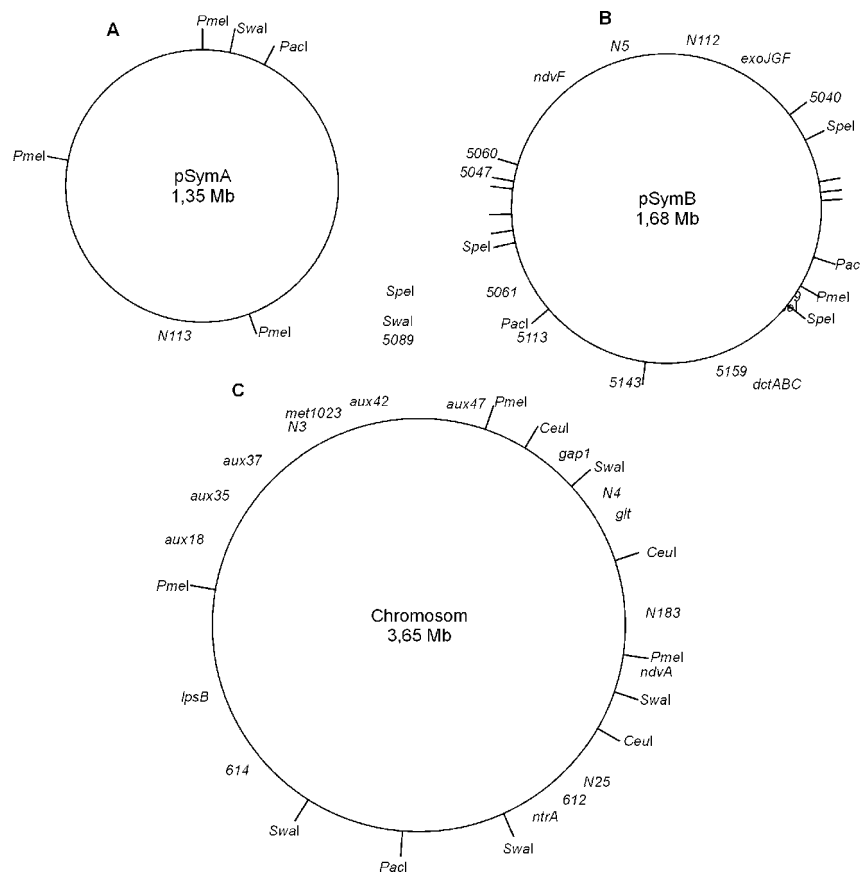


Abbildung B-2 Physikalische Karte des Genoms von *S. melloti* Rm1021 (nach Honeycutt *et al.*, 1993). Für die drei Replikons (A: pSymA; B: pSymB; C: Chromosom) sind die Schnittstellen einiger Restriktionsenzyme und kartierter Markergene dargestellt.

BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-Bibliothek (Capela *et al.*, 1999). Ausgehend von einer 384 Klone umfassenden genomischen BAC-Bibliothek wurde mittels eines zweistufigen PCR-Ansatzes der jeweils minimale BAC-Satz der einzelnen Replikons ermittelt (Barloy-Hubler *et al.*, 2000a; Barloy-Hubler *et al.*, 2000b; Capela *et al.*, 1999). Die minimalen Sätze an BAC-Klonen (Chromosom: 48 BACs, pSymA: 19 BACs, pSymB: 24 BACs) wurden den jeweiligen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

1.3.3 Sequenzierung des Megaplasמידs pSymB

Da die Koordinierung von Sequenzierung und *Assembly* der vollständigen Sequenz des Megaplasמידs pSymB im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden, soll im Folgenden kurz die Sequenzierung des pSymB näher erläutert werden.

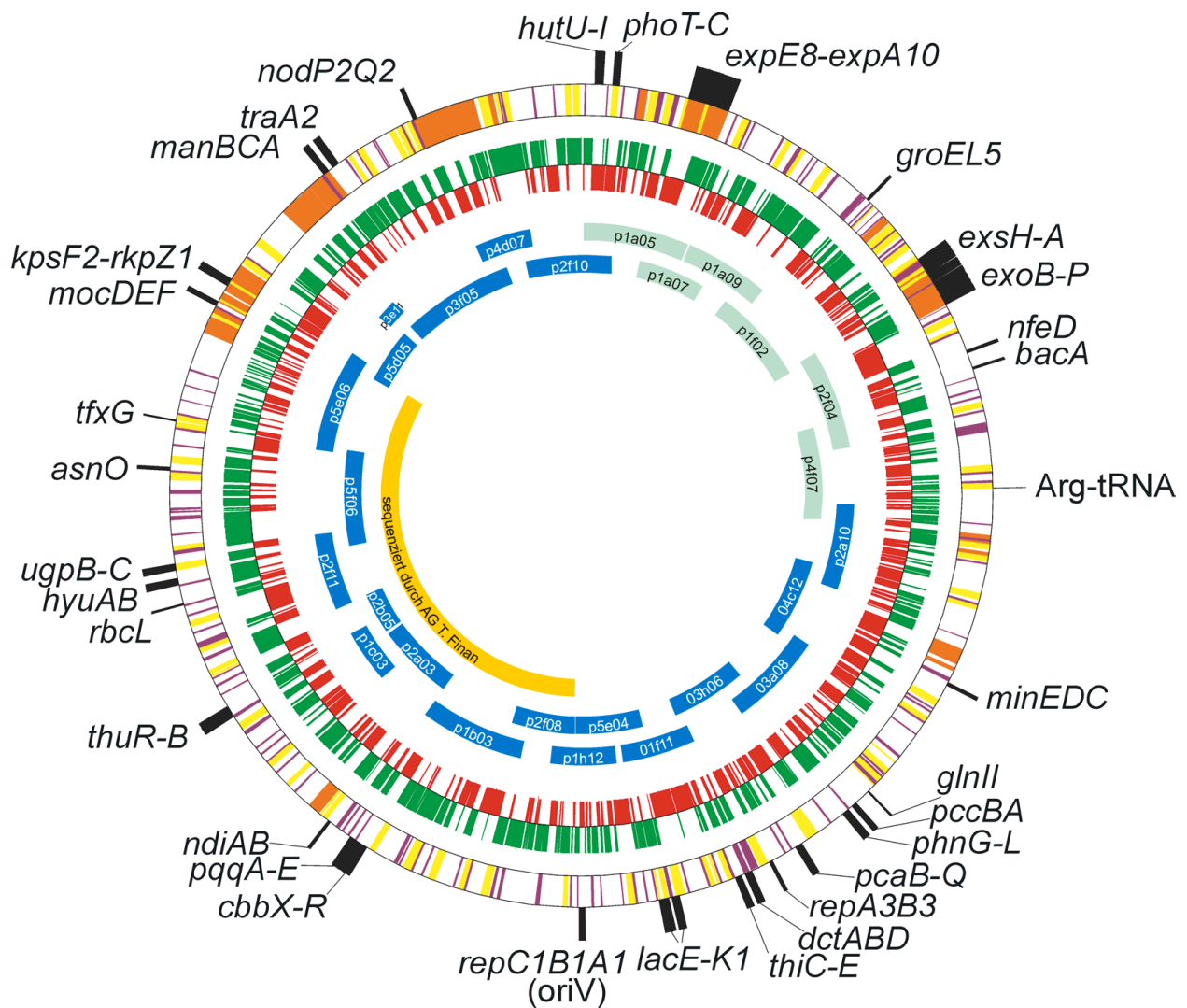


Abbildung B-3 Genomkarte des *S. meliloti* Rm1021 Megaplasmids pSymB (nach Finan *et al.*, 2001). Der äußere Ring stellt annotierte Genregionen dar, die transkriptionelle Regulatoren (lila), ABC-Transporter (gelb) und Gene der Polysaccharid-Biosynthese (orange) codieren. Die Lage spezifischer Markergene ist auf der Außenseite dargestellt. Der mittlere Ring zeigt potentielle ORFs auf dem Hin- (rot) und dem Rückstrang (grün) von pSymB. Der innere Ring zeigt die Lage der sequenzierten BACs (IIT Bielfeld, hellblau; LION bioscience AG, dunkelblau) des minimalen BAC-Contigs. Der von der Arbeitsgruppe T. Finan ebenfalls sequenzierte Bereich ist orange dargestellt.

Die Nativität der 24 BACs, die den minimalen Satz des pSymB bilden (Barloy-Hubler *et al.*, 2000a), wurde am Lehrstuhl für Genetik mittels *Southern*-Hybridisierung überprüft, bevor von der Firma Lion für jeden BAC eine *Shotgun*-Klonbibliothek mit einer zwischen 1 und 2 kb variierenden Insertgröße erstellt wurde. Ausgehend von diesen Klonbibliotheken wurde das Megaplasmid pSymB in unterschiedlichen Anteilen von den industriellen Kooperationspartnern LION bioscience (Heidelberg) und IIT Biotech (Bielefeld)

sequenziert (siehe Abbildung B-3). In Bielefeld erfolgte hierbei in der ersten Phase eine Sequenzierung von *Shotgun*-Klonen der einzelnen BACs bis zu einer theoretischen Abdeckung des Genoms (*coverage*) von ca. 6 bis 8 (*shotgun-sequencing phase*). Existierende Lücken in den jeweiligen BAC-*Contigs* wurden anschließend mittels *Primer-walking* geschlossen (*linking-phase*). Nach Übergabe von Sequenz-*Contigs* durch LION bioscience wurde in der zweiten Phase der Sequenzierung eine vorläufige Sequenz des pSymB erstellt, die an fraglichen Stellen ebenfalls mittels *Primer-walking* überarbeitet und gegebenenfalls korrigiert wurde (*finishing/polishing-phase*). Hierbei wurden die vorhandenen Einzelstranglücken in der Gesamtsequenz ebenfalls mittels *Primer-walking* aufgefüllt, um schließlich die finale Sequenz des Megaplasמידs pSymB zu erhalten.

Unabhängig von der beschriebenen Sequenzierung des minimalen BAC-*Contig* Satzes wurde in der Arbeitsgruppe von T. Finan ein Teilbereich des pSymB ebenfalls sequenziert (siehe Abbildung B-3). Anhand dieser Teilsequenz wurde der entsprechende Bereich der in Bielefeld erstellten Gesamtsequenz des Megaplasמידs pSymB abschließend überprüft.

1.3.4 Zusammenfassung der Annotation

Das gesamte Genom von *S. meliloti* Rm1021 umfasst ca. 6,681 Mb, die sich mit ca. 3,654 Mb für das Chromosom, ca. 1,354 Mb für pSymA und ca. 1,683 Mb für pSymB auf die verschiedenen Replikons verteilen (Galibert *et al.*, 2001). Die finalen Sequenzen der einzelnen Replikons wurden in einer gemeinschaftlichen Aktion der wissenschaftlichen Kooperationspartner nach einheitlichen Kriterien annotiert. Insgesamt wurden 6204 putative Gene annotiert (Chromosom: 3341 Gene; pSymA: 1293 Gene; pSymB: 1570 Gene), von denen für 59,7 % eine Funktion vorhergesagt werden konnte.

Das Chromosom weist die Merkmale eines typischen aeroben, heterotrophen Bakteriums auf. So wurden die meisten Gene für essentielle *Housekeeping*-Gene sowie an der Motilität, Chemotaxis, Stressantwort und Pflanzen-Interaktion beteiligte Gene auf dem Chromosom identifiziert (Capela *et al.*, 2001). Durch die Annotation wurde bestätigt, dass das Megaplasמיד pSymA für die Symbiose spezialisiert zu sein scheint, da die meisten für die Nodulation und Stickstofffixierung relevanten Gene dort identifiziert wurden. (Banfalvi *et al.*, 1981; Göttfert, 1993). Aufgrund eines gegenüber den weiteren Replikons unterschiedlichen GC-Gehalts von 60,4 % (Chromosom 62,7 %, pSymB: 62,4%) und eines abweichenden Codon-Gebrauchs scheint pSymA fremden Ursprungs zu sein und Plasmideigenschaften aufzuweisen

(Galibert *et al.*, 2001). Da auf pSymB ein für das Wachstum essentielles Gen für eine *arg-t*-RNA lokalisiert wurde, scheint pSymB chromosomale Eigenschaften aufzuweisen (Finan *et al.*, 2001). Eine herausragende Eigenschaft des Megaplasmid pSymB ist die große Anzahl an Genen, deren Produkte am Substrattransport, in der Polysaccharidsynthese und dem Katabolismus beteiligt sind (Abbildung B-3). Das Megaplasmid pSymB erweitert somit die Möglichkeiten des Bakteriums zur Aufnahme und Verwertung von vielen Verbindungen und erhöht dadurch die Konkurrenzfähigkeit des Bakteriums im Boden (Finan *et al.*, 2001).

Im gesamten Genom von *S. meliloti* Rm1021 wurden insgesamt 176 potentielle ABC-Transporter identifiziert (Chromosom: 78; pSymA: 34; pSymB: 64) die zusammen 12 % aller Gene des Genoms repräsentieren (Galibert *et al.*, 2001). Neben einer großen Anzahl von Zucker ABC-Transporter wurden auch potentielle Systeme für die Aufnahme von Eisen, Aminosäuren, Peptiden, Spermidin/Putrescin, Sulfat, Phosphat und einzelnen weiteren Stoffklassen im Genom identifiziert. Auch die Genome anderer frei-lebender Bakterien, wie z.B. *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner *et al.*, 2001), *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al.*, 2000) und *Pseudomonas aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000), weisen ähnlich hohe Zahlen an ABC-Transportsystemen auf. Für *S. meliloti* Rm1021 scheint die große Anzahl von Transportsystemen eine Bedeutung bei der Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen sowohl frei-lebend im Boden, sowie als Endosymbiont im Wirt zu haben (Finan *et al.*, 2001).

2 ABC-Transporter als bakterielle Transportsysteme

2.1 Allgemeine Merkmale

Der Ursprung der Arbeiten über ABC-Transporter geht zurück bis in die sechziger Jahre. Bei der Isolierung von periplasmatischen Proteinen Gram-negativer Bakterien wurde eine Vielzahl von bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntem Bindeproteinen mit einer hohen Affinität für Substrate wie Zucker, Aminosäuren und Ionen identifiziert (Neu & Heppel, 1965). Obwohl diese Proteine keine bekannte enzymatische Funktion zeigten wurde zum damaligen Zeitpunkt bereits eine Beteiligung an Transportsystemen angenommen (Pardee, 1968). In Bezug auf die Methode zur

Isolierung dieser Proteine wurden die Transporter damals sehr oberflächlich als *shock sensitive*-System bezeichnet. Die essentielle Bedeutung der periplasmatischen Bindeproteine für den Substrattransport wurde erstmals in den frühen siebziger Jahren anhand der Analyse von Bindeprotein-Mutanten, die nicht in der Lage waren das entsprechende Substrat zu transportieren, nachgewiesen (Ames & Lever, 1972; Boos, 1972). In der Folge wurden die Systeme somit als *binding-protein dependent*-Transportsysteme bezeichnet, um die Bedeutung des Bindeproteins für diese Transporter herauszustellen (Ames, 1986). Die weiteren membrangebundenen Komponenten der Transportsysteme wurden später auf Basis von Genfusionen identifiziert (Shuman *et al.*, 1980).

Aufgrund der Arbeiten von Ames *et al.* konnte in den späten achtziger Jahren erstmals gezeigt werden, dass die ATP-Hydrolyse die treibende Kraft des Substrattransportes ist (Ames & Joshi, 1990; Bishop *et al.*, 1989). Einige Komponenten der Transportsysteme weisen in einigen hochkonservierten Bereichen ihrer Sequenz die für ATP-hydrolysierende Proteine charakteristischen Walker_A- und Walker_B-Motive auf (Walker *et al.*, 1982). Diese Untereinheit wurde entsprechend *ATP-Binding-Cassette*- oder ABC-Untereinheit genannt und war später auch namensgebend für die Bezeichnung des gesamten Transportsystems (Higgins, 1992).

Prokaryotische ABC-Transporter sind beschrieben als unidirektionale Transporter, die die Translokation direkt mit der Hydrolyse von ATP koppeln. Abbildung B-4 zeigt die schematische Struktur eines typischen bakteriellen ABC-Transporters. Alle ABC-Transporter bestehen mindestens aus zwei Transmembran-Domänen (TMD) und zwei ABC-Domänen (ATPasen), die in nahezu allen möglichen Varianten miteinander kombiniert bzw. zu multifunktionalen Polypeptiden fusioniert sein können. Die beiden Transmembran-Domänen bilden den eigentlichen Substratkanal durch die Cytoplasmamembran. Die Mehrheit der bisher untersuchten Transmembran-Domänen weisen jeweils sechs hydrophobe Transmembran-Helices auf, die miteinander über fünf hydrophile Proteinschleifen verbunden sind. Die C- und N-terminalen Ende der Proteine befinden sich auf der inneren Seite der Cytoplasmamembran (Higgins, 1992). Die Proteinsequenzen der Transmembran-Domänen weisen ein kurzes konserviertes Sequenzmotiv auf, welches in einer cytoplasmatischen Proteinschleife lokalisiert wurde, die mit den ABC-Domänen interagiert (Dassa & Hofnung, 1985; Pearce *et al.*, 1992).

Die ATP-hydrolysierenden Domänen sind das charakteristische Merkmal der ABC-Transporter (Higgins, 1992). Beide ABC-Domänen sind essentiell für die Funktion des gesamten Transportsystems (Hiles *et al.*, 1987). Sie sind durchgängig hydrophil, weisen keine Membran-überspannende Segmente auf und sind an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert. Alle ABC-Domänen weisen die für ATP-bindende Proteine charakteristischen Walker-Motive

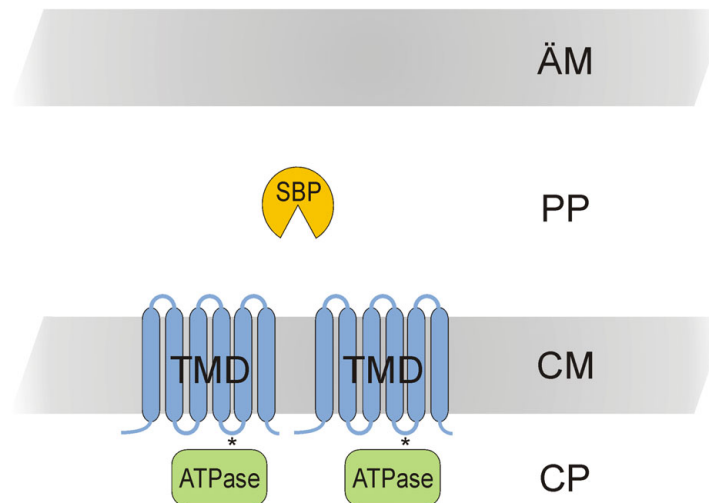


Abbildung B-4 Schematische Darstellung eines typischen ABC-Transporters Gram-negativer Bakterien. Die beiden Transmembran-Domänen (TMD) durchspannen die Cytoplasmamembran (CM) jeweils sechs mal, sodass insgesamt zwölf Transmembran-Segmente pro Transporter vorliegen. Das kurze Sequenzmotiv, welches bei der Interaktion mit den ABC-Domänen (ATPase) beteiligt ist, ist als * an der cytoplasmatischen Proteinschleife zwischen Segment 4 und 5 dargestellt. Die ABC-Domänen sind an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert. Das für Importsysteme charakteristische Substratbindeprotein (SBP) befindet sich im Periplasma (PP) zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran (ÄM).

auf (Higgins *et al.*, 1985; Higgins *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1982). In vielen bakteriellen ABC-Transportsystemen sind die ABC-Domänen mit den Transmembran-Domänen verankert und reichen teilweise in den von den Transmembran-Domänen geformten Kanal hinein (Davidson & Nikaido, 1990; Kerppola *et al.*, 1991; Shuman & Silhavy, 1981).

Im Gegensatz zu ABC-Exportern weisen prokaryotische ABC-Importer zusätzlich ein Bindeprotein auf, das sich bei Gram-negativen Bakterien im Periplasma zwischen äußerer Membran und Cytoplasmamembran befindet, während es bei Gram-positiven Bakterien über eine Lipidgruppe mit der Cytoplasmamembran verankert ist (Gilson *et al.*, 1988). Alle Bindeproteine weisen eine ähnliche Struktur mit zwei kugelförmigen Domänen und einer dazwischen liegenden Spalte, die die Substratbindestelle bildet, auf (Adams & Oxender, 1989; Quioco, 1990). Die periplasmatischen Bindeproteine dienen den ABC-Transportern als anfänglicher Rezeptor, der das Substrat im Verlauf des Transportprozesses den membrangebundenen Komponenten übergibt. Sie erleichtern somit die Diffusion des Substrats und erhöhen die Effizienz mit der das Substrat an den membrangebundenen Transportkomplex gelangt (Higgins, 1992).

2.2 Funktionsweise und Substratspezifität

Obwohl die Substrate der ABC-Transporter nicht nur chemisch sehr unterschiedlich sind, sondern auch stark in Bezug auf ihre Größe variieren, weisen einzelne ABC-Transporter eine sehr hohe Substratspezifität auf (Higgins, 1992). Neben den bereits beschriebenen periplasmatischen Bindeproteinen sind auch die Transmembran-Domänen an der Ausbildung der Substratspezifität beteiligt (Treptow & Shuman, 1985). Die Bindung des Substrats in der Spalte zwischen den beiden kugelförmigen Domänen bewirkt eine Konformationsänderung des periplasmatischen Bindeproteins (Sack *et al.*, 1989), die es dem Bindeprotein-Substrat-Komplex ermöglicht, mit den Transmembran-Domänen zu interagieren (Prossnitz *et al.*, 1988; Treptow & Shuman, 1985). Die Interaktion des Bindeprotein-Substrat-Komplexes ist direkt mit der ATP-Hydrolyse gekoppelt (Gorbulew *et al.*, 2001; Petronilli & Ames, 1991), die wiederum zeitgleich mit dem Substrattransport geschieht (Mimmack *et al.*, 1989). Auf Basis zahlreicher Arbeiten wurde ein Modell des Maltose-Transporter von *E. coli* entwickelt, welches auch auf andere ABC-Importer Gram-negativer Bakterien übertragen werden kann (Ehrmann *et al.*, 1998; Schneider, 2000). Abbildung B-5 zeigt die schematische Darstellung des Modells zur Funktionsweise der ABC-Transporter. Die ABC-Domänen (ATPase) haben im Grundzustand

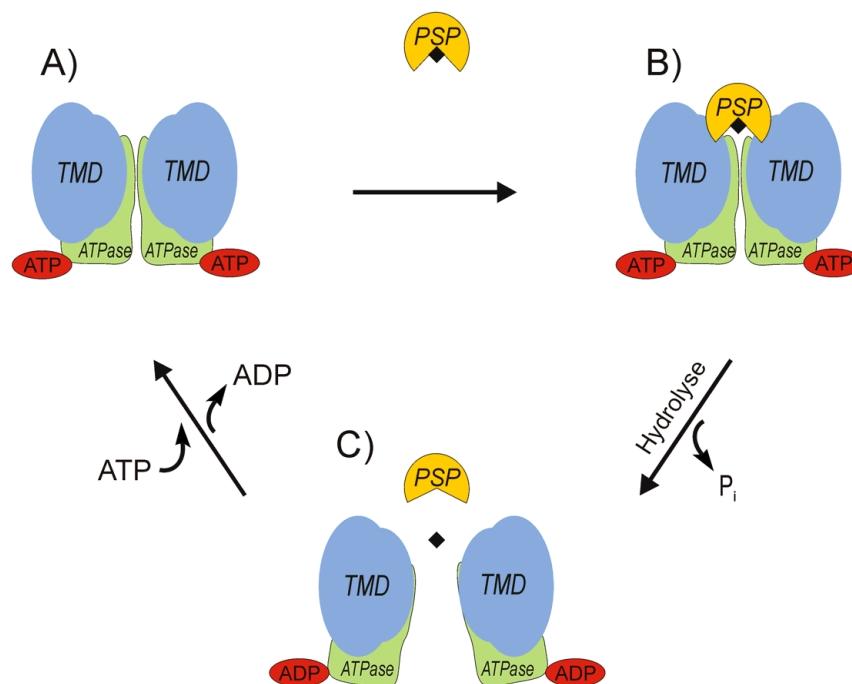


Abbildung B-5 Schematische Darstellung der Funktionsweise von ABC-Transportern Gram-negativer Bakterien. (Details im Text)

(A) jeweils ein ATP-Molekül gebunden und ragen in den von den Transmembran-Domänen (TMD) gebildeten Kanal hinein, der somit verschlossen ist. Ein Substrat-Bindeprotein-Komplex interagiert mit den extrazellulären Bereichen der Transmembran-Domänen, was wiederum die Aktivierung der ATP-Hydrolyse-Aktivität der ABC-Domänen bewirkt (B). Die ATP-Hydrolyse führt ihrerseits zu einer Konformationsänderung der ABC-Domänen, die als Folge den Kanal für den Durchtritt des Substratmoleküls freigeben (C). Die erneute Bindung von ATP bringt den ABC-Transporterkomplex in den stabilen Grundzustand zurück.

2.3 Die bakterielle Eisen-Aufnahme

2.3.1 ABC-Transporter vermittelter Import von Eisen-Ionen und Eisen-Komplexen

Sofern Bakterien unter aeroben Bedingungen leben, sind sie mit dem bereits beschriebenen Problem der extrem geringen Verfügbarkeit von Eisen konfrontiert. Um dennoch eine ausreichende Eisenversorgung zu erreichen, haben Bakterien unterschiedlichste Mechanismen entwickelt. An den meisten bakteriellen Mechanismen zur Eisenaufnahme sind spezialisierte ABC-Transporter beteiligt, die von Köster in drei funktionell unterschiedliche Transporter-Typen klassifiziert wurden (Köster, 2001). Eine schematische Darstellung der verschiedenen Transporter-Typen zeigt Abbildung B-6.

2.3.1.1 Eisen-ABC-Transporter des *Siderophore/Haem*-Typs

Aufgrund von Eisenmangel synthetisieren und sekretieren die meisten Bakterien Siderophore, die eine sehr hohe Spezifität und Affinität zu Fe^{3+} aufweisen (Byers & Arceneaux, 1998; Guerinot, 1994). Nach der Bindung von dreiwertigem Eisen in der Umgebung ermöglichen spezifische Rezeptoren in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien den Transport von Fe^{3+} -Siderophor-Komplexen in das Periplasma (Braun *et al.*, 1998; Stintzi *et al.*, 2000) (Abbildung B-6 A). Dieser Transport wird durch das TonB-ExbB-ExbD-System energetisiert (Braun & Killmann, 1999; Klebba *et al.*, 1993; Moeck & Coulton, 1998; Postle, 1993). Der

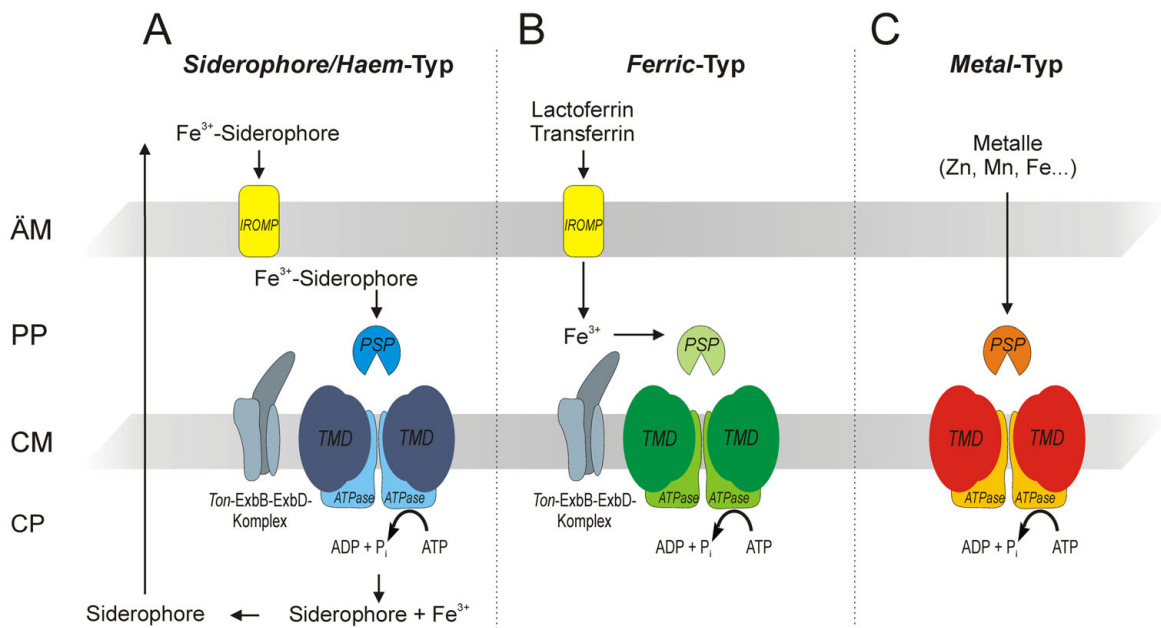


Abbildung B-6 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Eisen-ABC-Transporter Typen. A) Beim *Siderophore/Haem-Typ* Transporter wird an Siderophore gebundenes Fe³⁺ durch einen Rezeptor (IROMP; *iron regulated outer membrane receptor*) der äußeren Membran (ÄM) in das Periplasma (PP) transportiert. Diese Translokation wird durch das TonB-ExbB-ExbD-System energetisiert. Anschließend wird der Fe³⁺-Siderophore Komplex durch einen *Siderophore/Haem-Typ* ABC-Transporter in das Cytoplasma (CP) transportiert. B) Bei *Ferric-Typ* Transportern wird das an ein Eisen-Speicherprotein assoziierte Fe³⁺ an einen äußeren Rezeptor gebunden. Anschließend erfolgt die Freisetzung des Fe³⁺ in das Periplasma durch einen TonB-ExbB-ExbD-abhängigen Prozess. Die Aufnahme von Fe³⁺ in das Cytoplasma erfolgt durch einen *Ferric-Typ* Eisen-ABC-Transportern. C) Beim *Metal-Typ* Transporter ist der Transportmechanismus durch die äußere Membran unbekannt. Transporter diesen Typs sind in der Lage, chelatisiertes Eisen und/oder Mangan zu transportieren.

Transport von Fe³⁺-Siderophore-Komplexen durch die Cytoplasmamembran erfolgt durch ABC-Transporter. Einige, zumeist pathogene Bakterien nehmen über ähnliche Transportsysteme Hämoglobin, Hämopexin und Haptoglobin auf, oder sekretieren und importieren Hämophore, die analog zu Siderophoren Haem binden können (Genco & Desai, 1996; Vasil & Ochsner, 1999; Wandersman & Stojilkovic, 2000).

Der genaue Mechanismus, der abschließend im Cytoplasma zur Freisetzung des Eisens aus den importierten Fe³⁺-Siderophore-Komplexen führt, ist bisher nicht eindeutig aufgeklärt. Das derzeit favorisierte Modell geht davon aus, dass das gebundene Fe³⁺ enzymatisch zu Fe²⁺ reduziert wird und aufgrund der niedrigen Affinität von Siderophoren zu Fe²⁺ freigesetzt werden kann (Fontecave *et al.*, 1994; Guerinot, 1994; Pierre *et al.*, 2002). ABC-Transporter für den Transport von Fe³⁺-Siderophore wurden von Köster gemeinsam mit den funktionell ähnlichen ABC-Transportern für Haem-Verbindungen und Vitamin-B₁₂ in der Gruppe der *Siderophore/Haem-Typ* Transporter zusammengefasst (Köster, 2001).

2.3.1.2 Eisen-ABC-Transporter des *Ferric*-Typs

Eisen-ABC-Transporter des *Ferric*-Typs, sind in ihrer Funktion völlig unabhängig von den zuvor beschriebenen Siderophoren. Die Mitglieder dieser Gruppe ermöglichen den Transport von Fe^{3+} , welches aus Eisenspeicher-Proteinen wie z.B. Lactoferrin oder Transferrin stammt, in das Cytoplasma (Angerer *et al.*, 1990; Chin *et al.*, 1996; Abbildung B-6 B). Die Aufnahme des dreiwertigen Fe^{3+} in das Periplasma erfolgt zuvor anhand von spezifischen, durch das TonB-ExbB-ExbD-System energetisierten Rezeptoren in der äußeren Membran (Mietzner *et al.*, 1998; Schryers & Stojiljkovic, 1999; Vasil & Ochsner, 1999).

2.3.1.3 Eisen-ABC-Transporter des *Metal*-Typs

In der dritten Gruppe der Eisen-ABC-Transporter, der *Metal*-Typ Gruppe, werden zum einen ABC-Transporter, die den Transport chelatierten Eisens durch die Cytoplasmamembran bewerkstelligen, zum anderen ABC-Transporter mit einer hohen Spezifität für andere Metall-Ionen, wie Zink oder Mangan, zusammengefasst (Claverys, 2001; Köster, 2001). Im Gegensatz zu den *Siderophore/Haem*-Typ und *Ferric*-Typ Transportern wird kein Rezeptor in der äußeren Membran für die Aufnahme von chelatiertem Eisen in das Periplasma benötigt, sodass auch das TonB-ExbB-ExbD-System bei der Eisenaufnahme mittels *Metal*-Typ ABC-Transportern nicht beteiligt ist (Abbildung B-6 C).

2.3.2 Aufnahme von Fe^{2+}

Viele Bakterien besitzen neben den Eisen-ABC-Transportern mit dem Feo-System einen weiteren Mechanismus zur Aufnahme von Fe^{2+} (Andrews *et al.*, 2003). Die eigentliche Transportkomponente wird hierbei durch das membrangebundene Protein FeoB gebildet, welches die freiwerdende Energie der ATP-Hydrolyse zum Transport von Fe^{2+} nutzt (Lafontaine & Sokol, 1998; Velayudhan *et al.*, 2000). Die Aufnahme von Fe^{2+} durch FeoB bekommt unter anaeroben Bedingungen, wenn Fe^{2+} stabil vorliegt und gegenüber Fe^{3+} mengenmäßig dominiert, eine für das Bakterium deutlich stärkere Bedeutung als unter aeroben Bedingungen (Stojiljkovic *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996).

2.3.3 Low-affinity Eisenaufnahme

Neben den zuvor beschriebenen Aufnahmesystemen zur bakteriellen Eisenversorgung unter Eisenmangelbedingungen, gibt es Hinweise auf einen weiteren Mechanismus, der bei einer ausreichenden Eisenmenge im Habitat Fe^{3+} in die Zelle zu transportieren vermag. Dieser *low-affinity* Eisentransport konnte bei *E. coli* und *Helicobacter pylori* bereits gemessen werden, jedoch ist die Funktionsweise bisher völlig unklar, sodass ein direkter Nachweis noch aussteht (Earhart, 1996; Velayudhan *et al.*, 2000).

3 Der bakterielle Eisenmetabolismus

3.1 Eisen als essentieller Wachstumsfaktor

Mit *Lactobacilli* (Archibald, 1983; Weinberg, 1997) und *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000) als die einzigen bekannten Ausnahmen, handelt es sich bei Eisen um ein essentielles Spurenelement für fast alle Bakterien, da Eisen aufgrund seines weiten Redoxpotentials an einer Vielzahl von Elektronentransfer-Prozessen direkt oder im aktiven Zentrum von Redox-Enzymen beteiligt ist. So ist Eisen z.B. ein notwendiger Bestandteil zahlreicher Enzyme der Atmungskette sowie des Intermediärstoffwechsels. Der typische Eisengehalt einer Bakterienzelle beträgt ca. $10^5 - 10^6$ Ionen pro Zelle (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999; Rouf, 1964).

Trotz der entscheidenden biologischen Bedeutung kann ein Überfluss an freiem Eisen auch toxisch für die Bakterienzelle sein. Bereits geringe überschüssige Mengen des Metalls führen zur Bildung von beträchtlichen Mengen an Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid, da Eisen als Katalysator dieser Reaktion (Fenton-Reaktion) dient (Emery, 1991). So ist es nicht verwunderlich, dass viele Bakterien über intrazelluläre Eisenspeicher, wie z.B. Ferritin oder Bakterioferritin verfügen, die überschüssiges Eisen in einer für die Zelle sicheren Form verwalten (Crichton & Charlotheaux-Wauters, 1987; Harrison & Lilley, 1989; Massover, 1993; Theil & Hase, 1993).

Obwohl Eisen das vierthäufigste Element der Erde ist, steht es Bakterien nicht uneingeschränkt zur Verfügung, da im Gegensatz zur Löslichkeit von zweiwertigem Fe^{2+} (0,1 M bei pH 7,0) die des oxidierten dreiwertigen Fe^{3+} (10^{-18} M bei pH 7,0) extrem gering ausfällt (Andrews *et al.*, 2003). Unter physiologischen pH- und Sauerstoff-Bedingungen überwiegt jedoch das nahezu unlösliche dreiwertige Fe^{3+} , sodass Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen aufweisen, um ihre Versorgung mit Eisen zu gewährleisten.

3.2 Der Eisenmetabolismus bei Rhizobien

Eisen spielt auch in der Symbiose von Leguminosen und Rhizobien eine wichtige Rolle. So wurde Eisenmangel auch in vielen Arbeiten als Ursache für eine reduzierte Anzahl und Größe von Knöllchen an Leguminosen, wie Kichererbse (*Cicer arietinum L.*; Rai *et al.*, 1982), Linse (*Lens culinaris*; Rai *et al.*, 1984), Erdnuss (*Arachis hypogaea*; O'Hara *et al.*, 1988) und Lupine (*Lupinus polyphyllos*; Tang *et al.*, 1990) beschrieben.

Auch wenn der Eisengehalt der Knöllchen als sehr hoch eingestuft wurde (Raglan & Theil, 1993), ist über die vorherrschende Form des Eisens bisher nur sehr wenig bekannt, außer dass in tierischen oder pflanzlichen Wirten von Bakterien das Eisen fast ausschließlich in gebundener Form vorliegt (Ratledge & Dover, 2000). Das im Knöllchen vorliegende Eisen ist überwiegend an Proteine gebunden, die essentiell für eine einwandfreie Funktion der symbiotischen Stickstofffixierung sind. Einige dieser Proteine konnten in großen Mengen im Knöllchen nachgewiesen werden. So kann innerhalb von stickstofffixierenden Knöllchen das sauerstoffbindende Leghaemoglobin bis zu 30% des gesamten Proteingehalts ausmachen, während das stickstofffixierende Enzym Nitrogenase, ein Eisen-Schwefel-Protein mit insgesamt 30 Fe-Atomen, bis zu 10 – 12 % des gesamten Proteingehalts der Bakterien bilden kann

(Reigh & O'Connell, 1993; Verma & Long, 1983). Weitere an der Stickstofffixierung beteiligten Proteine, wie z.B. Ferredoxin oder Cytochrom enthalten ebenfalls zahlreiche Eisen-Atome (Fett *et al.*, 1998).

Bei Ferritin handelt es sich um ein pflanzliches Eisenspeicherprotein, das bis zu 4500 Fe-Atome speichern kann (Briat & Lobréaux, 1997). Ferritin konnte auch in jungen Knöllchen nachgewiesen werden, der Gehalt nimmt jedoch mit zunehmendem Alter und Differenzierung der Knöllchen drastisch ab (Bergersen, 1963; Ko *et al.*, 1987; Raglan & Theil, 1993). Ob das im

Ferritin gespeicherte Eisen von den Bakteroiden für ihre Eisenversorgung genutzt wird, konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

Einige Mechanismen zur Eisenversorgung der Bakterioide in Knöllchen der Sojabohnen wurden bisher biochemisch charakterisiert (Day *et al.*, 2001). So konnte nachgewiesen werden, dass Fe^{3+} komplexiert mit organischen Säuren, wie z. B. Citrat, durch die Peribakteroidmembran in den Peribakteroidraum transportiert und dort an Siderophor-ähnliche Moleküle gebunden wird (Levier *et al.*, 1996; Moreau *et al.*, 1995; Wittenberg *et al.*, 1996). Levier *et al.* konnten an isolierten Peribakteroidmembranen die Aktivität einer Fe^{3+} -Chelat-Reduktase gemeinsam mit einer Stimulation der Fe^{3+} -Aufnahme von isolierten Symbiosomen durch Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) nachweisen (Levier *et al.*, 1996). Gleichfalls wurde gezeigt, dass Fe^{2+} ebenfalls durch die Peribakteroidmembran transportiert werden kann und in größeren Mengen als Fe^{3+} von den Bakteroiden aufgenommen wird (Moreau *et al.*, 1998). An der Aufnahme von Fe^{2+} ist mit GmDmt1 ein in der Peribakteroidmembran lokalisierter Transporter beteiligt, der in sich entwickelnden Knöllchen mit Beginn der Stickstofffixierung verstärkt exprimiert wird (Kaiser *et al.*, 2003).

Mit RirA (*rhizobial iron regulator*) wurde in *R. leguminosarum* ein zentraler Regulator der Eisenaufnahme charakterisiert. Eisenabhängig regulierte Gene der Siderophorproduktion und -aufnahme, sowie Gene für die Aufnahme von Haem-Verbindungen und anderen Eisenquellen scheinen direkt unter der Kontrolle dieses Regulators zu stehen. (Todd *et al.*, 2002). Homologe von RirA konnten auch in den Genomen der Rhizobien *S. meliloti* und *M. loti* identifiziert werden, jedoch liegt für diese noch keine funktionelle Charakterisierung vor.

Aufgrund der unterschiedlichen von Rhizobien genutzten Strategien zur Eisenaufnahme (Johnston *et al.*, 2001) verwundert es nicht, dass *S. meliloti* Stämme eine Vielzahl von spezifischen Eisenquellen für ihr Wachstum nutzen können (Noya *et al.*, 1997). Frei lebende *S. meliloti* Rm1021 Zellen synthetisieren und sekretieren das hexadentate Dihydroxamat Rhizobactin 1021 als Siderophor (Lynch *et al.*, 2001; Persmark *et al.*, 1993; Schwyn & Neilands, 1987). Auf dem Megaplasmid pSymA wurde eine acht Gene umfassende Region identifiziert, deren Produkte an der Biosynthese, dem Transport und der Regulation von Rhizobactin 1021 beteiligt sind (Lynch *et al.*, 2001). So ermöglichen die Gen-Produkte des *rhbABCDEF*-Operons die Synthese von Rhizobactin 1021 aus den Aminosäuren Glutamat und Aspartat. Des Weiteren konnte mit *rhtA* das Gen des spezifischen Rezeptors in der äußeren Membran identifiziert werden, welches unter positiver Kontrolle des transkriptionellen Aktivators RhrA steht.

Die Rhizobactin 1021 abhängige Eisenaufnahme ist jedoch nicht essentiell für die Nodulation und Stickstofffixierung von *S. meliloti* Rm1021 in Symbiose mit der Wirts-Leguminose *M. sativa* (Gill & Neilands, 1989). Jedoch steht die Siderophor-abhängige Eisenaufnahme in direktem Zusammenhang mit spezifischen Eisen-regulierten Rezeptorproteinen (IROMPs; *iron regulated outer membrane proteins*) in der äußeren Membran, die es Rhizobien ermöglichen neben den endogenen Siderophoren auch exogene Siderophore anderer Stämme zu nutzen (Reigh & O'Connell, 1993). Im Genom von *S. meliloti* Rm1021 wurde bisher zusätzlich zu RhtA mit ShmR auch ein für Haem-Verbindungen spezifischer Rezeptor charakterisiert (Battistoni *et al.*, 2002b).

4 Ziele dieser Arbeit

In Bezug auf die an der Eisenaufnahme beteiligten ABC-Transporter von *S. meliloti* Rm1021 ist bisher wenig bekannt. Lediglich das chromosomal codierte SitABCD-System wurde ausführlich charakterisiert (Chao *et al.*, 2004; Platero *et al.*, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass dieser *Metal*-Typ Transporter jedoch überwiegend für die Aufnahme Mangan verantwortlich ist, benötigen *S. meliloti* Rm1021 Zellen zur ausreichenden Eisenversorgung weitere Aufnahmemechanismen. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit eine detaillierte Charakterisierung der weiteren, durch das *S. meliloti* Rm1021 Genom codierten, potentiellen Eisen-ABC-Transporter erfolgen. Hierbei soll ein besonderes Augenmerk auf ihre spezielle Rolle in der Eisenaufnahme sowohl unter frei-lebenden als auch unter symbiotischen Bedingungen gerichtet sein.

5 Publikationen

Teile der Dissertation wurden in folgenden Veröffentlichungen publiziert oder zur Veröffentlichung vorbereitet.

Chao, T., Becker, A., **Buhrmester, J.**, Pühler, A. & Weidner, S. (2004). The *Sinorhizobium meliloti* fur gene regulates in dependence of Mn(II) the transcription of the sitABCD operon encoding a metal type transporter. J Bacteriol 186, 3609-3620.

Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., **Buhrmester, J.** Chain, P., Vorhölter, F. J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. & Pühler, A. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci USA 98, 9889-9894.

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

Pühler, A., Bartelsmeier, V., **Buhrmester, J.**, Chao, T., Kapp, D., Vorhölter, F. J. & Weidner, S. (2004). Genome Based Analysis of Iron Uptake in the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Nova Acta Leopoldina 333, 133-138.

Buhrmester, J., Bartelsmeier, V., Chao, T., Pühler, A. & Weidner, S. (2004) Genome wide analyses of ABC-transporter gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 involved in iron import (zur Veröffentlichung vorbereitet)

C Material und Methoden

1 Material

1.1 Bakterienstämme

Tabelle C-1 Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften

Stamm/Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>S. meliloti</i>		
Rm1021	spontan resistente Mutante des Wildtyp RU47, Sm ^r	(Meade <i>et al.</i> , 1982)
Rm1021ΔSMc02509	Derivat von Rm1021, Δ <i>smc02509</i> (<i>sitA</i>), Sm ^r	(Chao <i>et al.</i> , 2004)
Rm1021ΔSMc04317	Derivat von Rm1021, Δ <i>smc04317</i> (<i>afuA</i>), Sm ^r	diese Arbeit
Rm1021ΔSMc01512	Derivat von Rm1021, Δ <i>smc01512</i> (<i>hmuT</i>), Sm ^r	diese Arbeit
Rm1021ΔSMa1746	Derivat von Rm1021, Δ <i>sma1746</i> , Sm ^r	diese Arbeit
Rm1021ΔSMb20056	Derivat von Rm1021, Δ <i>smb20056</i> , Sm ^r	diese Arbeit
Rm1021ΔSMb21432	Derivat von Rm1021, Δ <i>smb21432</i> , Sm ^r	diese Arbeit
Rm1021ΔSMb21540	Derivat von Rm1021, Δ <i>smb21540</i> , Sm ^r	diese Arbeit
Rm1021:: <i>rhbC</i>	Derivat von Rm1021, <i>pk18mob</i> :: <i>rhbC</i> , Sm ^r /Nm ^r	diese Arbeit
<i>E. coli</i>		
DH5αMCR	F ⁻ <i>endA1 supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ(<i>lacZYAargF</i>)U169 φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS</i> <i>mcrBC</i>)	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
S17-1	<i>E. coli</i> 294 ::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] <i>pro res</i> Δ <i>recA</i> , Tpr	(Simon <i>et al.</i> , 1983)

1.2 Plasmide

Tabelle C-2 Verwendete Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften

Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
pK18 <i>mob</i>	pK18-Derivat, <i>lacZα</i> , Km ^r /Nm ^r	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18 <i>mobsacB</i>	pK18-Derivat, <i>lacZα</i> , <i>sacB</i> , Km ^r /Nm ^r ,	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pJP2	<i>Broad-host-range</i> Promotor-Test Vektor, pTR102 GUS, Ap ^r , Tc ^r	(Prell <i>et al.</i> , 2002)
pJB-A	864 bp Fragment des <i>smc02509</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit
pJB-B	961 bp Fragment des <i>smc04317</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit
pJB-C	938 bp Fragment des <i>smc01513</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit
pJB-D	1010 bp Fragment des <i>sma1746</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit
pJB-E	1018 bp Fragment des <i>smb20056</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit
pJB-F	907 bp Fragment des <i>smb20365</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit
pJB-G	984 bp Fragment des <i>smb21432</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit
pJB-H	893 bp Fragment des <i>smb21540</i> Promotors kloniert in pJP2, Ap ^r , Tc ^r	diese Arbeit

1.3 Oligonukleotide

Tabelle C-3 Verwendete Oligonukleotide

Name*	Sequenz†
04317delS2PstI	TACGTCCTGCAGTCTCCTTCGTCCATGCCACC
04317delR2	ACCACCATGCCATAGGCCTTTTCCTTCAGCCGTTGCATCG
04317delS5	CGATGCAACGGCTGAAGGAAAAGGCCTATGGCATGGTGGT
04317delR5PstI	TACGTCCTGCAGATCGGCAGCATGAAGGCGAA
04317checkS10	TTCGTAGGCGCTGCGCATCT
04317checkR10	TCTCGCCGAAGGTGGACGAA
01512delS2EcoRI	TACGTCGAATTCACAAAGTTTCATCTGCGTCC
01512delR2	CTCGATGATCGCTTCTCAGCGATTGCCGTCCGATTGACT
01512delS3	AGTCAATCCGACGGCAATCGCTGAGGAAGCGATCATCGAG
01512delR3EcoRI	TACGTCGAATTCATGTGATAGGCAGCGGCTT
01512checkS10	GGCCACAACGAGATTCTCAT
01512checkR10	CCGATAGCTCCTGGTAGAAG
01746delS2EcoRI	TACGTCGAATTCAGAGTTGTACCGAAATCA
01746delR2	CGTATCGTTTCGTCTGTAGAGCTCGGTGAACTCAAGGCTG
01746delS3	CAGCCTTGAGTTCACCGAGCTCTACACGACGAACGATACG

01746delR3EcoRI	TACGTCGAATTCGTCCACGCCAACCAAGAG
01746checkS10	TGGCACTGTCCGACTCGTAT
01746checkR10	GAGCGGATTGCGTAACATGA
20056delS2BamHI	TACGTCGGATCCTGACGAGAAGGTGTTTCAGGA
20056delR2	TCGGCCATTTCGTCTTCTGTGATGCCGAGCTCCTCGAACTG
20056delS3	CAGTTCGAGGAGCTCGGCATCACAGAAGACGAATGGCCGA
20056delR3BamHI	TACGTCGGATCCGCATGCCAGAGACATACGAC
20056checkS11	ATATCGCCGCTGCTGCAAGG
20056checkR10	GCCGATGATGCCGAGGAACT
21432delS2EcoRI	TACGTCGAATTCGACTGTTATATCGGCGAAGC
21432delR4	TCCTTGCCGAAGAGCTTGCCCTCTCCAAGGATCACATGCT
21432delS3	AGCATGTGATCCTTGAGAGGGCAAGCTCTTCGGCAAGGA
21432delR3EcoRI	TACGTCGAATTCGATCGGCATGCGTATATCC
21432checkS11	AGCATGAACGTGATCCAGAG
21432checkR11	AGCGGATTGGCCAGGATCGT
21540delS4BamHI	TACGTCGGATCCGACGATGACGCAACGATCAC
21540delR4	GCTTCGTGAGATCCTTCCAGTCGAAGGTCTCCTTGTAACG
21540delS5	CGTTACAAGGAGACCTTCGACTGGAAGGATCTCACGAAGC
21540delR5BamHI	TACGTCGGATCCGGAAGAGCGCATAGGACTGA
21540checkS10	GCATGTGATCTCGTCACCT
21540checkR10	GCTACGACCGATGCACCTGA
02509promS3BamHI	TACGTCGGATCCTCTATTTCCGCCTGATCCAC
02509promR3XbaI	TACGTCTCTAGAATGACCGTGAAGGTGGTGAC
04317promS3BamHI	TACGTCGGATCCACTGTCCCAACGCTGTAG
04317promR3XbaI	TACGTCTCTAGAACCCACTCGACCTCGACAC
01513promS3BamHI	TACGTCGGATCCCGCCATGTGTTTCATTCTGT
01513promR3XbaI	TACGTCTCTAGACGCAGTTTCGGATTCTCG
01746promS3BamHI	TACGTCGGATCCCTTCAACACCTCAATGCGCT
01746promR3Sacl	TACGTCGAGCTCCTCTCGGCAGCGAACACAGT
20056promS3BamHI	TACGTCGGATCCGAAACGGTTGGAGCCTGAC
20056promR3Sacl	TACGTCGAGCTCTAGAGGATCTCGGTGCTGCT
20365promS3BamHI	TACGTCGGATCCATTGCTCTTGCCGTCGCCA
20365promR3Sacl	TACGTCGAGCTCCCGAGCAGATCAGATTGAGA
21432promS3BamHI	TACGTCGGATCCGTATCTCTCCGAGATCGGTA
21432promR3Sacl	TACGTCGAGCTCCAAGGATCACATGCTCGACC
21540promS3BamHI	TACGTCGGATCCCTACAAGGAAGGCGTGATCG
21540promR3XbaI	TACGTCTCTAGACTTCGATGGACGTGTAGACC

* Name der Oligonukleotide setzt sich zusammen aus ORF-Nummer, Verwendung des entsprechenden PCR-Produkts (del: Deletion; check: Überprüfung der Deletion; prom: Promotor-Region), Ausrichtung (S: *forward*; R: *reverse*) und der eingefügten Restriktionsschnittstelle

† Die Sequenz ist in 5´-3´ Richtung angegeben und Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen

1.4 Enzyme

Tabelle C-4 Verwendete Enzyme

Name	Typ	Merkmal	Hersteller
BamHI	Restriktionsendonuklease	GGATCC [*]	Amersham Pharmacia
EcoRI	Restriktionsendonuklease	GAATTC [*]	Amersham Pharmacia
EcoRV	Restriktionsendonuklease	GATATC [*]	Amersham Pharmacia
HindIII	Restriktionsendonuklease	AAGCTT [*]	Amersham Pharmacia
PstI	Restriktionsendonuklease	CTGCAG [*]	Amersham Pharmacia
SacI	Restriktionsendonuklease	GAGCTC [*]	Amersham Pharmacia
Sall	Restriktionsendonuklease	GTCGAC [*]	Amersham Pharmacia
Sau3A	Restriktionsendonuklease	GATC [*]	Amersham Pharmacia
SmaI	Restriktionsendonuklease	CCCGGG [*]	Amersham Pharmacia
XbaI	Restriktionsendonuklease	TCTAGA [*]	Amersham Pharmacia
Pfx	DNA-Polymerase	<i>proof-reading</i>	Invitrogen
Pfu	DNA-Polymerase	<i>proof-reading</i>	Promega
HotStart-KOD	DNA-Polymerase	<i>proof-reading</i>	Novagen
Red-Taq	DNA-Polymerase		Sigma
Taq	DNA-Polymerase		Qiagen
T4-Ligase	Ligase		Amersham Pharmacia

* Erkennungssequenz

1.5 Nährmedien und Zusätze

1.5.1 Nährmedien

LB-Medium (Luria-Bertani-Broth-Medium)	10,0 g/l	Bacto Trypton
	5,0 g/l	Yeast Extract
	5,0 g/l	NaCl
		pH 7,4
LBG-Medium	10,0 g/l	Bacto Trypton
	5,0 g/l	Yeast Extract
	5,0 g/l	NaCl
	1,0g/l	Glucose
		pH 7,4

Nodulationsmedium

Lösung A	294,0 g/l	CaCl ₂
Lösung B	50,0 g/l	KH ₂ PO ₄
	150,0 g/l	K ₂ HPO ₄
Lösung C	6,7 g/l	Fe-Citrat
Lösung D	123,0 g/l	MgSO ₄
	87,0 g/l	K ₂ SO ₄
	0,338 g/l	MnSO ₄
	0,247 g/l	H ₃ BO ₄
	0,288 g/l	ZnSO ₄
	0,1 g/l	CuSO ₄
	0,056 g/l	CoSO ₄
	0,048 g/l	NaMoO ₄

15 g/l Pflanzen Agar autoklavieren, jeweils 0,5 ml Lösung A, B, C und D zugeben. Das Medium für die Pflanzentests enthält anstelle des Fe-Citrats 10 µM FeSO₄.

PA-Medium (Pennassay Broth)	17,5 g/l	Pennassay Broth
	15,0 g/l	Agar

SOC-Medium	20,0 g/l	Trypton
	5,0 g/l	Yeast-Extract
	600mg/l	NaCl
	180 mg/l	KCl
	2,0 g/l	MgCl
	2,3 g/l	MgSO ₄
	4,0 g/l	Glucose

TY-Medium (Beringer, 1974)	5 g/l	Tryptone
	3 g/l	Yeast-Extract
	0,7 g/l	CaCl ₂

Vincent-Minimal-Medium (VMM)

Lösung A	10,0 g/l	Mannit
	1,0 g/l	K ₂ HPO ₄
	1,0 g/l	KH ₂ PO ₄
	0,6 g/l	KNO ₃
Lösung B	0,1 g/l	FeCl ₃
	2,5 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1,0 g/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
Lösung C	0,1 mg/ml	Biotin
	0,1 mg/ml	Ca-Pantothenat
	0,1 mg/ml	Thiamin

Lösung A + B getrennt autoklavieren, Lösung C sterilfiltrieren; abschließend 900 ml Lösung A, 100 ml Lösung B und 1 ml Lösung C mischen.

1.5.2 Zusätze zu Nährmedien

Tabelle C-5 Zusätze zu den verwendeten Nährmedien

Zusatz	Abkürzung	Konzentration (<i>E. coli</i>)	Konzentration (<i>S. meliloti</i>)
Ampicillin	Ap	50-100 mg/l	-
Tetracyclin	Tc	5 mg/l	-
Kanamycin	Km	50 mg/l	-
Streptomycin	Sm	40mg/l	600 mg/l
Neomycin	Nm	-	75-100 mg/l
Chloramphenicol	Cm	12,5 mg/l	-
Isopropylthiogalactosid	IPTG	40 mg/l	-
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid	X-Gal	25 mg/l	-
2,2'-Dipyridyl	Dip	-	200 μM
Agar	-	15 g/l	15g/l

1.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit Millipore-Wasser angesetzt. Puffer und Lösungen, die gebrauchsfertig in Kits enthalten waren, sind nicht aufgeführt.

BPB-Ladepuffer	50,0% (v/v) 2g/l	Glycerin in TAE-Puffer Bromphenolblau
CAS-Lösung	Lösung A	10mM HDTMA
	Lösung B	1mM FeCl ₃ 10mM HCL
	Lösung C	2mM CAS
	Lösung D	4,307g PIPES in 40 ml H ₂ O + 6,25 ml 12M HCl pH = pK _a = 5,6

für 100 ml CAS-Lösung werden unter vorsichtigem Rühren zu Lösung D jeweils 6 ml Lösung A, 1,5 ml Lösung B, 7,5 ml Lösung C und 55 ml H₂O gegeben

E1-Lysislösung	25,0% (w/v)	Saccharose
	10,0% (w/v)	Ficoll
	0,4 mg/ml	frisch zugeben: RNaseA
	1,0 mg/ml	Lysozym
EtBr-Färbelösung	1g/l	Ethidiumbromid
GUS-Puffer	1x	Phosphat-Puffer
	50 mM	DTT
	1 mM	EDTA
10 x HFM-Glycerinpuffer	1,7 mM	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ •2H ₂ O
	6,8 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,4 mM	MgSO ₄ •7H ₂ O
	36,0 mM	K ₂ HPO ₄
	13,2 mM	KH ₂ PO ₄
	44,0% (v/v)	Glycerin
Lysislösung	0,15 M	NaCl
	0,10 M	Na ₂ -EDTA
	15,0 mg/ml	Lysozym frisch zugeben; pH 8,0

Lysepuffer	0,1 M	NaCl
	0,5 M	Tris-HCl
	10 % (w/v)	SDS
Natriumcarbonat-Lsg.	0,46 M	Na ₂ CO ₃
NBT-Lösung	75 mg/ml	NBT in DMF
N-Lauroylsarcosin-Na-Lsg.	5% (v/v)	N-Lauroylsarcosin-Na-Salz in TE-Puffer
PCR-dNTP-Mix	je 2,5 mM	dATP
		dCTP
		dGTP
		dTTP
Phenol-Chloroform (1:1)	50,0% (v/v)	Phenol
	50,0% (v/v)	Chloroform
Phenol-Isoamylalkohol (24:1)	96,0% (v/v)	Phenol
	4,0% (v/v)	Isoamylalkohol
10x Phosphat-Puffer	0,5 M	NaH ₂ PO ₄
	mit 0,5 M	Na ₂ HPO ₄ den pH-Wert auf 7 einstellen
pNPG-Lösung	35mg/ml	pNPG
Proteinase K-Stocklösung	20 mg/ml	Proteinase K in TE-Puffer
Proteinase K-Lauroylsarcosin-Lösung	25 µl	Proteinase K-Stocklösung
	1,2 ml	N-Lauroylsarcosin-Na-Lösung
PS-Puffer	7 g/l	Na ₂ HPO ₄
	3 g/l	KH ₂ PO ₄
	5 g/l	NaCl
Puffer HB1	50 mM	Tris
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNaseA
		pH 8,0

Puffer HB2	200 mM	NaOH
	1,0 % (w/v)	SDS
Puffer HB3	3M	KAc
		pH 5,5
RNase-Lysozym-Lösung	1 mg/ml	RNaseA
	2 mg/ml	Lysozym in TE-Puffer
Saccharose-Lösung	20% (w/v)	Saccharose ein TE-Puffer
10% SDS-Lysis-Lösung	0,10 M	NaCl
	0,50 M	Tris-HCl
	10,0% (w/v)	SDS
SM-Puffer	100,0 mM	NaCl
	10,0 mM	MgSO ₄
	10,0 mM	Tris
TAE-Puffer	40,0 mM	Tris-HCl
	10,0 mM	Na-Acetat
	1,0 mM	EDTA pH 7,0
10 x TAR-Puffer	330,0 mM	Tris
	660,0 mM	K-Acetat
	100,0 mM	Mg-Acetat
	5,0 mM	Dithiothreitol
	0,1% (w/v)	BSA
TE-Puffer	10,0 mM	Tris-HCl
	1,0 mM	EDTA pH 8,0
X-Gluc Färbelösung	100 mM	Tris-HCl
	50 mM	NaCl
	2 mM	K-Ferricyanid
	2 mM	K-Ferrocyanid
	2 mM	X-Gluc

1.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle C-6 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Material	Anmerkung	Bezugsquelle
ATP		Boehringer Mannheim
CAS	Chrom-Azurol-S	Sigma
dNTP`s		Pharmacia
Längenstandard	100 bp <i>ladder</i> Marker X	Amersham Pharmacia
LB-Fertigmischung	LB-Broth Base	BRL Life Technologies
OPA Plus Puffer		Pharmacia
Phenol	Roti-Phenol; Tris-HCl, pH8, gesättigt	Roth
QIAquick PCR-Purification-Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Qiagen
NucleoBond Plasmid-Purification-Kit	Isolierung von BAC-DNA	Macherey Nagel

1.8 Software und Datenbanken

Tabelle C-7 Verwendete Software

Name	Funktion	Hersteller/URL
BLAST	Homologievergleiche mit Datenbanken	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast (Altschul <i>et al.</i> , 1997)
Clone Manager 5.0	Kontrolle von Klonierungen und Restriktionen	Sci Ed Central
Primer3	Generierung von Primern	www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
FLUOSTAR Galaxy	Steuerung des BMG Fluostar	BMG Labtechnologies
Phylip	Programmpaket zur Erstellung phylogenetischer Bäume	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html
treetool	Darstellung von Dendrogramm	http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/treetool.html
ClustalW	Durchführung von multiplen Alignments	(Thompson <i>et al.</i> , 1994)
SWISS-PROT+TrEMBL	Protein-Datenbank	www.expasy.ch/sprot (Bairoch & Apweiler, 2000)

2 Methoden

2.1 Kultivierung von Bakterienzellen

2.1.1 Bakterienanzucht

Die Anzucht von Bakterienzellen erfolgt sowohl in Flüssigmedium als auch auf Festmedien. Bei Bedarf werden die oben aufgeführten Zusätze in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Während *E. coli*-Zellen bei 37° C in LB-, LBG-, PA- oder SOC-Medium für den genannten Zeitraum inkubiert werden, erfolgt die Anzucht von *S. meliloti*-Kulturen in TY-Medium (TY) oder Vincent-Minimal-Medium (VMM) bei 30° C. Für die Anzucht unter spezifischen Eisenquellen wurde das VMM mit 0,01 g/l FeCl₃, 0,01 g/l FeSO₄, 0,01 g/l Haemoglobin und 0,01 g/l Haemin supplementiert. Eine definierte Anzahl an Bakterienzellen aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur wurde für die Wachstumstests in entsprechende Medien überimpft. Für Wachstumstests unter Eisenmangelbedingungen, werden die Bakterien aus der Vorkultur mehrmals in SM-Puffer gewaschen, um eine Übertragung von Eisen-Ionen aus den Vorkulturen zu minimieren.

2.1.2 Bestimmung des Bakterientiters

Der Bakterientiter wird durch photometrische Messungen ermittelt. Hierbei entspricht eine optische Dichte von 0,1 bei einer Wellenlänge von 595 nm (o.D._{595nm}), 2×10^7 *E. coli*-Zellen bzw. 1×10^8 *S. meliloti*-Zellen pro ml Kulturvolumen. Der bakterielle Lebendtiters wird durch Ausplattieren und Auszählen auf entsprechenden Festmedien ermittelt.

2.1.3 Archivierung von Bakterienstämmen

2.1.3.1 Glycerinkulturen

Bakterien können in ca. 50% (v/v) Glycerin für längere Zeit bei -20°C gelagert werden.

- Bakterien spezifisch auf Platte flächig anziehen
- mit Glaspipette Bakterien von Platte abnehmen und in 500 μl Nährmedium resuspendieren
- 500 μl Glycerin (87%) hinzugeben
- 30 min bei RT inkubieren
- bei -20°C lagern

2.1.4 Hogness-Freezing-Medium (HFM) (modifiziert nach Werner *et al.*, 1997)

Um Bakterienstämme dauerhaft zu archivieren, werden diese in einem Gemisch aus Vollmedium und HFM-Puffer resuspendiert, und bei -80°C gelagert.

- Bakterienzellen spezifisch o/n in Vollmedium anziehen
- 900 μl Bakterienkultur mit 100 μl 10xHFM-Puffer mischen
- bei -80°C lagern

2.2 Isolierung und Darstellung von DNA

2.2.1 Gesamt-DNA-Isolierung aus *S. meliloti*

2.2.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion (nach Meade *et al.*, 1982, modifiziert nach Simon)

- 6 ml einer o/n-Kultur in PE-Röhrchen überführen
- 5 min zentrifugieren, 5.000 g, RT

- Pellet in 800 µl 20 % Saccharose-Lösung. resuspendieren
- 30 min bei -20° C inkubieren
- 600 µl RNase-Lysozym-Lösung hinzufügen
- 1 h bei 37° C rollern
- 500 µl Proteinase K-Lauroylsarcosin-Lösung. hinzufügen
- 1,5 h bei 37° C rollern
- 250 µl TE-Puffer und 250 µl 3 M Na-Acetat hinzufügen, durch invertieren mischen
- 1 ml Phenol-Chloroform (1:1) zugeben und ca. 5 min invertieren
- 10 min zentrifugieren, 4.000 g, 12° C
- obere Phase in neues PE-Röhrchen, gegebenenfalls Phenolisierung wiederholen
- 1 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugeben und ca. 5 min. invertieren
- 10 min zentrifugieren, 4.000 g, 12° C
- obere Phase in neues PE-Röhrchen überführen, gleiches Volumen an kaltem Isopropanol zugeben, und schütteln bis DNA ausfällt
- 20 min zentrifugieren, 4.000 g, 4° C
- Überstand abziehen
- 1 ml 70% Ethanol zugeben, 5 min bei RT inkubieren
- 5 min zentrifugieren, 4.000 g, 4° C;
- Überstand abziehen
- DNA-Pellet bei 60° C trocknen
- Pellet in 200-300 µl H₂O o/n bei 4° C lösen

2.2.1.2 Schnelllyse

Bei dieser Methode werden die bakteriellen Zellwände durch das Aufkochen mit SDS und NaOH zerstört. Die Zelltrümmer werden abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand kann in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden.

- Zellen einer Bakterienkolonie in 50 µl Lysepuffer resuspendieren
- 15 min in 95° C WB inkubieren
- 450 µl H₂O zugeben
- 5 min zentrifugieren, 8.000 g
- 100 µl Überstand in frisches Eppi
- bei -20° C lagern

2.2.1.3 Kochlyse

Mit der Kochlyse kann, ähnlich wie bei der Schnelllyse, ein DNA-haltiger Überstand gewonnen werden, der als Vorlage bei der PCR eingesetzt wird. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgt jedoch rein physikalisch durch Aufkochen. Zelltrümmer werden ebenfalls abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand kann jedoch nicht, wie bei der Schnelllyse, dauerhaft gelagert werden.

- Bakterienzellen in 1 ml H₂O gründlich resuspendieren
- 8 min in 95° C WB inkubieren
- 2 min zentrifugieren, 6.000 g
- 4 µl des Überstands direkt für die PCR einsetzen
- evtl. bei 4° C o/n lagern

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.2.2.1 HB-Lyse (Ish-Horowitz & Burke, 1981; modifiziert)

Bei der HB-Lyse werden die Zellwände der Bakterien durch eine kombinierte Detergenz- und NaOH-Behandlung lysiert. Die dadurch freigesetzte DNA wird durch SDS-Einwirkung im alkalischen Milieu denaturiert. Im darauf folgenden Schritt wird der pH-Wert gesenkt, was eine Renaturierung der Plasmide bei gleichzeitiger Quervernetzung der Chromosomen zur Folge hat. Durch Zentrifugation werden die Plasmide im Überstand angereichert, und können aufgereinigt werden.

- Bakterienzellen einer Stocherkolonie in 150 µl Puffer HB1 resuspendieren
- 150 µl Puffer HB2 zugeben
- 6 x invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- 150 µl Puffer HB3 zugeben, 6 x invertieren
- 30 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Überstand erneut 10 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Überstand in neues Eppi überführen
- gleiches Volumen Isopropanol zugeben, invertieren
- 30 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Überstand quantitativ entfernen

- Pellet in 500µl 70% (v/v) Ethanol für 5 min bei RT waschen
- 5 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet ca. 20 min bei RT trocknen
- Plasmid-DNA in 25 µl H₂O resuspendieren
- evtl. 10 min bei 65° C inkubieren

2.2.2.2 QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Plasmidisolierung mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit beruht auf der HB-Lyse. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA geschieht hierbei jedoch nicht durch Phenolisierung bzw. Isopropanolpräzipitation, sondern durch eine Ionenaustauschersäule. Alle mit [⊗] gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des verwendeten Kits.

- plasmidhaltige Zellen flächig auf Selektivmedium ausstreichen
- o/n bei 37° C inkubieren
- Bakterienrasen mit Glaspipette aufnehmen und in 500 µl P1-Puffer[⊗] resuspendieren
- 500 µl P2-Puffer[⊗] zugeben, 8 x invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- 500 µl P3-Puffer[⊗] zugeben, 8 x invertieren
- 20 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Überstand in frische Eppendorfgefäß überführen
- 10 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Tip20-Säule[⊗] mit 1 ml QBT-Puffer[⊗] äquilibrieren
- Überstand auf Säule geben
- nach Durchlauf Säule 2 x mit je 2 ml QC-Puffer[⊗] waschen
- nach Durchlauf DNA mit 800 µl QF-Puffer[⊗] eluieren
- Eluat mit 700 µl Isopropanol mischen
- 20 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet in 500µl 70% (v/v) Ethanol für 5 min bei RT waschen
- 5 min zentrifugieren, 13.000 g, 4° C
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet ca. 20 min bei RT trocknen
- Plasmid-DNA in 25 µl H₂O resuspendieren
- evtl. 10 min bei 65° C inkubieren
- DNA bei -20° C lagern

2.2.2.3 Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Plasmidisolierung mit Hilfe des Qiagen Plasmid-Isolation Spinprep-Kits beruht ebenfalls auf der HB-Lyse. Zur Plasmidaufreinigung kommt hierbei jedoch keine Gravitations-Ionenaustauschersäule zum Einsatz. Der Säulendurchfluss wird in diesem Protokoll durch Zentrifugation erreicht. Alle mit [®] gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des verwendeten Kits.

- plasmidhaltige Zellen flächig auf Selektivmedium ausstreichen
- o/n bei 37° C inkubieren
- Bakterienrasen mit Glaspipette aufnehmen und in 250 µl P1-Puffer[®] resuspendieren
- 350 µl P2-Puffer[®] zugeben, 8 x invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- 350 µl P3-Puffer[®] zugeben, 8 x invertieren
- 10 min zentrifugieren, 13.000 g, RT
- Überstand auf Spinprep-Säule[®] geben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, RT
- 500 µl PB-Puffer[®] auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, RT
- 750 µl PE-Puffer[®] auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, RT
- Durchlauf verwerfen
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, RT
- 40 µl H₂O auf Säule geben
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, RT
- DNA-haltiges Eluat bei -20° C lagern

2.2.3 Isolierung von BAC-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von BAC-DNA beruht ebenfalls auf dem Protokoll der HB-Lyse, welches jedoch für diese Anwendung optimiert wurde. Die Isolation erfolgt hier mit dem NucleoBond Plasmid-Purification-Kit (Macherey Nagel). Alle mit [®] gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des verwendeten Kits.

- BAC-haltigen *E. coli*-Stamm in 60 ml LB-Medium o/n bei 37° inkubieren
- 15 min zentrifugieren, 5.000 g, 4° C
- Pellet in 8 ml Puffer S1[®] resuspendieren
- 8 ml Puffer S2[®] zugeben, 8 x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- 8ml Puffer S3[®] zugeben, 8 x invertieren
- 5 min bei 0° C inkubieren
- 30 min zentrifugieren, 10.000 g, 4° C
- Überstand auf zwei PE-Röhrchen verteilen
- 15 min zentrifugieren, 10.000 g, 4° C
- Nucleobond AX 100-Säule mit 2 ml Puffer N2[®] äquilibrieren
- Überstand durch Filter auf Säule geben, Durchlauf auffangen und erneut auf Säule geben
- Säule mit 3 x 4 ml Puffer N3[®] waschen
- BAC-DNA mit 2 x 2ml Puffer N5[®] (50° C) eluieren, Eluat auffangen
- Eluat mit 2,8 ml Isopropanol mischen, invertieren
- 30 min zentrifugieren, 10.000 g, 4° C
- Überstand quantitativ abziehen
- Pellet in 1 ml 70% (v/v) Ethanol waschen, 5 min bei RT inkubieren
- 5 min zentrifugieren, 10.000 g, 4° C
- Überstand quantitativ abziehen
- Pellet ca. 30 min bei RT trocknen
- Pellet in 100 µl H₂O resuspendieren, evtl. bei 65° C 10 min inkubieren
- DNA bei -20° C lagern

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Darstellung und Größenbestimmung von DNA-Molekülen erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA-Proben werden hierbei mit BPB-Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen eines zuvor erstellten Agarosegels pipettiert. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Nettoladung zur Anode. Hierbei ist die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments im Gel umgekehrt proportional zu seinem Molekulargewicht, so dass die Größenbestimmung über den Vergleich mit DNA-Längenstandards bekannter Größe erfolgen kann. Die Agarosekonzentration und Laufbedingungen können hierbei je nach erwarteten Fragmentgrößen variiert werden.

- 0,5 – 0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufkochen
- luftblasenfrei in eine mit Kamm bestückte Horizontalgelkammer gießen
- nach Aushärten der Agarose mit TAE-Puffer überschichten
- DNA-Proben mit BPB-Ladepuffer in die Geltaschen pipettieren
- Gellauf starten
- DNA mit EtBr anfärben
- Foto unter UV-Anregung auf Transilluminator

2.2.5 Eckhardt-Lyse (Eckhardt, 1978; modifiziert nach R. Simon)

Die Eckhardt-Lyse dient der raschen Bestimmung des Plasmidgehalts von Bakterienzellen. Zunächst werden die Zellwände durch Lysozym abgebaut, während die Lyse der Zellen durch SDS in den Taschen des vorbereiteten Gels erfolgt. Der folgende Elektrophoreselauf trennt die freigesetzten Plasmide nach ihrer Größe auf, während das Bakterienchromosom in den Geltaschen zurückbleibt.

- 0,8 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufkochen
- 1 ml 20% SDS zugeben
- blasenfrei in eine mit Kamm bestückte Horizontalgelkammer gießen
- Gel nach dem Abkühlen mit TAE-Puffer überschichten
- einige Zellen einer Bakterienkolonie in 5 µl TE-Puffer resuspendieren
- 20 µl E1-Lysislösung zugeben
- Zellsuspension in die vorbereiteten Geltaschen geben
- Vorlauf: ~ 30 min, 20 Volt; bis Zellsuspension in Taschen aufgeklart ist
- Hauptlauf: 90 min, 90 Volt
- 90 min wässern
- 7 min in EtBr-Färbelösung färben
- 10 min wässern
- zur Auswertung Foto unter UV-Anregung

2.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese kann auch zur Aufreinigung oder Trennung definierter DNA-Fragmente dienen. Nach größenabhängiger elektrophoretischer Trennung der

Fragmente im Gel, wird ein Agaroseblock mit dem gewünschten DNA-Fragment aus dem Gel herausgetrennt. Die Isolierung der DNA erfolgt abschließend mit dem QIAquick Gel-Extraction-Kit. Alle mit [®] gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des verwendeten Kits.

- Agarose-Gelelektrophorese nach Vorschrift durchführen
- Agaroseblock mit gewünschter DNA-Bande mit Skalpell heraustrennen
- in frisches Eppi überführen
- 3 faches Volumen QG-Puffer[®] zugeben
- 1 faches Volumen Isopropanol zugeben
- 10 min in 50° C WB inkubieren, alle 2 min vortexen
- 1 faches Volumen Isopropanol zugeben
- Gemisch auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, Durchlauf verwerfen
- 500 µl QG-Puffer[®] auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, Durchlauf verwerfen
- 750 µl PE-Puffer[®] zugeben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g, Durchlauf verwerfen
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g
- Säule in frische Eppi
- 30 µl H₂O auf Säule geben
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g
- DNA-haltigen Durchlauf bei -20° C lagern

2.3 Restriktion und Modifikation von DNA

2.3.1 DNA-Restriktion mit TypII-Restriktionsendonucleasen

Mit Hilfe von TypII-Restriktionsendonucleasen können DNA-Moleküle an definierten Stellen gespalten werden. Enzyme dieses Typs sind in der Lage, spezifische palindromische DNA-Sequenzen zu erkennen und den DNA-Strang an diesen Stellen aufzubrechen. In Abhängigkeit vom eingesetzten Restriktionsenzym entstehen hierbei glatte (*blunt-end*) oder überhängende Enden (*sticky-ends*). Die Kontrolle der Spaltung erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bei

Bedarf ist eine Inaktivierung der Enzyme durch entsprechende Inkubation bei 65° C möglich. Ein standardisiertes Protokoll für die DNA-Restriktion ist im Folgenden dargestellt.

- 2 µl DNA-Lösung
- 2 U Restriktionsenzym
- 3 – 6 µl OPA-Puffer
- mit H₂O auf 30 µl Gesamtvolumen auffüllen
- 1-3 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubieren

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) bietet eine Möglichkeit *in vitro* gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Abschnitten flankiert werden, zu vervielfältigen. Hierbei können verschiedene thermostabile Polymerasen verwendet werden, die sich in einigen Eigenschaften grundlegend unterscheiden. Hierzu zählen die Pufferbedingungen, die Polymerisationsgeschwindigkeit und das Vorhandensein einer 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Typische PCR-Protokolle für die Ansätze und Bedingungen der verschiedenen Enzyme sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle C-8 Standard PCR-Ansätze für die verwendeten Polymerasen

Komponente	(Red-) <i>Taq</i>	<i>Pfu</i>	<i>Pwo</i> ¹	Hot-Start <i>KOD</i>
10 x Puffer ²	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
PCR-dNTP-Mix	4 µl	4 µl	4 µl	5 µl ³
Primer (10mM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Template-DNA	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Polymerase	1 U	1 U	1 U	1,5 U
MgSO ₄ (25mM)	-	-	-	2 µl
H ₂ O	auf 50 µl Reaktionsvolumen auffüllen			

¹ aufgrund der Exonukleaseaktivität, Primer und Polymerase erst kurz vor Start des PCR-Programms mischen

² für die Enzyme spezifische Reaktionspuffer sind Bestandteil des jeweiligen Kits

³ spezielle dNTP-Lösung (Bestandteil des Kits)

Tabelle C-9 Standard PCR-Bedingungen für die verwendeten Polymerasen

Schritt	Temp.	<i>Taq</i>	<i>Pfu</i>	<i>Pwo</i>	Hot-Start <i>KOD</i>
1. primäre Denaturierung	94° C	90 sec	90 sec	90 sec	8 – 10 min
2. zyklische Denaturierung	94° C	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec
3. <i>Annealing</i>		primerabhängig			
4. Polymerisation	72° C	30 bp/sec	15 bp/sec	30 bp/sec	50 bp/sec
5. Zyklen		25 x zu 2.			
6. finale Polymerisation	72° C	10 min			
7. Kühlung	5° C	bis Ende			

Die angeführte *KOD*-Hot-Start-Polymerase ist aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit bei der Polymerisation besonders für die Amplifikation von großen Fragmenten (> 3kb) geeignet. Für diesen Anwendungsfall hat sich ein PCR-Protokoll bewährt, bei dem die ersten Polymerisationszyklen unter stringenteren Bedingungen ablaufen. In den darauf folgenden Abschnitten wird die Stringenz der Reaktionsbedingungen schrittweise reduziert, um den fortschreitenden Aktivitätsverlust der Polymerase zu kompensieren. Das modifizierte Protokoll ist in Tabelle C-10 aufgelistet.

Tabelle C-10 PCR-Protokoll für die *KOD*-Hot-Start-Polymerase zur Amplifikation von langen Fragmenten

Schritt	Temp.	Abschnitt 1	Temp.	Abschnitt 2	Temp.	Abschnitt 3
primäre Denaturierung	1. 94° C	3 min				
zyklische Denaturierung	2. 94° C	30 sec	6. 92° C	30 sec	10. 92° C	30 sec
<i>Annealing</i>	3. primerabhängig		7. primerabhängig		11. primerabhängig	
Polymerisation	4. 72° C	60 bp/sec	8. 70° C	60 bp/sec	12. 68° C	60 bp/sec
Zyklen	5. 5 x zu 2.		9. 5 x zu 6.		13. 20 x zu 10.	
finale Polymerisation					14. 68°	10 min
Kühlung					15. 5°	bis Ende

2.3.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten geschieht mittels des QIAquick PCR-Purification-Kit. Die Methode beruht auf der Bindung von einzel- oder doppelsträngigen DNA-Fragmenten einer bestimmten Größenordnung (hier 100 bp bis 100 kb) an das Material einer Ionenaustauschersäule. Kleinere DNA-Fragmente, wie z.B. Primer oder große Moleküle, können nicht an das Säulenmaterial binden und werden durch Waschung der Säule herausgetrennt. Alle mit [®] gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des verwendeten Kits.

- aufzureinigendes PCR-Fragment mit fünffachem Volumen PB-Puffer[®] mischen
- Gemisch auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g
- Durchlauf verwerfen
- 750 µl PE-Puffer[®] auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g
- Durchlauf verwerfen
- erneut 1 min zentrifugieren, 13.000 g
- Säule auf frisches Eppi geben
- 30 µl H₂O mittig auf Säule geben
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min zentrifugieren, 13.000 g
- Durchlauf enthält DNA
- bei -20° C lagern

2.3.4 *Gene Splicing by Overlap Extension* (GeneSOEing, nach Horton *et al.*, 1990)

Mittels GeneSOEing werden beliebige DNA-Sequenzen mittels PCR kombiniert, ohne dass geeignete Restriktionsschnittstellen vorhanden sein müssen. Auf diese Weise können Deletionskonstrukte erzeugt werden, die den Ausgangspunkt für eine definierte Deletionsmutagenese bilden. Die Methode gliedert sich in zwei voneinander unabhängige PCR-Reaktionen. Im ersten Schritt werden zwei PCR-Produkte erzeugt, die den zu deletierenden Bereich flankieren. Um Auswirkungen der Deletion auf die nachfolgenden Gene zu vermeiden, sollte der flankierte Bereich *in-frame* liegen. Die hierbei eingesetzten Primer an haben an den jeweiligen 5'-Enden zueinander homologe Sequenzen (*Extensions*), so dass die daraus

resultierenden PCR-Produkte ebenfalls homologe Sequenzen aufweisen. Die so erstellten PCR-Produkte werden nach erfolgter Aufreinigung in einer zweiten PCR-Reaktion vereinigt, und dienen als *Template* zur Erzeugung des gewünschten Fusionsproduktes, wobei die denaturierten Einzelstränge über die homologen Sequenzen eine komplette Basenpaarung eingehen können.

2.3.5 Ligation

Das Enzym Ligase ist in der Lage, endständige 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen von DNA-Molekülen unter Ausbildung von Phosphodiesterbrücken miteinander zu verknüpfen. Auf diese Weise können zuvor gespaltene DNA-Fragmente miteinander verbunden werden. Grundlegende Voraussetzung ist jedoch, dass die DNA-Moleküle zueinander komplementäre Einzelstränge (*sticky-ends*) oder glatte Enden (*blunt-ends*) aufweisen. Bei der Ligation der unterschiedlichen Ansätze ist darauf zu achten, dass die Effektivität der T4-Ligase bei der *blunt-end* Ligation, im Vergleich zur Verknüpfung von *sticky-ends*, deutlich reduziert ist. Die Ligation von glatten DNA-Molekülen wird ebenfalls durch hohe ATP-Konzentrationen gehemmt, so dass alternative Pufferbedingungen verwendet werden. Typische Ligationsansätze beider Typen sind im Folgenden dargestellt.

sticky-end Ligation:

- 2 µl Vektor-Plasmid
- 3 µl 10 x Ligationspuffer
- 2 U T4-Ligase
- 1 / 2 / 5 / 10 µl Insert-DNA
- mit H₂O auf 30 µl Reaktionsvolumen auffüllen
- Inkubation bei 14° C o/n

blunt-end Ligation:

- 2 µl Vektor-Plasmid
- 3 µl 10 x OPA-Puffer
- 1,5 µl 10 mM ATP
- 3 U T4-Ligase
- 1 / 2 / 5 / 10 µl Insert-DNA
- mit H₂O auf 30 µl Reaktionsvolumen auffüllen
- Inkubation bei RT o/n

2.4 DNA-Transfertechniken

2.4.1 DNA-Transfer mittels Transformation

2.4.1.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Um die DNA-Aufnahme durch *E. coli*-Zellen zu ermöglichen, inkubiert man diese in eiskalter CaCl_2 -Lösung. Diese Behandlung ermöglicht den Plasmiden bei der Transformation an der Oberfläche der Bakterienzellen zu binden, bevor sie ins Cytoplasma aufgenommen werden.

- 100 μl einer o/n-Kultur *E. coli* in 10 ml LB-Medium bis zu einer o.D.₅₉₀ von 0,5 – 0,6
- anziehen
- 5 min zentrifugieren, 6.000 g, 0° C
- Überstand verwerfen
- Pellet in 5 ml 100 mM CaCl_2 -Lösung (0° C) resuspendieren
- 30 min bei 0° C inkubieren
- 5 min zentrifugieren, 6.000 g, 0° C
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 100 mM CaCl_2 -Lösung (0° C) resuspendieren
- 200 μl Glycerin zugeben
- Ansatz in 200 μl Chargen aufteilen
- Chargen bei -80° C lagern

2.4.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (nach Morrison, 1977)

Die Aufnahme des Plasmids in das Cytoplasma der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgt nach einem kurzfristigen Hitzeschock bei 43° C. Das transformierte Plasmid verleiht den Bakterienzellen eine zusätzliche Antibiotikaresistenz, so dass eine Kontrolle der Transformation durch Selektion auf entsprechendem antibiotikahaltigem Medium möglich ist.

- zu 200 μl kompetenter *E. coli*-Zellen 10 μl der zu transformierenden Plasmid-DNA geben
- vorsichtig mischen
- 30 min bei 0° C inkubieren

- 90 sec im 43° C WB inkubieren
- 1 ml SOC-Medium zugeben
- vorsichtig mischen
- 45 min in 37° C WB inkubieren
- 100 µl des Transformationsansatzes auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattieren
- Rest des Ansatzes 5 min zentrifugieren, 6.000 g
- Überstand verwerfen
- Bakterienpellet im Rücklauf des Überstands resuspendieren
- auf Selektionsplatten ausplattieren
- Platten o/n bei 37° C inkubieren

2.4.1.3 Selektion der Transformanten durch *lacZ'*- α -Komplementation

Einige der bei der Transformation eingesetzte Vektorplasmide verleihen dem *E. coli*-Stamm DH5 α (*β -gal*) neben der Antibiotikaresistenz auch die Möglichkeit zur Synthese von β -Galactosidase, indem es den fehlenden α -Peptidanteil der β -Galactosidase mit einem intakten *lacZ'*-Gen ausgleicht. Rekombinante Vektorplasmide tragen ein durch Insertion inaktiviertes *lacZ'*-Gen, so dass die Bakterienzellen (*β -gal*), in die ein rekombinantes Plasmid transferiert wurde, keine funktionsfähige β -Galactosidase synthetisieren können. Die Untersuchung auf An- oder Abwesenheit von β -Galactosidase erfolgt auf Selektionsplatten mit dem Induktor IPTG (Isopropylthiogalactosid) und dem Laktoseanalogon X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid). X-Gal wird von der β -Galactosidase in Anwesenheit von IPTG zu einem dunkelblauen Reaktionsprodukt abgebaut, so dass Bakterienkolonien, die keine rekombinanten Plasmide enthalten blau gefärbt sind, während Kolonien mit Rekombinanten weiß erscheinen. Anhand der Färbung der Bakterienkolonien kann daher auf den Gehalt von rekombinanten Vektorplasmiden geschlossen werden.

2.4.2 DNA-Transfer mittels Konjugation

Im Gegensatz zu *E. coli* sind *S. meliloti*-Zellen nicht in der Lage, DNA mittels Transformation aufzunehmen. Eine Möglichkeit den DNA-Transfer von Plasmiden zu erwirken,

besteht in der Konjugation mit einem Donorstamm. Der zu transferierende Vektor muss in diesem Fall eine Mobilisierungsregion (*mob-site*) aufweisen. Ferner müssen die Genprodukte der Transfer-Gene (*tra*-Gene) vorliegen. Verwendung finden in diesem Fall der mobilisierbare Vektor pK18mob, und der Donorstamm *E. coli* S17-1, welcher ein integriertes RP4-Plasmidderivat aufweist, das die *tra*-Gene trägt.

- Anzucht der Donorzellen bis zur logarithmischen Phase (ca. o.D.₅₉₀ 0,4-0,6); der
- Rezipientenzellen bis zur Stationärphase (ca. o.D.₅₉₀ 0,7-0,9)
- mischen von 5×10^7 Donor- mit 2×10^8 Rezipientenzellen
- 30 s zentrifugieren, 6.000 g
- Überstand verwerfen, Pellet vorsichtig in Rücklauf resuspendieren
- Kreuzungsfiter auf TY-Platte legen, ca. 40µl der Konjuganten aufbringen
- o/n bei 30° C inkubieren
- Kreuzungsfiter in 1 ml H₂O aufnehmen, vorsichtig vortexen
- auf Selektionsplatten ausplattieren
- bei 30° C bis zum ausreichenden Wachstum der Transkonjuganten inkubieren

2.4.3 DNA-Transfer mittels Elektroporation

2.4.3.1 Herstellung elektroporationskompetenter *E. coli*-Zellen

- *E. coli* o/n anziehen
- 250 ml Vollmedium mit der o/n-Kultur frisch animpfen
- bei 37° C bis zu einer o.D._{590nm} von 0,5 – 0,7 anziehen
- Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen
- 15 min zentrifugieren, 6.000 g, 4° C
- Überstand verwerfen, Rücklauf vollständig abziehen
- Pellet vorsichtig 2x mit H₂O (0° C) waschen, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet vorsichtig in 5 ml sterilem H₂O (0° C) lösen
- 250 ml H₂O (0° C) zugeben, vorsichtig mischen
- 15 min zentrifugieren, 6.000 g, 4° C
- Überstand sofort verwerfen
- Pellet im Rücklauf vorsichtig resuspendieren
- Suspension auf zwei Zentrifugenbecher verteilen
- 25 ml 15% Glycerin zugeben, vorsichtig mischen
- 15 min zentrifugieren, 6.000 g, 4° C
- Überstand abziehen

- Pellet in 1ml 15 % Glycerin resuspendieren
- kompetente Zellen zu 250 μ l aliquotieren
- bei -80° C lagern

2.4.3.2 Aufreinigung von DNA

Die zu transferierende DNA muss vor der Verwendung in der Elektroporation gründlich aufgereinigt werden, um verbleibende Ionen aus den zuvor verwendeten Puffern zu entfernen. Hierzu werden die MicroSpin Säulen von *amersham pharmacia biotech* eingesetzt. Das aufgereinigte Eluat kann direkt für die Elektroporation verwendet werden.

- MicroSpin Säule 1 min zentrifugieren, 3.000 g
- Säule in frisches Eppi geben
- DNA auf Säule geben
- 2 min zentrifugieren, 3.000 g
- Säule verwerfen
- DNA-Eluat für Elektroporation einsetzen

2.4.3.3 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die suspendierten kompetenten Bakterienzellen zusammen mit der zu transferierenden DNA in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Hierbei entstehen in der Zellwand kurzzeitig Poren, durch die Makromoleküle wie DNA in die Zelle gelangen können.

- Elektroporationskompetente Zellen auf Eis auftauen
- DNA und Elektroporationsküvetten auf Eis vorkühlen
- 60 – 100 μ l kompetente Zellen mit 3 – 5 μ l DNA mischen
- Suspension in die Küvette geben
- Küvette gut trocknen
- Küvette in die Elektroporationsapparatur einsetzen und Puls auslösen
- Puls Bedingungen: 25 μ F Kapazität
- 400 Ω Parallelwiderstand
- 2,5 kV Spannung

- 7 – 9 Zeitkonstante
- 1 ml SOC-Medium zugeben
- Zellen in Eppi überführen
- 60 min in 37° C WB inkubieren
- Bakterienzellen auf Selektionsplatten ausbringen

2.5 Erstellung von *S. meliloti* Rm1021-Plasmidintegrationsmutanten

Durch gezielte Integration eines Plasmids in das Genom können Gene spezifisch disruptiert werden. Hierzu wird mittels PCR eine interne Region des zu disruptierenden Gens amplifiziert (ca. 300 bp), und in einen geeigneten konjugativen Vektor (hier pK18*mob* oder pK18*mobsacB*) kloniert. Dieses Konstrukt wird anschließend mittels Konjugation in *S. meliloti* eingebracht. Durch homologe Rekombination kann das Plasmid in das Genom integrieren. Der Nachweis auf eine erfolgreiche Plasmidintegration mit einhergehender Disruption des entsprechenden Gens erfolgt durch PCR mit spezifischen Primern.

2.6 Erstellung von *S. meliloti* Rm1021-Deletionsmutanten

Zur Erstellung von Deletionsmutanten werden die mittels Gene-SOEing erstellten Deletionskonstrukte in den konjugativen Vektor pK18*mobsacB* kloniert, und mittels Konjugation in *S. meliloti* eingebracht. In einem ersten *crossover*-Ereignis integriert das Plasmid mit dem Konstrukt in das Genom. Auf dieses Ereignis kann mit einem geeigneten Antibiotikum (hier Neomycin) selektioniert werden. Nach Wegfall des Selektionsdrucks durch Antibiotika kann in einem zweiten *crossover*-Ereignis zum einen das eingeführte Deletionskonstrukt im Genom verbleiben, wobei das native Gen mit dem Plasmid verloren geht. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass das Deletionskonstrukt wieder aus dem Genom entfernt wird und der ursprüngliche Genotyp wieder entsteht. Das *sacB*-Gen des pK18*mobsacB* verleiht hierbei dem Bakterienstamm eine Saccharose-Sensitivität und ermöglicht somit eine Selektion auf den Verlust des Plasmids im zweiten *crossover*-Ereignis, durch Wachstum auf Saccharose-haltigem

Medium. Der Nachweis der erfolgten Deletionsmutagenese geschieht durch PCR mit spezifischen Primern. Bei Bedarf lassen sich mit dieser Methode auch Mehrfach-Mutanten eines Bakterienstamms erzeugen.

2.7 Nachweis der Siderophorproduktion anhand des CAS-Test

Zum Nachweis der Siderophorproduktion durch Bakterien wurde von Schwyn und Neilands ein spezieller CAS-Test entwickelt, bei dem es in Anwesenheit der bakteriellen Chelatoren zu einem Farbumschlag von dunkelblau nach orange kommt (Schwyn & Neilands, 1987). Die Reaktion beruht darauf, dass die Siderophore als starke Liganden wirken und ein Eisen-Atom aus dem Farbstoffkomplex (Chrom-Azurol-S/EisenIII/Hexadecyltrimethylammoniumbromid) lösen. Der daraus resultierende Farbumschlag kann sowohl optisch als photometrisch verfolgt werden.

- Bakterien bis zu einer o.D._{590nm} anziehen
- Kulturüberstand 5 min zentrifugieren, 6.000 g
- Kulturüberstand entsprechend der o.D._{590nm} normieren
- 500 µl des normierten Kulturüberstands mit 500 µl CAS-Lösung mischen
- photometrische Messung bei 635 nm sofort starten

2.8 Ermittlung der Expressionsstärke durch *gusA*-Transkriptionsfusion

Durch eine Transkriptionsfusion mit einem Reporter gen kann die Stärke unterschiedlicher Promotoren unter verschiedenen Bedingungen ermittelt werden. Hierbei wird ein DNA-Fragment, welches die potentielle Promotorregion des zu untersuchenden Gens trägt, vor das promotorlose Reporter gen *gusA* des Vektor pJP2 kloniert. Das verwendete Reporter gen codiert für eine β -Glucuronidase, die in einer nachfolgenden enzymatischen Reaktion pNPG zu einem farbigen Reaktionsprodukt umsetzen kann.

2.8.1 Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität bei *S. meliloti*

(nach Reeve *et al.*, 1998)

Das Enzym β -Glucuronidase kann pNPG zu Glucuronat und dem farbigen 4-Nitrophenol umsetzen. Dieser Farbumschlag kann bei einer Wellenlänge von 405nm photometrisch verfolgt werden. Anhand von Geschwindigkeit und Verlauf der Farbreaktion können somit aufgrund der Aktivität des Reportergens, Aussagen über die Stärke des untersuchten Promotors getätigt werden.

- Bakterien bis zur gewünschten o.D.₅₉₀ anziehen
- Zentrifugation 3 min, 7000 g
- Zellen in 1 ml PS-Puffer resuspendieren
- gleiche Anzahl an Zellen entnehmen und mit GUS-Puffer auf 990 μ l auffüllen
- 1 Tropfen (ca. 10 μ l) Toluol zugeben, vortexen
- Toluol bei 37° C unter Abzug abdampfen lassen
- Reaktion durch Zugabe von 10 μ l pNPG starten
- zu definierten Zeitpunkten jeweils 200 μ l Probe entnehmen, mit 800 μ l Natriumcarbonat-
- Lsg. mischen und auf Eis inkubieren
- Mischung kurz abzentrifugieren und o.D. bei 405 nm messen

Formel zur Berechnung der β -Glucuronidaseaktivität in Miller-Units:

$$MillerUnits = \frac{1000 \cdot o.D._{405} \cdot V_{Gesamt}}{o.D._{590} \cdot t \cdot V_{Kultur}}$$

o.D.₄₀₅ = optische Dichte bei 405nm

o.D.₅₉₀ = optische Dichte bei 580nm

V_{Gesamt} = Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes [ml]

V_{Kultur} = Volumen der eingesetzten Kultur [ml]

t = Reaktionszeit [min]

2.8.2 Messung der Farbreaktion mit dem BMG *Fluostar*

Bei dem *Fluostar* der Firma BMG handelt es sich um ein spezielles Photometer, welches in frei definierbaren Intervallen die optische Dichte von Reaktionsansätzen an einzelnen Positionen von Mikrotiterplatten bestimmen kann. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die Mikrotiterplatte bei 37° C zu inkubieren, so dass sich dieses Gerät eignet, den Farbumschlag der oben beschriebenen Enzymreaktion für unterschiedliche Reaktionsansätzen mit einem entsprechend hohen Stichprobenumfang aufzunehmen. Im Folgenden sind die notwendigen Einstellungen der Steuerungssoftware des Gerätes aufgelistet, mit denen die Messungen durchgeführt wurden.

Mode:	absorption plate mode
Incubator:	on (37° C)
Positioning delay:	0,5
No. of cycles:	13
No. of flashes:	20
Cycletime:	300 sec
Gain:	34
Emissionsfilter:	empty
Excitationfilter:	A-405nm
No. of multichromatics :	1
Pause after cycle no.:	0
Shaking:	no shaking

- Bakterien bis zu einer o.D._{590nm} von 0,6 -0,8 anziehen
- entsprechend gemessener o.D._{590nm} gleiche Zellmengen einsetzen
- 3 min zentrifugieren, 7.000 g
- Überstand verwerfen, Zellen in 1ml Puffersaline resuspendieren
- je 300 µl Zellsuspension mit 1175 µl GUS-Puffer in *deep-well*-Mikrotiterplatte mischen
- 10 µl Toluol zugeben, 90 sec vortexen
- bei 37° C Toluol abdampfen lassen (ca. 1h)
- je 295 µl der Zellsuspension in Flachboden-Mikrotiterplatte aliquotieren
- 5 µl pNPG-Lösung (21mg/ml) zugeben
- Messung in Fluostar starten

2.9 Pflanzentests (nach Rolfe *et al.*, 1980)

Sterile Pflanzensamen werden auf Nodulationsmedium ausgebracht und anschließend mit unterschiedlichen *S. meliloti* Rm1021 Stämmen (Tabelle C-1) beimpft. Die Symbioseeigenschaften werden durch Auszählen der gebildeten Knöllchen pro Pflanze, sowie der Bestimmung des Frischgewichts der einzelnen Pflanzen überprüft. Für Expressionsstudien während der Symbiose werden die ausgebrachten Samen mit *gusA*-Transkriptionsfusionen (Tabelle C-2) tragenden *S. meliloti* Stämme beimpft. Nach Ernte der Knöllchen wurden mit einem Vibratom Dünnschnittschnitte (60 μM) angefertigt, die bei 37° C o/n in X-Gluc Färbelösung gefärbt werden (Beekmann *et al.*, 1996). Fotos werden mit einer auf einem Olympus BH-2 Mikroskop montierten Olympus C2000Z Digitalkamera aufgenommen.

- Luzernesamen (*Medicago sativa* L. cv. europ) 2 min in 80 % EtOH unter rühren waschen
- 2 x 2 min mit sterilem H₂O waschen
- 30 min in 32 % HCl waschen
- ausgiebig (ca. 7x 10 min) in sterilem H₂O waschen, bis pH neutral
- jeweils drei Samen auf Schrägagarplatten ausbringen
- Bakterienkulturen auf Agar ausbringen
- 3-4 Wochen bei 30° C vertikal im Pflanzenschrank inkubieren

2.10 Phylogenetische Klassifizierung

Mit Bezug auf Saurin *et al.*, 1999 ist die Analyse der ABC-Domänen der ATPasen auf einen Teil der Proteinsequenzen begrenzt, der sich 30 Aminosäuren vor dem Walker_A-Motiv beginnend, über die *Signature*-Sequenz bis zum Walker_B-Motiv erstreckt (zwischen 152 und 169 Aminosäuren). Die zur phylogenetischen Klassifizierung eingesetzten Referenzen sind mit ihrem Namen, der *Accession*-Nr., dem Organismus und dem bekannten Transporter-Typ in Tabelle C-11 dargestellt. ClustalW in der Version 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) ist mit den Standardeinstellungen für die multiplen Sequenz-*Alignments* verwendet worden. Das dargestellte Dendrogramm ist anhand der UPGMA-Methode (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*; Sneath & Sokal, 1973) generiert und mit *Treetool* dargestellt.

Tabelle C-11 Zur phylogenetischen Klassifizierung der ABC-Transporter eingesetzte Referenz-Proteine

Protein	Accession-Nr.	Organismus	Transporter-Typ	Referenz
FbpC_NEIGO	Q50966	<i>Neisseria meningitis</i>	<i>Ferric</i>	(Berish <i>et al.</i> , 1990)
SfuC_SERMA	P21410	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Ferric</i>	(Angerer <i>et al.</i> , 1990)
YfuC_YERENT	Q56927	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Ferric</i>	(Saken <i>et al.</i> , 2000)
AfuC_ACTPL	Q57293	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Ferric</i>	(Chin <i>et al.</i> , 1996)
FhuC_ECOLI	P07821	<i>E. coli</i>	<i>Siderophor/Haem</i>	(Fecker & Braun, 1983)
FhuC_BACSU	P49938	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Siderophor/Haem</i>	(Wipat <i>et al.</i> , 1998)
FecE_ECOLI	P15031	<i>E. coli</i>	<i>Siderophor/Haem</i>	(Staudenmaier <i>et al.</i> , 1989)
FepC_ECOLI	P23878	<i>E. coli</i>	<i>Siderophor/Haem</i>	(Shea & McIntosh, 1991)
PhuV_PSEAE	O68877	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Siderophor/Haem</i>	(Ochsner <i>et al.</i> , 2000)
HutD_VIBCH	Q9KL34	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Siderophor/Haem</i>	(Occhino <i>et al.</i> , 1998)
HmuV_RHILE	Q9AE30	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Siderophor/Haem</i>	(Wexler <i>et al.</i> , 2001)
TroB_TREPA	P96117	<i>Treponema palladium</i>	<i>Metal</i>	(Hardham <i>et al.</i> , 1997)
MntA_SYNY3	Q55281	<i>Synechocystis sp.</i>	<i>Metal</i>	(Bartsevich & Pakrasi, 1995; Bartsevich & Pakrasi, 1996)
AdcC_STRPY	Q9A1U6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Metal</i>	(Dintilhac <i>et al.</i> , 1997)
SitB_SALMO	Q874B0	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Metal</i>	(Zhou <i>et al.</i> , 1999)

2.11 Identifizierung orthologer Eisen-ABC-Transporter

Orthologe der *S. meliloti* RM1021 Eisen-ABC-Transporter wurden mit Hilfe des BLAST Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) in den Genomen anderer *Rhizobiaceae* identifiziert. Hierzu wurden die Homologien der Proteinsequenzen der einzelnen Eisen-ABC-Transporter-Komponenten aus *S. meliloti* RM1021 zu den kompletten Genomen von *A. tumefaciens* C58 (Goodner *et al.*, 2001), *M. loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000), *B. japonicum* USDA110 (Kaneko *et al.*, 2002), *B. melitensis* 16M (DelVecchio *et al.*, 2002) und *B. suis* 1330 (Paulsen *et al.*, 2002) ermittelt. Zusätzlich wurde das annähernd vollständig sequenzierte Genom von *R. leguminosarum* biovar *viciae* Stamm 3841 (99,92 % theoretische Abdeckung des Genoms, http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum/) mit in die Analysen einbezogen. Orthologe Transportsysteme sind anhand eines *blastp* *e-values* von weniger als e^{-30} für die einzelnen Komponenten identifiziert worden.

2.12 Statistische Auswertung anhand des t-Tests

Der t-Test dient dem Vergleich zweier Mittelwerte unabhängiger Stichproben. Voraussetzung ist die Normalverteilung beider Grundgesamtheiten mit gleichen, aber unbekanntem Varianzen. Die Messwerte seien intervallskaliert.

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right] \left[\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]}}$$

wobei \bar{x} der Mittelwert, n der Stichprobenumfang und s^2 die Varianz ist. Geprüft wird die Nullhypothese $\mu_1 = \mu_2$, mit $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden. Überschreitet der Prüfquotient die Signifikanzschranke gemäß der t-Tabelle, so gilt $\mu_1 \neq \mu_2$.

D Ergebnisse

1 Charakterisierung und phylogenetische Klassifizierung der potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter

Anhand eines Datensatzes von experimentell gut charakterisierten Eisen-ABC-Transporter wurden zur Identifizierung potentieller Eisen Transportsysteme, *blastp*-Homologievergleiche gegen das vollständige *S. meliloti* Rm1021 Genom durchgeführt. Auf diese Weise wurden im Genom insgesamt acht Gen-Cluster identifiziert, die jeweils einen aus den charakteristischen Komponenten bestehenden potentiellen Eisen-ABC-Transporter kodieren. Die identifizierten ABC-Transporter Gen-Cluster sind ungleich auf die verschiedenen Replikons des *S. meliloti* Rm1021 Genoms verteilt. Drei potentielle Eisen-ABC-Transporter werden durch das Chromosom (3,65 Mb), einer durch pSymA (1,35 Mb) und die verbleibenden vier durch pSymB (1,68 Mb) codiert. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Größen der Replikons, konnte somit die Mehrzahl der potentiellen Eisen-ABC-Transporter auf pSymB lokalisiert werden. Die umgebenden Regionen der jeweiligen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster des *S. meliloti* Rm1021 Genoms sind schematisch in Abbildung D-1 dargestellt. In dieser Arbeit sind die Gen-Cluster von *smFe-A* bis *smFe-H* und die potentiellen Eisen-ABC-Transporter entsprechend von SMFe-A bis SMFe-H bezeichnet. Die Ergebnisse von Homologievergleichen der einzelnen Komponenten dieser potentiellen Eisen-ABC-Transporter gegenüber orthologen, experimentell charakterisierten Proteinen sind in Tabelle D-1 aufgelistet.

Anhand von phylogenetischen Analysen der entsprechenden ATPasen konnten die potentiellen Eisen-ABC-Transporter von *S. meliloti* Rm1021 gemeinsam mit einer Auswahl an funktionell charakterisierten Eisen-ABC-Transportern (siehe Tabelle C-11) in die unterschiedlichen Eisen Transporter-Typen klassifiziert werden. Wie von Saurin *et al.* beschrieben, wurde die Analyse der ATPasen auf einen Bereich der jeweiligen Proteinsequenzen beschränkt, der sich von 30 AS vor dem Walker_A-Motiv bis zum Walker_B-Motiv erstreckt (Saurin *et al.*, 1999). Das entsprechende Dendrogramm zeigt Abbildung D-2.

Eine zusätzliche phylogenetische Analyse anhand der Sequenzen der periplasmatischen Substrat-Bindeproteine bestätigte die durchgeführte Klassifizierung der potentiellen Eisen-ABC-Transporter anhand der ATPasen.

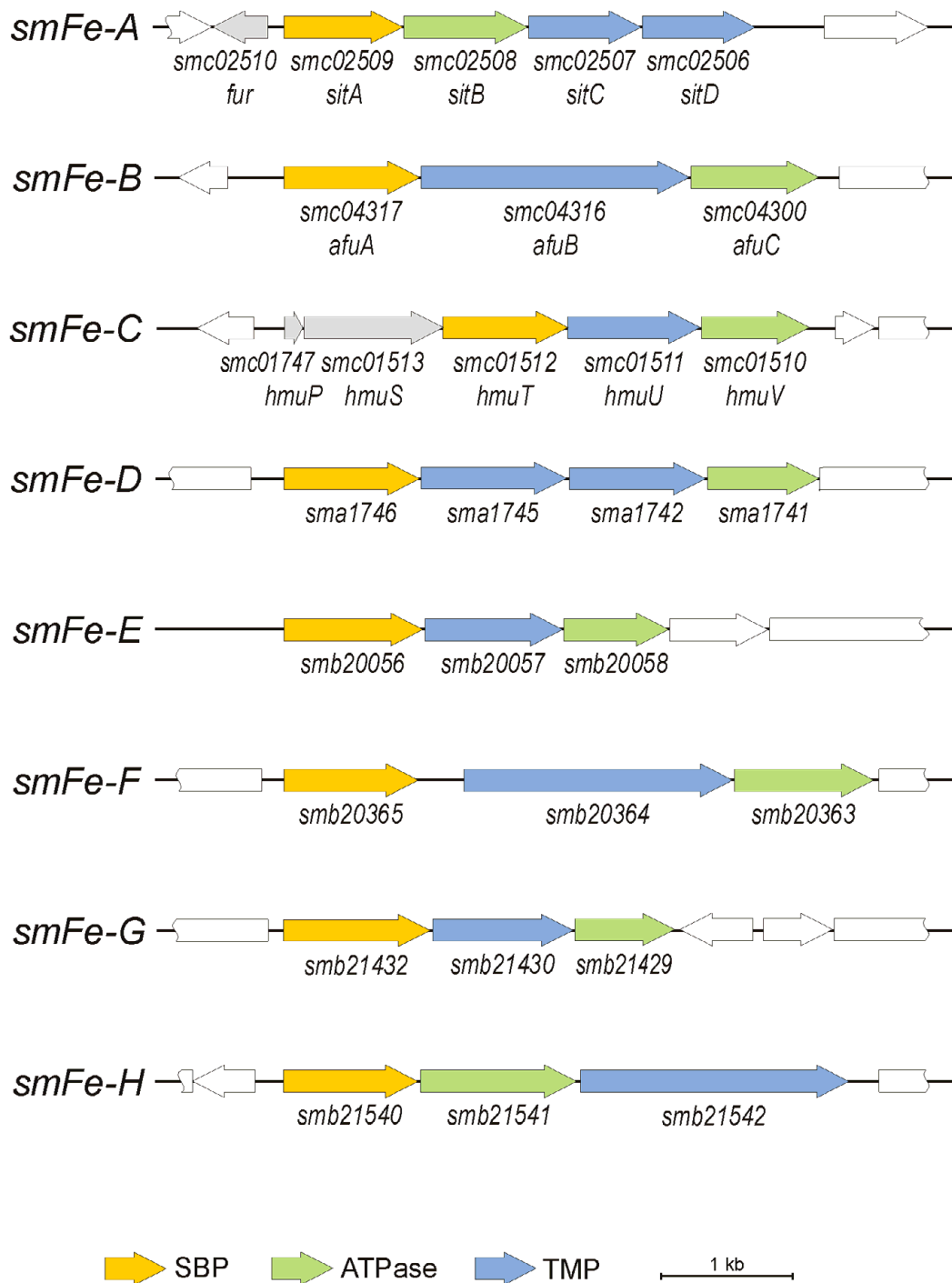


Abbildung D-1 Schematische Darstellung der *S. meliloti* Rm1021 Genom-Regionen die potentiellen Eisen-ABC-Transporter codieren. Die Gen-Cluster sind von *smFe-A* bis *smFe-H* benannt. Die entsprechenden Gene sind als gelbe Pfeile (periplasmatisches Substrat-Bindeprotein (SBP), grüne Pfeile (ATPase) und blaue Pfeile (Transmembranprotein (TMP)) dargestellt. Direkt benachbarte Gene der potentiellen ABC-Transporter Gen-Cluster sind durch weiße Pfeile dargestellt.

Das *S. meliloti* Rm1021 Genom codiert mit SMFe-A (SitABCD) nur einen *Metal*-Typ Transporter. Neben der Funktion als System zur Eisenaufnahme, wie sie auch für das homologe SitABCD-System in *Salmonella typhimurium* beschrieben wurde (Zhou *et al.*, 1999), ist dieser ABC-Transporter überwiegend an der Aufnahme von Mangan beteiligt (Chao *et al.*, 2004; Platero *et al.*, 2003). Dementsprechend bildete SMc02508 (SitB) in Abbildung D-2 gemeinsam mit SitB aus *S. typhimurium* und MntA aus *Synechocystes spec.* (Bartsevich & Pakrasi, 1995; Bartsevich & Pakrasi, 1996), ihrerseits ATPasen von charakterisierten Aufnahmesystemen für Mangan, eine klar definierte Untergruppe innerhalb der *Metal*-Typ ABC-Transporter. In direkter Nachbarschaft zu *smc02509 (sitA)* codierte auf dem Gegenstrang das Gen *smc02510* ein Polypeptid mit signifikanter Homologie zu Fur (*Ferric uptake regulator*), dem globalen Regulator der Eisenaufnahme in *E. coli* (Bagg & Neilands, 1987). Die spezielle Rolle von *fur* in *S. meliloti* Rm1021 und die *fur*-abhängige Regulation von SMFe-A (Sit) wurde bereits detailliert beschrieben (Chao *et al.*, 2004).

Insgesamt konnten drei unterschiedliche ABC-Transporter des *Siderophore/Haem*-Typs im *S. meliloti* Rm1021 Genom identifiziert werden. Wie in Abbildung D-2 dargestellt, wurde die entsprechende Gruppe in zwei Untergruppen aufgeteilt. SMa1741 (SMFe-D) bildet gemeinsam mit den ATPasen verschiedener Siderophor-abhängiger Eisen-ABC-Transporter, wie FhuC aus *E. coli* (Fecker & Braun, 1983) und *Bacillus subtilis* (Wipat *et al.*, 1998), FepC und FecE aus *E. coli* (Shea & McIntosh, 1991; Staudenmaier *et al.*, 1989) die Untergruppe der *Siderophore*-Typ Transporter.

Die zweite Untergruppe innerhalb der *Siderophore/Haem*-Typ Transporter bildeten ATPasen verschiedener ABC-Transporter für Haem oder Haem-Verbindungen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von SMFe-C zu orthologen Transporter von Haem oder Haem-Verbindungen (Tabelle D-1) wurde SMc01510 gemeinsam mit den Referenzen HmuV aus *Rhizobium leguminosarum* (Wexler *et al.*, 2001), PhuV aus *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2000) und HutD aus *Vibrio cholerae* (Occhino *et al.*, 1998), in die *Haem*-Typ Untergruppe der *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transporter gruppiert. Wie in Tabelle D-1 dargestellt zeigte die ATPase SMb20058 (SMFe-E) ähnliche Homologien zu FepC aus *Yersinia enterocolitica* (Schubert *et al.*, 1999) und zu HmuV aus *Bradyrhizobium japonicum* (Nienaber *et al.*, 2001). Während FepC an der Siderophor-abhängigen Eisenaufnahme beteiligt ist, ist HmuV Bestandteil eines Aufnahmesystems für Haem-Verbindungen. Aufgrund der unterschiedlichen Zugehörigkeiten dieser ATPasen zu den verschiedenen Untergruppen der *Siderophore/Haem*-Typ Transporter wurde SMb20058 in Abbildung D-2 nicht eindeutig einer Untergruppe zugeordnet. Auch die phylogenetische Klassifizierung anhand der periplasmatischen

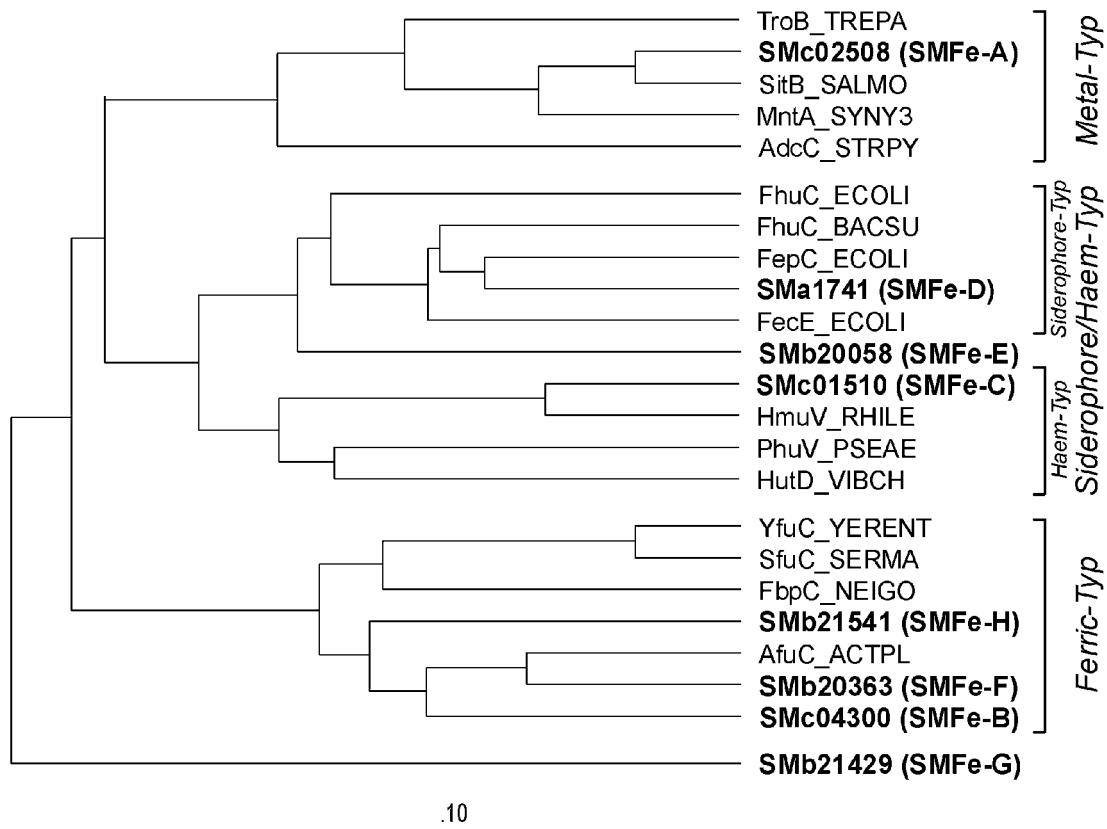


Abbildung D-2 Phylogenetische Klassifizierung der acht potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter. Partielle Proteinsequenzen der ATPasen, die sich über einen Bereich beginnend 30 AS stromaufwärts des Walker_A-Motivs bis einschließlich des Walker_B-Motivs erstreckt, wurden anhand von multiplen Sequenz-Alignments, berechneten Distanz-Matrices und Konstruktion eines Dendrogramms charakterisiert. Die Proteine wurden anhand bekannter Funktion der Referenzen in *Metal*-, *Ferric*- und *Siderophore/Haem*-Typ unterteilt. ATPasen der *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter sind fett dargestellt und der Name des entsprechenden Transportsystems ist in Klammern aufgeführt.

Substratbindeproteine ermöglichte keine eindeutige Gruppierung von SMb20056 (SMFe-E) innerhalb der *Siderophore/Haem*-Typ Transporter.

Die ATPasen des chromosomal codierten potentiellen Eisen-ABC-Transporters SMFe-B (Afu), sowie die beiden durch pSymB codierten putativen Transportsysteme SMFe-F und SMFe-H gruppierten in Abbildung D-2 gemeinsam mit Referenzen aus der Gruppe der *Ferric*-Typ ABC-Transporter. Alle ATPasen dieser potentiellen Transporter aus *S. meliloti* Rm1021 zeigten eine signifikante Sequenzhomologie zu AfuC aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Chin *et al.*, 1996; Tabelle D-1), die sich auch in der phylogenetischen Klassifizierung widerspiegelte. Gemeinsam mit AfuA aus *A. pleuropneumoniae* bildeten die ATPasen SMc04300 (SMFe-B), SMb20363 (SMFe-F) und SMb21540 (SMFe-H) eine klar abgegrenzte Untergruppe innerhalb der *Ferric*-Typ ABC-Transporter, während die weiteren Referenzen

dieses Transportertyps wie YfuC aus *Yersinia enterocolitica* (Saken *et al.*, 2000), SfuC aus *Serratia marcescens* (Angerer *et al.*, 1990) und FbpC aus *Neisseria meningitis* (Berish *et al.*, 1990) sich innerhalb dieser Gruppe phylogenetisch deutlich von der durch AfuC charakterisierten Untergruppe abgrenzten.

Die ATPase SMb21429 konnte mit diesem Ansatz nicht zu einem der unterschiedlichen Transporter-Typen gruppiert werden, so dass der verbleibende putative Transporter SMFe-G nicht eindeutig phylogenetisch klassifiziert werden konnte (Abbildung D-1). Jedoch deuten die ermittelten Homologien der entsprechenden Transporterkomponenten ausschließlich zu orthologen Proteinen von *Siderophore/Haem*-Typ Transportern (Tabelle D-1), darauf hin, dass es sich bei SMFe-G um einen weiteren ABC-Transporter des *Siderophore/Haem*-Typs handelt. Bei der ebenfalls durchgeführten phylogenetischen Klassifizierung anhand der periplasmatischen Substratbindeproteine wurde SMFe-G ebenfalls zu den *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transportern gruppiert.

Zusammenfassend zeigt die detaillierte Annotation gemeinsam mit den phylogenetischen Analysen, dass das *S. meliloti* Rm1021 Genom insgesamt einen potentiellen *Metal*-Typ (SMFe-A), 3 potentielle *Ferric*-Typ (SMFe-B, SMFe-F und SMFe-H) und 4 potentielle *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transporter codiert. Innerhalb der Gruppe der *Siderophore/Haem*-Typ Transporter konnte hierbei noch ein *Haem*-Typ (SMFe-C), 2 *Siderophore*-Typ (SMFe-D und SMFe-G) und ein nicht eindeutig differenzierbarer Eisen-ABC-Transporter (SMFe-E) unterschieden werden.

Zusätzlich zu den hier vorgestellten vollständigen Eisen-ABC-Transporter konnten zwei einzelne Gene (*smc00784* und *smb20723*) im *S. meliloti* Rm1021 Genom identifiziert werden, deren vorhergesagten Proteinsequenzen signifikante Homologien zu dem periplasmatischen Substratbindeprotein AfuA aus *A. tumefaciens* (Chin *et al.*, 1996) aufwiesen. Jedoch konnten im gesamten Genom keine weiteren Gene identifiziert werden, die für die zusätzlich benötigten Komponenten eines funktionsfähigen ABC-Transporters codierten. Somit wurden diese Gene nicht mit in die folgenden Analysen der vollständigen potentiellen Eisen ABC-Transportsysteme aus *S. meliloti* Rm1021 übernommen.

Tabelle D-1 Homologievergleiche der einzelnen Komponenten der potentiellen Eisen-ABC-Transporter aus *S. meliloti* Rm1021 und die Funktion der homologen Proteine

Transporter	Protein	Größe (AS)	Homologie¹	Funktion²	Referenz
SMFe-A	SMc02509	301	69% (299 AS) SitA <i>S. typhimurium</i>	Eisen/Mangan ABC-Transporter SBP	(Zhou et al., 1999)
	SMc02508	311	70% (266 AS) SitB <i>S. typhimurium</i>	Eisen/Mangan ABC-Transporter ATPase	(Zhou et al., 1999)
	SMc02507	285	78% (274 AS) SitC <i>S. typhimurium</i>	Eisen/Mangan ABC-Transporter TMP	(Zhou et al., 1999)
	SMc02506	284	66% (273 AS) SitD <i>S. typhimurium</i>	Eisen/Mangan ABC-Transporter TMP	(Zhou et al., 1999)
SMFe-B	SMc04317	326	32% (291 AS) AfuA <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter SBP	(Chin et al., 1996)
	SMc04316	678	24% (504 AS) AfuB <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter TMP	(Chin et al., 1996)
	SMc04300	346	38% (302 AS) AfuC <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter ATPase	(Chin et al., 1996)
	SMc01747	46	81% (37 AS) HmuP <i>R. leguminosarum</i>	Haem Transportprotein	(Wexler et al., 2001)
SMFe-C	SMc01513	355	60% (353 AS) HmuS <i>R. leguminosarum</i>	Periplasmatisches Haem Degradations-Protein	(Wexler et al., 2001)
	SMc01512	316	51% (309 AS) HmuT <i>R. leguminosarum</i>	Haem ABC-Transporter SBP	(Wexler et al., 2001)
	SMc01511	366	71% (366 AS) HmuU <i>R. leguminosarum</i>	Haem ABC-Transporter TMP	(Wexler et al., 2001)
	SMc01510	262	62% (260 AS) HmuV <i>R. leguminosarum</i>	Haem ABC-Transporter ATPase	(Wexler et al., 2001)
SMFe-D	SMA1746	343	46% (306 AS) IRP1 <i>C. diphtheriae</i>	Fe ³⁺ -Siderophore ABC-Transporter SBP	(Schmitt et al., 1997)
	SMA1745	366	35% (301 AS) FepD <i>Y. enterocolitica</i>	Fe ³⁺ -Siderophore ABC-Transporter TMP	(Schubert et al., 1999)
	SMA1742	345	37% (304 AS) FepG <i>Y. enterocolitica</i>	Fe ³⁺ -Siderophore ABC-Transporter TMP	(Schubert et al., 1999)
	SMA1741	280	55% (260 AS) ViuC <i>V. cholerae</i>	Fe ³⁺ -Siderophore ABC-Transporter ATPase	(Wyckoff et al., 1999)
SMFe-E	SMB20056	266	26% (229 AS) HmuT <i>B. japonicum</i>	Haem ABC-Transporter SBP	(Nienaber et al., 2001)
	SMB20057	347	39% (346 AS) HmuU <i>R. leguminosarum</i>	Haem ABC-Transporter TMP	(Wexler et al., 2001)

Transporter	Protein	Größe (AS)	Homologie ¹	Funktion ²	Referenz
SMFe-E	SMb20058	266	41% (234 AS) FepC <i>Y. enterocolitica</i>	Fe ³⁺ -Siderophore ABC-Transporter ATPase	(Schubert <i>et al.</i> , 1999)
			41% (244 AS) HmuV <i>B. japonicum</i>	Haem ABC-Transporter ATPase	(Nienaber <i>et al.</i> , 2001)
SMFe-F	SMb20365	342	29% (289 AS) BitA <i>B. hyodysenteriae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter SBP	(Dugourd <i>et al.</i> , 1999)
			29% (286 AS) BitB <i>B. hyodysenteriae</i>		(Dugourd <i>et al.</i> , 1999)
	SMb20364	681	28% (286 AS) BitC <i>B. hyodysenteriae</i>		(Dugourd <i>et al.</i> , 1999)
			43% (667 AS) AfuB <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter TMP	(Chin <i>et al.</i> , 1996)
			23% (277 AS, C-terminal) BitE <i>B. hyodysenteriae</i>		(Dugourd <i>et al.</i> , 1999)
			23% (257 AS, N-terminal) BitF <i>B. hyodysenteriae</i>		(Dugourd <i>et al.</i> , 1999)
SMFe-G	SMb20363	353	47% (348 AS) AfuC <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter ATPase	(Chin <i>et al.</i> , 1996)
	SMb21432	378	35% (212 AS) IRP6a <i>C. diphtheriae</i>	Fe ³⁺ -Siderophore ABC-Transporter SBP	(Qian <i>et al.</i> , 2002)
SMFe-H	SMb21430	356	37 % (335 AS) HmuU <i>R. leguminosarum</i>	Haem ABC-Transporter TMP	(Wexler <i>et al.</i> , 2001)
	SMb21429	253	36% (261 AS) FhuC <i>B. subtilis</i>	Fe ³⁺ -Siderophore ABC-Transporter ATPase	(Wipat <i>et al.</i> , 1998)
	SMb21540	340	35% (259 AS) FecE <i>E. coli</i>		(Staudenmaier <i>et al.</i> , 1989)
			35% (328 AS) AfuA <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter SBP	(Chin <i>et al.</i> , 1996)
SMb21541	395	57% (274 AS) PotA <i>E. coli</i>	Spermidin/Putrescin ABC-Transporter ATPase	(Kashiwagi <i>et al.</i> , 1995)	
SMb21542	680	44% (309 AS) AfuC <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter ATPase	(Chin <i>et al.</i> , 1996)	
			29% (656 AS) AfuB <i>A. pleuropneumoniae</i>	Fe ³⁺ ABC-Transporter TMP	(Chin <i>et al.</i> , 1996)

¹ Die Homologie wurde anhand des *blastp* Algorithmus ermittelt; die Werte geben die jeweils höchsten Homologien zu charakterisierten Proteinen mit experimentell nachgewiesener Funktion. Die Größe des homologen Bereichs ist in Klammern angegeben.

² Die Funktion der homologen Proteine entsprechend ihres experimentellem Nachweis; SBP (periplasmatisches Substrat-Bindeprotein), TMP (Transmembranprotein)

2 Orthologe der potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter in anderen *Rhizobiaceae*-Genomen

Das *S. meliloti* Rm1021 Genom codiert insgesamt acht potentielle Eisen-ABC-Transporter der unterschiedlichen Typen. Zur Klärung, ob diese Vielzahl an ABC-Transporter einzigartig für *S. meliloti* Rm1021 ist, oder ob es sich um eine gemeinsame Strategie der *Rhizobiaceae* zur Gewährleistung einer ausreichenden Eisenversorgung handelt, wurden die derzeit verfügbaren Genome von *A. tumefaciens* C58 (Goodner *et al.*, 2001), *M. loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000), *B. japonicum* USDA110 (Kaneko *et al.*, 2002), *B. melitensis* 16M (DeIVecchio *et al.*, 2002), *B. suis* 1330 (Paulsen *et al.*, 2002) und *R. leguminosarum* biovar *viciae* Stamm 3841 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum/) auf die Anwesenheit von Orthologen der potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter mit Hilfe des BLAST Algorithmus überprüft. Die hieraus resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle D-2 zusammengefasst.

Tabelle D-2 Anwesenheit von Orthologen der potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter in verschiedenen *Rhizobiaceae*-Genomen

<i>S. meliloti</i> Eisen ABC-Transporter		identifiziert in					
Name	Typ	<i>A. t.</i> ¹	<i>M. l.</i>	<i>B. j.</i>	<i>B. m.</i>	<i>B. s.</i>	<i>R. l.</i> ²
SMFe-A	<i>Metal</i>	+	-	-	-	-	+
SMFe-B	<i>Ferric</i>	+	+	-	-	-	-
SMFe-F	<i>Ferric</i>	+	-	-	+	+	-
SMFe-H	<i>Ferric</i>	-	-	-	-	-	-
SMFe-C	<i>Siderophore/Haem</i>	+	+	+	-	-	+
SMFe-D	<i>Siderophore/Haem</i>	-	-	-	-	-	-
SMFe-E	<i>Siderophore/Haem</i>	+	+	-	+	-	-
SMFe-G	<i>Siderophore/Haem</i>	+	-	-	-	-	+

¹ Abkürzungen der Bakteriennamen: *A. t.*: *Agrobacterium tumefaciens* C58; *M. l.*: *Mesorhizobium loti* MAFF303099; *B. j.*: *Bradyrhizobium japonicum* USDA110; *B. m.*: *Brucella melitensis* 16M; *B. s.*: *Brucella suis* 1330; *R. l.*: *R. leguminosarum* biovar *viciae* Stamm 3841

² unvollständiges Genoms; nur 99,92 % theoretische Genomabdeckung

³ Orthologe ABC-Transporter wurden anhand eines *blastp* *e-Values* kleiner als e^{-30} für alle Transporterkomponenten identifiziert (+).

Von sechs der acht potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter konnten im Genom von *A. tumefaciens* ein Ortholog identifiziert werden. Somit scheint in Bezug auf die Eisen-ABC-Transporter *A. tumefaciens* der nächste Verwandte zu *S. meliloti* Rm1021 zu sein, denn kein anderes der analysierten *Rhizobiaceae*-Genome wies diese Anzahl an orthologen Eisen-ABC-Transportern auf. Wie auch *A. tumefaciens*, wiesen alle Genome der stickstofffixierenden Spezies von *M. loti*, *B. japonicum* und *R. leguminosarum* ein Ortholog des *Haem*-Typ Transporters SMFe-C aus *S. meliloti* Rm1021 auf.

Da es sich bei den beiden analysierten *Brucella* Stämme um Tier-pathogene Stämme und nicht um Rhizobien handelt, verwundert es nicht, dass nur wenige Orthologe der *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter in den beiden Genomen identifiziert wurden. Lediglich ein Ortholog des *Ferric*-Typ Transporters SMFe-F konnte in beiden *Brucella*-Genomen identifiziert werden. Zusätzlich wies das Genom von *B. melitensis* ein Ortholog des *Siderophore*/*Haem*-Typ Transporters SMFe-E auf.

Aufgrund dessen, dass in keinem der analysierten *Rhizobiaceae*-Genome ein Ortholog des *Ferric*-Typ Transporters SMFe-H und des *Siderophore*-Typ Transporters SMFe-E identifiziert werden konnte, scheinen diese beiden potentiellen Eisen-ABC-Transporter einzigartig für *S. meliloti* Rm1021 zu sein.

3 Die Siderophor-Produktion von *S. meliloti* Rm1021 als Indikator für Eisenmangel

S. meliloti Rm1021 produziert und schleust das endogene Siderophore Rhizobactin 1021 aus (Lynch *et al.*, 2001; Persmark *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1985). Da die Produktion und Sekretion von Siderophoren typischerweise unter Eisenmangelbedingungen geschieht (Neilands, 1993), sollte im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis von Rhizobactin 1021 im Kulturüberstand mittels des CAS-Tests als ein Indikator für Eisenmangel genutzt werden.

3.1 Nachweis von Rhizobactin 1021 im Kulturüberstand mittels CAS-Test

Der CAS-Test ist ein universeller chemischer Nachweis für Siderophore im Überstand von Bakterienkulturen (Schwyn & Neilands, 1987). Der Nachweis beruht darauf, dass der ternäre chemische Komplex Chrom-Azuroil-S/ Fe^{3+} /Hexadecyl-Trimethyl-Amoniumbromid einen dunkelblauen Farbstoff bildet, der einen Extinktionskoeffizienten von annähernd $100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (pH 5,6) aufweist. Rhizobactin 1021 wirkt als starker Chelator und entfernt aufgrund seiner

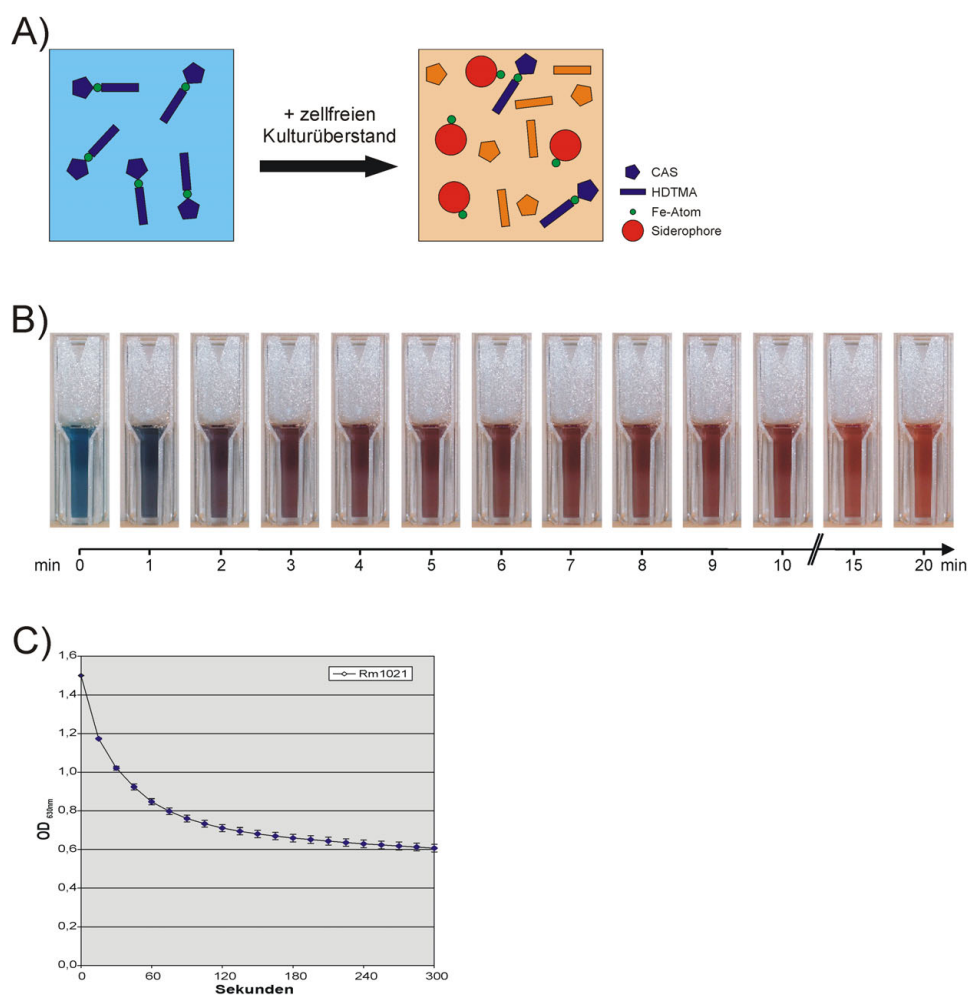


Abbildung D-3 Der CAS-Test zum Nachweis von Rhizobactin 1021. A) Schematische Darstellung des CAS-Tests. Chrom-Azuroil-S (CAS) bildet mit Hexadecyl-Trimethyl-Amoniumbromid (HDTMA) in Anwesenheit von Fe^{3+} einen tiefblauen Farbkomplex. Im Kulturüberstand enthaltene Siderophore entfernen aufgrund ihrer hohen Affinität das zentrale Fe-Atom aus dem Farbkomplex. Der resultierende Zerfall des Farbstoffkomplexes bewirkt einen Farbumschlag nach orange, der sowohl optisch als auch photometrisch verfolgt werden kann. B) Optischer Verlauf einer typischen CAS-Reaktion zum qualitativen Nachweis von Rhizobactin 1021 im Kulturüberstand. C) Der Farbumschlag der CAS-Reaktion kann auch photometrisch bei einer Wellenlänge von 635 nm quantitativ erfasst werden.

hohen Affinität das Fe^{3+} -Atom aus dem Farbstoffkomplex. Der resultierenden Zerfall des Farbstoffkomplexes bewirkt einen Farbumschlag von blau nach orange, der sowohl optisch als auch aufgrund dessen, dass das eisenfreie Indikatorsystem keine Absorption aufweist, photometrisch verfolgt werden kann (Abbildung D-3). Während die optische Auswertung nur der qualitativen Aussagen über den Siderophorgehalt diene, ermöglichte die photometrische Auswertung des CAS-Tests quantitative Analysen des Siderophorgehalts.

3.2 Eisenmangel bewirkt ein reduziertes Wachstum und eine erhöhte Rhizobactin 1021-Sekretion

Um den Einfluss des Eisengehalts des Mediums auf das bakterielle Wachstum zu klären, wurde der Wildtyp *S. meliloti* Rm1021 in TY Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen (200 μM , 300 μM und 400 μM) des Chelators 2,2'-Dipyridyl in Mikrotiterplatten angezogen. Die in Abbildung D-4 a) dargestellten Wachstumskurven wurden automatisch mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan GENIOS) aufgenommen. Eine Erhöhung der 2,2'-Dipyridyl-Konzentration im TY-Medium und der daraus resultierenden Reduzierung des Eisengehalts bewirkte ein signifikant vermindertes Wachstum des Wildtyps *S. meliloti* Rm1021. Entsprechend der eingesetzten 2,2'-Dipyridyl-Konzentrationen sank zum einen die maximal erreichte optische Dichte, zum anderen verlängerten sich die *lag*- und *log*-Phasen der jeweiligen Bakterienkulturen.

Ebenfalls wurde der Einfluss von Eisenmangel auf die Sekretion von Rhizobactin 1021 analysiert. Hierzu wurde nach der Anzucht von *S. meliloti* Rm1021 unter gleichen Bedingungen in Schüttelkolben die Kulturüberstände auf ihren Rhizobactin 1021-Gehalt mit dem CAS-Test quantitativ analysiert (Abbildung D-4 b). Der Kulturüberstand vom TY-Medium mit 400 μM 2,2'-Dipyridyl konnte nicht analysiert werden, da das Wachstum des Wildtyps Rm1021 unter dieser Bedingung nicht ausreichte. Während nach Wachstum in TY-Medium kein Rhizobactin 1021 im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte, bewirkt eine Anzucht von *S. meliloti* Rm1021 unter reduziertem Eisengehalt des Mediums einen signifikant erhöhten Gehalt an Rhizobactin 1021. Der annähernd gleiche Verlauf der CAS-Reaktionen für TY-Medium mit 200 μM (TYD 200 μM) und 300 μM (TYD 300 μM) 2,2'-Dipyridyl zeigte, dass die Stärke des induzierten Eisenmangels jedoch keinen Einfluss auf die Konzentration von Rhizobactin 1021 im jeweiligen Kulturüberstand hatte. Somit scheint der beobachtete Wachstumsunterschied

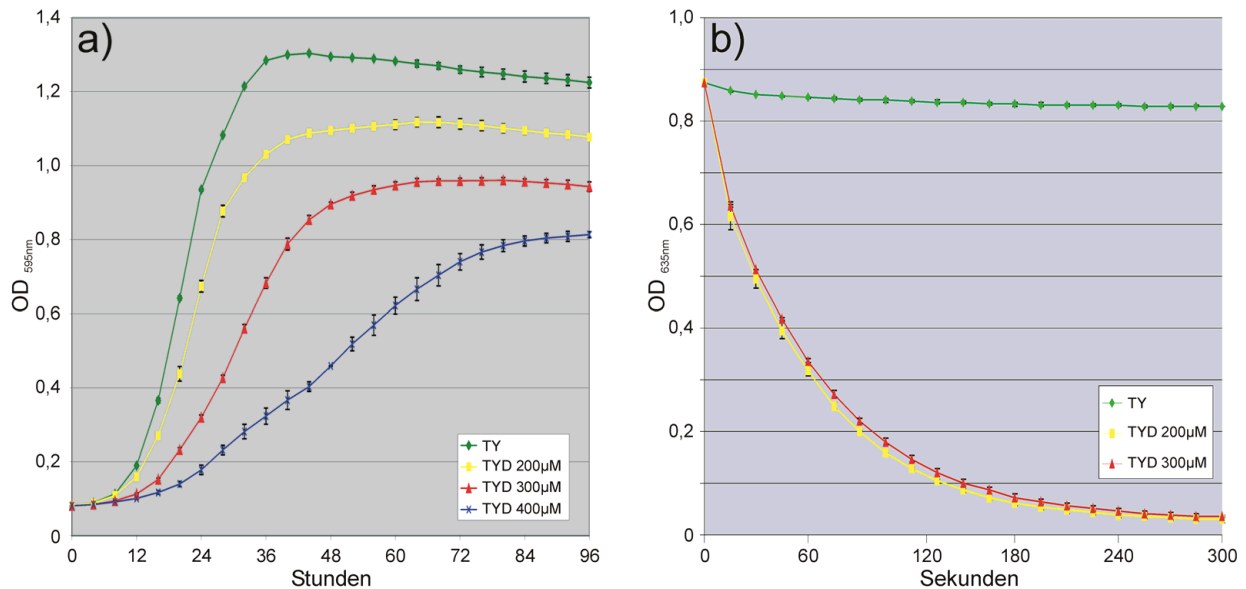


Abbildung D-4 Einfluss von Eisenmangel auf Wachstum (a) und Sekretion von Rhizobactin 1021 (b) von *S. meliloti* Rm1201. Die Anzucht des *S. meliloti* Rm1021 Wildtyps erfolgte in Mikrotiterplatten in TY-Medium mit normalem Eisengehalt (TY) sowie in TY-Medium mit durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen 2,2'-Dipyridyls induziertem Eisenmangel (TYD). Die Wachstumskurven wurden in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan Genios) anhand der OD_{595nm} ermittelt. Der Siderophorgehalt des Kulturüberstands wurde anhand des CAS-Tests ermittelt. Die Anzucht erfolgte in Schüttelkolben mit den gleichen Medien-Bedingungen wie für den Wachstumstest. Da das Wachstum in TY-Medium mit 400 µM 2,2'-Dipyridyl nicht für den CAS-Test ausreichte, konnte diese Wachstumsbedingung nicht auf den Siderophorgehalt analysiert werden.

zwischen den unterschiedlichen Bedingungen auf den jeweils reduzierten Eisengehalt des Mediums zurückzuführen, und nicht ein Effekt der erhöhten Sekretion von Rhizobactin 1021 durch *S. meliloti* Rm1021 und der damit evtl. verbundenen Einschränkung des Wachstums zu sein.

3.3 Die Aufnahme von Rhizobactin 1021 ist im Verhältnis zur Sekretion quantitativ untergeordnet

Die in der oben beschriebenen Form durchgeführte Variante des CAS-Tests ermöglichte quantitative Analyse des absoluten Siderophorgehalt eines Kulturüberstands. Eingesetzt als ein Indikator für die Sekretion, konnte jedoch nicht der Einfluss der bakteriellen Siderophoraufnahme auf die Gesamtkonzentration differenziert werden. Um den Einfluss der Aufnahme von Rhizobactin 1021 durch *S. meliloti* Rm1021 zu klären, wurde der

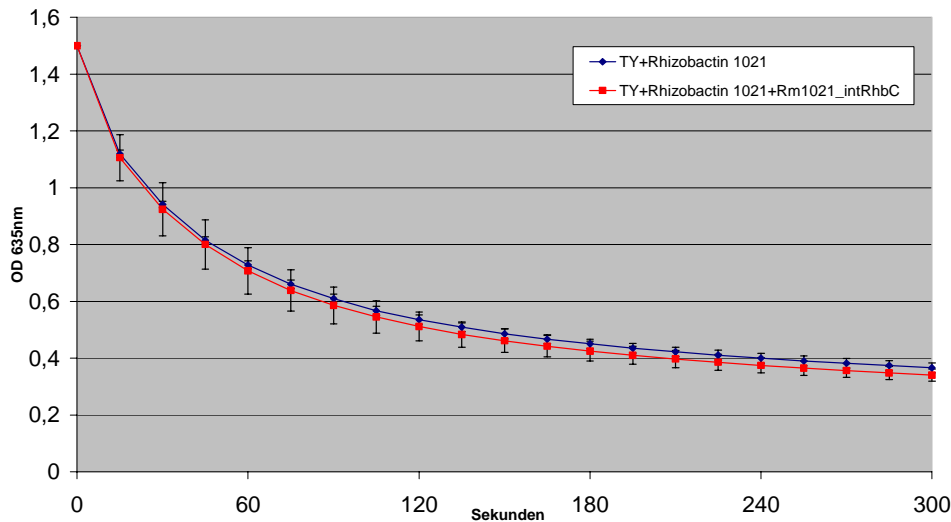


Abbildung D-5 Siderophorgehalt eines Rhizobactin 1021-supplementierten TY-Mediums vor (TY+Rhizobactin 1021) und nach (TY+Rhizobactin 1021+Rm1021_intRhbC) Anzucht der Rhizobactin 1021-Produktionsmutante Rm1021_intRhbC. Der absolute Gehalt an Rhizobactin 1021 wurde anhand des CAS-Tests ermittelt.

Siderophorgehalt eines Kulturüberstands vor und nach Inkubation der Rhizobactin 1021-Produktionsmutante Rm1021_intRhbC mittels CAS-Test ermittelt. Dieser Stamm war, da er selber kein Rhizobactin ausschleust, für ein ausreichendes Wachstum unter Eisenmangelbedingungen auf die Aufnahme von Ferri-Rhizobactin 1021 aus dem Medium angewiesen. Die Anzucht der Bakterien erfolgte daher in Rhizobactin 1021-supplementiertem TY-Medium, indem der zellfreie, Rhizobactin 1021 haltige Kulturüberstand einer unter Eisenmangel (TYD-Medium) angezogenen *S. meliloti* Rm1021 Kultur sowie frisches TYD-Medium in gleichen Anteilen gemischt wurde. Das Wachstum des Wildtyps Rm1021 wurde zusätzlich durch Zugabe des Antibiotikums Neomycin unterdrückt.

Wie in Abbildung D-5 dargestellt, erfolgte der Farbumschlag des CAS-Tests in beiden Ansätzen in gleicher Geschwindigkeit, was auf eine identische Konzentration von Rhizobactin 1021 deutete. Das Wachstum der Rhizobactin 1021 Mutante bewirkte demnach keine signifikante Reduktion des Gesamtgehalts an Siderophoren im Medium, so dass bei den folgenden Analysen die Aufnahme von Rhizobactin 1021 gegenüber der Sekretion quantitativ vernachlässigt werden konnte.

3.4 Die Produktion von Rhizobactin 1021 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Die Produktion von Siderophoren kann als ein qualitativer Indikator für Eisenmangel genutzt werden. Zur Überprüfung, ob die in dieser Arbeit genutzten Wachstumsbedingungen eine ausreichende Eisenversorgung der *S. meliloti* Rm1021 Zellen gewährleisteten, wurde der Kulturüberstand nach Anzucht unter verschiedenen Eisenbedingungen auf die Anwesenheit von Rhizobactin 1021 mittels des CAS-Tests überprüft. Bei den getesteten Wachstumsbedingungen handelte es sich zum einen um Komplexmedium mit normalem Eisengehalt (TY) sowie eisenreduziertes Komplexmedium (TYD). Zum anderen erfolgte die Anzucht in Vincent-Minimal-Medium mit den spezifischen Eisenquellen FeCl_3 , FeSO_4 , Haemoglobin und Haemin. Wie Abbildung D-6 zeigt, konnte Rhizobactin 1021 im Kulturüberstand nur nach Anzucht der Zellen in eisenreduziertem TY-Medium anhand des CAS-Tests nachgewiesen werden. Somit ermöglichten die supplementierten spezifischen Eisenquellen in den eingesetzten Konzentrationen eine ausreichende Eisenversorgung der frei lebenden *S. meliloti* Rm1021 Zellen.

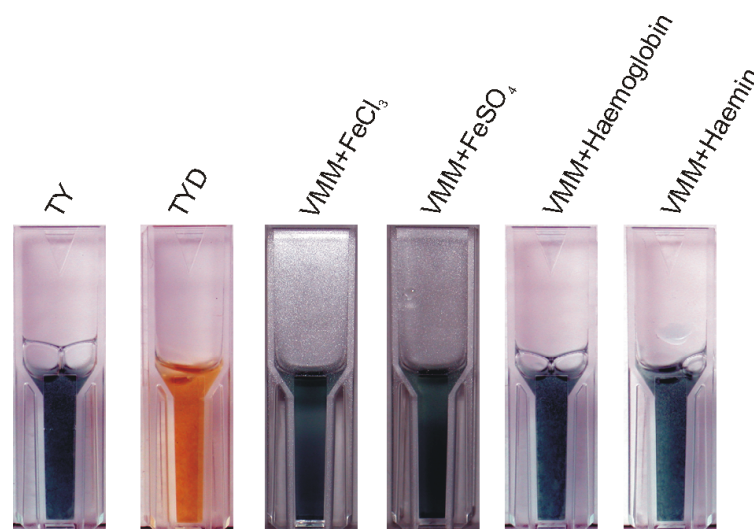


Abbildung D-6 Nachweis von Rhizobactin 1021 im Kulturüberstand verschiedener Medien anhand des CAS-Tests. *S. meliloti* Rm1021 wurde unter unterschiedlichen Eisenquellen und Eisenbedingungen angezogen und zellfreier Kulturüberstand für den CAS-Test eingesetzt. Rhizobactin 1021 konnte nur nach Wachstum unter induzierten Eisenmangelbedingungen (TYD) im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

4 Phänotypische Charakterisierung von *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transportermutanten

4.1 Erstellung von Deletionsmutanten

Um die Bedeutung der verschiedenen Eisen-ABC-Transporter für die Eisen-Aufnahme von *S. meliloti* Rm1021 zu klären, wurden mittels der PCR-basierten GeneSOEing-Methode (Horton *et al.*, 1990) ca. 300 bp große Deletionen in die Gene für die periplasmatischen Substratbindeproteine der Eisen-ABC-Transporter eingeführt. Auf diese Weise konnten für die Gen-Cluster *smFe-B*, *smFe-C*, *smFe-D* und *smFe-H* markerfreie *in-frame* Deletionsmutanten erstellt werden. In die Gene *smb20056* (Cluster *smFe-E*) und *smb21432* (Cluster *smFe-G*) wurde zusätzlich eine Gm^r-Kassette (*aacC*) integriert, die eine Selektion auf die erfolgreiche Integration des Deletionskonstrukts in das Genom ermöglichte. Die auf diese Weise eingeführten Deletionen waren jedoch auch ohne Gm-Selektionsdruck stabil. Die Position und Orientierung der verwendeten Primer (Tabelle C-3), sowie die Position der deletierten Bereiche in den Genen für die periplasmatischen Substratbindeproteine sind in Abbildung D-7 dargestellt. Zur Validierung der erstellten Mutanten wurden von den betroffenen genomischen Regionen PCR-Produkte mit spezifischen Primern amplifiziert und in Bezug auf ihre Größe mit den entsprechenden Produkten des Wildtyps verglichen. Abbildung D-8 zeigt die deutlichen Größenunterschiede der jeweiligen Produkte nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Größe der PCR-Produkte aller markerfreien Mutanten ist gegenüber dem jeweiligen Produkt des Wildtyps entsprechend der eingeführten Deletion verringert. Bei Mutanten mit eingeführter Gm^r-Kassette (Rm1021 Δ SMb20056, Rm1021 Δ SMb21432) fällt das PCR-Produkt im Vergleich zum Wildtyp *S. meliloti* Rm1021 um ca. 700 bp größer aus.

Trotz vielfacher Ansätze und Versuche war es nicht gelungen, eine Deletion in das Gen *smb20365* einzuführen, welches das periplasmatische Substratbindeprotein des *Ferric*-Typ Transporters SMFe-F codiert. Andererseits konnte jedoch dieses Gen mittels Plasmidintegration erfolgreich unterbrochen werden, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei *smb20365* um ein für *S. meliloti* Rm1021 essentielles Gen handelt. Um die beschriebene Plasmidintegration aufrecht zu halten, war es jedoch erforderlich das Wachstum unter selektiven Bedingungen in Anwesenheit von Antibiotika durchzuführen. Da jedoch das Wachstum unter selektiven Bedingungen nicht mit dem unter unselektiven Bedingungen zu vergleichen war, fand

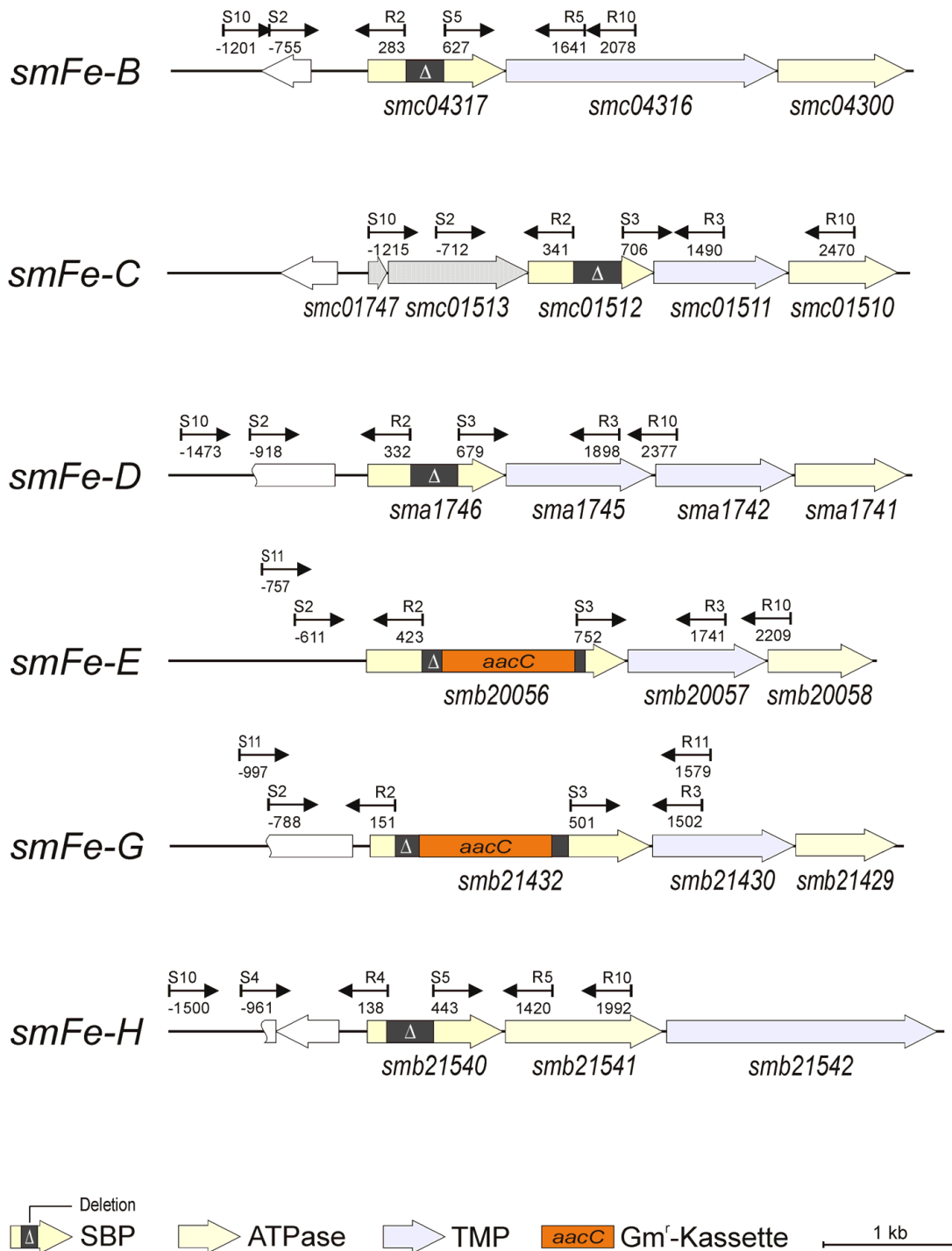


Abbildung D-7 Schematische Darstellung der erstellten Mutationen in den potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Clustern von *S. meliloti* Rm1021. Position und Größe der eingebrachten Mutationen in den Genen, die die periplasmatischen Substratbindepoteine kodieren, sind als graue Balken (Δ) dargestellt. Position und Orientierung der beim GeneSOEing eingesetzten Primer (Tabelle C-3) sind als Pfeile oberhalb der Gen-Cluster dargestellt. Die Zahlen geben die relative Position in Bezug auf den Start des deletierten Gens an. Zur Mutation der Gene *smb20056* und *smb21432* wurde zusätzlich zur Deletion eine Gm^r-Kassette (*aacC*) eingeführt.

diese Mutante keine Verwendung in den unselektiv durchgeführten vergleichenden Wachstumstest unter verschiedenen Eisen-Bedingungen.

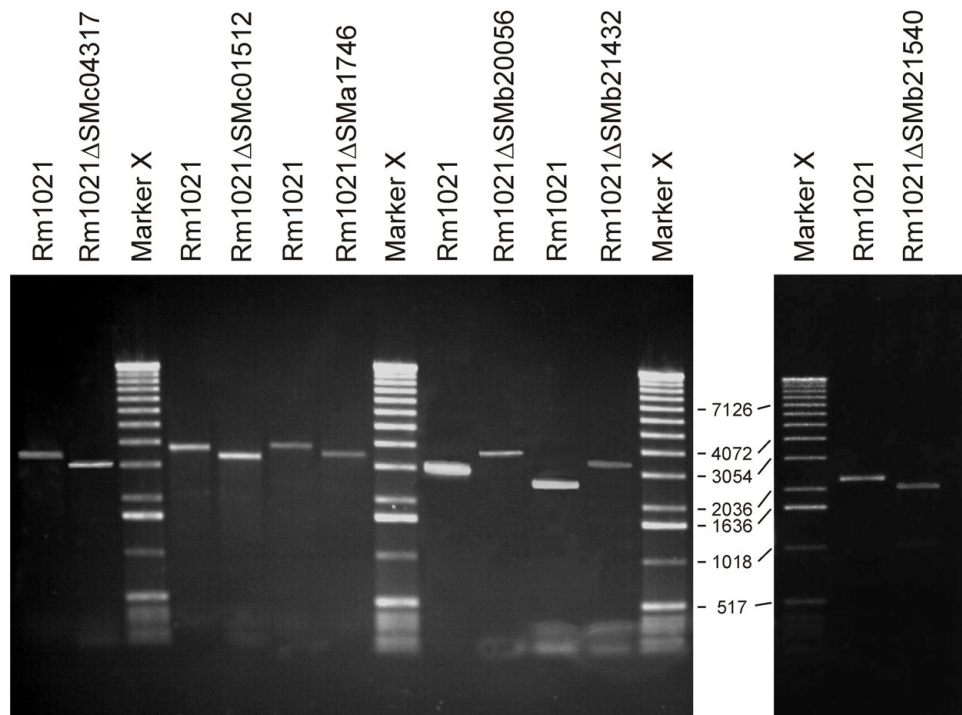


Abbildung D-8 Nachweis der Deletion der Gene des periplasmatischen Substratbindeproteins der Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster. PCR-Produkte der entsprechenden Regionen der Mutanten wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und nach elektrophoretischer Auftrennung in Bezug auf ihre Größe mit den entsprechenden Produkten des Wildtyps *S. meliloti* Rm1021 verglichen. Die Größe ausgewählter Banden des Längenstandards Marker X ist in bp dargestellt.

4.2 Wachstumstests unter verschiedenen Eisenbedingungen

Anhand eines Wachstumstests mit unterschiedlichen Eiskonzentrationen des Mediums sollte mit Hilfe der erzeugten Deletionsmutanten die Bedeutung der einzelnen potentiellen Eisen-ABC-Transporter von *S. meliloti* Rm1021 für die Eisenversorgung aufgeklärt werden. Hierzu wurden die Mutanten und der Wildtyp sowohl unter Eisenmangel-Bedingungen in TY-Medium mit

300 μM 2,2'-Dipyridyl, als auch unter ausreichender Eisenversorgung in TY Medium mit gleicher 2,2'-Dipyridyl-Konzentration, jedoch zusätzlich mit 30 μM FeCl_3 supplementiert, angezogen. Auf diese Weise sollten sekundäre Effekte des 2,2'-Dipyridyls, die möglicherweise Einfluss auf das Zellwachstum haben, ausgeschlossen und sichergestellt werden, dass die beiden Wachstumsbedingungen sich lediglich in der Eisenkonzentration unterschieden.

Wie in Abbildung D-9a dargestellt, zeigten die verschiedenen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transportermutanten unter Eisenmangel-Bedingungen nach 88 Stunden ein im Vergleich zum Wildtyp annähernd identisches, relativ geringes Wachstum. Die Supplementierung des Mediums mit FeCl_3 resultierte in einem im Vergleich zur Eisenmangel-Bedingung deutlich verstärkten Wachstum für alle Eisen-ABC-Transportermutanten sowie für den Wildtyp (Abbildung D-9b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keiner der sieben getesteten potentiellen Eisen-ABC-Transporter für die Eisenversorgung von *S. meliloti* Rm1021 essentiell zu sein scheint.

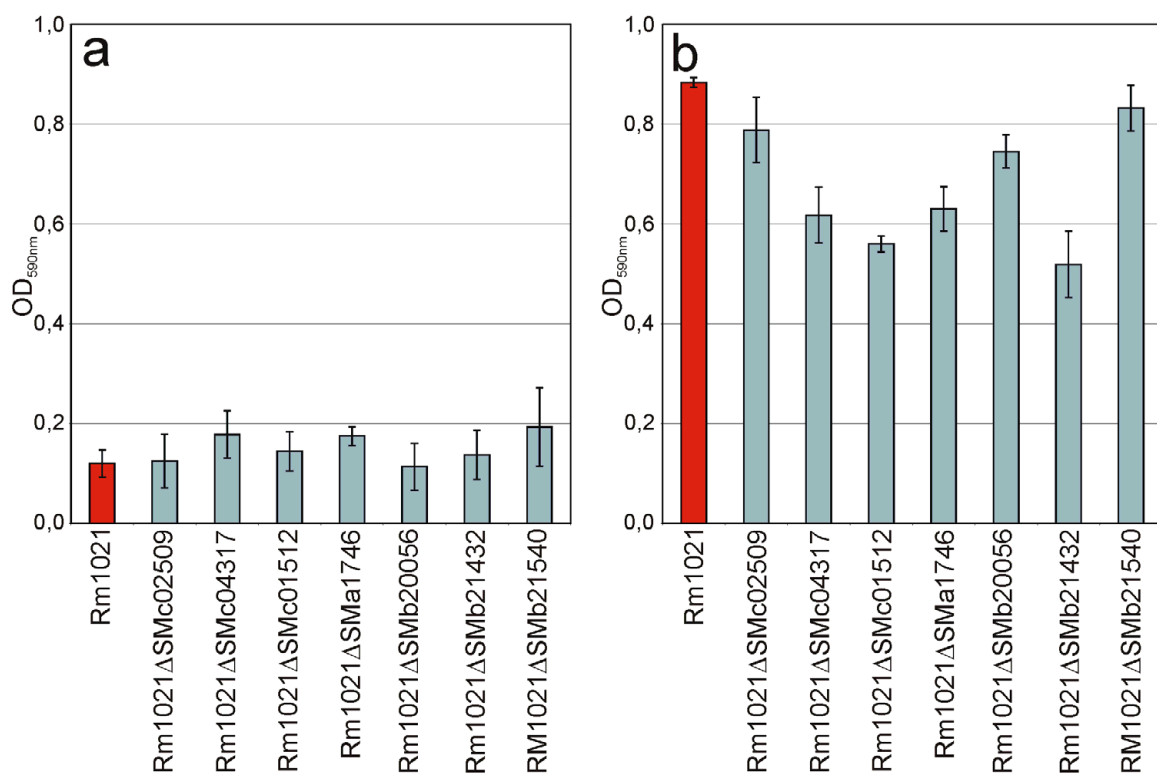


Abbildung D-9 Einfluss des Eisengehalts auf das Wachstum der *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter Mutanten. Die Stämme wurden unter Eisenmangelbedingungen (TY-Medium mit 300 μM 2,2'-Dipyridyl; a) sowie unter Eisen-supplementierten Bedingungen (TY-Medium mit 300 μM 2,2'-Dipyridyl und 30 μM FeCl_3 ; b) angezogen. Das Bakterienwachstum wurde anhand der optischen Dichte nach 88 Stunden ermittelt. Die roten Balken repräsentieren das Wachstum des Wildtyps, während die blauen Balken das Wachstum der Mutanten darstellen. (n=8)

Vier der sieben analysierten Transportermutanten wiesen jedoch unter Eisen-supplementierten Wachstumsbedingungen ein im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziertes Wachstum ($p < 0,5$; T-Test) auf. So resultierten die Mutation im *Ferric*-Typ Transporter Gen-Cluster *smFe-B* (Rm1021 Δ SMc04317) und im *Siderophore/Haem*-Typ Transporter Gen-Cluster *smFe-D* (Rm1021 Δ SMa1746) in einem gegenüber dem Wildtyp um ca. 30 % reduziertem Wachstum. Die Mutationen in *smFe-C* (Rm1021 Δ SMc01512) und *smFe-G* (Rm1021 Δ SMb21432) bewirkten insgesamt die stärkste Wachstumsreduzierung. Beide Stämme erreichten nach 88 Stunden nur ca. 60 % des Wachstums des Wildtyps *S. meliloti* Rm1021. Im Gegensatz dazu war das Wachstum der *Metal*-Typ Transportermutante Rm1021 Δ SMc02509 (*smFe-A*) sowie der *Siderophore/Haem*-Typ Transportermutante Rm1021 Δ SMb20056 (*smFe-E*) und der *Ferric*-Typ Transportermutante Rm1021 Δ SMb21540 (*smFe-H*) nicht signifikant ($p < 0,5$; T-Test) gegenüber dem Wildtyp reduziert.

Anhand der dargestellten Ergebnisse der Wachstumstests scheinen unter Eisen-supplementierten Wachstumsbedingungen vier der sieben analysierten potentiellen Eisen-ABC-Transporter in der Aufnahme von Eisen involviert zu sein, da nur bei Mutanten dieser Transporter ein eisenabhängiger Wachstumsphänotyp nachgewiesen werden konnte. Hierbei handelt es sich mit Ausnahme des *Ferric*-Typ Transporters SMFe-B um die *Siderophore/Haem*-Typ Transporter SMFe-C, SMFe-D und SMFe-G. Die weiteren potentiellen Eisen-ABC-Transporter scheinen unter den gewählten Wachstumsbedingungen keine entscheidende Rolle für die Eisenversorgung frei-lebender *S. meliloti* Rm1021 Zellen zu spielen.

4.3 Die *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transportermutanten weisen keine eingeschränkten Symbioseeigenschaften auf

Bisher wurde die Bedeutung der potentiellen Eisen-ABC-Transporter unter frei-lebenden Bedingungen charakterisiert. Im folgenden Abschnitt soll daher geklärt werden, welche Rolle die potentiellen Eisen-Transporter hinsichtlich der symbiotischen Fähigkeiten von *S. meliloti* Rm1021 haben. Hierzu wurden *M. sativa* Samen mit den bereits vorgestellten Deletionsmutanten der potentiellen Eisen-ABC-Transporter sowie mit dem Wildtyp beimpft, und im Pflanzenschrank inkubiert. Nach einem vierwöchigen Wachstum wurde die Knöllchenzahl pro Pflanze sowie das Frischgewicht der Pflanzen ermittelt. Auf eine Analyse der SMFe-A-Mutante

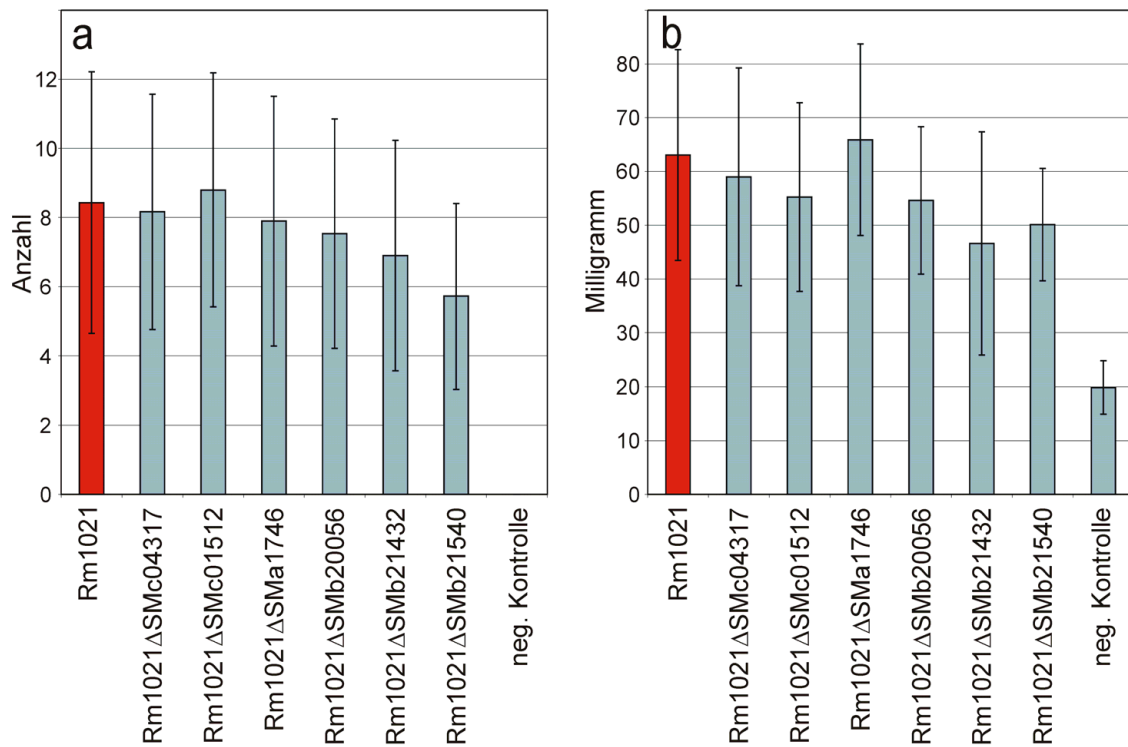


Abbildung D-10 Einfluss der Mutation von einzelnen Eisen-ABC-Transportern auf die Anzahl der Knöllchen (a) sowie auf das Frischgewicht der *M. sativa* Pflanzen (b). Ein unbeimpfter Kontrollansatz diente als negative Kontrolle. Die Pflanzen wurden vier Wochen im Pflanzenschrank inkubiert. Die Daten des Wildtyps sind durch rote Balken dargestellt, während die blauen Balken die Ergebnisse der Mutanten und der neg. Kontrolle repräsentieren. (n=30)

wurde hierbei verzichtet, da bereits gezeigt wurde, dass die Deletion dieses Transportsystems einen schwachen, aber dennoch signifikanten Einfluss auf das Frischgewicht der inokulierten *M. sativa* Pflanzen und die Stickstofffixierungsrate von *S. meliloti* Rm1021 hatte (Chao *et al.*, 2004).

Wie Abbildung D-10 zeigt, waren die Symbioseigenschaften der Eisen-ABC-Transportermutanten mit denen des Wildtyps *S. meliloti* Rm1021 vergleichbar. Sowohl die Anzahl der Knöllchen (Abbildung D-10a), als auch das Frischgewicht (Abbildung D-10b) der mit den Mutanten beimpften Pflanzen wiesen keinen signifikanten Unterschied zu dem Wildtyp-beimpften Ansatz auf.

Eine aufgrund des während der Symbiose gebildeten Leghaemoglobins verursachte rosa Färbung der Knöllchen aller Ansätze, die mit Wildtyp oder Transportermutante beimpft wurden, deutet auf eine aktive Stickstofffixierung der inokulierten Pflanzenansätze. Ein weiteres Indiz für eine intakte Symbiose war das gegenüber dem unbeimpften Kontrollansatz deutlich erhöhte

Frischgewicht der mit Wildtyp und Transportermutanten beimpften Pflanzenansätze. Die Deletion eines putativen Eisen-ABC-Transporters hatte somit keine signifikanten Auswirkungen auf die Symbioseeigenschaften von *S. meliloti* Rm1021.

5 Expressionsanalysen der Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster

Für die Expressionsanalysen der putativen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster wurden PCR-Produkte der jeweiligen Promotor-Regionen gerichtet in den *broad-host-range* Promotor-Test Vektor pJP2 (Prell *et al.*, 2002) vor ein promotorloses *gusA*-Gen kloniert. Eine schematische Darstellung der klonierten Promotorregionen der einzelnen ABC-Transporter Gen-Cluster zeigt Abbildung D-11. Die Nativität der PCR-Produkte wurde anhand ihrer ermittelten Sequenzen bestätigt. Die Expressionsstärke der Promotorregion der potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster wurde anhand der β -Glucuronidaseaktivität der erstellten Transkriptionsfusionen (Tabelle C-2) sowohl quantitativ für frei-lebende Bakterienzellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, als auch qualitativ während der Symbiose ermittelt.

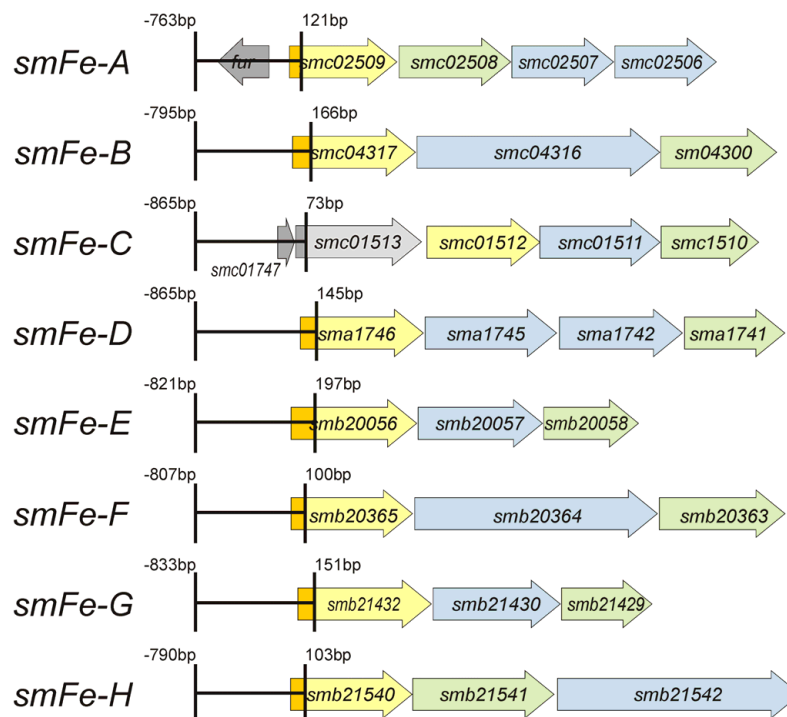


Abbildung D-11 Schematische Darstellung der in den *broad-host-range* Vektor pJP2 klonierten Bereiche der Promotor-Regionen der *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster. Die Zahlen oberhalb der Regionen geben die Position des klonierten PCR-Produkts in Bezug auf den Start des Gens an.

5.1 Eisenmangel bewirkt eine verstärkte Expression der Siderophore/Haem-Typ Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster

Mit Hilfe der erstellten *gusA*-Fusionsplasmide wurde der Einfluss des Eisengehalts im Medium auf die Expression der putativen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster von *S. meliloti* Rm1021 analysiert. Da das Zellwachstum unter den für den Wachstumstest gewählten Eisenmangelbedingungen nicht für die Expressionsanalyse ausreichte, erfolgte die Anzucht der *S. meliloti* Rm1021 zum einen in TY-Komplexmedium mit normalen Eisengehalt (TY) sowie durch die Zugabe von 2,2'-Dipyridyl (TYD) und Conalbumin (TYC) erzeugten Eisenmangel-Bedingungen. Die unter den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ermittelten Expressionsstärken der klonierten Promotorregionen sind in Abbildung D-12 dargestellt.

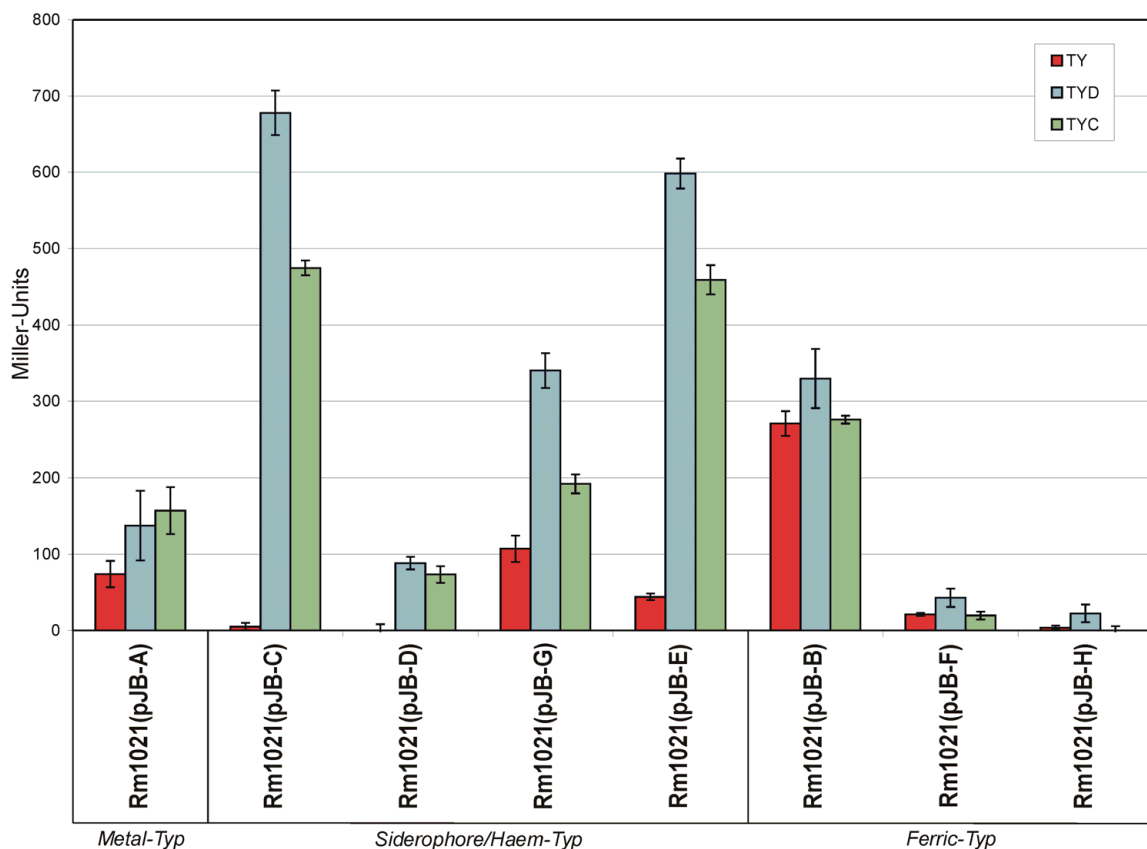


Abbildung D-12 Einfluss von Eisenmangel auf die Expression der potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster von *S. meliloti* Rm1021. Die Expression wurde durch Messung der β -Glucuronidaseaktivität verschiedener *gusA*-Fusionsplasmide tragender *S. meliloti* Rm1021 Stämme ermittelt. Die Stämme wurden unter normalen (TY) und durch Zugabe von 2,2'-Dipyridyl (200 μ M; TYD) sowie Conalbumin (5 μ M, TYC) induzierten Eisenmangel-Bedingungen angezogen.

Allgemein bewirkte Eisenmangel im Medium eine signifikant erhöhte β -Glucuronidaseaktivität der Promotor-*gusA*-Fusionen aller vier *S. meliloti* Rm1021 *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transporter, wohingegen die Expressionsraten der Promotoren der *Metal*- und *Ferric*-Typ Transporter nahezu unbeeinflusst von den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in Komplexmedium waren. Um sekundäre Effekte des eingesetzten 2,2'-Dipyridyls als Grund für die Expressionsunterschiede in beiden Medien auszuschließen, wurde Conalbumin als alternativer Eisenchelator zur Erzeugung von Eisenmangel in TY-Medium eingesetzt. Die hierbei ermittelten Expressionsunterschiede unter normalen Eisenbedingungen und Eisenmangelbedingungen waren mit denen unter Verwendung von 2,2'-Dipyridyl vergleichbar.

Das Wachstum unter Eisenmangelbedingungen bewirkte somit eine erhöhte Expression aller *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transport Gen-Cluster. Ähnlich wie die vergleichenden Wachstumsanalysen der Eisen-ABC-Transportermutanten, deuten somit die Expressionsanalysen auf eine vorherrschende Rolle der *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transporter bei der Eisenversorgung frei-lebender *S. meliloti* Rm1021 Zellen unter Eisenmangelbedingungen hin.

5.2 Die *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster weisen ein substratspezifisches Expressionsprofil auf

Um den Einfluss von spezifischen Eisenquellen auf die Expression der potentiellen Eisen-ABC-Transporter zu ermitteln, erfolgte die Anzucht in Vincent-Minimal-Medium (VMM) mit FeCl_3 als Fe^{3+} -Quelle, FeSO_4 als potentielle Fe^{2+} -Quelle, sowie, aufgrund der Tatsache das *S. meliloti*-Zellen Haem-Verbindungen zur Eisenversorgung nutzen können (Noya *et al.*, 1997), Haemoglobin und Haemin als spezifische Eisenquellen. Da die *S. meliloti* Rm1021 Stämme in VMM mit allen supplementierten spezifischen Eisenquellen ein vergleichbares Wachstum zeigten, ist durch die eingesetzten Konzentrationen der Eisenquellen eine ausreichende Eisenversorgung gewährleistet. Ebenfalls konnte die Produktion von Rhizobactin 1021 anhand des CAS-Tests, als weiterer Hinweis auf potentiellen Eisenmangel, nur nach Wachstum in TYD-Medium, nicht jedoch nach Wachstum in VMM mit den supplementierten spezifischen Eisenquellen nachgewiesen werden (Abbildung D-6). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass

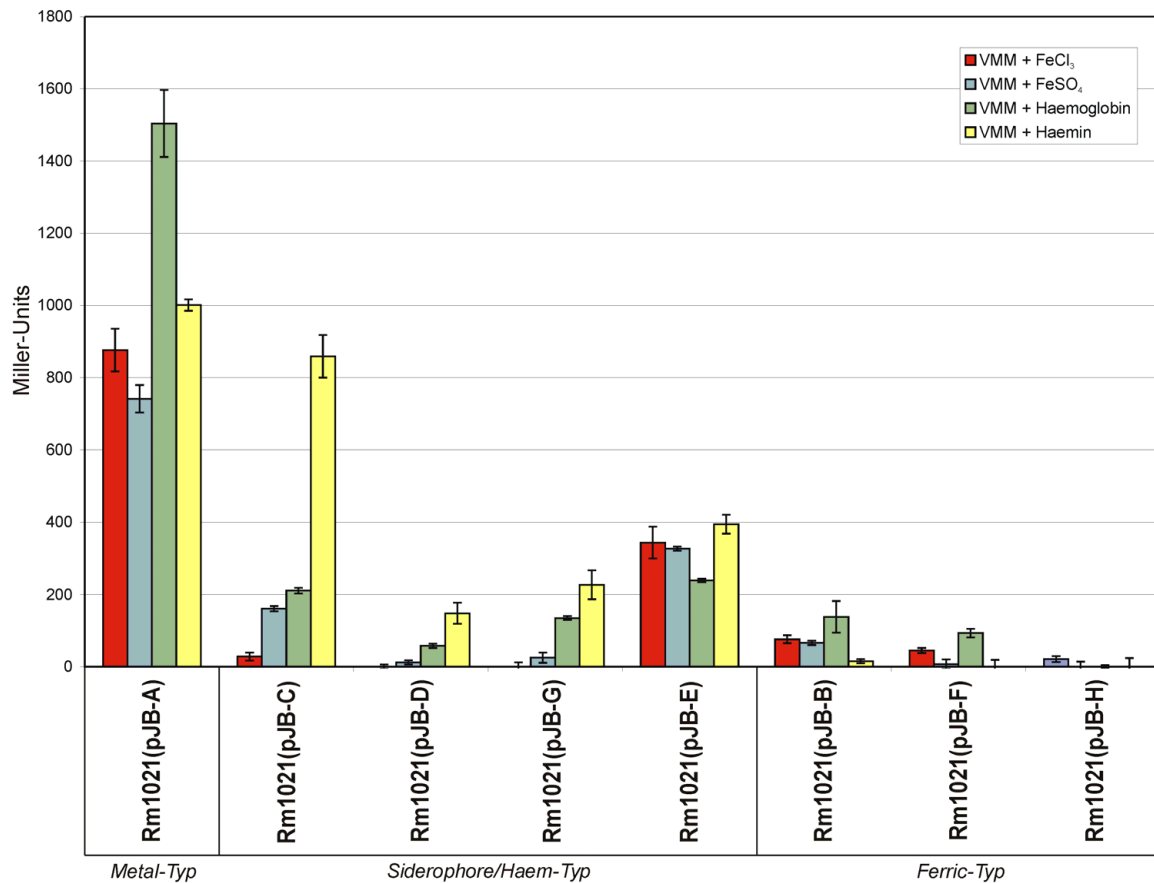


Abbildung D-13 Expressionsmuster der Promotoren der potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die Expression wurde durch Messung der β -Glucuronidaseaktivität verschiedener *gusA*-Fusionsplasmide tragender *S. meliloti* Rm1021 Stämme ermittelt. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit FeCl₃ (VMM+FeCl₃), FeSO₄ (VMM+FeSO₄), Haemoglobin (VMM+Haemoglobin) und Haemin (VMM+Haemin) als spezifische Eisenquellen angezogen.

die ermittelten Expressionsraten in VMM als eine substratspezifische Induktion und nicht als Folge potentiellen Eisenmangels zu betrachten sind. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen sind in Abbildung D-13 zusammengefasst.

Die Expression der Promotoren der *Siderophore/Haem*-Typ Gen-Cluster *smFe-C* und *smFe-D* konnte durch Haemin als alleinige Eisenquelle sehr stark induziert werden, da in diesem Fall die β -Glucuronidaseaktivität von Rm1021(pJB-C) und Rm1021(pJB-D) den höchsten Wert unter allen getesteten Wachstumsbedingungen erreichte. So erreichte die β -Glucuronidaseaktivität des Promotors des *Haem*-Typ Transporters SMFe-C beim Wachstum mit Haemin eine ca. 30 fach höhere Expression als mit FeCl₃. In Minimalmedium zeigte Rm1021(pJB-E) mit allen supplementierten Eisenquellen eine ähnliche β -Glucuronidaseaktivität (240 – 395 Miller-Units). Die Stärke der Aktivität war mit der unter Eisenmangelbedingungen ermittelten

(Abbildung D-13) vergleichbar, sodass die Expression dieses *Siderophore/Haem*-Typ Transporter Gen-Clusters durch alle supplementierten Eisenquellen induziert werden konnte.

Rm1021(pJB-A) zeigte im Gegensatz zur Aktivität in Komplexmedium (Abbildung D-12) eine ca. 10 fach erhöhte Expression, wenn die Zellen in Minimalmedium angezogen wurden. Da die Genprodukte von *smFe-A* überwiegend an der Aufnahme von Mangan beteiligt sind (Chao *et al.*, 2004; Platero *et al.*, 2003), bleibt offen, ob die ermittelte Expression durch die unterschiedlichen spezifischen Eisensubstrate oder durch einen Mangel an Mangan im verwendeten Minimalmedium bewirkt wurde. Jedoch bewirkte Haemoglobin als spezifische Eisenquelle die maximale Expression (1500 Miller-Units) von *smFe-A*.

Innerhalb der Gruppe der *S. meliloti* Rm1021 *Ferric*-Typ ABC-Transporter konnten für die jeweiligen Konstrukte unterschiedliche Expressionsmuster ermittelt werden. Rm1021(pJB-B) zeigte sowohl beim Wachstum in normalen TY-Medium (TY) als auch im eisenreduzierten TY-Medium (TYD und TYC) eine ca. 4-5 fach höhere β -Glucuronidaseaktivität (Abbildung D-12) als beim Wachstum in Minimalmedium mit den supplementierten Eisenquellen. Im Gegensatz dazu, konnte für Rm1021(pJB-F) der maximale Expressionswert (93 Miller-Units) durch Wachstum mit Haemoglobin als spezifische Eisenquelle induziert werden. Die ermittelten β -Glucuronidaseaktivitäten für Rm1021(pJB-H) fielen für alle Wachstumsbedingungen sehr gering aus, was daraufhin deutet, dass keine der getesteten Eisenquellen eine Induktion des *Ferric*-Typ ABC-Transporter Gen-Clusters *smFe-H* bewirkte.

Die vorliegenden Expressionsanalysen belegen, dass die unterschiedlichen potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster von *S. meliloti* Rm1021 ein substratspezifisches Expressionsmuster aufweisen. Es konnte anhand der ermittelten Expressionsmuster gezeigt werden, dass die Anwesenheit von definierten Eisenquellen die Expression spezifischer putativer Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster von frei-lebenden *S. meliloti* Rm1021 Zellen bewirkt.

5.3 *In planta* wird die Mehrheit der potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster von *S. meliloti* Rm1021 exprimiert

Unter frei-lebenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die potentiellen Eisen-ABC-Transporter von *S. meliloti* Rm1021 ein substratspezifisches Expressionsprofil aufweisen. Aufgrund der Tatsache, dass das Knöllchen in Bezug auf den Gehalt und die vorliegende Form

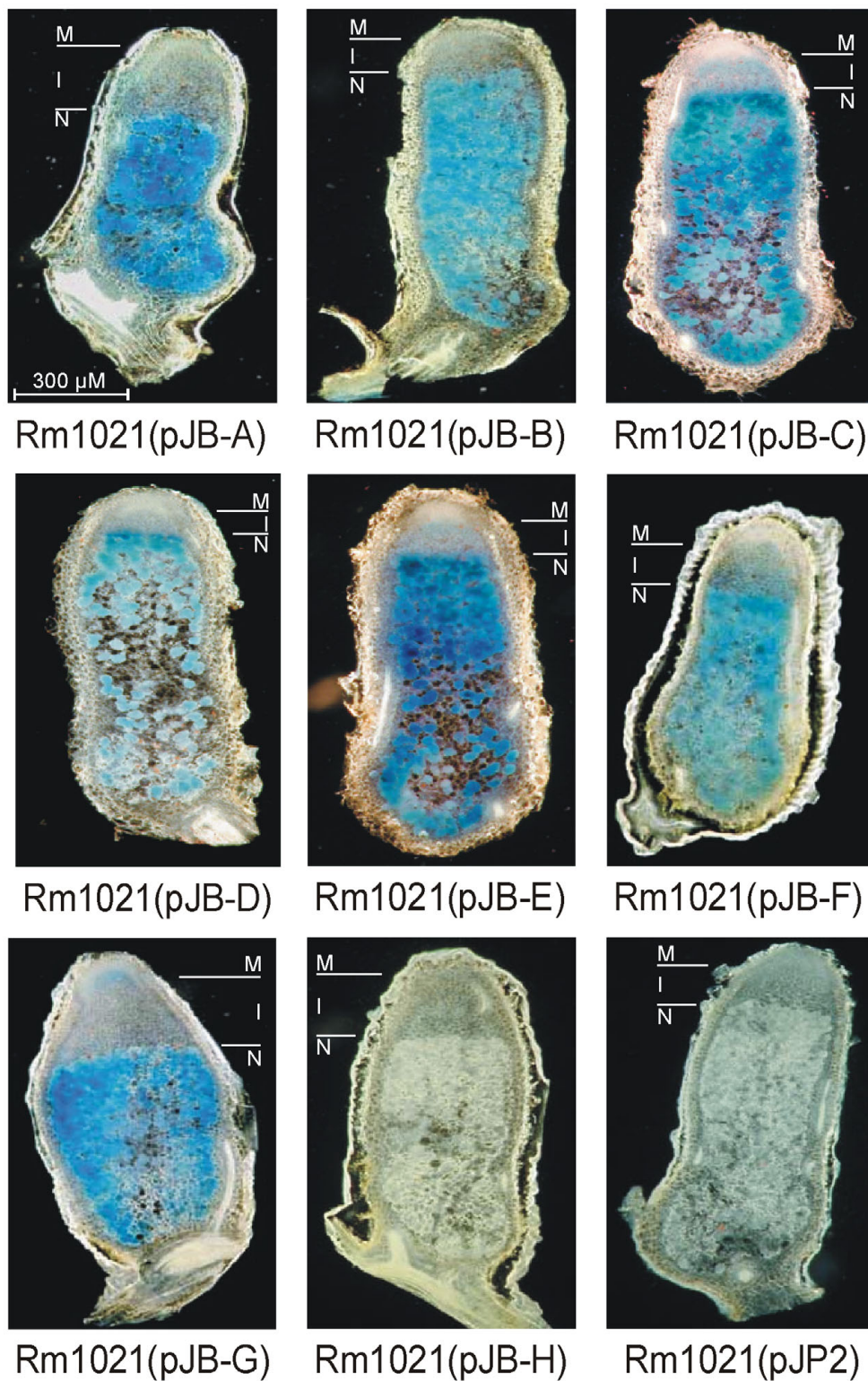


Abbildung D-14 Expression der Promotoren der potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster *in planta*. Die Fotos zeigen X-Gluc gefärbte Dünnschnittschnitte von *Medicago sativa* Wurzelknöllchen, die nach Inokulation der Pflanzen durch verschiedene *gusA*-Fusionsplasmide tragende *S. meliloti* Rm1021 Stämme, geerntet wurden. Abkürzungen: M, Meristem; I, Infektions-Zone; N, stickstofffixierende Zone.

des Eisens sehr komplex ist, wurden ebenfalls Pflanzentest mit den *gusA*-Fusionsplasmiden der Promotorregionen der einzelnen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster durchgeführt. Für sieben der acht potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster konnte nach Anfärbung der Knöllchenschnitte mit X-Gluc eine Expression im Knöllchen nachgewiesen werden (Abbildung D-14). In allen Fällen war die β -Glucuronidaseaktivität auf die stickstofffixierende Zone (N) der Knöllchen begrenzt. Im Meristem (M) sowie in der Infektions-Zone (I) konnte nach der X-Gluc-Färbung keine Aktivität detektiert werden. Der einzige Stamm, der keine signifikante β -Glucuronidaseaktivität im Knöllchen zeigte, war Rm1021(pJB-H). Auch unter frei lebenden Bedingungen bewirkte keine der getesteten Wachstumsbedingungen eine signifikante Expression dieses ABC-Transporter Gen-Clusters (Abbildung D-12 und D-13).

Der Expression von nahezu allen putativen Eisen-ABC-Transporter Gen-Clustern von *S. meliloti* Rm1021 *in planta*, steht somit die unter frei-lebenden Bedingungen in Abhängigkeit von spezifischen Eisenquellen nachgewiesenen Expression einzelner Eisenaufnahme-Systeme (Abbildung D-13) gegenüber. Ebenfalls wurde für frei-lebende *S. meliloti* Rm1021-Zellen gezeigt, dass induzierter Eisenmangel eine erhöhte Expression der *Siderophore/Haem*-Typ Transporter bewirkte (Abbildung D-12). Ob die Expression der potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster *in planta* auf die Verfügbarkeit einer Vielzahl unterschiedlicher Eisensubstrate im Knöllchen zurückzuführen, oder eine Folge von potentiell Eisenmangels ist, bleibt jedoch offen.

6 Eisenmangel bewirkt eine erhöhte Expression der Gene für die Rhizobactin 1021-abhängige Eisenaufnahme von *S. meliloti* Rm1021

Neben den bereits charakterisierten potentiellen ABC-Transportern ist bei der Eisenaufnahme von *S. meliloti* Rm1021 eine Vielzahl an zusätzlichen Proteinen beteiligt. Hierzu zählen neben den Proteinen, die an der Synthese von Siderophoren beteiligt sind, auch die Rezeptoren in der äußeren Membran (IROMPs) und die Komponenten des energieliefernden TonB-ExbB-ExbD-Systems. Bisher wurden im *S. meliloti* Rm1021 Genom die Genen für die Proteine der

Rhizobactin 1021-Biosynthese und der Rezeptoren RhtA (*sma2414*) und ShmR (*smc02726*) charakterisiert (Battistoni *et al.*, 2002b; Lynch *et al.*, 2001). Zusätzlich zu den bereits bekannten Genen, wurden anhand von *blastp*-Homologievergleiche eine Reihe von Genen identifiziert, deren Produkte ebenfalls an der Eisenaufnahme beteiligt sein könnten, da sie signifikante Homologien zu bereits charakterisierten Proteinen anderer Organismen aufweisen. Insgesamt wurden im Genom von *S. meliloti* neben den zwei bekannten Rezeptorgenen sechs weitere Gene für potentielle IROMPs identifiziert. Hierbei handelt es sich um die Gene *sma1747*, *smc02890*, *smc04205*, *smc01657*, *smc01611* und *smc02721*. Des Weiteren wurden die Produkte der Gene *smc01515* (*tonB*), *smc02084* (*exbB*) und *smc02085* (*exbD*) als potentielle Komponenten des TonB-ExbB-ExbD-Systems identifiziert.

Im Rahmen der Arbeiten zur Aufklärung der Eisenaufnahme von *S. meliloti* Rm1021 kristallisierten sich einige standardisierte Wachstumsbedingungen heraus, die geeignet schienen, anhand des etablierte *S. meliloti* Rm1021 Microarrays (Sm6kPCR; Rüberg *et al.*, 2003) eine genomweite vergleichende Expressionsanalyse durchzuführen. Da diese Untersuchungen für das in der Arbeitsgruppe bearbeitete Gebiet von allgemeinem Interesse waren, wurden sie von Victoria Bartelsmeier durchgeführt und die Ergebnisse standen der gesamten Arbeitsgruppe zur spezifischen Auswertung zur Verfügung. Es wurden zwei vergleichende Expressionsanalysen durchgeführt. Zum einen wurde die genomweite Expression nach Wachstum in TY-Komplexmedium mit der nach Wachstum in eisenreduziertem TY-Medium (TYD, 200 μ M 2,2'-Dipyridyl) verglichen. Zum anderen fand eine Untersuchung der genomweiten Expression nach Wachstum in VMM_{0,3} (0,3 mM FeCl₃) und VMM₃₀ (30 mM FeCl₃) statt. Nach Anzucht von *S. meliloti* Rm1021 unter den gewählten Wachstumsbedingungen und der RNA-Isolierung erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der cDNA, die Hybridisierung des Sm6kPCR-Microarrays und die Aufnahme der Rohdaten sowie deren Auswertung. Zur Validierung der Daten wurden für jedes Hybridisierungsexperiment mindestens 3 biologische sowie 2 technische Replikate durchgeführt, deren Daten in einer gemeinsam genutzten Datenbank verwaltet werden.

Die in den Datenbanken vorliegenden Ergebnisse der Array-Hybridisierungen wurden sowohl in Bezug auf die bekannten Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster, als auch auf die zusätzlich identifizierten, potentiell an der Eisenaufnahme beteiligten Gene analysiert. Hierbei wurde die Expression eines Gens als signifikant unterschiedlich gewertet, wenn die für den *S. meliloti* Rm1021-Microarray publizierten Kriterien erfüllt sind (\log -Wert der Intensität (M-Wert) ≥ 1 oder ≤ -1 , die durchschnittliche Intensität (A-Wert) ≥ 8 , der statistischen T-Test $p \leq 0,05$, die Rohdaten sind im Anhang aufgelistete; Rüberg *et al.*, 2003). Abbildung D-15 zeigt den Einfluss des Eisengehalts unterschiedlicher Medien auf die Expression dieser, entsprechend der potentiellen oder bereits nachgewiesenen Funktion ihres Produktes gruppierten, Gene.

Gen-Cluster/Annotation	Gen	relative Expression in		
		TYD vs. TY	VMM _{0,3} vs. VMM ₃₀	
Eisen ABC-Transporter	<i>smFe-A</i>	<i>smc02509</i>	1,43	1,06
		<i>smc02508</i>	1,37	1,47
		<i>smc02507</i>	1,41	1,42
		<i>smc02506</i>	1,42	1,15
	<i>smFe-B</i>	<i>smc04317</i>	-2,92	-2,86
		<i>smc04316</i>	1,06	1,10
		<i>smc04300</i>	-2,64	-1,69
	<i>smFe-C</i>	<i>smc01747</i>	2,86	4,94
		<i>smc01513</i>	8,24	5,23
		<i>smc01512</i>	2,50	2,52
		<i>smc01511</i>	1,24	1,62
		<i>smc01510</i>	-1,31	-1,03
	<i>smFe-D</i>	<i>sma1746</i>	3,88	3,94
		<i>sma1745</i>	1,42	2,13
		<i>sma1742</i>	-1,41	1,66
		<i>sma1741</i>	-1,43	1,04
	<i>smFe-E</i>	<i>smb20056</i>	1,17	1,16
		<i>smb20057</i>	1,26	1,18
		<i>smb20058</i>	1,09	1,31
	<i>smFe-F</i>	<i>smb20365</i>	-1,24	1,23
		<i>smb20364</i>	1,60	1,23
		<i>smb20363</i>	-1,52	n.m.
	<i>smFe-G</i>	<i>smb21432</i>	3,54	1,88
		<i>smb21430</i>	1,15	1,35
		<i>smb21429</i>	-1,06	-1,22
	<i>smFe-H</i>	<i>smb21540</i>	1,33	-1,39
		<i>smb21541</i>	-1,07	-1,22
		<i>smb21542</i>	-1,06	-1,16
Rhizobactin 1021 -Synthese	<i>rhbA</i>	<i>sma2400</i>	36,64	232,25
	<i>rhbB</i>	<i>sma2402</i>	28,90	56,02
	<i>rhbC</i>	<i>sma2404</i>	4,06	20,24
	<i>rhbD</i>	<i>sma2406</i>	8,64	36,95
	<i>rhbE</i>	<i>sma2408</i>	22,20	146,17
	<i>rhbF</i>	<i>sma2410</i>	22,20	83,44
	<i>rhrA</i>	<i>sma2412</i>	3,36	2,63
IROMPs	<i>rhtA</i>	<i>sma2414</i>	15,56	26,41
		<i>sma1747</i>	1,28	1,85
	<i>shmR</i>	<i>smc02726</i>	7,47	15,74
		<i>smc02890</i>	-1,11	-1,05
		<i>smc04205</i>	-1,21	1,43
	<i>fhuA2</i>	<i>smc01657</i>	1,25	1,09
	<i>fhuA1</i>	<i>smc01611</i>	1,02	1,61
	<i>smc02721</i>	1,72	-1,13	
Ton -System	<i>tonB</i>	<i>smc01515</i>	1,15	-1,10
	<i>exbB</i>	<i>smc02084</i>	2,74	2,32
	<i>exbD</i>	<i>smc02085</i>	6,08	3,90

Abbildung D-15 Einfluss des Eisengehalts unterschiedlicher Medien auf die Expression der potentiell an der Eisenaufnahme beteiligten Gene des *S. meliloti* Rm1021 Genoms. Die Gene wurden aufgrund ihrer Homologie zu funktionell bekannten Genen anderer Organismen identifiziert und entsprechend deren Funktion in verschiedene Untergruppen zusammengefasst. Unter Verwendung des genomweiten *S. meliloti* Rm1021-Microarrays wurde die Expression der Gene nach Wachstum in TY-Komplexmedium mit Eisenmangel (TYD) im Vergleich zu normalen Eisenbedingungen (TY), sowie nach Anzucht in Minimalmedium mit 0,3 mM im Vergleich zu 30 mM FeCl₃ analysiert. Die Werte geben die relative Expression der einzelnen Gene unter den gewählten Bedingungen an. Neben den relativen Werten stellen die Farben das Verhältnis der Genexpression dar (Grün: unter Eisenmangel höher exprimiert; Rot unter Eisenmangel schwächer exprimiert; Gelb: kein signifikanter Unterschied; Grau: nicht messbar, n.m.).

Der Eisenmangel in beiden Hybridisierungsexperimenten hatte einen ähnlichen Einfluss auf die Expression der analysierten Gene. So bestätigen die vorliegenden Daten beider Array-Experimente die vorherrschende Rolle der *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transporter bei der Eisenversorgung von frei-lebenden *S. meliloti* Rm1021 Zellen, wie sie bereits die Expressionstudien anhand der *gusA*-Fusionsplasmide und die Wachstumstests der Transportermutanten zeigten. Der induzierte Eisenmangel bewirkte auch hier eine signifikant erhöhte Expression einzelner Gene der *Siderophore/Haem*-Typ Gen-Cluster, während annähernd alle Gene der *Metal*- und *Ferric*-Typ Gen-Cluster in ihrer Expression nicht durch den Eisenmangel beeinflusst waren. Im Gegensatz zu den mittels der *gusA*-Fusionsplasmide ermittelten Expressionswerten waren jedoch zwei Gene des Clusters *smFe-B* unter Eisenmangel schwächer exprimiert als beim Wachstum mit höheren Eisenkonzentrationen im Medium. Ein Vergleich der beiden Ansätze ist jedoch nur bedingt möglich, da den relativen Microarray-Daten die absoluten Werte der β -Glucuronidaseaktivität gegenüber stehen. In welchem Ausmaß die Halbwertszeiten von mRNA und β -Glucuronidase die jeweiligen Ergebnisse beeinflussten, bleibt ebenfalls unklar.

Die besondere Bedeutung der Rhizobactin 1021-abhängigen Eisenaufnahme für frei-lebende *S. meliloti* Rm1021 Zellen wurde dadurch gefestigt, dass gemeinsam mit der erhöhten Expression einiger Gene der *Siderophore/Haem*-Typ Gen-Cluster auch das vollständige Rhizobactin 1021 Synthese-Operon, die Gene für die spezifischen Rezeptoren für Rhizobactin 1021 (*rhtA*) und Haem-Verbindungen (*shmR*) sowie mit *exbB* und *exbD* einzelne Gene für Komponenten des TonB-ExbB-ExbD-Systems in beiden Hybridisierungsexperimenten deutlich stärker unter den jeweiligen Eisenmangelbedingungen exprimiert wurden.

E Diskussion

1 Eine Vielzahl von Eisen-ABC-Transportern ist an der Eisenversorgung von *S. meliloti* Rm1021 beteiligt

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das *S. meliloti* Rm1021 Genom insgesamt acht unterschiedliche potentielle Eisen-ABC-Transporter codiert, die phylogenetisch in einen *Metal*-Typ, drei *Ferric*-Typ und vier *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transporter eingeteilt werden konnten. Bisher wurden genomweite Analysen der Systeme zur Eisenaufnahme nur für pathogene Bakterien durchgeführt. So weist *Haemophilus influenzae*, ähnlich wie *S. meliloti* Rm1021, Eisen-ABC-Transporter jeden Transporter-Typs auf (Köster, 2001). Im Gegensatz dazu, wurde in den Genomen der für Menschen pathogenen Stämme *Mycoplasma genitalum* und *Mycoplasma pneumoniae* kein Eisenaufnahmesystem identifiziert, welches zur Familie der ABC-Transporter gehört, obwohl beide Organismen für ein ausreichendes Wachstum Eisen benötigen (Himmelreich *et al.*, 1997; Himmelreich *et al.*, 1996). Aus der Gruppe der Rhizobien wurden bisher nur von *R. leguminosarum* System zur Eisenaufnahme experimentell charakterisiert. Ähnlich wie bei *S. meliloti* Rm1021 codiert das Genom von *R. leguminosarum* verschiedene Typen von Eisen-ABC-Transportern. Mit SfuABC wurde bisher ein *Ferric*-Typ (Todd *et al.*, 2002) und mit HmuPSTUV (Wexler *et al.*, 2001) sowie FhuABCD (Stevens *et al.*, 1999; Yeoman *et al.*, 2000) wurden zwei *Siderophore/Haem*-Typ Transporter charakterisiert. Die Vielzahl von unterschiedlichen Eisen-ABC-Transportern könnte somit *S. meliloti* Rm1021 eine in Bezug auf die Eisenversorgung erhöhte Kompetitivität gegenüber anderen Bodenbakterien verleihen, wie sie auch für andere frei-lebende Bakterien beschrieben wurde (Loper & Henkels, 1999).

In dieser Arbeit wurde die Beteiligung von vier potentiellen *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transportern an der Eisenaufnahme aufgrund eines reduzierten Wachstums der entsprechenden Mutanten in Abhängigkeit von Eisen, und ihr substratspezifisches Expressionsprofil gezeigt. Hierbei handelt es sich um den *Ferric*-Typ Transporter SMFe-B sowie die *Siderophore/Haem*-Typ Transporter SMFe-C, SMFe-D und SMFe-G. Die Mutanten des *Metal*-Typ Transporters SMFe-A, des *Siderophore/Haem*-Typ Transporters SMFe-E und den *Ferric*-Typ Transportern SMFe-F und SMFe-H wiesen keinen eisenabhängigen Wachstums-Phänotypen auf, so dass die Funktion dieser Transportsysteme nicht aufgeklärt werden konnte. Für den *Metal*-Typ

Transporter SMFe-A konnte jedoch inzwischen eine Funktion in der Mangan-Aufnahme experimentell nachgewiesen werden (Chao *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten stark darauf hin, dass unter Eisenmangelbedingungen die Rhizobactin 1021-abhängige Eisenaufnahme der bevorzugte Mechanismus zur Eisenversorgung frei-lebender *S. meliloti* Rm1021 Zellen ist. So wiesen überwiegend *Siderophore/Haem*-Typ Transportermutanten einen Eisen-abhängigen Wachstumsphänotyp auf, während die Mutanten der weiteren Transporter-Typen mit Ausnahme von SMFe-B nicht beeinflusst waren. Zusätzlich bewirkte ein induzierter Eisenmangel eine erhöhte Expression ausschließlich der *Siderophore/Haem*-Typ Gen-Cluster, des vollständigen Rhizobactin 1021 Synthese-Operons und dem Gen für den spezifischen Rezeptor für Rhizobactin 1021 (*rhtA*). Auch bei *R. leguminosarum* konnte die Expression der *Siderophore/Haem*-Typ Transportsysteme HmuPSTUV und FhuABCD durch Eisenmangel induziert werden (Stevens *et al.*, 1999; Wexler *et al.*, 2001). Gleichfalls zeigten Lynch *et al.*, dass die Anzucht von *S. meliloti* Rm1021 unter Eisenmangel eine verstärkte Produktion von Rhizobactin 1021 bewirkt (Lynch *et al.*, 2001). Bei dem Wildtyp-Isolat *S. meliloti* 220-5 ist die Produktion von Siderophoren ebenfalls durch die Verfügbarkeit von Eisen reguliert (Reigh & O'Connell, 1993). Obwohl die Gene für die Synthese von Rhizobactin 1021 und den spezifischen Rezeptor RhtA bereits detailliert beschrieben wurden (Lynch *et al.*, 2001), konnten spezifische ABC-Transporter für den Transport von *Ferri*-Rhizobactin 1021 durch die Cytoplasmamembran bisher nicht identifiziert werden, sodass der vollständige Mechanismus zur Aufnahme von Rhizobactin 1021 bisher unbekannt ist. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit scheinen aus der Vielzahl der potentiellen Eisen-ABC-Transporter nur wenige Transportsysteme als potentielle Kandidaten für die Rhizobactin 1021-Aufnahme in Frage zu kommen. Bei den Kandidaten handelt es sich um die beiden *Siderophore/Haem*-Typ Transporter SMFe-D und SMFe-G, da für beide Transportsysteme gemeinsam mit den bekannten Genen der Rhizobactin 1021-Synthese und dem spezifischen Rezeptor RhtA eine verstärkte Expression unter Eisenmangel nachgewiesen werden konnte. Eine Beteiligung beider Transporter an der Eisenaufnahme frei-lebender *S. meliloti* Rm1021-Zellen konnte aufgrund des Eisen-abhängigen Wachstumsphänotypen der entsprechenden Mutanten ebenfalls nachgewiesen werden.

Möglicherweise sind die unterschiedlichen *Siderophore/Haem*-Typ Eisen-ABC-Transporter von *S. meliloti* Rm1021 auch an der Aufnahme von exogenen Siderophoren beteiligt, da *S. meliloti* Rm1021, neben der durch Rhizobactin 1021 vermittelten Eisenaufnahme, in der Lage

zu sein scheint, exogene Siderophore zur Eisenversorgung nutzen zu können. Reigh und O'Connell zeigten, dass der *S. meliloti* Stamm 2011 und die Wildtyp-Isolate *S. meliloti* 220-5 und 220-3 jeweils die von den anderen Stämmen produzierten Siderophore nutzen können (Reigh & O'Connell, 1993). Die Nutzung von exogenen Siderophoren scheint jedoch Stammspezifisch zu sein, denn keiner der drei Stämme konnte das von *S. meliloti* DM4 produzierte Siderophor nutzen. Eine Charakterisierung der Siderophore beider Stämme zeigte jedoch eine unterschiedliche chemische Struktur. Bei dem Rhizobactin von *S. meliloti* DM4 handelt es sich um ein Carboxylat (Smith *et al.*, 1985), während Rhizobactin 1021 ein Dihydroxamat darstellt (Persmark *et al.*, 1993).

Im *S. meliloti* Rm1021-Genom codiert das Gen *smc02510* ein Polypeptid mit signifikanter Homologie zu Fur (*Ferric uptake regulator*), dem globalen Regulator der Eisenaufnahme in *E. coli* (Bagg & Neilands, 1987). Die potentiellen *Siderophore/Haem*- und *Ferric*-Typ Transporter von *S. meliloti* Rm1021 scheinen jedoch nicht unter Kontrolle dieses Regulators zu stehen (Chao *et al.*, 2004). Eine Regulation durch Fur konnte jedoch für den an der Manganaufnahme beteiligten *Metal*-Typ Transporter SMFe-A (SitABCD) nachgewiesen werden. Diaz-Mireles *et al.* beschrieben eine ähnliche manganabhängige Regulation durch den Fur-ähnlichen Regulator Mur in *R. leguminosarum* (Diaz-Mireles *et al.*, 2004). Mit *smc00785* wurde im Genom von *S. meliloti* Rm1021 ein Gen mit signifikanter Homologie (77% Identität) zu dem in *R. leguminosarum* charakterisierten Regulator der Eisenaufnahme *rirA* (*rhizobial iron regulator*) identifiziert (Todd *et al.*, 2002). Für *R. leguminosarum* wurde eine Regulation von bekannten, eisenabhängig regulierten Genen der Siderophorproduktion und -aufnahme, sowie Genen für die Aufnahme von Haem-Verbindungen und anderen Eisenquellen durch RirA gezeigt. Aufgrund der hohen Homologie scheint SMc00785 auch ein potentieller Kandidat für die Regulation der Eisenaufnahme in *S. meliloti* Rm1021 zu sein. Jedoch steht eine funktionelle Charakterisierung dieses potentiellen Regulators bei noch aus.

2 Die Beteiligung der unterschiedlichen Eisen-ABC-Transporter an der Eisenversorgung von *S. meliloti* Rm1021 in Symbiose

Bisher ist nur wenig über die Eisenaufnahme von Rhizobien in der Symbiose bekannt. Während bei frei-lebenden Zellen die Expression einzelner Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster durch spezifische Eisenquellen induziert werden kann, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass während der Symbiose die Mehrheit der *S. meliloti* Rm1021 Eisen-ABC-Transporter Gen-Cluster exprimiert werden.

Anhand von *gusA*-Reporter-Gen-Fusionen wurde gezeigt, dass das *Metal*-Typ Transportsystem SMFe-A im Knöllchen exprimiert wird. Die beobachtete Expression von *smFe-A* wurde durch die Arbeiten von Chao *et al.* bestätigt, in denen die spezielle Rolle von SMFe-A (SitABCD) sowohl in Bezug auf die frei-lebenden als auch die symbiotischen Bedingungen charakterisiert wurde (Chao *et al.*, 2004). Ebenso wie für das einzige *Metal*-Typ Transportsystem konnte gezeigt werden, dass alle ABC-Transporter Gen-Cluster der *Siderophore/Haem*-Typ Gruppe während der Symbiose exprimiert werden. Die Expression von *smFe-G* wird durch die Tatsache bestätigt, dass in einer genomweiten Proteom-Analyse das periplasmatische Substratbindeprotein dieses Transporters (SMb21432) in reifen Knöllchen identifiziert wurde (Djordjevic *et al.*, 2003). In einer genomweiten vergleichenden Expressionsanalyse von frei-lebenden, in VMM angezogenen *S. meliloti* Rm1021-Zellen und *S. meliloti* Rm1021-Bakteroiden aus *M. sativa*-Knöllchen, war keines, der für die Komponenten der potentiellen Eisen-ABC-Transporter kodierenden Gene, differentiell exprimiert (Becker *et al.*, 2004). Ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist jedoch nur bedingt möglich, da sich das eingesetzte VMM deutlich in den Konzentrationen der einzelnen Komponenten unterschied.

Ob die *Siderophore/Haem*-Typ ABC-Transporter eine spezifische Rolle für die Eisenversorgung im Knöllchen spielen, konnte bisher nicht geklärt werden. So korreliert die Expression der *Siderophore/Haem*-Typ Transporter im Knöllchen nicht mit Produktion und Aufnahme von Rhizobactin 1021, da weder Transkripte von *rhbB*, involviert in der Synthese von Rhizobactin 1021, noch Transkripte von *rhtA*, dem Gen für den spezifischen Rezeptor, mittels RT-PCR in reifen Knöllchen detektiert wurden (Lynch *et al.*, 2001). Entsprechend wurde gezeigt, dass die Produktion und Aufnahme von Rhizobactin 1021 nicht essentiell für die Nodulation und Stickstofffixierung sind (Gill & Neilands, 1989). Mutanten von *R. leguminosarum* mit einem Defekt in der Aufnahme des endogenen Siderophors Vicibactin

induzierten ebenfalls normale stickstofffixierende Knöllchen an *Pisum sativum* (Stevens *et al.*, 1999).

Obwohl unterschiedliche Studien darauf hindeuten, dass die Sekretion und Aufnahme von Rhizobactin 1021 nicht essentiell für die Nodulation ist, kann unter speziellen Wachstumsbedingungen der Pflanzen die Effizienz der Stickstofffixierung durch Rhizobactin 1021 dennoch beeinflusst werden. So war die Nitrogenaseaktivität von Luzerne-Pflanzen, die mit dem Wildtyp *S. meliloti* Rm1021 inokuliert wurden, deutlich erhöht gegenüber Pflanzen, die mit Rhizobactin 1021-Mutanten inokuliert wurden (Barton *et al.*, 1996; Gill *et al.*, 1991). Wenn die Verfügbarkeit von Eisen für die Bakterien gering war, wiesen *S. meliloti* 242 Mutanten, die nicht in der Lage waren Siderophore zu nutzen, eine gegenüber dem Wildtyp signifikant reduzierte Kompetitivität auf (Battistoni *et al.*, 2002a). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle *Siderophore/Haem*-Typ Transporter Gen-Cluster im Knöllchen exprimiert wurden. Gemeinsam mit den zitierten Studien deuten somit die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die *Siderophore/Haem*-Typ Eisen-ABC-Transporter an der Eisenversorgung von *S. meliloti* Rm1021 während der Symbiose beteiligt sein könnten.

Für die Knöllchen der Sojabohne wurde die Bindung von Fe^{3+} an Siderophor-ähnliche organische Verbindungen im Peribakteroidraum nachgewiesen (Wittenberg *et al.*, 1996). Die während der Symbiose ermittelte Expression der *Siderophore/Haem*-Typ Transporter, könnte hierbei als ein Indiz für die Anwesenheit und die mögliche Aufnahme dieser Verbindungen durch die *S. meliloti* Rm1021-Bakteroide angesehen werden. Jedoch wurde in der Peribakteroidmembran der Sojabohne die Aktivität einer Fe^{3+} Chelat-Reduktase nachgewiesen, die Fe^{2+} zur Verfügung stellen kann, welches nicht durch Siderophore gebunden wird (Levier *et al.*, 1996). Durch Reduktion des durch die Siderophor-ähnlichen Verbindungen chelatierten Eisens kann Fe^{2+} freigesetzt werden, welches auch direkt von den Bakteroiden aufgenommen wird. So wurde gezeigt, dass von *B. japonicum* Bakteroiden deutlich mehr Fe^{2+} als Fe^{3+} aufgenommen wird (Moreau *et al.*, 1998). Jedoch bleibt der Mechanismus zur Aufnahme von Fe^{2+} bisher unklar. Mit SMb20995 codiert *S. meliloti* Rm1021 ein Protein, welches Homologie zu dem aus Enterobakterien bekannten Fe^{2+} -Transporter FeoB (Kammler *et al.*, 1993) aufweist, jedoch sind die Homologien relativ schwach (30% Identität über 145 AS) und funktionelle Nachweise zur Fe^{2+} -Aufnahme durch *S. meliloti* Rm1021 fehlen. In Bezug auf die nachgewiesene Expression aller *S. meliloti* Rm1021 *Siderophore/Haem*-Typ Eisen-ABC-Transporter während der Symbiose, scheint das Modell der Fe^{3+} -Reduzierung mit

anschließender Aufnahme von Fe^{2+} durch die Bakterioide jedoch wenig überzeugend. Vielmehr könnte die direkte Aufnahme der Siderophor-ähnlichen Fe^{3+} -Komplexe aus dem Peribakteroidraum durch die *Siderophore/Haem*-Typ Transporter eine weitere mögliche Variante zur Eisenversorgung der Bakterioide zu sein. Jedoch scheint diese Variante der Eisenversorgung nicht essentiell für die Nodulation zu sein, da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die *Siderophore/Haem*-Typ Transportermutanten zum Wildtyp *S. meliloti* Rm1021 vergleichbare Symbioseigenschaften aufwiesen.

Die Funktion aller bisher bekannten *Siderophore/Haem*-Typ Transporter ist eng mit den TonB-abhängig Rezeptoren in der äußeren Membran gekoppelt. Jedoch hatte die Mutation von *tonB* bei *R. leguminosarum* keinen Einfluss auf die symbiotische Stickstofffixierung (Wexler *et al.*, 2001). Die durch *tonB*-Mutanten von *B. japonicum* induzierten Knöllchen an Sojabohnen wiesen ebenfalls eine zum Wildtyp vergleichbare Fähigkeit zur Symbiose auf (Nienaber *et al.*, 2001). Die in dieser Studie charakterisierten *exbD-tonB*-Deletionsmutanten konnten zwar keine Haem-Verbindungen, aber dennoch das Siderophor Ferrichrome sowie Fe-Citrat als Eisenquellen für ihr Wachstum nutzen, sodass das Vorhandensein einer zweiten Kopie von *tonB* im Genom von *B. japonicum* postuliert und zum Teil bereits durch *Southern-blot*-Hybridisierungen bestätigt wurde (Nienaber *et al.*, 2001). Ein für die Aufnahme von Haem-Verbindungen spezifisches TonB-System ist bei Bakterien keine Besonderheit. So weisen zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio cholerae* zwei, mit zum Teil redundante Funktionen versehene, *tonB*-Gene auf, von denen aber lediglich eine Variante der Aufnahme von Haem-Verbindungen dient (Occhino *et al.*, 1998; Seliger *et al.*, 2001; Zhao & Poole, 2000). Obwohl im Genom von *S. meliloti* Rm1021 insgesamt acht Gene für TonB-abhängige Rezeptoren in der äußeren Membran annotiert wurden, konnte jedoch kein ORF mit eindeutiger Homologie zu bekannten *tonB*-Genen identifiziert werden. Lediglich das Produkt des Gens *smc01515* weist eine schwache Homologie (27 % Identität über 89 AS) zu TonB aus *Brucella melitensis* auf. Für die Beteiligung dieses Gens an der Eisenaufnahme gibt es bisher keine experimentellen Nachweise, sodass über seine Funktion als TonB-Ortholog an dieser Stelle bestenfalls spekuliert werden kann.

Das eisenhaltige Protein Leghaemoglobin kann bis zu 30 % des gesamten löslichen Proteingehalts in stickstofffixierenden Knöllchen ausmachen (Verma & Long, 1983). Bisher konnte nicht nachgewiesen werden, ob diese Eisenquelle im Knöllchen zur Versorgung von *S. meliloti* Rm1021 Bakteroiden genutzt wird. Jedoch können frei-lebende *S. meliloti* Stamm 242

Zellen für ihr Wachstum unterschiedliche Haem-Verbindungen, zu denen auch Leghaemoglobin gehört, als alleinige Eisenquelle nutzen (Noya *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass frei-lebende *S. meliloti* Rm1021-Zellen ebenfalls Haemoglobin und Haemin für eine ausreichende Eisenversorgung während des Wachstums nutzen konnten. Möglicherweise deutet die ermittelte Expression des Aufnahmesystems für Haem-Verbindungen SMFe-C (HmuPSTUV) während der Symbiose an, dass diese Möglichkeit der Eisenversorgung auch im Knöllchen genutzt wird. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass anhand einer genomweiten Proteom-Analyse der Rezeptor für Haem-Verbindungen ShmR in reifen Knöllchen identifiziert wurde (Djordjevic *et al.*, 2003). Ein weiteres Indiz ist die bei frei-lebenden *S. meliloti* Rm1021-Zellen nachgewiesene verstärkte Expression des *smFe-C* Gen-Clusters durch Supplementierung des Minimalmediums mit Haemin. Dennoch hatte die Mutationen des Transporters SMFe-C (HmuPSTUV) keinen Einfluss auf die Symbioseigenschaften der entsprechenden *S. meliloti* Rm1021-Mutante. Die Aufnahme von Haem-Verbindungen durch das Hmu-System scheint somit nicht essentiell für die Nodulation zu sein, da auch die Mutation der orthologen Hmu-Systeme in *R. leguminosarum* und *B. japonicum* keinen Einfluss auf die Stickstofffixierung hatte (Johnston *et al.*, 2001).

Von den drei *S. meliloti* Rm1021 *Ferric*-Typ Gen-Clustern waren *smFe-B* und *smFe-F* im Knöllchen exprimiert. Für *smFe-H* konnte *in planta* keine Expression nachgewiesen werden. Das periplasmatische Substratbindeprotein SMC04317 des potentiellen Transporters SMFe-B wurde ebenfalls anhand der genomweiten Proteom-Analysen in stickstofffixierende Knöllchen identifiziert (Djordjevic *et al.*, 2003). *Ferric*-Typ ABC-Transporter sind vorrangig für den Transport von Fe^{3+} aus tierischen Eisenspeicherproteinen in das Cytoplasma pathogener Bakterien bekannt, jedoch ist im Gegensatz zu den Wirten pathogener Bakterien nur sehr wenig über Eisenspeicherproteine in Knöllchen bekannt. Das pflanzliche Ferritin, ein aus 24 identischen Untereinheiten bestehendes Protein, welches bis zu 4500 Fe-Atome speichern kann (Briat & Lobréaux, 1997), könnte im Knöllchen ebenfalls eine Bedeutung als Eisenreservoir haben. So steigt bei der Nodulation der Sojabohne in frühen Stadien der Gehalt an Ferritin im Knöllchen an, während er in den späten Stadien gleichzeitig mit der Zunahme von Nitrogenaseaktivität und Leghaemoglobin so weit abfällt, bis in reifen Knöllchen Ferritin kaum noch nachzuweisen ist (Bergersen, 1963; Raglan & Theil, 1993). Obwohl in den Knöllchen der Sojabohne für *B. japonicum* Bakterioide nachgewiesen wurde, dass Fe^{2+} in größerem Masse aufgenommen wurde als Fe^{3+} (Moreau *et al.*, 1998), kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit

eine von den *Ferric*-Typ ABC-Transportern vermittelte Aufnahme von Fe^{3+} durch *S. meliloti* Rm1021 Bakterioide nicht ausgeschlossen werden. Jedoch scheint keiner der *Ferric*-Typ Transporter für die Eisenversorgung der Bakterioide essentiell zu sein, da die getesteten *Ferric*-Typ Transportermutanten zum Wildtyp *S. meliloti* Rm1021 vergleichbare Symbioseeigenschaften aufwiesen.

Fasst man die Ergebnisse der bisher publizierten Arbeiten über Eisen-ABC-Transportern anderer Rhizobien mit den Ergebnissen dieser Arbeit zusammen, so hat die Deletion eines einzelnen Eisen-ABC-Transporters keinen Einfluss auf die Nodulationsfähigkeit und die Stickstofffixierung von Rhizobien und ihren spezifischen Wirts-Leguminosen. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass während der Symbiose eine Vielzahl von potentiellen Eisen-ABC-Transporter Gen-Clustern exprimiert war, so dass, ähnlich wie bei frei-lebenden *S. meliloti* Rm1021 Zellen, der Ausfall eines potentiellen Eisen-Aufnahmesystems durch zusätzlich vorhandene Eisen Aufnahmesysteme kompensiert werden konnte. Außerdem scheint es die große Zahl an potentiellen Eisen-ABC-Transportern *S. meliloti* Rm1021 zu ermöglichen, eine Vielzahl von Eisenquellen für eine ausreichende Eisenversorgung unter den speziellen Bedingungen der Symbiose zu nutzen.

F Literatur

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y. S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R. & Andrews, S. C. (1999).** Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**, 1415-1428.
- Adams, M. D. & Oxender, D. L. (1989).** Bacterial periplasmic binding protein tertiary structures. *J Biol Chem* **264**, 15739-15742.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Ames, G. F. (1986).** Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution. *Annu Rev Biochem* **55**, 397-425.
- Ames, G. F. & Lever, J. E. (1972).** The histidine-binding protein J is a component of histidine transport. Identification of its structural gene, hisJ. *J Biol Chem* **247**, 4309-4316.
- Ames, G. F. & Joshi, A. K. (1990).** Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. *J Bacteriol* **172**, 4133-4137.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.
- Angerer, A., Gaisser, S. & Braun, V. (1990).** Nucleotide sequences of the *sfuA*, *sfuB*, and *sfuC* genes of *Serratia marcescens* suggest a periplasmic-binding-protein-dependent iron transport mechanism. *J Bacteriol* **172**, 572-578.
- Archibald, F. S. (1983).** *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* **19**, 29-32.
- Arnold, W., Becker, A., Keller, M., Roxlau, A. & Pühler, A. (1994).** The role of *Rhizobium meliloti* surface polysaccharides in the infection of *Medicago sativa* nodules. *Endocyt Cell Res* **10**, 17-28.
- Bagg, A. & Neilands, J. B. (1987).** Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 5471-5477.
- Bairoch, A. & Apweiler, R. (2000).** The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* **28**, 15-18.
- Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I. & Kondorosi, A. (1981).** Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol Gen Genet* **184**, 318-325.

- Barloy-Hubler, F., Capela, D., Batut, J. & Galibert, F. (2000a).** High-resolution physical map of the pSymb megaplasmid and comparison of the three replicons of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Curr Microbiol* **41**, 109-113.
- Barloy-Hubler, F., Capela, D., Barnett, M. J., Kalman, S., Federspiel, N. A., Long, S. R. & Galibert, F. (2000b).** High-resolution physical map of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 pSymA megaplasmid. *J Bacteriol* **182**, 1185-1189.
- Barnett, M. J., Fisher, R. F., Jones, T., Komp, C., Abola, A. P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Palm, C., Peck, M. C., Surzycki, R., Wells, D. H., Yeh, K. C., Davis, R. W., Federspiel, N. A. & Long, S. R. (2001).** Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9883-9888.
- Barton, L. L., Johnson, G. V., Schitoskey, K. & Wertz, M. (1996).** Siderophore-mediated iron metabolism in growth and nitrogen fixation by alfalfa nodulated with *Rhizobium meliloti*. *J. Plant Nutr* **19**, 1201-1210.
- Bartsevich, V. V. & Pakrasi, H. B. (1995).** Molecular identification of an ABC transporter complex for manganese: analysis of a cyanobacterial mutant strain impaired in the photosynthetic oxygen evolution process. *Embo J* **14**, 1845-1853.
- Bartsevich, V. V. & Pakrasi, H. B. (1996).** Manganese transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **271**, 26057-26061.
- Battistoni, F., Platero, R., Noya, F., Arias, A. & Fabiano, E. (2002a).** Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of *Sinorhizobium meliloti* strains as inocula of alfalfa. *Soil Biol Biochem* **34**, 593-597.
- Battistoni, F., Platero, R., Duran, R., Cervenansky, C., Battistoni, J., Arias, A. & Fabiano, E. (2002b).** Identification of an iron-regulated, hemin-binding outer membrane protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5877-5881.
- Becker, A., Kleickmann, A., Arnold, W. & Pühler, A. (1993).** Analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted endo-b-1,2-1,4 glucanases and ExoH resembles membrane proteins. *Mol Gen Genet* **238**, 145-154.
- Becker, A., Schmidt, M., Jäger, W. & Pühler, A. (1995).** New gentamicin resistance and lacZ promoter-probe cassette suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**, 37-39.
- Becker, A., Rüberg, S., Küster, H., Roxlau, A. A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H. P., Walker, G. C. & Pühler, A. (1997).** The 32 kb *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J Bacteriol* **179**, 735-744.
- Becker, A., Bergés, H., Krol, E., Bruand, C., Rüberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Küster, H., Liebe, C., Pühler, A., Weidner, S. & Batut, J. (2004).** Global Changes in Gene Expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under Microoxic and Symbiotic Conditions. *MPMI* **17**, 292-303.

- Beekmann, S. E., Engler, H. D., Collins, A. S., Canosa, J., Henderson, D. K. & Freifeld, A. (1996).** Rapid identification of respiratory viruses: impact on isolation practices and transmission among immunocompromised pediatric patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **17**, 581-586.
- Bergersen, F. J. (1963).** Iron in the developing soybean nodule. *Aust J Biol Sci* **16**, 916-919.
- Beringer, J. E. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *J Gen Microbiol* **84**, 188-198.
- Berish, S. A., Kapczynski, D. R. & Morse, S. A. (1990).** Nucleotide sequence of the Fbp gene from *Neisseria meningitidis*. *Nucleic Acids Res* **18**, 4596.
- Bishop, I., Agbayane, J. R., Ambudkar, S. V., Maloney, P. C. & Ames, G. F. (1989).** Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6953-6957.
- Boos, W. (1972).** Structurally defective galactose-binding protein isolated from a mutant negative in the -methylgalactoside transport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **247**, 5414-5424.
- Braun, V. & Killmann, H. (1999).** Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**, 104-109.
- Braun, V., Hantke, K. & Koster, W. (1998).** Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst* **35**, 67-145.
- Brewin, N. J. (1991).** Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 191-226.
- Briat, J. F. & Lobréaux, S. (1997).** Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci* **2**, 187-193.
- Buendia, A. M., Enenkel, B., Köplin, R., Niehaus, K., Arnold, W. & Pühler, A. (1991).** The *Rhizobium meliloti* *exoZ/exoB* fragment of Megaplasmid 2: ExoB functions as a UDP-glucose-4'-epimerase and ExoZ shows homology to NodX of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viviae* strain TOM. *Mol Microbiol* **5**, 1519-1530.
- Burkhardt, B., Burkhardt, H. J. & Pühler, A. (1987).** Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. *Plasmid* **17**, 13-25.
- Byers, B. R. & Arceneaux, J. E. L. (1998).** Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganism. *Metal Ions In Biological Systems* **35**, 37-66.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gatius, M. T., Gouzy, J. & Galibert, F. (1999).** A high-density physical map of *Sinorhizobium meliloti* 1021 chromosome derived from bacterial artificial chromosome library. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9357-9362.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry, M., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss, E., Lelaure, V., Masuy, D., Pohl, T., Portetelle, D., Pühler, A., Purnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thebault, P., Vandenbol, M., Weidner, S. & Galibert, F. (2001).** Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9877-9882.

- Casadeus, J. & Olivares, J. (1979).** Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol Gen Genet* **174**, 203-209.
- Castillo, M., Flores, M., Mavingui, P., Martínez-Romano, E., Palacios, R. & Hernandez, G. (1999).** Increase in alfalfa nodulation, nitrogen, fixation and plant growth by specific DNA amplification in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2716-2722.
- Chao, T., Becker, A., Buhrmester, J., Pühler, A. & Weidner, S. (2004).** The *Sinorhizobium meliloti* fur gene regulates in dependence of Mn(II) the transcription of the sitABCD operon encoding a metal type transporter. *J Bacteriol* **186**, 3609-3620.
- Charles, T. C. & Finan, T. M. (1990).** Genetic map of *Rhizobium meliloti* megaplasmid pRmeSU47b. *J Bacteriol* **172**, 2469-2476.
- Chin, N., Frey, J., Chang, C. F. & Chang, Y. F. (1996).** Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **143**, 1-6.
- Claverys, J. P. (2001).** A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res Microbiol* **152**, 231-243.
- Crichton, R. R. & Charloreaux-Wauters, M. (1987).** Iron transport and storage. *Eur J Biochem* **164**, 485-506.
- Dammann-Kalinowski, T., Niemann, S., Keller, M., Selbitschka, W., Tebbe, C. C. & Pühler, A. (1996).** Characterization of two bioluminescent *Rhizobium meliloti* strains constructed for field releases. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**, 509-512.
- Dassa, E. & Hofnung, M. (1985).** Sequence of Gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *Embo J* **4**, 2287-2293.
- Davidson, A. L. & Nikaido, H. (1990).** Overproduction, solubilization and reconstitution of the maltose transport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**, 4254-4260.
- Day, D. A., Kaiser, B. N., Thomson, R., Udvardi, M. K., Moreau, S. & Puppo, A. (2001).** Nutrient transport across symbiotic membranes from legume root nodules. *Aust J Plant Physiol* **82**, 588-590.
- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. & Mujer, C. V. (2002).** The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* **90**, 587-592.
- Dénarié, J. F., F., D. & Rosenberg, C. (1992).** Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol* **46**, 497-531.
- Diaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J. D. & Johnston, A. W. (2004).** The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* **150**, 1447-1456.

- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C. & Claverys, J. P. (1997).** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* **25**, 727-739.
- Djordjevic, M. A., Chen, H. C., Natera, S., Van Noorden, G., Menzel, C., Taylor, S., Renard, C., Geiger, O. & Weiller, G. F. (2003).** A global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium meliloti*: discovery of new genes for nodule occupancy and stress adaptation. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 508-524.
- Dugourd, D., Martin, C., Rioux, C. R., Jacques, M. & Harel, J. (1999).** Characterization of a periplasmic ATP-binding cassette iron import system of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *J Bacteriol* **181**, 6948-6957.
- Earhart, C. F. (1996).** Uptake and metabolism of iron and molybdenum. *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology 2nd edn ASM Press Washington*, 1075-1090.
- Eckhardt, T. (1978).** A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588.
- Ehrmann, M., Ehrle, R., Hoffmann, E., Boos, W. & Schlösser, A. (1998).** The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol* **29**, 685-694.
- Emery, T. (1991).** Iron and Your Health. *CRC Press, Boca Raton, Florida*.
- Engelke, T. D., FJording, D., Kapp, D. & Pühler, A. (1989).** Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* *dctA* gene encoding the C4-dicarboxylate carrier. *J Bacteriol* **171**, 5551-5560.
- Fecker, L. & Braun, V. (1983).** Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **156**, 1301-1314.
- Fett, J. P., LeVier, K. & Guerinot, M. L. (1998).** Soil microorganisms and iron uptake by higher plants. *Met Ions Biol Syst* **35**, 187-214.
- Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorhölter, F. J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. & Pühler, A. (2001).** The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9889-9894.
- Fisher, R. F. & Long, S. (1992).** *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
- Fontecave, M., Coves, J. & Pierre, J. L. (1994).** Ferric reductases or flavin reductases? *Biomaterials* **7**, 3-8.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. & Batut,**

- J. (2001).** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672.
- Genco, C. A. & Desai, P. J. (1996).** Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol* **4**, 179-184.
- Gill, P. R., Barton, L. L., Scoble, M. D. & Neilands, J. B. (1991).** A high affinity iron transport system of *Rhizobium meliloti* may be required for efficient nitrogen fixation *in planta*. *Plant Soil* **130**, 211-217.
- Gill, P. R., Jr. & Neilands, J. B. (1989).** Cloning a genomic region required for a high-affinity iron-uptake system in *Rhizobium meliloti* 1021. *Mol Microbiol* **3**, 1183-1189.
- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J. P. & Dudler, R. (1988).** Evidence for high affinity binding-protein-dependent-transport systems in Gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *Embo J* **7**, 3971-3974.
- Glazebrook, J., Meiri, J. & Walker, G. (1992).** Genetic mapping of symbiotic loci on the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol Plant Microbe Interact* **5**, 223-227.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorllo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. & Slater, S. (2001).** Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2323-2328.
- Gorbulew, S., Abele, R. & Tampe, R. (2001).** Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3732-3737.
- Göttfert, M. (1993).** Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol Rev* **104**, 269-275.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645-4649.
- Guerinot, M. L. (1994).** Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**, 743-772.
- Hardham, J. M., Stamm, L. V., Porcella, S. F., Frye, J. G., Barnes, N. Y., Howell, J. K., Mueller, S. L., Radolf, J. D., Weinstock, G. M. & Norris, S. J. (1997).** Identification and transcriptional analysis of a *Treponema pallidum* operon encoding a putative ABC transport system, an iron-activated repressor protein homolog, and a glycolytic pathway enzyme homolog. *Gene* **197**, 47-64.
- Harrison, P. M. & Lilley, T. H. (1989).** Ferritin. *Iron Carriers and Proteins, New York: VCH Publishers*, 123-238.
- Higgins, C. F. (1992).** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.

- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Whalley, K. & Jamieson, D. J. (1985).** Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems. *Embo J* **4**, 1033-1040.
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P. C., Gill, D. R. & Downie, J. A. (1986).** A family of related ATP binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**, 448-450.
- Hiles, I. D., Gallagher, M. P., Jamieson, D. J. & Higgins, C. F. (1987).** Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **195**, 125-142.
- Himmelreich, R., Plagens, H., Hilbert, H., Reiner, B. & Herrmann, R. (1997).** Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res* **25**, 701-712.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B. C. & Herrmann, R. (1996).** Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **24**, 4420-4449.
- Honeycutt, R. J., McClelland, M. & Sobral, B. W. S. (1993).** Physical Map of the Genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol* **175**, 6945-6952.
- Horton, R. M., Cai, Z. L., Ho, S. N. & Pease, L. R. (1990).** Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**, 528-535.
- Huguet, T., Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., de Lajudie, P., Jouanin, L., Batut, J., Boistard, P., Julliot, J. S. & Denarie, J. (1983).** Studies on *Rhizobium meliloti* plasmids and their role in the control of nodule formation and nitrogen fixation: the pSym megaplasmids and other large plasmids. *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*, Springer-Verlag, Berlin, 35-45.
- Ish-Horowitz, D. & Burke, J. F. (1981).** Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**, 2989-2998.
- Johnston, A. W., Yeoman, K. H. & Wexler, M. (2001).** Metals and the rhizobial-legume symbiosis--uptake, utilization and signalling. *Adv Microb Physiol* **45**, 113-156.
- Jordan, D. C. (1984).** Family III. Rhicobiaceae CONN 1983. *Krieg, N.R., Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore*, 234-254.
- Kaiser, B. N., Moreau, S., Castelli, J., Thomson, R., Lambert, A., Bogliolo, S., Puppo, A. & Day, D. A. (2003).** The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *The Plant Journal* **35**, 295-304.
- Kammler, M., Schon, C. & Hantke, K. (1993).** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 6212-6219.

- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. & Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* **9**, 189-197.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**, 331-338.
- Kashiwagi, K., Endo, H., Kobayashi, H., Takio, K. & Igarashi, K. (1995). Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. ATP hydrolysis by PotA protein and its association with membrane. *J Biol Chem* **270**, 25377-25382.
- Kerppola, R. E., Shyamala, U. K., Klebba, P. & Ames, G. F. (1991). The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. *J Biol Chem* **266**, 9857-9865.
- Klebba, P. E., Rutz, J. M., Liu, J. & Murphy, C. K. (1993). Mechanisms of TonB-catalyzed iron transport through the enteric bacterial cell envelope. *J Bioenerg Biomembranes* **25**.
- Ko, M. P., Huang, P.-U., Huang, J.-S. & Barker, J. R. (1987). *Plant Physiol* **83**, 299-305.
- Köster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**, 291-301.
- Lafontaine, E. R. & Sokol, P. A. (1998). Effects of iron and temperature on expression of the *Pseudomonas aeruginosa* tolQRA genes: role of the ferric uptake regulator. *J Bacteriol* **180**, 2836-2841.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, C., Truchet, G. P., Promé, J. C. & Dénarié, J. F. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Levier, K., Day, D. A. & Guerinot, M. L. (1996). Iron uptake by symbiosomes from soybean nodules. *Plant Physiol* **111**, 893-900.
- Loper, J. E. & Henkels, M. D. (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5357-5363.
- Lynch, D., O'Brien, J., Welch, T., Clarke, P., Cuiv, P. O., Crosa, J. H. & O'Connell, M. (2001). Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **183**, 2576-2585.
- Massover, W. H. (1993). Ultrastructure of ferritin and apoferritin: a review. *Micron* **24**, 389-437.
- Meade, H. M. & Signer, E. R. (1977). Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 2076-2078.

- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkum, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982).** Physical and genetical characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**, 114 -122.
- Mietzner, T. A., Tencza, S. B., Adhikari, P., Vaughan, K. G. & Nowalk, A. J. (1998).** Fe(III) periplasm-to-cytosol transporters of gram-negative pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **225**, 113-135.
- Mimmack, M. L., Gallagher, M. P., Hyde, S. C., Pearce, S. R., Booth, I. R. & Higgins, C. F. (1989).** Energy-coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: Stoichiometry of ATP hydrolysis during transport. *J Biol Chem* **258**, 13665-13672.
- Moeck, G. S. & Coulton, J. W. (1998).** TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**, 675-681.
- Moreau, S., Meyer, F. & Puppo, A. (1995).** Uptake of iron by symbiosomes and bacteroids from soybean nodules. *FEBS Lett* **361**, 225-228.
- Moreau, S., Day, D. A. & Puppo, A. (1998).** Ferrous iron is transported across the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta* **207**, 83-87.
- Morrison, D. A. (1977).** Transformation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **132**, 3449-3510.
- Neilands, J. B. (1993).** Siderophores. *Arch Biochem Biophys* **302**, 1-3.
- Neu, H. C. & Heppel, L. A. (1965).** The Release of Enzymes from *Escherichia coli* by Osmotic Shock and during the Formation of Spheroplasts. *J Biol Chem* **240**, 3685-3692.
- Newcomb, W. (1981).** Nodule morphogenesis and differentiation. *Int Rev Cytol Suppl* **13**, 246-298.
- Nienaber, A., Hennecke, H. & Fischer, H. M. (2001).** Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* **41**, 787-800.
- Noya, F., Arias, A. & Fabiano, E. (1997).** Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. *J Bacteriol* **179**, 3076-3078.
- Occhino, D. A., Wyckoff, E. E., Henderson, D. P., Wrona, T. J. & Payne, S. M. (1998).** *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol Microbiol* **29**, 1493-1507.
- Ochsner, U. A., Johnson, Z. & Vasil, M. L. (2000).** Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146** (Pt 1), 185-198.
- O'Hara, G. W., Dilworth, M. J., Boonkerd, N. & Parkpian, P. (1988).** Iron deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *New Phytol* **108**, 51-57.
- Pardee, A. B. (1968).** Membrane transport proteins. Proteins that appear to be parts of membrane transport systems are being isolated and charcterized. *Science* **162**, 632-637.

- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L. M., Beanan, M. J., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Nelson, W. C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S. E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S. R., White, O., Salzberg, S. L., Hoover, D. L., Lindler, L. E., Halling, S. M., Boyle, S. M. & Fraser, C. M. (2002).** The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13148-13153.
- Pearce, S. R., Mimmack, M. L., Gallagher, M. P., Gileadi, U. & Hyde, S. C. (1992).** Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, of the oligonucleotide permease of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **6**, 47-57.
- Persmark, M., Pittmann, P., Buyer, J. S., Schwyn, B., Gill, P. R. & Neilands, J. B. (1993).** Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3950-3956.
- Peters, N. K., Frost, J. W. & Long, S. R. (1986).** A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**, 977-980.
- Petronilli, V. & Ames, G. F. (1991).** Binding protein-independent histidine permease mutants. *J Biol Chem* **266**, 16293-16296.
- Pierre, J. L., Fontecave, M. & Crichton, R. R. (2002).** Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals* **15**, 341-346.
- Platero, R. A., Jauregui, M., Battistoni, F. J. & Fabiano, E. R. (2003).** Mutations in *sitB* and *sitD* genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 65-70.
- Posey, J. E. & Gherardini, F. C. (2000).** Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**, 1651-1653.
- Postle, K. (1993).** TnB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomembranes* **25**, 591-601.
- Prell, J., Boesten, B., Poole, P. & Priefer, U. B. (2002).** The *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae VF39 gamma-aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. *Microbiology* **148**, 615-623.
- Prossnitz, E., Nikaido, K., Ulbrich, S. & Ames, G. F. (1988).** Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **263**, 17917-17920.
- Qian, Y., Lee, J. H. & Holmes, R. K. (2002).** Identification of a DtxR-regulated operon that is essential for siderophore-dependent iron uptake in *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **184**, 4846-4856.
- Quioco, F. A. (1990).** Atomic structures of periplasmic binding proteins and the high affinity active transport systems in bacteria. *Philos Trans R Soc London Ser B* **326**, 341-351.

- Raglan, M. & Theil, E. C. (1993).** Ferritin (mRNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Mol Biol* **21**, 555 - 560.
- Rai, R., Singh, S. N. & Prasad, V. (1982).** *J Plant Nutr* **5**, 905-913.
- Rai, R., Prasad, V., Choudhury, S. K. & Sinha, N. P. (1984).** *J Plant Nutr* **7**, 399-405.
- Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000).** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881-941.
- Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Wong, C. M., Dilworth, M. J. & Glenn, A. R. (1998).** The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology* **144** (Pt 12), 3335-3342.
- Reigh, G. & O'Connell, M. (1993).** Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **175**, 94-102.
- Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M. & Shine, J. (1980).** Rapid Screening for symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* and white clover. *Plant Sci Lett* **19**, 277-284.
- Rouf, M. A. (1964).** Spectrochemical analysis of inorganic elements in bacteria. *J Bacteriol* **88**, 1545-1549.
- Rüberg, S., Tian, Z. X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Pühler, A., Weidner, S. & Becker, A. (2003).** Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* genome microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol* **106**, 255-268.
- Sack, J. S., Saper, M. A. & Quijcho, F. A. (1989).** Periplasmic binding protein structure and function: refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine binding protein and its complex with leucine. *J Mol Biol* **206**, 171-191.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saken, E., Rakin, A. & Heesemann, J. (2000).** Molecular characterization of a novel siderophore-independent iron transport system in *Yersinia*. *Int J Med Microbiol* **290**, 51-60.
- Saurin, W., Hofnung, M. & Dassa, E. (1999).** Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* **48**, 22-41.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Schmitt, M. P., Talley, B. G. & Holmes, R. K. (1997).** Characterization of lipoprotein IRP1 from *Corynebacterium diphtheriae*, which is regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. *Infect Immun* **65**, 5364-5367.

- Schneider, E. (2000).** ABC-Transporter: Eine Proetinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chemie in unserer Zeit* **34**, 90-97.
- Schryers, A. & Stojiljkovic, I. (1999).** Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **32**, 1117-1123.
- Schubert, S., Fischer, D. & Heesemann, J. (1999).** Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. *J Bacteriol* **181**, 6387-6395.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47-56.
- Seliger, S. S., Mey, A. R., Valle, A. M. & Payne, S. M. (2001).** The two TonB systems of *Vibrio cholerae*: redundant and specific functions. *Mol Microbiol* **39**, 801-812.
- Shea, C. M. & Mcintosh, M. A. (1991).** Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport-system - homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**, 1415-1428.
- Shuman, H. A. & Silhavy, T. J. (1981).** Identification of the *malK* gene product. *J Biol Chem* **256**, 560-562.
- Shuman, H. A., Silhavy, T. J. & Beckwith, J. R. (1980).** Labeling of proteins with beta-galactosidase. Identification of a cytoplasmic membrane component of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J Biol Chem* **255**, 168-174.
- Simon, R., Prierer, U. B. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**, 784 - 791.
- Simon, R., Prierer, U. B. & Pühler, A. (1986).** Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **118**, 640-659.
- Simon, R., Quandt, J. & Klipp, W. (1989).** New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* **80**, 161-169.
- Smit, G., Swart, G. S., Lugtenberg, B. J. J. & Kijne, J. (1992).** Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol* **6**, 2897-2903.
- Smith, M. J., Shoolery, J. N., Schwyn, B., Holden, I. & Neilands, J. B. (1985).** Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. *Journal of the American Chemical Society* **107**, 1739-1743.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973).** Numerical Taxonomy. *W.H. Freeman and Company, San Francisco* **230-234**.
- Staudenmaier, H., Van Hove, B., Yaraghi, Z. & Braun, V. (1989).** Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**, 2626-2633.

- Stevens, J. B., Carter, R. A., Hussain, H., Carson, K. C., Dilworth, M. J. & Johnston, A. W. (1999).** The *fhu* genes of *Rhizobium leguminosarum*, specifying siderophore uptake proteins: *fhuDCB* are adjacent to a pseudogene version of *fhuA*. *Microbiology* **145** (Pt 3), 593-601.
- Stintzi, A., Barnes, C., Xu, L. & Raymond, K. N. (2000).** Microbial iron transport via a siderophore shuttle: A membrane ion transport paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 10691-10696.
- Stojiljkovic, I., Cobeljic, M. & Hantke, K. (1993).** *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett* **108**, 111-115.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. & Olson, M. V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Tang, C., Robson, A. D. & Dilworth, M. J. (1990).** The Role of Iron in Nodulation and Nitrogen Fixation in *Lupinus angustifolius* L. *New Phytol* **114**, 173-182.
- Theil, E. C. & Hase, T. (1993).** Plant and microbial ferritins. *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms New York: Academic press*, 133-157.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (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.
- Todd, J. D., Wexler, M., Sawers, G., Yeoman, K. H., Poole, P. S. & Johnston, A. W. (2002).** *RirA*, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **148**, 4059-4071.
- Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1985).** Genetic evidence for substrate and binding protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J Bacteriol* **163**, 654-660.
- Truchet, G. P., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J. C. & Dénarié, J. F. (1991).** Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *R. meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**, 670-673.
- Tsolis, R. M., Baumler, A. J., Heffron, F. & Stojiljkovic, I. (1996).** Contribution of TonB- and FeoB-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* **64**, 4549-4556.
- Turgeon, B. G. & Bauer, W. D. (1985).** Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta*.
- Udvardi, M. K. & Day, D. A. (1997).** Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 493-523.

- Van Berkum, P. & Eardly, B. D. (1998).** Molecular evolutionary systematics of the rhizobiaceae. *The rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria*. Spaink, H.D., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. (Eds.). Kluwer academic press, Netherlands.
- van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. (1995).** The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol Rev* **59**, 124-142.
- Vasil, M. L. & Ochsner, U. A. (1999).** The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**, 399-413.
- Velayudhan, J., Hughes, N. J., McColm, A. A., Bagshaw, J., Clayton, C. L., Andrews, S. C. & Kelly, D. J. (2000).** Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transport. *Mol Microbiol* **37**, 274-286.
- Verma, D. S. P. & Long, S. (1983).** The molecular biology of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Int. Rev. Cytol.* **14**, 211-245.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, J. M. & Gay, N. J. (1982).** Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-951.
- Wandersman, C. & Stojilkovic, I. (2000).** Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**, 215-220.
- Weinberg, E. D. (1997).** The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* **40**, 578-583.
- Werner, D. (1987).** Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*.
- Werner, E., Holder, A. A. & Hoheisel, J. D. (1997).** Growth and storage of YAC-clones on Hogness Freezing Medium. *Nucleic Acids Res* **25**, 1467-1468.
- Wexler, M., Yeoman, K. H., Stevens, J. B., de Luca, N. G., Sawers, G. & Johnston, A. W. (2001).** The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. *Mol Microbiol* **41**, 801-816.
- Wipat, A., Brignell, S. C., Guy, B. J., Rose, M., Emmerson, P. T. & Harwood, C. R. (1998).** The *yvsA-yvqA* (293 degrees-289 degrees) region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing genes involved in metal ion uptake and a putative sigma factor. *Microbiology* **144** (Pt 6), 1593-1600.
- Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A., Day, D. A., Udvardi, M. K. & Appleby, C. A. (1996).** Siderophore-bound iron in the peribacteroid space of soybean root nodule. *Plant Soil* **178**.
- Wyckoff, E. E., Valle, A. M., Smith, S. L. & Payne, S. M. (1999).** A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *J Bacteriol* **181**, 7588-7596.
- Yeoman, K. H., Wisniewski-Dye, F., Timony, C., Stevens, J. B., deLuca, N. G., Downie, J. A. & Johnston, A. W. (2000).** Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains. *Microbiology* **146** (Pt 4), 829-837.

Zhao, Q. & Poole, K. (2000). A second *tonB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the *exbB* and *exbD* genes. *FEMS Microbiol Lett* **184**, 127-132.

Zhou, D., Hardt, W. D. & Galan, J. E. (1999). *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**, 1974-1981.

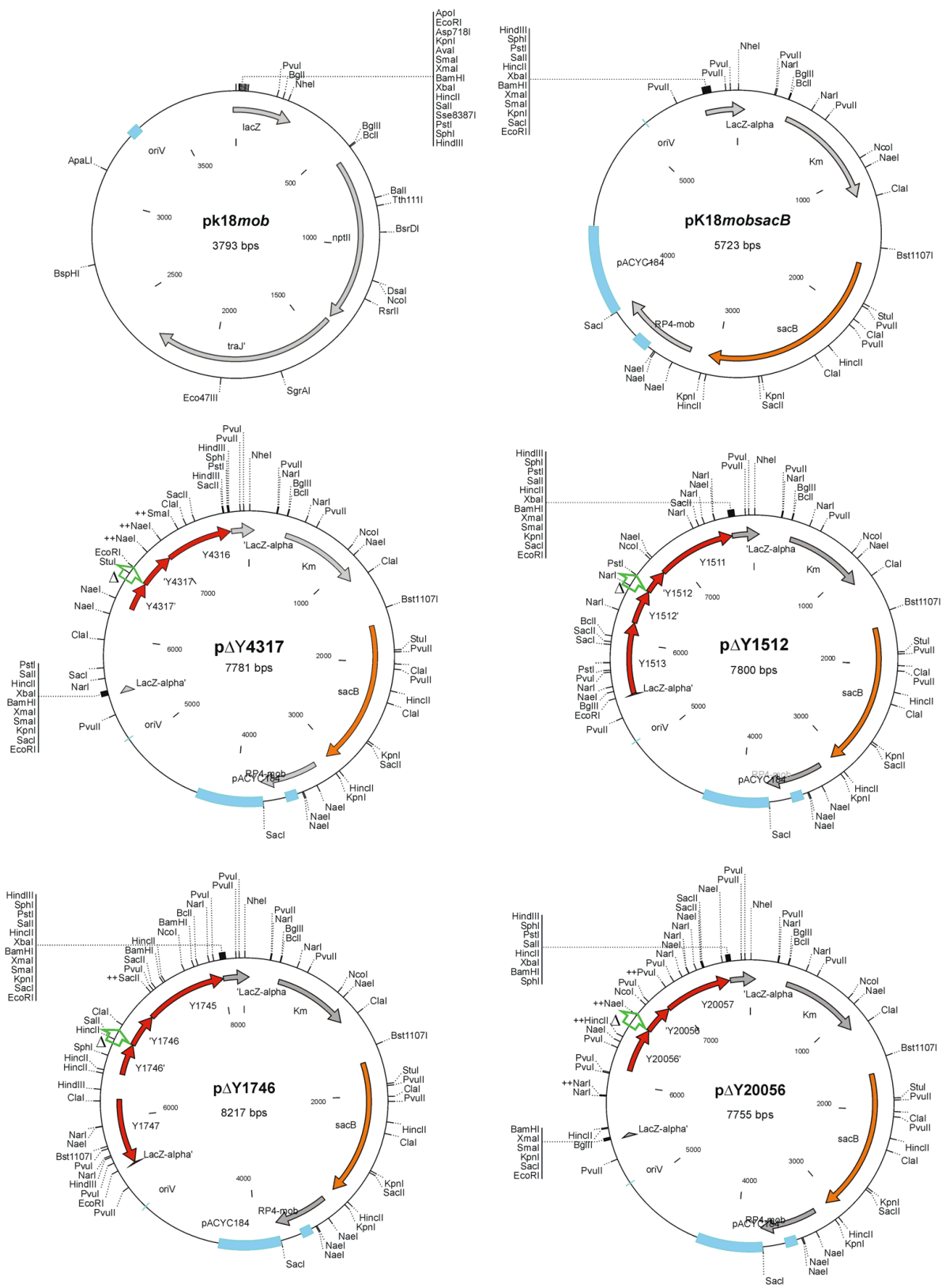
G Anhang

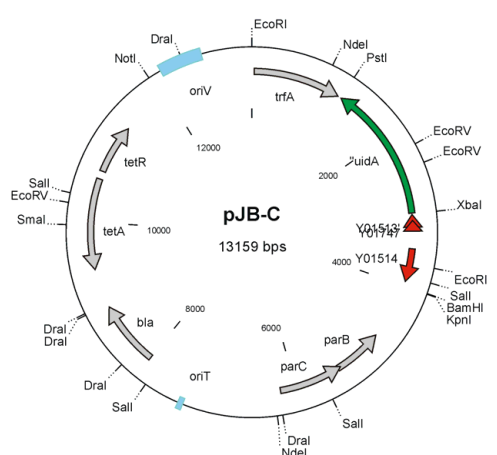
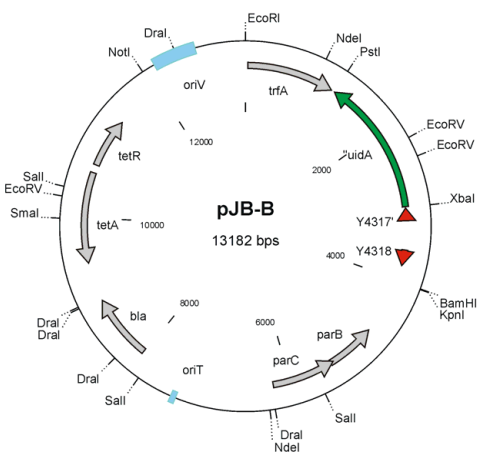
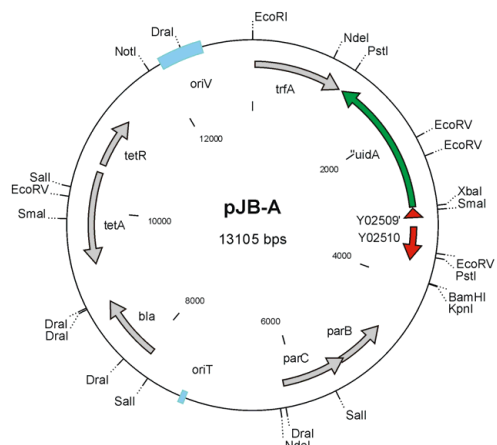
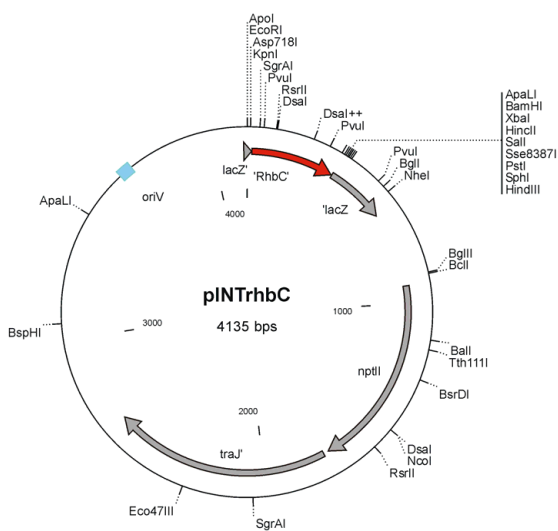
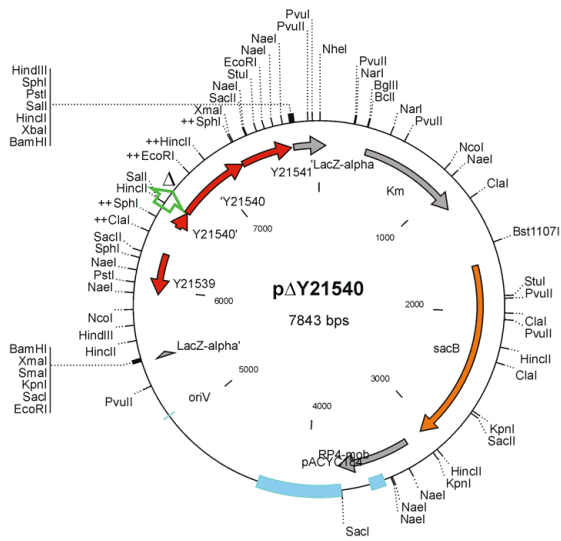
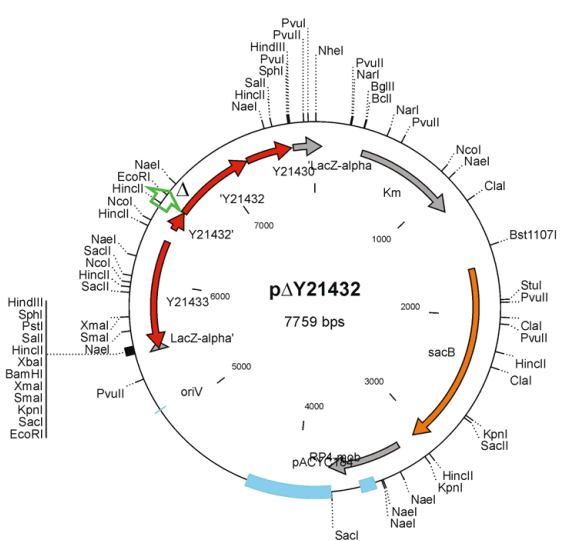
1 Abkürzungen

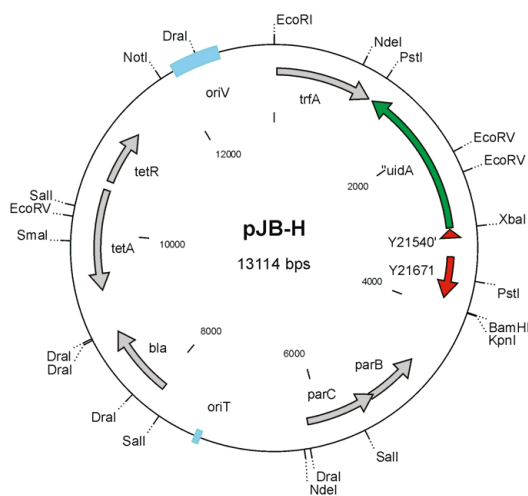
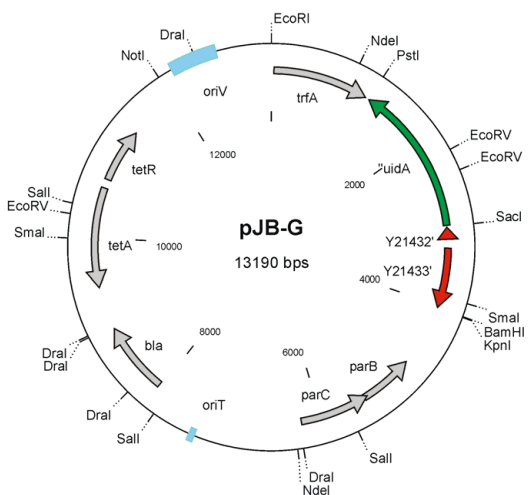
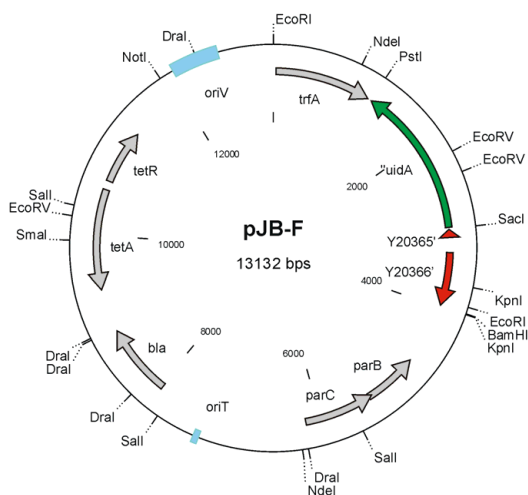
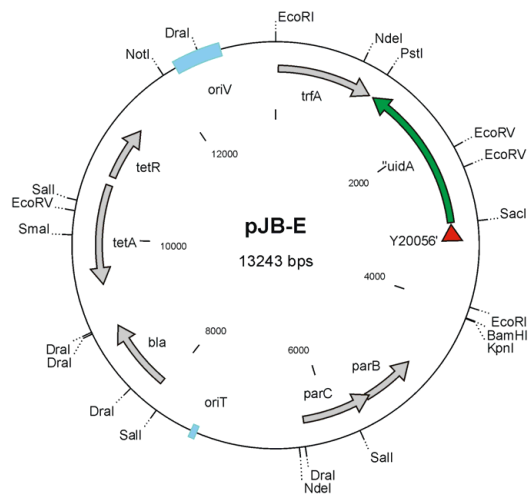
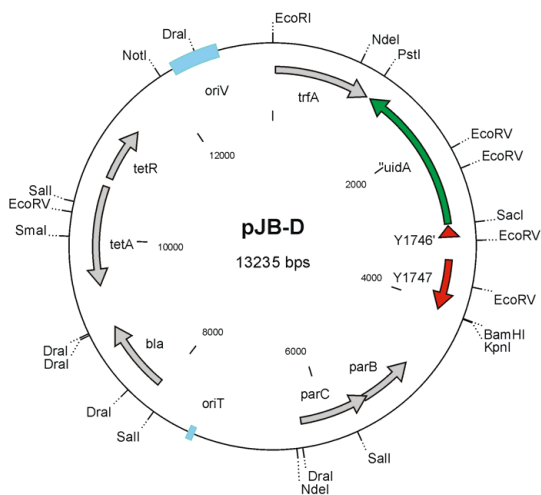
A	Adenin, Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ÄM	äußere Membran
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CAS	Chrom-Azurol S
Cm	Chloramphenicol
CP	Cytoplasma
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Eppi	Eppendorfreaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
F	Farad
Fe	Eisen
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ Odest	destilliertes Wasser
HDTMA	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	mikro
m	milli
M	Molar
Mb	Megabasen
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
n	nano
NB	Nutrient Broth

Ω	Ohm
o/n	über Nacht
o.D.	Optische Dichte
PBP	periplasmatisches Bindeprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazidinhansulfonsäure
PP	Periplasma
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sm	Streptomycin
Suc	Saccharose
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten, Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
z.B.	zum Beispiel

2 Plasmidkarten







3 Rohdaten der Array-Experimente

Tabelle G-1 Rohdaten und Annotation der ausgewählten Gene im Array-Experiment TYD vs. TY

Gen	Annotation	t-Wert	p-Wert	M-Wert	A-Wert	Replikate
<i>smc02509</i>		7,319796	1,19736E-06	0,5159041	14,377944	18
<i>smc02508</i>		6,107222	0,000287177	0,4590097	14,6293	9
<i>smc02507</i>		5,663908	2,80136E-05	0,491514	13,627172	18
<i>smc02506</i>		7,807631	5,07593E-07	0,5026718	12,931906	18
<i>smc04317</i>		-21,31789	1,24917E-12	-1,545763	11,73813	16
<i>smc04316</i>		1,139468	0,2736294	0,0860192	15,4017	15
<i>smc04300</i>		-5,664193	0,000473572	-1,39937	8,620064	9
<i>smc01747</i>		8,151501	2,82452E-07	1,518377	10,581023	18
<i>smc01513</i>		7,322583	1,1914E-06	3,043093	9,364648	18
<i>smc01512</i>		9,876118	1,8581E-08	1,324208	9,789093	18
<i>smc01511</i>		2,181638	0,04346451	0,3067202	9,200703	18
<i>smc01510</i>		-1,966203	0,08999333	-0,3894331	7,932545	8
<i>sma1746</i>		9,325836	7,18885E-08	1,956343	9,026665	17
<i>sma1745</i>		2,422501	0,02765125	0,5098718	8,577979	17
<i>sma1742</i>		-0,3278704	0,7741508	-0,4948317	7,23738	3
<i>sma1741</i>		-5,090549	9,07056E-05	-0,5141334	11,323106	18
<i>smb20056</i>		2,03581	0,0576618	0,2323192	15,065372	18
<i>smb20057</i>		4,231184	0,000562482	0,3349366	13,010828	18
<i>smb20058</i>		1,537892	0,1424793	0,1178133	14,251394	18
<i>smb20365</i>		-3,084671	0,006721657	-0,3152804	9,316666	18
<i>smb20364</i>		7,434805	1,41563E-06	0,6819245	10,324693	17
<i>smb20363</i>		-5,706202	0,1104447	-0,6025835	8,091485	2
<i>smb21432</i>		5,051469	9,84E-05	1,464796	11,93013	18
<i>smb21430</i>		2,239025	0,03881762	0,2011946	11,458811	18
<i>smb21429</i>		-0,9454832	0,357658	-0,09081539	12,342944	18
<i>smb21540</i>		1,472755	0,1843013	0,4073653	7,48905	8
<i>smb21541</i>		-0,9284978	0,3803112	-0,1001601	8,693352	9
<i>smb21542</i>		-0,6529518	0,5236698	-0,08121779	8,800387	16
<i>sma2400</i>	<i>rhbA</i>	16,14507	9,58254E-12	5,195468	9,032062	18
<i>sma2402</i>	<i>rhbB</i>	34,22046	4,03536E-17	4,85309	10,805583	18
<i>sma2404</i>	<i>rhbC</i>	7,423668	9,94747E-07	2,022546	11,246617	18
<i>sma2406</i>	<i>rhbD</i>	8,756513	1,04431E-07	3,11051	9,874034	18
<i>sma2408</i>	<i>rhbE</i>	14,05629	8,6423E-11	4,664916	10,509397	18
<i>sma2410</i>	<i>rhbF</i>	15,48627	1,86425E-11	4,472341	10,093007	18
<i>sma2412</i>	<i>rhrA</i>	6,487579	4,50368E-05	1,746988	7,453283	12
<i>sma2414</i>	<i>rhtA</i>	13,99512	9,25546E-11	3,959851	11,556817	18
<i>sma1747</i>	putativer Ferrichrome Rezeptor	3,285315	0,004366318	0,3513461	10,684377	18
<i>smc02726</i>	<i>shmR</i>	9,464375	3,44816E-08	2,901598	9,469772	18
<i>smc02890</i>	putativer Eisen-Rezeptor	-0,7154931	0,5063159	-0,1502313	8,530157	6
<i>smc04205</i>	putativer Eisen/Haem Rezeptor	-2,814902	0,01460697	-0,2753919	9,246194	14
<i>smc01657</i>	<i>fhuA2</i>	4,915309	0,000130871	0,3223567	14,457	18
<i>smc01611</i>	<i>fhuA1</i>	0,09296373	0,9344063	0,03361437	7,906943	3
<i>smc02721</i>	putativer Eisen-Rezeptor	5,488297	3,99785E-05	0,7861714	9,622569	18
<i>smc01515</i>	<i>tonB</i>	2,589842	0,01907645	0,200735	15,249022	18
<i>smc02084</i>	<i>exbD</i>	4,230755	0,000981704	1,454248	7,84742	14
<i>smc02085</i>	<i>exbB</i>	16,53044	6,56464E-12	2,604147	10,262432	18

Tabelle G- 2 Rohdaten und Annotation der ausgewählten Gene im Array-Experiment VMM_{0,3} vs. VMM₃₀

Gen	Annotation	t-Wert	p-Wert	M-Wert	A-Wert	Replikate
<i>smc02509</i>		1,059547	0,307289	0,090287	13,93405	15
<i>smc02508</i>		12,81344	5,15E-05	0,560392	13,90065	6
<i>smc02507</i>		6,407324	1,63E-05	0,502661	13,51253	15
<i>smc02506</i>		3,615301	0,002812	0,198939	12,76889	15
<i>smc04317</i>		-8,43713	7,33E-07	-1,51667	9,630879	15
<i>smc04316</i>		1,816573	0,119185	0,13566	13,91437	7
<i>smc04300</i>		-7,7356	0,081844	-0,75478	9,064665	2
<i>smc01747</i>		26,44306	2,37E-13	2,303889	12,56956	15
<i>smc01513</i>		20,41322	8,15E-12	2,386426	11,25456	15
<i>smc01512</i>		12,92786	3,58E-09	1,334482	10,77304	15
<i>smc01511</i>		6,24926	2,13E-05	0,70017	9,818831	15
<i>smc01510</i>		-0,26075	0,799575	-0,0476	8,288094	11
<i>sma1746</i>		18,56453	2,94E-11	1,97655	10,27391	15
<i>sma1745</i>		7,784622	1,88E-06	1,0936	8,601505	15
<i>sma1742</i>		-1,73317	0,333155	-0,72853	8,34298	2
<i>sma1741</i>		-0,85052	0,409346	-0,05853	11,10503	15
<i>smb20056</i>		3,675404	0,002496	0,213695	13,62783	15
<i>smb20057</i>		2,674232	0,018149	0,234029	11,85056	15
<i>smb20058</i>		-2,84494	0,012979	-0,38758	12,23969	15
<i>smb20365</i>		1,960403	0,071737	0,299904	9,584411	14
<i>smb20364</i>		2,477607	0,026592	0,299582	10,40873	15
<i>smb20363</i>		n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
<i>smb21432</i>		11,87467	1,0702E-08	1,354191	11,93002	15
<i>smb21430</i>		5,094376	0,000163	0,431839	11,81056	15
<i>smb21429</i>		-4,83253	0,000266	-0,2905	12,16863	15
<i>smb21540</i>		-2,72025	0,072534	-0,47712	8,660923	4
<i>smb21541</i>		-3,32559	0,008861	-0,28104	8,71333	10
<i>smb21542</i>		-1,54865	0,152507	-0,21602	9,006964	11
<i>sma2400</i>	<i>rhbA</i>	18,73318	2,61E-11	7,859524	10,29617	15
<i>sma2402</i>	<i>rhbB</i>	48,7484	4,96E-17	5,807803	12,69603	15
<i>sma2404</i>	<i>rhbC</i>	38,08115	1,54E-15	4,33942	12,09088	15
<i>sma2406</i>	<i>rhbD</i>	17,35456	7,29E-11	5,207637	11,06466	15
<i>sma2408</i>	<i>rhbE</i>	25,36627	4,2E-13	7,191524	11,80156	15
<i>sma2410</i>	<i>rhbF</i>	32,58815	1,33E-14	6,382683	11,90873	15
<i>sma2412</i>	<i>rhrA</i>	7,743852	2E-06	1,397171	8,972589	15
<i>sma2414</i>	<i>rhtA</i>	43,58846	2,35E-16	4,722797	13,29865	15
<i>sma1747</i>	putativer Ferrichrome Rezeptor	25,94009	3,09E-13	3,976649	11,14041	15
<i>smc02726</i>	<i>shmR</i>	25,94009	3,09E-13	3,976649	11,14041	15
<i>smc02890</i>	putativer ÄM Rezeptor	-0,20445	0,844762	-0,06943	8,04975	7
<i>smc04205</i>	putativer Eisen/Haem Rezeptor	4,530863	0,000471	0,517476	8,688488	15
<i>smc01657</i>	<i>fhuA2</i>	2,921013	0,011168	0,119019	14,78166	15
<i>smc01611</i>	<i>fhuA1</i>	2,422635	0,035899	0,685463	7,809576	11
<i>smc02721</i>	putativer ÄM Rezeptor	-0,77369	0,464436	-0,17041	8,526347	8
<i>smc01515</i>	<i>tonB</i>	-2,40247	0,030723	-0,14113	15,78045	15
<i>smc02084</i>	<i>exbD</i>	8,558084	6,19E-07	1,211233	8,305506	15
<i>smc02085</i>	<i>exbB</i>	19,59871	1,42E-11	1,962538	11,36694	15

4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben. Alle aus der Literatur entnommene Zitate sind als solche kenntlich gemacht.

Detmold, im Mai 2004

Jens Buhrmester

5 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld in der Zeit von Mai 1999 bis Mai 2004 angefertigt. An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler für die Möglichkeit, am Lehrstuhl diese Dissertation durchführen zu können. Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Stefan Weidner für die Betreuung dieser Arbeit und zahlreiche kritische Diskussionen und Anregungen danken. Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern aus „F1“ für eine ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, in der ich mich ausgesprochen wohl gefühlt habe.

Ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Frau Sandra, für die konstante Unterstützung und Ermutigung besonders während der schwierigen Phasen meiner Promotion. DANKE!