

---

**Untersuchung der Antwort des symbiontischen  
Bodenbakteriums *Sinorhizobium meliloti* 1021  
auf azidischen pH-Stress**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Christoph Hellweg**

aus Bonn

Juli 2009

<b>A. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>B. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>1. DAS STICKSTOFFFIXIERENDE BODENBAKTERIUM <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i> .....</b>	<b>3</b>
1.1. Die biologische Stickstofffixierung .....	3
1.2. Die Rhizobien-Leguminosen Symbiose .....	5
1.3. Das Untersuchungsobjekt <i>S. meliloti</i> 1021 .....	8
<b>2. DIE AUSWIRKUNGEN VON SAUREM PH AUF RHIZOBIEN .....</b>	<b>9</b>
2.1. Mechanismen der pH-Toleranz bei Rhizobien.....	10
2.2. Regulation der azidischen pH-Antwort bei Rhizobien.....	12
<b>3. ANALYSEN UMFANGREICHER GENEXPRESSIONSDATEN.....</b>	<b>14</b>
<b>4. ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>17</b>
<b>5. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>17</b>
<b>C. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>1. MATERIAL .....</b>	<b>18</b>
1.1. Bakterienstämme.....	18
1.2. Plasmide.....	19
1.3. Oligonucleotide.....	19
1.4. Enzyme.....	20
1.5. Chemikalien.....	20
1.6. Kits.....	20
1.7. Materialien .....	21
1.8. Software .....	21
1.9. Medien und Medienzusätze.....	21
<b>2. METHODEN .....</b>	<b>24</b>
2.1. Kultivierung von Bakterienstämmen .....	24
2.2. DNA-, RNA-Isolations- und Darstellungsmethoden .....	25
2.3. Klonierungsexperimente .....	29
2.4. PCR-Arbeitstechniken .....	30
2.5. <i>Microarray</i> -Experimente .....	31
<b>D. ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
<b>1. PHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON <i>S. MELILOTI</i> 1021 UNTER PH-STRESS.....</b>	<b>35</b>
1.1. Ein pH von 5,5 bildet die Untergrenze für Wachstum von <i>S. meliloti</i> 1021 .....	35
1.2. <i>S. meliloti</i> 1021 alkalisiert das Wachstumsmedium VMM.....	37
1.3. Ein pH 5,5 in VMM ist nicht letal für <i>S. meliloti</i> 1021.....	38
<b>2. IDENTIFIKATION DER RAHMENBEDINGUNGEN FÜR DIE UNTERSUCHUNGEN DER TRANSKRIPTIONELLEN PH-STRESSANTWORT VON <i>S. MELILOTI</i> 1021 IN EINER ZEITREIHE .....</b>	<b>39</b>
2.1. Physiologische Charakterisierung von <i>S. meliloti</i> während der pH-Stressuntersuchung.....	40

2.2. Identifikation des Zeitraumes zur pH-Stressuntersuchung .....	42
<b>3. DIE TRANSKRIPTIONELLE ZELLANTWORT VON <i>S. MELILOTI</i> 1021 AUF PH-STRESS.....</b>	<b>44</b>
3.1. Die Anzahl differentiell exprimierter Gene steigt mit zunehmender Stressdauer .....	45
3.2. Cluster-Analysen der transkriptionellen pH-Stressantwort von <i>S. meliloti</i> 1021 .....	47
3.3. Die zeitabhängige Expression der <i>exo</i> - und Flagellargene.....	55
<b>4. IDENTIFIKATION VON REGULATORISCHEN GENEN DER AZIDISCHEN PH-ANTWORT.....</b>	<b>59</b>
4.1. Funktionelle Charakterisierung der Mutanten, die einen pH-abhängigen Phänotyp zeigten .....	62
4.2. Untersuchung der möglichen Ursachen des pH-abhängigen Phänotyps der Deletionsmutanten.....	65
<b>E. DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
1. DIE TRANSKRIPTIONELLE ANTWORT VON <i>S. MELILOTI</i> 1021 WÄHREND DER ERSTEN STUNDE NACH UMSETZEN IN SAUREN PH LÄSST SICH DURCH ACHT EXPRESSIONSVERLÄUFE BESCHREIBEN.....	79
2. ANHAND DER ZEITABHÄNGIGEN TRANSKRIPTIONELLEN ANTWORT VON <i>S. MELILOTI</i> 1021 AUF PH-STRESS KONNTEN POTENTIELLE ZELLFUNKTIONEN DER PH-TOLERANZ IDENTIFIZIERT WERDEN.....	83
3. DIE GEGENSÄTZLICHE REAKTION VON FLAGELLAR- UND EXOPOLYSACCHARIDGENEN AUF PH-STRESS .....	84
4. DIE REGULATION VON ACTR IN <i>S. MELILOTI</i> 1021 .....	86
5. STELLEN TRANSPORTSYSTEME PROTONENLECKS DER CYTOPLASMAMEMBRAN DAR? .....	89
6. DIE PROBLEMATIKEN DER IDENTIFIKATION UND DES VERGLEICHES VON PH-STRESSANTWORTEN .....	91
<b>F. LITERATUR .....</b>	<b>95</b>
<b>G. ANHANG .....</b>	<b>105</b>
1. ABKÜRZUNGEN .....	105
2. ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	107
3. PLASMIDKARTEN .....	114
4. ROHDATEN DER <i>MICROARRAY</i> -EXPERIMENTE .....	115
5. ERKLÄRUNG.....	116
6. DANKSAGUNG .....	117

# A. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Antwort des symbiontischen Bodenbakteriums *S. meliloti* 1021 auf azidischen pH-Stress untersucht. Mit Hilfe des Sm6kOligo-Microarrays wurde die transkriptionelle Antwort von *S. meliloti* während der ersten Stunde nach Umsetzen von pH 7 auf pH 5,75 zu sechs Zeitpunkten erfasst. Die Analyse der Microarray-Daten mit informatorischen Werkzeugen ergab, dass sich der zeitabhängige Expressionsverlauf differentiell exprimierter Gene in acht Reaktionsprofile (Cluster) aufteilen ließ. Vier Cluster vereinten Gene, die eine Induktion als Antwort auf den pH-Stress aufwiesen, mit jeweils unterschiedlichem Verlauf der Induktion während der Zeitreihe. In den übrigen vier Clustern wurden Gene zusammengefasst, die eine Verringerung ihrer Expression zeigten. In vielen Fällen vereinigten die Cluster Gene, die hinsichtlich ihrer kodierten Produkte auch in einem funktionellem Zusammenhang stehen. Zwei große Gengruppen, die während der Zeitreihe differentiell exprimiert vorlagen, waren die Exopolysaccharidgene (EPS I) und die Motilitätsgene. Während die EPS I Gene stark induziert waren, wurde die Expression der Motilitätsgene während der Zeitreihe heruntergefahren. Neben diesen Genen waren u.a. Gene des Stickstoffmetabolismus, der Methionin-Biosynthese und Gene des Ionen-Transportes von der pH-Änderung betroffen.

Um Regulatoren der pH-Toleranz von *S. meliloti* zu identifizieren wurden Regulatorgene mutiert, die während der Zeitreihe differentiell exprimiert vorlagen. Von 55 identifizierten Regulatorgenen konnten für 43 von ihnen entsprechende Mutanten untersucht werden. Von diesen Mutanten zeigten solche mit Mutation in *sma1887*, *smc02584* (*actR*), *smc03015* (*visN*), *smc03046* (*rem*) und *smc04348* einen pH-abhängigen Wachstumsphänotyp. Durch Microarray-Analysen markerfreier Mutanten dieser Gene wurden potentielle Zielgene der Regulatoren identifiziert. In der *sma1887*-Mutante lag ein benachbartes Multidrug-Efflux System stark induziert vor und verursachte eine starke pH-Sensitivität der Mutante. Das Ausschalten von *actR* hatte ebenfalls pH-Sensitivität zur Folge und führte zur differentiellen Expression der Gene zweier terminaler Oxidasen (*cyoABC* und *qxtA*). Die Deletion von *smc04348* und *visN* verlieh den Mutanten einen Wachstumsvorteil bei niedrigem pH. Das verbesserte Wachstum einer *smc04348*-Mutante hängt vermutlich mit der Überexpression von *ilvC* zusammen, einem *Housekeeping*-Gen, dessen Genprodukt eine Schlüsselrolle bei der Isoleucin/Valin-Biosynthese spielt. Die aufgrund der Mutation von *visN* inaktivierte Motilität

fürte bei niedrigem pH zu einem verbesserten Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Der Phänotyp stärkt die These, dass das Ausschalten der Motilität bei Stress ein Mechanismus ist, Energie und Material für die Stressantwort einzusparen. Die Mutante von *rem*, einem VisN/VisR untergeordnetem Regulator, zeigte dagegen eine erhöhte pH-Sensitivität.

## B. Einleitung

### 1. Das stickstofffixierende Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti*

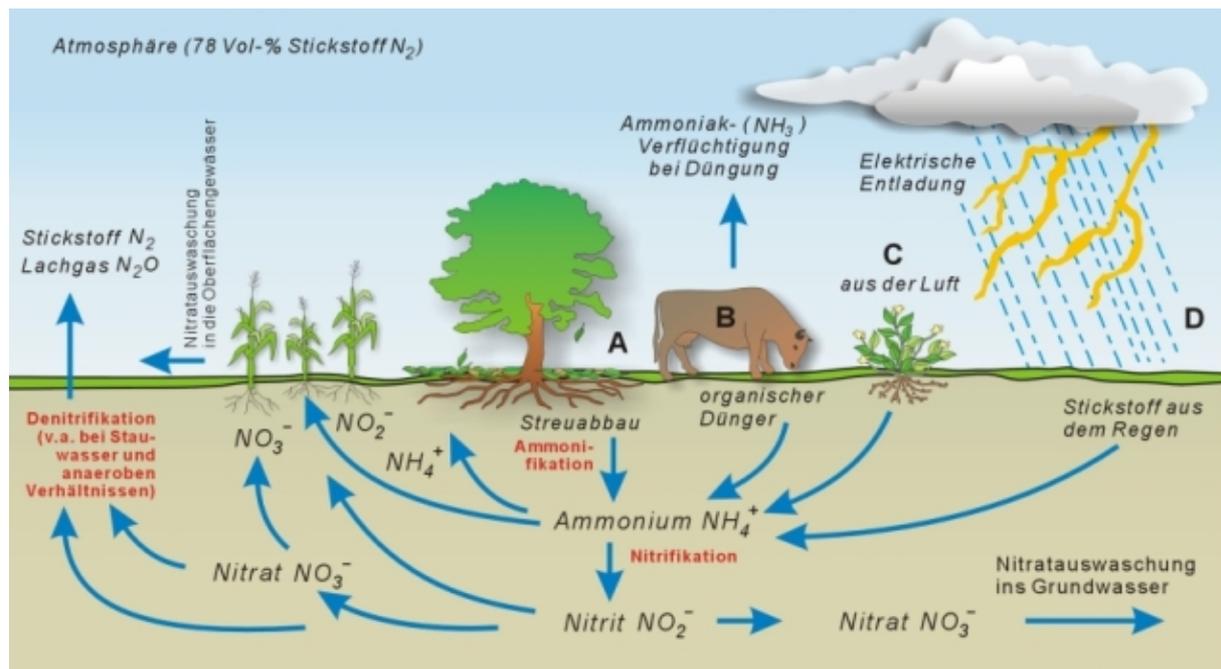
#### 1.1. Die biologische Stickstofffixierung

Obwohl der Stickstoff seinen Namen der Tatsache verdankt, dass er Flammen löscht oder Lebewesen erstickt, ist er doch ein essentielles Element für jede Form von Leben, da er Baustein für Proteine und DNA ist. In seiner molekularen Form ist Stickstoff zu ca. 78 % Bestandteil der Luft (Raumanteil), kann aber dennoch nicht direkt in den Stickstoffkreislauf (Abb. B-1) eingebracht und für biologische Prozesse verwendet werden. Der Grund hierfür liegt in der homodimer-Form des in der Luft vorkommenden Stickstoffmoleküls. Dessen zwei Stickstoffatome sind durch drei kovalente Bindungen stark aneinander gebunden und daher chemisch relativ inert.

Die Nutzbarmachung der molekularen Form des Stickstoffs erfordert viel Energie und wird als Stickstofffixierung bezeichnet. Im Wesentlichen sind drei Prozesse für die Stickstofffixierung verantwortlich. Die abiotischen Formen sind der Blitzschlag, der ca. 10 % des globalen Stickstoffs fixiert (Sprenst *et. al.*, 1990) und die Produktion von Düngern, bei der ca. 25 % fixiert werden. Das hierzu hauptsächlich verwendete Haber-Bosch-Verfahren zur Herstellung von Ammoniak ist für 1 % des weltweiten Energiekonsums verantwortlich (Smith, 2002). Mit 60 % wird der meiste Stickstoff jedoch durch den biologischen Prozess fixiert (Zahran, 1999). Dieser Prozess kann ausschließlich von Prokaryonten durchgeführt werden und wird als einer der bedeutsamsten enzymkatalytischen Prozesse angesehen. Für die Stickstofffixierung verantwortlich ist das heterodimere Nitrogenase-Enzym. Die typische Nitrogenase besteht aus zwei interagierenden Proteinkomponenten, dem Eisenprotein (Fe-Protein) und dem Molybdän-Eisen-Protein (MoFe-Protein). Das MoFe-Protein ist mit einer relativen Molmasse von ca. 220000 deutlich größer als das Fe-Protein. Es enthält 30 Eisen- und 2 Molybdänatome, die zusammen mit 32 Schwefelatomen in vier anorganischen Komponenten organisiert sind und die katalytischen Zentren der Stickstofffixierung

darstellen. Das kleinere Fe-Protein besitzt eine ATP-Bindestelle und stellt dadurch die Energie für den Prozess bereit. Mit ausreichenden Mengen von ATP ist die Reduktion von Stickstoff zu Ammonium durch die Nitrogenase bei Raumtemperatur möglich, während das chemische Haber-Bosch-Verfahren hierfür 500 °C und 200 Atmosphären Druck benötigt.

Den hohen energetischen Aufwand der Stickstofffixierung einzugehen macht für die Prokaryonten nur Sinn, wenn Stickstoff in ihrer Umgebung limitiert ist und ausreichend Energie in Form von organischen Verbindungen vorhanden ist. Diese speziellen Voraussetzungen haben dazu geführt, dass sich der Großteil der stickstofffixierenden Bakterien einen sehr speziellen Lebensraum erobert hat: Die Wurzel einer Pflanze. Dieses Habitat bietet sowohl Bakterium als auch Pflanze Vorteile. Da das Stickstoffvorkommen das Pflanzenwachstum limitiert, aber energiereiche organische Verbindungen durch die Photosynthese ausreichend vorhanden sind, verschafft das Bakterium der Pflanze den Stickstoff im Austausch gegen energiereiche Kohlenstoffverbindungen. Die Pflanze bildet eigens hierzu ein neues Pflanzenorgan aus, das Wurzelknöllchen. Diese symbiotische Beziehung liefert Schätzungen zufolge eine Menge von 139 bis 175 Millionen Tonnen fixierten Stickstoff jährlich (Burns *et. al.*, 1975; Paul, 1988). Von dieser Menge, so wird geschätzt, werden ca. 25-30 % auf Ackerland und ca. 30 % auf Weideland fixiert. Die Symbiose mit dem höchsten Stickstoffeintrag in den Stickstoffkreislauf ist die zwischen Rhizobien und Leguminosen. Die rhizobiellen Symbiosen mit den mehr als hundert landwirtschaftlich bedeutungsvollen Leguminosen sind wahrscheinlich für ca. 50 % der terrestrischen Stickstofffixierung verantwortlich (Tate, 1995). Leguminosen sind bereits seit dem Altertum für ihre bodenverbessernde Wirkung bekannt (Burris, 1974). Gegen Ende des 19. Jahrhunderts konnten schließlich Untersuchungen von Beijerinck zeigen, dass die Bakterien in den Wurzelknöllchen der Pflanzen für deren Stickstoffversorgung verantwortlich waren.



**Abbildung B-1: Der Stickstoffkreislauf.** Aus verschiedenen Quellen (A, D, C und D) wird Stickstoff in fixierter Form dem Kreislauf zugeführt. Im Wesentlichen wird nur durch die biologische Stickstofffixierung (C), den Blitzschlag (D) und das Haber-Bosch Verfahren zur Herstellung von Kunstdünger (nicht gezeigt) atmosphärischer Stickstoff direkt in den Kreislauf eingebracht (Quelle d. Abbildung: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt).

### 1.2. Die Rhizobien-Leguminosen Symbiose

Die Gattung *Rhizobium* umfasst nach klassischer Auffassung alle Bakterien, die stickstofffixierende Wurzelknöllchen mit Leguminosen ausbilden können. Einzelne Rhizobienarten wurden ursprünglich aufgrund ihrer Wirtsspezifität voneinander abgegrenzt, so wurden z. B. Rhizobien, die aus *Medicago sativa* (Luzerne) isoliert worden sind, gemeinschaftlich der Spezies *Rhizobium meliloti* zugeordnet (Abb. B-2). Rhizobien sind durchgängig streng aerobe, Gram-negative, stäbchenförmige Bodenbakterien, die sich chemoorganotroph ernähren. Allgemein sind sie subpolar oder peritrich begeißelt. Taxonomisch werden alle Vertreter dieser Gruppe den  $\alpha$ -Proteobakterien zugeordnet. Untersuchungen zeigten, dass die Gattung *Rhizobium* sehr heterogene Spezies vereint. Vornehmlich durch den Vergleich von rRNA-Sequenzen konnten in den letzten Jahren die verwandtschaftlichen Beziehungen der Rhizobien untereinander bestimmt werden. Aktuell werden die Rhizobien-Gattungen *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* und *Sinorhizobium* unterschieden. Daher wird *Rhizobium meliloti* heute als *Sinorhizobium meliloti* bezeichnet. Der Begriff Rhizobien wird weiterhin als Oberbegriff für Bakterien dieser

fünf Gattungen verwendet, obwohl die Rhizobien keine monophyletische Gruppe bilden (Van Berkum *et. al.*, 1998).

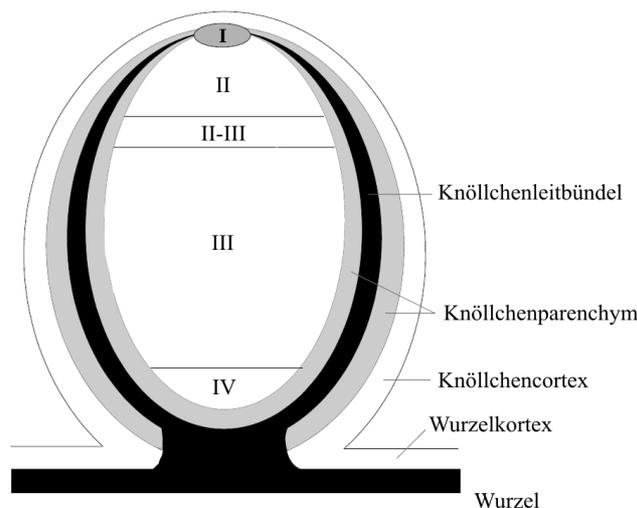
Leguminosen stellen mit ca. 19000 Arten eine der größten Pflanzenfamilien dar. Jede der drei Subfamilien der Leguminosen (*Caesalpinioideae*, *Mimosoidae* und *Papilinoideae*) beinhaltet einige Gattungen, die von Rhizobien noduliert werden können (Allen *et. al.*, 1981). Leguminosen sind sehr divers in Ökologie und Morphologie und daher in allen Klimazonen vertreten. Unter den Leguminosen gibt es einige wichtige Kulturpflanzen wie z.B. Sojabohne, Ackerbohne, Linse, Erbse, Klee und Luzerne. Der hohen Proteinanteil dieser Pflanzen kann in Zukunft dazu beitragen, die Situation der Welternährung zu verbessern (Vance, 1997).



**Abbildung B-2: *S. meliloti* Zellen und die Wirtspflanze *Medicago sativa* (Luzerne).** Das linke Bild zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einiger *S. meliloti* Zellen auf einer Wurzelhaarspitze (nach Dazzo, 1995). Das rechte Bild zeigt die charakteristischen lila Blüten der Wirtspflanze Luzerne.

Die Ausbildung von stickstofffixierenden Knöllchen ist das Resultat einer komplexen Interaktion zwischen Rhizobien und Leguminosen. Durch die Sekretion von Wurzelexsudaten lockt die Wirtspflanze die Bakterien chemotaxisch an (Barbour *et. al.*, 1991; Gaworzewaska *et. al.*, 1982). Nachdem die Bakterien die Wurzelhaare erreicht haben, kommt es zu deren Anheftung. Durch pflanzliche Signale aktiviert, beginnen die Bakterien mit der Biosynthese des Nod-Faktors, einem Lipochitinoligosaccharid, das eine morphologische Veränderung des Wurzelhaares induziert (Wood *et. al.*, 1989). Das Wurzelhaar krümmt sich und umschließt die Rhizobien in einer Art Tasche. Innerhalb der Tasche hydrolysieren die Bakterien die Zellwand und dringen in das Zellinnere des Wurzelhaares ein (Ridge *et. al.*, 1985; Turgeon *et. al.*, 1985). Um die eindringenden Bakterien herum lagert die Pflanze neues Zellwandmaterial an. Es entsteht eine nach innen wachsende, röhrenartige Struktur, die Infektionsschlauch genannt wird (Callaham *et. al.*, 1981; Turgeon *et. al.*, 1985). Parallel zur Entwicklung des Infektionsschlauchs und ebenfalls durch den Nod-Faktor induziert, beginnen

sich die Zellen im Wurzelcortex zu teilen, sodass das Knöllchenmeristem entsteht. Durch den Infektionsschlauch wachsen die Bakterienzellen in das Knöllchenmeristem ein und gelangen dort, durch einen endocytose-ähnlichen Mechanismus, in das Cytoplasma der Wirtszelle. Umschlossen von der pflanzlichen Peribakteroidmembran differenzieren die Bakterien zu stickstofffixierenden Bakteroiden aus. Ausdifferenzierte *S. meliloti* Bakterioide sind länglich geformt und vier bis fünfmal so groß wie vegetative Zellen. Die entstehende Organell-artige Struktur (Lodwig *et. al.*, 2003) von Peribakteroidmembran-umschlossenen Bakteroiden wird als Symbiosom bezeichnet und dient ausschließlich der Stickstofffixierung. Das entstehende Wurzelknöllchen ist nicht gänzlich mit Symbiosomen ausgestattet. Nicht determinierten Wurzelknöllchen, wie sie bei der Symbiose von *S. meliloti* und *Medicago sativa* entstehen, werden in unterschiedliche Zonen eingeteilt, die sich in ihrer Aktivität hinsichtlich der Stickstofffixierung unterscheiden (Abb. B-3).



**Abbildung B-3: Ein Wurzelknöllchen von *M. sativa*.** Das linke Bild zeigt eine schematische Darstellung des Wurzelknöllchens mit der charakteristischen Einteilung in verschiedene Zonen. Die Zone I besteht aus meristematischen Zellen. Zone II ist der Infektionsbereich, in dem die Bakterien in die pflanzlichen Zellen eindringen. In Zone III findet die Stickstofffixierung statt. Innerhalb dieser Zone sind die *S. meliloti*-Zellen zu Bakteroiden ausdifferenziert und bilden zusammen mit der Peribakteroidmembran des Wirtes die stickstofffixierenden Symbiosomen. Die Zone IV ist der Seneszenz-Bereich, der mit fortschreitendem Alter des Knöllchens anwächst. In diesem Bereich findet keine Stickstofffixierung statt. Die Bakterien sind nicht mehr in Symbiosomen organisiert und leben saprophytisch in der Wirtspflanze. Das rechte Bild zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch ein indetermiertes Wurzelknöllchen (Quelle: Chao, 2005).

### 1.3. Das Untersuchungsobjekt *S. meliloti* 1021

*S. meliloti* kann Symbiosen mit Leguminosen der Gattungen *Medicago*, *Melilotus* und *Trigonella* eingehen. Die Symbiose zwischen *S. meliloti* und *M. sativa* bzw. *M. truncatula* gilt als Modellsymbiose, da beide Symbiosepartner in der Vergangenheit Objekt zahlreicher Untersuchungen waren. Ein Ziel der Forschung ist es, die Symbiose hinsichtlich der Stickstofffixierung effizienter zu gestalten. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten auf andere Symbiosen übertragen werden. Eine erhöhte Stickstofffixierungsrate würde einen weiteren Schritt weg vom Gebrauch des künstlichen Stickstoffdüngers bedeuten und könnte in vielen Teilen der Welt zu einer verbesserten Ernährungslage führen. Da der Infektionsprozess und die Symbiose Analogien zu Pathogen-Wirts Interaktionen haben, können die Forschungsergebnisse auch das Wissen über solche Prozesse vertiefen.

Das Genom von *S. meliloti* 1021 liegt komplett sequenziert vor (Barnett *et. al.*, 2001; Capela *et. al.*, 2001; Finan *et. al.*, 2001; Galibert *et. al.*, 2001). Das Genom ist ähnlich wie bei anderen Rhizobien komplex und setzt sich aus drei Replikons zusammen. Neben dem 3,65 Mb großen Chromosom gibt es noch zwei Megaplasmide, die als pSymA und pSymB bezeichnet werden. Im gesamten Genom wurden 6204 putative Gene annotiert. Das Chromosom beinhaltet essentielle *Housekeeping*-Gene, Motilitäts- und Chemotaxisgene, sowie Gene der Pflanzeninteraktion (Capela *et. al.*, 2001). Das 1,35 Mb große Megaplasmid pSymA ist auf die Symbiose spezialisiert, da es die meisten Gene der Nodulation und Stickstofffixierung trägt (Banfalvi *et. al.*, 1981; Göttfert, 1993). Weiterhin scheint pSymA aufgrund des abweichenden GC-Gehalts und Kodon-Gebrauchs fremden Ursprungs zu sein und eher Plasmideigenschaften aufzuweisen (Galibert *et. al.*, 2001). Das 1,68 Mb große pSymB erweitert den akzessorischen Gen-Pool des Bakteriums um zahlreiche Gene des Substrattransportes und beinhaltet außerdem Gene, deren Produkte an der Exopolysaccharidsynthese und dem Katabolismus beteiligt sind. Durch zusätzliche akzessorische Gene ist das Bakterium in der Lage, eine größere Anzahl von Verbindungen zu verwerten bzw. auf unterschiedliche Stresssituationen zu reagieren und erhöht dadurch seine Flexibilität bei der Auswahl des Habitates auf Kosten einer größeren genetischen Fracht.

Die Sequenzierung des Genoms ermöglichte es, Proteom- und Transkriptomanalysen zu etablieren. So konnte in zahlreichen Analysen durch den Einsatz der *Microarray*-Technologie ein umfassendes Bild der transkriptionellen Antwort von *S. meliloti* 1021 auf verschiedene Lebenssituationen gewonnen werden, wie z.B. die Situation im Knöllchen, bei geringem

Sauerstoffpartialdruck, unter Phosphatmangel oder bei osmotischem Stress (Becker *et. al.*, 2004; Dominguez-Ferreras *et. al.*, 2006; Krol *et. al.*, 2004; Rüberg *et. al.*, 2003). Daneben konnte der *Microarray* auch zur Identifikation von Zielgenen der Regulatoren Fur und RirA eingesetzt werden (Chao *et. al.*, 2004; Chao *et. al.*, 2005). Es war ebenfalls möglich, komparative Genomanalysen mit dem *Microarray* durchzuführen (Giuntini *et. al.*, 2005; Stiens *et. al.*, 2008). Proteomanalysen von *S. meliloti* brachten Erkenntnisse über die globale Zellantwort von *S. meliloti* auf verschiedene Stress- oder Symbiosebedingungen (Djordjevic *et. al.*, 2003; Djordjevic, 2004; Natera *et. al.*, 2000).

## 2. Die Auswirkungen von saurem pH auf Rhizobien

Die Säuretoleranz von Wurzelknöllchenbakterien der Leguminosen ist ein Aspekt, dem besondere Gewichtung zukommt. Saure Böden sind ein globales Phänomen. Die Ansäuerung des Bodens ist häufig ein Resultat von sowohl industrieller Verschmutzung als auch der landwirtschaftlichen Nutzung von Anbauflächen (Robson *et. al.*, 1991; Von Uexküll *et. al.*, 1995). Die meisten Leguminosen benötigen für ihr Wachstum einen neutralen oder leicht sauren Boden-pH, insbesondere wenn sie auf symbiotische Stickstofffixierung angewiesen sind (Bordeleau *et. al.*, 1994; Brockwell *et. al.*, 1991). Die Produktivität von kultivierten Leguminosen wird durch die Bodenazidität, je nach Leguminosenart, unterschiedlich stark vermindert. Die Luzerne (*M. sativa*) reagiert sehr sensitiv auf einen sauren Boden, während z.B. *Lotus tenuis* auch saure Böden toleriert (Correa *et. al.*, 1997). Die Mechanismen der pflanzlichen pH-Toleranz sind weitgehend unbekannt. Wahrscheinlich hängen sie mit Abwehrmechanismen gegen Ionen von Aluminium und Mangan zusammen, die bei niedrigem pH in hohen Konzentrationen vorhanden sind (Silva *et. al.*, 2000). Um den negativen Einfluss der Bodensäure auf die Symbiose zu verringern, ist die Technik der Pelettierung der Saat mit Kalk weit verbreitet. Die Fähigkeit zur Ausbildung einer effektiven Symbiose auf sauren Böden hängt neben der pH-Toleranz der Wirtspflanze auch von der des Symbionten ab.

### 2.1. Mechanismen der pH-Toleranz bei Rhizobien

Rhizobien zeigen, ebenfalls artenabhängig, unterschiedlich ausgeprägte Toleranzen von saurem pH. Generell sind schnell wachsende Rhizobienarten weniger tolerant als langsam wachsende Rhizobienarten (Graham *et. al.*, 1994). Studien unterschiedlicher Rhizobienisolate konnten belegen, dass eine erhöhte Toleranz gegenüber sauren Bedingungen mit der Fähigkeit, den intrazellulären pH ( $\text{pH}_i$ ) zu halten, zusammenhängt. So hat der Einsatz von radioaktiven und fluoreszenten Indikatoren gezeigt, dass Rhizobien im Normalfall einen leicht alkalischen  $\text{pH}_i$  haben (Graham *et. al.*, 1994; O'Hara *et. al.*, 1989), fällt der  $\text{pH}_i$  in *S. meliloti*-Stämmen jedoch auf 6,5 findet kein Zellwachstum mehr statt (O'Hara *et. al.*, 1989). Säuretolerante Rhizobien, wie z.B. das eng mit *S. meliloti* verwandte Bakterium *S. medicae* (ehemals *S. meliloti* WSM419), gelingt es selbst bei einem Inkubations-pH von 5,5, einen  $\text{pH}_i > 7$  zu halten. Es ist bisher unklar, welche Eigenschaften diesen Stämmen das Konstanthalten des  $\text{pH}_i$  unter sauren Bedingungen ermöglicht, es sind jedoch einige mögliche Faktoren bekannt.

Die Barrieren für den Protoneneinstrom sind die Membranen der Zellen. Ein üblicher Mechanismus von Archaeobakterien ist es, die Permeabilität der Membranen gegenüber Protonen durch Strukturveränderungen zu verringern (Review, siehe De Rosa *et. al.*, 1991). Rhizobienstämme zeigten nach Anzucht bei saurem pH ebenfalls eine Veränderung der Membran in ihrer Lipid-Zusammensetzung (Ballen *et. al.*, 1998), dies konnte bisher jedoch nicht mit einer gesteigerten Impermeabilität der Membran gegenüber Protonen in Zusammenhang gebracht werden. Das Gen *lpiA* konnte in *S. medicae* und *Rhizobium tropici* CIAT899 (Tiwari *et. al.*, 2004; Vinuesa *et. al.*, 2003) bei niedrigem pH als induziert gezeigt werden. Das Genprodukt von *lpiA* ist an der Formation von LPG (Lysylphosphatidylglycerol) beteiligt (Sohlenkamp *et. al.*, 2007), einem Membranlipid, das Schutz vor saurem pH (Reeve *et. al.*, 2006) und kationischen antimikrobiellen Peptiden verleiht.

Da keine biologische Membran komplett undurchlässig für Protonen werden kann, muss sich die Zelle unter sauren Bedingungen immer mit einem erhöhten Protoneneinstrom auseinandersetzen. Ein weiterer Mechanismus ist es daher, den  $\text{pH}_i$  durch Substratkatabolisierung bzw. eine veränderte Metabolisierung konstant zu halten. *R. fredii* akkumuliert bei Verringerung des pH Wertes intrazellulär Homospermidine (Fujihara *et. al.*, 1993). Für *E. coli* ist bekannt, dass bei saurem pH intrazellulär Protonen durch die Decarboxylierung der Aminosäuren Glutamat und Arginin verbraucht werden und dadurch der  $\text{pH}_i$  alkalisiert wird. Die Endprodukte GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und Agmatin werden

dann jeweils durch Antiport mit ihren Ausgangssubstraten aus dem Zellinneren heraustransportiert (Foster, 2004). *Lactobacillus plantarum* wechselt von der Milchsäure- zur Acetoin-Produktion um eine Ansäuerung des Zellinneren zu vermeiden (Tsau *et. al.*, 1992). Ein anderer bekannter Mechanismus den  $pH_i$  konstant zu halten, ist der aktive Transport von Protonen aus dem Zellinneren. In einigen Streptokokken wird bei saurem pH eine  $F_1F_0$ -ATPase zur Protonentranslokation induziert (Kobayashi *et. al.*, 1984; Kobayashi *et. al.*, 1986; Sturr *et. al.*, 1990). Dieses System ist essentiell für diese Bakterien um das Überleben bei niedrigem pH zu sichern. Für *S. meliloti* ist ein potentieller  $K^+/H^+$ -Antiporter bekannt, der den intrazellulären pH bei alkalischen Bedingungen alkalisiert (Putnoky *et. al.*, 1998).

Es sind nicht nur direkte Maßnahmen von Bakterienzellen beschrieben, um den intrazellulären pH anzuheben. Während die Zelle relativ gut in der Lage ist den intrazellulären Raum zu schützen, sind Komponenten außerhalb der Cytoplasmamembran oder auf der Zelloberfläche relativ schutzlos, wie z.B. Flagellen, Chemorezeptoren, Zellwandstrukturen, Pili usw. Bei *R. leguminosarum* ist der Verlust der flagellaren Motilität nach Anzucht bei saurem pH beschrieben (Bowra *et. al.*, 1981). Eine andere Möglichkeit die negativen Auswirkungen eines sauren pH-Wertes zu verringern, ist es daher, durch Sekretion von Substanzen, das extrazelluläre Milieu zu alkalisieren. Für Rhizobien sind solche Mechanismen bisher nicht bekannt. *Helicobacter pylori* z. B. sekretiert das Enzym Urease, um durch die Spaltung von Harnstoff zu Ammoniak und  $CO_2$ , den gastrischen pH zu neutralisieren (Review, siehe Mobley *et. al.*, 1995). Eine Zellantwort, die im Zusammenhang mit einem solchen Mechanismus stehen könnte, ist die veränderte Exopolysaccharidstruktur von *S. medicae* bei Anzucht im niedrigen pH-Bereich (5,8) (Dilworth *et. al.*, 1999). Die Oktasaccharidstruktur des Exopolysaccharids I (EPS I) war nach Anzucht unter sauren Bedingungen deutlich weniger acetyliert und pyruviliert, während der Anteil an Succinylierungen annähernd gleich blieb. Das Genprodukt von *exoH* ist an der EPSI-Biosynthese beteiligt. Eine Mutante dieses Gens ist nicht in der Lage, das EPS zu succinylieren (Glenn *et. al.*, 1999) und hat einen säure- und zinksensitiven Phänotyp (Leigh *et. al.*, 1987). Einen Hinweis auf das Vorhandensein von sekretierten Faktoren, die das Überleben der Zelle bei saurem pH sichern, geben Experimente mit der bakteriellen ATR (*adaptive acid tolerance response*). Die ATR beschreibt eine Fähigkeit von Bakterienzellen, nach Inkubation bei leicht saurem pH, eine erhöhte Toleranz gegen stark sauren pH zu erhalten. Für *E. coli* Zellen konnte gezeigt werden, dass leicht saures Wachstumsmedium, in dem Zellen ihre ATR entwickelt haben, dazu verwendet werden kann, pH-neutral

angezogenen *E. coli* Zellen sofort die Fähigkeit der ATR zu verleihen (Rowbury *et. al.*, 1998).

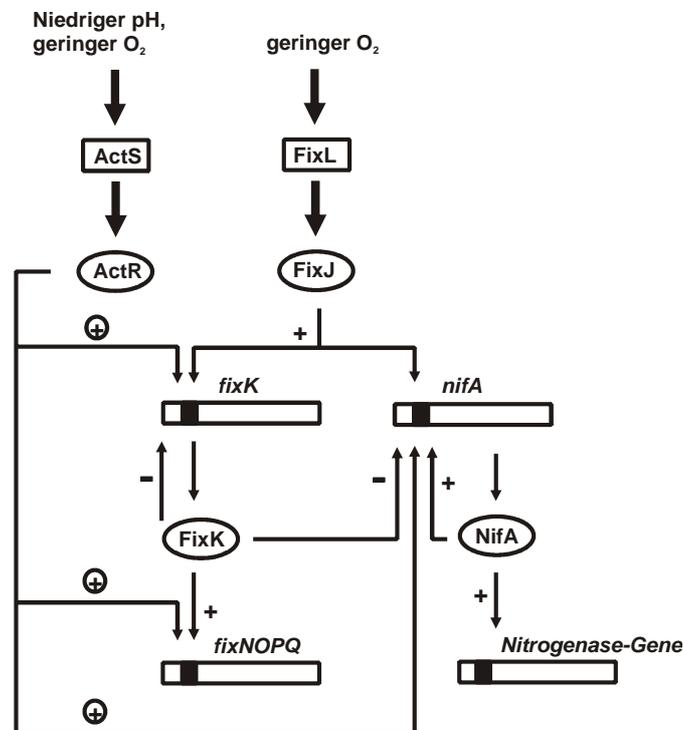
Ein indirektes Problem, das mit saurem pH einhergeht, ist die erhöhte Löslichkeit von Metallionen, wie z.B. Aluminium, Kupfer, Zink, Mangan, usw. Einige säuresensitive Rhizobienmutanten zeigen auch Sensitivität gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  oder Zink (Glenn *et. al.*, 1999). Das *S. medicae actP*-Gen codiert für ein Protein mit Ähnlichkeit zu einer P-Typ ATPase, die wahrscheinlich für das Erkennen und den Transport von Schwermetallionen zuständig ist. Eine *S. medicae actP*-Mutante kann in saurem Medium wachsen. Wird dem Medium Kupfer zugesetzt, ist bei einem pH von unter 5,8 kein Wachstum der Mutante feststellbar, während der Wildtyp noch in der Lage ist zu wachsen (Dilworth *et. al.*, 2001). ActP stellt daher eine Verbindung von Säurestress mit einhergehender Schwermetallbelastung dar. Umgekehrt scheinen erhöhte Calciumkonzentrationen von Vorteil für die Wachstumsraten von *S. meliloti* und *R. leguminosarum* zu sein. So wird durch Zusatz von Calcium die untere Grenze des pH-Wachstums verringert (Howieson *et. al.*, 1992; Reeve *et. al.*, 1993), sowie die Überlebensraten von Zellen erhöht, die sehr saurem pH ausgesetzt waren (Dilworth *et. al.*, 1999).

## 2.2. Regulation der azidischen pH-Antwort bei Rhizobien

Über Regulationssysteme der azidischen pH-Antwort von Rhizobien ist wenig bekannt. In *S. medicae* und *R. leguminosarum* konnte das ActS-ActR System als essentiell für azidischen pH-Stress identifiziert werden (Boesten *et. al.*, 2000; Tiwari *et. al.*, 1996). Das System ist ein Homolog des RegAB Sensor-Regulatorpaares aus dem Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*. In *Rhodobacter capsulatus* wird RegAB für die anaerobe Induktion des Photosyntheseapparates benötigt (Mosley *et. al.*, 1994; Sganga *et. al.*, 1992). Die Gene des homologen Histidin Sensor-Regulatorpaares werden in *S. medicae* konstitutiv exprimiert und kodieren für den Sensor ActS und den Regulator ActR. Durch Integration von Reporterengkassetten in eine *actS*-Mutante konnten einige Ziele der Regulation identifiziert werden (Fenner *et. al.*, 2004). Die ActS-ActR kontrollierten Gene kodieren Proteine für eine Vielzahl an metabolischen Funktionen von denen sehr wenige einen offensichtlichen Zusammenhang mit der pH-Homöostase haben, wie z.B. *gstI* (Detoxifizierung), *hyuA* (Hydantoin-Utilisierung) und *fixN2* (microaerobische Atmung). Es konnte gezeigt werden, dass ActS-ActR Einfluss auf die Regulation von *fixK* und *nifA* haben, deren Genprodukte

wiederum Gene der Stickstofffixierung kontrollieren. Die Regulation von *fixK* und *nifA* erfolgt in Abhängigkeit von pH und Sauerstoffverfügbarkeit zusammen mit dem Sensor-Regulatorpaar FixL-FixJ (Abb. B-4).

Ein anderes Regulatorgen, dessen Expression sich in *S. medicae* durch den pH-Wert verändert, ist *phrR*. Nach Anzucht von *S. medicae* Zellen bei niedrigem pH-Wert ist das Gen 5fach höher exprimiert als unter normalen pH-Bedingungen. Weiterhin zeigte sich eine höhere Expression bei Kupfer-, Zink-, Ethanol-, Wasserstoffperoxid-, Hitze-, Sucrose- und Phosphatstress und in der stationären Phase (Reeve *et. al.*, 1998). Die Expression von *phrR* wird nicht durch das *actS-actR* System reguliert.



**Abbildung B-4: Schema der Regulation von ActS-ActR und FixL-FixJ in Abhängigkeit von saurem pH und geringem Sauerstoffpartialdruck.** Während des Wachstums unter niedrigem pH und/oder geringer Sauerstoffverfügbarkeit aktivieren die membrangebundenen Histidin-Kinasen ActS und FixL ihre jeweiligen Regulatoren ActR und FixJ. Die aktiven Regulatoren kontrollieren dann, wahrscheinlich durch Bindung an stromaufwärts gelegene Promotoren, die Regulation ihrer Zielgene. Das eingekreiste „+“-Symbol deutet an, dass entweder eine direkte oder indirekte Kontrolle der Zielgene erfolgt (nach Fenner *et.al.*, 2004).

### 3. Analysen umfangreicher Genexpressionsdaten

Durch die Etablierung der „-omics-Technologien“ und die Möglichkeiten der *high-throughput* Sequenziertechnologien entstehen immer umfangreichere Datenmengen. Insbesondere die *Microarray*-Technologie erforderte in den vergangenen Jahren informatorische Werkzeuge, um die angefallenen Genexpressionsdaten zu analysieren. Die Ansätze zielen darauf ab, die Genexpressionsdaten in ähnliche Gruppen einzuteilen, um die Datenmenge zu reduzieren und die Resultate in einer übersichtlichen, für den Experimentator auswertbaren Form, verfügbar zu machen. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit eines funktionellen Zusammenhangs zwischen Genen mit ähnlichem Expressionsprofil. Daher ist die Clusteranalyse auch ein Werkzeug zur Annotation geworden (Sturn, 2001). Auch in dieser Arbeit wurde auf informatorische Werkzeuge zur Clusteranalyse zurückgegriffen.

Es haben sich im Wesentlichen vier Verfahren zur Identifikation von ähnlich exprimierten Genen durchgesetzt, deren Einsatz zu zahlreichen Publikationen führte. Die Verfahren sind hierarchisches Clustern, *k*-Means, selbstorganisierende Karten (*Self Organizing Maps*, SOM) und Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA).

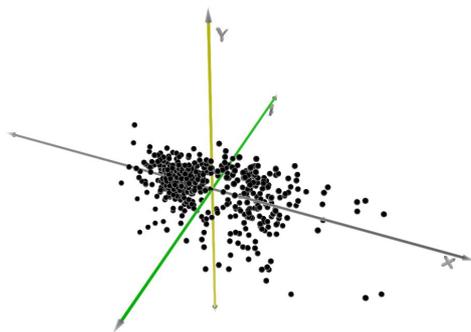
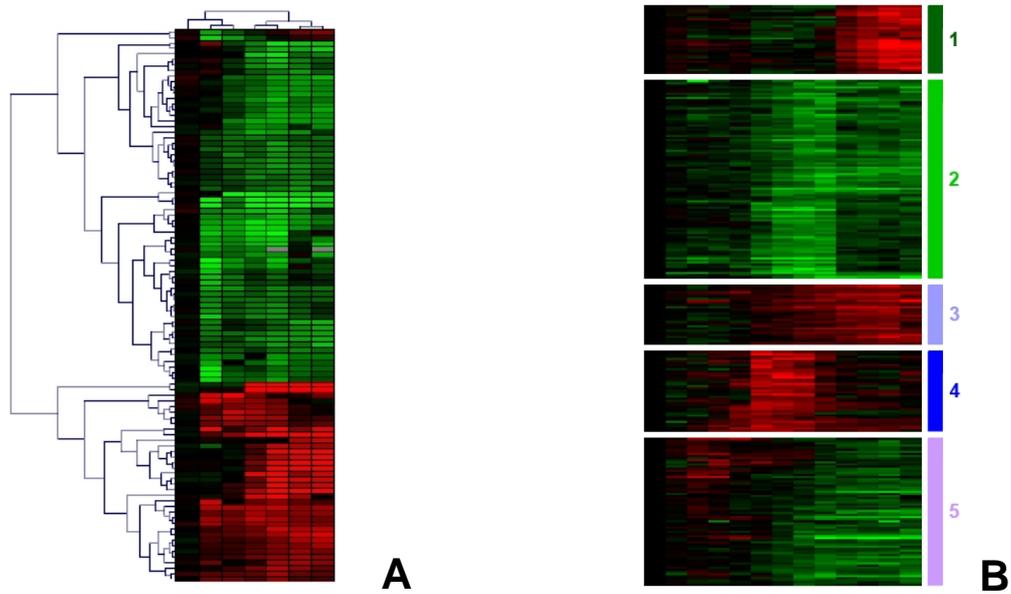
Bei hierarchischem Clustern (Collins, 1999; Wen *et. al.*, 1998) werden zunächst alle Expressionsprofile als einzelne Cluster behandelt und miteinander verglichen. Daraufhin werden die zwei Cluster, deren Distanz zueinander am geringsten ist, fortan als einzelnes Cluster weitergeführt. Dieser Vergleich wird iterativ fortgeführt, bis alle Gene einem Cluster zugewiesen sind. Das Resultat des hierarchischen Clusters ist eine Distanzmatrix, die sich in einem Dendrogramm veranschaulichen lässt (Abb. B-5, A).

Beim *k*-Means-Algorithmus (Soukas *et. al.*, 2000; Tavazoie *et. al.*, 1999; Zhexue Huang, 1997 a; Zhexue Huang, 1997 b) wird zunächst vom Anwender definiert, wie viele Cluster vorliegen sollen. Anschließend werden die Gene anhand ihrer Expressionsprofile dem ähnlichsten Cluster zugewiesen. Durch das neue Element in diesem Cluster verändert sich dessen Mittelwert. Falls das Gen einem Cluster entnommen wurde, wird auch dessen Mittelwert neu angepasst. Dies geschieht solange, bis keine Clusterzuweisung von Genen mehr stattfindet. Das Resultat von *k*-Means ist eine definierte Anzahl von Clustern (Abb. B 5, B).

SOM (Kohonen *et. al.*, 2009) liegt das Prinzip des Kohonen-Netzwerks zugrunde, das eines der populärsten neuronalen Netzwerk-Modelle ist. Das Prinzip beruht darauf, dass eine

definierte Anzahl von verknüpften Neuronen durch multidimensionale Eingangsvektoren trainiert wird. Die Eingangsvektoren (Genexpressionsdaten) werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit einem der Neuronen zugewiesen. Das Neuron wiederum verändert seine Eigenschaften und beeinflusst die der übrigen über seine Verknüpfungen. Das Resultat ist ein neuronales Netz, das die Topologie des Trainingsatzes, d.h. der Genexpressionsdaten, repräsentiert bzw. abbildet.

Durch PCA (Holter *et. al.*, 2000) ist es möglich, Schlüsselvariablen in einem multidimensionalen Eingangssatz zu identifizieren, die am besten die Unterschiede zwischen den Beobachtungen beschreiben. Wenn  $m$  Beobachtungen (Experimente) auf  $n$  Variablen (Gene) gemacht wurden, ist es das Ziel der PCA, die Dimensionalität der Datenmatrix zu verringern, indem  $r \leq n$  neue Variablen gefunden werden. Die Anzahl  $r$  an *Principal Components* beschreiben zusammen soviel Varianz der  $n$  Variablen wie möglich, wobei die *Principal Components* untereinander unkorreliert und orthogonal zueinander sind. Die PCA macht effektiv eine multidimensionale Regressionsanalyse. Das Ziel der PCA ist es, lineare Korrelationen zwischen den Eingangsdatensätzen zu finden und durch Filterung des Rauschens die Dimensionalität zu verringern, um den Eingangsdatensatz einfacher visualisieren und analysieren zu können (Abb. B-5, C).



**Abbildung B-5: Beispielhafte Resultate verschiedener Clusteringmethoden.**

Hierarchisches Clustering resultiert in einer Distanzmatrix, die anhand des Baum-Diagramms die Ähnlichkeit der Genexpressionsprofile untereinander bewertet (A). *k*-Means und SOM ergeben eine zuvor definierte Anzahl an Gruppen, deren beinhaltete Gene zueinander jeweils möglichst ähnlich sind (B). PCA reduziert die Dimensionen multidimensionaler Eingangsdatensätze und bildet sie z.B. in einem dreidimensionalen Raum ab (C).

**C**

## 4. Ziele der Arbeit

Die Antwort auf sauren pH-Stress ist für *S. meliloti* bisher kaum und für Rhizobien, mit Ausnahme von *S. medicae*, nur rudimentär untersucht worden. Grundlegende Erkenntnisse über die Zellantwort könnten hilfreich sein, das agronomische Problem der ineffizienten Symbiose auf sauren Böden zu lösen. Das Ziel der Arbeit ist es daher, zunächst die transkriptionelle Antwort von *S. meliloti* 1021 auf azidischen pH-Stress in einer Zeitreihe zu erfassen. In einem weiteren Schritt werden dann, auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse, potentiell an der pH-Stressantwort beteiligte Regulatorgene gezielt mutiert. Durch transkriptionelle Analysen dieser Regulatorgenmutanten sollen dann Ziele ihrer Regulation identifiziert werden, um die basalen Regulationsmechanismen der azidischen pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021 aufzudecken.

## 5. Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation ist folgende Publikation veröffentlicht worden:

**Hellweg, C., A. Pühler, and S. Weidner.** 2009. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol.* **9**:37.

# C. Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1. Bakterienstämme

**Tabelle C-1** Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Referenz
<b><i>S. meliloti</i> Stämme</b>		
Rm1021	Spontan resistente Mutante des Wildtyp RU47, Sm <sup>r</sup>	(Meade <i>et. al.</i> , 1982)
Rm1021Δsma1887	Derivat von Rm1021, Δsma1887, Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
Rm1021ΔactR	Derivat von Rm1021, ΔactR, Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
Rm1021ΔvisN	Derivat von Rm1021, ΔvisN, Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
Rm1021Δrem	Derivat von Rm1021, Δrem, Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
Rm1021Δsmc4348	Derivat von Rm1021, Δsmc04348, Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
Rm1021::sma1887	Derivat von Rm1021, pCH87::sma1887, Sm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
Rm1021Δsma1887::sma1884	Rm1021Δsma1887, pCH84::sma1884, Sm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
Rm1021Δsma1887::sma1885	Rm1021Δsma1887, pCH85::sma1885, Sm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
<b><i>E. coli</i> Stämme</b>		
<i>E. coli</i> DH5αMCR	F <sup>+</sup> endA1 supE44 thi-1 λ <sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYAargF)U169 Φ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)	(Grant <i>et. al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294 ::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] <i>pro res</i> ΔrecA, Tpr	(Simon <i>et. al.</i> , 1983)

## 1.2. Plasmide

**Tabelle C-2** Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Merkmale	Referenz
pK18mob	Derivat von pK18, lacZ $\alpha$ , Km <sup>r</sup> /Nm <sup>r</sup> , mobilisierbar	(Schäfer <i>et. al.</i> , 1994)
pK18mobsacB	Derivat von pK18, lacZ $\alpha$ , Km <sup>r</sup> /Nm <sup>r</sup> , mobilisierbar, enthält <i>sacB</i>	(Schäfer <i>et. al.</i> , 1994)
pCH84	pK18mob mit ~400bp Region von <i>sma1884</i>	diese Arbeit
pCH85	pK18mob mit ~400bp Region von <i>sma1885</i>	diese Arbeit
pCH87	pK18mob mit ~350bp Region von <i>sma1887</i>	diese Arbeit

## 1.3. Oligonucleotide

Name	Sequenz (5'→3')
Del_sma1887_A	CGTAACGAGCTTCGTATGTG
Del_sma1887_B	TGGAAGCATCGTCATTGGCGCATGATCGACCTCCGATTAG
Del_sma1887_C	CTAATCGGAGGTCGATCATGCGCCAATGACGATGCTTCCA
Del_sma1887_D	AACCAGGAGCCGACCTTGAT
Del_actR_A	GGCAATCTACTGGAGAAC
Del_actR_B	AAGGCGGCGGAGTTATTCGATCAGAAGGCTCTTGT
Del_actR_C	AATAACTCGCGCCGCCTT
Del_actR_D	GGCGGCAATGACGATCTT
Del_visN_A	CTGGTTCCGGAGTTGTAT
Del_visN_B	GCATTACGCTGGTGATGTCAAGCCTTCGGATCAGTT
Del_visN_C	AACTGATCCGAAGGCTTGACATCACCAGCGTAATGC
Del_visN_D	CTTGAACAGACGCTTCTC
Del_rem_A	GCATGCAGATCAACTACC
Del_rem_B	ACCGAGCTTCTTGCGCAGTT
Del_rem_C	GAATGATCGTGGTGGTTGAACTGCGCAAGAAGCTCGGT
Del_rem_D	AGCAATGAGGCCGTCCGAAG
Del_smc04348_A	CATGCAGCGACTTCAACT
Del_smc04348_B	TACCTTCTTCAGGCTGCCATCGCCGAACCACTTGTA
Del_smc04348_C	TACAAGTGGTTTCGGCGATGGCAGCCTGAAGAAGGAT
Del_smc04348_D	CGGAAGCGTCCTGATGAA
Int_sma1884_A	GATGCTATCCGGTACACT
Int_sma1884_B	GATCGTCGTCTCGATACT
Int_sma1885_A	GCTATGCCACTCTTGTC
Int_sma1885_B	CACGTAACGAGCTTCGTA
Int_sma1887_A	CAAATCGCGAAGCGGTCAT
Int_sma1887_B	CTTCACGTCGACGCCTTGC

### 1.4. Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Restriktionendonucleasen	Peq-Lab
T4-DNA Ligase	Roche
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Peq-Lab
<i>Pfu</i> -Polymerase	Qiagen
RNaseA	Qiagen
DNaseA	Qiagen
DNA molecular weight marker	Roche
Superscript II RT	Invitrogen

### 1.5. Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aceton	Roth
Agar	GIBCO
Agarose	SeaKem
dNTPs	Qiagen
Ethanol	Roth
Isopropanol	Roth
LB Base/Agar	GIBCO
B-Mercaptoethanol	Roth
HCl	Roth
Tris	ICN Biomedicals
Tryptone	Oxoid
Yeast Extract	Oxoid

### 1.6. Kits

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
QIAprep Miniprep	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Rneasy Minikit	Qiagen
Rnase-Free DNase Set	Qiagen
CyScribe Purification Kit	Amersham Biosciences
DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer

### 1.7. Materialien

Material	Bezugsquelle
Eppendorfgefäße	Greiner/Star Lab/Brand
Glaswaren	Schott
Küvetten	Brand
Nitrilhandschuhe	Ansell
Parafilm	American
PCR-Stripes	Biozym
PE-Röhrchen	Greiner
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Greiner/Star Lab
Sterilfilter	Schleicher & Schuell

### 1.8. Software

Programm	Referenz
BLAST	(Altschul <i>et. al.</i> , 1997)
Clone Manager 6.0	Sci Ed Central
EMMA	(Dondrup <i>et. al.</i> , 2003)
Genesis	Sturn, 2001; <a href="http://genome.tugraz.at/Software/GenesisCenter.html">http://genome.tugraz.at/Software/GenesisCenter.html</a>
ImaGene	Bio Discovery

### 1.9. Medien und Medienzusätze

#### 1.9.1. Nährmedien

<b>LB-Medium</b> (Miller, 1972)	10 g/l 5 g/l 5 g/l	Bacto Tryptone Yeast Extract NaCl
<b>TY-Vollmedium</b> (Beringer, 1974)	5 g/l 3 g/l 0,7 g/l	Tryptone Yeast Extract CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
<b>10x Hogness-Freeze Medium</b>	63 g/l 18 g/l 1 g/l 5 g/l 9 g/l 44 % (v/v)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> Na-Citrat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Glycerin
<b>Vincent Minimal Medium</b> (nach (Vincent, 1970), modifiziert) Lösung A	10 g/l	Mannose oder Mannit

## C. Material und Methoden

---

	1 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,6 g/l	KNO <sub>3</sub>
Lösung B	2,5 g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	1 g/l	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
Lösung C (steril filtriert)	0,1 mg/ml	Biotin
	0,1 mg/ml	Ca-Pantothenat
	0,1 mg/ml	Thiamin
FeCl <sub>3</sub> Stocklösung (steril filtriert)	10 g/l	FeCl <sub>3</sub>
	2,78 g/l	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O

Alle Lösungen werden getrennt autoklaviert bzw. steril filtriert. Anschließend werden gemischt:

- 900 ml Lösung A
- 100 ml Lösung B
- 1 ml Lösung C
- 1 ml FeCl<sub>3</sub> bzw. FeSO<sub>4</sub> Stocklösung

### 1.9.2. Medienzusätze

<b>für Festmedien</b>	16 g/l	Agar
<b>für β-Galactosidase Nachweis</b>		
X-Gal-Stammlösung	40 mg/ml	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid in N-N-Dimethylformamid (DMF)
IPTG-Stammlösung	25 mg/ml	Isopropylthiogalactosid (IPTG)

Zu 1 l Medium wird jeweils 1 ml der jeweiligen Stammlösung gegeben.

### 1.9.3. Antibiotikazusätze

Die Antibiotika werden steril filtriert und jeweils 1 ml zu 1 l des bereits abgekühlten Mediums gegeben:

<b>Antibiotikum</b>	<b>Abkürzung</b>	<b><i>S. meliloti</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>
Kanamycin	Km	-	50 mg/l
Neomycin	Nm	80 mg/l	-
Streptomycin	Sm	600 mg/ml	-

---

### 1.9.4. Puffer und Lösungen

#### Puffer für Bakterien

<b>PS (Puffersaline)</b>	7 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5 g/l	NaCl
<b>SM-Puffer</b>	100 mM	NaCl
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	10 mM	Tris

#### DNA- und Enzypuffer

<b>TE-Puffer</b>	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA pH 7,5
<b>OPA –Puffer Plus</b>	10x	Pharmacia Biotech

#### Puffer und Lösungen für DNA-Isolationen

<b>E1-Lyislösung</b>	25 % (w/v)	Saccharose
	10 % (w/v)	Ficoll
	nach Autoklavieren zugeben:	
	0,4 mg/ml	RNase A
	1 mg/ml	Lysozym
<b>Na-Acetat</b>	3 M	Na-Acetat pH 5,3
<b>EDTA</b>	25 mM	EDTA pH 8
<b>RNase-Lysozym-Lösung</b>	1 mg/ml	RNase A
	2 mg/ml	Lysozym in TE-Puffer lösen
<b>Saccharose-Lösung</b>	20 % (w/v)	Saccharose in TE-Puffer
<b>Proteinase K-Stocklösung</b>	20 mg/ml	Proteinase K in TE-Puffer
<b>N-Lauroylsarcosin-Na-Lsg.</b>	5 % (v/v)	N-Lauroylsarcosin-Na-Salz in TE-Puffer
<b>Proteinase K-Lauroylsarcosin-Lsg.</b>	25 µl	Proteinase K-Stocklösung
	1,2 ml	N-Lauroylsarcosin-Na-Lsg.

### Puffer und Lösungen für Agarosegele

<b>TAE-Puffer</b>	40 mM 10 mM 1 mM	Tris Na-Acetat EDTA pH 7,8
<b>BPB/Glycerinlösung</b>	50 % (v/v) 1 mM 2 mg/ml	Glycerin in TAE-Puffer EDTA Bromphenolblau
<b>Agarosegel</b>	0,5-2 % (w/v)	Agarose in TAE-Puffer

## 2. Methoden

### 2.1. Kultivierung von Bakterienstämmen

#### 2.1.1. Bakterienanzucht

*E. coli*-Stämme werden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. Eine Anzucht der *S. meliloti*-Stämme erfolgt in TY oder in Vincent Minimalmedium (VMM) für 36-48 h bei 30 °C. Die Anzucht von Bakterienstämmen auf Festmedium wird durch einen Einzelkoloniausstrich und anschließende Inkubation im Brutschrank vorgenommen. Die Kultivierung von Bakterienstämmen im Flüssigmedium erfolgt durch Animpfen einer Einzelkolonie von einer Stammpatte. Dann wird die Kultur im Roller oder im Schüttler inkubiert.

Für Wachstumstests werden aus einer Vorkultur jeweils eine definierte Anzahl an Bakterienzellen in entsprechende Medien überimpft. Bei Bedarf werden zusätzlich entsprechende Antibiotika hinzugegeben.

#### 2.1.2. Anzucht von Kulturen für pH-Stress-Experimente

*S. meliloti* 1021 Kulturen werden in Erlenmeierkolben bei 30 °C in Vincent Minimalmedium angezogen und bei 140 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer o.D.<sub>580</sub> von 0,8 wird die Kultur in zwei gleiche Teile aufgeteilt und zentrifugiert (10000xg, 2 min, 30 °C). Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets jeweils in frischem VMM mit saurem pH und VMM mit pH 7 (beide auf 30 °C vorgewärmt) resuspendiert. Die pH-Werte des VMM Mediums werden vor dem Autoklavieren mit Hilfe des pH-Meters eingestellt, indem die VMM-Lösung A mit entsprechenden Mengen an HCl oder NaOH versetzt wird. Während der Zentrifugations- und Resuspensionsschritte ist darauf zu achten, dass sämtliche Arbeitsmaterialien auf 30 °C vorgewärmt sind. Die resuspendierte Kultur wird dann wie zuvor bei 140 rpm und 30 °C geschüttelt. Zu definierten Zeitpunkten werden anschließend parallel 5 ml der Kultur mit saurem pH und der Referenz-Kultur (in VMM pH 7) geerntet und sofort zentrifugiert (10000xg, 1 min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das resultierende Pellet sofort durch flüssigen Stickstoff eingefroren.

### 2.1.3. pH-abhängige Wachstumstests auf VMM-Festmedium

VMM-Festmediumplatten werden durch Einstellen des pH-Wertes von VMM Lösung A vor dem Autoklavieren hergestellt. Der Agar wird ebenfalls vor dem Autoklavieren der Lösung A zugesetzt (16 g/l). Es ist zu beachten, dass sich durch diese Methode keine Agarplatten mit einem pH-Wert < 5,5 herstellen lassen, da der Agar unterhalb dieses pH-Wertes nicht bindet. Da sich der pH-Wert durch das Autoklavieren verändert, wird der pH nach Fertigstellung des VMM-Festmediums abermals gemessen.

Einzelkolonien von *S. meliloti* Kulturen werden o/n bei 30 °C in TY-Medium gerollert. Nach Zentrifugation der o/n Kulturen (10000xg, 2 min) wird der Überstand verworfen und die Zellpellets in Sm-Puffer (ohne Zusatz von Tris) resuspendiert. Die o.D.<sub>580</sub> der resultierenden Kultur wird gemessen und durch Zusatz von Sm-Puffer auf 1 eingestellt. 5 µl der Kultur werden auf die VMM-Festmediumplatten (Referenz pH und Test pH) getropft. Nach 1d Inkubation im Brutschrank (30 °C) wird das Wachstum der Kulturen verglichen (ggf. durch Fotos protokolliert). Je nach gewähltem VMM-pH wird dieser Schritt nach 2 d und 3 d wiederholt.

### 2.1.4. Herstellung von Dauerkulturen

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

Bakterienkultur auf Platte anziehen

mit Glaspipette Bakterien von Platte abnehmen und in 500 µl Nährmedium resuspendieren

500 µl Glycerin (87 %) hinzugeben

30 min bei RT inkubieren, dann bei –20 °C einfrieren

Für eine dauerhaftere Lagerung empfiehlt es sich, die Kulturen bei –80° C in HF-Medium einzufrieren.

Bakterien in 10 ml Nährmedium o/n anziehen

1 ml 10x Hogness-Freeze-Medium hinzugeben

– aliquotieren und bei –80 °C einfrieren

## 2.2. DNA-, RNA-Isolations- und Darstellungsmethoden

### 2.2.1. Gesamt-DNA-Isolation aus *S. meliloti*

(nach Meade et. al., 1982, modifiziert nach Simon)

Um Gesamt-DNA aus *S. meliloti* zu isolieren, muss zunächst die äußere Membran durch EDTA-Behandlung destabilisiert werden. Anschließend erfolgt die Zerstörung der Zellwand durch Lysozym. Die eigentliche Lyse der Zelle erfolgt durch ein Detergenz in Form von Lauroylsarcosin. Die anschließende Phenolextraktion dient dem Entfernen von Proteinverunreinigungen im Lysat. Eine weitere Reinigung der DNA erfolgt durch Isopropanolpräzipitation und anschließendem Waschen mit Ethanol. Bei der gesamten Extraktion muß darauf geachtet werden, dass die DNA nicht gescheert wird.

6 ml einer o/n-Kultur in PE-Röhrchen überführen

Zentrifugation, 5 min, 5000xg, RT

Pellet in 800µl 20 % Saccharose-Lsg. resuspendieren

30 min bei –20 °C inkubieren

600 µl RNase-Lysozym-Lösung hinzufügen  
1 h bei 37 °C rollern  
500 µl Proteinase K-Lauroylsarcosin-Lsg. hinzufügen  
1,5 h bei 37 °C rollern  
250 µl TE-Puffer und 250 µl 3M Na-Acetat hinzufügen, durch invertieren mischen  
1ml Phenol-Chloroform (1:1) zugeben und ca. 5 min invertieren  
Zentrifugation, 10 min, 4000xg, 12 °C  
obere Phase in neues PE-Röhrchen, gegebenenfalls Phenolisierung wiederholen  
1 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zu der Oberphase geben und ca. 5 min. invertieren  
Zentrifugation, 10 min, 4000xg, 12 °C  
obere Phase in neues PE-Röhrchen überführen, gleiches Volumen an kaltem Isopropanol zugeben, und schütteln bis DNA ausfällt  
Zentrifugation 20 min, 4000xg, 4 °C; Überstand abziehen  
1 ml 70% Ethanol zugeben, 5 min bei RT inkubieren  
Zentrifugation, 5 min, 4000xg, 4 °C; Überstand abziehen  
DNA-Pellet bei 60 °C trocknen  
Pellet in 200-300 µl H<sub>2</sub>O o/n bei 4 °C lösen

### 2.2.2. Kochlyse von *S. meliloti*-Zellen

Durch kochen werden Zellen lysiert und deren DNA freigesetzt. Dieses Lysat ist zwar noch von Zellbestandteilen verunreinigt, aber für gewöhnlich ist die DNA trotzdem für PCR-Reaktionen geeignet.

mit Glaspipette Bakterien aufnehmen und in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendieren  
8 min bei 100 °C kochen  
Zelltrümmer abzentrifugieren, 8000 rpm, 1 min  
4 µl des Lysats werden für eine PCR-Reaktion mit 50 µl Gesamtvolumen eingesetzt

### 2.2.3. Plasmidisolierung aus *E. coli* (QIAprep Spin Miniprep Kit Protokoll)

Mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN können Plasmide rasch isoliert werden. Nachdem die Zellen mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen worden sind, erfolgt eine Neutralisierung des Lysats unter salzreichen Bedingungen. Chromosomale DNA, Zelltrümmer, sowie denaturierte Proteine können nun präzipitiert und von der Plasmid-DNA abgetrennt werden. Die Aufreinigung der Plasmide geschieht dann in Säulen in einer Zentrifuge.

### 2.2.4. Eckhardt-Lyse von *E. coli*-Zellen (Hynes et. al., 1985)

Diese Methode dient der raschen Kontrolle von Zellen auf ihren Plasmidgehalt. Dabei werden Zellen direkt in den Taschen des Agarosegels durch Lysozym und SDS-Einwirkung lysiert. Die freigesetzten Plasmide werden anschließend im Gel aufgetrennt.

0,8-1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufkochen  
nach Abkühlen des Gels of ca. 60 °C 1ml 20 % (w/v) SDS-Lösung zugeben, Gel gießen  
geringe Mengen einer Einzelkolonie mit sterilem Zahnstocher aufnehmen und in 10 µl TE-Puffer resuspendieren  
Zugabe von 20 µl E1-Lysislösung  
20 µl der Probe auf Gel auftragen  
die Proben in den Taschen ca. 15 min inkubieren  
Vorlauf: 15-20 min bei 20 V  
Hauptlauf 2-3 h bei 80-100 V  
2 h wässern, regelmäßig Wasser wechseln  
Gel in Ethidiumbromid-Bad färben, anschließend wässern  
Detektion der Plasmide unter UV-Licht

### 2.2.5. RNA-Isolation

Mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits wird ein modifiziertes Protokoll für RNA-Isolationen aus *S. meliloti* 1021 verwandt:

10 µl β-Mercaptoethanol zu 1 ml RLT-Puffer geben (unter Abzug arbeiten!, 700 µl pro Pellet im Eppi)  
700 µl RLT in Ribolysertubes geben (Lysing Matrix B/ blauer Deckel) und auf Eis stellen  
Pellets in 200 µl Tris-HCl (steril, pH 8, 10 mM) resuspendieren durch Auf und Abpipettieren in Ribolysertubes überführen  
Ribolyser: 30 sec bei 6,5  
3 min auf Eis  
3 min bei 14000 rpm zentrifugieren (4 °C)  
Überstand (ca. 900 ml) in neues RNasefreies Eppi pipettieren (ohne Matrix!)  
3 min bei 14000 rpm zentrifugieren (4 °C)  
Überstand in Greiner-Röhrchen überführen (ohne Matrix!) und jew. 450 µl Lysat mit 250 µl Ethanol (96-100 %) durch Invertieren vermischen bis das Gemisch schlierenfrei ist  
750 µl pro Säule auftragen  
30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren  
Durchfluss verwerfen und ca. 750 ml Lysat abermals auf die Säule geben  
30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren  
Durchfluss verwerfen und den Rest des Lysates abermals auf Säule geben  
30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren  
neues 2 ml Collectiontube unterstellen  
500 µl RW1 Puffer waschen, 30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
500 µl RPE Puffer waschen, 30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
500 µl RPE Puffer waschen, 30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
2 min bei 14000 rpm zentrifugieren  
neues 1,5ml Eppi (Deckel abschneiden) unterstellen  
30 µl RNase freies Wasser auf Filter pipettieren, Säule 1 min stehen lassen

1 min bei 14000 rpm zentrifugieren  
Elutionsschritt wiederholen  
1 µl eluierte RNA abpipettieren und mit 49 µl Wasser zum Messen der o.D.<sub>260/280</sub>  
3 µl DNase und 6 µl RDD-Puffer zu 60 µl Eluat geben und 1 h bei 30°C inkubieren  
77 µl RNA-Eluat und 200 µl RLT-Puffer (+βME) und 150 µl EtOH mischen und auf eine Säule geben (bis ca.900 µl pro Säule)  
30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
350 µl RW1 Puffer  
30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
350 µl RW1 Puffer  
30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
neues 2 ml Collectiontube unterstellen  
500 µl RPE  
30 sec bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
500 µl RPE  
2 min bei 14000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen  
Säule in 1,5 ml Eppi stellen (Deckel abschneiden)  
30-50 µl RNase freies Wasser auf die Säule geben  
1 min bei 14000 rpm zentrifugieren  
eluierte RNA in RNasefreies Eppi transferieren  
bei -80 °C lagern  
1µl mit 49 µl Wasser für 2. o.D. Messung vermischen

### 2.2.6. Aufkonzentrierung von RNA

RNA wird mit Microcon-30 Filtern von Millipore aufkonzentriert. Das Aufkonzentrieren besteht aus einer Reihe von Zentrifugations- und Waschschritten, die Prozedur sorgt daher zusätzlich für eine weitere Aufreinigung der RNA:

Microcon-Filter auf das Sammelgefäß stecken  
20-30 µg RNA auf den Filter geben  
500 µl DEPC-Wasser auf den Filter geben  
10 min zentrifugieren, 12000 rpm  
altes Sammelgefäß verwerfen und neues Sammelgefäß benutzen  
500 µl DEPC-Wasser auf den Filter geben  
10 min zentrifugieren, 12000 rpm  
altes Sammelgefäß verwerfen und neues Sammelgefäß benutzen  
500 µl DEPC-Wasser auf den Filter geben  
8 min zentrifugieren, 12000 rpm  
falls mehr als 16 µl Flüssigkeit auf der Membran sind, in 1 Minutenschritten weiterzentrifugieren und nach jedem Zentrifugationsschritt, die Menge überprüfen  
Microcon umdrehen und auf ein neues Sammelgefäß stecken  
1 min bei 13000 rpm zentrifugieren  
Eluat je nach Bedarf mit MilliQ H<sub>2</sub>O verdünnen  
RNA in RNase freies Eppendorfgefäß überführen

### 2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Visualisierung von DNA. Dabei wird die negativ geladene DNA in einer festen Gelmatrix durch eine angelegte Spannung zur Anode gezogen. Die Wandergeschwindigkeit der DNA hängt von ihrer Größe und Form ab. Durch den Einsatz von Markern kann die Größe eines DNA-Fragmentes bestimmt werden. Durch das interkalierende Reagenz Ethidiumbromid wird die DNA gefärbt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

0,5-2,0 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer ansetzen, kochen und in Gelkammer mit Kamm gießen, erkalten lassen

DNA-Probe mit BPB/Glycerin-Lsg. mischen und in Geltaschen geben  
der Gellauf erfolgt in Abhängigkeit vom Gel zwischen 50-100 V

## 2.3. Klonierungsexperimente

### 2.3.1. Ligation von DNA

Die endständigen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen des Zuckergerüsts von DNA-Molekülen können von Ligase unter Bildung von Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft werden. Voraussetzung ist allerdings, dass diese Fragmente entweder glatte Enden (blunt ends) besitzen, oder dass die Überhänge zueinander komplementär sind (sticky ends).

gespaltene Vektor-DNA und Insert-DNA im Verhältnis von 1:5-15 in Eppendorfgefäß geben

2 µl 10x Ligase-Puffer zugeben

2 Units T4 DNA-Ligase zugeben

mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen

2-4 h bei RT, oder o/n in Thermoskanne mit 20 °C warmem Wasser bei 4 °C inkubieren

### 2.3.2. Transformation von *E. coli*

Durch eine CaCl<sub>2</sub>-Behandlung können *E. coli* Zellen kompetent gemacht werden. Kompetente Zellen sind durch Transformation in der Lage, freie zirkuläre Plasmid-DNA aufzunehmen.

#### Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

*E. coli* aus einer o/n-Kultur in 10 ml frisches Medium überimpfen und bis zur logarithmischen Phase (o.D. von ~0,5) anwachsen lassen

Zentrifugation, 5 min, 5000xg, 4 °C

Pellet in 5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (4 °C) vorsichtig resuspendieren

30 min bei 0 °C inkubieren

Zentrifugation, 5 min, 5000xg, 4 °C

Pellet in 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (4 °C) vorsichtig resuspendieren

Zugabe von 175 µl kaltem Glycerin (87 %)

Zellen in 0,2 ml Portionen aliquotieren

2 h oder o/n bei 0 °C inkubieren

bei -80 °C lagern

#### Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen

DNA zu 200 µl kompetenter *E. coli*-Zellen geben  
Inkubation: 30 min bei 0 °C  
Hitzeschock: 3 min 42 °C  
800 µl LBG zugeben und vorsichtig mischen  
Inkubation: 45 min bei 37°C  
100 µl auf entsprechende Selektionsplatte austreichen  
Zellen abzentrifugieren, Überstand verwerfen  
Zellen im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsplatte austreichen

### 2.3.3. Konjugation nach *S. meliloti*

*S. meliloti* kann weder durch Transformation noch durch Elektroporation DNA aufnehmen. Der DNA-Transfer wird daher durch Konjugation von *S. meliloti* mit einem Donor durchgeführt. Der zu transferierende Vektor muss eine Mobilisierungsregion (*mob-site*) tragen, und *tra*-Gene besitzen.

Anzucht der Donorzellen bis zur logarithmischen Phase (ca. o.D.<sub>580</sub>: 0,4-0,6); der Rezipientenzellen bis zur Stationärphase (ca. o.D.<sub>580</sub> : 0,7-0,9)  
Mischen von  $5 \times 10^7$  Donor- mit  $2 \times 10^8$  Rezipientenzellen  
Zentrifugation 30 sec, 6000 rpm  
Überstand verwerfen, Pellet vorsichtig in Rücklauf resuspendieren  
Kreuzungsfilter auf TY-Platte legen, Konjuganten aufbringen  
o/n bei 30 °C inkubieren  
Kreuzungsfilter in 1 ml H<sub>2</sub>O aufnehmen und 1-2 h bei RT inkubieren  
Verdünnungsreihe anlegen und jeweils 100 µl auf Selektionsplatten auftragen  
Inkubation bei 30 °C bis zum Anwachsen der Transkonjuganten (2-4 d)

## 2.4. PCR-Arbeitstechniken

### 2.4.1. Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)

Standard-PCRs wurden nach Polymerase-Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.4.2. Gene-SOEing

Die Methode des Gene-SOEing erlaubt es, fast beliebige DNA-Sequenzen miteinander zu kombinieren. Durch Gene-SOEing werden Konstrukte zur Deletion von Genen erzeugt. Im ersten Schritt werden zwei PCR-Produkte erzeugt, die den zu deletierenden Bereich flankieren. Durch homologe Verlängerungen (*Extensions*) in den 5'-Enden der Primer der PCR-Produkte werden diese in einer weiteren PCR vereinigt. Bei der Ermittlung der Schmelztemperatur der Primer muß darauf geachtet werden, dass die *Extensions* nicht in die Berechnung miteinbezogen werden dürfen.

Die aufgereinigten PCR-Produkte werden in der Fusions-PCR im Verhältnis 1:1 als *Template* hinzugegeben. Für die Berechnung der *Annealing*-Temperatur sind nur die

Schmelztemperaturen der äußeren Primer, sowie der *Extensions* zu berücksichtigen. Die PCR wird nach den bereits beschriebenen Protokollen durchgeführt.

### 2.4.3. Real Time RT-PCR

Quantitative Real Time RT-PCRs werden mit dem Light Cycler der Firma Roche durchgeführt. Die zuvor isolierte RNA durchläuft im Light Cycler eine reverse Transkription, bei der die *Template*-DNA für die folgende quantitative PCR gebildet wird. Das verwendete QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit enthält den Farbstoff SYBR Green, der sich während der PCR an doppelsträngige DNA bindet und für die quantitative Nachweismöglichkeit der DNA sorgt. Je Ansatz werden folgende Reagenzien in einer Lightcycler Kapillare vereinigt:

10 µl SYBR RT-Master Mix  
1 µl Primer 1 (10 µM)  
1 µl Primer 2 (10 µM)  
0,2 µl LightCycler RT Mix  
300 ng *Template* RNA  
mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen

Programmablauf für die RT RT-PCR im Lightcycler:

1. Reverse Transkription:  
50 °C, 20 Minuten
2. Denaturierung:  
95 °C, 15 Minuten
3. Amplifikation in 55 Zyklen:  
94 °C 15 sec  
55 °C 20 sec  
72 °C 5 sec
4. Schmelzkurvenbestimmung:  
65 °C 10 sec  
Bis 95 °C mit 0,1 °C/s erhitzen

## 2.5. **Microarray-Experimente**

Die transkriptionelle Zellantwort von *S. meliloti* 1021 auf pH-Stress sowie die Auswirkungen verschiedener Gen-Deletionen wurden anhand des Sm6kOligo *Microarrays* (Krol und Becker, 2004) identifiziert. Er besteht aus 6226 Oligonucleotiden mit einer Länge von 70 Nukleotiden. Von diesen sind 6208 Teil von jeweils einem der bekannten Gene aus *S. meliloti*, 4 beinhalten transgene Sequenzen (*gusA*, *lacZ*, *nptII*, *aacCI*), 2 Stringenz-Kontrollsequenzen und 12 Fremd-DNA-Kontrollsequenzen. Um *S. meliloti*-Zellen differentiell mit dem Sm6kOligo-*Microarray* zu vergleichen, wurde aus deren Proben die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und jeweils mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Durch anschließende kompetitive Hybridisierung auf dem *Microarray* können dann Unterschiede in der mRNA-Menge spezifischer Gene detektiert werden.

### 2.5.1. Markierung revers-transkribierter RNA mit Cy3 und Cy5

Für die kompetitive Hybridisierung gegen den Sm6kOligo-*Microarray* müssen die isolierten Gesamt-RNAs aus *S. meliloti*-Zellen mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt werden. Hierzu wird die RNA bei Anwesenheit von Aminoallyl-dUTPs zunächst revers-transkribiert. An die resultierenden Aminoallyl-Reste können in einem weiteren Schritt die Farbstoffe Cy3 oder Cy5 gekoppelt werden.

### **Reverse Transkription:**

10 µg RNA mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf 16 µl auffüllen  
2 µl Hexanukleotide zugeben  
10 min bei 70 °C inkubieren  
5 min bei 0 °C inkubieren  
6 µl 5x First Strand-Buffer  
3 µl 0,1 M DTT  
0,5 µl Rnase-Inhibitor  
0,6 µl 50x dNTPs  
1,5 µl (300 Units) Superscript II Reverse Transkriptase zugeben  
1 h bei 42 °C inkubieren  
1 µl (200 Units) Superscript II zugeben  
1 h bei 42 °C inkubieren  
15 µl 0,2 M NaOH zugeben  
10 min bei 70 °C inkubieren  
15 µl 0,2 M HCl zugeben, mischen  
450 µl MilliQ H<sub>2</sub>O zugeben und auf Microcon-Filter geben  
10 min bei 12000 rpm zentrifugieren  
neues Sammelgefäß benutzen  
450 µl MilliQ H<sub>2</sub>O zugeben  
9 min bei 12000 rpm zentrifugieren  
falls mehr als 20 µl Flüssigkeit auf der Membran sind in 1 min-Schritten Zentrifugation wiederholen  
wenn weniger als 20 µl Flüssigkeit auf dem Microcon verbleiben, umdrehen und auf ein neues Sammelgefäß setzen  
1 min bei 13000 rpm zentrifugieren  
Eluat mit MilliQ H<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen und in RNase freies Eppendorfgefäß überführen

### **Kopplung der Fluoreszenz-Farbstoffe:**

1 µl 1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9) zugeben  
Cy3- und Cy5-NHS Aliquots in gefärbten Eppendorfgefäßen mit der cDNA mischen (Proben vor Licht Schützen !)  
1 h im Dunkeln inkubieren  
4,5 µl Hydroxylamin zugeben  
15 min im Dunkeln inkubieren  
Cy5-markierte Proben mit 600 µl Caputre-Buffer vermischen (CyScribe Purification Kit, Amersham Biosciences)  
Cy3-markierte Proben zugeben  
Aufreinigung nach dem CyScribe Purification Kit-Protokoll  
Qualität der Proben überprüfen (Typhoon Scanner, Nanodrop)

### 2.5.2. Hybridisierung der cDNA gegen den Sm6kOligo-Microarray

Alle Hybridisierungen wurden mit der ASP-Hybridisierungs-Station durchgeführt.  
Dummy Slides 5 min mit deionisiertem Wasser waschen  
Dummy Slides 1 min mit Ethanol (96 % v/v) waschen  
Dummy Slides in der Zentrifuge trocknen  
Dummy Slides in die Hybridisierungskammer der ASP-Station einlegen  
markierte cDNA in der Speed-Vac auf 20-25 µl eindampfen  
mit DIG Easy Hyp-Hybridisierungslösung auf ein Volumen von 250 µl auffüllen  
abzentrifugieren  
ASP-Programm starten  
Dummy Slides durch Array Slides ersetzen  
Hybridisierungslösung auf 65 °C erwärmen  
mit Hamilton-Spritze 250 µl Hybridisierungslösung luftblasenfrei in die Kammer spritzen  
Programm für ca. 15 h ablaufen lassen  
nach Ablauf des Programmes Slides aus den Kammern entfernen  
Slides für 1 min in vorgewärmten 2xSSC mit 0,1 % (w/v) SDS schütteln  
Slides für 1 min in 0,2xSSC mit 0,1% (w/v) SDS 1 min schütteln  
Slides für 1 min in 0,2xSSC mit 0,1% (w/v) SDS 1 min schütteln  
Slides für 1 min in 0,2xSSC schütteln  
Slides für 1 min in 0,2xSSC schütteln  
Slides bei 18 °C in 0,1xSSC schütteln  
Slides durch Abzentrifugieren trocknen  
mit ScanArray 4000 scannen

Nachdem die Slides gescannt worden sind, werden die Bilddateien in Image 5.0 (Biodiscovery Inc., Los Angeles, Calif., USA) analysiert. Durch diese Software wird die mittlere Signalintensität jedes einzelnen *Spots* bestimmt. Hierzu wird das Verhältnis der Intensitäten (Cy3 zu Cy5 bzw.  $ch_{1i}$  zu  $ch_{2i}$ ) jedes einzelnen *Spots* mit der Formel  $M_i = \log_2(R_i/G_i)$ .  $R_i = I_{ch1i} - Bg_{ch1i}$  und  $G_i = I_{ch2i} - Bg_{ch2i}$  berechnet, wobei  $Bg_{ch1i}$  und  $Bg_{ch2i}$  das Hintergrundrauschen des jeweiligen Farbkanals darstellt. Die mittlere Intensität wird für jeden *Spot* berechnet:  $A_i = \log_2(R_i G_i)^{0,5}$ . *Spots* werden als leer behandelt, wenn der R-Wert in beiden Farbkanälen kleiner als 1,5 ist ( $R = (\text{Mittelwert des Signals} - \text{Mittelwert des Hintergrunds}) / \text{Standartabweichung des Hintergrunds}$ ). Die anschließende Normalisierung der Daten und die T-Statistiken werden mit EMMA 2.0 kalkuliert (Dondrup *et al.*, 2003) ([www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/emma](http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/emma)). Für die weiteren Analysen werden die Daten auf einen A-Wert  $\geq 0,8$  gefiltert. Für das durchgeführte Zeitreihen-Experiment wurden nur Gene betrachtet, die zu 5 von 6 Zeitpunkten einen M-Wert hatten. Dieser musste mindestens einmal während des Zeitreihen-Experimentes einen M-Wert von  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  haben. Die Clusterbildung und Visualisierung der Daten erfolgt durch die Software Genesis (Sturn, 2001) ([http://genome.tugraz.at/genesserver/genesserver\\_description.shtml](http://genome.tugraz.at/genesserver/genesserver_description.shtml)).

### 2.5.3. Clusterbildung der Microarraydaten durch k-Means

Im Rahmen dieser Arbeit sind Gene aufgrund ihrer Expressionsdaten durch die Genesis Software in 8 Cluster eingeteilt worden. Diese Software bedient sich verschiedener Verfahren zur Clusterbildung, im Falle der 8 Cluster wurde *k*-Means (Soukas *et al.*, 2000; Tavazoie *et al.*, 1999; Zhaxue Huang, 1997a; Zhaxue Huang, 1997b) eingesetzt. *k*-Means ist ein verbreitetes Verfahren zur Clusterbildung, weil es auf einem einfachen Prinzip beruht und gute Resultate erzielt. Es ist SOM (*Self Organized Maps*) sehr ähnlich und

kann als ein Bayesischer (höchste Wahrscheinlichkeit) Ansatz zur Clusterbildung verstanden werden.

Die grundsätzlichen Ideen dieses Ansatzes sind es, die Lage eines Cluster abzuschätzen und eine Einteilung der Datenpunkte auf die Cluster vorzunehmen. Dabei wird ein Ansatz benutzt, um den anderen neu zu definieren. Wenn also eine Abschätzung der zentralen Lagen der Cluster erfolgt ist, dann wird jeder Datenpunkt dem Cluster mit der ähnlichsten Lage zugeordnet. Danach wird das Zentrum jedes Cluster aufgrund der beinhalteten Datenpunkte neu definiert. Der  $k$ -Means-Algorithmus fährt dann in mehreren Iterationen fort die Datenpunkte den Clustern zuzuordnen und die Lage der Cluster neu zu definieren.

Um die Zuteilung der Datenpunkte vorzunehmen, wird auf eine Kostenfunktion zurückgegriffen.

Der  $k$ -Means-Algorithmus sieht folgendermaßen aus:

1. Weise jeden Vektor einem der  $k$  Cluster zu
2. Kalkuliere den Mittelwert der  $k$  Cluster
3. Kalkuliere die Distanz zwischen dem Objekt und dem Mittelwert des Clusters
4. Weise das Objekt dem Cluster zu, dessen Mittelwert dem Objekt am nächsten ist
5. Kalkuliere jene Cluster neu, denen Objekte zugeteilt oder weggenommen wurden
6. Wiederholte die Schritte 3 bis 5 bis keine Neuzuweisungen mehr vorgenommen werden

## D. Ergebnisse

### 1. Physiologische Charakterisierung von *S. meliloti* 1021 unter pH-Stress

*S. meliloti* 1021 und seine Wirtspflanzen sind Modellorganismen für eine symbiontische Beziehung zwischen Prokaryont und Pflanze. Ein häufig auftretender Faktor, der diese Symbiose behindert, ist ein niedriger pH-Wert des Bodens. Da beide Partner Teil der Symbiose sind, kann man bei dieser funktionellen Beeinträchtigung nur schwerlich einen der beiden Partner als verantwortlich identifizieren, vielmehr müssen beide Partner gesondert betrachtet werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die grundlegenden Mechanismen der rhizobiellen Zellantwort auf azidischen pH-Stress am Beispiel des Modellorganismus *S. meliloti* 1021 aufzudecken, um einen Teil der komplexen Prozesse zu verstehen. Zum Erreichen dieses Zieles wurde die transkriptionelle Antwort der Zelle auf pH-Stress analysiert. In einem weiteren Schritt wurden dann regulatorische Gene, die auf pH-Stress reagierten, mutiert und charakterisiert. Zunächst mussten jedoch die physiologischen Faktoren, innerhalb derer die pH-Stressantwort untersucht werden sollte, festgelegt werden.

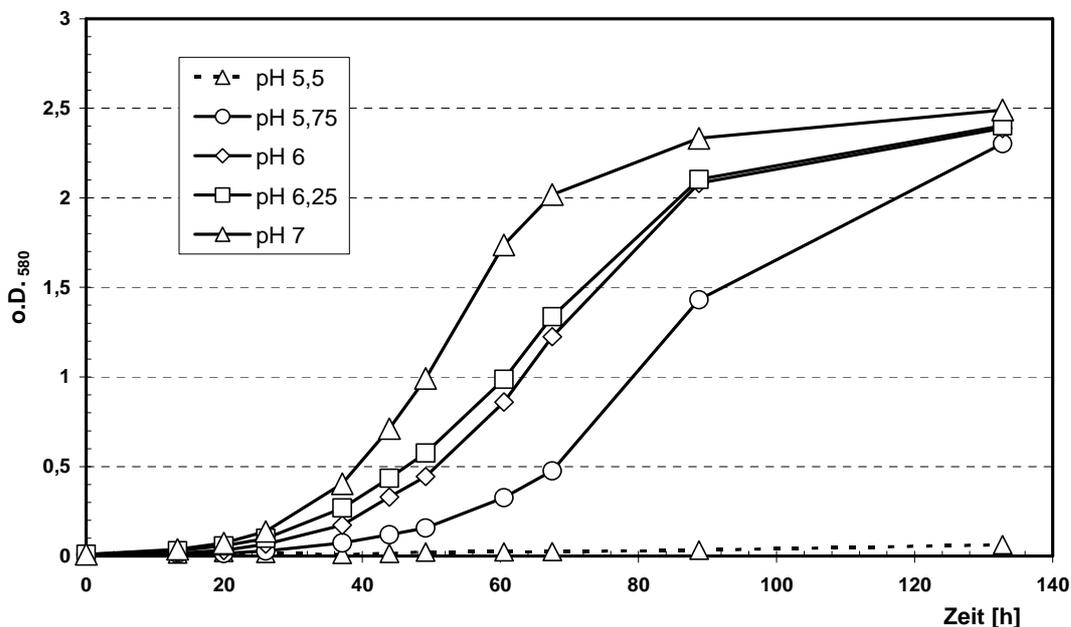
#### 1.1. Ein pH von 5,5 bildet die Untergrenze für Wachstum von *S. meliloti* 1021

Stress bezeichnet zum einen, durch spezifische äußere Reize hervorgerufene physiologische Reaktionen, die zur Bewältigung besonderer Anforderungen befähigen, und zum anderen, die dadurch entstehende Stoffwechselbelastung. Ein eingeschränktes Wachstum bei einem bestimmten pH-Bereich, im Vergleich zum „normalen“ Wachstum, belegt demnach

Stress für das Bakterium. Um den pH-Bereich einzugrenzen, der für *S. meliloti* 1021 Stress bedeutet, wurden daher pH-abhängige Wachstumstests vorgenommen.

Als Wachstumsmedium wurde Vincent Minimalmedium (VMM) (Vincent, 1970) ausgewählt, da dessen Komponenten, im Gegensatz zu einem Vollmedium, definiert sind. Weiterhin entspricht dessen Zusammensetzung mit einfachen Kohlenhydraten und Salzen eher dem Nährstoffangebot innerhalb der Mehrzahl von Böden als bei einem Vollmedium. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Erlenmeyerkolben bei 30° C.

Da die pH-Stressantwort des Bakteriums auf einen niedrigen pH untersucht werden sollte und nicht bekannt war, ab welchem pH-Bereich *S. meliloti* 1021 gestresst ist, wurde dessen Wachstumsgeschwindigkeit zu 5 unterschiedlichen pH-Startwerten getestet (Abb. D-1). Mit HCl und NaOH ist der pH-Startwert des jeweiligen Testmediums eingestellt worden. Getestet wurden pH 5,5, pH 5,75, pH 6, pH 6,25 und pH 7. Die Zelldichten der Kulturen wurden indirekt über die Messung der optischen Dichte bei 580 nm ermittelt. Die Messpunkte wurden von drei parallel angezogenen biologischen Replikaten bestimmt und deren Mittelwert errechnet.



**Abbildung D-1: pH-abhängiges Wachstum von *S. meliloti* 1021 in VMM.** Der Wildtyp wurde bei fünf unterschiedlichen pH-Stufen auf sein Wachstum untersucht. Die Zelldichte innerhalb der angezogenen Kulturen wurde indirekt über die optische Dichte bei 580 nm bestimmt (y-Achse) und gegen die benötigte Inkubationszeit aufgetragen (x-Achse). Die Symbole der Wachstumsgrafiken geben den jeweiligen Start-pH des VMM Mediums an. Jeder Messpunkt wurde aus dem Mittelwert von drei biologischen Replikaten errechnet. Die Standardabweichungen sind ebenfalls für jeden Punkt angegeben, da diese aber gering waren, verschwinden sie größtenteils unter den eingezeichneten Messpunkten.

Die so erhaltene Wachstumskurve zeigt den üblichen sigmoiden Verlauf bei der Referenzkultur (pH 7), mit dem Ende der lag-Phase ca. 40 h nach Inkubationsbeginn, dem logarithmischen Wachstumsverlauf von 40 – 70 h nach Inkubationsbeginn und dem Eintritt in die stationären Phase ab ca. 70 h nach Inkubationsbeginn. Bis auf die Kultur mit dem Start-pH von 5,5 zeigen alle Testkulturen in gradueller Abstufung einen ähnlichen Wachstumsverlauf. Ein höherer Start-pH führte zu signifikant höheren Zelldichten pro Zeiteinheit. Die deutlich reduzierte Zellteilung einer *S. meliloti* Kultur bei pH 5,5 im Vergleich zu pH 5,75 zeigt an, dass hier ein physiologischer Grenzbereich vorliegt. Ein pH von 5,5 scheint der minimale Wert für eine *S. meliloti* Kultur zu sein, bei dem in VMM noch Wachstum möglich ist.

### 1.2. *S. meliloti* 1021 alkalisiert das Wachstumsmedium VMM

Die Anzucht der *S. meliloti* 1021 Kulturen in einem Testsystem wie einem Erlenmeyerkolben führt zwangsläufig zu einer kontinuierlichen Veränderung der Medienzusammensetzung, da Inhaltsstoffe aufgenommen und metabolisiert werden, die dann später als Katabolyte wieder ausgeschieden werden. Weiterhin gelangen Komponenten der Zellhülle und sekretierte Proteine in das Medium. Da dieser Prozess auch Einfluss auf den pH-Wert des Mediums haben kann, ist nach dem pH-abhängigen Wachstumstest (Abb. D-1) eine End-pH Bestimmung durchgeführt worden (Tab.D-1).

**Tabelle D-1:** Die Veränderung des Medium pH-Wertes nach 132 h Inkubation mit *S. meliloti* 1021.

Ausgangs-pH <sup>1</sup>	End-pH nach 132 h Inkubation <sup>2</sup>	pH-Differenz <sup>3</sup>
5,5	5,46	-0,04
5,75	6,69	0,94
6	6,70	0,70
6,25	6,84	0,59
7	7,20	0,20

<sup>1</sup> Der Ausgangs-pH entspricht dem pH-Wert des VMM zum Zeitpunkt des Animpfens.

<sup>2</sup> Der VMM End-pH wurde nach Abzentrifugieren der Zellen nach 132 h Inkubation bestimmt.

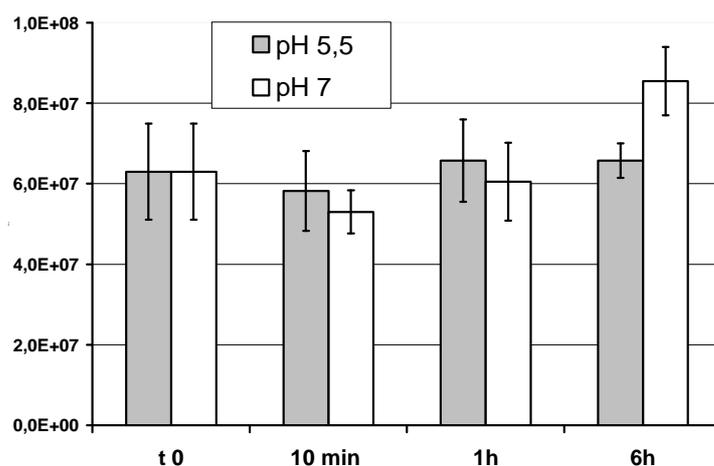
<sup>3</sup> Die pH-Differenz entspricht der Veränderung des pH-Wertes während der 132 h Inkubation.

Wie die Ergebnisse der End-pH Messung belegen, führt das Wachstum von *S. meliloti* 1021 zu einer Veränderung des Medium pH-Wertes. Mit Ausnahme der bei pH 5,5 angezogenen Kultur erreichten alle Testkulturen einen End-pH, der nahe dem Neutralpunkt

lag. Das Wachstum dieser Kulturen führte somit zu einer deutlichen Alkalisierung des Nährmediums. Die bei pH 5,75 angezogene Kultur alkalisierte das Medium mit einer Änderung um pH 0,94 am stärksten. Auch im Falle eines Ausgangs-pH bei 7 wurde das Medium noch leicht alkalisiert und erreichte einen End-pH von 7,20. Einzig bei der Testkultur mit pH 5,5 konnte nach 132 h keine Alkalisierung festgestellt werden. Da jedoch die Zelldichte der pH 5,5 Kultur zu diesem Zeitpunkt ( $t_{132} = o.D._{580} 0,064$ ) deutlich unter dem Wert der übrigen Anzuchten lag ( $t_{132} \approx o.D._{580} 2,4$ ) ist keine direkte Vergleichbarkeit gegeben. Die Messung der End-pH-Werte verdeutlicht, dass die Verläufe des pH-abhängigen Wachstums (Abb. D-1) nur in der lag-Phase aussagekräftig sind, da sich das Medium zunehmend alkalisiert.

### 1.3. Ein pH 5,5 in VMM ist nicht letal für *S. meliloti* 1021

Um sicherzustellen, dass der niedrige Start-pH von 5,5 nicht letal für *S. meliloti* 1021 ist, wurde zusätzlich eine Zelltitrier-Bestimmung vorgenommen. Hierfür ist zunächst eine *S. meliloti* 1021 Kultur bei pH 7 in VMM bis zu einer  $o.D._{580}$  von 0,8 angezogen worden. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium getrennt und zu gleichen Teilen in frischem Medium bei pH 7 (als Referenz) und bei pH 5,5 resuspendiert. Zu vier Zeitpunkten wurde der Zelltiter bestimmt: Unmittelbar vor der Resuspension, 10 min-, 1 h- und 6 h nach Resuspension (Abb. D-2).



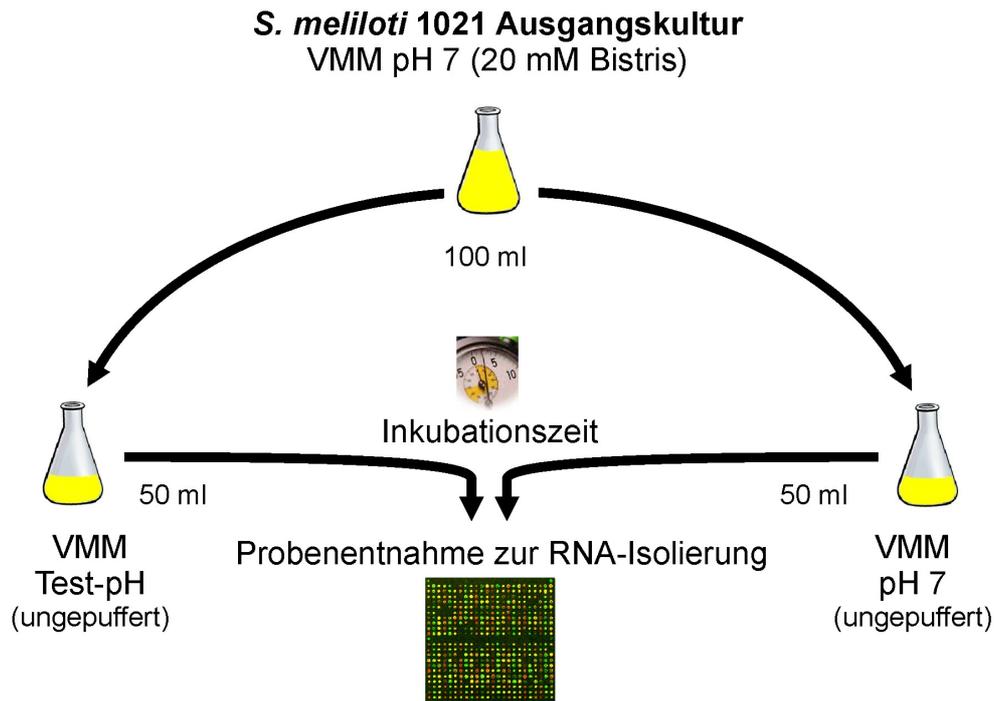
**Abbildung D-2: Zelltitrierbestimmung nach Umsetzen einer *S. meliloti* 1021 Kultur in VMM-Medium mit pH 5,5.** Nach 10 Minuten, 1 h und 6 h Inkubationszeit bei pH 5,5 und pH 7 (Referenz) wurde der Zelltiter für beide Kulturen bestimmt. Die Balkenhöhe entspricht dem Zelltiter, die Farbe der Balken gibt den pH-Wert des Mediums an (grau = pH 5,5; weiß = pH 7). Der Zelltiter wurde von vier parallel ausgestrichenen Festmediumplatten bestimmt und deren Standardabweichung errechnet.

Der Vergleich des Zelltiters zu den vier verschiedenen Zeitpunkten zeigte, dass ein pH-Wert von 5,5 nicht letal für *S. meliloti* 1021 Zellen ist. Bis zu einer Stunde nach Umsetzen der Kultur war, innerhalb der biologischen und messtechnischen Schwankungen, keine Zunahme des Zelltiters zu registrieren. Diese Stagnation war für die bei pH 5,5 inkubierte Kultur auch 6 Stunden nach Umsetzen zu beobachten, während der Zelltiter der bei pH 7 inkubierten Kultur, nach 6 Stunden signifikant zugenommen hatte. Die Resultate aus der Zelltiterbestimmung belegen und ergänzen somit die vorangegangenen Wachstumstests. Eine Zunahme des Zelltiters, der bei pH 5,5 inkubierten Zellkultur, war innerhalb der 6 h Inkubationszeit nicht signifikant messbar.

## **2. Identifikation der Rahmenbedingungen für die Untersuchungen der transkriptionellen pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021 in einer Zeitreihe**

Da es das Ziel dieser Arbeit war, durch transkriptionelle Analysen die pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021 zu erfassen und potentiell involvierte regulatorische Gene zu identifizieren, mussten zunächst Rahmenbedingungen festgelegt werden, unter denen diese Analysen durchgeführt werden können.

Wie der Wachstumstest belegen konnte, wird das Wachstum von *S. meliloti* durch sauren pH eingeschränkt und das Medium kontinuierlich alkalisiert. Während das pH-abhängige Wachstum von *S. meliloti* 1021 (Abb. D-1) in der lag-Phase die deutlichsten Unterschiede zeigte, sind die Unterschiede in der log-Phase nur noch gering. Dies könnte entweder bedeuten, dass die Zellen nach Eintritt in die log-Phase bereits eine Adaptionsphase abgeschlossen hatten oder sich der pH zu diesem Zeitpunkt bereits soweit alkalisiert hat, dass ein relativ gutes Wachstum möglich war. Es stand daher fest, dass die Untersuchung der transkriptionellen Antwort von *S. meliloti* 1021 auf sauren pH zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach Stressen der Zellen untersucht werden sollte. Dies würde sicherstellen, dass die Adaptionsphase erfasst wird und würde außerdem die Konstanz des pH-Wertes gewährleisten. Die gewonnenen Erkenntnisse der vorhergehenden physiologischen Charakterisierungen von *S. meliloti* wurden in ein Arbeitsschema integriert (Abb. D-3), anhand dessen pH-Stress-Experimente durchgeführt werden sollten.



**Abbildung D-3: Arbeitsschema der Behandlung einer *S. meliloti* 1021 Ausgangskultur zur Analyse der Zellantwort auf azidischen pH.** 100 ml einer Wildtypkultur wurden in VMM angezogen (auf pH 7,0 eingestellt und gepuffert mit 20 mM BisTris) und nach Erreichen einer o.D. <sub>580</sub> von 0,8 in zwei gleiche Teile aufgeteilt und abzentrifugiert. Die resultierenden Zellpellets wurden daraufhin in frischem Medium mit dem Test-pH und dem Referenz-pH (pH 7,0) für eine bestimmte Zeit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden Proben für die RNA-Isolation gezogen.

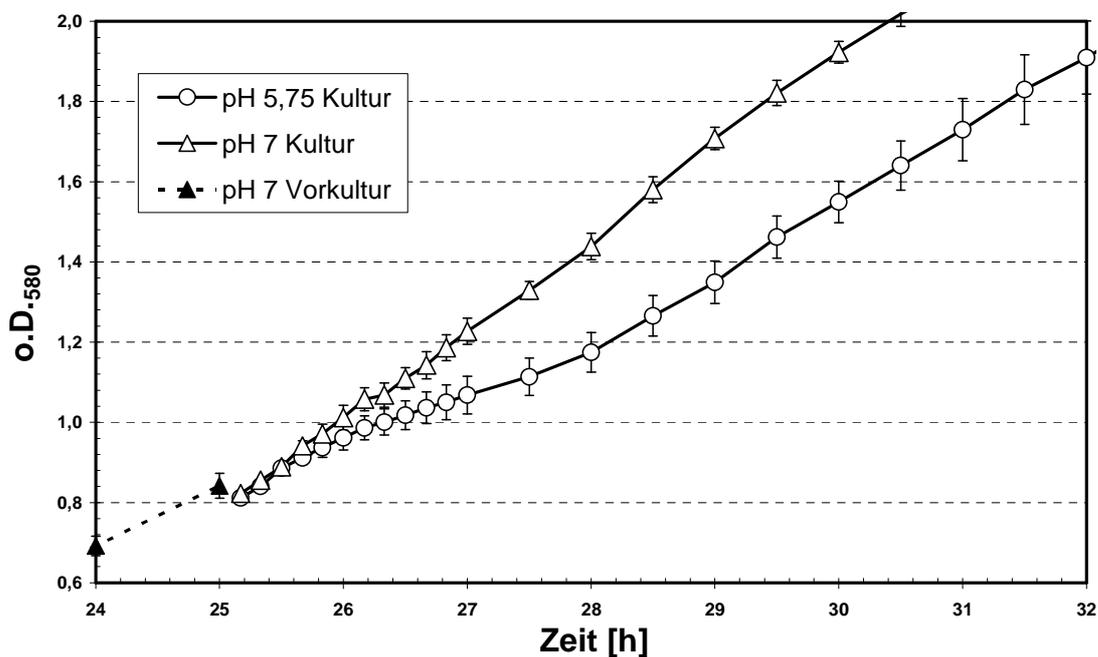
## 2.1. Physiologische Charakterisierung von *S. meliloti* während der pH-Stressuntersuchung

Entscheidend war die Auswahl eines pH-Wertes, der *S. meliloti* Zellen in ihrem Wachstum beeinträchtigt, nicht aber völlig hindert. Sollte kein Zellwachstum nach pH-Stress stattfinden, würde dies bei Untersuchungen des Transkriptoms zur Folge haben, dass eine große Menge mit dem Zellwachstum assoziierter Gene als pH-abhängig reguliert identifiziert werden würden. Der Kern der Zellantwort auf pH-Stress würde so überlagert werden.

Wie der Wachstumstest belegt hatte (Abb. D-1), sind die Zellen nach Anzucht bei pH 5,75 in ihrer Zellteilungsrate wesentlich langsamer als bei neutralem pH. Im Vergleich zur Situation nach Anzucht bei pH 5,5 jedoch, findet noch eine signifikante Zellteilung statt. Aus diesem Grund wurde pH 5,75 zum Stressen der Zellen nach dem Arbeitsschema (Abb. D-3) ausgewählt. Nach dem Stressen wurde das Wachstum der pH 5,75 Kultur und der pH 7 Kultur beobachtet. Hierzu wurde eine Ausgangskultur in VMM bei pH 7 angezogen. Um den pH-Wert konstant zu halten, wurde dem Medium zusätzlich 20 mM BisTris zur Pufferung zugesetzt. Nach Erreichen einer o.D. <sub>580</sub> von 0,8 wurde die Zellkultur in zwei gleiche Teile

geteilt und zentrifugiert. Während des Umsetzens wurden sämtliche Materialien, mit denen die Zellkultur in Kontakt gekommen ist, auf 30° C vorgewärmt (Rotor, Zentrifugenbecher, Wechselmedium, Pipetten). Die erhaltenen Zellpellets wurden dann in VMM mit pH 5,75 und in VMM mit pH 7 (Referenzkultur) resuspendiert.

Um die physiologische Situation der *S. meliloti* 1021 Zellen nach der Behandlung zur Induktion des pH-Stresses zu untersuchen, ist die o.D.<sub>580</sub> während des Versuches gemessen worden (Abb. D-4). Die Wachstumsgraf, der bei pH 7 und bei pH 5,75 inkubierten Kulturen, gehen scherenförmig auseinander. Die bei pH 7 inkubierte Kultur zeigte trotz Zentrifugation und Resuspension weiterhin einen linear verlaufenden Wachstumsgraf. Die Behandlung der Zellen hatte demnach keinen nachteiligen Effekt auf das Zellwachstum. Der Wachstumsgraf der gestressten Kultur verläuft erst ca. 2,5 h nach Induktion des Stresses linear, davor findet die Adaptionphase statt. Die Sattelstelle des Grafen, der bei pH 5,75 inkubierten Kultur, deutet an, dass die Adaptionphase nach ca. 1,5 h zu großen Teilen abgeschlossen ist.



**Abbildung D-4: Vergleich des Wachstums von *S. meliloti* 1021 nach einem Umsetzen in Medium mit pH 5,75.** Eine Ausgangskultur, die bei pH 7 inkubiert wurde, ist in zwei Teile aufgeteilt worden. Die zwei resultierenden Kulturen wurden anschließend in frisches VMM umgesetzt, das auf pH 5,75 (Kreis) und pH 7,0 (Dreieck) eingestellt wurde. Der weitere Verlauf des Wachstums wurde gemessen (y-Achse: o.D.<sub>580</sub>). Die x-Achse entspricht der Zeit in Stunden seit Inkubationsbeginn der Ausgangskultur. Die Unterbrechung der Linie ergibt sich aus der Prozedur des Teilens, Zentrifugierens und Resuspendierens der Ausgangskultur.

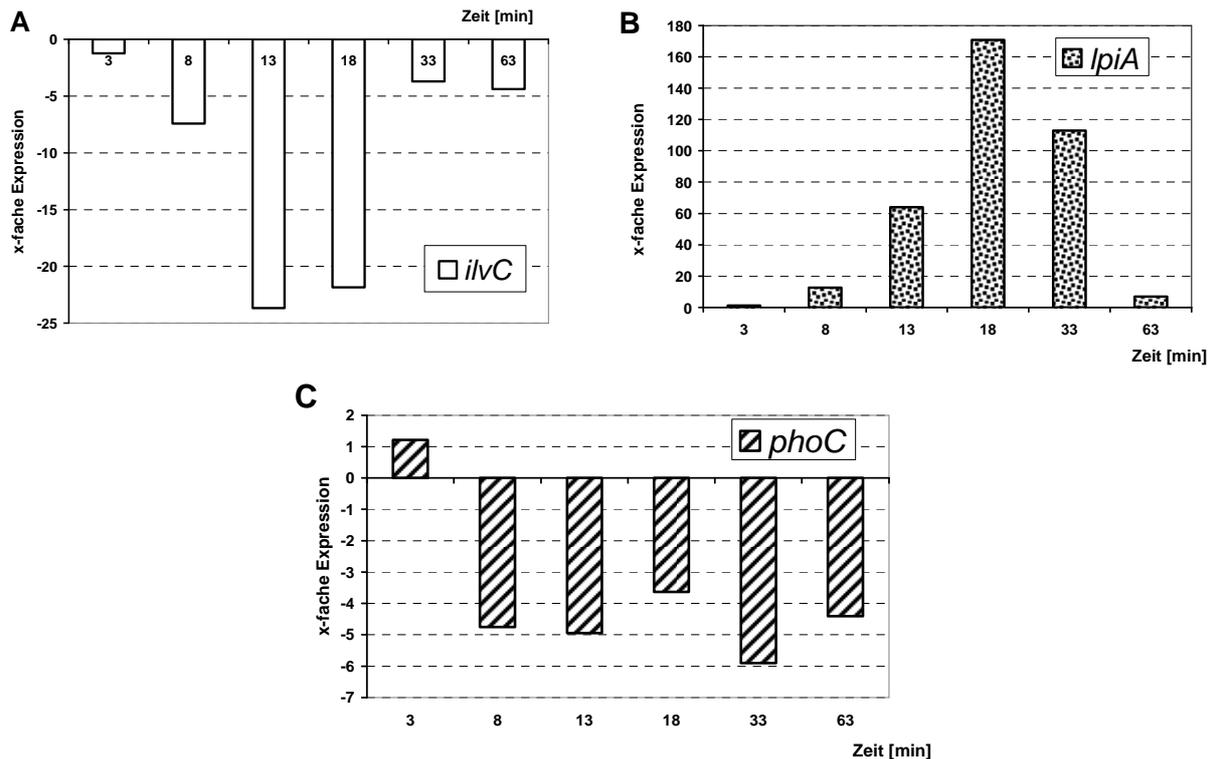
### 2.2. Identifikation des Zeitraumes zur pH-Stressuntersuchung

Für die Untersuchung der Antwort von *S. meliloti* auf pH-Stress galt es, neben der Bestimmung eines geeigneten pH-Wertes, auch einen geeigneten Zeitraum zu bestimmen. Der Wachstumsgraf einer bei pH 5,75 inkubierten Kultur zeigte bereits, dass nach ca. 1,5 h pH-Stress, ein Großteil der Adaption abgeschlossen ist (Abb. D-4). Da die Auswirkungen der transkriptionellen Antwort auf die physiologische Situation zeitversetzt stattfinden, wurden zunächst Real Time RT-PCR Experimente durchgeführt, um den Einfluss unterschiedlicher Stresszeiten bei pH 5,75 auf die transkriptionelle Aktivität von drei ausgesuchten Genen zu erfassen (Abb. D-5). Als Testgene sind *ilvC*, *lpiA* und *phoC* ausgesucht worden. Das Gen *ilvC* ist ein *Housekeeping*-Gen, dessen Genprodukt zur Synthese der Aminosäuren Valin und Isoleucin benötigt wird (Aguilar *et. al.*, 1991). Die Aktivität dieses Genes korreliert daher mit der allgemeinen Stoffwechselaktivität. Das Gen *lpiA* kodiert für ein Protein der Lysylphosphatidylglycerol Synthese (Reeve *et. al.*, 2006), einem Lipid, das scheinbar azidische pH-Toleranz verbessert. Die Expression von *lpiA* ist pH-Stress spezifisch. Das Gen *phoC* ist Teil des *phoCDET* Operons (Bardin *et. al.*, 1996). Das Operon kodiert für ein Phosphat-Transportsystem, das bei zuvor durchgeführten Stressexperimenten mit *S. meliloti*, eine differentielle Expression zeigte (Becker *et. al.*, 2004; Krol *et. al.*, 2004), und daher als Indikator für allgemeinen Stress hinzugezogen wurde. Die Expression dieser Gene wurde nach dem Arbeitsschema (Abb. D-3) zu 6 Zeitpunkten nach Umsetzen einer *S. meliloti* 1021 Kultur von VMM pH 7 nach pH 5,75 erfasst (Abb. D-4).

Die Zeitpunkte sollten innerhalb der ersten Stunde liegen und eine annähernd logarithmische Verteilung haben, da die größten Veränderungen unmittelbar nach Umsetzen der Kultur zu erwarten waren. Aus diesem Grund wurde die transkriptionelle Antwort dieser Gene zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33-, und 63 Minuten nach pH-Stress untersucht. Die teilweise ungeraden Zeitpunkte sind entstanden, da die Behandlung des Zentrifugierens und Resuspendierens der Proben bis zum Einfrieren eine Verzögerung von drei Minuten verursachte.

Die Ergebnisse der RT RT-PCR (Abb. D-5) zeigten zeitweilig eine starke Induktion des Gens *lpiA* als Antwort auf den pH-Stress. Die übrigen zwei getesteten Gene, *ilvC* und *phoC*, waren nach Umsetzen in VMM mit pH 5,75 zumeist reprimiert. Die Induktion von *lpiA* stieg zunächst stetig an und erreichte bei t= 18 min das Maximum mit ca. 170facher Expression. Nach weiteren 15 Minuten hatte sich die Induktion auf das 110fache verringert, um schließlich bei 7facher Induktion zu enden (t= 63 min).

## D. Ergebnisse



**Abbildung D-5: Ergebnisse einer RT-RT PCR zur Identifikation eines geeigneten Zeitraumes zur Durchführung eines pH-Schockexperimentes.** Untersucht wurde die Expression von drei *S. meliloti* 1021 Genen (A: *ilvC*, B: *lpiA*, C: *phoC*) für sechs Zeitpunkte (x-Achse) nach Umsetzen von VMM mit pH 7 in frisches VMM mit pH 5,75. Die Balken entsprechen der Relation von Transkriptmenge bei pH 5,75, im Vergleich zu pH 7, für das jeweilige Gen und den jeweiligen Testzeitpunkt (x-Achse).

Interpretiert man die Expression von *lpiA* als einen Indikator für pH-Stress, ist das Ergebnis dieses Versuches, dass eine spezifische transkriptionelle Zellantwort auf den pH-Stress stattfand und nach 63 Minuten beendet war. Die Genexpression von *ilvC* nahm in der gestressten Kultur im Vergleich zur ungestressten bis zur 13ten Minute stetig ab und erreichte dort ein Minimum (23fach geringere Expression). Im weiteren Verlauf wurde die Repression geringer und blieb für die Zeitpunkte  $t = 33$  min und  $t = 63$  min konstant bei  $\approx -4$ . Wird die Aktivität von *ilvC* stellvertretend für die Stoffwechselaktivität generell interpretiert, bedeutet dies, dass neben der spezifischen pH-Stressantwort auch der Stoffwechsel, nach anfänglicher Verringerung in der Aktivität, innerhalb der Testperiode wieder fast auf normalem Niveau liegt. Das Gen *phoC* ist, mit Ausnahme von  $t = 3$  min, für die gesamte Testperiode reprimiert, dabei liegen die Expressionswerte der gestressten Kultur im Vergleich zur ungestressten bei  $\approx -4,5$ . Die Genaktivität von *phoC* wurde stellvertretend für den allgemeinen Stress der Zelle untersucht. Die konstante Repression von *phoC* für die 63 Minuten Dauer des Testzeitraums zeigt, dass es auch Gene gibt, deren transkriptionelle Aktivität nach pH-Stress dauerhaft konstant verändert ist.

Die Untersuchung der drei Kandidatengene belegt, dass die erste Stunde nach pH-Stress ein geeigneter Testzeitraum ist. Die transkriptionelle Reaktion von zwei der getesteten Gene endete innerhalb dieses Zeitraumes (*lpiA*, *ilvC*). Die konstante Repression von *phoC* spricht ebenfalls für diesen Testzeitraum, da sich einige Zellfunktionen dauerhaft den veränderten Bedingungen anpassen müssen.

Die transkriptionellen und physiologischen Untersuchungen konnten zeigen, dass nach Umsetzen einer *S. meliloti* Kultur in Medium mit pH 5,75 eine Adaption an die veränderten Bedingungen stattfindet, die wahrscheinlich innerhalb der ersten Stunde abgeschlossen ist. Das experimentelle Setup konnte also für ein *Microarray*-Experiment verwendet werden.

### **3. Die transkriptionelle Zellantwort von *S. meliloti* 1021 auf pH-Stress**

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch transkriptionelle Analysen, die pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021 zu erfassen und potentiell involvierte regulatorische Gene zu identifizieren und zu charakterisieren. Durch die pH-abhängigen Wachstumstests wurden zusammen mit den RT-PCR Analysen die Untersuchungsbedingungen für das Zeitreihenexperiment zur Identifikation der transkriptionellen pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021 festgelegt. Die Antwort der Zelle auf pH-Stress sollte nach den Ergebnissen der vorangehenden Analysen nach Umsetzen in einen pH von 5,75 für eine Stunde untersucht werden. Auch die Zeitpunkte, zu denen die transkriptionelle Antwort erfasst werden sollte, wurden analog zu den RT-PCR Untersuchungen gewählt. Diese annähernd logarithmische Zeitpunktverteilung innerhalb der ersten Stunde (nach 3-, 8-, 15-, 18-, 33- und 66 Minuten) nach pH-Stress wurde deshalb vorgenommen, weil in den ersten Minuten die deutlichsten transkriptionellen Veränderungen erfolgen sollten und im späteren Verlauf eine Stabilisierung erwartet wurde.

Das Erfassen und Analysieren des Transkriptomts ist mit Sm6kOligo-*Microarrays* durchgeführt worden. Dieser *Microarray* wurde bereits mehrfach zur Stress-Analyse bei *S. meliloti* 1021 eingesetzt (Becker *et. al.*, 2004; Chao *et. al.*, 2005; Krol *et. al.*, 2004).

Der Sm6kOligo-*Microarray* wurde speziell zur Erfassung des Transkriptomts von *S. meliloti* 1021 an der Universität Bielefeld entwickelt (Krol *et. al.*, 2004). Er besteht aus 6226 individuellen Oligonucleotiden mit einer Länge von 70 Basen. Von diesen repräsentieren 6208 jeweils einen Teil eines der bekannten Gene aus *S. meliloti*, 4 beinhalten

transgene Sequenzen (*gusA*, *lacZ*, *nptII*, *aacCI*), 2 Stringenz-Kontrollsequenzen und 12 Fremd DNA-Kontrollsequenzen.

Der pH-Stress wurde entsprechend dem Arbeitsschema induziert (Abb. D-3). Unmittelbar nach Resuspension des Zellpellets in frischem VMM wurde die erste Probe gezogen, zentrifugiert und durch flüssigen Stickstoff schockgefroren. Fünf weitere Proben sind 5 Minuten, 10 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten nach Resuspension entnommen worden. Wegen der benötigten Zeit von drei Minuten für die Behandlungsschritte von der Zellentnahme bis zum Schockgefrieren wurde tatsächlich jeweils die transkriptionelle Antwort nach 3 Minuten, 8 Minuten, 13 Minuten, 18 Minuten, 33 Minuten und 63 Minuten untersucht. Um die Daten abzusichern, sind die Proben von drei biologischen Replikaten zu den 6 Zeitpunkten entnommen worden.

Nach dem Isolieren der RNA wurde sie revers transkribiert. Die resultierende cDNA wurde mit den Farbstoffen Cy5 (pH 7) und Cy3 (pH 5,75) gefärbt. Für jeden Zeitpunkt wurden dann jeweils die Cy5 und Cy3 markierte DNA auf einen *Slide* hybridisiert. Insgesamt sind 18 *Microarray-Slides* angefertigt worden (3 biologische Replikate zu 6 Zeitpunkten). Die Bilddateien der gescannten *Microarray-Slides* wurden anschließend mit ImaGene und EMMA analysiert.

### **3.1. Die Anzahl differentiell exprimierter Gene steigt mit zunehmender Stressdauer**

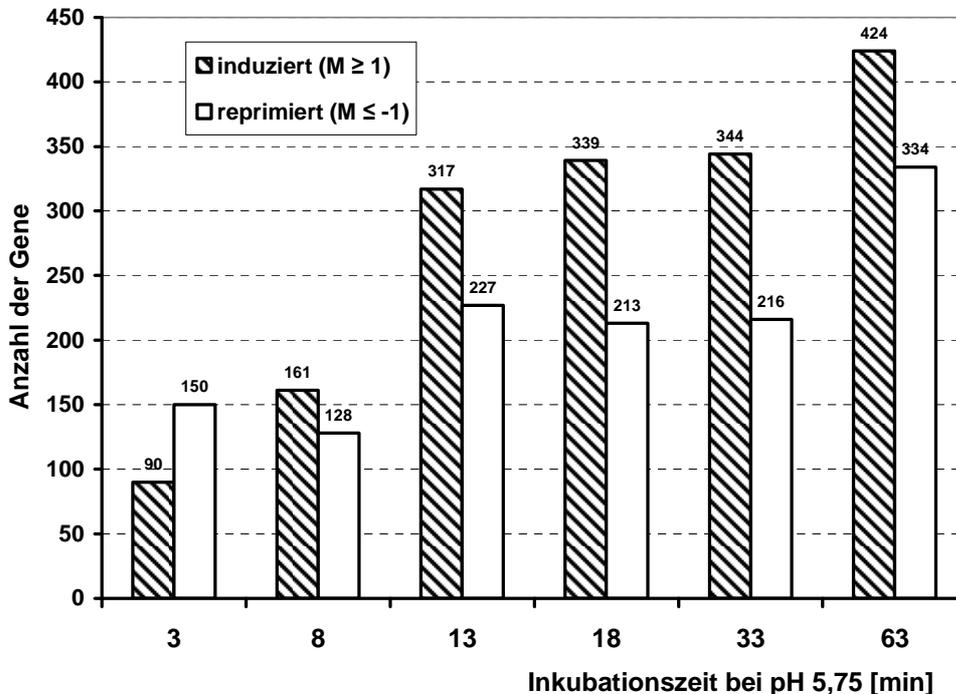
Als differentiell exprimiert werden Gene dann bezeichnet, wenn sie einen Schwellenwert des M-Wertes ( $\log_2$ -Fache Veränderung des Expressionswertes) überschreiten. Dieser Schwellenwert ist empirisch und schwankt je nach gewählter Fragestellung. Für die Analyse der Zeitreihe war es erforderlich, die Anzahl der differentiell exprimierten Gene auf ein Maß zu verringern, das den Kern der transkriptionellen Zellantwort repräsentiert.

Die Ergebnisse der Zeitreihenanalyse zeigen eine zeitlich zunehmende Anzahl differentiell exprimierter Gene (Abb. D-6 A und B) mit einer Stagnation von  $t=13$  min bis  $t=33$  min. Tendenziell stieg sowohl die Anzahl reprimierter als auch induzierter Gene. Abhängig vom gesetzten Schwellenwert des M-Wertes schwankt die Relation von induzierten zu reprimierten Genen. Grundsätzlich liegen unabhängig vom Schwellenwert des M-Wertes mehr Gene induziert als reprimiert vor, wobei die Relation von induzierten zu reprimierten Genen mit Zunahme des M-Schwellenwertes steigt.

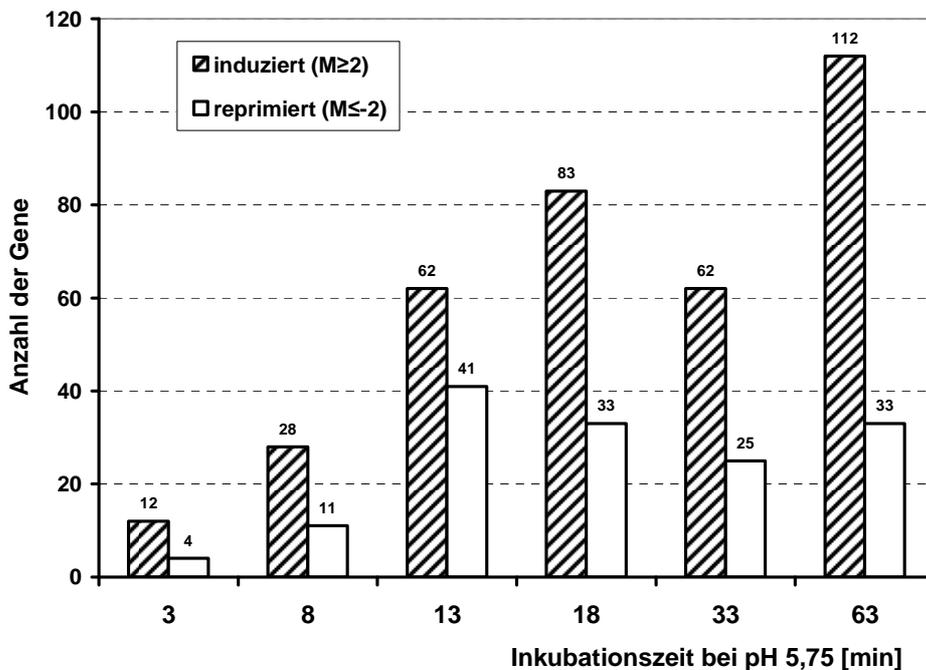
## D. Ergebnisse

Obwohl die RT-PCR Analysen der drei Kandidatengene ein Ende der transkriptionellen pH-Stressantwort innerhalb der ersten Stunde nach pH-Stressapplikation suggeriert haben, weisen die transkriptionellen Messungen auf eine anhaltende Antwort hin.

### A



### B



**Abbildung D-6: Anzahl an differenziell exprimierten Genen für jeden Zeitpunkt des Zeitreihen pH-Stress Experiments bei zwei unterschiedlichen Signifikanz-Schranken (A:  $M \geq 1$  und  $M \leq -1$ ; B:  $M \geq 2$  und  $M \leq -2$ ). Die Balkenhöhe entspricht der Anzahl an induzierten (gestrichelte Balken) und reprimierten Genen (weiße Balken). Die entsprechenden Zeitpunkte werden durch die x-Achse repräsentiert.**

### 3.2. Cluster-Analysen der transkriptionellen pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021

Um die Ergebnisse der *Microarray*-Untersuchungen genauer zu analysieren, war es notwendig, die angefallene Datenmenge zu filtern, um anschließend diejenigen Gene zu erhalten, deren differentielle Expression relevant für die pH-Stressantwort waren. Da mehrere Zeitpunkte untersucht worden waren bestand die Möglichkeit, dass Genprodukte nur kurzfristig benötigt wurden und ihre Gene nur für einzelne Zeitpunkte eine differentielle Expression zeigten. Daher sollte jedes Gen, dessen Expressionswert auch nur zu einem Zeitpunkt während des Zeitreihen-Experimentes die Signifikanzschwelle überschritten hatte in die weiteren Analysen miteinbezogen werden. Des Weiteren bestand das Problem, eine Signifikanzschwelle für den Expressionswert (M-Wert) zu definieren. Das Gen *lpiA* war das einzig bekannte Gen, dessen erhöhte Expression als Antwort auf pH-Stress bereits beschrieben war (Tiwari *et. al.*, 2004) und dessen Expression auch während des Zeitreihen-Experimentes erhöht war. Dieses Gen erreichte einen M-Wert von 4,7. Allgemein stressabhängig differentiell exprimierte Gene wie *phoC* hatten M-Werte von maximal -2,7. Das *Housekeeping*-Gen *ilvC* erreichte für einen Zeitpunkt einen M-Wert von -3. Durch diese Beobachtungen und den Vergleich anderer stressabhängig exprimierter Gene aus zuvor gemachten *Microarray*-Analysen wurde daher eine Signifikanzschwelle von  $M \geq 2$  und  $M \leq -2$  angesetzt. Diese Signifikanzschwelle war im Vergleich zu zuvor mit dem Sm6kOligo publizierten *Microarray*-Experimenten relativ hoch angesetzt (z.B.  $M \geq 1,58$  oder  $M \leq -1,58$  in Krol *et. al.*, 2004). In diesen Experimenten wurden jedoch einzelne Zeitpunkte und keine ganze Zeitreihe betrachtet. Weiterhin sollten die Gene einen A-Wert (Signalintensität) von  $\geq 8$  haben. Auf den p-Wert (entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass der M-Wert=0 ist) wurde nicht gefiltert. Das Filtern auf den p-Wert wurde nicht vorgenommen, da die Gene während ihres Expressionsverlaufes den Wert 0 annehmen durften. Alle Zeitpunkte, die einen M-Wert von  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  hatten, wurden auf ihren p-Wert (korrigiert nach FDR, *False Discovery Rate*) untersucht. Nur vier Zeitpunkte ( $\approx 0,9\%$ ) lagen oberhalb eines p-Wertes von 0,05. Diese waren:  $t = 3$  min, *smc01523*,  $P = 0,07$ ;  $t = 33$  min, *smc04173*,  $P = 0,09$ ;  $t = 63$  min, *smb21026*,  $P = 0,06$ ;  $t = 62$  min, *sma1736*,  $P = 0,22$ . Bei der näheren Betrachtung einzelner Gene wurde der p-Wert jedoch berücksichtigt und falls notwendig, in Einzelfällen darauf eingegangen. Insgesamt resultieren aus diesen Filterkriterien 230 relevante Gene.

Die Daten dieser 230 Gene sind dann auf verschiedene Weisen geclustert worden, um Gruppen von ähnlich reagierenden Genen zu identifizieren. Zunächst wurde durch

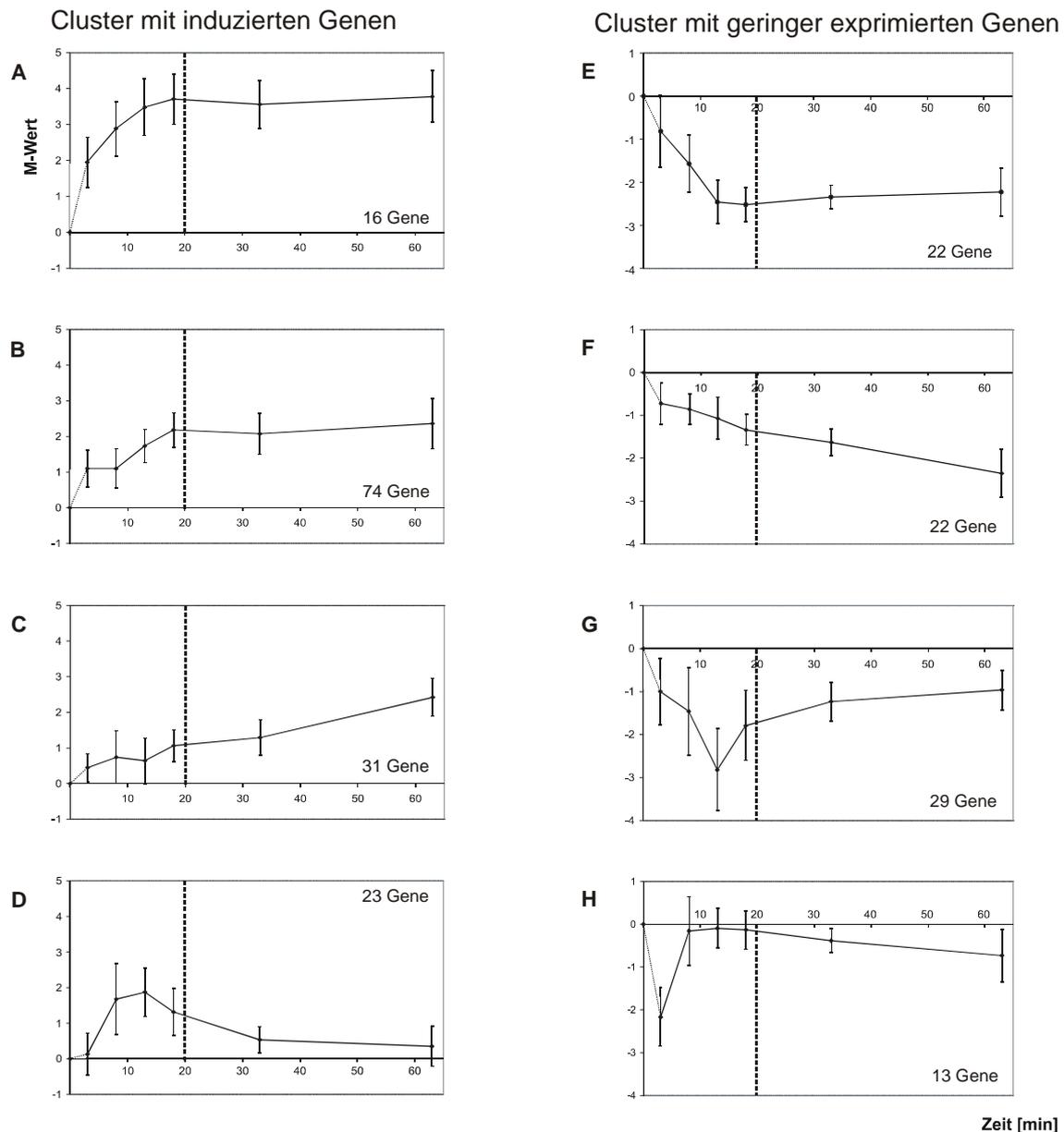
hierarchisches Clustern ein Überblick der Expressionsdaten gewonnen. Es zeigte sich, dass sich die Daten grob in acht ähnliche Expressionsverläufe unterteilen lassen. Hierarchisches Clustern hatte jedoch den Nachteil, dass es alle Daten in einem großen Cluster abbildete. Daher wurden die Clustermethoden SOM und *k*-Means verwendet, mit der Vorgabe, dass acht Cluster resultieren sollen. Als geeignete Methode hat sich *k*-Means erwiesen. Die acht *Heatmaps* von *k*-Means verdeutlichen die Homogenität der Genexpressionen innerhalb der Cluster (Abb. G-1 bis G-8).

Durch die Cluster-Analysen konnten somit acht Cluster mit individuellen Expressionsprofilen erzeugt werden (Abb. D-7), die sich in vier induzierte- (Cluster A-D) und vier reprimierte Cluster (Cluster E-H) einteilen ließen. Sie unterscheiden sich nicht nur durch Induktion und geringere Expression, sondern auch durch Expressionsintensität, sowie den zeitlichen Expressionsverlauf. Die Cluster können grob in solche mit permanent exprimierten Genen und Cluster mit zeitweise exprimierten Genen aufgeteilt werden. Die Übersicht der Cluster (Abb. D-7) verdeutlicht weiterhin, dass die stärksten transkriptionellen Veränderungen innerhalb der ersten 20 Minuten nach pH-Stress erfolgt waren. Nach dieser Zeit hatte ein Großteil der Gene innerhalb der Cluster eine konstante differentielle- bzw. eine sich konstant verändernde differentielle Expression erreicht. Erwähnenswert ist weiterhin, dass einzelne Cluster Gen-Gruppen beinhalten, die in funktioneller Beziehung zueinander stehen.

Die Cluster sind in ihrem Verlauf sehr individuell und wie folgt zu beschreiben:

Cluster A beinhaltet Gene, die während des Zeitreihenverlaufs stark induziert vorlagen und daher sicherlich von besonderer Bedeutung für die pH-Stressantwort der Zelle sind. In Cluster B befinden sich Gene, die eine Expression ähnlich zu Genen aus Cluster A haben, deren Expressionswerte allerdings schwächer sind. Cluster C besteht aus Genen, deren Expressionswerte mit zunehmender Zeitdauer ansteigen. Der durchschnittliche Expressionsverlauf der Gene in Cluster D zeigt eine kurzzeitige Induktion zwischen 10 und 30 Minuten nach pH-Stressbeginn.

Cluster E besteht aus Genen, deren Expressionswert sich bis zur 20. Minute verringerte und dann konstant reprimiert blieb. Im Gegensatz dazu zeigten die Gene in Cluster F eine stetige Verringerung ihrer Expression im Verlauf der Zeitreihe. Cluster G besteht aus Genen, deren verringerte Expression während der ersten 20 Minuten nach pH-Stress ein Minimum durchlaufen hat. Cluster H ist mit nur 13 Genen das kleinste Cluster. Die beinhaltenden Gene zeigten eine sehr kurze Repression zur 3. Minute.



**Abbildung D-7: Ergebnisse einer *k*-Means-Clusterberechnung des pH-Stress-Microarray-Experimentes.** Durch *k*-Means-Clusterberechnung sind die Expressionsprofile der einzelnen Gene in acht möglichst homogene Gruppen eingeteilt worden. Die abgebildeten Diagramme zeigen den Mittelwert des M-Wertes (y-Achse) im Verlauf der Zeit (x-Achse) für jedes der acht Cluster (A bis H). Die Anzahl der Gene je Cluster ist angegeben. Die gestrichelte vertikale Linie gibt die Zeit  $t=20$  min nach Umsetzen der Kultur an.

### 3.2.1. Cluster A beinhaltet stark induzierte Gene deren Genprodukte für eine Membranzumstrukturierung und Protein-Recycling notwendig sind

Das Cluster A enthält 16 Gene, die eine zunehmende Expression bis zu 18. Minute als Antwort auf den pH-Stress zeigten und anschließend auf hohem Expressionslevel blieben (Abb. D-7, A). Die abgeleiteten Proteine von 9 der 16 Gene tragen Signalpeptid-Sequenzen. Signalpeptide dienen als Erkennungsstellen zur Sekretion des Proteins. Während die

Genprodukte von fünf dieser potentiell sekretierten Proteine hypothetisch sind, kodieren zwei dieser Gene für lytische Proteine. Das Gen *degP1* (*smc02765*) kodiert für eine Protease, während das Gen *smc01855* für ein putatives Lysozym kodiert. Proteasen dienen der Remodellierung von denaturierten oder beschädigten Proteinen, oder ihrer Degradation zu freien Aminosäuren. Sie bilden zusammen mit Chaperonen ein Qualitätskontrollsystem der Zelle (Wickner *et. al.*, 1999). Unmittelbar stromaufwärts von *degP1* befinden sich zwei Gene (*smc02366* und *smc02367*), die aufgrund ihrer starken Induktion ebenfalls Cluster A zugeordnet worden sind. Die Produkte dieser Gene haben Homologien zu RagA (*smc02366*) und RagB (*smc02367*). RagA und RagB sind bekannt aus *Porphyromonas gingivalis*, einem gram-negativen Bakterium, das maßgeblich an der Parodontose beteiligt ist (Curtis *et. al.*, 1991). Zusammen bilden RagA und RagB einen an der Zelloberfläche lokalisierten Transporter aus, der durch einen TonB-abhängigen Prozess große Protein-Degradationsprodukte aktiv transportiert (Nagano *et. al.*, 2007).

Aufgrund seines Expressionsprofils wurde *lpiA* ebenfalls Cluster A zugeordnet. LpiA-Orthologe stellen eine neue Familie von integrierten Membran-Proteinen in Proteobakterien. Mit 13 transmembran-Helices sind sie strukturell zu MprF und FmtC verwandt (Vinuesa *et. al.*, 2003). Das Genprodukt von *lpiA* ist an der Formation des Membranlipids LPG (Lysyl-phosphatidylglycerol) beteiligt (Sohlenkamp *et. al.*, 2007), das durch seine positive Nettoladung zu einem Rückstoß von kationischen, membranzerstörenden Peptiden führt (Peschel *et. al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *lpiA* in Rhizobien notwendig für die Adaption an sauren pH-Stress (Reeve *et. al.*, 2006) und dem Schutz vor kationischen, antimikrobiellen Peptiden ist (Sohlenkamp *et. al.*, 2007).

Das Gen *cah* kodiert für eine carbonische Anhydrase und wurde ebenfalls aufgrund seines Expressionsprofils während des Zeitreihenexperimentes Cluster A zugeordnet. Die carbonische Anhydrase katalysiert die reversible Reaktion von  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zu  $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ .

### 3.2.2. Die induzierten Gene in Cluster B kodieren hauptsächlich für hypothetische und konservierte Proteine und sind teilweise RpoE2-reguliert

Der Expressionslevel der Gene in Cluster B stieg während der ersten 10 bis 20 Minuten nach pH-Stress auf Werte um  $M = 2$  an und blieb fortan auf diesem Niveau (Abb. D-7, B).

Das Cluster B ist mit 74 Genen das größte Cluster. Es besteht hauptsächlich aus Genen, die entweder für hypothetische oder konservierte hypothetische Gene kodieren (41 Gene). Die hohe Anzahl dieser Gene reflektiert möglicherweise die geringen Kenntnisse über die

rhizobiellen pH-Toleranzmechanismen. Von diesen 41 Genen ist der Großteil auf dem Chromosom (24 Gene) und pSymA (10 Gene) lokalisiert. Da über die Funktion der Genprodukte dieser Gene keine Aussage zu machen ist, kann man nur anhand ihrer dominanten Lokalisierung auf dem Chromosom mutmaßen, dass sie Teil der wesentlichen genetischen Ausstattung von Sinorhizobien sind und eventuell *housekeeping*-Funktionen haben.

Acht Gene der EPS I Biosynthese wurden aufgrund ihres Expressionsprofils Cluster B zugeordnet. Die Induktion der EPS I Biosynthese ist offensichtlich eine wesentliche Reaktion von *S. meliloti* 1021 auf den azidischen pH-Stress. Ein wichtiger Regulator (*chvI*) dieser Gene ist ebenfalls Teil von Cluster B. Da noch drei weitere EPS I Biosynthese-Gene für die Cluster-Analysen eingesetzt worden sind, jedoch auf andere Cluster verteilt worden sind (zwei auf Cluster A und eins auf Cluster C), wird dies in Sektion 3.3 eingehend diskutiert.

In einer Arbeit von Sauviac *et. al.* 2007 wurde untersucht, welche Gene aus *S. meliloti* einer Regulation durch RpoE2 unterliegen. Interessanterweise befinden sich in Cluster B 15 von 41 identifizierten RpoE2 regulierten Genen (*sma2071*, *katC*, *smb20086*, *ndiA1*, *glgA2*, *smb21441*, *glgX2*, *smb21473*, *smc00063*, *smc00371*, *smc00792*, *smc00796*, *smc00800*, *smc00885*, *smc01446*) (Sauviac *et. al.*, 2007). Elf dieser Gene kodieren für hypothetische Proteine. Die Genprodukte von zwei Genen sind vermutlich Teil der Glycogen-Biosynthese (*glgA2* und *glgX2*), ihre Funktion im Zusammenhang mit Stress ist jedoch unklar. Das Gen *ndiA1* wurde ursprünglich bei Hungerstress von *S. meliloti* als differentiell exprimiert identifiziert (Davey *et. al.*, 2000), jedoch ist die Funktion des Gens unbekannt. Einzig für *katC* kann ein funktioneller Zusammenhang zu pH-Stress hergestellt werden. Das Gen *katC* kodiert für eine Katalase. Niedriger pH begünstigt, u.a. durch die erhöhte Löslichkeit von Metallionen, die Fenton-Reaktion, die zur Bildung von zelltoxischen ROS (*reactive oxygen species*) wie Wasserstoffperoxid führt. Katalasen setzen das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff um.

### 3.2.3. Cluster C enthält das Gen einer Oxidase mit geringer Sauerstoffaffinität und ein Chaperon

Cluster C enthält 31 Gene, deren Expression im Verlauf der Zeitreihe zunimmt (Abb. D-7, C).

Während die ebenfalls induzierten Gene in Cluster A und B spätestens zu t= 18 min den höchsten Expressionswert erreicht hatten und dann konstant die starke Induktion hielten,

deutet das Expressionsprofil der Gene in Cluster C auf einen weiteren Anstieg hin. Wie auch in Cluster B kodiert der Großteil der Gene innerhalb von Cluster C für hypothetische Proteine (16 von 31 Genen).

Innerhalb dieses Clusters befindet sich *groEL5*. GroEL5 wurde als spezialisiertes Stresschaperon beschrieben (Bittner A.N. *et. al.*, 2007). Für *S. medicae* konnte die differentielle Expression der Proteine von GroESA und GroES2 nach fünftägiger Inkubation bei niedrigem pH nachgewiesen werden (Reeve *et. al.*, 2004). Chaperone haben eine wichtige Rolle bei der Reparatur stressbedingt beschädigter oder falsch gefalteter Proteine (Lund, 2001). Zusammen mit dem Proteasegen *degP1* ist *groEL5* das einzige Gen, dessen Produkt eine Funktion im Zusammenhang mit der Qualitätskontrolle von Proteinen hat.

Das ebenfalls in Cluster C lokalisierte Gen *cyoB* ist Teil des *cyoABC*-Operons. Das Operon kodiert für eine putative terminale Oxidase, die eine geringe Affinität für Sauerstoff besitzt, aber eine hohe Protonenpump-Aktivität. Der veränderte extrazelluläre pH macht scheinbar eine Anpassung der Elektronentransportkette erforderlich. Da diese Oxidase bisher noch nicht für *S. meliloti* 1021 charakterisiert worden ist, ist ihre konkrete Rolle jedoch unbekannt.

Daneben findet sich in Cluster C noch *nex18*, ein Gen mit unbekannter Funktion, dessen differentielle Expression schon während der Symbiose, sowie Nährstoffmangel beobachtet wurde (Davey *et. al.*, 2000; Oke *et. al.*, 1999).

### 3.2.4. Die 23 zeitweise induzierten Gene in Cluster D bestehen aus Carboxylat-Aufnahme- und Fettsäure-Degradationsgenen

Die Gene, die aufgrund ihres Expressionsprofils Cluster D zugeordnet worden (Abb. C-6, D) sind, zeigen eine zeitweilige Induktion während des Zeitreihenexperimentes. Unter ihnen befindet sich *dctA*, dessen Genprodukt für das DctA Dicarboxylatimportsystem kodiert. Das Importsystem ist für *S. meliloti* 1021 bereits gut charakterisiert worden (Watson *et. al.*, 1988) und eine breite Substratpalette ist beschrieben worden (Yurgel *et. al.*, 2000). Der Importer ist essentiell für die Symbiose. Während der Bakteroid-Phase nimmt er Tricarbonsäure-Intermediate, wie z.B. Succinat, Malat und Fumarat der Wirtspflanze auf, um die Zelle mit der nötigen Energie für die Stickstofffixierung zu versorgen.

Innerhalb von Cluster D befinden sich vier Gene deren putative Genprodukte einige Schritte der Fettsäuredegradierung katalysieren. Das Gen *smc00976* kodiert für eine putative Enoyl-CoA-Hydratase, die Gene *smc00977* und *smc02229* kodieren für putative Acyl-CoA-

Dehydrogenaseproteine. Daneben ist noch das Gen *glpD* zu finden, dessen Genprodukt für eine Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase kodiert.

### 3.2.5. In Cluster E befinden sich Gene des Stickstoff-Metabolismus, deren Expression stark reprimiert ist

Cluster E besteht aus 22 Genen, deren Expressionswerte sich nach Umsetzen auf pH 5,75 im Vergleich zu pH 7 verringerten (Abb. D-7, E). Die Expressionswerte, der in diesem Cluster vereinten Gene, sanken bis 10 Minuten nach pH-Veränderung und sind dann konstant auf dem verringerten Niveau geblieben.

Cluster E beinhaltet Gene des Stickstoff-Metabolismus. Das Gen *glnK* kodiert für ein PII regulatorisches Protein, dessen Aktivierung bei Stickstoffmangel erfolgt. *glnK* liegt zusammen mit dem ebenfalls in Cluster E lokalisierten *amtB* in einem Operon. Die Genprodukte dieser Gene bilden einen stickstoffabhängigen Sensor-, Regulations- und Transportkomplex in der Cytoplasmamembran, der aus dem Ammoniumtransporter AmtB und dem Regulator GlnK besteht (Javelle *et. al.*, 2004). AmtB deuridyliert GlnK bei Transport von (methyl-)Ammonium und fungiert daher als Sensor für Ammoniumverfügbarkeit.

Innerhalb von Cluster E befinden sich vier Gene (*metF*, *metK*, *bmt* und *ahcY*), die Funktionen im Methionin-Metabolismus haben.

Verschiedene Gene, deren Produkte Ionentransportsysteme kodieren, sind ebenfalls in Cluster E organisiert. Das *sitABCD* Operon kodiert für ein Mangan/Eisen-Transportsystem (Chao *et. al.*, 2004; Platero *et. al.*, 2003). Die Gene *phoC* und *phoD* sind Teile des *phoCDET* Operons. Das *pho*-Operon kodiert für ein Phosphattransportsystem (Bardin *et. al.*, 1996).

### 3.2.6. Die Gene der Chemotaxis und Motilität befinden sich fast ausschließlich in Cluster F

Cluster F besteht aus Genen, deren Expression kontinuierlich während des Zeitreihen-Experimentes sank (Abb. D-7, F). Es besteht hauptsächlich aus Genen der Chemotaxis und der Flagellen-Biosynthese (*flgB*, *flgG*, *flgL*, *flgF*, *flgC*, *flgE*, *fliE*, *flbT*, *motA*, *mcpU*). Diese Gene werden in Kapitel 3.3 gesondert betrachtet. Daneben gibt es in Cluster F noch *lppB*, dessen Genprodukt für ein Lipoprotein kodiert. Lipoproteine sind Komponenten der äußeren Membran.

### 3.2.7. Die kurzzeitig geringer exprimierten Gene in Cluster G haben Funktionen der Stickstoffaufnahme und Reduktion

Cluster G besteht aus Genen, deren Expression sich nur in der Zeitspanne von 8 bis 18 Minuten nach pH-Umsatz verringerte (Abb. D-7, G). Danach ging die Expression der Gene annähernd auf einen M-Wert von -1 zurück.

Die Gene *nirB*, *nirD* und *narB* wurden diesem Cluster G zugeteilt. Sie kodieren für Nitrit- und Nitratreduktasen, die durch Reduktion schließlich Ammonium bilden. Auch *nrtB* ist innerhalb dieses Clusters lokalisiert. Das Gen ist Teil des *nrtABC*-Operons, das einen Nitrat-Importer kodiert. Die übrigen zwei Gene dieses Operons wurden für die Clusteranalysen gefiltert, weil der M-Wert unterhalb des Schwellenwertes lag.

Wie schon in Cluster E sind auch in Cluster G zahlreiche Gene vertreten, die im Zusammenhang mit der Aufnahme und Metabolisierung von Stickstoff stehen. Während die Gene in Cluster E eine verringerte Expression während des gesamten Verlaufs der Zeitreihe hatten, zeigen die Gene innerhalb von Cluster G ein langsames Angleichen des Expressionsniveaus an das der pH 7-Referenzkultur. In Cluster G sind auch die Gene eines ABC-Transportsystems lokalisiert (*smb21707*, *smb20602*, *smb20603*, *smb20604* und *smb20605*). Dieses Transportsystem hat Homologie zu Transportsystemen des Aminosäure- und Harnstoff/Amid Imports. Daneben sind auch noch zwei Gene eines putativen ABC-Transporters (*smb20141* und *smb20142*) mit Homologie zu Dpp. Dieses Transportsystem wurde in *E. coli* charakterisiert und ist für den Import von Dipeptiden zuständig (Olson *et. al.*, 1991).

### 3.2.8. Die Gene in Cluster H bilden eine Randgruppe

Cluster H ist mit 13 Genen das kleinste Cluster (Abb. C-6, H). Das mittlere Expressionsprofil der beinhalteten Gene zeigte eine kurze Verringerung der Expression zum ersten gemessenen Zeitpunkt. Es gibt keine Gengruppen innerhalb dieses Clusters, die an ähnlichen Stoffwechselfunktionen beteiligt sind, bis auf die Gene *mcpW* und *fliP*, die an der Chemotaxis und Flagellarbiosynthese beteiligt sind. Neben Genen, deren Genprodukte für hypothetische Proteine kodieren, sind noch ein Gen für eine sekretierte Peroxidase (*sma1944*) (Barloy-Hubler *et. al.*, 2004) und ein Nodulationsgen vertreten (*nodPI*). Das Gen *nodPI* war

in *S. medicae* nach längerer Inkubation (mindestens 1d) bei azidischem pH induziert (Tiwari *et. al.*, 2004).

Vieles deutet daraufhin, dass die kurzfristige Verringerung der Expressionswerte zum ersten Zeitpunkt, das Resultat einer Fehlinterpretation der Zelle eines pH-induzierten Reizes ist. So zeigt auch keines der Gene, die innerhalb von Cluster H sind, einen signifikanten Expressionswert hinsichtlich ihres p-Wertes (holm) für den ersten Testzeitpunkt. Dies bedeutet, dass die Streuung der gemessenen Spotintensitäten zwischen den drei angefertigten *Microarrays* sehr variierte. Eventuell führten kleinste zeitliche Unterschiede bei der Probenentnahme der drei biologischen Replikate zu großen Varianzen, da die Expression der Gene anfänglich sehr variable ist.

Wegen der geringen Anzahl an Genen, fehlender Signifikanz der Werte und scheinbar artifizierlicher Expression der Gene, ist Cluster H als eine Randgruppe zu betrachten, dessen Expressionsprofil keine substantielle Antwort auf pH-Stress beinhaltet.

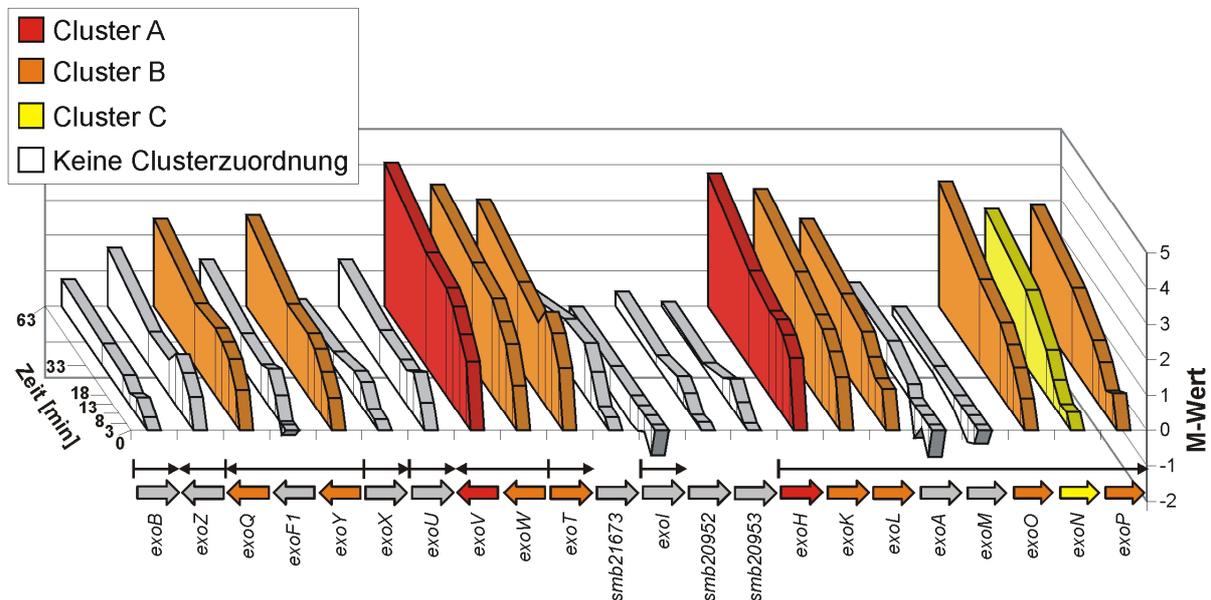
### 3.3. Die zeitabhängige Expression der *exo*- und Flagellargene

Die Betrachtung der Cluster zeigte, dass zahlreiche Gene der EPS I-Biosynthese und der Motilität während des Zeitreihen-Experimentes differentiell exprimiert vorlagen. Für beide Gruppen wurde der Großteil der differentiell exprimierten Gene je einem Cluster zugeordnet. Bemerkenswert ist weiterhin der gegensätzliche Expressionsverlauf der beiden Gruppen. Die EPS I-Biosynthesegene antworteten mit einer schnellen Zunahme der Expression, gefolgt von einer konstant hohen Expression, während die Gene der Motilität im Verlauf der Zeitreihe zunehmend reprimiert waren. Das Regulatorgen *chvI* ist zusammen mit den meisten *exo*-Genen Cluster B zugeteilt worden.

Es ist für *S. meliloti* bekannt, dass ExoS und ChvI ein Zwei-Komponenten-System bilden, das die Succinoglycan-Biosynthese reguliert. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung zeigte eine genauere Untersuchung, der auf pSymB kodierten EPS I-Biosynthesegene (Abb. D-8), hohe Induktionswerte für den Großteil der *exo*-Gene. Die höchsten Induktionswerte wurden jeweils zu  $t = 63$  min gemessen. Neben den *exo*-Genen in Cluster B wurden drei *exo*-Gene Cluster A und C zugeordnet. Die *exo*-Gene in Cluster A (*exoV* und *exoH*) sind unter den am stärksten induzierten Genen dieses Experimentes. Die Produkte dieser Gene sind für die letzten Schritte der EPS I-Biosynthese notwendig. Sie sind verantwortlich für Succinylierung und Pyrovylierung von EPS I. Der höhere Expressionswert von *exoH* verglichen mit anderen

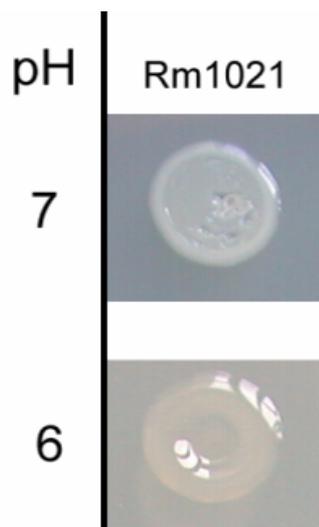
## D. Ergebnisse

*exo*-Genen könnte mit seiner Positionierung an erster Stelle eines großen Operons (*exoHKLAMONP*) zusammenhängen.



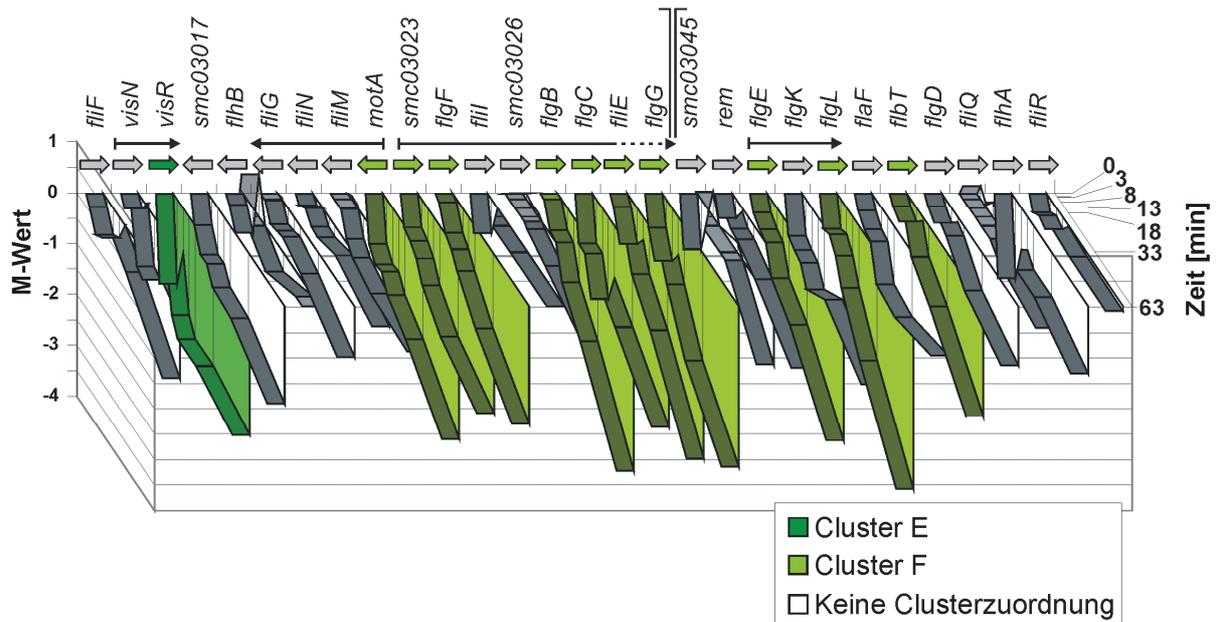
**Abbildung D-8: Zeitabhängige Expression der Gene der *exo*-Genregion auf Megaplasmid pSymB.** Die jeweiligen Gene (x-Achse) sind mit ihrer Expression (y-Achse: M-Wert) in zeitlicher Abhängigkeit (z-Achse) abgebildet. Die Expressionsgrafiken der Gene, die einem Cluster zugeordnet worden sind, wurden farbig hinterlegt (rot: Cluster A; orange: Cluster B; gelb: Cluster C). Gene mit weißem Grafen wurden vor der Clusterbildung gefiltert, sind also nicht Teil der acht Cluster. Die farbigen Pfeile geben die Orientierung der Gene an, die schwarzen Pfeile zeigen bekannte Operon-Strukturen.

Die zentral gelegenen Gene dieses Operons (*exoA* und *exoM*) zeigten im Gegensatz zu den umgebenden Genen keine signifikante Veränderung ihrer Expressionswerte während des Zeitreihenexperimentes. Drei ORFs mit unbekannter Funktion innerhalb dieser Region (*smb21673*, *smb20952* und *smb20953*) zeigten keine differentielle Expression, was darauf hindeutet, dass sie entweder nicht funktionell sind oder keine Funktion bei der EPS I-Biosynthese haben. Da diese Gene nur durch informatorische Genvorhersage identifiziert wurden, ist es fraglich, ob ihre DNA-Abschnitte eine Funktion haben. Insgesamt zeigt sich die Induktion der *exo*-Gene in Übereinstimmung mit dem mucoiden Phänotyp einer *S. meliloti* 1021 Kultur, die auf einer VMM-Platte bei niedrigem pH angezogen worden ist (Abb. D-9).



**Abbildung D-9: Mucoider Phänotyp von *S. meliloti* 1021 nach Anzucht auf einer VMM-Agarplatte bei pH 6.** Abgebildet ist der Wachstumsphänotyp nach Anzucht auf einer VMM-Agarplatte bei pH 7 (oben) und pH 6 (unten) nach 24

Während die Expression der *exo*-Gene erhöht war, lagen zahlreiche Gene der Motilität und Chemotaxis reprimiert vor (*flgB*, *flgG*, *flgL*, *flgF*, *flgC*, *flgE*, *fliE*, *flbT*, *motA*, *mcpU*). Nach 63 Minuten Inkubation bei pH 5,75 wurde die stärkste Repression gemessen. VisR ist der Hauptaktivator der Flagellargene und bildet zusammen mit VisN die hierarchische Spitze von drei untergeordneten Regulationsebenen. Da *visN* im Zeitreihenexperiment bereits früh stark reprimiert vorlag, wurde es Cluster E zugeordnet. Die übrigen Flagellargene folgten der Repression ihres Hauptaktivators zeitlich versetzt und wurden daher Cluster F zugeordnet. Das Gen des untergeordneten Regulators Rem wurde ebenfalls während der Zeitreihe zunehmend reprimiert, der Expressionswert erfüllte allerdings die Filterkriterien nicht. Eine genauere Betrachtung der Flagellar-Biosyntheseregion auf dem Chromosom (Abb. D-10) zeigt eine Repression der kompletten Region. Einige Teile der Region waren deutlicher reprimiert als andere. Die stärkere Repression von *motA*, *flgF* und *flgE* ist sehr wahrscheinlich ein Resultat ihrer Lokalisierungen als jeweils erstes Gen eines Operons. Es ist erwähnenswert, dass von den 10 stark reprimierten Flagellargenen in Cluster F, fünf für Teile des Flagellarruders kodieren (*flgF*, *flgB*, *flgC*, *fliE* and *flgG*) und zwei für Teile des Flagellarhakens (*flgE* and *flgL*).



**Abbildung D-10: Zeitabhängige Expression der Motilitäts-Genregion auf dem Chromosom.** Die jeweiligen Gene (x-Achse) sind mit ihrer Expression (y-Achse: M-Wert) in zeitlicher Abhängigkeit (z-Achse) abgebildet. Die Expressionsgrafiken der Gene, die einem Cluster zugeordnet worden sind, wurden farbig hinterlegt (grün: Cluster E; hellgrün: Cluster F; graugrün: Cluster H). Gene mit weißem Grafen wurden vor der Clusterbildung gefiltert, sind also nicht Teil der acht Cluster. Die farbigen Pfeile geben die Orientierung der Gene an, die schwarzen Pfeile zeigen bekannte Operon-Strukturen.

## 4. Identifikation von regulatorischen Genen der azidischen pH-Antwort

Nachdem die unmittelbare transkriptionelle Antwort auf den pH-Stress erfasst worden ist, sollten im folgenden Gene identifiziert werden, die in der azidischen pH-Toleranz von *S. meliloti* eine regulatorische Funktion haben. Dieser Schwerpunkt auf Gene, die Regulatoren kodieren, wurde gewählt, weil durch die Identifikation potentieller Zielegene dieser Regulatoren, funktionelle Zusammenhänge und möglicherweise regulatorische Netzwerke aufgedeckt werden können. Die Ergebnisse der Zeitreihen-Analyse wurden hierzu als Basis verwendet, um Regulatorgene zu identifizieren, die während des Experimentes differentiell exprimiert vorlagen. In einem weiteren Schritt wurden diese Gene systematisch durch Mutation inaktiviert und diese Mutanten dann, in vergleichenden Wachstumstests auf VMM-Agarplatten mit neutralem und niedrigem pH-Wert, auf einen pH-abhängigen Phänotyp hin untersucht.

Zur Clusteranalyse der transkriptionellen Antwort auf den pH-Stress sind nur Gene verwendet worden, deren M-Werte mindestens einmal während der Zeitreihe einen M-Wert von  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  erreichten. Da Regulatorgene häufig keine hohen differentiellen Expressionswerte zeigen, wurden die Grenzen für deren Auswahl zur gezielten Mutation verringert. Als Kriterium wurde ein M-Wert von  $\geq 1$  oder  $\leq -1$ , der von einem Gen mindestens einmal während des Zeitreihenexperimentes erreicht werden musste, verwendet. Insgesamt wurden 55 regulatorische Gene identifiziert (Tab. G-1). Unter diesen Genen befanden sich 35 Regulatorgene, die bisher nicht charakterisiert worden sind. Daneben gab es z.B. Regulatorgene, deren Produkte eine Rolle bei der Regulation der Motilität (*visN*, *visR*, *rem*, *flaF*, *flbT*) und Exopolysaccharidsynthese (*chvI*, *exsF*, *exsI*) spielen. Auch Gene von extracytoplasmatischen Sigmafaktoren (*rpoE1*, *rpoE2* und *rpoE5*) waren vertreten. Zusätzlich zu den 55 identifizierten Regulatorgenen wurde noch *smc04348* ausgewählt, da die Gene in seiner Umgebung sehr hohe differentielle Expressionswerte nach pH-Stress aufwiesen.

Um Mutanten dieser Gene zu erhalten, wurde zum Teil auf die *S. meliloti* 1021 Mutantenbibliothek zurückgegriffen, die über das *Rhizo*GATE-Portal zu erreichen ist

(Becker *et. al.*, 2009), ([www.cebitec.uni-bielefeld.de/transcriptomics/sm-genome/sm-mutagenesis.htm](http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/transcriptomics/sm-genome/sm-mutagenesis.htm)). Diese Bibliothek besteht aktuell aus ca. 5000 Plasmid-Integrationsmutanten. Die Insertionskonstrukte dieser Mutanten wurden auf Basis der PCR-

Fragmente erstellt, die auch für den Sm6KPCR-*Microarray* verwendet worden sind (Rüberg *et. al.*, 2003). Von 55 erforderlichen Mutanten konnten 23 dieser Bibliothek entnommen werden.

In dieser Arbeit konnten weitere 20 Mutanten unter Verwendung der Primer, die für die Erstellung des Sm6KPCR-*Microarrays* verwendet wurden, erstellt werden. Die erstellten PCR-Produkte wurden dazu in das Plasmid pUC19 kloniert und das erhaltene Konstrukt per Konjugation über *E. coli* S-17-1 nach *S. meliloti* 1021 transferiert. Da pUC19 in *S. meliloti* 1021 nicht stabil repliziert, konnte durch Selektion auf die Vektorresistenz (Kanamycin) nach möglichen Insertionsereignissen gesucht werden. Die resultierenden Mutanten sind abschließend durch PCR auf die Insertion im gewünschten Gen hin untersucht worden. Insgesamt konnten auf diese Weise von 56 im Zeitreihenexperiment identifizierten Regulatorgenen 43 Plasmid-Integrationsmutanten erhalten werden.

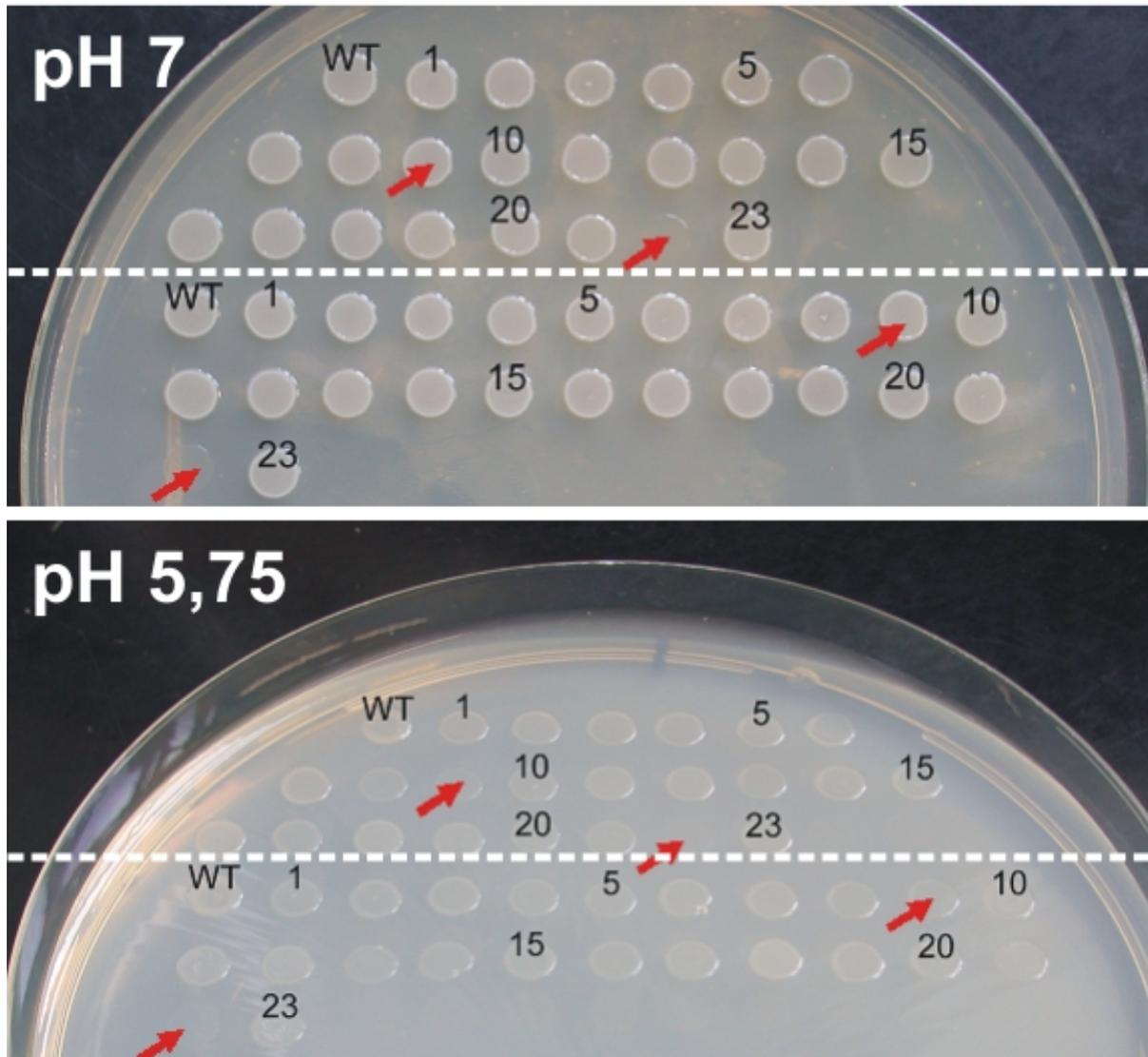
Von den übrigen 12 Regulatorgenen lag für 7 zwar das Konstrukt in *E. coli* S17-1 vor, jedoch konnte keine erfolgreiche Konjugation nach *S. meliloti* 1021 nachgewiesen werden. Für die restlichen 5 konnte kein Konstrukt erstellt werden, da keine erfolgreiche Ligation des PCR-Amplifikates mit dem Vektor nachgewiesen werden konnte.

Um zu untersuchen, ob die Mutanten einen pH-abhängigen Phänotyp aufweisen, sind die Mutanten auf VMM-Agarplatten jeweils bei pH 7 und pH 5,75 angezogen worden (Abb. D-11).

Nach 2 d Inkubation im Brutschrank bei 30° C wurden die Testkulturen auf ihr Wachstum untersucht. Eine Mutante, die eine Insertion in einem Regulator mit einer möglichen Funktion bei pH-Toleranz trägt, sollte auch einen pH-abhängigen Phänotyp aufweisen. Um einen pH-abhängigen Phänotyp zu identifizieren, wurden jeweils die Größe und Morphologie der gewachsenen Kolonien auf den Platten mit pH 7 und pH 5,75 des Wildtyps verglichen. Falls das Koloniewachstums einer Mutante bei einer pH-Stufe in Größe oder Morphologie zum Wildtyp abwich, bei der anderen jedoch nicht, galt der Phänotyp als pH-abhängig (Abb. D-11).

Aus 56 untersuchten Integrationsmutanten hatten 5 einen pH-abhängigen Phänotyp. Hierbei handelte es sich um Stämme mit Integration in *smal1887*, *smc02584* (*actR*), *smc03015* (*visN*), *smc03046* (*rem*) und *smc04348*. Bei all diesen Mutanten entsprach die Größe der Kolonie bei pH 7 der des Wildtyps. Die Kolonien der *visN*-Mutante und der *smc04348*-Mutante waren nach Anzucht bei pH 5,75 dicker als die des Wildtyps, während die Kolonien der *smal1887*-Mutante deutlich dünner als die des Wildtyps waren. Die Kolonien der *actR*-Mutante und der *rem*-Mutante waren zwar etwas dünner als die des Wildtyps, jedoch nicht so

dünn wie die *sma1887*-Mutante. Dass *actR* bereits für *S. medicae* als regulatorisches Gen der pH-Toleranz identifiziert werden konnte, spricht für die gewählte Vorgehensweise. Weiterhin wurden mit *visN* und *rem* zwei regulatorische Gene der Motilität identifiziert. Das Genprodukt von *sma1887* besitzt Homologien zu dem RND-Effluxsystem Regulator AcrR. Für das Genprodukt von *smc04348* konnten lediglich Homologien zu TetR ähnlichen Regulatoren gefunden werden.



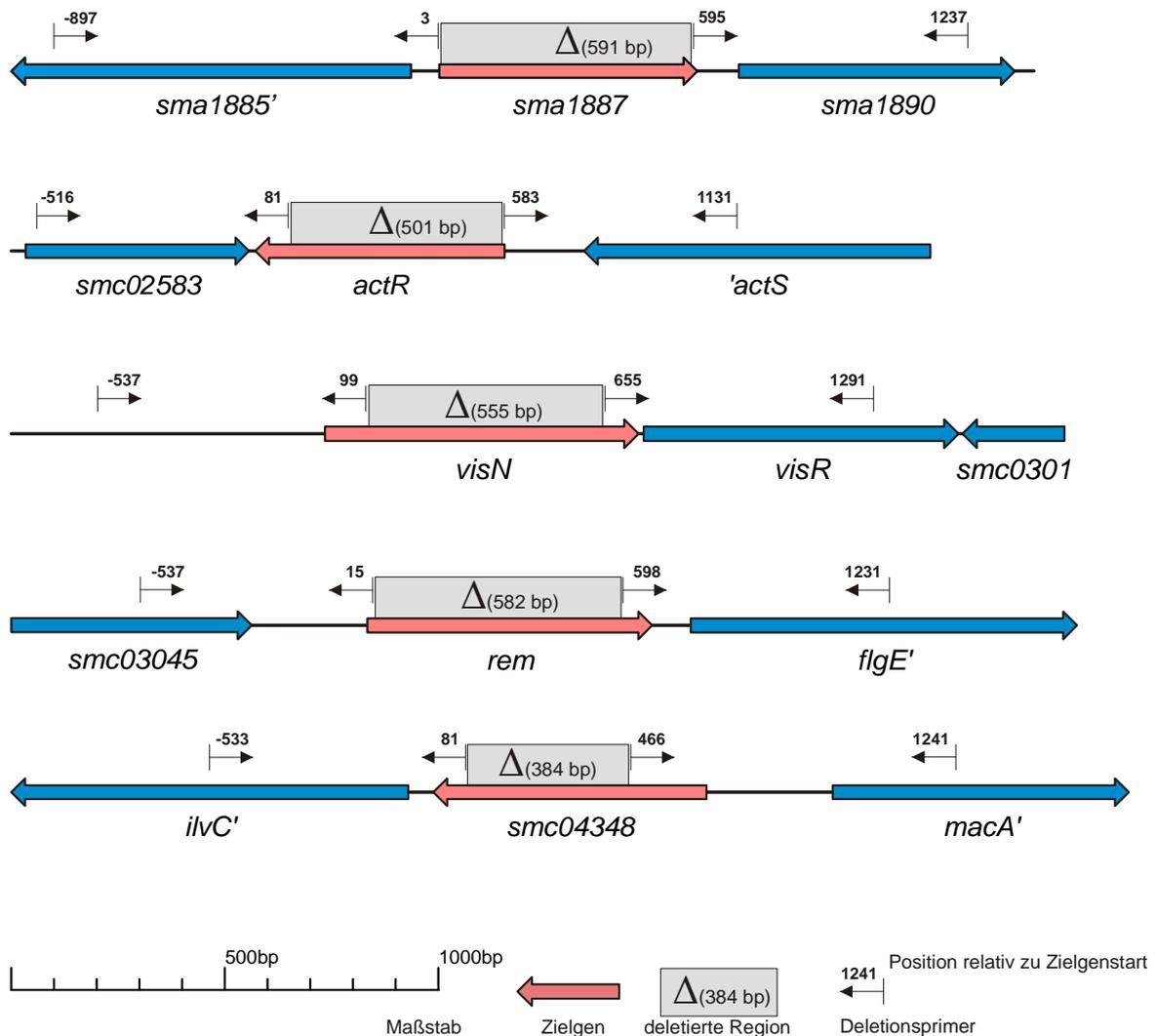
**Abbildung D-11: Exemplarischer Wachstumstest von 23 Regulatormutanten auf VMM-Festmedium in Abhängigkeit vom pH Wert.** Das Wachstum des Wildtyps wurde mit dem der Mutanten der Regulatorgene verglichen, die während des Zeitreihenexperimentes differentiell exprimiert vorlagen. Jeweils 5  $\mu$ l Zellsuspension der Kulturen wurden zweifach (durch die gestrichelte weiße Linie getrennt) auf einer großen VMM-Agarplatte mit pH 7 (oben) und pH 5,75 (unten) aufgetropft. Die Zahlen geben eine fortlaufende Nummerierung der Mutanten an. Mutante 9 zeigte bei pH 7 ein ähnliches Wachstum wie der Wildtyp, Mutante 22 jedoch hatte ein deutlich schlechteres Wachstum als der Wildtyp. Bei pH 5,75 war das Wachstum sowohl von Mutante 9, als auch von Mutante 22, schlechter als das des Wildtyps. Daher war nur für Mutante 9 ein pH-abhängiger Phänotyp festzustellen, da sie bei pH 7 ähnlich gut wie der Wildtyp wuchs. Mutante 22 hingegen hatte ein pH-unabhängig schlechteres Wachstum als der Wildtyp.

### 4.1. Funktionelle Charakterisierung der Mutanten, die einen pH-abhängigen Phänotyp zeigten

Um eine mögliche Rolle der fünf identifizierten regulatorischen Gene im Zusammenhang mit pH-Toleranz zu untersuchen, sollten die Mutanten dieser Gene charakterisiert werden. Durch Wachstumstests in Flüssigmedium sollten zunächst die Wachstumsunterschiede zum Wildtyp besser quantifiziert werden. Zur Identifikation potentieller Zielgene der Regulation von mutierten Genen, sollten dann *Microarray*-Experimente mit den Mutanten durchgeführt werden. Da in den Plasmid-Integrationsmutanten die Last des integrierten Plasmids zu unvorhersehbaren sekundären Effekten führen kann und das Plasmid außerdem bei fehlendem Selektionsdruck verloren gehen kann, sollten zunächst markerfreie Deletionsmutanten der fünf identifizierten regulatorischen Gene erstellt werden.

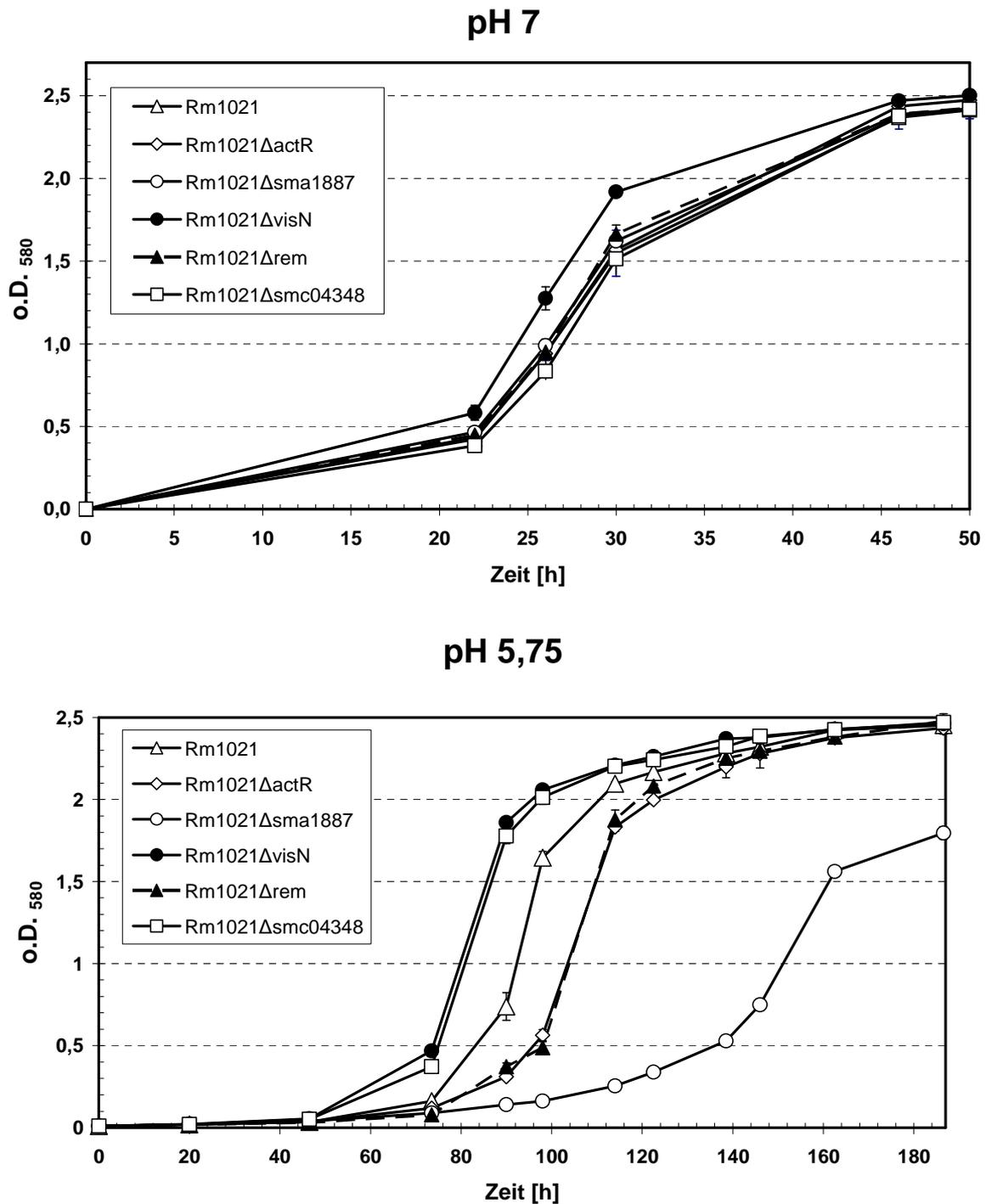
#### 4.1.1. Von fünf Regulatorgenen wurden Deletionsmutanten hergestellt

Zum Erstellen des Deletionskonstruktes wurde die Technik des Gene-SOEing verwandt. Hierzu sind zunächst jeweils die beiden Flanken des zu deletierenden Gens mittels PCR amplifiziert worden. In einem weiteren Schritt wurden diese Flanken miteinander durch die SOEing-PCR verknüpft, so dass als Resultat lediglich die native Sequenz um das Zielgen erhalten blieb. Dieses Deletionskonstrukt wurde dann in den pK18mobSacB Kloniervektor inseriert, anhand dessen durch Selektion auf die Vektorresistenz (Kanamycin) und anschließendes *curing* des Plasmides (Sucrosemedium), die Deletion im Genom von *S. meliloti* 1021 etabliert werden konnte. Auf diese Weise wurden die markerfreien Deletionsmutanten von *sma1887* (Rm1021 $\Delta$ *sma1887*), *actR* (Rm1021 $\Delta$ *actR*), *visN* (Rm1021 $\Delta$ *visN*), *rem* (Rm1021 $\Delta$ *rem*) und *smc4348* (Rm1021 $\Delta$ *smc04348*) erstellt (Abb. D-12). Abschließend wurde die erfolgte Deletion durch Sequenzierungen der umgebenden Region bestätigt.



**Abbildung D-12: Karte der genetischen Region um die deletierten regulatorischen Gene.** Die zur Deletion ausgewählten Gene (rote Pfeile) und benachbarte Gene (blaue Pfeile) sind jeweils mit deren Namen maßstabsgetreu eingezeichnet. Die Lokalisation der vier Primer zum Erstellen des jeweiligen Deletionskonstruktes (schwarze Pfeile) deutet an, welcher Teil des Gens deletiert worden ist (grauer Kasten). Die Länge des deletierten Bereichs ist angegeben.

Um die Ergebnisse des VMM-Plattentests der Plasmid-Integrationsmutante zu bestätigen, wurden die Deletionsmutanten auf ihr pH-abhängiges Wachstum in Flüssigmedium untersucht (Abb. D-13). Erst durch diesen Test ließen sich genauere Aussagen über das qualitative Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp machen. Der Phänotyp auf der Agarplatte kann subjektiv durch unterschiedliche bestimmte Morphologien der Mutanten verfälscht werden, z.B. wenn eine Mutante eine erhöhte Exopolysaccharidbiosynthese aufweist.



**Abbildung D-13: Wachstumstest der Deletionsmutanten in VMM-Flüssigmedium bei pH 5,75 (oben) und pH 7 (unten).** Der Wildtyp und fünf Deletionsmutanten wurden auf ihr Wachstum bei pH 7 (oben) und pH 5,75 untersucht. Die Zelldichte der angezogenen Kulturen wurde indirekt über die optische Dichte bei 580 nm bestimmt (y-Achse) und gegen die benötigte Inkubationszeit aufgetragen (x-Achse). Die Symbole der Wachstumsgrafiken geben den jeweiligen Stamm an. Jeder Messpunkt wurde aus dem Mittelwert von vier biologischen Replikaten errechnet. Die Standardabweichungen sind ebenfalls für jeden Punkt angegeben, da diese aber gering waren, verschwinden sie größtenteils unter den eingezeichneten Messpunkten.

Der Wachstumstest der Deletionsmutanten (Abb. D-13) bestätigt mit Ausnahme von Rm1021 $\Delta$ *visN* die Ergebnisse des Wachstumstests der Integrationsmutanten auf VMM-Festmedium. Nach Anzucht bei pH 7 war der Wachstumsverlauf der *actR*-, *sma1887*-, *rem*- und *smc04348*-Mutante ähnlich dem des Wildtyps, Rm1021 $\Delta$ *visN* jedoch zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein schnelleres Wachstum.

Bei pH 5,75 hatten alle Mutanten einen unterschiedlichen Wachstumsverlauf im Vergleich zum Wildtyp. Die *visN*- und die *smc04348*-Mutante hatten eine verkürzte lag-Phase, während die log-Phase ähnlich wie beim Wildtyp verlief. Umgekehrt verhielt es sich bei der *rem*- und der *actR*-Mutante, hier dauerte die lag-Phase länger als beim Wildtyp, das Wachstum in der log-Phase verlief wieder ähnlich wie beim Wildtyp. Am deutlichsten eingeschränkt war das Wachstum von Rm1021 $\Delta$ *sma1887*. Erst nach ca. 150 h Anzucht wurde die log-Phase erreicht.

Die Mutante Rm1021 $\Delta$ *visN* zeigte bei pH 7, genau wie bei pH 5,75, eine verkürzte lag-Phase im Vergleich zum Wildtyp. Das Wachstum scheint daher pH-unabhängig und generell besser zu sein als das des Rm 1021 Wildtyps unter den gewählten Bedingungen. Die übrigen Mutanten bestätigten den pH-abhängigen Phänotyp.

### 4.2. Untersuchung der möglichen Ursachen des pH-abhängigen Phänotyps der Deletionsmutanten

Nachdem der pH-abhängige Phänotyp von vier Deletionsmutanten nachgewiesen werden konnte, sollten nun die Ursachen für das veränderte Wachstumsverhalten untersucht werden. Hierzu wurde die transkriptionelle Antwort der Mutanten mit der des Wildtyps verglichen. Die differentiell exprimierten Gene in der Mutante sind potentielle Zielgene der mutierten Regulatoren bzw. Gene, die durch sekundäre Effekte der Mutation in ihrer Expression beeinflusst worden sind. Die Expressionsunterschiede sind wahrscheinlich auch die Ursachen für den Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp und Mutante bei niedrigem pH. Die identifizierten, differentiell exprimierten Gene könnten daher eine Rolle im Zusammenhang mit der pH-Toleranz von *S. meliloti* 1021 spielen.

### 4.2.1. Die Deletionsmutante Rm1021 $\Delta$ *actR* zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine gegensätzlichen Genexpression zweier Oxidasen

Das Gen *actR* wurde bereits für *S. medicae* durch Transposonmutagenese als ein regulatorisches Gen der pH-Toleranz identifiziert (Tiwari *et. al.*, 1996). Durch den hier gewählten Ansatz konnte das orthologe Gen auch für *S. meliloti* 1021 als essentielles Gen der pH-Toleranz identifiziert werden, da die *actR*-Mutante nach Anzucht bei pH 5,75 ein langsames Wachstum als der Wildtyp zeigte (Abb. D-13). Das Gen *actR* wurde zur Deletion ausgewählt, da es während der Zeitreihe einem M-Wert von 1,06 erreichte (t 63). Es bildet zusammen mit *actS* ein typisches Zwei-Komponenten Regulationssystem (Fenner *et. al.*, 2004). ActS bildet die membrandurchspannende Histidinkinase, die den Regulator ActR nach Erhalt des Aktivierungssignals aktiviert. In *S. medicae* konnten Gene der Stickstofffixierung als ActR-abhängig aktiviert nachgewiesen werden (Fenner *et. al.*, 2004). Das orthologe *S. meliloti* ActR ist zu 97,9 % identisch, ActS besitzt 94,9 % Homologie.

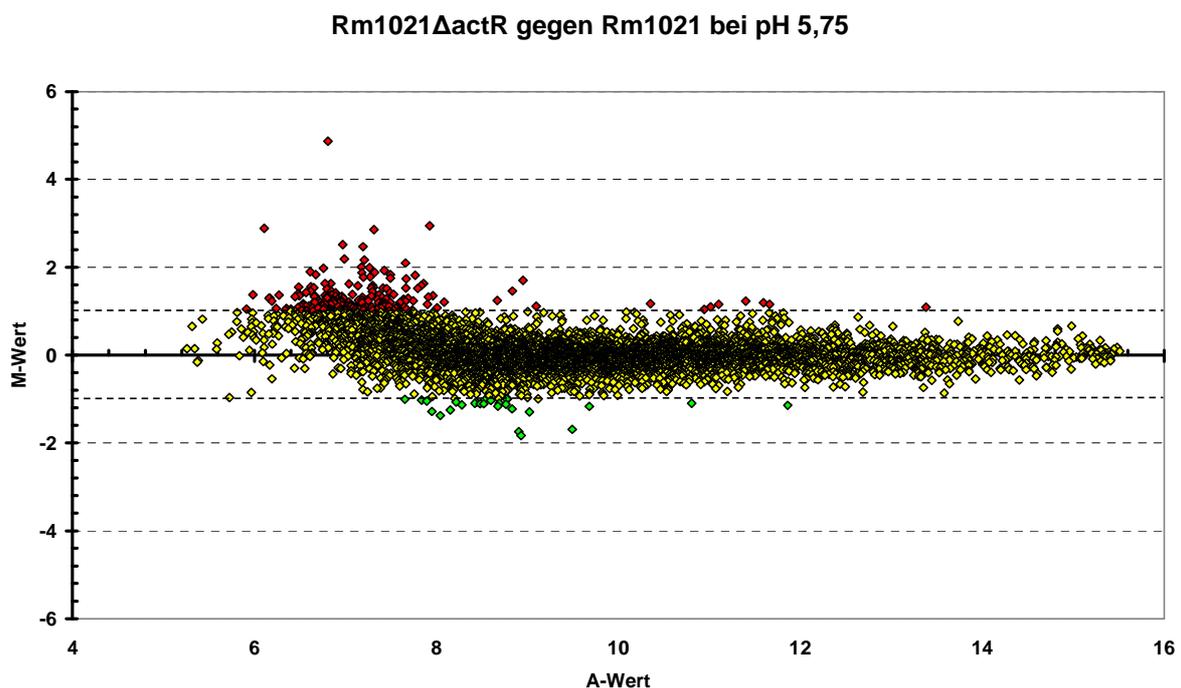
Um die transkriptionellen Differenzen von Rm1021 $\Delta$ *actR* im Vergleich zum Wildtyp zu identifizieren, wurden sowohl Mutante als auch Wildtyp in VMM bei pH 5,75 angezogen und jeweils drei biologische Replikate nach Erreichen einer o.D. <sub>580</sub> von 0,8 geerntet. Nach den üblichen Prozeduren der RNA-Isolation und reversen Transkription wurden die jeweils unterschiedlich gefärbte Mutanten- und Wildtyp-cDNA gegen den Sm6kOligo hybridisiert und nach dem Scannen durch Imagene und EMMA ausgewertet. Als differentiell exprimiert galten wiederum die Gene, deren M-Werte  $\geq 1$  oder  $\leq -1$  waren. Der Scatterplot zeigt eine geringe Streuung der Messpunkte (Abb. D-14). Oberhalb eines A-Wertes von 8 erreicht kein Messwert einen M-Wert von 2 oder -2. Insgesamt lagen in Rm1021 $\Delta$ *actR* 12 Gene induziert vor, während 21 Gene geringer als im Wildtyp exprimiert waren (Tab. D-2). Das aufgrund der Deletion am deutlichsten reprimierte Gen war *actR* selber (M=-1,83).

Die differentiell exprimierten Gene deuten einen gegensätzlichen Einfluss auf zwei Komponenten der Elektronentransportkette an. Die Deletion von *actR* verursacht sowohl eine Induktion von Gen *qxtA* des *qxtAB*-Operons als auch eine geringere Expression des *cyoABC*-Operons. Beide Operons kodieren vermutlich für eine Ubiquinol Oxidase der Elektronentransportkette. Das *qxtAB*-Operon kodiert für Proteine mit Homologie zu einer Cytochrom-*d*-Ubiquinol Oxidase, während die Genprodukte des *cyoABC*-Operon vermutlich für eine Cytochrom-*o*-Ubiquinol Oxidase kodieren. Die wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden Oxidasetypen liegen in der Affinität zu Sauerstoff und der Protonenpumpaktivität. Das *cyoABC*-Operon kodiert für eine Oxidase mit geringer

Sauerstoffaffinität und hoher Protonenpumpaktivität, während das *qxtAB*-Operon für eine Oxidase mit hoher Sauerstoffaffinität und niedriger Protonenpumpaktivität kodiert.

Elemente beider Oxidasen zeigten sich während des pH-Zeitreihenexperimentes im Wildtyp deutlich induziert, beide jedoch erst zum letzten Testzeitpunkt (*cyoB*: M=2,67; *qxtA*: M=3,03). Analog dazu hatte auch *actR* den höchsten Expressionswert zum letzten Testzeitpunkt. Da *actR* bei pH 5,75 einen aktivatorischen Einfluss auf die Expression von *cyoABC* und einen repressorischen auf *qxtA* hatte, beide aber im Wildtyp nach pH-Stress eine Induktion zeigten, ist wahrscheinlich ein weiterer Regulator involviert. In Zusammenhang mit der differentiellen Expression der Oxidasen treten vermutlich koreguliert einige Gene der Häm-Biosynthese wie z.B. *hemA* und *ctaB* und ein Cytochrom-Gen (*fbcC*) auf, deren Expression von *actR* direkt oder indirekt beeinflusst wird.

Wie die transkriptionelle Analyse belegt, ist ActR in *S. meliloti* sicherlich kein globaler Regulator. Die differentiell exprimierten Gene zeigen eine Regulationsaufgabe innerhalb der Elektronentransportkette.



**Abbildung D-14: Scatterplot der *Microarray*resultate von Rm1021 $\Delta$ actR im Vergleich zu Rm1021 nach Anzucht bei pH 5,75.** Zu drei biologischen Replikaten von Mutante und Wildtyp wurde jeweils ein Sm6kOligo-*Microarray* hybridisiert. Die Resultate sind in einem Scatterplot zusammengefasst, bei dem jeder Punkt den Expressionswert (M-Wert; y-Achse) und Intensitätswert (A-Wert; x-Achse) jedes Gens darstellt. Die gestrichelte Linie bei M = 1 und M = -1 zeigt den Schwellenwert an. Darüberliegende Gene werden als induziert (rote Punkte), darunterliegende als geringer exprimiert  $\leq -1$  (grüne Punkte) betrachtet. Da die Grenzen für den A-Wert bei  $\geq 8$  lagen konnte ein großer Teil der induzierten Gene die Kriterien nicht erfüllen.

## D. Ergebnisse

**Tabelle D-2: Differentiell exprimierte Gene der transkriptionellen Untersuchung von Rm1021 $\Delta$ actR im Vergleich zum Wildtyp nach Anzucht bei pH 5,75.**

Name	Alias	M-Wert <sup>1)</sup>	Annotation
smc02584	actR	-1,83	pH-Toleranz regulatorisches Protein ActR
smb21489	cyoC	-1,74	Cytochrom O Ubiquinol Oxidase Polypeptid III (EC 1.10.3. -)
smc03104	hemA	-1,69	5-Aminolävulinat Säure Synthase (EC 2.3.1.37)
smb21043		-1,38	Hypothetisches Protein
smc00972	dxs	-1,29	1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphat Synthase (EC 2.2.1.7)
smb20669	hyi	-1,25	Hydroxypyruvat Isomerase
sma1400	acdA	-1,22	Acyl-CoA Dehydrogenase (EC 1.3.99.-)
smb21487	cyoA	-1,17	Ubiquinol Oxidase Polypeptid II Vorstufe (EC 1.10.3.-)
smb21488	cyoB	-1,16	Ubiquinol Oxidase Polypeptid I (EC 1.10.3.-)
smc00189	fbcC	-1,14	Cytochrom b/c <sub>1</sub>
smb21315	wgdB	-1,13	Putatives Membran-Fusionsprotein WgdB (ehemals ExpD2)
smb21252		-1,12	Putative Glycosyltransferase
smb21105		-1,11	Putative Zuckeraufnahme ABC Transporter Permease
smb21206		-1,11	Putatives ABC Transporter ATP-Bindeprotein
smc00858		-1,10	Konserviertes hypothetisches Protein
smc03141		-1,10	Putative Diguanylate Phosphodiesterase
smc00450	ctaB	-1,09	Protohäm IX Farnesyltransferase (EC 2.5.1.-)
smc00590		-1,07	Putatives ABC Transporter ATP-Bindeprotein
smb20263		-1,07	Putatives periplasmatisches ABC-Transporter Aminosäure Bindeprotein
smc03225		-1,02	Hypothetisches, unbekanntes Protein
smb21670		-1,00	Konserviertes hypothetisches Protein
smb20578	pcaC	1,04	4-Carboxymuconolactone Decarboxylase (EC 4.1.1.44)
sma0579	cyaN	1,07	Adenylate Cyclase 2 (EC 4.6.1.1)
smc03847	ccmA	1,10	Putativer Häm-Exportierender ABC-Transporter
smb20078		1,11	<i>Response Regulator</i>
smc00280		1,16	Konserviertes hypothetisches Protein
smc00929		1,16	Möglicher transkriptioneller Regulator
smb20364		1,17	Putative Eisen-3-Transportsystem Permease
smc01718		1,19	Hypothetisches Transmembranprotein
sma1018		1,20	Hypothetisches Protein
smc04411		1,23	Membrangebundene lytische Murein Transglycosylase B Vorstufe (EC 3.2.1.-)
smc01671		1,46	Hypothetisches Protein
smc02255	qxtA	1,71	Cytochrom D Ubiquinol Oxidase Untereinheit I (EC 1.10.3.-)

<sup>1)</sup> Der M-Wert entspricht dem log<sub>2</sub>-Wert der *Spot*intensitäten der Mutante Rm1021 $\Delta$ actR im Vergleich zum Wildtyp nach Anzucht bei pH 5.75.

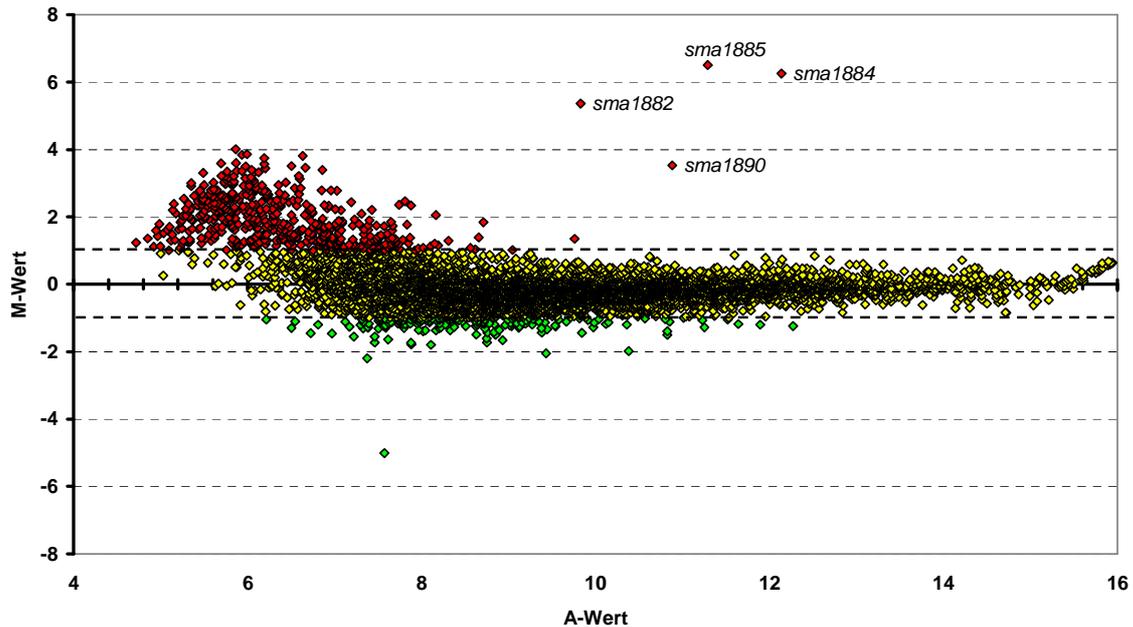
### 4.2.2. Die konstitutive Expression eines RND-Efflux Systems verursacht die pH-Sensitivität der *sma1887*-Mutante

Das Gen *sma1887* war während des Zeitreihenexperimentes zu allen Messpunkten induziert (für t 8 lag kein Messwert vor) mit M-Werten von 1,11 (t3), 1,68 (t13), 1,37 (t18), 1,5 (t33) und 1,49 (t63). Das Gen kodiert für einen transkriptionellen Regulator mit Homologie zu AcrR, einem Regulator eines Multidrug-Efflux Systems in *E. coli* (Ma *et. al.*, 1996).

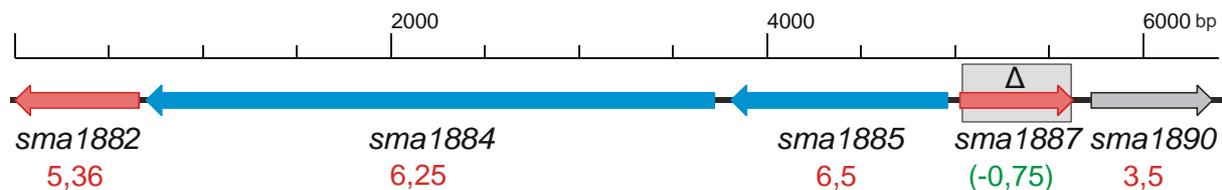
Das Wachstum von Rm1021Δ*sma1887* war nach Anzucht bei pH 5,75 im Vergleich zum Wildtyp am deutlichsten eingeschränkt (Abb. D-13). Aufgrund dieses stark eingeschränkten Wachstums der Mutante wurde von einem transkriptionellen Vergleich mit dem Wildtyp bei pH 5,75 abgesehen. Der deutliche Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit lässt auf einen erheblichen Stress der Zelle schließen, die transkriptionelle Analyse würde daher von sekundären Stressantworten überlagert werden. Aus diesem Grunde wurde bei Rm1021Δ*sma1887* der Vergleich mit dem Wildtyp bei pH 7 durchgeführt. Wie zuvor bei Rm1021Δ*actR*, wurden die transkriptionellen Antworten dreier biologischer Replikate nach Erreichen einer o.D. <sub>580</sub> von 0,8 mit dem Sm6kOligo untersucht.

Der Scatterplot des *Microarray*-Experimentes (Abb. D-15) zeigt für jedes Gen den M- und A- Wert. Unterhalb der Intensitätsgrenze eines A-Wertes von 8 streuen die Messwerte deutlich. Oberhalb dieser Grenze fallen vier stark induzierte Gene auf, die in genetischer Nachbarschaft von *sma1887* liegen: *sma1885*, *sma1884*, *sma1882* und *sma1890* (Abb. D-16). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass *sma1887* für einen Repressor kodiert, der die Gene im näheren genetischen Umfeld kontrolliert. Die Gene *sma1884* und *sma1885* liegen stromabwärts benachbart von *sma1887* und haben Homologien zu *acrA* und *acrB* (Ma *et. al.*, 1995). Die Gene kodieren in *E. coli* das periplasmatische Verbindungsstück (*acrA*) und den *Multidrug*-Protonen Antiporter (*acrB*), die zusammen mit einem Kanal der äußeren Membran (*tolC*) ein *Multidrug*-Efflux-System bilden. Ein solches System dient dem Ausschleusen eines breiten Spektrums antimikrobieller Substrate wie z.B. Antibiotika, Detergenzien, Farbstoffe und organische Lösungen. Da *Sma1887* Homologien zu AcrR besitzt, einen bekannten Repressor von *acrAB* (Ma *et. al.*, 1996), ist die hohe Induktion der Gene *sma1884* und *sma1885* in RmΔ*sma1887*-Mutante schlüssig. Das Gen *sma1882* ist ein hoch induziertes regulatorisches Gen, das stromabwärts von *sma1884* lokalisiert ist. Ähnlich wie *sma1887*, besitzt es Homologien zu AcrR.

Rm1021 $\Delta$ sma1887 gegen Rm1021 bei pH 7



**Abbildung D-15: Scatterplot der *Microarray*resultate von Rm1021 $\Delta$ sma1887 im Vergleich zu Rm1021 nach Anzucht bei pH 7.** Zu drei biologischen Replikaten von Mutante und Wildtyp wurde jeweils ein Sm6kOligo-*Microarray* hybridisiert. Die Resultate sind in einem Scatterplot zusammengefasst, bei dem jeder Punkt den Expressionswert (M-Wert; y-Achse) und Intensitätswert (A-Wert; x-Achse) jedes Gens darstellt. Die gestrichelte Linie bei M = 1 und M = -1 zeigt den Schwellenwert an. Darüberliegende Gene werden als induziert (rote Punkte), darunterliegende als geringer exprimiert  $\leq -1$  (grüne Punkte) betrachtet. Da die Grenzen für den A-Wert bei  $\geq 8$  lagen, konnte ein großer Teil der induzierten Gene die Kriterien nicht erfüllen.



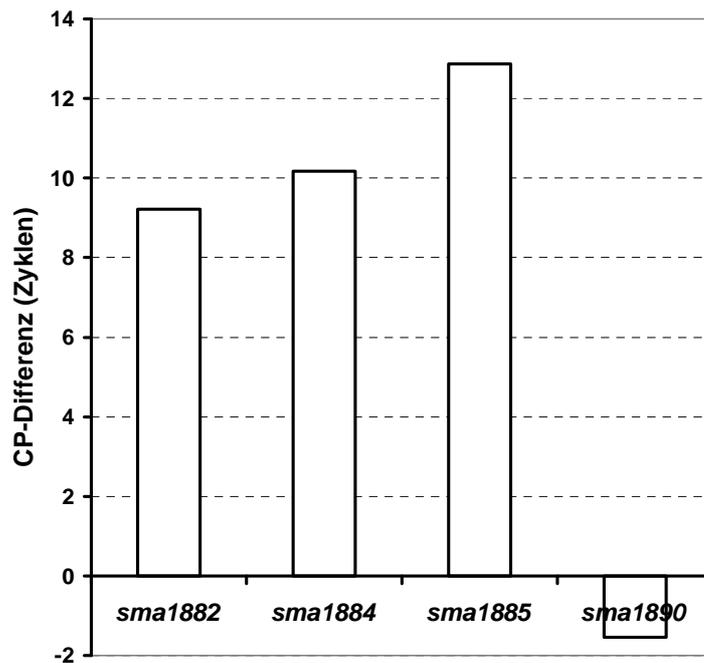
**Abbildung D-16: Physikalische Karte der Genregion um *sma1887*.** Die Gene sind entsprechend ihrer Leserichtung in Pfeilen dargestellt, die Gennamen sind angegeben. Die Zahlen in der untersten Zeile geben die M-Werte des *Microarray*-Experimentes an, die Rm1021 $\Delta$ sma1887 im Vergleich zum Wildtyp hatte. Die Deletion von *sma1887* ist durch den grauen Kasten angedeutet.

Durch die Deletion wurde bis auf 12 Basenpaare das komplette Gen *sma1887* entfernt (Abb. D-17). Direkt in Leserichtung angrenzend, befindet sich das hoch exprimierte Gen *sma1890*, das für eine Thioredoxin-Reduktase kodiert.

Um zu überprüfen, ob die hohe Expression von *sma1890* ein Resultat der Promotoraktivität von *sma1887* selber ist, wurde anhand von RT-PCR die Genexpression im Hintergrund der *sma1887* Integrationsmutante (Rm1021::*sma1887*) untersucht. In der Integrationsmutante sollte *sma1890* keine hohen Induktionswerte zeigen, wenn dessen erhöhte Expression in der *sma1887*-Mutante im Zusammenhang mit der Promotoraktivität von *sma1887* gestanden hätte. Zusätzlich wurden noch die Genexpressionen von *sma1882*, *sma1884* und *sma1885* gemessen, um den Effekt der Genunterbrechung von *sma1887* auch für die Integrationsmutante zu bestätigen.

Die Resultate der RT-PCR Messungen (Abb. D-17) bestätigen die Ergebnisse der *Microarray*-Experimente der Rm1021 $\Delta$ *sma1887*-Mutante auch für Rm1021::*sma1887*. Zwar können Messwerte von RT-PCR und *Microarray* nicht direkt miteinander verglichen werden, jedoch zeigen sich in ähnlichen Abstufungen hohe Induktionswerte für *sma1885*, *sma1884* und *sma1882*. Das Gen *sma1890* jedoch zeigt im Gegensatz zu den *Microarray*resultaten in der Integrationsmutante, im Vergleich zum Wildtyp, eine geringere Expression an. Damit ist bestätigt, dass die hohe Expression von *sma1890* in Rm1021 $\Delta$ *sma1887* ein Effekt der Deletion ist. Da durch die Deletion von *sma1887* bis auf den Promotor nahezu das ganze Gen entfernt wurde, könnte die hohe Expression von *sma1890* ein Resultat der Promotoraktivität von *sma1887* sein. Dies würde auch bedeuten, dass *Sma1887* einen repressorischen Effekt auf seinen eigenen Promotor ausübt.

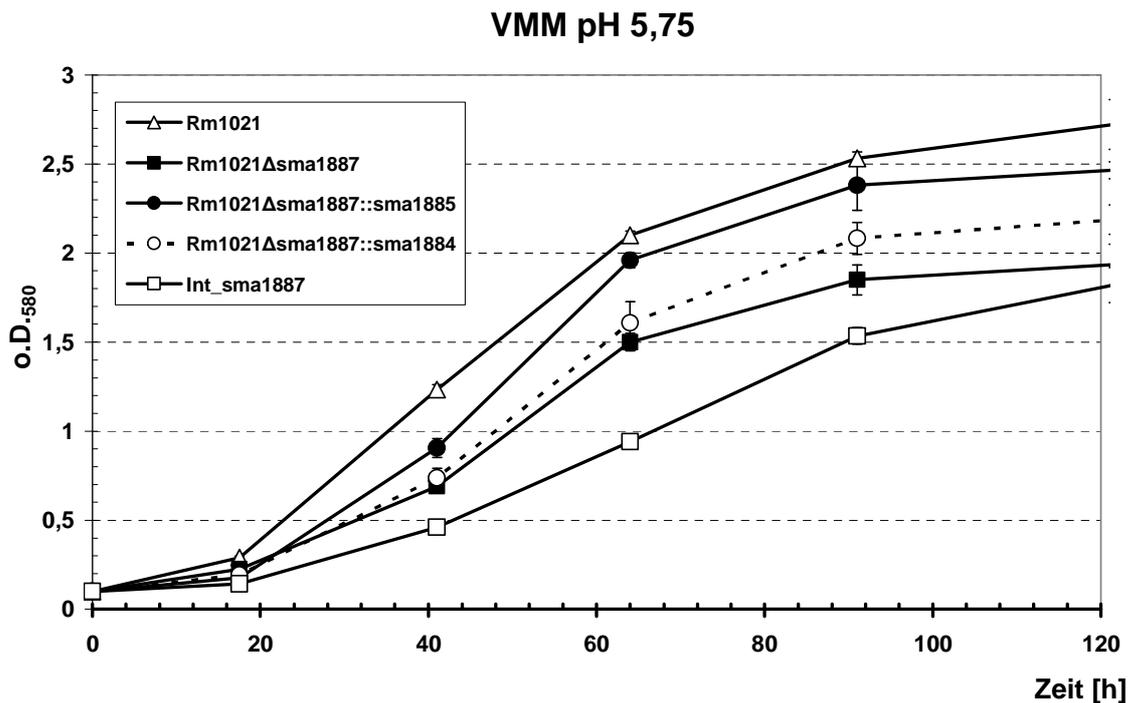
Es liegt die Vermutung nahe, dass die hohe Expression des von *sma1884* und *sma1885* kodierten RND-Effluxsystems, die Ursache für den pH-sensitiven Phänotyp der *sma1887*-Mutante ist. Daher sollte der Einfluss der Überexpression von *sma1884* und *sma1885* untersucht werden. Um diese Gene in der *sma1887*-Mutante auszuschalten, wurden Rm1021 $\Delta$ *sma1887* zusätzlich noch Plasmidintegrationen in den Genen *sma1884* und *sma1885* eingefügt. Die resultierenden Plasmidintegrationsmutanten Rm1021 $\Delta$ *sma1887*::*sma1884* und Rm1021 $\Delta$ *sma1887*::*sma1885* sind anschließend in einem Wachstumstest (Abb. D-18) untersucht worden. Um die Auswirkungen der zusätzlichen genetischen Last durch die Plasmidintegration zu erfassen, wurde die Rm1021::*sma1887*-Mutante ebenfalls untersucht.



**Abbildung D-17: RT RT-PCR Resultate eines Vergleiches der Genexpression von *sma1882*, *sma1884*, *sma1885* und *sma1890* in der *sma1887*-Integrationsmutante (Rm1021::*sma1887*) im Vergleich zum Wildtyp Rm1021.** Nachdem die Zellen in VMM bei pH 7 bis zu einer o.D. <sub>580</sub> von 0,8 angezogen worden sind, wurde die RNA isoliert und eine RT RT-PCR durchgeführt. Die Balken geben die Differenzen in Zyklen an, die zwischen Integrationsmutante und Wildtyp, zum Erreichen des *Crossing-Points* (CP) lagen.

Der Wachstumstest (Abb. D-19) belegt, dass die pH-Sensitivität von Rm1021Δ*sma1887* mit der Überexpression von *sma1884* und *sma1885* zusammenhängt. Während in Rm1021Δ*sma1887*::*sma1884* schon eine deutliche Verbesserung des Wachstums im Vergleich zu Rm1021Δ*sma1887* und Rm1021::*sma1887* zeigt, ist bei Rm1021Δ*sma1887*::*sma1885* das Wachstum des Wildtyps fast wiederhergestellt. Die leichten Wachstumsdefizite von Rm1021Δ*sma1887*::*sma1885* lassen sich mit der Plasmidlast erklären. Der Vergleich von Rm1021Δ*sma1887* mit Rm1021::*sma1887* veranschaulicht die Auswirkungen der Plasmidlast. Die Mutante Rm1021::*sma1887* wächst langsamer als die *sma1887*-Deletionsmutante. Neben den negativen Auswirkungen, die eine Deletion von *sma1887* verursacht, bedeutet die Plasmidlast in der stark gestressten Zelle eine weitere Wachstumseinschränkung.

Das schnellere Wachstum von Rm1021Δ*sma1887*::*sma1885* im Vergleich zu Rm1021Δ*sma1887*::*sma1884* könnte damit begründet sein, dass die beiden Gene ein Operon bilden. Da *sma1885* das erste Gen innerhalb des Operons bildet, sollte eine Insertion zum Verlust beider Transkripte führen und somit einen größeren Einfluss haben. So konnte auch mit Hilfe von bioinformatischen Promotorvorhersage-Programme vor *sma1884* keine Promotorsequenz identifiziert werden.



**Abbildung D-18: Wachstumstest zur Identifikation der Ursachen des pH-sensitiven Phänotyps von Rm1021Δsma1887.** Neben dem Wildtyp Rm1021 (weißes Dreieck) wurden 4 Mutanten getestet: Rm1021Δsma1887 (schwarzes Quadrat), Rm1021Δsma1887::1885 (schwarzer Kreis), Rm1021Δsma1887::sma1884 (weißer Kreis) und Int\_sma1887 (weißes Quadrat). n=4

#### 4.2.3. Der gegensätzliche pH-Phänotyp der Mutanten von *visN* und *rem*

Die Gene *visN* und *rem* wurden jeweils zur Mutation ausgewählt, da beide Gene während der Zeitreihe in den pH-gestressten Zellen reprimiert vorlagen.

Das Gen *visN* wies im Zeitreihenexperiment nach pH-Stress einem M-Wert von -1,06 zu t18 auf. VisN bildet zusammen mit VisR ein Heterodimer aus. Ihre Gene liegen benachbart auf dem Chromosom und sind umgeben von Motilitätsgenen. VisN und VisR sind die Hauptregulatoren der Chemotaxis- und Flagellargene (Sourjik *et. al.*, 2000). *visR* wurde ebenfalls wegen hoher Repressionswerte während der Zeitreihe für die Mutagenese ausgewählt, jedoch konnte keine Mutante erstellt werden. Da die Aktivatoren jedoch ausschließlich als Heterodimer aktiv sind, sollte eine Deletion von *visN* den gleichen Effekt wie eine Deletion von *visR* zeigen.

Das Gen *rem* kodiert für einen Regulator der Motilitätsgene, der VisNR untergeordnet ist (Rotter *et. al.*, 2006) und übt, genau wie VisNR, einen aktivatorischen Einfluss auf die kontrollierten Gene aus. Da die Gene des übergeordneten Regulatorpaares VisNR im

Zeitreihenexperiment reprimiert vorlagen, ist es auch plausibel, dass *rem* während des Zeitreihenexperimentes reprimiert war (M-Wert bei  $t = 63 = -1,2$ ). Die Kontrolle von VisNR über die Motilitätsgene findet ausschließlich durch *rem* statt, d.h. VisNR aktiviert den *rem*-Promotor, Rem selber dann die Motilitätsgene. Sowohl der Verlust von *visN*, *visR* oder *rem* hat zur Folge, dass die Zelle nicht mehr motil ist.

Nach diesen Kenntnissen sollten Mutationen in *visN* und *rem* einen ähnlichen pH-Phänotyp zur Folge haben, der Wachstumstest (Abb. D-13) jedoch zeigte einen gegensätzlichen Effekt. Rm1021 $\Delta$ *visN* erreichte nach Anzucht bei pH 5,75 schneller die log-Phase als der Wildtyp, während Rm1021 $\Delta$ *rem* die log-Phase im Vergleich zum Wildtyp verspätet erreichte.

Um die Ursachen für die phänotypischen Differenzen zu identifizieren, wurden *Microarray*-Analysen der beiden Mutanten vorgenommen. Analog zu den vorangehenden Experimenten wurde jeweils das Transkriptom der beiden Mutanten mit dem Wildtyp nach Anzucht in VMM bei pH 5,75 verglichen. Von drei biologischen Replikaten sind nach Erreichen einer o.D.<sub>580</sub> von 0,8 die Zellen geerntet worden.

Die Scatterplots der *Microarray*-Resultate (Abb. D-19) belegen die unterschiedlichen Einflüsse, die eine Deletion von *visN* und *rem* auf das Transkriptom haben.

Wie der Scatterplot zeigt, liegen in der *visN*-Mutante kaum differentiell exprimierte Gene vor. Mit Berücksichtigung des p-Wertes ergeben sich nach Anzucht unter niedrigem pH lediglich zwei Gene als signifikant differentiell exprimiert. Der errechnete p-Wert von *nosZ* (0,053) lag knapp oberhalb des Schwellenwertes von 0,05. Das Gen wurde daher gefiltert.

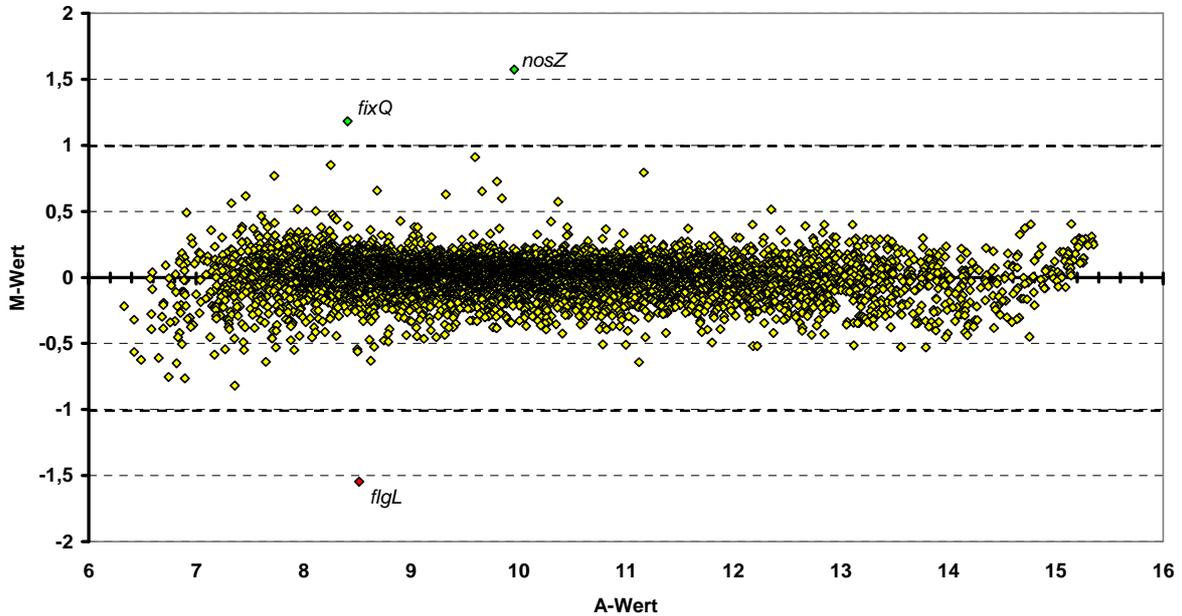
Das Gen *fixQ1* lag mit  $M = 1,18$  höher exprimiert vor. Es ist Teil des *fixNOQP* Operons, das für eine Cytochrom cbb3 Typ Oxidase mit hoher Affinität zu Sauerstoff kodiert. Während der Bakteriod-Phase im Knöllchen ist diese Terminale Oxidase bei dem vorherrschenden niedrigen Sauerstoffpartialdruck exprimiert. Das zweite differentiell exprimierte Gen war *flgL* mit  $M = -1,55$ . Das Genprodukt von *flgL* ist Teil der Flagellarbiosynthese. Obwohl mit *visN* das Gen des Hauptaktivators des Flagellarapparates ausgeschaltet wurde, ist das Fehlen weiterer differentiell exprimierter Flagellargene nicht verwunderlich, da im Zeitreihen pH-Experiment gezeigt werden konnte, dass die Flagellargene bei niedrigem pH im Wildtyp geringer exprimiert wurden.

Wie der Scatterplot zeigt (Abb. D-19) waren in Rm1021 $\Delta$ *rem* mehr Gene im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimiert. Insgesamt lagen 5 Gene reprimiert und 13 Gene induziert vor (Tab. D-3). Fast alle differentiell exprimierten Gene sind mit der

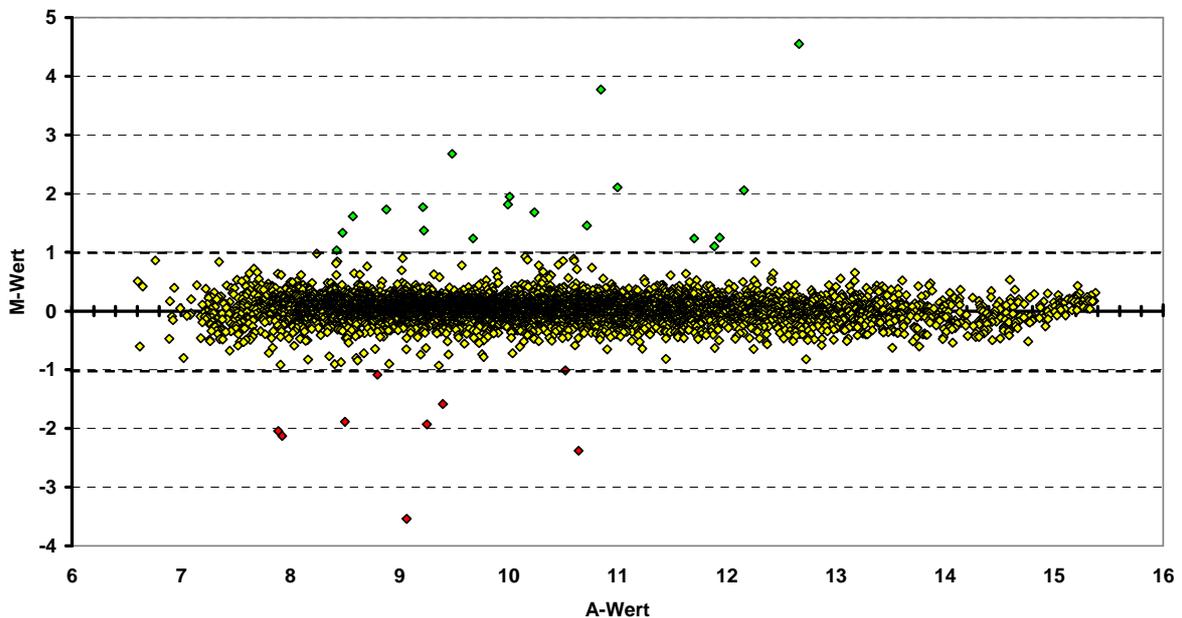
## D. Ergebnisse

Elektronentransportkette assoziiert. Ein regulatorischer Zusammenhang von Rem mit Elementen der Elektronentransportkette wurde bisher nicht beschrieben.

Rm1021 $\Delta$ visN gegen Rm1021 bei pH 5,75



Rm1021 $\Delta$ rem gegen Rm1021 bei pH 5,75



**Abbildung D-19: Scatterplot der *Microarray*resultate von Rm1021 $\Delta$ visN (oben) und Rm1021 $\Delta$ rem (unten) im Vergleich zu Rm1021 nach Anzucht bei pH 5,75.** Von drei biologischen Replikaten der Mutante und des Wildtyps wurde jeweils ein Sm6kOligo-*Microarray* hybridisiert. Die Resultate sind in einem Scatterplot zusammengefasst, bei dem jeder Punkt den Expressionswert (M-Wert; y-Achse) und Intensitätswert (A-Wert; x-Achse) jedes Gens darstellt. Die gestrichelte Linie bei M = 1 und M = -1 zeigt den Schwellenwert an. Darüberliegende Gene werden als induziert (rote Punkte), darunterliegende als geringer exprimiert  $\leq -1$  (grüne Punkte) betrachtet.

**Tabelle D-3: Resultate der Hybridisierung isolierter RNA von Rm1021Δrem und Rm1021 gegen den Sm6kOligo *Microarray*.**

Name	Alias	M-Wert <sup>1)</sup>	Annotation
<i>smb20342</i>		-3,54	putative Isoquinolin 1-Oxidoreduktase
<i>smb20292</i>		-2,38	hypothetisches immunogenes Protein
<i>smb20343</i>		-1,93	putative Isoquinolin 1-Oxidoreduktase
<i>smb20263</i>		-1,89	periplasmatisches Bindeprotein eines putativen ABC-Transporters
<i>smb20284</i>		-1,58	periplasmatisches Bindeprotein eines putativen ABC-Transporters
<i>sma1041</i>		1,10	Kupfer-Bindeprotein
<i>sma1084</i>		1,24	Phosphoketolase
<i>sma1149</i>		1,37	konserviertes hypothetisches Protein
<i>sma1183</i>	<i>nosD</i>	1,61	periplasmatisches Kupfer-Bindeprotein .
<i>sma1082</i>		1,68	konserviertes hypothetisches Protein
<i>sma1220</i>	<i>fixN1</i>	1,73	Cytochrom c Oxidase Polypeptid I
<i>sma1213</i>	<i>fixP1</i>	1,77	Di-Häm C-Typ Cytochrom
<i>sma1243</i>	<i>azu1</i>	1,81	Pseudoazurin
<i>sma1182</i>	<i>nosZ</i>	1,95	Di-Stickstoff Monoxid Reduktase
<i>smc04089</i>		2,11	konserviertes hypothetisches Protein
<i>sma1214</i>	<i>fixQ1</i>	2,68	Stickstoff-Fixierungs Protein
<i>sma0091</i>		3,77	konserviertes hypothetisches Protein
<i>sma0089</i>		4,55	konserviertes hypothetisches Protein

<sup>1)</sup> Der M-Wert entspricht dem log<sub>2</sub>-Wert der Spotintensitäten der Mutante Rm1021Δrem im Vergleich zum Wildtyp nach Anzucht bei pH 5.75.

Unter den reprimierten Genen befanden sich zwei Gene des Operons einer Isoquinolin Oxidoreduktase (*smb20342* und *smb20343*) und zwei Bindeproteine zweier ABC-Transportsysteme (*smb20263* und *smb20284*).

Die am stärksten induzierten Gene kodieren für benachbart liegende konservierte hypothetische Proteine (*sma0089* und *sma0091*). Daneben sind bis auf *fixO1* alle Gene des *fixNOQP*-Operons vertreten sowie zwei Gene der Di-Stickstoffmonoxid Reduzierung. Das Gen *fixQ1* trat auch in der *visN*-Mutante als differentiell exprimiert auf.

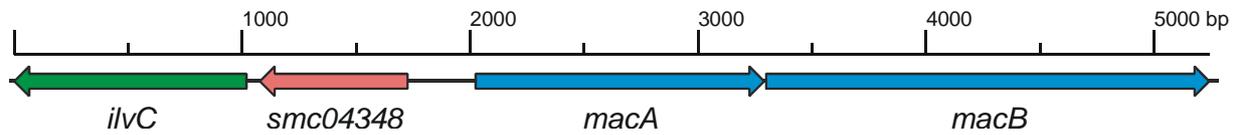
#### 4.2.4. In Rm1021Δsmc04348 sind *nex18* und *ilvC* differentiell exprimiert

Der Wachstumstest der *smc04348*-Mutante belegte eine verkürzte lag-Phase bei pH 5,75 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. D-13). Während des Zeitreihenexperimentes gab es für die ersten vier getesteten Zeitpunkte von *smc04348* keine Messwerte, da die Spotintensitäten unterhalb des Mindestwertes lagen, für t 33 und t 63 lagen die Expressionswerte bei 0,2 und 0,04. Das Gen *smc04348* wurde dennoch als Kandidat ausgewählt, da das Umfeld des Gens (Abb. D-20) stark differentiell exprimierte Gene während des Zeitreihenexperimentes enthielt. Das stromabwärts lokalisierte *ilvC* (Isoleucin und Valin Biosynthese) war reprimiert, ein stromaufwärts gelegenes Macrolid-Exportsystem (*macA* und *macB*) war stark induziert.

## D. Ergebnisse

---

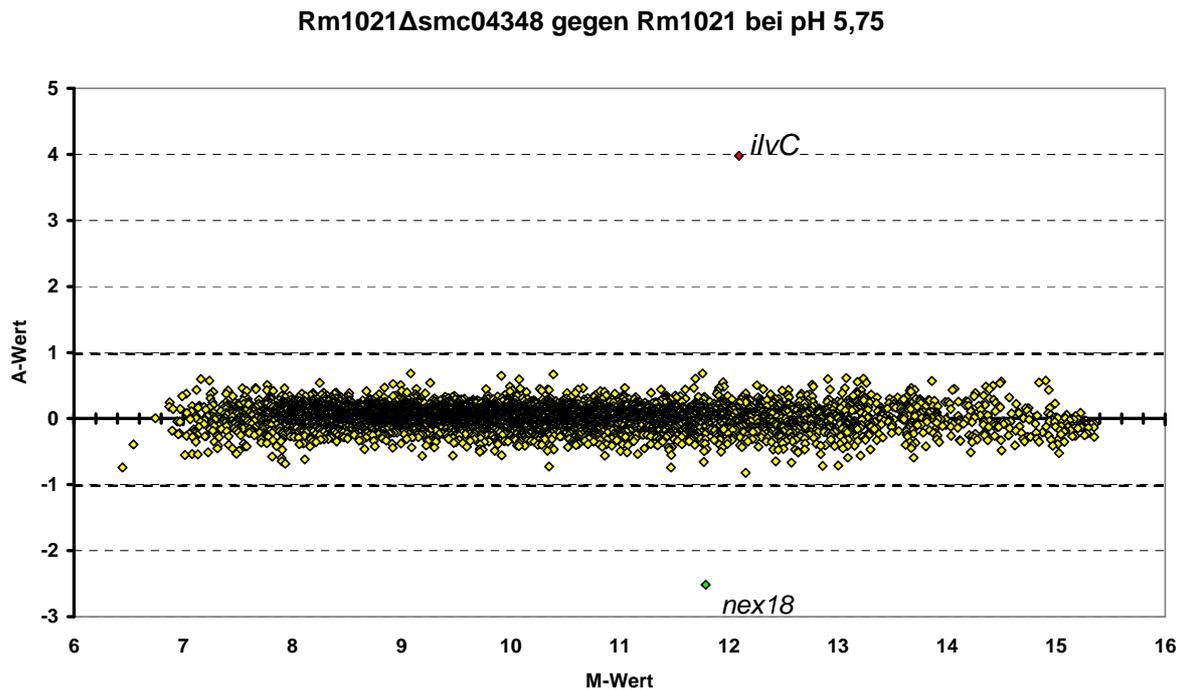
*smc04348* ist ein regulatorisches Gen der tetR-Familie, das eng verwandte Gene in *S. medicae* und *R. leguminosarum* hat, deren Funktionen jedoch nicht weiter charakterisiert sind.



**Abbildung D-20: Physikalische Karte der Genregion um *smc04348*.** Die Gene sind entsprechend ihrer Leserichtung als Pfeile dargestellt, die Gennamen sind angegeben. Das Gen des tetR-Regulators *Smc04348* (roter Pfeil) liegt umgeben von einem Macrolid-Exportsystem (blaue Pfeile) und *ilvC* (grüner Pfeil), einem Gen dessen Produkt für die Synthese von Isoleucin und Valin benötigt wird. Die Gene zeigten während des Zeitreihenexperimentes hohe M-Werte (*ilvC*: -3; *macA*:4,4; *macB*: 4,8).

Um die Funktion von *smc04348* in *S. meliloti* zu identifizieren, wurden von drei biologischen Replikaten der  $\Delta smc04348$ -Mutante *Microarrays* angefertigt. Dies geschah nachdem die Zellen der Mutante bis zu einer o.D. <sub>580</sub> von 0,8 in VMM bei pH 5,75 angezogen worden sind. Der Vergleich wurde wiederum gegen 3 biologische Replikate des identisch behandelten Wildtyps durchgeführt.

Der Scatterplot der *Microarray*-Daten (Abb. D-21) zeigt, dass der Verlust von *smc04348* die gegensätzliche Expression von *ilvC* und *nex18* zur Folge hat. Beide Gene lagen in *Rm1021* $\Delta smc04348$  stark differentiell exprimiert vor, wobei *ilvC* einen M-Wert von 3,98 hatte und *nex18* bei -2,52 lag. Das Genprodukt von *ilvC* ist entscheidend für die Biosynthese von Isoleucin und Valin. Die Funktion von *nex18* hingegen ist unbekannt. Dieses Gen wurde erstmals im Knöllchen als induziert identifiziert (Oke *et. al.*, 1999), aber die Expression ist nicht nur knöllchenspezifisch. Aufgrund der Lokalisierung von *nex18* zusammen in einem Operon mit *tspO* ist ein Zusammenhang mit Nährstoffmangelsituationen wahrscheinlich. Das Gen *tspO* kodiert für das Tryptophan Rich Sensory Protein, einem Protein, das an der Regulation von Nährstoffmangel-Genen beteiligt ist (Davey *et. al.*, 2000). Trotz der Lage von *tspO* und *sma1078* im Operon mit *nex18* treten diese jedoch nicht als differentiell exprimiert auf, sondern zeigen signifikante, schwache Repressionen (*tspO* M-Wert = -0,34; *sma1078* M-Wert = -0,76). Aufgrund der räumlichen Nähe zu *ilvC* und der Zuordnung von *smc04348* zur tetR-Familie ist eine direkte repressorische Kontrolle von *ilvC* anzunehmen. Die starke Repression von *nex18* hingegen war wahrscheinlich ein sekundärer Effekt der Überexpression von *ilvC*. Ein repressorischer Effekt von *ilvC* auf *nex18* würde Sinn ergeben, da *ilvC* als Teil der Aminosäurebildung nur bei Substratversorgung aktiv ist. Unter Nährstoffmangel würde *nex18* induziert, da weniger *ilvC* vorliegt.



**Abbildung D-21: Scatterplot der *Microarray*resultate von Rm1021 $\Delta$ smc04348 im Vergleich zu Rm1021 nach Anzucht bei pH 5,75.** Von drei biologischen Replikaten der Mutante und des Wildtyps wurde jeweils ein Sm6kOligo-*Microarray* hybridisiert. Die Resultate sind in einem Scatterplot zusammengefasst, bei dem jeder Punkt den Expressionswert (M-Wert; y-Achse) und Intensitätswert (A-Wert; x-Achse) jedes Gens darstellt. Die gestrichelte Linie bei  $M = 1$  und  $M = -1$  zeigt den Schwellenwert an. Darüberliegende Gene werden als induziert (rote Punkte), darunterliegende als geringer exprimiert  $\leq -1$  (grüne Punkte) betrachtet.

## E. Diskussion

### 1. Die transkriptionelle Antwort von *S. meliloti* 1021 während der ersten Stunde nach Umsetzen in sauren pH lässt sich durch acht Expressionsverläufe beschreiben

Saurer pH ist ein Stressfaktor, dem Rhizobien in ihrem natürlichen Habitat häufig ausgesetzt sind und der die Symbiose mit ihrer Wirtspflanze beeinträchtigt. Bisher gab es jedoch kaum Erkenntnisse darüber, wie pH-Toleranzmechanismen der Rhizobien funktionieren könnten. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, das Verständnis der pH-Antwort in Rhizobien anhand des Modellsymbionten *S. meliloti* 1021 zu erweitern. Hierzu sollte zunächst die transkriptionelle Antwort von *S. meliloti* bei pH-Stress analysiert werden. Stress ist definiert als eine physiologische Reaktion auf einen spezifischen Reiz, die eine Belastung für den Organismus darstellt. Diese Belastung kann für Bakterien bei einigen Stressarten anhand der Einschränkung des Wachstums erfasst werden. Das Wachstum verringert sich, weil die Zelle Metabolite und Energie in Abwehrmechanismen investiert und/oder weil die Verfügbarkeit von einem oder beiden Faktoren stressbedingt beschränkt ist. Um die transkriptionelle pH-Antwort von *S. meliloti* untersuchen zu können, mussten zunächst Bedingungen identifiziert werden, die in der Zelle azidischen pH-Stress verursachen. Daher wurden verschiedene Tests durchgeführt, die zu einem geeigneten experimentellen *Setup* zur Identifikation der transkriptionellen pH-Antwort führten. Es zeigte sich, dass *S. meliloti* eine Phase der Adaption benötigt (Abb. D-4). Nach Abschluss dieser Adaptionsphase schränkte der saure pH das Wachstum der Kultur kaum noch ein, d.h. die Zellen erlitten kaum noch pH Stress. Es musste davon ausgegangen werden, dass nach der Adaptionsphase keine besondere Anpassung der Zellstrukturen mehr erfolgt. Daher sollte die transkriptionelle Antwort der Zelle während der Adaptionsphase untersucht werden. Die phänotypisch beobachtete Dauer der Adaption betrug ca. 1,5 h. Um die Dauer der Adaptionsphase auf Ebene der Transkription zu messen, wurde die transkriptionelle Aktivität von drei Kandidatengen untersucht. Die Expression dieser Gene deutete daraufhin, dass ein Zeitraum von einer Stunde nach Induktion des Stresses ausreicht, um die transkriptionelle Antwort der Zelle zu erfassen. Durch diesen

kurzen Testzeitraum war es auch möglich, Nachteile durch Veränderung des Mediums bei Anzucht in einer *Batch*-Kultur z.B. durch Alkalisierung während dieses Testzeitraums zu vernachlässigen. Da anzunehmen war, dass die transkriptionelle Antwort nach pH-Stress während der ersten Minuten am stärksten ist, wurden die Messpunkte innerhalb des Testzeitraums annähernd logarithmisch gesetzt. Die Übersicht der Cluster nach Analyse des *Microarray*-Experimentes (Abb. D-7) verdeutlicht, dass die Wahl des Zeitraums und der Zeitpunkte geeignet war. Die größten Veränderungen der transkriptionellen Aktivitäten fanden während der ersten 4 Zeitpunkte statt. Nach ca. 20 Minuten hatte dann ein Großteil der Gene ein transkriptionelles Expressionsniveau erreicht, das sich im weiteren Verlauf kaum noch änderte. Es gibt jedoch auch Gene, deren Expressionsverlauf eine Veränderung über die Zeitreihe hinaus andeutete, wie z.B. die Gene aus Cluster C und Cluster F. Der komplette transkriptionelle Verlauf der Adaption von *S. meliloti* an den niedrigen pH konnte demnach nicht identifiziert werden, wohl aber die wesentlichen Teile.

Die dynamischen Genexpressionen während des Zeitreihenexperimentes verdeutlichen die Notwendigkeit, Stressanalysen zu mehreren Zeitpunkten durchzuführen. Die temporär differentiell exprimierten Gene aus Cluster D und G belegen dies in besonderem Maße. Bei Beobachtungen der transkriptionellen Antwort zu nur einem Zeitpunkt besteht die Gefahr, wesentliche Teile der Zellantwort zu verpassen. Dadurch sind Fehlinterpretationen der Genexpressionen bezüglich ihrer Bedeutung für die Stressantwort wahrscheinlich. Insbesondere bei *Batch*-Anzuchten im Erlenmeyerkolben wird das Bakterium permanent Anpassungen der Zellfunktionen vornehmen müssen, da sich das Medium kontinuierlich verändert.

Die 8 *k*-Means Cluster sind das Resultat eines langen Prozesses verschiedener Arten des Filterns und Clusters der *Microarray*-Daten. Die Analysen der Daten sollten darauf zielen, die stressspezifischen Vorgänge in der Zelle zu erfassen, und von den sekundären Reaktionen, die z.B. durch das verringerte Wachstum entstehen, abzugrenzen. Bei der Auswahl des wichtigsten Filterkriteriums, dem M-Wert, konnte nicht auf empirische Standards zurückgegriffen werden, da bis dato noch keine Zeitreihenuntersuchungen mit dem Sm6kOligo durchgeführt worden waren. Bei der Auswahl des M-Wertes wurden daher die Expressionswerte von Genen analysiert, deren differentielle Expression als Antwort auf den pH-Stress zu erwarten waren oder die bereits in anderen Stressexperimenten mit dem Sm6kOligo identifiziert werden konnten, wie z.B. *lpiA*, *ilvC* und *phoC* (Becker *et. al.*, 2004; Krol *et. al.*, 2004; Tiwari *et. al.*, 2004). Im Endeffekt wurden daher nur die Gene berücksichtigt, deren Expressionswert (M-Wert)  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  zu irgendeinem Zeitpunkt

während der Zeitreihe war. Insgesamt lagen 99,1 % der Messpunkten, die diese Kriterien erfüllten, unterhalb eines p-Wertes von 0,05 (FDR korrigiert, *False Discovery Rate*). Durch Verwendung zahlreicher mathematischer Methoden (hierarchisches Clustering, *k*-means, PCA, SOM) konnten die Vektordaten der Genexpressionen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeiten sortiert und visualisiert werden. Diese Analysen konnten zeigen, dass es möglich ist, die Gene durch die *k*-means Clustermethode in acht Cluster mit jeweils sehr ähnlichem zeitlichen Expressionsverlauf der darin gruppierten Gene einzuteilen (Abb. D-7). Durch die Cluster-Analysen konnten somit 8 Cluster mit individuellen Expressionsprofilen erzeugt werden (Abb. D-7), die sich in 4 induzierte- (Cluster A-D) und 4 reprimierte Cluster (Cluster E-H) einteilen ließen. Sie unterscheiden sich nicht nur durch Induktion und geringere Expression, sondern auch durch Expressionsintensität, sowie den zeitlichen Expressionsverlauf. Zwar zeigt jedes Cluster einen distinkten Expressionsverlauf, die Übergänge der Expressionsprofile einzelner Gene zwischen Clustern sind jedoch fließend. Dies wird durch die Expressionsprofile der *exo*-Gene besonders deutlich (Abb. D-8). Acht Gene wurden Cluster B zugeordnet. Die Gene *exoV* und *exoH* jedoch wurden aufgrund geringfügig höherer M-Werte Cluster A zugeteilt. Das Gen *exoN* wurde hingegen Cluster C zugeordnet, da es im Vergleich leicht verringerte Expressionswerte hatte.

Da sich in den Clustern häufig Gruppen von Genen akkumulierten, deren Genprodukte in funktionellem Zusammenhang stehen, kann der Expressionsverlauf einiger Cluster stellvertretend für die Gene bestimmter Zellfunktionen betrachtet werden, wie z.B. Cluster F für die Chemotaxis und Motilitätsgene oder Cluster E für die EPS I-Biosynthesegene. Die häufige Organisation dieser Gene in Operons bedingt einen ähnlichen Expressionsverlauf. Auch Gene mit funktionell assoziierten Genprodukten, die nicht in Operons organisiert sind, zeigten ähnliche Expressionsprofile während des Zeitreihenexperimentes. Die Gene der Methionin-Biosynthese sind über das gesamte Chromosom verteilt. Trotzdem finden sich innerhalb von Cluster E vier Gene (*metF*, *metK*, *bmt* und *ahcY*), die Funktionen im Methionin-Metabolismus haben. Zwei weitere *met*-Gene wurden Cluster F (*metH*, *metA*) zugeteilt. Die transkriptionelle Aktivität dieser Gene wird durch einen übergeordneten Regulationsmechanismus scheinbar eng aufeinander abgestimmt.

Viele Beobachtungen zeigten, dass Gene innerhalb eines Clusters, potentiell von einem Regulator koreguliert sein können. In einigen Fällen konnten das Regulatorgen und die Zielgene während des Zeitreihenexperimentes als differentiell exprimiert identifiziert werden. Die Regulatorgene hatten, im Vergleich zu den Zielgenen, teilweise unterschiedliche Expressionsverläufe. Diese Diskrepanzen können durch verschiedene Faktoren verursacht

sein, wie z.B. posttranslationale Regulationsmechanismen. Die Expressionsverläufe der Zielgene hingegen zeigten hohe Ähnlichkeiten während der Zeitreihe. Ein wichtiger Regulator der EPS I-Biosynthese wurde zusammen mit den meisten *exo*-Genen Cluster B zugeordnet, da die Gene ein sehr ähnliches Expressionsprofil aufwiesen. Die geringer exprimierten Gene der Motilität- und Chemotaxis aus Cluster F reagierten hingegen langsamer als das Gen ihres Hauptaktivators *VisR*. *visR* war schneller und stärker in der Expression verringert und wurde daher Cluster E zugeordnet. Es gab aber auch den Fall, in dem ausschließlich Zielgene der Regulation, nicht aber das Regulatorgen selber, während der Zeitreihe differentiell exprimiert vorlagen. In einer Arbeit von Sauviac *et. al.* 2007 wurden RpoE2-regulierte Gene aus *S. meliloti* identifiziert, bei RpoE2 handelt es sich um einen extracytoplasmatischen Sigmafaktor. Interessanterweise befinden sich ausschließlich in Cluster B RpoE2 regulierte Gene (*sma2071*, *katC*, *smb20086*, *ndiA1*, *glgA2*, *smb21441*, *glgX2*, *smb21473*, *smc00063*, *smc00371*, *smc00792*, *smc00796*, *smc00800*, *smc00885*, *smc01446*). Das Regulatorgen *rpoE2* war hingegen nur zu zwei Zeitpunkten (18- und 33 Minuten) mit einem M-Wert >1 (1,36 und 1,07) exprimiert.

Einiges deutet darauf hin, dass durch unterschiedliche Halbwertszeiten von mRNAs bzw. von Teilen eines mRNA-Stranges Fehlanalysen möglich sind. Scheinbar sind die mRNAs von Operons in ihrer Mitte teilweise stärkeren Degradationseffekten ausgesetzt als an den Enden. Die 10 Gene, deren Genprodukte Chemotaxis- und Motilität-Funktionen haben (*flgB*, *flgG*, *flgL*, *flgF*, *flgC*, *flgE*, *fliE*, *flbT*, *motA*, *mcpU*), sind zum Großteil in Operons strukturiert. Die differentiellen Expressionswerte dieser Region verdeutlichen (Abb. D-10), dass innerhalb der reagierenden Operons Gene vorhanden sind, deren Expression scheinbar kaum durch den pH-Stress beeinflusst wird. Diese Gene sind teilweise in der Mitte des Operons lokalisiert (*fliI*, *flgK*), umgeben von Genen, die aufgrund ihrer Expression Cluster F zugeordnet worden sind. In einigen Fällen trat auch nur das erste Gen des Operons mit einer signifikanten differentiellen Expression auf (*motA*), während die übrigen Gene kaum differentiell exprimiert vorlagen (*fliM*, *fliN*, *fliG*). Die *exo*-Gene, deren Genprodukte Teil der EPS I-Biosynthese sind, wurden ebenfalls hauptsächlich einem Cluster zugeordnet. Im Gegensatz zu den Chemotaxis- und Motilitätsgenen waren diese jedoch induziert. Auch hier konnte beobachtet werden, dass Gene mittig im Operon schwächere Expressionswerte hatten (*exoFI*, *exoA*, *exoM*), als ihre umgebenden Gene (Abb. D-8).

## **2. Anhand der zeitabhängigen transkriptionellen Antwort von *S. meliloti* 1021 auf pH-Stress konnten potentielle Zellfunktionen der pH-Toleranz identifiziert werden**

Durch die *Microarray*-Analysen der azidischen pH-Antwort von *S. meliloti* konnten zelluläre Prozesse identifiziert werden, die potentiell an der pH-Stresstoleranz von *S. meliloti* 1021 involviert sind. Die unterschiedlichen Expressionsverläufe der Gene verdeutlichen die Komplexität der zellulären Antwort auf veränderte Umgebungsbedingungen. Anhand der Cluster können die Expressionsverläufe ganzer Gruppen von Genen beschrieben werden. Die Zellantwort auf niedrigen pH ist demnach eine Mischung verschiedener Reaktionen, die jeweils einem bestimmten zeitlichen Verlauf folgen.

Die unmittelbarste und intensivste transkriptionelle Induktion zeigten die Gene aus Cluster A (Abb. D-6, A), daher scheinen ihre Genprodukte eine zentrale Rolle bei der Antwort auf azidischen pH-Stress zu haben. Die Gene dieser Cluster deuten an, dass die Zelle sofort mit der Sekretion lytischer Enzyme beginnt (DegP1, Smc01855) und entstehende Degradationsprodukte wieder in den periplasmatischen Raum transportiert (durch Smc02366 und Smc02367). Diese Reaktion erscheint notwendig, da die Komponenten außerhalb der Membranen dem denaturierenden Einfluss des verringerten pH-Wertes weitgehend schutzlos ausgeliefert sind, sie könnte aber auch Teil einer Umbaumaßnahme der äußeren Zellstrukturen sein. Weiterhin wird scheinbar die äußere Membran modifiziert (LpiA), um sie undurchlässiger für Protonen zu machen. Parallel zu den Genen aus Cluster A sind die Gene aus Cluster B induziert, allerdings weniger schnell und stark. Die induzierten *exo*-Gene dieses Clusters deuten auf die Sekretion von EPS I als Antwort auf den sauren pH hin. Die Induktion der EPS I Biosynthese ist offensichtlich eine wesentliche Reaktion von *S. meliloti* 1021 auf den azidischen pH-Stress, wie auch der mucoide Phänotyp von *S. meliloti* 1021 Kulturen auf VMM-Platten belegen konnte (Abb. D-8). Die Sekretion von EPS I könnte eine Reaktion der Zelle sein, um das Außenmedium zu alkalisieren. Eine andere wesentliche Reaktion ist das Einstellen der Motilität, wie durch die kontinuierlich verringerte Expression der Motilitäts- und Chemotaxisgene aus Cluster F belegt wird. Dies könnte ein Versuch der Zelle sein, Energie und Metabolite zu sparen. Das verminderte Wachstum während der Adaptionsphase kann mit zahlreichen geringer exprimierten Genen aus Cluster E und Cluster G in Verbindung

gebracht werden, die für Genprodukte zur Aufnahme von Stickstoffverbindungen (z. B. *amtB*, *nir*-Gene) und der AS-Biosynthese (*met*-Gene) kodieren. Da der Übergang zwischen den beiden Clustern fließend ist, wie z.B. *metK* aus Cluster E zeigt, deutet sich bereits ein Ende der verringerten Expression dieser Gene an. Dies könnte demnach auch ein Indiz dafür sein, dass die phänotypisch beobachtete Adaptionsphase der gestressten Kultur fast abgeschlossen ist.

### 3. Die gegensätzliche Reaktion von Flagellar- und Exopolysaccharidgenen auf pH-Stress

Die transkriptionellen Analysen der pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021 zeigten, dass Gene der EPS I-Biosynthese (*exo*-Gene) und Gene der Motilität und Chemotaxis in einem besonderen Maße transkriptionell aktiviert bzw. geringer exprimiert waren. Die Clusteranalysen bestätigen die Ähnlichkeiten der Expressionsprofile innerhalb der funktionellen Gruppen durch die mathematische Zuweisung in gleiche Cluster. So wurde ein Großteil der EPS I-Biosynthesegene Cluster B zugeordnet (9 von 12), während die Gene der Motilität und Chemotaxis Cluster F zugeordnet worden sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gene der EPS I-Biosynthese mit einer sofort einsetzenden Induktion auf den pH-Stress antworten, die ca. 20 Minuten nach pH-Stress ein Plateau erreicht und sich dann bis zum Ende der Zeitreihe etwas steigert (Abb. D-8). Die vermehrte Sekretion von Exopolysacchariden verdeutlicht auch der mucoide Phänotyp von *S. meliloti* 1021 nach Anzucht auf saurem Festmedium (Abb. D-9). Da gezeigt werden konnte, dass erhöhte EPS I-Biosynthese die Nodulationseffizienz verringert (Cheng *et. al.*, 1998), könnte diese Reaktion unter pH-Stress, mit der beobachteten Verringerung der Nodulationseffizienz in sauren Böden zusammenhängen (Ibekwe *et. al.*, 1997). Im Gegensatz dazu waren die Gene der Motilität und Chemotaxis während des gesamten Verlaufs der Zeitreihe zunehmend geringer exprimiert (Abb. D-10).

Auch für *A. tumefaciens* konnte die Induktion von *exo*-Genen und die Repression der Motilitätsgene nach 7 Stunden pH-Stress identifiziert werden (Yuan *et. al.*, 2008). In diesem Experiment war, genau wie während des Zeitreihenexperimentes, das Gen *chvI* induziert. Aufgrund seines Expressionsprofiles wurde *chvI* Cluster B mit dem Großteil der EPS I-Biosynthesegene zugeteilt. Dieses Gen kodiert zusammen mit *exoS* das ExoS/ChvI Sensor-

Regulatorpaar aus, das die Gene der EPS I-Biosynthese reguliert (Cheng *et. al.*, 1998). Für dieses Regulationssystem konnte gezeigt werden, dass es durch direkte oder indirekte Regulation auch Einfluss auf die Motilitätsgene hat und diese auch gegensätzlich zu den EPS I-Genen reguliert (Yao *et. al.*, 2004). Neuere Analysen zeigen, dass diese Regulation vermutlich über das Hauptaktivatorpaar der Motilität und Chemotaxis, VisN/VisR, und dem untergeordneten Regulator Rem geschieht (Hoang *et. al.*, 2008). Da in der vorliegenden Arbeit das Gen von VisR das am stärksten reprimierte Regulatorgen war, ist ein Zusammenhang wahrscheinlich.

Bisher konnte noch nicht belegt werden, dass eine gesteigerte Exopolysaccharidbiosynthese eine erhöhte Toleranz gegen pH-Stress verleiht. Obwohl Untersuchungen in der Vergangenheit eine Korrelation zwischen Exopolysaccharidsynthese und Säuretoleranz beschreiben (Cunningham *et. al.*, 1984), wurden später widersprüchliche Ergebnisse erzielt. So hatte eine *exoR*-Mutante von *R. leguminosarum*, die in hohem Maße EPS synthetisierte, einen säuresensitiven Phänotyp (Reeve *et. al.*, 1997). Es gibt jedoch Hinweise, dass die Exopolysaccharidsynthese für pH-Toleranz qualitativ von Bedeutung ist. Für eine *exoH*-Mutante konnte in *S. medicae* ein säuresensitiver Phänotyp, sowie Zinksensitivität gezeigt werden (Leigh *et. al.*, 1987). Das Gen *exoH* war neben *exoV* während der Zeitreihen unter den *exo*-Genen am stärksten induziert und wurde daher Cluster A zugeordnet. Die Genprodukte dieser Gene kodieren für Enzyme, die an der Succinylierung und Pyruvylierung im letzten Schritt der EPS I-Biosynthese nötig sind. Der hohe Expressionslevel von *exoH*, im Vergleich zu den anderen *exo*-Genen während der Zeitreihen, steht aber wahrscheinlich nicht mit einer besonderen Bedeutung für die pH-Antwort im Zusammenhang. Wahrscheinlicher ist, dass die Anfangsposition im *exoHKLAMONP*-Operon (Abb. D-8) für die erhöhten Expressionswerte verantwortlich ist.

Die verringerte Expression der zahlreichen Motilitäts- und Chemotaxisgene während der Zeitreihe deutet auf einen Verlust der flagellaren Motilität nach pH-Stress hin. Dies konnte bei niedrigem pH bereits für die eng verwandten Bakterien *R. leguminosarum* und *Agrobacterium tumefaciens* gezeigt werden (Bowra *et. al.*, 1981; Yuan *et. al.*, 2008), während die entfernter verwandten Enterobakteriaceen *E. coli* und *Salmonella enterica* eine gesteigerte Motilität zeigten (de Jonge *et. al.*, 2003; Hickey *et. al.*, 1990; Maurer *et. al.*, 2005). Für die Fälle einer induzierten Motilität wurde argumentiert, dass die erhöhte protonenmotorische Kraft bei niedrigem pH die Flagellarrotation begünstigt (Khan *et. al.*, 1980). Da es allerdings auch Berichte gibt, in denen ein Abschalten der flagellaren Motilität bei *E. coli* beobachtet wurde (Soutourina *et. al.*, 2002), bleibt das Bild unklar. Da *S. meliloti*

außerdem bei verschiedenen Stressen wie osmotischem Stress, Hitzestress und Nahrungsmangel, mit dem Herunterfahren der Motilitätsgene reagiert (Dominguez-Ferreras *et. al.*, 2006; Rüberg *et. al.*, 2003; Sauviac *et. al.*, 2007), ist diese Antwort offensichtlich eine generelle Stressantwort. Die Motilität der Zelle ist sehr energieaufwendig. Dies könnte daher ein Mechanismus sein, um Energie zu sparen.

Die Ergebnisse der Zeitreihenanalyse zeigten, dass die zunehmend verringerte Expression der Motilitäts- und Chemotaxisgene (*flgB*, *flgG*, *flgL*, *flgF*, *flgC*, *flgE*, *fliE*, *flbT*, *motA*, *mcpU*) ihrem Hauptregulatorgen *visR* folgte. Das Gen *visR* zeigte eine schnellere und stärkere Repression und wurde daher Cluster E zugeordnet. VisR bildet zusammen mit VisN den Hauptaktivator einer dreiklassigen Hierarchie an Motilitätsregulatoren (Sourjik *et. al.*, 2000), wie *visN* und *visR* reguliert werden ist bisher jedoch unklar. Da sowohl *visN* als auch *visR* während der Zeitreihe einen M-Wert von  $\leq -1$  aufwiesen, wurde für beide Gene versucht, eine Mutante zu erstellen. Dies gelang jedoch nur im Fall von *visN*. Da VisN und VisR nur im Komplex aktiv sind, sollte das Ausschalten eines der Gene jedoch ausreichend sein. Die Rm1021 $\Delta$ *visN* Mutante zeigte ein im Vergleich zum Wildtyp schnelleres Wachstum in neutralem und saurem Medium (Abb. D-13). Dieses Ergebniss veranschaulicht, dass es in einer *in vitro*-Kultur generell vorteilhaft für das Zellwachstum ist, den Flagellarapparat abzuschalten, es bestätigt jedoch keinen Vorteil speziell für die Anzucht bei niedrigem pH.

## 4. Die Regulation von ActR in *S. meliloti* 1021

ActR/ActS ist das im Zusammenhang mit pH-Stress am besten untersuchte Regulationssystem in Rhizobien. Ursprünglich wurde dieses Regulationssystem in *S. medicae* identifiziert, da Transposonmutanten dieser Gene einen pH-sensitiven Phänotyp zeigten (Tiwari *et. al.*, 1996). Das System ist ein Homolog des RegAB Sensor-Regulatorpaares aus dem Purpubakterium *Rhodobacter capsulatus*. In *Rhodobacter capsulatus* wird RegAB für die anaerobe Induktion des Photosyntheseapparates benötigt (Mosley *et. al.*, 1994; Sganga *et. al.*, 1992). Das ActS/ActR System wurde daher auf seine Funktionalität im Zusammenhang mit niedrigem pH und geringer Sauerstoffverfügbarkeit in *S. medicae* untersucht (Fenner *et. al.*, 2004). In den Untersuchungen von Fenner *et al.* konnten Gene identifiziert werden, die in Abhängigkeit von pH, Sauerstoffverfügbarkeit und ActS/ActR reguliert werden. Die ActS-ActR regulierten Gene kodieren Proteine für eine Vielzahl an metabolischen Funktionen, wie z.B. GstI (Detoxifizierung), HyuA (Hydantoin-Utilisierung), NifA (Stickstofffixierung), FixK

(microaerobe Atmung) und FixN<sub>2</sub> (microaerobe Atmung). Es wurde weiterhin gezeigt, dass das Sensor-Regulatorpaar FixL/FixJ zusammen mit ActS/ActR an der Regulation der Regulatorgene *fixK* und *nifA*, die Stickstofffixierungsgene in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit regulieren (Abb. B-4). Es wurde daher ein Modell postuliert, das eine gemeinschaftliche Kontrolle dieser Gene mit FixL/FixJ vorsieht (Fenner *et. al.*, 2004) (Abb., B-4). *actR* und *actS* homologe Gene sind in Rhizobien weit verbreitet. In *S. meliloti* 1021 besitzen ActS und ActR große Ähnlichkeit zu ihren Homologen in *S. medicae* (ActS: 94% identische-, 97% positive AS; ActR: 97% identische-, 97% positive AS).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *actR* und *actS* auch in *S. meliloti* 1021 einen Einfluss auf die azidische pH-Toleranz haben. Das Gen *actR* wurde als regulatorisches Gen zur Mutation ausgewählt, da es während der Zeitreihe einem M-Wert von 1,06 erreichte (t 63). Die Integrationsmutante von *actR* zeigte nach Anzucht auf saurem VMM-Platten einen säuresensitiven Phänotyp, daher wurde zusätzlich eine markerfreie Deletionsmutante (Rm1021 $\Delta$ actR) erstellt. Der Phänotyp der Rm1021 $\Delta$ actR-Mutante bestätigte die Säuresensitivität auch in VMM-Flüssigmedium (Abb. D-13). Zur Identifikation der Regulationsziele von ActS/ActR wurde in einem *Microarray*-Experiment die Rm1021 $\Delta$ actR-Mutante mit dem Wildtyp nach Anzucht bei pH 5,75 verglichen.

Die differentiell exprimierten Gene (Tab. D-3) dieses Experimentes belegten einen gegensätzlichen regulatorischen Einfluss von *actR* auf zwei Terminalen-Oxidase. Die ersten drei Gene des *cyoABCD*-Operons lagen geringer exprimiert vor, während das erste Gen des *qxtAB*-Operons induziert war. Neben diesen Oxidasegenen waren noch weitere Gene differentiell exprimiert, die im wesentlichen an der Synthese von Komponenten dieser Oxidasen beteiligt sind, wie z.B. Häm und Cytochrome. Das *cyoABCD*-Operon kodiert für eine Cytochrom-*o*-Oxidase mit einer geringen Affinität für Sauerstoff aber hoher Protonenpump-Aktivität. Das *qxtAB*-Operon hingegen kodiert für eine Cytochrom-*d*-Oxidase mit hoher Sauerstoffaffinität aber geringer Protonenpump-Aktivität. Beide Oxidasen sind für *S. meliloti* 1021 bisher nicht genauer charakterisiert worden. In *S. meliloti* konnte in bisherigen Arbeiten nur das *cyoABCD*-Operon als Sauerstoff-abhängig reguliert identifiziert werden (Bobik *et. al.*, 2006; Trzebiatowski *et. al.*, 2001). In *E. coli* wird die Expression von *cyoABCD* und *qxtAB* in Abhängigkeit von Sauerstoff und pH reguliert (Cotter *et. al.*, 1990). Die Mutante eines Homologes von *qxtAB* hatte in *Brucella abortus* einen stark säuresensitiven Phänotyp (Endley *et. al.*, 2001).

Die Ergebnisse deuten also daraufhin, dass ActR in *S. meliloti*, wie auch in *S. medicae*, eine wichtige Funktion bei der Anpassung der Elektronentransportkette an niedrigen pH und

geringe Sauerstoffverfügbarkeit hat. Obwohl die Untersuchungen in *S. medicae* bei nahezu identischen Bedingungen durchgeführt worden sind, konnte keine *actR*-abhängige Regulation von *fixK* und *nifA* in *S. meliloti* festgestellt werden. Erstaunlicherweise scheint die Situation in *E. coli* der in *S. meliloti* ähnlicher zu sein. In *E. coli* werden *cyoABCD* und *qxtAB* über den Regulator Fnr bei niedrigem pH aktiviert (Cotter *et. al.*, 1990). In *S. meliloti* zeigt sich ein regulatorischer Einfluss von *actR* auf beide Oxidasen, jedoch ist dieser Einfluss sowohl aktivatorisch als auch repressorisch. Fenner *et. al.* äußerten die Hypothese, dass durch niedrigen pH die Protonenpump-Aktivität der terminalen Oxidasen eingeschränkt wird und es zu einem reduzierten Fluss von Reduktionsequivalenten kommt. Dieser reduzierte Elektronenfluss soll die Aktivierung der Histidinkinase ActS bewirken. ActS phosphoryliert im aktivierten Zustand ActR. Das aktivierte ActR wiederum aktiviert daraufhin die Transkription seiner Zielgene. Wenn diese Hypothese auch für *S. meliloti* zutrifft, muss aufgrund des aktivatorischen und repressorischen Effektes der Deletion von *actR*, noch mindestens ein weiterer Regulator an der Regulation von *cyoABCD* und *qxtAB* beteiligt sein.

Während der Zeitreihe waren in der transkriptionellen Antwort des Wildtyps sowohl *qxtA* als auch *cyoC* induziert. Für Gene beider Oxidasen lag ein hoher Induktionswert zum letzten Zeitpunkt vor (*cyoB*: M=2,67; *qxtA*: M=3,03). Jedoch trat nur *cyoB* in den Clusteranalysen auf. Das Gen *qxtA* ist gefiltert worden, da zu wenig Messwerte vorlagen (für 5 von 6 Zeitpunkten musste ein M-Wert vorliegen). Während die Oxidasegene in der *actR*-Mutante eine gegensätzliche transkriptionelle Aktivität als Antwort auf den niedrigen pH hatten, waren im Wildtyp beide Gene bei niedrigem pH induziert. Dies ist wiederum ein klares Indiz für die Existenz eines weiteren Regulators, der an der Regulation von *cyoABCD* und *qxtAB* beteiligt ist.

In einem möglichen Modell der ActR vermittelten Regulation in *S. meliloti* 1021, würde demnach ActR durch ActS bei niedrigem pH aktiviert werden und einen aktivatorischen Einfluss auf die Expression von *cyoABCD* ausüben. Da dieser Einfluss nur aktivatorisch sein kann, muss ActR zusätzlich einen Repressor von *qxtAB* aktivieren, da in der *actR*-Mutante, die Expressionen von *qxtAB* und *cyoABCD* gegensätzlich reagierten. Das Gen *qxtAB* lag im Wildtyp bei niedrigem pH aber induziert vor. Daher muss ein weiterer unbekannter Regulator einen starken aktivatorischen Einfluss auf die Expression von *qxtAB* haben, der die Reprimierung von *qxtAB* aufhebt.

Die Vorteile der *actR*-vermittelten Veränderung der Oxidasenkomposition bei niedrigem pH sind unklar, jedoch ist es einleuchtend, dass eine Veränderung stattfindet, da niedriger pH das Membranpotential und die PMF verändert.

## 5. Stellen Transportsysteme Protonenlecks der Cytoplasmamembran dar?

Die Mutation in *sma1887* zeigte den deutlichsten säuresensitiven Phänotyp. Der Wachstumstest bei pH 5,75 belegte (Abb. D-13), dass die übrigen säuresensitiven Stämme Rm1021 $\Delta$ rem und Rm1021 $\Delta$ actR die log-Phase nach ca. 100 h Inkubation erreichten, während Rm1021 $\Delta$ sma1887 ca. 150 h Inkubation bis zur log-Phase benötigte. Anhand des *Microarray*-Experimentes von Rm1021 $\Delta$ sma1887 konnte gezeigt werden, dass in der Mutante die Gene *sma1884* und *sma1885* des näheren genetische Umfeld von *sma1887* stark induziert vorlagen. Homologievergleiche der Genprodukte dieser Gene zeigten, dass Sma1887, Sma1884 und Sma1885 Ähnlichkeiten zu dem Regulator AcrR und seinem *Multidrug*-Efflux-System AcrA und AcrB haben, einem System, das in *E. coli* charakterisiert wurde (Ma *et. al.*, 1995; Ma *et. al.*, 1996). Das Transportsystem besteht aus der Effluxpumpe AcrA, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Das periplasmatische Protein AcrB bildet vermutlich einen Komplex mit AcrA und TolC. TolC bildet einen Kanal durch die äußere Membran, dessen Zusammenwirken mit *Multidrug*-Efflux-Systeme typisch ist (Nikaido, 1996). Die Substrate von AcrAB sind vielfältig, es wurden Lösungsmittel, Farbstoffe, Detergenzien und lipophile Antibiotika wie z.B. Erythromycin und Novobiocin identifiziert. Das Transportsystem transportiert seine Substrate durch zwei Barrieren, durch die Cytoplasmamembran und die äußere Membran. Das Ausschleusen von Substraten, wie z.B. Tetrazyklin in das Außenmedium, ist ca. 100 mal effektiver als der einfache Transport in den periplasmatischen Raum (Thanassi *et. al.*, 1995). Um den Transport der Substrate zu energetisieren, gelangen im Antiport Protonen in das Cytoplasma der Zelle.

Weitere Wachstumstests zeigten (Abb. D-18), dass die Säuresensitivität von Rm1021 $\Delta$ sma1887 durch zusätzliches Ausschalten von *sma1884* oder *sma1885* aufgehoben werden kann. Demnach verursacht die Überexpression von *sma1884* und *sma1885* vermutlich die Säuresensitivität der *sma1887*-Mutante. Die *Microarray*-Analysen von Rm1021 $\Delta$ sma1887 belegten eine extrem starke Induktion der Gene *sma1884* und *sma1885*, mit M-Werten von 6,25 und 6,5 in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die genauen Ursachen der starken Säuresensitivität, die durch die Überexpression von *sma1884* und *sma1885* bewirkt, sind nicht bekannt. Es ist sicherlich möglich, dass eine vermehrte Synthese von Sma1884 und Sma1885 den Organismus belastet, jedoch steht diese Belastung nicht im

Verhältnis zu dem beobachteten Phänotyp. Wahrscheinlicher ist daher, dass durch den Transportmechanismus oder einen sekundären Effekt des Transportsystems die Säuresensitivität verursacht. Der Transportmechanismus von AcrAB bewirkt bei Substrattransport eine Ansäuerung des Cytoplasmas, da im Antiport mit dem Substrat Protonen ins Zellinnere geschleust werden. Sollte die funktionsbedingte Ansäuerung des Cytoplasmas für den Phänotyp verantwortlich sein, stellt sich die Frage nach dem Substrat. Es müsste demnach durchgängig Substrat vorhanden sein, um den Prozess zu unterhalten. Natürlich besteht die Möglichkeit, dass durch den niedrigen pH Stoffwechselprodukte entstehen, die ein potentiell Substrat bilden könnten, wie z.B. das kationische Membranlipid Lysyl-phosphatidylglycerol. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Transportsystem ein Protonenleck bildet, das durch den erhöhten  $\Delta\text{pH}$  bei niedrigem pH einen substantziellen Effekt zeigt.

Die beobachteten pH-Toleranzmechanismen von *S. meliloti* 1021 scheinen teilweise darauf abzuzielen, die Zelle vor dem Einstrom von Protonen zu schützen. Sollte der Phänotyp von Rm1021 $\Delta\text{sma1887}$  mit einem gesteigerten Protoneneinstrom über Sma1884 und Sma1885 zusammenhängen stellt sich die Frage, ob Bakterien, die über eine gute Ausstattung an unterschiedlichen Transportsystemen verfügen, eine Einschränkung bei der pH-Toleranz in Kauf nehmen müssen.

Da in Rm1021 $\Delta\text{sma1887}$  die Gene *sma1884* und *sma1885* induziert vorlagen, ist eine repressorische Kontrolle von Sma1887 zu erwarten gewesen. Das Gen *sma1887* war während des Zeitreihenexperimentes des Rm1021-Wiltyps konstant mit einem M-Wert von etwa 1,5 induziert. Es ist daher möglich, dass dies eine stressspezifische Reaktion der Zelle auf den niedrigen pH war, um die Expression von *sma1884* und *sma1885* zu verringern. Jedoch konnten für die Transportergene nur zu vier Zeitpunkten Werte erhalten werden, die allerdings lassen auf eine leicht verringerte Expression schließen (M-Wert:  $\approx -0,3$ ). Der repressorische Effekt den Sma1887 während der Zeitreihe auf *sma1884* und *sma1885* hat, fällt demnach im Vergleich zu pH 7 schwach aus. Wahrscheinlich waren *sma1884* und *sma1885* bei pH 7 kaum exprimiert, weil z.B. kein Substrat vorhanden war.

Um festzustellen, ob die Induktion des Regulatorgens *sma1887* bei niedrigem pH eine stressspezifische Reaktion zur Verringerung der Expression von *sma1884* und *sma1885* ist, müssten demnach erst Bedingungen bei neutralem pH identifiziert werden zu denen diese Transportergene induziert vorliegen.

## 6. Die Problematiken der Identifikation und des Vergleiches von pH-Stressantworten

In dieser Arbeit wurde erstmals die transkriptionelle Antwort eines Rhizobiums auf azidischen pH-Stress untersucht. Obwohl pH-Stress ein globales agronomisches Problem ist, das in vielen Teilen der Welt die Effizienz der Symbioseleistung von Rhizobien und Leguminosen verringert, sind bisher kaum Untersuchungen durchgeführt worden, um Toleranzmechanismen in Rhizobien zu identifizieren. Die bisherigen Erkenntnisse sind im Wesentlichen anhand des zu *S. meliloti* eng verwandten Rhizobiums *S. medicae* gewonnen worden. Diese Spezies zeichnet sich durch seine erhöhte Säuretoleranz im Vergleich zu anderen *Sinorhizobium* Stämmen aus und wurde daher als Untersuchungsobjekt zur Identifikation von pH-Toleranzmechanismen in Rhizobien ausgewählt. Durch Transposon-Mutagenese mit einem Repotergenkonstrukt konnten für dieses Bakterium 10 Gene identifiziert werden, die für die pH-Stressantwort von Bedeutung sind (Tiwari *et. al.*, 2004). Daneben wurden in Proteom-Analysen Proteine identifiziert, die nach 30 Minuten (4 Proteine) bzw. 5 Tagen (14 Proteine) Inkubation bei pH 5,7, im Vergleich zu pH 7, differentiell exprimiert waren (Reeve *et. al.*, 2004).

Die Ergebnisse der Zeitreihenanalyse der pH-Stressantwort von *S. meliloti* 1021 geben einen sehr detailliertes Bild der transkriptionellen Antwort auf den um 1,25 Einheiten (von pH 7 auf pH 5,75) verringerten pH-Wert. In diesem Experiment konnten trotz strenger Kriterien (M-Value  $\geq 2$ ) 230 Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden. Die augenscheinlich großen Differenzen der Anzahl differentiell exprimierter Gene im transkriptionellen Ansatz im Vergleich zum proteomischen Ansatz bei *S. medicae*, kann vielfältige Gründe haben. Für *S. meliloti* 1021 stellt die Inkubation bei pH 5,75 sicherlich einen größeren Stress dar als für *S. medicae* pH 5,7. So konnten Untersuchungen belegen, dass *S. medicae* selbst bei einem extrazellulären pH von 5,5 noch in der Lage ist, den intrazellulären pH stabil bei einem pH>7 zu halten und Wachstum zu zeigen (O'Hara *et. al.*, 1989), während *S. meliloti* 1021 Zellen bei diesem Medium-pH nicht mehr wachsen (Abb.C-1). Hinzu kommt die höhere Sensitivität der transkriptionellen Analyse anhand von *Microarrays* im Vergleich zur proteomischen Analyse durch Proteingele. Bemerkenswert ist jedoch, dass von vier identifizierten Proteinen nach 30 Minuten pH Stress in *S. medicae* (einem Protein konnte kein Gen zugeordnet werden), die Gene von zweien auch während des *Microarray*-Experimentes differentiell exprimiert vorlagen. Bei diesen Proteinen handelt es sich um einen Regulator des Stickstoff-

Metabolismus (GlnK) und ein Protein mit unbekannter Funktion, kodiert von *smc00371*. Die Existenz von weiteren, während des Zeitreihen-Experimentes differentiell exprimierten Genen des Stickstoff-Metabolismus neben *glnK*, belegt die Bedeutung dieses Teiles der Stressantwort. Da in den übrigen Experimenten mit *S. medicae* längere Stresszeiträume untersucht worden sind, sind Übereinstimmungen mit der kurzfristigen Antwort von *S. meliloti* nicht zu erwarten gewesen, jedoch finden sich auch hier Gemeinsamkeiten. So konnte nach fünf Stunden pH Stress das hochinduzierte Protein DegP in *S. medicae* identifiziert werden, dessen Gen während des Zeitreihenexperimentes am drittstärksten induziert vorlag. Das am stärksten induzierte Gen des Zeitreihenexperimentes war *lpiA*. Auch dieses Gen konnte in *S. medicae* bereits als pH-induziert identifiziert werden (Tiwari *et. al.*, 2004).

Der Vergleich der Ergebnisse zeigt demnach trotz unterschiedlicher Untersuchungsmethoden in wesentlichen Punkten Übereinstimmungen zwischen *S. meliloti* und *S. medicae* im Bezug auf die Antwort auf azidischen pH. Dies stärkt nicht nur die Resultate des Zeitreihenexperimentes, sondern verdeutlicht auch, dass es nötig ist, die Antwort von pH-sensitiven und pH-toleranten Stämmen miteinander zu vergleichen, um Mechanismen der pH-Toleranz zu identifizieren. Die Zeitreihe der transkriptionellen Antwort von *S. meliloti* auf pH-Stress verdeutlicht die Komplexität und zeitliche Variabilität der Zellantwort. Da es sehr problematisch ist, die spezifischen Reaktionen auf pH-Stress von den unspezifischen zu trennen, wäre ein direkter Vergleich von *S. meliloti* und *S. medicae* bei „gleichem“ pH-Stress zu identischen Untersuchungszeitpunkten sehr aufschlussreich. Es ist jedoch offensichtlich nicht einfach möglich zwei unterschiedlich pH-tolerante Stämme miteinander zu vergleichen, indem man die Stämme bei identischen pH-Bedingungen stresst, vielmehr sollten durch Vorversuche Bedingungen identifiziert werden, zu denen beide Stämme gleichermaßen gestresst sind.

Die Schwierigkeiten der Identifikation und Reproduktion solcher Stressbedingungen zeigen sich in dieser Arbeit. Hier sollten die zeitabhängige transkriptionellen Vorgänge von *S. meliloti* 1021 während der Adaptionphase an pH-Stress erfasst werden. Durch die transkriptionelle Aktivität der drei Kandidatengene *lpiA*, *phoC* und *ilvC* wurde der Untersuchungszeitraum zuvor auf eine Stunde nach pH-Stress begrenzt, da die durch RT-PCR gemessene Transkription von *lpiA* und *ilvC* während dieses Zeitraumes zu- und wieder abnahm. Diese Tendenzen konnten für diese Gene im *Microarray*-Experiment nicht bestätigt werden. Das Gen *lpiA* war zwar ebenfalls stark induziert, verblieb aber während der *Microarray*-Zeitreihe auf einem hohen Expressionsniveau. *ilvC* war während der *Microarray*-

Zeitreihe kontinuierlich reprimiert, ohne, wie in den vorangegangenen RT-PCR Experimenten, auf ein neutrales Niveau zurückzukehren. Die Differenzen zwischen diesen Beobachtungen kommen wahrscheinlich durch zwei wesentliche Faktoren zustande. Zum einen sind die Resultate der unterschiedlichen Messmethoden nicht direkt miteinander vergleichbar, zum anderen wurden die Experimente mit verschiedenen Medienchargen durchgeführt. Scheinbar war der Stress für die *S. meliloti*-Zellen in dem für die *Microarray*-Analysen verwandten VMM-Medium größer. Dies führte zu einer verlängerten Adaptionsphase an den azidischen pH-Stress, deren Ende sich aber ebenfalls durch die Expression einiger Gene, insbesondere der in Cluster G, abzeichnet. Dies verdeutlicht wiederum, wie difiziel die Einflüsse sind, die sich auf die transkriptionelle Antwort auswirken. Um solche Differenzen zu minimieren ist es daher notwendig, neben den benutzten Geräten und Anzuchtgefäßen auch dieselbe Mediencharge zu benutzen.

Bei der Untersuchung der Mutanten mit pH-abhängigem Phänotyp wurde daher auch nicht versucht, die Adaptionsphasen mit dem Wildtyp zu vergleichen. Durch die Einflüsse der Mutation hätten sich Verschiebungen in der zeitlichen Dauer der Adaption im Vergleich zum Wildtyp ergeben, die eine Analyse der Daten erschwert hätten. Um der gesamten Problematik zu entgehen, wurde die Untersuchung der transkriptionellen Antwort der Mutanten nur zu einem Zeitpunkt während der log-Phase vorgenommen. Da die Wachstumsgeschwindigkeit der meisten Mutanten in der log-Phase annähernd der des Wildtyps gleich, sollten somit sekundäre, wachstumsabhängige transkriptionelle Aktivitäten minimiert werden. So wurden in den Mutanten auch häufig nur sehr wenige Gene als differentiell exprimiert identifiziert, deren Funktion aber immer mit der jeweiligen Deletion in Verbindung gebracht werden konnte. Nur Rm1021 $\Delta$ smal887 hatte eine deutlich geringere Zellteilungsrate während der log-Phase im Vergleich zum Wildtyp, daher wurde für diese Mutante der Vergleich zum Wildtyp bei pH 7 durchgeführt, da das Wachstum der Mutante bei pH 7 mit dem Wildtyp vergleichbar war. Hier gelang es den säuresensitiven Phänotyp durch die Identifikation der differentiell exprimierten Gene in Rm1021 $\Delta$ smal887 bei pH 7, in einen funktionellen Zusammenhang zur Überexpression von *smal884* und *smal885* zu stellen.

Aufgrund der engen Verwandtschaft, aber der deutlichen Unterschiede in der pH-Toleranz, wären *S. meliloti* und *S. medicae* sehr geeignete Untersuchungsobjekte, um rhizobielle pH-Toleranzmechanismen effektiv zu identifizieren. *S. meliloti* ist durch zahlreiche transkriptionelle und proteomische Ansätze auf verschiedene Stressantworten untersucht worden (Becker *et. al.*, 2004; Djordjevic *et. al.*, 2003; Djordjevic, 2004; Hellweg *et. al.*, 2009; Krol *et. al.*, 2004; Rüberg *et. al.*, 2003). Diese Vorkenntnisse sind essentiell, um

transkriptionelle Analysen zu deuten. Da die genomische Sequenz von *S. medicae* bisher noch nicht verfügbar ist und transkriptionelle *Microarray*-Analysen daher nicht möglich sind, bleibt eine detailliertere Analyse abzuwarten.

## F. Literatur

**Aguilar, O. M. and D. H. Grasso.** 1991. The product of the *Rhizobium meliloti* *ilvC* gene is required for isoleucine and valine synthesis and nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* **173**:7756-7764.

**Allen, O. N. and Allen, E. K.** The *Leguminosae*: a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, Wi 1981.

**Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.

**Ballen, K. G., P. H. Graham, R. K. Jones, and J. H. Bowers.** 1998. Acidity and calcium interaction affecting cell envelope stability in *Rhizobium*. *Canadian Journal of Microbiology* **44**:582-587.

**Banfalvi, Z., V. Sakanyan, C. Koncz, A. Kiss, I. Dusha, and A. Kondorosi.** 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol.Gen.Genet.* **184**:318-325.

**Barbour, W. M., D. R. Hattermann, and G. Stacey.** 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2635-2639.

**Bardin, S., S. Dan, M. Osteras, and T. M. Finan.** 1996. A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **178**:4540-4547.

**Barloy-Hubler, F., A. Cheron, A. Hellegouarch, and F. Galibert.** 2004. Smc01944, a secreted peroxidase induced by oxidative stresses in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Microbiology* **150**:657-64.

**Barnett, M. J., R. F. Fisher, T. Jones, C. Komp, A. P. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, M. Gurjal, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, C. Palm, M. C. Peck, R. Surzycki, D. H. Wells, K. C. Yeh, R. W. Davis, N. A. Federspiel, and S. R. Long.** 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* **98**:9883-9888.

**Becker, A., M. J. Barnett, D. Capela, M. Dondrup, P. B. Kamp, E. Krol, B. Linke, S. Ruberg, K. Runte, B. K. Schroeder, S. Weidner, S. N. Yurgel, J. Batut, S. R. Long, A. Puhler, and A. Goesmann.** 2009. A portal for rhizobial genomes: RhizoGATE integrates a *Sinorhizobium meliloti* genome annotation update with postgenome data. *J. Biotechnol.* **140**:45-50.

**Becker, A., H. Berges, E. Krol, C. Bruand, S. Rüberg, D. Capela, E. Lauber, E. Meilhoc, F. Ampe, F. J. de Bruijn, J. Fourment, A. Francez-Charlot, D. Kahn, H. Kuster, C. Liebe, A. Pühler, S. Weidner, and J. Batut.** 2004. Global changes in gene expression in

*Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**:292-303.

**Beringer, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**:188-98.

**Bittner A.N., Foltz A., and V. Oke.** 2007. Only one of five *groEL* genes is required for viability and successful symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **189**:1884-1889.

**Bobik, C., E. Meilhoc, and J. Batut.** 2006. FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**:4890-4902.

**Boesten, B., A. Schlüter, J. Prell, M. Krämer, V. Lipka, and U. B. Priefer.** 2000. Identifying genes suitable for constructing pH and salt tolerant *Rhizobium* inoculants for improving French bean cultivation under semiarid conditions, p. 319. In J. Olivares and A. J. Palomares (eds.), Proceedings of the Fourth European Nitrogen Fixation Conference. Viceconsejería, Seville.

**Bordeleau, L. M. and D. Prevost.** 1994. Nodulation and nitrogen-fixation in extreme environments. *Plant and Soil* **161**:115-125.

**Bowra, B. J. and M. J. Dilworth.** 1981. Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* **126**:231-235.

**Brockwell, J., A. Pilka, and R. A. Holliday.** 1991. Soil-pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in noncultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **31**:211-219.

**Burns, R. C. and R. W. F. Hardy.** 1975. Nitrogen fixation in bacteria. Springer-Verlag, New York, N.Y.

**Burris, R. H.** 1974. Biological Nitrogen-Fixation, 1924-1974. *Plant Physiology* **54**:443-449.

**Callaham, D. A. and J. G. Torrey.** 1981. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**:1647-1664.

**Capela, D., F. Barloy-Hubler, J. Gouzy, G. Bothe, F. Ampe, J. Batut, P. Boistard, A. Becker, M. Boutry, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, D. Kahn, E. Kiss, V. Lelaure, D. Masuy, T. Pohl, D. Portetelle, A. Pühler, B. Purnelle, U. Ramsperger, C. Renard, P. Thebault, M. Vandenbol, S. Weidner, and F. Galibert.** 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**:9877-82.

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

**Chao, T. C., J. Buhrmester, N. Hansmeier, A. Pühler, and S. Weidner.** 2005. Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5969-82.

- Cheng, H. P. and G. C. Walker.** 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **180**:5183-5191.
- Collins, F. S.** 1999. Microarrays and macroconsequences. Nat. Genet. **21**.
- Correa, O. S. and A. J. Barneix.** 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. World J. Microbiol. Biotechnol. **13**:153-157.
- Cotter, P. A., V. Chepuri, R. B. Gennis, and R. P. Gunsalus.** 1990. Cytochrome-O (*cyoABCDE*) and D (*cydAB*) oxidase gene-expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene-product. J. Bacteriol. **172**:6333-6338.
- Cunningham, S. D. and D. N. Munns.** 1984. The correlation of the exopolysaccharide production and acid-tolerance in *Rhizobium*. Soil Sci. Soc. Am. J. **48**:1273-1276.
- Curtis, M. A., J. M. Slaney, R. J. Carman, and N. W. Johnson.** 1991. Identification of the major surface protein antigens of Porphyromonas gingivalis using IgG antibody reactivity of periodontal case-control serum. Oral Microbiol. Immunol. **6**:321-326.
- Davey, M. E. and F. J. de Bruijn.** 2000. A homologue of the tryptophan-rich sensory protein TspO and FixL regulate a novel nutrient deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* locus. Appl. Environ. Microbiol. **66**:5353-5359.
- de Jonge, R., W. S. Ritmeester, and F. M. van Leusden.** 2003. Adaptive responses of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104 and other *S. Typhimurium* strains and *Escherichia coli* O157 to low pH environments. J. Appl. Microbiol. **94**:625-632.
- De Rosa, M., A. Trincone, B. Nicolaus, and A. Gambacorta.** 1991. Archaeobacteria: lipids, membrane structures, and adaptations to environmental stresses, p. 61-87. In G.di Prisco (ed.), Life under Extreme Conditions. Springer Verlag.
- Dilworth, M. J., J. G. Howieson, W. G. Reeve, R. P. Tiwari, and A. R. Glenn.** 2001. Acid tolerance in legume root nodule bacteria and selecting for it. Australian Journal of Experimental Agriculture **41**:435-446.
- Dilworth, M. J., F. G. Rynne, J. M. Castelli, A. I. Vivas-Marfisi, and A. R. Glenn.** 1999. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. Microbiology-Uk **145**:1585-1593.
- Djordjevic, M. A.** 2004. *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: a proteomic perspective. Proteomics. **4**:1859-1872.
- Djordjevic, M. A., H. C. Chen, S. Natera, G. Van Noorden, C. Menzel, S. Taylor, C. Renard, O. Geiger, and G. F. Weiller.** 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**:508-24.
- Dominguez-Ferreras, A., R. Perez-Arnedo, A. Becker, J. Olivares, M. J. Soto, and J. Sanjuan.** 2006. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **188**:7617-7625.

**Dondrup, M., A. Goesmann, D. Bartels, J. Kalinowski, L. Krause, B. Linke, O. Rupp, A. Sczyrba, A. Pühler, and F. Meyer.** 2003. EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol* **106**:135-46.

**Endley, S., D. McMurray, and T. A. Ficht.** 2001. Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. *J. Bacteriol.* **183**:2454-62.

**Fenner, B. J., R. P. Tiwari, W. G. Reeve, M. J. Dilworth, and A. R. Glenn.** 2004. *Sinorhizobium medicae* genes whose regulation involves the ActS and/or ActR signal transduction proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**:21-31.

**Finan, T. M., S. Weidner, K. Wong, J. Buhrmester, P. Chain, F. J. Vorhölter, I. Hernandez-Lucas, A. Becker, A. Cowie, J. Gouzy, B. Golding, and A. Pühler.** 2001. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **98**:9889-9894.

**Foster, J. W.** 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:898-907.

**Fujihara, S. and T. Yoneyama.** 1993. Effects of pH and osmotic-stress on cellular polyamine contents in the soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1104-1109.

**Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Pühler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dreano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F. J. Vorhölter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K. C. Yeh, and J. Batut.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668-72.

**Gaworzewaska, E. T. and M. J. Carlile.** 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* **128**:1179-1188.

**Giuntini, E., A. Mengoni, F. C. De, D. Cavalieri, N. ubin-Horth, C. R. Landry, A. Becker, and M. Bazzicalupo.** 2005. Large-scale genetic variation of the symbiosis-required megaplasmid pSymA revealed by comparative genomic analysis of *Sinorhizobium meliloti* natural strains. *BMC Genomics* **6**:158.

**Glenn, A. R., W. G. Reeve, R. P. Tiwari, and M. J. Dilworth.** 1999. Acid tolerance in root nodule bacteria. *Novartis Found Symp* **221**:112-26.

**Göttfert, M.** 1993. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol.Rev.* **10**:39-63.

**Graham, P. H., K. Draeger, M. L. Ferrey, M. J. Conroy, B. E. Hammer, E. Martinez, S. R. Naarons, and C. Quinto.** 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and

*Bradyrhizobium*, and initial studies for the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. Can. J. Microbiol. **40**:198-207.

**Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:4645-4649.

**Hellweg, C., A. Pühler, and S. Weidner.** 2009. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. BMC Microbiol. **9**:37.

**Hickey, E. W. and I. N. Hirshfield.** 1990. Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1038-1045.

**Hoang, H. H., N. Gurich, and J. E. Gonzalez.** 2008. Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **190**:861-871.

**Holter, N. S., M. Mitra, A. Maritan, M. Cieplak, J. R. Banavar, and N. V. Fedoroff.** 2000. Fundamental patterns underlying gene expression profiles: simplicity from complexity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:8409-8414.

**Howieson, J. G., A. D. Robson, and L. K. Abbott.** 1992. Calcium modifies pH effects in acid-tolerant and acid-sensitive strains of *Rhizobium meliloti*. Australian Journal of Agricultural Research **43**:765-772.

**Ibekwe, A. M., J. S. Angle, R. L. Chaney, and P. vanBerkum.** 1997. Enumeration and N<sub>2</sub> fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. Agriculture Ecosystems & Environment **61**:103-111.

**Javelle, A., E. Severi, J. Thornton, and M. Merrick.** 2004. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. J. Biol. Chem. **279**:8530-8538.

**Khan, S. and R. M. Macnab.** 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility. J. Mol. Biol. **138**:599-614.

**Kobayashi, H., T. Suzuki, N. Kinoshita, and T. Unemoto.** 1984. Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. J. Bacteriol. **158**:1157-1160.

**Kobayashi, H., T. Suzuki, and T. Unemoto.** 1986. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. J. Biol. Chem. **261**:627-630.

**Kohonen, T., Hynnine, J., Kangas, J., and Laaksonen, J.** SOM\_PAK The Self-Organizing Map Program Package. 2009. Helsinki University of Technology. Laboratory of Computer and Information Science.

**Krol, E. and A. Becker.** 2004. Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. Mol. Genet. Genomics **272**:1-17.

- Leigh, J. A., J. W. Reed, J. F. Hanks, A. M. Hirsch, and G. C. Walker.** 1987. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* **51**:579-587.
- Lodwig, E. M., A. H. Hosie, A. Bourdes, K. Findlay, D. Allaway, R. Karunakaran, J. A. Downie, and P. S. Poole.** 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**:722-726.
- Lund, P. A.** 2001. Microbial molecular chaperones. *Adv. Microb. Physiol.* **44**:93-140.
- Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* **19**:101-112.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**:45-55.
- Maurer, L. M., E. Yohannes, S. S. Bondurant, M. Radmacher, and J. L. Slonczewski.** 2005. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **187**:304-319.
- Meade, H. M., S. R. Long, G. B. Ruvkun, S. E. Brown, and F. M. Ausubel.** 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* **149**:114-122.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press .
- Mobley, H. L., M. D. Island, and R. P. Hausinger.** 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **59**:451-480.
- Mosley, C. S., J. Y. Suzuki, and C. E. Bauer.** 1994. Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. *J. Bacteriol.* **176**:7566-7573.
- Nagano, K., Y. Murakami, K. Nishikawa, J. Sakakibara, K. Shimozato, and F. Yoshimura.** 2007. Characterization of RagA and RagB in *Porphyromonas gingivalis*: study using gene-deletion mutants. *J. Med. Microbiol.* **56**:1536-1548.
- Natera, S. H., N. Guerreiro, and M. A. Djordjevic.** 2000. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:995-1009.
- Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:5853-5859.
- O'Hara, G. W., T. J. Goss, M. J. Dilworth, and A. R. Glenn.** 1989. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1870-1876.
- Oke, V. and S. R. Long.** 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **32**:837-849.

- Olson, E. R., D. S. Dunyak, L. M. Jurss, and R. A. Poorman.** 1991. Identification and characterization of *dppa*, an *Escherichia coli* gene encoding a periplasmic dipeptide transport protein. *J. Bacteriol.* **173**:234-244.
- Paul, E. A.** 1988. Towards the year 2000: directions for future nitrogen research, p. 417-425. *In* J. R. Wilson (ed.), *Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Peschel, A., R. W. Jack, M. Otto, L. V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, W. F. Nieuwenhuizen, G. Jung, A. Tarkowski, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp.** 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J. Exp. Med.* **193**:1067-1076.
- Platero, R. A., M. Jauregui, F. J. Battistoni, and E. R. Fabiano.** 2003. Mutations in *sitB* and *sitD* genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *Fems Microbiology Letters* **218**:65-70.
- Putnoky, P., A. Kereszt, T. Nakamura, G. Endre, E. Grosskopf, P. Kiss, and A. Kondorosi.** 1998. The *pha* gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type of K<sup>+</sup> efflux system. *Molecular Microbiology* **28**:1091-1101.
- Reeve, W. G., L. Bräu, J. Castelli, G. Garau, C. Sohlenkamp, O. Geiger, M. J. Dilworth, A. R. Glenn, J. G. Howieson, and R. P. Tiwari.** 2006. The *Sinorhizobium medicae* WSM419 *lpiA* gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions. *Microbiology* **152**:3049-3059.
- Reeve, W. G., M. J. Dilworth, R. P. Tiwari, and A. R. Glenn.** 1997. Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710 involves *exoR*. *Microbiology* **143** ( Pt 6):1951-8.
- Reeve, W. G., R. P. Tiwari, M. J. Dilworth, and A. R. Glenn.** 1993. Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology & Biochemistry* **25**:581-586.
- Reeve, W. G., R. P. Tiwari, N. Guerreiro, J. Stubbs, M. J. Dilworth, A. R. Glenn, B. G. Rolfe, M. A. Djordjevic, and J. G. Howieson.** 2004. Probing for pH-regulated proteins in *Sinorhizobium medicae* using proteomic analysis. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**:140-7.
- Reeve, W. G., R. P. Tiwari, C. M. Wong, M. J. Dilworth, and A. R. Glenn.** 1998. The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology-Uk* **144**:3335-3342.
- Ridge, R. W. and B. G. Rolfe.** 1985. *Rhizobium* sp. Degradation of Legume Root Hair Cell Wall at the Site of Infection Thread Origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:717-720.
- Robson, A. D. and P. J. Bottomley.** 1991. Limitations in the use of legumes in agriculture and forestry, p. 320-349. *In* *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*.
- Rotter, C., S. Mühlbacher, D. Salamon, R. Schmitt, and B. Scharf.** 2006. Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**:6932-6942.

**Rowbury, R. J., N. H. Hussain, and M. Goodson.** 1998. Extracellular proteins and other components as obligate intermediates in the induction of a range of acid tolerance and sensitisation responses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* **166**:283-288.

**Rüberg, S., Z. X. Tian, E. Krol, B. Linke, F. Meyer, Y. Wang, A. Pühler, S. Weidner, and A. Becker.** 2003. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.* **106**:255-68.

**Sauviac, L., H. Philippe, K. Phok, and C. Bruand.** 2007. An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **189**:4204-4216.

**Schäfer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 69-73.

**Sganga, M. W. and C. E. Bauer.** 1992. Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell* **68**:945-954.

**Silva, J. A. and R. Uchida.** 2000. Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa.

**Simon, R., Priefer U.B., and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* 784-791.

**Smith, B. E.** 2002. Nitrogenase reveals its inner secrets. *Science* **297**:1654-1655.

**Sohlenkamp, C., K. A. Galindo-Lagunas, Z. Q. Guan, P. Vinuesa, S. Robinson, J. Thomas-Oates, C. R. H. Raetz, and O. Geiger.** 2007. The lipid lysyl-phosphatidylglycerol is present in membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and confers increased resistance to polymyxin B under acidic growth conditions. *Mol. Plant Microbe Int.* **20**:1421-1430.

**Soukas, A., P. Cohen, N. D. Socci, and J. M. Friedman.** 2000. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* **14**:963-980.

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

**Soutourina, O. A., E. Krin, C. Laurent-Winter, F. Hommais, A. Danchin, and P. N. Bertin.** 2002. Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. *Microbiology* **148**:1543-1551.

**Sprent, J. I. and P. Sprent.** 1990. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

- Stiens, M., A. Becker, T. Bekel, V. Godde, A. Goesmann, K. Niehaus, S. Schneiker-Bekel, W. Selbitschka, S. Weidner, A. Schluter, and A. Pühler.** 2008. Comparative genomic hybridisation and ultrafast pyrosequencing revealed remarkable differences between the *Sinorhizobium meliloti* genomes of the model strain Rm1021 and the field isolate SM11. *J. Biotechnol.* **136**:31-37.
- Sturn, A.** 2001. Cluster Analysis for Large Scale Gene Expression Studies.
- Sturr, M. G. and R. E. Marquis.** 1990. Inhibition of proton-translocating ATPases of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* by fluoride and aluminum. *Arch. Microbiol.* **155**:22-27.
- Tate, R. L.** 1995. Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation), p. 307-333. *In* John Wiley & Sons, Inc N.Y.
- Tavazoie, S., J. D. Hughes, M. J. Campbell, R. J. Cho, and G. M. Church.** 1999. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat. Genet.* **22**:281-285.
- Thanassi, D. G., G. S. Suh, and H. Nikaido.** 1995. Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:998-1007.
- Tiwari, R. P., W. G. Reeve, M. J. Dilworth, and A. R. Glenn.** 1996. Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two-component sensor-regulator system. *Microbiology* **142** ( Pt 7):1693-704.
- Tiwari, R. P., W. G. Reeve, B. J. Fenner, M. J. Dilworth, A. R. Glenn, and J. G. Howieson.** 2004. Probing for pH-regulated genes in *Sinorhizobium medicae* using transcriptional analysis. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**:133-9.
- Trzebiatowski, J. R., D. M. Ragatz, and F. J. de Bruijn.** 2001. Isolation and regulation of *Sinorhizobium meliloti* 1021 loci induced by oxygen limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3728-3731.
- Tsau, J. L., A. A. Guffanti, and T. J. Montville.** 1992. Conversion of Pyruvate to Acetoin helps To maintain pH Homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:891-894.
- Turgeon, B. G. and W. D. Bauer.** 1985. Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean. *Planta* **174**:3403-3406.
- Van Berkum, P. and B. D. Eardly.** 1998. Molecular evolutionary systematics of the rhizobiaceae. The rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer academic press, Netherlands.
- Vance, C. P.** 1997. Enhanced agricultural sustainability through biological nitrogen fixation, p. 179-186. *In* A. Legocki, Bothe H., and Pühler A. (eds.), Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and sustainable Agriculture. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: IBP Handbook No.15.
- Vinuesa, P., F. Neumann-Silkow, C. Pacios-Bras, H. P. Spaink, E. Martinez-Romero, and D. Werner.** 2003. Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici*

CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**:159-168.

**Von Uexküll, H. R. and E. Mutert.** 1995. Global extent development and economic impact of acid soils, p. 1-19. *In* Plant soil interactions at low pH. Principles and management.

**Watson, R. J., Y. K. Chan, R. Wheatcroft, A. F. Yang, and S. H. Han.** 1988. *Rhizobium meliloti* genes required for C-4-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen-fixation are located on a megaplasmid. *J. Bacteriol.* **170**:927-934.

**Wen, X., S. Fuhrman, G. S. Michaels, D. B. Carr, S. Smith, J. L. Barker, and R. Somogyi.** 1998. Large-scale temporal gene expression mapping of central nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:334-339.

**Wickner, S., M. R. Maurizi, and S. Gottesman.** 1999. Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**:1888-1893.

**Wood, S. M. and W. Newcomb.** 1989. Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Bot.* **67**:3108-3122.

**Yao, S. Y., L. Luo, K. J. Har, A. Becker, S. Rüberg, G. Q. Yu, J. B. Zhu, and H. P. Cheng.** 2004. *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J. Bacteriol.* **186**:6042-6049.

**Yuan, Z. C., P. Liu, P. Saenkham, K. Kerr, and E. W. Nester.** 2008. Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *J. Bacteriol.* **190**:494-507.

**Yurgel, S., M. W. Mortimer, K. N. Rogers, and M. L. Kahn.** 2000. New substrates for the dicarboxylate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **182**:4216-4221.

**Zahran, H. H.** 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:968-89.

**Zhexue Huang.** A fast clustering algorithm to cluster very large categorical data sets in data mining. 1997. SIGMOD Workshop on Research Issues on Data Mining and Knowledge Discovery.

**Zhexue Huang.** Clustering large data sets with mixed numerical and categorical values. 1997. Proceedings of the First Pacific-Asia Conference on Knowledge Discovery and Data Mining.

# G. Anhang

## 1. Abkürzungen

A	Adenin
°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
ATR	Adaptive Acid Tolerance Response
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Fe	Eisen
g	Gramm
G	Guanin
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktosid
Km	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Broth
m	milli
M	Molar
Mb	Megabasen
MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
n	nano
o.D.	optische Dichte
o/n	über Nacht
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMF	Proton Motive Force

RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sm	Streptomycin
SOM	Self Organizing Maps
Suc	Saccharose
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TE	Tris/ EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units, Uracil
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 2. Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

Cluster A	16 Genes	Genename	Product				
2.2	3.8	4.3	4.4	4.0	3.9	<i>smc04350</i>	Multidrug efflux protein
2.9	4.3	4.6	4.5	3.7	4.3	<i>sma0045</i> or <i>cah</i>	Carbonic anhydrase
2.1	3.3	4.1	3.5	3.5	3.0	<i>sma1791</i>	Hypothetical protein
1.8	2.3	2.8	3.0	3.2	4.1	<i>smb20949</i> or <i>exoV</i>	Putative pyruvyltransferase protein
1.8	2.7	2.9	2.9	2.6	3.1	<i>smb21025</i>	Hypothetical protein
2.0	1.8	2.6	3.5	4.3	4.8	<i>smb21440</i>	Hypothetical protein
3.5	3.2	4.7	4.6	4.6	4.3	<i>smc00611</i> or <i>lpiA</i>	Transmembrane protein
1.3	2.5	3.1	3.7	3.7	4.0	<i>smc01580</i>	Hypothetical protein signal peptide
2.3	2.8	3.8	4.0	3.5	3.6	<i>smc01774</i>	Hypothetical protein signal peptide
2.2	2.6	2.9	3.2	3.5	4.7	<i>smc01855</i>	Putative lysozyme
1.9	3.9	4.3	4.9	4.8	4.0	<i>smc02365</i> or <i>degP1</i>	Probable serine protease
2.5	3.6	4.1	4.3	4.1	2.9	<i>smc02366</i>	Probable two-component response regulator
0.8	2.3	3.0	3.4	3.3	4.4	<i>smc04267</i>	Hypothetical protein
1.3	1.9	3.3	3.4	3.1	2.1	<i>smc02367</i>	Putative sensor histidine kinase transmembrane protein
1.9	2.3	2.4	2.4	2.7	3.7	<i>smb20954</i> or <i>exoH</i>	Succinyltransferase protein
0.7	NaN	2.6	3.6	2.5	3.4	<i>smb21026</i>	Hypothetical exopeptide protein

**Abbildung G-1: Heatmap von Cluster A.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

## G. Anhang

Cluster B						74 Genes	Genename	Product
2.1	1.7	2.1	2.6	2.1	3.4	<i>sma0404</i>	FMN-dependent dehydrogenase	
1.9	1.0	1.8	2.3	2.4	2.5	<i>smb20094</i>	Putative phospholipase protein	
1.1	1.3	1.7	1.8	1.6	2.5	<i>smb20810</i>	Putative O-acetyl transferase	
1.0	1.0	1.4	1.8	2.0	2.5	<i>smb20956 or exoL</i>	Putative glucosyltransferase protein	
1.1	0.6	0.9	1.4	2.1	1.2	<i>smb21441</i>	Conserved hypothetical protein	
1.1	2.0	2.4	2.7	2.9	3.4	<i>smb21690 or exoW</i>	Glucosyltransferase protein	
1.6	1.0	1.8	2.5	2.6	NaN	<i>smc00792</i>	Hypothetical transmembrane protein	
1.0	0.8	2.5	3.2	1.5	NaN	<i>smc02227 or fadB</i>	Putative fatty oxidation complex alpha subunit	
0.8	1.9	2.4	2.9	2.9	2.0	<i>smc04246</i>	Hypothetical transmembrane signal peptide protein	
2.3	1.3	1.4	2.3	3.3	3.3	<i>sma0134</i>	Conserved hypothetical protein	
1.4	-0.4	NaN	2.2	1.5	2.2	<i>sma0210</i>	Hypothetical protein	
0.6	0.5	1.5	1.5	1.7	2.2	<i>sma0211</i>	Hypothetical protein	
1.7	1.0	1.9	2.7	2.3	1.9	<i>sma0293</i>	Conserved hypothetical protein	
1.3	0.9	1.6	2.1	1.1	1.3	<i>sma0340 or wrbA2</i>	WrbA2 flavoprotein	
1.1	1.1	1.5	2.0	2.0	2.8	<i>sma1264</i>	Conserved hypothetical protein	
1.4	1.8	2.5	2.6	2.7	3.4	<i>sma1705</i>	Transcriptional regulator, MucR family	
1.3	1.3	1.4	1.8	1.7	2.5	<i>sma1831</i>	Conserved hypothetical protein	
0.7	NaN	1.7	2.1	1.1	2.6	<i>sma1960</i>	Conserved hypothetical protein	
1.9	1.6	1.9	2.4	3.1	3.9	<i>sma2061</i>	Conserved hypothetical protein	
1.0	NaN	1.1	1.5	1.8	2.1	<i>sma2063</i>	Sensor histidine kinase	
2.6	1.2	1.8	2.9	2.9	2.6	<i>sma2071</i>	Conserved hypothetical protein	
1.4	1.8	2.1	2.1	2.0	2.8	<i>sma2259</i>	Conserved hypothetical protein	
0.9	1.4	1.7	2.6	1.1	2.8	<i>sma2357 or cyaO</i>	Adenylate/guanylate cyclase	
1.6	0.8	1.2	2.3	2.2	1.8	<i>smb20007 or katC</i>	KatC	
0.5	0.4	2.1	1.1	1.2	1.7	<i>smb20011</i>	Putative heavy-metal transporter	
0.9	0.4	0.9	1.6	2.1	1.4	<i>smb20086</i>	Hypothetical protein	
1.0	1.2	1.2	2.3	2.2	NaN	<i>smb20227 or ndiA1</i>	NdiA1	
1.0	1.7	2.0	2.1	2.0	2.4	<i>smb20359</i>	Hypothetical protein	
2.3	1.2	1.6	2.9	3.8	2.4	<i>smb20704 or glgA2</i>	Putative glycogen synthase protein	
0.9	0.7	1.3	2.0	1.7	2.5	<i>smb20713</i>	Putative sugar uptake ABC transporter ATP binding protein	
1.0	1.6	1.8	1.9	1.8	2.5	<i>smb20944 or exoQ</i>	Putative polysaccharide polymerase, similar to Wzy protein	
0.8	1.2	1.6	1.7	1.7	2.6	<i>smb20946 or exoY</i>	Exopolysaccharide production protein	
1.6	2.3	2.6	2.1	2.4	3.0	<i>smb20950 or exoT</i>	Probable exopolysaccharide transport protein	
1.3	1.8	2.1	2.3	2.6	3.3	<i>smb20955 or exoK</i>	Endo-beta-1,3-1,4-glycanase protein	
0.7	1.3	1.7	2.0	2.4	3.5	<i>smb20959 or exoO</i>	Glucosyltransferase protein	
0.9	0.7	1.2	1.6	2.2	2.9	<i>smb20961 or exoP</i>	ExoP	
1.2	0.3	2.9	NaN	1.2	2.6	<i>smb21191 or trsA</i>	ABC transporter, ATP-binding and permease components	
0.7	NaN	2.2	2.8	1.5	2.5	<i>smb21211</i>	Putative membrane protein	
1.9	1.0	1.7	2.5	2.4	1.5	<i>smb21446 or glgX2</i>	Probable glycogen operon protein GlgX	
1.8	0.9	1.3	2.5	2.3	2.1	<i>smb21473</i>	Conserved hypothetical protein	
0.7	0.9	2.1	2.0	1.7	2.8	<i>smb21516</i>	Conserved hypothetical protein	
0.8	1.6	2.1	2.3	2.3	3.0	<i>smc00045 or cycF</i>	Probable cytochrome c556	
1.5	1.7	2.4	2.7	2.6	3.1	<i>smc00062</i>	Hypothetical protein	
1.8	1.1	1.6	2.4	2.5	2.0	<i>smc00063</i>	Hypothetical protein	
0.5	1.3	1.7	1.6	1.7	2.2	<i>smc00086 or cycG</i>	Putative diheme cytochrome c type signal peptide protein	
0.4	1.1	1.9	1.5	1.5	2.0	<i>smc00096</i>	Hypothetical protein	
0.5	0.5	1.1	1.7	1.9	2.1	<i>smc00115</i>	Conserved hypothetical protein	
1.1	1.5	1.7	1.8	2.0	2.3	<i>smc00280</i>	Conserved hypothetical protein	
1.6	0.9	1.3	2.0	3.0	2.4	<i>smc00371</i>	Conserved hypothetical protein	
1.1	NaN	1.5	3.5	2.3	1.9	<i>smc00612</i>	Hypothetical protein signal peptide	
1.3	1.1	1.5	2.3	3.0	NaN	<i>smc00796</i>	Hypothetical transmembrane protein	
1.7	1.2	2.0	2.8	2.3	2.0	<i>smc00800</i>	Hypothetical transmembrane protein	
1.0	1.2	1.5	1.3	1.7	2.4	<i>smc00801</i>	Hypothetical protein	
1.2	0.3	0.9	1.6	2.5	1.0	<i>smc00885</i>	Hypothetical transmembrane signal peptide protein	
1.6	0.7	0.8	1.7	2.1	1.8	<i>smc01016</i>	Hypothetical protein	
0.9	1.8	2.0	2.1	2.2	2.9	<i>smc01341</i>	Hypothetical protein	
0.0	0.1	1.5	2.2	1.5	3.4	<i>smc01446</i>	Hypothetical protein	
0.2	NaN	2.6	1.9	3.1	1.2	<i>smc01457</i>	Probable acriflavine resistance protein	
1.0	NaN	3.0	2.5	1.9	3.8	<i>smc01583</i>	Conserved hypothetical protein	
1.0	2.0	1.9	2.3	2.4	2.7	<i>smc01765</i>	Hypothetical transmembrane protein	
0.8	1.0	1.2	1.5	1.7	2.4	<i>smc01788</i>	Hypothetical protein	
-0.1	NaN	1.8	3.1	1.9	3.4	<i>smc02181 or putA</i>	Proline dehydrogenase	
0.5	0.9	1.4	2.0	1.4	1.7	<i>smc02201</i>	Conserved hypothetical protein	
0.8	1.7	1.9	2.2	2.0	2.4	<i>smc02242</i>	Hypothetical transmembrane protein	
0.5	1.0	1.4	1.6	1.9	2.3	<i>smc02382</i>	Conserved hypothetical protein	
0.7	1.4	2.0	2.4	1.8	1.8	<i>smc02403</i>	Probable soluble lytic murein transglycosylase	
1.1	-0.3	1.4	3.0	2.4	0.7	<i>smc02516</i>	Putative transport system permease ABC transporter protein	
0.9	1.8	1.6	2.1	2.1	2.3	<i>smc02560 or chvI</i>	Transcriptional regulator protein	
1.0	0.8	2.0	2.7	1.3	1.7	<i>smc02731</i>	Putative transposase protein	
0.4	NaN	1.8	2.5	1.6	2.0	<i>smc02854</i>	Hypothetical signal peptide protein	
0.5	0.7	1.3	1.8	1.7	2.1	<i>smc03956 or toIA</i>	Hypothetical signal peptide protein	
0.9	0.8	2.3	NaN	2.6	3.2	<i>smc04173</i>	Conserved hypothetical protein	
1.4	1.1	1.4	2.0	1.8	0.8	<i>smc04194</i>	Putative transmembrane protein	
0.8	0.4	1.2	2.3	1.0	1.4	<i>smc00503</i>	Conserved hypothetical protein	

**Abbildung G-2: Heatmap von Cluster B.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

## G. Anhang

Cluster C	31 Genes	Genename	Product				
0.9	0.5	0.1	0.8	1.2	2.1	<i>smc00591</i>	Hypothetical signal peptide protein
0.4	-1.4	0.7	NaN	1.2	2.7	<i>smc01798</i>	Conserved hypothetical protein
0.4	0.8	-2.0	2.1	1.0	0.8	<i>sma0081</i>	ABC transporter, permease
0.1	0.4	0.5	0.1	0.5	2.1	<i>sma1736</i>	Transcriptional regulator, LysR family
1.0	0.8	0.5	0.6	1.0	2.5	<i>smb20470</i>	Hypothetical protein
-0.4	1.4	NaN	0.4	0.2	2.3	<i>smb20813</i>	ABC transporter, ATP-binding and permease components
0.2	0.5	-0.1	0.8	1.0	2.2	<i>smb21258</i>	Hypothetical adenylate cyclase truncated protein
0.5	1.0	0.8	0.4	1.0	2.7	<i>smb21488</i> or <i>cyoB</i>	Putative cytochrome o ubiquinol oxidase chain I protein
0.2	0.7	0.7	0.7	1.3	2.2	<i>smb21491</i>	Hypothetical exported protein
0.0	0.3	0.6	0.8	1.4	2.3	<i>smb21566</i> or <i>groEL5</i>	Putative heat shock protein groEL
0.1	0.8	0.4	NaN	0.9	2.2	<i>smc00642</i>	Hypothetical transmembrane protein
0.1	0.7	0.0	0.8	1.3	2.4	<i>smc02278</i>	Hypothetical transmembrane protein
0.7	0.5	0.8	0.6	1.1	2.3	<i>smc02306</i>	Hypothetical protein
0.9	0.7	1.0	1.2	1.6	2.2	<i>sma1077</i> or <i>nex18</i>	Nex18 symbiotically induced conserved protein
0.3	2.8	-0.2	NaN	0.0	3.4	<i>sma1254</i>	Hypothetical Protein
1.2	NaN	0.5	1.3	1.9	2.4	<i>sma2353</i>	Oxidoreductase
-0.5	0.4	0.5	NaN	0.8	4.1	<i>smb20015</i>	Putative sugar ABC transporter
0.4	0.3	0.7	1.3	2.1	2.7	<i>smb20960</i> or <i>exoN</i>	UDPglucose pyrophosphorylase protein
0.7	0.5	0.8	1.5	1.7	2.3	<i>smb21122</i> or <i>mccA</i>	Putative methylcrotonoyl-CoA carboxylase
0.6	1.0	0.5	1.1	1.5	3.2	<i>smb21188</i>	Putative acyltransferase
0.7	0.5	0.9	1.1	1.8	3.1	<i>smb21518</i>	Hypothetical protein
0.5	0.7	1.1	1.2	1.5	2.1	<i>smc00404</i>	Hypothetical protein
0.9	2.4	0.8	1.1	1.3	2.1	<i>smc01165</i> or <i>iolC</i>	Putative sugar kinase protein
0.9	0.5	1.2	0.9	1.6	2.2	<i>smc01281</i>	Conserved hypothetical protein
0.1	-0.4	1.2	1.6	2.1	2.6	<i>smc01465</i> or <i>creA</i>	Putative CreA protein
0.5	0.9	1.4	1.3	1.3	2.1	<i>smc02351</i>	Conserved hypothetical protein
0.4	0.6	1.0	1.3	1.9	2.7	<i>smc02769</i>	Conserved hypothetical transmembrane protein
0.2	1.0	1.1	1.3	1.6	2.1	<i>smc02885</i> or <i>msrA1</i>	Probable peptide methionine sulfoxide reductase protein
0.4	0.7	1.2	1.4	1.3	2.0	<i>smc02940</i>	Hypothetical protein
0.6	0.8	1.0	1.7	1.7	2.4	<i>smc00346</i>	Hypothetical transmembrane protein
0.8	1.7	1.4	1.4	1.2	2.4	<i>smb20965</i>	Probable beta-lactamase

**Abbildung G-3: Heatmap von Cluster C.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

Cluster D	23 Genes	Genename	Product				
-1.0	0.5	2.1	2.1	0.3	NaN	<i>sma1209</i> or <i>fixI1</i>	FixI1 copper transport ATPase
0.0	0.8	2.3	2.0	0.9	0.9	<i>smc02520</i> or <i>glpD</i>	Putative glycerol 3 phosphate dehydrogenase protein
0.7	0.9	NaN	2.2	0.3	0.3	<i>smb20243</i>	Putative glycosyltransferase protein
0.6	0.1	2.2	1.6	0.5	0.6	<i>smb20344</i>	Putative transcriptional regulator protein
1.1	3.3	1.6	0.5	0.4	-0.6	<i>smb20347</i>	Putative transcriptional regulator protein
0.8	0.9	1.1	2.0	0.5	1.0	<i>smb20367</i>	Putative transcriptional regulator protein
0.0	1.9	2.1	1.4	0.6	0.1	<i>smb20611</i> or <i>dctA</i>	C4 dicarboxylate transport protein
0.1	0.2	2.0	0.7	0.0	0.2	<i>smb21081</i> or <i>manB</i>	Probable phosphoglucomutase phosphomannomutase protein
1.0	2.1	0.9	1.0	0.7	0.5	<i>smc00141</i>	Hypothetical protein
0.2	2.4	2.2	1.3	0.4	1.2	<i>smc00147</i>	Hypothetical protein
-0.6	0.9	2.2	1.2	0.3	0.1	<i>smc00976</i>	Putative enoyl CoA dehydrogenase protein
-0.5	1.0	2.2	0.9	0.3	-0.6	<i>smc00977</i>	Putative acyl CoA dehydrogenase protein
0.4	2.4	1.6	0.7	1.0	0.8	<i>smc01034</i>	Hypothetical protein
-0.2	1.4	2.1	1.3	0.7	0.6	<i>smc01814</i>	Probable glutamate synthase small chain protein
-0.5	0.9	2.0	1.7	0.8	0.4	<i>smc01815</i>	Dihydropyrimidine dehydrogenase
-0.6	2.0	0.5	NaN	0.3	-0.4	<i>smc02657</i>	Hypothetical protein
0.5	2.5	1.8	0.8	0.4	-0.1	<i>smc03167</i>	MFS-type transport protein
1.0	3.3	2.7	1.1	0.5	0.5	<i>smc03168</i>	Multidrug resistance efflux pump
0.2	2.1	1.1	0.4	-0.3	-0.2	<i>smc03169</i>	Transcription regulator TetR family
0.2	2.2	0.4	0.1	0.0	NaN	<i>sma0914</i>	Conserved hypothetical protein
0.5	3.7	2.7	1.3	1.1	-0.1	<i>smb20346</i>	Putative efflux transmembrane protein
-0.2	2.0	2.5	2.1	1.1	1.2	<i>smc02150</i>	Conserved hypothetical protein
-0.6	1.0	2.8	2.5	1.2	1.1	<i>smc02229</i>	Putative acyl CoA dehydrogenase protein

**Abbildung G-4: Heatmap von Cluster D.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

## G. Anhang

Cluster E	22 Genes	Genename	Product				
0.0	-1.2	-2.0	-2.4	-2.6	-2.4	<i>smc02509</i> or <i>sitA</i>	Manganese ABC transporter periplasmic substrate binding protein
-0.5	-1.8	-3.1	-3.2	-2.7	-1.8	<i>smc02634</i>	Hypothetical transmembrane protein
-0.8	-2.2	-2.9	-2.8	-2.2	-1.7	<i>smc02774</i>	Putative ABC transporter periplasmic binding protein
-1.3	-1.1	-1.8	-2.3	-2.5	-3.0	<i>smc02284</i>	Hypothetical signal peptide protein
-1.0	-1.1	-2.1	-2.0	-2.5	-2.6	<i>smc02506</i> or <i>sitD</i>	Manganese ABC transporter permease
-0.7	-1.2	-1.8	-2.2	-2.5	-2.6	<i>smc02507</i> or <i>sitC</i>	Manganese ABC transporter permease
-0.4	-1.3	-1.8	-2.4	-2.5	-2.4	<i>smc02508</i> or <i>sitB</i>	Manganese ABC transporter ATPase
-0.3	-1.1	-2.5	-2.8	-2.4	-1.6	<i>smc02755</i> or <i>ahcY</i>	Probable adenosylhomocysteinase protein
-1.7	-0.9	-1.9	-2.2	-2.2	-2.5	<i>smc03016</i> or <i>visR</i>	VisR
-2.0	-2.1	-3.2	-3.0	-2.6	-2.8	<i>smc03773</i>	Hypothetical protein
-0.3	-1.3	-2.7	-2.7	-2.2	-2.5	<i>smc03806</i> or <i>glnK</i>	Probable nitrogen regulatory protein PII 2
0.2	-0.5	-2.2	-2.2	-1.8	-2.1	<i>smc03807</i> or <i>amtB</i>	Probable ammonium transporter protein
-0.8	-1.7	-2.8	-2.5	-2.4	-2.9	<i>smc04325</i> or <i>bmt</i>	Betaine-homocysteine methyltransferase
0.0	-1.1	-2.4	-2.7	-2.3	-1.6	<i>smb21176</i> or <i>phoD</i>	Phosphate uptake ABC transporter periplasmic binding protein
-0.9	-1.5	-2.0	-2.1	-2.6	-2.7	<i>smc00638</i>	Putative heat resistant agglutinin 1 protein
-3.5	-3.3	-2.7	-3.0	-2.2	-3.2	<i>smc01523</i> or <i>emrE</i>	Putative methyl viologen/ethidium resistance transmembrane protein
-0.2	-2.1	-3.4	-3.3	-2.9	-2.4	<i>smc01842</i>	Probable transcriptional regulator
-0.1	-1.7	-1.9	-1.7	-2.0	-1.7	<i>smc01843</i> or <i>metF</i>	Probable methylenetetrahydrofolate reductase protein
-1.3	-0.7	-2.8	-2.7	-2.3	-1.8	<i>smc02079</i> or <i>fadL</i>	Long-chain fatty acid transport protein precursor
-1.5	-2.4	-3.0	-2.2	-1.9	-2.3	<i>smc04346</i> or <i>ilvC</i>	Ketol acid reductoisomerase protein
-0.3	-2.0	-2.5	-2.3	-2.0	-1.3	<i>smc01109</i> or <i>metK</i>	Probable S adenosylmethionine synthase protein
-0.6	-2.3	-2.7	-2.4	-2.1	-1.2	<i>smb21177</i> or <i>phoC</i>	Phosphate uptake ABC transporter ATP-binding protein

**Abbildung G-5: Heatmap von Cluster E.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

Cluster F	22 Genes	Genename	Product				
-1.2	-0.5	-0.7	-1.3	-1.1	-2.0	<i>smc01950</i> or <i>livM</i>	High-affinity amino acid transport system permease protein
0.0	-0.4	-0.5	-1.1	-1.7	-3.2	<i>smc03027</i> or <i>flgB</i>	Flagellar basal body rod protein
-0.6	-1.0	-0.8	-1.2	-2.1	-3.2	<i>smc03030</i> or <i>flgG</i>	Flagellar basal body rod protein
-0.6	-0.5	-0.8	-1.2	-2.1	-3.6	<i>smc03049</i> or <i>flgL</i>	Putative flagellar hook associated protein
-0.9	-1.1	-1.1	-1.4	-1.7	-2.6	<i>smc03022</i> or <i>motA</i>	Chemotaxis (motility protein A) transmembrane
-0.6	-0.7	-0.8	-1.2	-1.7	-2.1	<i>smc03023</i>	Conserved hypothetical protein
-0.1	-0.5	-0.6	-0.9	-1.5	-2.3	<i>smc03024</i> or <i>flgF</i>	Flagellar basal body rod protein
-0.9	-0.9	-1.6	-1.0	-1.5	-2.4	<i>smc03028</i> or <i>flgC</i>	Flagellar basal body rod protein
-0.2	-0.7	-0.5	-1.0	-1.5	-3.0	<i>smc03029</i> or <i>fljE</i>	Flagellar hook basal body complex protein
-0.3	-0.4	-0.5	-1.0	-1.4	-2.6	<i>smc03047</i> or <i>flgE</i>	Flagellar hook protein
-0.1	-0.3	-0.1	-0.6	-1.1	-2.2	<i>smc03051</i> or <i>flbT</i>	Putative flagellin synthesis repressor protein
-1.2	-1.0	-0.9	-1.2	-1.4	-2.3	<i>sma1614</i>	TRM1b transposase
-0.6	-1.3	-1.4	-1.5	-1.4	-2.0	<i>smc02060</i> or <i>lppB</i>	Lipoprotein precursor
-1.6	-1.1	-1.4	-1.2	-1.4	-2.1	<i>smc02371</i>	Hypothetical transmembrane protein
-0.8	-1.4	-1.5	-1.6	-1.3	-2.2	<i>smc04111</i> or <i>cpaC1</i>	Pilus assembly protein
-0.2	-0.5	-1.4	-2.0	-1.6	-1.0	<i>sma0252</i>	Extracellular solute binding protein, TRAP-T type
-0.7	-1.1	-1.4	-1.7	-2.1	-2.1	<i>smb21273</i> or <i>potD</i>	Putative spermidine/putrescine ABC transporter protein
-1.2	-1.2	-1.6	-1.6	-1.9	-2.8	<i>smc00975</i> or <i>mcpU</i>	Probable chemoreceptor transmembrane protein
-1.6	-1.4	-1.3	-1.5	-1.6	-2.4	<i>smc01239</i>	Hypothetical transmembrane protein
-0.6	-0.5	-1.5	-2.0	-2.3	-1.7	<i>smc02400</i>	Probable outer membrane protein
-1.4	-1.0	-1.2	-1.9	-1.9	-2.0	<i>smc02488</i>	Hypothetical transmembrane protein
-0.8	-1.4	-2.1	-1.5	-1.6	-1.9	<i>smc03797</i> or <i>metA</i>	Probable homoserine o succinyltransferase protein

**Abbildung G-6: Heatmap von Cluster F.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

## G. Anhang

Cluster G	29 Genes	Genename	Product				
-1.8	-3.0	-3.3	-1.2	-1.7	-1.3	<i>smb20604</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter
0.1	-0.3	-2.9	-2.2	-1.3	-1.1	<i>smb20985</i> or <i>nirD</i>	Putative nitrite reductase [NAD(P)H], small subunit protein
0.0	0.5	-3.5	-2.1	-1.2	-1.1	<i>smb20986</i> or <i>narB</i>	Putative nitrate reductase, large subunit protein
-0.9	-0.9	-3.0	-2.1	-1.1	-1.1	<i>smb21707</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter
0.0	-1.0	-3.0	-2.5	-1.4	-1.5	<i>sma0583</i> or <i>nrtB</i>	Nitrate transporter, permease
-0.3	-1.5	-2.1	-1.5	-0.9	-0.5	<i>sma0241</i>	Epimerase
-1.4	-0.4	-6.7	-0.5	-0.7	-0.1	<i>sma1649</i>	ABC transporter, permease
-0.1	0.9	-3.3	-0.4	-0.1	0.0	<i>sma2385</i>	ABC transporter ATP-binding protein
-0.7	-2.2	-1.8	-1.5	-0.8	-0.5	<i>smb20032</i>	Hypothetical protein
-1.2	-1.1	-2.5	-1.8	-1.1	-0.7	<i>smb20141</i>	Putative oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein
-0.7	-1.7	-2.3	-1.5	-1.0	-0.5	<i>smb20142</i>	Putative oligopeptide ABC transporter permease protein
-0.7	-2.7	-3.1	-2.3	-1.3	-0.6	<i>smb20145</i>	Hypothetical protein
-1.0	-1.4	-3.3	-2.1	-1.3	-0.8	<i>smb20602</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter ATP binding protein
-1.1	-1.8	-2.8	-1.4	-1.0	-0.8	<i>smb20603</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter permease protein
-1.7	-3.5	-1.9	-1.1	-2.1	-1.5	<i>smb20605</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter periplasmic binding protein
-0.9	-1.7	-2.2	-2.3	-1.2	NaN	<i>smb20681</i> or <i>gcl</i>	Putative glyoxylate carboligase protein
-1.5	-2.8	-3.3	-3.8	-1.8	-0.7	<i>smb20871</i>	Putative dehydrogenase/reductase
0.1	-1.4	-3.5	-2.3	-1.6	-1.3	<i>smb20984</i> or <i>nirB</i>	putative nitrite reductase [NAD(P)H], large subunit protein
-1.3	-1.1	-2.1	-1.6	-1.4	-1.8	<i>smc00088</i>	Hypothetical transmembrane protein
-1.2	-0.6	-2.3	-1.8	-1.2	-0.8	<i>smc00409</i>	Hypothetical signal peptide protein
-1.5	-1.2	-2.9	-1.5	-1.4	-1.5	<i>smc00595</i> or <i>ndk</i>	Probable nucleoside diphosphate kinase protein
-2.3	-1.6	-2.6	-1.7	-0.3	NaN	<i>smc01017</i>	Putative acetyltransferase protein
-1.6	-3.5	-3.9	-3.6	-1.5	-0.6	<i>smc02581</i> or <i>glcB</i>	Probable malate synthase g protein
-1.0	-1.0	-3.3	-2.6	-1.5	-1.3	<i>smc02582</i>	Conserved hypothetical protein
-1.2	-1.3	-2.1	-1.2	-1.8	-1.4	<i>smc02772</i>	Sugar transport system permease protein
-2.0	-2.0	-1.9	-0.7	-0.4	NaN	<i>smc02773</i>	Sugar transport ATP-binding protein
0.1	-1.5	-2.2	-1.7	-1.7	-1.2	<i>smc03112</i> or <i>methH</i>	Probable 5-methyltetrahydrofolate-homocystein methyltransferase protein
-0.2	-1.3	-1.8	-2.5	-1.5	-0.7	<i>smc04317</i> or <i>afuA</i>	Solute-binding periplasmic protein precursor
-3.1	-1.3	-2.2	-0.5	-1.2	-1.6	<i>smc01522</i>	Hypothetical protein

**Abbildung G-7: Heatmap von Cluster G.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

Cluster H	13 Genes	Genename	Product				
Time after pH shift [min]							
	3	8	13	18	33	63	
-0.4	-2.2	0.1	0.5	-0.4	-0.3	<i>smc00107</i>	Putative transcriptional regulator
-1.4	-0.4	-0.6	0.7	-0.4	-2.1	<i>smc01469</i> or <i>mcpW</i>	Probable methyl accepting chemotaxis transmembrane protein
-2.6	-0.2	0.2	-0.3	-0.6	-0.8	<i>sma0855</i> or <i>nodP1</i>	ATP sulfurylasesmall subunit
-3.2	-0.6	-1.1	-0.9	-0.8	-0.8	<i>sma2087</i>	Hypothetical protein
-2.1	0.6	0.4	-0.2	-0.2	-1.1	<i>smb21469</i>	Hypothetical protein
-2.0	-0.3	0.0	-0.7	-0.5	-1.5	<i>smc01944</i>	Peroxidase protein
-2.6	-0.3	0.3	-0.7	-0.4	0.1	<i>smc01976</i>	Putative deaminating carbon sulfur lyase protein
-2.4	0.0	0.0	-0.1	-0.4	-0.1	<i>smc02034</i>	Putative oxidoreductase protein
-2.2	0.2	-0.1	-0.2	0.1	-0.5	<i>smc03036</i> or <i>fljP</i>	Flagellar biosynthetic transmembrane protein
-2.6	0.6	0.1	-0.2	-0.4	-0.7	<i>smc03960</i>	Conserved hypothetical protein
-2.4	0.9	0.4	0.1	0.2	-0.1	<i>smc04294</i>	Putative peptide transport system permease ABC transporter protein
-2.3	-0.3	-0.1	0.2	-0.2	-1.1	<i>smc04333</i>	Conserved hypothetical protein
-2.1	NaN	-0.7	0.2	-0.8	-0.5	<i>smb21083</i>	Probable transposase

**Abbildung G-8: Heatmap von Cluster H.** Neben der Heatmap wird das jeweilige Gen und dessen Genprodukt angegeben. Die Heatmap zeigt die Genexpressionen des jeweiligen Gens zu den Zeitpunkten 3-, 8-, 13-, 18-, 33- und 63 Minuten nach Induktion des pH-Stresses bei pH 5,75 im Vergleich zu einer bei pH 7 inkubierten *S. meliloti* 1021 Kultur. Die Zahlen entsprechen dem gemessenen M-Wert des Gens zu dem jeweiligen Zeitpunkt, der Farbton visualisiert den M-Wert.

**Tabelle G-1: Liste differentiell exprimierte Gene ( $M \geq 1$  und  $M \leq -1$ ) des Zeitreihen pH-Schock Experimentes die für regulatorische Proteine kodieren.** Für jedes identifizierte Gen (Spalte 1) ist dessen Genprodukt angegeben (Spalte 2). Falls eine *S. meliloti* 1021 Integrationsmutante erstellt werden konnte, wird zusätzlich das verwendete Integrationskonstrukt angegeben (Spalte 4). Die erstellten Mutanten wurden auf VMM-Platten bei pH 7,0 und pH 6,0 auf einen pH abhängigen Phänotyp hin untersucht (Spalte 5).

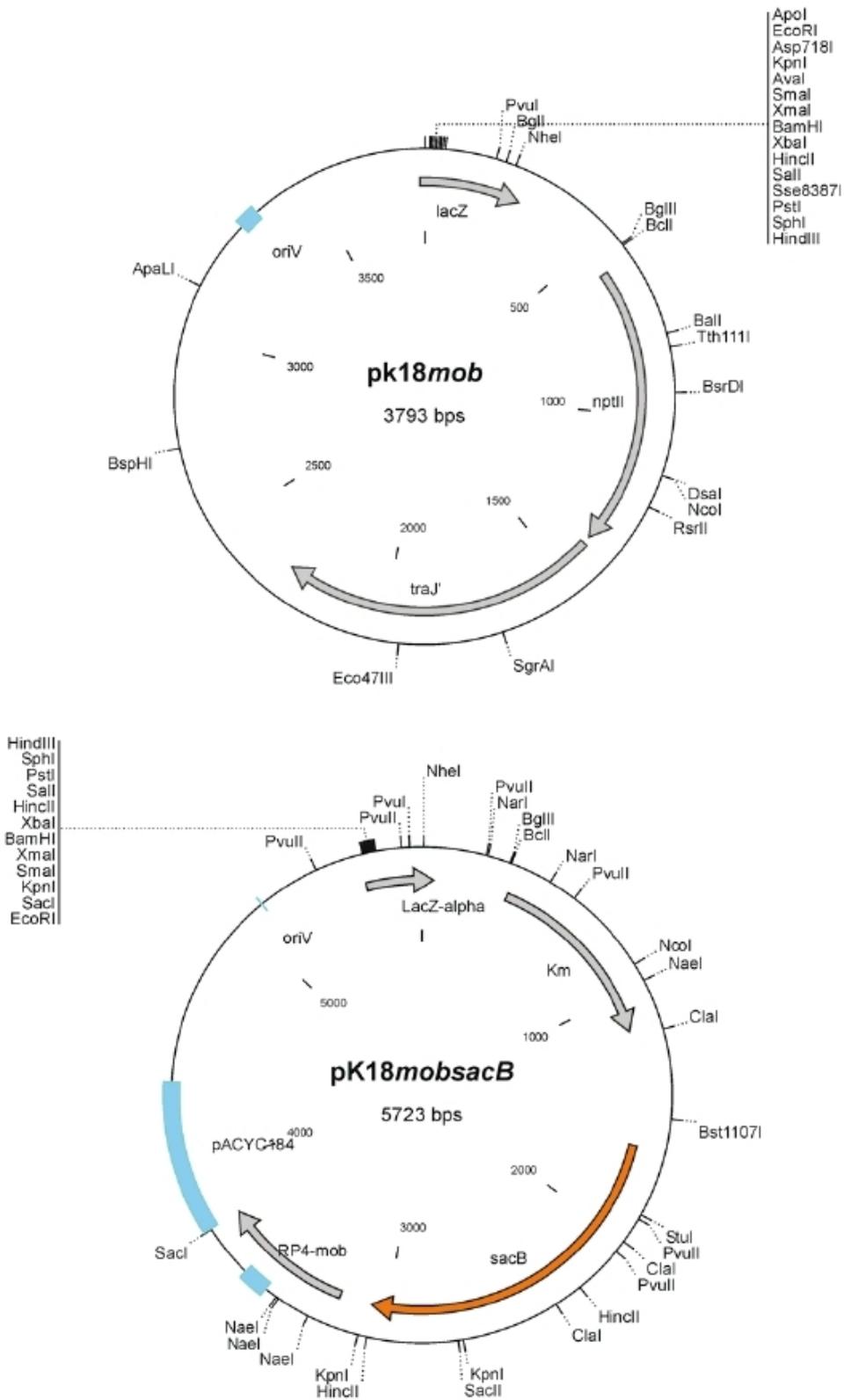
Genname	Genprodukt	<i>S.meliloti</i> 1021-Mutante	Integrationskonstrukt	Phänotyp
<i>sma0078</i>	Transkriptioneller Regulator, LacI Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma0114</i>	Zwei-Komponenten Response Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma0181</i>	CspA7 Kälteschockprotein, transkriptioneller Regulator	nicht vorhanden	puc19	Nein
<i>sma0246</i>	Transkriptioneller Regulator, GntR Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma0372</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma0760</i>	FixT2 Anti-Kinase Protein, transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma0870</i>	NodD1, Nod-Box abhängiger transkriptioneller Aktivator	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma1014</i>	HmrR, Schwermetallabhängiger transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma1476</i>	Transkriptioneller Regulator, AraC Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma1632</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma1705</i>	Transkriptioneller Regulator, MucR Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma1887</i>	Transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	<b>Ja</b>
<i>sma1954</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma1966</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>sma2015</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>sma2027</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>sma2412</i>	RhrA, transkriptioneller Aktivator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smb20078</i>	Putativer Nitrat/Nitrit-Antwortsregulator	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smb20148</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	nicht vorhanden	puc19	Nein
<i>smb20276</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smb20337</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smb20344</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smb20347</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smb20367</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smb20934</i>	ExsF, putativer zwei-Komponenten Response Regulator	nicht vorhanden		Nein
<i>smb20935</i>	ExsI, putativer transkriptioneller Regulator	nicht vorhanden		Nein
<i>smb21115</i>	Putativer Response Regulator	nicht vorhanden	puc19	Nein
<i>smb21140</i>	Transkriptioneller Regulator, lclR Familie	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smb21272</i>	Transkriptioneller Regulator, lacI Familie	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smb21434</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	nicht vorhanden		Nein
<i>smb21484</i>	RpoE5, putativer RNA Polymerase Sigma E Faktor	vorhanden	puc19	Nein
<i>smb21535</i>	Transkriptioneller Regulator, LysR Familie	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc00163</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smc00283</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc00878</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc01225</i>	LsrB	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc01226</i>	Transkriptioneller Regulator, ArsR Familie	nicht vorhanden	puc19	Nein
<i>smc01260</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc01419</i>	RpoE1, putativer RNA Polymerase Sigma E Faktor	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smc01506</i>	RpoE2, putativer RNA Polymerase Sigma E Faktor	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc01842</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc02141</i>	PhoU, möglicher Phosphat Transportsystem Regulator	nicht vorhanden	puc19	Nein
<i>smc02235</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	nicht vorhanden	puc19	Nein
<i>smc02366</i>	RagA, putativer zwei-Komponenten Response Regulator	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc02560</i>	ChvI, transkriptioneller Regulator	nicht vorhanden		Nein
<i>smc02584</i>	ActR, transkriptioneller Regulator	vorhanden	pk18mob	<b>Ja</b>
<i>smc02876</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smc02888</i>	Putativer transkriptioneller Regulator	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smc02976</i>	Transkriptioneller Regulator, MarR Familie	vorhanden	puc19	Nein

## G. Anhang

---

<b>Genname</b>	<b>Genprodukt</b>	<b><i>S.meliloti</i> 1021-Mutante</b>	<b>Integrations-konstrukt</b>	<b>Phänotyp</b>
<i>smc03015</i>	VisN, transkriptioneller Aktivator	vorhanden	pk18mob	<b>Ja</b>
<i>smc03016</i>	VisR, transkriptioneller Aktivator	nicht vorhanden	puc19	Nein
<i>smc03046</i>	Rem, transkriptioneller Regulator	vorhanden	pk18mob	<b>Ja</b>
<i>smc03050</i>	FlaF, Flagellinsynthese Regulator	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smc03051</i>	FlbT, Flagellinsynthese Repressor	vorhanden	puc19	Nein
<i>smc03169</i>	Transkriptioneller Regulator, TetR Familie	nicht vorhanden		Nein
<i>smc03806</i>	GlnK, regulatorisches PII Stickstoffmetabolismus-Protein	vorhanden	pk18mob	Nein
<i>smc04348</i>	Transkriptioneller Regulator, TetR Familie	vorhanden	pk18mob	<b>Ja</b>

### 3. Plasmidkarten



#### **4. Rohdaten der *Microarray*-Experimente**

Rohdaten der *Microarray* Experimente befinden sich auf der beiliegenden CD.

## 5. Erklärung

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

Bielefeld, im Juli 2009

Christoph Hellweg

## 6. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld in der Zeit vom Juni 2003 bis Juli 2009 angefertigt. Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen bedanken, die mir mit ihrer Zeit, Rat und Tat zu Seite gestanden haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler für die Möglichkeit, am Lehrstuhl diese Dissertation durchführen zu können. Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Stefan Weidner für die Anregungen und zahlreichen kritischen Diskussionen die während seiner Betreuung der Arbeit entstanden sind. Auch den ehemaligen „F1lern“ möchte ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die netten Frühstücks-, Grill- und Kaffeestunden danken.