

Etablierung einer Transposon-basierten Methode  
zur fluoreszenten Markierung  
und mikroskopischen Aufklärung  
subzellulärer Proteinlokalisierungen  
in *S. meliloti* Rm1021

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Hanna Bednarz**

aus Rzeszow / Polen

Mai 2012

“Bastler kennen keine Probleme, sie kennen nur Herausforderungen.”

Der Doc. “Deponia”, Daedalic.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I Zusammenfassung</b> .....	9
<b>II Einleitung</b> .....	11
II-1. Mikroskopie als Werkzeug der Systembiologie.....	12
II-1.1 Das fehlende Puzzlestück der “omics”-Disziplinen.....	12
II-1.2 Fluoreszente Moleküle als Marker biologischer Zusammenhänge in lebenden Organismen.....	13
II-1.3 Technischer Fortschritt: von der Überwindung der Beugungsgrenze und hochauflösender Bildgebung.....	18
II-2. Von „Säckchen mit Enzymen“ bis zur überraschender Komplexität – das Bild von der Organisation der prokaryotischen Zelle im Wandel.....	19
II-2.1 Kategorien der prokaryotischen Proteinlokalisierung - keine Organellen, keine Kompartimentierung?.....	20
II-2.2. “Folge dem Licht!”- bisherige Studien zur Aufklärung von Proteinlokalisierung in bakteriellen Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie .....	24
II-3. <i>Sinorhizobium meliloti</i> , ein nützliches Bodenbakterium und Modellorganismus für Bakterien- Pflanzen-Symbiosen.....	27
II-4. Ziele der Arbeit.....	32
<b>III Material</b> .....	33
III-1. Verwendete Bakterienstämme und Pflanzen.....	34
III-1.1 Bakterienstämme.....	34
III-1.2 Pflanzen.....	34
III-2 Primer, Plasmidvektoren und Transposon.....	34
III-2.1 Primer.....	34
III-2.2 Plasmidvektore.....	35
III-2.3 Transposon.....	35
III-3. Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	35
III-3.1 Enzyme.....	35
III-3. 2 Antikörper.....	36
III-3.3. Chemikalien.....	36
III-3.4 Kits.....	37
III-3.5 Verbrauchsmaterial.....	37
III-4. Geräte.....	37
III-4.1 Laborgeräte.....	37
III-4.2 Mikroskope und Mikroskopiezubehör.....	38

III-5. Software.....	39
III-6. Nährmedien und Medienzusätze.....	39
III-6.1 Nährmedien für Bakterienkultivierung.....	39
III-6.1.1 Komplexe Medien zur Kultivierung von Bakterien.....	39
III-6.1.2 Definiertes Medium zur Kultivierung von Bakterien.....	40
III-6.1.3 Festmedien.....	40
III-6.2 Medium zur Pflanzenkultivierung.....	40
III-6.3 Medienzusätze.....	41
III-6.3.1 Zusätze für $\beta$ -Galaktosidase Nachweis.....	41
III-6.3.2 Antibiotika.....	41
III-7. Puffer und Lösungen.....	41
III-7.1 Lösungen zur Herstellung von Dauerkulturen.....	41
III-7.2 Puffer für die Plasmidisolierung aus Bakterienkultur nach TELT.....	41
III-7.3 Puffer für die Gesamt-DNA-Isolierung aus <i>S. meliloti</i> nach R. Simon.....	41
III-7.4 Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	42
III-7.5 Puffer für die DNA-Agarosegelelektrophorese.....	42
III-7.6 Puffer für die Ligation.....	43
III-7.7 Puffer für die Aufreinigung des hyperaktive Transposase Proteins.....	43
III-7.8. Puffer für die in vitro Transposition.....	43
III-7.9 Puffer für SDS-PAGE der Proteine.....	43
III-7.10 Puffer für den Western-Blot.....	45
III-7.11 Puffer für die "Enhanced-Chemical-Luminescence" (ECL)-Reaktion.....	45
III-7.12 Lösungen zur Herstellung gefärbter, Agarosebeschichteter Objektträger für Fluoreszenzmikroskopie von Mikroorganismen.....	46
<b>IV Methoden.....</b>	<b>47</b>
IV-1. Kultivierung von Bakterien.....	48
IV-1.1 Anzucht von Bakterien.....	48
IV-1.2 Herstellung von Dauerkulturen.....	48
IV-1.3 Bestimmung des Bakterientiters.....	48
IV-2. Isolierung und Darstellung von DNA.....	48
IV-2.1 Gesamt-DNA-Isolation aus <i>S. meliloti</i> (Methode nach R. Simon).....	48
IV-2.2 Isolierung von Plasmid-DNA nach dem Tris-EDTA-LiCl-Triton (TELT)-Protokoll .....	49
IV-2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von "QIAprep Spin Miniprep Kit".....	50
IV-2.4 Konzentrationsbestimmung der DNA .....	51
IV-2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	51
IV-2.6 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten.....	51



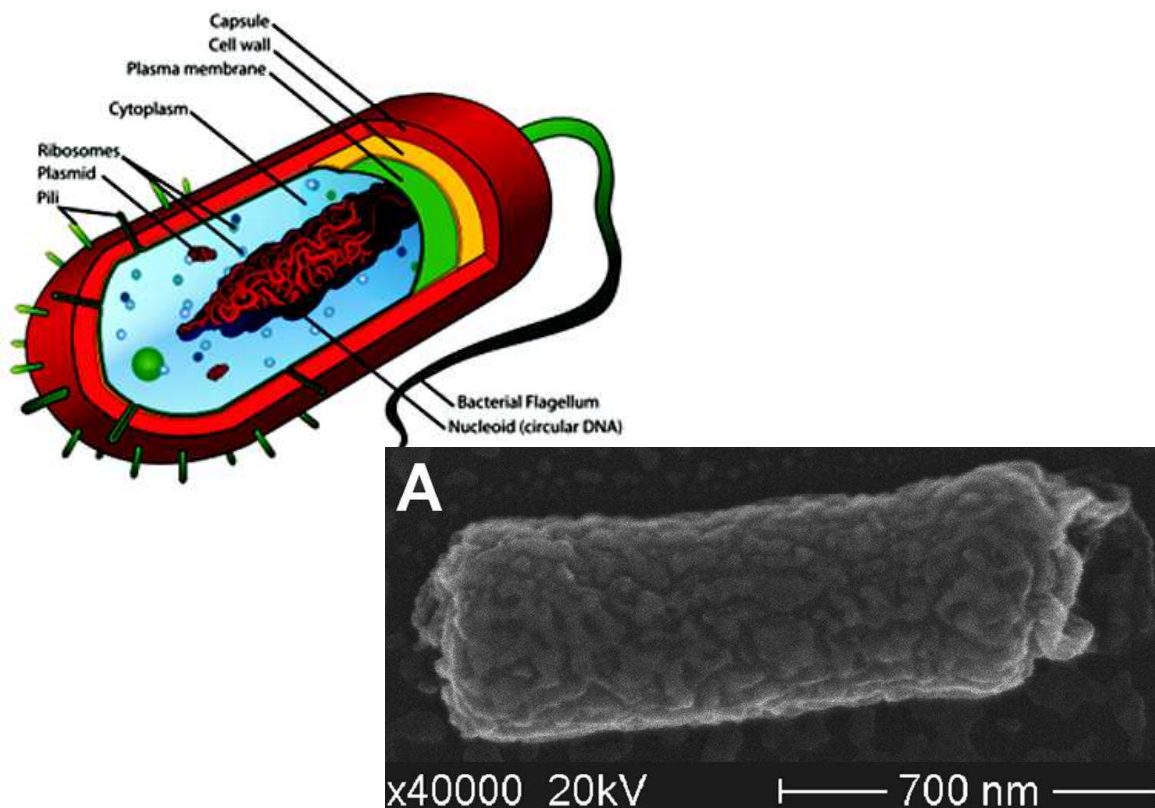
IV-2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels "MN Nucleospin Extract II".....	52
IV-3. Restriktion und Modifikation von DNA.....	52
IV-3.1 DNA- Restriktion mit TypII Restriktionsendonukleasen.....	52
IV-3.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden.....	53
IV-3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	53
IV-3.4. Aufreinigung von PCR Produkten mittels "QIAquick-PCR-Purification Kit".....	54
IV-3.5 Ligation.....	55
IV-3.6 Transposition <i>in vitro</i> .....	55
IV-3.6.1 Überexpression und Aufreinigung der hyperaktiven Transposase.....	56
IV-3.6.2 Durchführung einer <i>in vitro</i> Transposition-Reaktion.....	56
IV-3.7 Amplifikation von DNA mittels Phi29-Polymerase und "Rolling Cycle Amplification" .....	57
IV-4. DNA-Transfertechniken.....	58
IV-4.1 DNA-Transfer mittels chemischer Transformation in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	58
IV-4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	58
IV-4.1.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	58
IV-4.2 DNA Transfer mittels Elektroporation.....	59
IV-4.2.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> - Zellen.....	59
IV-4.2.2 Elektroporation kompetenter Zellen.....	59
IV-4.3 DNA-Transfer mittels Konjugation (nach Simon et. al., 1983).....	59
IV-4.4 Sequenzierung.....	60
IV-5. Identifizierung rekombinanter DNA.....	60
IV-5.1 Identifizierung rekombinanter Vektoren durch $\alpha$ -Komplementation.....	60
IV-5.2 Positivselektionierung von rekombinanten Bakterien.....	61
IV-5.3 Negativselektionierung von rekombinanten Bakterien.....	61
IV-6. Fluoreszenzmikroskopie.....	61
IV-6.1. Erzeugung Agar-beschichteter, gefärbter Objektträger oder Deckgläschen für Fluoreszenz- mikroskopie von Mikroorganismen.....	61
IV-7. Immunonachweis der Fusionsproteine in Kulturextrakten mittels Western-Blot mit einem anti-GFP Antikörper.....	62
IV-7.1 SDS-PAGE.....	62
IV-7.2 Elektrobplot.....	63
IV-7.3 Immunonachweis.....	64
IV-7.4 Nachweisreaktion und Größenbestimmung der Proteine am Fusion FX7-Analysegerät.....	64
IV-8. Pflanzen.....	65
IV-8.1 Oberflächensterilisation von <i>Medicago sativa</i> Samen.....	65
IV-8.2 Anzucht von <i>Medicago sativa</i> auf Festmedium und Inokulation der Pflanzen.....	65

<b>V Ergebnisse</b> .....	66
V-1. Erstellung fluoreszent markierter <i>Sinorhizobium meliloti</i> Stämme mittels <i>in vitro</i> Transposition konnte nicht effizient umgesetzt werden.....	67
V-1.1. <i>In vitro</i> Transposition isolierter Gesamt-DNA und weitere gentechnische Manipulationen zur Herstellung fluoreszenter Fusionsproteine in <i>S. meliloti</i> .....	68
V-1.2. Niedrige Effizienz der Methode führt zu einem Wechsel der Strategie.....	71
V-2. Etablierung einer Methode zur zufälligen fluoreszenten Markierung von <i>S. meliloti</i> Proteinen mittels <i>in vivo</i> Transposition.....	72
V-2.1. Erstellung geeigneter Vektorkonstrukte zur <i>in vivo</i> Transposition genomkodierter Proteine mit eGFP beinhaltenden Transposons in <i>S. meliloti</i> .....	72
V-2.2. Erstellung zufällig fluoreszent-markierter Proteine unter dem Einfluss ihrer nativen Promotoren in <i>S. meliloti</i> mittels Transposition.....	76
V-2.3 Selektion fluoreszenter Kolonien nach erfolgreicher Transposition.....	77
V-2.4 Entfernung des Selektionsmarkers mittels Cre-vermittelter Rekombination und dadurch Erstellung vollständiger Fusionsproteine.....	78
V-2.5 Identifizierung der Insertionsstellen des eGFP-Transposons im <i>S. meliloti</i> Genom mittels kombinierter "Rolling Cycle Amplification "(RCA) und inversen PCR (iPCR) Methode.....	81
V-2.6 Sequenzspezifische Analyse der mittels <i>in vivo</i> Transposition erstellten <i>S. meliloti</i> Fusionsproteine.....	83
V-2.7 Untersuchung ausgewählter eGFP-Fusionsproteine mittels Western Blot mit einem Anti-GFP Antikörper.....	85
V-3. Mikroskopische Charakterisierung erstellter eGFP-Fusionsproteine in <i>S. meliloti</i> in Flüssigkultur und während der Symbiose mit der Leguminose <i>Medicago sativa</i> .....	86
V-3.1 Etablierung einer Methode zur Fluoreszenzmikroskopie von Mikroorganismen aus Flüssigproben für aufrechte und inverse Mikroskopie.....	87
V-3.2 Subzelluläre Lokalisierung der eGFP-Fusionsproteine in <i>S. meliloti</i> .....	88
V-3.2.1 Bildrekonstruktion mittels Dekonvolution und weitere Bildanalyse.....	89
V-3.2.2 Der <i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm1021 Wildtypstamm zeigt keine messbare Fluoreszenz.....	89
V-3.2.3 eGFP-Fusionsproteine zeigen in <i>S. meliloti</i> eine Vielfalt an distinkten subzellulären Lokalisierungsmustern.....	91
V-3.2.4 Ungleichmäßige Verteilung der zytosolischen Fusionsproteine.....	93
V-3.2.5 Membranproteine weisen in einigen Fällen nur in ihrer vollständigen Länge und nicht als C-terminal trunke Proteine korrekte Lokalisierungen auf.....	101
V-3.2.6 Diverse Lokalisierungsmuster polarer und variabler zytosolischen Fokuse in bakteriellen Zellen.....	111
V-3.2.7 Helikale Lokalisierung der Endoribonuklease E aus <i>S. meliloti</i> .....	115
V-3.2.8 Heterologe Lokalisierungsmuster der RNA Polymerase RpoB und Smc04094.....	116

V-3.2.9. Das mögliche Transkriptionsregulatorprotein SMA5007 zeigt eine messbare Expression in der stationären Phase während des Wachstums auf komplexen Festmedien, nicht in exponentiell wachsenden Flüssigkultur im Minimalmedium.....	119
V-4 Untersuchung der Expression und Lokalisierung der Fusionsproteine <i>in planta</i> während der Symbiose mit <i>M. sativa</i> .....	121
V-4.1 Erste Analyse der wachsenden symbiotischen Wurzelknöllchen an <i>M. sativa</i> mittels Binokular-Fluoreszenz.....	122
V-4.2 Untersuchung der Proteinaktivität im symbiotischen Wurzelknöllchen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	123
V-4.3 Mikroskopische Untersuchung der Lokalisierung der Fusionsproteine in isolierten <i>S. meliloti</i> Bakteroiden aus dem Stickstoff-fixierenden Wurzelknöllchen von <i>M. Sativa</i> .....	140
<b>VI Diskussion</b> .....	153
VI-1. Transposition stellt eine optimale Methode zur internen fluoreszenten Markierung von Proteinen zwecks Mikroskopie ihrer subzellulären Lokalisierung dar.....	154
VI-2. Die Etablierung der Transpositionsmethode zur Proteinmarkierung als <i>in vitro</i> Reaktion stellt sich als nicht ausreichend effizient raus und wird verworfen.....	156
VI-3. Die auf <i>in vivo</i> Transposition basierende Methode kann erfolgreich realisiert werden und führt zur Erstellung und Identifizierung von eGFP-Fusionsproteinen diverser Funktionen in <i>Sinorhizobium meliloti</i> . .....	157
VI-3.1 Die erstellten Vektorkonstrukte sind für die <i>in vivo</i> Herstellung von eGFP-Fusionsproteinen in <i>S. meliloti</i> gut geeignet.....	157
VI-3.2 Die Methode zur Herstellung von eGFP-Fusionsproteinen mittels Transposition wird mittels eines zusätzlichen Cre Rekombinase Reaktionsschrittes für <i>in vivo</i> Anwendungen angepasst.....	159
VI-3.3 Die Phi29 vermittelte Amplifikation des genetischen Materials stellt ausreichende Mengen DNA zur Identifizierung unbekannter Insertionsstellen des Transposons im <i>S. meliloti</i> Genom für die DNA-Sequenzierung zur Verfügung.....	160
VI-3.4 Die erzeugten Fusionskonstrukte decken ein weites Spektrum an verschiedenen Kodierungsorten im Genom von <i>S. meliloti</i> , sowie diverse Proteinfunktionen ab.....	161
VI-4. Subzelluläre Lokalisierungen von eGFP-Fusionsproteinen können mikroskopisch in lebenden <i>S. meliloti</i> Zellen dokumentiert und den verschiedenen Kategorien der Proteinlokalisierung in Prokaryoten zugeordnet werden.....	163
VI-5. Die Aktivitäten der Fusionsproteine können während der Symbiose mit <i>Medicago sativa</i> <i>in planta</i> dokumentiert werden.....	165
VI-6. <i>S. meliloti</i> Fusionsproteine weisen auch in ausdifferenzierten Bakteroiden in symbiotischen Wurzelknöllchen distinkte subzelluläre Lokalisierungen auf.....	167
VI-7. Die erstellten eGFP-Fusionsproteine verschiedener Funktionen liefern einen Einblick in das	

vielfältige Spektrum der bakteriellen Proteinlokalisierungen unter Kultivierungs-bedingungen und in ausdifferenzierten Bakteroiden <i>in</i> und <i>ex planta</i> .....	168
VI-7.1. Zytosolisch homogen verteilten Fusionsproteine unterscheiden sich in den Lokalisationscharakteristika voneinander, sowie auch vom subzellulären Lokalisierungs-muster des ungebundenen GFP.....	168
VI-7.2. Die Insertionen des Transposons in Gensequenzen, die für ribosomale Proteine, RNA Polymerase und RNase E kodieren, erlaubt Beobachtungen von transkriptionellen und translationellen Vorgängen in <i>S. meliloti</i> Zellen.....	172
VI-7.3. Die interne Fusion mit dem eGFP Transposon erlaubt die Erstellung und Lokalisierung von funktionalen, fluoreszenten Membranproteinen in <i>S. meliloti</i> Rm1021.....	178
VI-7.4. Die Lokalisierung des Membranproteins Quinoloxidase erscheint abhängig von ihrer Assoziierung mit Phospholipidbausteinen, insbesondere dem Cardiolipin der Zellmembran.....	178
VI-7.5. Die subzelluläre Verteilung der ATP Synthase in der Zytoplasmamembran ist homogen und scheinbar nicht abhängig von Cardiolipinlokalisierung in <i>S. meliloti</i> .....	184
VI-7.6. Der Mangan ABC Transporter SitABCD lokalisiert in der Zellmembran von <i>S. meliloti</i> und ist auch während der Symbiose in Stickstoff-fixierenden Bakteroiden in <i>M. sativa</i> Wurzelknöllchen aktiv. ....	185
VI-7.7. Das hypothetische Transmembranprotein TerC stellt laut Homologievergleichen einen Tellurtransporter dar und ist aktiv in den im Minimalmedium kultivierten Zellen, sowie während der Symbiose mit <i>M. sativa</i> .....	186
VI-7.8. Die Fusionskonstrukte IolA-eGFP und HutU-eGFP, die in variablen und polaren Foki lokalisieren, repräsentieren Enzyme der katabolen Stoffwechselfvorgänge.....	188
VI-7.9. Mikroskopische Lokalisierungen von zwei unbekannt Proteinen können nicht näher bezüglich ihrer Funktionen charakterisiert werden.....	190
VI-8. Fazit und Ausblick.....	191
<b>VII Literatur</b> .....	196
<b>VIII. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	205
<b>IX Danksagung</b> .....	206
<b>X Erklärung</b> .....	207

# I Zusammenfassung



Ein einfach organisierter Organismus oder doch ein „Brain-Bak“?

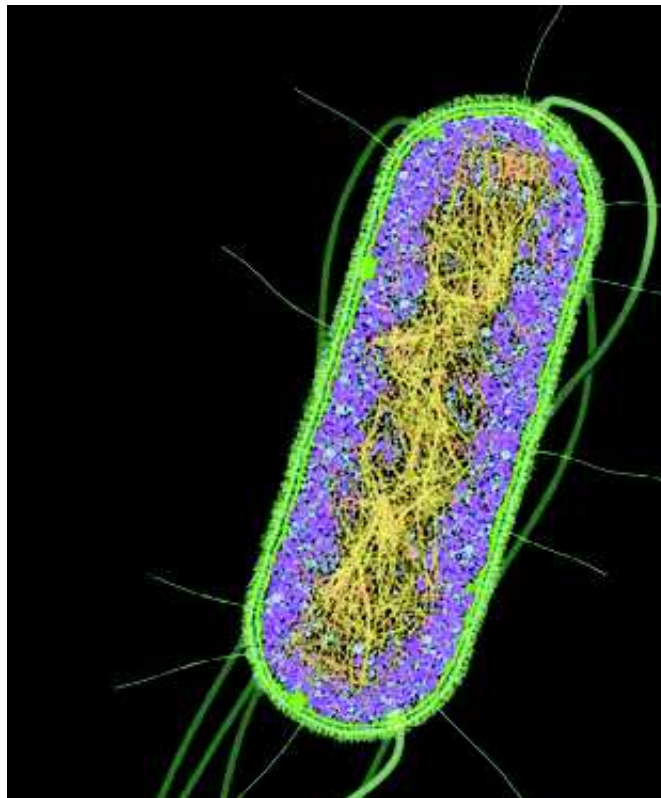
Bildquellen: schematische Zeichnung einer Bakterienzelle ([www.nexiumresearch.com](http://www.nexiumresearch.com)) und eine SEM-Aufnahme einer *S. meliloti* Zelle (Greif et al. 2010)

## I Zusammenfassung

Der technische und methodische Fortschritt auf dem Gebiet der Mikroskopie eröffnete die Möglichkeiten der Abbildung sehr kleinen Strukturen, u.a. auch subzellulärer Strukturen in lebendigen einzelligen Organismen. Die Beobachtung und Charakterisierung der subzellulären Lokalisierung von Proteinen kann Hinweise auf die Funktion der Proteine, sowie deren Interaktionspartner liefern. Die gesammelten Informationen zur räumlichen und zeitlichen Auflösung der Proteinlokalisierung in lebenden Organismen bieten die fehlende Komponente in der ganzheitlichen systembiologischen Aufklärung der Interaktionsnetzwerke eines Organismus.

Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Methode zur genomweiten Transposon-basierten Markierung von bakteriellen Proteinen mit Hilfe des eGFP (enhanced green fluorescent protein) entwickelt und etabliert worden. Für diesen Zweck wurde ein Transposon entwickelt, das ein *egfp* Gen ohne Start- und Stoppkodon, mit der Neomycin/Kanamycin-Resistenz als Selektionsmarker beinhaltet. Der in *Sinorhizobium meliloti* nicht replizierende Vektor pHB14 trägt das Transposon, ebenso wie das Gen für die hyperaktive Form der Transposase unter der Kontrolle des *trc*-Promoters. Nach dem *in vivo* Transpositionsschritt entstehen im ersten Schritt, aufgrund des Stopp-Kodons im Selektionsmarkergen carboxyterminal-trunkierte Proteine. Im folgenden Schritt kann der Selektionsmarker dank der integrierten loxP Erkennungsstellen mittels Cre Rekombinase gezielt entfernt werden. Dafür werden die Transposon tragenden Stämme mit dem Vektor pHB15 transformiert, der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines durch Arabinose induzierbaren Promoters exprimiert. In Folge dessen entstehen intern in der Aminosäuresequenz mit eGFP markierte Proteine, die unter der Kontrolle der jeweiligen endogenen Regulationsmechanismen exprimiert werden. Mithilfe dieses Systems wurden mit der Transpositionseffizienz von 0,8% fluoreszent markierte *S. meliloti* Proteinfusionen erzeugt und sechzehn dieser zufällig markierten Proteine sind als „proof-of-principle“ identifiziert und mittels Fluoreszenzmikroskopie in lebenden kultivierten Zellen von *S. meliloti*, sowie während der Symbiose mit *Medicago sativa* dokumentiert worden. Die Ergebnisse zeugen von einer vielseitigen Proteinlokalisierungs-maschinerie in prokaryotischen Organismen und beweisen die simultane Nutzbarkeit der Methode für Expressions-, sowie Proteinlokalisierungsstudien. Zum ersten Mal wurde so die Lokalisierung von definierten Proteinen in ausdifferenzierten Bakteroiden, die aus den Wurzelknöllchen reisoliert wurden dokumentiert, sowie mit den Lokalisierungsmustern der jeweiligen Proteine unter Kultivierungsbedingungen verglichen. Damit konnte gezeigt werden, dass auch in den hoch spezialisierten Bakteroiden eine strikte Verteilung der essentiellen Proteine vorliegt, die in einigen Fällen von der Lokalisierung in kultivierten Bakterien abweicht, was in den veränderten Bedingungen der Umgebung, sowie der spezialisierten Funktionen der Bakterioide begründet ist.

## II Einleitung



David S. Goodsell – *E. coli*

## **II Einleitung**

### **II-1. Mikroskopie als Werkzeug der Systembiologie**

Trotz mehrhundertjähriger Geschichte und dem etablierten Einsatz als ein Werkzeug wissenschaftlicher Wahrheitsfindung erlebt die Disziplin der Mikroskopie heutzutage eine wiederholte Renaissance. Seit den ersten Beobachtungen und Dokumentationen von Bakterien und Protozoen durchgeführt von Antoni van Leeuwenhoek mithilfe seiner selbst erbauten Mikroskope mit 270-fachen Vergrößerung im Jahre 1675 sind der technische Fortschritt, gepaart mit neuartigen Methoden und Erkenntnissen auf den Feldern der Physik, Optik und Biochemie für ein stärker wachsendes Interesse der Naturwissenschaften an Daten aus mikroskopischen Bildgebung verantwortlich. Der Antrieb für diese Entwicklung ist die Forschung auf dem Gebiet der Systembiologie.

#### **II-1.1 Das fehlende Puzzlestück der “omics”-Disziplinen**

Das Ziel der Systembiologie ist die Aufklärung der Struktur von biologischen Netzwerken, was das Wissen über die dazugehörigen Komponenten und Interaktionen beinhaltet, sowie darauf aufbauend die Erkenntnis, wie das Netzwerk funktioniert und auf Änderungen reagiert. Basierend auf den vielseitigen technischen Möglichkeiten Experimente durchzuführen, die umfangreiche Mengen an Daten produzieren und den Möglichkeiten, diese Daten in Datenbanken zu speichern und mit der Wissenschaft weltweit zu teilen, hat in den letzten Jahren zu einem rasanten Anstieg der gesammelten Information geführt. Ausgehend von der Sequenzierung der Genome ganzer Organismen, wurde mithilfe der etablierten Techniken der Postgenomforschung, wie Transkriptomics, Proteomics und Metabolomics, sowie der bioinformatische Ausarbeitung der experimentell gesammelten Daten, das Ziel verfolgt, ein dynamisches ganzheitliches Verständnis des Organismus zu erlangen und in Folge dessen, auch eine Reaktion auf eine Änderung der Umstände voraussagen oder sogar beeinflussen zu können („synthetische Biologie“). Die gesammelten Datensätze der sog. „omics“-Disziplinen liefern allerdings keinerlei strukturelle oder zeitliche Auflösung der Vorgänge (Megason & Fraser 2000). Diese und andere biochemische Methoden setzen das Aufbrechen der Zelle und eine Homogenisierung des Zellmaterials voraus, um die zu untersuchenden Substanzen (mRNA, Proteine, Metabolite) zu isolieren, identifizieren und zu quantifizieren. Damit können Durchschnittsdaten für diese Komponenten in einer Zellkultur, einem Gewebe oder bezüglich des gesamten komplexen Organismus zu einem bestimmten gewählten Zeitpunkt gewonnen werden. Dabei gehen die Informationen zu Variation des Verhaltens einzelner Zellen in Zellkultur über Zeit oder der anatomische Kontext der Informationen von Veränderungen



in bestimmten Zellarealen im Gewebe eines Organismus verloren. Der Versuch mit konventionellen Methoden genügend Daten für ein orts- und zeitaufgelöstes Modell der Embryonalentwicklung eines Zebrafisches zu gewinnen, müssten für jedes der 25,000 Gene zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung und aus jedem intrazellulären Koordinatenpunkt des wachsenden Organismus Proben entnommen und analysiert werden (Megason & Fraser 2000). Dies ist mit den klassischen „omics-Techniken“ nicht möglich. Die Mikroskopie kann diese vierdimensionalen Daten (3D-Ortsauflösung und Zeitabfolge) mit einer hohen Auflösung und einem hohen Durchlauf generieren und damit die fehlenden dynamischen Informationen zu zeitlich bedingten Veränderungen, Daten zum Verhalten einzelner Zellen bis zu den Aktivitäten einzelner Moleküle und Molekül-Interaktionen gewinnen.

## **II-1.2 Fluoreszente Moleküle als Marker biologischer Zusammenhänge in lebenden Organismen**

Seit den ersten Mikroskopen von Leewenhoek zielten die Bemühungen der Apparatenbauer auf die Verbesserung des Kontrastes zwischen dem, was gesehen werden soll (Signal) und was nicht (Hintergrund). Erreicht werden konnte dieses lange Zeit nur über gezielte und oft sehr aufwendige spezifische Färbungen, wofür die Proben oft zuerst fixiert werden mussten, was die Analyse von lebenden Organismen verhindert hat. Andererseits wurden so häufig langlebige Präparate hergestellt, die immer wieder für diverse Forschungs- oder Bildungszwecken verwendet werden konnten. Der Einsatz der Fluoreszenz revolutionierte die Disziplin der Mikroskopie, da diese die Objekte von Interesse anzeigt, gleichzeitig aber den Hintergrund in den meisten Fällen schwarz und signallos belässt (Lichtman & Conchello 2005). Das Interesse der wissenschaftlichen Welt an den Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenz für die Aufklärung ihrer Fragestellungen wächst unaufhaltsam. Für das Jahr 2004 meldete Lichtman (Lichtman & Conchello, 2005) laut PubMed 127,804 wissenschaftliche Veröffentlichungen, die das Wort „Fluoreszenz“ im Titel oder der Zusammenfassung benutzten, das war damals eine höhere Zahl als alle Fluoreszenz-basierten Arbeiten in den fünf Jahren zuvor. Heute beträgt die Zahl dieser Veröffentlichungen insgesamt 276,574, alleine 19,191 erscheinen im Jahr 2011.

Ursprünglich wurde die natürliche Fluoreszenz von Zellbestandteilen beobachtet, die von Natur aus fluoreszieren, wie z.B.: von Pflanzengewebe. Heutzutage ist diese sog. Autofluoreszenz ein eher unerwünschtes Phänomen, weil sie zu starken unspezifischen Hintergrundsignalen führt. Die gezielte Anwendung von Fluoreszenz in der Mikroskopie begann mit der Anwendung kleiner organischer Fluorophore, die an Antikörper gekoppelt waren (Giepmans et al. 2006). Der sog. immunologische Nachweis hat jedoch den Nachteil, dass die zu beobachtenden Zellen fixiert und

permeabilisiert werden müssen, wodurch keine Möglichkeit zur Beobachtung der Vorgänge in lebenden Zellen gegeben ist. Darüber hinaus ist die Herstellung von spezifischen Antikörpern zeit- und kostenaufwendig. Später fanden fluorophore Moleküle Anwendung, die spezifisch bestimmte Bereiche der Zellen markieren, Organellen, Nukleinsäuren oder Membranen. Das Spektrum an diesen Molekülen ist heutzutage besonders umfangreich. Die elfte Ausgabe des Handbuchs „Molecular Probes“ (<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>) umfasst 23 Kapitel, die über 3000 verschiedene Moleküle, Reagenzien und Techniken zu Markierung von Biomolekülen für diverse Fragestellungen vorstellen.

Die wahre Revolution allerdings brachte erst die Erarbeitung genetisch kodierter fluoreszenter Tags oder Proteine. Mit dem Einsatz von fluoreszierenden Proteinen wurden Analysen an lebenden Zellen oder Organismen möglich, denn die Gensequenzen dieser Proteine lassen sich auf genetischer Ebene an ein Protein der Wahl fusionieren (Kumar et al. 2002). In die Zellen eingebracht, wird das Fusionsprotein dann in jeder neuen durch Zellteilung entstandenen Zelle von Neu auf produziert. Die ersten fluoreszierenden Proteine mit Einsatz in der Zellbiologie waren Phykobiliproteine aus Cyanobakterien. Ihre Größe von über 200 kD limitierte allerdings die Diffusion der Moleküle und bedurfte die getrennte Expression des Apoproteins und spätere Zugabe des Bilin-Chromophors (Glaser 1989). Um einiges anspruchloser und vielseitiger, aus diesen Gründen für die Fluoreszenzmikroskopie revolutionärer war die Entdeckung des „grün fluoreszierenden Proteins“, für die im Jahr 2008 der Nobelpreis an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien verliehen wurde. Die Entdeckung des GFP in der Qualle *Aequorea victoria* (ABB. II-1A) wurde zwar bereits im Jahr 1962 gemeldet (Shimomura et al. 1962), das Interesse der Wissenschaft wurde allerdings erst mit der dokumentierten Anwendung des Proteins als Marker der Genexpression in Pro- und Eukaryonten im Jahre 1992 geweckt (Chalfie et al. 1994). GFP ist ein 26,9 kDa (238 Aminosäuren) großes Protein, das bei Anregung mit blauen oder ultravioletten Licht (395/475 nm) im grünen Wellenlängenbereich (bei 509 nm) fluoresziert. Der Fluorophor des GFP (p-Hydroxybenzylideneimidazolinon) besteht aus einer Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 und wird autokatalytisch gebildet, d.h. die Funktionalität des GFP erfordert keine Zugabe von Co-Faktoren oder Substraten (ABB. II-1B). Weiteren Vorteile des GFP sind seine hohe Stabilität gegenüber schwankenden Salzkonzentrationen und pH-Werten, wahrscheinlich bedingt durch die faßartige Struktur, die das aktive Chromophor vor äußeren Einflüssen schützt, so dass das Protein in verschiedenen Kompartimenten der Zelle nachgewiesen werden kann (Cubitt et al. 1995). Mittlerweile gibt es diverse modifizierte Versionen des fluoreszierenden Proteins, die verschiedene Fluoreszenzspektren, verbesserte Quantenausbeuten und Fotostabilitäten aufweisen (ABB. II-1C) und den Nachweis von mehreren markierten Proteinen in einer Zelle ermöglichen (Shaner et al.

2005). Das „enhanced green fluorescent protein“ eGFP zeichnet sich durch zum langwelligen Bereich (488 nm) verschobene Anregungswellenlänge, die durch eine Punktmutation am Serin zu Threonin an der Position 65 (S65T) verursacht wird (Heim et al. 1995). Die energieärmere Anregung schont die lebenden Zellen vor Fototoxizität und Ausbleichen. Darüber hinaus bewirkt die Mutation eine doppelt so hohe Helligkeit des Proteins im Vergleich zu GFP, einen deutlich höheren molaren Extinktionskoeffizienten und bessere Quantenausbeute, sowie eine kürzere Zeit, die zur Bildung des Chromophors benötigt wird (0,45 min eGFP vs. 2h GFP). Das an weiteren Aminosäuren modifizierte Protein faltet auch effizienter bei höheren Temperaturen, was den Einsatz als Marker in Bakterien und Säugerzellen bei 37°C deutlich verbessert und zeichnet sich durch eine höhere Löslichkeit aus, was die Bildung von Inklusionskörpern durch das Protein verhindert.

Das GFP und dessen Varianten wurde umfangreich für den Einsatz in Bakterien, u.a. auch für die Erstellung fluoreszenter Proteinfusionen untersucht (Margolin 2000). Die fluoreszenten Proteine können N- oder C- terminal an ein Protein vom Interesse fusioniert werden, die Okklusion des N-Terminus kann allerdings die Regulation der Expression des Gens beeinflussen.

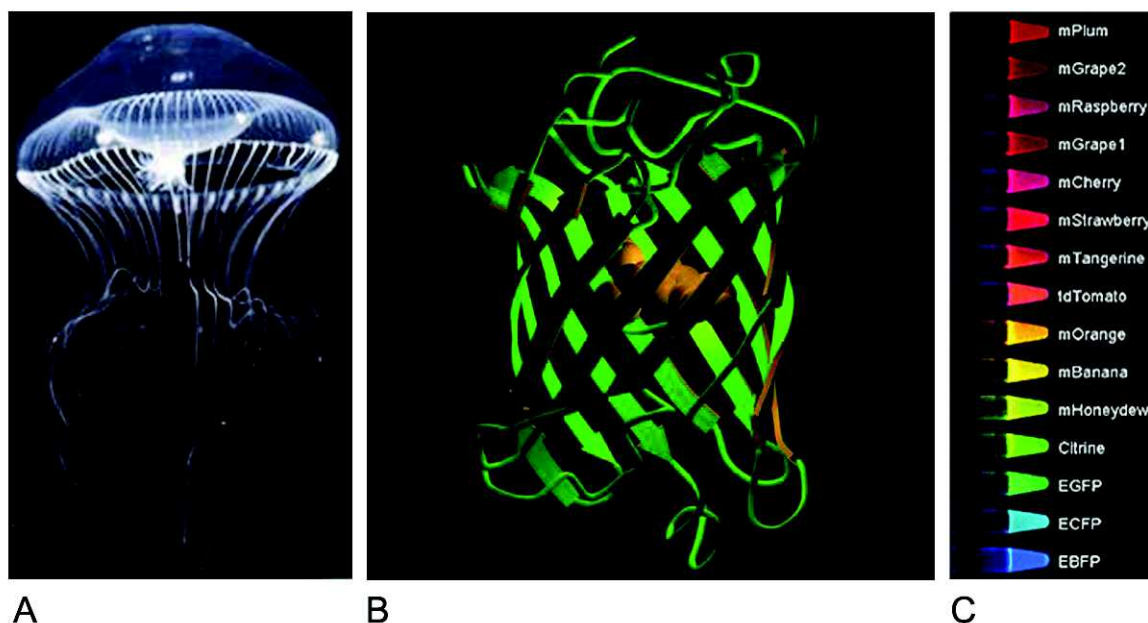


ABB. II-1. Das GFP und weitere entwickelte Varianten von fluoreszierenden Proteinen. A) Die Qualle *Aequorea victoria*, in der neben Aequorin auch das Wildtyp-GFP gefunden wurde. B) Die Struktur des GFP. Die Zylinderstruktur besteht aus elf beta-Faltblättern und einer alpha-Helix, die das Chromophor enthält. C) Andere Varianten von fluoreszierenden Proteinen mit verschiedenen Fluoreszenzspektren und -eigenschaften. Quelle: <http://www.tsienlab.ucsd.edu>.

Die oft bevorzugte C-terminale Fusion stört eventuell Interaktionen mit anderen Proteinen oder Zellbestandteilen, wie z.B. im Fall von zwar korrekt lokalisierenden, aber nicht vollkommen funktionsfähigen Zellteilungsproteinen, wie dem FtsZ-eGFP Fusionsprotein (Ma et al. 1996; Osawa & Erickson 2005). Die interessanten Membranproteine sollten in ihren zytoplasmatisch lokalisierten Schleifendomänen mit dem fluoreszenten Marker ausgestattet werden, da das GFP nur im Zytoplasma zu falten fähig ist und im reduzierender Umgebung des Periplasmas die Tertiärstruktur nicht ausbilden kann. Abgesehen von terminalen Fusionkonstrukten, kann der Marker auch intern in die Aminosäuresequenz eingefügt werden, was mit Hilfe von Transposons geschehen kann (Osawa & Erickson 2005), oder durch arbeitsintensive Suche nach einer geeigneten Insertionsstelle. Die Expression von markierten Proteinen kann von induzierbaren oder konstitutiv aktiven Promotoren statt finden, was aber zu eventuellen Phänotypänderungen und Fehllokalisierungen des im Überschuss vorhandenen Proteins führen kann, sowie im Fall von Überexpression von Membranproteinen oder Zellteilungsproteinen, die einen toxischen Effekt auf die Zellen ausüben kann (Wagner et al. 2007; Hale & de Boer 1997). Wird das interessante Protein natürlicherweise in einer ausreichend hohen Konzentration in der Zelle exprimiert, sind die endogenen Promotoren den künstlichen überlegen.

Ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Lokalisierung eines Fusionsproteins stellt ebenfalls die resultierende Diffusionsgeschwindigkeit des durch die Markierung größeren Fusionsproteins, v.a. in Fällen, wenn der Fluoreszenztag größer ist als das markierte Protein (z.B. CheY (14 kDa) fusioniert mit YFP (27 kDa) in Cluzel et al. 2000). Das bakterielle Zytoplasma stellt eine mit Molekülen dicht gepackte Umgebung dar (ABB. II-2) und eine verhinderte oder verlangsamte Bewegung des Fusionskonstrukts zum Ort der Funktion wäre unerwünscht. Mehrere Studien sind dieser Fragestellung nachgegangen und fanden heraus, dass die Fusion mit dem für Bakterien nicht endogenen GFP keinen Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten des Konstrukts hat (Slade et al. 2009; Nenninger et al. 2010).

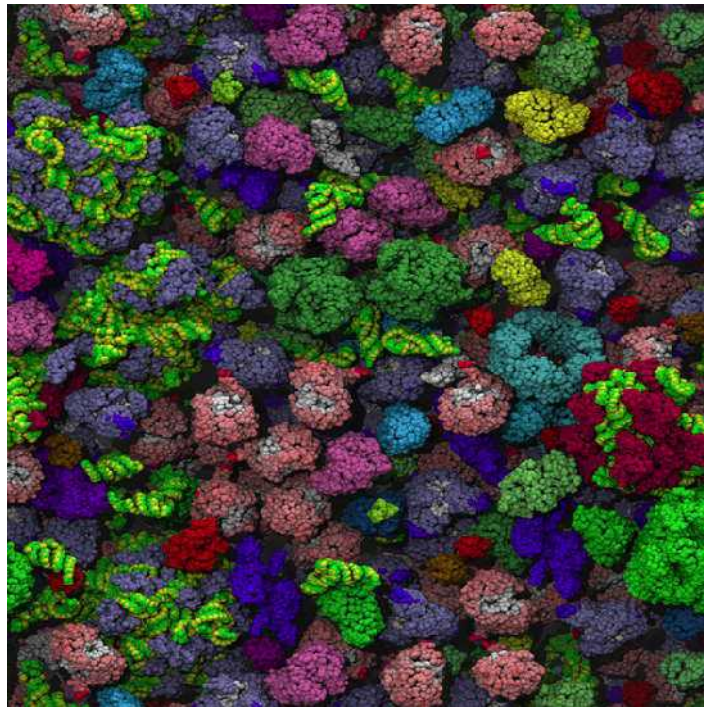


ABB.II-2. Computerunterstütztes Modell des makromolekularen „Gedränges“ („molecular crowding“) im Zytoplasma von *E. coli*. Gerendertes Modell als Resultat einer Simulation der Brownschen Dynamik mit einer definierten Anzahl zytoplasmatischer Moleküle. Die RNA wird z.B. in grün/gelb dargestellt. Die Diffusion durch die dicht gedrängte Umgebung wird bis zu einer bestimmten Größe der Moleküle eher durch sterische Hinderungen der Moleküle untereinander behindert als durch die zusätzliche Größe der fusionierten Fluoreszenzmarker. Die Assoziierung der Makromoleküle zu funktionellen, lokal versammelten Einheiten verkürzt die Reaktionswege (Quelle: McGuffee & Elcock 2010).

Die dokumentierten Diffusionsgeschwindigkeitsunterschiede lassen sich über die Stokes-Einstein-Gleichung für globuläre Teilchen erklären und sind bis zu einer Addition von zusätzlichen vier GFP Molekülen an einem Protein vernachlässigbar (Nenninger et al. 2010). Die Diffusion wird wiederum deutlich verändert, wenn das endogene Protein des Fusionskonstruktes während der Bewegung durch das Zytoplasma der Zelle auf natürliche Interaktionspartner trifft.

Das GFP ist auch für Lokalisierungsstudien in der Pflanze geeignet, allerdings existiert in diesem Kontext eine Studie, die eine Abnahme der Fluoreszenz in der sauerstoffarmen Umgebung der symbiotischen Wurzelknöllchen von *M. sativa* berichtet (Auriac & Timmers 2007). Angeblich benötigt das GFP Sauerstoff für die korrekte Ausbildung des Fluorophors (Tsien 1998). Allerdings verbesserte auch der Einsatz einer GFP-Variante, die auch unter sauerstoffarmen Bedingungen die Faltung durchführt, nichts am fehlenden Fluoreszenzsignal. Ebenso wurden die Signale anderer Fluoreszenzmarker, wie SYTO9 und Acridinorange, in den Wurzelknöllchen plötzlich unterdrückt. Für dieses Auslöschen jeglicher Fluoreszenz, auch der von eingesetzten Farbstoffen, soll laut

Autoren das Quenchen einer unbekanntenen Komponente des Zytoplasmas verantwortlich sein. Paradoxerweise wurden seitdem viele Studien vorgestellt, die erfolgreich GFP Fluoreszenz im gesamten Knöllchen und in den Bakteroiden verfolgen konnten (Gage 1996, Stuurman et al. 2000). Eine große Limitierung der mikroskopischen Aufklärung der Struktur einer wenige Mikrometer kleinen Bakterienzelle sind die Auflösungsgrenzen der klassischen Mikroskopie. Die Zahl der fusionierten GFP Moleküle, die lokalisiert mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können, schwankt abhängig von gegebenen Equipment, beträgt aber ca. 100 Moleküle, wenn sie in einem Fokus konzentriert vorliegen (Margolin 2000). Diese Limitierung wird heutzutage mit modernen Methoden durchbrochen und wird sicherlich in der nächsten Zeit für erstaunliche Einblicke in die Nanowelt sorgen.

### **II-1.3 Technischer Fortschritt: von der Überwindung der Beugungsgrenze und hochauflösender Bildgebung**

Die Grenzen der klassischen optischen Mikroskopie sind durch das Abbe'sche Beugungslimit ausgedrückt. Die Formel definiert den minimalsten Abstand zwischen zwei mikroskopierten Objekten, die bei dem gegebenen Gerätesetup noch getrennt voneinander abgebildet werden können, als eine Funktion der verwendeten Emissionswellenlänge im Verhältnis zu numerischen Apertur des Systems. Im Fall von eGFP mit einer noch vergleichbar kurzwelligen Emissionswellenlänge von 520 nm und z. B. einem Objektiv von NA 1.3 beträgt diese Entfernung 200 nm. Das Beugungslimit der optischen Mikroskopie verhindert hiermit die Abbildung aller subzellulärer Strukturen, die kleiner sind als ca. 200 nm, also z. B. Mikrotubuli, Aktinfilamente, Ribosomen, Transportvesikel und natürlich Aufnahmen einzelner markierter Proteine.

$$d = \lambda / 2NA$$

Formel II-1: Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops zusammen gefasst in einer Formel, vorgestellt u.a. durch Ernst Abbe 1873. Die Limitierung der Fluoreszenzmikroskopie beim der Verwendung von eGFP und Objektiven der NA von 1.45 beträgt hiermit ca. 180 nm als minimaler Abstand zwischen zwei abgebildeten Objekten, die noch getrennt wahrgenommen werden.

d: minimale Abstand zwischen zwei Objekten, die unter dem Mikroskop noch voneinander getrennt abgebildet werden können in nm.

$\lambda$ : Emission der eingesetzten Lichtwellenlänge, z.B. 520 nm für eGFP

NA: die numerische Apertur des eingesetzten Systems, in modernen Systemen gewöhnlich von 1.2 – 1.45

Lange Zeit schien die Grenze der optischen Auflösung als unüberwindbar. Heutzutage sind einige Systeme entwickelt worden, die diese Limitierung mit unterschiedlichen Vorgehensweisen geschickt umgehen und dadurch den Bereich der sog. Superauflösung erreichen (Patterson et al. 2010).

Eine Strategie nutzt nichtlineare optische Prozesse und modifiziert das Muster des Anregungslichts, um den Fokuspunkt zu reduzieren. Die sog. STED Mikroskopie („stimulated emission depletion“) (Hell & Wichmann 1994) erreicht die Auflösung von Strukturen bis ca. 30 nm und wurde bereits zur Dokumentation von Mitochondrienmembran, der Organisation der Zellkernhülle oder von Neuronen im zerebralen Kortex der Maus eingesetzt (Schmidt et al. 2009; Schermelleh et al. 2008; Berning et al. 2012). Die andere strategische Vorgehensweise setzt typischerweise photoaktivierbare Moleküle ein und basiert auf der stochastischen Anregung einer möglichst geringen Anzahl einzelner Moleküle, gefolgt von gezielten Ausbleichen und der sequenziellen Anregung weiterer Moleküle, die sonst nicht getrennt voneinander dokumentiert werden könnten. Aus diesen „blinkenden“ Ergebnissen für einzelne Moleküle können die fertigen Superauflösungsaufnahmen zusammengesetzt werden. Diese Methoden heißen folglich „Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie“ (PALM) oder „stochastisch optische Rekonstruktionsmikroskopie“ (STORM) und trugen bereits zur Aufklärung der Strukturen von Aktinzytoskelett, polaren Komplexen in *Caulobacter crescentus*, Chemotaxisnetzwerk in *E. coli* oder einzelner Moleküle auf der Plasmamembran bei (Xu et al. 2012; Biteen et al. 2008; Greenfield et al. 2009; Hess et al. 2007). Kürzlich gemeldet wurde auch eine vergleichbare Methode, die allerdings auf blinkenden und bleichenden Ereignissen von konventionellen Fluorophoren mit anschließender subtrahierender Bildanalyse basiert (BaLM) (Burnette et al. 2011). Alle diese Methoden werden in den nächsten Jahren sicherlich zu unserem Verständnis der Organisation der Zellen und Organismen beitragen. Sehr große Überraschungen erwarten uns unter anderem hinsichtlich der Komplexität und Struktur der prokaryotischen Organismen, die aus wissenschaftlichen Standpunkt aus lange Zeit unterschätzt wurden.

## **II-2. Von „Säckchen mit Enzymen“ bis zur überraschender Komplexität – das Bild von der Organisation der prokaryotischen Zelle im Wandel**

Während die eukaryotischen Organismen aufgrund des komplexen Aufbaus und spezialisierten Organellen als „höher entwickelt“ galten und vielseitige Mechanismen z.B. der gezielten Sortierung von Proteinen bekannt und allgemein akzeptiert wurden, galten die Prokaryoten als einfach organisierte, primitive Frühformen der Evolution. Moderne Techniken der Mikroskopie, die einen Einblick in die Dynamik der Vorgänge von bakteriellen, lebenden Zellen erlauben, sowie neue

methodische Vorgehensweisen verändern allmählich unseres Bild von prokaryotischen Zellorganisation.

Aufgrund von fehlenden Organellen oder einer sichtbaren Kompartimentierung galt seit langem eine recht einfache Vorstellung von prokaryotischen Zellen als „Säckchen gefüllt mit Enzymen“. Die Moleküle waren gedacht, sich durch reine Diffusion durch das Zytoplasma zu bewegen und zufällig auf Interaktionspartner zu treffen und die Orte ihrer Funktionsausübung zu erreichen. Mikroskopiegestützte Studien zu essentiellen Ereignissen der Zelle, v.a. der prokaryotischen Zellteilung und die Entdeckung von Elementen des bakteriellen Zytoskeletts trieben weitere Arbeiten auf diesem interessantem Feld an und ändern allmählich das Bild von unorganisierten, kompartmentfreien Bakterium.

### **II-2.1 Kategorien der prokaryotischen Proteinlokalisierung - keine Organellen, keine Kompartimentierung?**

Der erste Schritt der Aufklärung von Netzwerken von Proteinen und Organisation eines funktionellen Systems beginnt mit der Lokalisierung einzelner Proteine und Analyse der möglichen Dynamiken und involvierter Interaktionspartner. Angefangen bei der mikroskopischen Beobachtung statischer Verteilungen der Proteine zu einem bestimmten Augenblick und Erkennung von distinkten Strukturen, die Proteine annehmen können, wie z.B. polare Lokalisierung, Assoziierung mit der Membranregion oder der Zellmitte, auch in besonderen Strukturen, wie Helices, sowie zytoplasmatisch homogene, sowie heterogene Proteinverteilung (ABB. II-3). Im nächsten Schritt kann durch Analyse der möglicherweise bereits vermuteten Funktion des Proteins das dynamische System durch Kolo-kalisierung der interagierender Proteine und Zellstrukturen aufgeklärt werden. Dynamische Muster beinhalten schnelle Pol-zu-Pol Oszillationen, Ausbildung von dynamischen Ringstrukturen aus der Zellmitte, Bildung von mobilen helikalen Flecken entlang der Zelle, wandernden Foki an der Zelloberfläche oder ganze Proteincluster an spezifischen intrazellulären Positionen. Die strukturierte und organisierte Proteinlokalisierung vermittelt wichtige Funktionen der Zelle, wie Zellteilung, Motilität, morphologische Differenzierung, Interaktionen mit tierischen und pflanzlichen Wirten.



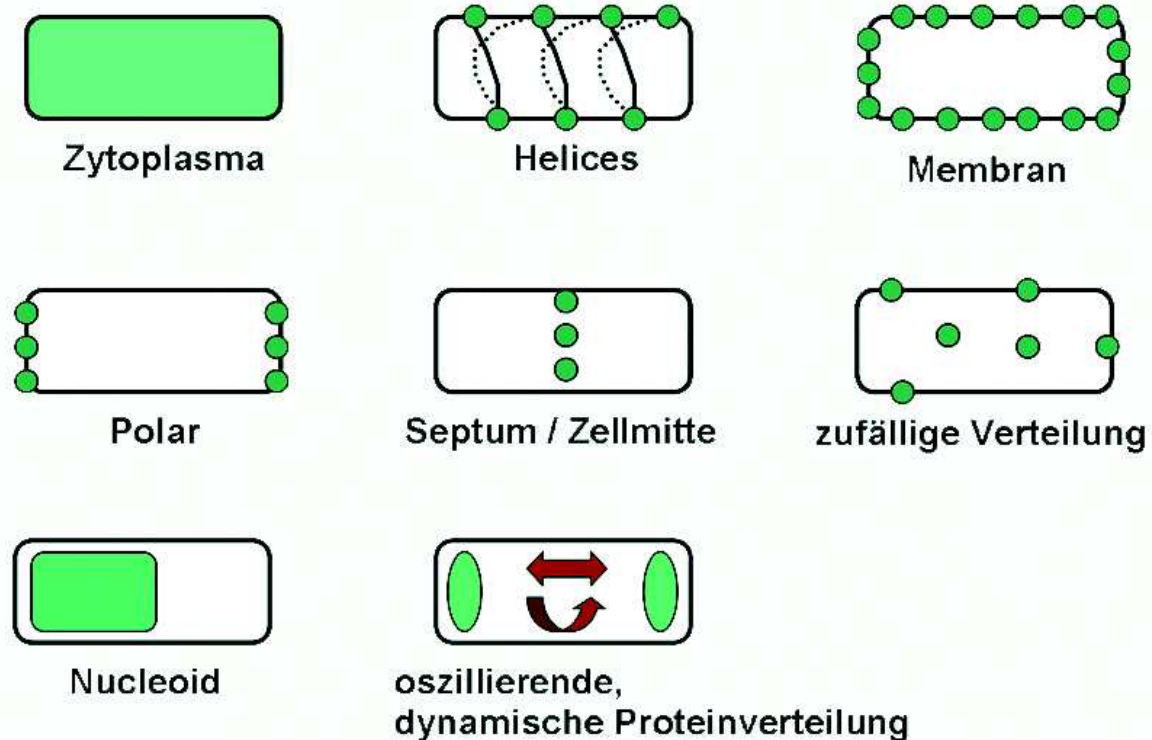


ABB. II-3. Beispiele für mögliche Muster der subzellulären Proteinverteilung, die in Prokaryoten beobachtet werden können. Die Proteine können homogen im Zytoplasma vorliegen, an einem oder beiden Polen der Zelle, mit dem Nucleoid assoziiert oder in Helices. Sie können eine Assoziierung mit der Membranproximalen Region vorweisen, Linie in der Zellmitte oder am Septum bilden oder in zufälligen „Flecken“ verteilt sein. Diese Muster können auch Dynamiken unterliegen. Die Analyse der Proteinlokalisierung kann Hinweise liefern auf die Funktion und Regulation des Proteins liefern, sowie mögliche Interaktionspartner und -netzwerke identifizieren.

Welche Mechanismen wurden in den Bakterienzellen entwickelt, um die Effizienz der Vorgänge zu sichern und eine schnelle und flexible Adaption an ihre Umwelt zu erhalten? Einige dieser Mechanismen wurden bereits entschlüsselt, einige mehr werden vermutet und warten auf weitere Bestätigung, andere sind bestimmt noch unbekannt. Viele Lokalisierungen von Proteinen und anderen Molekülen basieren auf bestimmten strukturellen Eigenschaften des Aufbaus und der Funktion der bakteriellen Zelle.

Ein interessanter Schlüssel zur Lokalisierung und Verankerung von Molekülen ist die nicht uniforme Verteilung von Phospholipiden in der Zellhülle von Prokaryoten, insbesondere die septale und polare Anreicherung von Cardiolipin. Bedingt eventuell durch die Struktur des Moleküls, mit einer kleinen Kopfgruppe im Vergleich zur hydrophoben Domäne, bevorzugt es Bereiche mit einer starken Krümmung und scheint für die Verankerung vieler Moleküle und Komplexe verantwortlich zu sein, die für den Energiemetabolismus, Zellteilung und Membrantransport verantwortlich sind.

Ein anderes essentielles Bestandteil der bakteriellen Zellhülle, das Peptidoglykan wird in einer helikalen Struktur um die Gram positive Zelle von *B. subtilis* lokalisiert, sowie an Septen der sich teilenden Zellen und eine gewisse Zeit im Bereich der neu entstandenen Zellpolen (Tiyanont et al. 2006). Die Synthese des mit jeder Zellteilung erweiterten Komponente der Zellwand ist eng mit dem bakteriellen Zytoskelett verbunden. Die Entdeckung der bakteriellen Proteinen, die Homologien zu eukaryotischen Zytoskelettelementen, wie dem Tubulin (FtsZ; Bi & Lutkenhaus, 1991), Aktin (MreB; Jones et al. 2001) und den Intermediärfilamenten ( Crescentin, Ausmees et al. 2003) aufweisen, initialisierte eine Reihe von Studien auf diesem Gebiet. Heute werden immer mehr Details zum Aufbau, Synthese und assoziierten Molekülen bekannt, sowie neue Zytoskelettproteine gefunden, auch welche ohne bekannte Homologen in Eukaryoten, wie WACA-Proteine (Walker A Zytoskelett ATPasen) und Bactofiline (Ingerson-Mahar et al. 2012). Eine andere Maschinerie, die den dynamischen Antrieb für differentielle Lokalisierung von Zellkomponenten regelt, ist die Gruppe von Proteinen assoziiert mit der Zellteilung. Eine Gruppe von amphitropischen Proteinen, wie MinD, DnaA, FtsA und FtsZ wird durch anionische Phospholipide der Membran aktiviert und ist involviert in der Definition der Zellteilungsstelle (ABB. II-4) (Mileykovskaya et al. 2009; Garcia Vescovi et al. 2010).

Eine strukturelle Eigenschaft der bakteriellen Zelle, die möglicherweise einen starken Einfluss auf subzelluläre Proteinlokalisierung hat, ist das bereits erwähnte „molekulare Gedränge“ („molecular crowding“). Die bakterielle Zelle stellt eine dicht gepackte Einheit dar (s. ABB. II-2), mit geschätzter weise ca. 200 – 320 mg mL<sup>-1</sup> Proteinkonzentration im Zytoplasma (Vendeville et al. 2010). Das Nukleoid mit den Nukleinsäuren und daran operierenden Proteinkomplexen nehmen einen relativ großen Raum in der Zellmitte in Anspruch, wodurch die Zellpole eines Stäbchenbakteriums vergleichbar mehr Platz für Proteine der anderen zellbiologischen Funktionen enthalten und zahlreiche dokumentierte Proteinkomplexe beherbergen.

Proteine, die direkt mit den strukturellen Elementen der Bakterienzelle assoziiert sind und auch das restliche Spektrum an enzymatisch aktiven und strukturellen Proteinen, bedienen sich den verschiedenen Mechanismen der differentiellen Lokalisierung, um vom jeweiligen Ort der Synthese bis zum Bereich der Funktionsausübung geführt zu werden.

Die zwei relativ einfachen, weil nahe liegenden Mechanismen sind die Lokalisierung durch gezielte Insertion, wie im Fall der vorsporalen Proteine (z.B. SpoIIQ) in *B. subtilis* oder der Lokalisierungsmechanismus des „Diffusion und Einfangens“, wenn das Proteins frei durch das Zytoplasma diffundiert, bis es von einem bereits lokalisierten Proteinpartner „eingefangen“ wird, wie im Fall der Membranhistidinkinase PleC in *C. crescentus*. Ein faszinierender Mechanismus ist der Aufbau räumlich-zeitlicher Gradienten an Proteinen mit Hilfe von oszillierenden Systemen. Die

zellteilungsassoziierten Min Proteine in *E. coli* sind ein Beispiel für ein solches System (ABB. II-4). Die MinC und D Proteine, die eine Ausbildung des Z Ringes an den Polen und damit eine asymmetrische Teilung verhindern, bilden polare Kappen aus und werden immer wieder durch den an der Membran entlang wandernden Ring aus MinE-Molekülen von der Membran abgelöst. Diffundiert zum gegenüber liegenden Pol bilden die Proteine eine weitere Kappe aus. Damit entsteht in der Zellmitte eine Region mit der niedrigsten Konzentration an MinCD Proteinen, bis zu dem Zeitpunkt, wenn der Effekt der Nukleoidokklusion, der auf noch ungeklärte Weise die Ansammlung der Divisommaschinerie in der Zellmitte verhindert, solange die Replikation und Trennung der Chromosomen nicht erfolgt ist, aufgehoben wird, bildet sich der FtsZ Ring aus und leitet die Zellteilung ein.

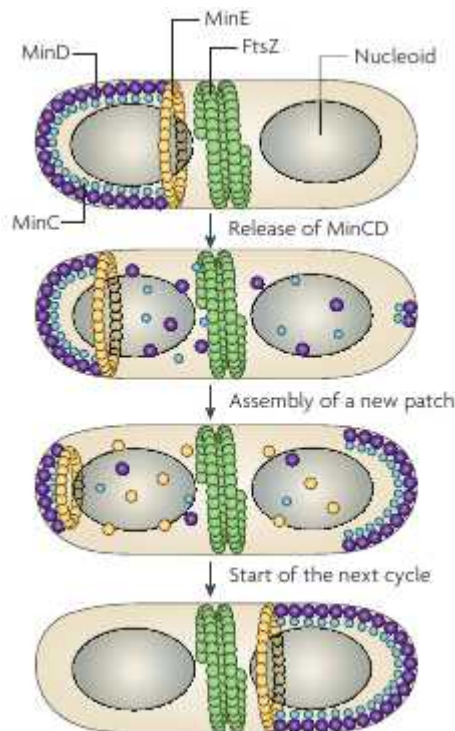


ABB.II-4. Mechanismus der Positionierung der Zellteilungsebene in *E. coli*. Der Aufbau des FtsZ-Ringes in der Zellmitte des Stäbchenbakteriums wird durch Nukleoidokklusion und MinE angetriebene Pol-zu-Pol Oszillation der Zellteilungsinhibitoren MinC und MinD reguliert (aus: Thanbichler & Shapiro 2008).

Als ein weiterer Mechanismus kann auch die Lokalisierung eines Proteins durch gezielte Durchführung der Proteinsynthese an den Orten der späteren Funktionsausübung gelten. Die Transkription und Translation der bakteriellen Zelle, wurde lange Zeit als ein Vorgang wahrgenommen, der gleichzeitig an dem Ort der mRNA Synthese statt findet, da die Prokaryoten über keinen abgetrennten Zellkern verfügen. Diese Beobachtung ist grundsätzlich nicht falsch, es

stellte sich allerdings heraus, das ähnlich wie in Eukaryoten, einige fertig synthetisierte mRNA auch zu den Orten der Funktionsausübung des Proteins gezielt geführt werden und tatsächlich distinkte Muster ausbilden kann, wie Membran, Pole der Zelle oder in Helices (Nevo-Dinur et al. 2011). Hiermit gesellt sich zu den bekannten möglichen Mechanismen der Proteinsortierung in Bakterien ein neues dazu: die gezielte Leitung der mRNA zu Orten der Proteinfunktion mit anschließender Proteinsynthese vor Ort. Die Vorteile dieses möglichen Mechanismus liegen u.a. in der Effektivität, da nicht jedes Protein einzeln durch das gedrängte Zytoplasma geführt werden muss und die lokal erhöhte Konzentration auch die Ausbildung von Proteinkomplexen und „molekularen Maschinen“ unterstützt. Auf diesem Wege kann auch eine eventuelle schädliche Wirkung eines Proteins auf subzelluläre Regionen, die nicht dessen spezielle Funktion benötigen, verhindert werden.

Eine andere Studie zu diesem Thema ist zu ganz anderen Ergebnissen gekommen (Montero Llopis 2010). Die mRNA in *E. coli* und *C. crescentus* zeigte eine deutlich verminderte Mobilität und verblieb in der Nähe des Chromosoms, was auf eine räumliche Organisation der Proteinexpression auf der Basis des bakteriellen Chromosoms als Matrize hinweist. Dafür spricht auch der Fakt, dass Gene die für Proteininteraktionspartner kodieren, oft Cluster im Genom bilden. Möglicherweise haben beide Studien richtige Beobachtungen und Schlussfolgerungen getroffen und die Bakterienzelle ist komplexer organisiert, als einzelne wissenschaftliche Arbeitsgruppen annehmen. Die Aufklärung der molekularen Strukturen und Netzwerken bedarf Studien in verschiedenen Bakterienstämmen, da offensichtlich nicht alle Mechanismen im Bakterienreich konserviert sind, andererseits auch intelligenter Techniken zu Erstellung markierter Proteine und deren Dokumentation *in vivo*. Eine Vielzahl neuer Studien, die unterschiedliche Ansätze verfolgen, ist in der letzten Zeit Publik gemacht worden.

## **II-2.2. “Folge dem Licht!”- bisherige Studien zur Aufklärung von Proteinlokalisierung in bakteriellen Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie**

Mehrere Forschungsprojekte mit dem Schwerpunkt der systematischen subzellulären Lokalisierung von Proteinen in eukaryotischen Organismen wurden in den letzten Jahren durchgeführt, z.B. in der Knospungs-Hefe (Kumar et al., 2002, Matsuyama et al. 2006, Haim-Vilmovsky et al. 2011), oder in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Dupuy et al. 2004, Meissner et al. 2011). Die Größe dieser Organismen variiert zwischen 6µm (Hefe) bis zu einem Milimeter (*C. elegans*). Der Fortschritt der optischen Technik ermöglicht heutzutage aber auch Mikroskopie von dynamischen Proteinverteilungen in lebenden Bakterien der Größe von 0,5-10 µm. Die alte Vorstellung von der Bakterienzelle als ein „Sack“ gefüllt mit Proteinen, die ebenmäßig im Zytoplasma verteilt am Stoffwechsel der Zelle beteiligt sind, musste der Erkenntnis weichen, dass auch in den Bakterien

bestimmte Muster in der Proteinverteilung existieren, die je nach Funktion und Aktivität des Proteins, Veränderungen unterliegen. Aus der Beobachtung eines Proteins über Zeit können Erkenntnisse zu der Proteinfunktion und den Interaktionspartnern gewonnen werden. Die heutige Bioinformatik kann die gewonnenen Daten zur Entwicklung von Auswertungsprogrammen für mikroskopische Aufnahmen verwenden. Die mikroskopische Dokumentation von Lokalisierungsdaten setzt eine Methode zur Markierung der gewünschten Zellelemente voraus. Wie bereits erwähnt, sind fluoreszente Marker besonders für die intrazelluläre Verfolgung von Proteinen in lebenden Organismen geeignet. Sie können auf genomischer Ebene mit einem Gen fusioniert und damit in jeder Zelle in Abhängigkeit von Expressionsmechanismen *de novo* synthetisiert werden. Sie sind für die meisten Modellorganismen exogen und somit als Marker inert gegen ungewünschte Kreuzreaktionen mit Zellbestandteilen des untersuchten Organismus. Eingesetzt in üblichen Konzentrationen sind sie nicht toxisch und erlauben die Beobachtung von subzellulären Proteindynamiken in lebenden Zellen, was die Wahrscheinlichkeit der unabsichtlichen Erzeugung von Artefakten, die aus der Fixierung von Gewebe stammen können, ausschließt. Neben der klassischen und der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie sind auch Möglichkeiten zu alternativen Techniken zur Erschließung von Proteindynamiken und Interaktionen gegeben, wie FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) und FRET (Förster resonance energy transfer), sowie BiFC (bimolecular fluorescence complementation) und Nutzung von photoaktivierbaren Proteinen zur subzellulären Verfolgung von markierten vs. unmarkierten Proteinen (Giepmans et al. 2006). So ist es nicht verwunderlich, dass mit den Jahren einige Methoden und Studien bezüglich subzellulärer Lokalisierung fluoreszenter Proteine in Prokaryoten publik gemacht wurden. Sie bedienten sich dabei unterschiedlicher Vorgehensweisen und nutzten entweder eine gezielte Markierung des Carboxy- oder Aminoterminus eines Zielproteins oder eine zufällige interne Markierung der Gensequenz mit Hilfe von Transposons. Bereits im Jahr 1998 wurde von Merkulov & Boeke eine auf dem Retrotransposon Ty1 und *in vitro* Transposition basierende Studie in *Saccharomyces cerevisiae* vorgestellt (Merkulov & Boeke 1998). Die eingesetzten Transposons beinhalteten sowohl eine Variante, die C-terminal trunkierte Proteine aufgrund eines Stop-kodons im *gfp* Gen produziert, als auch eine *gfp* Kassetten mit „Amber“ Suppressor tRNA *supF* (*tyrT*), die sog. interne „Tribid“ in-frame Fusionen mit einem Gen von Interesse produziert. Diese Techniken wurden für die *in vitro* Markierung von Plasmidkodierten Ty1 Proteinen und anschließender Analyse der Lokalisierung in der Bäckerhefe verwendet.

Die erste Anwendung der auf Transposons basierten Erstellung von GFP- Proteinfusionen in *Rhizobium* wurde von Xi et al. vorgestellt (Xi et al. 1999). Die auf dem Tn5 Transposon basierenden Konstrukte beinhalten neben dem *gfp* Gen auch die Neomycinresistenz, sowie *gusA* für

verschiedene Anwendungen *in vivo* und ggf. *in planta*. Der Transpositionsschritt erfolgte in dieser Studie ebenfalls *in vitro* und produzierte carboxyterminal trunkierte Proteinfusionen, die allerdings lediglich zur Lokalisierung der Bakterien in den Wirtspflanzen benutzt und nicht weiter charakterisiert wurden.

In einer umfangreichen und arbeitsintensiven Studie in *Bacillus subtilis* wurden 110 „open reading frames“ (ORFs) N- und C-terminal mit *gfp* fusioniert (Meile et al. 2006). Die Expression der *gfp*-Fusionen erfolgte von Xylose-induzierbaren Promotoren, eine Maßnahme, die zwar eine hohe Expression des Fusionskonstrukts garantiert, allerdings eventuell in Artefakten der subzellulären Lokalisierung, aufgrund von zu hohen Konzentrationen des Proteins resultiert und keine Analyse der endogenen Genexpression des zu untersuchenden Gens unter verschiedenen Bedingungen erlaubt. Nichtsdestotrotz konnten Lokalisierungen zahlreicher Proteine, darunter auch einiger mit unbekannter Funktion dokumentiert werden und in sechs generelle Kategorien der prokaryotischen Proteinlokalisierung zugeordnet werden. In den meisten Fällen war entweder die N- oder die C-terminale Fusion funktionsfähig, in 78% der Fälle konnten beide Fusionen gewonnen werden. Elf der ausgewählten ORFs konnten nicht effektiv zur Expression gebracht werden; die Autoren vermuten als Grund die Größe der genetischen Fusionsprodukte von mehr als 2.5 kb. Knapp mehr als die Hälfte der funktionsfähigen Konstrukte (62%) zeigten eine vergleichbare Lokalisierung als entsprechende C- und N-Fusionen, der Rest wies ausschließlich als eine der Fusionsvarianten die erwartete Lokalisierung auf, wahrscheinlich aufgrund der Störung der Proteinfunktion durch die endständige Fusion an GFP. Die Studie bietet unter anderem neue Einblicke in die Organisation der DNA Replikationsmaschinerie.

Chromosomales Markieren von 23 ausgewählten „kodierender DNA-Sequenzen“ (CDSs) am C-Terminus mittels  $\lambda$ -Red Rekombiantion in *E. coli* stellt der Inhalt der Studie von Watt et al. dar (Watt et al. 2007). Der Vorteil dieser Methode liegt in dem Potential der wiederholten gezielten Markierung von potentiellen Interaktionspartnern mit unterschiedlichen Markern in einem Bakterienstamm mit der Möglichkeit der Kolo-kalisation, die arbeitsintensive Durchführung stellt den klaren Nachteil dar.

Russel & Keiler stellen in einer Studie mini-Tn5-GFP Transposons vor, mit deren Hilfe 20.000 C-terminal trunkierte Proteine in *Caulobacter crescentus* erstellt und mittels „fluorescent activated cell sorting“ FACS nach deutlichem Signal sortiert wurden (Russel & Keiler 2008). Knapp über 6000 dieser Stämme wurden mikroskopisch ausgewertet und 24 Klone identifiziert, sowie genauer untersucht, u.a. einige hypothetischen Proteine.

In einer weiteren, recht aufwändigen Studie aus dem Jahr 2009 wurde mittels Gateway-Methode der Versuch gestartet, alle ORFs von *C. crescentus* sowohl N- wie auch C-terminal mit dem

fluoreszenten Protein mCherry zu markieren und die plasmidkodierte Fusionen unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors zu exprimieren, sowie mikroskopisch zu dokumentieren (Werner et al. 2009). Letztendlich wurden knapp 300 Proteine analysiert und in Kategorien der bakteriellen Proteinlokalisierung eingeordnet. Dabei haben die Autoren die Kategorie der Membranlokalisierung als „nicht-lokalisiert“ deklariert und in den Hauptergebnissen nicht eingeschlossen. Transposons ebenfalls mit mCherry als fluoreszenten Marker, allerdings konstitutiv exprimiert, wurden für die Studie von Lagendijk et al. gewählt (Lagendijk et al. 2010). Der Schwerpunkt dieses Vorhabens lag hier in der Möglichkeit, eine Markierungsmöglichkeit für Stämme zu entwickeln, die in nachfolgenden Untersuchungen in Biofilmen oder Wirt-Pathogen-Interaktionen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie darstellbar sind. Die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen spielte in diesem Fall keine Rolle, die Studie demonstriert jedoch die Vielseitigkeit der Anwendung einer Transposon-basierten Methode.

Eine auf *in vitro* Transposition basierende Methode wurde für die Erstellung von zufälligen Insertionen in die *lacI* Gensequenz und anschließende Analyse in *E. coli* Zellen genutzt (Gregory et al. 2010). Die *gfp* Gensequenz beinhaltet hier keinerlei regulatorischen Elemente, um endogene Mechanismen nutzen zu können. Die Methode nutzt die Cre vermittelte Rekombination für die spätere *in vivo* Exzision der beiden Selektionsmarker *lacZ* ( $\beta$ -Galaktosidase Reporter) und *kan* (Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin), um den Leserater bis zum 3' Ende des Gens zu erweitern.

Diese Auswahl an Proteinmarkierungs- und Lokalisierungsstudien in verschiedenen Organismen demonstriert die Vielseitigkeit der Methoden und präsentiert ein breites Spektrum an lokalisierten Proteinen, die einen kleinen Einblick in prokaryotische Organisation der Zelle bieten. Basierend auf Ergebnissen aus anderen Mikroorganismen, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Markierung von Proteinen in dem Erdbodenbakterium und Modellorganismus für Pflanze-Bakterium-Interaktionen, *Sinorhizobium meliloti* entwickelt werden, die für Lokalisierungen von Proteinen in frei lebenden Zellen, aber auch unter den besonderen Umständen der intrazellulären Symbiose mit den Leguminosepflanzen ermöglicht.

### **II-3. *Sinorhizobium meliloti*, ein nützliches Bodenbakterium und Modellorganismus für Bakterien-Pflanzen-Symbiosen**

In dieser Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, die einen dynamischen Einblick in das Innenleben des Bakteriums *Sinorhizobium meliloti* bietet. *Sinorhizobium* gehört zu der Familie der *Rhizobiaceae* aus der Klasse der  $\alpha$ -Proteobakterien und ist ein im Boden lebendes, streng aerobes und chemoorganotroph lebendes Bakterium. Die Gram negativen Stäbchenbakterien besitzen zwei

bis sechs peritrich angeordnete Flagellen (Jordan 1984) und haben eine Länge von ca. 2 Mikrometer sowie die Breite von ca. 0,5 Mikrometer (ABB. II-5A). *Sinorhizobium* zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, eine stickstofffixierende Symbiose mit Leguminosepflanzen einzugehen.

Symbiotische Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Bakterien sind in der Natur weit verbreitet (Udvardi & Day 1997), zu den am besten untersuchten gehören dabei die Symbiosen zwischen Leguminosen und stickstofffixierenden Bakterien. Die biologische Stickstofffixierung ist geschätztweise für ca. 90% des im Boden gebundenen Stickstoff verantwortlich, das entspricht jährlich 100-140 Mt (Megatonnen) Stickstoff (Gage 2004). Zu der Ordnung der Leguminosen (Fabaceae) gehören landwirtschaftlich relevante Arten wie *Medicago sativa*, *Medicago truncatula*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*. Während der Wirtspflanzeninfektion, werden meist an den unterirdischen Wurzeln der Pflanzen in einer komplexen Interaktion Knöllchen ausgebildet, die eine microaerobe Umgebung für die besiedelnden, symbiotischen Bakterien bietet (ABB. II-5B). Diese produzieren ein spezielles Enzymkomplex, die Nitrogenase, die für Stickstoffreduktion verantwortlich ist, jedoch durch Sauerstoff irreversibel inaktiviert wird. Bakterien der Gattung *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, sowie *Frankia* wandeln in komplexen Reaktionen atmosphärischen Stickstoff in das von der Pflanze verwertbare Ammonium (Buhrmester 2004). Damit können die Wirtspflanzen auf eine Stickstoffquelle zugreifen, die unabhängig ist von der Gehalt des essentiellen Verbindung im Bodengrund. Dadurch haben die Leguminosen bei einem Stickstoffmangel im Boden einen wesentlichen Wachstumsvorteil gegenüber Pflanzen, die nicht zu einer symbiotischen Stickstofffixierung in der Lage sind (ABB. II-5C). So kann eine Leguminose aufgrund der Aktivität des Mikrosymbionten pro Jahr und Hektar 250 kg Stickstoff fixieren (Werner 1987). In einem symbiotischen Gleichgewicht enthalten die Knöllchen-besiedelnden Bakterien von der Wirtspflanze energiereiche Kohlenstoffverbindungen, meist in Form von Dicarbonsäuren (Udvardi & Day 1997), wie Malat, Succinat und Fumarat, womit sie ihren Energiehaushalt decken.

Die Etablierung der stickstofffixierenden Symbiose basiert auf sehr komplexen Mechanismen, die auf gegenseitiger Signalgebung und Erkennung aufgebaut ist und für den engen Wirtsbereich der jeweiligen Gattungen verantwortlich sind (ABB II-6).



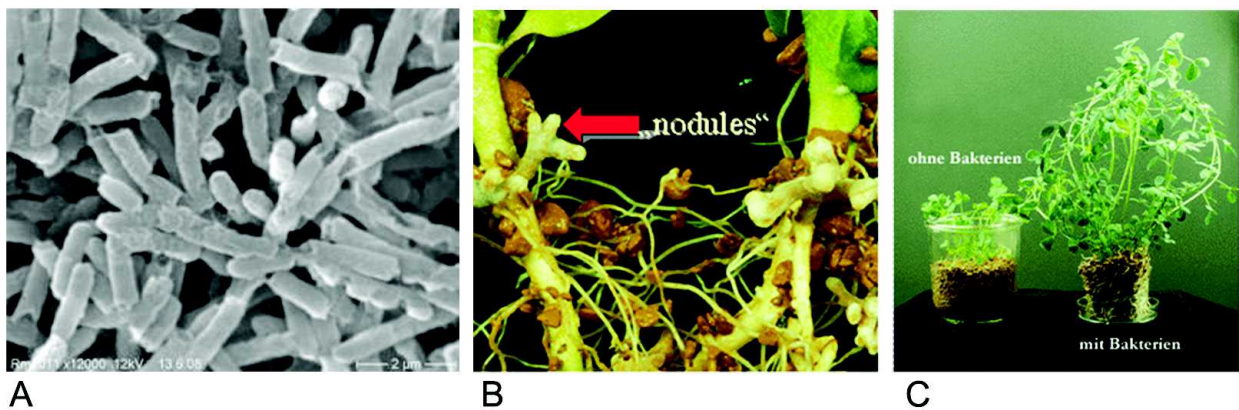


ABB. II-5. Rhizobien als Mikrosymbionten. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. meliloti* Rm2011 Zellen (D. Greif, Universität Bielefeld). B) Von *S. meliloti* induzierte Knöllchen an einer *M. sativa* Wurzel. (Proteom- und Metabolomforschung, Universität Bielefeld). C) Einfluss der Rhizobien/Leguminosen Symbiose auf das Pflanzenwachstum. Das Foto zeigt gleich alte *M. sativa*-Pflanzen ohne und mit Inokulation durch *S. meliloti* Bakterien. Deutlich sichtbar ist das stärkere Wachstum der in Symbiose lebenden Pflanze, die von zusätzlichen assimilierten Stickstoff profitiert.

Der Signalaustausch beginnt bereits im Boden, wo die Pflanze über die produzierten Wurzelexudate „ihre“ Bakterien chemotrophisch anzieht. Diese von der Pflanze produzierten sekundären Stoffe, wie Flavonoide werden kontinuierlich in den Boden abgegeben, jedoch in einer erhöhten Konzentration unter herrschenden Konditionen des Stickstoffmangels. Mit der beginnenden Infektionsphase haften sich die Bakterien an die Wurzelhaare der Pflanze an und beginnen ihrerseits mit der Produktion von Signalstoffen, den sog. Nod-Faktoren, die im Wirt die zur Nodulation notwendigen Prozesse in Gang setzen (Fisher & Long 1992). Diese Nod-Faktoren besitzen eine variable Struktur und sind rhizobienspezifisch substituiert, worauf die hohe Wirtsspezifität des Mikrosymbionten beruht (Denarie et al. 1992; Long 1996; Spaink 2000; Perret et al. 2000). Es folgen diverse subzelluläre und zelluläre Reaktionen der Leguminose, u.a. findet innerhalb von wenigen Stunden die durch Phytohormonverlagerung regulierte Wurzelhaarkrümmung („root hair curling“) statt. Dabei werden die an den Wurzelhaaren anhaftenden Bakterien eingeschlossen und bilden sog. Mikrokolonien aus (Turgeon & Bauer 1985). In nachfolgenden Schritten folgt die Degradierung der Pflanzenzellwände (Carden & Felle 2003), sowie die Ausbildung des Infektionsschlauches, durch den die sich teilenden Rhizobien die meristematischen Kortezellen der Wurzel infizieren können. Zeitgleich bilden einige kortikale Zellen der Pflanze bereits ein Knöllchenmeristem aus und die Infektionsschläuche richten ihr Wachstum in dessen Richtung aus (Newcomb 1981). Nach und nach werden die Bakterien in die Pflanzenzellen entlassen (Brewin

1991), wobei sie mit der wirtseigenen Peribakteroidmembran umschlossen werden und sog. Symbiosome ausbilden. Während die Bakterien zu Stickstoff-fixierenden Bakteroiden differenzieren (Vasse et al. 1990), vergrößern sie ihr Volumen und bilden Verzweigungen aus. Das infizierte Gewebe der Pflanzenwurzel kann determinierte oder nicht-determinierte Knöllchen ausbilden (ABB.II-6). Die Leguminosen der gemäßigten Klimazonen bilden zylindrische nicht-determinierte Knöllchen aus, die sich über ein langzeitiges Wachstum auszeichnen und über verschiedene funktionelle Bereiche verfügen, die in vier Zonen eingeteilt werden (Vasse et al. 1990; Hirsch 1992). An dem apikalen Teil des Knöllchens befindet sich die bakterienfreie meristematische Zone I (ABB. II-6). Daran schließt sich die schmale Invasions- oder Präfixierungszone II an. In diesem Gewebe finden sich weitlumige Zellen mit großen Vakuolen, wo die endozytotische Freisetzung der Bakterien aus den Infektionsschläuchen stattfindet. Die Differenzierung der Bakterien zu Stickstoff-fixierenden Bakteroiden findet in dem Zwischenbereich der sog. Interzone (II-III) statt (Vasse et al. 1990). In der Stickstofffixierungszone III wird unter hohem Energie- und Sauerstoffverbrauch der atmosphärische Stickstoff durch den Nitrogenasekomplex zu Ammoniak umgewandelt, den die Pflanze schnell zu Synthese von nicht-giftigen Verbindungen von Glutamin und Glutaminsäure verwendet. Der benötigte Sauerstoff wird durch die von der Pflanze synthetisierte und in die Knöllchen transportierte Leghämoglobin komplexiert. Durch die hohe Konzentration an dem eisenhaltigen Molekül nehmen die funktionsfähigen Stickstofffixierenden Knöllchen eine rosa bis rote Färbung an (de Billy et al. 1991). Im proximalen Bereich bildet sich ca. 4-5 Wochen nach der Infektion die Seneszenzzone IV aus, in der die Apoptose der Zellen und der Abbau von Symbiosomen statt finden. Abgesehen von seiner wichtigen Rolle im Stickstoffkreislauf der Natur findet das Bakterium *Sinorhizobium meliloti* durch seine Verwandtschaft mit den Humanpathogenen der Gattung *Brucella* und *Bartonella*, auch als Modellorganismus zur Erforschung von intrazellulär lebenden Bakterien Anwendung. Darüber hinaus bietet es hierbei den Vorteil der Nicht-Pathogenität und risikofreien Handhabung in experimentellen Forschung. Das symbiotische Bakterium wurde bereits ausführlich mit den konventionellen Mitteln der Systembiologie untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode zur Gewinnung von fehlenden dynamischen und strukturellen Daten zur Proteinaktivität in lebendigen *S. meliloti* Bakterien in Zellkultur und in der Symbiose in den Wurzelknöllchen der Pflanze etabliert und zur Datengewinnung genutzt werden, um die Voraussetzungen des systembiologischen Forschungsansatzes zu erfüllen.

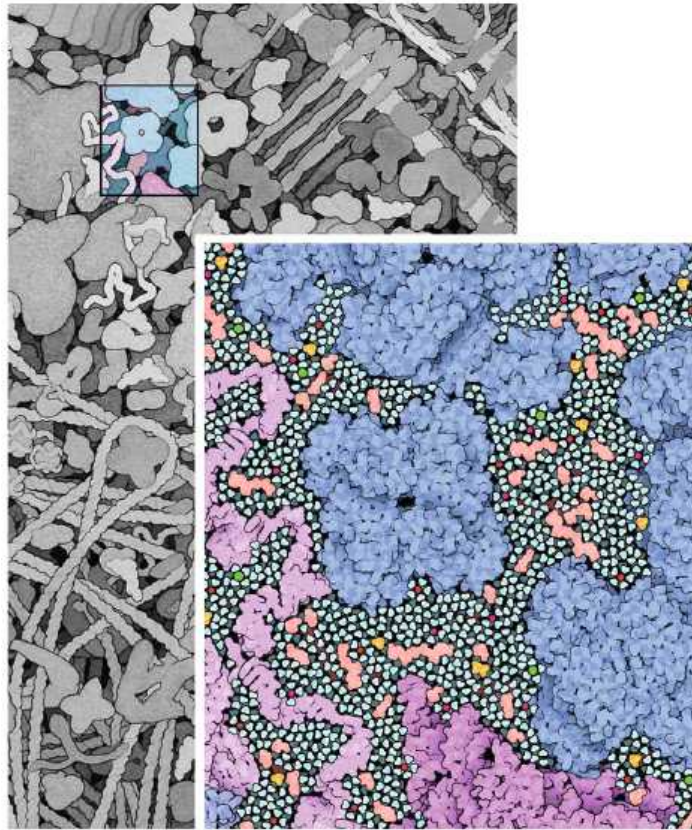


ABB. II-6. Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Etablierung einer stickstofffixierenden Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen. Auf der linken Seite befindet sich die detaillierte Aufzeichnung der Ausbildung von nicht-determinierten Knöllchen, wie z.B. an den Wurzeln von *M. sativa*. Rechts in kürzeren Form die Entwicklung von determinierten Knöllchen, wie z.B. in der Sojabohne (*Glycine max*). Über komplexen Signalaustausch zwischen dem pflanzlichen Wirt und den im Boden lebenden Bakterien wird das Einwandern der Mikroorganismen in tiefere Schichten von Wurzelgewebe und Ausbildung von Stickstoff fixierenden Organen an der Wurzel, den Knöllchen ermöglicht. Dabei werden die nicht-determinierten Knöllchen ständig von neuen Bakterien infiziert und erleben ein distales Wachstum. Die sphärische Form der determinierten Knöllchen stammt von Proliferation der bereits infizierten Zellen. Abbildung von Dieter Kapp, Universität Bielefeld, aus dem Lehrbuch „Allgemeine Botanik“ von Wilhelm Nultsch, Thieme, Stuttgart; Auflage: 11.

#### **II-4. Ziele der Arbeit**

Die subzelluläre Organisation einer prokaryotischen Zelle stellt ein noch weitgehend unbekanntes und spannendes Experimentalfeld dar. Gleichzeitig ist der Vertreter des bakteriellen Reiches, *Sinorhizobium meliloti*, durch seine vielfältige Lebensweise als Bodenbakterium und ausdifferenziertes Bakteroid während der Stickstoff fixierenden Symbiose, sowie durch die bereits etablierte Arbeitstechniken und gesammelte vielfältige Daten ein bestens geeignetes Objekt für die Gesamt-Systembiologische Untersuchung. Für die Aufklärung der subzellulären Lokalisierung der wichtigsten Struktur- und Funktionsbausteine der Zelle, den Proteinen sind Methoden der fluoreszenzmikroskopischen Dokumentierung die Werkzeuge der Wahl. Dies benötigt die funktionierende Ausstattung möglichst vieler, auch unbekannter Proteine mit einer fluoreszenten Markierung. Im Rahmen dieser Arbeit soll diese Methode entwickelt und etabliert werden, sowie Daten zur subzellulären Lokalisierung von Proteinen in frei lebenden Bakterien, sowie während der Symbiose mit Leguminosen als „proof of principle“ gesammelt werden.

### III Material



David S. Goodsell - "Inneres einer Bakterienzelle"

### III Material

#### III-1. Verwendete Bakterienstämme und Pflanzen

##### III-1.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm1021	Spontan Resistente Mutante des Wildtyps RU47, Sm <sup>r</sup> , Nx <sup>r</sup> , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> , Inf <sup>r</sup> , RecA <sup>+</sup>	Meade et al., 1982
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm2011 pHC60	Sm <sup>r</sup> , Nx <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , exprimiert konstitutiv freies GFP Protein vom pHC60 Plasmid	Cheng & Walker, 1998
<i>E. coli</i> DH5α	supE44Δ, lacU169 (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)], pro, res, ΔrecA, Tp <sup>r</sup> , Ap <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Spc <sup>r</sup>	Simon et al., 1983

Tab. III-1 Verwendete Bakterienstämme

##### III-1.2 Pflanzen

Spezies	Herkunft
<i>Medicago sativa</i> L. cv Europe	Dt. Saatveredelung, Lippstadt, Jahr 2000

Tab. III-2 Pflanzen

#### III-2 Primer, Plasmidvektoren und Transposon

##### III-2.1 Primer

Bezeichnung	Sequenz†	Hersteller
TranspEco	<u>GAATTC</u> GGAGGCAGGAGATATACATATGAT	Metabion
TranspSal	GTCGACTCATAGACCCATCCGCCATTAAAA	Metabion
LTTSac	<u>GAGCTCT</u> CAATTCAGGGTGGTGAATG	Metabion
LTTBam	<u>GGATCCA</u> ATTCATGAGCGGATACATA	Metabion
ME	CTGTCTCTTATACACATCT	Metabion
CreSmaI	<u>CCCGGG</u> ATGTCCAATTTACTGACCGTACACC	Metabion
CreSmaII	<u>CCCGGG</u> GCTAATCGCCATCTTCCAGCAGGCGC	Metabion
GFPup	TTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGAT	Metabion
GFPprev	AGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC	Metabion
Exonuklease-Resistenter Random Primer (500μM)	5'-NpNpNpNpNp <sup>S</sup> Np <sup>S</sup> N-3'	Fermentas

† Die Sequenz ist in 5'-3'-Richtung angegeben und die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

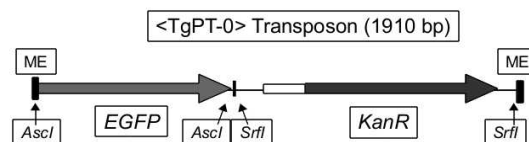
Tab. III-3 Primer

### III-2.2 Plasmidvektoren

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGEM-T Easy	<i>lacZα</i> , Ap <sup>r</sup> , Kloniervektor für PCR Produkte mit A-Überhang	Promega
pBNJ24.6	Km <sup>R</sup> , Quelle des eGFP Transposons	Sheridan, 2002
pG18mob2	Gm <sup>R</sup> , Kloniervektor, <i>oriV E. coli</i>	Kirchner, 2003
pXK99E	Km <sup>R</sup> , Expressionsvektor, <i>lacIq</i> Repressor, <i>P<sub>trc</sub></i> Promoter	Kirchner, 2003
pQL123	Amp <sup>R</sup> , pGEX-2T Derivat, Cre Recombinase, C-terminale GST Domäne	Liu et al., 1998
pJN105	<i>araC</i> -P <sub>BAD</sub> Kasette kloniert in pBBR1MCS-5	Newman et Fuqua, 1999
pWH1891	Ap <sup>R</sup> , pTYB2 Derivat, Tn5 Transposase E54K, M56A, L372P; C-terminal, Intein-chitin bindende Domäne	Köstner et al., 2006
pHB10	Km <sup>R</sup> , <i>SrfI</i> Fragment beinhaltet <i>nptII</i> -Gen und loxP Stellen, kloniert ins pANY-Kana	Diese Arbeit
pHB11	Km <sup>R</sup> , <i>SrfI</i> Fragment beinhaltet das <i>nptII</i> -Gen und loxP Stellen, kloniert ins pBNJ24.6	Diese Arbeit
pHB12	Km <sup>R</sup> , Gmr, Fragment beinhaltet das <i>egfp-nptII</i> Transposon kloniert blunt-end nach pG18mob2	Diese Arbeit
pHB13	Km <sup>R</sup> , das hyperaktive Transposase Gen kloniert in die <i>EcoRI/SalI</i> Stellen des Vektors pXK99E	Diese Arbeit
pHB14	das Fragment mit <i>P<sub>trc</sub></i> Promoter, <i>lacIq</i> Repressor, hyperaktive Transposase Gen und Terminatoren kloniert in die <i>BamHI/SacI</i> Stellen des pHB12 Plasmids	Diese Arbeit
pHB15	Gm <sup>R</sup> , <i>cre</i> Gen kloniert in <i>SmaI</i> Stelle des pJN105 Plasmids	Diese Arbeit

Tab. III-4 Plasmide

### III-2.3 Transposon



(nach Sheridan, Hughes, 2002)

## III-3. Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

### III-3.1 Enzyme

Wenn nicht anders genannt, wurden für die Verwendung der Enzyme die von Herstellern mitgelieferten Reaktionspuffer eingesetzt.



<b>Restriktionsenzyme</b>		
Enzym	Erkennungssequenz (5'-3')	Hersteller
<i>AscI</i>	GG <sup>^</sup> CGCGCC	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	G <sup>^</sup> GATCC	Fermentas
<i>EcoRI</i>	G <sup>^</sup> AATTC	Fermentas
<i>EcoRV</i>	GAT <sup>^</sup> ATC	Fermentas
<i>PvuI</i>	CGAT <sup>^</sup> CG	Fermentas
<i>PvuII</i>	CAG <sup>^</sup> CTG	Fermentas
<i>SacI</i>	GAGCT <sup>^</sup> C	Fermentas
<i>SalI</i>	G <sup>^</sup> TCGAC	Fermentas
<i>SmaI</i>	CCC <sup>^</sup> GGG	Fermentas
<i>SrfI</i>	GCCC <sup>^</sup> GGGC	Stratagene
<i>XhoI</i>	C <sup>^</sup> TCGAG	Fermentas
<b>DNA-Polymerasen</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Anbieter</b>
GoTaq	A-Überhänge	Promega
<i>Pfu</i> Polymerase	proof- reading	Fermentas
<i>Phi29</i> Polymerase	"rolling-cycle amplification"	Fermentas
<b>sonstige Enzyme</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Anbieter</b>
T4-Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	Fermentas
Shrimp alkaline Phosphatase	Dephosphorylierung von DNA	Fermentas
Hyperaktive Transposase	<i>In vitro</i> Transposition	Epicentre
Lysozym	Isolierung von Plasmid/Gesamt-DNA	Serva
RNase	Isolierung von Plasmid/Gesamt-DNA	Serva
Pronase	Isolierung von Plasmid/Gesamt-DNA	Serva

Tab. III-5 Liste der verwendeten Enzyme

### III-3.2 Antikörper

Primärantikörper:

Anti-GFP, spezifisch gegen das gesamte GFP-Protein aus Kaninchen, TORREY PINES BIOLABS, USA

Sekundärantikörper:

Anti-Kaninchen IgG Antikörper, konjugiert mit Meerrettichperoxidase, SIGMA

### III-3.3. Chemikalien

Chemikalie	Anbieter	Chemikalie	Anbieter
Agar No.1	Oxoid	Kaliumhydroxid	Merck
Agar Kobe Nr1	Roth	L+ Arabinose	Roth
Agarose	peqLab	Luminol	Roth
Amidoschwarz	Merck	Magnesiumsulfat	Merck
Antibiotika	Serva und Sigma Aldrich	Milchpulver	Sucofin



Borsäure	Merck	MOPS	Roth
Bromphenolblau	Serva	NaCl	Merck
BSA	Sigma	NaOH	Merck
CaCl <sub>2</sub>	Merck	Natriumacetat	Merck
Cumarsäure	Roth	Natriumchlorid	Merck
EDTA	Merck	Rubidiumchlorid	Merck
Essigsäure	Roth	Schwefelsäure	VWR
Ethanol	Roth	SDS-Pellets	Roth
Ethidiumbromid	Serva	Sudan Schwarz	Serva
Glycerin	Roth	Tris	Roth
Hefeextrakt	Oxoid	Trypton	OXOID
IPTG	Roth	XGal	Roth
Kaliumacetat	Merck		

Tab. III-6      Verwendete Chemikalien

### III-3.4 Kits

Kit	Anbieter	Verwendung
Qiaprep Spin Miniprep	Qiagen	Aufreinigung von Plasmid DNA
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen	Aufreinigung von DNA aus PCR
Nucleo Spin Extract II Kit	Macherey- Nagel	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
pGem T-Easy Kit	Promega	Ligation von PCR Amplifikaten mit A-Überhängen in den pGem teasy Vektor

Tab. III-7      Verwendete Kits

### III-3.5 Verbrauchsmaterial

Produkt	Bezugsquelle
Reaktionsgefäße, andere Plastikwaren	Sarstedt und Greiner
Pipettenspitzen	Starlab
Elektroportationsküvetten	Roth
Konjugationsfilter	Sartorius
Western Blotmembran	QIAgen
Glaswaren	Schott
Mikroskopiematerial (Objektträger, Deckgläschen.)	Roth
Sterilfilter	Roth

Tab. III-8      Verbrauchsmaterial

## III-4. Geräte

### III-4.1 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Autoklav	Webeco, Fedegari Autoclavi
Brutschränke	Memmert
Digitalkamera Camedia C4040 Zoom	Olympus
Eismaschine AF-20	Scotsman
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau
Feinwaage	Sartorius
Kippschüttler WS-10	Edmund Bühler
Klimakammer/Kühlraum	BBC York
Kühlschränke	Privileg, AEG
Kühlzentrifuge (Allegra 25R Rotor: TS5.1-500)	Beckmann
Kühlzentrifuge BR4i	Jouan
Luftschüttler	New Brunswick, Gerhardt
Magnetrührer	IKAMAG, Heidolph
PCR-Gerät (Mastercycler gradient)	Eppendorf
Pipettierhilfen	Gilson
pH-Meter (calimatic pH Meter 766)	Knick
Photometer (Ultraspec 2100 pro)	Amsersham
Reinraumwerkbank UniFlow (UVUB1200)	UniEquip
Spannungsgeber	UniEquip
Thermoschüttler (Thermomixer comfort)	Eppendorf
Tischzentrifuge (5415 D),(Biofuge A)	Eppendorf, Heraeus Christ
Transilluminator	UVP,Inc.
Videoprinter	Mitsubishi
Vortex (Genie)	Bender & Hobein
Waagen	Satorius
Wasserbäder	Kottermann

Tab. III-9 Geräte

### III-4.2 Mikroskope und Mikroskopiezubehör

#### Leica-Binokular MZFLIII

Das Leica Binokular wurde zum Identifizieren fluoreszenter *S. meliloti* Kolonien und zur Charakterisierung von Fluoreszenz in infizierten Knöllchen von *M. sativa* verwendet.

Es wurde der GFP-Plus Filtersatz für die Anregungswellenlänge von 470/40 nm und die Emission im Bereich von 525/50 nm benutzt.

#### Nikon Eclipse 80i

Das Fluoreszenzmikroskop mit dem eGFP Filterset und 63x Wasserimmersionsobjektiv NA 1.3 wurde für die Etablierung der Fluoreszenzmikroskopie von Mikroorganismen auf Agar beschichteten Objektträgern verwendet.

#### Zeiss Axiovert 200

Mit diesem System entstanden die Fluoreszenzaufnahmen von Bakterien und vereinzelt Bakteroiden. Zum Einsatz kamen ein 100x Ölimmersionsobjektiv mit NA 1.3 von Zeiss, eine CCD Kamera (Imager3LS von

LaVision, 1376x1040 Pixel) und Filterset 44 (Zeiss).

### Leica TCS SPE

Das System für konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde für die Abbildung von Knöllchenschnitten verwendet, die mit fluoreszenten *S. meliloti* Stämmen infiziert wurden.

## III-5. Software

Programm	Funktion	Quelle:
Clone Manager 5.0	Planung und Kontrolle von Klonierungen und Restriktionen	Sci Ed Central
ISI Web of Knowledge Pubmed	Literatur und Informationsrecherchen	<a href="http://isiwebofknowledge.com">http://isiwebofknowledge.com</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
BLAST ProSite	Homologiensuche Domänen- und Motivsuche in Proteinsequenzen	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast</a> <a href="http://prosite.expasy.org/">http://prosite.expasy.org/</a>
Comprehensive Microbial Resource CMR	<i>in silico</i> Genomrestriktionen	<a href="http://cmr.jcvi.org/">cmr.jcvi.org/</a>
SVI Huygens ImageJ	Dekonvolution Bildbearbeitung	<a href="http://www.svi.nl/">www.svi.nl/</a> <a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
<i>S.meliloti</i> Genomdatenbank	Suche nach Genomsequenzen, Planung von Klonierungen	<a href="http://iant.toulouse.inra.fr">http://iant.toulouse.inra.fr</a> Galibert <i>et al.</i> , 2001; <i>Sinorhizobium meliloti</i> strain 1021 Genome Project

Tab. III-10 Verwendete Software

## III-6. Nährmedien und Medienzusätze

### III-6.1 Nährmedien für Bakterienkultivierung

#### III-6.1.1 Komplexe Medien zur Kultivierung von Bakterien

##### TY-Medium (Beringer 1974)

5,0 g/l	Trypton
3,0 g/l	Hefeextrakt
0,7 g/l	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O

##### LB-Medium (Luria-Bertani Broth) (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl

##### SOC-Medium

20,0 g/l	Trypton
5,0 g/l	Hefeextrakt
0,5 g/l	NaCl
10,0 ml	250 mM KCl-Stock
ad 950 ml	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>
pH 7,0 mit 5 M NaOH einstellen	
ad 980 ml	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>

autoklavieren und auf  $\uparrow 55^{\circ}\text{C}$  abkühlen lassen  
 10,0 ml 2 M Glucose-Stock, sterilfiltriert und  
 10,0 ml 1 M  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ -Stock zugeben

### III-6.1.2 Definiertes Medium zur Kultivierung von Bakterien

**Vincent Minimal Medium** (Vincent 1970):

48 mM MOPS	4 $\mu\text{M}$ Biotin
54 mM Mannitol	48.5 $\mu\text{M}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$
20 mM Na Glutamat	10 $\mu\text{M}$ $\text{MnSO}_4$
1 mM $\text{MgSO}_4$	1 $\mu\text{M}$ $\text{ZnSO}_4$
2 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.27 $\mu\text{M}$ $\text{CoCl}_2$
250 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	0.5 $\mu\text{M}$ $\text{NaMoO}_4$
35 $\mu\text{M}$ $\text{FeCl}_3$	

### III-6.1.3 Festmedien

Zur Herstellung von Festmedien wurde Agar zum flüssigen Medium in der Konzentration von 15g/L zugegeben und autoklaviert. Die Antibiotika wurden, wenn benötigt, nach der Abkühlung des Mediums auf mind.  $60^{\circ}\text{C}$  hinzugegeben.

### III-6.2 Medium zur Pflanzenkultivierung

Um eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen mit dem Stickstoff-fixierenden Symbionten *S. meliloti* zu gewährleisten, sind in dem Medium keine Stickstoff-haltige Komponenten vorhanden.

- 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  autoklavieren (für Festmedium 12 g stickstofffreien Agar (Agar No.1, Oxoid) mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen).

Lösungen A – D wie in Tabelle Tab. III- 11 angegeben unter sterilen Bedingungen hinzufügen.

Stammlösung	Einzusetzende Menge/l Medium	Salz	g/l Stammlösung
Lösung A	0,5 ml/l	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	294
Lösung B + B <sub>1</sub>	0,5 ml/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	150
		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	50
Lösung B <sub>1</sub>	1 ml/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	116
Lösung C	0,5 ml/l	Fe-Citrat	6,7
		$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	123
Lösung D	0,5 ml/l	$\text{K}_2\text{SO}_4$	87
		$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,338
		$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,247
		$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,288
		$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1
		$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,056
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,048

Tab. III- 11 Lösungen zur Herstellung von Pflanzenmedium

### III-6.3 Medienzusätze

#### III-6.3.1 Zusätze für $\beta$ -Galactosidase Nachweis

##### X-Gal-Stammlösung

40 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid (X-Gal) in N-N-Dimethylformamid (DMF)

##### IPTG-Stammlösung

25 mg/ml Isopropylthiogalactosid (IPTG)  
Zu 1 l Medium wird jeweils 1 ml der jeweiligen Stammlösung gegeben

#### III-6.3.2 Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	Konz. in <i>S. meliloti</i>	Konz. in <i>E. coli</i>
Nalidixin	Nx	H <sub>2</sub> O	8	-
Kanamycin	Kan	H <sub>2</sub> O	-	25mg/l
Neomycin	Nm	H <sub>2</sub> O	200	-
Ampicillin	Amp	H <sub>2</sub> O	-	100-200mg/l
Tetracyclin	Tet	EthOH	10	10
Streptomycin	Sm	H <sub>2</sub> O	400-600	400

Tab. III- 12 Liste der verwendeten Antibiotika

### III-7. Puffer und Lösungen

#### III-7.1 Lösungen zur Herstellung von Dauerkulturen

87 % Glycerin(steril)

#### III-7.2 Puffer für die Plasmidisolierung aus Bakterienkultur nach TELT

2,5 ml 1M Tris-HCL pH 7.5  
6,2 ml 0,5M EDTA  
2,0 ml 10% TritonX 100  
39,2 ml 3,2M LiCl  
0,1 ml H<sub>2</sub>O ad 50 ml TELT-Lsg, autoklavieren

Lysozym: 50mg/ml

RNAse-H20: 0,1mg/ml

#### III-7.3 Puffer für die Gesamt-DNA-Isolierung aus *S. meliloti* nach R. Simon

##### NaCl-Lösung

1 M NaCl

**TE- Puffer**

10 mM Tris-HCl  
 1 mM EDTA  
 pH 7,5

**Saccharose**

20 % (w/v) Saccharose in TE-Puffer

**RNase-Lysozym-Lösung**

5 mg/ml Lysozym  
 1 mg/ml RNaseA

in TE-Puffer frisch ansetzen

**Sarkosyl/Pronase-Lösung**

5 % N-Lauroylsarkosin-Na-Salz in TE-Puffer (Sarkosyllösung)

Frisch ansetzen: 5 mg/ml Pronase in Sarkosyllösung

**Na-Acetat**

3 M Na-Acetat, pH 5,2

**III-7. 4 Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen****TFB1**

30 mM Kaliumacetat, 100 mM Rubidiumchlorid, 10 mM Calciumchlorid, 50 mM Manganchlorid, 15 % (v/v) Glycerin, pH-Wert auf 5,8 mit 10 %iger Essigsäure einstellen und sterilisieren durch Autoklavieren.

**TFB2**

10 mM MOPS, 75 mM Calciumchlorid, 10 mM Rubidiumchlorid, 15 % (v/v) Glycerin, pH- Wert auf 6,5 mit 2 M NaOH einstellen und autoklavieren.

**III-7.5 Puffer für die DNA-Agarosegelelektrophorese****TAE-Puffer (50x)**

2 M Tris  
 500 mM Natriumacetat  
 50 mM EDTA  
 mit Essigsäure auf pH 7,8 einstellen

**DNA-Probenpuffer (6x)**

10 ml TAE-Puffer  
 10 ml Glycerin  
 0,2 % Bromphenolblau

### III-7.6 Puffer für die Ligation

T4 DNA Ligase Puffer (10X):

400 mM	Tris-HCl
100 mM	MgCl <sub>2</sub>
100 mM	DTT
5 mM	ATP (pH 7.8 at 25°C)

### III-7.7 Puffer für die Aufreinigung des hyperaktive Transposase Proteins

TEGX Puffer:

10 mM	Tris-HCl pH 7.5
700 mM	NaCl
1 mM	EDTA
10%	Glycerol
0.1%	Triton X-100

Aufbewahrungspuffer:

50%	Glycerol
50 mM	Tris-HCl pH 7.5
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT

### III-7.8. Puffer für die *in vitro* Transposition

Transpositionsbuffer (10X):

0.50 M	Tris-acetate (pH 7.5)
1.5 M	Kaliumacetat
100 mM	Magnesiumacetat
40 mM	Spermidine

10X Stopp-Lösung 100 µl:

1%	SDS
----	-----

### III-7.9 Puffer für SDS-PAGE der Proteine

#### 5 x SDS-Probenpuffer

320 mM	Tris HCl pH 6,8
20 mM	EDTA
20 % (v/v)	Glycerin
10 % (w/v)	SDS
40 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau (BPB)

Der Puffer wird nicht autoklaviert und bei -20°C gelagert.

Trenngel-Lösung für ein 12,5%iges Acrylamidgel

12,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8)
3,75 ml	3 M Tris HCl pH 8,8
0,3 ml	10% (w/v) SDS-Lösung
230 µl	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung
13,2 ml	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>
15 µl	100%iges TEMED

Nach der Zugabe von TEMED sollte das Gel sofort gegossen werden. Der Ansatz reicht für 6 Minigele.

Sammelgel-Lösung

2,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8)
5 ml	0,5 M Tris HCl pH 6,8
0,2 ml	10% (w/v) SDS-Lösung
150 µl	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung
12,2 ml	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>
15 µl	TEMED

Nach der Zugabe von TEMED sollte das Gel sofort gegossen werden. Der Ansatz reicht für 6 Minigele.

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

250 mM	Tris HCl
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>

der pH-Wert sollte zwischen 8,2-8,4 liegen

Dieser Puffer wird nicht autoklaviert und bei 4°C gelagert.  
Vor der Benutzung wird er 1/10 mit H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> verdünnt.

Coomassie-Färbelösung

250 ml	Ethanol
70 ml	Essigsäure (100%)
680 ml	H <sub>2</sub> O <sub>deionisiert</sub>
1 g	Coomassie-Blue R250

Die Lösung wird durch einen Faltenfilter filtriert und nicht autoklaviert.

Coomassie-Entfärbelösung

250 ml	Ethanol
70 ml	Essigsäure (100%)
680 ml	H <sub>2</sub> O <sub>deionisiert</sub>



Die Lösung nicht autoklavieren.

### III-7.10 Puffer für den Western-Blot

TB-Puffer (Tris-Borat-Puffer) (10x):

60,55 g Tris

30,91 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Ad 1 L H<sub>2</sub>O

TBS-Puffer (Tris bufferde saline) (10x):

24,23 g Tris

60 g NaCl

Ad 1 L H<sub>2</sub>O

pH 7,5 mit HCl

Blockierlösungen: 5% Magermilchpulver in TBS (noch am selben Tag verwenden) oder 1% BSA in TBS

### III-7.11 Puffer für die "Enhanced-Chemical-Luminescence" (ECL)-Reaktion ECL Lösungen:

Luminol: 250 mM      0.44 g Luminol (3-aminophthalhydrazide; Sigma A 8511)

DMSO bis 10 ml

Aliquotieren: 0.5 ml/Gefäß

Im Dunkeln lagern bei -20°C.

Kumarinsäure: 90 mM      0.15 g p-Coumaric acid (Sigma C 9008)

DMSO bis 10 ml

Aliquotieren: 0.5 ml/Gefäß

Im Dunkeln lagern bei -20°C.

Tris-HCl: 1M pH 8.5

Wasserstoffperoxid: 30%

### Arbeitslösungen:

Lösung 1:

9 ml      dH<sub>2</sub>O

1 ml      1M Tris-HCl, pH 8.5

45 µl      Kumarinsäure

100 µl      Luminol

Zuerst Tris-HCl zugeben und mixen.

Kumarinsäure zugeben und mixen.

Dann Luminol zugeben und mixen.

**Lösung 2:**

9 ml dH<sub>2</sub>O  
1 ml 1M Tris-HCl, pH 8.5  
6µl Hydrogen Peroxide, 30%

Die Arbeitslösungen wie benötigt vorbereiten, oder im Dunkeln bei 4°C lagern (bis ca. 1 Monat).

**III-7.12 Lösungen zur Herstellung gefärbter, Agarosebeschichteter Objektträger für Fluoreszenzmikroskopie von Mikroorganismen****Sudan Black Beschichtung:**

Sudan Black-Stammlösung:

1 oder 2 mg Sudan Black in 100 ml EthOH

25 ml der Stammlösung werden mit 25 ml dest. Wasser vermischt, auf 60°C erhitzt und zu 50 ml geschmolzenen 4% Agar zugegeben.

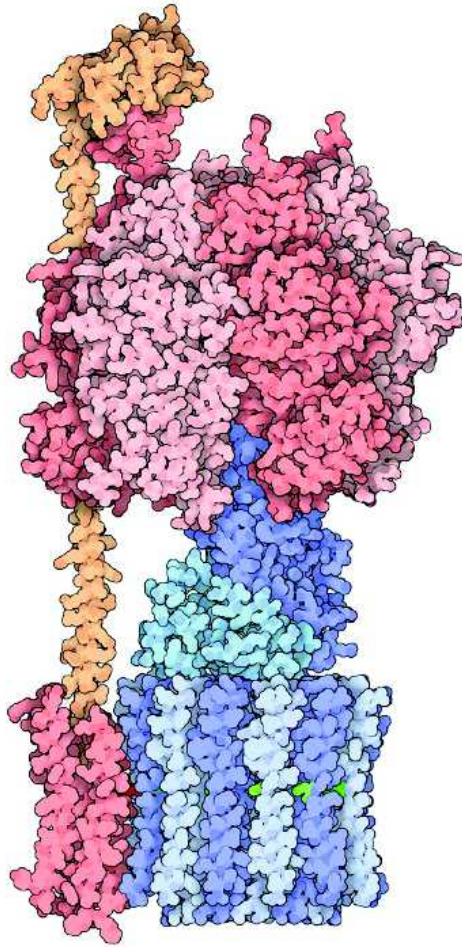
**Amido Black Beschichtung:**

Amido Black- Stammlösung:

0,05 g Amido Black  
3,75 ml Eisessig  
10 ml 100% MethOH auf 50 ml mit dest. Wasser auffüllen

25 ml der Stammlösung werden mit 25 ml dest. Wasser vermischt, auf 60°C erhitzt und zu 50 ml geschmolzenen 4% Agar zugegeben.

## IV Methoden



David S. Goodsell "ATP Synthase"

## IV Methoden

### IV-1. Kultivierung von Bakterien

#### IV-1.1 Anzucht von Bakterien

Die Bakterienanzucht erfolgt sowohl in Flüssigmedium, als auch auf Festmedien. Während *E. coli*-Zellen bei 37°C in LB-Medium inkubiert werden, erfolgt die Anzucht von *S. meliloti* im komplexen TY-Medium oder definiertem Vincent Minimal Medium (VMM) bei 30°C. Bei Anzucht in Flüssigkulturen wird beachtet, dass der Anteil des Kulturvolumens max. 10% des Gefäßvolumens beträgt, um eine aerobe Anzucht zu gewährleisten.

#### IV-1.2 Herstellung von Dauerkulturen

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

- Bakterien spezifisch auf Platte flächig anziehen
- Mit Glaspipette die Bakterien von der Hälfte der Platte abnehmen und in 500 µl Nährmedium (LB für *E. coli*, TY für *S. meliloti*) resuspendieren
- 500 µl Glycerin (steril, 87%) zugeben
- 30 min bei RT stehen lassen
- bei –20°C lagern

#### IV-1.3 Bestimmung des Bakterientiters

Der Bakterientiter wird durch photometrische Messungen ermittelt. Als Referenz dient steriles Nährmedium. Hierbei entspricht eine optische Dichte von 0,1 bei einer Wellenlänge von 600 nm (o.D.<sub>600</sub>)  $2 \times 10^7$  *E. coli*-Zellen bzw.  $1 \times 10^8$  *S. meliloti*-Zellen pro ml Kulturvolumen. Um den exakten Lebendtiters zu bestimmen, werden Verdünnungsreihen angelegt, ausplattiert und nach der Inkubation ausgezählt.

### IV-2. Isolierung und Darstellung von DNA

#### IV-2.1 Gesamt-DNA-Isolation aus *S. meliloti* (Methode nach R. Simon)

- 1,5 ml ü.N.-Kultur (o.D.<sub>600</sub> 0,5-0,8) 2 Min in einer Eppendorfzentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand abgießen
- Zellpellet homogen in 1 ml NaCl resuspendieren, 30-60 Min bei 0°C inkubieren
- 3 Min abzentrifugieren (Eppendorfzentrifuge 13.200 rpm), Überstand abgießen
- Zellen in 250 µl 20% Saccharose in TE resuspendieren
- Zugabe von 250 µl RNase/Lysozym-Lösung (frisch), durchmischen (nicht vortexen!)

- 30-60 Min bei 37°C inkubieren (Brutschrank)
- Zugabe von 100 µl 5 % Sarkosyl-Pronase (5mg/ml) in TE (frisch)
- ca. 1 h (bei Bedarf ü/N) bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 70 µl 3 M NaAc, pH 5,2
- Zugabe von 200 µl Phenol, gut vortexen
- zweimal wiederholen:
  - Eppendorfgefäße mindestens 2 Min schütteln
  - 10 Min zentrifugieren (Eppendorfszentrifuge 13.000 rpm), obere Phase in ein neues Eppi überführen
  - 200 µl Phenol/Chloroform zugeben und gut mischen
- obere Phase in eine neues Eppendorfgefäß überführen und 700 µl Isopropanol (-20°C), zugeben
- durch invertieren mischen und ca. 10 Min bei -20°C inkubieren
- 10 Min zentrifugieren (Eppendorfszentrifuge 13.000 rpm)
- Überstand vorsichtig abziehen
- zweimal wiederholen:
  - 500 µl 70 % Ethanol zugeben, 5 Min bei RT stehen lassen
  - 5 min zentrifugieren (Eppendorfszentrifuge 13.000 rpm)
  - Überstand verwerfen
- den Rücklauf quantitativ abziehen
- Pellet im 60°C Brutschrank trocken (nicht zu lange!)
- Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O lösen
- 30 Min bei 65°C inkubieren
- mehrmals auf und ab pipettieren, bis eine viskose Lösung entsteht
- DNA kann bei 4°C gelagert werden.

#### **IV-2.2 Isolierung von Plasmid-DNA nach dem Tris-EDTA-LiCl-Triton (TELT)-Protokoll**

Es gibt vielzählige Methoden, um Plasmid-DNA zu präparieren. Sie unterscheiden sich stark im benötigtem Zeitaufwand, Reinheitsgrad und Ausbeute der gewonnenen DNA. Die TELT-Methode eignet sich besonders gut zur schnellen Analyse einer höheren Anzahl an Bakterienklonen, die Plasmidkonzentration kann aber für weitere Prozessierung zu niedrig ausfallen. Auch der Reinheitsgrad kann schwanken. Die Affinitätsaufreinigung über Säulen bietet eine kostenaufwendigere, aber immer zuverlässige Alternative an, die zu hohen Ausbeute und hohem Reinheitsgrad führt.

- 2 ml ü.N.- Kultur 5 Min bei 7.000 rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 160 µl TELT-Lsg. resuspendieren, 5,4 µl einer 50mg/ml Stammlösung Lysozym (270µg) zugeben und mischen
- 5 Min bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 Min bei 95°C inkubieren
- 8 Min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit einem sterilen Zahnstocher fischen und den Überstand mit 0,6 vol. Isopropanol versetzen (~100 µl)
- 15 Min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 0,5 vol 70% Ethanol waschen (~120µl)
- 5 Min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 5 Min bei 65°C trocknen
- das Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O/RNase aufnehmen (0,2 µg RNase/Isolierung)
- 5 Min bei Raumtemperatur inkubieren
- 5 Min bei 65°C das Pellet lösen
- DNA auf Eis lagern

#### **IV-2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von "QIAprep Spin Miniprep Kit"**

Die Puffer P1, P2, N3, PB und PE stammen aus dem QIAGEN „QIAprep Spin Miniprep Kit“.

- Die Bakterien über Nacht in 5 ml LB-Flüssigmedium anziehen
- 3 ml der Zellsuspension in einem Eppendorfgefäß 1 min zentrifugieren (Eppendorfszentrifuge 13.000 rpm)
- das Pellet in 250 µl P1-Puffer resuspendieren (P1 + RNase)
- 350 µl Puffer N3 hinzugeben und 4-6 invertieren
- 10 min in der Eppendorfszentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugieren
- der Überstand auf die Silikasäule geben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- den Durchfluß verwerfen
- optional: 500 µl Puffer PB auf die Säule geben (1. Waschung) und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Durchfluß verwerfen
- 750 Puffer PE auf die Säule geben (2. Waschung) und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

- Durchfluß verwerfen
- die Säule zum Trocknen erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- 50 µl Puffer EB zur Elution auf die Säule gegeben und 1 min stehen lassen
- die Säule in ein steriles Eppendorfgefäß überführen und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- die eluierte Plasmid-DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern

#### **IV-2.4 Konzentrationsbestimmung der DNA**

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA (Gesamt-DNA, Plasmid-DNA) oder modifizierten DNA (Gelaufreinigung, Restriktion, PCR, Phi29-RCA etc.) erfolgte mit Hilfe einer spektrophotometrischen Messung je eines Mikroliters der DNA-Lösung im NanoDrop-Gerät (Thermo Fisher Scientific).

#### **IV-2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe. Die DNA-Moleküle sind aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Molekülgröße, der DNA-Konformation (linear, offen, superhelikal), der angelegten Feldstärke und der Agarosekonzentration. Die DNA wird vor dem Beladen der Geltaschen mit Bromphenolblau-Ladungspuffer versetzt, was die Diffusion der DNA aus der Geltasche verhindert und auch als Anhaltspunkt über die zurückgelegte Laufstrecke dient. Nach dem Färben in Ethidiumbromidlösung werden die aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht.

- 1 – 2 % Agarose (je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente) in TA-Elektrophoresepuffer aufkochen
- Agarose in Gelkammer füllen und geeigneten Kamm einsetzen
- Gel nach dem Auspolymerisieren mit TA-Elektrophoresepuffer überschichten und Kamm entfernen
- DNA-Probe mit ca. 3 µl BPB-Ladepuffer versetzen und in Geltaschen füllen
- Gel bei 90-100 V laufen lassen
- Gel ca. 5 min in EtBr-Lösung färben, wässern und unter UV-Licht fotografieren

#### **IV-2.6 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten**

Über einen weiten Größenbereich der DNA besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen dem natürlichen Logarithmus der Länge des Fragments (in bp) und der relativen Wanderungsdistanz im Agarosegel. Durch Vergleich der Laufstrecke mit einem als Referenz auf das Gel aufgetragenen

Längenmarker (DNA-Marker von MBL) kann die gesuchte Größe des DNA-Fragmentes bis auf ca. 100 bp genau bestimmt werden.

#### **IV-2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels "MN Nucleospin Extract II"**

Restriktionsfragmente für die Klonierungen wurden nach der Auftrennung aus Agarosegelen mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" isoliert. Die Methode ist zur Gewinnung reiner DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 10 kb gut geeignet.

- das Gel nur unter langwelligem UV-Licht darstellen
- DNA-Fragment im Gel kennzeichnen und mit Skalpel heraustrennen
- Gelausschnitt in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wiegen und 3 Vol des QG-Puffers pro Volumen Gel zusetzen (100 mg 1%-Agarosegel ~100µl; maximale Gelmasse pro Eppendorfgefäß = 300 mg)
- 10 min Inkubation bei 50°C, Ansatz alle 2 bis 3 min vortexen, oder auf dem Eppendorf Thermomixer inkubieren
- nach vollständiger Suspension des Agarosegels pH-Wert der Lösung anhand QG-Pufferfarbindikators überprüfen (optimale DNA-Bindung an Säule bei pH 7,5; Farbindikation gelb)
- optional: für DNA-Fragmente < 500 bp und >4 kb 1 Vol Isopropanol zugeben und vortexen
- QIAquick-Säule in 2 ml-Gefäß platzieren, die Suspension darauf pipettieren und bei 13 000 rpm 1 min zentrifugieren (bei Endvolumen > 800 µl mehrfach laden und zentrifugieren); Durchfluss verwerfen
- optional: 0,5 ml QG-Puffer auf Säule pipettieren, 1 min zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- Säule mit 0,75 ml PE-Puffer waschen und für 1 min zentrifugieren (DNA für *blunt-end* Ligationen nach Zugabe des Waschpuffers etwa 2 bis 5 min ruhen lassen)
- Durchfluss verwerfen und 1 min trocken zentrifugieren
- QIAquick-Säule in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführen und DNA mit 30 bis 50 µl Millipore-Wasser oder EB-Puffer auf das Säulenzentrum eluieren
- je 1 min inkubieren und zentrifugieren

### **IV-3. Restriktion und Modifikation von DNA**

#### **IV-3.1 DNA- Restriktion mit TypII Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle in Fragmente zerschneiden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen von TypII verwendet. Diese erkennen



und schneiden DNA spezifisch innerhalb bestimmter palindromischer Sequenzen. Dabei entstehen entweder versetzte ("*sticky-ends*") oder glatte Enden ("*blunt-ends*").

Eine effiziente Spaltung der eingebrachten DNA wird mit etwa 1 U Restriktionsenzym pro 1 µg zu spaltender DNA unter den vom Enzymhersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen (zumeist 37°C, enzymspezifische Ionenkonzentrationen) erreicht.

#### Exemplarischer Spaltungsansatz (V<sub>end</sub> 20µl):

- Vorlegen sterilen Millipore Wassers im Eppendorfgefäß ( $V_{\text{Wasser}} = V_{\text{End}} - V_{\text{Spaltungskomponenten}}$ )
- Gewünschte Menge DNA-Lösung dazupipettieren
- 1/10 Vol TA-Restriktionspuffer (10x)
- kalkuliertes Restriktionsnukleasen-Volumen (1U/µg zu spaltender DNA)
- Spaltungsansatz mischen und beim Temperaturoptimum des eingesetzten Restriktionsenzym je nach Bedarf 1h bis ü/N inkubieren
- Inaktivierung des Enzyms durch 15 min bei -80°C oder 15 min Inkubation bei 65°C

### **IV-3.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden**

Um eine Religierung eines mit nur einem Restriktionsenzym gespaltenen Vektors ohne Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes zu verhindern, wird der Vektor vor der Durchführung einer Ligation mit alkalischer Phosphatase behandelt. Das Enzym katalisiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen, die zum Ringschluss des linearisierten Vektors benötigt werden. Danach kann das Plasmid nur noch mit den 5'-Phosphatgruppen des zu ligierenden Inserts reagieren.

#### Exemplarischer Dephosphorylierungsansatz:

- 20 µl gespaltene DNA
- 2 µl Shrimp Alkaline (SA) Phosphatase-Puffer (10x)
- 1 µl SA-Phosphatase (1 U/ µl)
- Reaktionsansatz mischen und 10 min – 1 h bei 37°C inkubieren
- Inaktivierung des Enzyms 10 min bei 65°C

### **IV-3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es, geringste Mengen DNA *in vitro* zu vervielfältigen, wenn die flankierenden Sequenzen des gewünschten DNA-Fragmentes bekannt sind. Auf dem Markt befindet sich weine breit gefächerte Auswahl an den benötigten thermostabilen DNA-Polymerasen, die sich durch spezifische Eigenschaften voneinander unterscheiden. Hierzu zählen die Aktivierungsbedingungen für das Enzym, die Pufferbedingungen, die Polymerisationsgeschwindigkeit, oder das Vorhandensein einer 5'-3'-Exonukleaseaktivität.

Exemplarischer PCR-Ansatz:

- 2,5 µl 10x-Puffer
- 2,5 µl PCR-dNTP-Mix (200 µM)
- 2 µl Primer (200 nM)
- 2 µl Template DNA
- 1-1,5 U Polymerase
- 2 µl MgCl<sub>2</sub> (1,5-2mM)
- H<sub>2</sub>O auf 25µl Reaktionsvolumen auffüllen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz. Im Folgenden sind die wichtigsten Eigenschaften und die Standard-PCR-Bedingungen für die verwendeten DNA-Polymerasen aufgelistet.

Enzym	Hersteller (diese Arbeit)	Organismus	(°C)Temp Optimum	Exonuklease Aktivität	Fehlerrate X10-6	weitere Eigenschaften
<i>Taq</i>	Fermentas	<i>Thermus aquaticus</i>	75-78	5'-3'	20-100	poly-A-Überhänge
<i>Pfu</i>	Fermentas	<i>Pyrococcus furiosus</i>	72-78	3'-5'	1,6	Proofreading-Aktivität, <i>blunt-end</i> -Produkte

Tab. IV- Eigenschaften der verwendeten thermostabilen DNA Polymerasen

Schritt	Temp.	<i>Taq</i>	<i>Pfu</i>
1. Primäre Denaturierung	95°C	90 sec	90 sec
2. Zyklische Denaturierung	94°C	30 sec	30 sec
3. Annealing		<i>primerabhängig</i>	
4. Polymerisation	72°C	30 bp/sec	15 bp/sec
5. Zyklen		30 x zu 2.	
6. Finale Polymerisation	72°C		10 min
7. Kühlung	4°C		bis Ende

Tab. IV- Standard PCR-Bedingungen für verwendete Polymerasen

#### IV-3.4. Aufreinigung von PCR Produkten mittels "QIAquick-PCR-Purification Kit"

Die Methode des QIAquick PCR-Purification-Kits beruht auf der Bindung von einzel- oder doppelsträngigen DNA-Fragmenten einer bestimmten Größenordnung (hier 100 bp bis 100 kb) an das Material einer Ionenaustauschersäule. Kleinere DNA-Fragmente, wie z.B. Primer oder große Moleküle, können nicht an das Säulenmaterial binden und werden durch Waschung der Säule abgetrennt.

Puffer PB, PE, EB sind Bestandteile des Kits.

- aufzureinigendes PCR-Fragment mit fünffachem Volumen PB-Puffer mischen
- Gemisch auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13 000 rpm
- Durchlauf verwerfen
- 750 µl PE-Puffer auf Säule geben
- 1 min zentrifugieren, 13 000 rpm
- Durchlauf verwerfen
- erneut 1 min zentrifugieren, 13 000 rpm
- Säule in ein frisches Eppendorfgefäß überführen
- 30 µl EB-Puffer, oder Millipore-Wasser mittig auf die Säule geben
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min zentrifugieren, 13000 rpm
- der Durchlauf enthält die aufgereinigte DNA

#### IV-3.5 Ligation

Das ATP-abhängige Enzym T4-DNA-Ligase ist in der Lage, die endständigen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen von DNA-Molekülen miteinander zu verknüpfen. Voraussetzung ist jedoch, dass die DNA-Moleküle zueinander komplementäre Einzelstränge ("*sticky-ends*") oder glatte Enden ("*blunt-ends*") aufweisen.

exemplarischer Ligationsansatz:

- kalkulierte Menge sterilen Millipore-Wassers ( $V_{\text{Wasser}} = V_{\text{End}} - V_{\text{Ligationkomponenten}}$ ) vorlegen
- vorgespaltene DNA-Moleküle im Mischverhältnis vom Vektor zum zu klonierenden DNA-Fragment von etwa 1:2
- 1/10 Vol Ligationspuffe (10x) zugeben
- 3 U der T4-Ligase hinzu pipettieren und gut mischen
- Inkubation bei 16°C ü.N.
- Deaktivierung der T4-Ligase 15 min bei 65°C

#### IV-3.6 Transposition *in vitro*

Für die Transposition *in vitro* wird eine mutierte, hyperaktive Form der Tn5 Transposase verwendet. Die Transposase ist in der Lage, aus einem beliebigen DNA-Fragment ein mobiles, an zufälligen

Stellen in eine vorgegebene Ziel-DNA springendes Transposom-Element zu formen. Voraussetzung ist eine Flankierung des DNA-Fragmentes mit Erkennungssequenzen der hyperaktiven Transposase, den sog. Mosaikenden (ME). Die Modifizierung der hyperaktiven Form der Transposase, sowie der Mosaikenden führt zu einer 1000-fachen Steigerung der Transposasesaktivität gegenüber der normalen Form der Tn5 Transposase. Das Enzym wurde in *E. coli* überexprimiert und dank eines integrierten, sich selbst abspaltenden Intein-Tag in einem Chromatographieschritt über eine Chitinsäule aufgereinigt.

#### **IV-3.6.1 Überexpression und Aufreinigung der hyperaktiven Transposase**

BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pWH1891 (Köstner et al. 2006) in 10 ml ü.N. Kultur in LB-Medium anziehen;

- 1L LB-Medium mit der Vorkultur inokulieren und 5-6h bei 23°C bis o.D.600 0.5 kultivieren
- die Expression der Transposase durch Zugabe von 500 µM IPTG zur Kultur induzieren und bei einer reduzierten Temperatur von 23°C weitere 3h kultivieren
- 15Min bei 5.000g und 4°C zentrifugieren
- Pellets in 80ml TEGX-Puffer resuspendieren
- 15Min bei 5.000g und 4°C zentrifugieren
- Pellets in 20ml TEGX-Puffer unter Zugabe von Proteaseinhibitoren resuspendieren
- 6 Mal für 30 Sek, mit Pausen von je 4 Min die Probe bei 4°C mit Ultraschall behandeln
- 1h bei 30.000 rpm und 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugieren
- den Überstand auf die mit Chitinbeads beladene Säule geben (4°C)
- mit TEGX-Puffer waschen
- die Selbstspaltung des Intein-Tags durch Zugabe von TEGX+DTT initiieren
- Inkubation ü.N. (4°C)
- Elution mit TEGX-Puffer in je 1,5 ml Fraktionen
- die Konzentration und Reinheit des Proteins in den Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung untersuchen

#### **IV-3.6.2 Durchführung einer *in vitro* Transposition-Reaktion**

Für eine effiziente Transposition sollte in einer Reaktion die gleiche Anzahl der Transposons und der Ziel-DNA-Moleküle vorhanden sein. Hier wurde das TgPT-0-Transposon (Sheridan et al. 2002) mit aufgereinigten DNA-Fragmenten der Größe von 3-5 kb aus isolierten, mit *PvuII*-Restriktionsenzym geschnittenen Gesamt-DNA von *S. meliloti* vermischt, mit dem Vorsatz, die transponierte DNA in einem weiteren Schritt in geeignete Vektoren zu klonieren.

- das TgPT-0 Transposons mit der Pfu Polymerase amplifizieren,

- das PCR-Amplifikat aufreinigen,
- die Konzentration auf 0,1 µg DNA/ml einstellen
- Einstellen der Ziel DNA auf eine Konzentration von 0,2 µg/ml
- den Reaktionsansatz in der folgenden Reihenfolge pipettieren:
  - 1 µl 10xReaktionspuffer
  - 0,2 µg konzentrierte Ziel-DNA
  - 1 µl Transposonlösung (0,1 µg/µl konzentriert)
  - 1 µl Transposase (100 ng/µl)
  - H<sub>2</sub>O ad 10 µl
- Inkubation für 2 Std bei 37 °C
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 µl Stopplösung
- Inkubation für 10 Min bei 70 °C
- Ansatz aufreinigen
- Elektroporation in *E. coli*, Selektion auf Kanamycin

#### **IV-3.7 Amplifikation von DNA mittels Phi29-Polymerase und "Rolling Cycle Amplification"**

Die Amplifikation erfolgt mit zirkulärer religierter DNA als Matrize und hexameren Primern zufälliger Zusammensetzung. In dem ersten Schritt wird die DNA durch Erhitzen in Einzelstränge denaturiert. Beim Abkühlen legen die Primer an, die restliche Reaktion erfolgt bei gleichbleibender Temperatur. Nach Phi29 Zugabe erfolgt die Wiederherstellung des komplementären Stranges, wobei die Polymerase eine Strangverdrängungsaktivität einsetzt, um lange Konkatemere der kopierten Matrize zu erstellen.

- aus folgenden Zutaten einen Reaktionsmix herstellen:
  - 2 µl zirkulärer DNA aus 25 µl Aufreinigung der Ligation
  - 1 µl Exonuklease-Resistenter Random Primer (500 µM)
  - 7 µl H<sub>2</sub>O
- den Reaktionsmix 3 Min bei 95°C erhitzen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- folgendes zugeben:
  - 2 µl 10x Phi29 Reaktionspuffer
  - 0,7 µl Phi29 Polymerase (10U/µl)
  - 1 µl dNTPs (10mM)
  - 6,3 µl MilliQ Wasser

bei 30°C ü.N. Inkubieren, 20 Min bei 65°C die Reaktion stoppen

## IV-4. DNA-Transfertechniken

### IV-4.1 DNA-Transfer mittels chemischer Transformation in kompetente *E. coli* -Zellen

#### IV-4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Freie Plasmid-DNA kann aus dem Medium in sog. kompetente Zellen aufgenommen werden. Die kompetenten *E.coli*-Zellen werden u.a. durch  $\text{CaCl}_2$ - oder  $\text{RbCl}$ -Behandlung gewonnen. Diese Behandlung ermöglicht den Plasmiden an der Oberfläche des kompetenten Bakteriums zu binden, bevor sie in das Cytoplasma aufgenommen werden. Die Herstellung kompetenter Zellen sollte möglichst mit vorgekühlten Materialien bei  $4^\circ\text{C}$  stattfinden. Bei einer sorgfältigen Durchführung ist eine Herstellung von dauerkompetenten Zellen mit der Effizienz von  $10^7$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA möglich.

- 500  $\mu\text{l}$  einer ü.N.-Kultur *E.coli* in 100 ml LB-Medium bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer o.D.<sub>600</sub> von 0,5-0,6 anziehen
- 15 Min auf Eis inkubieren
- 5 min zentrifugieren, 5.000 g,  $0^\circ\text{C}$
- Überstand verwerfen
- Pellet in 40 ml TfbI-Puffer ( $0^\circ\text{C}$ ) resuspendieren
- 15 min auf Eis inkubieren
- 5 min zentrifugieren, 5.000 g,  $0^\circ\text{C}$
- Überstand verwerfen
- Pellet in 4 ml TfbII-Puffer, ( $0^\circ\text{C}$ ) resuspendieren
- 15 Min auf Eis inkubieren
- Aliquots von je 100  $\mu\text{l}$  auf Reagenzgefäße verteilen und in flüssigen Stickstoff einfrieren
- Bei  $-80^\circ\text{C}$  lagern

#### IV-4.1.2 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Die Aufnahme des Plasmids in das Cytoplasma der kompetenten *E.coli*-Zellen erfolgt nach einem kurzfristigen Hitzeschock bei  $43^\circ\text{C}$ .

- Zu 100  $\mu\text{l}$  kompetenter *E.coli*-Zellen die zu transformierende DNA zugeben, vorsichtig mischen
- 30 Min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock 1 Min bei  $43^\circ\text{C}$
- 2 Min auf Eis stehen lassen
- 1 ml LB-Medium zugeben und vorsichtig mischen
- 45 min-1h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubieren

- 100 µl des Transformationsansatzes auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattieren
- Rest des Ansatzes 5 Min zentrifugieren, 6 000 rpm
- Überstand verwerfen
- Bakterienpellet im Rücklauf des Überstandes resuspendieren
- Auf Selektionsplatten ausplattieren
- Platten ü.N. bei 37°C inkubieren

#### **IV-4.2 DNA Transfer mittels Elektroporation**

Die Elektroporation von DNA in kompetente Zellen kann mit einer höheren Effizienz (ca.  $10^9$  cfu/µg DNA) als mit der chemischen Methode durchgeführt werden. Dabei müssen sowohl die Zellen als auch die DNA salzfrei sein, um Kurzschlüsse in der Reaktionsprobe zu vermeiden.

##### **IV-4.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* - Zellen**

- 100 ml LB-Medium mit 1 ml ü.N. Kultur animpfen;
- bei 37°C und 200 rpm bis zur einer o.D. von 0,6 inkubieren;
- mind. 10 Min im Eisbad abkühlen;
- 10 Min bei 4°C und 5.000g zentrifugieren;
- Übersand verwerfen, Pellet im 100 ml eiskalten Millipore Wasser resuspendieren;
- diese Waschschriffe 3 x wiederholen;
- in 200 µl 10% Glycerin in H<sub>2</sub>O resuspendieren;
- Aliquotieren a 50µl, bei -80°C lagern;

##### **IV-4.2.2 Elektroporation kompetenter Zellen**

- elektrokompetente Zellen auf Eis auftauen;
- 25 µl der Zellen in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführen;
- DNA-Lösung hinzugeben;
- Elektroporation bei *E. coli* mit 1,8 kV
- sofort 1ml SOC-Medium zugeben und 1 h bei 37°C rollend inkubieren;
- ausplattieren auf entsprechende Antibiotikahaltige LB-Platten;

#### **IV-4.3 DNA-Transfer mittels Konjugation (nach Simon et. al., 1983)**

Im Gegensatz zu *E.coli* sind *S.meliloti*-Zellen nicht in der Lage, DNA mittels Transformation aufzunehmen. Eine Möglichkeit den DNA-Transfer von Plasmiden zu erwirken besteht in der Konjugation mit einem geeigneten Donorstamm. Der zu transferierende Vektor muss in diesem Fall eine Mobilisierungsregion (*mob*-site) aufweisen. Ferner müssen die Genprodukte der Transfer-Gene

vorliegen. Verwendung findet in diesem Fall der mobilisierbare Vektor pG18mob2 (Kirchner & Tauch 2003), und der Donorstamm *E.coli* S17-1, welcher ein chromosomal integriertes RP4-Plasmidderivat aufweist, das die *tra*-Gene trägt.

- Kreuzungsstämmen aus Einzelkolonien in Flüssigmedium selektiv ü.N. anziehen
- Donor am Morgen überimpfen und bis zur spätlogarithmischen Phase wachsen lassen (o.D.<sub>600</sub> 0,6-0,8)
- 0,5 ml Donor und 0,8 ml Rezipientenkultur in ein Eppendorfgefäß pipettieren und abzentrifugieren, zur Kontrolle Donor und Rezipient einzeln in Eppendorfgefäße pipettieren und weiter wie die Kreuzungsstämmen behandeln.
- Überstand abgießen
- Bakterienpellet im Rücklauf vorsichtig mischen
- Kleine Nitrocellulosefilter auf vorgewärmte Agarplatten legen
- Das konzentrierte Kreuzungsgemisch auf die Filter pipettieren
- Die Platten im Brutschrank bei 30°C ü.N. bebrüten
- Für die Kreuzung nach *Rhizobium* jeweils 1 ml steriles Millipore-Wasser in Eppendorfgefäße vorlegen
- Die Filter mit einer abgeflamnten Pinzette abnehmen und in die Eppendorfgefäße übertragen
- Vortexen, bis eine homogene Suspension entstanden ist
- Jeweils 100 µl der unverdünnten Bakteriensuspension und der geeigneten Verdünnungstufen auf Selektionsplatten ausplattieren
- Drei Tage bei 30°C bebrüten

Bei den Kontrollen mit Donor bzw. Rezipient dürfen keine, bzw. eine um mehrere Größenordnungen (Faktor 1000) niedrigere Zahl, Kolonien auftreten.

#### **IV-4.4 Sequenzierung**

Die erstellten Plasmidkonstrukte, sowie die Insertionsorte des Transposons in *S. meliloti* Genom nach Phi29-Amplifikation und iPCR wurden mittels Sequenzierungen analysiert. Diese wurden von der "Sequencing Core Facility" der Universität Bielefeld durchgeführt.

#### **IV-5. Identifizierung rekombinanter DNA**

##### **IV-5.1 Identifizierung rekombinanter Vektoren durch $\alpha$ -Komplementation**

Die Identifizierung der erfolgreichen Ligation eines gewünschten Inserts in die „multiple cloning site“ (MCS) einiger in dieser Arbeit verwendeten Vektoren erfolgt nach der Methode der  $\alpha$ -



Komplementation (Sambrook et al., 1989). Diese Methode basiert auf der Umsetzung des Substrates 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid (X-Gal) durch das lacZ-Genprodukt  $\beta$ -Galactosidase, was zu einer Blaufärbung führt. Der verwendete Wirtstamm (*E.coli* DH5 $\alpha$ ) ist aufgrund einer Mutation im lacZ $\alpha$ -Genfragment nicht mehr in der Lage eine funktionstüchtige  $\beta$ -Galactosidase zu synthetisieren. Da die Vektoren jedoch ein lacZ $\alpha$ - Genfragment tragen, kann das  $\alpha$ -Peptid mit dem chromosomal kodierten lacZ $\Delta$ M15-Genprodukt assoziieren, wodurch wieder eine funktionstüchtige  $\beta$ -Galactosidase zu Verfügung steht. Durch die Klonierung eines DNA-Fragmentes in die MCS wird jedoch das lacZ $\alpha$ -Genfragment unterbrochen. Auf diese Weise lassen sich rekombinante Klone auf X-Gal-haltigem Medium leicht an der fehlenden Blaufärbung erkennen.

#### **IV-5.2 Positivselektionierung von rekombinanten Bakterien**

Das Durchführen von gentechnischen Arbeiten erfordert die Selektion von Rekombinanten mit dem gesuchten gentechnisch veränderten Merkmal. Die positive Selektion ermöglicht die Auffindung von Bakterienklonen die mit dem gewünschten Vektor transformiert wurden oder das Transposon tragen und nutzt dabei die vermittelten Resistenzmerkmale gegen diverse Antibiotika.

#### **IV-5.3 Negativselektionierung von rekombinanten Bakterien**

Zur Auffindung der *Sinorhizobium meliloti*-Rekombinanten, die mit einem erfolgreichen Cre Rekombination die Antibiotikaresistenz verloren haben, muss auf den Verlust der Neomycin-Resistenz durch die Bakterien selektioniert werden.

Dabei werden nach einer Anzucht der Kultur unter Induktionsbedingungen der Cre Rekombinase ausplattierte bakterielle Einzellkolonien zuerst auf ein Neomycin-haltiges Medium mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers übertragen. Hier sollte nach einer erfolgreichen Exzision des Antibiotikumresistenzgens aus dem Transposon im Genom der Bakterien kein Wachstum der Kolonie stattfinden. Mit dem gleichen Zahnstocher werden die Bakterien auf einen Streptomycin-haltigen Nährboden übertragen, wo die Streptomycin-tolerierenden *S. meliloti*-Kolonien wachsen sollen. Als Hilfe für die Lokalisierung der zu vergleichenden Kolonien werden Rasterschablonen für Agarplatten verwendet.

### **IV-6. Fluoreszenzmikroskopie**

#### **IV-6.1. Erzeugung Agar-beschichteter, gefärbter Objektträger oder Deckgläschen für Fluoreszenzmikroskopie von Mikroorganismen.**

**Agar Grundbasis:** Agar guter Qualität (Agar Microscopy grade, Sigma), wird mehrmals mit dest.

Wasser gewaschen, um Staub und kleine Partikel zu entfernen. Anschließend wird das Agar in entsprechender Menge dest. Wasser gelöst, um eine 4% Konzentration zu erreichen. Agar autoklavieren.

#### **Sudan Black Beschichtung:**

Sudan Black-Stammlösung:

- 1 oder 2 mg Sudan Black in 100 ml EthOH

25 ml der Stammlösung werden mit 25 ml dest. Wasser vermischt, auf 60°C erhitzt und zu 50 ml geschmolzenen 4% Agar zugegeben.

#### **Amido Black Beschichtung:**

Amido Black- Stammlösung:

- 0,05 g Amido Black
- 3,75 ml Eisessig
- 10 ml 100% MethOH
- auf 50 ml mit dest. Wasser auffüllen

25 ml der Stammlösung werden mit 25 ml dest. Wasser vermischt, auf 60°C erhitzt und zu 50 ml geschmolzenen 4% Agar zugegeben.

#### **Durchführung:**

Agar-Farbstoff-Lösung im Wasserbad warm halten. 1 ml entnehmen und auf jedem Objektträger im Zickzack von oben nach unten verteilen. Trocknen lassen.

### **IV-7. Immunonachweis der Fusionsproteine in Kulturextrakten mittels Western-Blot mit einem anti-GFP Antikörper**

Der Nachweis der Integrität der eGFP-Fusionsproteine wurde mittels der Western-Blot-Methode erbracht. Die Gesamtzellextrakte wurden im ersten Schritt mit Hilfe der SDS-PAGE entsprechend der Größe der Proteine aufgetrennt und danach auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis der eGFP-Fusionsproteine in der jeweiligen Gesamtproteindarstellung wurde mit Hilfe einer Immunreaktion mit einem Anti-eGFP Antikörper, gekoppelt an eine Signal verstärkende Reaktion mit einem HRP-markierten Sekundärantikörper und anschließender ECL-Reaktion durchgeführt.

#### **IV-7.1 SDS-PAGE**

Die Proteine werden entsprechend ihrer Größe typischerweise mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Vorbehandlung der Proben mit dem Detergenz SDS erfüllt dabei vielerlei Funktionen: die Proteine werden durch die Auflösung der räumlichen Strukturen in eine gestreckte Form gebracht und mit den SDS-Molekülen in einem konstanten Verhältnis zur ihrer Größe beladen. Dies macht es

möglich, Proteine in einem elektrischem Feld in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe aufzutrennen.

- Glasplatten, Spacer und Kämme mit Millipore-Wasser und anschließend mit 70% Ethanol säubern;
- Gießvorrichtung zusammenbauen;
- die Trenngellösung einfüllen und mit Wasser überschichten, mind 1 h auspolymerisieren lassen;
- Wasser entfernen, Kamm einsetzen und das Sammelgel giessen, 1 h polymerisieren lassen;
- das fertige Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen und die Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer füllen, Kamm entfernen;
- die Proben mit 5x-SDS-Probenpuffer versetzen, 5 Min aufkochen und auf das Gel auftragen;
- Proben bei 80V in das Gel einlaufen lassen, bis sie das Trenngel erreicht haben;
- 1,5 - 2h bei 100-120V weiterlaufen lassen;

Das Gel kann nun einer Gesamtproteinfärbung mit z.B. Coomassie unterzogen werden. Dies wurde im Rahmen der Arbeit für den Nachweis der Aufreinigung der hyperaktiven Transposase durchgeführt. Im Falle einer gewünschten Nachweisreaktion mit einem Antikörper werden die aufgetrennten Proteine mittels Elektroblothing auf eine PVDF-Membran übertragen.

#### **IV-7.2 Elektroblothing**

Im Laufe eines Elektroblothingvorgangs werden die zuvor aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen, wobei das Trennungsmuster erhalten bleibt. Im Tank-Blot-Verfahren (Wet-Blotting) werden die zusammengesetzten Blot-Vorrichtungen in einem mit Puffer gefüllten Behälter eingesetzt und in einem elektrischem Feld werden die mit SDS beladenen Proteine auf die Blotting-Membran transferiert.

- im Anschluss an die SDS-PAGE das Gel aus der Vorrichtung entnehmen und 20 Min im TB-Puffer equilibrieren
- PVDF-Membran entsprechend der Gelgröße zurechtschneiden und einige Sekunden in Methanol eintauchen;
- die Membran 5 Min in Millipore Wasser waschen
- 15 Min im TB-Puffer equilibrieren
- die Blotvorrichtungen zusammen bauen: den Sandwich-Rahmen aufklappen, die mit TB-Puffer durchtränkten Schwammeinlagen auflegen, je zwei Lagen durchtränkten Gel-Blotting-Papier darauf legen, die Membran und das Gel luftblasenfrei in der Mitte platzieren,

- die Sandwich-Seiten zusammenklappen;
- die Blot-Sandwiches in einem mit TB-Puffer gefüllten Blot-Tank einsetzen, dabei auf die Position der PVDF-Membran bezüglich der Wanderrichtung der Proteine im elektrischen Feld achten;
- ca. 1,5h bei 100 mA blotten;

#### **IV-7.3 Immunonachweis**

Der Immunonachweis dient einem sensitiven und spezifischen Nachweis eines Zielproteins mit einem entsprechendem spezifischen Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Anti-GFP-Antikörper (gegen das gesamte GFP-Protein) verwendet. In einem zweiten Schritt erfolgt die Bindung eines Sekundärantikörpers, das mit Horseradish-Peroxidase (HRP) markiert ist.

Die Blockierung der Membran kann entweder in 5% Magermilchpulver oder in 1% BSA-Lösung stattfinden. Als Puffer wird TBS-Puffer verwendet. Die Inkubationsschritte werden in einem 50ml PE-Röhrchen auf einem Roller durchgeführt, um eine regelmäßige Verteilung der Lösungen bei minimalem Verbrauch der Antikörper zu gewährleisten.

- Die PVDF-Membran mit gebundenen Proteinen in TBS-Puffer mit 5% Magermilchpulver 1h inkubieren;
- 3x 10 min mit TBS waschen;
- ü.N. bei 4°C mit 10 ml TBS mit 5% Magermilchpulver und 1µl Anti-GFP-Antikörper inkubieren (Kaninchen Anti-GFP, 1:10.000 Verdünnung);
- 3x 10 Min mit TBS waschen;
- 1 h bei RT mit 10 ml TBS + 5% Magermilchpulver und 1 µl Sekundärantikörper inkubieren (Ziege Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert, 1:10.000 Verdünnung);
- 3x 10 Min mit TBS waschen;

Die Membran ist bereit für den Nachweis mittels Chemolumineszenz.

#### **IV-7.4 Nachweisreaktion und Größenbestimmung der Proteine am Fusion FX7-Analysegerät**

Die "enhanced chemical fluorescence"-Reaktion basiert auf der Peroxidase-Aktivität, im Rahmen deren ein Acridinum-Ester erzeugt wird, der mit Wasserstoffperoxid abreagiert. Während dieser Reaktion wird Chemolumineszenz erzeugt, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann, oder mit Hilfe einer sensitiven Kamera dokumentiert werden kann.

Die PVDF-Membran mit gebundenen Antikörpern wird in einer 1:1-Mischung der beider ECL-Reaktionslösungen 1 und 2 inkubiert (min 5 Min). Im Anschluss kann der Nachweis erfolgen.

Nach einer Kallibrierung des Fusion FX7-Gerätes wird die Membran auf der Ablage platziert und

die Kammer des Gerätes verschlossen. Zuerst wird ein Hellfeldbild der Membran aufgenommen, um die Position der Markerbanden zu dokumentieren. Die Belichtungszeit für die Detektion der Chemolumineszenz kann frei gewählt werden. Die beiden Aufnahmen können nachträglich zu einem Gesamtbild kombiniert werden.

## **IV-8. Pflanzen**

### **IV-8.1 Oberflächensterilisation von *Medicago sativa* Samen**

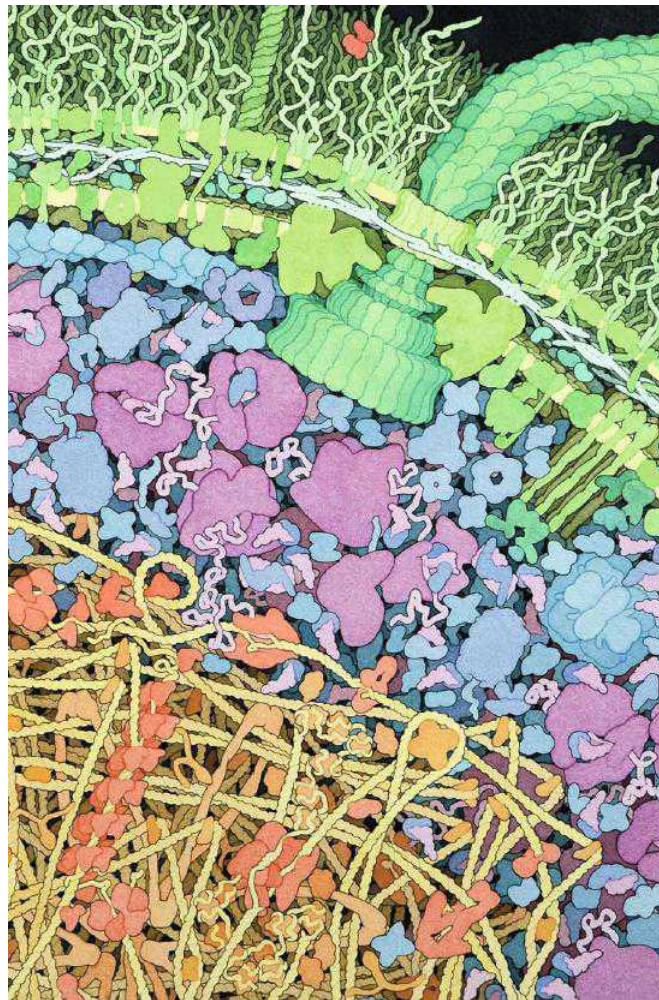
Die Pflanzensamen müssen oberflächensterilisiert werden, um aseptische Bedingungen für die Inokulation mit den Rhizobien Teststämmen herzustellen. Darüber hinaus schädigt die Säurebehandlung die Samenhülle (Testa), was zu einer verbesserten Wasseraufnahme führt und damit die Keimungswahrscheinlichkeit erhöht.

- Die Samen in einen 50 ml PE Röhrchen platzieren und mit konzentrierten (95-97%) Schwefelsäure überschichten (ca. 20 ml), 12 Min rollend inkubieren  
(bei einer kleinen Samenanzahl kann die Behandlung im 1,5 ml Gefäß stattfinden, die Volumina können dafür um das 40-fache reduziert werden)
- Die Säure abgiessen und quantitativ abpipettieren
- 40 ml steriles Millipore Wasser zugeben, 2-3 Mal invertieren, Wasser entfernen
- 40 ml Millipore Wasser zugeben, 2-3 Min inkubieren, Wasser entfernen
- die Waschschrte 2 weiteren Male wiederholen
- die Samen mit Wasser bedecken (5-6 ml) und 30-40 Min im Licht stehen lassen
- mit abgeflamtem Spatel auf Pflanzenagar grob auslegen, mit Parafilm versiegeln und in Aluminiumfolie einpacken
- für ca. 24 h bei 4°C inkubieren
- senkrecht stellen und für ca. 36 h im Dunkeln keimen lassen

### **IV-8.2 Anzucht von *Medicago sativa* auf Festmedium und Inokulation der Pflanzen**

- Keimlinge auf Schrägagarplatten (drei oder vier Stück pro Agarplatte) mit der Radikula in Richtung zunehmenden Mediums auf ca. Äquatorlinie auslegen
- Pro Platte 100 µl einer *Sinorhizobium meliloti* 48h-Kultur mit einer sterilen Glaspipette unterhalb der Wurzeln ausstreichen
- In der Klimakammer bei 24°C, 70 % Luftfeuchtigkeit und einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 16 h zu 8 h inkubieren.

## V Ergebnisse



David S. Goodsell - "Inneres einer Bakterienzelle"

## V Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur fluoreszenten Markierung von Proteinen in einem Bakterium zu etablieren, die folgende Kriterien erfüllen würde:

- die Fusionsproteine sollen unter der Kontrolle der nativen Promotoren verbleiben, um eine Überexpression und Falschlokalisierung bzw. Degradation des Proteins durch die Verwendung von heterologen Promotoren zu vermeiden. Native Promotoren erlauben demnach auch eine Beobachtung der Proteinexpression, in Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen und auch während der stickstofffixierenden Symbiose mit den Leguminosen;
- die Fusion an dem fluoreszenten Marker sollte intern bezüglich der Aminosäuresequenz erfolgen, nicht N- oder C-terminal, um Überdeckung von Signalpeptiden oder anderen für die Funktion und Lokalisierung eines Proteins essentiellen Bereichen zu vermeiden;
- die Insertion einer fluoreszente Markierung innerhalb der Aminosäuresequenz sollte zufällig erfolgen, um die Suche nach einer geeigneten, nicht lethalen und die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigenden Insertionsstelle zu beschleunigen und um auch unbekannte und hypothetische Proteine zu finden und beobachten zu können.

Die mit Hilfe der etablierten Methode erstellten *S. meliloti* Stämme sollten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, um ihre Lokalisationsmuster zu charakterisieren und die markierten Proteine sollten identifiziert werden, um Aussagen zur Korrektheit der Beobachtung und zur Verifizierung der Methode treffen zu können. Die Aktivität der Fusionsproteine sollte auch in den Bakteroiden in den Wurzelknöllchen während der Symbiose mit den Pflanzen der Gattung *Medicago* untersucht werden.

### **V-1. Erstellung fluoreszent markierter *Sinorhizobium meliloti* Stämme mittels *in vitro***

#### **Transposition konnte nicht effizient umgesetzt werden**

Im Jahr 2002 stellte die Autorengruppe um Dr. Thomas Hughes ein Transposon basiertes System zur Erstellung von eGFP-Fusionsproteinen vor (Sheridan et al. 2002). Die geschilderte Reaktion erfolgt *in vitro* durch Zugabe des hyperaktiven Transposase Proteins zu einem Mix aus dem Transposon und der Ziel-DNA, z.B. einem Vektor, der das Gen für ein Protein von Interesse beinhaltet. Das Transposon (ABB. V-1) wird von modifizierten Mosaiksequenzen für die Erkennung durch die hyperaktive Form der Transposase flankiert, es beinhaltet das Gen für die GFP-Variante mit verbesserten Eigenschaften "enhanced GFP" ohne Start- und Stopp-Kodon, um eine echte Fusion im internen Abschnitt eines Ziel-Proteins zu gewährleisten und ein Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion transponierter Klone. Das Kanamycin-Resistenzgen beinhaltet ein

Stopp-Kodon, was zur Produktion trunkierter Proteine im ersten Schritt führt, es kann aber nachträglich durch eine Restriktion mit *SrfI*-Enzym vollständig entfernt werden. Nach der Entfernung des Selektionsmarkers stört das Transposon nicht den Verlauf des Leserasters des fusionierten Gens. Das Transposon lag zur Beginn dieser Arbeit vor und sollte zur Erstellung eGFP-Fusionsproteine in *S. meliloti* benutzt werden.

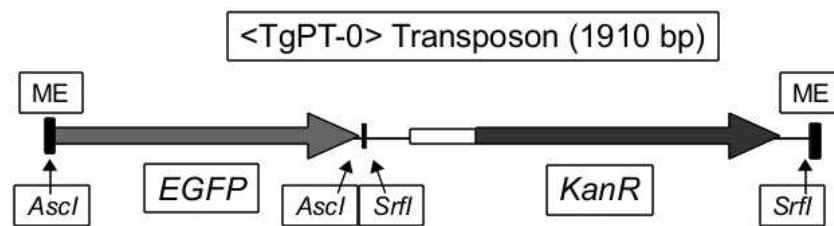


ABB.V-1. Schema des TgPT-0 Transposons. Das Transposonkonstrukt wird durch die Erkennungsbereiche für die hyperaktive Transposase, die sog. Mosaikenden (ME, je 19 bp) flankiert. Das *egfp* Gen enthält kein Start- und Stoppkodon und kann bei Bedarf durch eine Restriktion mit *AscI* durch einen anderen Marker ersetzt werden, z.B. ein anderes fluoreszentes Protein. Die Kanamycinresistenz enthält ein Stoppkodon und führt nach der Produktion eines Fusionsproteins zunächst zu trunkierten Proteinen. Das Resistenzgen kann durch *SrfI* Restriktion entfernt werden, danach ist das übrig gebliebene Konstrukt genau 774 bp lang und führt bei einer erfolgreichen "in-frame" Insertion in ein Zielgen zu keiner Verschiebung des Leserasters.

### V-1.1. *In vitro* Transposition isolierter Gesamt-DNA und weitere gentechnische Manipulationen zur Herstellung fluoreszenter Fusionsproteine in *S. meliloti*

Eine Möglichkeit der genomweiten Insertion des GFP-Gens in Gene des Zielbakteriums ist die *in vitro* Transposition mit einem GFP-tragenden Transposon. Für diesen Ansatz wird genomische DNA des Bakteriums isoliert, fragmentiert und dann mit einem geeigneten Transposon *in vitro* mutagenisiert. Für die Fragestellung dieser hier vorliegenden Arbeit sollte die aus *S. meliloti* isolierte DNA in Abschnitte von 3-5 kb fragmentiert werden und nach dem Beladen mit eGFP-Transposons in einen geeigneten Vektor kloniert werden, um nach dem Entfernen des Selektionsmarkers aus dem Transposon von *E. coli* nach *S. meliloti* mobilisiert werden zu können (s. ABB. V-2).



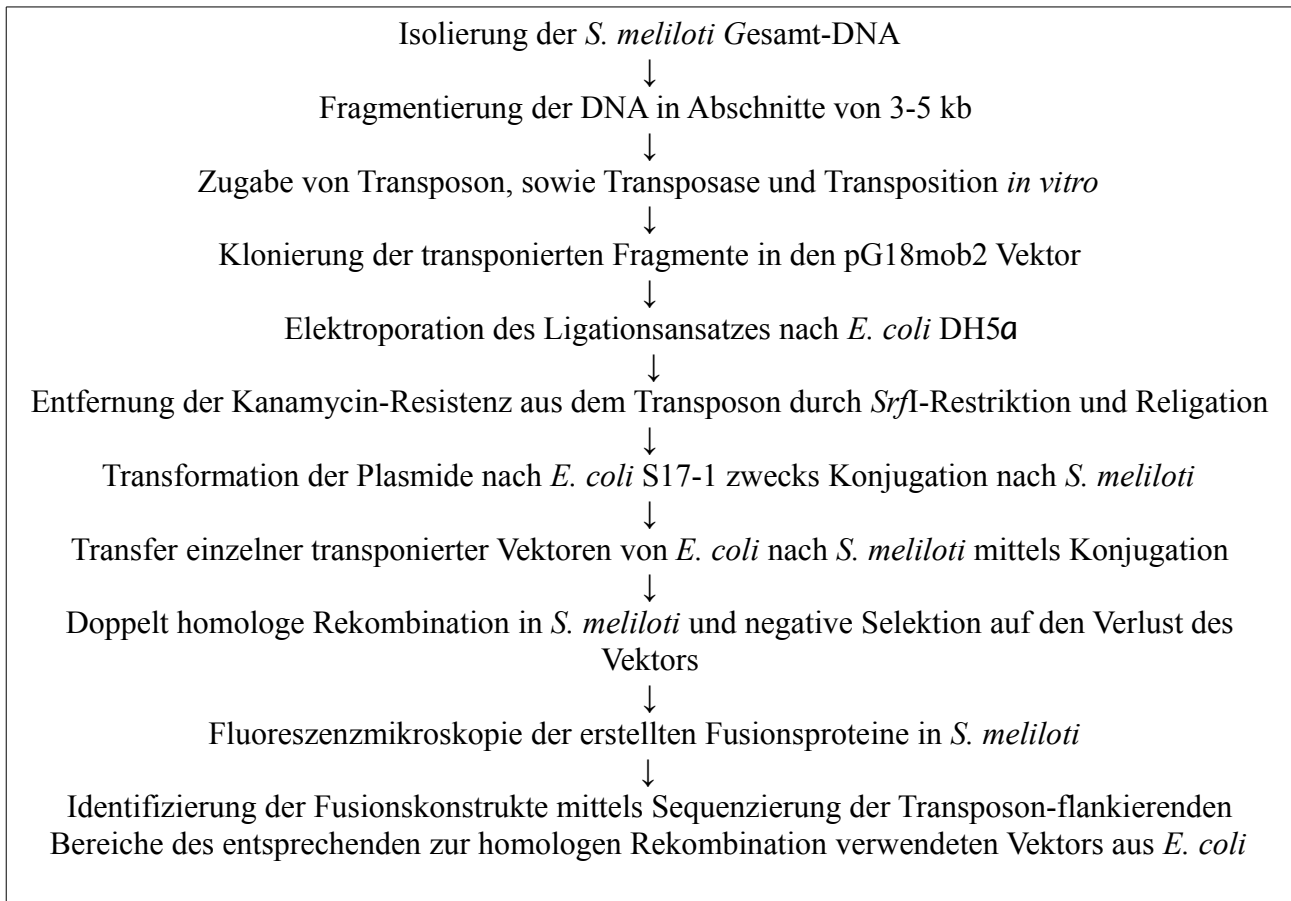


ABB.V-2. Schema der Strategie zur Erstellung fluoreszenter Proteine in *S. meliloti* mittels der *in vitro* Transposition. Die Methode beherbergt einige problematischen Schritte, wie Isolierung einer ausreichenden Menge an DNA des gewünschten Größenbereiches; die Transposition in möglichst mittlere Sequenzabschnitte der genomischen DNA-Fragmente, damit genügend lange homologen Bereiche für die spätere Rekombination ins *S. meliloti* Genom verbleiben; die wiederholte *SrfI*-Restriktion und Religation des Vektors zum Verlust der transposonkodierten Kanamycinresistenz und zahlreiche unnötige homologe Rekombinationen von eventuell nicht-kodierenden Genomsequenzen.

Die genetischen Fragmente sollten eine Größe von 3-5 kb besitzen, um nach einer Insertion des Transposons mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit flankierende sequenzhomologe Bereiche von ca. 1-2 kb zu erhalten, die eine homologe Rekombination mit der genomischen Sequenz ermöglichen.

Im Rahmen der Arbeit wurden zuerst verschiedene Ansätze zu Fragmentierung des genetischen Materials und zur anschließenden Erstellung einer Plasmidbank mit Transposon-beladenen genomischen DNA-Fragmenten aus *S. meliloti* untersucht. Die Fragmentierung des genetischen Materials wurde mechanisch durch den Einsatz von Ultraschall durchgeführt, gefolgt von einer Auffüllreaktion der gescherten Fragmentenden mit dem Klenow-Fragment der Polymerase und nach der Transposition einer „blunt-end“ Ligation in den Vektor pG18mob2. Die auf diesem Weg

erzeugten Vektorkonstrukte waren so gering an der Zahl, dass nach einer Elektroporation des Ansatzes nach *E. coli* kaum Klone entstanden sind und die Methode, als nicht geeignet für einen gesamtgenomischen Ansatz, verworfen wurde.

Als eine andere Vorgehensweise wurde ein partieller Verdau der DNA mit dem *Sau3AI*-Isochizomer *Bsp143I*-Restriktionsenzym und spätere Klonierung der Fragmente in einen mit *Bam*HI geschnittenen Vektor untersucht. Da *Bsp143I* eine 4-er Erkennungssequenz als Schnittstelle besitzt, schneidet es die DNA mit einer theoretischen Häufigkeit von  $4^4 = 256$  bp. Die Spaltungen wurden mit einer Verdünnungsreihe des Enzyms bei gleicher Reaktionszeit oder als zeitabhängige Restriktion durchgeführt. Die besten Ergebnisse entstanden bei einer (1:1000) Verdünnung des Enzyms und 20 Min Einwirkungszeit. Der dritte Ansatz beinhaltete einen vollständigen Verdau der DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym *Pvu*II. Die Genomsequenz von *S. meliloti* wurde zuerst auf der Homepage von TIGR-CMR ([cmr.jcvi.org/](http://cmr.jcvi.org/)) einem *in silico* Verdau unterzogen. Hierbei hat es sich herausgestellt, dass das blunt-end schneidende Enzym ca. 700 Fragmente einer durchschnittlichen Länge von 5,2 kb erzeugt. Die Schwachstelle der beiden genannten, auf Restriktion basierenden Methoden war der benötigte Schritt der Isolierung der fragmentierten DNA der Größe von 3-5 kb aus den Agarosegelen. Die konventionell im Laboralltag genutzten Aufreinigungsmethoden, die auf Verwendung von Durchflusssäulen mit Adsorbermaterial und Zentrifugation oder auf der Bindung der DNA-Fragmente an Milchglas basieren, lieferten eine zu niedrige Aufreinigungseffizienz. So waren die mittels Nucleo-Spin Extract II-Kit aus LMP-Agarose ("low melting point") extrahierte DNA-Konzentrationen niedrig und lagen in dem Bereich von 30 bis 60 ng DNA pro  $\mu$ l. Der dritte Ansatz mit Hilfe eines vollständigen Verdaus mit *Pvu*II wurde schliesslich in den ersten Versuchen zu Erstellung fluoreszenter *S. meliloti* Stämme angewendet.

Die Wahl des Vektors für die Klonierung der Fragmente fiel auf das Konstrukt pG18mob2 (Kirchner 2003). Der Vektor enthält eine MCS in einem *lacZ*-Gen, was die Blau/Weiss-Selektion von inserthaltigen Klonen auf IPTG/X-Gal Medien ermöglicht, ein *oriT* für die Replikation in *E. coli* und eine RP4-Region für die Konjugation nach *S. meliloti*. Da er sich durch eine geringe Größe von 2,8 kb auszeichnet, überschreitet der Vektor mit einem integrierten genomischen Fragment von *S. meliloti* der Länge von max. 5 kb und dem Transposon der Größe von 2 kb nicht die Endgröße von 10 kb, was die Durchführung der Charakterisierungsschritte und Klonierungsarbeiten vereinfacht.

Die *in vitro* Transposition setzt den Einsatz des aktiven Transposase Enzyms voraus. Die Tn5 hyperaktive Transposase trägt drei Punktmutationen EK54/MA56/LP372 im Vergleich zum Wildtyp, die die Bindungsaktivität der Transposase an ihre Erkennungssequenzen, sog. Mosaikenden (ME) erhöhen, die Aktivität des Transpositionsinhibitors ausschalten und die

Dimerbildung des Enzyms beeinflussen, was zu einer Erhöhung der Transpositionseffektivität bis zu 1% führt (Goryshin & Reznikoff 1998). Das Protein wurde im *E.coli* Stamm BL21(DE3) pWH1891 überexprimiert und dank eines fusionierten, sich selbst absplattendem Intein tags mittels Affinitätschromatographie über eine chitinhaltige Säule aufgereinigt (ABB. V-3) (Chong et al. 1997). Die Ausbeute ergab 6 mg/ml der hyperaktiven Transposase, die aber für den Gebrauch auf die Konzentration von 100 ng/μl im Aufbewahrungspuffer verdünnt worden ist.

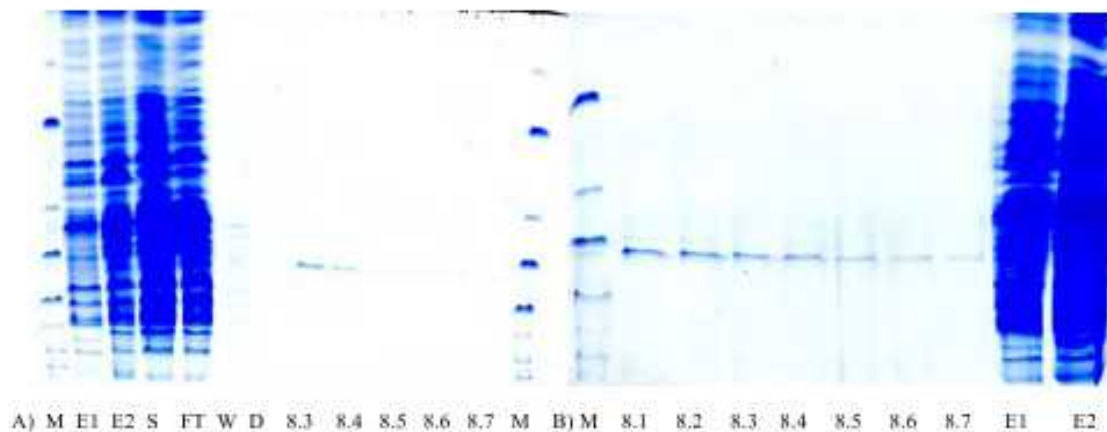


ABB. V-3. Ergebnisse der Aufreinigung des Transposase Proteins. SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte der hyperaktiven Transposase. A) M: Marker, E1: Zellextrakt vor der Induktion, E2: Zellextrakt 4h nach der IPTG-Induktion, S: Überstand nach Ultrazentrifugation, FT: Durchfluss nach Beladung der Säule, W: Waschen, D: Waschen mit DTT- haltigem Puffer, 8.3-8.7: aufgefangene proteinhaltige Elutionsfraktionen. B) 8.1 – 8.7 erste Fraktionen nach der Elution, die höchste Konzentrationen an hyperaktiven Transposase enthalten, E1: Zellextrakt vor der Induktion, E2: Zellextrakt 4h nach der IPTG-Induktion.

### V-1.2. Niedrige Effizienz der Methode führt zu einem Wechsel der Strategie

Zur zufälligen Herstellung fluoreszenter Proteine in *S. meliloti* Rm1021 wurde zuerst die GesamtdNA durch die Lysozym/Sarkosyl/Pronase Behandlung, mit einer anschließenden Phenolextraktion und Ethanolprecipitation isoliert. Die erhaltene Konzentration ergab ca. 1 μg DNA/μl. Das TgPT-0-Transposon wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert und die Reaktion unter Zugabe von Fragmenten der genomischen DNA und hyperaktiven Transposase der im Methodenteil beschriebenen Vorgehensweise entsprechend durchgeführt. Nach der Deaktivierung der Transposase und einem Reinigungsschritt wurden die beladenen Fragmente in den Vektor pG18mob2 ligiert und der Ligationsansatz nach *E. coli* DH5a elektroporiert. Der Elektroporationsschritt konnte nicht direkt mit dem konjugationsfähigen Stamm *E. coli* S17-1 durchgeführt werden, da die Kompetenz der Zellen, experimentell getestet durch die Elektroporation mit dem reinen Plasmid pG18mob2

schon sehr niedrig ausfiel (233.3 cfu/ $\mu$ g DNA). Die Ausbeuten an transponierten *E. coli* Kolonien nach Transposition, Ligation und Aufreinigungsschritten fielen wiederholterweise sehr niedrig aus, um 130 cfu/ $\mu$ g DNA. Die Plasmide aus diesen Zellen müssten danach mittels Konjugation von *E. coli* S17-1 nach *S. meliloti* transferiert werden und durch doppelt homologe Rekombination in das Genom von *S. meliloti* eingebaut werden. Dieser Schritt würde die Anzahl der erfolgreich konstruierten, fluoreszenten Stämme nochmals reduzieren, da nicht jede Transposition findet in einem kodierenden Bereich statt und nur jede sechste in-frame. Diese Methode wurde schliesslich aufgrund eines zu hohen Aufwands mit zu geringen Resultaten in dieser Form verworfen und zu einem *in vivo* Ansatz modifiziert.

## **V-2. Etablierung einer Methode zur zufälligen fluoreszenten Markierung von *S. meliloti* Proteinen mittels *in vivo* Transposition**

Basierend auf den vorigen Versuchen zur *in vitro* Transposition wurde ein neuer Ansatz entwickelt und durchgeführt, der auf dem Transfer eines modifizierten Transposons auf die chromosomale DNA *in vivo* basiert. Benötigt wurde dafür ein Plasmidvektor, der die genetische Information für die hyperaktive Transposase beinhaltet, sowie für ein Transposonkonstrukt, das vom Vektor auf die Ziel-DNA übertragen wird. Das Transposon muss über einen Selektionsmarker verfügen, der in einem weiteren Schritt *in vivo* entfernt werden kann, um ein vollständiges Fusionsprotein zu erzeugen. Die Entscheidung fiel auf die Cre basierende Rekombination. Die Cre Rekombinase ist eine Typ I Topoisomerase aus dem P1 Bakteriophagen. Die Rekombination ermöglicht das gezielte Entfernen von DNA-Sequenzen, die mit den Erkennungsabschnitten der Cre Rekombinase, den *loxP*-Bereichen ("locus of X over P1") flankiert sind. Nach einer erfolgreichen Exzision verbleibt eine der 34 bp langen *loxP* Erkennungssequenzen in der Ziel-DNA, was in der Konstruktion des Transposons berücksichtigt wurde. Die neue *in vivo* Methode bedurfte darüber hinaus einer Möglichkeit, die auf diese Weise zufällig erzeugten Fusionsproteine im *S. meliloti* auf der Genomebene zu identifizieren.

### **V-2.1. Erstellung geeigneter Vektorkonstrukte zur *in vivo* Transposition genomkodierter Proteine mit eGFP beinhaltenden Transposons in *S. meliloti***

Die Etablierung einer Methode zur zufälligen Erstellung fluoreszenter Proteine in *S. meliloti* initiierte die Konstruierung von zwei Vektoren, pHB14 und pHB15. Der Vektor pHB14 (ABB. V-4 A) beinhaltet das Gen für die hyperaktive Form der Tn5 Transposase unter der Kontrolle des *P<sub>trc</sub>/lacI* Promotersystems und das modifizierte Transposon, das ein mit *loxP*-Sequenzen flankiertes *nptII*-Gen kodiert. Das *nptII*-Gen vermittelt die Resistenzen gegen Neomycin und Kanamycin und

wurde samt der flankierenden *loxP*-Sequenzen und *SrfI*-Restriktionsstellen als ein 1,2 kb Fragment synthetisiert (Mr. Gene GmbH, Regensburg). Diese Kassette ersetzte das *SrfI*-Fragment im Vektor pBNJ24.6 (Hughes et al. 2002) und produzierte damit den Vektor pHB11. Entsprechende Vorversuche, das Fragment mittels PCR zu konstruieren schlugen fehl, aufgrund der in Primern liegenden palindromischen *loxP* Sequenzen. Das gesamte Transposon in pHB11 wurde daraufhin mit Primern analog zu den Mosaikenden (Primersequenzen ABB. V-4 und Abschnitt III-2.1) amplifiziert und blunt-end in die *EcoRV*-Schnittstellen des Plasmids pG18mob2 (Kirchner & Tauch 2003) integriert. Das Plasmid wurde auch für diesen *in vivo* Transpositionsansatz als Rückgrat gewählt, da es über eine geringe Ausgangsgröße verfügt, in *E. coli* repliziert, in *S. meliloti* aber ein Selbstmord-Plasmid ist. Nach der Ligation entstand das Plasmid pHB12.

Parallel dazu wurde das Gen für die hyperaktive Transposase aus dem Vektor pWH1891 (Köstner et al. 2006) amplifiziert, zwischen die *EcoRI* und *SalI* Schnittstellen des Plasmids pXK99E (Kirchner & Tauch 2003) eingefügt und damit den Vektor pHB13 produziert. Die "multiple cloning site" des Vektors pXK99E ermöglicht das Einfügen beliebiger ORFs, die dann unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren *lacI/Ptrc* Promotersystems agieren. Der gesamte Repressor/Promoter/Terminator Abschnitt samt der hyperaktiven Transposase wurde im nächsten Schritt mit PCR amplifiziert und in die *SacI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen des Plasmids pHB12 eingefügt. Dadurch entstand der Zielvektor pHB14.

Die Entfernung des Neomycin-Selektionsmarkers aus den in Genom inserierten Transposons, sollte mittels Cre Rekombination erfolgen und bedarf der Konstruktion des pHB15 Vektors (ABB. V-4B). Für die Expression der Cre Rekombinase in *S. meliloti* wurde der Vektor pJN105 (Newman & Fuqua 1999) gewählt, der über ein Arabinose-induzierbaren ParaBAD Promoter verfügt. Die *cre* Gensequenz wurde aus dem Plasmid pQL123 (Liu et al. 1998) amplifiziert und in die *SmaI* Schnittstelle von pJN105 "blunt-end" ligiert. Nach der Bestätigung der korrekten Orientierung der Genkassette entstand der Vektor pHB15.

Die beiden Konstrukte pHB14 und pHB15 wurden mittels Restriktionsanalyse und anschließender gelelektrophoretischen Auftrennung (ABB. V-4), sowie zusätzlich mittels Sequenzierung auf ihre Integrität überprüft.

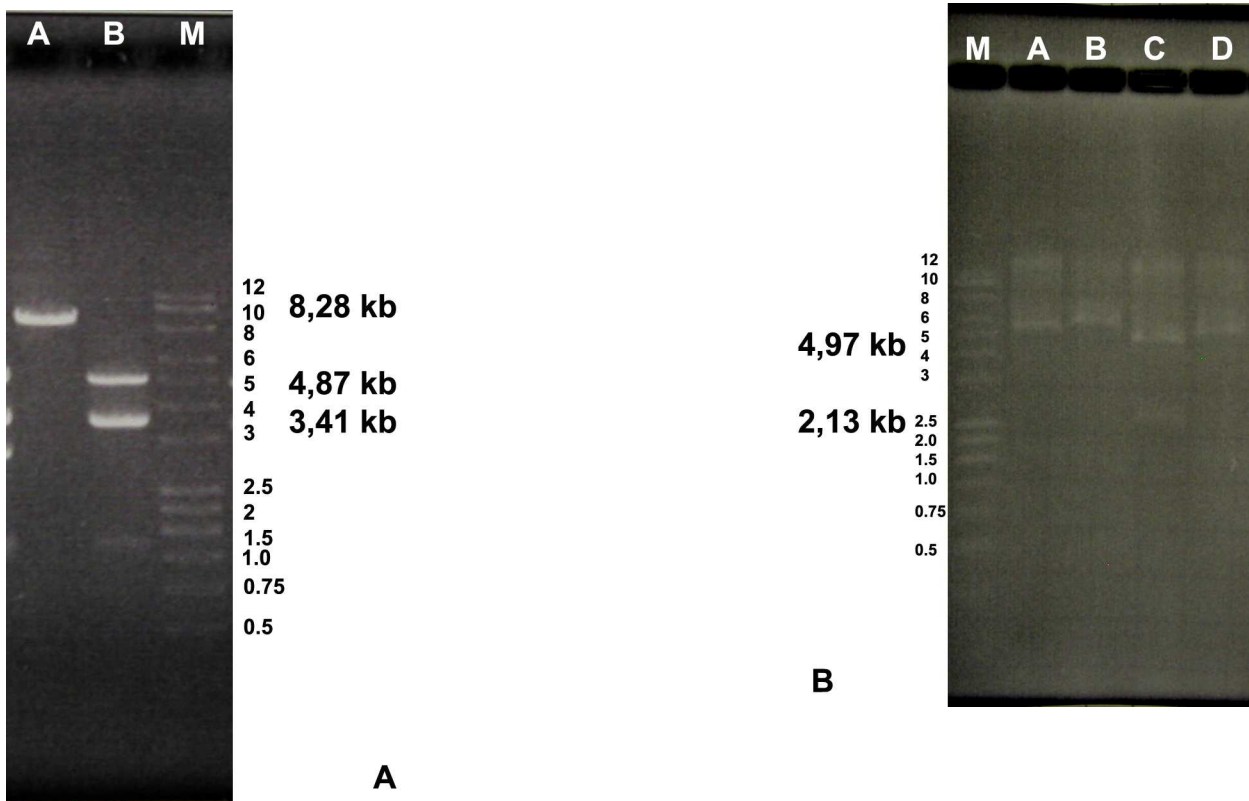


ABB.V-3. Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung von Restriktionsprodukten der erstellten Konstrukte pHB14 und pHB15, zwecks Untersuchung der Klonierungserfolge. A) Restriktionsanalyse des Vektors pHB14. Spur A: Mittels *Bam*HI-Restriktion linealisierter Vektor (erwartete Größe: 8,28 kb, ~8,3kb); Spur B: eine kombinierte Spaltung mittels *Bam*HI und *Sac*I ergibt Banden der erwarteten Größen von 4,9 kb und 3,4 kb; Spur M: DNA-Größenmarker (250 Bp-12 KBp DNA Leiter (P-755), MBBL); B) Restriktionsanalyse des Vektors pHB15 zu Untersuchung der korrekten Insertionsrichtung des *cre* Gens in der MCS des Vektors pJN105 mittels *Cla*I-Spaltung. Erwartete Fragmentgrößen bei der korrekten Insertionsrichtung: 5 kb und 2,1 kb, bei umgekehrten Ausrichtung des Fragmentes: 5,5 kb und 1,5 kb. Spur M: DNA-Größenmarker (250 Bp-12 KBp DNA Leiter (P-755), MBBL); Spuren A,B,D: drei zufällig nach der Transformation des Ligationsansatzes nach *E. coli* gewählten Stämme erhalten Konstrukte, die das *cre* Gen umgekehrt eingebaut enthalten; Spur C: das Konstrukt enthält das *cre* Gen in der gewünschten Orientierung; obwohl das 2,1 kb Fragment im Agarosegel etwas zu groß erscheint, bestätigte die anschließende Sequenzierung die Korrektheit des Vektorkonstruktes.



ABB.V-4: Konstruktionsschema für die Plasmidvektoren pHB14 und pHB15 für eine Transposon basierte Einfügung von *egfp* (A) und die Exzision des Selektionsmarker durch Cre vermittelte Rekombination (B). Schwarzen Segmente im inneren Bereich der Plasmidkarten repräsentieren das Fragment des Vektors, das weiter verarbeitet wird. (A) Erstellung des Plasmids für die Transposon vermittelte Einfügung des *egfp* Gens und der Neomycinresistenz (pHB14). Der finale mobilisierbare Vektor enthält das eGFP Transposon und die hyperaktive Transposase unter der Kontrolle des *P<sub>trc</sub>* Promoters. Das Plasmid pBNJ24.6 (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Dr. Hughes) beherbergt das TgPT-0 Transposon, das eine promotorlose Version des *egfp* Gens ohne Stratkodon beinhaltet, sowie das Kanamycinresistenzgen flankiert mit Mosaiksequenzen, die von hyperaktiven Transposase erkannt werden. Der Selektionsmarker kann *in vitro* durch ein Restriktionsschritt mit dem *S<sub>rf</sub>I* Enzym entfernt werden. Um das Transposon für eine *in vivo* Selektion benutzbar zu gestalten, wurde eine durch *loxP* Stellen flankierte Neomycinresistenzkassette entworfen und synthetisiert. Diese Fragment ersetzte das Kanamycinresistenzgen in TgPT-0 durch die Insertion in *S<sub>rf</sub>I*-Restriktionsstellen. Das resultierende Transposon wurde blunt-end in die *EcoRV* Stelle des mobilisierbaren *S. meliloti* Selbstmord-Vektors pG18mob2 (Kirchner & Tauch 2003) integriert, wodurch der Vektor pHB12 entstand (ABB. V-4A). Das Gen für hyperaktive Transposase wurde mittels PCR aus dem Überexpressionsvektor pWH1891 (Köstner et al. 2006) amplifiziert und zwischen die *EcoRI* und *S<sub>al</sub>I* Restriktionsstellen des Vektors pXK99E (Kirchner & Tauch 2003) ligiert, wodurch der Vektor pHB13 entstand. Das Fragment mit *lacI<sup>q</sup>*, *P<sub>trc</sub>* Promoter, der hyperaktiven Transposase, sowie den Transkriptionsterminatoren wurde aus dem Vektor pHB13 mittels PCR amplifiziert und zwischen die *S<sub>ac</sub>I* und *B<sub>am</sub>HI* Stellen des Plasmids pHB12 ligiert, um das finale Konstrukt pHB14 zu erhalten.

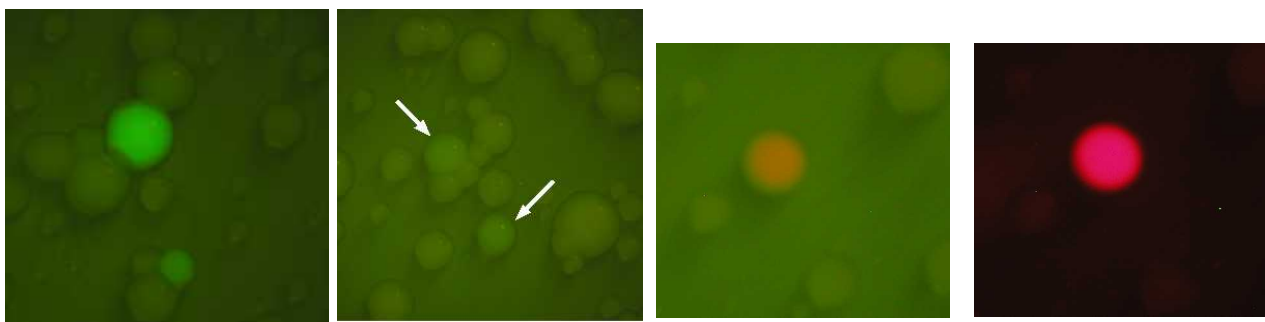
(B) Erstellung des pHB15, eines mobilisierbaren Vektors, der die Expression der *cre* Rekombinase unter der Kontrolle des Arabidose-induzierbaren Promoters beherbergt. Das *cre* Gen wurde aus dem Vektor pGST-Cre (Liu et al. 1998) amplifiziert und in die *S<sub>ma</sub>I* Stelle des Plasmids pJN105 (Newman & Fuqua 1999) "blunt-end" ligiert, um pHB15 zu erstellen. Die Expression der Cre Rekombinase kann dann über die Zugabe von Arabinose zum Kultivierungsmedium induziert werden.

### **V-2.2. Erstellung zufällig fluoreszent-markierter Proteine unter dem Einfluss ihrer nativen Promotoren in *S. meliloti* mittels Transposition.**

Die Transposition der genomischen *S. meliloti* DNA wurde *in vivo* durch den Einsatz von pHB14 Vektor durchgeführt. Dafür wurde das Konstrukt nach *E. coli* S17-1 transformiert. Der *E. coli* Stamm S17-1 ist ein Donor-Stamm für den konjugativen Gentransfer (Simon et al., 1983) der die *tra* Gene des RP4 Replikons im Genom integriert trägt. Dadurch ist er in der Lage, Plasmide die über die Transferfunktion (*tra*), den Transferreplikationsursprung (*oriT*) und einen Kodierungsbereich für Mobilisierungsproteine (*mob*) verfügen konjugativ zu transferieren. Für die Konjugation nach *S. meliloti* Rm1021 wurden die beiden exponentiell wachsenden Stämme gemischt und auf Kreuzungsfilter ausgelegt. Die Konjugationsdauer wurde auf 3,5 h minimiert, was



der ungefähren Generationszeit von *S. meliloti* entspricht (Adt et al. 2000), um eine subsequenzielle Replikation der transponierten Rezipienten zu verhindern. Die Kreuzung wurde anschließend auf Nx/Nm-haltige Antibiotikamedien ausplattiert, die 0,5 mM IPTG enthielten für die Induktion des *P<sub>trc</sub>*-Promoters und die Expression der Vektorkodierten hyperaktiven Transposase (Cebolla et al. 1995), gefolgt von dem Transfer des Transposons ins Genom des Rezipienten. Der pHB14 Vektor repliziert nicht in *S. meliloti*, somit wird das Plasmid nicht auf die Nachkommen übertragen und verursacht keine weiteren Transpositionen. Die Selektion erfolgt auf die vom Transposon vermittelte Nm-Resistenz. Durch die kurze Konjugationsdauer bedingt, erfolgten die Zellteilungen der Transposon-Rezipienten erst auf den Selektionsplatten und gewährleisteten eine heterogene Verteilung der erzeugten Transposoninsertionen an diversen Orten im *S. meliloti* Genom innerhalb der resultierenden Kolonien. Die Transpositionsrate der hyperaktiven Tn5 Transposase beträgt laut Literatur 1% (Goryshin & Reznikoff 1998). In diesem Experiment lag die Transpositionshäufigkeit bei nur 0,8 %. Die Konjugation des pHB14 Vektors und die anschließende Transpositionsreaktion erzeugten trotzdem eine ausreichend hohe Zahl an Kolonien, ca. 23 transponierte Kolonien pro µl der Konjugationslösung (1ml). Die aus der Kreuzung resultierenden Kolonien wurden auf die Erscheinung von Fluoreszenzaktivität unter einem Fluoreszenzstereomikroskop untersucht (Leica MZFLIII, GFP Filterset).



A)

B)

C)

D)

ABB. V-5. Beispiele für verschiedene dokumentierte Intensitäten von *S. meliloti* Kolonien nach der Transposition mit eGFP Transposon auf Selektionsmedien. Kolonien, die stärkere Fluoreszenz (A) aufwiesen wurden für weitere Charakterisierung gewählt, um eine erfolgreiche mikroskopische Analyse möglich zu machen. Kolonien, die besonders niedrige Level an eGFP Fusionsproteinen (B) produzierten wurden bis auf wenige Ausnahmen im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Kolonien des Kobaltochelatase-eGFP Fusion produzierenden Stammes erschienen beobachtet durch den GFP Filterset rotverschoben in ihrer emittierten Wellenlänge (C) und waren auch im DsRed-Filterset mit roter Fluoreszenz sichtbar (D).

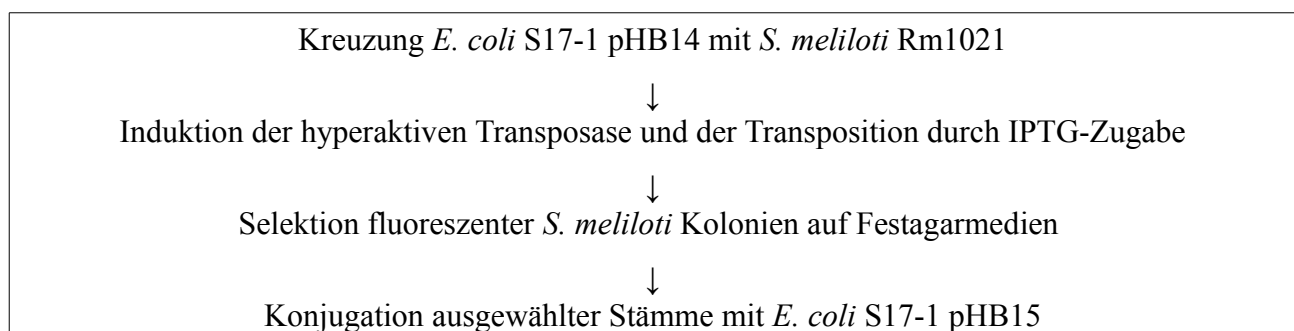
### V-2.3 Selektion fluoreszenter Kolonien nach erfolgreicher Transposition.

Ca. 2% der erzeugten Kolonien zeigten eine auffallend höhere Fluoreszenz. Das Transposon kann

theoretisch in jeden der drei Leseraster springen und auch in einer zum Leserichtung umgekehrten Ausrichtung. Somit liegt bei einer vorgegebener Ziel-DNA die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Insertion bei 16,7%. Durch die Transposition *in vivo* werden aber die lethalen genomischen Insertionen direkt aussortiert. In einigen Fällen springt das Transposon in nicht kodierende Bereiche, in Gene, die unter anderen Bedingungen exprimiert werden oder in Gene, die stetig ein niedriges Expressionslevel haben, der nicht für die Akkumulation des Fluoreszenzsignals innerhalb der Kolonie ausreichend ist. Die Spektrumsbreite an Fluoreszenzintensitäten zwischen den *S. meliloti* Kolonien war daher sehr hoch und reichte von schwacher Fluoreszenz bis zu einem starken Signal (s. ABB. V-5 A und B) und sogar zu abweichenden Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzsignals (s. ABB. V-5 C und D).

#### **V-2.4 Entfernung des Selektionsmarkers mittels Cre-vermittelter Rekombination und dadurch Erstellung vollständiger Fusionsproteine**

*S. meliloti* Kolonien mit sichtbaren Fluoreszenzsignal wurden für die weitere Untersuchung gewählt und einzeln einem Kreuzungsschritt mit dem *E. coli* Stamm S17-1 pHB15 unterzogen, um die *nptIII* Genkassette aus der Transposonsequenz zu entfernen und ein vollständiges Fusionsprotein zu produzieren (ABB.V-6). Kolonien, die aus diesem Kreuzungsschritt resultierten, wurden einige Generationen lang im LB Medium unter dem Zusatz von Arabinose angezogen, um die Expression und die Aktivität der Cre Rekombinase zu induzieren. Nach einem verdünntem Ausstrich ( $10^{-6}$ ) auf Festmedien, wurden die Kolonien auf entsprechenden Festagarmedien einer Negativ-Selektionierung auf den Verlust der Neomycin-Resistenz unterzogen. Fluoreszente *S. meliloti* Kolonien, die den Selektionsmarker verloren haben und nun eGFP-Fusionsproteine vollständiger Länge produzieren, wurden für Mikroskopie und weitere Charakterisierung gewählt. Von allen ausgewählten Stämmen wurden darüber hinaus auch die dazugehörigen Stämme behalten, die entsprechende trunkierte Formen der Proteine produzieren, um eventuellen Einfluss des fehlenden C-Terminus auf die subzelluläre Lokalisierung des Proteins untersuchen zu können.



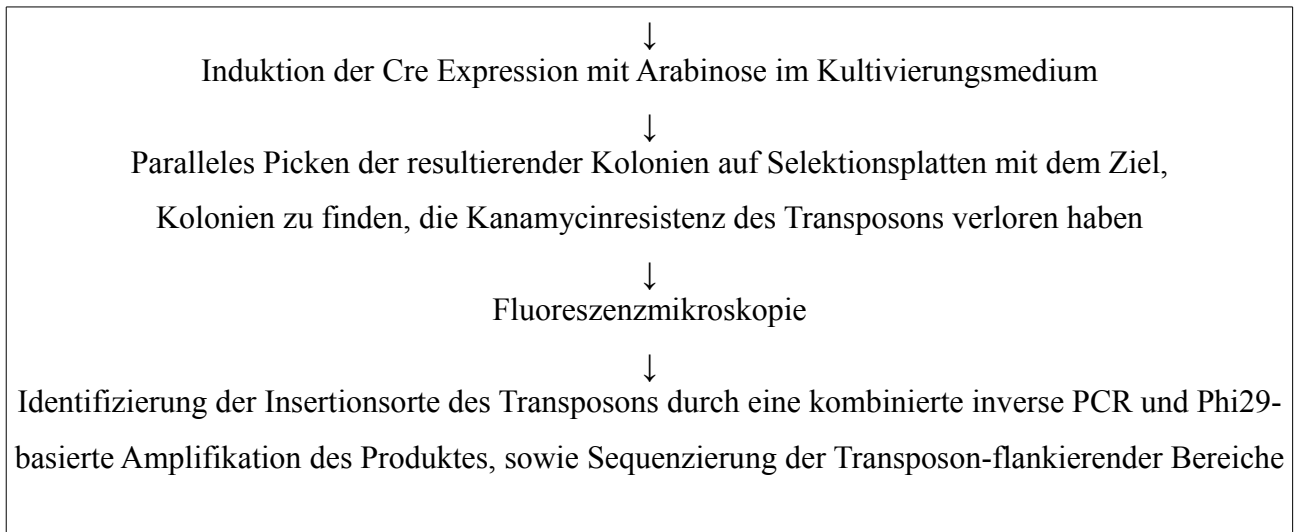


ABB. V-6. Schema der Strategie zur zufälligen *in vivo* Erstellung von eGFP Fusionskonstrukten in *S. meliloti*. Die Durchführung ist weniger Arbeitsintensiv und leicht für einen höheren Durchsatz zu etablieren.

Die Transposons wurden dahingehend entworfen, dass nach einer erfolgreichen "in-frame" Insertion ins Genom und Cre-basierten Entfernung des Selektionsmarkers, die Aminosäuresequenz des markierten Proteins nicht verändert wird (ABB. V-7). Zusätzlich zu der *egfp* Genkassette verbleiben in Genom zwei Mosaikendsequenzen von je 19 bp, die 34 bp *loxP*-Erkennungsequenz der Cre Rekombinase und die *AscI* und *SrfI* Schnittstellen für eine möglichen Austausch des fluoreszenten Proteins oder des Selektionsmarkers. Darüber hinaus bewirkt ein Transpositionereignis eine 9 bp Duplikation der Zielsequenz, die nicht zur Gesamtlänge des Transposons gerechnet wird und den Leseraster nicht verschiebt (Goryshin & Reznikoff 1998). Die Gesamtlänge des eGFP-Transposonkonstrukts nach Cre-vermittelter Exzision beträgt 819 bp, das ergibt für ein Fusionsprotein 273 zusätzliche Aminosäuren. Die Ergebnisse der Cre-vermittelten Exzision des Selektionsmarkers wurden mittels PCR an ausgewählten Stämmen untersucht, die bei Negativ-Selektion auf Agar-Platten scheinbar die Resistenz verloren haben und mit Hilfe von Primern, die an die Mosaikenden des Transposons binden und die gesamte Transposonlänge amplifizieren. Die nach negativer Selektion gegen Neomycin erhaltenen Kolonien wurden per PCR auf den Verlust der *nptIII*-Kassette überprüft. Die gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte (ABB. V-8) zeigt, dass die mittels Cre Rekombinase durchgeführte Exzision des Selektionsmarkers erfolgreich war. Der Selektionsmarker wurde in allen Fällen erfolgreich aus der genomkodierten Transposonsequenz entfernt. Dreißig Stämme resultierend aus fluoreszenten Kolonien wurden hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung der eGFP-Fusionsproteine untersucht und siebzehn davon mit einem deutlichen und charakteristischen Signal wurden für die Identifizierung und weitere Charakterisierung gewählt.

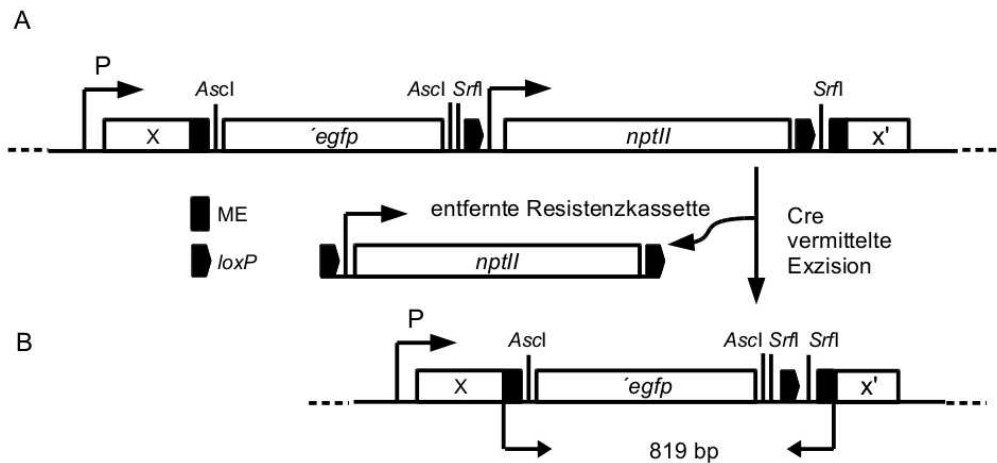


ABB. V-7. Strategie für die Cre-vermittelte Exzision der Neomycin Resistenzkassette aus chromosomal integrierten Transposons. A. Schematische Darstellung des Transposons, beinhaltend das promotorlose *egfp* Gen, sowie das *nptII* Resistenzgen und zusätzliche Elemente, integriert in einer zufälligen Geneinheit im *S. meliloti* Genom. Die Erkennungssequenzen der hyperaktiven Transposase, die sog. Mosaikenden (ME) sind durch schwarze Rechtecke dargestellt, die Erkennungssequenzen der Cre Rekombinase als schwarze Fünfecke. B. Nach der Transformation des bereits transponierten Stammes mit dem Plasmid pHB15 und Inkubation mit 1% Arabinose im Kultivierungsmedium, wird das Neomycinresistenzgen aus der Sequenz durch die Cre Rekombinase entfernt. Zurück im Genom verbleibt die 819 bp lange Start- und Stoppkodonfreie Transposonsequenz, die das unterbrechungsfreie Ablesen des Fusionsgenkonstruktes ohne Änderung der Aminosäuresequenz des Zielproteins ermöglicht.

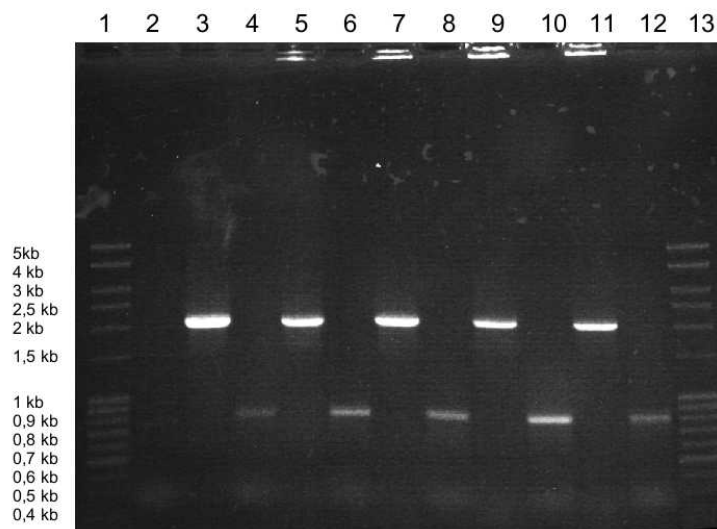


ABB. V-8: Agarosegelelektrophorese der PCR von Ergebnissen der Cre Rekombinase-vermittelten Exzision der Neomycinresistenzkassette aus einigen *S. meliloti* eGFP Stämmen. Primer binden an Mosaiksequenzen, die das eingefügte Transposon flankieren und sind nach Innen gerichtet, amplifizieren damit die gesamte Transposonsequenz. Spur 1: MW Marker (MBBL, Bielefeld); Spur 2: *S. meliloti* Rm1021 WT. Eine sehr feine Bande von ca. 750 bp erscheint in allen PCR Reaktionen mit der Wildtyp DNA, sowie den eGFP Fusionsprotein-exprimierenden Stämmen. Die Herkunft der Bande verbleibt unklar; Spur 3+4: QxtB-eGFP-Nm und QxtB-

bp erscheint in allen PCR Reaktionen mit der Wildtyp DNA, sowie den eGFP Fusionsprotein-exprimierenden Stämmen. Die Herkunft der Bande verbleibt unklar; Spur 3+4: QxtB-eGFP-Nm und QxtB-

eGFP ; Spur 5+6: Smc04094-EGF-Nm und Smc04094-EGF ; Spur 7+8: IolA-eGFP-Nm und IolA-eGFP; Spur 9+10: RNaseE-eGFP-Nm und RNaseE-eGFP; Spur 11+12: RplS-eGFP-Nm und RplS-eGFP; Spur 13: MW Marker (MBBL, Bielefeld).

Erwartete Größen : *eGFP-nptII-loxP* Transposon: 1921 bp; *eGFP*-Transposon: 819 bp

### **V-2.5 Identifizierung der Insertionsstellen des eGFP-Transposons im *S. meliloti* Genom mittels kombinierter "Rolling Cycle Amplification "(RCA) und inversen PCR (iPCR) Methode**

Die Implementierung einer Transposon basierten Methode zur Erstellung von fluoreszenten Fusionsproteinen *in vivo* bedarf einer ausgeklügelten Methode, um die zufälligen Insertionsstellen des Transposons im Genom zu identifizieren. Aufgrund seiner erheblichen Größe fiel die Entscheidung gegen eine Integration eines Replikationsursprungs (*oriV*) in die Transposonsequenz, um transposonbesetzte Sequenzen als Plasmide zurückzugewinnen. Stattdessen wurde eine kombinierte Methode aus einer "Rolling Cycle" Amplifizierung mit Hilfe von Phi29 Polymerase mit anschließender inversen PCR und Sequenzierung angewendet (ABB. V-9). Die Polymerase aus dem Phagen 29 hat eine starke Prozessivität und zusätzlich eine DNA-Strang Verdrängungsaktivität. Dadurch ist sie in der Lage, eine starke Amplifikation der Ziel-DNA durchzuführen und ausgehend von einer zirkulären Matrize lange Sequenzen (bis 70kb) aus konkatemeren Fragmenten zu synthetisieren. Zuerst führte eine *in silico* Restriktion des gesamten *S. meliloti* Genoms ([www.cmr.jcvi.org](http://www.cmr.jcvi.org)) zur Wahl von *PvuI* als Restriktionsenzym, da es kurze Fragmente von ca. 704 bp produziert und keine Restriktionsstelle im Transposon selbst besitzt (ABB.V-9A). Der Restriktion isolierter Gesamt-DNA aus den jeweiligen fluoreszenten *S. meliloti* Stämmen folgte einer Religation der entstandenen Fragmente, um zirkuläre Templates für die Phi29 Polymerase herzustellen (ABB. V-9B). Die DNA-Konzentration in den Ligationsansätzen musste bis 1 ng/µl verdünnt werden, um eine Rezirkularisation der Restriktionsprodukte statt einer Konkatenierung der Fragmente aneinander zu erreichen (Shoab et al. 2008). Die zirkulären Fragmente werden als Matrize für die Phi29-Polymerase bei Verwendung hexamerer Zufallsprimer verwendet (ABB. V-9C). Die Ligationsprodukte werden dadurch bis zu 10.000-fach amplifiziert. Ohne diesen zusätzlichen Schritt würde in vielen Fällen nicht genug Transposon beladene Matrizen DNA für die nachfolgende PCR-Reaktion in der Probe vorhanden sein (Tsaftaris et al. 2010). Während der PCR-Reaktion (ABB.V-9D) kommen Primer zum Einsatz, die an 5' und 3'-Enden der *egfp*-Gensequenz binden und aufwärts und abwärts gerichtet sind. An den von Phi29-Polymerase produzierten Konkatemeren der transposontragenden Sequenz werden dadurch die Transposon flankierenden Bereiche mittels einer klassischen PCR amplifiziert (ABB. V-9E). Zuallerletzt werden die amplifizierten Fragmente der Sequenzierung unterzogen, die je nach Primerwahl die aufwärts oder

abwärts von Transposon liegenden Bereiche entschlüsselt (ABB. V-9F).

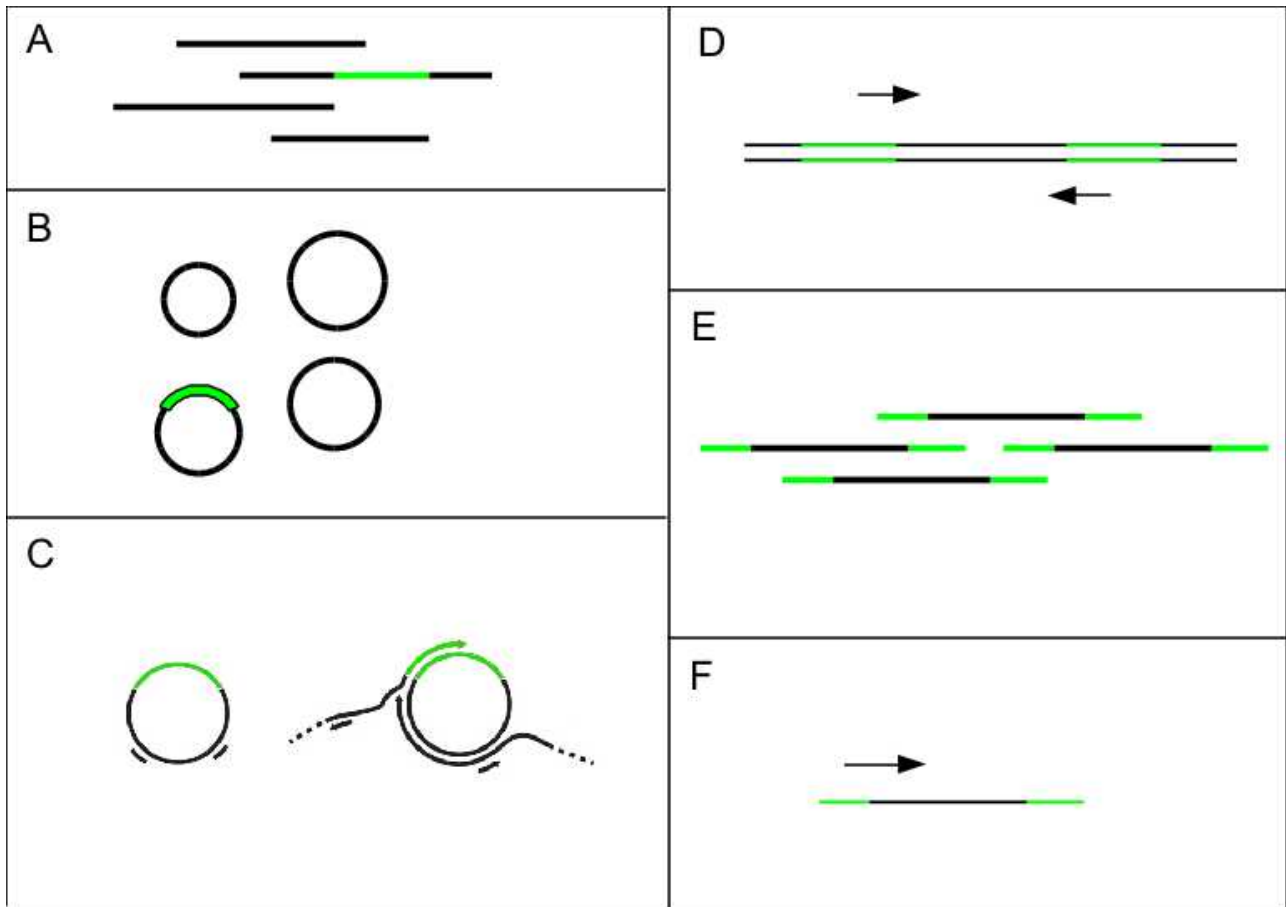


ABB. V-9. Schema des Ansatzes zur Identifizierung der eGFP-Insertionsstellen im *S. meliloti* Genom. A. Die isolierte genomische DNA wird mit *PvuI*-Restriktionsenzym vollständig verdaut. B. Bei einer starken Verdünnung der DNA in der Ligrationsreaktion kommt es zur Rezirkularisierung der Fragmente. C. Die Phi29 Polymerase amplifiziert, ausgehend von zufälligen hexameren Primern das genetische Material durch ihre Strang-Verdrängungsaktivität zur langen Konkatemeren. D.+ E. Primer, die innerhalb der *eGFP* Gensequenz binden und abwärts und aufwärts gerichtet sind, amplifizieren spezifisch die transposonflankierenden Bereiche. F. Die PCR Produkte dienen als Matrize für die Ansequenzierung und nachfolgende Identifikation der Transposon-Insertionsstelle.

Die Primer für die iPCR und Sequenzierung lagen ca. 230 bp vor dem jeweiligen 5', oder 3' Ende des Transposonkonstrukts entfernt, um eine hohe Qualität der Sequenzierungsinformation an der wichtigen Stelle des Übergangs zwischen Transposon und genomischer Sequenz zu gewährleisten. Die Identifizierung der Sequenz erfolgte durch BLAST-Suche gegen das annotierte *S. meliloti* Sm1021 Genom (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

TAB. V-1. Auflistung der identifizierten eGFP-Fusionsproteine in *S. meliloti* und die Auflistung der respektiven Insertionsstellen des eGFP-Transposons. Dem N- Aminoterminus folgt die Anzahl der Aminosäuren bis zur Insertionsstelle des eGFP Transposons, gefolgt von der Anzahl der C-terminalen Aminosäuren.

<b>Gene ID</b>	<b>identifiziertes Protein</b>	<b>Struktur des vollständigen Proteins nach der Transposition</b>
SMc02254	QxtB put. Quinoloxidase Untereinheit II Transmembranprotein	N - 316 AS - eGFP - 18 AS - C
SMc04094	Konserviertes hypothetisches Protein	N - 198 AS - eGFP - 34 AS - C
SMc04303	CobN Kobaltochelataase	N - 1269 AS - eGFP - 6 AS - C
SMc00781	IolA putative malonische Semialdehyd-dehydrogenase	N - 30 AS - eGFP - 468 AS - C
SMc00100	hypothetisches Protein, put. ATP bindendes Protein	N - 412 AS - eGFP - 108 AS - C
SMc01336	RNAseE mögliche Ribonuklease E,	N - 838 AS - eGFP - 86 AS - C
SMc03863	RplS mögl. 50S ribosomales Protein L19	N - 124 AS - eGFP - 53 AS - C
SMc00565	RplI mögl. 50S ribosomales Protein L9	N - 64 AS - eGFP - 127 AS - C
SMc01317	RpoB mögl. DNA -abhängige RNA Polymerase, Beta-Kette	N - 1359 AS - eGFP - 21 AS - C
SMc03171	TerC Hypothetisches Transmembranprotein	N - 230 AS - eGFP - 19 AS - C
SMc00641	SerA putative D-3-Phosphoglycerat- Dehydrogenase	N - 92 AS - eGFP - 439 AS - C
SMc02507	SitC Mangan ABC Transporter- permease	N - 283 AS - eGFP - 28 AS - C
SMc00868	AtpF2 mögl. ATP Synthase B Kette Transmembranprotein	N - 154 AS - eGFP - 6 AS - C
SMc01160	konserviertes hypothetisches Protein	N - 98 AS - eGFP - 54 AS - C
SMA5007	mögl. Transkriptionsregulator, Lambda-repressor-ähnlich	N - 111 AS - eGFP - 15 AS - C
SMb21163	HutU putative Urokanathydratase	N - 57 AS - eGFP - 500 AS - C

### **V-2.6 Sequenzspezifische Analyse der mittels *in vivo* Transposition erstellten *S. meliloti* Fusionsproteine.**

In allen sequenzierten Stämmen fand die Insertion des Transposons im richtigen Leseraster des Zielproteins statt. Die Abbildung V-10 A zeigt am Beispiel des Sequenzierungsergebnisses für das Fusionskonstrukt *egfp-qxtB* den Übergang zwischen dem Transposonkonstrukt, das mit dem Bereich des Mosaikendes (ME, grau) endet und der chromosomalen Gensequenz von *qxtB* (blau),

die nach 57 Basenpaaren mit einem Stoppkodon endet. Somit sprang das eGFP-Transposon in das richtige Leseraster und nur achtzehn Aminosäuren vom C-Terminus des Proteins entfernt (ABB.V-10 B). Dieser Stamm wurde beispielhaft auch der Sequenzierung der aufwärts an *egfp* anliegenden Bereiche unterzogen. Dabei konnte belegt werden, dass eine 9 bp Duplikation der Sequenz am Insertionsort erfolgt ist (wie schon beschrieben von Goryshin & Reznikoff 1998), resultierend in der Wiederholung der drei Aminosäuren 317Ala/318Tyr/319Ala, ohne jedoch den Leseraster und die Aminosäurezusammensetzung des Proteins zu verändern.

A

```

          'egfp                               AscI/SrfI
121  GGGATCACTC TCGGCATGGA CGAGCTGTAC AAGGGTGGGC GCGCCCGGGC CATAACTTCG
      g i t l g m d e l y k g g r a r a i t s
          loxP                               +2 SrfI ME
181  TATAGCATAC ATTATACGAA GTTATCCGCC CGGGCAGATG TGTATAAGAG ACAGGCCTAT
      y s i h y t k l s a r a d v y k r q a y
          Smc02254 (qxtB)                   -19 AS Stopp
241  GCCTACTGGG TCTTCCGCGG CAAGGTCGAT CCGGAGGAGG GCTACCATTG ACGCGCTCCA
      a y w v f r g k v d p e e g y h - r a p

301  GCGGGACTGC CCGCAAGCTT CTCTGGTTCG TGGGCCTCTG GGCCGCCGGC GTCGCTGCGG
      a g l p a s f s g s w a s g p p a s l r

```

B

```

  1  MAIDLPLIWA AIIAFAVLAY VVLDGFDLGV GILFFPFPEK HDRDVMMSV APVWDGNETW
 61  LVLGGGGLLA VFPLAYATIL PALYAPIIAM LIGLIFRGVA FEYRWRTQRG EFLWNWAFAG
121  GSMLAAFAQG LALGALVQGI PVENRAYVGG WWDWLTPFSI ATGLAIVIGY ALLGATWLVM
181  KTRGELAERA RGVALRTALA TVAAMGIVSL WTPFLEPVYL ERWFGWPTAI FSVIVPLLVL
241  GCLYLLLKGI RDRHDVQPMI AALGLFVLGY IIGIGISFYPF MVPPSLTIWD AAPDESLEAF
301  LLVGALVLPV MILTYTAYA-eGFP-AYAY WVFRGKVDPE EGYH

```

ABB.V-10. Analyse der Transposoninsertion ins *S. meliloti* Genom auf der Basis von Sequenzierungsdaten und am Beispiel von QxtB-eGFP (Quinoloxidase Subunit II Transmembranprotein, Smc02254). A. Ergebnisse der Sequenzierung in Richtung abwärts von *egfp* im FASTA-Format mit allen relevanten Regionen. Der Übergang zwischen dem Transposon und der genomischen Sequenz von *qxtB* findet im richtigen Leseraster statt, nur 57 Basenpaare vor dem Stoppcodon des Gens. B. Gesamte Aminosäuresequenz von QxtB mit markierten Insertionsstelle des eGFP-Transposons. Die Transposition führt zu einer 9 bp Duplikation der Sequenz am Insertionspunkt (blau markiert) die in der Wiederholung der drei Aminosäuren 317Ala/318Tyr/319Ala resultierte. Die Insertion des Transposons fand statt nur achtzehn Aminosäuren von QxtB C-Terminus statt.

Einige der transponierten Gene sind auf dem Minusstrang positioniert. In den meisten Fällen befindet sich die Insertionsstelle in der Nähe von C-Terminus des Proteins. Fast alle Fusionsproteine sind auf dem Hauptchromosom kodiert. Zwei Zielgene liegen auf den



Megaplasmiden von *S. meliloti*, der Sma5007 Transkriptionsregulator auf pSymA und *hutU*, putative Urokanathydratase auf pSymB Megaplasmid. In einem Fall sprang das Transposon in eine der 16S rRNA Sequenzen und bewirkte eine Falschexpression des Fusionsabschnittes. Die genauen Gründe dafür können nicht nachvollzogen werden, da die Sequenzierungsqualität in diesem repetitiven Bereich negativ beeinflusst wurde. Das künstliche Protein zeigt darüber hinaus auch ein starkes Fluoreszenzsignal sowie eine distinkte subzelluläre Lokalisierung und wurde aus diesem Grund zur Identifizierung gewählt.

Darüber hinaus wurden keine weiteren falsch positiven Expressionen von *egfp*-Fusionen an nicht-kodierende Bereiche beobachtet, auch tragen alle charakterisierten ORFs die eGFP kodierende Sequenz im richtigen Leseraster, was die Einsatzfähigkeit der Methode unterstreicht.

### **V-2.7 Untersuchung ausgewählter eGFP-Fusionsproteine mittels Western Blot mit einem Anti-GFP Antikörper**

Die Fusionsproteine wurden mittels Western Blot mit einem Antikörper gegen das GFP Protein untersucht. Die Schwierigkeit der Untersuchung lag in den sehr unterschiedlichen Konzentrationen, in denen die Fusionsproteine in der Gesamtheit der Proteine der Zelle vorgekommen sind und in der relativen Unspezifität des Anti-GFP Antikörpers, der auch im *S. meliloti* Wildtyp Proteine markierte. Erhöhungen der Konzentration an Gesamtprotein in den Proben beziehungsweise der Antikörperkonzentration, sowie der Dauer der Inkubationszeit mit den beiden Antikörpern führten zum Erscheinen von mehr unspezifischen Banden. Die Abbildung V-11 stellt eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus den besten drei Proteinblots dar. Die Fusionsproteine zeigen die erwarteten, errechneten Größen. Die Herkunft der zusätzlichen Banden, die auch in der Spur des Wildtyps *S. meliloti* vorkamen wurde nicht aufgeklärt. Der Stamm *S. meliloti* Rm2011 pHC60 produziert das freie, ungebundene GFP-Protein konstitutiv von einem Plasmid. Der Stamm dient hier als Größenreferenz für das unfusionierte GFP der Größe von 27 kDa, anscheinend wird in jedem der untersuchten Stämme ein größeres Fusionsprotein produziert.

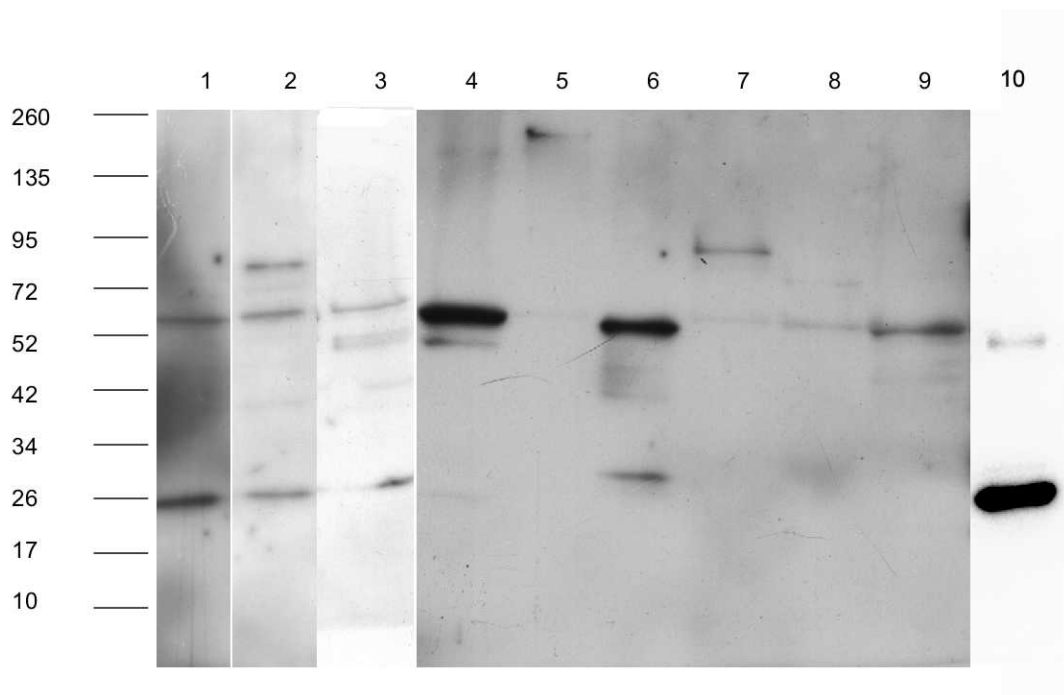


ABB.V-11. Gesammelten Ergebnisse aus drei verschiedenen Immunoblots der *S. meliloti* eGFP Fusionsproteine mit einem Anti-GFP Antikörper. Links die Darstellung der Markerbanden entsprechend dem Prestained Protein Marker von Fermentas, Thermo Fisher; Spur 1: *S. meliloti* Rm1021 Wildtyp, die immer wieder auftauchenden unspezifischen zwei Banden; Spur 2: Smc00100-eGFP (87,3 kDa); Spur 3: AtpF-eGFP (47,7 kDa); Spur 4: Smc04094-eGFP (55,6 kDa); Spur 5: RpoB-eGFP (181,9 kDa); Spur 6: RplS-eGFP (49,6 kDa); Spur 7: IolA-eGFP (84,9 kDa); Spur 8: SitC-eGFP (64,3 kDa); Spur 9: TerC-eGFP (57,5 kDa); Spur 10: *S. meliloti* Rm2011 pHC60 (26,9 kDa).

### V-3. Mikroskopische Charakterisierung erstellter eGFP-Fusionsproteine in *S. meliloti* in Flüssigkultur und während der Symbiose mit der Leguminose *Medicago sativa*

Die identifizierten Fusionsproteine in *S. meliloti* Stämmen wurden mikroskopisch bezüglich ihrer respektiven subzellulären Lokalisierungen untersucht. Es wurde die Proteinverteilung in Zellen untersucht, die aus exponentiell wachsenden Flüssigkultur stammen oder in einigen Fällen aus stationären Festmediumkolonien. Auch die trunkierten Formen der Fusionsproteine vor dem Entfernen des Selektionsmarkers wurden analysiert, um mögliche Auswirkungen der fehlenden C-Termini für die Proteinlokalisierung feststellen zu können.

Darüber hinaus wurden die *S. meliloti* Stämme während der Symbiose mit der Wirtspflanze *Medicago sativa* auf die Aktivität des Proteins und auch hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der Fusionsprotein in den ausdifferenzierten Bakteroiden in den Wurzelknöllchen untersucht.

Die Mikroskopie erfolgte an diversen optischen Instrumenten, darunter die Fluoreszenzmikroskope Nikon Eclipse 80i, Zeiss Axiovert 200 und das konfokale Laserscanningmikroskop Leica TCS SPE.

Bevor die mikroskopischen Untersuchungen stattfinden konnten, mussten jedoch verlässliche Methoden für Fluoreszenzmikroskopie von so kleinen und beweglichen Objekten, wie *S. meliloti* Zellen etabliert werden.

### **V-3.1 Etablierung einer Methode zur Fluoreszenzmikroskopie von Mikroorganismen aus Flüssigproben für aufrechte und inverse Mikroskopie**

Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie sehr kleiner Objekte in einer Trägerflüssigkeit, dazu zählen auch die ca. 1µm breite und 2µm lange stäbchenförmige *S. meliloti* Zellen, trifft auf vielzählige Probleme. Die Zellen befinden sich in stetiger Bewegung, man beobachtet Strömungen unter dem Deckglas, sowie Brown'sche Bewegung der Teilchen (ABBV-12A). Die Zellen, die zur Ruhe gekommen sind, befinden sich dann oft in Schichten unterschiedlicher Dicke gehäuft und nicht horizontal ausgerichtet, was oft durch Tiefenschärfe nicht mehr zu erfassen ist. Die Menge der Zellen, die in einem Bild in Fokus liegen, variiert stark mit der Dicke der Flüssigprobe auf dem Objektträger. Um die genannten Schwierigkeiten im Mikroskopieren von Bakterien zu umgehen, wurde auf eine im Jahr 1986 beschriebene Methode zurückgegriffen (Pfennig & Wagener, 1986). Die Objektträger für aufrechte Mikroskopie, bzw. die Deckgläser für inverse Mikroskopie werden hierbei mit Wasseragar beschichtet und vollständig getrocknet. Der Agar wird zuvor gewaschen und von kleinen Staub- und Schwebepartikeln befreit. Die Bakteriensuspension wird auf trockene agarbeschichtete Objektträger getropft, mit Deckglas zugedeckt und mit z.B. Nagellack versiegelt. Der trockene Agar nimmt die Flüssigkeit auf, quillt und drückt die Bakterien gegen das Deckglas, durch die Versiegelung trocknet die Probe jedoch nicht aus. Somit sind die Zellen fixiert und in einer horizontalen Ebene ausgerichtet (ABB. V-12 B). Für Durchführung von Fluoreszenznachweisen bietet sich an, dem Agar ein Farbstoff, z.B. Sudanschwarz oder Amidoschwarz zuzugeben, um die Hintergrundfluoreszenz des Agar zu senken (ABB. V-12 C-D).

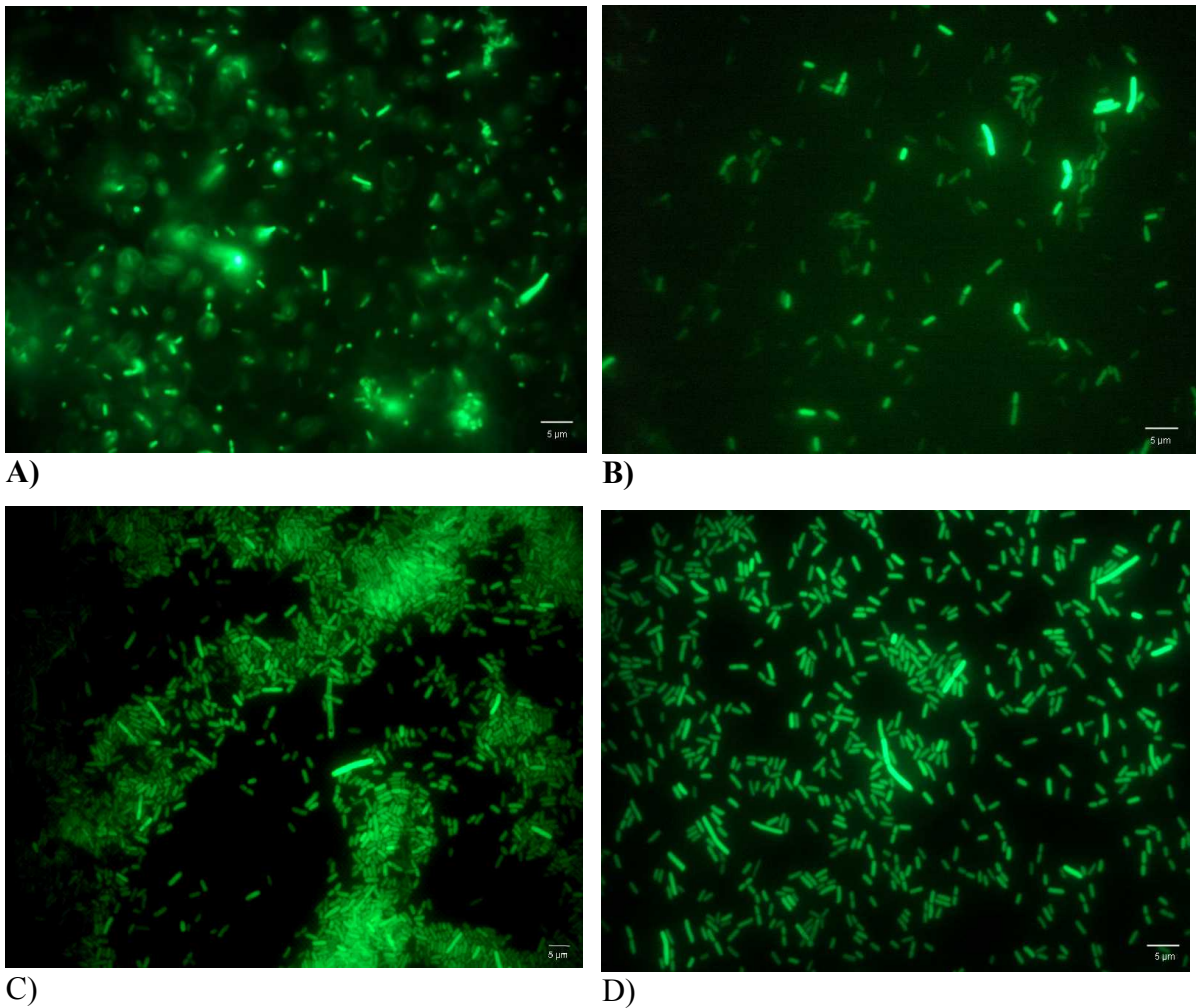


ABB. V-12. Vergleich der Objektpräparationsmethoden für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender Bakterien. Der abgebildete Bakterienstamm ist *S. meliloti* Rm2011 pHc60 in TY-Medium. Der Stamm produziert konstitutiv freies GFP, das sich homogen im Zytoplasma verteilt.

A) 10  $\mu$ l der Flüssigkultur auf Glasobjektträger. Nur ein Teil der Bakterien befindet sich im Fokus, große Bewegungsunschärfe, die Zahl der Zellen im Fokus ist abhängig von der Dicke des Flüssigkeitstropfens. B) 10  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf einem mit Agar präparierten Objektträger. Alle Bakterien sind im Fokus, horizontal zur Fokusebene ausgerichtet, allerdings ist die Hintergrundfluoreszenz des Agars sichtbar. C) + D) 10  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf einem mit Agar präparierten Objektträger mit einem Zusatz von Amidoschwarz (C) oder Sudanschwarz (D). Die gleichen Vorteile wie in (B), zusätzlich kaum Hintergrundfluoreszenz. Alle Aufnahmen: Nikon Eclipse 80i, 60x WI Objektiv, GFP-Filter

### V-3.2 Subzelluläre Lokalisierung der eGFP-Fusionsproteine in *S. meliloti*

Die identifizierten Fusionsproteine in *S. meliloti* Rm1021 wurden unter dem Zeiss Axiovert 200 (100x Öl, NA 1.3 von Zeiss; CCD Kamera (Imager3LS, LaVision, 1376x1040 pixel, 6.7pixel/ $\mu$ m)) auf Deckgläschen platziert, mit einem agarosebeschichteten, Sudanschwarz gefärbten Deckgläschen abgedeckt, mit Nagellack versiegelt und sofort mikroskopiert. Die Stämme wurden

dafür vorher im modifizierten Vincent Minimalmedium 16 h bei 30°C angezogen. Die Anwendung von Komplexmedien, wie TY kann problematisch werden, da sie aufgrund der pepsinierten und trypsinierten Hefe- und Bakterienbestandteilen eine hohe Eigenfluoreszenz aufweisen und eine mikroskopische Beobachtung stören können. Die Kulturproben können natürlich auch vorher abzentrifugiert und in einem adequaten Puffer resuspendiert werden, was aber zusätzlichen Stress für die Zellen und eventuelle Perturbationen in Proteinlokalisierung bedeuten könnte. Bakterienkulturen in Minimalmedien können problemlos direkt aus dem Kultivierungsgefäß entnommen und mikroskopiert werden. In einem Fall (Sma5007) war die Expression des möglichen Transkriptionsregulator im Minimalmedium so niedrig, dass keine subzelluläre Lokalisierung beobachtet werden konnte. In dem Fall wurden stationäre Zellen aus einer Festagarplatte zum mikroskopieren verwendet (s. unten). Die aufgenommenen mikroskopischen Aufnahmen wurden im 16-Bit Tiff Format verlustfrei gespeichert und mit Hilfe der Dekonvolution rekonstruiert.

### **V-3.2.1 Bildrekonstruktion mittels Dekonvolution und weitere Bildanalyse**

Die Dekonvolution der Mikroskopieaufnahmen wurde mit der Huygens Deconvolution Software von SVI Scientific (NL) durchgeführt. Die Software verwendet eine automatisch aus den vorgegebenen Bilddaten kalkulierte, tiefen-abhängige Punktspreizfunktion (PSF) und restauriert die Aufnahmen, indem sie Bildrauschen und Unschärfen, sowie sphärische Abberation rechnerisch korrigiert. Die Fluoreszenzsignale sind dadurch klarer zu sehen, an der Bildinformation wird jedoch nichts verändert. Zum Vergleich werden trotzdem die Originalaufnahmen und die dekonvolvierten Bilder präsentiert. Die Aufnahmen wurden, wenn nicht anders angemerkt, mit 30 Iterationsschritten restauriert. Weitere Bearbeitung der Bilder fand im ImageJ statt und beinhaltete die Wahl des Ausschnitts aus der großformatigen (1376x1040 Pixel) Aufnahme und wenn nötig minimale Korrekturen der Helligkeit/Kontrast-Werte. Von einer Bakterienzelle in dem ausgewählten Bildausschnitt wurde ein Plot der Intensitätsverteilung des empfangenen Signals entlang der Längs- oder Querachse im ImageJ erstellt. Die 3D Intensitätsplots der Bakteroiden wurden ebenfalls in ImageJ erstellt, mit Hilfe des Plugins "3D Interactive Surface Plot". Änderungen am Helligkeit/Kontrast-Verhältnis in ImageJ verändern nur die graphische Ausgabe der Datei und manipulieren nicht die Ergebnisse der Grauwertanalysen und Intensitätplots.

### **V-3.2.2 Der *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 Wildtypstamm zeigt keine messbare Fluoreszenz**

Der Wildtypstamm wurde zur Kontrolle unter den gleichen Bedingungen, wie die Fusionsproteinstämme angezogen und abgebildet. Es wurden zwei Belichtungszeiten gewählt, die

auch bei der Mikroskopie der anderen Stämme Verwendung fanden, 200 ms und 500 ms. Die Bakterien zeigen eine leichte Eigenfluoreszenz, die aber im dekonvoluierten Bild und im Intensitätsplot (ABB. V- 13) nicht mehr zu sehen ist. Der Plot der Intensitätsverteilung über die Längsachse einer *S. meliloti* Wildtypzelle und zehn zusätzliche Mikrometer des Hintergrundes ergab ein starkes Rauschen, in der die Eigenfluoreszenz der Zelle komplett unterging.

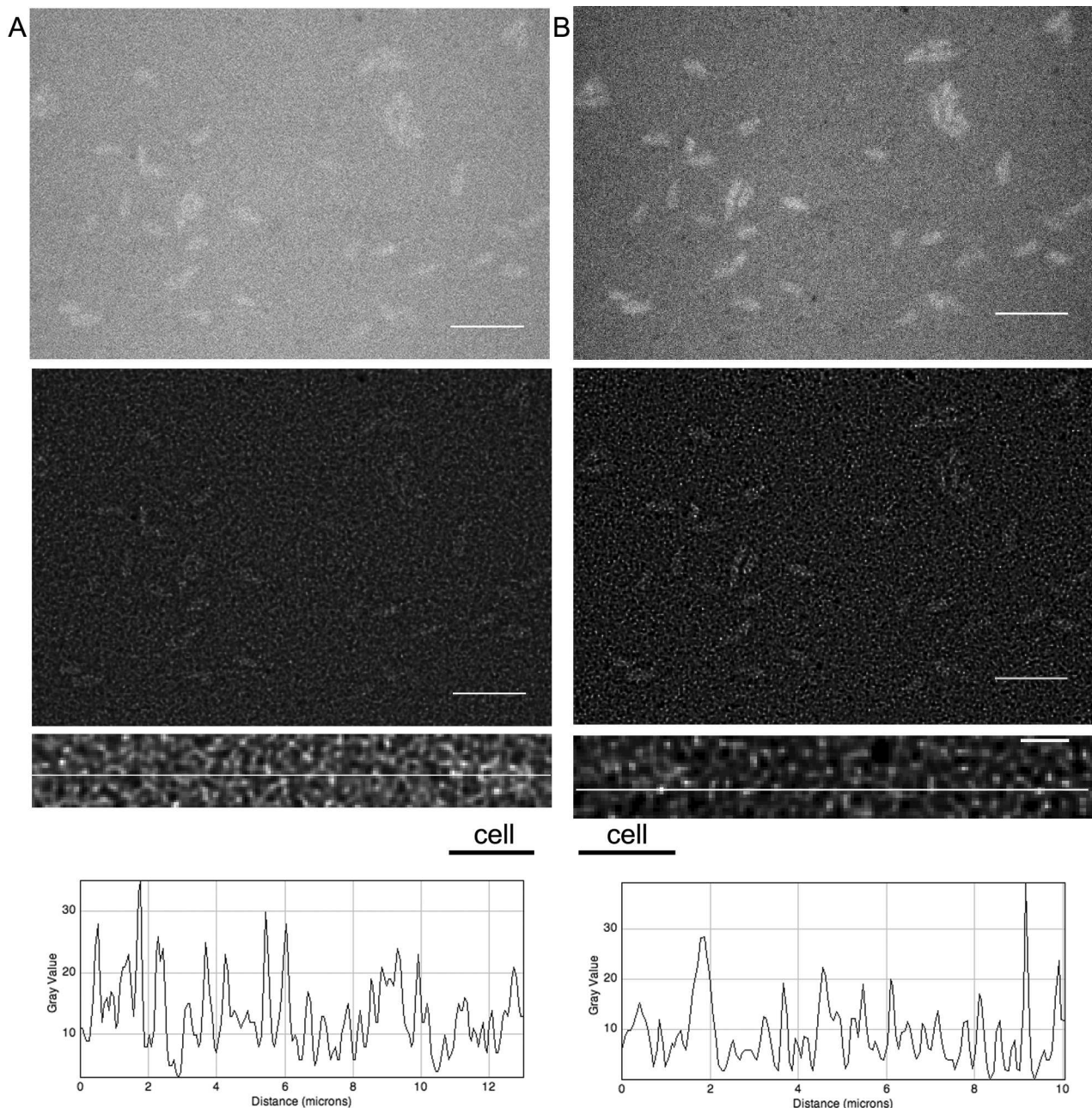


ABB. V-13 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und der Dekonvolution der Aufnahmen des *S. meliloti* Rm1021 Wildtyps. In der Original- und der dekonvoluierten Aufnahme sind die Zellen diffus noch erkennbar. Die Vergrößerung des Bereiches um eine der Zellen und der Plot der Intensitätsverteilung in Form von Grauwerten, zeigt dass die von der Zelle erzeugten Signale nicht vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden sind. A) Belichtungszeit 200 ns. B) 500 ns Belichtungszeit. Größenbalken beträgt  $5\mu\text{m}$  in den

großen Aufnahmen und 1 µm in der vergrößerten Darstellung der Zelle.

### **V-3.2.3 eGFP-Fusionsproteine zeigen in *S. meliloti* eine Vielfalt an distinkten subzellulären Lokalisierungsmustern**

Die im Rahmen dieser Studie zufällig erfolgte Auswahl einiger eGFP Fusionsproteine aus den über 6204 vermuteten Proteine in *S. meliloti* (Galibert et al. 2001) zeigen eine erstaunliche Vielfalt an diversen Lokalisierungsmustern (TAB. V- 2), die nicht in einfachen Kategorien zusammen zu fassen sind. Im Gegensatz zu dem Wildstamm zeigen alle eGFP-Fusionsproteine in *S. meliloti* deutliche Signale im eGFP-Kanal. Nur ein Protein, Sma5007, zeigte eine sehr schwache Fluoreszenz in der exponentiellen Phase und wurde aus diesem Grund erst in der stationären Phase abgebildet. Die beobachteten subzellulären Lokalisierungsmuster wurden für jedes der Fusionsproteine dokumentiert und mit Voraussagen zur Proteinlokalisierung, die mit Hilfe von PSORTb (Version 3.0.2) erstellt wurden, verglichen. Die *in silico* Lokalisierungsvorhersagen basieren auf bestimmte Struktureigenschaften der Proteine, wie Motive die speziell für Membranassoziiierung bekannt sind usw. In drei Fällen hat das Programm keine Voraussage nennen können. Die übrigen Ergebnisse der *in silico* Vorhersage sind zutreffend, wobei sie keinerlei nähere Informationen zum Lokalisierungsmuster von z.B. der Membran assoziierter Proteine an den Zellpolen oder zytosolischer Proteine in Helices liefern können. Der Fakt zeigt auf, dass eine Zuordnung des Proteins in grobe Lokisierungskategorien für die Gram-Negative Zelle nicht die Komplexität der bakteriellen Proteinlokalisierung, -regulation und -wechselwirkungen widerspiegelt.

Die Ergebnisse der Lokalisierungsstudien der sechzehn eGFP-Fusionsproteine werden im Folgenden im Detail beschrieben.

TAB. V-2. Vergleich zwischen der beobachteten und den *in silico* Vorhersagen der subzellulären Lokalisierung der eGFP-Fusionsproteine in *S. meliloti*. In einigen Fällen existiert keine *in silico* Vorhersage. In sonstigen Fällen stimmt die vorhergesagte mit der beobachteten Lokalisierung überein, die sequenzbasierte Aussage des PSORTb unterscheidet allerdings nicht zwischen einer homogenen und distinkten zytoplasmatischen Proteinlokalisierung und eignet sich dadurch zwar zur allgemeinen Unterstützung der beobachteten Ergebnisse aber nicht zur Gewinnung neuer Erkenntnisse.

<b>Gen ID</b>	<b>identifiziertes Protein</b>	<b>beobachtete subzelluläre Lokalisierung in <i>S. meliloti</i> kultiviert in Vincent Minimal-medium</b>	<b>Lokalisierungsvoraussagen durch PSORTb (Version 3.0.2)</b>
SMc02254	QxtB put. Quinoloxidase Untereinheit II Transmembranprotein	Membran und polare "Kappen"	Zytoplasmamembran
SMc04094	Konserviertes hypothetisches Protein	Heterogen "fleckig" im Zytoplasma, auch multiple Foki in einigen Zellen	zytoplasmatisch
SMc04303	CobN Kobaltochelatase	Gleichmäßig zytoplasmatisch, Zellen in selben Probe produzieren auffallend diverse Konzentrationen des Fusionsproteins	zytoplasmatisch
SMc00781	IolA putative malonische Semialdehyd-dehydrogenase	Einzelnes bis multiple Foki, manchmal entlang der Membran	zytoplasmatisch
SMc00100	hypothetisches Protein, put. ATP bindendes Protein	Zytoplasmatisch, manchmal multiple Foki	zytoplasmatisch
SMc01336	RNAseE mögliche Ribonuklease E,	Multiple Foki / Flecken, helikale Verteilung	zytoplasmatisch
SMc03863	RplS mögl. 50S ribosomales Protein L19	Zytoplasma/ "fleckig"	zytoplasmatisch
SMc00565	RplI mögl. 50S ribosomales Protein L9	Zytoplasma/ "fleckig"	zytoplasmatisch
SMc01317	RpoB mögl. DNA -abhängige RNA Polymerase, Beta-Kette	heterogen, Zytoplasma/ fleckig oder multiple Foki	zytoplasmatisch
SMc03171	TerC Hypothetisches Transmembranprotein	Membran	Zytoplasmamembran
SMc00641	SerA putative D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	Zytoplasma/ "fleckig"	zytoplasmatisch
SMc02507	SitC Mangan ABC Transporter-permease	Membran/ Membrane-nahe "Flecken"	Zytoplasmamembran
SMc00868	AtpF2 mögl. ATP Synthase B Kette Transmembranprotein	Membran	Finale Vorhersage: unbekannt
SMc01160	konserviertes hypothetisches Protein	Zytoplasma, in einigen Zellen 1-3 Foki (nur in komplexen Medien)	Finale Vorhersage: unbekannt
SMA5007	mögl. Transkriptionsregulator, Lambda-repressor-ähnlich	schwach zytoplasmatisch, Membran?	Finale Vorhersage: unbekannt
SMb21163	HutU putative Urokanathydratase	1 oder 2 polaren Foki/Zelle ~ 1 zus. mittiger Punkt	zytoplasmatisch



#### **V-3.2.4 Ungleichmäßige Verteilung der zytosolischen Fusionsproteine**

Der Stamm *S. meliloti* Rm 2011 pHc60 (Cheng & Walker 1998) wurde als einer der ersten im Rahmen dieser Arbeit mikroskopisch charakterisiert. Der Stamm exprimiert das GFP Protein von dem pHc60 Plasmid unter der Kontrolle eines spontan mutierten, konstitutiv exprimierenden *lac* Promoter. Das freie, ungebundenen GFP Protein verteilt sich gleichmäßig im gesamten Zytosol der Zellen (ABB. V-14A) ohne erkennbare Muster zu produzieren. Die heterologe Verteilung der Fluoreszenzintensitäten zwischen den verschiedenen Zellen beruht auf intrinsischem Rauschen. An dem Beispiel einer ausgewählten Zelle aus der Originalaufnahme (ABB. V-14 B) wird die Verteilung der Grauwerte über die Längsachse präsentiert. Es ist eine homogene Verteilung der Fluoreszenz entlang des gesamten Zellraumes ohne Signalabweichungen. Um zu demonstrieren, dass die Restauration des Bildes durch Dekonvolution nichts an dem Inhalt der Bildinformation ändert, wurde die Grauwertverteilung nochmal für die gleiche, diesmal dekonvolvierte Zelle berechnet (ABB. V-14 C). Die Kurve zeigt das gleiche Verhalten und erreicht die selben hohen Werte der Intensität. Die Schwankungen entlang der Kurve stammen von den stärker voneinander abgegrenzten Pixel im dekonvolvierten Bild.

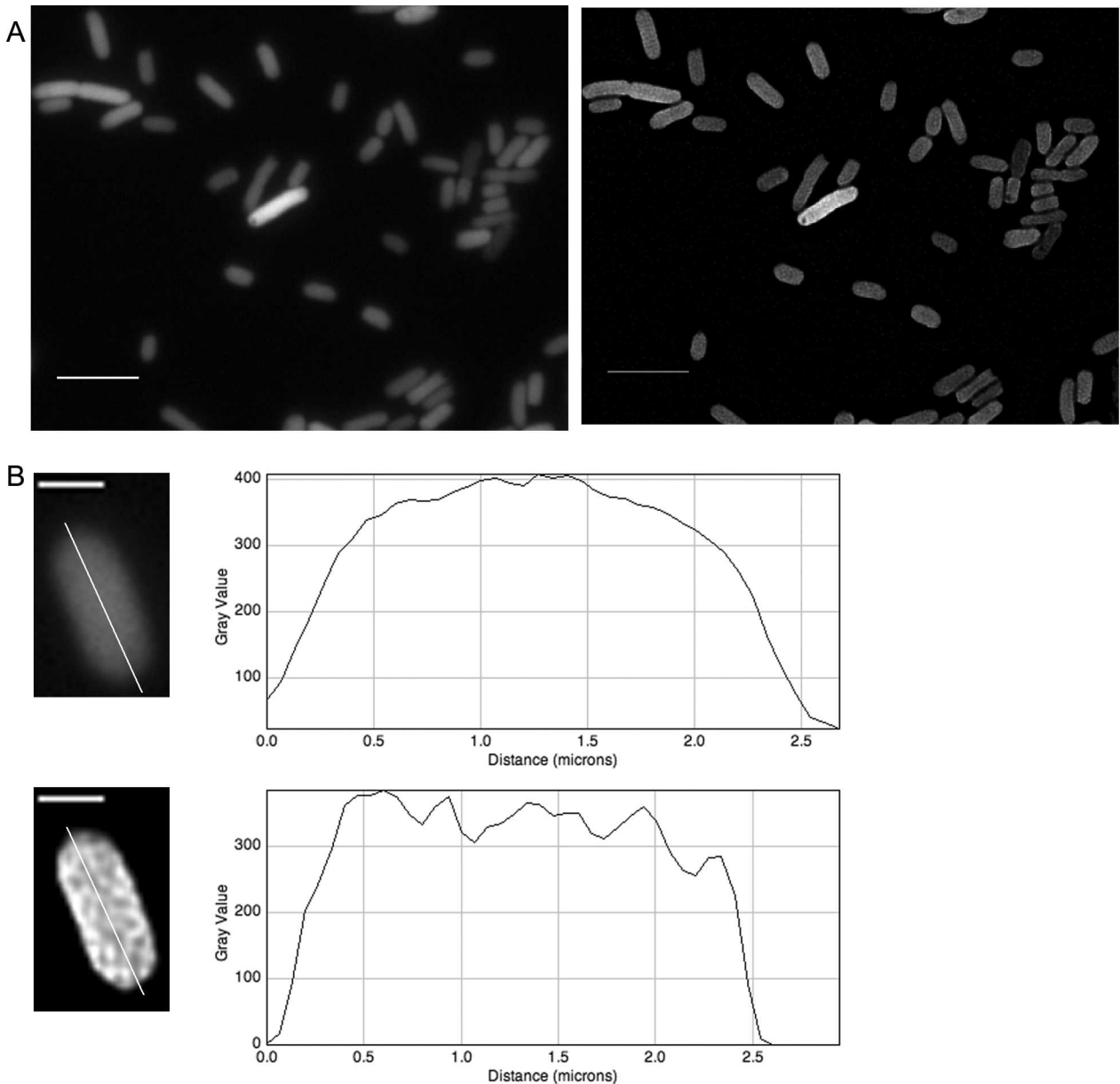


ABB. V- 14. Verteilung eines zytosolischen, nicht-lokaliserten Proteins in *Sinorhizobium meliloti* Rm2011 pHC60; freies, ungebundenes GFP, konstitutiv exprimiert von Vektor pHC60. A. Links die Original- und rechts die dekonvoluierte Aufnahme einer größeren Anzahl Bakterienzellen. Deutlich zu sehen ist die gleichmäßige Verteilung des ungebundenen GFP Proteins im gesamten Zytoplasma der Zellen. Die unterschiedliche Intensität des Signals in den einzelnen Zellen beruht auf der heterogenen Expression des fluoreszenten Proteins von Plasmidvektor bedingt durch intrinsisches Rauschen. B. Ausschnitt einer Einzelzelle aus den Originalaufnahmen und dem dekonvoluierten Bild, sowie korrespondierende Intensitätsplots. Die Intensität und Verteilung der Graustufen der dekonvoluierten Aufnahme sind mit denen des Originalbildes vergleichbar. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.

Im Vergleich zur homogenen Verteilung eines frei diffundierenden, für *S. meliloti* exogenen Proteins, wie das aus der Qualle stammende GFP im subzellulären Raum, zeigen die zytosolisch lokalisierten Fusionsproteine alle distinkte, "fleckige" Verteilungen mit dichter konzentrierten Bereichen und Bereichen mit niedriger Konzentration, (ABB.V-15,16,17). Die ribosomalen 50S Proteine L19 und L9 zeigen vergleichbare Lokalisierungsmuster, mit stärker und schwächer fluoreszierenden Bereichen. Die beiden Proteine, sowie SerA, put. D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase, weisen in manchen Zellen ganz "leere" Stellen auf, die nicht zu fluoreszieren scheinen (ABB. V-16B, ABB. V-17B).

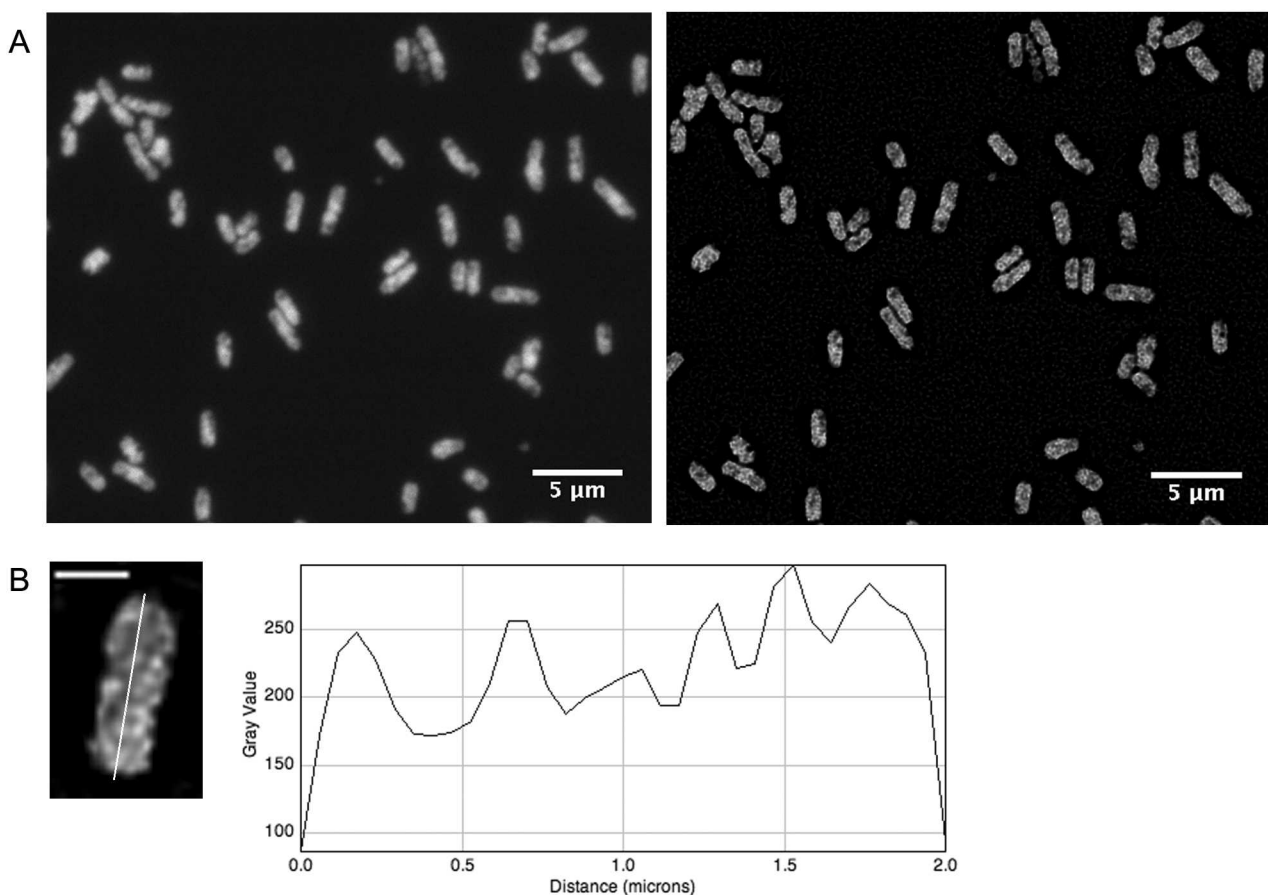


ABB. V-15. Mikroskopieergebnisse für das putative 50S ribosomale Protein L19, RplS, (Smc03863).

A. Original und dekonvoluierte Aufnahme, 200 ms Belichtungszeit. B. Einzelzelle und Fluoreszenzplot über die Längsachse der Zelle. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.

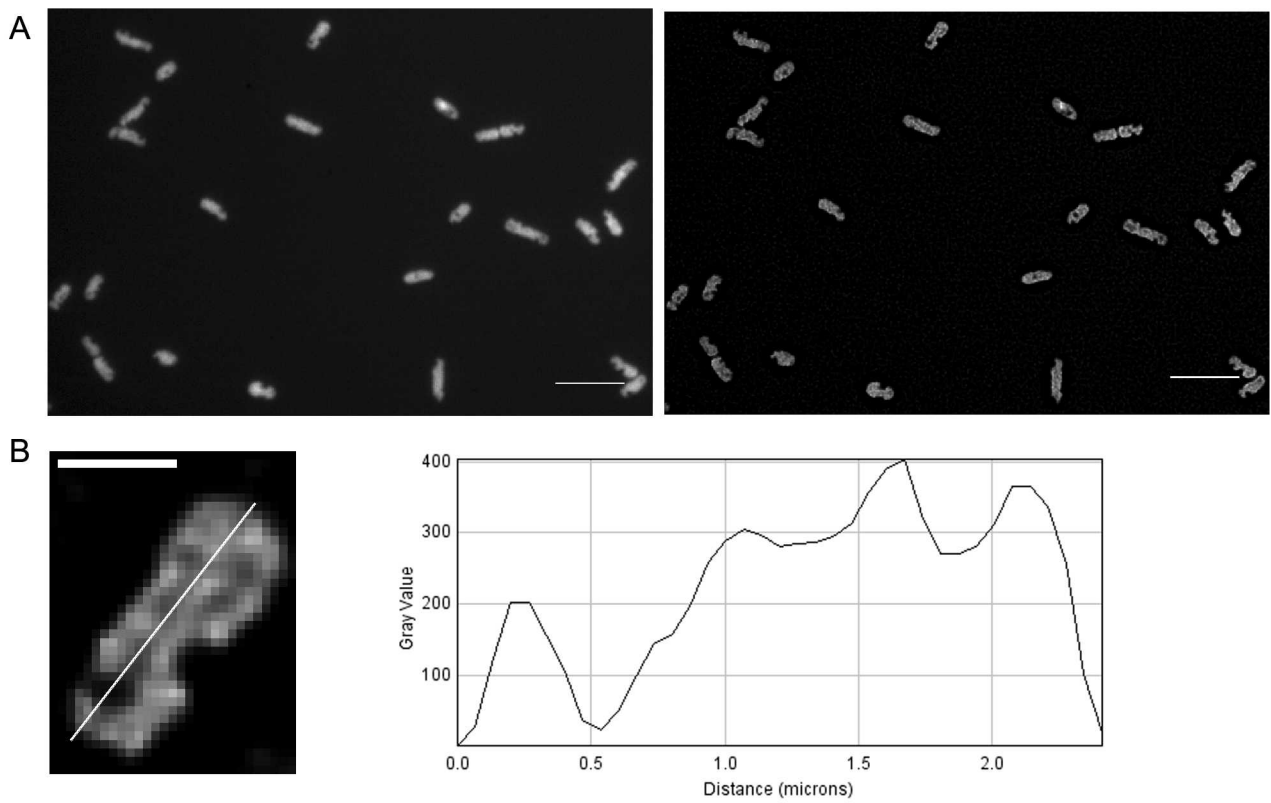


ABB. V-16. Mikroskopieergebnisse für das putative 50S ribosomale Protein L9, RplI, (Smc 00565), A. Original und dekonvoluierte Aufnahme, 200 ms Belichtungszeit. B. Einzelzelle und Fluoreszenzplot über die Längsachse der Zelle; Größenbalken: 5 $\mu$ m in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu$ m in den Einzelzellbildern.

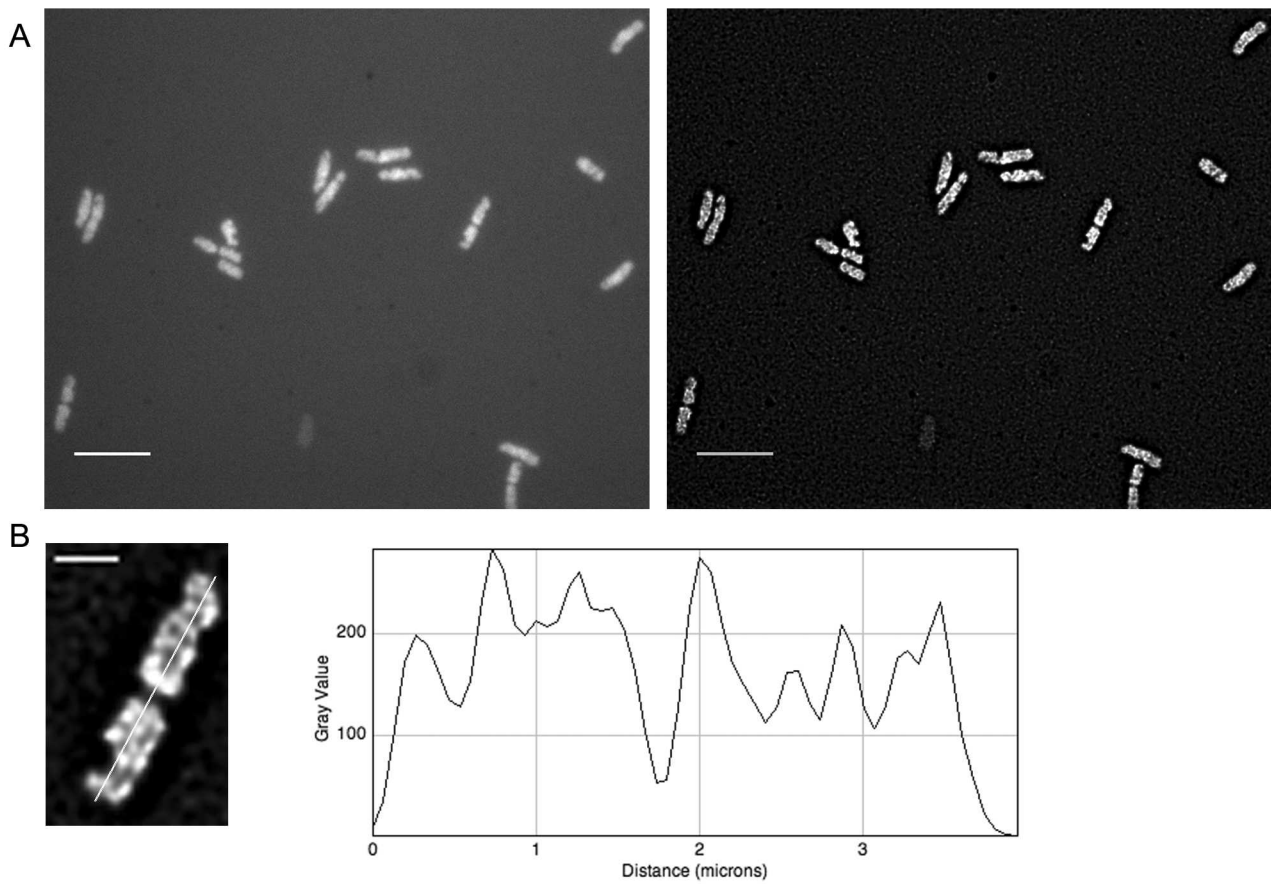


ABB. V-17. Mikroskopieergebnisse für SerA, put. D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, Smc00641. A. Original und dekonvoluierte Aufnahme, 200 ms Belichtungszeit. B. Einzelzelle und Fluoreszenzplot über die Längsachse der sich teilenden Zelle; Größenbalken: 5 $\mu$ m in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu$ m in den Einzelzellbildern.

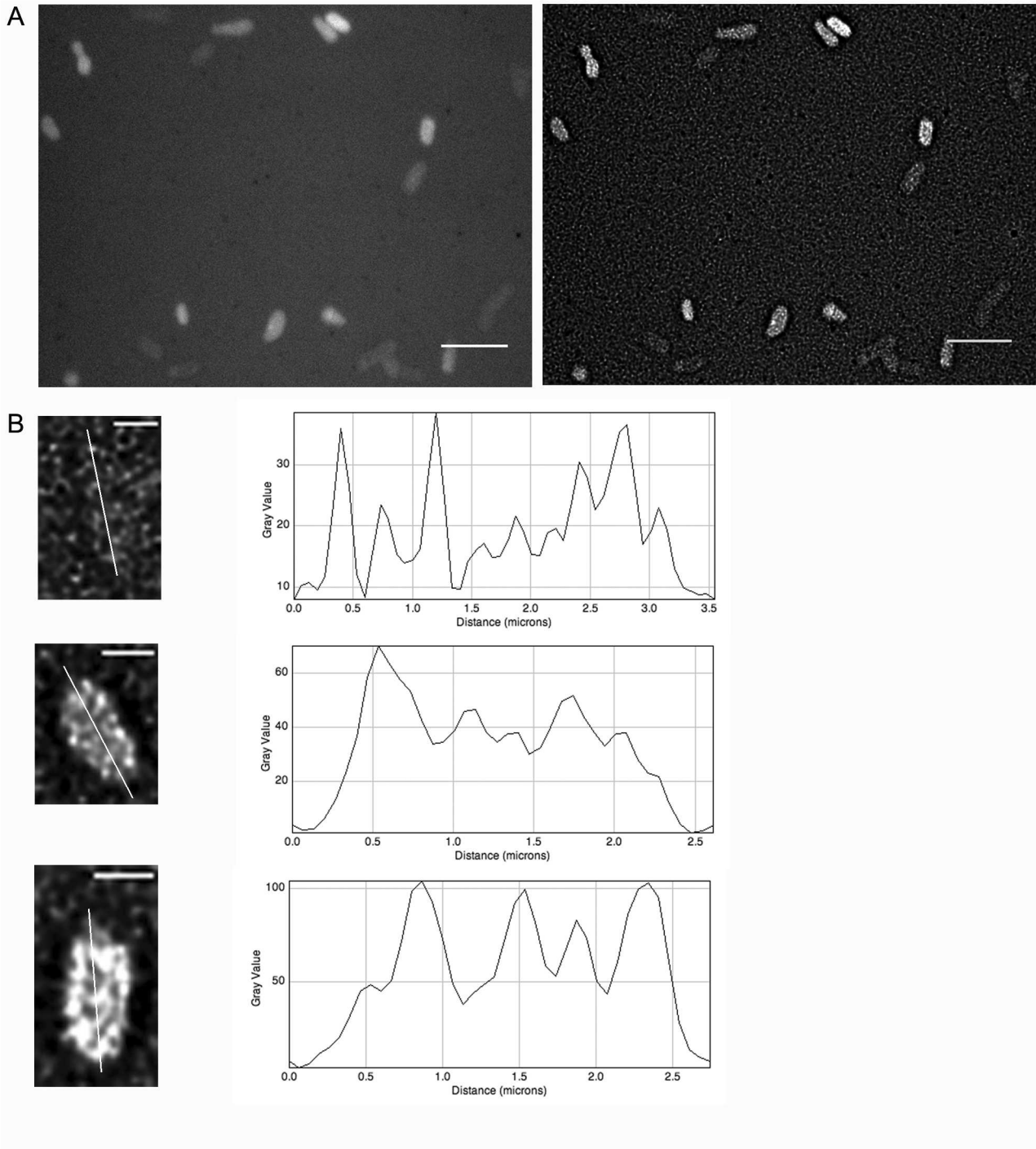
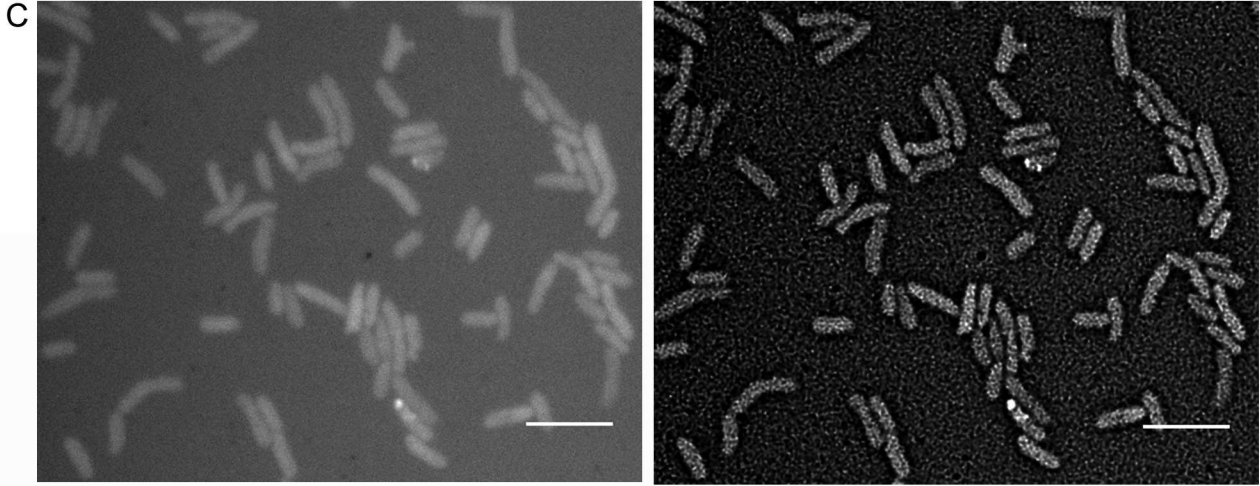
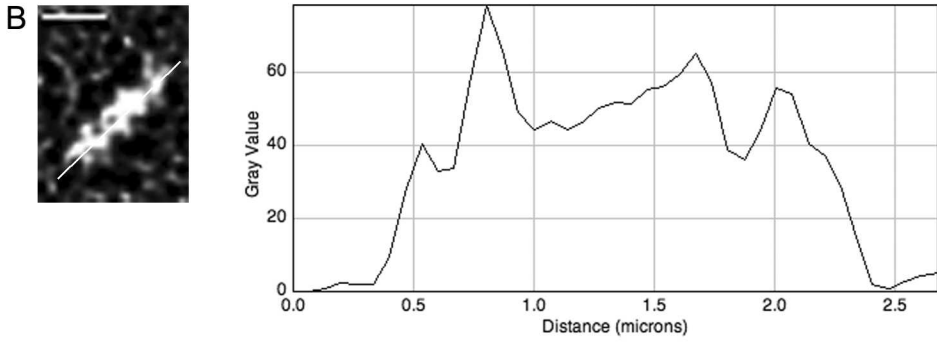
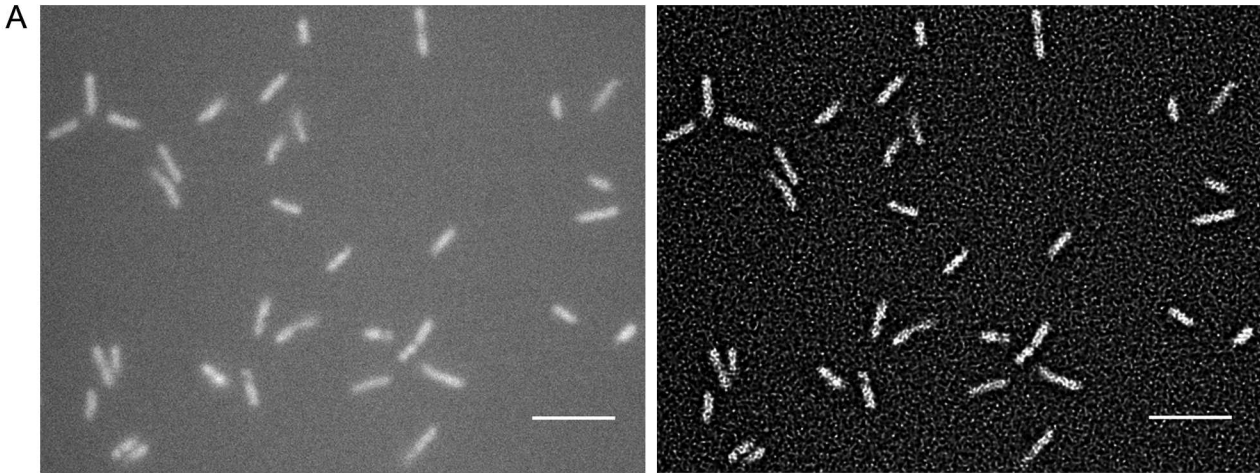


ABB. V-18. Ergebnisse der Mikroskopie der Kobaltochelatase CobN-eGFP; Smc04303; A) homologe zytoplasmatische Proteinverteilung B) starke Heterogenitäten in der Fluoreszenzintensität zwischen den einzelnen Zellen einer Kultur in Minimalmedium, von fast unsichtbaren Zellen (oben) bis intensive Fluoreszenz (unten); Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.

Eine andere Situation ist in den Zellen zu beobachten, die das Fusionsprotein CobN-eGFP, die Kobaltochelatase exprimieren. Das trunkierte Protein, ohne sechs C-Terminale Aminosäuren ist bereits in der Selektionsphase als Kolonie kurios aufgefallen, da es unter dem Leica-Binokular und dem eGFP-Plus-Filtersatz (Ex 480/40nm, Em 510nm) eine Emission im orange/rotem, anstatt im grünem Bereich gezeigt hat (ABB.V-5C und D). Ablichtung der in Minimalmedium kultivierten Zellen unter dem Zeiss Filter Set 05 (Ex: 395-440; Em: 470 open) hat diese Fluoreszenz ebenfalls nachgewiesen, die allerdings die selbe Lokalisierung aufweist, wie die eGFP-Fluoreszenz (nicht gezeigt). Das vollständige Protein zeigt eine homogene Verteilung im Zytoplasma einer Zelle, aber eine stark abweichende Fluoreszenzintensität zwischen den Zellen in einer Kultur. Das insgesamt unter den gegebenen Bedingungen schwächer exprimierte Protein kann in manchen Zellen Bereiche von ca. 100 counts erreichen, in anderen Zellen eine Intensität, die mit dem Hintergrundrauschen vergleichbar ist (ABB. V-18B).

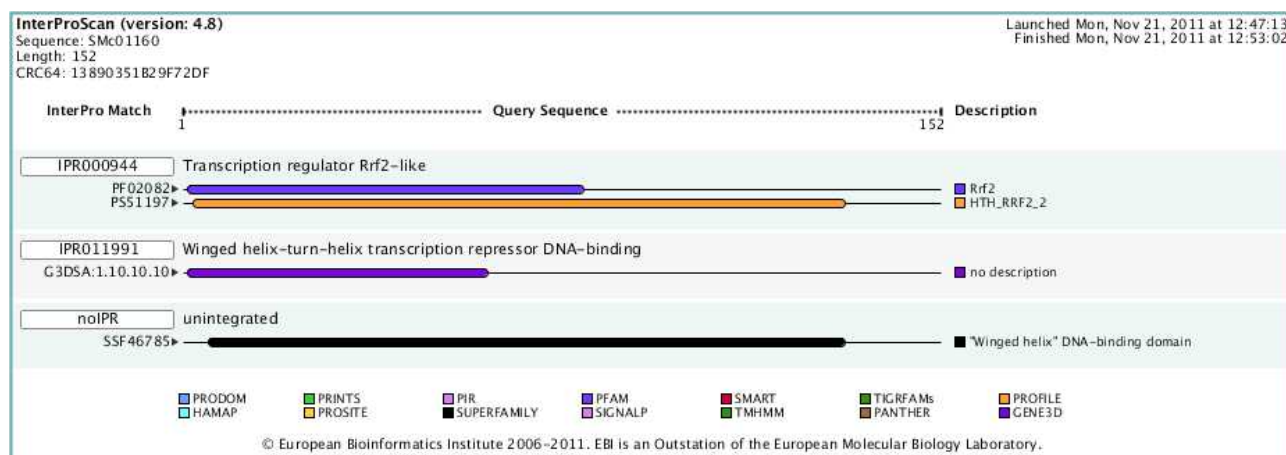
Abbildung befindet sich auf den nächsten 2 Seiten.

ABB V-19. Mikroskopieergebnisse für das konservierte hypothetische Protein Smc01160. A. Hellfeld und Fluoreszenzaufnahmen einer Auswahl von Zellen, die in Minimalmedium angezogen wurden. Fluoreszenzsignal ist erkennbar, aber zu schwach für eine Aussage über die subzelluläre Lokalisierung des Proteins. B. Vergrößerte Aufnahme einer ausgewählten Einzelzelle mit einem Plot der Grauwertintensität über die Länge der Zelle. Vermutet wird eine homogene zytoplasmatische Verteilung des Proteins. C. Aufnahmen einer Auswahl an Zellen, die auf TY Festagarplatte angezogen wurden, um anschließend in 0,85% NaCl resuspendiert wurden. Die Zellen sind größer und die homogene Proteinverteilung im Zytoplasma mit vereinzelt helleren Flecken ist nun deutlich sichtbar. D. Ergebnisse des InterProScans des Proteins ergeben einen Hinweis auf die mögliche Funktion des Proteins als transkriptioneller Regulator hin. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$  in den Übersichtsbildern, 1  $\mu\text{m}$  in Einzelzellaufnahmen.





## D



Das hypothetische Protein SMc01160, basierend auf den Annotationsinformationen zum Stamm *S. meliloti* Rm1021, wurde nach einer Protein-BLAST Analyse mit einer 100%-igen Übereinstimmung als Transkriptionsregulator der FAD-abhängigen Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase der BadM/Rrf2 Familie in *S. meliloti* SM11 (Schneiker-Bekel et al. 2011) identifiziert. Ein InterProScan-Vergleich der Aminosäuresequenz erkannte ebenso intern liegende DNA-Binde- und Transkriptionsrepressionsmotive. Das Protein wird in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkultur in definierten Medium nur mittelstark exprimiert (ABB. V-19B. Grauwertskala: ca. 60, sonst 100-400) und aus diesem Grund läßt sich auch das Signal nicht eindeutig räumlich auflösen. In stationären Bakterien aus einer Komplexmediumagarplatte sieht man deutlich, dass in einigen Zellen kleine, hellere Flecken mit höheren Konzentration an Fusionsproteinen zu finden sind.

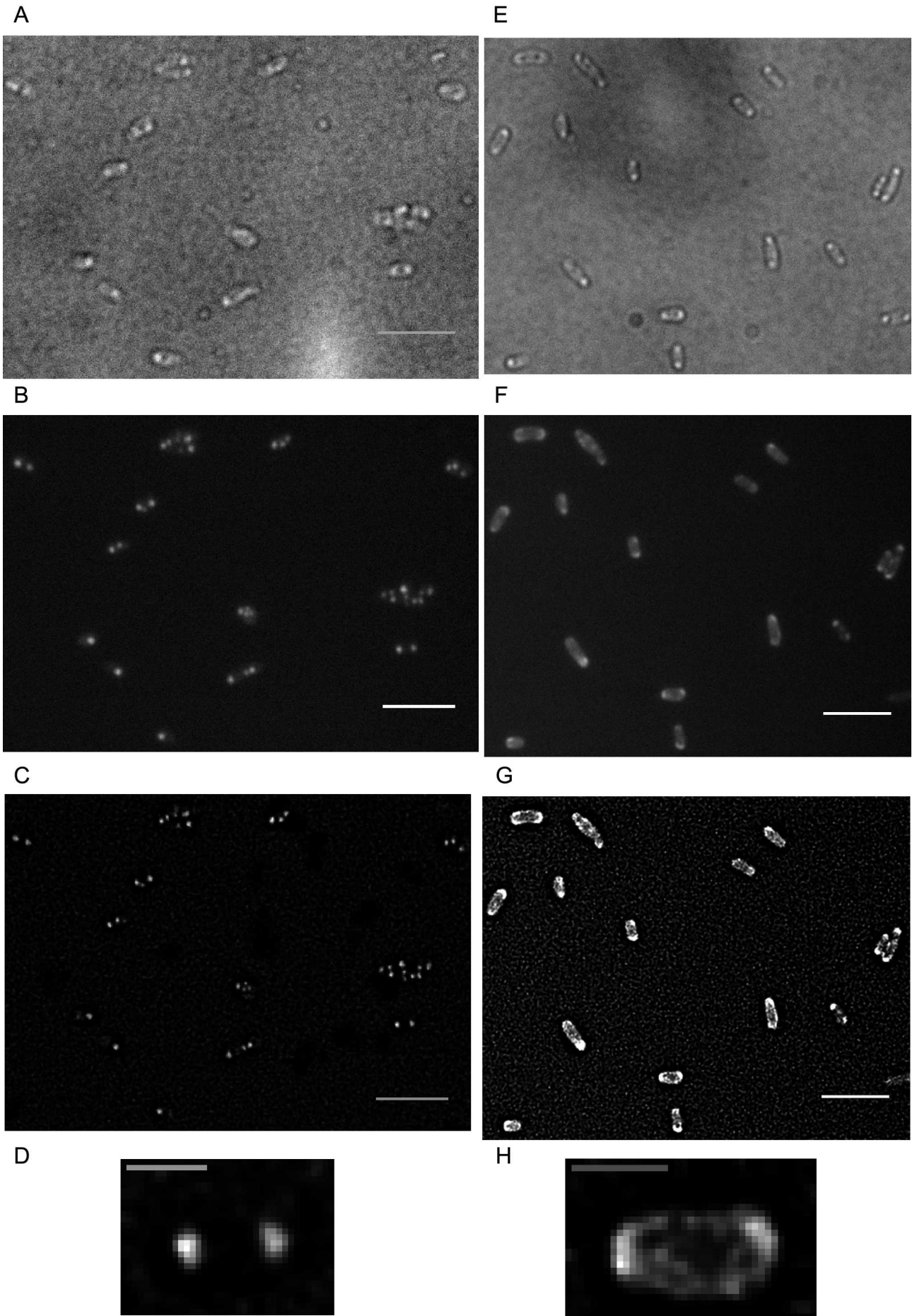
### V-3.2.5 Membranproteine weisen in einigen Fällen nur in ihrer vollständigen Länge und nicht als C-terminal trunke Proteine korrekte Lokalisierungen auf

Die Vorteile der im Rahmen dieser Studie etablierten Methode sind besonders bei der Erstellung von korrekt lokalisierenden Membranproteinen zu sehen. Unter den sechzehn lokalisierten und identifizierten Proteinen befinden sich vier bestätigte Membranproteine, QxtB, TerC, SitC, AtpF2. Diese Beispiele machen besonders deutlich, wie wichtig die Vollständigkeit eines Proteins für die korrekte Lokalisierung und die Verankerung in der Membran ist. Der Genlocus *qxtB* kodiert in *S. meliloti* für ein Teil des Multienzymkomplex der Atmungskette, die Untereinheit II des Transmembranproteins Quinoloxidase. Die trunke Version des eGFP-QxtB Proteins ist nur achtzehn Aminosäuren kürzer als das vollständige Protein. Die wenigen fehlenden Aminosäuren am C-Terminus bewirken aber, dass das Protein nicht korrekt gefaltet wird, sondern in

Inklusionskörpern verpackt wird (ABB. V-20). Das vollständige Fusionsprotein lokalisiert korrekt in der Zytoplasmamembran und zusätzlich an den beiden Zellpolen in Form von helleren "Kappen".

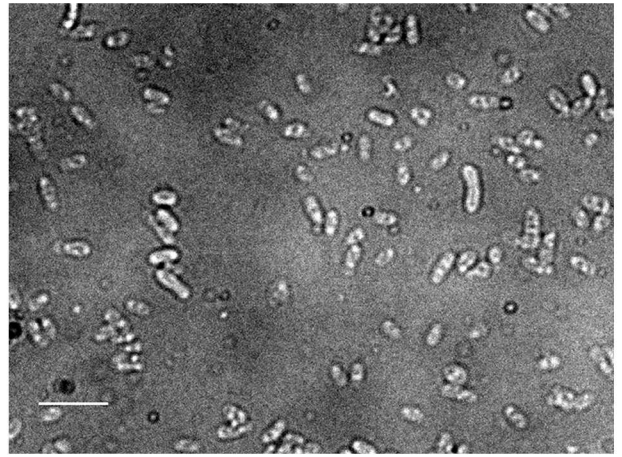
Abb. befindet sich auf der nächsten Seite.

ABB. V-20. QxtB-eGFP Unterschied zwischen der Proteinlokalisierung eines trunkierten und eines vollständigen Fusionsproteins. A-D) Mikroskopie und Dekonvolutionsergebnisse des trunkierten QxtB-eGFP  $\Delta$ -C316. Die Fluoreszenz sammelt sich in punktförmigen Gebilden innerhalb der Zellen, die auch im Hellfeldbild zu sehen sind. A) Hellfeldaufnahme. Auffällig sind die hellen Bereiche, die nicht nur an den Zellpolen auftreten und nicht mit der abweichenden Fokusebene zusammenhängen. B) Originalaufnahme Fluoreszenz. Hellen Punkte, 2-3 pro Zelle. C) Dekonvolution der Originalaufnahme. D) Vergrößerung einer Einzelzelle. E-H) Mikroskopie und Dekonvolution des QxtB-eGFP Konstrukts, in dem das QxtB-Protein den vollständigen C-Terminus produziert. A) Hellfeldaufnahme. B) Originalsignal Fluoreszenz. Fluoreszenzsignal an der Membran und in auffälligen "Polkappen". C) Dekonvolution der Originalaufnahme. H) Vergrößerung einer ausgewählten Einzelzelle. Größenbalken: 5 $\mu$ m in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu$ m in den Einzelzellbildern.

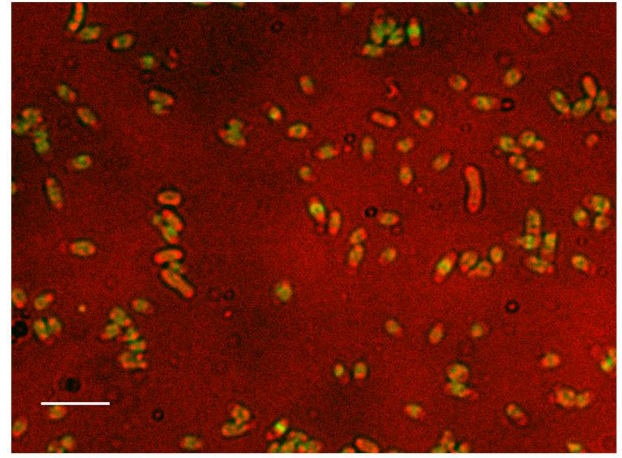
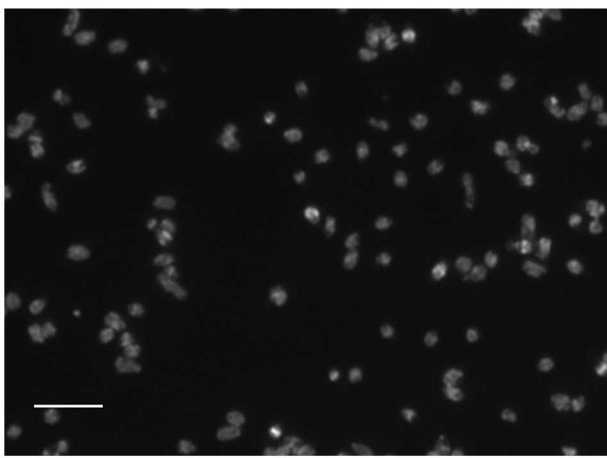


Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenso mit einem anderen Membranproteinen erzielt, der Untereinheit b' der putativen ATP Synthase. Die b' Untereinheit der ATP Synthase gehört zu sog. Stator Subkomplex ( $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$ ). Im Gegensatz dazu besteht der bewegliche Rotor aus drei verschiedenen Untereinheiten ( $\gamma\epsilon cn$ ) (ABB. V-22E). Der Abbildung V-22C kann entnommen werden, dass das eGFP-Transposon zwischen die Aminosäuren V180 und V181 integriert wurde. Ein InterProScan der Aminosäuresequenz der ATPF2-Synthase ergab, dass die Transmembranregion der b' Untereinheit wahrscheinlich in dem N-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 56-76 liegt; das Ergebniss stimmt mit der Abbildung V-22D überein. Demnach ist das eGFP-Protein in die C-Terminale, zytoplasmatisch lokalisierte Region integriert. Die ATP Synthase in *E. coli* wurde in zahlreichen Studien detailliert untersucht. Leider hat das Protein in *S. meliloti* nur kleine Homologien zu *E. coli* ATP Synthase, d. h. die Ergebnisse aus Deletionsstudien in *E. coli* können nur vorsichtig mit der Situation in *S. meliloti* verglichen werden. In *E. coli* besteht die b Untereinheit aus 156 Aminosäuren. Der N-Terminus liegt auf der periplasmatischen Seite, direkt gefolgt von einer Transmembranhelix. Der zytoplasmatische Teil des Proteins liegt wahrscheinlich als alpha-Helix vor (Dunn et al. 2000). Deletion von vier C-terminalen Aminosäuren der b Untereinheit störte möglicherweise die Bindung an die  $\delta$  Untereinheit (McLachlin et al. 1998).

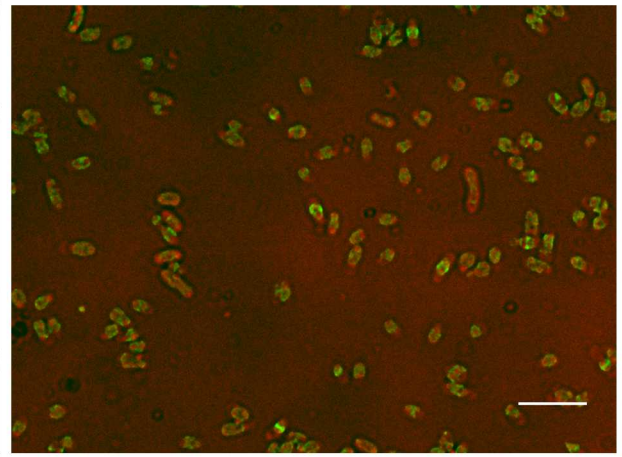
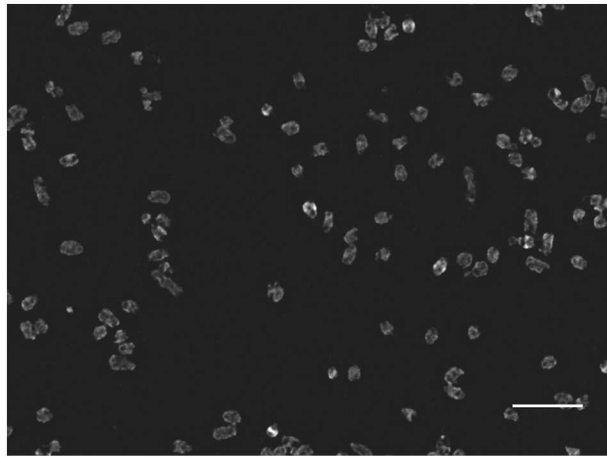
A



B



C



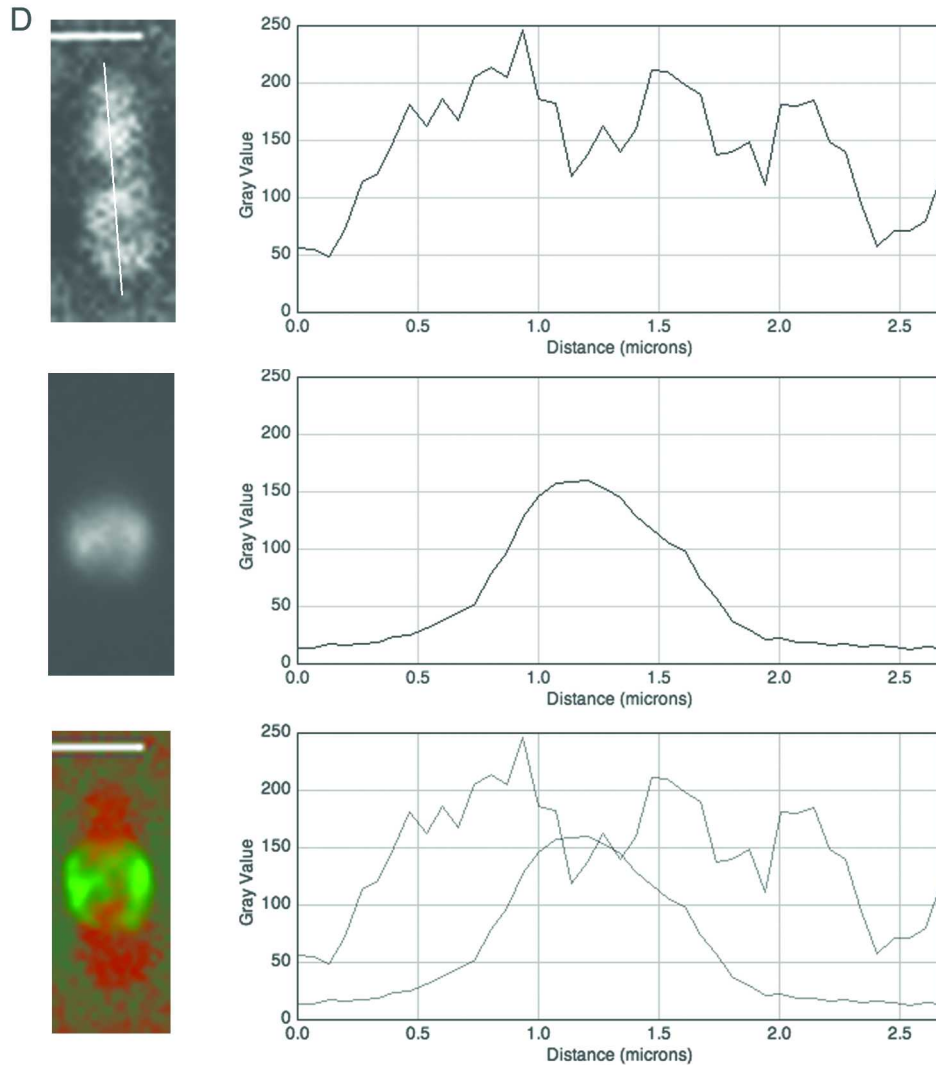
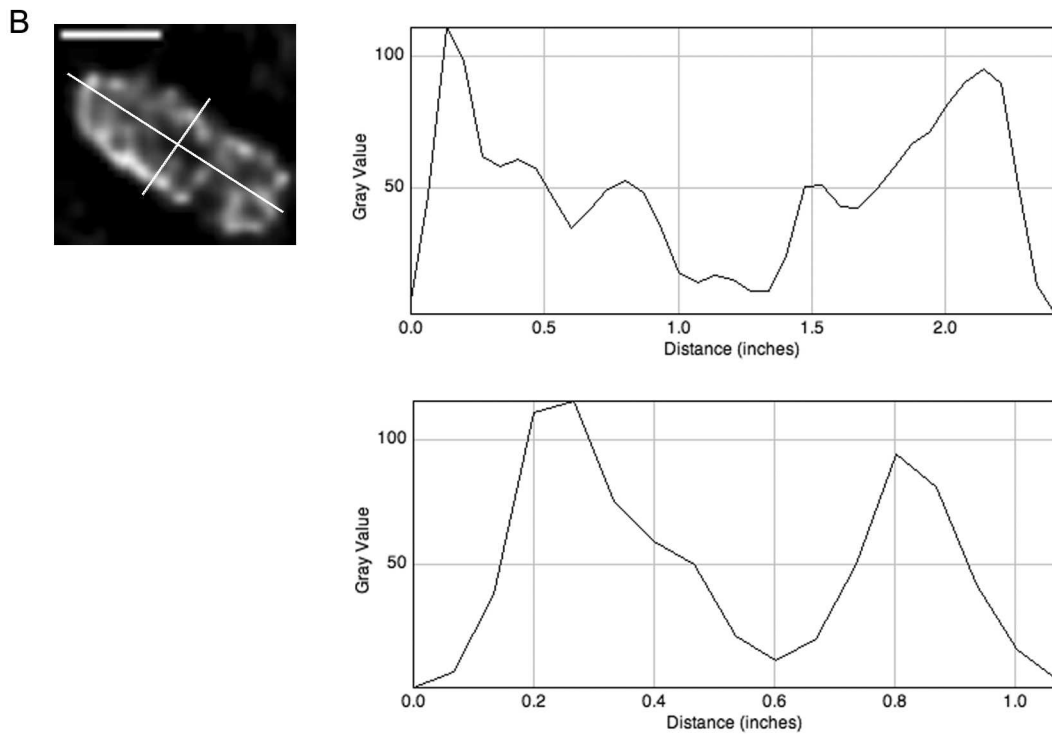
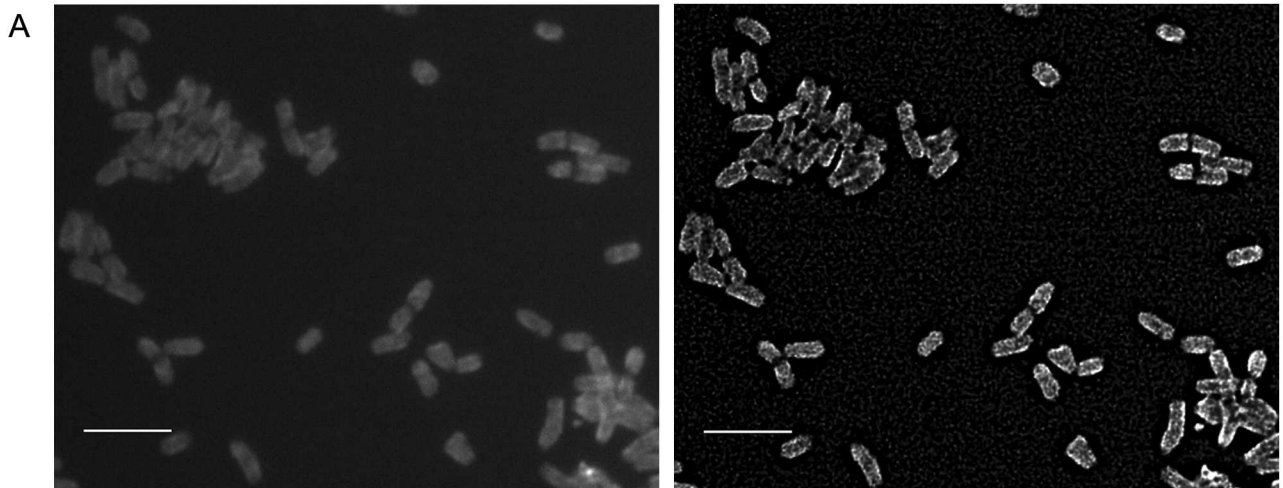


ABB.V- 21 Mikroskopie des trunkierten Fusionsproteins ATPF-eGFP in *S. meliloti*. A) Hellfeldaufnahme einer Gruppe von Zellen kultiviert in Vincent Minimalmedium; B) das entsprechende Fluoreszenzsignal derselben Gruppe von Zellen (links) und ein Overlay mit der Hellfeldaufnahme (rechts, Zellen/Hellfeld in rot, eGFP-Signal in grün); C) dekonvolvierte Aufnahme der Zellen (links) und das entsprechende Overlay mit dem Hellfeldbild (rechts, Zellen/Hellfeld in rot, das dekonvolvierte eGFP-Signal in grün); D) Vergrößerte Aufnahme einer Einzelzelle mit dazu gehörigen Plots der Signalintensität senkrecht entlang der Längsachse, von oben nach unten : Hellfeldaufnahme, dekonvolvierte eGFP-Fluoreszenz und ein Overlay beider Signale; die trunkierten Fusionsproteine scheinen ein kleines sphärisches Gebilde in der Zellmitte auszubilden.





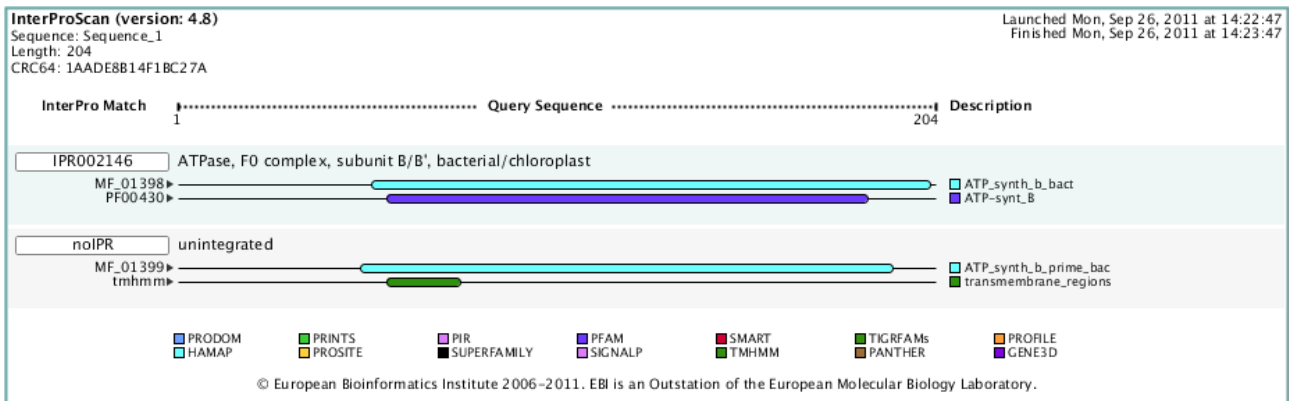
C

```

1 MFVTAAYAQS STTEGAEAHG AAAAGEVHTE TGVAHEADHG AGVFPPFDDT HFASQLLWLA
61 ITFGLFYLLM SKVIIPRIGG ILETRHDRIA QDLDEASRLK GEADAAIAAY EQELAGARAK
121 GHSIADTARE AAKAKAKADR DGVEAGLAKK IAAAEARIAD IKSKALADVG AIAEETATAV
181 VKQ-eGFP-VKQLIGGTVT KAEIAAFKA SAGN

```

D



E

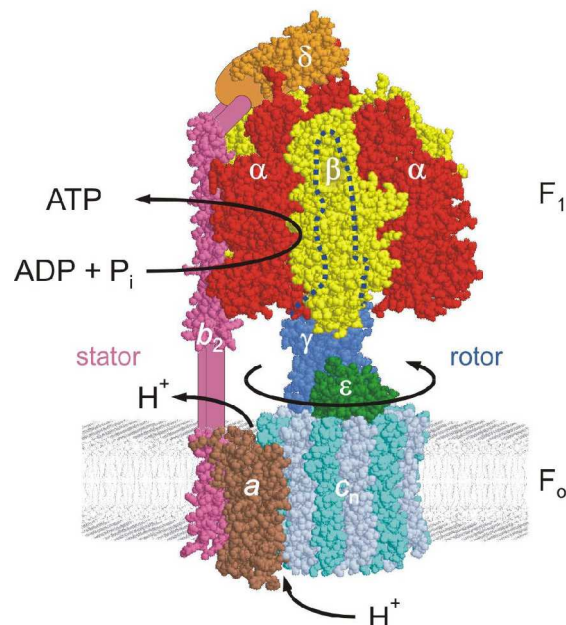


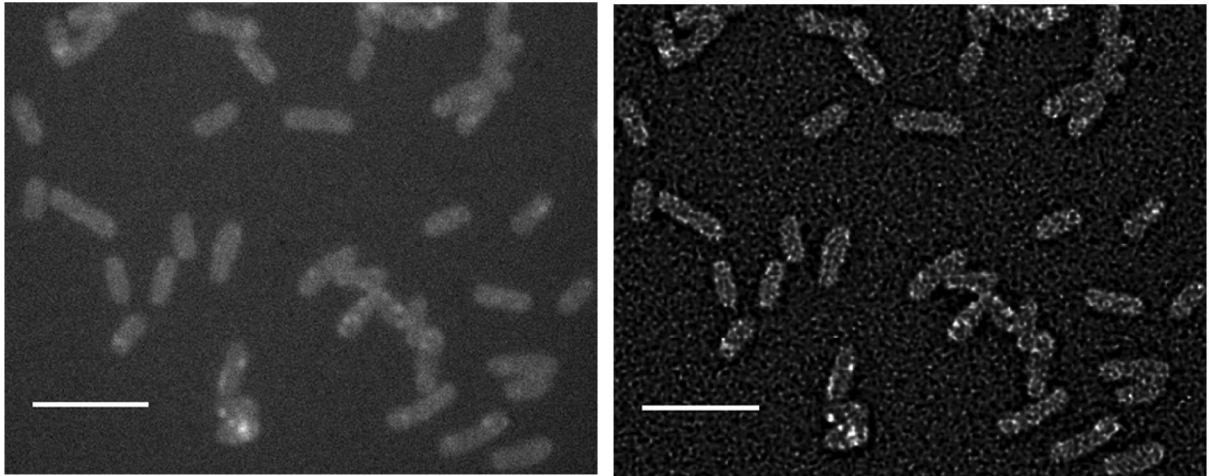
ABB. V-22. Mikroskopische Aufnahmen und Charakteristika des vollständigen Fusionsproteins ATPF2-eGFP. A) Fluoreszenzsignal und Dekonvolution der Aufnahme einer Gruppe von Zellen; B) eine repräsentative Einzelzelle mit einer deutlichen Membranlokalisierung des Fusionsproteins und den dazu gehörigen Intensitätsplots des Zellenlängsschnitts (oben) und Querschnitts (unten) mit Signalpeaks im Bereich der Membran; C) Die Aminosäuresequenz des ATPF2-Proteins mit angedeuteter Insertionsstelle des eGFP (grün hervorgehoben) und der Duplizierung der drei Aminosäuren VKQ an der Insertionsstelle; D) Ergebnisse von InterPoScan der Sequenz mit dem dargestellten Bereich der Transmembranregion, die Insertion des Transposons erfolgte im C-Terminalen, zytoplasmatischen Domäne; E) Schematische Darstellung der Untereinheiten einer ATP-Synthase, die  $b_2$  Untereinheiten gehören zum Stator der molekularen Fabrik, wobei über den N-terminalen Bereich die Verankerung in der Membran erfolgt und über den C-terminalen Bereich die Bindung an die  $\delta$ -Untereinheit ausgeübt wird, die eventuell im trunktierten Protein fehlerhaft ist. Größenbalken:  $5\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen,  $1\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.



Zu den weiteren identifizierten Membranproteinen gehören die Mangan ABC Transporterpermease SitC (SMc002507) und das hypothetische Transmembranprotein TerC (SMc03171). Hiermit sind vier der sechzehn untersuchten Proteinfusionen membranassoziiert. Die gemachten Beobachtungen decken sich hier auch in drei der vier Fällen mit den *in silico* Vorhersagen zur Proteinlokalisierung, d.h. als Lokus wird die Zytoplasmamembran genannt. Im Fall der ATP Synthase b' Untereinheit wird als Ergebnis der PSORTb Analyse "unbekannt" als finale Vorhersage genannt. Der Grund dafür ist das implementierte ModHMM+-Modul, das in der Aminosäuresequenz von ATPF2 nur ein Motiv für eine Transmembranhelix gefunden hat. Für die Kategorisierung eines Proteins als membranlokalisiert werden vom Programm jedoch drei Transmembranhelices innerhalb der Sequenz vorausgesetzt (<http://www.psорт.org/documentation>). In dem speziellen Fall ist die Untereinheit b' der ATP Synthase ein Teil des größeren Proteinkomplexes und nur über eine N-terminal situierte Transmembranhelix in der Zytoplasmamembran verankert.

Ebenfalls konnten von PSORTb keine Voraussagen zur über die hauptsächliche Lokalisierung hinaus auftretenden Anhäufungen des betroffenen Proteins getroffen werden, z. B. die polaren Kappen des QxtB-eGFP Proteins (ABB. V-20) oder die punkt-/fleckentartigen hellfluoreszierenden Bereiche in den *S. meliloti* Zellen, die das Fusionsprotein SitC-eGFP exprimieren (ABB. V-23 A).

A



B

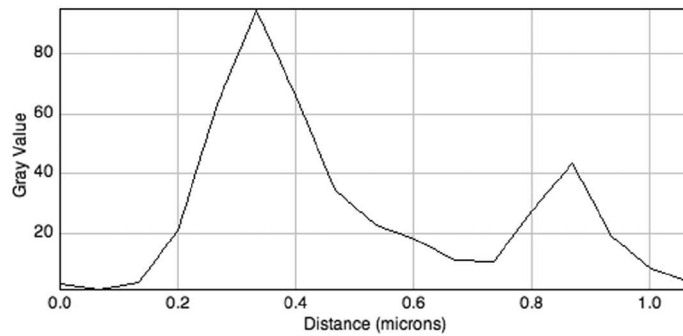
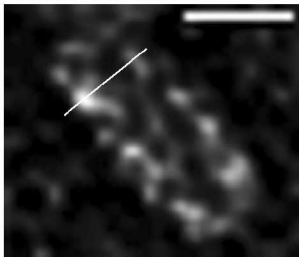


ABB. V-23. Mikroskopieergebnisse für das SitC-eGFP Fusionsprotein, die Mangan ABC Transporterpermease. A. Aufnahmen aus der Fluoreszenzmikroskopie und der Dekonvolution. B. Vergrößerung einer Einzelzelle und ein Intensitätsplot der Grauwerte über die Breite der Zelle. Zwei Peaks in Bereichen der Membran sind deutlich sichtbar. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.

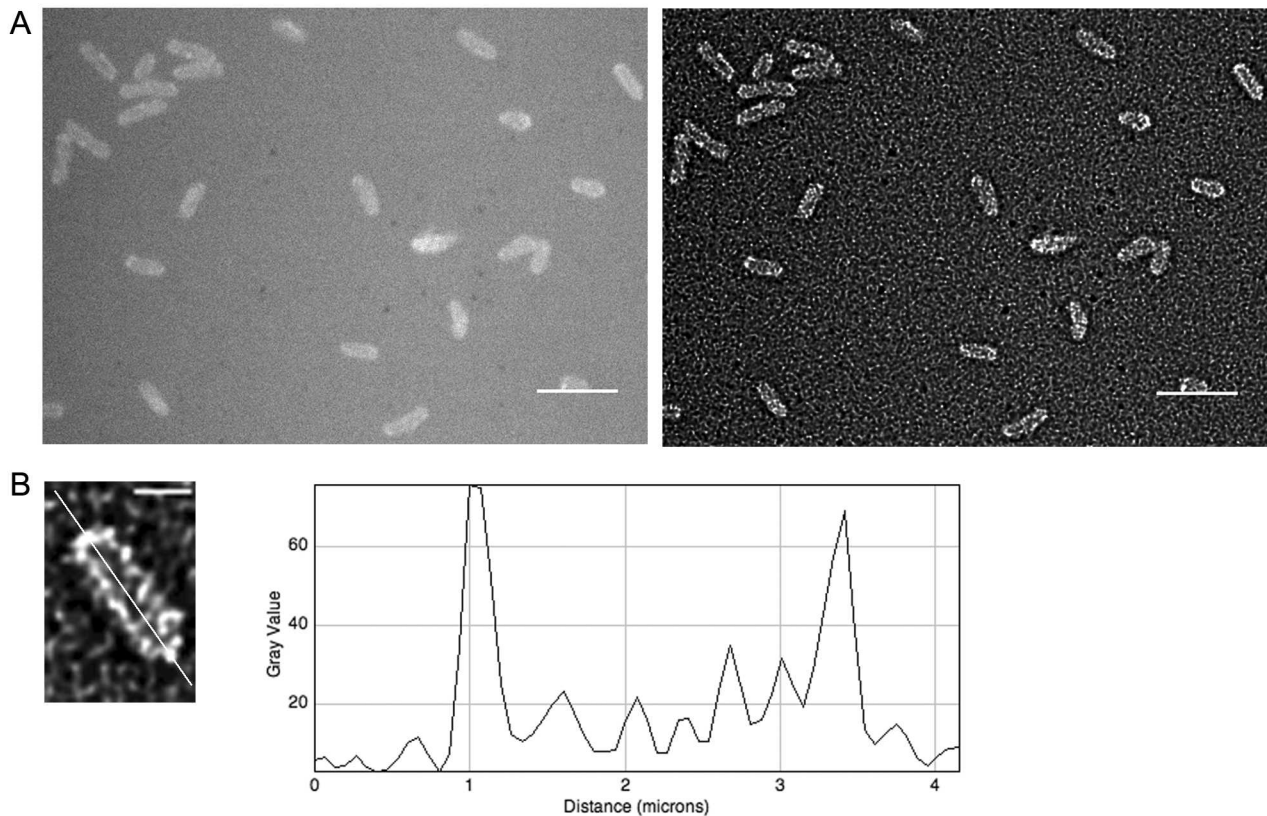


ABB. V-24. Ergebnisse der Mikroskopie des TerC-eGFP Fusionsproteins. A) Fluoreszenzmikroskopie und Dekonvolution der Aufnahme. B) Vergrößerung einer Einzelzelle und Plot der Signalintensität über die Längsachse der Zelle. Starkes Signal an der Membran der Zelle. Größenbalken:  $5\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen,  $1\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.

### V-3.2.6 Diverse Lokalisierungsmuster polarer und variabler zytosolischen Fokusse in bakteriellen Zellen

Einige der näher charakterisierten Fusionsproteine bilden subzellulär distinkte Bereiche mit deutlich höheren Konzentration. Diese Fokusse können an den Polen der Zelle liegen, aber auch an variablen Orten im Zytoplasma, sie können vereinzelt oder in hoher Anzahl vorkommen. Das putative Protein Methylmalonat Semialdehyd-Dehydrogenase IolA (*mmsA*, SMC00781) ist ein Beispiel für solches in vielzähligen komplexen vorliegendes Protein (ABB.V-25). Die hellen Spots können im Zytoplasma vorkommen, sind aber meist scheinbar an der Membran um die Zelle herum, wie in einer Perlschnur situiert. Wenige, nur 1-2 Fokusse pro Zelle können in den Bakterien beobachtet werden, die das Fusionskonstrukt putative Urocanhydratase-eGFP exprimieren (*HutU*, SMC21163) (ABB.V-26). Eine gänzlich andere subzelluläre Lokalisierung konnte für das hypothetische Protein SMC00100 dokumentiert werden. Das Protein trägt einige Motive eines ATP-bindenden Proteins und liegt fusioniert mit eGFP im Zytoplasma und in helleren Fokussen vor (ABB.V-27).

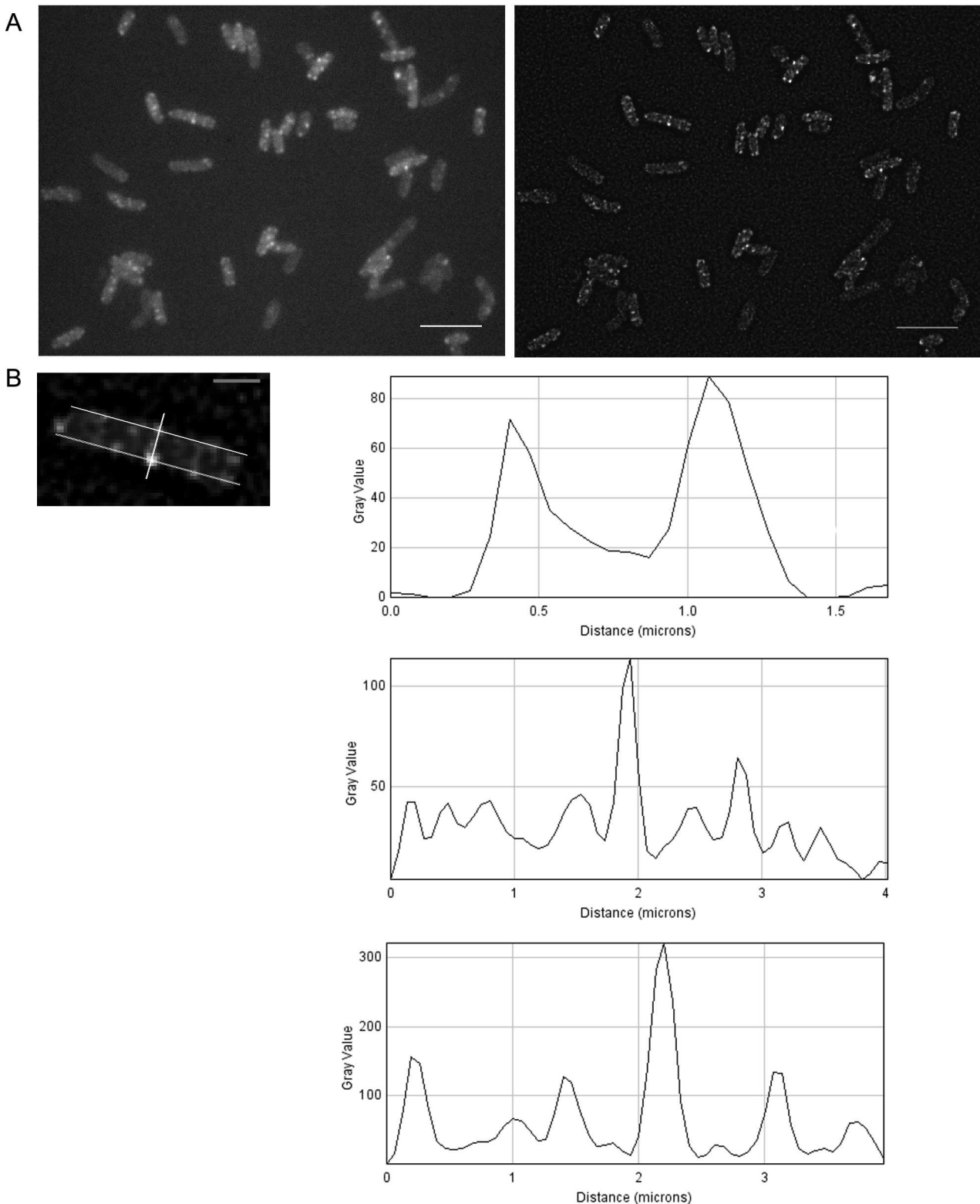


ABB. V-25. Ergebnisse der Mikroskopie für putative Methylmalonat Semialdehyd Dehydrogenase, Iola-eGFP. Helle fluoreszente Foki entlang der Zellenumrisse. A) Fluoreszenzmikroskopie und Dekonvolution der Aufnahme. B) Vergrößerung einer ausgewählten Einzelzelle und Plots der Signalintensitäten in verschiedenen Bereichen der Zelle. Von oben nach unten: Oben: Zellquerschnitt auf der Höhe der zwei

helleren Bereiche. Keine Fluoreszenz im Zytoplasma, Ausschläge an der Membran. Mitte: Entlang der oberen Grenze der Zellhülle. Wiederholt höheren Peaks an fluoreszenten Foki entlang der Membran. Unten: Entlang der unteren Zellmembran auch einige starken Signale. Die Fluoreszenzfoki haben den Durchschnitt von ca. 300-400 nm. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.

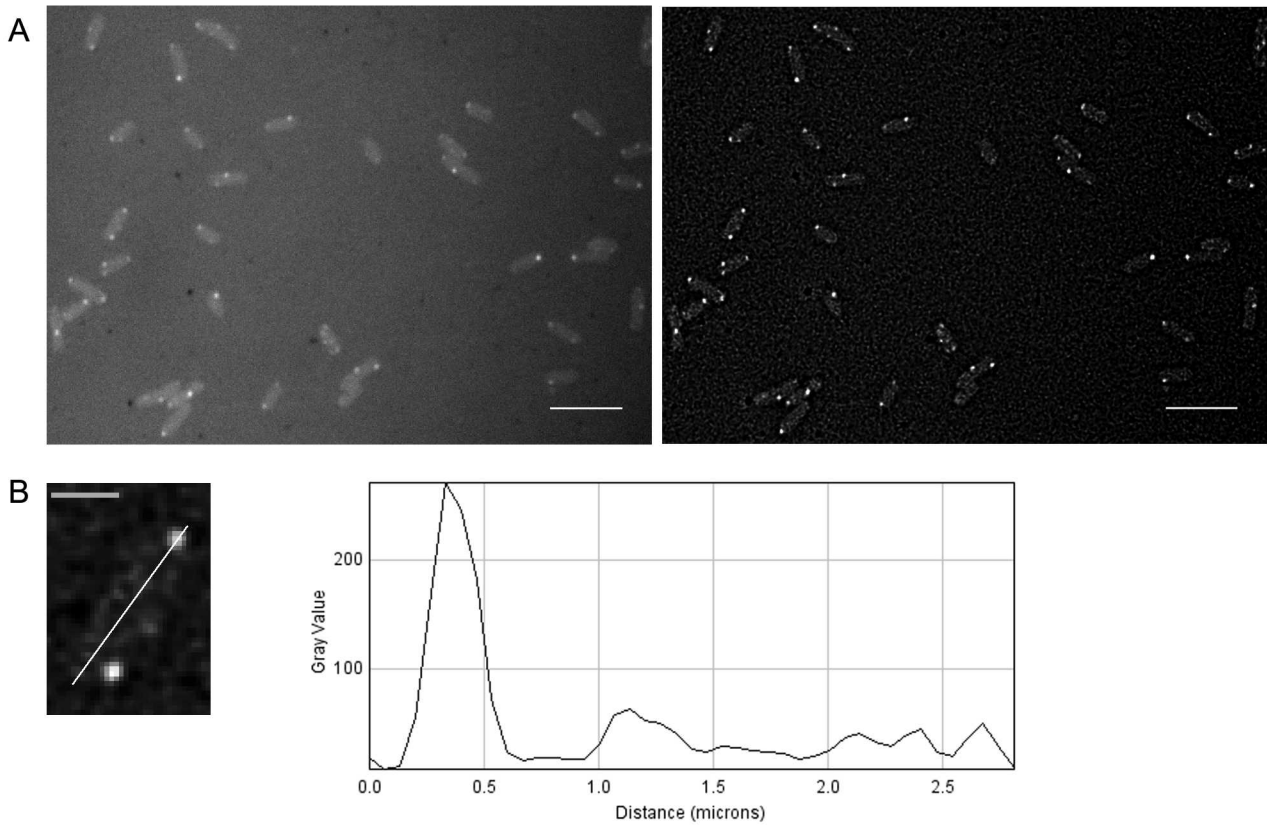


ABB. V-26. Ergebnisse der Mikroskopie für das Fusionsprotein HutU-eGFP. A) Fluoreszenzmikroskopie und Dekonvolution der Aufnahme. Vereinzelt kleine Fokuse oft an den Polen der Zelle, es treten durchschnittlich zwei Fokuse pro Zelle auf, beide Membran-proximal. B) Vergrößerung einer Einzelzelle und Plot der Signalintensität über die Länge der Zelle entlang der Membran. Starkes Signal an einem Fluoreszenzfokus am Pol der Zelle. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$  in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu\text{m}$  in den Einzelzellbildern.

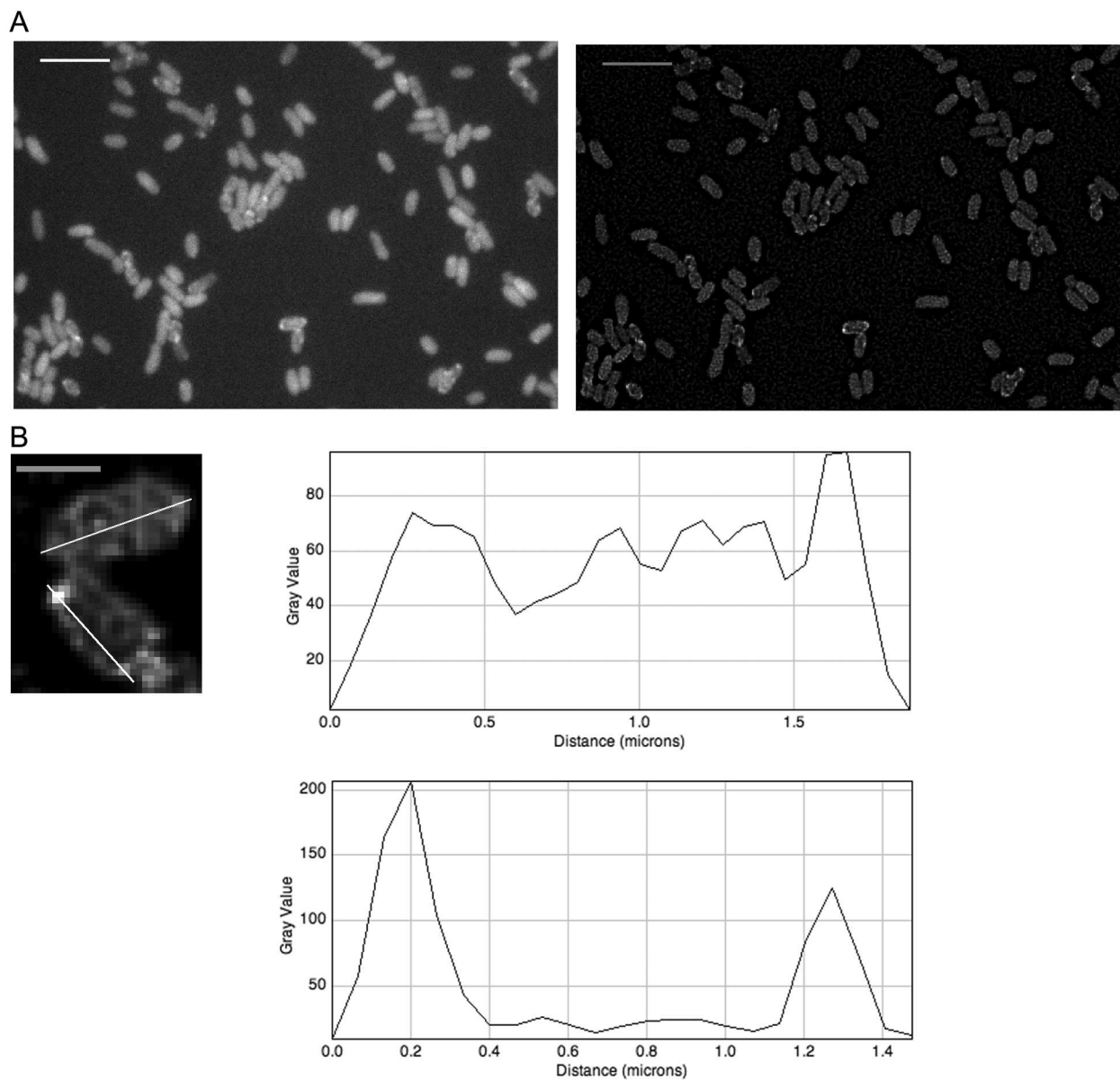


ABB: V-27. Ergebnisse der Mikroskopie des Fusionsproteins SMC00100-eGFP. A) Fluoreszenzmikroskopie und Dekonvolution der Aufnahme. Zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins mit einzelnen hellen, unförmigen "Flecken" oder Punkten. B) Vergrößerung von zwei ausgewählten Einzelzellen mit unterschiedlichen Charakteristika und Plots der Signalintensitäten über die Längsachsen der Zellen. Oben: die obere Zelle zeigt ein homogen verteiltes, zytoplasmatisches Signal. Unten: die untere Zelle zeigt kaum Fluoreszenz im Zytoplasma, dafür eine Konzentrierung an einem der Pole der Zelle. Größenbalken: 5 $\mu$ m in den oberen Aufnahmen, 1  $\mu$ m in den Einzelzellbildern.

### V-3.2.7 Helikale Lokalisierung der Endoribonuklease E aus *S. meliloti*

Ein spezieller Fall der subzellulären Lokalisierung stellen Proteine dar, die in Helices angeordnet sind. In *S. meliloti* Endoribonuklease E - eGFP Stamm, bilden die Fusionsproteine eine spiralförmige Struktur aus, die sich um das stäbchenförmige Bakterium herumwindet (SMc01336, RNaseE) (ABB. V-28). Besonders in der Nahaufnahme sind die Windungen deutlich zu sehen (ABB. V-28B).

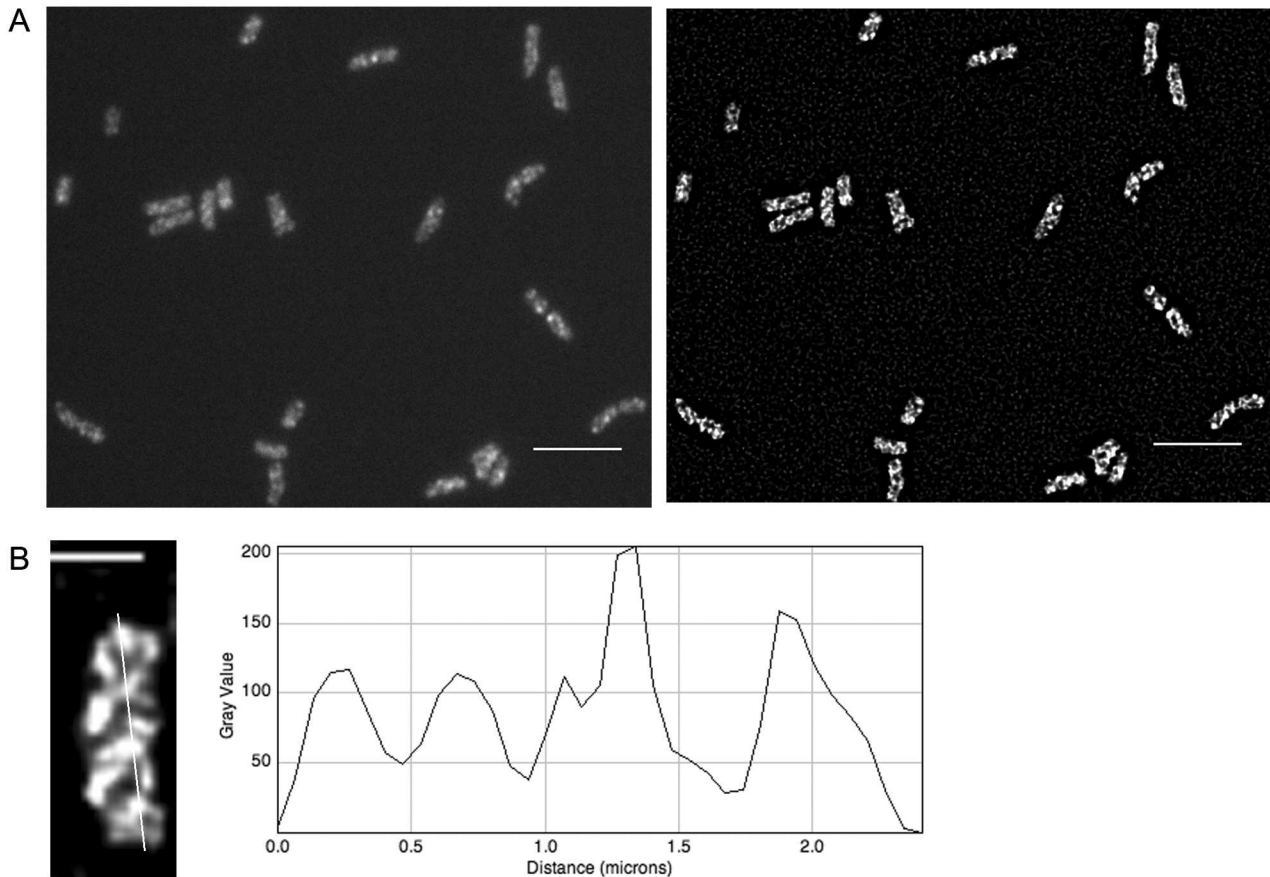


ABB.V-28. Mikroskopische Untersuchungen des RNaseE-eGFP-Fusionsproteins in *S. meliloti*. A) Die Originalaufnahme (links) und das Ergebnis der Dekonvolution (rechts). B) Nahaufnahme einer Einzelzelle mit deutlich sichtbaren spiralförmigen Lokalisierung des Fusionsproteins. Der Intensitätsplot über die Längsachse der Zelle weist vier Scheitelwerte der Signalintensität auf.

### **V.3.2.8 Heterologe Lokalisierungsmuster der RNA Polymerase RpoB und Smc04094**

Zwei der sechzehn erstellten Fusionskonstrukte weisen einen heterogenen Charakter der subzellulären Lokalisierung auf. Die RNA Polymerase RpoB verteilt sich in der Mehrheit der Zellen im Zytoplasma, allerdings verglichen mit dem freien GFP Protein nicht ganz homogen, sondern eher „fleckig“ (ABB.V-29). In einigen Zellen, die meist eher kürzere Länge besitzen, liegt das Fusionskonstrukt in hellen, konzentrierten „Flecken“, in der Zahl von zwei bis drei pro Zelle vor. Ein ähnliches Bild der Proteinlokalisierung bietet sich bei Betrachtung exponentiell wachsender Zellen, die das Fusionsprotein Smc04094-eGFP exprimieren. Das konservierte hypothetische Protein liegt in einer recht hohen Konzentration als Fusionsprotein vor, was in den vergleichbar hohen Signalstärken von 400-600 Grauwerten (16 Bit TIFF) widergespiegelt wird (ABB.V-30B). Unterschiedliche Proteinlokalisierungen innerhalb einer Kultur von genetisch identischer Bakterienzellen könnten ein Hinweis sein auf eine mögliche zeitabhängige Veränderung des Musters, abhängig von dem Zustand oder Zellzyklus jeder Zelle. Leider erlaubte das gegebene Gerätesetup keine Aufnahmen der lebenden und sich teilenden Zellen über Zeit. Dieser interessanten Fragestellung kann zukünftig nachgegangen werden.



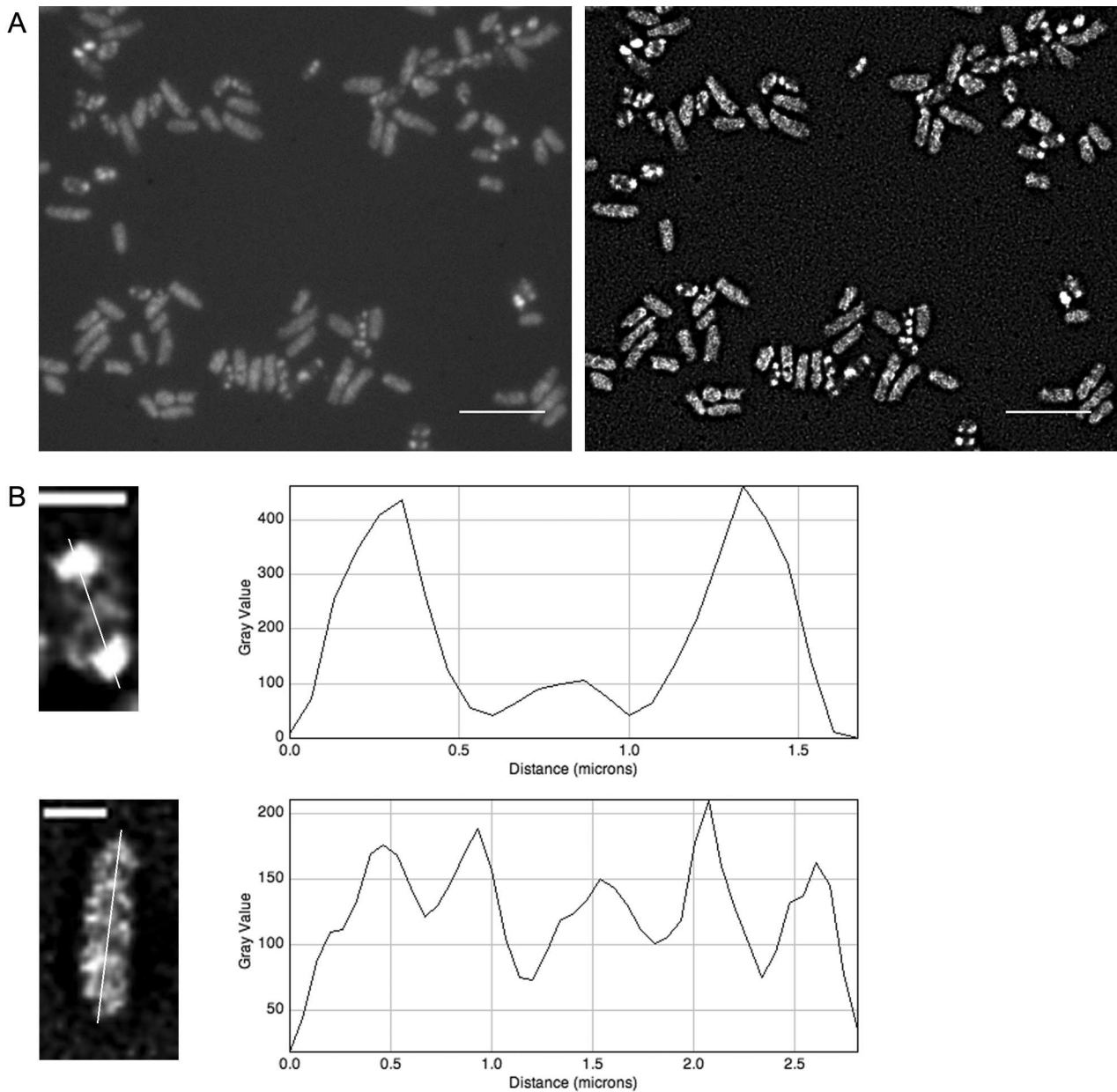


ABB. V-29 . Mikroskopieergebnisse für die DNA abhängige RNA Polymerase RpoB, (Smc01317).

A) Epifluoreszenz (links) und Dekonvolution (rechts). Heterogener Charakter der Proteinverteilung, einige Zellen mit zytoplasmatischer Proteinverteilung, andere mit wenigen hellen Proteinflecken. B) Einzelzell-aufnahmen repräsentativer Zellen. Unten ein ca. 2.5 Mikrometer langes Bakterium mit fleckiger, zytoplasmatischer Proteinverteilung, oben eine kürzere, ca. 1.5 Mikrometer Bakterienzelle mit zwei polaren, sehr hellen „Flecken“.

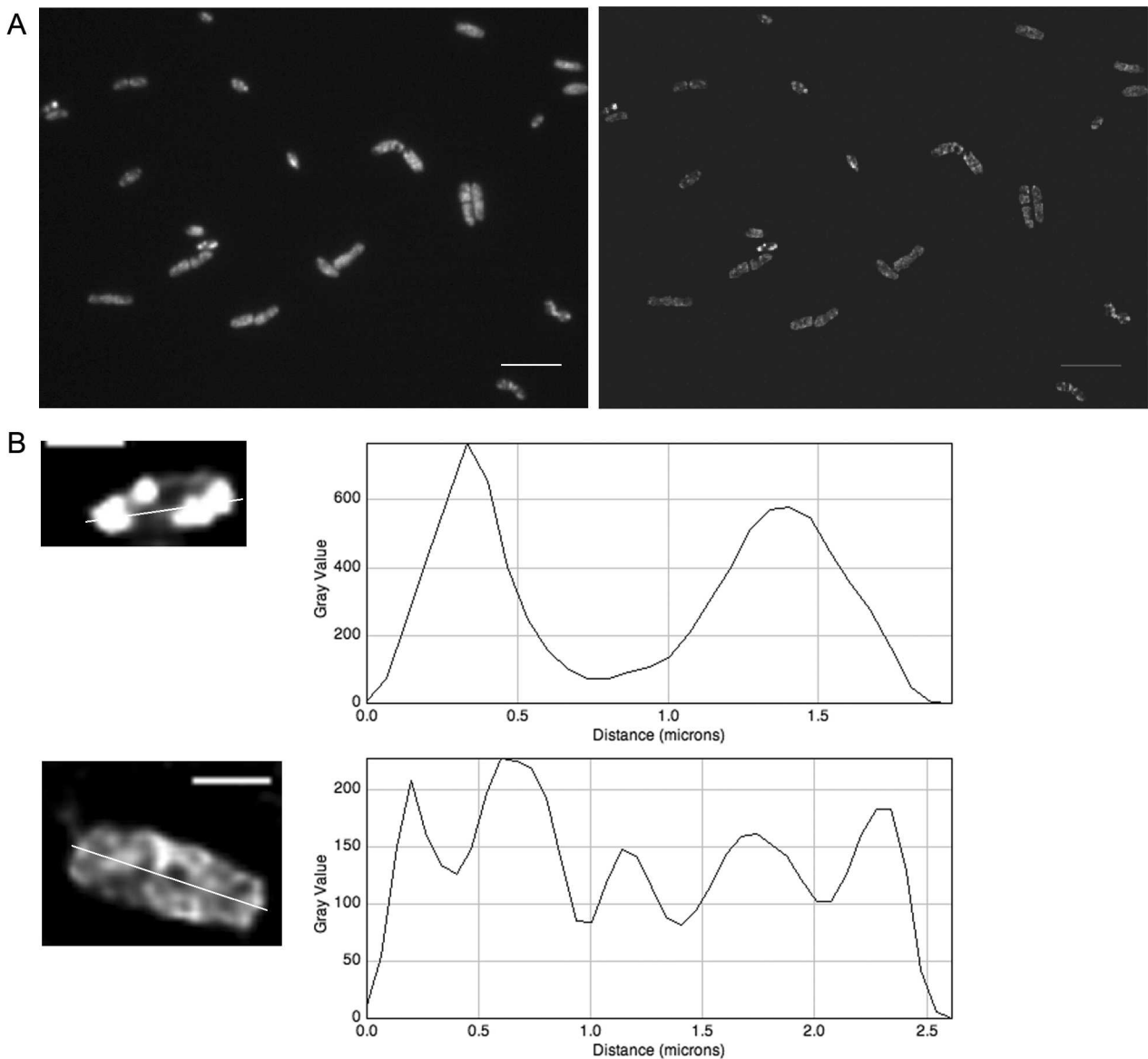


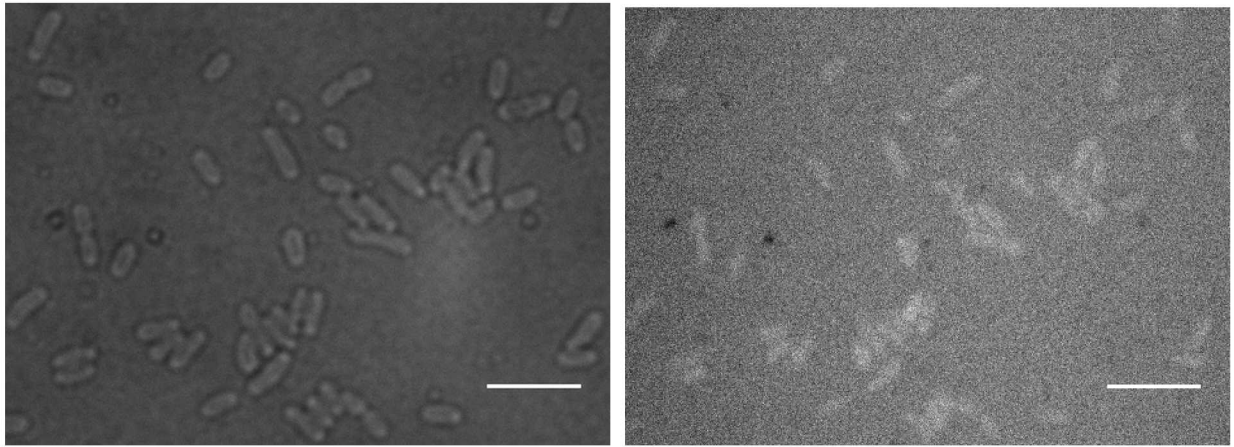
ABB. V-30. Ergebnisse aus Mikroskopie des Fusionsproteins Smc04094. A) Links das Originalfluoreszenzbild, links die dekonvolvierte Aufnahme. Heterogene Proteinverteilung zwischen den Zellen einer Kultur. B) Vergrößerung einzelner Zellen, oben eine ca. 2 Mikrometer lange Zelle mit „fleckiger“ Zytoplasmalokalisierung des Fusionsproteins, unten eine kürzere, ca. 1 Mikrometer lange Zelle mit wenigen, sehr hellen „patches“. Größenbalken: 5 Mikrometer im oberen Bildern, 1 Mikrometer in den Einzelzellbildern

**V-3.2.9. Das mögliche Transkriptionsregulatorprotein SMA5007 zeigt eine messbare Expression in der stationären Phase während des Wachstums auf komplexen Festmedien, nicht in exponentiell wachsenden Flüssigkultur im Minimalmedium.**

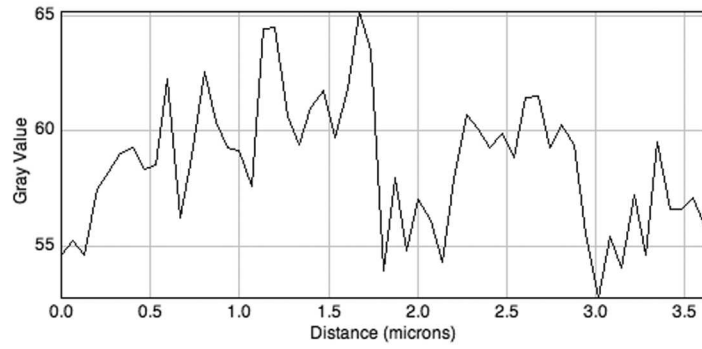
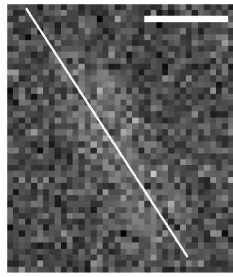
Das Fusionsprotein SMA5007-eGFP wird auf dem Megaplasmid von *S. meliloti* pSymA kodiert und beweist damit, dass die vorgestellte Methode nicht nur auf Transpositionen im Hauptchromosom beschränkt ist, sondern Markierungen von allen genetischen Elementen ermöglicht (s. auch *hutU-egfp* kodiert auf dem pSymB Megaplasmid). Während der Selektion transponierter Kolonien auf Agarplatten wurde dieses Fusionskonstrukt tragende Bakterienkolonie aufgrund des deutlichen Fluoreszenzsignals ausgewählt. Die Mikroskopie der Kultur im Vincent-Minimalmedium ergab jedoch, dass kaum Fluoreszenz vorhanden war, diese war mit der Eigenfluoreszenz des *S. meliloti* Wildtyps vergleichbar (ABB. V-13 und V-31). Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde eine Probe direkt von einem 5 Tage alten Ausstrich auf Agarplatte aus komplexen TY-Medium gesammelt und in 0,85% NaCl für die nachfolgende Mikroskopie suspendiert. Die stationären Zellen zeigten tatsächlich ein deutliches Fluoreszenzsignal, das in manchen Zellen gleichmäßig im Zytoplasma verteilt war, in einigen Fällen in hellen "patches" konzentriert war.

ABB. V-31 (nächste Seite). Ergebnisse der Mikroskopie des SMA5007-eGFP Fusionsproteins (möglicher Transkriptionsaktivator, Lambda-Repressor-Art). A) Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur in Minimalmedium. Kaum sichtbare Fluoreszenz auch der Einzelzelle. B) Auf Komplexfestmedien gewachsene Zellen mit deutlich intensiveren Schwellenwerten und besserem Zelle/Hintergrund Signalverhältnis.

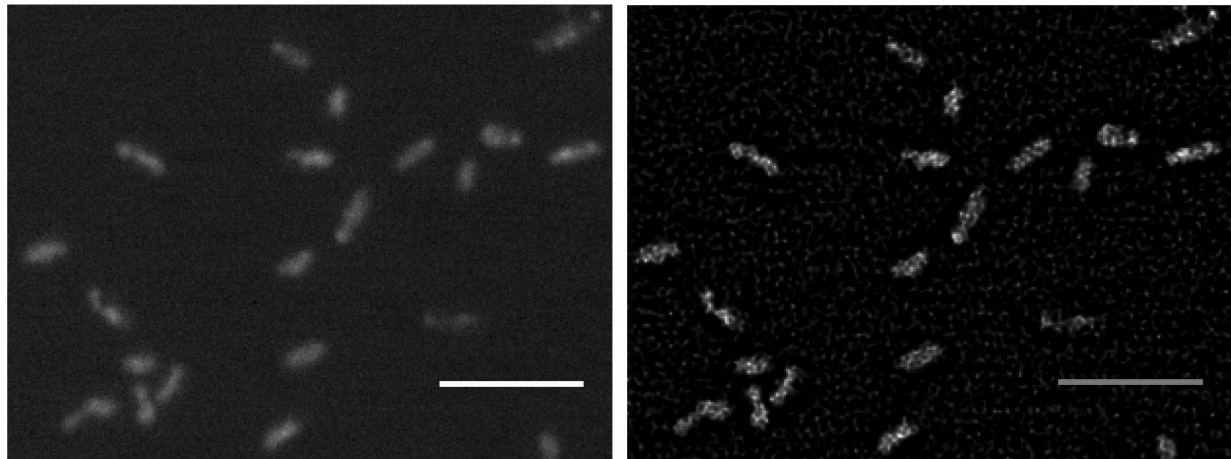
A



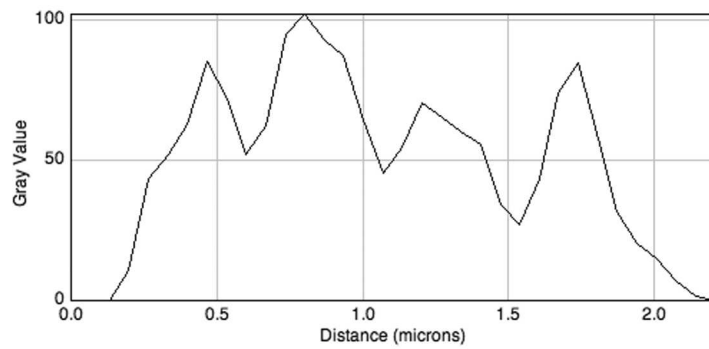
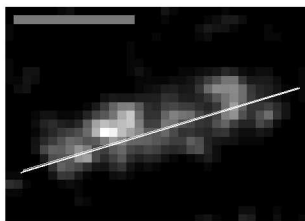
B



C



D



#### V-4 Untersuchung der Expression und Lokalisierung der Fusionsproteine *in planta* während der Symbiose mit *M. sativa*

Die erstellten Fusionsproteine in *Sinorhizobium meliloti* sind genomisch kodiert, benötigen dadurch keinen antibiotischen Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung des fluoreszenten Markers. Darüber hinaus werden die Fusionskonstrukte mit Hilfe endogener Regulationsmechanismen exprimiert. Aus diesem Grund sind die Stämme sehr gut zur Analyse der Expression der entsprechenden Fusionsproteine während der Symbiose mit den Leguminosepflanzen geeignet. Im Rahmen dieser Studie wurde als Symbiosepartner *Medicago sativa*, die Luzerne gewählt. Für diese Untersuchungen wurden die *S. meliloti* eGFP-Stämme in Minimalmedium angezogen und zur Inokulation von drei Tage alten *M. sativa* Keimlingen auf Nodulationsagarmedien verwendet. Das Nodulationsfestmedium beinhaltet alle von der Pflanze benötigten Mineralien und Spurenelemente, mit Ausnahme von Stickstoffverbindungen. Um ihr Wachstum aufrechtzuerhalten, ist die Pflanze gezwungen die Symbiose mit den Stickstoff-fixierenden Bakterien einzugehen. Ungefähr zehn Tage nach Inokulation werden die ersten symbiotischen Knöllchen sichtbar. Die Knöllchen zeigten die typische rosa farbene Koloration, die auf die pflanzliche Produktion von Leghämoglobin hinweist. Das Globulin ist für die Bindung von Sauerstoff und dadurch für die Aufrechterhaltung einer niedrigen Sauerstoffkonzentration in den Knöllchen verantwortlich, sowie ein Indiz für eine funktionierende Stickstofffixierung. Nach vier Wochen haben die Knöllchen eine praktikable Größe von ca. 1,5-2,5 mm erreicht (ABB. V-32) und sind den folgenden Analysen unterzogen, wie auch geerntet worden.

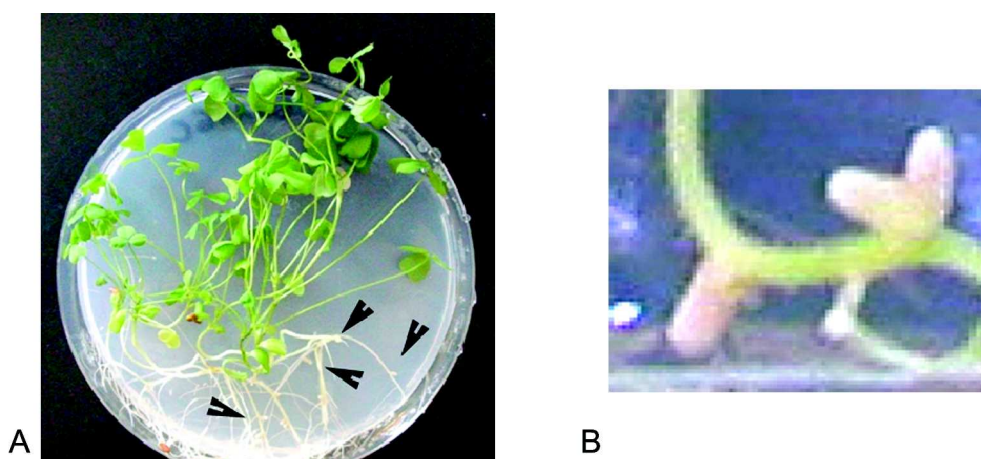


ABB. V-32. Eine vier Wochen alte *Medicago sativa* Pflanze mit symbiotischen atmosphärischen Stickstoff-fixierenden Knöllchen, induziert durch einen der *S. meliloti* eGFP-Fusionsproteinstämme. Einige der Knöllchen sind durch schwarze Pfeile markiert. Rechts: Vergrößerung des Bereichs. Die Rosafärbung der Knöllchen weist auf das Vorhandensein von Leghämoglobin und funktionierende Stickstofffixierung hin.

#### V-4.1 Erste Analyse der wachsenden symbiotischen Wurzelknöllchen an *M. sativa* mittels Binokular-Fluoreszenz

Wie schon die Fluoreszenz der *S. meliloti* Kolonien sind auch die Aktivitäten der erstellten Fusionsproteine im Stadium der Symbiose in den Wurzelknöllchen dokumentiert worden. Die ersten Aufnahmen wurden von den intakten Knöllchen auf der wachsenden inokulierten Pflanze unter dem Leica Binokular gemacht. Bereits junge Knöllchen (ABB.V-33 C),D),E),H),I)) zeigten deutliche Intensitätsunterschiede der Fluoreszenz.

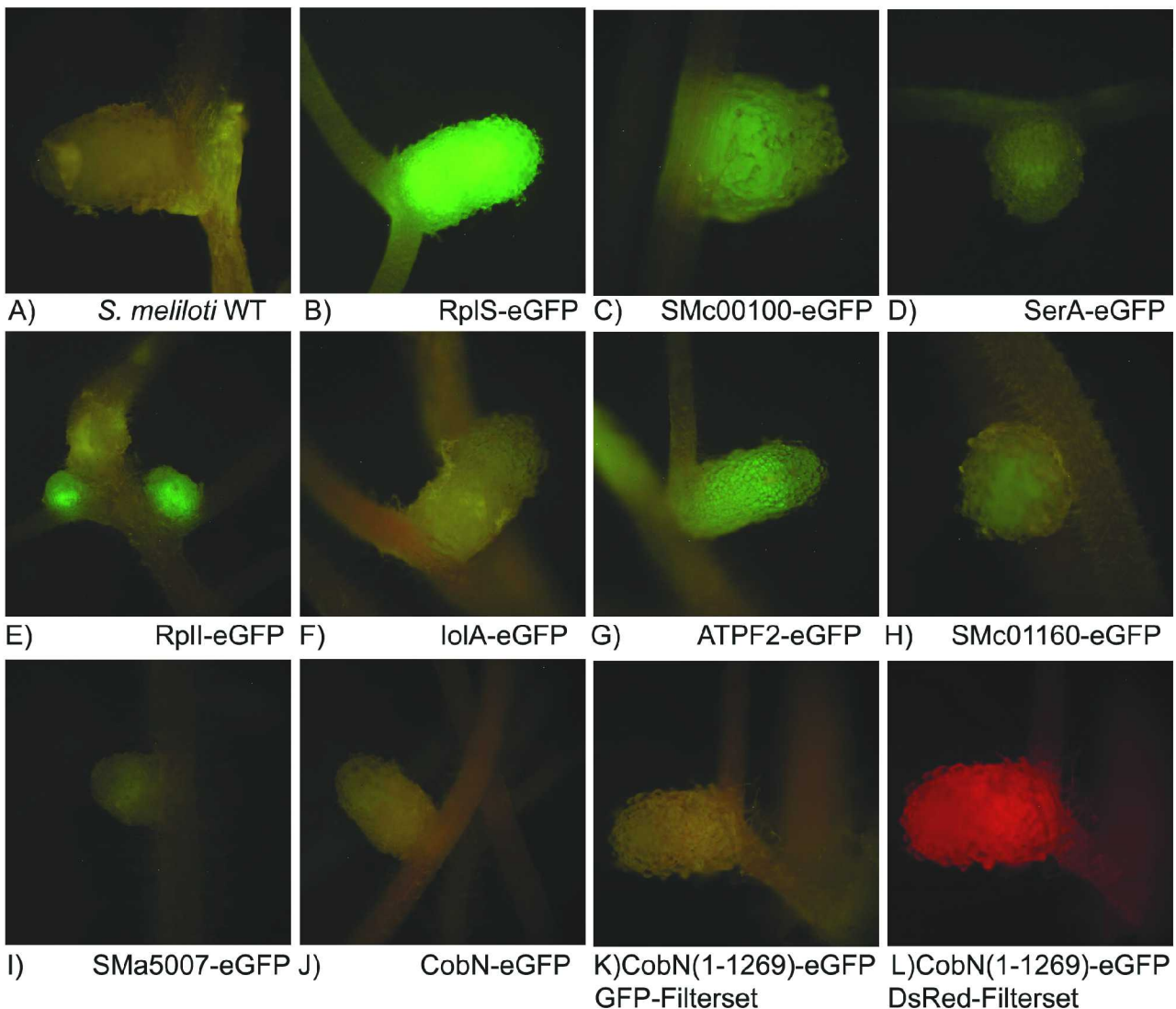


ABB.V-33. Analyse der Fluoreszenz wachsender symbiotischer, stickstofffixierender Wurzelknöllchen von *Medicago sativa*, ca. 2-3 Wochen nach Inokulation mit *S. meliloti* Stämmen, die diverse eGFP-Fusionsproteine produzieren. Eine Auswahl unterschiedlicher Fluoreszenz und somit der abweichenden Grade der Expression von eGFP-Fusionsproteinen im Knöllchen. Keine Fluoreszenz in dem von Wildstamm *S. meliloti* infizierten Knöllchen (A) und z.B. bei CobN-eGFP (J). Vergleichbar stärkere Fluoreszenz und damit Expression von Ribosomalen Proteinen (B und E), sowie ATP Synthase (G). Rotverschobene

Fluoreszenz des trunkierten Kobaltochelata-eGFP Fusionsproteins ist auch während der Symbiose mit *M. Sativa* im Knöllchen sichtbar. Leicht orange Fluoreszenz des resultierenden Knöllchens bei der Verwendung des GFP-Filtersets (K, A) *S. meliloti* WT; B) RplS-eGFP; C) SMc00100-eGFP; D) SerA-eGFP; E) RplI-eGFP; F) IolA-eGFP; G) ATPF2-eGFP; H) SMc01160-eGFP; I) SMA5007-eGFP; J) CobN-eGFP; K) CobN'-eGFP mit GFP-Filterset; L) CobN'-eGFP mit DsRed-Filterset.

Während die mit dem *S. meliloti* Rm1021 Wildtyp infizierten Wurzelknöllchen eine gelblich braune und sehr schwache Eigenfluoreszenz aufwiesen, zeigten die diversen anderen Stämme in den symbiotischen Organen ein breites Spektrum an eGFP-Fluoreszenzintensitäten. Der *S. meliloti* CobN'-eGFP Stamm, der die C-trunkierte Version der Kobaltochelata-eGFP fusioniert exprimiert zeigt auch im Wurzelknöllchen eine "orange" Fluoreszenz durch den GFP-Plus-Filtersatz (Ex: 480/40nm, Em:510nm), das Knöllchen erscheint durch den DsRed Filter (Ex: 545/30nm, Em:620/60nm) im leuchtenden Rot (ABB.V-33 K und L). Als Positivkontrolle sollten bei dieser Versuchsreihe Knöllchen dienen, die mit dem konstitutiv GFP-exprimierenden *S. meliloti* Stamm Rm2011 pHc60 infiziert wurden. Leider hat der vor Ort verbreitete Stamm anscheinend seine Infektionsfähigkeit durch eventuellen Verlust eines der symbioserelevanten Megaplasmide verloren und so musste für diese Studie auf die Untersuchung der Expression und der Proteinverteilung in den Bakteroiden, die freies GFP produzieren verzichtet werden. Dieses Experiment wird baldmöglichst ausgeführt, sofern der Stamm funktionsfähig vorliegt.

Die ca. vierwöchigen Knöllchen wurden mit einer sterilen Rasierklinge abgeerntet, auf einem durchgeschnittenen eingekerbten Holunderzweig platziert und in einen kleinen Schraubstock eingespannt. Dadurch konnten bequem mit der Hand und einer sterilen scharfen Rasierklinge ca. 250 µm breite Scheiben aus einem Knöllchen herausgeschnitten werden. Die zentralen Scheiben wurden direkt nach der Entnahme mit Hilfe der Konfokalen Laserscanning-Mikroskopie untersucht.

#### **V-4.2 Untersuchung der Proteinaktivität im symbiotischen Wurzelknöllchen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)**

Die Anregung der eGFP-Fluoreszenz in den vorbereiteten Proben geschieht in dem Leica TCS Mikroskop mittels Laserstrahl der Wellenlänge von 488nm. Da es sich um ein konfokales System handelt, wird das emittierte Lichtsignal durch eine Lochblende, das sog Pinhole geschickt, um streuendes außerfokales Fluoreszenzsignal abzufiltern. Die Größe dieser Öffnung und somit die Menge des durchstrahlenden Lichtes können variiert werden. Wählt man eine größere Lochblendenöffnung mit AU(Airy Units)=1 (1 AU= 15,876 Mikrometer beim 40x/0.75 Objektiv und 9,9 Mikrometer bei dem 10x/0.3 Objektiv, so wird immer noch genug Licht aus außerfokalen



Ebenen als störendes Signal empfangen und die ansonsten schwache Eigenfluoreszenz der Knöllchenschnitte, die mit dem *S. meliloti* Rm1021 Wildtyp infiziert wurden erscheint wie ein echtes Fluoreszenzsignal (ABB.V-34A). Die tatsächliche Intensität des Signals ist jedoch nicht sehr hoch, was man in einem Plot der Signalintensitäten durch den Querschnitt des abgebildeten Knöll-

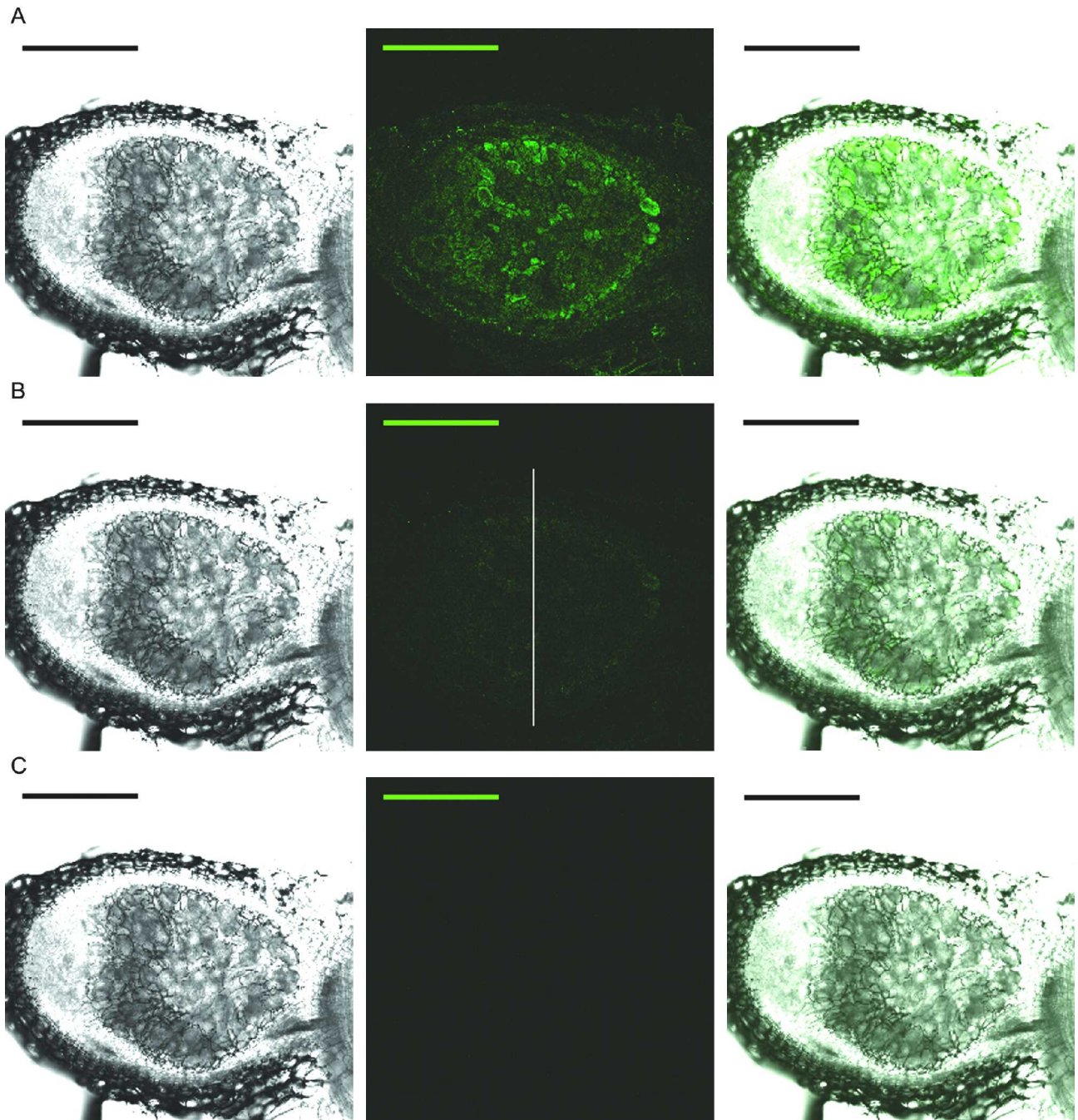


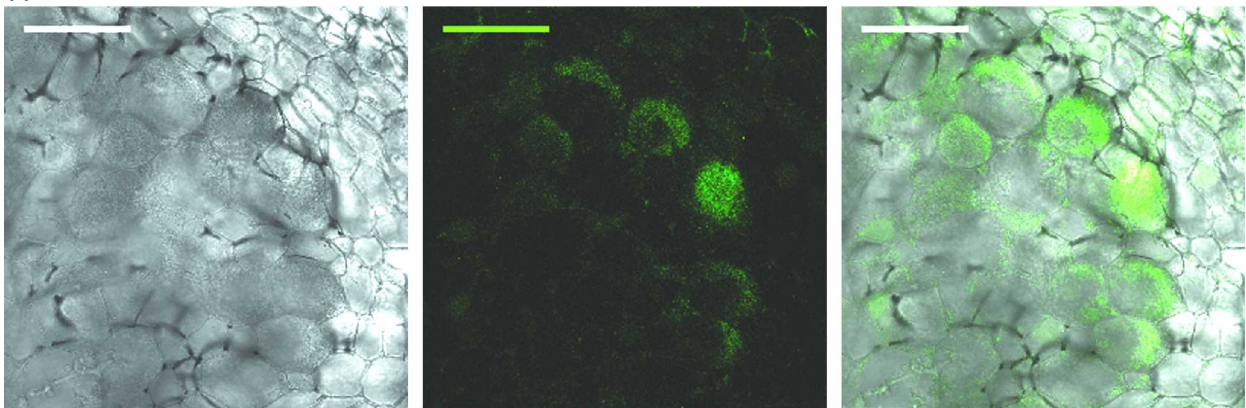
ABB.V-34. Untersuchung der Eigenfluoreszenz von *S. meliloti* Rm1021 Wildtyp in der CLSM bei abnehmender Pinhole Größe (AU 1, 0.7, 0.5) bei 10x Vergrößerung. Der weiße Strich repräsentiert den Bereich als Querschnitt durch die Breite des Knöllchenschnittes, der für die Darstellung der Signalintensität in einem 2D-Plot (ImageJ) in jedem Bild ausgewählt wurde. Größenbalken: 500  $\mu$ m.



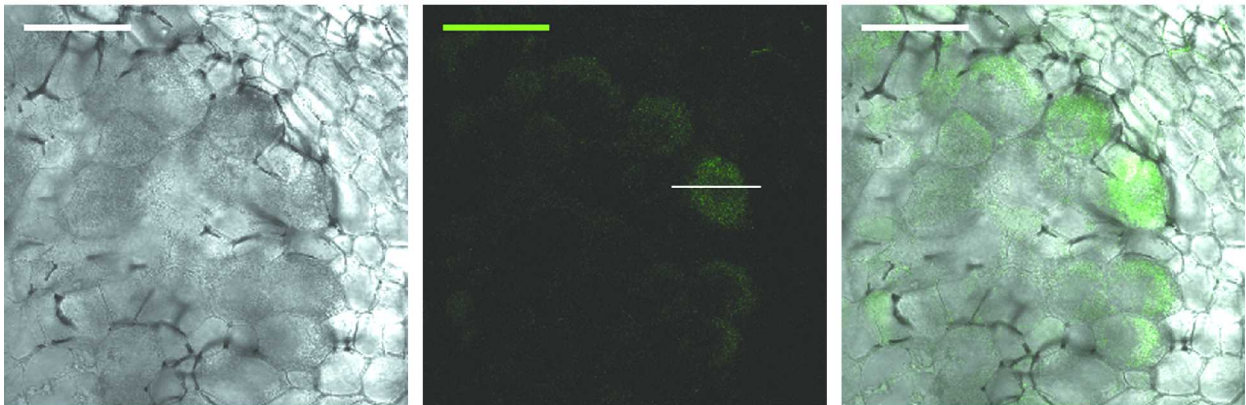
chenschnitts sehen kann. Die Grauwertverteilung erreicht max. den Wert von 60. Bei der Reduzierung der Pinholegröße graduell bis AU 0.5 schwindet allmählich das Fluoreszenzsignal und ist schließlich nicht mehr wahrnehmbar (ABB.V-34C). Auch die Grauwerte sinken auf ca. 5 herab, was vernachlässigt werden kann.

Auch beim Einsatz einer höheren Vergrößerung und des 40x Objektivs kann Fluoreszenz bei AU 1 beobachtet werden, die bei AU 0.5 vernachlässigbar wird (ABB. V-35A-C). Aus diesem Grund ist für alle folgenden Schnitte die gleiche Pinholegröße von AU 0.5 (7,938 Mikrometer bei 40x Objektiv und 4,95 Mikrometer bei dem 10x Objektiv) bei einer stetigen Laserintensität von 69% gewählt, um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten. Nur bei einigen sehr stark fluoreszenten Proben wurde die Laserintensität herunter reguliert.

A



B



C

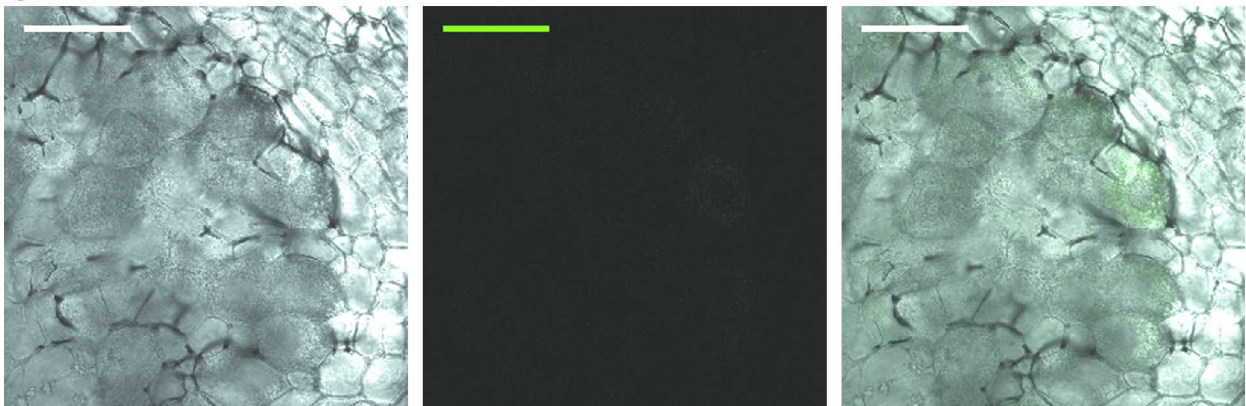


ABB.V-35. Untersuchung der Eigenfluoreszenz von *S. meliloti* Rm1021 Wildtyp in der CLSM bei abnehmender Pinhole Größe (AU 1, 0.7, 0.5) bei 40x Vergrößerung. Größenbalken: 100 µm. Bei einer relativ großen Pinhole von 15,886 Mikrometer Durchmesser reicht die Lichtintensität aus, um die Eigenfluoreszenz des Wildtypstammes *S. meliloti* Rm1021 zu detektieren. Dieses Signal ist allerdings bei einer Quantifizierung der entsprechenden Grauwerte des Bereiches nur sehr niedrig (s. ABB. V-36). Bei der Pinholegröße von 0.5 AU (7,938 Mikrometer Durchmesser) ist keine Fluoreszenz mehr sichtbar.

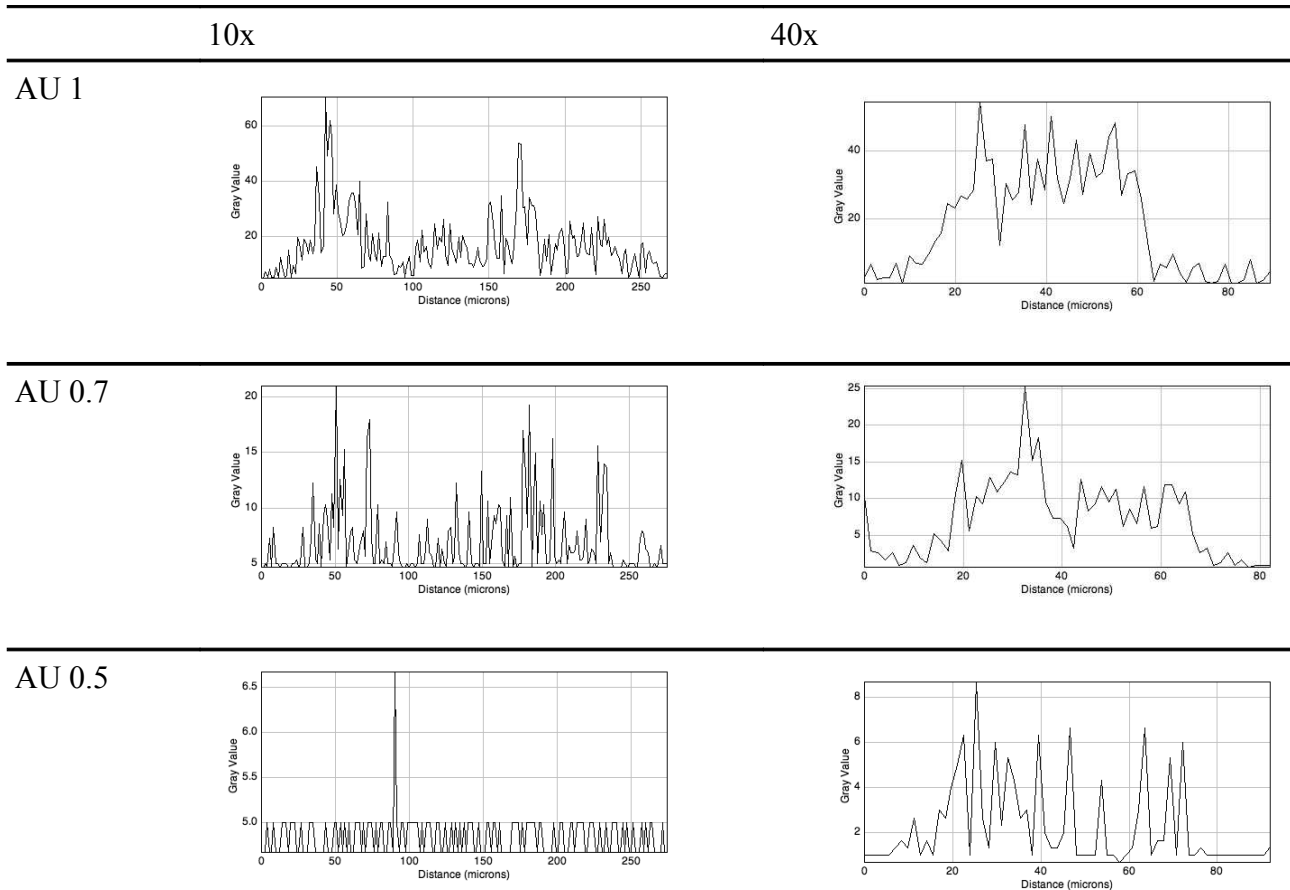


ABB. V-36. Intensitätenverteilung über die ausgewählten Bereiche der in ABB.V-34 und ABB.V-35 abgebildeten, in Grauwerte umgewandelten Aufnahmen der Knöllchenschnitte bei abnehmender Pinholegröße von AU 1 bis 0.5 und den 10x und 40x Objektiven. Die Signalintensität beträgt bei AU 1 noch ca. 60 und fällt bei der Reduzierung der Pinholegröße auf AU 0.5 auf den Wert von ca. 5.

Mit den oben genannten Einstellungen wurden alle mit eGFP-Fusionsproteinen produzierenden *S. meliloti* Stämmen infizierten Wurzelknöllchen untersucht. Bei den meisten wurde eine starke Expression der eGFP-Fusionsproteine in den ausdifferenzierten Bakteroiden festgestellt (RNaseE (ABB.V-37); RplI (ABB.V-38); RplS (ABB.V-44); SitC (ABB.V-43); RpoB (ABB.V-45); ATPF (ABB.V-48); Smc04094 (ABB.V-50); Smc00100 (ABB.V-51)). Mittlere Expressionsstärke wurde in den Fusionsproteinen TerC (ABB.V-39), QxtB (ABB.V-40), Smc01160 (ABB.V-46), HutU

(ABB.V-47) und Sma5007 (ABB.V-49) festgestellt. Kaum Fluoreszenz wurde beobachtet bei IolA-eGFP (ABB.V-41), SerA-eGFP (ABB.V-42) und CobN-eGFP (ABB.V-52) Fusionsproteinen. Darüber hinaus wurden auch die Stämme für die Infektion von *M. sativa* verwendet, die trunkierte Formen der Fusionsproteine exprimieren. In zwei Fällen wurden abweichende Beobachtungen im Vergleich zu den freilebenden Bakterien gemacht (nicht gezeigt). Die *S. meliloti* Stämme eGFP-TerC'(1-230) und eGFP-SitC'(1-283) zeigten keine Fluoreszenz in den *M. sativa* Wurzelknöllchen, im Gegensatz zu ihren respektiven vollständigen Proteinfusionskonstrukten.

Trotz vergleichbar starker Fluoreszenz konnten bei einigen Knöllchenschnitten Auffälligkeiten im Erscheinungsbild der fluoreszenten Bakterioide beobachtet werden, die aber mit der maximalen Vergrößerung von 630x im konfokalen Mikroskop nicht aufgelöst werden konnten. So erscheinen die Bakterioide, die das Fusionskonstrukt QxtB-eGFP exprimieren auffällig gepunktet, im Vergleich zum viel ebenmäßigeren Verteilung der Fluoreszenz in z.B. den RplS-Bakteroiden (ABB.V-40 vs. ABB.V-44). Aus diesem Grund wurden auch reisolierte Bakterioide, die diverse eGFP Fusionsproteine exprimieren, genauer dokumentiert mittels der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie.

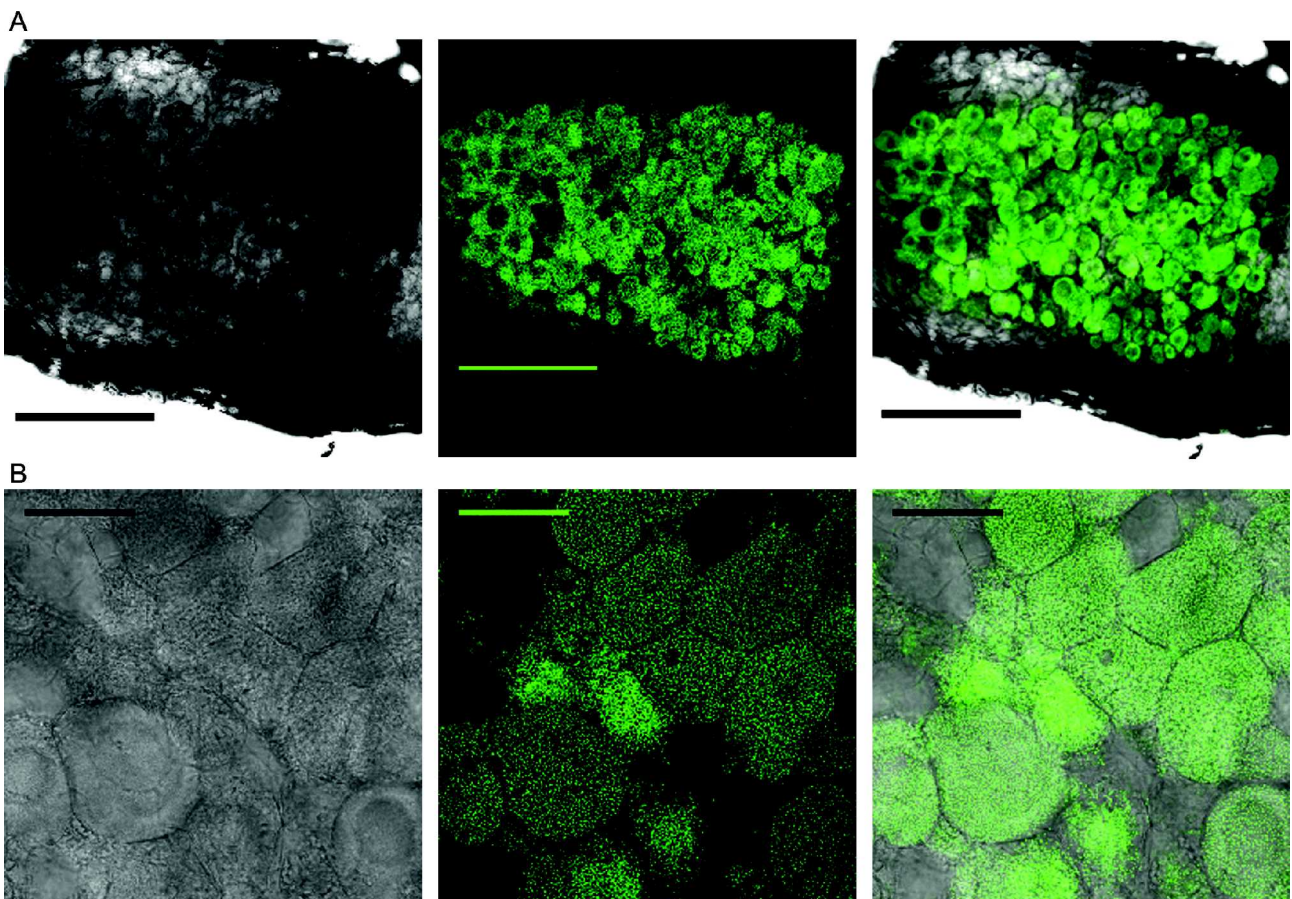




ABB. V-37. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins RNaseE-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Starke Fluoreszenz. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Unebene Fluoreszenz mit gepunktet wirkenden Bakteroiden in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

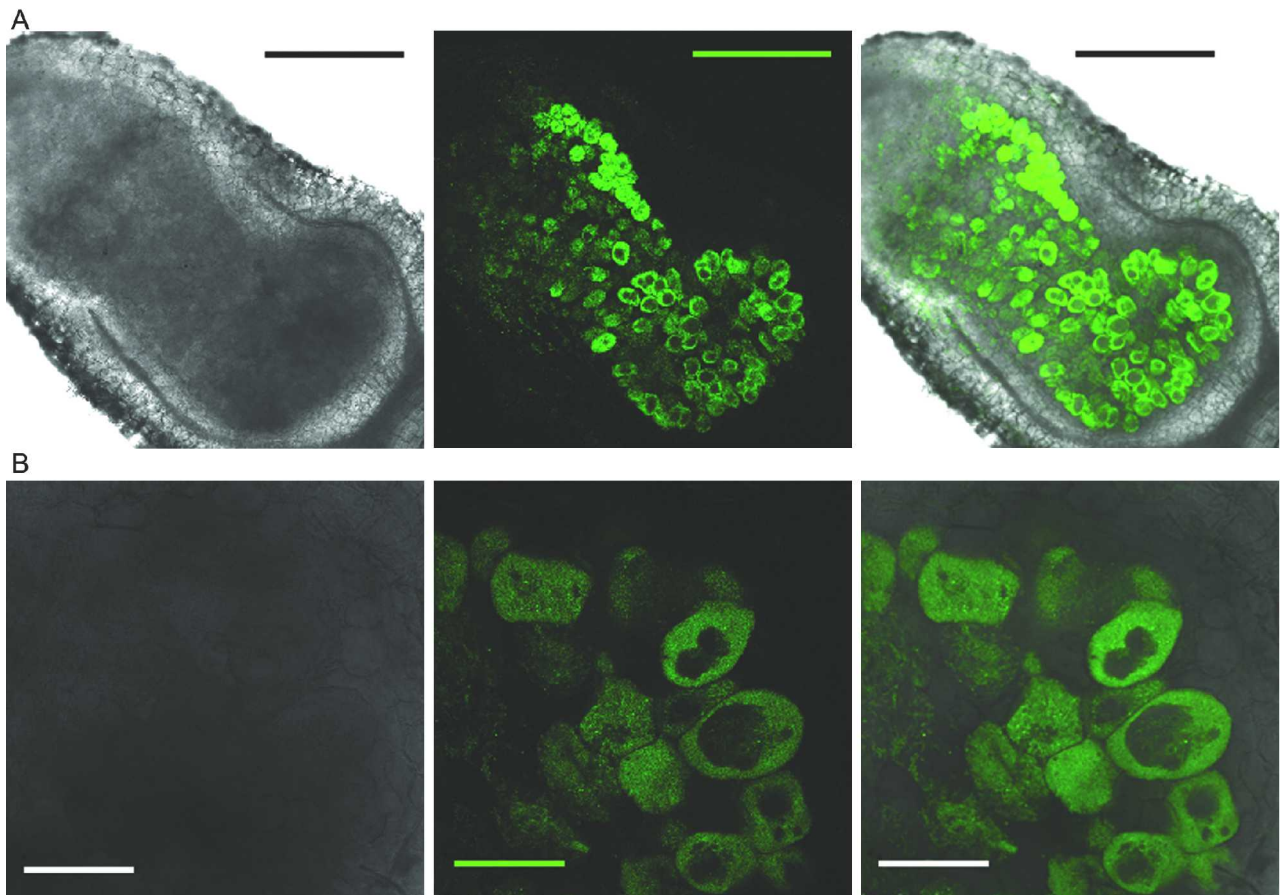


ABB. V-38. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins RplI-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Leichte Fluoreszenz in der Infektionszone. Starke Fluoreszenz von der Stickstofffixierungszone bis zur Seneszenzzone. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Gleichmäßig starke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

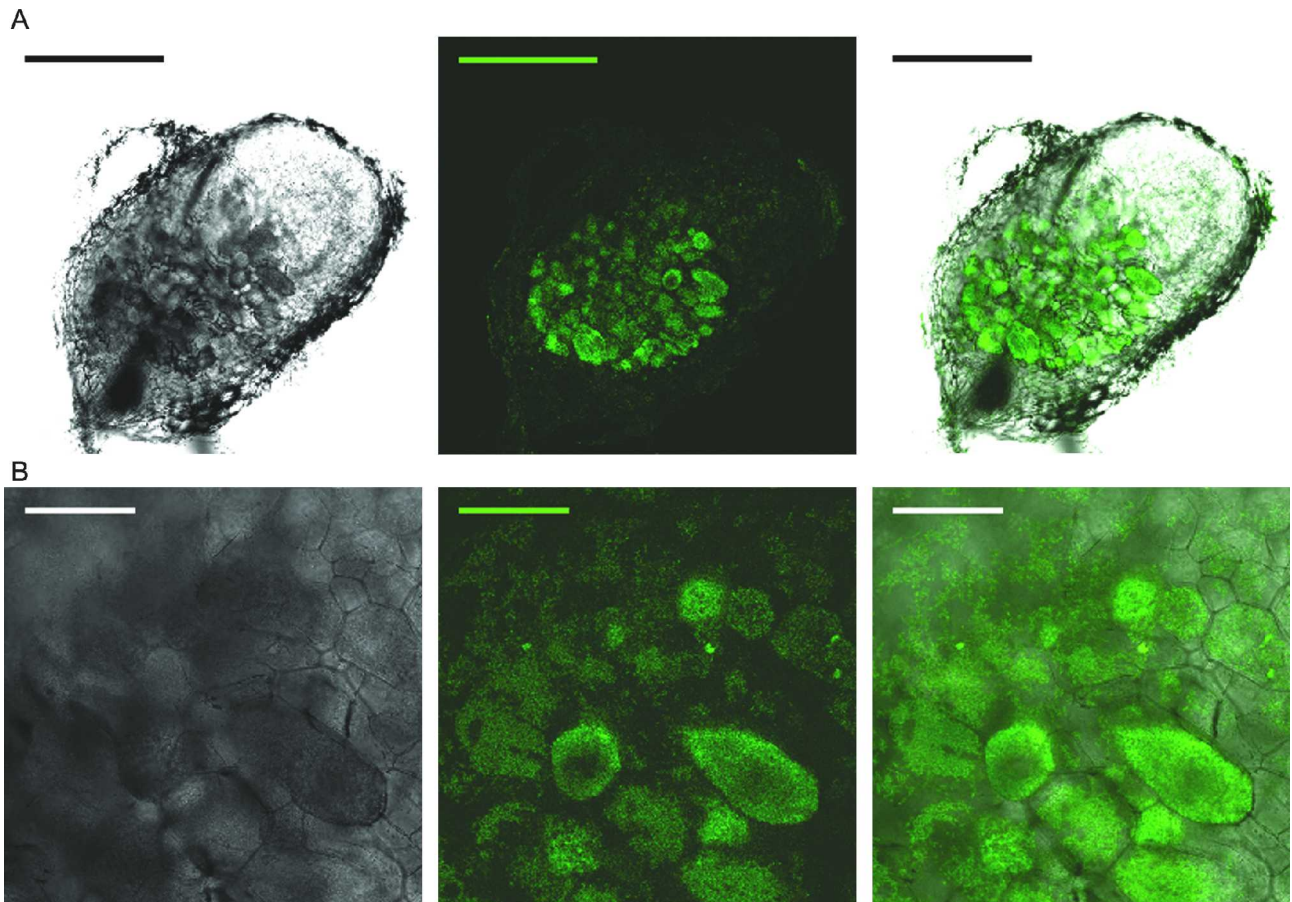


ABB. V-39. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins TerC-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Leichte Fluoreszenz in der Infektionszone und der Intermediären Zone. Starke Fluoreszenz von der Stickstofffixierungszone bis zur Seneszenzzone. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Mittelstarke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .



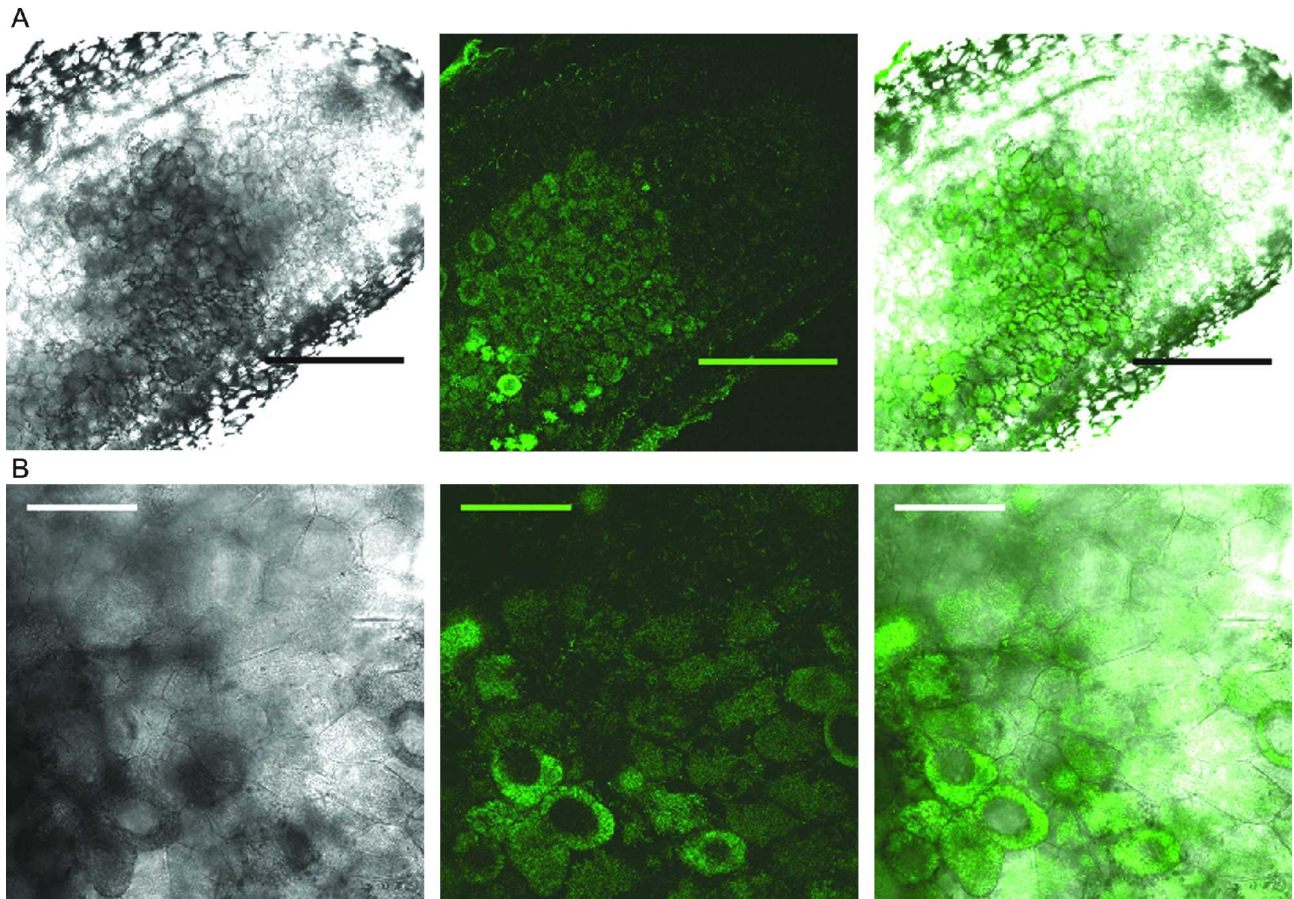


ABB. V-40. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins QxtB-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Leichte Fluoreszenz in der Infektionszone und der Intermediären Zone. Starke Fluoreszenz von der Stickstofffixierungszone bis zur Seneszenzzone. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Mittelstarke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .



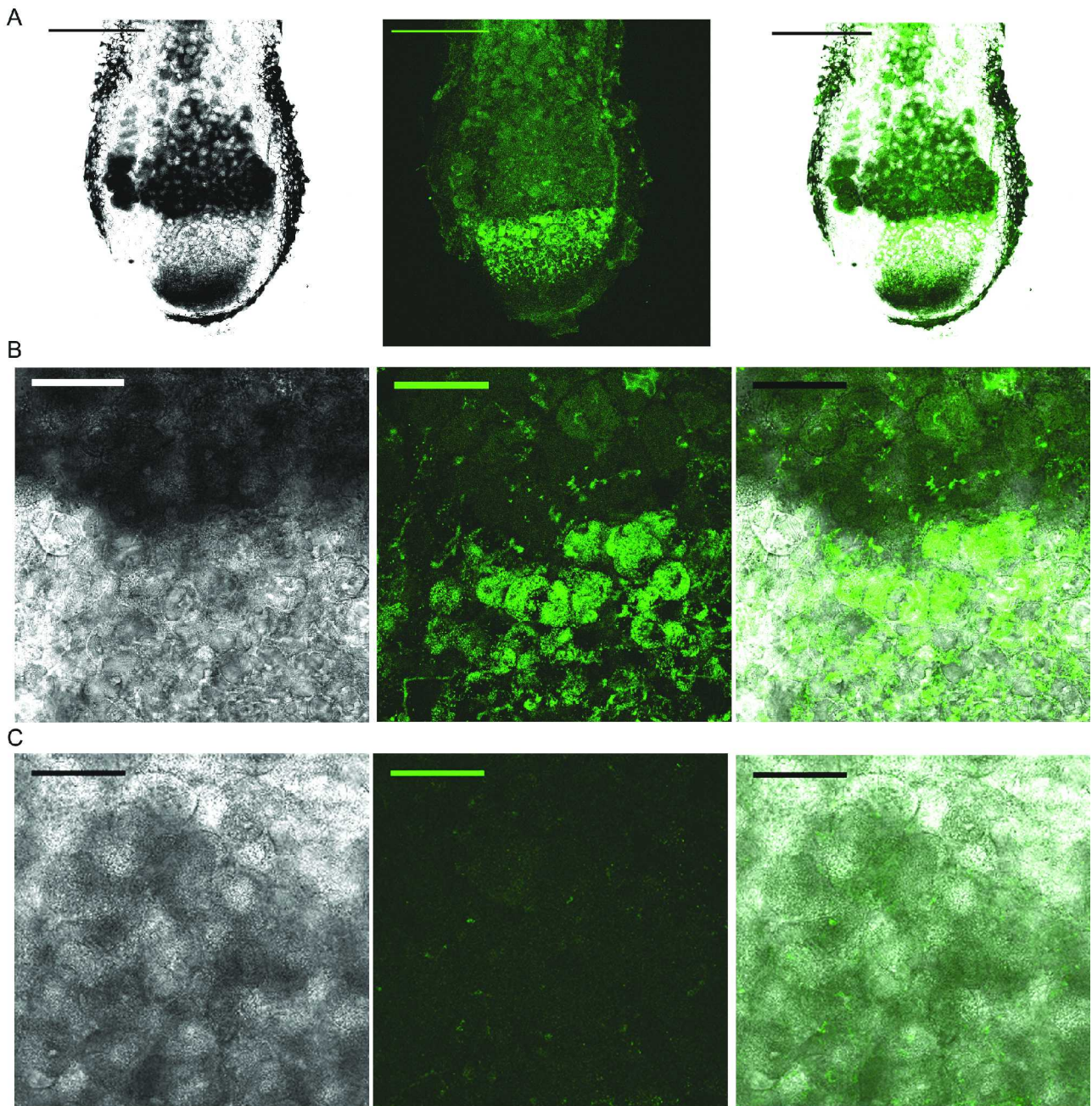


ABB. V-41. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins IolA-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Leichte Fluoreszenz in der Infektionszone, Abbruch der Fluoreszenz der Bakterioide nach dem Übergang zur intermediären Zone. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Übergangsbereich zwischen der Infektionszone und der intermediären Zone. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ . C) Ein Ausschnitt der Stickstofffixierungszone, fehlende Fluoreszenz deutet auf schwache bis keine Expression des eGFP-fusionsproteins hin. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

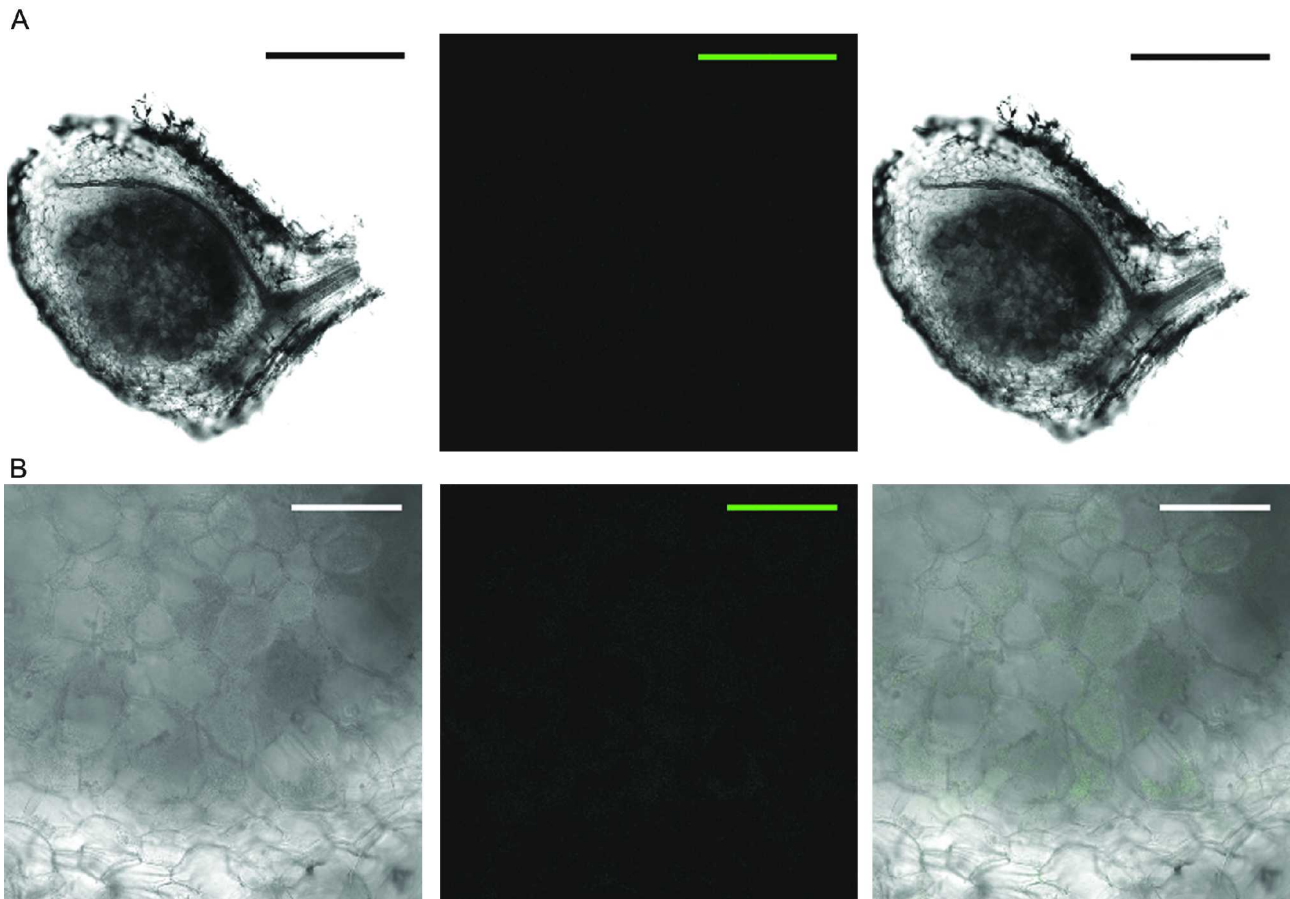


ABB. V-42. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins SerA-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Keine sichtbare Fluoreszenz. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Ebenfalls ein Fehlen von sichtbaren Fluoreszenzsignalen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .



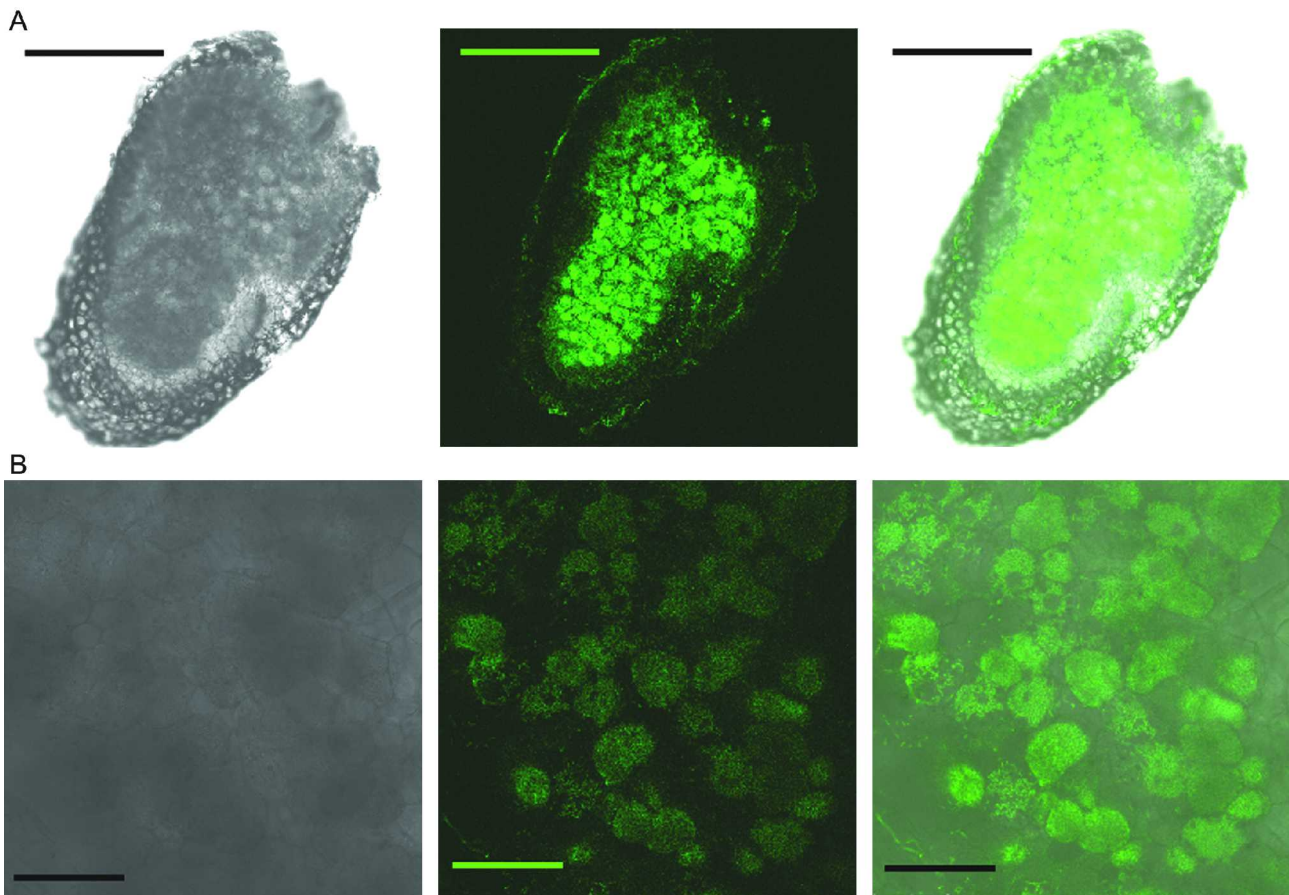


ABB. V-43. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins SitC-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Mittlere bis starke Fluoreszenz in allen Knöllchenzonen. Größenbalken: 500 µm. B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Mittelstarke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100 µm.

Abbildung befindet sich auf der nächsten Seite.

ABB. V-44. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins RplS-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Starke Fluoreszenz von der Infektionszone bis zur Stickstofffixierungszone. Abnehmende Fluoreszenz in der Seneszenzzone eventuell schnittbedingt. Größenbalken: 500 µm. B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Starke, homogene Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100 µm.



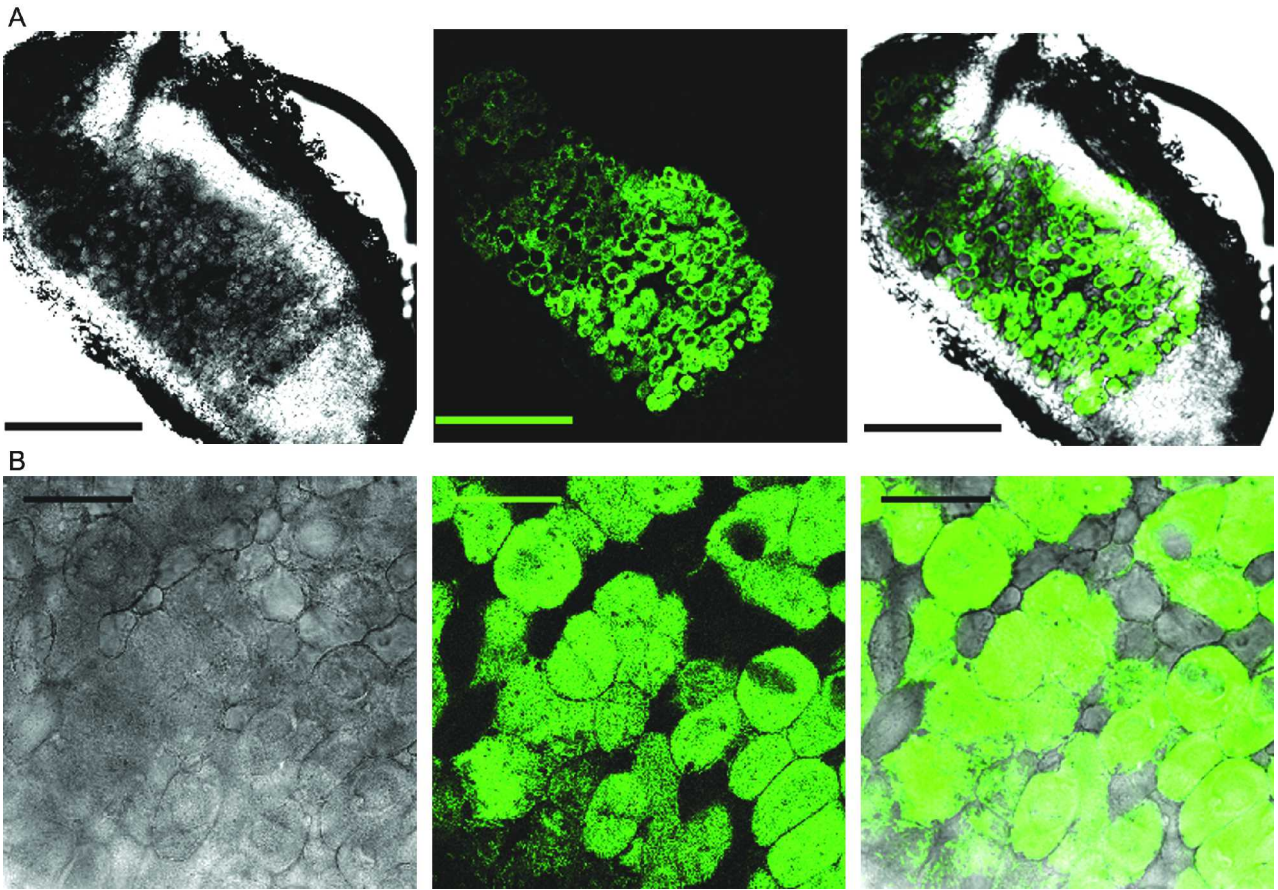


ABB. V-44. (oben) und ABB. V-45 (unten)

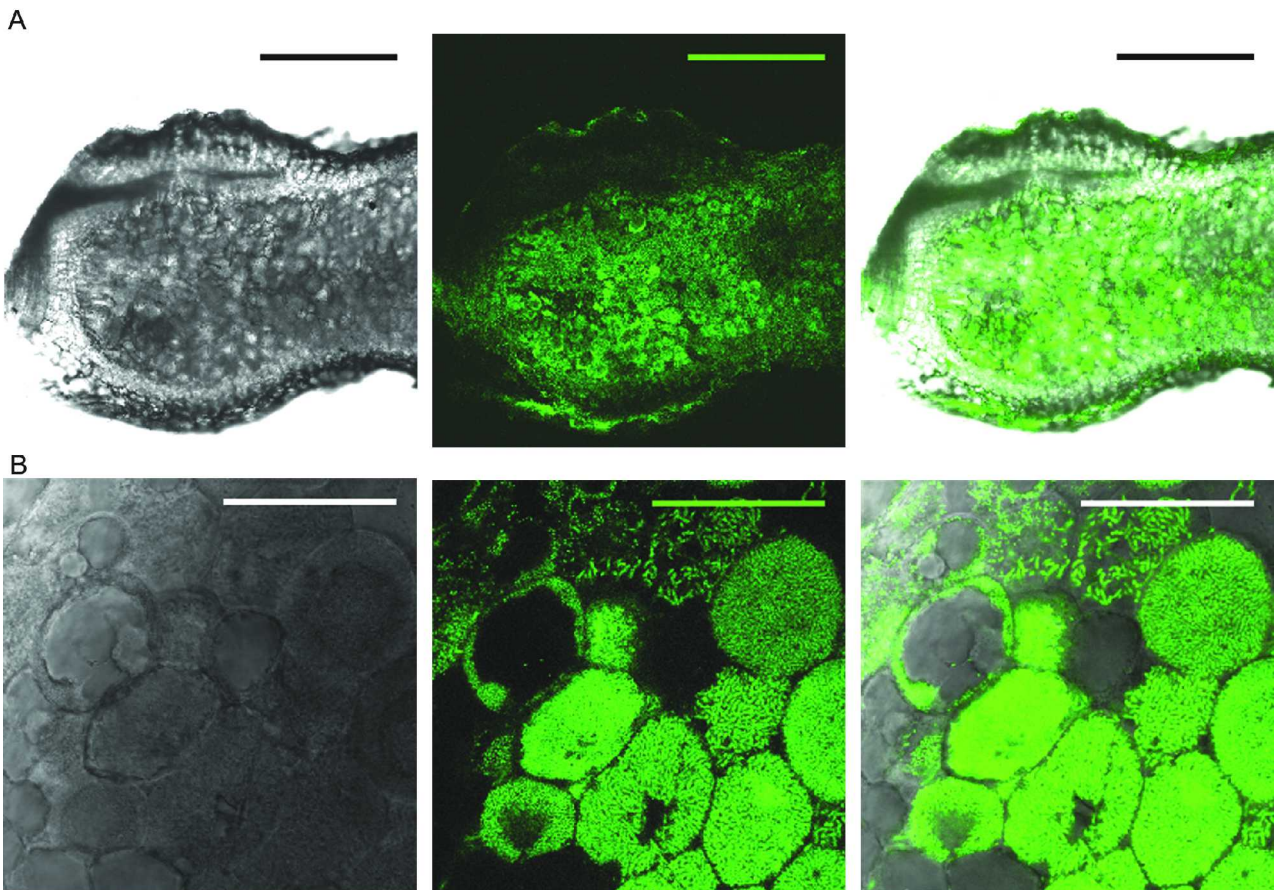




ABB. V-45. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins RpoB-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Starkes Signal in allen Zonen des Knöllchens, im Bild Stickstofffixierungszone bis zur Seneszenzzone. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Starke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

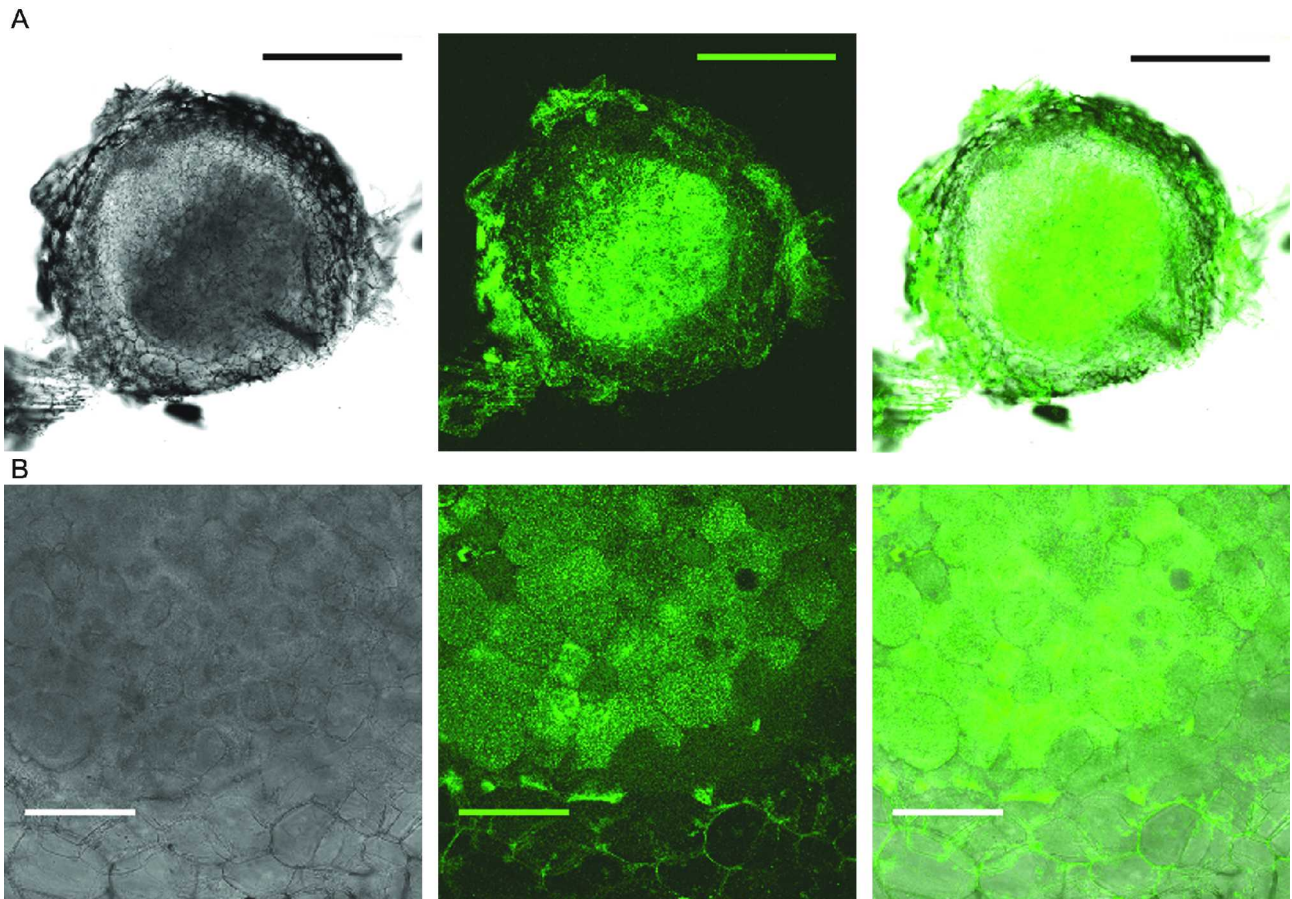


ABB. V-46. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins SMc01160-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Mittlere Fluoreszenz in allen Knöllchenzonen. Scheinbar stärkere Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen, verglichen mit der Signalintensität der frei lebenden Zellen. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Mittelstarke bis starke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Auffallende Heterogenitäten der Signalintensität und Verteilung innerhalb der infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

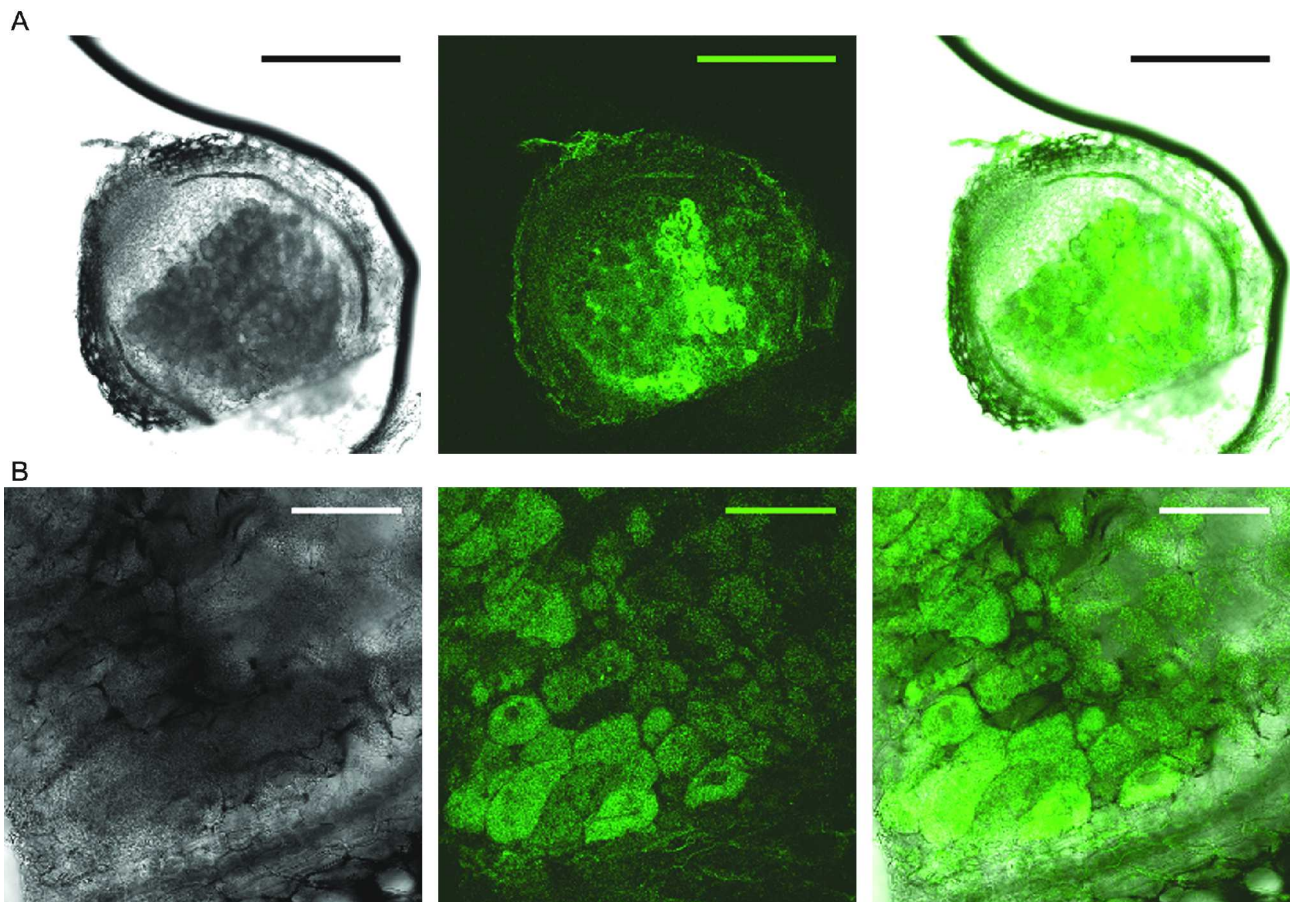


ABB. V-47. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins HutU-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Mittlere Fluoreszenz in allen Zonen. Senkrechte Abweichungen der Signalintensität bedingt durch den Schnitt durch das Knöllchen. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Mittelstarke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

Abbildung befindet sich auf der nächsten Seite.

ABB. V-48. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins ATPF-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Starke Fluoreszenz von der Stickstofffixierungszone bis zur Seneszenzzone. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Starke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .



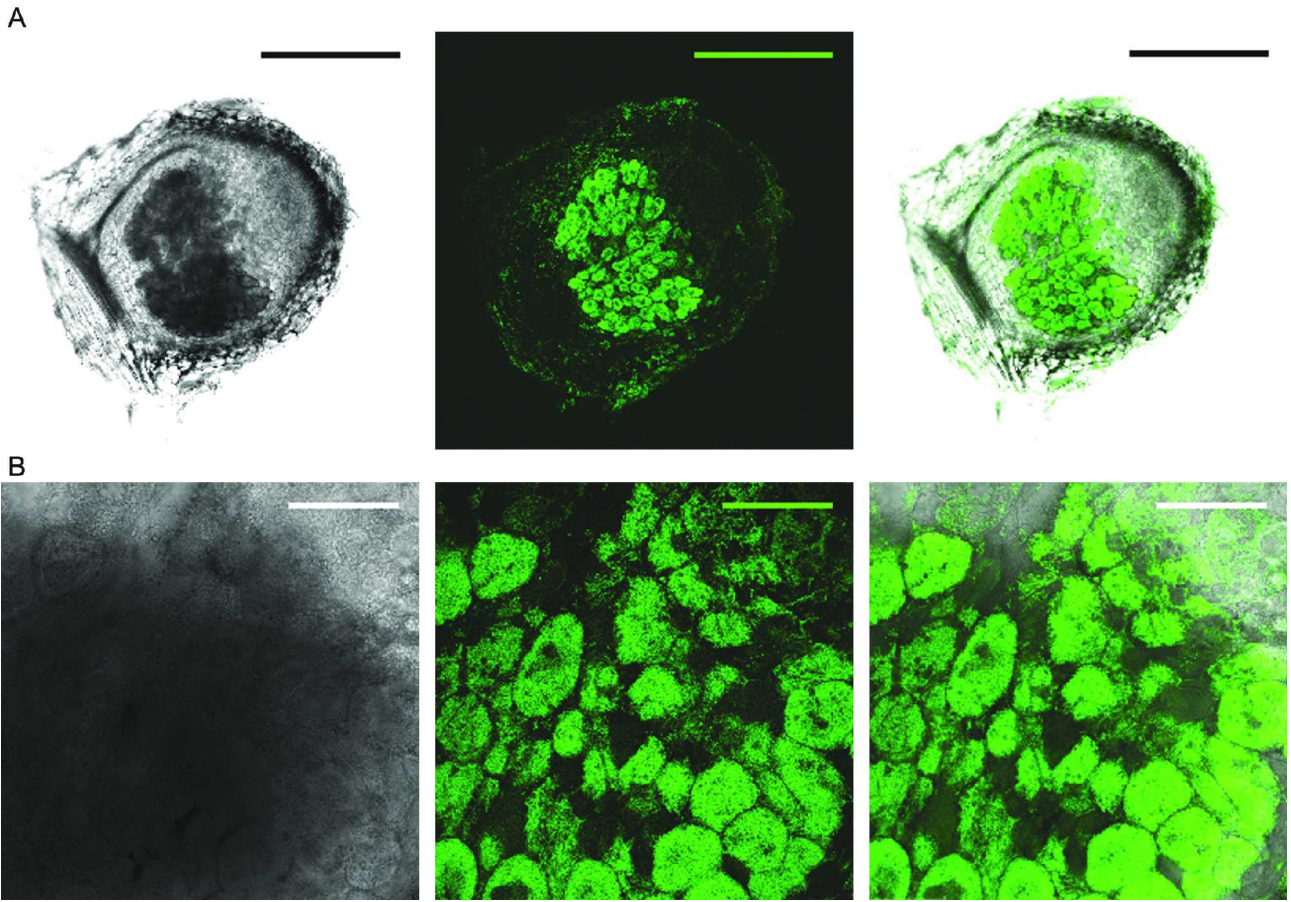


ABB. V-48 (ATPF-eGFP , oben) und ABB. V-49 (Sma5007-eGFP, unten).

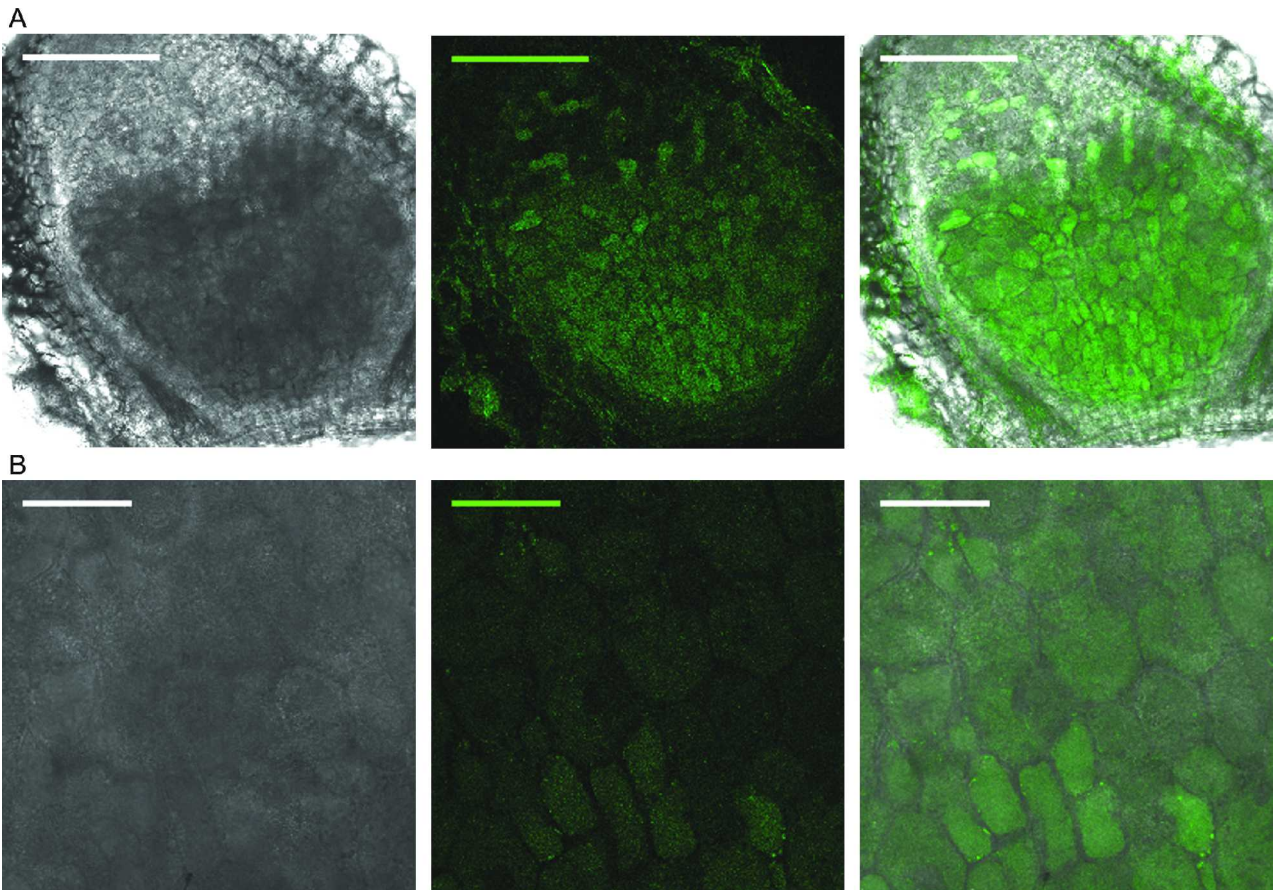




ABB. V-49. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins SMA5007-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Leichte Fluoreszenz in allen Zonen. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Ebenfalls sehr leichte Fluoreszenz der Bakterioide mit einer scheinbaren heterogenen Lokalisierung der Fluoreszenz in den Bakteroiden der infizierten Zellen, die dadurch gepunktet erschein. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

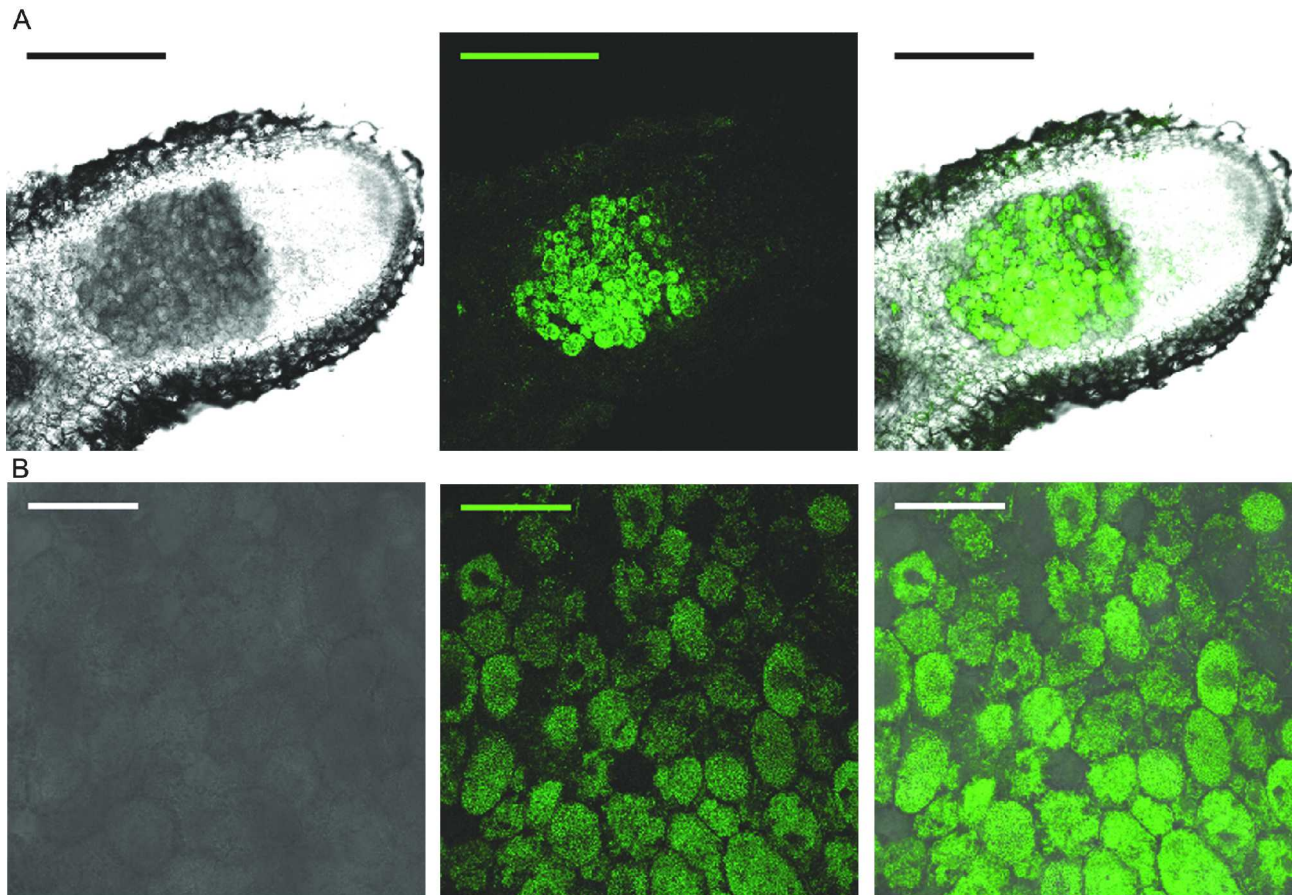


ABB. V-50. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins SMC04094-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Sichtbar starke Fluoreszenz in der intermediären und der Stickstofffixierungszone, leicht abnehmendes Signal beim Übergang zur Seneszenzzone (nicht im Bild). Die Unterbrechung des Bereiches mit infizierten Zellen ist schnittbedingt. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Starke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen der Stickstofffixierungszone. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

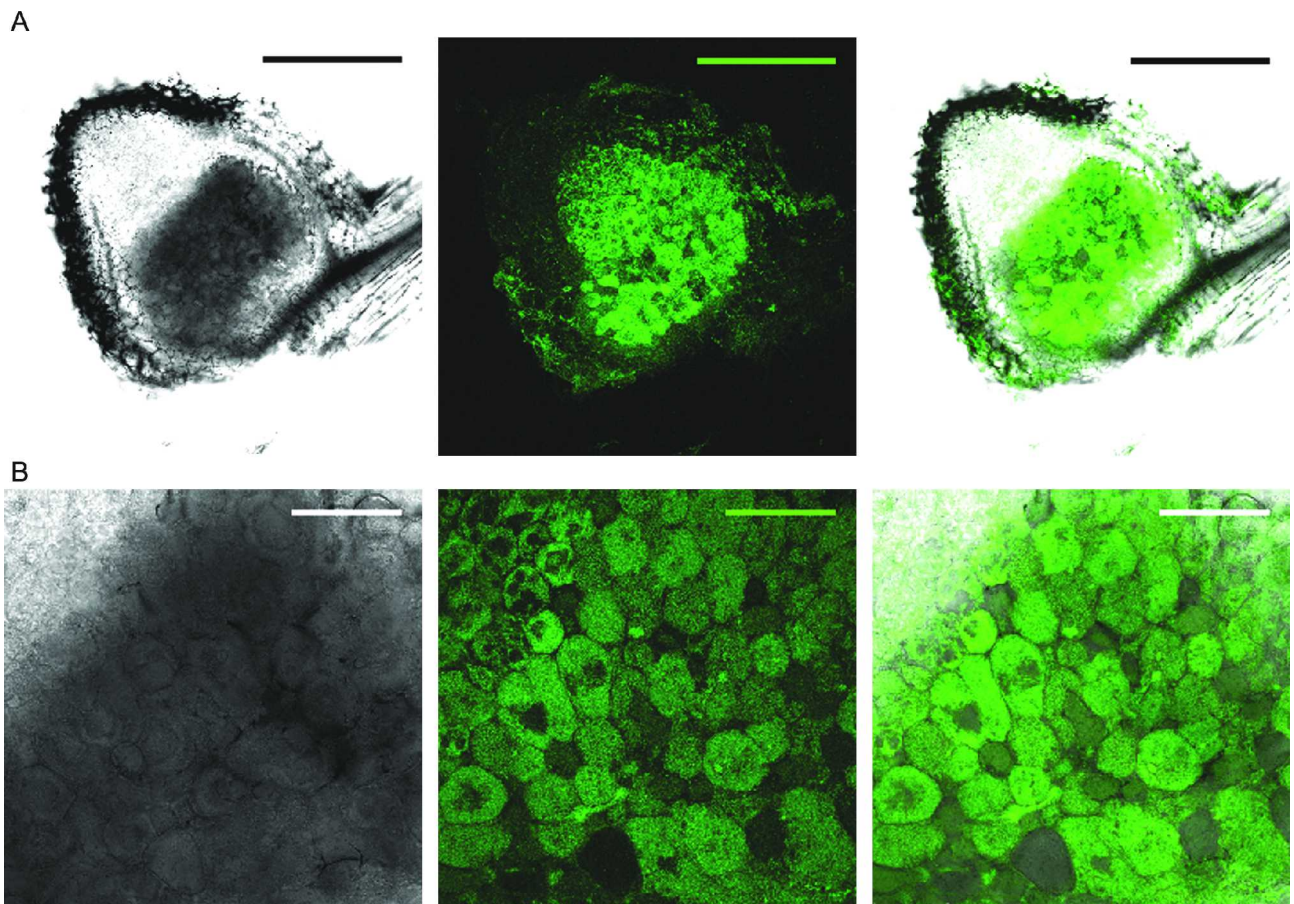


ABB. V-51. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins SMc00100-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Leichte Fluoreszenz in der Infektionszone und der intermediären Zone. Starke Fluoreszenz von der Stickstofffixierungszone bis zur Seneszenzzone. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Mittelstarke Fluoreszenz der Bakterioide in den infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .



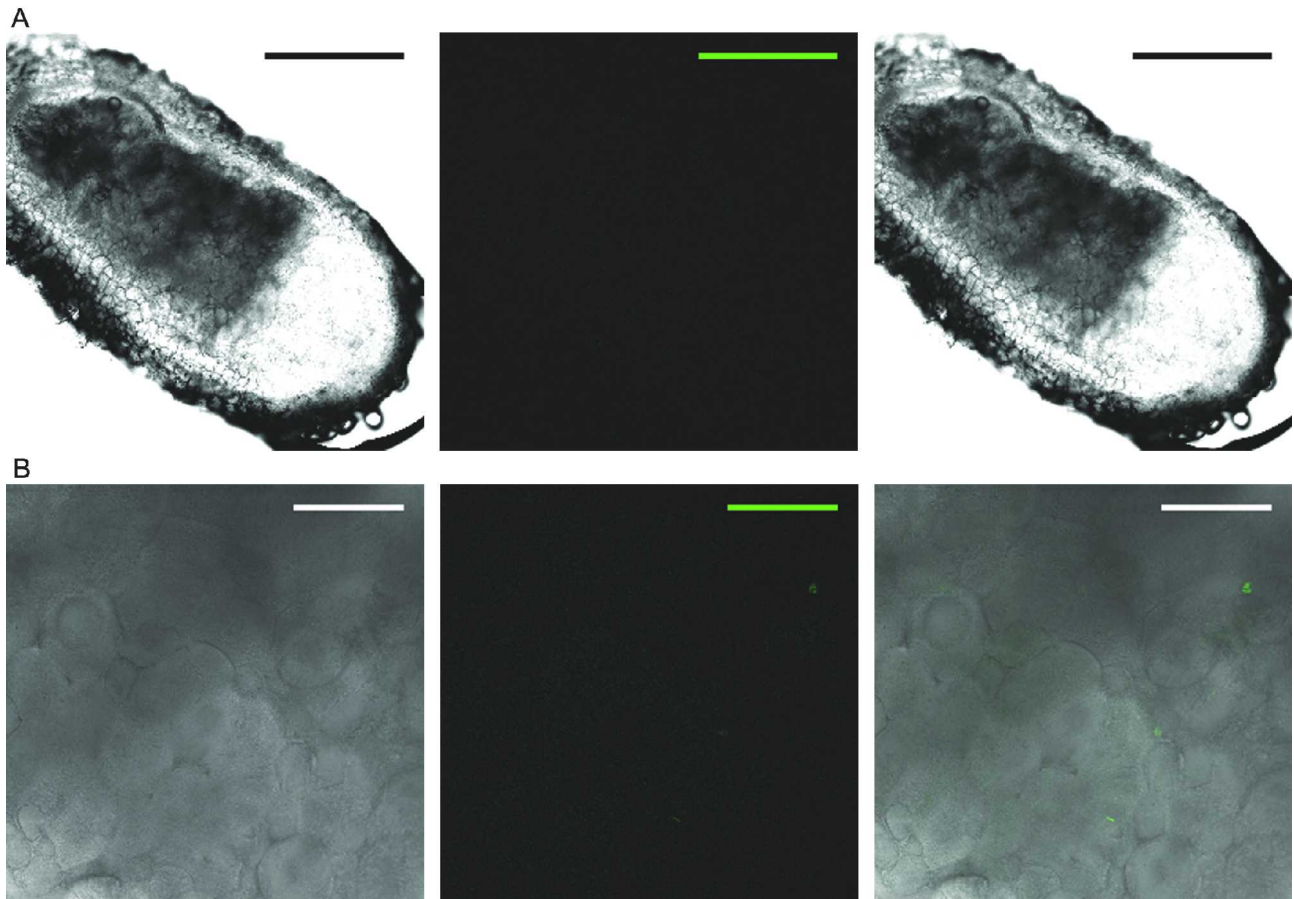


ABB. V-52. Fluoreszenzaktivität des Fusionsproteins CobN-eGFP in den Wurzelknöllchen. CLSM-Aufnahmen der Schnitte von infizierten Knöllchen. A) Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Fehlen von sichtbaren Fluoreszenz. Größenbalken: 500  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahmen mit dem 40x-Objektiv. Ebenfalls fehlendes Fluoreszenzsignal in den Bakteroiden der infizierten Zellen. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

#### V-4.3 Mikroskopische Untersuchung der Lokalisierung der Fusionsproteine in isolierten *S. meliloti* Bakteroiden aus dem Stickstoff-fixierenden Wurzelknöllchen von *M. sativa*

Während die mikroskopischen Aufnahmen der Knöllchenschnitte Einblicke in die Expressionsleveln der eGFP-Fusionsproteine geliefert haben, konnten keine Aussagen über die subzelluläre Lokalisierung dieser Proteine in den ausdifferenzierten Bakteroiden getroffen werden. Aus diesem Grund wurden Bakterioide einiger Stämme durch sanftes Auspressen aus den Wurzelknöllchen reisoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf Agarosepads abgebildet. Diese Aufnahmen liefern interessante Einblicke in die Vielseitigkeit der Proteinlokalisierung in den Bakteroiden. Die Einstellungen der Helligkeit und des Kontrastes wurden mit Hilfe des OpenSource Programms ImageJ angepasst, dabei wurde zugunsten der Vergleichbarkeit die Helligkeit auf Maximum gesetzt und der Kontrast so weit angepasst, dass das Rauschen des Hintergrundes nicht



mehr zu sehen ist, dabei verändert die Software nur die bildliche Ausgabe, nicht die ursprünglichen Werte. Die Plots der Intensitätsverteilung wurden ebenfalls in ImageJ angefertigt, dabei dienten die unveränderten Aufnahmen als Berechnungsbasis. Als Kontrolle wurden auch hier Bakterioide des *S. meliloti* Rm1021 Wildtyps verwendet. Die Bakterioide des Wildtyps *S. meliloti* Rm1021 zeigen eine schwache Eigenfluoreszenz unter den eGFP Detektionseinstellungen (ABB.V-53). Diese ist jedoch nur dann verstärkt wahrnehmbar, wenn mehrere Zellen aufeinander liegen. Die einzelnen Bakterioide zeigen auch in den hellsten Pixeln eine Intensität von höchstens 25, in übrigen Bereichen liegt diese bei ca 5. Alle übrigen untersuchten Bakterioide weisen eine vielfach höhere Fluoreszenzintensität auf und distinkte Verteilungen der eGFP-Fusionsproteine im Bakteroid. Die ribosomalen Proteine L9 und L19 zeigen auch in den Bakteroiden eine intensitätsstarke zytosolische, aber strukturierte Lokalisierung mit deutlichen fluoreszenzfreien Bereichen und einigen sehr dunklen punktförmigen Stellen (ABB. V-54 und V-60). Die Intensität des Fluoreszenzsignals des Fusionsproteins TerC-eGFP ist in den Bakteroiden viel höher als in den frei lebenden Zellen und lokalisiert deutlich in der Membran (ABB. V-55). Das Protein SerA-eGFP wird in den Bakteroiden viel schwächer exprimiert als in den frei lebenden Zellen, lokalisiert aber vergleichbar in hellen und dunklen Flecken im Zytosol (ABB. V-56). Überraschenderweise ist das Fusionsprotein QxtB-eGFP nicht membranlokalisiert zu beobachten in den Bakteroiden, sondern liegt in hellen Bereichen im Zytoplasma vor, die sich mit proteinfreien, dunklen Bereichen abwechseln (ABB. V-57). Eine ganz auffällige Lokalisierung kann man am Fusionskonstrukt RNaseE-eGFP in den Bakteroiden beobachten (ABB. V-58). Das Protein liegt in sehr intensitätsstarken punktförmigen Stellen im Zytoplasma konzentriert vor. Das Fusionskonstrukt SMc00100-eGFP liegt, wie auch in den frei lebenden Zellen im Zytoplasma und in polaren und zytoplasmatischen Punkten vor (ABB. V-59). Die ATPSynthase fusioniert mit eGFP zeigt eine insgesamt niedrigere Fluoreszenzintensität und lokalisiert nicht nur an der Membran, wie in freien Zellen, sondern akkumuliert auch zu Ring- und sphärischen Strukturen (ABB.V-61). Die RNA Polymerase RpoB ist mal homogen im Zytoplasma der Bakterioide verteilt, in anderen Zellen liegt sie mit deutlichen nicht-fluoreszierenden punktförmigen Bereichen vor (ABB. V-62). Interessanterweise ähneln die ausgesparten Bereiche der RNA Polymerase dem Lokalisierungsmuster der RNaseE (ABB. V-63).

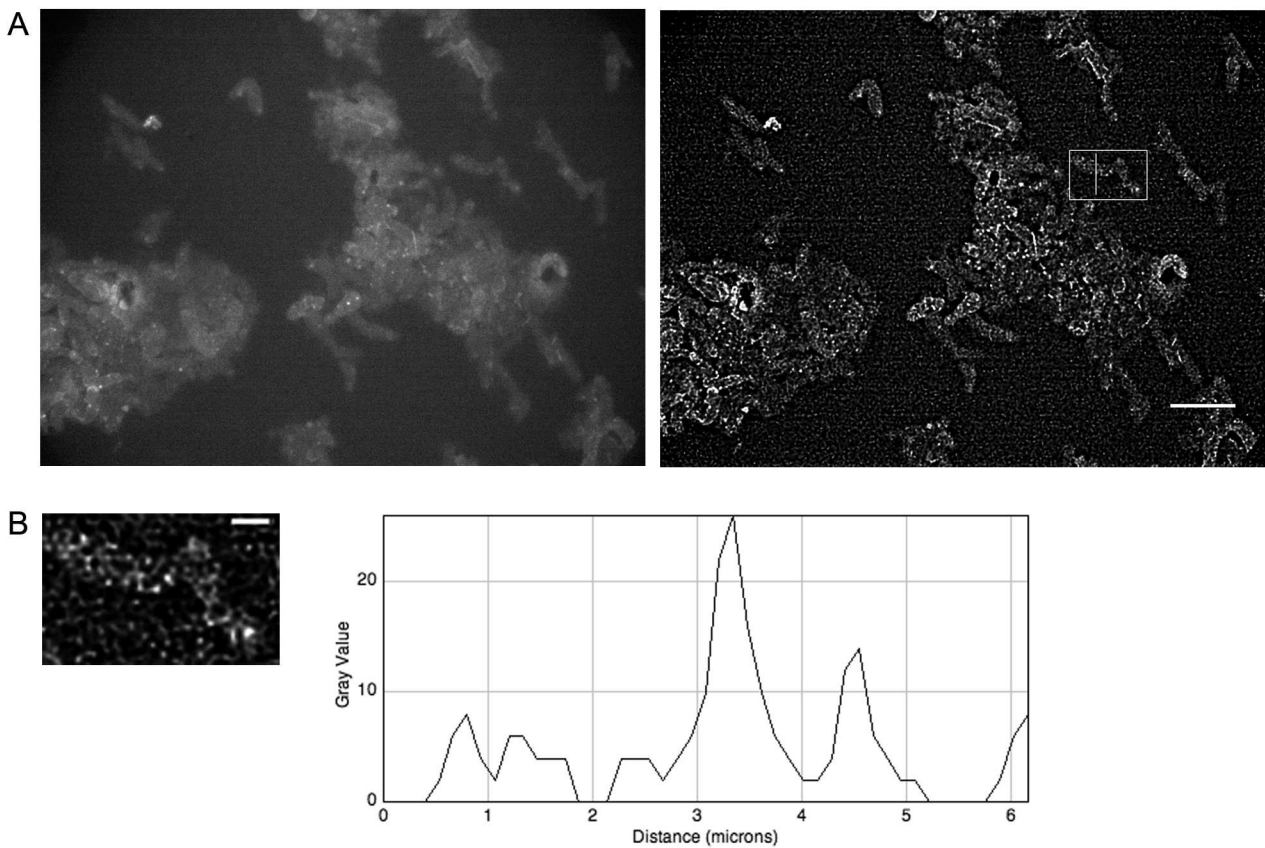


ABB. V-53. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der aus Wurzelknöllchen reisolieren Bakterioide des Wildtypstamms *S. meliloti* Rm1021. A) Aufnahmen einer größeren Anzahl an Bakteroiden. Autofluoreszenz der Bakterioide ist stärker zu sehen, als in entsprechenden frei lebenden Zellen, allerdings tritt diese verstärkt dort auf, wo mehrere Zellen in einem Haufen übereinander liegen. Im Auswahlrechteck liegt die ausgewählte Bakteroidgruppe für eine Vergrößerungsaufnahme. B) Vergrößerung von zwei Bakteroiden mit einem Intensitätsplot des Signals entlang der Diagonale durch die beiden Zellen. Die Grauwerte erreichen den niedrigen Bereich von max. 20. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

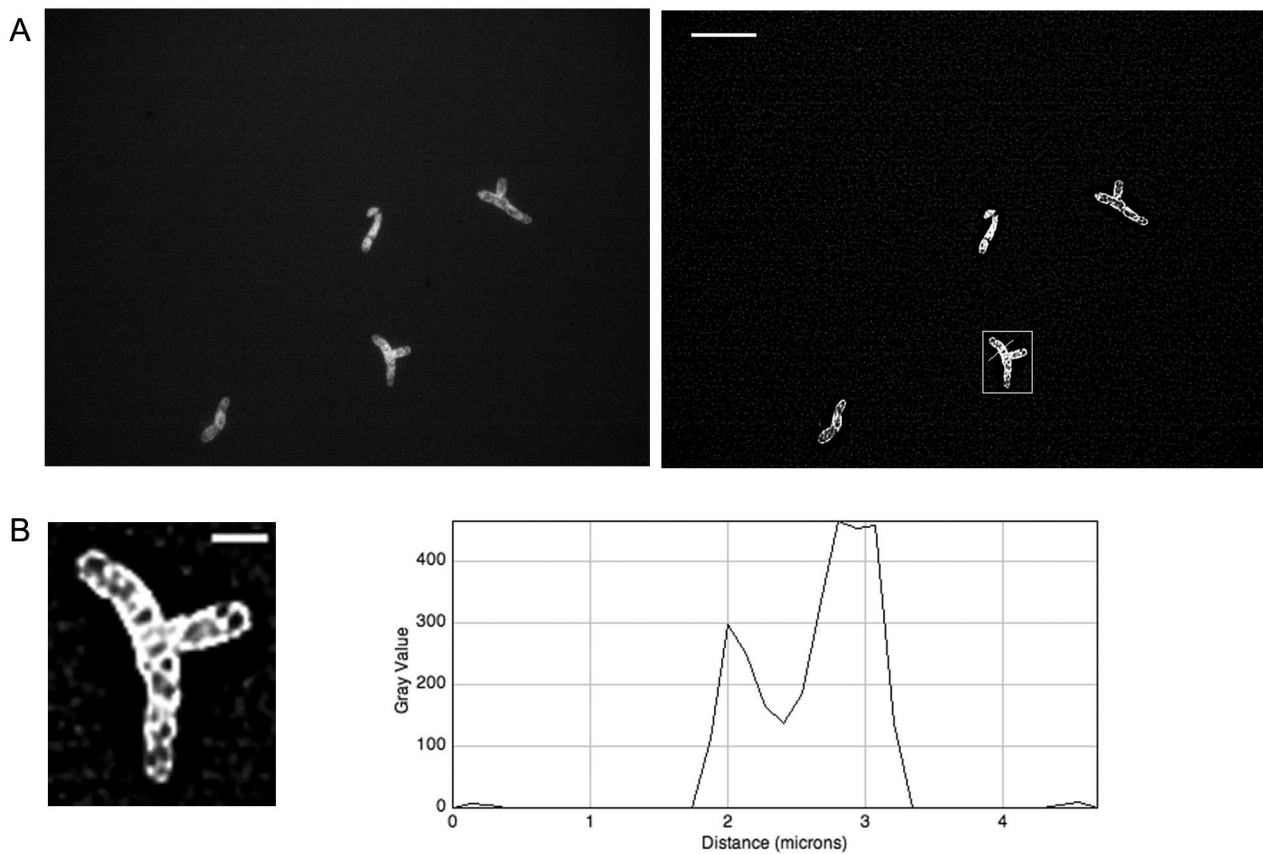


ABB. V-54. Aufnahmen von Bakteroiden des RplI-eGFP Fusionskonstruktes. A) Eine Auswahl an Bakteroiden, die das 50S ribosomales Protein L9 mit eGFP fusioniert exprimieren. Die Zellen zeichnen sich deutlich vom Hintergrund ab. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit einem typisch verzweigten Bakteroid und Signalplot des Querschnitts eines der Zellausläufe. Die Grauwerte erreichen liegen im hohen Bereich von bis zu 400. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

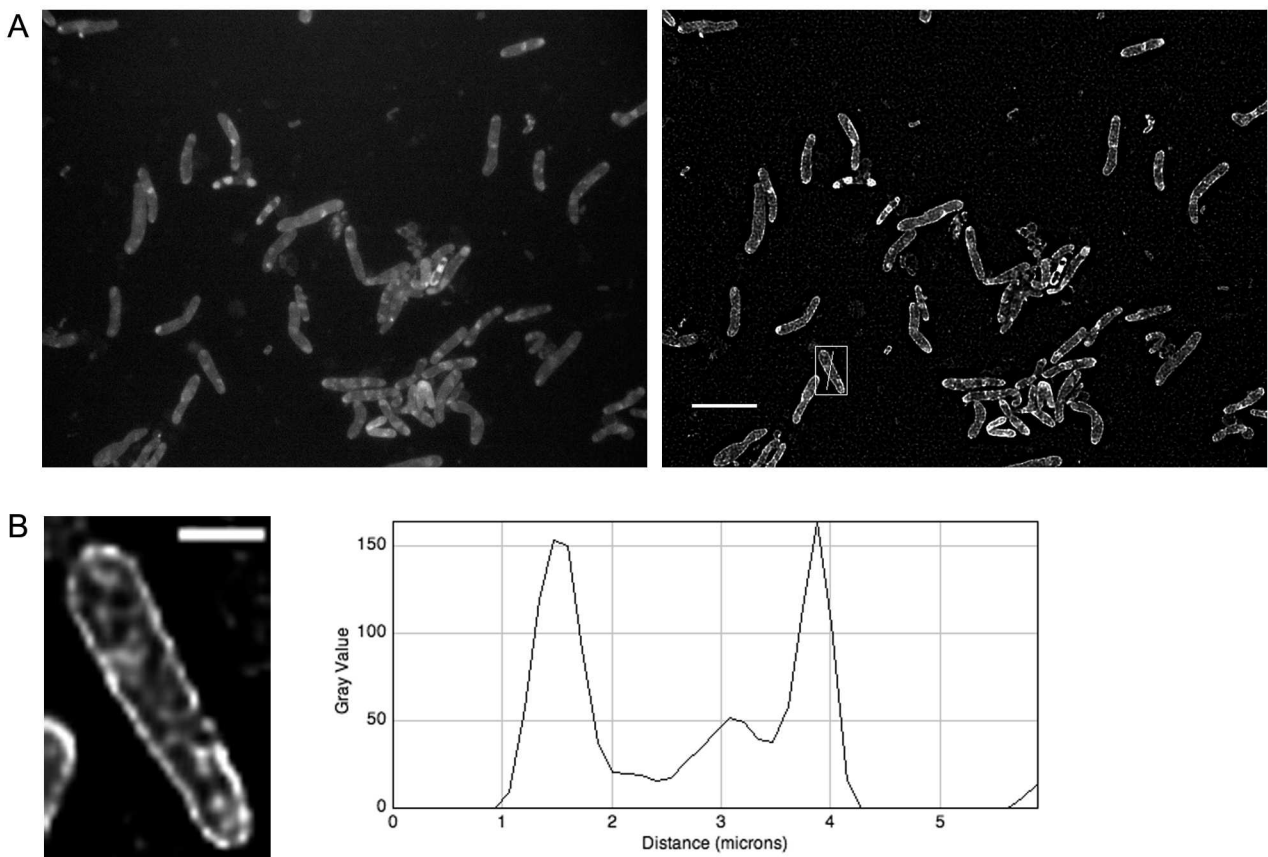


ABB. V-55. Aufnahmen von Bakteroiden, die das TerC-eGFP Fusionskonstrukt exprimieren. A) Eine Auswahl an Bakteroiden, die das hypothetische Transmembranprotein unbekannter Funktion exprimieren. Die Fusionsproteine lokalisieren deutlich an der Membran der Bakterioide. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit einem Bakteroid und Signalplot des schrägen Querschnitts der Zelle. Deutlich zu sehen die Ausschläge der Grauwerte in den Bereichen der Membran, schwächere Signalintensität innerhalb der Zelle. Die Membranlokalisierung ist in den Bakteroiden deutlicher festzustellen, als in den frei lebenden Zellen. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

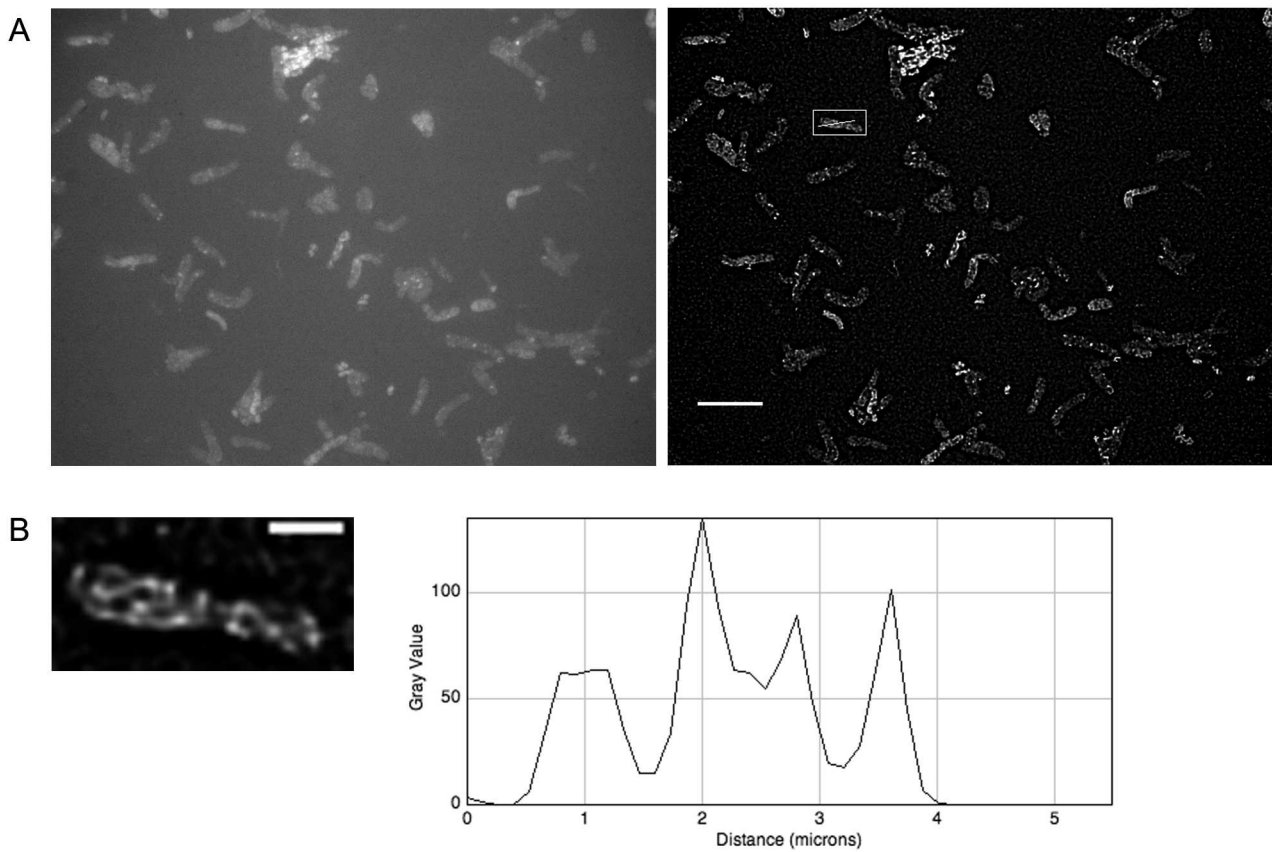


ABB. V-56. Aufnahmen von Bakteroiden des SerA-eGFP Fusionskonstruktes. A) Eine Auswahl an Bakteroiden, die das eGFP Protein mit der D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase fusioniert exprimieren. Die Zellen fluoreszieren nur leicht. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit einem ausgewählten Bakteroid und Signalplot des flachen Querschnitts durch die Zelle. Die Grauwerte erreichen in den hellsten Pixeln den Wert von maximal 100, sind insgesamt sehr niedrig. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

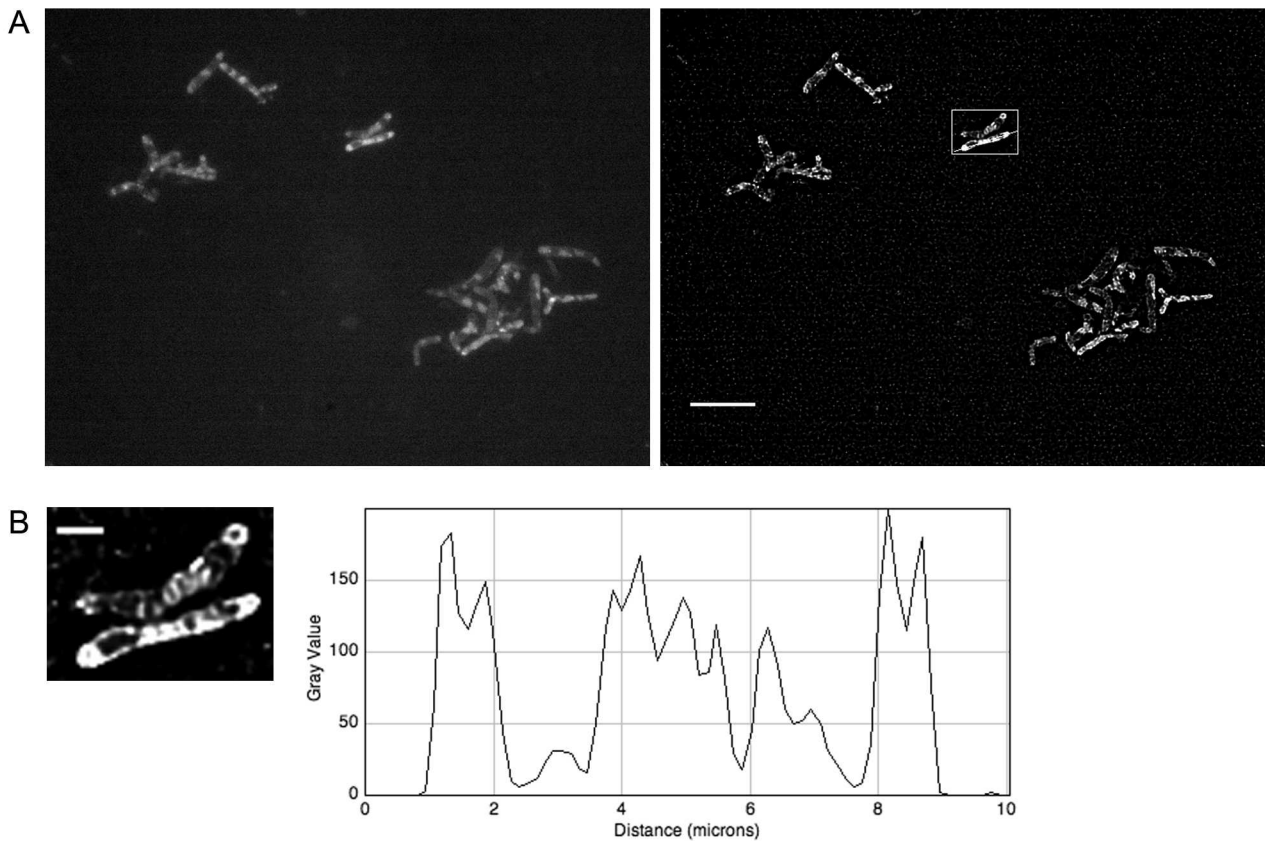


ABB. V-57. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Bakteroiden die das QxtB-eGFP Fusionskonstrukt exprimieren. A) Eine Auswahl an Bakteroiden, die das eGFP fusioniert mit der Unterinheit II der Quinoloxidase bilden. Das in frei lebenden Bakterien an der Membran und den Zellkappen lokalisiertes Protein liegt in den Bakteroiden im Zytoplasma vor und bildet eine auffällige segmentierte Struktur in den Bakteroiden aus. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit zwei Bakteroiden und Signalplot der Intensität der Grauwerte entlang des unteren Bakteroids. Deutlich im Plot sind die hellen zytosolischen Bereiche unterbrochen durch nicht fluoreszierenden Abschnitte. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

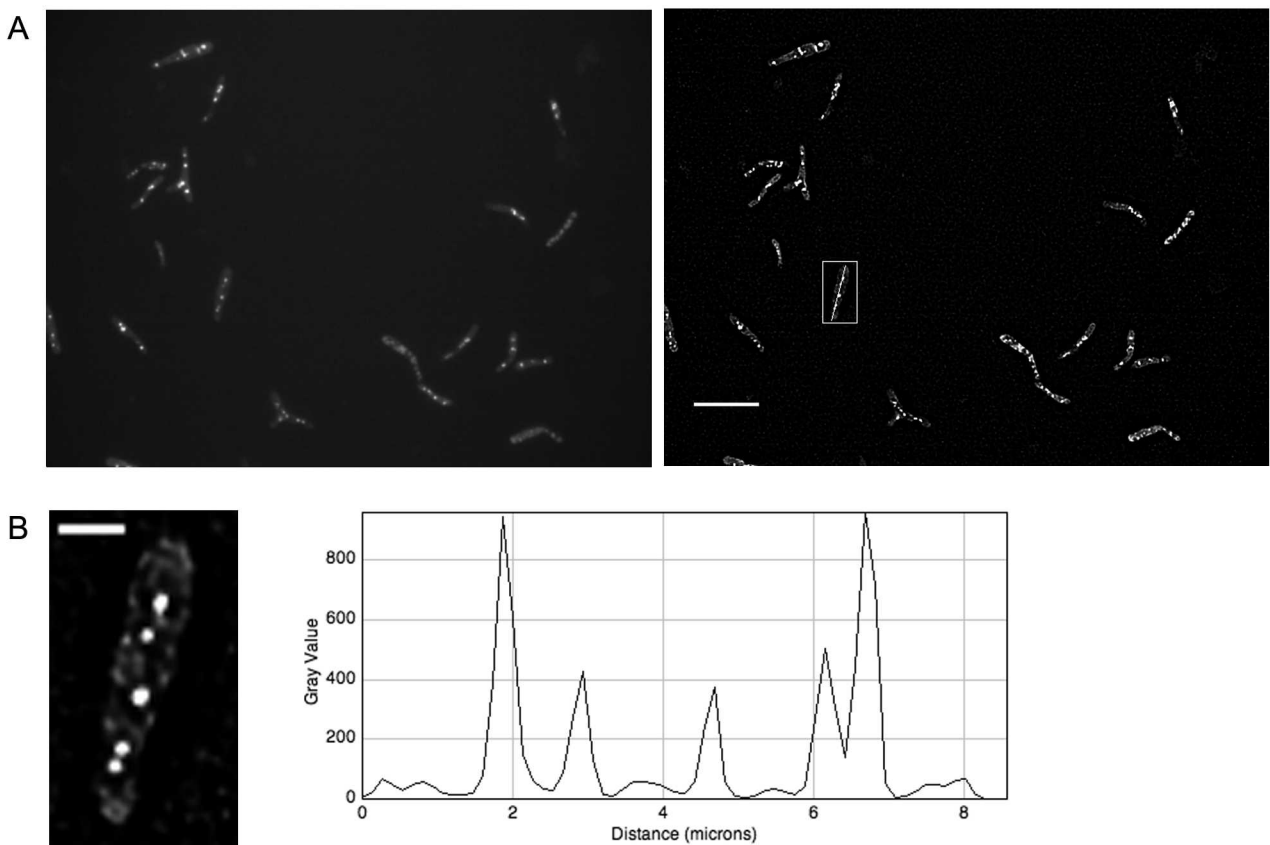


ABB. V-58. Aufnahmen von Bakteroiden des RNaseE-eGFP Fusionskonstruktes. A) Eine Auswahl einer höheren Anzahl an Bakteroiden. Die Zellen weisen ein charakteristisches Lokalisierungsmuster auf. Die Fusionsproteine konzentrieren sich in sehr hellen Punkten entlang der Zelllänge. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit einem Bakteroid und Signalplot des Längsschnitts der Zelle. Die Grauwerte erreichen einen hohen Bereich von über 800 an den gesamt fünf hellen Foki der Fluoreszenz und zeugen von kaum vorhandener Fluoreszenz im Zytoplasma. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

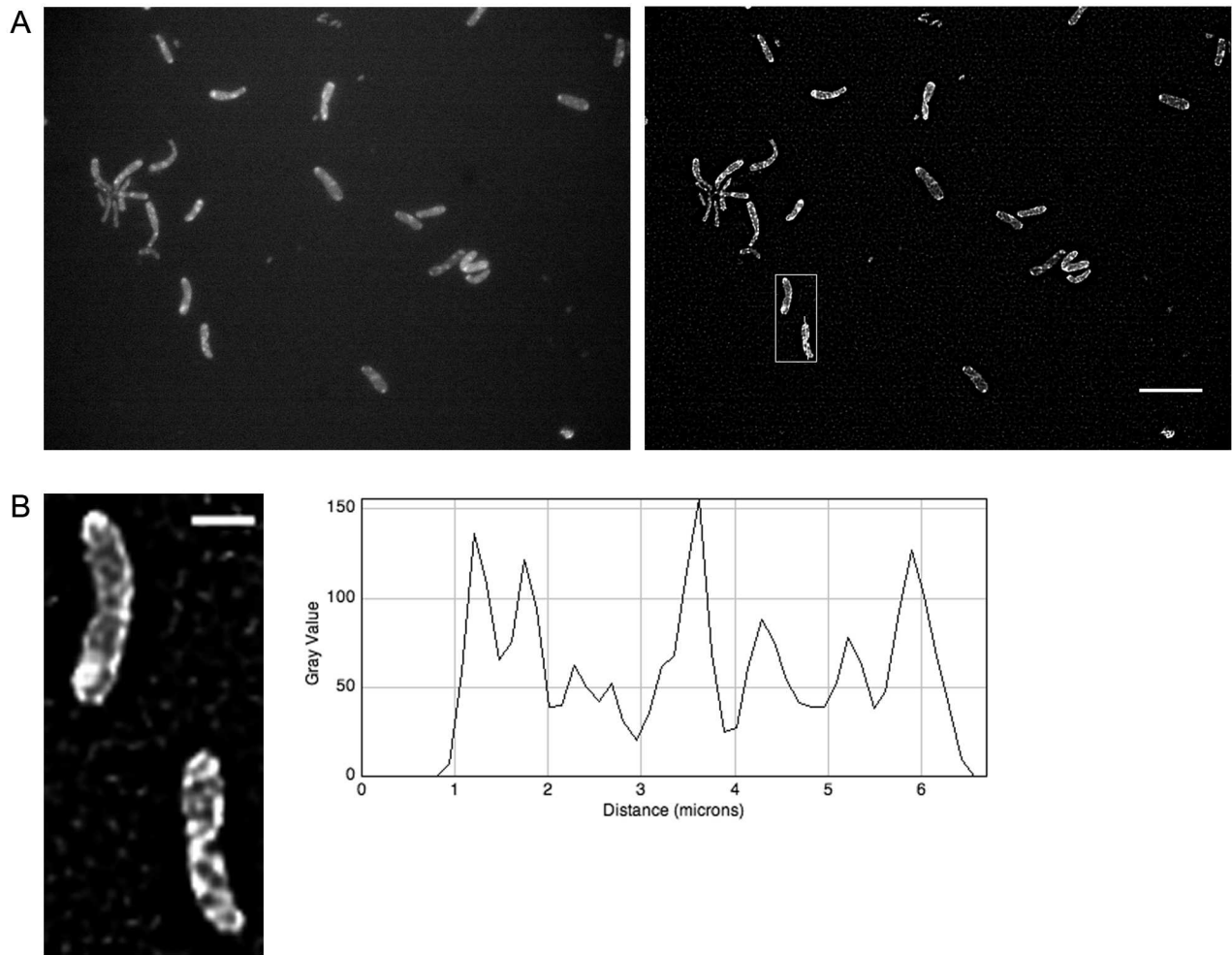


ABB. V-59. Aufnahmen von Bakteroiden des SMc00100-eGFP Fusionskonstruktes. A) Einige Bakterioide, die das hypothetische Protein-eGFP Konstrukt exprimieren. Die Zellen zeigen eine zytosolische Lokalisierung des Fusionsproteins mit einigen hellen Foki an den Zellpolen. Das zytosolische Lokalisierungsmuster ist ebenfalls stark punktförmig, nicht homogen verteilt. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit zwei Bakteroiden und Signalplot des Längsschnitts der unteren Zelle. Der Plot zeigt mehrere Peaks mit einem erhöhten Basiswert im Zytoplasma. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).



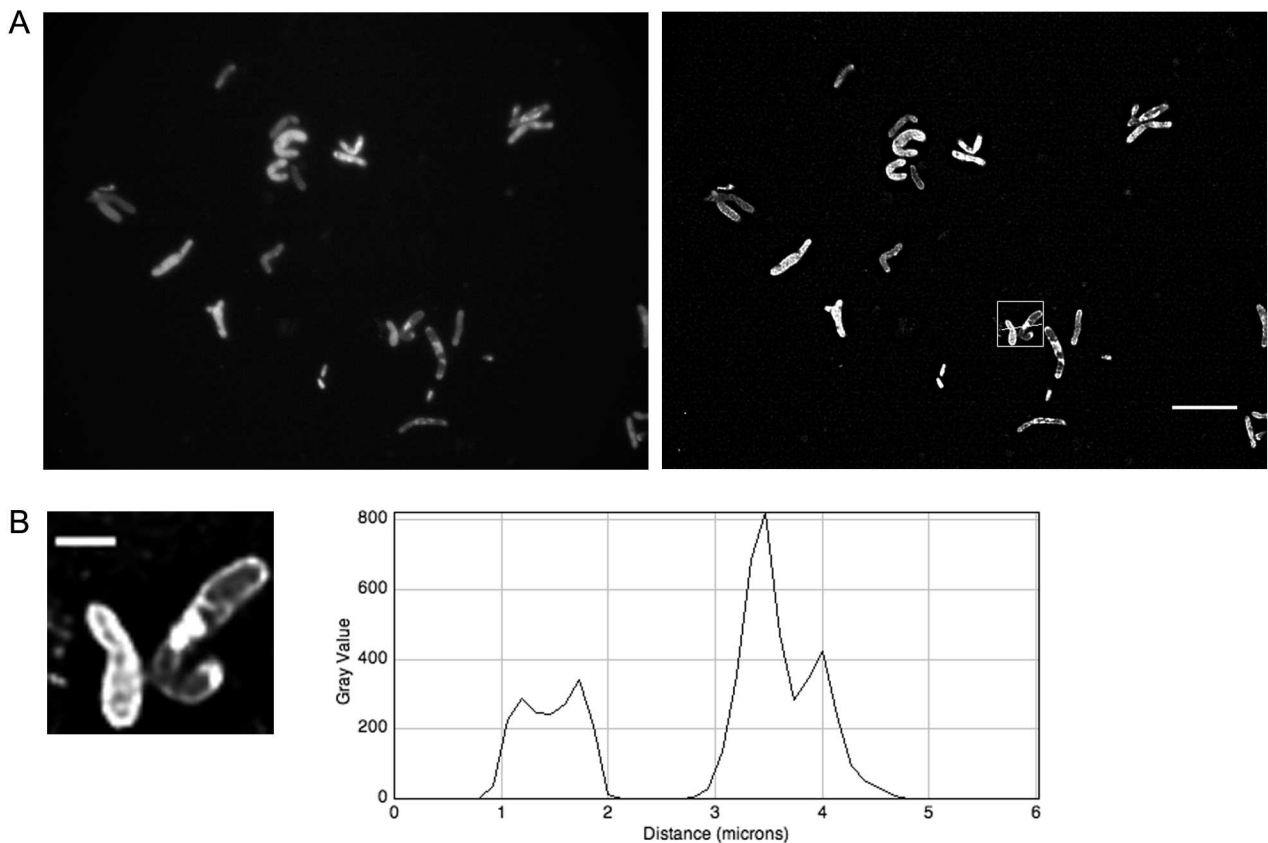


ABB. V-60. Aufnahmen von Bakteroiden des RplS-eGFP Fusionsproteins. A) Einige Bakterioide, die das 50S ribosomale Protein L19 mit eGFP fusioniert exprimieren. Die Zellen zeigen entweder eine zytoplasmatische Lokalisierung des Proteins oder eine Konzentration in Segmenten. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit zwei Bakteroiden und Signalplot des Querschnitts durch beide Zellen. Die Grauwerte erreichen hohe Bereiche bei beiden Zellen, im Zytoplasma, wie auch im Fluoreszenzfokus. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

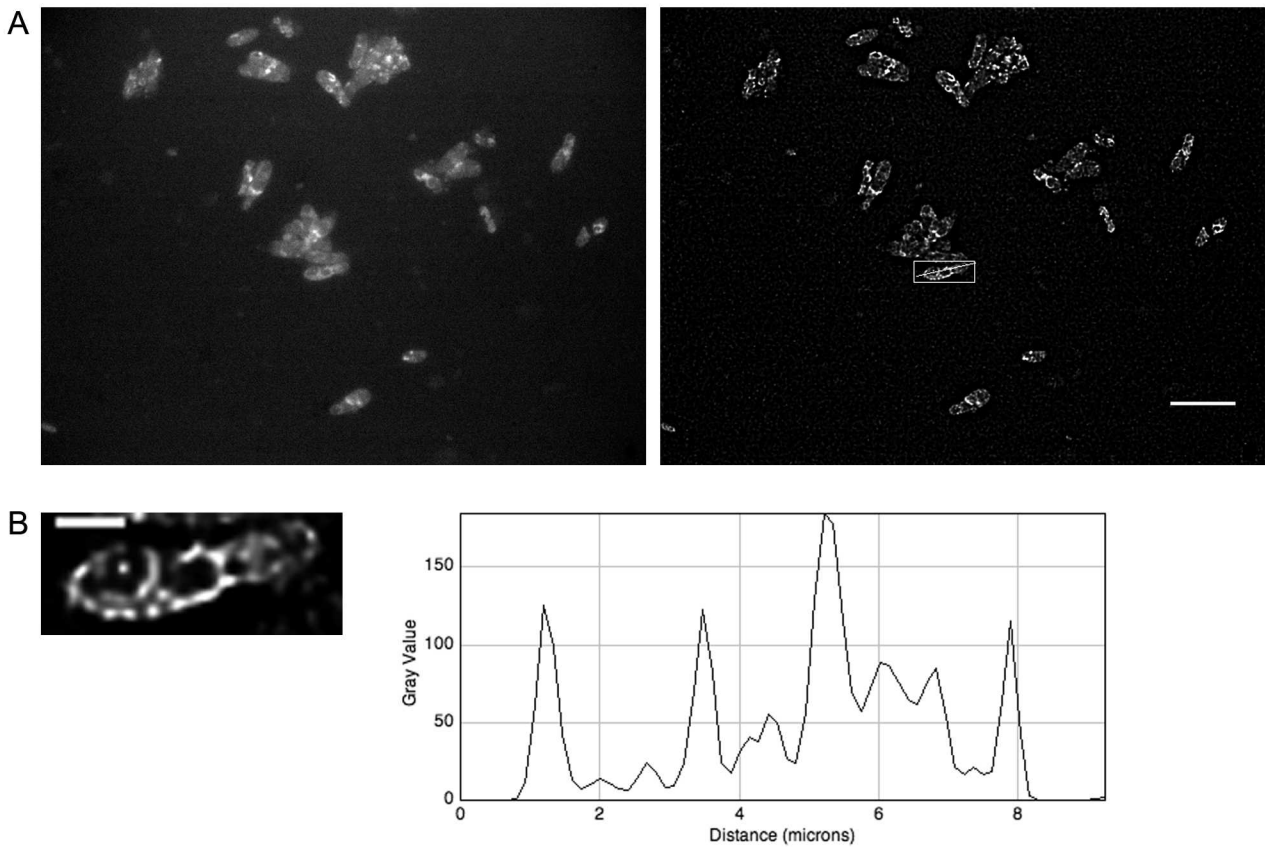


ABB. V-61. ABB. V-59. Aufnahmen von Bakteroiden des ATPF-eGFP Fusionskonstruktes. A) Eine Auswahl an Bakteroiden, die das ATP-Synthase-eGFP Konstrukt exprimieren. Die Zellen zeigen eine zytosolische, vielleicht auch eine Membran-assoziierte Lokalisierung des Fusionsproteins mit einigen hellen Bereichen in der Zellmitte. B) Eine Vergrößerung des markierten Bereiches in A) mit einem Bakteroid und Signalplot des Längsschnitts der Zelle. Der Plot zeigt mehrere Peaks mit einer kaum vorhandenen Fluoreszenz in den dunkleren Bereichen im Zytoplasma. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$  in A), 2  $\mu\text{m}$  in B).

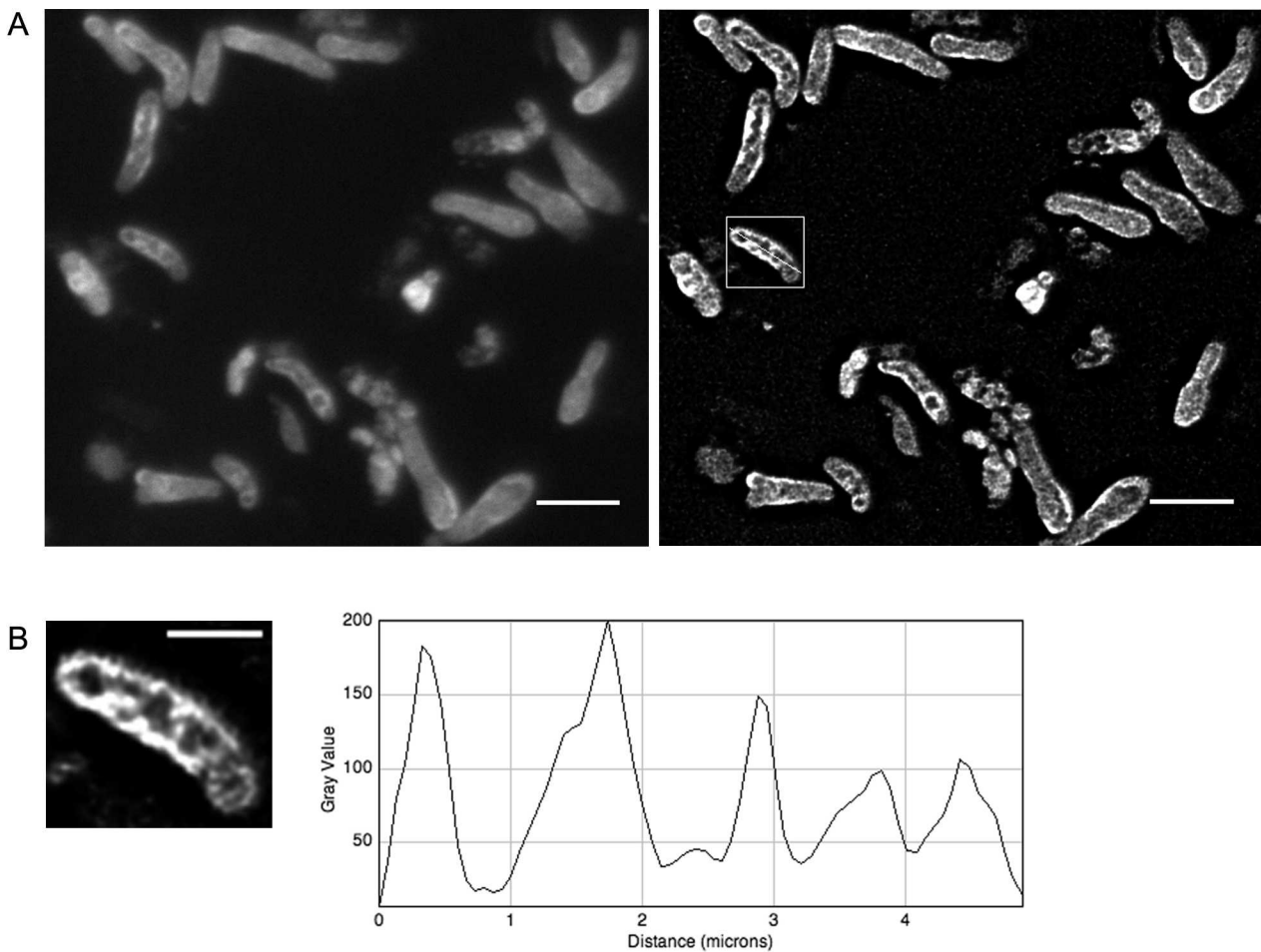


ABB. V-62. Aufnahmen von Bakteroiden des RpoB-eGFP Fusionsproteins. A) Eine Auswahl an Bakteroiden, die RNA-Polymerase fusioniert mit eGFP exprimieren. Die Lokalisierung ist "fleckig" zytoplasmatisch. B) Eine Vergrößerung des markierten Bakteroids in A) und Signalplot des Längsschnitts durch die Zelle. Starkes Fluoreszenzsignal wird durch abrupten Abfälle der Signalintensität unterbrochen. In diesen dunklen Bereichen ist fast keine Fluoreszenz nachweisbar. Größenbalken: 5 $\mu$ m in A) und in B).

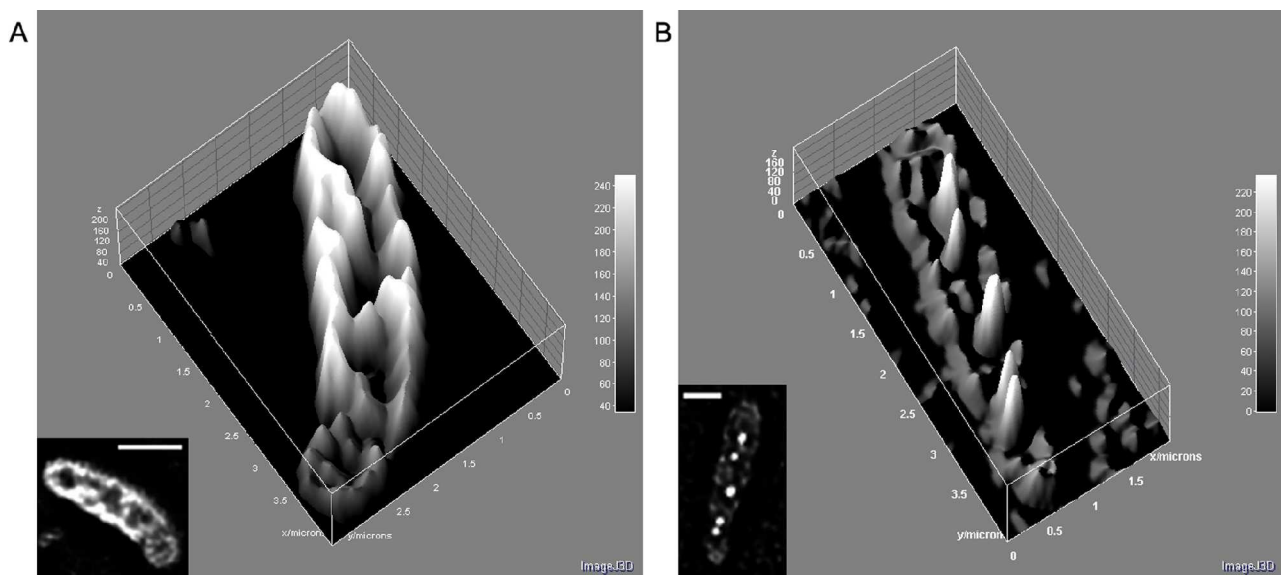
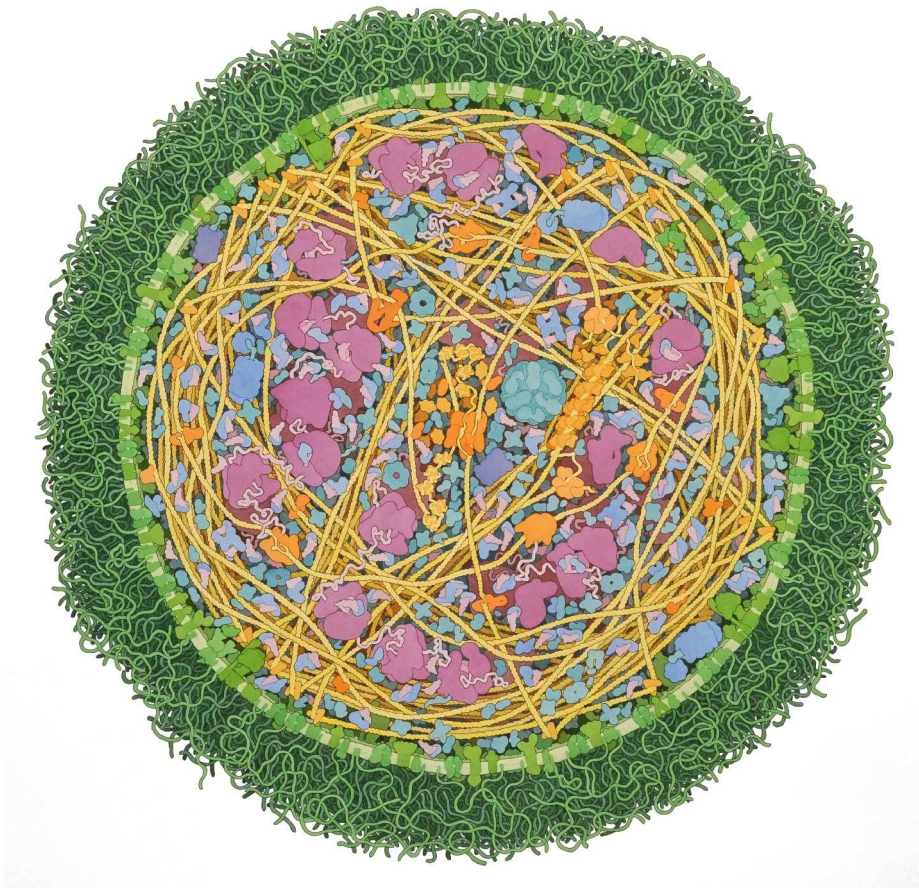


ABB. V-63. 3D-Oberflächenplots der Intensitätenverteilungen von lokalisierten RpoB-eGFP und RNaseE-eGFP Molekülen in den *S. meliloti* Bakteroiden. A) Intensitätenplot der RNA Polymerase RpoB-eGFP Fluoreszenz. B) Fluoreszenzverteilung von RNaseE-eGFP im Bakteroid. Die punktförmigen Aussparungen in der Fluoreszenzverteilung der RNA Polymerase ähneln den Intensitätspeaks der RNaseE subzellulären Verteilung.

## VI Diskussion



## VI Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur zufälligen, internen Markierung von Proteinen mit einem fluoreszenten Marker zu etablieren und diese Methode zur mikroskopischen Dokumentation von subzellulären Lokalisierungen von Proteinen in dem Stickstoff fixierenden  $\alpha$ -Proteobakterium *Sinorhizobium meliloti* anzuwenden.

Die neuesten Erkenntnisse der molekulargenetischen Forschung haben unsere Vorstellung von dem Aufbau und der Organisation einer prokaryotischen Zelle umfassend verändert. Die neu entdeckte Komplexität basiert hauptsächlich auf dem Fakt, dass die fehlende Kompartimentierung einer Bakterienzelle durch gezielte und zeitlich gesteuerte Bewegung von Proteinen und Proteinkomplexen aufgewogen wird. Diese Steuerungsmechanismen sind im Ganzen noch nicht aufgeklärt und nur für einige wenige Proteine dokumentiert worden. Die Dechiffrierung des Aufbaus und der Funktion von Zellen und vielzelligen Organismen mit vereinter Hilfe verschiedener methodischer Ansätze wird durch den Forschungszweig der Systembiologie als Ziel verfolgt. Die konventionellen, sog. "omic"- Forschungsbereiche der Systembiologie, wie Proteomik, Metabolomik und Transkriptomik können diese Fragestellungen nicht effizient lösen, denn es fehlt ihnen die zeitliche Auflösung der zellulären Vorgänge. Die moderne Mikroskopie schließt diese Lücke der zeitlichen Dimension und erlaubt dank immer neuer technologischer, sowie methodischer Lösungen ein tiefer gehendes Verständnis der örtlichen und zeitlichen Zusammenhänge von Vorgängen in einem Organismus. Die im Rahmen dieser Studie vorgestellte Methode stellt ein optimales Werkzeug zur Erstellung von chromosomal kodierten, fluoreszent markierten Proteinfusionen in einem großen Maßstab und zur Mikroskopie der Expression dieser Proteinkonstrukte bei deren Regulation durch endogene Mechanismen in lebenden Zellen dar. Die vielseitige Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode u. a. zur bildhaften Auflösung zellulärer Strukturen und Darstellung diverser Lokalisierungsmöglichkeiten von Proteinen wurden im Rahmen dieser Studie am Beispiel des symbiotischen Bakteriums *Sinorhizobium meliloti* getestet und werden hier präsentiert.

### **VI-1. Transposition stellt eine optimale Methode zur internen fluoreszenten Markierung von Proteinen zwecks Mikroskopie ihrer subzellulären Lokalisierung dar.**

Bakteriellen Chromosome können durch diverse Mechanismen des Gentransfers manipuliert werden, die hauptsächlich auf der Integration oder Exzision des genetischen Materials basieren. Diese Mechanismen beruhen auf der homologen Rekombination (z.B. RecA oder  $\lambda$ -Red vermittelte Rekombinationen), ortsspezifischen Rekombination (z.B. FLP- FRT, Cre-loxP Systeme), sowie der

Transposon-vermittelten Genintegration. Transposons sind mobile genetischen Elemente, die in einem als Transposition bezeichneten Prozess, entweder durch sog. "cut-and-paste" oder einen replikativen Mechanismus ihre Position im Genom wechseln können, wobei im erstgenannten Fall das Transposon lediglich sein Insertionsort ändert, im zweiten Fall eine zusätzliche Kopie des Transposons in der Ursprungs-DNA verbleibt (Choi & Kim, 2009). Je nach gewünschter Anwendung kann auf eine breite Palette von Transposons mit verschiedenen Eigenschaften zurückgegriffen werden. Mobile Elemente, wie Insertionselemente, konjugativen Transposons oder das Tn7 integrieren spezifisch an bestimmten homologen oder bevorzugten Stellen im Genom und eignen sich z.B. für die Ausstattung eines Bakterienchromosoms an einer bekannten, neutralen Stelle mit einem Marker unter der Kontrolle eines gewünschten Promoters (Koch et al. 2001). Der Mitte der siebziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts entdeckte Mechanismus des mobilen Austausches von genetischer Information mittels der an zufälligen chromosomalen Stellen erfolgenden Transposition wurde schnell zum Werkzeug der Wahl zur Erstellung von Insertionsmutationen zwecks der Funktionsaufklärung genetisch kodierter Elemente (Cohen 1976). Eine Reihe von diesen Transposons mit jeweils eigenen Eigenschaften (Mariner, Mu, Tn3, Tn5, Tn10, Tn552) findet für verschiedene Zwecke Verwendung in Bakterien. Insbesondere die Methode der Tn5-basierten Mutagenese wurde für eine große Bandbreite von bakteriellen Organismen etabliert (Shaw & Berg 1979; Petzke & Luzhetskyy 2009; Ficht et al. 2010; Ito et al. 2010; Rott et al. 2011; Zou et al. 2011), u.a. auch speziell für die Analyse von Genfunktionen in *S. meliloti* (Simon et al. 1983; Pobigaylo et al. 2006). Die zufällig erfolgende Transposition stellt darüber hinaus ein Werkzeug der Wahl für weitere Anwendungen, wie Identifizierung essentieller Gene, Erstellung von transkriptionalen und translationalen Fusionen, sowie DNA Sequenzierung. Vorteile eines Transposon-basierten Versuchsansatzes liegen hier in Sequenz-unabhängigen, also rein zufälligen Insertion ins genetische Material der Wahl und der Möglichkeit die Versuche mit relativ kleinen Aufwand im großen Maßstab realisieren zu können (Zhou et al. 1998). Später wurde die Methode der *in vitro* Transposition etabliert, die durch Zugabe einer modifizierten, hyperaktiven Form des Tn5 Transposase Proteins zur Antibiotikaresistenz-tragenden Transposon, die Insertion dessen in ein genetisches Material der Wahl in einem Reaktionsschritt möglich machte (Goryshin & Reznikoff 1998). In einer zur Mikroskopiezwecken modifizierten Form wurde eine *in vitro* Transposition von Sheridan & Hughes vorgestellt (Sheridan et al. 2002; Sheridan & Hughes 2004). Hier wurde das übliche Antibiotikumsresistenzgen um einen Start- und Stoppkodonfreien fluoreszenten Marker, wie z. B. *eGFP*-Gen erweitert. Zufällige Insertionen in einen offenen Leserahmen führen zur Erstellung von Fusionsproteinen des aminoterminalen Endes eines Proteins mit dem fluoreszenten Marker und der nachfolgenden Kanamycinresistenz. Die Entfernung der Antibiotikumsresistenz

durch Restriktion des Fusionskonstrukt kodierenden Plasmids mit *SrfI* Enzym und Religation des transponierten Vektors führen zur Produktion eines intern fluoreszent markierten Proteins der vollständigen Länge. Diese Methode wurde daraufhin zur Suche von möglichen Insertionsstellen in offenen Leserahmen bestimmter plasmidkodierter interessanter Gene angewandt (Sheridan et al. 2002; Osawa & Erickson 2005).

Konventionelle Studien zur Lokalisierung fluoreszenter Proteine in lebenden Zellen basieren auf einer C- oder N-terminalen Markierung der interessanten Eiweiße (Watt et al. 2007; Werner et al. 2009). Interne Ausstattung eines Proteins von Interesse mit einem fluoreszenten Marker hat u. a. den Vorteil, dass bestimmte aminoterminaler Erkennungssequenzen oder carboxyterminale Bindungsdomänen nicht verdeckt werden. Einige Gruppen von Proteinen, wie z. B. Membranproteine sind durch einfache N- oder C-Terminale Markierungen oft nicht funktionsfähig und eine interne Markierung führt dabei mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zum Erfolg (Sheridan et al. 2002). Die Suche nach einer funktionierenden internen Insertionsstelle für einen Marker, kann sich als langwierig und methodisch kompliziert erweisen. Die zufällige Insertion durch Transposition erhöht so die Wahrscheinlichkeit der Erstellung eines funktionierenden, korrekt lokalisierenden Proteins. Darüber hinaus werden nicht funktionierende, jedoch für die Zelle essentielle Fusionsproteine direkt durch die Letalität der Insertion eliminiert, was die Selektion korrekter Fusionen erleichtert.

Diese Methode sollte im Rahmen dieser Arbeit für die Markierung eines möglichst breiten Spektrums an Proteinen in *S. meliloti* zuerst mittels *in vitro* Transposition modifiziert und etabliert werden. Hier sollten dann nicht ein ausgewähltes einzelnes Gen, sondern möglichst viele in einer Reaktion markiert werden.

## **VI-2. Die Etablierung der Transpositionsmethode zur Proteinmarkierung als *in vitro* Reaktion stellt sich als nicht ausreichend effizient raus und wird verworfen.**

Das hyperaktive Transposase Enzym konnte vom pWH1891 Plasmid überexprimiert, sowie effizient und hochkonzentriert aufgereinigt werden und stand für die Durchführung der *in vitro* Transposition von genetischen *S. meliloti* Fragmenten zur Verfügung. Da konventionelle Methoden des DNA Transfers in prokaryotische Zellen mittels z. B. der chemischen Transformation oder Elektroporation aufgrund von nicht-reproduzierbaren Ergebnissen nicht für das Bakterium *S. meliloti* angewendet werden (Courtois et al. 1988), war es nötig, den transponierten Ansatz zuerst in einen mobilisierbaren *E. coli* Stamm S17-1 (Simon et al. 1983), der die RK2 *tra* Gene im Chromosom kodiert trägt zu elektroporieren, um die bestmögliche Ausbeute zu erhalten um dann einzelne Kolonien zur Konjugation mit *S. meliloti* zu verwenden. Leider war schon die



Konzentration der im Vorfeld isolierten, gespaltenen und aus dem Agarosegel aufgereinigten genomischen Fragmente aus *S. meliloti* sehr niedrig und führte nur zu vereinzelt transponierten Konstrukten in *E. coli*. Darüber hinaus wurde die effiziente Ausführung der angestrebten Methode durch den Fakt der im folgenden Schritt notwendigen Entfernung des Antibiotikaresistenz erschwert. Transponierte Konstrukte, die nachweislich nach einer homologen Rekombination in *S. meliloti* lokalisierbare Fusionsproteine produziert haben, mussten wieder in *E. coli* einer *SrfI* Restriktion, sowie einer Religation des Plasmids unterzogen werden und in einer wiederholten Konjugation nach *S. meliloti* transferiert werden, allerdings ohne dieses Mal die Möglichkeit der Selektion bezüglich des Transposonkonstrukts zu haben. Aus diesem Grund fand die nachfolgende Selektion transponierter *S. meliloti* Klone über den zweistufigen Prozess statt: der negativen Selektion nach der Vektor-vermittelten Antibiotikaresistenz und im nachfolgenden Schritt dem Resistenzverlust nach erfolgreicher doppelt homologen Rekombination und Verlust des Vektors. Nicht jede Rekombination konnte erfolgreich verlaufen, da die Insertion des Transposons in einigen Fällen nicht genügend lange flankierenden Bereiche für den Einbau über homologe Abschnitte hinterlassen hat. Natürlich musste auch mit vielen Reaktionsansätzen gerechnet werden, die aufgrund des Transposoneinbaus in der falschen Leserichtung und/oder Reading Frame, sowie in nicht kodierenden Bereichen keine funktionierenden Fusionsproteine produzieren können. Die Ausbeute an fluoreszenten *S. meliloti* Stämmen war für den benötigten Aufwand zu gering. Aus diesen Gründen wurde diese Ausführung der Methode verworfen und die ursprüngliche Idee zur Verwendung der Transposition in einem *in vivo* Ansatz modifiziert.

### **VI-3. Die auf *in vivo* Transposition basierende Methode kann erfolgreich realisiert werden und führt zur Erstellung und Identifizierung von eGFP-Fusionsproteinen diverser Funktionen in *Sinorhizobium meliloti*.**

#### **VI-3.1 Die erstellten Vektorkonstrukte sind für die *in vivo* Herstellung von eGFP-Fusionsproteinen in *S. meliloti* gut geeignet.**

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein Set aus zwei Plasmidvektoren entstanden, der alle benötigten Elemente für einen zweistufigen Prozess der *in vivo* Transposition und Cre-Rekombinase vermittelter Exzision des Selektionsmarkers beinhaltet. Der Vektor pHB14 wurde aus Fragmenten von fünf verschiedenen Plasmiden erstellt, mit einem Vektorrückgrad basierend auf dem Konstrukt pG18mob2 (Kirchner & Tauch 2003), der Transposonsequenz stammend aus dem Vektor pBNJ24.6 (Hughes et al. 2003), der Sequenz der hyperaktiven Transposase aus dem Überexpressionsvektor pWH1891 (Köstner et al.) und dem Promotersystem *lacI/Ptrc* aus dem Vektor pXK99E (Kirchner & Tauch 2003). Die Neomycinresistenzkassette, die mit *loxP* Erkennungsstellen, sowie *SrfI*-

Restriktionsschnittstellen flankiert ist, wurde extern synthetisiert (Mr. Gene), da eine Erstellung mittels PCR aufgrund von langen palindromischen, zueinander homologen Sequenzen nicht erfolgreich war. Der finalisierte Vektor pHB14 wurde anschließend mittels Konjugation von *E. coli* nach *S. meliloti* transformiert und durch Induktion der Transposase Aktivität für die Erstellung von genomischen Insertionen des eGFP Transposons in den Empfängerzellen verwendet. Es wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen, um eine eventuelle Redundanz der erzeugten Fusionsproteine auszuschließen. Dabei wurde auch berücksichtigt, dass der Vektor pHB14 nicht in *S. meliloti* repliziert, um eine Weitergabe des Vektors und damit des Transposons an Tochterzellen und eine eventuelle Heterogenität der Zellen einer aus der Konjugation resultierender Kolonie zu verhindern. Darüber hinaus wurde die Konjugationszeit auf die minimal benötigte Zeit reduziert, um eine Vermehrung der Transposon tragenden *S. meliloti* Zellen und wiederholtes Auftauchen gleicher markierter Proteine in einem Konjugationsansatz zu verhindern. Die hyperaktive Transposase besitzt zwar eine erhöhte Transpositionseffizienz, diese beträgt allerdings nur 1% (Goryshin & Reznikoff 1998), was nur in einem transponierten Genom pro hundert Zellen, die das pHB14 Konstrukt mittels Konjugation empfangen haben resultiert. Tatsächlich betrug die Transpositionseffizienz in dem Versuch nur 0,8 %. Es konnten ca. 23 transponierte Klone aus einem Mikroliter Konjugationslösung resultierend, als Kolonien auf Selektionsplatten gewonnen werden. Da die Konjugationslösung allerdings ein recht großes Volumen von 1,3 ml hatte und die einfache Selektionsmöglichkeit der *S. meliloti* Klone, die das Transposon im Genom tragen, auf Festmedien gegeben war, ist die Zahl der insgesamt resultierten Kolonien pro Ansatz recht hoch gewesen. Das Transposon im Konstrukt pHB14 wurde mittels einer blunt-end Ligation in die *EcoRV* Schnittstelle des Ausgangsplasmids pG18mob2 integriert. Es ist allerdings bekannt, dass die Position und eventuell auch die Ausrichtung des Transposons in dem zu Manipulation verwendeten Vektor die Transpositionsfrequenz erheblich, sogar um den Faktor 100 beeinflussen kann (Simon et al. 1986). Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, in der Zukunft die Insertionsstelle für das eGFP-Transposon im pHB14 Vektorrückgrat mittels zufälliger Insertion durch Transposition zu finden, die in bestmöglicher Transpositionseffizienz resultiert. Die Anzahl der Kolonien, die ein starkes Fluoreszenzsignal emittierten war deutlich niedriger als die Gesamtzahl der gewonnenen Kolonien, nur ca. 2% der erzeugten Kolonien hatten ein markiertes Protein sichtbar hoch exprimiert. Zwar ist die Wahrscheinlichkeit des Treffens eines richtigen Leserahmens durch ein springendes Transposon nur 1/6, also 16,67% und die letalen Insertionen werden bereits im Vorfeld ausselektiert, trotzdem kann das Transposon nicht nur in einen der vorhergesagten 6207 Protein-kodierenden Gene in *S. meliloti*, sondern in die zahlreichen nicht kodierenden Genombereiche springen. Darüber hinaus werden einige Gene erst zu bestimmten, nicht anzutreffenden Konditionen exprimiert oder

die Expressionsniveaus der endogenen Promotoren sind insgesamt sehr niedrig, zu niedrig für ein auffallendes Fluoreszenzsignal (Russel & Keiler 2008). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transposition mit Hilfe der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte eine ausreichend hohe Zahl an *S. meliloti* Stämmen, die eGFP-Fusionsproteine exprimieren produziert hat. Diesen Fusionsproteinen fehlten allerdings zu diesem Zeitpunkt mehr oder weniger lange Sequenzfragmente der respektiven C-Termini, da die Neomycinresistenz-vermittelnde Aminoglycosid-Phosphotransferase des Transposons mit dem Stoppkodon in ihrem Gen die Proteinsynthese abbricht. Der Selektionsmarker muss aus diesem Grund in einem nachfolgenden Schritt ebenso wie die Transposition selbst, *in vivo* entfernt werden.

### **VI-3.2 Die Methode zur Herstellung von eGFP-Fusionsproteinen mittels Transposition wird mittels eines zusätzlichen Cre Rekombinase Reaktionsschrittes für *in vivo* Anwendungen angepasst.**

Die Anpassung der Methode für zufällige Markierung von Proteinen mit fluoreszenten Markern unter der Kontrolle der endogenen Promotoren von einem *in vitro* zu einem *in vivo* Ansatz bedurfte einer Möglichkeit, den Selektionsmarker des Transposons aus dem Insertionsort im Genom *in vivo* herauszuschneiden, um die Erstellung von markierten Proteinen der vollständigen Aminosäuresequenz zu gewährleisten. Die Entscheidung fiel auf das bereits gut etablierte Cre/lox System. Das Cre/lox System für genetische Rekombination wurde in den Achtziger Jahren etabliert (Sauer 1987; Sauer & Henderson 1988) und findet seitdem etablierte Anwendung in genetischen Manipulationen in tierischen Zellkulturen, Pflanzen, Hefe und besonders in der Erstellung von Knockout Mutationen in Mäusen (Hegemann et al. 2006; Kawakami et al. 2011; Khattri et al. 2011; Gilbertson 2003; Yu & Bradley 2001;). Die aus dem Bakteriophagen P1 gewonnene Rekombinase ist ein besonders vielseitiges Werkzeug. Das Enzym erkennt spezifische genomisch kodierte Basensequenzen von 34 bp und katalysiert ohne den Bedarf an Kofaktoren die Rekombination von Fragmenten, die zwischen diesen zwei Erkennungsbereichen liegen. Je nach der Orientierung der sog. *loxP* (locus x-over P1) Stellen zueinander wird das dazwischen positionierte Fragment herausgeschnitten, invertiert oder zwischen verschiedenen Chromosomen transloziert werden. Die Vorteile der Methode, sowie des verwandten Flippase Flp/FRT Systems liegen in den Möglichkeiten zu einem beliebigen Zeitpunkt die Rekombination *in vivo* zu induzieren. Das System findet deshalb auch oft Anwendung als Reaktion in Methoden, die mikroskopische Analysen anwenden, z. B. um neuronale Zellen eines Mausgehirns in einer statistischen Wahrscheinlichkeitsverteilung mit multiplen Fluoreszenzmarkern zu exprimieren („Brainbow“, Livet et al. 2007) oder die Infektion der Maus mit Toxoplasmen zu verfolgen (Koshy et al. 2010). Auch in einzelligen Organismen wird

die Methode gerne im Vorfeld der Mikroskopie gewählt, ob für die Erstellung und Lokalisierung von N-Terminalen GFP-Fusionsproteinen oder mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae* (Prein et al. 2000; Haim-Vilmowsky & Gerst 2011) oder Fusionsproteinen in *E. coli* (Watt et al. 2007). Aus diesen Gründen haben wir uns für die Implementierung der Cre Rekombinase Reaktion in dem Entwurf der in dieser Arbeit entwickelten *in vivo* Markierungsmethode entschieden. Das entworfene Transposon trägt einen Neomycin-Resistenzgen-Selektionsmarker, der mit gleichgerichteten *loxP* Bereichen flankiert ist. Nach der Selektion transponierter Klone kann die Entfernung des Selektionsmarkers bequem *in vivo* erfolgen, durch die Transfektion mit einem Cre Rekombinase exprimierenden Plasmid und Inkubation auf Arabinose haltigen Kultivierungsmedium, das die Rekombinase-Expression induziert. Das Plasmid pHB15 enthält das *cre* Gen stammend aus dem Überexpressionsplasmid pQL123 (Liu et al. 1998) kloniert hinter dem durch Arabinose induzierbarem Promoter des in *S. meliloti* replizierenden Plasmids pJN105. Die mit dem Plasmid pHB15 transformierten *S. meliloti* Stämme wurden nach der Induktion der Cre Rekombinase Expression auf Selektionsmedien verdünnt ausplattiert und später auf den Verlust des Selektionsmarkers des Transposons durch paralleles picken der einzelnen Kolonien auf passenden Festagarmedien negativ selektioniert. Die Cre Rekombination erwies sich als eine sehr effiziente Reaktion. In fast allen Fällen genügte die Analyse von 50 Kolonien, um mindestens einen Fall von Cre vermittelter Exzision des Selektionsmarkers fest zu stellen. In nur einem Fall mussten hundert Kolonien untersucht werden. Meistens war in der Mehrheit der untersuchten Kolonien die Rekombination erfolgreich gewesen und die Antibiotikaresistenz des Transposons verloren. Somit kann gesagt werden, dass die Möglichkeit der *in vivo* Entfernung des Selektionsmarkers mit Hilfe Cre vermittelter Rekombination das Mittel der Wahl für diese Art von Anwendungen darstellt.

### **VI-3.3 Die Phi29 vermittelte Amplifikation des genetischen Materials stellt ausreichende Mengen DNA zur Identifizierung unbekannter Insertionsstellen des Transposons im *S. meliloti* Genom für die DNA-Sequenzierung zur Verfügung.**

Um die unbekannt Insertionsstellen des eGFP-Transposons im *S. meliloti* Genom und somit die Identität der erstellten Fusionsproteine mit interessanten Lokalisierungsmustern aufzuklären, fiel die Entscheidung zugunsten der Methode der inversen PCR. Hierbei wird die isolierte gesamte DNA, die einen Marker an einer unbekannt Stelle enthält komplett mit einem Restriktionsenzym verdaut und die kleineren Fragmente werden in sich rezirkularisiert. Nun können Primer, die an die Enden des inserierten Markers anliegen und auswärts gerichtet sind verwendet werden, um die unbekannt, flankierenden Bereiche als ein zusammengefügt Produkt zu amplifizieren. Nach der Sequenzierung des PCR Produktes können die flankierenden Bereiche in den meisten Fällen gegen

die annotierten Informationen der Genomdatenbanken verglichen werden.

Die Methode führte anfänglich zur Identifizierung von nur einem Fusionsprotein aus der Sammlung der erstellten Konstrukte. Anscheinend sind nicht genügend Transposon-beladene zirkuläre DNA-Moleküle als Matritze für die PCR in der Reaktion vorhanden (Tsaftaris et al. 2010). Alternative Methoden beruhen auf dem Anfügen sog. Linkersequenzen bekannter Zusammensetzung an die Enden der fragmentierten DNA und der PCR unter Benutzung dieser Linkersequenzen, sowie bekannter Primerbindungsstellen des integrierten Fragmentes. Diese Methoden erfordern allerdings einer schrittweisen Optimierung der Vorgehensweise und sind in der Ausführung oft sehr aufwendig.

Die von uns bevorzugte Methode stellt eine Kombination der auf Phi29-Polymerase-Aktivität basierenden Amplifizierung des DNA Materials und der nachfolgenden inversen PCR (Tsaftaris et al. 2010). Nach der Restriktion der gesamten *S. meliloti* DNA wurden großvolumige Ligationsansätze von je 500µl zur Rezirkulation der Fragmente zusammengestellt, die eine DNA-Konzentration von weniger als 1 ng pro µl besaßen. Bei höheren Konzentrationen werden anstatt Kreisschließungen der Fragmente eher Konkatemerbildungen bevorzugt (Shoaib 2008).

Während der Amplifikation der zirkulären DNA Fragmente können durch die Strang-Verdrängungsaktivität der Phi29 Polymerase Konkatemere von bis zu 70 kb Länge produziert und die Ligationsprodukte bis zu 10000-Mal amplifiziert werden. Dieser Schritt gewährleistet eine ausreichend hohe Konzentration der Transposon-haltigen Fragmente für die PCR. Lediglich die für die Elongation von der DNA-Polymerase benötigte Zeitspanne in der PCR Reaktion musste gegebenenfalls korrigiert werden. Das Restriktionsenzym *PvuI* wurde für den Verdau des *S. meliloti* Genoms ausgewählt, da es durchschnittlich kleine Fragmente von ca. 700 bp produziert. Da es sich um einen Durchschnittswert handelt, wurden der Taq Polymerase, die 1 Minute pro ein Kilobasenpaar benötigt, fünf Minuten Elongationszeit pro Zyklus gewährt, um möglichst viele längeren Produkte auch amplifizieren zu können. Die Länge der vervielfältigten PCR Produkte erreichte allerdings nicht diese Werte und betrug durchschnittlich nur 1kb bis 2,5 kb. Diese kombinierte Methode aus Phi29 Amplifizierung und inversen PCR führten zur erfolgreichen Identifizierung von allen anderen Fusionsproteinen und überzeugten als verlässlich und vergleichbar einfach in der Ausführung.

#### **VI-3.4 Die erzeugten Fusionskonstrukte decken ein weites Spektrum an verschiedenen Kodierungsorten im Genom von *S. meliloti*, sowie diverse Proteinfunktionen ab.**

Die zur Sequenzierung der Transposon-flankierenden Bereiche verwendeten Primer binden weit (bis 230bp) innerhalb der Transposon Sequenz, um eine gute Sequenzqualität in der interessanten

und wichtigen Region der Insertion des Transposons zu erhalten. Dadurch konnten die Überprüfung der Richtigkeit des Leserasters, sowie die Verfolgung der genauen Abfolge der Aminosäuren vor und nach dem Transposon erfolgen. In allen sechzehn Fällen ist das Transposon in das korrekte Leseraster gesprungen. Die Identifizierung der Proteine ergab ein weites Spektrum an Integrationsorten des Transposons im Genom von *S. meliloti*. Die Verteilung der Insertionsstellen des Transposons im gesamten Chromosom, sowie in Megaplasmiden pSymA und pSymB zeigt, dass das erstellte eGFP-Transposon tatsächlich an zufälligen Stellen und vermutlich ohne bestimmte Hotspots springt. Die meisten Insertionen finden sich Nahe am Carboxyterminalem Teil des Zielproteins (acht von sechzehn), (ABB. VI-1) aber nicht deutlich weniger Insertionen fanden statt im mittleren Teil der Proteine (sechs Stück). Zwei Proteine hatten das Transposon in der Nähe des Aminoterminus inseriert, allerdings schon 30-57 Aminosäuren von N-Terminus entfernt. Genauere statistische Analysen der Transpositionsverteilung konnten wegen der geringen Zahl identifizierter Insertionsorte noch nicht durchgeführt werden und müssen in der Zukunft durch einen größeren Experimentalansatz realisiert werden. Der gesamte Versuch wurde wiederholt durchgeführt und die fluoreszenten *S. meliloti* Klone für die spätere Identifizierung vereint. Das Protein 04094-eGFP ist in beiden Ansätzen identifiziert worden und der Insertionsort des Transposons war in beiden Fällen gleich. Das Problem lässt sich eventuell durch die starke Expression des konservierten Proteins mit unbekannter Funktion auf komplexen Festmedien erklären und dadurch die wiederholte Auswahl der stark fluoreszenten Kolonie bei beiden Versuchsansätzen.

Alle Fusionen an Proteine der vollständigen Länge, d.h. nach der Markerexzision durch Cre-Rekombinase, scheinen keine phänotypischen Änderungen hervorzurufen. Dagegen zeigen die

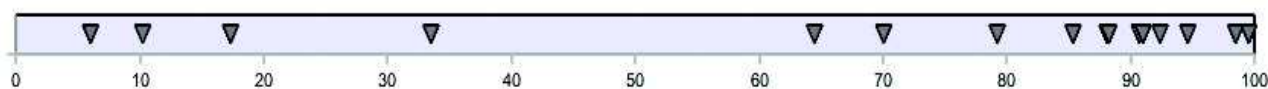


ABB. VI-1. Schematische Abbildung eines virtuellen Gens der Länge von 100%, in dem die sechzehn Insertionsorte des Transposons dargestellt sind. Sechs der sechzehn Insertionen befinden sich innerhalb der letzten 10% des virtuellen Gens, nahe des 3' Hydroxyterminus. Elf Insertionen sogar innerhalb der "hinteren" 30%. Der Grund für die statistische Tendenz der Transposoninsertionen, eher in der Nähe des 3'-Terminus vorzukommen, liegt in der Erzeugung von trunkierten Versionen der gegebenen Gene im ersten Schritt der Methode. Eine Transposoninsertion am 5'-Terminus eliminiert somit zuerst fast das gesamte kodierte Protein und ist nur in Fällen erfolgreich, wenn das Protein nicht essentiell ist, die Funktion durch ein anderes Protein ersatzweise ausgeführt werden kann oder unter den gegebenen Konditionen nicht notwendig ist.

Stämme, die trunkierte Versionen der Proteine produzieren eine Vielzahl an Veränderungen, wie langsames Wachstum (ATPF, RpoB), Fehllokalisierungen (Membranproteine: QxtB, ATPF), Änderungen der Fluoreszenzcharakteristika (langwelligere, orange Emission des CobN-eGFP-Konstruktes). In einem Fall führte das Springen des Transposons zur Herstellung eines Fehlproduktes aus der 16S rRNA Sequenzinformation, hier war die Sequenzierungsqualität aufgrund der repetitiven Elemente nicht ausreichend, um den Grund für diese Fehlproduktion und -lokalisierung definieren zu können.

Die Intaktheit der eGFP Fusionsproteine wurde mittels eines Western Blots mit einem Anti-GFP-Antikörper untersucht. Leider zeigt der besagte Antikörper einen unspezifischen Bindungscharakter und produziert in der Kontrollreaktion gegen den Wildtypstamm *S. meliloti* Rm1021 ebenfalls zwei Banden unbekannter Herkunft. Diese Banden sind auch in der Positivkontrolle, dem Stamm *S. meliloti* Rm2011 pHc60 (Cheng & Walker 1998) zu erkennen. Die kleinere, ca. 26 kDa Bande wird hier allerdings fast vollkommen von dem Signal des freien GFP überdeckt, das dieser Stamm konstitutiv exprimiert. Banden, die kleiner sind als die errechneten Größen der Fusionsproteine kommen bei dem unbekanntem Protein Smc04094, sowie ATPF-eGFP und RplS-eGFP vor und könnten auf Degradationsprodukte hinweisen. Es hat sich als schwierig erwiesen, sehr große Proteine oder Membranproteine im Western Blot unter den angewandten Bedingungen nachzuweisen. Die Ergebnisse des Western Blots der Proteine mussten im Endeffekt aus verschiedenen Durchführungen zusammen gestellt werden, da es sich als schwierig erwies, die Experimentalbedingungen so zu wählen, dass alle Fusionsproteine als Banden im Blot gleich stark zu sehen sind. Erhöhungen an Konzentrationen des Zellmaterials oder die der Antikörper resultierten in verstärkt auftretenden unspezifischen Banden. Gegebenenfalls muss hier auf andere Bedingungen (längere Laufzeiten) und Materialien (abweichende Puffersysteme und Akrylamidkonzentrationen) zurückgegriffen werden.

#### **VI-4. Subzelluläre Lokalisierungen von eGFP-Fusionsproteinen können mikroskopisch in lebenden *S. meliloti* Zellen dokumentiert und den verschiedenen Kategorien der Proteinlokalisierung in Prokaryoten zugeordnet werden.**

Die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Bakterien auf Agarosebeschichteten Objektträgern bietet die Möglichkeit die Zellen in der Fokusebene zu fixieren und damit die Dokumentation des Fluoreszenzsignals in Millisekunden, was das Ausbleichen des Fluorophors und Bestrahlungsabhängige Belastung der Zellen minimiert. Die Implementierung eines guten Objektivs (Zeiss 100x, NA 1.3) und einer sensitiven Kamera (Imager 3LS CCD) in das Mikroskopiesystem hat im Rahmen dieser Arbeit die Dokumentation von subzellulären Lokalisierungen von 16



Fusionsproteinen in lebenden *S. meliloti* Zellen, sowie neun dieser Konstrukten in den *ex planta* reisolierten, ausdifferenzierten Bakteroiden ermöglicht. Die beobachteten Lokalisierungen variieren stark zwischen den verschiedenen Konstrukten, einerseits spiegeln sie die in der Literatur vorgeschlagenen Kategorien der Proteinlokalisierung in den meist organellosen Bakterienzellen, andererseits lassen sich die sechzehn verschiedene Proteine nur schwer diesen Kategorien zuordnen und repräsentieren fast jedes für sich allein eine eigene Sparte. Ganz allgemein wurde hier der Versuch unternommen, diese verschiedenen Lokalisierungen in fünf Bereiche einzuteilen, die zytosolische, membranassoziierte, polare und in Fokusse konzentrierte, helikale sowie heterogene Proteinlokalisierung, die im Folgendem im Detail diskutiert werden.

Die erste mikroskopische Untersuchung galt der Analyse der Eigenfluoreszenz des Wildtypstamms *S. meliloti* Rm1021. Diese für lebende Zellen typische Fluoreszenz basiert auf der natürlichen Konzentration von Vitamin B2 (Riboflavin) (Murphy 2001). Die Wildtypzellen wurden den verwendeten Belichtungszeiten von 200 und 500 ms ausgesetzt, die im Bild festgehaltene Fluoreszenz reicht in beiden Fällen nicht über die Intensität des Hintergrundrauschens hinaus. Zur Kontrolle der intrazellulären Verteilung von freien, ungebundenen GFP Proteinmolekülen wurde der Stamm *S. meliloti* Rm2011 pHc60 verwendet, der das fluoreszente Protein konstitutiv von Plasmid exprimiert. Hier variiert die Intensität des fluoreszenten Signals zwischen den einzelnen *S. meliloti* Zellen, was auf den Einfluss von intrinsischen / extrinsischen Rauschen zurück verfolgt werden kann (Davidson & Surette 2008) und bei Expression Plasmidkodierter Proteine bekannt ist. Die intrazelluläre Verteilung des freien GFP Proteins ist allerdings immer gleichmäßig im gesamten Zytoplasma, wie ebenfalls in der Literatur berichtet wird (Ma et al. 1996). Diese Beobachtungen werden durch die ImageJ Analyse der Intensitätsverteilung über die Länge der Zellen bestätigt und decken sich mit den Ergebnissen aus den dekonvolvierten Abbildungen. Seit ihrer Einführung Mitte der achtziger Jahre und ermöglicht durch die Entwicklung der Rechenleistung der damaligen Zeit etablierte sich die Dekonvolution als die Methode der Wahl, um das Signal-Rausch Verhältnis von Aufnahmen aus der Fluoreszenzmikroskopie zu verbessern (Agard 1984; Carrington et al. 1985; Agard et al. 1989). Dabei wird mit Hilfe einer Bandbreite von diversen Algorithmen (Sibarita 2005), das bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie während der weitflächigen Anregung der Probe aus benachbarten, angeregten fokalen Ebenen emittierende und störende Streulicht, das sog. "out-of-focus light" rechnerisch eliminiert und dadurch die räumliche Auflösung der Aufnahme verbessert. Die Anwendung der Dekonvolution setzt die Kenntnis über die "point spread function" (PSF) des Mikroskopiesystems voraus, die von den optischen Eigenschaften des Systems, sowie der verwendeten Emissionswellenlänge abhängt und beschreibt, wie eine einzelne punktförmige Lichtquelle durch die gegebene Optik abgebildet wird. Die Ermittlung der PSF kann rechnerisch

über die bekannten Eigenschaften des Mikroskops erfolgen, oder sie wird mithilfe von fluoreszenten, kugelförmigen Referenzkörpern passender Größe experimentell ermittelt. Die PSF des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zeiss Axiovert Mikroskops wurde anhand der Parameter des Experiments durch die Dekonvolutionssoftware Huygens rechnerisch ermittelt, da zum Zeitpunkt der Messungen keine Referenzkörper annähernd passender Größe (für das verwendete Ölimmersionsobjektiv der NA von 1.3 und 520 nm Emissionswellenlänge von eGFP würde das richtige Durchmesser der Referenzkörper bei 100nm liegen, wie z.B. bei TetraSpeck Fluorescent Microspheres, Molecular Probes) zu Verfügung standen. Die Messung mithilfe von Quantum Dots war nicht erfolgreich, da die in Suspension vorliegenden Nanokörper nach mehrmaligen Entnahme aus dem Behälter und Kontakt mit Sauerstoff zur Klumpung neigen und dadurch die Messung einer einzelnen Punktlichtquelle nicht möglich war. Weitere vorhandene Kugelkörper (5µm) waren zu groß, um als Punktquellen zu gelten und konnten von der Huygens Dekonvolutionssoftware nicht erfasst werden. Die Vorteile der experimentell ermittelten PSF liegen in die Ermittlung von kleinen sphärischen Abberationen des Objektivs etc. die durch die theoretisch errechnete PSF nicht berücksichtigt werden können. Die Auflösung einer Aufnahme unter Verwendung einer experimentell ermittelten PSF kann dadurch verbessert werden, allerdings liefert auch die kalkulierte PSF qualitativ hochwertig dekonvoluierte Aufnahmen. Die Dekonvolution der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Mikroskopiebilder wurde angewandt, um die Bildfehler, wie Rauschen und Unschärfen zu korrigieren. Die vergleichbar identische Intensitätsverteilung von intrazellulären GFP in den originalen und dekonvoluierten Mikrographien war ebenfalls ein Beweis für die korrekte Wiedergaben der Ergebnisse der übrigen Stämme in der Dekonvolution.

#### **VI-5. Die Aktivitäten der Fusionsproteine können während der Symbiose mit *Medicago sativa* in planta dokumentiert werden.**

Alle im Rahmen dieser Studie erstellten eGFP-Fusionskonstrukte sind auf ihre Fähigkeit hin getestet worden, funktionelle Symbiosen mit der Leguminosenpflanze *Medicago sativa* etablieren zu können. Alle untersuchten Stämme haben Stickstoff fixierende Knöllchen mit einer deutlichen rötlichen Färbung gebildet, die auf die Produktion des Leghämoglobins hinweist und damit auf eine funktionsfähige Symbiose (Wittenberg et al. 1975). Lediglich der als Positivkontrolle dienender Stamm *S. meliloti* Rm2011 pHc60, der das unfusionierte GFP produziert, hat die Symbiosefähigkeit verloren, eventuell durch den Verlust eines Megaplasmids und damit der für Symbiose essentiellen Genprodukte. Da diese Beobachtung von weiteren Forscherkollegen ebenso gemacht wurde und wir den Stamm aus einer gemeinsamen Glycerinkultur erhalten haben, muss in der Zukunft ein gesunder Stamm wieder in die Stammsammlung aufgenommen werden.

Die gebildeten Knöllchen konnten bereits im frühen Stadium von zwei Wochen unter einem Binokular auf mögliche Ausbildung von Fluoreszenz hin untersucht werden. Nach vier Wochen Entwicklungszeit wurden Wurzelknöllchenschnitte mittels Konfokaler Laserscanningmikroskopie dokumentiert. Dabei wurden die Meßparameter basierend auf den Aufnahmen der mit *S. meliloti* Wildtyp besiedelten Knöllchen dahingehend gewählt, dass keinerlei Autofluoreszenz mehr sichtbar wird. Mit diesen Einstellungen wurden alle weiteren Symbiosen mit den erstellten *S. meliloti* Stämmen dokumentiert. Dabei konnten deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, die auf differierende Expressionslevel und somit auch Konzentrationen an eGFP in den Bakteroiden zurückgeführt werden können. Interessanterweise konnte die Expression von eGFP in allen Stadien der Stickstoff-fixierenden Symbiose beobachtet werden, obwohl in Knöllchen die Sauerstoffkonzentration durch Bindung an Leghämoglobin stark reguliert wird, um die Funktionalität des sehr sauerstoffempfindlichen Nitrogenase-Enzyms zu gewährleisten. Gleichzeitig benötigt das GFP richtige pH-Konditionen und Sauerstoff zur korrekten Faltung und Funktion (Heim et al. 1994; Tsien 1998). Bereits frühere Studien jedoch haben von erfolgreichen GFP Expression im Knöllchen als Methode zum Studium von Symbiose und derer Etablierung durch Rhizobien berichtet (Gage et al. 1996, Stuurman et al. 2000). Diverse im Rahmen dieser Arbeit erstellten Fusionsproteine wurden mehr oder weniger stark in den Bakteroiden der verschiedenen Zonen eines durch *M. sativa* ausgebildeten Knöllchens exprimiert. Nur im Fall von zwei Proteinen, Kobaltochelatase CobN und D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase SerA konnte überhaupt keine GFP-Aktivität der Bakterioide in Knöllchenschnitten festgestellt werden. Proteomanalysen haben ergeben, dass die Kobalaminsynthese im Knöllchen runterreguliert wird (Natera et al. 2000). Nach einer Infektion mit dem IolA-eGFP Stamm (Malonat Semialdehyd-Dehydrogenase Fusionsprotein) konnte eGFP Fluoreszenz in der Infektionszone II, aber nicht in der Stickstofffixierungszone III dokumentiert werden. Zu dieser Beobachtung konnten leider keine vergleichbare Studien gefunden werden. Darüber hinaus würden experimentelle Ansätze der Systembiologie, globale Untersuchungen des Proteoms oder Transkriptoms des Knöllchens keinen räumlichen Unterschied zwischen den einzelnen Knöllchenzonen berücksichtigen, sondern das Knöllchen als ein Ganzes analysieren. Daten aus Transkriptomstudien können nicht direkt mit den mikroskopischen Beobachtung der Fusionsproteinkonzentration verglichen werden, da Änderungen der mRNA - Level nicht zwangsweise mit Änderungen auf dem Proteinlevel korrelieren (Humphery-Smith et al. 1997). Die Analyse des Knöllchenproteoms versus des der frei lebenden Bakterien ergab eine Induktion bzw. Aufregulierung von 250 Proteinen während des Bakteroidstadiums in *Medicago alba* und gleichzeitig eine Runterregulierung von 350 Proteinen (Natera et al. 2000). Diese Studie zur Proteomanalyse kann mit einigen der Ergebnissen der

vorliegenden Arbeit verglichen werden, da auch hier die Konzentrationen an Proteinen dokumentiert werden, wenngleich hier anhand der eGFP Fluoreszenzintensität und nicht der Spotintensität im 2D-Gel. Darüber hinaus besitzen die Modellpflanzen *Medicago alba* und die Leguminose *M. sativa* vergleichbare Charakteristika, sowie Muster der Genexpression (Kneen et al. 1988).

#### **VI-6. *S. meliloti* Fusionsproteine weisen auch in ausdifferenzierten Bakteroiden in symbiotischen Wurzelknöllchen distinkte subzelluläre Lokalisierungen auf.**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus einigen Wurzelknöllchen, die durch fluoreszente, eGFP-Fusionsproteine exprimierende *S. meliloti* Stämme induziert wurden, die ausdifferenzierten Bakterioide reisoliert und direkt im Anschluss mikroskopisch ausgewertet. Die als Kontrolle abgebildeten *S. meliloti* Wildtyp-Bakterioide zeigen eine schwache Autofluoreszenz, die allerdings kaum über dem Hintergrundrauschen liegt. Die schwache Autofluoreszenz konnte bereits auch bei frei lebenden Zellen beobachtet werden, die ausdifferenzierten Bakterioide haben zusätzlich ein drei- bis siebenfach höheres Volumen und einen bis siebenfach höheren Proteingehalt (Tremblay et al. 1984; Schlaman 1991), was das vergleichbar erhöhte Fluoreszenzsignal erklärt. Die diversen eGFP-Fusionsproteine zeigen sehr variable Lokalisierungsmuster in den isolierten Bakteroiden. Basierend auf Ergebnissen von Elektronenmikroskopie wurden von Vasse et al. die verschiedenen Stadien der Ausdifferenzierung von Bakteroiden in den nicht-determinierten Knöllchen aus *M. sativa* klassifiziert (Vasse et al. 1990). Die Funktionalisierung und somit auch die phänotypische Differenzierung findet beginnend in der Infektionszone II statt, wo die Bakterien über die Infektionsschläuche die Pflanzenzellen besiedeln und eine wirtseigene sog. Peribakteroidmembran erhalten, die sie von Pflanzenzytoplasma räumlich trennt. In diesem Stadium finden einige Runden von DNA-Replikation statt, eine Zellteilung findet allerdings nicht mehr statt, was zu einer Erhöhung des DNA-Gehalts führt. In Elektronenmikrographischen Aufnahmen ist das Nukleoid in diesem Stadium nicht mehr sichtbar. Über die Interzone II-III bis zur Stickstofffixierungszone III findet die finale Differenzierung der Bakterioide statt, die mit starker Größenzunahme und einer charakteristischen Heterogenität des Zytoplasmas mit elektronendichten und elektronentransparenten Zellarealen einhergeht. Obwohl Untersuchungen zur Expression bestimmter Proteine über die Zeit und Knöllchenwachstum existieren, konnten keine Hinweise auf die Zusammensetzung der heterogenen Areale des Zytoplasmas gefunden werden. Beobachtet man nun die Lokalisierung der Fusionsproteine in einer Vielzahl aus dem gesamten Knöllchen isolierter Bakterioide, so sind die Heterogenitäten zwischen den Bakteroiden einer Gruppe selten und eher bei zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen zu sehen, somit nicht auf das Entwicklungsstadium des

jeweiligen Bakteroids zurückzuführen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen jedoch sind sehr groß und die Lokalisierungsmuster charakteristisch und reproduzierbar.

**VI-7. Die erstellten eGFP-Fusionsproteine verschiedener Funktionen liefern einen Einblick in das vielfältige Spektrum der bakteriellen Proteinlokalisierungen unter Kultivierungsbedingungen und in ausdifferenzierten Bakteroiden *in* und *ex planta*.**

Folgend werden die Ergebnisse der mikroskopischen Aufnahmen der erstellten *S. meliloti* Stämme im einzelnen diskutiert, beginnend mit der subzellulären Lokalisierung der fluoreszenzmarkierten Proteine in freien, im Flüssigmedium kultivierten Bakterien, bis zur Aktivität in den symbiotischen Wurzelknöllchen, sowie falls dokumentiert der Lokalisierung im reisolierten Bakteroid.

**VI-7.1. Zytosolisch homogen verteilten Fusionsproteine unterscheiden sich in den Lokalisationscharakteristika voneinander, sowie auch vom subzellulären Lokalisierungsmuster des ungebundenen GFP.**

Von den sechzehn identifizierten und lokalisierten Proteinen zeigten drei Konstrukte eine homogene Verteilung im Zytoplasma von *S. meliloti*, wobei sie ganz andere eigene Charakteristika besitzen. So ist das Fusionsprotein CobN-eGFP, die Kobaltochelatase uniform im Zytoplasma verteilt, allerdings variiert die Konzentration des Proteins und damit die Fluoreszenzintensität sehr stark zwischen den einzelnen Zellen aus einer Kultur, angefangen bei einem recht deutlichen Signal bis fast nicht vorhandener Fluoreszenz nah am Hintergrundrauschen. Das Protein CobN ist für den Schritt des Einbaus von Kobalt-Ionen in die Vorstruktur Hydrogenobyrinat-a,c-diamid verantwortlich (ABB.VI-2). Die Kobalaminsynthese gehört zu den komplexesten natürlichen Synthesewegen mit dreißig involvierten Enzymen und wird als einziges Vitamin ausschließlich von Mikroorganismen produziert. Vitamin B12 dient als Kofaktor bei vielen Umlagerungs-, Methylierungs- und Reduktionsprozessen (Raux & Schubert 2000). Die detaillierte Rolle von Kobalamin in Bakterien ist noch nicht vollständig entschlüsselt, allerdings sind in diversen Arten von Prokaryoten, die selbst Vitamin B12 herstellen oder importieren müssen, eine Vielzahl von B12-regulierten Genen gefunden worden, darunter die B12- und Kobalamin Transporter, Methioninsynthasen, Ribonukleotidreduktasen (Rodionov et al. 2003). In *S. meliloti* wurden drei Kobalaminabhängige Enzyme gefunden, die Methioninsynthase MetH, Methylmalonyl CoA Mutase BhbA und Klasse II Ribonukleotidreduktase RNR (Rodionov et al. 2003; Taga & Walker 2010).

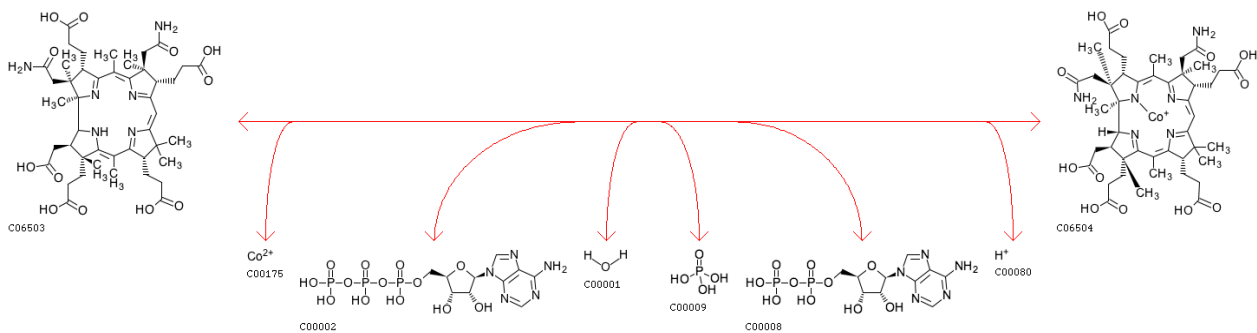


ABB. VI-2. Die von Kobaltochelatase CobN vermittelte Reaktion. Das Enzymsubstrat Hydrogenobyrinat-a,c-diamid ist links zu sehen. Eventuell bewirkt die Akkumulation des Intermediats in den Bakterien, die nur eine trunkierte Version des Enzyms produzieren eine orange Fluoreszenz, gegebenenfalls in Verbindung mit dem fusionierten eGFP Protein.

Die Existenz weiterer Enzymklassen wird nicht ausgeschlossen. Anscheinend sind entweder diese Vorgänge oder die Synthese des Kobalamins starken zeitlichen Fluktuationen untergeordnet, die die heterogenen Intensitäten und Konzentrationen des Proteins in den verschiedenen Zellen erklären würden.

Die beobachtete zum langwelligen Bereich verschobene Fluoreszenzemission der trunkierten CobN-eGFP Fusionskonstrukte könnte durch die Akkumulation von intermediären Metaboliten, z.B. des Vorläufermoleküls Hydrogenobyrinat-a,c-diamid, einer Struktur mit einer Vielzahl an delokalisierten Pi-Elektronen, in Kombination mit der Struktur von eGFP, das mit dem trunkiertem CobN fusioniert ist, verursacht werden. In symbiotischen Wurzelknöllchen scheint das Protein nicht mehr in hohen Konzentrationen produziert zu werden, da keine sichtbare Fluoreszenz der Knöllchen dokumentiert werden konnte. Diese Beobachtung wird bestätigt durch Proteomuntersuchungen der während Symbiose abweichend exprimierter Proteine in Bakteroiden vs. kultivierten Bakterien, die eine Herunterregulierung der Kobalaminsynthese im Knöllchen ergaben (Natera et al. 2000).

Eine uniforme Verteilung der eGFP Fluoreszenz in den Zellen von *S. meliloti* konnte auch für das Fusionskonstrukt SMc01160-eGFP beobachtet werden. Das Protein wurde nach einer genauen Sequenzanalyse als ein transkriptioneller Regulator der Thioedoxinreduktasen identifiziert. Es ist interessant, dass ein Regulator in sichtbar fluoreszenten, hohen Konzentrationen zu finden ist. Eine vergleichbare Studie zur Lokalisierung von Transkriptionsfaktoren wurde in *Bacillus subtilis* durchgeführt (Lewis 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Elongationsfaktoren der Nus Familie, die an der rRNA Synthese beteiligt sind, in der Nähe des Nukleolids vorliegen. Gleichzeitig

lokalisiert der Transkriptionsfaktor GreA, der vorwiegend zur Bildung von mRNA Elongationskomplexen rekrutiert wird, uniform im Zytoplasma. Eine uniforme Verteilung eines transkriptionellen Regulators um das Nukleoid und frei diffundierend im Zytoplasma erscheint plausibel und konform auch mit *in silico* Vorhersagen (PSORTb) zu subzellulären Lokalisierung. Thiothioninreduktasen sind in den Prokaryoten an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt und mitunter stellt eine erhöhte Produktion auch eine Antwort der Zellen auf möglichen oxidativen Stress dar (Zeller & Klug 2006). Dieser Stressfaktor kann natürlich auch während einer Kultivierung in 10 ml Maßstab in Reagenzgläsern erzeugt werden. Leider ist unbekannt, um welchen transkriptionellen Regulator es sich handelt, z.B. einen alternativen Sigmafaktor etc. In der Zukunft wäre es sicherlich interessant, Veränderungen der Lokalisierung durch gezielte Induzierung einer Stressantwort durch z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe zu beobachten. Ein weiterer in dieser Studie identifizierter und lokalisierter Transkriptionsregulator SMA5007 kann in der exponentiellen Phase nicht detektiert werden, wird aber in der stationären Phase auf Komplexagarmedium deutlicher, mit einer fleckigen subzellulären Verteilung. Das Protein ist leider nicht näher klassifiziert und Suche nach Homologien in BLAST2 ergab nur Verweise auf Ähnlichkeiten zu Lambda-Phagen-Repressoren. So können leider keine weiteren Aussagen zur Stimmigkeit der Beobachtung gemacht werden. Beide Fusionskonstrukte werden auch während der Stickstoff-fixierenden Symbiose in Wurzelknöllchen gebildet, dabei wird das Protein SMC01160 in höheren Konzentrationen produziert als SMA5007.

Im Gegensatz zur gleichmässigen zytosolischen Verteilung des freien GFP Proteins in der Bakterienzelle zeigen andere im Zytoplasma vorliegenden eGFP Fusionsproteine, die ribosomalen Proteine L9 und L19, sowie D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase SerA deutlich lokalisierte Signale. Da bestimmte zytoplasmatischen Bereiche eine höhere Konzentration an besagten Protein aufweisen als andere, diese aber nicht in einem distinkten Punkt fokussiert wird, ist die Lokalisierung zytosolisch inhomogen, also "fleckig". Diese Beschreibung taucht mehrfach in der Literatur auf und wird in englischsprachigen Texten meist als "patchy" beschrieben (Werner et al. 2010). Dieses Lokalisierungsmuster deutet darauf hin, dass die Proteine nicht frei im Zytoplasma der Zellen diffundieren, sondern für ihre Aufgabenerfüllung lokal von anderen Proteinkomplexen oder durch andere Mechanismen rekrutiert werden. Während das ungebundene GFP-Protein, das nicht endogen für *S. meliloti* ist, keine diffusionsstörenden Interaktionen mit anderen Proteinen oder Zellkompartimenten erfährt und sich ebenmäßig im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt, bewegen sich die eGFP-Fusionsproteine langsamer und gezielter. Die Diffusionskoeffizienten hängen dabei nicht nur von der Größe des Konstruktes, sondern auch von der Interaktionsfrequenz ab (Nenninger et al. 2010). Diese Beobachtung stimmt mit der mittlerweile durch zahlreiche

wissenschaftlichen Studien bestätigten Vorstellung von gezielt zeitlich und räumlich gesteuerten Organisation der Proteine in einer kompartmentarmen Umgebung einer prokaryotischen Zelle (Thanbichler & Shapiro 2008; Rudner & Losick 2010; Vendeville et al. 2011) überein. Im Fall der endogenen Proteine wird ein bestimmter Anteil des Proteins frei durch das Zytoplasma diffundieren, während ein höherer Anteil bereits durch Interaktionspartner in der zugehörigen "molekularen Maschine" gefangen wurde. Diese molekularen Fabriken können an distinkten Stellen im Zytoplasma oder in der Zellhülle verankert sein, in scharf abgezeichneten Fokussen oder als "Flecken" in kondensierten Bereichen.

Die putative D-3-Phosphoglycerat-dehydrogenase katalysiert den ersten Schritt der Biosynthese von Serin und ist auch in den Metabolismus von Glycin und Threonin involviert (<http://www.genome.jp/kegg/>). Es konnte ferner gezeigt werden, dass der Carboxyterminus des Proteins nicht für die Aktivität benötigt wird, jedoch die Sensitivität für Inhibition durch L-Serin verloren geht (Peters-Wendisch et al. 2002). Die fehlende Notwendigkeit des C-Terminus für die Aktivität des Proteins erklärt und bestätigt in diesem Fall auch die Überlebensfähigkeit des die trunke Form des Fusionsproteins produzierenden Stammes vor der Exzision des Stopp-Kodons in dieser Arbeit. In der Studie von Russell und Keiler (Russell & Keiler 2008) wird auf die polare oder zytosolische, punktförmige Lokalisierung eines C-terminal trunkeierten GFP-Fusionsproteins hingewiesen. In der hier vorliegenden Studie wurde die Beobachtung gemacht, dass in Minimalmedium exponentiell wachsende Zellen, die ein intern mit eGFP markiertes SerA, mit dem vollständigen C-Terminus exprimieren, eine recht homogene zytoplasmatische Verteilung des Proteins vorzeigen. In stationär wachsenden Zellen auf komplexen Festagarmedien konnte jedoch eine heterogene Verteilung beobachtet werden, wobei ein Teil der Zellen die zytoplasmatische Lokalisierung behalten hat, ein Teil der Zellen allerdings über eher punktuelle, variierende Konzentrierung aufweist.

Das Protein zeigt keine sichtbare Fluoreszenz im Knöllchen. Die Bakterioide allerdings weisen eine schwache Fluoreszenz auf, die etwas höher ist als die Autofluoreszenz des Wildtypstammes. Eine frühere Studie von Auxotrophen Mutanten von *S. meliloti* hinsichtlich ihrer Symbiosefähigkeit haben gezeigt, dass Mutanten in der Serinbiosynthese imstande sind, Stickstoff-fixierende Knöllchen zu bilden, während sie im Kultivierungsmedium auf Serin- oder Glycinzugabe angewiesen sind (Kerppole & Kahn 1987). Das deutet darauf hin, dass die Bakterioide während der Symbiose von dem pflanzlichen Wirt mit einigen Aminosäuren, u.a. auch Serin, versorgt werden. Im Gegenzug werden wahrscheinlich die endogenen Synthesemechanismen abgeschaltet um den Stoffwechsel in Richtung von Steigerung der Stickstofffixierungsaktivität zu verschieben.



### **VI-7.2. Die Insertionen des Transposons in Gensequenzen, die für ribosomale Proteine, RNA Polymerase und RNase E kodieren, erlaubt Beobachtungen von transkriptionellen und translationellen Vorgängen in *S. meliloti* Zellen.**

Die beobachtete heterogene Verteilung der RNA Polymerase mit einigen Zellen die wenige, sehr helle punktförmige Konzentrierungen des Fusionsproteins tragen und anderen Zellen, die eine fast homogene zytoplasmatische Lokalisierung des Konstruktes aufweisen, innerhalb einer *S. meliloti* Kultur, kann mit Hilfestellung aktueller Forschungsergebnisse erklärt werden. Die RNA Polymerase ist ein Komplexprotein bestehend aus mehreren Einheiten ( $\alpha 2\beta\beta'\omega$ ). Zusammen mit dem entsprechend benötigten Sigmafaktor entsteht das sog. Holoenzym. Die Untereinheit  $\alpha$  bildet ein Rückgrat, um die zwei katalytischen Untereinheiten  $\beta$  und  $\beta'$  zusammen zu halten. Die  $\omega$  Untereinheit hat eine noch nicht ganz bestätigte Funktion, es wird angenommen, dass diese die Transkription in Abhängigkeit von Nährstoffangebot kontrolliert und für die Stabilisierung der Struktur der RNA Polymerase verantwortlich ist (Mukherjee et al. 1999; Chatterji et al. 2007). Die Insertion des Transposons fand auch hier im C-proximalen Bereich der  $\beta$ -Untereinheit statt, nach der Aminosäure 1359, 21 Aminosäuren vor dem C-Terminus. Diese katalytisch aktive  $\beta$ -Untereinheit besitzt neun konservierte Regionen, deren Mutationen zu schweren Defekten in der Funktion der RNA Polymerase führen (Opalka et al. 2000). Der vom Transposon getroffene Bereich zählt nicht zu den essentiellen Proteinabschnitten, deren Mutationen oft wenige oder gar keine evidenten Effekte auf die Funktion der RNA Polymerase haben. Der benachbarte essentielle Bereich um die Aminosäure 1237 partizipiert z.B. in der Formation der Initiierungsstelle des Enzyms. In Abhängigkeit von der Wachstumsrate der Kultur befinden sich etwa 1500-11000 Moleküle der RNA Polymerase in *E. coli* (Shepherd et al. 1980; Bremer & Dennis 1996). Davon sind rund 93% mit dem Nukleoid assoziiert und die restlichen 7% diffundieren frei durch das Zytoplasma mit einer Diffusionskonstante von  $0.22 \pm 0.16 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  (Bratton et al. 2011). Viele nukleidgebundene RNA Polymerasen sind inaktiv (Shepherd et al. 2001); in Abhängigkeit vom Wachstum sind nur 16-29% der Enzymmoleküle aktiv in der Transkription. Etwa 54-75% binden nicht-spezifisch die DNA (Klumpp & Hwa 2008) während die Transkription pausiert oder warten an starken Promotoren (Bremer et al. 2003, Herring et al. 2005). Die mobile Fraktion, die mit der DNA assoziiert ist, bewegt sich entweder über eindimensionales gleiten am DNA Strang entlang oder durch dreidimensionales Springen zwischen verschiedenen DNA Strängen. Im reichhaltigen, definierten Nährmedium wurden bei den schnell wachsenden *E. coli* Zellen vergleichbare Heterogenitäten in der Verteilung der RNA Polymerase zwischen den Zellen einer Kultur beobachtet (Bratton et al. 2011), wie diese im Rahmen dieser Studie an exponentiell wachsenden *S. meliloti* Zellen im Minimalmedium dokumentiert werden konnten. In langsam wachsenden *E. coli*

Zellen verteilt sich die RNA Polymerase homogen um das Nukleoid (Vendeville et al. 2011). Die konzentrierten punktförmigen Lokalisierungsfoci der RNA Polymerase entsprechen höchstwahrscheinlich in ihrer Funktion den eukaryotischen Nukleoli, die für die Transkription der rRNA verantwortlich sind. Natürlich besitzen die prokaryotischen Zellen keine subnukleotidischen Organellen, jedoch während rapider Wachstumsphasen lokalisiert die RNA Polymerase in diskreten subnukleotidischen Regionen mit höherer Dichte, die als Transkriptionsfoci bezeichnet werden (Lewis et al. 2000). Diese konzentrierten Bereiche lösen sich bei der Induzierung einer stringenten Antwort, die Abwendung der Zelle von Prozessen der Teilung zugunsten der Synthese von essentiellen Stoffwechselelementen, wie Aminosäuren auf (Cabrera & Jin 2006). Diese während der exponentiellen Wachstumsphase auftretenden Transkriptionsfoci repräsentieren die RNA Polymerase, die Synthese von rRNA Genen, sowie mRNA von stark transkribierten Genen vorantreibt. So befinden sich zahlreiche rRNA kodierenden Bereiche nah am *oriC* des Chromosoms in *E. coli*, wodurch gewährleistet wird, dass bedingt durch den schnellen Replikationszyklus der DNA und durch die Bildung von Replikationsgabeln mehr Transkriptionsmatrizen für essentielle Bausteine zum Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums in der Zelle vorliegen. Diese Funktionen führen zur Bildung von Lokalisierungsstellen der RNA Polymerase in dichten Punkten am Nukleoid. Vereinzelt kodierende Stellen für weitere rRNAs liegen verstreut im Chromosom, so dass die Vermutung nahe liegt, dass auch eine dreidimensionale Faltung des Chromosoms vorliegt, um auf diesem Weg eine räumliche Nähe der wichtigen kodierenden Bereiche und einen schnellen Einsatz der RNA Polymerase zu gewährleisten. Die Expression der RNA Polymerase im Knöllchen ist sehr deutlich am starken Fluoreszenzsignal erkennbar. Die Fluoreszenz im Bakteroid liegt an der Membran und im Zytoplasma, wobei bestimmte subzelluläre Bereiche fluoreszenzfrei verbleiben. Die fluoreszente eGFP Markierung der 50S ribosomalen Proteinen L9 und L19 in *S. meliloti* ergab ein "fleckiges" Abbild der Ribosomenverteilung in den Zellen, in dem zwar fast das gesamte Zytoplasma mit den Fusionsproteinen gefüllt ist, aber manche Bereiche eine dichtere Konzentration aufweisen, als andere. Eine Besonderheit der Lokalisierung von ribosomalen Proteinen ist darüber hinaus in *S. meliloti* das Auftreten von kleinen, selten zu beobachtenden (ca. 1-2 pro Zelle) gänzlich nicht fluoreszenten punktförmigen Bereichen. Vergleichende Beobachtungen wurden aus anderen Prokaryoten nicht gemeldet. Es handelt sich dabei eventuell um das eingelagerte Polyhydroxybutyrat, eine alternative Energiequelle der Rhizobien, die in anderen Modellorganismen unüblich ist und in *Sinorhizobium* häufig und in kugelförmigen Ablagerungen gespeichert wird (ABB. VI-3). Diese Vermutung kann in zukünftigen Experimenten durch eine Färbung mit dem Lipidfarbstoff Nilrot nachgewiesen werden.

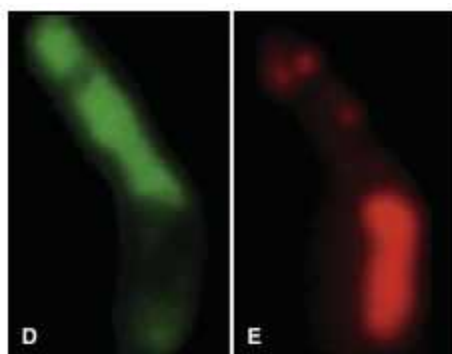


ABB. VI-3. Aufnahme aus der Veröffentlichung von Ratcliff & Denison (Ratcliff & Denison 2010). Links ein GFP-produzierende *S. meliloti* Zelle. Das GFP verteilt sich homogen im Zytoplasma, läßt aber bestimmte Bereiche aus, die dann in der Fluoreszenzaufnahme schwarz erscheinen. Es handelt sich dabei um Polyhydroxybutyrat (PHB), das mit dem Lipidfarbstoff Nilrot (rechts) angefärbt werden kann. Die Färbung zeigt eindeutig, dass genau die vorher schwarzen Bereiche nun auf die hohe Konzentration von PHB aufweisen.

Die fleckige Verteilung der Ribosomen in den Zellen spiegelt die komplexen und oft nicht gänzlich aufgeklärten Vorgänge auf der Ebene der Translation wider. Diese Beobachtungen werden durch aktuelle wissenschaftliche Veröffentlichungen basierend auf Studien in anderen Bakterien bestätigt. Ribosomen stellen die Gruppe der zahlreichsten intrazellären Strukturen in einer Zelle (Vendeville et al. 2011) dar. Rund 20% aller Ribosomen, bestehend aus unreifen Vorstufen und ungebundenen Ribosomen befinden sich frei im Zytoplasma, die restlichen 80% sind als 70S Ribosomen aktiv mit der mRNA verbunden und bilden Polysomstrukturen aus. Häufig wird in aktuellen Studien die räumliche Kompartimentierung der Proteinsynthese diskutiert. Unter 40% aller Ribosomen interagieren mit der inneren Zytoplasmamembran (Cancedda & Schlesinger 1974) und Synthese der Zellhüllproteine soll vorzugsweise an der inneren Zytoplasmamembran stattfinden (Luirink et al. 2005; Luirink et al. 2011). Da in *E. coli* ca 1200, d.h. 30% aller Proteine mit der Zellhülle assoziiert sind, scheinen diese Ergebnisse untereinander stimmig. Die Mehrheit der Ribosomen ist in der aktiven Translation involviert und nicht imstande, frei durch das Zytoplasma zu diffundieren, woran sie durch ihre verhältnismäßig großräumige Struktur im Vergleich zu dem in der Zelle limitierten Bewegungsraum für Moleküle noch beschränkt werden ("molecular crowding").

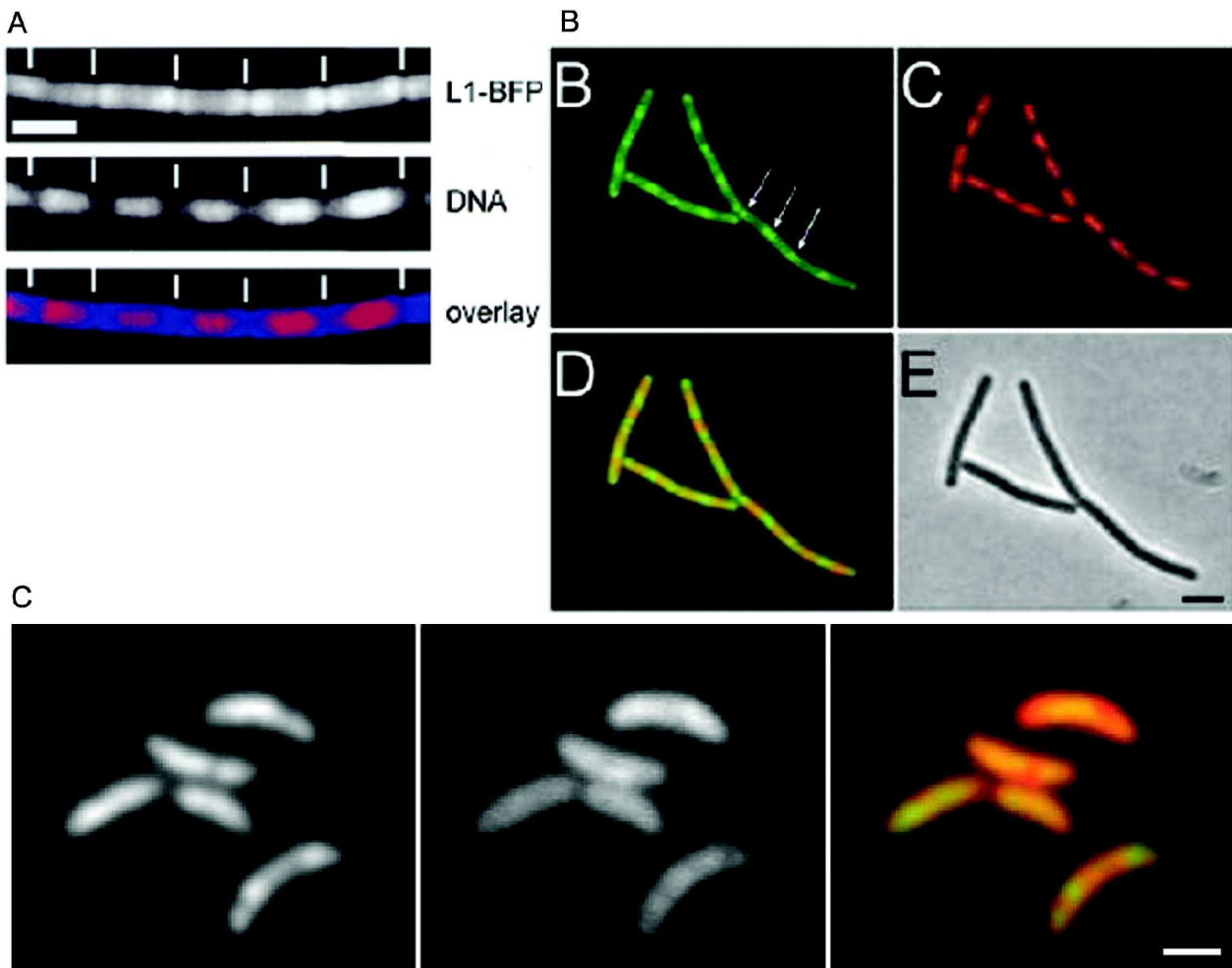


ABB. VI-4. Beispiele für die räumliche Organisation der transkriptionellen und translationellen Vorgänge in prokaryotischen Zellen. (A) Das ribosomale Protein L1 fusioniert mit BFP lokalisiert in *B. subtilis* außerhalb des Nukleoids, nah an den Polen der Zellen. Oben das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins, darunter die DNA, gefärbt mit SYTO59, sowie ein Overlay, das die räumliche Trennung dokumentiert (Mascarenas et al. 2001). (B) In *B. subtilis* liegen die Ribosomen räumlich getrennt vom Nukleoid vor. Im Fenster B dargestellt ist das Signal der RpsB-GFP Fusion, im Unterfenster D die Nukleoide nach einer DAPI Färbung. Im Fenster D ist ein Overlay zu sehen, das die Trennung der beiden Signal deutlich macht. Im Fenster E ist das Phasenkontrastbild zu sehen (Lewis et al. 2000). (C) Die Ribosomen in *C. crescentus* kolokalisieren mit dem Nukleoid. Von links nach rechts: Zellen, die das ribosomale Protein L1 fusioniert mit GFP produzieren; die DNA des Bakteriums dargestellt mittels DAPI-Färbung; ein Overlay beider Aufnahmen. Die Diffusion der Ribosomen wird durch die eingeschränkte Mobilität der assoziierten mRNA limitiert (hier nicht gezeigt), (Montero Llopis et al. 2010).

Die Mehrheit der mRNA in *E. coli* und *C. crescentus* verbleibt sogar in der Nähe ihrer chromosomalen Transkriptionsstelle und diffundiert keine langen Wege durch das Zytoplasma, was auf eine komplexe räumliche Organisation des Chromosoms und des genetischen

Informationsflusses hinweist (Montero Llopis et al. 2010). Die lokalisierte Verteilung von ribosomalen Proteinen wurde für das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* mehrfach gezeigt (ABB.VI-4 A und B) (Lewis et al. 2000, Mascarenas et al. 2001). Anscheinend separieren sich die Ribosomen vom Nukleoid während der exponentiellen Wachstumsphase, um die Funktionen der Transkription und der Translation räumlich voneinander zu trennen. So nimmt das Nukleoid zwar den größten, zentralen Teil des Zellvolumens ein, die Zellpole und die an Zytoplasmamembran angrenzenden Bereiche beinhalten die Ribosomen. Wahrscheinlich werden die zu exprimierenden Genabschnitte zu den peripheren Zellbereichen hin exponiert. In *C. crescentus* wiederum liegen die aktiv translatierenden Ribosomen mit der gebundenen mRNA kolokalisierend mit dem Nukleoid der Zelle (ABB.VI-4 C) (Montero Llopis et al. 2010). In *Mycoplasma pneumoniae* liegen die weniger zahlreichen Ribosomen (ca. 140) uniform in der Zelle verteilt (ABB. VI-7) (Kühner et al. 2009). Ein vergleichbares Experiment konnte in der hier vorliegenden Studie für *S. meliloti* nicht in der gleichen Form durchgeführt werden, da das Filterangebot und die gegebene Farbstoffauswahl nicht die Kolokalisierung von eGFP-Proteinen und DNA erlaubt hat. Dieses Experiment muss noch in der Zukunft wiederholt werden, eventuell als ein Zeitrafferversuch zur zeitlichen Auflösung der Vorgänge. Während der Stickstoff-fixierenden Symbiose in *M. sativa* Wurzelknöllchen sind beide ribosomalen Proteine stark aktiv, obwohl bekannt ist, dass der RNA Stoffwechsel während der Symbiose herunter reguliert wird (Becker et al. 2004). Eine mögliche Antwort auf diese Beobachtung ist die trotz der Expressionsabnahme weiterhin eine hohe Basisproduktion der Proteine in den Bakteroiden, verglichen mit anderen, weniger abundanten Proteinen.

Im sog. Turnover-Prozess wird die RNA in Prokaryoten relativ schnell degradiert, wobei die Halbwertszeiten z.B. der bakteriellen mRNA bei zwischen 3 und 8 Min für 80% der *E. coli* Transkripte liegen (Bernstein et al. 2002). Die in dieser Studie in helikalen Anordnung um die *S. meliloti* Zelle herum, aber in hellen Punkten in den Bakteroiden lokalisierte Ribonuklease E ist der Hauptakteur des Turnoverprozesses der RNA. Stabile RNA, wie rRNA und tRNA machen den Hauptteil von 98% der gesamten zellulären RNA aus. Diese wird nicht während des exponentiellen Wachstums degradiert. Allerdings bei Nährstoffknappheit oder langsamen Wachstum wird auch die stabile RNA stark degradiert um als interne Nährstoffreserve zu dienen (Nomura 1999). Es ist bis jetzt nicht bekannt, wo diese RNA Degradation stattfindet, an der Membran oder im Zytoplasma. Der größte Teil des Degradasomes (70-80%) befindet sich jedoch nah an der Membran, nur die Mehrheit der PNPase Moleküle liegt im Zytoplasma vor (Liou et al. 2001). Die Zytoskelett-assoziierte Lokalisierung des Proteins in Helices, die die Zelle von einem zum anderen Pol umwinden, konnte in *E. coli* untersucht werden (Taghbalout & Rothfield 2007). Die Bildung dieser Zytoskelettstruktur benötigt in *E.coli* ca. 290-500 RNase E Tetramere (Vendeville et al. 2011) und

ist unabhängig von den anderen Zytoskelett-assoziierten Proteinen, wie dem oszillierenden Zellteilungsprotein MinD oder dem bakteriellen Aktin homolog MreB, scheint aber nicht für das gesamte Prokaryotenreich vergleichbar zu sein. In *C. crescentus* wurde eine Kolokalisierung von RNaseE mit der DNA beobachtet (Montero Llopis et al. 2010), allerdings diskutieren die Autoren, dass die schmale Zellbreite des Bakteriums eine ausreichende räumliche Auflösung verhindert haben könnte. Diese Kolokalisation mit der DNA ist auch bei der Entfernung von allen mRNAs aus der Zelle durch eine mehrstündige Rifampicin-Einwirkung nicht unterbrochen, was auf eine bis jetzt unbekannt Art Verankerung mit dem Nukleoid hinweist. Die RNaseE Moleküle konzentrieren sich dabei in punktförmige Gebilde am Nukleoid, die mit der RNaseE Verteilung in den Bakteroiden von *S. meliloti* erinnert. Eine Kolokalisation mit der DNA in den Bakteroiden muss zukünftig noch untersucht werden.

Das in *S. meliloti* 924 Aminosäuren lange Protein (in *E. coli* sind es 1061 Aminosäuren) wurde 86 Aminosäuren vor dem Carboxyterminus mit eGFP intern fusioniert. In vorigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nur der N-Terminus für die Viabilität benötigt wird und der C-Terminus anscheinend für die Degradation von mRNAs, nicht für die Prozessierung von rRNAs verantwortlich ist (Lopez et al. 1999). Die aminoterminalen 529 Aminosäuren bilden die katalytische Domäne aus, der Carboxyterminus ist für die Interaktion mit den anderen aktiven Bestandteilen des RNA Prozessierungs- und Degradationsapparates (Callaghan et al. 2004, Callaghan et al. 2005), z.B. der RNA Helikase B, PNPase (Kaberdin et al. 1998, Vanzo et al. 1998), die den Abbau bis zum Mononukleotidlevel weiterführen. Mutationen in dem Carboxyterminalen, mit PNPase assoziierten Teil des Proteins sind vital (Donovan & Kushner 1986). Die Interaktion der Ribonuklease E mit der Membran bzw. dem Zytoskelett benötigt eine amphipatische  $\alpha$ -Helix, gebildet durch die Region zwischen den Aminosäuren 568-582, dem sog. Segment A (Khemici et al. 2008). Mutationen dieser Region verhindern die Verankerung an der inneren Zytoplasmamembran und die RNaseE Moleküle konzentrieren sich in hellen Foki. Wie im Falle der Interaktion von RNaseE mit dem Nukleoid in *C. crescentus* (Montero Llopis et al. 2010) besteht eine starke Ähnlichkeit mit der in dieser Arbeit beobachteten punktförmigen Lokalisierung von RNaseE in ausgereiften *S. meliloti* Bakteroiden.

In symbiotischen Wurzelknöllchen wird die Genexpression der ausdifferenzierter *S. meliloti* Bakterioide an die veränderten Umstände und Aufgaben angepasst, dabei wird der RNA Metabolismus insgesamt herunterreguliert (Becker et al. 2004), im speziellen die RNA Polymerase und RNaseE. Da die Bakterioide im Vergleich zu freien *S. meliloti* Zellen ein größeres Volumen besitzen ist eine Interpretation von veränderter Fluoreszenzintensitäten basierend auf mikroskopischen Daten schwierig. Die RNA assoziierten Proteine dieser Studie werden allesamt

recht stark in den Bakteroiden exprimiert. Die Lokalisierungsmuster der RNAP-eGFP und RNaseE-eGFP in den Bakteroiden ergänzen sich bei einer Überlagerung der 3D-Projektionen der Intensitätsprofile interessanterweise. Die punktförmigen Intensitätspeaks der RNaseE passen genau in die fluoreszenzfreien Aussparungen der RNAP-eGFP Bakterioide. Um jedoch weitere Aussagen zu einer möglichen räumlichen Trennung der Transkription und der RNA Degradation in Bakteroiden treffen zu können, bedarf es weiterer Kollokalisierungsstudien, auch mit dem Nukleoid der vergrößerten Zellen.

### **VI-7.3. Die interne Fusion mit dem eGFP Transposon erlaubt die Erstellung und Lokalisierung von funktionalen, fluoreszenten Membranproteinen in *S. meliloti* Rm1021.**

Ein großer Vorteil der zufälligen internen Markierung der Proteine liegt in der bequemen Möglichkeit, mit geringem Aufwand passende Insertionsstellen für den fluoreszenten Marker zu finden, um funktionierende Membranproteine produzieren zu können. Für ein intaktes, korrekt verankertes Membranprotein muss das eGFP Protein zwischen den Transmembranbereichen, in den im Zytoplasma liegenden Schleifen eingefügt werden um die korrekte Faltung des Proteins und des Chromophors zu gewährleisten. Frühere Studien zeigen auf, dass GFP-Fusionsproteine die über die Sec-abhängige Sekretion ins Periplasma gelangen, nicht korrekt falten können und nicht-fluoreszent verbleiben (Feilmeier et al. 2000). Die Unfähigkeit von GFP im Periplasma die korrekte Struktur anzunehmen, liegt eventuell an dort fehlenden Chaperonen (Hsp60/70) oder oxidierenden Bedingungen. Der Transport der Fusionsproteine über den Tat-Translokon stört nicht die Fluoreszenz, da die Proteine bereits im Zytoplasma gefaltet werden und in diesem Zustand über die Zytoplasmamembran transportiert werden (Thomas et al. 2001). Somit können in dieser Studie nur zytoplasmatische Proteine und Membranproteine mit zytoplasmatischen Bereichen, sowie die über den Tat-Translokon ins Periplasma transportierten Proteine lokalisiert werden.

### **VI-7.4. Die Lokalisierung des Membranproteins Quinoloxidase erscheint abhängig von ihrer Assoziierung mit Phospholipidbausteinen, insbesondere dem Cardiolipin der Zellmembran.**

Unter den sechzehn identifizierten und lokalisierten Proteinen befindet sich ein hoher Anteil membranassoziierter Fusionskonstrukte. Einige sind homogen in der gesamten Zytoplasmamembran verteilt, andere bevorzugen distinkte Bereiche. Am stärksten ausgeprägt sind in dieser Kategorie der Proteinlokalisierung in Bakterien auch die Unterschiede zwischen den Lokalisierungsmustern der trunkierten und der vollständigen Fusionsproteine. In einigen Fällen reichen scheinbar nur wenige fehlende Aminosäuren des C-Terminus, bzw. die zusätzlich zu eGFP anhängende 70,4 kDa große Neomycinphosphotransferase II in trunkierten Konstrukten, um die

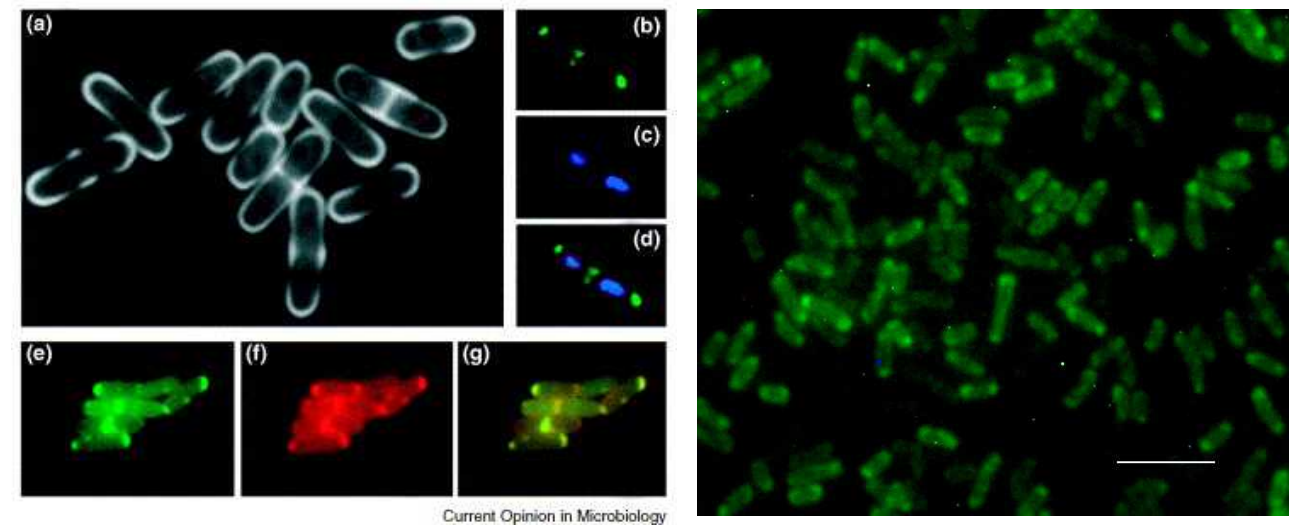
Lokalisierung des Proteins zu verändern. Die Quinoloxidase in ihrer trunkeierten Form mit nur achtzehn fehlenden Aminosäuren am C-Terminus wird in zwei hellen Punkten pro Zelle konzentriert, während die intakte Form in der Membran, sowie auffallenden polar liegenden "Kappen" zu finden ist. Nach dem aktuellen Stand der Forschung wird diese auffällige Lokalisierung durch die Organisation der Phospholipide in der Membran der Bakterien bedingt. Biologische Membranen sind keine homogene Strukturen, sondern sie bestehen aus Domänen, die mit bestimmten Lipiden und Proteinen angereichert sind (Edidin 2003). Diese sog. "Lipid Rafts" sind dynamische Strukturen bezüglich ihrer Größe und Zusammensetzung. Bereits vor einiger Zeit wurde die Beobachtung gemacht, dass das Phospholipid Cardiolipin in Grampositiven, wie Gramnegativen Bakterien an den Zellpolen und den künftigen Zellteilungsorten lokalisiert (Mileykovskaya & Dowhan 2000). Auch die Phospholipide Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG) sind in abgegrenzten, proteinangereicherten Domänen zu finden. Die Phospholipidzusammensetzungen diverser Bakterienmembranen sind bekannt, und variieren zwischen den Gram-negativen und Gram-positiven untersuchten Modellorganismen. So beträgt die Zusammensetzung für *B. subtilis* PE50/PGL15/CL0-8% (de Mendoza et al. 2002) und für *E. coli* PE 70-80%/PG 15-25%/CL5-10% (Kadner 1996). Für *S. meliloti* beträgt diese PE22/PGL11/CL11% (Thompson et al. 1983). Somit ist die Konzentration an Cardiolipin in *S. meliloti* vergleichbar mit den entsprechenden Werten für *E. coli*. Hier wurde u.a. gezeigt, dass die Akkumulation von Cardiolipin an den Polregionen mit der steigenden Osmolalität der Umgebung und während des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase drastisch steigt (Romantsov et al. 2007). Da Bakterien mit einer Mutation der Cardiolipin-Synthase nicht in der stationären Phase überleben können, wird Cardiolipin als notwendig für das langzeitiges Überleben unter nicht-wachsenden Bedingungen gesehen (Hiraoka et al 1993). Cardiolipin formt dynamische Protein/Lipid Mikrodomänen mit starker Krümmung, eventuell aufgrund des Aufbaus des Moleküls, der vergleichbar kleinen Kopfgruppe bezüglich der hydrophoben Domäne (ABB.VI-5D). Diese starke Krümmung findet man in prokaryotischen Zellen an den Polen. In *B. subtilis* wurden die Enzyme für Cardiolipinbiosynthese in septalen Regionen nachgewiesen, aber es existiert bis dato keine Erklärung, welche Mechanismen die Diffusion von Cardiolipin in andere Membranbereiche verhindern (Nishibori et al. 2005). Neben den Aufbaucharakteristika des Moleküls kann die septale Lokalisierung durch die geringere osmotische Druckdifferenz verglichen mit der Zellmembran erklärt werden (Mileykovskaya & Dowhan 2009). Der Farbstoff NAO (10-N-Nonyl-Acridin-orange) wird für die spezifische Färbung von Cardiolipin verwendet (ABB. VI-5A und 5C). Dieser färbt in prokaryotischen Zellen die Zytoplasmamembran ein und konzentriert sich darüber hinaus stark an Polrändern, während unspezifische Membranfarbstoffe wie FM-64 eine gleichmäßige



Färbung der Membran erreichen. Damit bietet die Verteilung des Farbstoffs eine genaue Übereinstimmung mit dem in dieser Studie lokalisierten *S. meliloti* Protein Quinoloxidase QxtB (ABB. VI-5B). Diese Cytochrom bd Oxidase gehört zur Zellatmungskette der Prokaryoten und stellt eine Redox-angetriebene Protonenpumpe dar. Die Ubiquinoloxidasen benutzen membranlösliche Ubiquinol-8-Moleküle als Elektronendonoren und verbinden die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser mit vertikalen Translokation von Protonen über die Membran. Dieser Transmembrangradient der Protonen und der dadurch erzeugten Spannung wird in besser verwendbare Energieformen umgewandelt z.B. das ATP über die ATP Synthase.

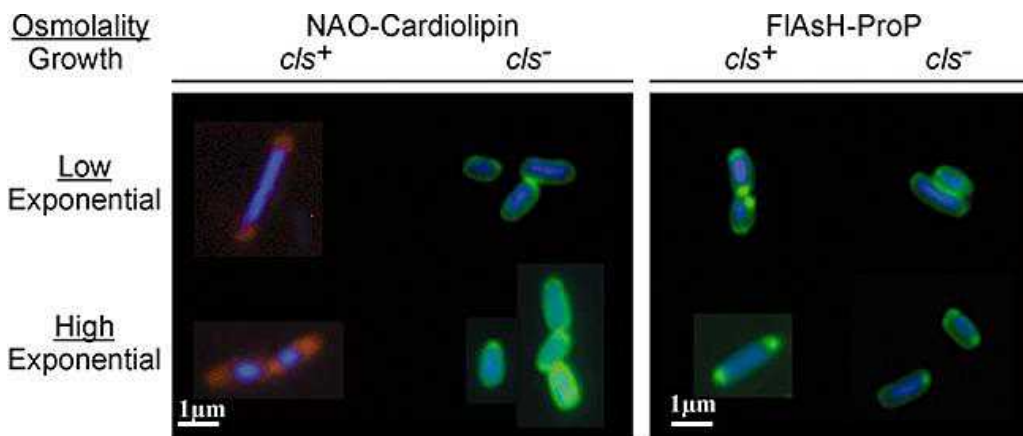
Die Insertion des Transposons erfolgte nah am C-Terminus der Untereinheit II der Cytochrom bd Quinoloxidase. Dieser Bereich liegt im periplasmatischen Raum. Da das eGFP Protein sichtbar fluoresziert und die korrekt anmutende Lokalisierung des Fusionsproteins zeigt, muss angenommen werden, dass der Transport und der Einbau des Proteins nicht über die Sec-abhängige Translokation alleine funktioniert, denn das native eGFP ist nicht imstande, in der oxidierenden Umgebung des Periplasmas korrekt zu falten. Vielmehr werden wahrscheinlich alternative Mechanismen benutzt, wie z. B. der kotranslationale Einbau in die Zytoplasmamembran über interne hydrophobe Transmembransegmente, auch Signalankersequenzen genannt. Das sogenannte "signal recognition particle" SRP bindet an diese Domänen und transportiert den Ribosomkomplex zur Membran, wo die Insertion der hydrophoben Helices, sowie die Biogenese des Proteins von YidC (bakterielles Oxa1 Analog) oder YidC/SecA/SecYEG-Komplex vermittelt wird. Das YidC Protein ist verantwortlich für die Faltung von u.a. Laktosepermease LacY, für die Membranintegration der Untereinheit II (CyoA) des Cytochrom bo3 und der Foc Untereinheit des F0F1 ATPase Komplexes. (van der Laan et al. 2003).

Eine interessante Studie berichtet von polaren Lokalisierung von YidC in *E.coli* (Urbanus et al. 2002). Gleichzeitig ist bekannt, dass Proteine und Proteinkomplexe des Energiemetabolismus, wie NADH Dehydrogenase, Cytochrome bc1, ATP Synthase, Cytochromoxidase und das ADP/ATP Carrierprotein das Cardiolipin für die korrekte Funktion benötigen (Lee et al. 2005).

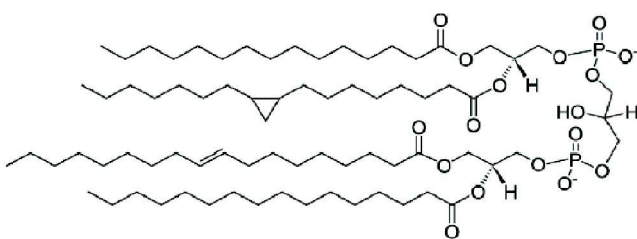


A

B



C



D

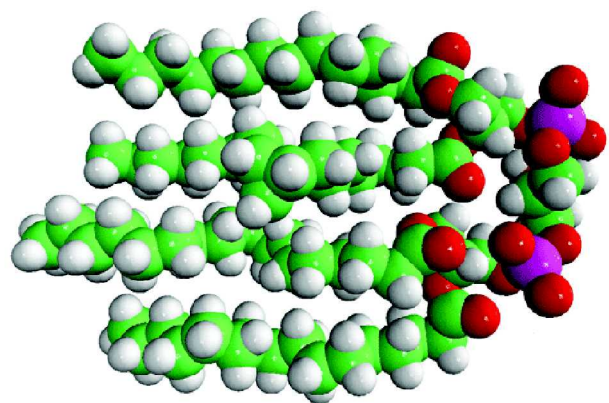


ABB. VI-5. Vergleich der durch Färbungen in der Literatur berichteten subzellulären Lokalisierung von „lipid rafts“ A(a), sowie Cardiolipin A(b) und A(e), mit der in dieser Studie dokumentierten Lokalisierung des Membranproteins QxtB-eGFP (B) und anderer berichteten Proteine mit einer möglichen Cardiolipin-assoziiierung in *E. coli*, ProP(C).

A)(a) „Lipid rafts“ in Spalthefe, Färbung von Sterol-reichen Domänen mit Filipin (aus Rajagopalan et al.

2003). A(b)-(d) Cardiolipin-angereicherte Domänen in *E. coli*-Zellen gefärbt mit NAO (grün, b) für Cardiolipin und DAPI (blau, c) für das Nukleoid. Ein Overlay der Aufnahmen (d) zeigt die Lokalisierung des Cardiolipins an den Zellpolen und am Septum der Zelle (aus Mileykovskaya & Dowhan 2000). A(e)-(f) Cardiolipindomänen an den Zellpolen und Zellmitte in *B. subtilis* (aus Kawai et al. 2004). (e) NAO gefärbtes Cardiolipin (grüne Emission, 525 nm); (f) hochspezifische rote Fluoreszenz von NAO gebunden von Cardiolipin (Emission 640 nm), und (g) overlay der Aufnahmen. Die Bildauswahl aus: (Mileykovskaya & Dowhan 2005);

B) Fluoreszenzmikroskopie des Fusionskonstruktes QxtB-eGFP in *S. meliloti*. Das Protein lokalisiert in der Zytoplasmamembran und an den Zellpolen in auffälligen „Kappen“, die an die Lokalisierung von Kardiolipin in *B. subtilis* und *E. coli*, sowie FAsH-ProP erinnern.

C) Färbung von Cardiolipin mit NAO, sowie Lokalisierung vom Cardiolipin-assoziierten Protein ProP in Abhängigkeit von der Osmolalität der Umgebung in *E. coli* (low/high) und Funktionsfähigkeit der Cardiolipinsynthase (cls+/cls-) (aus Romantsov et al. 2007). Links: Zellen gefärbt mit DAPI (Nucleoids) und NAO (grüne oder rote Fluoreszenz). Steigende Osmolalität des Mediums und eine funktionierende Cardiolipinsynthase sorgen für deutliche Ansammlung des Phospholipids in der Membran und den Polen der Zellen. Rechts: Der markierte Osmosensor FAsH-ProP lokalisiert in einer vergleichbaren Abhängigkeit und gleichen Muster, wie das Cardiolipin.

D) Die Struktur einer häufigen Variante von Cardiolipin aus *E. coli*. Das Molekül besitzt eine auffallend kleine hydrophile Kopfgruppe im Vergleich zu langkettigen hydrophoben Fettsäuredomäne. Links die Strukturformel, rechts davon das Kalottenmodell (Quelle: <http://www.avantilipids.com>).

Vielen Proteinkomplexen mit mehreren Untereinheiten dient Cardiolipin als flexibler amphipatischer Anker. Cardiolipin wurde in dieser Rolle in den Kristallstrukturen von Reaktionszentren (Fyfe et al. 2001), der *E.coli* Succinatdehydrogenase (Mileykovskaya & Dowhan 2009), Formatehydrogenase -N (Jormakka et al. 2002)) und dem Nitratreduktasekomplex NarGHI (Arias-Cartin et al. 2010). In NarGHI-Komplex bindet das Cardiolipin in der Umgebung der Quinoloxidierungsstelle und erlaubt dadurch die korrekte Interaktion mit dem Quinolsubstrat. Auch im Cytochrom bc1-Komplex in *S. cerevisiae* wurde eine enge Bindung von Cardiolipin in der direkten Umgebung der Quinoloxidierungsstellen nachgewiesen, was auf eine mögliche Beteiligung von Cardiolipin in der Protonenaufnahme an der Ubiquinone-Reduktionsstelle hinweist (Pfeiffer et al. 2003).

Es erscheint als eine sinnvolle Maßnahme für die Zelle, wenn Elemente der oxydativen Phosphorylierung (OXPHOS) in Domänen zusammen liegen, deren Aktivität durch die Änderung der Cardiolipin-Menge in der Membran von Bakterien oder Mitochondrien auf eine elegant mechanische Weise bei wechselnden Bedarf z. B. Wachstumsphasenabhängig, hoch oder herunter

reguliert werden kann (Arias-Cartin et al. 2010). Cardiolipin scheint in Mikrodomänen organisiert, die das Potential als "proton sink", Protonenverbraucher haben, besonders wenn diese Domänen in der Nähe zu Komplexen der oxidativen Phosphorylierung, die Protonen generieren und konsumieren, liegen (Mileykovskaya & Dowhan 2009). Lenn et al. stellten 2008 nach einer mikroskopischen Beobachtung von Cytochrom bd1 Molekülkomplexen in *E. coli* eine Hypothese auf, wonach die OXPHOS Elemente in funktioneller Nähe zueinander in Domänen vorliegen (Lenn et al. 2008). Sie beobachteten die GFP-Fusionsproteine unter dem Einfluss der natürlichen Promotoren und fanden diese in mehreren hellen Flecken pro Zelle scheinbar über die gesamte Fläche der Zytoplasmamembran verteilt. Leider wird diese Beobachtung mit keinerlei mikroskopischen Aufnahmen oder weiterführenden Experimenten untermauert. Weitere Studien zur Lokalisierung des Quinoloxidase Proteins in Bakterien liegen nicht vor, die Genobase *E. coli* Datenbank (ecoli.naist.jp) berichtet lediglich von der Toxizität der IPTG induzierten Überexpression von CydB und präsentiert aus diesem Grund keine Lokalisierungsaufnahmen der Protein-GFP Fusion. Ein anderer Komplex des respiratorischen Systems, die Succinat-Dehydrogenase SdhB zeigt in diesem japanischen Projekt eine homogene zytoplasmatische Lokalisierung, allerdings kann diese Beobachtung auch durch die Überexpression des Komplexes bedingt sein, wenn der Überschuss an Protein die distinkte korrekte Verteilung im Hintergrund überdeckt.

Für den Osmosensor ProP in *E. coli* konnte eine direkte Abhängigkeit von Konzentration und Lokalisierung mit Cardiolipin gezeigt werden (Romantsov et al. 2007), eine polare aber Cardiolipin-unabhängige Lokalisierung zeigt auch der H<sup>+</sup>-Lactose-Symporter LacY (Nagamori et al. 2004). Eventuell signalisiert ein verminderter Energiemetabolismus den Bedarf an erhöhter Cardiolipin Konzentration in der Membran und dies führt zur Verbesserung der Effizienz des Energiemetabolismus (Romantsov et al. 2007).

Die Verteilung von Cardiolipin an den Zellpolen und im Septum kann auch für die Selektion und Erkennung der Zellteilungsstelle durch amphitropische Zellzyklus- und Zellteilungsproteine, wie DnaA (Initiation der DNA Replikation am *oriC*), MinD (Teil des MinCDE Systems, das die Positionierung des Divisomes an den Zellpolen verhindert), FtsA (bakterieller, aktinähnlicher Linker des Zytoskelettproteins FtsZ (bakterielles Tubulin) genutzt werden. Die FtsZ/FtsA, sowie MinD Proteine aggregieren an Domänen, die Cardiolipin angereichert sind und zeigen auch *in vitro* eine hohe Affinität zu anionischen Phospholipiden, v.a. Cardiolipin (Mileykovskaya & Dowhan 2009).

Die Assoziierung des respiratorischen Komplexes mit dem Cardiolipin der Zellmembran gibt eventuell einen Hinweis auf in dieser Studie beobachtete, fehlerhafte Lokalisierung des um 18

Aminosäuren trunkierten QxtB Proteins in wenigen, sehr konzentrierten Punkten im Zytoplasma, die auch in den Hellfeldaufnahmen zu sehen sind. Höchstwahrscheinlich besteht ein Fehler in der Verankerung im Cardiolipin der Zellmembran oder in der Interaktion mit anderen Proteinen des respiratorischen Komplexes und das trunkierte Protein wird in Inklusionskörpern der Zelle abgebaut. Der Fakt, dass der Stamm, der die trunkierte Version des Proteins exprimiert trotz langsameren Wachstums vital ist deutet darauf hin, dass *S. meliloti* in diesem Fall auf alternative Elektronentransferwege, also diverse Cytochromoxidasen (Yurgel et al. 2007) zurückgreifen kann. In den infizierten Zellen der Knöllchen in *M. sativa* werden die QxtB-eGFP Proteine mittelstark exprimiert, sie zeigen auch in den ausdifferenzierten Bakteroiden eine interessante Lokalisierung. Das Protein liegt scheinbar in mehreren zytoplasmatischen Segmenten vor, die durch nicht-fluoreszenten Bereiche voneinander klar getrennt sind. Leider existieren zur Zeit keine Studien hinsichtlich dieser Beobachtung. Weitere Analysen des Phänomens, sowie eventuelle Abweichungen der Lokalisierung der trunkierten Form des Proteins könnten im Anschluss an diese Studie erfolgen.

#### **VI-7.5. Die subzelluläre Verteilung der ATP Synthase in der Zytoplasmamembran ist homogen und scheinbar nicht abhängig von Cardiolipinlokalisierung in *S. meliloti*.**

Das ATPF-eGFP Fusionsprotein zieht in der Fluoreszenzmikroskopie von *S. meliloti* Zellen eine gleichmäßige Membranlokalisierung. Trotz bereits erwähnter, viel diskutierter Assoziation der ATP Synthasen mit dem Cardiolipin der Mitochondrienmembran in Eukaryoten, sowie der Zellmembran der Bakterien (Mileykovskaya & Dowhan 2009), scheint die Konzentration an ATP-Synthasemolekülen in Cardiolipin-angereicherten Domänen im Vergleich zur QxtB-eGFP Lokalisierung nicht an den Zellpolen erhöht zu sein. Fluoreszenzmikroskopie von *B. subtilis* ATP Synthase zeigte eine vergleichbare, homogene Verteilung (Johnson et al. 2004; Meredith et al. 2008). In beiden Fällen erfolgte die Expression des *atpA* Fusionsproteins (der  $\alpha$  Untereinheit des F1-Komplexes der ATP Synthase) von den respektiven natürlichen Promotoren, die Expression der "downstream" im Operon liegenden Gene wurde durch die Plasmid-vermittelte Insertion von Xylose, oder IPTG induzierbaren Promotoren gewährleistet. Auch in *E. coli* Genobase-Datenbank wird die Membranlokalisierung von IPTG-induzierten AtpA Fusionsprotein vorgestellt, die den in dieser Studie gemachten Beobachtung in *S. meliloti* gleicht. Bemühungen, die Expression der b'-Untereinheit (ATPF) des F0F1-Komplexes mit IPTG zu induzieren schlugen in den Versuchen der japanischen Arbeitsgruppe jedoch fehl, aufgrund von der starken toxischen Wirkung des überexprimierten Konstruktes auf die *E. coli* Zellen. In der hier vorgestellten Studie erfolgte die Insertion des fluoreszenten Markers intern in die Gensequenz und sie nutzt den endogenen

Promotor zur Expression. Das eGFP liegt hier zwischen der Aminosäure 183-184 von insgesamt 204 Aminosäuren, d.h. die Insertion erfolgte am fernem C-Terminus der b'-Untereinheit, der zum Zytoplasma gerichtet ist und wahrscheinlich als eine alpha-Helix vorliegt (Dunn et al. 2000). Die trunkierte Form des Proteins, der die wenigen C-terminalen Aminosäuren fehlen, zeigt ein stark verändertes Lokalisierungsverhalten. Das Konstrukt scheint in kleinen, intern liegenden sphärischen Gebilden zu akkumulieren. Für diese Beobachtung existieren keine vergleichbare Studien, allerdings konnten *in vitro* Studien zeigen, dass durch die Deletion von nur vier C-terminalen Aminosäuren der *E. coli* b'-Untereinheit der ATP Synthase, die Interaktion mit dem ebenfalls C-Terminus der Delta-Untereinheit inhibiert wird und dadurch die Interaktion der F<sub>0</sub> mit der F<sub>1</sub>-Untereinheit gestört wird (McLachlin et al. 1998). Die *S. meliloti*-Mutanten, die die trunkierte, fehllokalisierte Version der b'-Untereinheit der ATP Synthase exprimieren, zeigen ein verlangsamtes Wachstum, sind aber vital. Ob die zu beobachtende interne sphärische Strukturen imstande sind, ATP zu gewinnen, konnte im Rahmen dieser Studie nicht erschlossen werden und bedarf weitergehender Analysen.

In symbiotischen Wurzelknöllchen von *M. sativa* weist das Protein ein recht hohes Expressionsniveau auf. Die hohe Produktion in Bakteroiden kann erklärt werden durch den erhöhten Bedarf an ATP, bedingt durch die ATP-abhängige Nitrogenaseaktivität der Stickstoff-fixierenden Zellen während der Symbiose. Die subzelluläre Lokalisierung des Proteins innerhalb der Bakterioide ist nicht mehr rein membranassoziiert, sondern deutet auch auf Bereiche innerhalb des Zytoplasmas. Diese Beobachtung kann aktuell noch mit keinen anderen wissenschaftlichen Studien verglichen werden.

#### **VI-7.6. Der Mangan ABC Transporter SitABCD lokalisiert in der Zellmembran von *S. meliloti* und ist auch während der Symbiose in Stickstoff-fixierenden Bakteroiden in *M. sativa* Wurzelknöllchen aktiv.**

Das SitC-eGFP Fusionsprotein wird nur schwach unter den gegebenen Bedingungen im Minimalmedium exprimiert, es lokalisiert konform mit den PSORTb Vorhersagen in der Zytoplasmamembran, sowie in Membran-nahen "Flecken". Die Lokalisierungsvorhersagen wurden bisher durch keine experimentelle Studie bestätigt. Das SitABCD System ist ein Metall-Typ ABC Transporter, wobei basierend auf Sequenzhomologien SitA das periplasmatische Bindeprotein, SitB die ATPase und SitC/SitD die Transmembrandomänen aufbauen. In *S. meliloti* ist der SitABCD der Haupttransporter von Mn(II)-Ionen (Chao et al. 2004). Die engsten Homologien zu Metall-Typ ABC Transporterproteinen in anderen Bakterienstämmen bestehen zu diversen Proteinen von tierischen Pathogenen, z.B. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SitABCD oder dem *Yersinia*

*pestis* YfeABCD Transporter, sowie dem nicht identifiziertem Protein des nahen Verwandten von *S. meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*. Anscheinend tragen diese Transporter zur Versorgung der diversen Stämme mit Metallionen während ihrer Existenz in tierischen oder pflanzlichen Wirten. Tatsächlich trägt SitABCD in *S. meliloti* zur Etablierung einer erfolgreichen Symbiose bei und wird im Knöllchen stark exprimiert (Chao et al. 2004). Fusionen von *sitA* an ein *gusA*-Reporter gen ergaben eine heterogene Expression in der gesamten Stickstoff-fixierungszone, sowie eine schwächere in der Infektionszone, eine Beobachtung, die mit der Expression des SitC-eGFP Fusionsproteins in dieser Studie gleicht. Auch bei Interaktionen von Pathogenen mit ihren Wirten scheint das SitABCD Transportersystem eine erhebliche Rolle zu spielen, so ist das Protein essentiell für Eisenaufnahme und die volle Virulenz von *Salmonella typhimurium* (Janakiraman & Slauch 2000), sowie in Avian Pathogenen *E. coli* (APEC) (Sabri et al. 2006). Im letzteren vermittelt der ABC Transporter ebenfalls eine Resistenz gegenüber oxidativen Stress. Auch in *S. meliloti* führt die Deletion des SitABCD Systems zur erhöhten Sensitivität gegenüber Hydrogenperoxid und Superoxid (Davies & Walker 2008). Einen interessanten Aspekt stellt die experimentell bestätigte Studie von Kehres und Janakiraman (Kehres et al. 2002), wonach das SitABCD Transportersystem nur unter leicht basischen Bedingungen aktiv ist und kaum unter sauren Bedingungen transportiert. Konform mit dieser Dokumentation ist der Fakt, dass während der Symbiose die Stickstoff-fixierenden Bakterioide eine eher basische Umgebung darstellen, während im Zytosol des Symbiosoms saure Bedingungen vorherrschen (Day et al. 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SitC-eGFP Fusionsprotein sichtbar stark in den symbiotischen Wurzelknöllchen exprimiert wird, obwohl in dem Pflanzenanzuchtmedium eine um Zehnerpotenz niedrigere Konzentration an Mn(II)-Ionen vorherrschte, als im VMM in dem die Lokalisierung in frei lebenden Bakterien charakterisiert wurde (1  $\mu$ M vs 10  $\mu$ M).

#### **VI-7.7. Das hypothetische Transmembranprotein TerC stellt laut Homologievergleichen einen Tellurtransporter dar und ist aktiv in den im Minimalmedium kultivierten Zellen, sowie während der Symbiose mit *M. sativa*.**

Eines der eGFP-Fusionsproteine die eine Membranlokalisierung aufzeigen, wurde als das hypothetische Protein TerC identifiziert. Das Protein kommt in diversen Prokaryoten vor und vermittelt dort die Resistenz gegenüber dem Chalkogen Tellur (Taylor, 1999; Kormutakova et al. 2000). Die Telluritresistenz von Bakterien ist seit langer Zeit eine gut bekannte Eigenschaft, da noch vor der Verwendung von Antibiotika antimikrobielle Eigenschaften von Tellurium bekannt waren (Fleming, 1932) und Telluritresistenz zur Selektion von Pathogenen benutzt wurde (Zadik & Chapman 1993). Die Membranassoziiierung des TerC-eGFP Proteins ist in den frei lebenden *S.*

*meliloti* Zellen zwar sehr schwach, aber deutlich zu sehen, die Beobachtung gleicht den PSORTb Vorhersagen. Die Expression des TerC-eGFP-Konstrukts scheint in symbiotischen Wurzelknöllchen sogar erhöht zu sein. Auch die Aufnahmen der reisolierten TerC-eGFP-Bakteroide deuten auf eine stärkere Konzentration in der Bakteroidmembran hin. Diese Beobachtung ist sehr interessant, aufgrund von fehlender Substituierung der Wachstumsmedien mit diesem Element. Das Vorkommen von Tellurium im Anzucht-, sowie Pflanzenmedium kann eventuell auf eine während des Produktionsprozesses entstandene Verunreinigung einer verwendeten Gummi/ Kunststoffkomponente zurückzuführen sein. Möglicherweise übernimmt der Transporter aber auch alternative, bisher nicht untersuchte Funktionen in frei lebenden und symbiotischen *S. meliloti* Zellen. Eventuell agiert es als ein Effluxtransporter anderer Metallionen, wie Selen.

In *Bacillus subtilis* existiert ein Operon, dessen Genprodukte eine variierende, aber feststellbare Homologie zu der TerC Proteinfamilie aufweisen. Die *B. subtilis* YceC-F Proteine sind in diversen Studien im Zusammenhang mit Stressadaptation der Zellhülle bedingt durch Antibiotika, pH, Hitze, Ethanol oder Superoxidstress (aktiviert durch Sigmafaktoren SigM,V,W,X,Y) und als generelles Stressprotein (SigB Regulon) aufgefallen (Eiamphungporn & Helmann 2008; Höper et al. 2005). Ein Sequenzvergleich der Aminosäurezusammensetzung der beiden entsprechenden Proteine TerC (*S. meliloti*) und YceF (*B. subtilis*) mittels UniProt ergibt allerdings eine geringe Homologie von nur 18,382% (ABB. VI-6). Damit läßt sich nur schwer die Behauptung stellen, die Aktivität des TerC-eGFP Konstruktes in den frei lebenden Zellen, sowie in Bakteroiden von *S. meliloti* könnte auf generelle Stressbedingungen zurückzuführen sein. Die häufig im Reich der Prokaryoten verbreitete Telluriumresistenz und deren Mechanismus, sowie die Funktion der beteiligten Proteine sind zumindest bis zum heutigen Tag noch nicht aufgeklärt worden.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment:

```

SP|O34447|YCEF_BACSU
MDFLHHILSTYASF~FDWKMWGEVLTDPVSWGLIGSLVVLEGLLSADNALVLAVMVKHLPE 60
lcl|SMc03171
---MQEILT-----LAQSPEAWIALITLIVMEVVLGIDNLIFISILTNKLPP 44
  ::**          :  .*  :*  :  :*:**  :*.  **  ::::::::::**

SP|O34447|YCEF_BACSU
KQRKKALTYGLFGAYIFRFIFIGLGMLLIKFWW-----IKVLGALYLAWL 105
lcl|SMc03171
ENRVSARRIGIGLALIMRLALLGTIAWIVQLTQPVF~EAFGHGFSWKDMILIAGGLFLVWK 104
:*  .*  *  *  *:*  ::*  ::*  ::*  :  *  :*:*:*

SP|O34447|YCEF_BACSU
VIKHFWIGEKEEEEADGMKKN~SWMVRTFGIFWATVISVELMDLAFSVDSILAAFAVSEKVV 165
lcl|SMc03171
ATKEIHHS---VDPSDHEEDFIASSAINSFAAAIGQILL~LDLVFSVDSIITAVGMTPHLP 161
.  *.:  .  :...  :::  :..  *  *::  .:  *:*.******:*.....  ::

```





(Duke 1992; Streeter 1987). *S. meliloti* ist imstande, einige der Inositolverbindungen, wie Myo-, Scyllo- und D-chiro-Inositol abzubauen (Kohler et al. 2010) und bedürft dafür das *iola* Genprodukt. Das *iola* Gen liegt 400 kb entfernt von dem Iol-Cluster in *S. meliloti* und wird unabhängig vom IolR Regulator reguliert (Kohler et al. 2011). Die Beobachtung, dass das *iola* gen konstitutiv auf einem hohem Niveau exprimiert wird, auch wenn für die Kultivierung andere C-Quellen verwendet werden als Inositolverbindungen, z.B. Glukose oder Glycerol, führte zur Untersuchungen von möglichen alternativen Funktionen im Stoffwechsel von *S. meliloti*. Ebenso wie in *Pseudomonas* spp. und *Streptomyces coelicolor* ist IolA in *S. meliloti* ein essentieller Bestandteil des Valin-Abbaustoffwechsels (Kohler et al. 2010). Darüber hinaus sind die IolA-Mutante, sowie Mutanten der gesamten Inositolkatabolismogene und deren Regulatoren nicht wettbewerbsfähig gegenüber dem Wildstamm in kompetitiven Besiedlung der Wurzelknöllchen von Alfalfa-Pflanzen, ein Hinweis für eine wichtige Rolle in der Nährstoffgewinnung oder Signalfaktoren der Symbiose. Ebenso ist IolA essentiell für die Verwertung von Rhizopin, eines Inositolderivats und einer symbiosespezifischen Verbindung (Galbraith et al. 1998). Die Aktivität des Proteins in den in Minimalmedium kultivierten Zellen deutet aufgrund von nicht im Medium vorhandenem Inositol auf den Einsatz des IolA im Valinstoffwechsel hin. In einer Proteomuntersuchung im MOPS Medium ist das Protein durch eine mehr als 2-fach erhöhte Expression bei Nährstofflimitierung aufgefallen (Djordjevic et al. 2003). Die mikroskopische Untersuchung der Aktivität des IolA-eGFP Konstrukts im symbiotischen Wurzelknöllchen wies auf eine Expression ausschließlich in der Infektionszone des Knöllchens hin. Die Stickstoff-fixierungszone und weitere zeigen nur eine minimale bis keine Expression auf. Eventuell basiert diese Beobachtung auf dem verstärkten Inositolstoffwechsel oder noch unbekannte Signalkommunikation mit dem Wirt in dieser frühen Phase des Knöllchenbesiedlung. Die einzelnen Bakterioide wurden bisher nicht genauer untersucht und können in weiteren Studien zur Unterstützung der Beobachtung und möglicher Aufklärung dieses Charakteristikums verwendet werden.

Während das IolA-eGFP Konstukt in vielen kleinen Foki pro Zelle lokalisiert, wurde das HutU-eGFP in einem bis zwei hellen Foki in den *S. meliloti* Zellen beobachtet. Die putative Urokanatreduktase HutU katalysiert den zweiten Schritt des Histidinkatabolismus. Ebenso in diesem Fall finden sich leider keine Hinweise in der Literatur auf die subzelluläre Lokalisierung des Proteins. Während *in silico* Lokalisierungsvorhersagen, wie PSORTb eine zytoplasmatische Lokalisierung vorschlagen, haben diese Informationen keine Aussagekraft bezüglich des genauen Charakters der subzellulären Verteilung des zytoplasmatischen Proteins. Die Histidinverwertungsgene liegen allesamt in einem einzelnen Operon auf dem akzessorischen Megaplasmid pSymb (Finan et al. 2001), die Produkte des Operons sind für die Konversion von L-

Histidin zu Glutamat und Formamid verantwortlich. Das chromosomalkodierte Histidintransportersystem HutXWVH2 ist darüber hinaus involviert in die Aufnahme von Betain und Prolin (Boncompagni et al. 2000). Eine interessante Studie hat gezeigt, dass eine *S. meliloti* *hutU* Mutante sensitiv auf das antimikrobielle Modellpeptid Protamin reagiert und nicht imstande ist im Flüssigmedium zu wachsen, sowie stark in der Symbiose mit Leguminosen in der Kompetitivität gegenüber einem Wildstamm benachteiligt ist (Nogales et al. 2006). Die mikroskopische Beobachtung der subzellulären Verteilung und Aktivität in der hier vorliegenden Studie deutet auch in diesem Fall auf Degradationsprozesse von Proteinen hin, sowie interne Umlagerungen der Aminosäuren und deren Abbauprodukte, die eventuell in der spätexponentiellen Wachstumsphase der Kultur bereits verstärkt stattfinden können. Ein interessanter experimenteller Ansatz in diesem Fall wäre eine systematische Lokalisierung der restlichen am Abbau beteiligten Proteine und die Beobachtung eventueller Kolo-kalisationen. Es wäre sinnvoll für eine eng mit Molekülen gepackte bakterielle Zelle, aufgrund des "molecular crowding" und erschwerten Diffusionsprozessen im Zytoplasma die Enzyme der nachfolgenden Reaktionsschritte lokal nah beieinander zu gruppieren, eventuell in größeren sog. "molekularen Maschinen" (Kühner et al. 2009).

#### **VI-7.9. Mikroskopische Lokalisierungen von zwei unbekannt Proteinen können nicht näher bezüglich ihrer Funktionen charakterisiert werden.**

Zwei zufällig erstellte Fusionskonstrukte repräsentieren im Bakteriengenom konservierte Proteine unbekannter Funktionen. Obwohl sie über interessante Lokalisierungen verfügen können leider keine genaue Aussagen über die Funktion gemacht werden, da in der Literatur keine gezielten Experimente oder entfernte Hinweise bezüglich dieser Proteine existieren. Das Konstrukt SMC00100-eGFP weist eine homogen zytoplasmatische Lokalisierung auf, gemischt mit einzelnen Zellen, die das Protein zusätzlich noch in hellen, kleinen Foki konzentrieren. Es handelt sich um ein Protein der sog. „Domain of unknown function“ (DUF) 853 Familie. Die Mitglieder der Proteinfamilie sind allesamt P-Schleifen-haltige Nukleotidtriphosphatase, die zwar in vielen Bakterien konserviert, aber nicht näher charakterisiert sind. Die Expression des Proteins in den symbiotischen Wurzelknöllchen ist vergleichbar stark. In den aus den Knöllchen isolierten *S. meliloti* Bakteroiden findet man das Fusionsprotein in der Membran und entweder an den Polen der ausdifferenzierter Zellen oder in vielen kleinen Punkten im Zytoplasma vor.

Das Fusionsprotein SMC04094-eGFP gehört zu der in Proteobakterien konservierten DUF1013 Familie. In diesem Fall findet die Funktionsanalyse mittels InterProScan, sowie Motivsuche mittels Prosite keine besonderen Charakteristika. Das Protein weist eine sehr interessante subzelluläre

Lokalisierung in *S. meliloti* auf. Vergleichbar mit dem Muster von RNA Polymerase liegt es in manchen Zellen einer Kultur homogen im Zytoplasma verteilt, während die gleichen Konstrukte in benachbarten Zellen in wenigen, stark konzentrierten Foki vorliegen. Diese Beobachtung lässt den Rückschluss zu, dass es sich um eine räumlich und zeitlich dynamische Veränderung der Proteinlokalisierung handelt, dies muss in späteren Experimenten bestätigt werden. Das Protein ist auch während der Symbiose im Knöllchen stark vertreten, eine gezielte Beobachtung der Lokalisierung in den Bakteroiden wurde für dieses Proteinkonstrukt noch nicht vorgenommen. Beiden hypothetischen Proteine scheinen Funktionen inne zu halten, die auch während der Symbiose relevante Rollen spielen.

#### **VI-8. Fazit und Ausblick.**

Unsere Vorstellung des funktionellen Aufbaus und der Organisation einer prokaryotischen Zelle wurde in der letzten Zeit durch die Entwicklungen auf dem Gebiet neuer bildgebender Methoden und dadurch einer Möglichkeit des Einblicks in das dynamische Innenleben der mikroskopisch kleinen Organismen systematisch verändert. Trotz zahlreicher jüngst durchgeführter Studien zur Aufklärung von einzelnen interessanten Mechanismen der bakteriellen Existenz fehlen unserem Verständnis noch zahlreiche Fakten, um das Bild vollständig zu machen. Wir wissen, dass die Prokaryoten trotz der fehlenden Kompartimentierung der Zellen durch Organellen ihre Proteine nicht ziellos im Zytoplasma diffundieren lassen, bis zufällig die passenden Reaktionspartner gefunden werden. Die bakterielle Zelle stellt ein enorm dicht gepacktes System dar, ein Zustand der in Illustrationen des Wissenschaftlers mit künstlerischen Talent, David S. Goodsell, die an mehreren Stellen dieser Arbeit als Beispiele angebracht sind, veranschaulicht (Goodsell 2010). Diese Vorstellung macht klar, dass Strömung, Diffusion und Brown'sche Molekularbewegung im bakteriellen Zytoplasma alleine nicht ausreichend sind, um die Mobilität und das Zusammentreffen von Molekülen und ihren Interaktionspartnern zu gewährleisten. Die Konzentration an Makromolekülen im Zytoplasma von *E. coli* wird in der exponentiellen und stationären Phase auf bis zu 300-400 mg/ml geschätzt (Zimmerman & Trach 1991). In den Zellen, die einen Volumen von 0.22-3.27 Kubikmikrometer besitzen (Trueba & Woldringh 1980) befinden sich u.a. 120 Millionen Ionen, 18 Millionen kleiner organischer Moleküle und ca. 2.1 Millionen Proteine von geschätzter weise 4288 verschiedener Typen (Trevors 2012, Blattner et al. 1997). Zuzüglich zu biophysikalischen Mechanismen basiert die räumliche und zeitliche Organisation von Protein-basierten Vorgängen in der Zelle auch auf der gezielten Lokalisierung der Eiweiße, also eine Art von Kompartimentierung der Prozesse. Durch räumliche Nähe von Interaktionspartnern und ein Zusammenschluss in Proteinkomplexe, sog. molekulare Maschinen kann z.B. die Dauer der

Stoffwechselprozesse verkürzt werden (Kühner et al. 2009) oder die lokale Organisation der Vorgänge von Transkription und Translation kann durch limitierte Diffusion der mRNA von ihren Synthesorten optimiert werden (Montero Llopis et al. 2010). Die Bakterien haben in der Zeit, die sie auf der Erde existieren, vielfache ausgeklügelte Mechanismen entwickelt, um die vielfältigen Prozesse des Zellaufbaus, des Stoffwechsels, der Zellteilung und vielen mehr möglichst effizient und effektiv zu gestalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur zufälligen Herstellung fluoreszenter Fusionsproteine auf Genomebene mit Hilfe von Transposition etabliert. Aufgrund der Eliminierung von Transkriptions- und Translationssignalen aus der Transposonsequenz, sowie des Designs, das die Triplettleseraster der getroffenen Sequenz nicht verändert, entstehen schließlich eGFP Fusionsproteine in ihrer vollständigen Länge, die zusätzlich das fluoreszente Protein als Marker für die subzelluläre Lokalisierung intern in der Aminosäureabfolge tragen. Einer der Vorteile dieser Vorgehensweise liegt in den vollständig erhaltenen, nicht maskierten N- und C- Termini der markierten Proteine, wodurch gewährleistet wird, dass essentielle Signalsequenzen oder Bindedomänen nicht abgeschirmt werden und das Fusionsprotein seine Funktion korrekt erfüllen kann. Auf diese Weise steigt die Wahrscheinlichkeit, passende Insertionsstellen im zytoplasmatischen Domänen von Membranproteinen zu treffen und deren richtige Faltung, sowie Verankerung in der Zellhülle zu erlauben. Weiteren Vorteile einer Transposon-basierten Methode zur Markierung von Proteinen ist die effektiv hohe Anzahl an resultierenden erfolgreichen Fusionen bei einer gleichzeitig unkomplizierten und kostengünstigen Ausführung, sowie die Gewährleistung der Erhaltung von endogenen Expressionsleveln der markierten Proteine durch die Verwendung natürlicher Promotoren. Die Reaktionsgrößen können einfach erweitert werden und eignen sich dadurch zur Durchführung großer Experimentalansätze, wie z.B. der Erstellung eines Sets an markierten Proteinen eines gesamten Organismus, eines so genannten Lokalisoms. Das macht diese Methode zu einem nützlichen Werkzeug der Mikroskopie hinsichtlich einer systembiologischen Aufklärung der Organisation und Funktionsweise von Lebewesen.

Trotz der Vorteile einer Transposon-basierten Vorgehensweise zur massiven Herstellung von fluoreszenten Fusionsproteinen für die Mikroskopie, sind in der Vergangenheit auch einige Studien veröffentlicht worden, in denen eine hohe Anzahl an „open reading frames“ einzeln als C- oder N-terminale Fusionen mit einem Marker erstellt und analysiert worden sind. In *Bacillus subtilis* wurden auf diese Weise in einer aufwendigen Studie 110 ausgewählte ORFs markiert und unter der Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promoters exprimiert, sowie dokumentiert (Meile et al. 2006). In massiven Experimentalansätzen wurden ebenso ORFs aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Matsuyama et al. 2006), *Caulobacter crescentus* (Werner et al. 2009) wie "coding DNA

sequences" aus *E. coli* (Watt et al. 2007), oder sogar humane cDNAs in Vero Zellen (Simpson et al. 2000) N- oder C-terminal mit einem fluoreszenten Tag einzeln fusioniert und exprimiert. Um diese aufwendige Prozedur zu umgehen, sind im Vorfeld der hier vorgestellten Methode auch andere Transposon-basierte Experimentalansätze veröffentlicht worden, die sich allerdings in den Kerneigenschaften stark von dieser unterscheiden. So haben die Autoren um Merkulov et al. bereits im Jahr 1998 ein Transposonsystem für *in vitro* Transposition und Erstellung sogenannter Tribid-GFP-Fusionen, die außer dem GFP Marker auch den "Amber Suppressor tRNA"-Marker beinhalteten, gemeldet und haben dessen Funktionalität an zwei Proteinen in *S. cerevisiae* demonstriert (Merkulov et al. 1998). Zwei später vorgestellte Studien setzten Transposons ein, die aufgrund des beinhalteten Selektionsmarkers C-terminal trunkierte Proteinfusionen produzierten und lokalisierten mit deren Hilfe beispielhaft Proteine in *C. crescentus* (Russel & Keiler 2008), sowie u.a. in *Rhizobium etli* (Xi et al. 1999). Eine fluoreszente Markierung zum Zweck der Visualisierung ganzer Stämme in z.B. Biofilmen mit Hilfe von Transposons mit einem eigenen induzierbaren Promotor wurde in der Studie von Lagendijk et al. durchgeführt (Lagendijk et al. 2010). Hier stand allerdings nicht die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen im Vordergrund. Zuletzt wurde im Jahr 2010 ein dem hier vorgestellten Transposon ähnliches Konstrukt von Gregory et al vorgestellt, das allerdings wieder für *in vitro* Transpositionen ausgewählter Zielgene entworfen wurde (Gregory et al. 2010). Dieses wurde für die interne Markierung des LacI-Proteins in *E. coli* benutzt. Hiermit kann abschließend zusammen gefasst werden, dass die hier vorgestellte Methode die Vorteile einer Transposon-basierten Methode zur Herstellung von intern markierten, fluoreszenten Fusionsproteinen mit der vereinfachten Nutzbarkeit durch die gleichzeitige Lieferung der Transposase auf dem selben Vektor und die Möglichkeit der *in vivo* Transposition vereinigt. Mit Hilfe dieses Transpositionssystems wurden sechzehn verschiedene Proteine in *S. meliloti* funktional mit eGFP markiert und identifiziert, sowie ihre subzelluläre Lokalisierung in lebenden Zellen aus diversen Wachstumsmedien, sowie während der Symbiose mit *Medicago sativa* dokumentiert. Erstmals wurden auch die Proteinlokalisierungen in ausdifferenzierten *S. meliloti* Bakteroiden analysiert, die erstaunlicherweise nicht nur eine Änderung im Expressionslevel aufweisen, sondern in vielen Fällen auch eine abweichende funktionsabgeleitete Lokalisierung. Die Lokalisierungsmuster geben Hinweise auf mögliche Funktionen und Interaktionspartner der markierten Proteine und liefern detailliertere Informationen als *in silico* basierte Vorhersagen zur Proteinlokalisierung. Zukünftig können wir die Anzahl erfolgreich markierter essentieller Proteine, die ohne ihr C-Terminus nicht funktionsfähig sind, durch die Transposition mit dem "kurzen", markerfreien Transposon mit einer anschließenden FACS-Sortierung fluoreszenter Klone erhöhen. Darüber hinaus können neue interessante Fragestellungen verfolgt werden durch den Einsatz

neuartiger fluoreszenter Proteine, wie sfGFP das erst im Periplasma gefaltet wird und die Lokalisierung sekretierter und Außenmembranproteine ermöglicht (Dinh & Berhardt, 2011) oder den Einsatz fotoschaltbarer Proteine wie rseGFP (Grotjohann et al. 2011) für die Hebung der Methode in den Bereich ausserhalb der optischen Auflösungsgrenze der Standardmikroskopie. Eine einfache Modifikation des Transposons durch den Austausch des *egfp* Gens durch den neuartigen SNAP-Tag (New England Biolabs), eine Mutante des DNA Reparaturproteins O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase, können nach dem erfolgten Transpositionsschritt beliebige Farbstoffe, die an Benzylguanin gekoppelt sind, zur kovalenten Bindung des Tags und somit zur spezifischen Färbung angewandt werden. Aus der breitgefächerten Auswahl an verfügbaren Farbstoffen, die verschiedene Wellenlängeigenschaften, sowie Zellpermeabilitäten besitzen, kann je nach Fragestellung immer wieder neu gewählt werden und dadurch eine hochauflösende Mikroskopie von Bakterien ermöglichen. Mit Hilfe der neuen mikroskopischen Werkzeuge können wir ein wenig mehr Licht in die komplexe Organisation und die Funktionen einer prokaryotischen Zelle bringen (ABB VI-7).

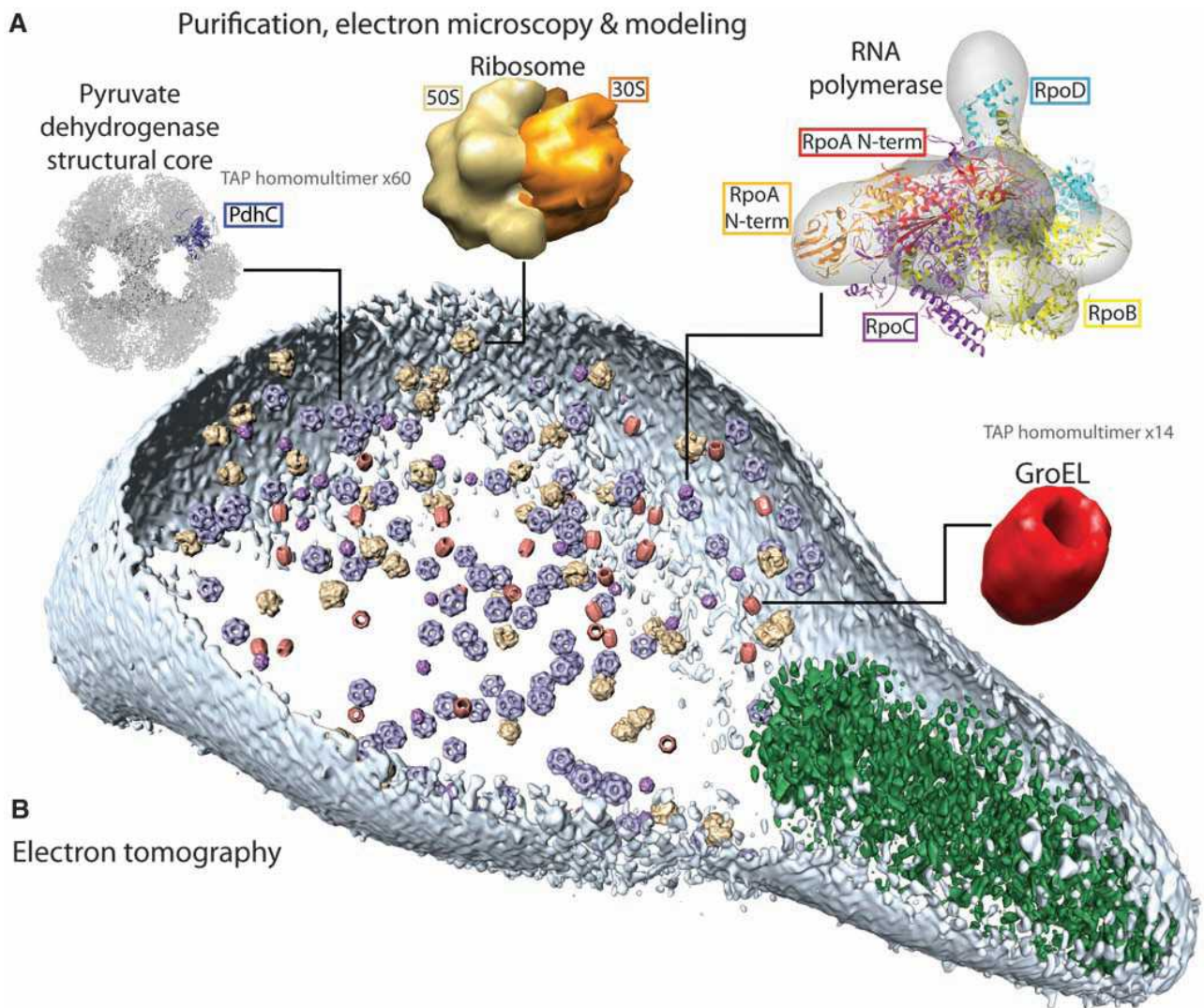


ABB.VI-7: Ein Tomogramm der *Mycoplasma pneumoniae* Zelle, entstanden durch eine Kombinationsanalyse der Ergebnisse aus Elektronenmikroskopie, Mustererkennungskarten, sowie Proteinkomplexuntersuchungen. Die in (A) abgebildeten Proteinmoleküle stellen das Homomultimer der Pyruvatdehydrogenase (~23nm), das prokaryotische 70S Ribosom (~26 nm), das RNA Polymerasekomplex (~17 nm), sowie das GroEL Chaperon (~20 nm) im Kontext des subzellulären Raumes der Zelle dar (~300-700 nm) (B). Die zytoskelettale Stäbchenstruktur von *M. pneumoniae*, die zum Anheften der Zelle an das epithalische Gewebe benötigt wird besteht aus den Proteinen HMW3 (Mpn452) und HMW2 (Mpn310), beide in grün dargestellt. Die Moleküle in (B) sind im korrekten Maßstab bezüglich der Zelle abgebildet und zeugen von einer strikten räumlichen Organisation des bakteriellen Proteoms (Quelle: Kühner et al. 2009).



## VII Literatur

- Adt I, Courtois B, Courtois J. (2000). Increase of the ATP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Sinorhizobium meliloti* (*Rhizobium meliloti*) during hypothermic environmental conditions. *Int J Food Microbiol.* Apr 10;55(1-3):69-72.
- Agard DA. (1984). Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions. *Annu Rev Biophys Bioeng.*;13:191-219.
- Agard DA, Hiraoka Y, Shaw P, Sedat JW. (1989). Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol.*; 30:353-77.
- Arias-Cartin R, Grimaldi S, Pommier J, Lanciano P, Schaefer C, Arnoux P, Giordano G, Guigliarelli B, Magalon A. (2011). Cardiolipin-based respiratory complex activation in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(19):7781-6.
- Arias-Cartin R, Lyubenova S, Ceccaldi P, Prisner T, Magalon A, Guigliarelli B, Grimaldi S. (2010). HYSCORE evidence that endogenous mena- and ubisemiquinone bind at the same Q site (Q(D)) of *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J Am Chem Soc.* 132(17):5942-3.
- Becker A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Bruijn FJ, Fourment J, Francez-Charlot A, Kahn D, Küster H, Liebe C, Pühler A, Weidner S, Batut J. (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact.* (3):292-303.
- Bernstein JA, Khodursky AB, Lin PH, Lin-Chao S, Cohen SN. (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(15):9697-702.
- Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 277(5331):1453-62.
- Boncompagni E, Dupont L, Mignot T, Osteräs M, Lambert A, Poggi MC, Le Rudulier D. (2000). Characterization of a *Sinorhizobium meliloti* ATP-binding cassette histidine transporter also involved in betaine and proline uptake. *J Bacteriol.* 182(13):3717-25.
- Bratton BP, Mooney RA, Weisshaar JC. (2011). Spatial distribution and diffusive motion of RNA polymerase in live *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 193(19):5138-46.
- Bremer, H. & Dennis, P. P. (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell growth rate. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd edn, pp. 1553–1568. Editor by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Bremer H, Dennis P, Ehrenberg M. (2003). Free RNA polymerase and modeling global transcription in *Escherichia coli*. *Biochimie.* 85(6):597-609.
- Cabrera JE, Jin DJ. (2006). Active transcription of rRNA operons is a driving force for the distribution of RNA polymerase in bacteria: effect of extrachromosomal copies of *rrnB* on the *in vivo* localization of RNA polymerase. *J Bacteriol.* 188(11):4007-14.
- Callaghan AJ, Aurikko JP, Ilag LL, Günter Grossmann J, Chandran V, Kühnel K, Poljak L, Carpousis AJ, Robinson CV, Symmons MF, Luisi BF. (2004). Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the *Escherichia coli* ribonuclease RNase E. *J Mol Biol.* 340(5):965-79.
- Callaghan AJ, Marcaida MJ, Stead JA, McDowall KJ, Scott WG, Luisi BF. (2005). Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature.* 437:1187-91.
- Cancedda R, Schlesinger MJ. (1974). Localization of polyribosomes containing alkaline phosphatase nascent polypeptides on membranes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 117(1):290-301.
- Carrington WA, Lynch RM, Moore ED, Isenberg G, Fogarty KE, Fay FS. (1995). Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure. *Science.* 268:1483-7.

- Cebolla A, Vázquez ME, Palomares AJ (1995) Expression vectors for the use of eukaryotic luciferases as bacterial markers with different colors of luminescence. *Appl Environ Microbiol* 61: 660-8.
- Chakraborty A, Kim S, Snyder SH. (2011). Inositol pyrophosphates as mammalian cell signals. *Sci Signal*. 4(188):re1.
- Chao TC, Becker A, Buhrmester J, Pühler A, Weidner S. (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(11):3609-20.
- Chatterji D, Ogawa Y, Shimada T, Ishihama A. (2007). The role of the omega subunit of RNA polymerase in expression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 267(1):51-5.
- Cheng HP, Walker GC. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*. 180:5183-91.
- Choi KH, Kim KJ. (2009). Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J Microbiol Biotechnol*. 19:217-28.
- Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D, Vence LM, Perler FB, Benner J, Kucera RB, Hirvonen CA, Pelletier JJ, Paulus H, Xu MQ. (1997). Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*. 192(2):271-81.
- Cohen SN. (1976). Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*. 263(5580):731-8.
- Courtois J, Courtois B, Guillaume J. (1988). High-frequency transformation of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*. 170(12):5925-7.
- Davidson CJ, Surette MG. (2008). Individuality in bacteria. *Annu Rev Genet*. 42:253-68. Review.
- Davies BW, Walker GC. (2008). A highly conserved protein of unknown function is required by *Sinorhizobium meliloti* for symbiosis and environmental stress protection. *J Bacteriol*. 190(3):1118-23.
- Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci*. 58(1):61-71.
- Deich J, Judd EM, McAdams HH, Moerner WE. (2004). Visualization of the movement of single histidine kinase molecules in live *Caulobacter* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:15921-6.
- de Mendoza, D., Schujman, G. E. & Aguilar, P. S. (2002). Biosynthesis and function of membrane lipids. Kapitel 5 des Buches: *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives: from Genes to Cells, pp. 43–56. Editoren: A. L. Sonenshine, J. A. Hoch & R. Losick. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Donovan WP, Kushner SR. (1986). Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:120-4.
- Dinh T, Bernhardt TG. (2011). Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. *J Bacteriol*. 193(18):4984-7.
- Djordjevic MA, Chen HC, Natera S, Van Noorden G, Menzel C, Taylor S, Renard C, Geiger O, Weiller GF. (2003). *Sinorhizobium* DNA Sequencing Consortium. 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(6):508-24.
- Duke J. (1992). Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Dunn SD, Revington M, Cipriano DJ, Shilton BH. (2000). The b subunit of *Escherichia coli* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*. 32(4):347-55. Review.
- Edidin, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, 257–283.
- Eiamphungporn W, Helmann JD. (2008). The *Bacillus subtilis* sigma(M) regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol Microbiol*. 67(4):830-48.

- Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ. (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 182(14):4068-76.
- Ficht TA, Pei J, Kahl-McDonagh M. (2010). *In vitro* mutagenesis of *Brucella* species. *Methods Mol Biol.* 634: 15-35.
- Finan TM, Weidner S, Wong K, Buhrmester J, Chain P, Vorhölter FJ, Hernandez-Lucas I, Becker A, Cowie A, Gouzy J, Golding B, Pühler A. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(17):9889-94.
- Fleming A. (1932). On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. *J. Pathol. Bacteriol.* 35, 83 1-842.
- Fu X, Shih YL, Zhang Y, Rothfield LI. (2001). The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:980-5.
- Fyfe PK, McAuley KE, Roszak AW, Isaacs NW, Cogdell RJ, Jones MR. (2001). Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. *Trends Biochem Sci.* 26:106–112.
- Gage DJ, Bobo T, Long SR. (1996). Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J Bacteriol.* 178(24):7159-66.
- Galbraith MP, Feng SF, Borneman J, Triplett EW, de Bruijn FJ, Rossbach S. (1998). A functional myo-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology.* 144 ( Pt 10):2915-24.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science.* 293(5530):668-72.
- Gilbertson L. (2003). Cre-lox recombination: Cre-ative tools for plant biotechnology. *Trends Biotechnol.* 21(12):550-5. Review.
- Glazer AN. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. (1989). *J Biol Chem.* 264 (1): 1-4.
- Goodsell DS. *Wie Zellen funktionieren: Wirtschaft und Produktion in der molekularen Welt.* (2010). 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag. ISBN: 9783827424532.
- Goryshin IY, Reznikoff WS. (1998). Tn5 *in vitro* transposition. *J Biol Chem.* 273(13):7367-74.
- Gregory JA, Becker EC, Jung J, Tuwatananurak I, Pogliano K. (2010). Transposon assisted gene insertion technology (TAGIT): a tool for generating fluorescent fusion proteins. *PLoS One.* 5(1):e8731.
- Greif D, Wesner D, Regtmeier J, Anselmetti D. (2010). High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells. *Ultramicroscopy.* 110:1290-6.
- Grotjohann T, Testa I, Leutenegger M, Bock H, Urban NT, Lavoie-Cardinal F, Willig KI, Eggeling C, Jakobs S, Hell SW. (2011). Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. *Nature.* 478(7368):204-8.
- Haim-Vilmovsky L, Gerst JE. (2011). Visualizing endogenous mRNAs in living yeast using m-TAG, a PCR-based RNA aptamer integration method, and fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol.* 714:237-47.
- Hegemann JH, Gldener U, Köhler GJ (2006). Gene disruption in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 313:129-44.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green

- fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(26):12501-4.
- Herring CD, Raffaella M, Allen TE, Kanin EI, Landick R, Ansari AZ, Palsson BØ. (2005). Immobilization of *Escherichia coli* RNA polymerase and location of binding sites by use of chromatin immunoprecipitation and microarrays. *J Bacteriol*. 187(17):6166-74.
- Hiraoka S Matsuzaki H Shibuya I. (1993). Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 336(2):221-4.
- Höper D, Völker U, Hecker M. (2005). Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 87(8):2810-26.
- Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. (1997). Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 18:1217-1242.
- Ito M, Kim YG, Tsuji H, Kiwaki M, Nomoto K, Tanaka R, Okada N, Danbara H. (2010). A practical random mutagenesis system for probiotic *Lactobacillus casei* using Tn5 transposition complexes. *J Appl Microbiol*. 109:657-66.
- Janakiraman A, Slauch JM. (2000). The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 35(5):1146-55.
- Johnson AS, van Horck S, Lewis PJ. (2004). Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 150(Pt 9):2815-24.
- Jormakka M, Törnroth S, Byrne B, Iwata S. (2002). Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science*. 295(5561):1863-8.
- Kaberdin VR, Miczak A, Jakobsen JS, Lin-Chao S, McDowall KJ, von Gabain A. (1998). The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis* sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(20):11637-42.
- Kadner, R. J. (1996). Cytoplasmic membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology 2. Ausgabe, S. 58–87. Editoren: F. C. Neidhardt und andere. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Kawai F, Shoda M, Harashima R, Sadaie Y, Hara H, Matsumoto K. (2004). Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis marburg* membranes. *J Bacteriol*. 186(5):1475-83.
- Kawakami M, Umeda M, Nakagata N, Takeo T, Yamamura K. (2011). Novel migrating mouse neural crest cell assay system utilizing P0-Cre/eGFP fluorescent time-lapse imaging. *BMC Dev Biol*. 11:68.
- Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME. (2002). SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*. 184(12):3159-66.
- Kerppola TK, Kahn ML. (1988) Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. *J Gen Microbiol*. 134(4):913-9.
- Khatti A, Nandy S, Srivastava V. (2011). Heat-inducible Cre-lox system for marker excision in transgenic rice. *J Biosci*. 36(1):37-42.
- Khemici V, Poljak L, Luisi BF, Carpousis AJ. (2008). The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol*. 70(4):799-813.
- Kirchner O, Tauch A. (2003). Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*. 104(1-3):287-99. Review.
- Klumpp S, Hwa T. (2008). Growth-rate-dependent partitioning of RNA polymerases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(51):20245-50.
- Kneen, B. E., and LaRue, T. A. (1988). Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweetclover (*Melilotus alba annua*). *Plant Sci*. 58:177-182.
- Koch B, Jensen LE, Nybroe O. (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or

for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods*. 45:187-95.

Köstner M, Schmidt B, Bertram R, Hillen W. (2006). Generating tetracycline-inducible auxotrophy in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by using an insertion element and a hyperactive transposase. *Appl Environ Microbiol*. 72(7):4717-25.

Kohler PR, Zheng JY, Schoffers E, Rossbach S. (2010) Inositol catabolism, a key pathway in *Sinorhizobium meliloti* for competitive host nodulation. *Appl Environ Microbiol*. 76(24):7972-80.

Kohler PR, Choong EL, Rossbach S. (2011). The RpiR-like repressor IolR regulates inositol catabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*. 193(19):5155-63.

Kormutakova R, Klucar L, Turna J. (2000). DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes. *Biometals*. 13(2):135-9.

Koshy AA, Fouts AE, Lodoen MB, Alkan O, Blau HM, Boothroyd JC. (2010). Toxoplasma secreting Cre recombinase for analysis of host-parasite interactions. *Nat Methods*. 7(4):307-9.

Kühner S, van Noort V, Betts MJ, Leo-Macias A, Batisse C, Rode M, Yamada T, Maier T, Bader S, Beltran-Alvarez P, Castaño-Diez D, Chen WH, Devos D, Güell M, Norambuena T, Racke I, Rybin V, Schmidt A, Yus E, Aebersold R, Herrmann R, Böttcher B, Frangakis AS, Russell RB, Serrano L, Bork P, Gavin AC. (2009). Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science*. 326(5957):1235-40.

Legendijk EL, Validov S, Lamers GE, de Weert S, Bloemberg GV. (2010). Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization *in vitro* and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett*. 305(1):81-90.

Lee AG. (2005). How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach. *Mol Biosyst* 1:203-212.

Lenn T, Leake MC, Mullineaux CW. (2008). Clustering and dynamics of cytochrome bd-I complexes in the *Escherichia coli* plasma membrane *in vivo*. *Mol Microbiol*. 70(6):1397-407.

Lewis PJ, Thaker SD, Errington J. (2000). Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*. 19(4):710-8.

Liou GG, Jane WN, Cohen SN, Lin NS, Lin-Chao S. (2001). RNA degradosomes exist *in vivo* in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(1):63-8.

Liu Q, Li MZ, Leibham D, Cortez D, Elledge SJ. (1998). The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr Biol*. 8(24):1300-9.

Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*. 450(7166):56-62.

Lopez PJ, Marchand I, Joyce SA, Dreyfus M. (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol Microbiol*. Jul;33(1):188-99.

Luirink J, von Heijne G, Houben E, de Gier JW. (2005). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*. 59:329-55. Review.

Luirink J, Yu Z, Wagner S, de Gier JW. (2011). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*.

Ma X, Ehrhardt DW, Margolin W. (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(23):12998-3003.

Mascarenhas J, Weber MH, Graumann PL. (2001). Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *EMBO Rep*. 2(8):685-9.

- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol.* 24(7):841-7.
- McLachlin DT, Bestard JA, Dunn SD. (1998). The b and delta subunits of the *Escherichia coli* ATP synthase interact via residues in their C-terminal regions. *J Biol Chem.* 273(24):15162-8.
- Mealer R, Butler H, Hughes T. (2008). Functional fusion proteins by random transposon-based GFP insertion. *Methods Cell Biol.* 85:23-44.
- Meile JC, Wu LJ, Ehrlich SD, Errington J, Noirot P. (2006). Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. *Proteomics.* 6(7):2135-46.
- Meredith DH, Plank M, Lewis PJ. (2008). Different patterns of integral membrane protein localization during cell division in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 154(Pt 1):64-71.
- Mileykovskaya E, Dowhan W. (2000). Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange. *J Bacteriol.* 182:1172-5.
- Mileykovskaya E, Dowhan W. (2005). Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr Opin Microbiol.* 8(2):135-42. Review.
- Mileykovskaya E, Dowhan W. (2009). Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.* 1788:2084-91.
- Montero Llopis P, Jackson AF, Sliusarenko O, Surovtsev I, Heinritz J, Emonet T, Jacobs-Wagner C. (2010). Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature.* 466(7302):77-81.
- Mukherjee K, Nagai H, Shimamoto N, Chatterji D. (1999). GroEL is involved in activation of *Escherichia coli* RNA polymerase devoid of the omega subunit *in vivo*. *Eur J Biochem.* 266(1):228-35.
- Murphy, D.B. (2001). *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. John Wiley & Sons, N.Y.
- Ma X, Ehrhardt DW, Margolin W. (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(23):12998-3003.
- Nagamori S, Smirnova IN, Kaback HR. (2004). Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J Cell Biol.* 165(1):53-62.
- Natera SH, Guerreiro N, Djordjevic MA. (2000). Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact.* 13(9):995-1009.
- Newman JR, Fuqua C. (1999). Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene.* 227(2):197-203.
- Nishibori A, Kusaka J, Hara H, Umeda M, Matsumoto K. (2005). Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *J Bacteriol.* 187(6):2163-74.
- Nogales J, Muñoz S, Olivares J, Sanjuán J. (2006). *Sinorhizobium meliloti* genes involved in tolerance to the antimicrobial peptide protamine. *FEMS Microbiol Lett.* 264(2):160-7.
- Nomura M. (1999). Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and common principles. *J Bacteriol.* 181(22):6857-64. Review.
- Opalka N, Mooney RA, Richter C, Severinov K, Landick R, Darst SA. (2000). Direct localization of a beta-subunit domain on the three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(2):617-22.
- Osawa M, Erickson HP. (2005). Probing the domain structure of FtsZ by random truncation and insertion of GFP. *Microbiology.* 151(Pt 12):4033-43.
- Peters-Wendisch P, Netzer R, Eggeling L, Sahm H. (2002). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for

- inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60(4):437-41.
- Petzke L, Luzhetskyy A. (2009). *In vivo* Tn5-based transposon mutagenesis of *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83:979-86.
- Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schägger H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* 278(52):52873-80.
- Pfennig N, Wagener S (1986) An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. *J Microbiol Methods* 4: 303-306.
- Pobigaylo N, Wetter D, Szymczak S, Schiller U, Kurtz S, Meyer F, Nattkemper TW, Becker A. (2006). Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol.* 72:4329-37.
- Prein B, Natter K, Kohlwein SD. (2000). A novel strategy for constructing N-terminal chromosomal fusions to green fluorescent protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 485(1):29-34.
- Rajagopalan S, Wachtler V, Balasubramanian M. (2003). Cytokinesis in fission yeast: a story of rings, rafts and walls. *Trends Genet.* 19, pp. 403–408.
- Raskin DM, de Boer PA. (1997). The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. *Cell.* 91: 685-94.
- Ratcliff WC, Denison RF. (2010). Individual-level bet hedging in the bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Curr Biol.* 20(19):1740-4.
- Raux E, Schubert HL, Warren MJ. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *Cell Mol Life Sci.* 57(13-14):1880-93. Review.
- Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. (2003). Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem.* 278(42):41148-59.
- Romantsov T, Helbig S, Culham DE, Gill C, Stalker L, Wood JM. (2007). Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 64(6):1455-65.
- Rott P, Fleites L, Marlow G, Royer M, Gabriel DW. (2011). Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 24:594-605.
- Rubio A, Pogliano K. (2004). Septal localization of forespore membrane proteins during engulfment in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 23:1636-46.
- Rudner DZ, Losick R. (2010). Protein subcellular localization in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000307.
- Russell JH, Keiler KC. (2008). Screen for localized proteins in *Caulobacter crescentus*. *PLoS One.* 3(3):e1756.
- Sabri M, Léveillé S, Dozois CM. (2006). A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology.* 152(Pt 3):745-58.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" 2. Auflage. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 7(6):2087-96.
- Sauer B, Henderson N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(14):5166-70.
- Schlaman HR, Horvath B, Vijgenboom E, Okker RJ, Lugtenberg BJ. (1991). Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *J Bacteriol.* 173(14):4277-87.
- Schneiker-Bekel S, Wibberg D, Bekel T, Blom J, Linke B, Neuweger H, Stiens M, Vorhölter FJ, Weidner S,

- Goesmann A, Pühler A, Schlüter A. (2011). The complete genome sequence of the dominant *Sinorhizobium meliloti* field isolate SM11 extends the *S. meliloti* pan-genome. *J Biotechnol.* 155(1):20-33.
- Shaw KJ, Berg CM. (1979). *Escherichia coli* K-12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5. *Genetics.* 92(3):741-7.
- Shepherd N, Churchward G, Bremer H. (1980). Synthesis and activity of ribonucleic acid polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 141(3):1098-108.
- Shepherd N, Dennis P, Bremer H. (2001). Cytoplasmic RNA Polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183(8):2527-34.
- Sheridan DL, Hughes TE. (2004). A faster way to make GFP-based biosensors: two new transposons for creating multicolored libraries of fluorescent fusion proteins. *BMC Biotechnol.* 4:17.
- Sheridan DL, Berlot CH, Robert A, Inglis FM, Jakobsdottir KB, Howe JR, Hughes TE. (2002). A new way to rapidly create functional, fluorescent fusion proteins: random insertion of GFP with an *in vitro* transposition reaction. *BMC Neurosci.* 3:7.
- Shoab M, Baconnais S, Mechold U, Le Cam E, Lipinski M, Ogryzko V (2008). Multiple displacement amplification for complex mixtures of DNA fragments. *BMC Genomics.* 9: 415.
- Sibarita JB. (2005). Deconvolution microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*; 95:201-43. Review.
- Simon R, Priefer U, Pühler A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for *in vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature Biotechnology* 1:784 - 791.
- Simon R, O'Connell M, Labes M & Pühler A. (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Plant Molecular Biology Volume 118*, 640–659.
- Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R, Wiemann S. (2000). Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep.* 1(3):287-92.
- Streeter J. G. (1987). Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiol.* 85:768–773.
- Stuurman N, Pacios Bras C, Schlaman HR, Wijffes AH, Bloemberg G, Spaink HP. (2000). Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol Plant Microbe Interact.* 13(11):1163-9.
- Taga ME, Walker GC. (2010). *Sinorhizobium meliloti* requires a cobalamin-dependent ribonucleotide reductase for symbiosis with its plant host. *Mol Plant Microbe Interact.* 23(12):1643-54.
- Taghbalout A, Rothfield L. (2007). RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:1667-72.
- Taylor DE. (1999 ). Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* 7(3):111-5.
- Thanbichler M, Shapiro L. (2008). Getting organized--how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol.* 6: 28-40.
- Thomas JD, Daniel RA, Errington J, Robinson C. (2001). Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 39(1):47-53.
- Thompson, E. A., A. E. Kaufman, N. C. Johnston, and H. Goldfine. (1983). Phospholipids of *Rhizobium meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens*: lack of effect of Ti plasmid. *Lipids.* 18: 602-606.
- Tremblay PA, Miller RW. (1984). Cytoplasmic membrane of *Rhizobium meliloti* bacteroids. II. Functional differentiation and generation of membrane potentials. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 62:(7) 592-600.
- Trevors JT. (2012). A perspective on the mobilization, localization and delivery of molecules in the crowded bacterial cytoplasm. *Curr Issues Mol Biol.* 14(2):39-46.
- Trueba FJ, Woldringh CL. (1980). Changes in cell diameter during the division cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 142(3):869-78.



- Tsaftaris A, Pasentzis K, Argiriou A. (2010). Rolling circle amplification of genomic templates for inverse PCR (RCA-GIP): a method for 5'- and 3'-genome walking without anchoring. *Biotechnol Lett.* 32(1):157-61.
- Tsien RY. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67:509-44. Review.
- Urbanus ML, Fröderberg L, Drew D, Björk P, de Gier JW, Brunner J, Oudega B, Luirink J. (2002). Targeting, insertion, and localization of *Escherichia coli* YidC. *J Biol Chem.* 277(15):12718-23.
- van der Laan M, Urbanus ML, Ten Hagen-Jongman CM, Nouwen N, Oudega B, Harms N, Driessen AJ, Luirink J. (2003). A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10):5801-6.
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol.* 172(8):4295-306.
- Vanzo NF, Li YS, Py B, Blum E, Higgins CF, Raynal LC, Krisch HM, Carpousis AJ. (1998). Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* 12:2770-81.
- Vendeville A, Larivière D, Fourmentin E. (2011) An inventory of the bacterial macromolecular components and their spatial organization. *FEMS Microbiol Rev.* 35:395-414.
- Watt RM, Wang J, Leong M, Kung HF, Cheah KS, Liu D, Danchin A, Huang JD. (2007). Visualizing the proteome of *Escherichia coli*: an efficient and versatile method for labeling chromosomal coding DNA sequences (CDSs) with fluorescent protein genes. *Nucleic Acids Res.*;35(6):e37.
- Werner JN, Chen EY, Guberman JM, Zippilli AR, Irgon JJ, Gitai Z. (2009). Quantitative genome-scale analysis of protein localization in an asymmetric bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(19):7858-63.
- Wittenberg JB, Appleby CA, Bergersen FJ, Turner GL. (1975). Leghemoglobin: the role of hemoglobin in the nitrogen-fixing legume root nodule. *Ann N Y Acad Sci.* 244:28-34.
- Xi C, Lambrecht M, Vanderleyden J, Michiels J. (1999). Bi-functional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *J Microbiol Methods.* 35(1):85-92.
- Xiao Z, Zhang N, Murphy DB, Devreotes, PN (1997). Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J. Cell Biol.*, 139, 365-74.
- Yu Y, Bradley A. (2001). Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet.* 2(10):780-90.
- Yurgel SN, Berrocal J, Wilson C, Kahn ML. (2007). Pleiotropic effects of mutations that alter the *Sinorhizobium meliloti* cytochrome c respiratory system. *Microbiology.* 153(Pt 2):399-410.
- Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol.* 39(2):155-8.
- Zeller T, Klug G. (2006). Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften.* 93(6):259-66. Review.
- Zhou M, Bhasin A, Reznikoff WS. (1998). Molecular genetic analysis of transposase-end DNA sequence recognition: cooperativity of three adjacent base-pairs in specific interaction with a mutant Tn5 transposase. *J Mol Biol.* 276(5):913-25.
- Zimmerman SB, Trach SO. (1991). Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 222(3):599-620.
- Zou HS, Yuan L, Guo W, Li YR, Che YZ, Zou LF, Chen GY. (2011). Construction of a Tn5-tagged mutant library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as an invaluable resource for functional genomics. *Curr Microbiol.* 62:908-16.

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	M	Molar
°C	Grad Celsius	μ	mikro
Abb.	Abbildung	ME	“mosaic ends”
Amp	Ampicillin	Min	Minute
AS	Aminosäuren	Mg	Miligramm
BaLM	“bleaching/blinking assisted localization microscopy”	ml	Milliliter
BF	“bright field”, Hellfeld	μM	Mikromolar
BFP	“blue fluorescent protein”	mM	Millimolar
BiFC	“bimolecular fluorescence complementation”	mRFP	“modified red fluorescent protein”
Bp	Basenpaare	mRNA	“Messenger” Ribonukleinsäure
BPB	Bromphenolblau	mg	Milligramm
BSA	“bovine serum albumine”	ml	Milliliter
cDNA	“complementary” DNA	μl	Mikroliter
CDS	“coding DNA sequence”	μm	Mikrometer
CL	Cardiolipin	NA	Numerische Apertur
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	nm	Nanometer
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins	N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	oD	Optische Dichte
DMSO	Dimethylsulfoxid	ORF	“open reading frame”
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
DTT	Dithiothreitol	PALM	“photoactivated localization microscopy”
ECL	“enhanced chemoluminescence”	PBS	Phosphat buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	pH	potentia Hydrogenii
EGFP:	“enhanced green fluorescent protein”	PSF	“point spread function”, Punktspreizfunktion
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>	RNA	Ribonukleinsäure
FACS	“fluorescence activated cell sorting”	rpm	“revolutions per minute”
FRAP	“fluorescence recovery after photobleaching”	RT	Raumtemperatur
FRET	“Förster resonance energy transfer”	rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
g	Erdschwerebeschleunigung	S / Ser	Serin
GFP	“green fluorescent protein”	T	Threonin
Gly	Glycin	Tyr	Tyrosin
H <sub>2</sub> O	Wasser	STED	“stimulated emission depletion”
H	Stunde	STORM	“stochastic optical reconstruction microscopy”
HRP	“horse raddish peroxidase”, Meerrettichperoxidase	Tab.	Tabelle
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	TAE	Tris Acetat EDTA
Kan	Kanamycin	TFB	Transformationspuffer
kB	Kilobasen	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
kDa	Kilo Dalton	YFP	“yellow fluorescent protein”
kV	Kilovolt	Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
LB	Luria Bertani broth	z.B.	Zum Beispiel
L	Leucin		

## **IX Danksagung**

Herrn Prof. Karsten Niehaus danke ich für die Möglichkeit, dieser Doktorarbeit am Lehrstuhl für Proteom- und Metabolomforschung durchführen zu können und stetige Unterstützung und Förderung.

Dem Promotionsstudiengang “Graduate School of Bioinformatics and Genome Research” des Landes NRW, sowie dem Rektorat der Universität Bielefeld danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und nicht nachlassendes Vertrauen in den erfolgreichen Abschluss derer.

Der gesamten Arbeitsgruppe Phytopathologie und den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern für die Begleitung in “guten und in schweren Zeiten” und immer angenehme Zusammenarbeit. Der Arbeitsgruppe “Experimentelle Biophysik” für den Zugang zur Mikroskopiestation.

Meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Abschliessend soll hier aus allem Herzen Dominik Greif gedankt werden. Für alles. Insbesondere Geduld. *“Die Klugen meistern das Leben, die Weisen durchleuchten es und schaffen neue Schwierigkeiten.”* - Emil Nolde, 10. November 1943.

**X Erklärung**

Mit dieser Unterschrift bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Nutzung anderer als angegebener Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die vorliegende Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät oder Universität mit dem Ziel vorgelegt, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften.

Bielefeld, Mai 2012

---