

**Molekularbiologische Charakterisierung des  
ExpG-Proteins aus *Sinorhizobium meliloti*  
und Untersuchungen zur komplexen Regulation  
der *exp*-Genexpression durch  
MucR, PhoB und ExpG**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Birgit Baumgarth**  
aus Bielefeld

Mai 2004

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	1
<b>II</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	2
1.	<b>Globale Regulationsnetzwerke in Bakterien</b> .....	2
2.	<b>Regulatorische Proteine haben verschiedene DNA-Bindemotive</b> .....	2
3.	<b>Bakterielle Exopolysaccharide</b> .....	3
4.	<b>Exopolysaccharide aus <i>S. meliloti</i>: Succinoglycan (EPS I) und Galactoglucan (EPS II)</b> .....	3
5.	<b>Die Biosynthese von Succinoglycan (EPS I)</b> .....	5
6.	<b>Die Biosynthese von Galactoglucan (EPS II)</b> .....	7
7.	<b>Regulation der EPS I und EPS II-Biosynthese in <i>Sinorhizobium meliloti</i></b> ...	9
8.	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	13
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	15
1.	<b>Material</b> .....	15
1.1	<b>Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme</b> .....	15
1.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	15
1.1.2	Enzyme.....	16
1.2	<b>Bakterienstämme und Plasmide</b> .....	17
1.2.1	Bakterienstämme.....	17
1.2.2	Plasmide.....	17
1.3	<b>Phagen</b> .....	19
1.4	<b>Nährmedien und Zusätze</b> .....	19
1.4.1	Nährmedien.....	19
1.4.2	Zusätze.....	20
1.5	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	20
1.5.1	Puffer für Bakterien.....	20
1.5.2	DNA-Puffer.....	20
1.5.3	Puffer für Proteine.....	21
1.5.4	Puffer zur Isolierung und Reinigung von DNA.....	21
1.5.5	Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen.....	22
1.5.6	Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....	23
1.5.7	Puffer für „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSAs).....	23

1.5.8	Puffer und Lösungen für Vakuumblotting und Hybridisierungen.....	23
1.5.9	Lösungen für biochemische Analysen.....	24
1.5.10	Puffer und Lösungen für die Isolierung der His-Tag-Fusionsproteine aus <i>E. coli</i> .....	24
1.5.11	Puffer für die Affinitätschromatographie der His-Tag-Fusionsproteine.....	25
1.5.12	Puffer und Lösungen zur Regenerierung und Äquilibration des Ni-NTA-Harzes.....	25
1.5.13	Puffer und Lösungen für die analytische diskontinuierliche SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE).....	25
1.5.14	Puffer und Lösungen für Immunoblotting-Verfahren.....	26
1.5.15	Puffer für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC).....	27
<b>1.6</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>27</b>
<b>1.7</b>	<b>Primer</b> .....	<b>28</b>
<b>1.8</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>30</b>
<b>1.9</b>	<b>Computerprogramme</b> .....	<b>32</b>
<b>2.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Kultivierung von Bakterienstämmen</b> .....	<b>33</b>
2.1.1	Bakterienanzucht.....	33
2.1.2	Bestimmung des Bakterientiters.....	33
2.1.3	Konservierung von Bakterienstämmen.....	33
<b>2.2</b>	<b>Genetische Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.2.1	Nukleinsäure-Isolierung.....	33
2.2.1.1	HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA.....	34
2.2.1.2	Sequenzierlyse.....	34
2.2.1.3	Plasmid-DNA-Isolierung.....	35
2.2.1.4	Isolierung von Gesamt-DNA.....	35
2.2.2	Reinigung und Darstellung von DNA.....	36
2.2.2.1	Ethanol-fällung von DNA.....	36
2.2.2.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	36
2.2.3	<i>In vitro</i> DNA-Manipulationen.....	36
2.2.3.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	36
2.2.3.2	DNA-Ligation.....	37
2.2.3.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.2.3.4	Reinigung und Klonierung von PCR-Produkten.....	38
2.2.3.5	Reinigung und Aufkonzentrierung der PCR-Produkte durch Microcon- Microkonzentratoren.....	39

2.2.3.6	Aufreinigung von PCR-Produkte aus PCR-Platten.....	39
2.2.3.7	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	40
2.2.3.8	Plasmidintegrations-Mutagenese.....	40
2.2.3.9	Markeraustausch-Mutagenese.....	40
2.2.4	DNA-Transfermethoden.....	41
2.2.4.1	Konjugation.....	41
2.2.4.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	41
2.2.4.3	Allgemeine Transduktion in <i>S. meliloti</i> .....	42
2.2.5	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA).....	42
2.2.5.1	Eingrenzung der Bindestelle durch Konkurrenzexperimente.....	43
2.2.5.2	Bestimmung der Bindungsaffinitäten: on- und off-Raten.....	44
2.2.6	Southern Hybridisierung.....	45
2.2.7	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.....	47
<b>2.3</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>47</b>
2.3.1	Protein-Expression in <i>E. coli</i> und Gesamtproteinextraktion.....	47
2.3.1.1	Expression in <i>E. coli</i> .....	48
2.3.1.2	Zellernte und Gesamtproteinextraktion von cytoplasmatischen Proteinen aus <i>E. coli</i> .....	48
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford-Test.....	49
2.3.3	Analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE).....	49
2.3.3.1	Herstellung der Gele.....	49
2.3.3.2	Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf.....	50
2.3.3.3	Färbung der Proteine und Dokumentation.....	51
2.3.4	Affinitätschromatographie von His-Tag-Fusionsproteinen.....	51
2.3.4.1	Affinitätschromatographie.....	51
2.3.4.2	Regeneration des Ni-NTA-Harzes.....	52
2.3.5	Proteinkonzentrierung und Umpuffern durch Ultrafiltration.....	52
2.3.6	HPLC Gelpermeationschromatographie (GPC) des C-terminalen ExpG- Fusionsproteins.....	52
<b>2.4</b>	<b>Immunologische Methoden</b> .....	<b>52</b>
2.4.1	Immunoblotting-Verfahren (Western-Blot).....	52
2.4.2	Immunologische Detektion geblotteter Proteine.....	53
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>54</b>
1.	<b>Molekularbiologische Charakterisierung des ExpG-Proteins aus <i>Sinorhizobium meliloti</i></b> .....	<b>54</b>

1.1	Heterologe Expression und Aufreinigung des N-terminalen (His) <sub>6</sub> ExpG und des C-terminalen ExpG(His) <sub>6</sub> -Fusionsproteins.....	54
1.1.1	Konstruktion des Expressionssystems für das N-terminale Fusionsprotein (His) <sub>6</sub> ExpG.....	54
1.1.2	Konstruktion des Expressionssystems für das C-terminale Fusionsprotein ExpG(His) <sub>6</sub> .....	56
1.1.3	Heterologe Expression des N-terminalen (His) <sub>6</sub> ExpG- und des C-terminalen ExpG(His) <sub>6</sub> -Fusionsproteins.....	58
1.1.4	Affinitätschromatographische Aufreinigung der Fusionsproteine.....	59
<b>2.</b>	<b>Die <i>expA1</i>-, <i>expG</i>-, <i>expD1</i>- und <i>expE1</i>-Promotorregionen zeigen starke Sequenzhomologien.....</b>	<b>60</b>
<b>3.</b>	<b>Nachweis der Bindung von ExpG an die <i>expA1</i>-, <i>expG/expD1</i>- und <i>expE1</i>-Promotorregionen.....</b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>ExpG bindet spezifisch an die <i>expA1</i>-, <i>expG/expD1</i>- und <i>expE1</i>-Promotorregionen.....</b>	<b>64</b>
<b>5.</b>	<b>Die palindromische Sequenz in den <i>exp</i>-Promotorregionen ist essentiell für die Bindung von ExpG.....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Das C-terminale ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein bildet Protein-Dimere.....</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>Bindungskinetik der ExpG-DNA-Komplexe.....</b>	<b>71</b>
7.1	on-Raten ( $k_{on}$ ) der Bindungsreaktion zwischen dem ExpG(His) <sub>6</sub> -Protein und den einzelnen <i>exp</i> -Promotorfragmenten.....	71
7.2	off-Raten ( $k_{off}$ ) der ExpG(His) <sub>6</sub> -Protein-DNA-Komplexe.....	73
7.3	Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) der ExpG-DNA-Komplexe.....	74
<b>8.</b>	<b>Promotoranalysen.....</b>	<b>75</b>
8.1	Die identifizierten ExpG-Bindestellen in den <i>exp</i> -Promotorregionen überlappen mit den potentiellen PHO Boxen.....	77
8.2	PhoB und ExpG haben einen direkten und MucR einen indirekten regulatorischen Einfluss auf das <i>expA</i> - und <i>expE</i> -Operon.....	79
8.3	Die <i>expG</i> - und <i>expD1</i> -Promotoren zeigen vergleichbare Aktivitäten zu den <i>expA</i> - und <i>expE</i> -Promotorregionen.....	83
<b>V</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>86</b>
<b>1.</b>	<b>Die komplexe Regulation der EPS II-Biosynthese.....</b>	<b>86</b>
1.1	Das ExpG-Protein aktiviert die Transkription der <i>exp</i> -Gene durch direkte Bindung an <i>exp</i> -Promotorregionen.....	88
1.2	Die Interaktion zwischen ExpG und den <i>exp</i> -Promotorregionen stellt eine spezifische Bindung dar.....	88

---

1.3	Die Bindung des ExpG-Proteins an die <i>exp</i> -Promotorregionen erfordert mehr als nur die palindromische Sequenz.....	89
1.4	Die ExpG-DNA-Komplexe zeigen Dissoziationskonstanten, die vergleichbar zu transkriptionellen Regulatoren aus anderen Regulatorprotein-Familien sind...	91
2.	<b>Durch die Analysen der <i>exp</i>-Promotorregionen läßt sich ein hypothetisches Modell für die komplexe Regulation der EPS II-Biosynthese entwickeln.....</b>	<b>92</b>
3.	<b>Perspektiven.....</b>	<b>98</b>
<b>VI ABKÜRZUNGEN.....</b>		<b>99</b>
<b>VII LITERATUR.....</b>		<b>102</b>

## I ZUSAMMENFASSUNG

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung der Funktion des an der Galactoglucan-Biosynthese (EPS II) beteiligten transkriptionellen Aktivators ExpG aus *Sinorhizobium meliloti*. Die EPS II-Biosynthese wird von den *exp*-Genen gesteuert, die als Gencluster auf dem Megaplasmid 2 lokalisiert sind. Das ExpG-Protein zeigt Ähnlichkeiten zu Transkriptionsregulatoren der MarR-Familie, die an die DNA mittels eines *helix-turn-helix* (HTH)-Motivs binden. Das *expG*-Genprodukt weist ein C-terminales HTH-MarR-Motiv auf. Im Rahmen der Untersuchungen wurde ExpG als N-terminales und C-terminales His<sub>6</sub>-Fusionsprotein in *Escherichia coli* heterolog exprimiert. Durch Sequenzvergleich konnte eine AT-reiche, 21 bp umfassende palindromische Kernregion in den Promotorregionen vor dem *expA*-, *expE*- und *expD*-Operon sowie vor dem *expG*-Gen identifiziert werden. Mit Box1 und Box2 wurden zwei weitere Bereiche, die hohe Übereinstimmungen zeigen, stromaufwärts bzw. stromabwärts dieser Kernregion lokalisiert. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung des jeweiligen Fusionsproteins konnte eine direkte Bindung an die *exp*-Promotorregionen nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Transkription der EPS II-Biosynthesegene erfolgt durch die spezifische Bindung von ExpG an die *expA1*- und *expE1*-Promotorregionen sowie an die intergenische Region zwischen *expG* und *expD*. Die palindromische Kernregion ist essentiell für diese Protein-DNA-Interaktion, die aber erst vollständig durch die vermutlich stabilisierende Wirkung der beiden Motive Box1 und Box2 ermöglicht wird. Aus den in dieser Arbeit ermittelten Assoziations- und Dissoziationsraten ließen sich Dissoziationskonstanten für die ExpG-DNA-Komplexe errechnen, die vergleichbar zu transkriptionellen Regulatoren aus anderen Regulatorprotein-Familien sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte durch Promotoranalysen die komplexe Regulation der *exp*-Genexpression durch MucR, PhoB und ExpG weiter aufgeklärt werden. Die Überlappung der ExpG-Bindestellen mit den potentiellen PHO Boxen in den *exp*-Promotorregionen läßt auf ein Zusammenspiel der beiden Regulatoren ExpG und PhoB schließen. Der regulatorische Einfluss von MucR erfolgt vermutlich indirekt über die zusätzlich identifizierte palindromische Sequenz in den *expA1*- und *expE1*-Promotorregionen, die möglicherweise als Bindestelle für ein weiteres regulatorisches Protein fungiert. Basierend auf den Ergebnissen der Aktivitätsstudien der untersuchten Promotorregionen im Wildtyp-, *phoB*-, *mucR*-,  $\Delta G$ - und  $\Delta G$ /*mucR*-Hintergrund ließ sich ein Modell zur komplexen Regulation der Transkription der Galactoglucan-Biosynthesegene sowohl unter Phosphat-suffizienten, als auch unter Phosphat-limitierenden Bedingungen entwickeln. Der transkriptionelle Regulator ExpG kann bei Phosphatmangel und bei ausreichenden Phosphatkonzentrationen zum einen als Aktivator und zum anderen als Repressor auf die potentiellen Promotoren in den *exp*-Promotorregionen wirken. Der reprimierende Einfluss des zentralen Regulators MucR wird sehr wahrscheinlich durch den kooperativen Effekt von PhoB und ExpG unter Phosphat-limitierenden Bedingungen teilweise wieder aufgehoben und es erfolgt die Aktivierung der Galactoglucan-Biosynthese.

## II EINLEITUNG

### 1. Globale Regulationsnetzwerke in Bakterien

Bakterien haben ein komplexes und effizientes System entwickelt um auf ihre Lebensumstände zu reagieren und können somit schnell und wirksam auf Veränderungen in ihrer Umwelt antworten. Sie besitzen die Fähigkeit Aminosäuren aus ihrer Umgebung zu nutzen, können diese aber auch selbst synthetisieren, wenn sie ihnen nicht mehr zur Verfügung stehen. Aus einer Mischung verschiedener Kohlenstoffquellen können sie die energiereichsten abbauen, sowohl anaerob als auch aerob wachsen, gemäßigte DNA-Schäden überleben und mit begrenzten Nährstoffen in ihrer Umwelt auskommen. Bakterien können sich schwankenden Temperaturen und pH-Werten in ihren Lebensräumen anpassen. Trotz der wechselnden Umweltbedingungen und den dadurch ausgelösten Stress sind Bakterien in der Lage die komplexe Koordination von z.B. DNA-Replikation, Zellwachstum und -teilung zu bewältigen. Diese Anpassungen erfolgen häufig durch Veränderungen in der Genexpression.

Das Überleben und die Konkurrenzfähigkeit von Bakterien werden durch ein globales regulatorisches Netzwerk, in das verschiedene einzelne Regulationskreisläufe eingebunden sind, gewährleistet. An diesem Netzwerk sind über das ganze Bakteriengenom verteilte Operons beteiligt, die unterschiedlichste Funktionen übernehmen und koordiniert kontrolliert werden. Ein oder mehrere Operons bilden ein Regulon, das unter der Kontrolle eines regulatorischen Proteins steht. Die Voraussetzung eines allgemeinen Regulators für alle Komponenten eines globalen Netzwerkes lässt darauf schließen, dass allgemeine Erkennungssequenzen für das regulatorische Protein in der jeweiligen zu kontrollierenden DNA-Region eines Operons zu finden sind.

### 2. Regulatorische Proteine haben verschiedene DNA-Bindemotive

Viele regulatorische Proteine kontrollieren Operons mit einem oder mehreren Promotoren, während andere z.B. an der Regulation von katabolische Regulons beteiligt sind oder strukturelle und regulatorische Aufgaben erfüllen. In einigen Fällen haben regulatorische Proteine auch direkten Einfluss auf andere Regulatoren. Ein häufig stattfindender Mechanismus ist z.B. auch die negative Autoregulation.

Die Proteine lassen sich aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten in evolutionäre Familien einteilen. Transkriptionelle Regulatoren binden an die DNA zumeist durch das *helix-turn-helix* (HTH)-Motiv und sind in vielen Protein-Familien, die wiederum eine große Anzahl an Regulatoren aufweisen, zu finden. Sie gehören z.B. zur MarR-, AraC/XylS-, LysR-, MerR- oder LacI/GalR-Familie (Brown et al., 2003; Chapuy-Regaud et al., 2003; Henikoff et al., 1988; Sulavik et al., 1995; Tobes & Ramos, 2002). Bereits Sauer et al. (1982) konnten durch Modell-Studien zeigen, dass das HTH-Motiv ein gemeinsames Merkmal für viele DNA-bindende Proteine ist.

Weitere, wesentlich weniger häufig vorkommende, DNA-Bindemotive sind u.a. das Zinkfingermotiv (Berg, 1990), das *helix-loop-helix* (HLH)-Motiv (Huffman & Brennan, 2002) oder antiparallele  $\beta$ -Faltblätter (de Jong et al., 1998).

### 3. Bakterielle Exopolysaccharide

Die von vielen Bakterien sekretierten Exopolysaccharide (EPS) übernehmen eine besondere Rolle bei der Anpassung an die verschiedenen Umweltbedingungen. Als äußerste Schicht der Zelloberfläche schützen Exopolysaccharide das Bakterium gegen Umwelteinflüsse und unterstützen die Versorgung mit Nährstoffen durch Anheften an Oberflächen, an denen sich Nährstoffe sammeln und durch Binden von Mineralien und Nährstoffen oder sie werden als Antigenitätsfaktoren erkannt (Beveridge & Graham, 1991; Costerton, 1997; Sutherland, 1988; Whitfield, 1988).

Exopolysaccharide haben zusätzlich zu ihrer Schutzfunktion auch eine essentielle Aufgabe in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion (Niehaus & Becker, 1998), wie das Beispiel der intensiv untersuchten Symbiose zwischen dem Gram-negativen Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* und seiner Wirtspflanze Luzerne (*Medicago sativa*) verdeutlicht. Die Ausbildung von Wurzelknöllchen, in denen sich die Bakterien zu Stickstoff-fixierenden Bakteroiden differenzieren, ist charakteristisch für diese Symbiose (De Lajudie et al., 1994).

Sowohl die an der Symbiose beteiligten Teilschritte als auch die Synthese der Exopolysaccharide werden durch ein regulatorisches Netzwerk kontrolliert.

### 4. Exopolysaccharide aus *S. meliloti*: Succinoglycan (EPS I) und Galactoglucan (EPS II)

Das Gram-negative Bodenbakterium *S. meliloti* erlangt in Symbiose mit Pflanzen der Gattungen *Medicago*, *Melilotus* und *Trigonella* die Fähigkeit zur Stickstoff-Fixierung. Die Initiierung dieser Symbiose ist ein hoch spezifischer und komplexer Entwicklungsprozess, in dem beide Partner eine gemeinsame Differenzierung durchmachen. Im frühen Stadium

dieser Interaktion induzieren Flavonoide in den Wurzelexsudaten die Produktion von Nod-Faktoren durch die Bakterien. Diese Nod-Faktoren wiederum lösen ein Entwicklungsprogramm aus, das schließlich zu der Bildung von Wurzelknöllchen führt (Long, 2001; Spaink, 2000). Die Bakterien infizieren die Knöllchen durch Infektionsschläuche und besiedeln dann das Cytoplasma der Pflanze, wo sie zu Stickstoff-fixierenden Bakteroiden differenzieren (Oke & Long, 1999). Oberflächenpolysaccharide, wie z.B. die Exopolysaccharide aus *S. meliloti*, spielen eine wichtige Rolle bei der Bakterien-Pflanzen-Interaktion.

*S. meliloti* ist in der Lage zwei strukturell unterschiedliche Exopolysaccharide zu synthetisieren (Abb. II.1). Succinoglycan (EPS I) ist ein komplex verzweigtes Heteropolysaccharid und besteht aus Oktasacchariduntereinheiten, die jeweils aus sieben Glukose- und einem Galaktosemolekül aufgebaut sind. Die Untereinheiten können durch Acetyl-, Pyruvyl- oder Succinylgruppen dekoriert sein (Reinhold et al., 1994). Das aus alternierenden Glukose- und Galaktose-Molekülen aufgebaute Galactoglucan (EPS II) ist ein unverzweigtes acetyl- und pyruvylsubstituiertes Heteropolysaccharid (Glazebrook & Walker, 1989; Her et al., 1990; Zhan et al., 1989). Beide Exopolysaccharide kommen in einer hochmolekularen (HMW) und einer niedermolekularen (LMW) Form vor (Battisti et al., 1992; Gonzalez et al., 1996; Zevenhuizen & van Neerven, 1983).



**Abb. II.1: Struktur der Exopolysaccharid-Untereinheiten aus *S. meliloti*. A) Succinoglycan (EPS I), die Succinat-Dekoration kann entweder nur an einem oder an beiden Glukoseresten gleichzeitig erfolgen. B) Galactoglucan (EPS II).**

Abkürzungen: Glc, Glukoserest; Gal, Galaktoserest; Ac, Acetylgruppe; Pyr, Pyruvylgruppe; Suc, Succinylgruppe.

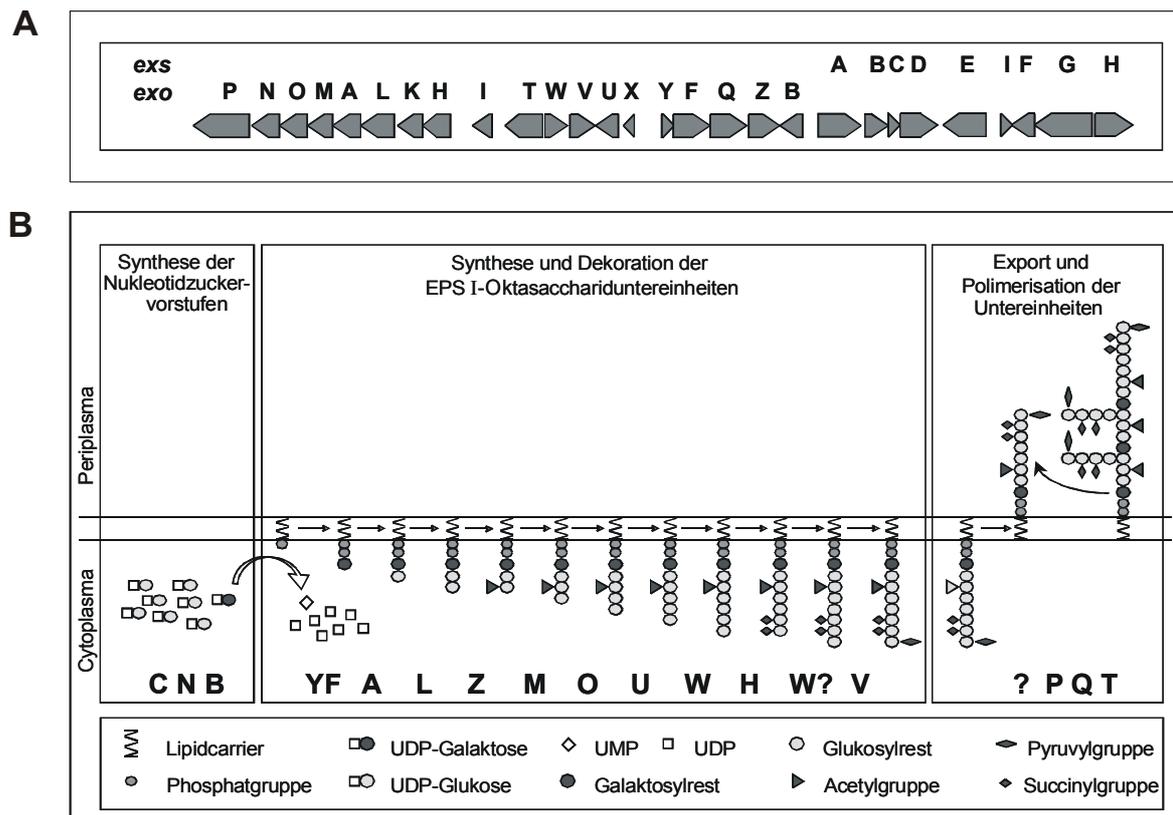
Das HMW EPS I setzt sich aus Polymeren in der Größenordnung zwischen  $10^6$  und  $10^7$  Da zusammen und umfasst ca. 500 bis 5000 Untereinheiten. Das LMW EPS I besteht aus Monomeren, Dimeren und Trimeren der Oktasacchariduntereinheiten (Battisti et al., 1992; Gonzalez et al., 1998), die nicht nur durch *de novo* Biosynthese sondern auch durch spezifische Degradation des HMW EPS I mittels Endoglykanasen entstehen. Eine Erhöhung des osmotischen Drucks im Medium führt zu einer verstärkten Produktion von HMW EPS I zu Lasten von LMW EPS I (Breedveld et al., 1990). Das LMW EPS II besteht aus 12 bis 35 Disacchariduntereinheiten (Gonzalez et al., 1996).

Succinoglycan ist für die Infektion der Wurzelknöllchen von *Medicago sativa* erforderlich, kann aber durch Galactoglucan ersetzt werden, wobei eine spezifische Oligosaccharidform des LMW EPS II die Rolle des Signalmoleküls bei der Infektion übernimmt (Glazebrook & Walker, 1989; Gonzalez et al., 1996; Wang et al., 1999).

## 5. Die Biosynthese von Succinoglycan (EPS I)

Die Biosynthese-Gene des EPS I sind auf einer 36 kb umfassenden Genregion auf dem Megaplasimid 2 lokalisiert, die die bislang identifizierten 28 *exo*- und *exs*-Gene trägt (Abb. II.2) (Becker et al., 1993a; Becker et al., 1993b; Becker et al., 1993c; Becker et al., 1995a; Buendia et al., 1991; Glucksmann et al., 1993a; Glucksmann et al., 1993b; Müller et al., 1993; York & Walker, 1997). Weitere an der EPS I-Biosynthese beteiligte Gene sind auf dem Chromosom lokalisiert (Doherty et al., 1988; Finan et al., 1986; Keller et al., 1995; Reed et al., 1991b; Reed & Walker, 1991; Uttaro et al., 1990; Zhan et al., 1989).

Durch Sequenz- und Mutationsanalysen konnte der EPS I-Biosyntheseweg fast vollständig aufgeklärt werden (Buendia et al., 1991; Leigh et al., 1987; Reuber & Walker, 1993a; Reuber & Walker, 1993b; Uttaro et al., 1990; Becker et al., 1995a; Becker et al., 1995b; Gonzalez et al., 1998). Die Biosynthese des Succinoglycans erfolgt, wie auch die Synthese vieler anderer Heteropolysaccharide, gekoppelt an einen Lipidcarrier, der in der Membran verankert ist. Der Ablauf der Biosynthese kann in drei Teilschritte gegliedert werden (Abb. II.2).



**Abb. II.2: Organisation der *S. meliloti* *exo/exs*-Genregion und Modell der EPS I-Biosynthese. A)** Die Pfeile stellen die Lokalisation und Orientierung der *exo*- und *exs*-Gene dar.

**B)** Schematische Darstellung der EPS I-Biosynthese. Die einzelnen Syntheseschritte werden durch Pfeile symbolisiert. Der Mechanismus der Polymerisation ist hypothetisch und wurde in Anlehnung an das Modell der O-Antigensynthese (Whitfield, 1995) vorgeschlagen. Die Großbuchstaben bezeichnen die *exo*-Genprodukte, die den jeweiligen Syntheseschritt katalysieren. Die verwendeten Symbole sind im unteren Teil der Abbildung erläutert.

Im ersten Teilschritt werden die Nucleotidzuckerdiphosphate UDP-Glukose und UDP-Galaktose unter Beteiligung der Genprodukte des chromosomal lokalisierten *exoC*- sowie des *exoB*- und *exoN*-Gens synthetisiert. Die Phosphoglukomutase ExoC katalysiert die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat in Glukose-1-Phosphat, der Vorstufe für die Synthese von UDP-Glukose durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase ExoN. Die Umwandlung von UDP-Glukose in UDP-Galaktose erfolgt durch die UDP-Glukose-Epimerase-Aktivität von ExoB. Die synthetisierten Nucleotidzuckervorstufen werden auch zum Teil für die Synthese von EPS II und Lipopolysacchariden (LPS) sowie für die Synthese von zyklischen Glukanen benötigt.

Die Synthese und Dekoration der EPS I-Oktasacchariduntereinheiten erfolgt im zweiten Schritt. Durch die Übertragung des Galaktosylrestes auf den Lipidcarrier Undecaprenol, unter Beteiligung von ExoY und ExoF, wird die Synthese initiiert. Die nachfolgenden sieben Glykosylreste werden sukzessive durch die Glukosyltransferasen ExoA, ExoL, ExoM, ExoO, ExoU und ExoW übertragen. Die Dekoration der Oktasacchariduntereinheiten übernehmen

die Proteine ExoZ, ExoH und ExoV durch die Übertragung der Acetyl-, Succinyl- und Pyruvylgruppen.

Im dritten Schritt des EPS I-Biosyntheseweges erfolgt vermutlich der Export der Oktasacchariduntereinheiten ins Periplasma und die nachfolgende Polymerisation der Untereinheiten. An diesem Schritt sind die *exoP*-, *exoQ*- und *exoT*-Genprodukte beteiligt, die jeweils in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Die zugrundeliegenden Mechanismen konnten im einzelnen noch nicht aufgeklärt werden. Mutationen innerhalb dieser Gene zeigten jedoch, dass ExoQ für die Produktion von HMW EPS I von Bedeutung ist. Für ExoT wurde eine Beteiligung an der Synthese und dem Export von Di- und Trimeren der Oktasacchariduntereinheit der LMW EPS I Fraktion vorgeschlagen (Gonzalez et al., 1998). Mutanten in *exoP* verlieren vollständig die Fähigkeit Succinoglycan zu polymerisieren. Monomere der EPS I-Untereinheit werden sowohl von *exoP*, als auch von *exoQ*- und *exoT*-Mutanten sekretiert. Mutationen spezifischer Tyrosinreste in der cytoplasmatischen Domäne von ExoP verschieben das Verhältnis von LMW Succinoglycan zu HMW Succinoglycan (Niemeyer & Becker, 2001).

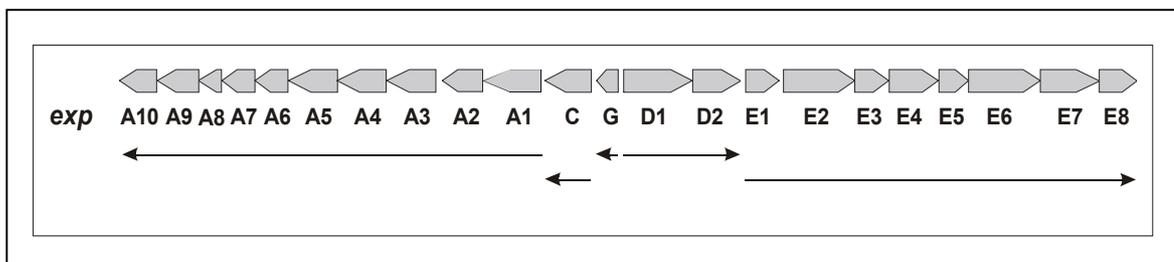
Die Biosynthese von EPS I erfolgt nach einem Mechanismus, der auch für andere Heteropolysaccharide bekannt ist. Der Aufbau der Untereinheiten gekoppelt an einen Lipidcarrier und die nachfolgende blockweise Polymerisation der Untereinheiten, die zu einer am reduzierenden Ende wachsenden Polymerkette führt, ist kennzeichnend für diesen Mechanismus (Becker & Pühler, 1998; Leigh & Walker, 1994; Whitfield, 1995). Dagegen führt ein zweiter für Homopolysaccharide typischer Synthesemechanismus durch prozessive Übertragung der Zuckerreste auf die wachsende Polysaccharidkette zu einem Wachstum des Polymers am nicht-reduzierenden Ende (Becker & Pühler, 1998; Whitfield, 1995).

## 6. Die Biosynthese von Galactoglucan (EPS II)

Die vollständige Sequenzierung eines 32 kb DNA-Fragmentes, das die *exp*-Genregion beinhaltet, führte zur Identifizierung der Biosynthesegene des Galactoglucans (Becker et al., 1997; Rüberg et al., 1999). Diese 22 *exp*-Gene sind in einem 30 kb großen Gencluster auf dem Megaplamid 2 lokalisiert und können in fünf Transkriptionseinheiten zusammengefasst werden: *expA1* bis *expA10*, *expC*, *expG*, *expD1* und *expD2* sowie *expE1* bis *expE8* (Abb. II.3). Auch in die EPS II-Biosynthese sind chromosomal lokalisierte Gene involviert (Glazebrook & Walker, 1989; Keller et al., 1995; Pellock et al., 2002).

Den *exp*-Genen konnten, basierend auf Homologien von *exp*-Genprodukten zu Proteinen mit bekannter Funktion, diverse potentielle Funktionen in der EPS II-Biosynthese zugewiesen

werden. Die Proteine ExpA7, ExpA8, ExpA9 und ExpA10 sind homolog zu Proteinen des dTDP-Rhamnosebiosynthesewegs und könnten an der Synthese von Nukleotidzuckervorstufen beteiligt sein. Mit den Proteinen ExpA2, ExpA3, ExpC, ExpE2, ExpE4 und ExpE7 wurden insgesamt sechs potentielle Glykosyltransferasen identifiziert (Becker et al., 1997). Die zwei Genprodukte ExpD1 und ExpD2 weisen neben Struktur- auch Sequenzähnlichkeiten zu Proteinexportern des Typ I Transportsystems auf und sind für die Sekretion von ExpE1 notwendig (Moreira et al., 2000). Für das ExpE1-Protein, das Homologie zu dem sekretierten NodO-Protein aus *Rhizobium* zeigt, konnte die Fähigkeit zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  nachgewiesen werden. Da im Kulturüberstand von nicht polaren *expD1*-, *expD2*- und *expE1*-Deletionsmutanten kein extrazelluläres EPS II zu finden ist, sind diese drei Gene für die Biosynthese und Sekretion von Galactoglucan essentiell (Moreira et al., 2000). In der ExpE3-Aminosäuresequenz konnten für Methyltransferasen charakteristische Sequenzmotive gefunden werden. Dem *expG*-Genprodukt kann aufgrund seiner Homologie zu transkriptionellen Regulatoren der MarR-Familie eine regulatorische Funktion zugeordnet werden. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine ExpA1, ExpA4, ExpA5, ExpA6, ExpE5, ExpE6 und ExpE8 zeigen keine Homologien zu Proteinen mit bekannten Funktionen. Allein die hohe Übereinstimmung von 47 % identischen Aminosäuren in ExpA4 und ExpA5 lässt darauf schließen das diese beiden Proteine ähnliche Funktionen übernehmen könnten (Becker et al., 1997; Rüberg et al., 1999).



**Abb. II.3: Organisation der *exp*-Genregion.** Die grauen Pfeile stellen die Lokalisation und Orientierung der *exp*-Gene dar. Die Transkriptionseinheiten sind durch schwarze Pfeile markiert.

## 7. Regulation der EPS I- und EPS II-Biosynthese in *Sinorhizobium meliloti*

Auch die Biosynthese der beiden Exopolysaccharide EPS I und EPS II in *S. meliloti* unterliegt einer strengen Regulation. Unter Standardkulturbedingungen konnte bislang nur die Synthese von EPS I nachgewiesen werden. Erst unter Phosphatmangelbedingungen produziert auch der Wildtyp EPS II (Zhan et al., 1991). Eine weitere Möglichkeit zur Induktion der EPS II-Biosynthese ist der sogenannte „Plasmid-Effekt“, hierbei werden zusätzliche Kopien der *exp*-Genregion in den Wildtyp eingebracht (Glazebrook & Walker, 1989; Zhan et al., 1989). Die konstitutive Produktion von EPS II in *S. meliloti* konnte bei einer *mucR*- und bei einer *expR*-Mutante beobachtet werden (Glazebrook & Walker, 1989; Keller et al., 1995).

Durch die Mutation des chromosomal lokalisierten *mucR*-Gens wird die Synthese von EPS II positiv und die von EPS I negativ beeinflusst. Im Kulturüberstand einer *mucR*-Mutante können neben HMW EPS II nur geringe Mengen LMW EPS I nachgewiesen werden (Bertram-Drogatz et al., 1998; Keller et al., 1995; Zhan et al., 1989). MucR stellt somit einen zentralen Regulator für die Biosynthese beider Exopolysaccharide dar (Abb. II.4). Das 15,7 kDa große MucR-Protein zeigt eine 80 %ige Homologie zu den Ros-Proteinen aus *Agrobacterium tumefaciens* (Ros<sub>At</sub>) und *Agrobacterium radiobacter* (Ros<sub>Ar</sub>), die sowohl als Repressor des *virC*- und *virD*-Operons sowie des Isopentanyltransferasegens (*ipt*) als auch als Aktivator der EPS-Produktion fungieren (Brightwell et al., 1995; Chou et al., 1998; Cooley et al., 1991; D'Souza-Ault et al., 1993). Beide Proteine, MucR und Ros, tragen das für DNA-bindende regulatorische Zinkfinger-Proteine charakteristische Zinkfingermotiv. Das *mucR*-Gen und auch die *ros*-Gene werden auf transkriptioneller Ebene negativ autoreguliert (Cooley et al., 1991; Keller et al., 1995). Die Ros-Proteine binden an invers repetitive Sequenzen (*ros*-Box), die in den Promotorregionen des *ros* Gens und der *vir* Gene lokalisiert sind (D'Souza-Ault et al., 1993). Auch vor dem *mucR*-Gen konnte eine *ros*-Box homologe Sequenz identifiziert und die Bindung des MucR-Proteins an diesen Sequenzbereich nachgewiesen werden (Bertram-Drogatz et al., 1997). Eine Bindung von MucR konnte ebenfalls stromaufwärts des *exoH*-Gens und in der intergenischen *exoXY*-Genregion demonstriert werden, obwohl die Transkription der *exo*-Gene durch die *mucR*-Mutation gar nicht oder nur sehr gering beeinflusst wird (Bertram-Drogatz et al., 1998; Cheng & Yao, 2004; Quester & Becker, 2004). Dabei weist nur die Bindestelle zwischen *exoX* und *exoY* eine zur *ros*-Box homologe invers repetitive Sequenz auf. Im Gegensatz zur Transkription der *exo*-Gene im Hintergrund einer *mucR*-Mutante konnte durch zwei *lacZ*-

Transkriptionsfusionen für die *expA*-Komplementationsgruppe ein deutlich positiver Effekt der *mucR*-Mutation auf transkriptioneller Ebene gezeigt werden (Keller et al., 1995).

Zusätzlich zum MucR-Protein konnten noch weitere Gene, deren Genprodukte an der Regulation der EPS I-Biosynthese beteiligt sind, identifiziert werden. Durch das im *exo/exs*-Gencluster lokalisierte *exoX*-Gen wird die Synthese von EPS I negativ reguliert (Müller et al., 1993; Reed et al., 1991a). Eine Mutation im *exoX*-Gen bewirkt eine starke Erhöhung der EPS I-Produktion, während eine verdoppelte *exoX*-Kopienzahl zu einem Ausfall der EPS I-Biosynthese führt. Eine entsprechende Erhöhung der *exoY*-Kopienzahl hebt den negativen *ExoX*-Effekt jedoch wieder auf. Da die Transkription der *exo*-Gene durch *ExoX* nicht beeinflusst wird, wird eine posttranskriptionaler Regulationsmechanismus vorgeschlagen, wobei *ExoX* als Inhibitor von *ExoY*, das als erste Galaktosyltransferase den Aufbau der EPS I-Oktasacchariduntereinheiten initiiert, fungieren könnte (Gray et al., 1990; Gray & Rolfe, 1990).

Eine gesteigerte EPS I-Produktion kann ebenfalls bei Mutationen in den chromosomal lokalisierten *exoR*- und *exoS*-Genen beobachtet werden (Doherty et al., 1988). *ExoR* beeinflusst die Expression der *exo*-Gene auf transkriptioneller Ebene (Cheng & Yao, 2004; Doherty et al., 1988; Quester & Becker, 2004). Eine *exoR*-Mutation stimuliert die EPS I-Produktion, zumindest nach einem Wachstum über 24 Stunden, unabhängig vom Ammoniumgehalt des Mediums (Doherty et al., 1988; Ozga et al., 1994; Reed et al., 1991b). Während Ammoniummangel die EPS I-Produktion stimuliert, synthetisiert die *exoR*-Mutante sowohl unter niedrigen als auch unter hohen Ammoniumkonzentrationen im Medium eine große Menge an EPS I. Im Gegensatz dazu kann die EPS I-Produktion in einer *exoS*-Mutante durch Ammoniummangel noch zusätzlich gesteigert werden (Doherty et al., 1988). *ExoS* beeinflusst dabei ebenfalls die Transkription der *exo*-Gene (Ozga et al., 1994). Das *exoS*-Gen entspricht dem von Østerås et al. (1995) beschriebenen *chvG*-Gen und kodiert gemeinsam mit dem stromaufwärts lokalisierten *chvI*-Gen für ein Zweikomponenten-Regulationssystem (Cheng & Walker, 1998). *ExoS* (*ChvG*) fungiert dabei als Sensorprotein und *ChvI* als *Response* Regulator. Das mutierte *exoS*-Gen (*exoS96::Tn5*) kodiert für ein N-terminal verkürztes *ExoS*-Protein, das wahrscheinlich auch in Abwesenheit seines Stimulus den *Response* Regulator *ChvI* phosphoryliert und somit aktiviert (Cheng & Walker, 1998).

Innerhalb des *exo/exs*-Genclusters konnten mit den Genen *exsB*, *exsI*, *exsG* und *exsF* weitere, möglicherweise an der Regulation der EPS I-Biosynthese beteiligte Gene, identifiziert werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *exsB*-Gens zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen (Becker et al., 1995a). Eine Mutation im *exsB*-Gen führt zu einer verstärkten EPS I-Produktion, während eine Erhöhung der *exsB*-Kopienzahl die EPS I-Synthese reduziert. *ExsB* beeinflusst wahrscheinlich die *exo*-Genexpression auf

posttranskriptionaler Ebene (Becker et al., 1995a). Da das ExsG-Protein Homologien zu Sensorproteinen und ExsF zu *Response* Regulator Proteinen aufweist, kodieren die Gene *exsG* und *exsF* möglicherweise für ein Zweikomponenten-Regulationssystem. Das *exsI*-Genprodukt könnte aufgrund seiner 33 %igen Homologie zu einem regulatorischen Protein aus *Bacillus licheriformis* ebenfalls als Regulator der EPS I-Biosynthese fungieren (A. Becker, Universität Bielefeld, persönliche Mitteilung).

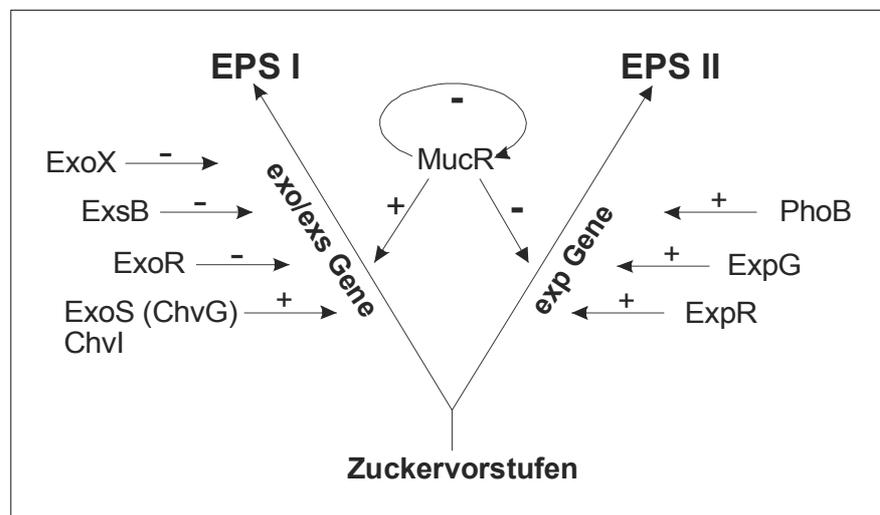
Das *expR*-Genprodukt kann der LuxR-Protein-Familie zugeordnet werden, in der sowohl viele Rezeptoren für *N*-Acylhomoserinlactone (AHLs) als auch Transkriptionsregulatoren für das „Quorum Sensing“ zu finden sind. „Quorum Sensing“ ist die Kontrolle der Expression von Genen in Abhängigkeit der Populations-Zelldichte. Das ExpR-Protein aktiviert abhängig von der Zelldichte die an der EPS II-Biosynthese beteiligten Gene, wobei die von *S. meliloti* detektierte Zelldichte wesentlich geringer als bei vielen anderen „Quorum Sensing“ Systemen ist. Für das *expE*-Operon konnte eine ExpR-abhängige Expression aktiviert durch AHLs festgestellt werden (Pellock et al., 2002). Im Gegensatz zur *mucR*-Mutante produziert die *expR*-Mutante zusätzlich zum HMW EPS II noch LMW EPS II (Gonzalez et al., 1996).

Für das zum *Response* Regulator aus dem Zweikomponenten-Regulationssystem PhoR-PhoB des PHO Regulons in *E. coli* homologe PhoB-Protein konnte eine für die Phosphat-abhängige Regulation essentielle Funktion als Aktivator der *exp*-Genexpression nachgewiesen werden (Rüberg et al., 1999). In der intergenischen *exp*-Genregion konnten Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu der als PHO Box bezeichneten PhoB-Bindungsstelle aus *E. coli* identifiziert werden. Promotoranalysen zeigten, dass jeweils beide Kopien der PHO Box-ähnlichen Sequenz, die stromaufwärts des *expA*- und des *expE*-Operons lokalisiert wurden, für eine Phosphat-abhängige Regulation der Promotoraktivität essentiell sind. Des weiteren lassen die Promotoranalysen auf eine komplexe Regulation der durch Phosphatmangel induzierbaren Expression des *expG*-Gens schließen, an der die zwei potentiellen PHO Boxen in der intergenischen *expD/expG*-Region beteiligt sind (Rüberg et al., 1999).

Aufgrund der Homologie von ExpG zu transkriptionellen Regulatoren der MarR-Familie wird diesem Protein eine regulatorische Funktion zugeschrieben. Unter Phosphatmangelbedingungen ist ExpG essentiell für die Expression eines der Gene des *expE*-Operons (Astete & Leigh, 1996). Des weiteren konnte eine verstärkte Transkription für das *expA*-, *expD*- und *expE*-Operon im Wildtyp-Hintergrund durch zusätzlichen Kopien des *expG*-Gens festgestellt werden (Rüberg et al., 1999). Die Transkription dieser Gene lässt sich durch Phosphatmangelbedingungen noch weiter steigern. Eine Deletion des *expG*-Gens reduziert den stimulierenden Effekt niedriger Phosphatkonzentrationen auf die Transkription der *expA1*- und *expE2-lacZ*-Transkriptionsfusionen (Rüberg et al., 1999). Das ExpG-Protein fungiert als transkriptioneller Aktivator der *exp*-Genexpression. Die Regulatoren MucR und

ExpG sowie PhoB bei Phosphatmangel beeinflussen die Transkription der *exp*-Gene unabhängig voneinander.

Die Exopolysaccharid-Biosynthese in *S. meliloti* wird durch ein komplexes Regulationsnetzwerk kontrolliert, an dem eine große Anzahl regulatorischer Proteine, die auf unterschiedlichen Ebenen die Expression der *exo*- und *exp*-Gene beeinflusst, beteiligt ist (Abb. II.4). Unterschiedliche Umweltbedingungen können auf dieses Regulationsnetzwerk einwirken. Neben dem bereits beschriebenen Effekt von Phosphat- und Ammoniumgehalt des Mediums auf die EPS I- und EPS II-Biosynthese, beeinflussen auch Sulfatgehalt und Osmolarität des Mediums die Produktion von EPS I (Breedveld et al., 1990; Leigh et al., 1985). Die Regulationsmechanismen der verschiedenen Regulatoren und die Mechanismen, die die Perzeption der Umweltreize ermöglichen, sind weitgehend ungeklärt.



**Abb. II.4: Regulation der Exopolysaccharid-Biosynthese in *S. meliloti*.** Die schematische Darstellung beruht auf einem von Leigh et al. (1993) vorgeschlagenen Modell und wurde entsprechend den Beobachtungen von Glazebrook und Walker (1989), Becker et al. (1995a, 1997), Cheng und Walker (1998), Rüberg et al. (1999) und Pellock et al. (2002) modifiziert. Die mit einem (+) markierten Pfeile weisen auf einen aktivierenden und die mit einem (-) markierten Pfeile auf einen reprimierenden Regulationsmechanismus hin.

## 8. Ziele der Arbeit

Für die EPS I-Biosynthese des symbiontischen Bodenbakteriums *S. meliloti* konnte durch intensive genetische und biochemische Analysen ein Biosynthesemodell erstellt werden (Becker et al., 1995a; Becker et al., 1995b; Buendia et al., 1991; Gonzalez et al., 1998; Leigh et al., 1987; Reuber & Walker, 1993a; Reuber & Walker, 1993b; Uttaro et al., 1990). Durch die Identifizierung und Charakterisierung regulatorischer Proteine ist eine große Anzahl der Komponenten des komplexen Regulationsnetzwerkes, das die EPS I-Produktion an die jeweiligen Umweltbedingungen anpasst, bekannt (Becker et al., 1995a; Becker et al., 1997; Cheng & Walker, 1998; Leigh et al., 1993). Die Galactoglucan-Biosynthesegenregion konnte ebenfalls identifiziert werden (Rüberg et al., 1999). Die Regulation der EPS I- und der EPS II-Biosynthese ist bislang jedoch erst wenig erforscht. Die Analyse von MucR (Bertram-Drogatz et al., 1998; Keller et al., 1995; Zhan et al., 1989), ExpR (Pellock et al., 2002) sowie PhoB und ExpG (Astete & Leigh, 1996; Rüberg et al., 1999) bilden einen ersten Ansatz zur Aufklärung des komplexen Regulationsnetzwerkes der Galactoglucan-Biosynthese.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch die molekularbiologische Charakterisierung des ExpG-Proteins, das als transkriptioneller Aktivator der EPS II-Biosynthese fungiert, die Regulation dieser Biosynthese weiter aufzuklären. Da ExpG Homologien zu DNA-bindenden regulatorischen Proteinen der MarR-Familie aufweist, sollte die Bindung an die *exp*-Promotorbereiche nachgewiesen und darüber hinaus die identifizierten ExpG-Bindestellen genauer charakterisiert werden. Die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Genen *mucR*, *expG* und dem Phosphat-abhängigen Regulationssystem PhoR-PhoB sollte darüber hinaus die streng regulierte Galactoglucan-Biosynthese weiter aufdecken.

Im Verlauf der fortgeschrittenen Arbeit sollte durch die Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften im Rahmen des interdisziplinären Sonderforschungsbereiches 613 die Bindung von ExpG an die identifizierten Bindestellen in den *expA*- und *expE*-Promotorregionen sowie der intergenischen *expD/expG*-Region auch auf der Einzelmolekül-Ebene eingehender analysiert werden.

Im folgenden sind die Publikationen aufgeführt, in denen wesentliche Teile dieser Arbeit präsentiert werden.

**Becker, A., Rüberg, S., Baumgarth, B., Bertram-Drogatz, P. A., Quester, I. & Pühler, A. (2002):** Regulation of succinoglycan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4 (3): 187-190. Review.

**Bartels\*, F. W., Baumgarth\*, B., Anselmetti, D., Ros, R. & Becker, A. (2003):** Specific binding of the regulatory protein ExpG to promoter regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of *Sinorhizobium meliloti* – a combined molecular and force spectroscopy investigation. J. Struct. Biol. 143 (2): 145-152.

**Ros, R., Eckel, R., Bartels, F. W., Sischka, A., Baumgarth, B., Wilking, S. D., Pühler, A., Sewald, N., Becker, A. & Anselmetti, D. (2004):** Single molecule force spectroscopy on ligand-DNA complexes: From molecular binding mechanisms to biosensor applications. J. Biotech. (in press)

\* F. W. Bartels und B. Baumgarth haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

## III MATERIAL UND METHODEN

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme

##### 1.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie / Verbrauchsmaterial	Hersteller / Bezugsquelle
40 % Acryl/bisacrylamid (37,5/1)	Amresco
Agar	Gibco
Agarose	Gibco, Roth, SeaKem
Ammoniumpersulfat	Amresco
Antibiotika	Serva, Sigma-Aldrich
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva
Cellulose-Acetat-Filter	Sartorius
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	ICN Biomedicals Inc.
DNA Längenstandard X	Boehringer
dNTP's	Amersham Biosciences
Einwegküvetten	Brand
Eppendorfgefäße	Brand
Ethidiumbromid	Serva
Filterpapier 3 MM	Whatman
Glycin	Bio-Rad
Hefeextrakt	Difco, Oxoid
Hybond-N-Membran	Amersham Biosciences
IPTG	Serva
LMW Gel Filtration Calibration Kit	Amersham Biosciences
Low Profile Multiplate 96 (PCR-Platte)	Biozym
Magermilchpulver	Glücksklee, Lasana
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Microcon YM-30 Mikrokonzentratoren	Millipore
MOPS (Morpholinopropionsäure)	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Ni-NTA Superflow-Harz	Qiagen
Nitrocellulosemembran BioTrace NT	Pall Corporation

<b>Chemikalie / Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
Nucleofast 96er PCR-Aufreinigungsplatten	Macherei-Nagel
Oligonukleotide	Qiagen-Operon, Sigma-Aldrich, ARK Scientific
ONPG	Serva
Parafilm	American National
PCR Softstrips	Biozym
Penassay Broth	Oxoid
PE-Röhrchen (12 und 50 ml)	Greiner
Petrischalen	Greiner
Phenol	Roth
Pipettierspitzen	Greiner
Polycarbonat-UZ-Röhrchen	Beckmann
Ponceau-S	Sigma-Aldrich
Prestained SDS-PAGE Standard (broad range)	Bio-Rad
Protein-Assay (Bradford-Farbstoffkonzentrat)	Bio-Rad
Proteinmarker VII-L	Sigma-Aldrich
Spritzen	Becton-Dickinson
TEMED	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Serva
Trypton	Difco; Oxoid
Tween 20	Serva
Ultrafree-4 Konzentratoren	Millipore
UVette®, Einwegküvette zur DNA-Konzentrationsbestimmung	Eppendorf
X-Gal	Biomol

Weitere Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen.

### 1.1.2 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
DNase I	Serva
DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	Boehringer
Lysozym	Serva
Pronase E	Serva
RNase A	Serva
Restriktionsendonukleasen und -Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, New England Biolabs, Boehringer
<i>Pwo</i> DNA Polymerase	Boehringer
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen
T4 DNA Ligase	Boehringer

## 1.2 Bakterienstämme und Plasmide

### 1.2.1 Bakterienstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz / Herkunft
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
XL1-Blue	<i>recA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ] <i>thi</i>	Bullock et al., 1987
DH5α	<i>recA1 ΔlacU169 φ80dlacZΔM15</i>	Bethesda Research Laboratories
S17-1	<i>E. coli</i> 294, <i>thi</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integriert in das Chromosom	Simon et al., 1983
M15[pREP4]	Nal <sup>s</sup> Str <sup>s</sup> Rif <sup>s</sup> <i>thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>+</sup> gal<sup>-</sup> Mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>-</sup> uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup></i>	Gottesman et al., 1981
SURE	<i>e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyr96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i>]</i>	Stratagene
<b><i>Sinorhizobium meliloti</i></b>		
Rm2011	Wildtyp, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> Inf <sup>+</sup> Cfw <sup>+</sup> Nx <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	Casse et al., 1979
Rm101	Rm2011, Insertion der Spc <sup>r</sup> -Kassette aus pHP45Ω in die <i>PmaCI</i> Schnittstelle von <i>mucR</i> ( <i>mucR101-Spc</i> )	Becker et al., 1997
RmH406	Ω <i>phoB3::Tn5-132</i>	T. M. Finan
SmSRΔG	Rm2011 mit Deletion des <i>expG</i> Gens, 490 Nukleotide des 3'-Terminus des <i>expG</i> Gens und 17 Nukleotide stromabwärts des <i>expG</i> Gens umfassend	Rüberg et al., 1999
SmBBΔG101	Rm 2011 mit Deletion des <i>expG</i> Gens, 490 Nukleotide des 3'-Terminus des <i>expG</i> Gens und 17 Nukleotide stromabwärts des <i>expG</i> Gens umfassend und Insertion der Spc <sup>r</sup> -Kassette aus pHP45Ω in die <i>PmaCI</i> Schnittstelle von <i>mucR</i> ( <i>ΔGmucR101-Spc</i> )	diese Arbeit

### 1.2.2 Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz / Herkunft
pARIIa	4,249 kb <i>EcoRI</i> - <i>BglIII</i> -Fragment der <i>exp</i> -Genregion kloniert in pUC19	Becker, et al., 1997
pARIV	4,973 kb <i>BglIII</i> - <i>HindIII</i> -Fragment der <i>exp</i> -Genregion kloniert in pUC19	Becker et al., 1997

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz / Herkunft
pEXP2	Expressionsvektor	MBBL
pBBPPA1-6	0,163 kb Fragment mit indirekt MucR-abhängiger Region und proximaler PHO Box vor <i>expA1</i> kloniert in pSRPP18	diese Arbeit
pBBPPE1-6	0,184 kb Fragment mit unvollständiger MucR-abhängiger Region und proximaler PHO Box vor <i>expE1</i> kloniert in pSRPP18	diese Arbeit
pBBPPG5-6	0,197 kb Fragment mit 5'-Bereich von <i>expD1</i> und 65 bp intergenischer Region <i>expD-expG</i>	diese Arbeit
pHisG4032	573 bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III- <i>expG</i> Fragment kloniert in pWH844; kodiert für (His) <sub>6</sub> ExpG	diese Arbeit
pHisGC31	567 bp <i>Eco</i> RI- <i>Ecl</i> 136II- <i>expG</i> Fragment kloniert in pEXP2, kodiert für ExpG(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pSRPP18	Promotor-Testvektor, pK18mob-Derivat, promotorlose lacZ-Transkriptionsfusionskassette aus pAB10002, Km <sup>r</sup>	Rüberg, 1999
pSRPPA1-2	0,144 kb Fragment mit proximaler PHO Box vor <i>expA1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPA3-4	0,181 kb Fragment mit distaler PHO Box vor <i>expA1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPA1-4	0,301 kb Fragment mit beiden PHO Boxen vor <i>expA1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPE1-4	0,217 kb Fragment mit proximaler PHO Box vor <i>expE1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPE3-5	0,131 kb Fragment mit distaler PHO Box vor <i>expE1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPE1-5	0,326 kb Fragment mit beiden PHO Boxen vor <i>expE1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPG1-3	0,132 kb Fragment mit PHO Box vor <i>expG</i> und halber PHO Box vor <i>expD1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPG1-4	0,158 kb Fragment mit PHO Box vor <i>expG</i> und PHO Box vor <i>expD1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPD1-2	0,242 Fragment mit PHO Box vor <i>expD1</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pSRPPD1-3	0,169 Fragment mit PHO Box vor <i>expD1</i> und PHO Box vor <i>expG</i> kloniert in pSRPP18	Rüberg, 1999
pUC18	Sequenziervektor/lacZ $\alpha$ , Ap <sup>r</sup>	Yanisch-Perron et al., 1985
pWH844	His-Tag Expressionsvektor	Schirmer et al., 1997

## 1.3 Phagen

Für die Transduktionen wurde der allgemein transduzierende Phage  $\Phi$ M12 (Finan et al., 1984) eingesetzt.

## 1.4 Nährmedien und Zusätze

### 1.4.1 Nährmedien

Die Medien werden, sofern nicht anders vermerkt, mit demineralisiertem Wasser ( $H_2O_{MP}$ ; Milli-Q® Water Purification System; Millipore) angesetzt und autoklaviert.

<u>PA-Medium</u> (Penassay Broth)	17,5 g/l	Penassay Broth
<u>LB(G)-Medium</u> (Luria-Bertani Broth)	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	(1 g/l	Glucose)
<u>SB-Medium</u> (Superbroth)	32 g/l	Trypton
	20 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
		pH 7,5
<u>TY-Medium</u> (Tryptone-Yeast)	5 g/l	Trypton
	3 g/l	Hefeextrakt
	0,4 g/l	CaCl <sub>2</sub>
<u>MOPS-Medium</u>	50 mM	MOPS
	55 mM	Mannitol
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,25 mM	CaCl <sub>2</sub>
	19 mM	Natriumglutamat
	0,004 mM	Biotin
		pH 7,4
	0,1 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		oder
	2 M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

### 1.4.2 Zusätze

- Agar  
Zur Herstellung von Festmedien werden 15 g/l Agar Flüssigmedium zugesetzt.
- X-Gal/IPTG  
Für die  $\alpha$ -Komplementation wurden 20 mg X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid) und 20 mg IPTG (Isopropylthiogalaktosid) pro Liter Medium zugesetzt.
- IPTG zur Induktion bei der Proteinüberexpression  
1 M Lösung, sterilfiltriert.
- Antibiotika

Substanz	Konzentration [mg/l] für <i>E. coli</i> -Anzucht	Konzentration [mg/l] für <i>S. meliloti</i> -Anzucht
Ampicillin (Ap)	100, 200	-
Chloramphenicol (Cm)	50	-
Gentamicin (Gm)	10	40, 30
Kanamycin (Km)	25-50	-
Nalidixinsäure (Nx)	-	8
Neomycin (Nm)	-	120
Oxytetracyclin (OxyTc)	-	0,5
Spectinomycin (Spc)	-	200
Streptomycin (Sm)	-	600
Tetracyclin (Tc)	-	10

## 1.5. Puffer und Lösungen

### 1.5.1 Puffer für Bakterien

<u>PS</u> (Puffersaline)	7 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5 g/l	NaCl

### 1.5.2 DNA-Puffer

<u>TE-Puffer</u>	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA

<u>TES-Puffer</u>	50	mM	Tris
	5	mM	EDTA
	50	mM	NaCl
			pH 7,5

### 1.5.3 Puffer für Proteine

<u>Proteinaufbewahrungspuffer</u>	250	mM	NaCl
	10	mM	Tris
	1	mM	Dithiothreitol
	50%	(v/v)	Glycerin

### 1.5.4 Puffer zur Isolierung und Reinigung von DNA

<u>P1-Puffer</u>	50	mM	Tris-HCl
	10	mM	EDTA
	0,1	g/ml	RNase A
			pH 8,0

<u>P2-Puffer</u>	200	mM	NaOH
	1%	(w/v)	SDS

<u>P3-Puffer</u>	3	M	K-Acetat
			pH 4,8

<u>QBT-Äquilibriumspuffer</u>	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS
	15%	(v/v)	Ethanol
	0,15%	(v/v)	Triton X-100
			pH 7

<u>QC-Waschpuffer</u>	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS
	15%	(v/v)	Ethanol
			pH 7

<u>QF-Elutionspuffer</u>	1,25	M	NaCl
	50	mM	MOPS
	15%	(v/v)	Ethanol
			pH 8,2

<u>QX1-Puffer</u>	4	M	NaClO <sub>4</sub>
	3	M	NaI
	10	mM	Tris-HCl
	0,1%	(v/v)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
			pH 7

<u>QX2-Puffer</u>	8	M	NaClO <sub>4</sub>
	10	mM	Tris-HCl pH 7
<u>QX3-Puffer</u>	100	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl
	70%	(v/v)	Ethanol

### 1.5.5 Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen

<u>10 x TA-Restriktionspuffer</u>	330	mM	Tris-Acetat
	660	mM	K-Acetat
	5	mM	DTT
	100	mM	Mg-Acetat
	1	mg/ml	BSA pH 7,9 mit Eisessig einstellen
<u>10 x One-Phor-All-Puffer</u>	100	mM	Tris-Acetat
	100	mM	Mg-Acetat
	500	mM	Na-Acetat pH 7,5
<u>10 x Klenow-Puffer</u>	100	mM	Tris-HCl
	50	mM	MgCl <sub>2</sub>
	75	mM	DTT pH 7,5
<u>10 x Ligationspuffer</u>	660	mM	Tris-HCl
	50	mM	MgCl <sub>2</sub>
	10	mM	ATP
	10	mM	DTE pH 7,5
<u>PCR-dNTP-Mix</u>	10	mM	dATP
	10	mM	dTTP
	10	mM	dCTP
	10	mM	dGTP
<u>10 x Pwo-Puffer</u>	100	mM	Tris-HCl
	250	mM	KCl
	50	mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	20	mM	MgSO <sub>4</sub> pH 8,85

<u>10 x Taq-Puffer (Qiagen)</u>	?		Tris-HCl
	?		KCl
	?		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	15	mM	MgCl <sub>2</sub>
			pH 8,7

### 1.5.6 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

<u>TA-Puffer</u>	40	mM	Tris-Acetat
	10	mM	Na-Acetat
	1	mM	EDTA
			pH 7
<u>DNA-Ladepuffer</u>	10	ml	TA-Puffer
	80	ml	Glycerin
	2,5	g	Bromphenolblau
<u>Ethidiumbromid-Färbelösung</u>	1	mg/l	Ethidiumbromid

### 1.5.7 Puffer für „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSAs)

<u>10 x Reaktionspuffer</u>	500	mM	Tris-HCl
	1	M	NaCl
	1	mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,5	mg/ml	Heringsperma-DNA
	5	mg/ml	Rinderserumalbumin
			pH 8
<u>TA-Puffer</u>	40	mM	Tris-Acetat
	10	mM	Na-Acetat
	1	mM	EDTA
			pH 7,8
<u>DNA/Protein-Ladepuffer</u>	77	%(v/v)	Glycerin in Elektrophoresepuffer

### 1.5.8 Puffer und Lösungen für Vakuumblotting und Hybridisierungen

<u>Depurinierungslösung</u>	0,25	M	HCl
<u>Denaturierungslösung</u>	0,5	M	NaOH
	1,5	M	NaCl
<u>Neutralisierungslösung</u>	1	M	Tris-HCl
	2	M	NaCl
			pH 5

<u>20 x SSC</u>	3	M	NaCl
	0,3	M	Na-Citrat
<u>(Vor)-Hybridisierungslösung</u>	5	x	SSC
	0,1	% (v/v)	N-Lauroylsarkosin
	0,02	% (w/v)	SDS
	1	% (w/v)	Blocking-Reagenz
<u>Waschpuffer 1</u>	2	x	SSC
	0,1	% (w/v)	SDS
<u>Waschpuffer 2</u>	0,1	x	SSC
	0,1	% (w/v)	SDS
<u>Detektionspuffer 1</u>	100	mM	Tris-HCl
	150	mM	NaCl
			pH 7,5
<u>Detektionspuffer 2</u>	1	% (w/v)	Blocking-Reagenz in Detektionspuffer 1
<u>Detektionspuffer 3</u>	100	mM	Tris-HCl
	100	mM	NaCl
	50	mM	MgCl <sub>2</sub>
			pH 9,5
<u>Färbelösung für die immunologische Detektion</u>	10	ml	Detektionspuffer 3
	45	µl	NBT (Nitroblau-Tetrazolium)
	35	µl	X-Phosphat (5-Brom-4-Chlor- Indolylphosphat-Toluidin)

### 1.5.9 Lösungen für biochemische Analysen

<u>Z-Puffer</u>	60	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	40	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10	mM	KCl
	1	mM	MgSO <sub>4</sub>
	50	mM	β-Mercaptoethanol

### 1.5.10 Puffer und Lösungen für die Isolierung der His-Tag-Fusionsproteine aus *E. coli*

<u>Aufschlusspuffer</u>	25%	% (w/v)	Saccharose
	50	mM	Tris-HCl
	100	mM	NaCl pH 8

<u>LysozymbLösung</u>	20 mg/ml	Lysozym	Frisch in Aufschlusspuffer ansetzen.
<u>Triton X-100-Lösung</u>	0,1 % (v/v)	Triton	
<u>DNase I-Lösung</u>	4 mg/ml	DNase I	
	59 % (v/v)	Glycerin	In 50 mM Tris-HCl, pH 8 ansetzen, Lagerung bei -20°C.
<u>RNase A-Lösung</u>	10 mg/ml	RNase A	
	50 mM	Tris-HCl	
	50 mM	NaCl	
		pH 8	
			Lagerung bei 4°C.

### 1.5.11 Puffer für die Affinitätschromatographie der His-Tag-Fusionsproteine

<u>Waschpuffer I</u>	50 mM	Tris-HCl	
	300 mM	NaCl	
	1 % (v/v)	Glycerin	pH 7,5
<u>Waschpuffer II</u>	100 mM	Tris-HCl	
	500 mM	NaCl	pH 8,9
<u>Imidazol-Lösung</u>	1 M	Imidazol in Waschpuffer II	

### 1.5.12 Puffer und Lösungen zur Regenerierung und Äquilibrierung des Ni-NTA-Harzes

<u>EDTA-Lösung</u>	100 mM	EDTA
<u>NiCl<sub>2</sub>-Lösung</u>	100 mM	NiCl <sub>2</sub>
<u>Aufschlusspuffer</u>	siehe III.1.5.10	

### 1.5.13 Puffer und Lösungen für die analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE)

<u>Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (40%)</u>	Acrylamid/N,N'-Methylen-Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 zu 1
---	--

<u>4 x Trenngelpuffer</u>	1,5	M	Tris-HCl
	0,4	% (w/v)	SDS
			pH 8,8
<u>4 x Sammelgelpuffer</u>	500	mM	Tris-HCl
	0,4	% (w/v)	SDS
			pH 6,8
<u>10 x SDS-Elektrophoresepuffer</u>	250	mM	Tris
	1,92	M	Glycin
	1	% (w/v)	SDS
			pH 8,2 - 8,4 (nicht einstellen)
<u>APS-Lösung</u>	10	% (w/v)	Ammoniumpersulfat
<u>TEMED-Lösung</u>	10	% (v/v)	Tetramethylethylendiamin
<u>Proteingel-Ladepuffer (PBJR), reduzierend</u>	100	mM	Tris
	200	mM	DTT
	4	% (w/v)	SDS
	0,2	% (w/v)	Bromphenolblau
	20	% (v/v)	Glycerin
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	2	g	Coomassie Brilliant Blue R 250
	475	ml	Ethanol
			rühren bis Coomassie gelöst ist,
	425	ml	H <sub>2</sub> O
	100	ml	konz. Essigsäure
			rühren, Rückstand abfiltrieren.
<u>Proteingel-Entfärbelösung</u>	210	ml	Ethanol
	510	ml	H <sub>2</sub> O
	80	ml	konz. Essigsäure

#### 1.5.14 Puffer und Lösungen für Immunoblotting-Verfahren

<u>Towbin-Transferpuffer</u>	48	mM	Tris
	39	mM	Glycin
	0,04	% (w/v)	SDS
	20	% (v/v)	Methanol
			pH 8,2 - 8,4 (nicht einstellen)
<u>Ponceau S-Lösung</u>	0,2	% (w/v)	Ponceau S
	3	% (v/v)	Trichloressigsäure

<u>10 x PBS-Puffer</u>	1,4	M	NaCl
	27	mM	KCl
	10	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	18	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
<u>10 x TBS-Puffer</u>	200	mM	Tris-HCl
	1,5	M	NaCl pH 7,5
<u>Blockingpuffer</u>	1	x	PBS-Puffer
	5	% (w/v)	Magermilchpulver
<u>Immunpuffer</u>	1	x	TBS-Puffer
	0,3	% (w/v)	Magermilchpulver
<u>Entwickler-Lösung</u>	15	ml	TBS-Puffer
	10	mg	Diaminobenzidin (DAB)
	12	µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30% in H <sub>2</sub> O

### 1.5.15 Puffer für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

<u>HPLC-Gelfiltrationspuffer</u>	50	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	50	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7

## 1.6 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-His6-Antikörper aus Mäusen	Eurogentec, Belgien
Anti-Maus IgG, Meerrettichperoxidase-konjugierter Spezies-spezifischer Antikörper aus Kaninchen	Sigma-Aldrich

## 1.7 Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
universal M13 universal M13-SH	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Sequenzierung; PCR-Primer 5'-SH modifiziert
universal-b	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG	PCR-Primer, 5'-Biotin modifiziert
reverse M13 reverse M13-SH	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	Sequenzierung; PCR-Primer 5'-SH modifiziert
HisG3	AAAAAGCTTCATGTTACCGCCCTTGCTCG	PCR-Primer zur Amplifikation des expG Gens, flankiert von einer <i>HindIII</i> -Schnittstelle
HisG5	AAAAGGATCCATGAACCACAGGATACTCTATCCGT	PCR-Primer zur Amplifikation des expG Gens, flankiert von <i>BamHI</i> -Schnittstelle
expG.EXP2.5	AAAAGAATTCAAACCACAGGATACTCTATCCG	PCR-Primer zur Amplifikation des expG Gens, flankiert von einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
HisG.EXP2.3	AAAAGAGCTCTCA[GTGATGGTGATGGT] [GATG]GATGCCGTAGCGTGCGGC	PCR-Primer zur Amplifikation des expG Gens, flankiert von [6 Histidin-Codons], einem <b>Stop-Codon</b> und einer <i>Ecl136II</i> -Schnittstelle
expGint	TCTCCTATTATCTGAAGCAG	Sequenzierung
expGCterm1	AGCTTCGTCAGTTCCGCAC	Sequenzierung
expGCterm2	GCAGCGTGACAAGCGTTC	Sequenzierung
mucR1	TTTTGTACATCCTCCCCCTG	Sequenzierung
mucR2	CCACTTGTCGCGGTATTCTT	Sequenzierung
PSeq1	GGAGCTCGAACAGAAGGCAG	PCR-Primer
lacZGm2	TTGAGGGGACGACGACAGTAT	PCR-Primer
A1 A1-Cy3 A1-SH A1- <i>BamHI</i>	CATCAACTCTTGCACGCAGC  AAAGGATCCCATCAACTCTTGCACGCA GC	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expA1</i> -Promotorregion 5'-Cy3 modifiziert 5'-SH modifiziert flankiert von einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle
A2	CAAGAATCTATTGTTGTGCA	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expA1</i> -Promotorregion
A3 A3-SH	GCACAACAATAGATTCTTGG	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expA1</i> -Promotorregion 5'-SH modifiziert
A4 A4-Cy3 A4-SH	CAGAACGGTCGAACAGAGGT	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expA1</i> -Promotorregion 5'-Cy3 modifiziert 5'-SH modifiziert

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
A5	AACGCAGTTTGTCTGAATAT	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expA1</i> -Promotorregion
A6	AAAGGTACCTAAATACCGGGTAAAGCC CC	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expA1</i> -Promotorregion, flankiert von einer <i>KpnI</i> -Schnittstelle
G1	TCTCCATTGGGAACGTA	PCR-Primer zur Amplifikation der intergenischen Region <i>expD-expG</i>
G1-SH		5'-SH modifiziert
G4	CTGGTCCAGATTCACTCAA	PCR-Primer zur Amplifikation der intergenischen Region <i>expD-expG</i>
G4-Cy3		5'-Cy3 modifiziert
G5	AAAGGTACCATAAAGAAGCGTCACGAC GAA	PCR-Primer zur Amplifikation der intergenischen Region <i>expD-expG</i> , flankiert von einer <i>KpnI</i> -Schnittstelle
G6	AAAGGATCCTTTGAGTGAATCTGGACC AG	PCR-Primer zur Amplifikation der intergenischen Region <i>expD-expG</i> , flankiert von einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle
E1	AAAGTGGCCATCTGCTTCTC	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expE1</i> -Promotorregion
E1-Cy3		5'-Cy3 modifiziert
E1-SH		5'-SH modifiziert
E1- <i>BamHI</i>	AAAGGATCCAAGTGGCCATCTGCTTC TC	flankiert von einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle
E3	AAACATATCTCCATGCTGTG	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expE1</i> -Promotorregion
E3-SH		5'-SH modifiziert
E4	TCCGTCAGAATTACTCCTAA	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expE1</i> -Promotorregion
E5	CAGTCTCCGACAGTTTCAAC	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expE1</i> -Promotorregion
E5-Cy3		5'-Cy3 modifiziert
E5-SH		5'-SH modifiziert
E6	AAAGGTACCCAATATTGGCACAGCATG GA	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>expE1</i> -Promotorregion, flankiert von einer <i>KpnI</i> -Schnittstelle

## 1.8 Oligonukleotide

Bezeichnung / Orientierung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
KofraA1cH sense	<u>AGCT</u> GCGAAAGAAACGCAGTTTGTCTGA ATATTGCTTCAATTTTTGAAGTATAAATAC CGGGTAAAGCCCCA	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraA1cR antisense	<u>AATT</u> TGGGGCTTTACCCGGTATTTATACT TCAAAAATTGAAGCAATATTCAGACAAAC TGCGTTTCTTTTCGC	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>EcoRI</u> -Überhang
KofraA1dH sense	<u>AGCT</u> ITGTCTGAATATTGCTTCAATTTTTG AAG	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraA1dR antisense	<u>AATT</u> CTTCAAAAATTGAAGCAATATTCAG ACA	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>EcoRI</u> -Überhang
KofraA1eH sense	<u>AGCT</u> GCGAAAGAAACGCAGTTTGTCTGA ATATTGCTTCAATTTTTGAAGTATAAATAC CGGGTAAAGCCCCAAGAATCTATTGT	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraA1eR antisense	<u>AATT</u> ACAATAGATTCTTGGGGCTTTACCC GGTATTTATACTTCAAAAATTGAAGCAAT ATTCAGACAAACTGCGTTTCTTTTCGC	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>EcoRI</u> -Überhang
KofraA1fH sense	<u>AGCT</u> GCGAAAGAAACGCAGTTTGTCTGA ATATTGCTTCGGTTTAAACAAGTATAAATA CCGGGTAAAGCCCCAAGAATCTATTGT	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraA1fR antisense	<u>AATT</u> ACAATAGATTCTTGGGGCTTTACCC GGTATTTATACTTGTTAAACCGAAGCAAT ATTCAGACAAACTGCGTTTCTTTTCGC	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>EcoRI</u> -Überhang
KofraA1gH sense	<u>AGCT</u> GCGAAAGAAACGTAGTTTGTCTGA ATATTGCTTCAATTTTTGAAGTATAAATAC CGGGTAAAGCCCCAAGAATCTATTGT	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraA1gR antisense	<u>AATT</u> ACAATAGATTCTTGGGGCTTTACCC GGTATTTATACTTCAAAAATTGAAGCAAT ATTCAGACAAACTACGTTTCTTTTCGC	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>EcoRI</u> -Überhang

Bezeichnung / Orientierung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
KofraA1hH  sense	<u>AGCT</u> GCGAAAGAAACGCAGTTTGTCTGA ATATTGCTTCAATTTTTGAAGTATAAATAC CGGGTAAAGCCTTAAGAATCTATTGT	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraA1hR  antisense	AATTACAATAGATTCTTAAGGCTTTACCC GGTATTTATACTTCAAAAATTGAAGCAAT ATTCAGACAAACTGCGTTTCTTTTCGC	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expA1</i> Promotorregion; <u>EcoRI</u> -Überhang
KofraGeH  sense	<u>AGCT</u> GCTCAAGAGCACGCAATTTCCGGGG CAGGGGTGTTATGAAATTACTTCAAGTTT TGAAGTAATTTCCGGAATTGG	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der intergenischen Region <i>expG-expD1</i> ; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraGeR  antisense	AATTCCAATTCCGGAAAATTACTTCAAAA CTTGAAGTAATTTCATAACACCCCTGCCC CGAAATTGCGTGCTCTTGAGC	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der intergenischen Region <i>expG-expD1</i> ; <u>EcoRI</u> -Überhang
KofraE1eH  sense	<u>AGCT</u> CTCTTCTCGTCGCAAATTACTTTAA AATTTGAAGCGCTTTGCCTGCATTTCCGT CAGAATTACTCCTAAAATTAT	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expE1</i> Promotorregion; <u>HindIII</u> -Überhang
KofraE1eR  antisense	AATTATAATTTTAGGAGTAATTCTGACGG AAATGCAGGCAAAGCGCTTCAAATTTTAA AGTAATTTGCGACGAGAAGAG	Kompetition der Bindung von ExpG an die Bindestelle in der <i>expE1</i> Promotorregion; <u>EcoRI</u> -Überhang

## 1.9 Computerprogramme

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Hersteller/Referenz
Align Plus 4 V. 4.10 inkorporiert mit Clone Manager Professional Suite	Programm zum Vergleich von DNA- oder Proteinsequenzen	Scientific & Educational Software
Blast V.2.2.8	Programmpaket zum Vergleich von DNA- oder Proteinsequenzen mit Sequenzen aus verschiedenen Datenbanken über das Internet	Altschul et al., 1990 Gish & States, 1993 Madden et al., 1996 Altschul et al., 1997 Zhang & Madden, 1997
Clustal W V 1.6 inkorporiert mit Open Genome Environment (OGenE)	Programm zum Vergleich mehrerer DNA-Sequenzen gleichzeitig	IMB
DCA (Divide and Conquer Multiple Alignment) V. 5.a	Programm zum Vergleich mehrerer DNA-Sequenzen gleichzeitig	Stoye, 1998
Fasta V. 1.6	Programmpaket zum Vergleich zweier beliebiger Sequenzen	Pearson & Lipman, 1988
Neural Network Promoter Prediction (NNPP) V. 2.2	Programm zur Promotorvorhersage	Reese, 2000 Reese, 2001
Primer 3 inkorporiert mit Open Genome Environment (OGenE)	Programm zur Ermittlung und Berechnung von Primern u.a. für PCR und Sequenzierung	IMB
Primer Designer 4 V. 4.20 inkorporiert mit Clone Manager Professional Suite	Programm zur Ermittlung und Berechnung von Primern u.a. für PCR und Sequenzierung	Scientific & Educational Software

## 2. Methoden

### 2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

#### 2.1.1 Bakterienanzucht

*E. coli* Stämme werden je nach Verwendungszweck in LB(G)-Medium, in SB-Medium oder auf PA-Agarplatten bei 37 °C angezogen. Für die Anzucht der *S. meliloti* Stämme wird TY- bzw. LB-Flüssig- oder Festmedium verwendet, die Inkubationstemperatur beträgt 30 °C.

Um die Expression der *exp*-Gene in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration zu untersuchen, wurde als Anzuchtmedium für die *S. meliloti* Stämme MOPS-Medium (Zhan et al., 1991) mit 0,1 mM (niedrige Phosphatkonzentration) und 2 mM Phosphat (hohe Phosphatkonzentration) gewählt. Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden Vorkulturen nach selektiver Anzucht über 48 h in LBG- oder TY-Medium mit MOPS-Medium mit 0,1 mM oder 2 mM Phosphat gewaschen. 10 ml des entsprechenden MOPS-Mediums wurden dann mit den gewaschenen Bakterien beimpft, wobei die überimpfte Bakterienmenge 75  $\mu$ l einer stationären Bakterienkultur entsprach.

#### 2.1.2 Bestimmung des Bakterientiters

Der Bakterientiter wird mittels photometrischer Bestimmung der Zelldichte bei 600 nm ermittelt. Eine optische Dichte ( $o.D._{600}$ ) von 0,1 entspricht bei *E. coli* einem Titer von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml und bei *S. meliloti* einer Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml.

#### 2.1.3 Konservierung von Bakterienstämmen

1,5 ml einer ü.N. Kultur werden 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,4 ml Puffersaline resuspendiert, mit 0,6 ml 87 % (v/v) Glycerin versetzt und nach gründlicher Durchmischung bei -20 °C gelagert.

## 2.2 Gentechnische Methoden

### 2.2.1 Nukleinsäure-Isolierung

Bei den Plasmid-Isolierungsmethoden wird die chromosomale DNA durch Alkalidenaturierung ausgefällt und von der noch in Lösung vorliegenden Plasmid-DNA abgetrennt.

### 2.2.1.1 HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA

Diese Methode ist ein schnelles Verfahren, um kleine Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* zu gewinnen.

- 5 mm<sup>3</sup> Zellen vom Festmedium abnehmen und in 200 µl P1-Puffer resuspendieren
- 200 µl P2-Puffer zugeben, invertieren
- 200 µl P3-Puffer zugeben, invertieren
- 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen und 500 µl Isopropanol zugeben
- 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand abziehen und DNA-Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Ethanol quantitativ abziehen und Pellet trocknen
- Pellet in H<sub>2</sub>O resuspendieren

### 2.2.1.2 Sequenzierlyse

Auch diese Methode nutzt die Vernetzung von chromosomaler DNA durch Denaturierung und Renaturierung über Änderung des pH-Wertes. Nach Zentrifugation wird der plasmidhaltige Überstand über eine Tip20-Ionenaustauschersäule (*Plasmid Mini Kit*, Qiagen) gereinigt. Die gebundene Plasmid-DNA wird im Gegensatz zu Verunreinigungen erst bei einer NaCl-Konzentration von 1,25 M eluiert. Die so gewonnene sehr reine DNA eignet sich insbesondere für Sequenzierungen.

- Pellet von 3 ml Flüssigkultur oder Zellen vom Festmedium in 0,3 ml P1-Puffer (+ RNase A) resuspendieren
- Zugabe von 0,3 ml P2-Puffer, sofort 6 mal invertieren, 5 min RT
- Zugabe von 0,3 ml gekühltem P3-Puffer, sofort 6 mal invertieren, 5 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Tip20-Säulen mit 1 ml QBT-Puffer äquilibrieren
- Überstand der Zentrifugation auf die Säulen geben und vollständig durchlaufen lassen
- Waschen der Säulen mit 4 x 1 ml QC-Puffer
- DNA mit 0,8 ml QF-Puffer von der Säule eluieren
- Fällung der DNA durch Zugabe von 0,7 ml Isopropanol und Zentrifugation über 30 min bei 13.000 rpm
- DNA-Pellet mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol waschen, 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Ethanol quantitativ abziehen und DNA-Pellet bei RT trocknen
- DNA in 20 µl H<sub>2</sub>O aufnehmen

### 2.2.1.3 Plasmid-DNA Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen). Diese Methode beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse, gefolgt von einer Bindung der DNA an Anionenaustauschersäulen. Nach der Elution der DNA von den Säulen und anschließender Konzentration und Reinigung erhält man Plasmid-DNA, die z.B. für Klonierungen oder Transformation geeignet ist. Für folgendes Verfahren können Zellen direkt vom Festmedium eingesetzt werden. (Die benötigten Lösungen stammen aus dem Kit und wurden nach Herstellerangaben verwendet).

- $\frac{1}{4}$  der Zellen gewachsen auf Festmedium (Petrischale) in 250  $\mu$ l P1-Puffer resuspendieren
- Zugabe von 250  $\mu$ l P2-Puffer, sofort 4 bis 6 mal invertieren
- Zugabe von 350  $\mu$ l N3-Puffer, sofort 4 bis 6 mal invertieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- QIAprepspin-Säule in 2 ml Sammelgefäß setzen
- Überstand nach Zentrifugation auf die Säule geben
- 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren; Durchlauf verwerfen und Säule zurück in Sammelgefäß setzen
- Säule mit 500  $\mu$ l PB-Puffer waschen
- 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren; Durchlauf verwerfen und Säule zurück in Sammelgefäß setzen
- Säule mit 750  $\mu$ l PE-Puffer waschen
- 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren; Durchlauf verwerfen, Säule zurück in Sammelgefäß setzen und erneut 30-60 sec zentrifugieren
- Säule in neues Eppendorfgefäß setzen
- DNA mit 30-50  $\mu$ l EB-Puffer oder Millipore eluieren, dazu 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

### 2.2.1.4 Isolierung von Gesamt-DNA

- 1,5 ml einer ü.N. Kultur bei 10.000 rpm abzentrifugieren
- Pellet in 1 ml 1 M NaCl resuspendieren, waschen
- 3 min bei 10.000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet in 250  $\mu$ l 20 % (w/v) Saccharose in TE-Puffer resuspendieren
- 250  $\mu$ l Lysozym (5 mg/ml) in TE-Puffer zugeben und mischen
- 30 bis 60 min bei 37 °C inkubieren
- 100  $\mu$ l N-Lauroylsarkosin (10 %, v/v)/Pronase E (5 mg/ml) in TE-Puffer zugeben, mischen und 1-4 h bei 37 °C inkubieren
- 70  $\mu$ l 3 M Na-Acetat, 300  $\mu$ l Phenol:Chloroform (1:1) zugeben, mischen (ca. 5 min leicht schütteln)
- 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Oberphase abziehen und 300  $\mu$ l Phenol:Chloroform (1:1) zugeben, schütteln
- 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Oberphase abziehen und 200  $\mu$ l Chloroform zugeben, mischen
- 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

- 0,7 ml Isopropanol (-20 °C) zur Oberphase zugeben, invertieren
- 30 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- DNA-Pellet mit 0,5 ml 70 % (v/v) Ethanol waschen, 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Waschschrift eventuell wiederholen
- nach dem letzten Waschen Ethanol quantitativ abziehen und das Pellet bei 65 °C trocknen
- DNA in 100 µl H<sub>2</sub>O ca. 1 h bei 55 °C lösen

## 2.2.2 Reinigung und Darstellung von DNA

### 2.2.2.1 Ethanolfällung von DNA

- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,8) oder 1/20 Volumen 4 M LiCl<sub>2</sub> zum DNA-Ansatz in Lösung
- Zugabe von 3 x Volumen an Ethanol (LiCl<sub>2</sub>-Fällung, -20 °C), gründlich mischen
- 30-60 min bei -20 °C inkubieren
- 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Ethanol quantitativ abziehen und Pellet bei 65 °C trocknen
- DNA in gewünschter Menge H<sub>2</sub>O aufnehmen

### 2.2.2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

DNA-Fragmente werden je nach Größe in 0,8 –2 % (w/v) TA-Agarosegelen bei 90 V aufgetrennt. Nach dem Anfärben in Ethidiumbromid-Färbelösung kann die DNA im UV-Licht detektiert werden. Die Laufstrecke eines DNA-Fragmentes im Agarosegel ist dem Logarithmus des Molekulargewichts umgekehrt proportional. Mit Hilfe von Längenstandards bekannter Größe, die im gleichen Gel mit aufgetrennt werden, können die Längen der DNA-Fragmente bestimmt werden. Solche Längenstandards können *EcoRI-HindIII* gespaltene Lambda-DNA oder die 1 kb DNA-Leiter (Boehringer) sein.

## 2.2.3 *In vitro* DNA-Manipulationen

### 2.2.3.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle sequenzspezifisch in diskrete Fragmente zerschneiden können. Die Spaltung von Plasmid- bzw. Gesamt-DNA erfolgt nach Empfehlung des Herstellers der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Eine Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch wiederholtes Einfrieren bei – 20 °C oder durch Inkubation bei 65 °C über 20 min.

### 2.2.3.2 DNA-Ligation

Gespaltene DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden, können durch das Enzym T4-Ligase, welches 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle kovalent verbindet, miteinander verknüpft werden. Die zu ligierende DNA muss in einem geeigneten Verhältnis (Insert-DNA immer deutlich im Überschuss) gemischt werden.

Ein typischer Ligationsansatz könnte folgendermaßen aussehen:

- 3 µl Vektor-DNA
- 6 µl Insert-DNA
- 2 µl 10x Ligationspuffer
- 1 µl T4-Ligase
- 8 µl H<sub>2</sub>O

Der Ligationsansatz wird für mindestens 3 h bei RT oder ü.N. in einem Temperaturgradienten (20 °C → 14 °C) inkubiert.

### 2.2.3.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR, (Saiki et al. 1988)) stellt ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer dar. Es wird dabei die Eigenschaft von DNA-Polymerasen genutzt, einen DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang aufpolymerisieren zu können, sofern ein kurzer doppelsträngiger DNA-Abschnitt mit einem freien 3'-Ende vorliegt. Diese kurzen doppelsträngigen Bereiche entstehen nach Denaturierung des DNA-Doppelstranges durch die Bindung (*Annealing*) der Primer an den zu amplifizierenden DNA-Bereich im *sense*- und im *antisense*-Strang.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind jeweils in der Tabelle unter III.1.7 wiedergegeben. Als PCR Gerät wurde der PTC-100™ (*Programmable Thermal Controller*, MJ Research), PTC-200™ (*Programmable Thermal Cycler*, MJ Research) oder DYAD™ (*Programmable Thermal Cycler*, MJ Research) verwendet.

#### PCR-Ansatz

1 bzw. 2 µl	Template	1 bzw. 2 µl	Template
10 µl	PCR-Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> )	10 µl	PCR-Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> )
20 µl	Q-Mix	1 µl	Primer 1 (25 pmol/µl)
1 µl	Primer 1 (25 pmol/µl)	1 µl	Primer 2 (25 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (25 pmol/µl)	2 µl	dNTP-Mix (10 mM)
2 µl	dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl	Pwo-Polymerase
0,5 µl	Taq-Polymerase	84,5 bzw. 83,5 µl	H <sub>2</sub> O
64,5 bzw. 63,5 µl	H <sub>2</sub> O		

Als Template kann 1 µl Plasmid-DNA (→ 2.2.1.2 und 2.2.1.3) oder 2 µl Zellysate eingesetzt werden. Das Zellysate gewinnt man, indem man mit einem sterilen Zahnstocher ca. 2 mm<sup>3</sup> der entsprechenden Zellen vom Festmedium abnimmt, in 100 µl Millipore resuspendiert und für 5-10 min bei 95-100°C inkubiert. Anschließend auf Eis abkühlen und in der PCR einsetzen.

#### PCR-Programm

Initiale Denaturierung:	95 °C,	1 min
30-35 Zyklen	Denaturierung:	95 °C, 30 sec
	Annealing:	50-65 °C, 1 min
	Polymerisation:	72 °C, 1-3 min
Finale Polymerisation:	72 °C,	10 min

#### **2.2.3.4 Reinigung und Klonierung von PCR-Produkten**

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des *QIAquick-spin PCR Purification Kits* (Qiagen). Die verwendeten Lösungen stammen alle aus dem Kit.

#### Reinigung der PCR-Produkte

- 500 µl Puffer PB zu 100 µl PCR-Reaktionsansatz geben
- QIAquick Säule in 2 ml Sammelgefäß einsetzen
- Gemisch aus Puffer PB und Reaktionsansatz auf die Säule geben, 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren (Bindung der DNA)
- Durchlauf verwerfen, Säule in gleiches Sammelgefäß zurücksetzen
- zum Waschen 750 µl Puffer PE auf die Säule geben, 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen, Säule in gleiches Sammelgefäß zurücksetzen und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Säule in neues Eppendorfgefäß setzen
- DNA mit 30-50 µl Puffer EB von der Säule eluieren, dazu 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

Durch die Verwendung von Primerpaaren, von denen der zum *sense*-Strang bzw. der zum *antisense*-Strang komplementäre Primer als Verlängerung des 5'-Endes eine Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen trägt, konnte das gereinigte PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten werden und in die jeweiligen Restriktionsschnittstellen von diversen Vektoren kloniert werden.

Nach diesem Verfahren wurde das Plasmid pHisG4032 (N-terminales (His)<sub>6</sub>ExpG), das Plasmid pHisGC31 (C-terminales ExpG(His)<sub>6</sub>) und die Plasmide für die Promotoranalysen pBBPPA1-6, pBBPPE1-6 und pBBPPG5-6 konstruiert.

### Ligationsansatz

- 7 µl PCR-DNA gereinigt, gespalten mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen
- 3 µl jeweilige Vektor-DNA, gespalten mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen
- 2 µl 10x TA-Restriktionspuffer
- 1 µl T4-Ligase (7 U/µl)
- 7 µl H<sub>2</sub>O

- Inkubation ü.N. im Temperaturgradienten (20 °C → 14 °C)
- Ligationsansatz bei -20 °C lagern oder direkt zur Transformation einsetzen

### **2.2.3.5 Reinigung und Aufkonzentrierung der PCR-Produkte durch Microcon Mikrokonzentratoren**

Die wie unter 2.2.3.4 aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend mittels *Microcon YM-30 Mikrokonzentratoren* weiter aufkonzentriert und aufgereinigt.

- Microcon-Säulchen in ein Sammelgefäß setzen
- gleiche PCR-Ansätze vereinigen und in das Microcon-Säulchen geben
- 3-5 min bei 12.000 rpm zentrifugieren und das Volumen auf ca. 50 µl reduzieren
- Durchlauf entfernen und Säulchen zurück in das Sammelgefäß setzen
- Zugabe von 500 µl Millipore und erneut ca. 3-5 min bei 12.000 rpm zentrifugieren bis das Volumen auf ca. 50-100 µl reduziert ist; Durchlauf entfernen und Säulchen zurück in das Sammelgefäß setzen (Aufreinigung der DNA).
- das Aufreinigen der DNA 3 mal wiederholen
- Microcon-Säulchen umgedreht in ein neues Sammelgefäß setzen und 1-2 min bei 3.300 rpm zentrifugieren

Mit diesem Verfahren erhält man sehr reine und gleichzeitig aufkonzentrierte DNA-Fragmente die für die AFM-Experimente eingesetzt wurden.

### **2.2.3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten aus PCR-Platten**

Die Amplifizierung der Kompetitorfragmente erfolgte in PCR-Platten (*Low Profile Multiplate 96*). Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde nach folgendem Verfahren durchgeführt:

- Transfer der PCR-Produkte mit 8-Kanalpipette in *Nucleofast 96er* PCR-Aufreinigungsplatten
- Filterplatte auf Vakuumkammer stellen
- Vakuum auf -400 bis -600 mbar einstellen
- 10-15 min Überstand bzw. Flüssigkeit absaugen lassen und weitere 30-60 sec nachträgliches Trockensaugen
- Vakuum für 60-90 sec ventilieren lassen
- Zugabe von jeweils 100 µl Millipore mit 8er-Kanalpipette in jedes Well

- Flüssigkeit bei  $-400$  bis  $-600$  mbar Vakuum 10-15 min absaugen und weitere 30-60 sec Trockensaugen (Waschen der DNA)
- Vakuum für 60-90 sec ventilieren lassen
- 30  $\mu$ l Millipore auf die Membran geben und 2-3 mal mit 8er-Kanalpipette resuspendieren; anschließend 1 min auf Plattenschüttler schütteln

DNA-Fragmente in Eppendorfgefäße vereinigen und nachfolgend über *Microcon 30 Microkonzentratoren* aufkonzentrieren und/oder zusätzlich aufreinigen ( $\rightarrow$  2.2.3.5).

### 2.2.3.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration der wie unter 2.2.3.5 und 2.2.3.6 aufgereinigten und aufkonzentrierten PCR-Produkte wurde mit dem *BioPhotometers* (Eppendorf) bestimmt. Hiermit läßt sich die quantitative Analytik von dsDNA mittels einer programmierten Methode nach Angaben des Herstellers schnell und zuverlässig durchführen.

### 2.2.3.8 Plasmidintegrations-Mutagenese

Bei der Plasmidintegrations-Mutagenese wird ein DNA-Fragment des zu mutagenisierenden Gens in einen mobilisierbaren *E. coli* Vektor kloniert und durch Konjugation nach *S. meliloti* transferiert. Da die verwendeten Vektoren in *S. meliloti* nicht replizieren können, kann eine Etablierung nur durch ein einfaches homologes Rekombinationsereignis in das Genom von *S. meliloti* erfolgen. Auf die Anwesenheit des Vektors kann mit Hilfe einer vom Vektor kodierten Antibiotikaresistenz selektioniert werden. Durch die Integration unterbricht der Vektor das Genom und kann so eine Mutation verursachen.

### 2.2.3.9 Markeraustausch-Mutagenese

Die Markeraustausch-Mutagenese wird angewendet, um einen nativen DNA-Bereich gegen einen entsprechenden *in vitro* manipulierten Bereich auszutauschen. Hierfür wird das native genomische DNA-Fragment in einen Vektor kloniert und z.B durch die Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette verändert. Um den veränderten DNA-Bereich von *E. coli* nach *S. meliloti* zu transferieren, dient als Trägerreplikon ein mobilisierbarer, in *S. meliloti* nicht-replizierbarer Vektor. Bei Stämmen, die nach dem konjugativen Plasmidtransfer die Antibiotikaresistenz der inserierten Kassette, nicht aber die Vektorresistenz aufweisen, erfolgte der Austausch des nativen genomischen Bereichs gegen den entsprechenden durch die Kassette unterbrochenen Bereich durch ein doppeltes Rekombinationsereignis (eines stromaufwärts und eines stromabwärts der Kassette).

Die Markeraustausch-Mutagenese wurde zur Konstruktion der Doppelmutante SMBB $\Delta$ G101 angewendet. Zur Unterbrechung des *mucR*-Gens in der *expG*-Deletionsmutante SmSR $\Delta$ G wurde dabei die Spc-Resistenzkassette aus dem Plasmid pHP45 $\Omega$ , die bereits in die *PmacI*-Schnittstelle von *mucR* inseriert vorlag (Rm101, (Becker et al., 1997)), eingesetzt.

## 2.2.4 DNA-Transfermethoden

### 2.2.4.1 Konjugation

Der Transfer eines Plasmids von einer Donor- in eine Rezipientenzelle wird als Konjugation bezeichnet. Voraussetzung für die Konjugation sind Transferfunktionen und eine Mobilisierungsregion (*mob*-Region). Plasmide, die nur über eine *mob*-Region verfügen, können durch einen Donorstamm mobilisiert werden, der die Transferfunktionen zur Verfügung stellt. Ein solcher Donor ist *E. coli* S17-1, der ein im Chromosom integriertes RP4-Derivat trägt, das die Transferfunktion vermittelt (Simon et al., 1983). Im folgenden ist das Prinzip der Filterkreuzung beschrieben:

- Mischen von  $5 \times 10^7$  Zellen logarithmischer Donorkultur mit  $2 \times 10^8$  Zellen stationärer Rezipientenkultur
- Abzentrifugieren der Zellen
- Überstand abgießen und Zellen im Rücklauf resuspendieren
- Kreuzungsgemisch auf Nitrocellulosefilter (Porengröße:  $0,45 \mu\text{m}$ ) auf LBG-Festmedium auftragen
- Inkubation bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  ü.N.
- Abschwemmen der Kreuzungsfilter in 1 ml LBG-Flüssigmedium
- Verdünnungsreihe anlegen und auf Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$

### 2.2.4.2 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Durch Transformation können kompetente *E. coli* Zellen freie zirkuläre Plasmid-DNA aufnehmen. Die *E. coli* Zellen müssen durch eine  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung kompetent gemacht werden (modifiziert nach Maniatis et al., 1982):

#### Präparation kompetenter Zellen

- 10 ml einer logarithmischen *E. coli*-Kultur ( $\text{o.D.}_{580} = 0,6$ ) 5 min bei 6.000 rpm abzentrifugieren
- Pellet in 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) resuspendieren
- Inkubation bei  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min
- 5 min bei 5.000 rpm und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugieren
- Pellet in 1 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) resuspendieren
- für eine Lagerung kompetenter Zellen bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  werden zu 850  $\mu\text{l}$  kompetenter Zellen 150  $\mu\text{l}$  87 % (v/v) Glycerin zugegeben

#### Transformation kompetenter Zellen

- 100  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen werden mit der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt
- Inkubation der Mischung bei  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min
- Hitzeschock: 3 min bei  $43 \text{ }^\circ\text{C}$

- Zugabe von 1 ml LBG-Medium, mischen
- Inkubation bei 37 °C für 30 – 60 min
- Ausplattieren des Transformationsansatzes auf Selektionsmedium

### 2.2.4.3 Allgemeine Transduktion in *S. meliloti*

(modifiziert nach Finan et al., 1984)

Die Übertragung von DNA in eine Bakterienzelle oder zwischen verschiedenen Bakterien mit Hilfe von Bakteriophagen bezeichnet man als Transduktion. Die übertragenen Fremd-DNA wird hierbei in das Genom des Phagen aufgenommen und wie phageneigene Gene an die infizierte Bakterienzelle weitergegeben, wo sie durch homologe Rekombination in das Genom integrieren kann. In dieser Arbeit wurde der allgemein transduzierende Phage  $\Phi$ M12 eingesetzt.

#### Herstellung des Phagenlysats:

- zu 0,5 ml einer ü.N. Bakterienkultur 4,5 ml LB/MC-Flüssigmedium (LBG-Medium ohne Glukose + 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> + 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) zugeben
- 2 h bei 30°C inkubieren bis o.D. = 0,3–0,4
- Zugabe des Phagen  $\Phi$ M12 → 10<sup>8</sup> pfu
- ca. 12 h bei 30°C inkubieren
- Zugabe von 2-3 Tropfen Chloroform
- 10 min bei 10.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen und bei 4°C aufbewahren

#### Transduktion:

- Anziehen der Bakterien in LB/MC-Flüssigmedium
- zu 3 ml einer u.N. Kultur 30 µl des Phagenlysats zugeben (moi = 0,5)
- 15 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, Überstand abziehen
- Pellet mit 0,85 % NaCl waschen
- 10 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, Überstand abziehen
- Pellet in 0,1 ml 0,85 % NaCl resuspendieren
- Ausplattieren auf Selektionsmedium ohne MgSO<sub>4</sub> und CaCl<sub>2</sub>
- Inkubation bei 30°C

### 2.2.5 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

Im EMSA kann die Bindung eines Proteins an die Ziel-DNA nachgewiesen werden. Die DNA-Bindung des aufgereinigten N-terminalen bzw. C-terminalen Fusionsproteins wird durch einen nicht-radioaktiven EMSA (Fried & Crothers, 1981) gezeigt. Die Reaktionsansätze werden in 2 % (w/v) TA-Agarosegelen bei 4,5 V/cm für 2h bei 4°C im Dunkeln (Kühlraum) aufgetrennt. Die Detektion und

quantitative Datenanalyse der Protein-DNA-Komplexe bzw. der nicht gebundenen DNA-Fragmente erfolgt über die Cy3-Markierung der DNA mittels des *Typhoon 8600 Variable Mode Imagers* (Amersham Biosciences). Die Laufstrecke eines Protein-DNA-Komplexes im Agarosegel ist wie die eines DNA-Fragmentes dem Logarithmus des Molekulargewichts umgekehrt proportional. Die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes ist durch einen „shift“ im Vergleich zum Kontroll-DNA-Fragment zu erkennen.

<u>Reaktionsansatz</u>	0,013	µg/µl	Protein
	2 bis 23	ng/µl	Cy3-markierte DNA
	2	µl	10x Reaktionspuffer
	auf 20	µl	mit H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub> auffüllen

- Reaktionsansatz auf Eis pipettieren
- für 15 min bei 20°C im Dunkeln inkubieren
- Zugabe von 5 µl DNA/Protein-Ladepuffer
- elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel bei 4°C im Dunkeln

### 2.2.5.1 Eingrenzung der Bindestelle durch Konkurrenzexperimente

In Konkurrenzexperimenten werden unmarkierte spezifische DNA-Fragmente im Überschuss zur markierten Ziel-DNA zu den EMSA-Reaktionsansätzen gegeben. Die Kompetitor-DNA bindet das Protein, so dass die Cy3-markierte Ziel-DNA nicht mehr mit dem Protein interagieren kann und auf gleicher Höhe wie die Kontroll-DNA-Fragmente im Agarosegel bandiert. Zunächst wurden zu der Cy3-markierten Ziel-DNA identische, aber unmarkierte DNA-Fragmente als Kompetitor eingesetzt. Des Weiteren dienten Oligonukleotide und die entsprechenden antisense Oligonukleotide (→ III.1.8), die nach der Hybridisierung (Sambrook et al., 1989) in den Vektor pUC18 kloniert und anschließend mittels PCR amplifiziert wurden, als Kompetitor-DNA. Durch den Einsatz definierter Oligonukleotide die z.B. unterschiedlich lang sind oder Basenaustausche in möglichen Bindemotiven enthalten kann die Bindestelle eines Proteins bestimmt werden.

#### Hybridisierung der Oligonukleotide

- jeweilige sense und antisense Oligonukleotide in ein Eppendorfgefäß geben; Endkonzentration 50 µM, d.h. 10µl einer 50 pmol/µl Oligonukleotidlösung
- Zugabe von NaCl mit einer Endkonzentration von 30 –50 mM
- Oligo-Gemisch im Eppendorfgefäß in einem Becherglas 5 – 10 min aufkochen
- Becherglas von der Heizplatte nehmen und auf RT abkühlen lassen
- Becherglas im Kühlschrank auf 4°C weiter abkühlen lassen
- hybridisierte dsDNA-Fragmente können direkt zur Klonierung eingesetzt oder bei –20°C gelagert werden

Reaktionsansatz

- zu dem unter 2.2.5 aufgeführten Reaktionsansatz werden entsprechende Kompetitorfragmente in einem 25 bis 2000x Überschuss zur Cy3-markierten DNA zugegeben und wie angegeben weiterverfahren

**2.2.5.2 Bestimmung der Bindungsaffinitäten: on- und off-Raten**

Die Bindungskinetik für die Bindungsreaktion des C-terminalen Fusionsproteins ExpG(His)<sub>6</sub> an die unterschiedliche Ziel-DNA wird durch Standard-EMSAs (→ 2.2.5 und 2.2.5.1) ermittelt. Hierbei werden Proben zwischen 0 und 15 min Reaktionszeit während der Inkubation im 20°C Wasserbad aus dem Reaktionsansatz entnommen und in einem bereits laufenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Fried & Crothers, 1981; Lane et al., 1992).

Bestimmung der on-Rate  $k_{on}$ 

In einem Standard-EMSA werden nach 1; 2; 3,5; 6; 10 und 15 min Proben entnommen und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit zunehmender Reaktionszeit werden immer mehr Protein-DNA-Komplexe gebildet und die Konzentration an ungebundener DNA im Reaktionsansatz nimmt ab. Die Konzentrationsverschiebung zwischen freier DNA und Protein-DNA-Komplex wird durch die detektierte Signalstärke der Cy3-markierten DNA zu den einzelnen Zeitpunkten der Probenentnahmen dokumentiert und unter Berücksichtigung der Ausgangskonzentrationen von Protein und DNA können die einzelnen Werte für P, PN und N zum Zeitpunkt  $t$  berechnet werden.

Die Assoziationsrate der Bindungsreaktion von Protein und DNA wird mit folgender Formel (Lane et al., 1992) ermittelt:

$$k_{on} = d(1/(P-N)) \ln (N(P-PN))/(P(N-PN))/dt$$

- P = Konzentration an freiem Protein in M  
 PN = Konzentration des Protein-DNA Komplexes in M  
 N = Konzentration an freier DNA in M  
 t = Zeit der Probenentnahme in min

Bestimmung der off-Rate  $k_{off}$ 

Zu einem Standard-EMSA-Reaktionsansatz werden unmarkierte Kompetitor-Fragmente in 50 x Überschuss zur Cy3-markierten Ziel-DNA gegeben. Nach 0; 1; 2; 3,5; 10; und 15 min werden Proben entnommen und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit zunehmender Reaktionszeit ist ein Anstieg der Konkurrenz zu verzeichnen, d.h. die Kompetitor-DNA ist im Protein-DNA-Komplex gebunden, die Cy3-markierte Ziel-DNA bleibt ungebunden und bandiert unterhalb des Protein-DNA-Komplexes im Agarosegel. Die Konzentrationsverschiebung zwischen Protein-DNA-Komplex und freier DNA wird durch die detektierte Signalstärke der Cy3-markierten DNA zu den einzelnen Zeitpunkten der

Probenentnahmen dokumentiert und unter Berücksichtigung der Ausgangskonzentrationen von Protein und DNA können die einzelnen Werte für PN und  $PN_0$  berechnet werden.

Die Dissoziationsrate der Bindungsreaktion von Protein und DNA wird mit folgender Formel (Lane et al., 1992) ermittelt:

$$k_{\text{off}} = -d(\ln PN/PN_0)/dt$$

PN = Konzentration des Protein-DNA-Komplexes bei Probenentnahme nach Zugabe der Kompetitor DNA in M

$PN_0$  = Konzentration des Protein-DNA-Komplexes direkt vor Zugabe der Kompetitor-DNA in M

$t$  = Zeit der Probenentnahme in min

#### Bestimmung der Dissoziationskonstanten $K_d$

Die Dissoziationskonstante des Protein-DNA-Komplexes berechnet sich aus dem Verhältnis der off-Rate zur on-Rate (Bisswanger, 1994; Lane et al., 1992):

$$K_d = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$$

### 2.2.6 Southern Hybridisierung

Mit Hilfe der Southern Hybridisierung (Southern, 1975) kann die genomische Struktur von Bakterienstämmen überprüft werden. Dazu wird die zu überprüfende DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wird die DNA mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Apparatur auf eine Nylonmembran übertragen. Die auf der Nylonmembran fixierten DNA-Fragmente werden gegen eine Digoxigenin-ddUTP-markierte DNA-Sonde hybridisiert. Durch immunologische Detektion unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats und einer enzymkatalysierten Farbreaktion lassen sich die DNA-Fragmente identifizieren, die zur markierten DNA-Sonde homolog sind. Die Markierung der DNA-Sonden und die immunologische Detektion wurde mit dem *Digoxigenin DNA-Labeling and Detection Kit* von Boehringer durchgeführt. (Substanzen aus dem Kit sind mit einem \* gekennzeichnet)

#### Markierung der Sonden-DNA

- ca. 1  $\mu\text{g}$  DNA mit *SauIII*A spalten
- Spaltungsansatz:
 

1 $\mu\text{l}$	DNA aus Sequenzierlyse
2 $\mu\text{l}$	10x TA-Spaltungspuffer
1 $\mu\text{l}$	<i>SauIII</i> A (1U)
16 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$
- Spaltung nach 5-15 min RT stoppen
- gespaltene DNA 10 min bei 100 °C denaturieren

- im Eis-Wasserbad für 5 min abkühlen
- Zugabe von:
  - 2  $\mu$ l Hexanukleotid Gemisch\*
  - 2  $\mu$ l dNTP-Gemisch\*
  - 1  $\mu$ l Klenow-Polymerase\*

mischen und bei 37 °C 3 h oder ü.N. inkubieren.

#### Vakuumblot

- Agarosegel mit den aufgetrennten DNA-Fragmenten auf den Nylonfilter, der auf der porösen Trägerplatte der Vakuumblotapparatur liegt, legen
- sofort nach Anlegen des Vakuums Depurinierungslösung (0,25 M HCl) auf das Gel gießen, nach 10 min Lösung absaugen
- Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) auf das Gel gießen, nach 10 min Lösung absaugen
- Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, 2 M NaCl) auf das Gel gießen, nach 10 min Lösung absaugen
- 20x SSC auf das Gel gießen, nach ca. 90 min Lösung absaugen
- Filter mit DNA-Seiten nach unten auf Frapan legen und DNA-Seite zur Fixierung 5 min mit UV-Licht bestrahlen (UV-crosslinking)

#### Vorhybridisierung und Hybridisierung

- präparierten Nylonfilter mit der DNA-Seite nach innen in einen Hybridisierungszylinder stecken
- 20 ml Vorhybridisierungslösung zugeben
- 2-6 h bei 68 °C rollern
- zu 6 ml Hybridisierungslösung die markierte Sonden-DNA zugeben und für 10 min bei 100 °C denaturieren
- Vorhybridisierungslösung abgießen und Hybridisierungslösung mit Sonden-DNA zugeben
- ü.N. bei 68 °C rollern

#### Waschen und immunologischer Nachweis

- Hybridisierungslösung mit Sonden-DNA auffangen, bei -20 °C lagern (kann mehrere Male verwendet werden)
- Nylonfilter zweimal 5 min mit je 100 ml Waschpuffer 1 schütteln
- zweimal 15 min mit je 50 ml Waschpuffer 2 bei 68 °C rollern
- 1 min mit Detektionspuffer 1 schütteln
- 30 min mit 30 ml Detektionspuffer 2 (Detektionspuffer 1 + 1 % (w/v) Blocking Reagenz\*) bei RT rollern
- 1 min mit Puffer 1 schütteln
- 30 min mit 20 ml Puffer 2 + 4  $\mu$ l Antikörperkonjugat\* bei RT rollern
- zweimal 15 min mit je 150 ml Detektionspuffer 1 schütteln

- Filter für 2 min in Detektionspuffer 3 legen
- Filter in 10 ml Färbelösung\* legen und im Dunkeln färben
- Färbereaktion mit H<sub>2</sub>O stoppen
- Filter bei RT trocknen

### 2.2.7 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

(nach Miller, 1972)

Die  $\beta$ -Galaktosidase spaltet neben dem natürlichen Substrat Laktose auch das künstliche Substrat ONPG. Bei der Spaltung des ONPG entsteht Galaktose und ein gelbes o-Nitrophenol, dessen Adsorption bei einer Wellenlänge von 420 nm photometrisch bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität werden Vorkulturen der zu testenden Stämme unter selektiven Bedingungen angezogen, in LBG-Medium bzw. MOPS-Medium überimpft und bis zu einer o.D.<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 inkubiert.

- photometrische Bestimmung des Bakterientiters bei o.D.<sub>600</sub>
- 100  $\mu$ l – 500  $\mu$ l der Bakterienkultur mit Z-Puffer auf 860 ml auffüllen
- 10  $\mu$ l 0,1 % (w/v) SDS und 20  $\mu$ l Chloroform zugeben und mischen (10 sec vortexen)
- 10 min bei RT inkubieren
- 170  $\mu$ l ONPG (4 mg/ml Z-Puffer) zugeben und bei RT inkubieren
- nach 30 bis 50 min Reaktion durch Zugabe von 430  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> stoppen
- Ansatz 10 min bei 10.000 rpm zentrifugieren
- photometrische Messung des Überstandes bei o.D.<sub>420</sub>

Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Miller Units wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Miller Units} = \frac{(1000 \times \text{o.D.}_{420} \times \text{Ansatzvolumen})}{(\text{o.D.}_{600} \times 1,7 \times \text{Kulturvolumen} \times \text{Reaktionszeit})}$$

Einheiten: Ansatzvolumen und Kulturvolumen in ml, Reaktionszeit in min

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Protein-Expression in *E. coli* und Gesamtproteinextraktion

Durch gentechnische Methoden werden Expressionsvektoren konstruiert, die nach Transformation in spezielle *E. coli*-Stämme zur Expression des gewünschten Proteins genutzt werden können.

### 2.3.1.1 Expression in *E. coli*

- 10 ml ü.N. Kultur in SB-Selektivmedium anziehen
- 2 x 400 ml SB-Selektivmedium mit dieser Vorkultur animpfen, bei 37 °C bis zu einer o.D.<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 inkubieren
- Induktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration in der Kultur: 1 mM), Inkubation bei 37 °C fortsetzen
- direkt vor und nach der Induktion und anschließend in 30 min Abständen jeweils 200 µl Kultur steril entnehmen, in Eppendorfgefäße überführen und bis zu ihrer Vorbereitung zur analytischen SDS-DISKPAGE auf Eis lagern (bei erster Expression)
- bei Folgeexpression erfolgt die Zellernte und Gesamtproteinextraktion zu einem Zeitpunkt, an dem bei der Erstexpression eine hohe Konzentration an exprimiertem Protein auftrat (ca. 3 h nach Induktion).

### 2.3.1.2 Zellernte und Gesamtproteinextraktion von cytoplasmatischen Proteinen aus *E. coli*

Der Zellaufschluss von *E. coli* erfolgt enzymatisch mittels Lysozym und Triton X-100. DNA- und RNA-Bestandteile werden ebenfalls enzymatisch abgebaut und restliche Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt.

- 2 x 400 ml Kultur 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Bakterienpellet vollständig in 22,5 ml Aufschlusspuffer resuspendieren
- Zugabe von 1,5 ml Lysozymlösung und durch mehrmaliges Umschwenken mischen (Zellwandlyse)
- 25 min auf Eis inkubieren
- Einstellen der Zellsuspension mit Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 0,01 % (v/v) und mit einer Glaspipette durch Rühren mischen (Zerstörung der Zellmembran)
- Überführung des Zentrifugenbechers in 37°C Wasserbad und Inhalt rühren, bis eine starke Viskositätszunahme auftritt (Freiwerden der DNA)
- Zugabe von 75 µl RNase A- und 75 µl DNase I-Lösung
- weiter unter Rühren inkubieren, bis die Viskosität drastisch abnimmt
- 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugieren

Die ExpG-Fusionsproteine liegen in der löslichen Fraktion vor. Der Überstand kann bei 4°C ü.N. gelagert werden. Weitere Aufreinigungsschritte schließen sich an (→ III.2.3.4).

### 2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford-Test

Der Bradford-Test ist eine colorimetrische Methode zur Quantifizierung von Proteinen in Lösung (Bradford, 1976). Gemessen wird die Menge an Coomassie Brilliant Blue, die an die Proteine bindet. Über einen Vergleich mit der Eichkurve eines Standardproteins (BSA) lässt sich so die Proteinkonzentration in der Lösung bestimmen.

- eine Eichgerade im verwendeten Puffer mit BSA-Lösungen der Konzentrationen 0,05-15 µg/µl erstellen
- von der Probe entsprechende Verdünnungsstufen im verwendeten Puffer ansetzen
- in einer Mikroküvette 800 µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> und 5 µl der jeweiligen Proteinlösung mischen (Referenz 800 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> + 5 µl Puffer)
- 200 µl Bradford Farbstoff-Konzentrat, zufügen und 2 min bei RT inkubieren
- o.D.<sub>595</sub> aller Proben am Spectro-Photometer bestimmen und mit Hilfe der Eichgerade Proteinkonzentration bestimmen

### 2.3.3 Analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (analytische SDS-DISKPAGE)

#### 2.3.3.1 Herstellung der Gele

- Glasplatten, Aluminiumplatten, Spacer (0,75 mm Dicke) und Probenkämme mit H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> und Ethanol säubern
- Trenngel-Lösung (siehe Tabelle unten) in Saugflasche ansetzen
- "Starter" Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugeben und gut vermischen
- Gel(e) bis ca. 1 cm unter oberen Rand der Gelkammer gießen
- jedes Gel mit 250 µl Wasser-gesättigtem t-Butanol überschichten (für glatte Oberfläche)
- mindestens 10 min auspolymerisieren lassen, dann t-Butanol abgießen
- Sammelgel-Lösung (siehe Tabelle unten) in Saugflasche ansetzen und 2 min entgasen
- "Starter" Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugeben und gut vermischen
- Sammelgel(e) aufgießen und Probenkamm einsetzen
- mindestens 30 min auspolymerisieren lassen
- Lagerung bei 4°C (ca. 2 Wochen)

Die Angaben der folgenden Tabelle über die Zusammensetzung der Gele beziehen sich auf die unter 1.5.13 aufgeführten Stamm-Lösungen und Puffer. Die Volumina reichen für das Gießen von 2 Minigelen (8,5 cm × 5,5 cm) aus.

Trenngel (15 ml)

<b>Acrylamid [%T]</b>	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>12,5</b>	<b>15</b>
Trennbereich [kDA]	30-120	18-75	15-60	15-45
Acrylamid-Stammlsg. [ml]	2,8	3,75	4,7	5,625
4 x Trenngelpuffer [ml]	3,75	3,75	3,75	3,75
steriles Millipore [ml]	8,8	7,65	6,2	5,275
TEMED (10 %) [ml]	0,25	0,25	0,25	0,25
APS-Lsg. (10 %) [ml]	0,1	0,1	0,1	0,1

Sammelgel (5 ml)

<b>Acrylamid [% T]</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
Acrylamid-Stammlsg. [ml]	0,375	0,75
4 x Trenngelpuffer [ml]	1,25	1,25
steriles Millipore [ml]	3,245	2,87
TEMED (10 %) [ml]	0,1	0,1
APS-Lsg. (10 %) [ml]	0,03	0,03

**2.3.3.2 Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf**

Die Proben, die während der Expression entnommen und auf Eis gelagert wurden, werden wie folgt für die analytische SDS-DISKPAGE vorbereitet:

- 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen und Pellet in 20 µl Proteingel-Ladepuffer (PBJR) resuspendieren
- 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubieren, zentrifugieren
- Proben entweder direkt zur Analyse einsetzen oder bei -20°C lagern

Als Faustregel zur Beladung der einzelnen Gelspuren gilt:  $x \mu\text{l (Probe)} = 8/\text{o.D.}_{600}$  (Zellkultur-Probe)

Gelkammer mit Klammern in einer Midget 2050 Elektrophorese-Einheit (für 1-2 Gele) befestigen

- ca. 170 ml SDS-Elektrophorese-Puffer (2 Gele: 250 ml) in oberen und unteren Pufferbehälter füllen
- Probenkamm ziehen, Proben in die Taschen pipettieren
- Elektrophoreselauf mit 15 mA/Gel
- Gelkammer entnehmen und mit Hilfe der Spacer vorsichtig öffnen
- Gel färben oder zum Western Blot einsetzen

### 2.3.3.3 Färbung der Proteine und Dokumentation

Durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 werden die Proteine im Gel sichtbar gemacht und fixiert.

- Gel in der Coomassie-Färbelösung kurz aufkochen und unter leichtem Schütteln 10 min anfärben
- Färbelösung abgießen
- Proteingel-Entfärbelösung zugeben, aufkochen, unter leichtem Schütteln ca. 10 min entfärben
- Entfärbelösung 2-3 x wechseln und ohne weiteres Aufkochen ca. 2 h bei RT weiter entfärben

### 2.3.4 Affinitätschromatographie von His-Tag-Fusionsproteinen

#### 2.3.4.1 Affinitätschromatographie

- Packen der Säule mit Ni-NTA Superflow-Harz nach den Anweisungen des Herstellers (Qiagen)
- Äquilibrieren der Matrix mit 5 Säulenvolumen Aufschlusspuffer
- Referenzküvette des Durchflussphotometers mit Aufschlusspuffer eichen
- Schreiber mit 20 mV und 1 mm/min starten - vollen Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchflussphotometers (Absorption bei 280 nm) passend einregeln
- Flussrate 0,5 bis 1 ml/min
- Ultrazentrifugation (50 min) der Protein-Lösung bei 45.000 rpm und 4 °C
- Beladen der Säule mit dem Überstand der ultrazentrifugierten Protein-Lösung
- Durchlauf in Form einer Fraktion auffangen
- Waschen der Protein-Matrix mit Waschpuffer I bis die o.D.<sub>280</sub> stabil ist (5-10 Säulenvolumen)
- Referenzküvette des Durchflussphotometers mit Waschpuffer II eichen
- Skalenausschlag an der Messeinheit des Durchflussphotometers auf 0,5 einregeln
- Waschen der Protein-Matrix mit Waschpuffer II bis die o.D.<sub>280</sub> stabil ist
- Schreiber auf 10 mV umstellen
- Elution der Fusionsproteine mit einem 0-1 molaren Imidazolgradienten
- Durchlauf in 4 ml Fraktionen sammeln

Zur Auswertung der Affinitätschromatographie werden geeignete Volumina des Durchlaufes beim Beladen der Säule, beim Waschen und insbesondere bei der Elution als Proben in einer analytischen SDS-DISKPAGE (→ III 2.3.3) eingesetzt.

Die Fraktion, bei der ein Elutionspeak während der Chromatographie detektiert wird, wird anschließend aufkonzentriert und umgepuffert (→ III 2.3.5)

### 2.3.4.2 Regeneration des Ni-NTA-Harzes

Das Ni-NTA Superflow-Harz kann 5 – 6 mal wiederverwendet werden, wenn es nach jedem Gebrauch regeneriert wird.

- Waschen der Matrix mit 5 Säulenvolumen EDTA
- Waschen der Matrix mit 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub>
- Beladen der Matrix mit 2 Säulenvolumen NiCl<sub>2</sub>
- Waschen der Matrix mit 2 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O
- Äquilibrieren der Matrix mit 2 Säulenvolumen Aufschlusspuffer

Die Säule kann so bei 4 °C gelagert und erneut zur Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

### 2.3.5 Proteinkonzentrierung und Umpuffern durch Ultrafiltration

Die Proteinlösung wird mittels Zentrifugalkraft durch eine Ultrazentrifugationsmembran gepresst. Die Poren definierter Größe halten Proteine ab einem bestimmten Molekulargewicht ( $\geq 5$  kDa) zurück, was zur Konzentrierung führt. Ist ein bestimmtes Volumen der aufkonzentrierten Proteinlösung erreicht, wird diese in einen neuen Puffer pipettiert.

- Ultrafree-4 Konzentrator im passenden PE-Röhrchen mit Proteinlösung befüllen
- bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugieren bis die gewünschte Konzentrierung (50 – 100  $\mu$ l) erreicht ist
- zum Umpuffern wird die Proteinlösung in 2 ml Proteinaufbewahrungspuffer gegeben und kann anschließend bei –20°C gelagert werden

### 2.3.6 HPLC Gelpermeationschromatographie (GPC) des C-terminalen ExpG-Fusionsproteins

Die Größenverteilung von ExpG(His)<sub>6</sub> wurde durch GPC mit einer TSK Gel G2000SW Säule (TosoHaas, Stuttgart) ermittelt. Mit Hilfe des „LMW Gel Filtration Calibration Kits“ wurde die Säule kalibriert. Die Eluierung der Proteine erfolgte durch den Gelfiltrationspuffer (50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und die Absorption wurde bei 280 nm durch einen UV-Detektor gemessen. Die Konzentration von ExpG(His)<sub>6</sub> in Proteinaufbewahrungspuffer betrug 4  $\mu$ g/ $\mu$ l. Von dieser Proteinlösung wurden 20  $\mu$ l auf die Säule injiziert.

## 2.4. Immunologische Methoden

### 2.4.1 Immunoblotting-Verfahren (Western-Blot)

Proteingemische werden mittels analytischer SDS-DISKPAGE ( $\rightarrow$  2.3.3) aufgetrennt und mit der "Semi-Dry-Blotting"-Methode (Khyse-Anderson, 1984) zwischen zwei Graphitplatten im elektrischen Feld vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Semi-Dry-Proteinblot:

- ungefärbtes Proteingel 15 min in Towbin-Transferpuffer äquilibrieren
- Nitrocellulose-Membran und 6 Filterpapiere 3MM in den Maßen 5,5 cm x 8,5 cm (Minigele) zuschneiden und 5 min in Towbin-Transferpuffer äquilibrieren
- folgendes Sandwich auf die untere Graphitplatte (Anode) einer *Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) schichten:
  - 3 Filterpapiere 3 MM (unten)
  - Nitrocellulose-Membran
  - Proteingel (ohne Sammelgel)
  - 3 Filterpapiere 3 MM (oben)
- Luftblasen aus dem Sandwich herausrollen
- obere Platte (Kathode) auflegen, anschließen, 1 h bei 15 V transferieren
- anschließend kann der Protein-Transfer durch reversibles Anfärben der Membran mit Ponceau-S in TBS-Puffer überprüft werden

**2.4.2 Immunologische Detektion geblotteter Proteine**

Spezifische Proteine/Epitope werden auf der Nitrocellulose-Membran durch ein indirektes immunologisches Verfahren nachgewiesen. Zunächst bindet der unmarkierte Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird anschließend von einem Sekundärantikörper erkannt, der Spezies-spezifisch den Primärantikörper erkennt. Der Sekundärantikörper ist mit einem Detektionssystem konjugiert, z. B. mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase. Nach spezifischer Substratzugabe katalysiert dieses Enzym die Entstehung eines sichtbaren Farbkomplexes an den Stellen auf der Membran, an denen der Sekundärantikörper gebunden hat.

- Nitrocellulose-Membran 1-2 h in Blockingpuffer inkubieren, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren
- 3 ml Immunpuffer pro Membran (5,5 x 8,5 cm) mit adäquat verdünnter Primärantikörperlösung mischen
- Membran 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C mit Primärantikörper-Mix in Folie eingeschweißt inkubieren
- 3 x 15 min in TBS waschen
- Membran 1,5 h mit entsprechend verdünnter Spezies-spezifischer Sekundärantikörperlösung in TBS inkubieren
- 3 x 15 min in TBS waschen
- in Entwickler-Lösung inkubieren bis die Banden sichtbar sind, Reaktion durch Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> stoppen

## IV ERGEBNISSE

### 1. Molekularbiologische Charakterisierung des ExpG-Proteins aus *Sinorhizobium meliloti*

Das Protein ExpG aus *S. meliloti* zeigt Ähnlichkeiten zu Transkriptionsregulatoren der MarR-Familie. Mitglieder der MarR-Familie kontrollieren ein Sortiment an biologischen Funktionen wie z.B. Vermittlung von Resistenzen gegen multiple Antibiotika sowie Schutz gegenüber Detergenzien, Agenzien die oxidativen Stress auslösen können, organischen Lösungsmitteln oder Pathogenitätsfaktoren (Alekhun & Levy, 1999; Miller & Sulavik, 1996). Die Regulatoren können an die DNA mittels eines *helix-turn-helix* (HTH)-Motivs binden. Da bereits frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe den regulatorischen Einfluss des *expG*-Genprodukts auf die Expression der *exp*-Gene zeigen konnten (Rüberg et al., 1999), sollte in dieser Arbeit die direkte Bindung des ExpG-Proteins an die *exp*-Promotorregionen gezeigt werden.

Die Aminosäuresequenz des Proteins ExpG und das HTH-Motiv sind in Abb. IV.1 dargestellt.

1	MNHRILYPFA	DFGDTVAILP	ANETQRKGLD	TPVDDRDGDD	SLVTYFELAR
51	VMERASRRFS	GLLRAELTKL	<b>GVEDIGPAQA</b>	<b>MVLLAIGEAE</b>	<b>LSVGELDRG</b>
101	<b>HYVGSNISYY</b>	<b>LKQLADGDYI</b>	<b>DRIASQRDKR</b>	<b>SARIRLSEKG</b>	<b>RQLCAGLRQA</b>
151	<b>AKGYERALSH</b>	<b>GDQDRRNLET</b>	AFQTLHRLEL	VWGNAARYGI	

Abb. IV.1: Aminosäuresequenz des ExpG Proteins. Das HTH-MarR-Motiv ist durch Fettdruck hervorgehoben.

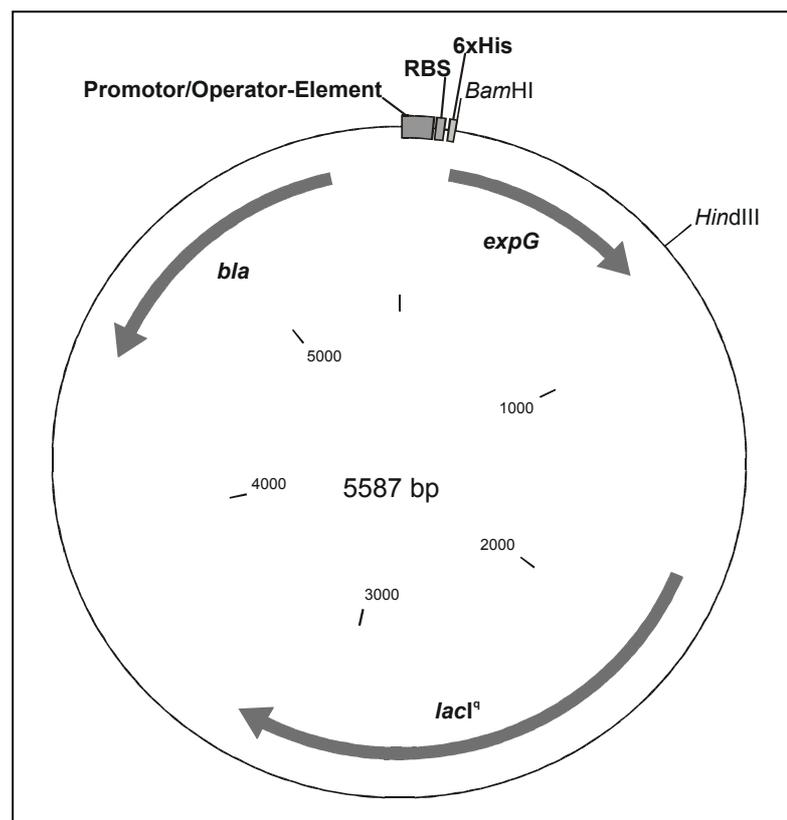
#### 1.1 Heterologe Expression und Aufreinigung des N-terminalen (His)<sub>6</sub>ExpG- und des C-terminalen ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins

##### 1.1.1 Konstruktion des Expressionssystems für das N-terminale Fusionsprotein (His)<sub>6</sub>ExpG

Das *expG*-Gen des *S. meliloti* Rm2011 Wildtyp-Stammes wurde mittels PCR amplifiziert. Als *Template* diente das Plasmid pARIIa (Becker et al., 1997), das ein 4,249 Kilobasen (kb) Fragment der *exp*-Genregion trägt. An die PCR-Primer (→ III.1.7) waren die Sequenzen für eine *Bam*HI- und *Hind*III-Restriktionsschnittstelle angefügt. Dieses so konstruierte *Bam*HI-

*Hind*III-Fragment umfasst 573 Basenpaare (bp) der Kodierregion des *expG*-Gens und 51 bp stromabwärts von *expG*.

Das Fragment wurde in den Expressionsvektor pWH844 (Schirmer et al., 1997), ein Derivat des Qiaexpress-Systems (Qiagen, Hilden), kloniert. Das so entstandene Konstrukt wurde mit pHisG4032 (→ Abb. IV.2) bezeichnet und kodiert für ein Fusionsprotein aus ExpG von Aminosäure eins (Met) bis Aminosäure 190 (Ile) mit einem N-terminalen (His)<sub>6</sub>GlySer-Anhang (*Tag*).



**Abb. IV.2: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pHisG4032.** Das Expressionsplasmid trägt unter anderem eine für sechs N-terminale Histidine (6xHis) kodierende Sequenz, die im Leseraster mit der 573 bp langen *expG*-Sequenz aus *S. meliloti* fusioniert ist. RBS bezeichnet eine synthetische Ribosomenbindestelle. Das optimierte Promotor/Operator-Element besteht aus dem T5-Phagenpromotor und zwei *lac*-Operator-Sequenzen, die eine Induktion mit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) ermöglichen. Die bei der Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind mit *Bam*HI und *Hind*III gekennzeichnet. Abkürzungen: *lacI*<sup>q</sup>, Lac-Repressorgen; *bla*,  $\beta$ -Lactamase-Gen (vermittelt Ampicillin-Resistenz).

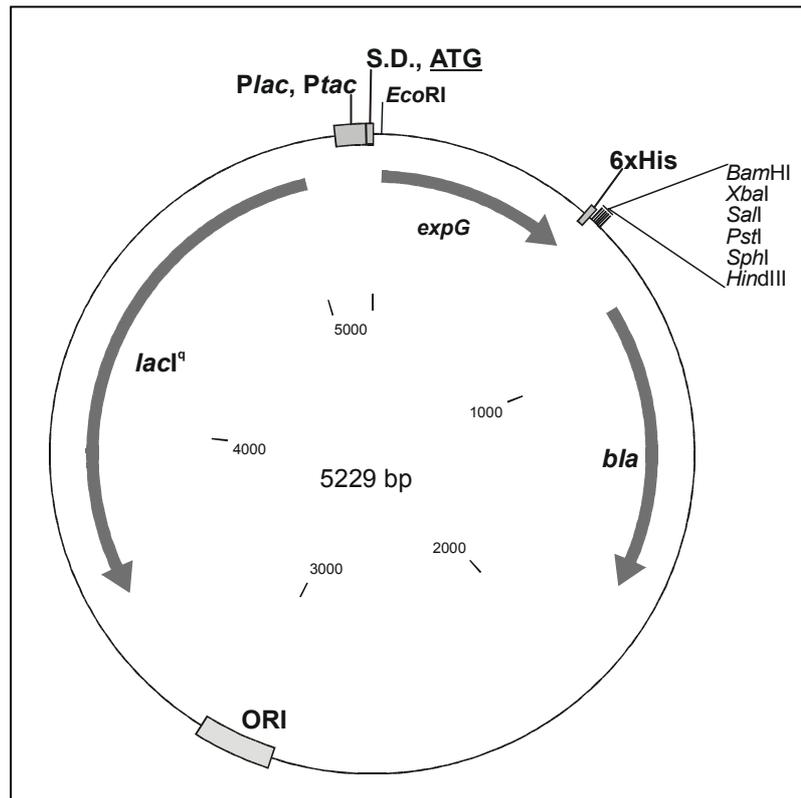
Der Expressionsvektor enthält den Promotor des T5-Phagen der von der *E.coli* RNA-Polymerase erkannt wird und eine hohe Expression des Fusionsproteins bewirkt. Die zwei *lac*-Operator-Sequenzen im Promotor/Operator-Element erhöhen die *lac*-Repressor-Bindung und somit die effiziente Repression des T5-Promotors. Die synthetische Ribosomen-Bindestelle (RBS) bewirkt eine hohe Translationsrate. Das *lacI*<sup>q</sup>-Repressorgen erlaubt eine durch Isopropanyl- $\beta$ -D-thiogalactosid chemisch induzierbare, kontrollierte Überexpression

des Fusionsproteins in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Das Expressionskonstrukt pHisG4032 wurde in den *E. coli*-Stamm M15 [pRep4] transformiert. Dieser *E. coli*-Wirtstamm für das QIAexpress-System erlaubt eine hohe Expression von rekombinanten Proteinen.

### 1.1.2 Konstruktion des Expressionssystems für das C-terminale Fusionsprotein ExpG(His)<sub>6</sub>

Auch für das Expressionssystem des C-terminalen Fusionsproteins wurde das *expG*-Gen des Wildtyp-Stammes Rm2011 mittels PCR amplifiziert und das Plasmid pARIIa (Becker et al., 1997) auch hier als *Template* genutzt. An die PCR-Primer ( → III.1.7) waren die Sequenzen für eine *EcoRI*- und *Ecl136II*-Restriktionsschnittstelle angefügt. In den N-terminalen Primer war nach der *EcoRI*-Schnittstelle ein zusätzliches Adenosin eingesetzt, um das Leseraster mit der fusionierten *expG*-Sequenz zu erhalten. Der C-terminale Primer kodierte des weiteren für sechs Histidine (His) und ein nachfolgendes Stoppcodon. Das so konstruierte *EcoRI-Ecl136II*-Fragment umfasst 567 bp der Kodierregion des *expG*-Gens sowie 18 bp für den (His)<sub>6</sub>-*Tag* und ein abschließendes Stoppcodon.

Das Fragment wurde in den mit *EcoRI* und *SmaI* verdauten Expressionsvektor pEXP2 kloniert und das so entstandene Konstrukt mit pHisGC31 (→ Abb. IV.3) bezeichnet. Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus ExpG von Aminosäure zwei (Asn) bis Aminosäure 190 (Ile) mit einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>-*Tag* und zehn zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren (Met Asn Ile Phe Glu Met Leu Arg Asn Ser).

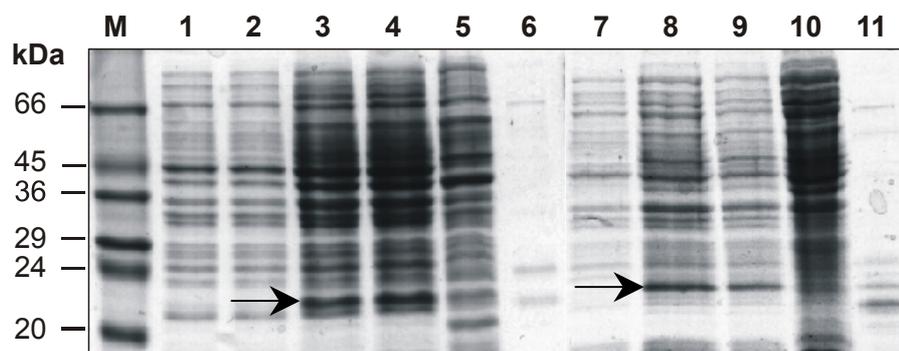


**Abb. IV.3: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pHisGC31.** Das Expressionsplasmid trägt unter anderem eine für sechs C-terminale Histidine (6xHis) kodierende Sequenz, die im Leseraster mit der 567 bp langen *expG*-Sequenz aus *S. meliloti* fusioniert ist. Die bei der Klonierung verwendete und unveränderte Restriktionsschnittstelle ist durch Fettdruck hervorgehoben. Abkürzungen: *lacI<sup>q</sup>*, Lac-Repressorgen; *bla*,  $\beta$ -Lactamase-Gen (vermittelt Ampicillin-Resistenz); *P<sub>lac</sub>*, *lac*-Promotor; *P<sub>tac</sub>*, *tac*-Promotor; S.D., Shine-Dalgarno-Sequenz; ATG, Startcodon; ORI, origin of replication.

Der Expressionsvektor enthält den *tac*-Promotor, der eine hohe Expression des Fusionsproteins ermöglicht. Der *lac*-Promotor bewirkt die *lac*-Repressor-Bindung und somit die effiziente Repression des *tac*-Promotors. Die Shine-Dalgarno-Sequenz vermittelt eine hohe Translationsrate und das *lacI<sup>q</sup>*-Repressorgen erlaubt eine durch Isopropanyl- $\beta$ -D-thiogalactosid chemisch induzierbare, kontrollierte Überexpression des Fusionsproteins in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Das Expressionskonstrukt pHisGC31 wurde in den *E. coli* SURE-Stamm transformiert der als optimierter Expressionsstamm die Produktion rekombinanter Proteine erlaubt.

### 1.1.3 Heterologe Expression des N-terminalen (His)<sub>6</sub>ExpG- und des C-terminalen ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins

Die heterologe Expression der Fusionsproteine wurde bei einer Wachstumstemperatur von 37°C durchgeführt. Nach Inkubation der Bakterienkultur bis zu einer o.D.<sub>580</sub> von 0,5 bis 0,7 wurde die Expression der Fusionsproteine durch 1 mM IPTG induziert. Nach weiterer dreistündiger Inkubation erfolgte die Zellernte und anschließende Gesamtproteinextraktion. Die Expression und Aufreinigung des N-terminalen Fusionsproteins (His)<sub>6</sub>ExpG bzw. des C-terminalen ExpG(His)<sub>6</sub> ist zusammenfassend auf einem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten SDS-PAGE Gel in Abb. IV.4 dargestellt. Die Gesamtzellextrakte nach Induktion zeigen im Vergleich mit den Gesamtzellextrakten vor Induktion nach Auftrennung in der SDS-PAGE eine Bande bei ca. 22 kDa, die der Größe des (His)<sub>6</sub>ExpG-Fusionsproteins entspricht bzw. bei ca. 23 kDa, die der Größe des ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins entspricht.



**Abb. IV.4: Zusammenfassende analytische SDS-DISKPAGE der Expression und Aufreinigung des N-terminalen Fusionsproteins (His)<sub>6</sub>ExpG bzw. des C-terminalen Fusionsproteins ExpG(His)<sub>6</sub>.** Die Abbildung zeigt ein Coomassie-gefärbtes Acrylamid-Gel mit Gesamtzellextrakten, Gesamtproteinextrakten und aufgereinigten Protein-Lösungen.

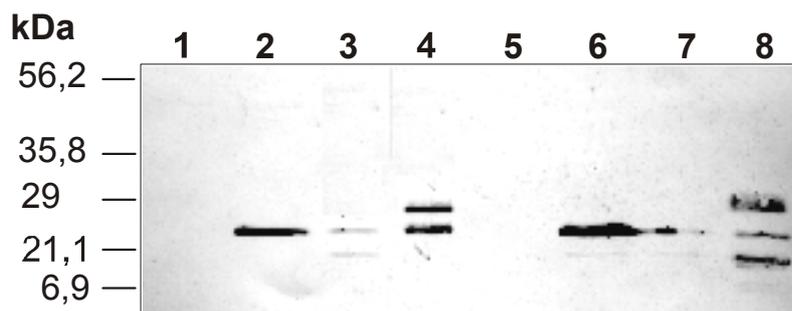
M: Marker

- 1 + 2: *E. coli* M15.pHisG4032-Gesamtzellextrakt vor der Induktion
- 3 + 4: *E. coli* M15.pHisG4032-Gesamtzellextrakt nach der Induktion
- 5: *E. coli* M15.pHisG4032-Gesamtproteinextrakt nach der Zellernte
- 6: (His)<sub>6</sub>ExpG nach Affinitätschromatographie
- 7: *E. coli* SURE.pHisGC31-Gesamtzellextrakt vor der Induktion
- 8 + 9: *E. coli* SURE.pHisGC31-Gesamtzellextrakt nach der Induktion
- 10: *E. coli* SURE.pHisGC31-Gesamtproteinextrakt nach der Zellernte
- 11: ExpG(His)<sub>6</sub> nach Affinitätschromatographie

### 1.1.4 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Fusionsproteine

Das Gesamtproteinextrakt wurde durch Ultrazentrifugation von den Zelltrümmern befreit und an einer Ni-NTA-Matrix aufgereinigt. Der (His)<sub>6</sub>-Anteil des Fusionsproteins bindet spezifisch an die Matrix und alle übrigen Proteine des Gesamtproteinextrakts können durch diverse Waschschriffe während der Aufreinigung herausgewaschen werden. Durch Verdrängung der Fusionsproteine von der Säulenmatrix mittels eines 0 bis 1 M Imidazol-Gradienten in Pufferlösung wurde das (His)<sub>6</sub>ExpG- bzw. ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein eluiert. Das jeweilige Eluat zeigt nach Auftrennung in der SDS-PAGE eine Bande bei ca. 22 und 24 kDa für das N-terminale und bei ca. 22, 23 und 24 kDa für das C-terminale Fusionsprotein (→ Abb. IV.4).

Um sicherzustellen, dass es sich bei den jeweiligen Banden um die gewünschten Fusionsproteine handelt, wurden sie im Western-Blot immunologisch mit einem Anti-His-Antikörper, der spezifisch den His-Tag-Anteil detektiert, und einem spezifischen Sekundärantikörper nachgewiesen (→ Abb. IV.5). Da in diesem Western-Blot neben den entsprechenden Banden für das jeweilige N-terminale bzw. C-terminale Fusionsprotein auch Banden detektiert wurden die einem Protein mit etwas geringerem bzw. etwas größerem Molekulargewicht entsprechen, wird davon ausgegangen, dass es sich bei den zusätzlichen Banden um unterschiedlich gefaltete Formen oder, im Fall der bei geringerem Molekulargewicht bandierenden Proteinen, um Degradationsprodukte des (His)<sub>6</sub>ExpG- bzw. ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins handelt.



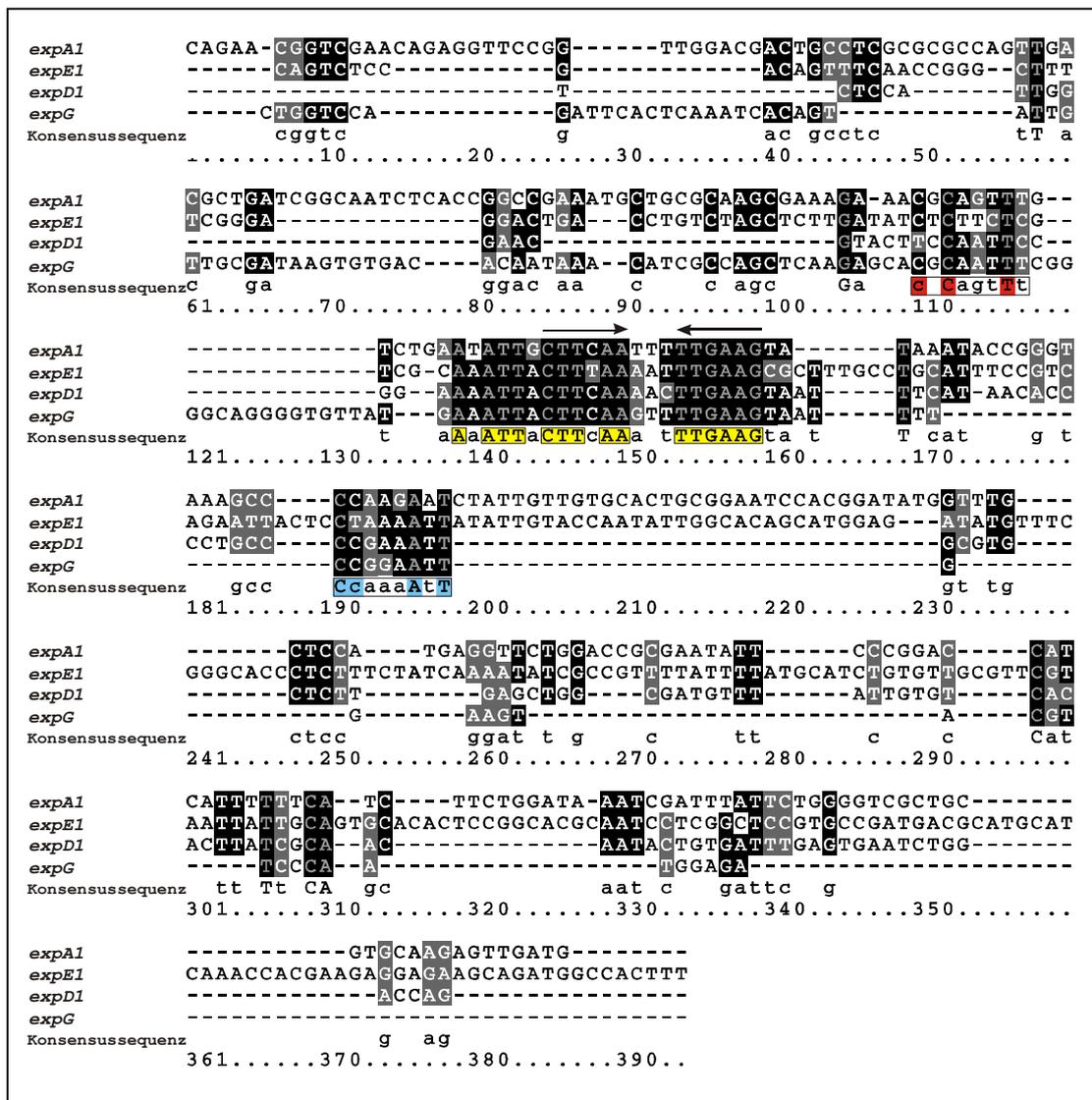
**Abb. IV.5: Western-Blot und Nachweis mit einem gegen den (His)<sub>6</sub>-Anteil gerichteten Antikörper.**

- 1: *E. coli* M15.pHisG4032-Gesamtzellextrakt vor der Induktion
- 2: *E. coli* M15.pHisG4032-Gesamtzellextrakt nach der Induktion
- 3: *E. coli* M15.pHisG4032-Gesamtproteinextrakt nach der Zellernte
- 4: (His)<sub>6</sub>ExpG nach Affinitätschromatographie
- 5: *E. coli* SURE.pHisGC31-Gesamtzellextrakt vor der Induktion
- 6: *E. coli* SURE.pHisGC31-Gesamtzellextrakt nach der Induktion
- 7: *E. coli* SURE.pHisGC31-Gesamtproteinextrakt nach der Zellernte
- 8: ExpG(His)<sub>6</sub> nach Affinitätschromatographie

Insgesamt war die Ausbeute der N-terminalen Fusionsproteinaufreinigung relativ gering und ließ sich durch den Wechsel zum C-terminalen Fusionsprotein leicht steigern. Eine Verbesserung durch die Verwendung anderer Expressionssysteme, wie z.B. der Einsatz des Flag-Tag-Expressionsvektors pFLAG MAC (Eastman Kodak Company, New Haven, CT, USA) mit anschließender Aufreinigung des Fusionsproteins an einem Anti-Flag-Affinitäts-Harz, ließ sich nicht erzielen. Aus diesem Grund wurde das speziell etablierte His-Tag-Expressionssystem weiter angewendet.

## **2. Die *expA1*-, *expG*-, *expD1*- und *expE1*-Promotorregionen zeigen starke Sequenzhomologien**

In vorangegangenen Arbeiten konnte durch Expressionsanalysen ausgewählter *exp-lacZ*-Transkriptionsfusionen bereits ein regulatorischer Einfluss von ExpG auf die EPS II-Biosynthesegene gezeigt werden. Mit Hilfe des DCA (Divide and Conquer Multiple Alignment) Programms (Stoye, 1998) wurde ein Vergleich der Promotorregionen des *expA1*-, *expG*-, *expD1*- und *expE1*-Gens durchgeführt. Die Sequenzen dieser Promotorregionen zeigen starke Übereinstimmungen in drei unterschiedlichen Bereichen. Es wurde eine 21 bp umfassende konservierte Kernregion, die ein Palindrom aufweist, identifiziert. Eine weitere hohe Ähnlichkeit zeigte ein Bereich von 8 bp stromaufwärts dieser Kernregion, der als Box1 bezeichnet wurde. Die dritte übereinstimmende Region von ebenfalls 8 bp wurde stromabwärts der Kernregion gefunden und Box2 benannt (→ Abb. IV.6). Die identifizierte Kernregion mit der palindromischen, AT-reichen Sequenz ist ein starker Hinweis auf eine mögliche Bindestelle des ExpG-Proteins in der *expA1*-, *expG*-, *expD1*- bzw. der *expE1*-Promotorregion.



**Abb. IV.6: Vergleich der Promotorregionen von *expA1*, *expE1*, *expD1* und *expG*.** Die Konsensussequenz der konservierten Kernregion ist gelb hinterlegt. Konservierte Nukleotide in Box1 sind rot und in Box2 blau markiert. Das Palindrom in der Kernregion ist durch Pfeile gekennzeichnet.

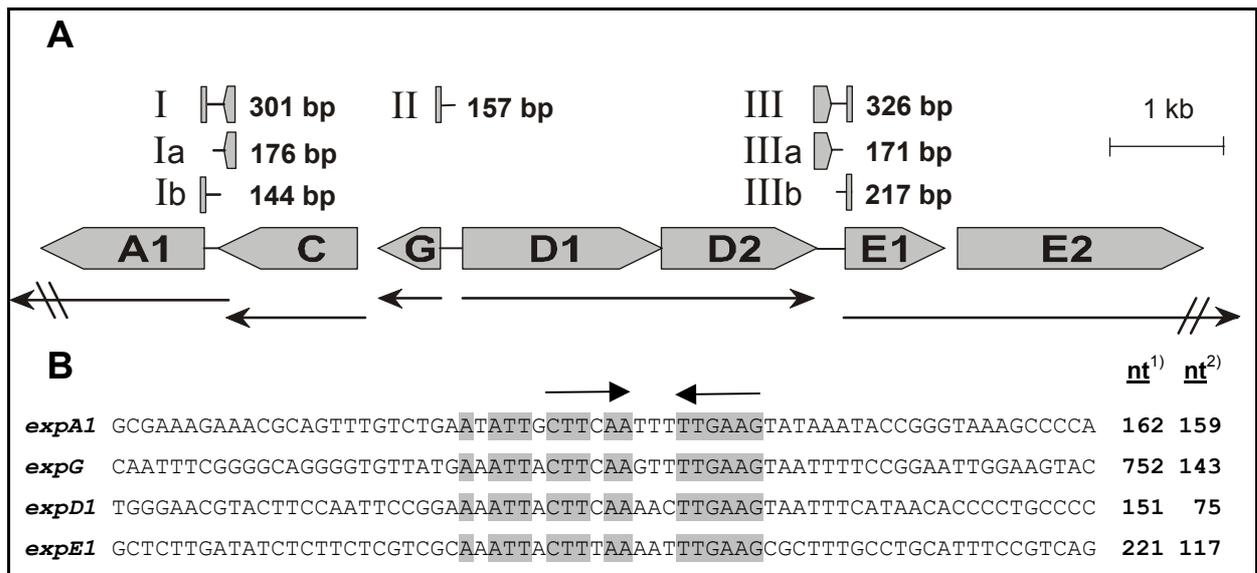
### 3. Nachweis der Bindung von ExpG an die *expA1*-, *expG/expD1*- und *expE1*-Promotorregionen

Die direkte Bindung von ExpG an die potentiellen Bindestellen in den *exp*-Promotorregionen wurde durch „Electrophoretic Mobility shift assays“ (EMSA) nachgewiesen. Für die Gelretardationsexperimente wurden Cy3-markierte DNA-Fragmente (→ Abb. IV.7), die bestimmte Promotorregionen bzw. intergenische Regionen der EPS II–Biosynthesegene tragen, mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Hilfe des *QIAquick-spin PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Als *Template* wurde das Plasmid pARIIA bzw. pARIV

(Becker et al., 1997) eingesetzt. Die verwendeten Primer sowie die resultierende Fragmentlänge und -bezeichnung sind in der nachfolgenden Tabelle IV.1 zusammengefasst. Zum Nachweis der Protein-DNA-Bindung wurde das überexprimierte und aufgereinigte N-terminale (His)<sub>6</sub>ExpG eingesetzt. Bindende und nicht-bindende DNA-Fragmente sind ebenfalls in Tabelle IV.1 aufgeführt.

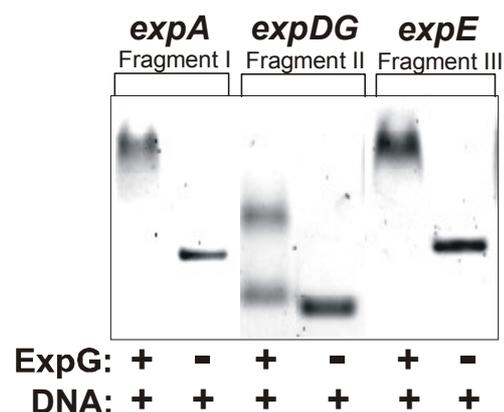
**Tab. IV.1: Primer, Markierung und *Template* zur Amplifizierung der DNA-Fragmente für EMSAs.** Des Weiteren sind die Fragmentbezeichnung und die resultierende Fragmentlänge der amplifizierten *expA1*- bzw. *expE1*-Promotorregion sowie der intergenischen Region zwischen *expG* und *expD1* aufgeführt. (+) Protein-DNA-Bindung; (-) keine Protein-DNA-Bindung.

Promotorregion/ intergenische Region	Primer	Template	Fragment- länge [bp]	Fragment	Bindung
<i>expA1</i>	A1 A4-Cy3	pARIIa	301	I	+
<i>expA1</i>	A3 A4-Cy3	pARIIa	176	Ia	+
<i>expA1</i>	A1-Cy3 A2	pARIIa	144	Ib	-
<i>expG/expD1</i>	G1 G1-Cy3	pARIIa	158	II	+
<i>expE1</i>	E1-Cy3 E5	pARIV	326	III	+
<i>expE1</i>	E3 E5-Cy3	pARIV	171	IIIa	+
<i>expE1</i>	E1-Cy3 E4	pARIV	217	IIIb	-



**Abb. IV.7: DNA-Fragmente für EMSAs und Vergleich der Promotorregionen.** **A)** Dargestellt ist die *exp*-Genregion von *expA1* bis *expE2* (10.330 nt) aus dem *exp*-Gencluster. Transkriptionseinheiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. I, Ia, Ib, II, III, IIIa und IIIb bezeichnen die Cy3-markierten DNA-Fragmente für die EMSAs. **B)** Alignment der konservierten Kernregion in der *expA1*-, *expG*-, *expD1*- und *expE1*-Promotorregionen. Identische Nukleotide sind grau hinterlegt. Die Pfeile kennzeichnen das Palindrom in der Kernregion. <sup>1)</sup> Distanz des letzten grau markierten Nukleotids zum ATG des ersten *open reading frames* des jeweiligen Operons. <sup>2)</sup> Distanz bis zum 5'-Ende des DNA-Fragments I, Ia, II, III und IIIa.

Das N-terminale (His)<sub>6</sub>ExpG-Protein band an die Fragmente I, II und III (→ Abb. IV.8). Durch die Bildung des Protein-DNA-Komplexes wurde die Mobilität des jeweiligen DNA-Fragmentes in der Elektrophorese reduziert. Der Protein-DNA-Komplex war durch einen „shift“ im Vergleich mit dem Kontrollansatz, Cy3-markierte DNA ohne Protein, zu erkennen.



**Abb. IV.8: EMSAs mit aufgereinigtem (His)<sub>6</sub>ExpG-Fusionsprotein und *expA1*-, *expG/expD*- und *expE1*-Promotorfragmenten.** Die Proteinkonzentration in allen Reaktionsansätzen betrug 0,125 µg/µl.

Durch den Einsatz der DNA-Fragmente Ia, Ib, IIIa und IIIb (→ Abb. IV.7) konnte die ExpG-Bindestelle weiter eingegrenzt werden. Die Fragmente Ia und IIIa sind kürzer als Fragment I und III (→ Tab. IV.1), tragen jedoch weiterhin die konservierte Kernregion der *expA1*- bzw. *expE1*-Promotorregion. Auch an diese reduzierten Fragmente konnte (His)<sub>6</sub>ExpG (→ Abb. IV.9) binden. Die Fragmente Ib und IIIb zeigten keine Bindung des

ExpG-Proteins (→ Tab. IV.1). Die konservierte Kernregion liegt nicht auf diesen verkürzten *expA1*- bzw. *expE1*-Promotorfragmenten (→ Abb. IV.7), was darauf schließen lässt, dass die palindromische Kernregion in der *expA1*- und *expE1*-Promotorregion sowie in dem intergenischen *expG/expD*-Bereich an der Bindung des ExpG-Proteins beteiligt ist.

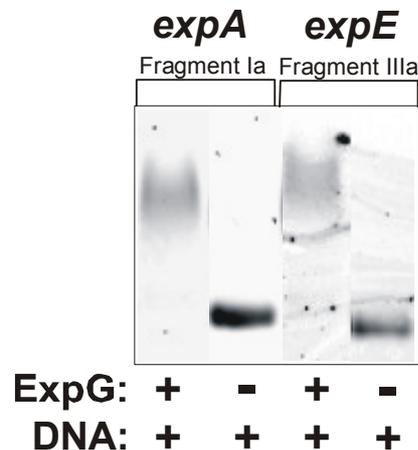
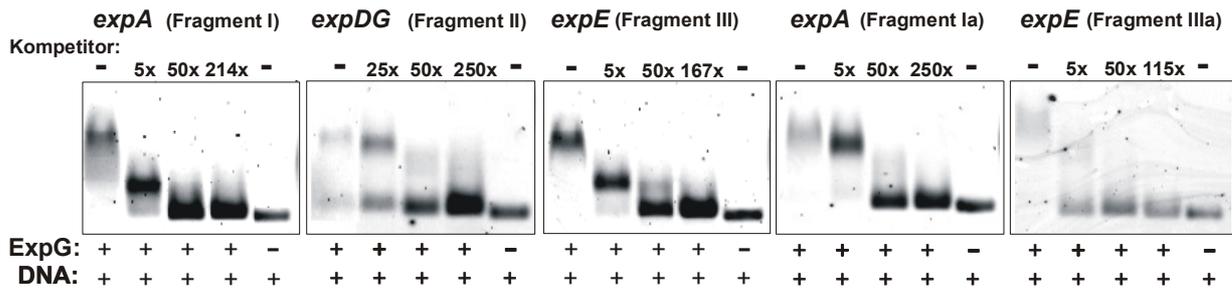


Abb. IV.9: EMSAs mit aufgereinigtem (His)<sub>6</sub>ExpG-Fusionsprotein und verkürzten *expA1*- sowie *expE1*-Promotorfragmenten. Die Proteinkonzentration in allen Reaktionsansätzen betrug 0,125 µg/µl.

#### 4. ExpG bindet spezifisch an die *expA1*-, *expG/expD*- und *expE1*-Promotorregionen

Die spezifische Bindung des (His)<sub>6</sub>ExpG-Proteins an die *exp*-Promotorregionen wurde durch Konkurrenzexperimente nachgewiesen. Zu den Reaktionsansätzen wurde unmarkierte Konkurrenz-DNA im Überschuss zur Cy3-markierten DNA zugegeben und im EMSA analysiert. Die Konkurrenz-DNA wurde mit den gleichen, aber unmarkierten Primern wie die Cy3-markierten bindenden DNA-Fragmente (→ Tab. IV.1) mittels PCR amplifiziert, anschließend aufgereinigt und im EMSA eingesetzt. Der im Überschuss vorhandene Konkurrenz-DNA band das (His)<sub>6</sub>ExpG-Protein und die Cy3-*exp*-Promotorfragmente konnten keinen Protein-DNA-Komplex bilden. Die Cy3-markierte DNA bandierte auf gleicher Höhe wie die DNA im Protein-freien Kontrollansatz und es war kein „shift“ zu erkennen.



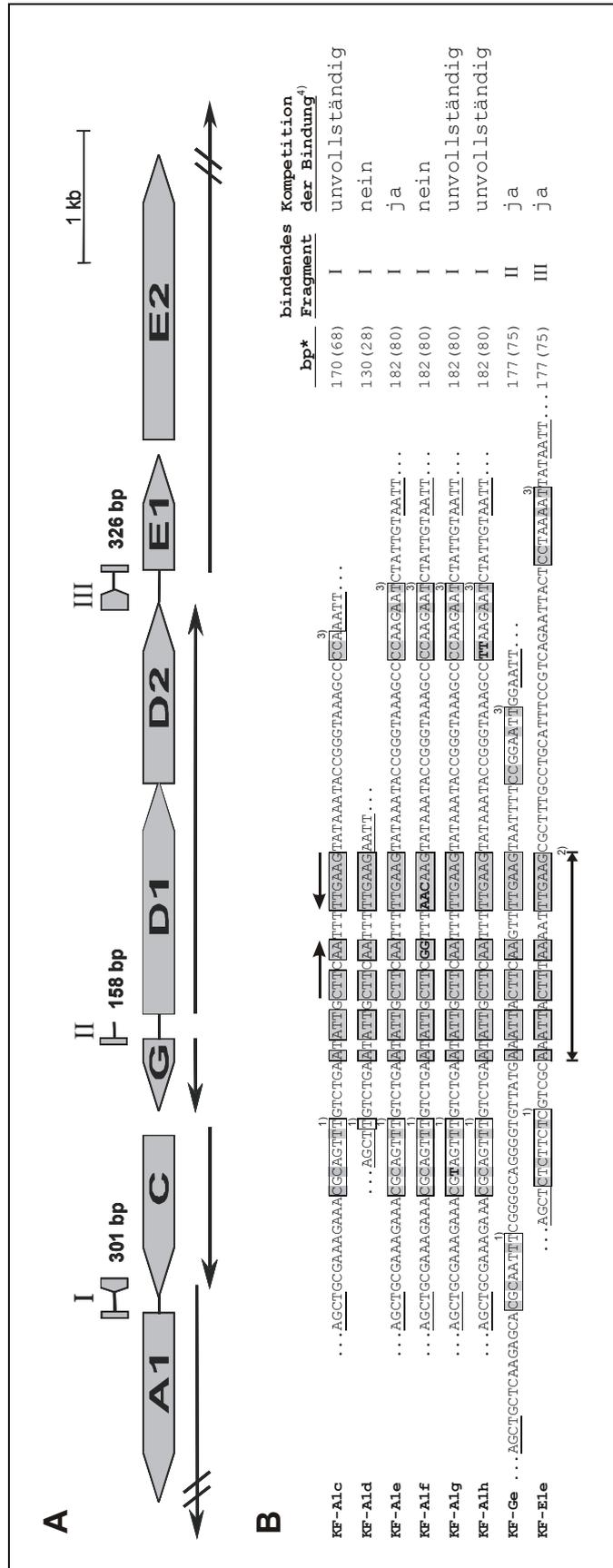
**Abb. IV.10: EMSAs mit aufgereinigtem  $(\text{His})_6\text{ExpG}$ -Fusionsprotein, *exp*-Promotorfragmenten und Kompetitor-DNA.** Die Proteinkonzentration in allen Reaktionsansätzen betrug 0,125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Zugabe der unmarkierten Kompetitor-DNA erfolgte in 5 bis 250x Überschuss zu den Cy3-markierten DNA-Fragmenten.

Ein 50x Überschuss an unmarkierter Kompetitor-DNA verhinderte die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes zwischen dem N-terminalen ExpG-Fusionsprotein und den Cy3-markierten DNA-Fragmenten I, II, III und Ia ( $\rightarrow$  Abb IV.10). Die Konkurrenz der Bindung zwischen dem Cy3-DNA-Fragment IIIa und dem  $(\text{His})_6\text{ExpG}$ -Protein erfolgte bereits bei einem 5x Überschuss an nicht-markierter Kompetitor-DNA ( $\rightarrow$  Abb IV.10). Das Konkurrenzexperiment mit 5x Überschuss an unmarkierter Kompetitor-DNA,  $(\text{His})_6\text{ExpG}$ -Protein und den Cy3-DNA-Fragmenten I und III führte zu einem unvollständigen „shift“ im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Kompetitor-DNA aber mit Protein und Cy3-markierter DNA ( $\rightarrow$  Abb IV.10). Diese unterschiedlichen „shifts“ könnten möglicherweise auf zwei verschiedene Bindestadien hinweisen, z.B. auf ein Protein-Dimer-DNA-Komplex bei dem unvollständigen „shift“ bzw. auf ein Protein-Tetramer-DNA-Komplex bei dem vollständigen „shift“. Nach der Zugabe ansteigender Konzentrationen von nicht-spezifischer Kompetitor-DNA, die vom Epstein-Barr Virus (Rawlins et al., 1985) stammt, ließ sich kein Effekt auf die Bindung des N-terminalen Fusionsproteins mit den spezifischen *exp*-DNA-Fragmenten feststellen. Diese Ergebnisse bestätigen die Spezifität der Bindung des N-terminalen  $(\text{His})_6\text{ExpG}$ -Fusionsproteins an das *expA1*-, *expG/expD*- sowie an das *expE1*-Promotorfragment.

## 5. Die palindromische Sequenz in den *exp*-Promotorregionen ist essentiell für die Bindung von ExpG

Der eindeutige Nachweis, dass die palindromische Kernregion innerhalb des *expA1*- und *expE1*-Promotors sowie in der intergenischen Region zwischen *expD1* und *expG* die tatsächliche ExpG-Bindestelle ist, konnte durch Konkurrenzexperimente mit speziell konstruierten Kompetitor-DNA-Fragmenten gezeigt werden. Zusätzlich zu der konservierten Kernregion sind auch die in den *exp*-Promotorregionen identifizierte Box1 und Box2 ( $\rightarrow$  Abb. IV.6) von großer Bedeutung.

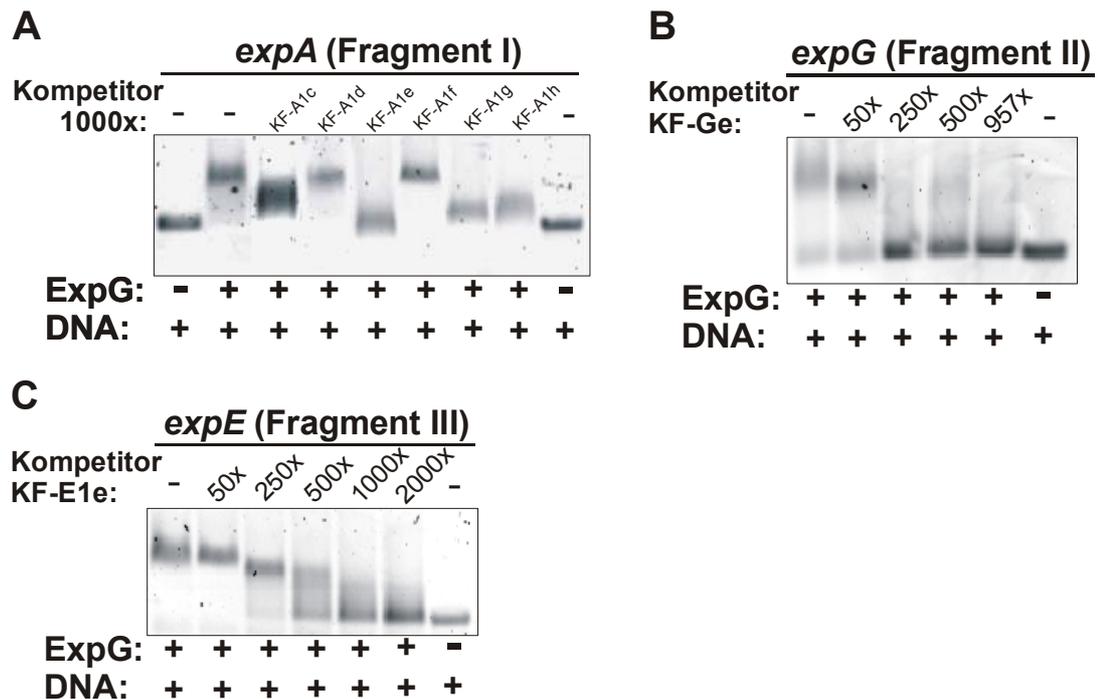
Zur Herstellung der Kompetitorfragmente wurden Oligonukleotide sowie die entsprechenden antisense Oligonukleotide hybridisiert (→ II.1.8 und 2.2.5.1) und die resultierenden dsDNA-Fragmente zunächst als Kompetitor-DNA eingesetzt. Diese 68 bis 80 bp umfassenden Fragmente fungierten nicht als effektive Kompetitoren der Protein-DNA-Interaktion in den Kompetitionsexperimenten. Aufgrund des *Hind*III- und *Eco*RI-Überhangs ließen sich die hybridisierten Oligonukleotide in den mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Eco*RI gespaltenen Vektor pUC18 klonieren. Die resultierenden Plasmide wurden als *Template* in der PCR zur Amplifizierung der entsprechenden Kompetitorfragmente (→ Abb IV.11 B) mittels der Primer universalM13 und reverseM13 eingesetzt. Die vom Vektor pUC18 abgeleiteten flankierenden Sequenzen der amplifizierten Kompetitor-DNA verlängern die spezifischen Sequenzen der *exp*-Promotorregionen auf 130 bp bis 182 bp (→ Abb IV.11), um zu vermeiden, dass die Kompetitor-Fragmente möglicherweise zu kurz für die DNA-Protein-Interaktion sind, obwohl sie die spezifische Sequenz der Bindestelle tragen. In den folgenden Kompetitionsexperimenten wurde im Gegensatz zu den bisherigen EMSAs statt des N-terminalen ExpG-Fusionsproteins das C-terminale ExpG(His)<sub>6</sub>-Protein eingesetzt. Der Wechsel vom N-terminalen zum C-terminalen Fusionsprotein erfolgte aufgrund erheblicher Schwierigkeiten bei der Aufreinigung des (His)<sub>6</sub>ExpG-Proteins über die Ni-NTA-Säule, die bei der Verwendung des C-terminalen Fusionsproteins nicht auftraten. Es wurden keine Unterschiede zwischen der Bindung des N-terminalen oder des C-terminalen Fusionsproteins und den spezifischen *exp*-DNA-Fragmenten festgestellt.



**Abb. IV.11: DNA-Fragmente für EMSAs und Alignment der spezifischen Kompetitor-Fragmente.** A) Dargestellt ist die exp-Genregion von *expA1* bis *expE2* aus dem *exp*-Gencluster (10.330 nt). Transkriptionseinheiten sind durch Pfeile markiert. I, II und III bezeichnen die Cyt3- markierten DNA-Fragmente für die EMSAs. B) Alignment der Kompetitor-Fragmente. Identische Nucleotide in den *expA1*-, *expG*- und *expE7*-Promotorregionen sind grau hinterlegt. <sup>1)</sup> Box1, <sup>2)</sup> konservierte Kernregion, <sup>3)</sup> Box2. Mutationen in Box1, der konservierten palindromischen Region und in Box2 sind fett gedruckt. Die invertierten Pfeile kennzeichnen das Palindrom in der konservierten Kernregion. AGCI *HindIII*-Überhang. AAAT *EcoRI*-Überhang. <sup>\*)</sup> Fragmentlänge nach Amplifizierung mittels PCR; Länge der nativen *S. meliloti*-Sequenz ist eingeklammert. <sup>4)</sup> siehe Abb. IV.12.

Die Kompetitor-Fragmente KF-A1e, g und h, KF-Ge sowie KF-E1e weisen die drei entsprechenden Motive der *expA*-, *expG/expD*- und *expE*-Promotorregionen auf. Die Fragmente KF-A1e (→ Abb. IV.12 A), KF-Ge (→ Abb. IV.12 B) und KF-E1e (→ Abb. IV.12 C), die die Wildtyp-Sequenz tragen, waren effektive Kompetitoren für die Bindung des C-terminalen ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins an die DNA-Fragmente I, II und III. Diese bindenden DNA-Fragmente beinhalten die jeweiligen *expA*-, *expG/expD*- und *expE*-Promotorregionen (→ Abb. IV.11 A). Das Kompetitor-Fragment KF-A1d, das nur die konservierte palindromische Region trägt (→ Abb. IV.11 B), konnte die Bindung von ExpG(His)<sub>6</sub> an die *expA*-Promotorregion (Fragment I) nicht unterbinden (→ Abb. IV.12 A). Auch das Fragment KF-A1c, auf dem die Box1, die palindromische Region, aber nur drei bp der Box2 vorhanden sind (→ Abb. IV.11 B), konnte keine vollständige Konkurrenz der Protein-DNA-Interaktion bewirken (→ Abb. IV.12 A) und lässt darauf schließen, dass zumindest die palindromische Region und Box2 für die Bindung von ExpG an die DNA erforderlich sind.

Der Austausch von fünf Nukleotiden in der palindromischen Region des Fragmentes KF-A1e führte zum Erhalt von Fragment KF-A1f (→ Abb. IV.11 B). KF-A1f hatte keinen Einfluss auf die Bindung von ExpG(His)<sub>6</sub> an die Wildtyp-Sequenz (Fragment I) im Konkurrenzexperiment (→ Abb. IV.12 A). Dieses Ergebnis zeigt, dass die palindromische Sequenz für die Bindung des C-terminalen Fusionsproteins essentiell ist. Weder eine Mutation in Box1, KF-A1g (→ Abb. IV.11 B), noch eine Mutation in Box2, KF-A1h (→ Abb. IV.11 B), verhinderten den Einfluss dieser Kompetitor-Fragmente im Konkurrenzexperiment, obwohl hier ebenfalls nur eine unvollständige Konkurrenz beobachtet werden konnte (→ Abb. IV.12 A). Die unvollständige Konkurrenz in diesen Experimenten ist ebenfalls ein Hinweis auf eventuelle unterschiedliche Binstadien der Protein-DNA-Komplexe. Möglicherweise wird auch hier bei einem unvollständigen „shift“ ein Protein-Dimer und bei einem vollständigen „shift“ ein Protein-Tetramer im Komplex gebunden, wie auch schon die in Abb. IV.10 dargestellten Konkurrenzexperimente vermuten ließen. Die Resultate der Konkurrenzexperimente mit den Fragmenten KF-A1d und KF-A1c, die entweder nur die palindromische Region oder die palindromische Region und Box1 aufweisen, zeigten, dass die alleinige konservierte palindromische Sequenz nicht ausreichend für eine effektive Bindung von ExpG(His)<sub>6</sub> ist. Die Motive Box1 bzw. Box2 ermöglichen offensichtlich eine vollständige DNA-Protein-Interaktion.



**Abb. IV.12: EMSAs mit aufgereinigtem ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein, *exp*-Promotorfragmenten und spezifischer Kompetitor-DNA. A) *expA1*-Promotorregion; DNA-Fragment I, B) *expG/expD*-Promotorregion; DNA-Fragment II und C) *expE1*-Promotorregion; DNA-Fragment III. Die Proteinkonzentration in allen Reaktionsansätzen betrug 0,013 µg/µl. Die Zugabe der unmarkierten Kompetitor-DNA erfolgte in 50 bis 2000x Überschuss zu den Cy3-markierten DNA-Fragmenten.**

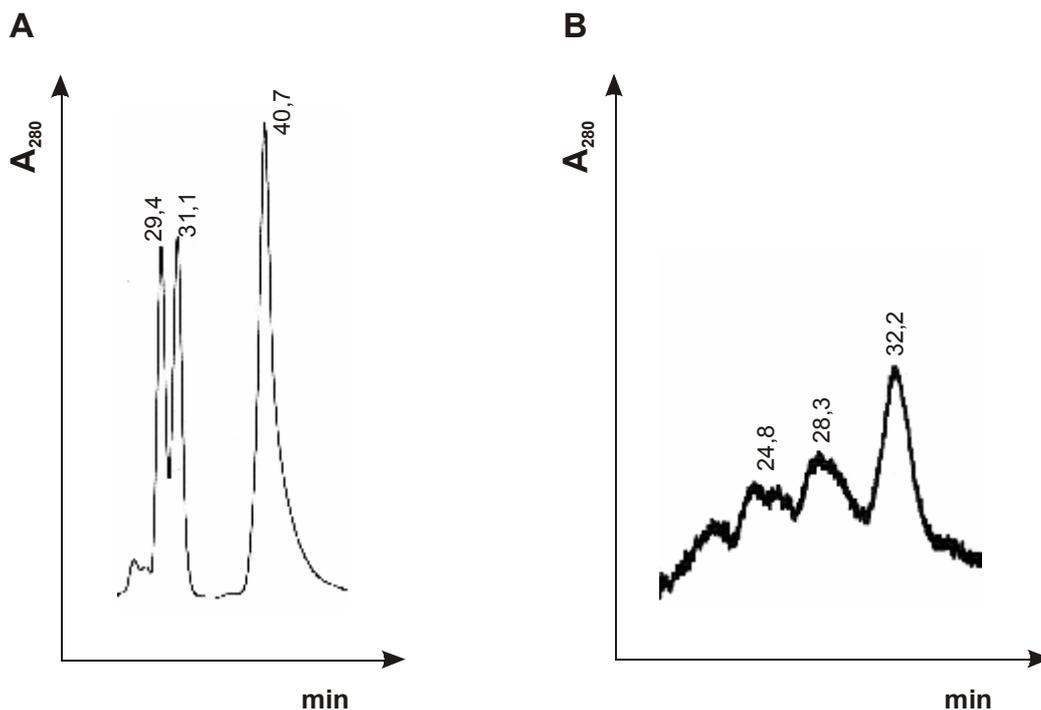
## 6. Das C-terminale ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein bildet Protein-Dimere

Das überexprimierte und über die Ni-NTA-Säule aufgereinigte C-terminale Fusionsprotein wurde aufkonzentriert und in Proteinaufbewahrungspuffer aufgenommen. Mit Hilfe der HPLC Gelpermeationschromatographie (GPC) erfolgte die Auftrennung der ExpG(His)<sub>6</sub>-Proteinlösung an einer TSK Gel G2000SW Säule, die zuvor mittels des *LMW Gel Filtration Calibration Kits* (→ Tab. IV.2) kalibriert wurde.

Im Chromatogramm zeigte das C-terminale ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein einen Peak nach ca. 32 min. Dieser Peak entspricht einem apparenten MW von 44,4 kDa unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Vergleich zu den entsprechenden Referenz-Proteinen (→ Abb. IV.13).

**Tab. IV.2: Referenzproteine des „LMW Gel Filtration Calibration Kits“.** Die Standard-Proteine wurden im Gelfiltrationspuffer gelöst.

Referenz-Protein	Molekulargewicht [kDa]	Absorption bei 280 nm [min]
Albumin	61,660	40,7
Ovalbumin	48,470	31,1
Chymotrypsinogen A	21,180	29,4
Ribonuclease A	15,230	n.d.



**Abb. IV.13: Chromatographische Auftrennung von ExpG(His)<sub>6</sub> zur Bestimmung der Größenverteilung des C-terminalen Fusionsproteins.** A) Kalibrierung der Säule durch Referenzproteine. B) Detektion von ExpG(His)<sub>6</sub> nach ca. 32 min. Als Laufmittel diente 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0). UV-Detektion durch Absorptionsmessung bei 280 nm.

In der SDS-PAGE zeigte ExpG(His)<sub>6</sub> ein MW von ca. 23 kDa (→ IV.1.1.3) und im Western Blot konnten entsprechende Banden mit einem MW von ca. 22 bis 24 kDa mittels eines Anti-His-Tag Antikörpers detektiert werden (→ IV.1.1.4). Diese ermittelten Molekulargewichte stimmen gut mit dem kalkulierten MW von ca. 23,2 kDa des C-terminalen ExpG-Fusionsproteins überein. Das in der GPC detektierte apparente MW von 44,4 kDa lässt darauf schließen, dass das ExpG-Protein Dimere bildet und zumindest auch als Protein-Dimer an die Ziel-DNA bindet. Die weiteren detektierten Peaks bei ca. 28 und 25 min könnten auf die Möglichkeit einer weiteren Multimerisierung des ExpG-Proteins hindeuten.

## 7. Bindungskinetik der ExpG-DNA-Komplexe

Die on- und off-Raten für die jeweiligen ExpG(His)<sub>6</sub>-DNA-Komplexe mit den entsprechenden *expD/expG*-, *expE1*- sowie *expA1*-Promotorfragmenten wurden mit Hilfe von Standard-EMSAs bzw. Konkurrenzexperimenten (→ II.2.2.5.2) ermittelt. Aus den berechneten Assoziations- ( $k_{on}$ ) und Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ) ließen sich die entsprechenden Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) kalkulieren.

### 7.1 on-Raten ( $k_{on}$ ) der Bindungsreaktion zwischen dem ExpG(His)<sub>6</sub>-Protein und den einzelnen *exp*-Promotorfragmenten

Zur Bestimmung der Assoziationsrate der jeweiligen Protein-DNA-Komplexe wurden über eine Reaktionszeit von einer bis 15 min Proben entnommen und in einem Standard-EMSA analysiert. Mit zunehmender Reaktionszeit entstehen immer mehr Protein-DNA-Komplexe und die Konzentration an ungebundener DNA im Reaktionsansatz wird geringer. Die Konzentrationsverschiebung zwischen freier DNA und Protein-DNA-Komplex zu den einzelnen Zeitpunkten der Probenentnahme konnte durch die detektierte Signalstärke der Cy3-markierten DNA festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentration von Protein und DNA im Reaktionsansatz ließen sich die einzelnen Werte für P (Konzentration an freiem Protein), PN (Konzentration des Protein-DNA-Komplexes) und N (Konzentration an freier DNA) zum jeweiligen Zeitpunkt  $t$  der Probenentnahme berechnen. Diese Werte wurden in den entsprechenden Term der Formel zur Kalkulation von  $k_{on}$  (→ II.2.2.5.2) eingesetzt und der Term wurde berechnet. Die somit erhaltenen Werte wurden schließlich in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der durch die einzelnen Punkte gelegten Ausgleichgeraden repräsentiert die on-Rate der ExpG-DNA-Protein-Komplexe (→ Abb. IV.14).

Da das Ergebnis der GPC-Analyse vermuten lässt, dass ExpG als Protein-Dimer an die DNA bindet sind ebenfalls die on-Raten für die entsprechenden DNA-Protein-Dimer-Interaktionen kalkuliert worden. Die ermittelten Werte für die Assoziationsraten der einzelnen *exp*-Promotorfragmente und dem ExpG-Protein als Monomer bzw. Dimer sind in nachfolgend aufgeführter Tabelle IV.3 zusammengefasst.

Tab. IV.3: on-Raten ( $k_{on}$ ), off-Raten ( $k_{off}$ ) und Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) der ExpG-DNA-Komplexe.

Promotorregion	$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]		$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$K_d$ [M]	
	Monomer	Dimer		Monomer	Dimer
<i>expD/expG</i>	$1,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$4,3 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-9}$
<i>expE1</i>	$1,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-9}$	$5,8 \times 10^{-10}$
<i>expA1</i>	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-9}$	$1,3 \times 10^{-9}$

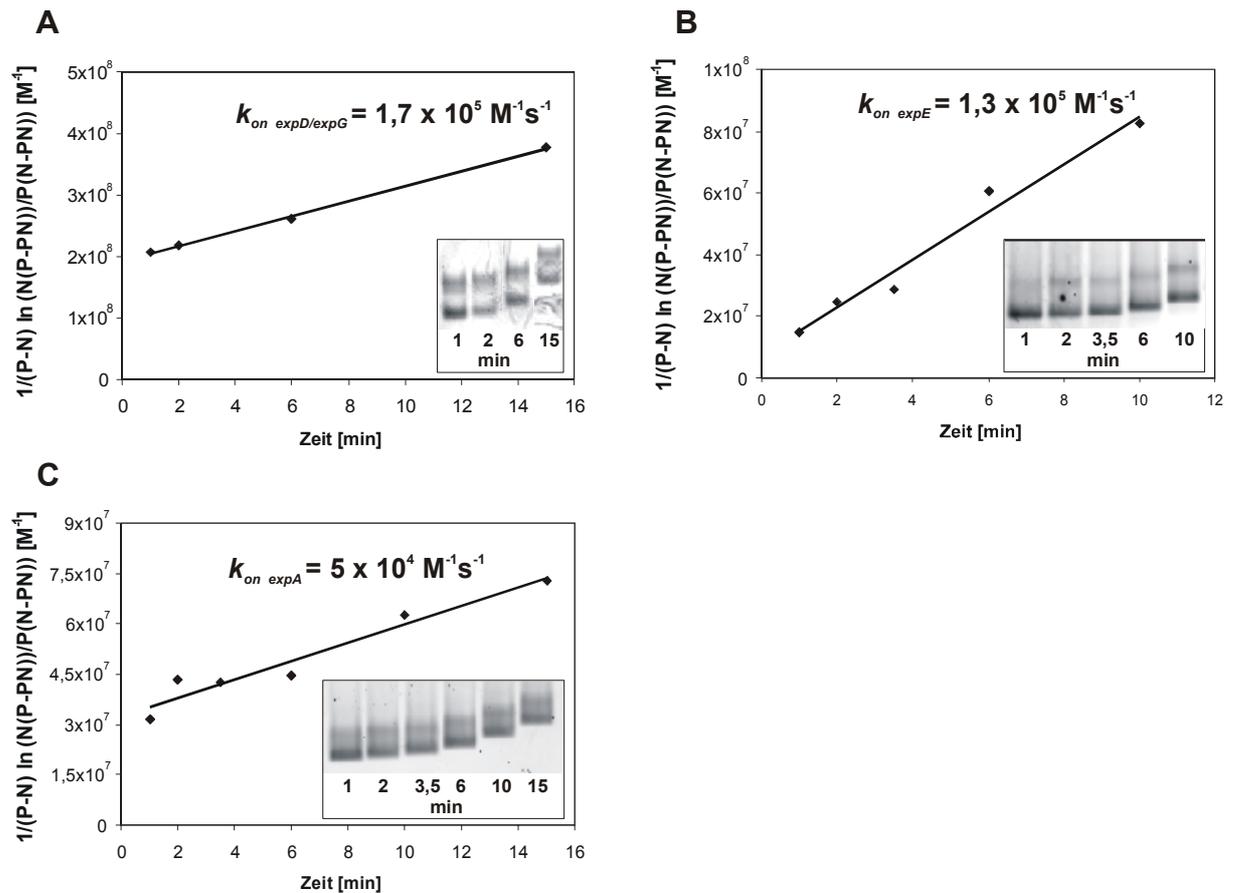
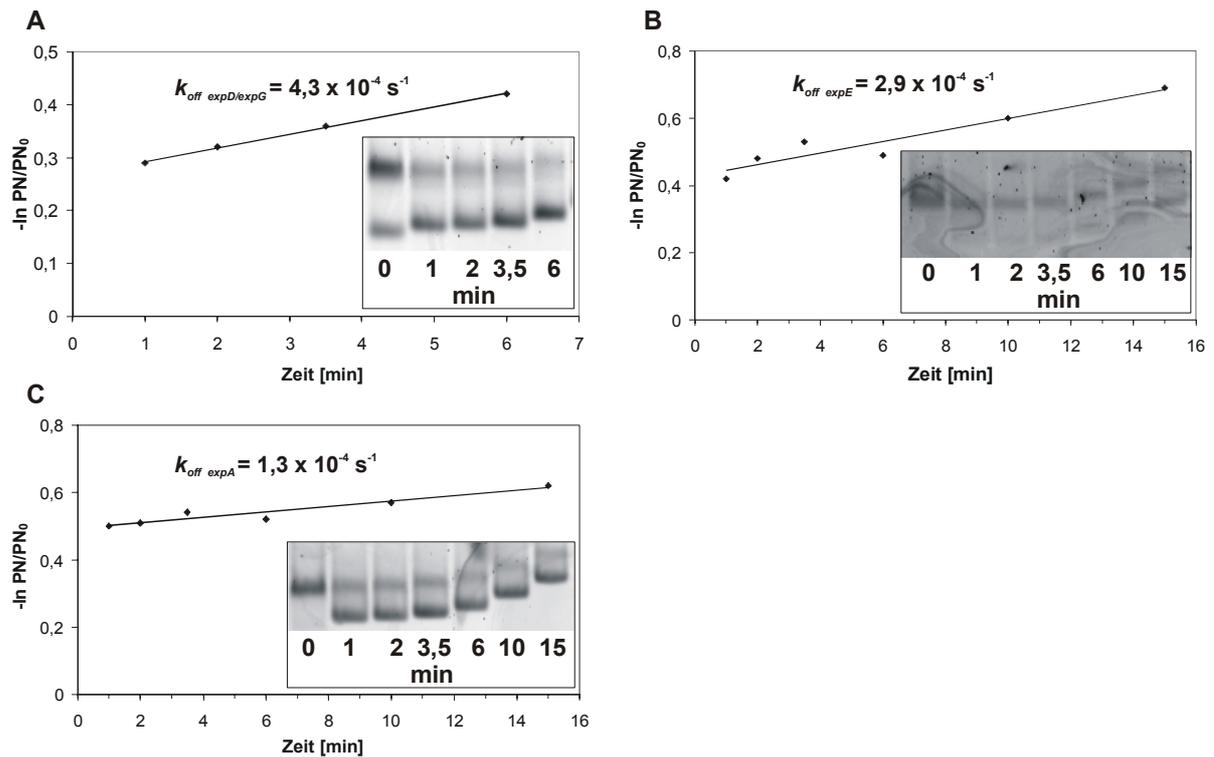


Abb. IV.14: on-Raten ( $k_{on}$ ) der Protein-DNA-Komplexe aus C-terminalem ExpG-Fusionsprotein und den einzelnen *exp*-Promotorfragmenten. **A**) ExpG-*expD/expG*, **B**) ExpG-*expE*, **C**) ExpG-*expA*. In den Diagrammen ist  $1/(P-N) \ln(N(P-PN))/P(N-PN)$  gegen die Zeit aufgetragen. Die im EMSA eingesetzte Proteinkonzentration betrug A)  $2,8 \times 10^{-8}$  M B)  $4,5 \times 10^{-8}$  M und C)  $5,6 \times 10^{-8}$  M. Die Steigung der Ausgleichsgeraden entspricht  $k_{on}$ . In die Diagramme sind die Originaldaten aus den EMSA-Gelen eingefügt.

## 7.2 off-Raten ( $k_{\text{off}}$ ) der ExpG(His)<sub>6</sub>-Protein-DNA-Komplexe

Die Dissoziationsraten der Protein-DNA-Komplexe aus C-terminalem ExpG-Fusionsprotein und den *exp*-Promotorfragmenten wurde durch Konkurrenzexperimente ermittelt. In einem Standard-EMSA wurden die unmarkierten DNA-Fragmente I, II und III (→ Abb. IV.11 A) in 50x Überschuss als Kompetitor-DNA zum EMSA-Reaktionsansatz zugegeben. Nach definierten Zeitpunkten erfolgte die Probenentnahme und anschließende Analyse im EMSA. Mit zunehmender Reaktionszeit konnte ein Anstieg der Konkurrenz detektiert werden, da immer mehr Kompetitor-DNA im Protein-DNA-Komplex gebunden vorliegt, so dass die Cy3-markierte DNA nicht mehr mit dem ExpG-Protein interagieren kann. Die Konzentrationsverschiebung zwischen dem Protein-DNA-Komplex und freier DNA konnte durch die detektierte Signalstärke der markierten DNA zu den einzelnen Zeitpunkten der Probenentnahme festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentration von Protein und DNA im Reaktionsansatz ließen sich die einzelnen Werte für PN (Konzentration des Protein-DNA-Komplexes bei Probenentnahme nach Zugabe der Kompetitor-DNA) und  $PN_0$  (Konzentration des Protein-DNA-Komplexes direkt vor Zugabe der Kompetitor-DNA) zum jeweiligen Zeitpunkt  $t$  der Probenentnahme berechnen. Diese Werte wurden in den entsprechenden Term der Formel zur Kalkulation von  $k_{\text{off}}$  (→ II.2.2.5.2) eingesetzt und der Term wurde berechnet. Die somit erhaltenen Werte wurden schließlich in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der durch die einzelnen Punkte gelegten Ausgleichgeraden repräsentiert die off-Rate der ExpG-DNA-Protein-Komplexe (→ Abb. IV.15).

Die ermittelten Dissoziationsraten der jeweiligen Komplexe aus den einzelnen *exp*-Promotorfragmenten und dem ExpG-Protein sind in der vorangestellten Tabelle IV.3 zusammengefasst.



**Abb. IV.15: off-Raten ( $k_{\text{off}}$ ) der Protein-DNA-Komplexe aus C-terminalem ExpG-Fusionsprotein und den einzelnen *exp*-Promotorfragmenten. A) ExpG-*expD/expG*, B) ExpG-*expE*, C) ExpG-*expA*. In den Diagrammen ist  $-\ln \text{PN}/\text{PN}_0$  gegen die Zeit aufgetragen. Die im EMSA eingesetzte Proteinkonzentration betrug A)  $2,8 \times 10^{-7} \text{ M}$ , B) und C)  $5,6 \times 10^{-7} \text{ M}$ . Die Steigung der Ausgleichsgeraden entspricht  $k_{\text{off}}$ . In die Diagramme sind die Originaldaten aus den EMSA-Gelen eingefügt. Die Daten, die zum Zeitpunkt 0 ermittelt wurden (direkt vor Zugabe der Kompetitor-DNA), dienen zur Berechnung von  $\text{PN}_0$ .**

### 7.3 Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) der ExpG-DNA-Komplexe

Die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) für die Komplexe zwischen dem ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein und den *expD/expG*-, *expE*- sowie *expA*-Promotorfragmenten berechnen sich aus dem Verhältnis der jeweiligen Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ) zur Assoziationsrate ( $k_{\text{on}}$ ) (→ II.2.2.5.2). Die  $K_d$ -Werte wurden sowohl für einen Protein-Monomer-DNA-Komplex als auch für einen ExpG-Dimer-DNA-Komplex kalkuliert:

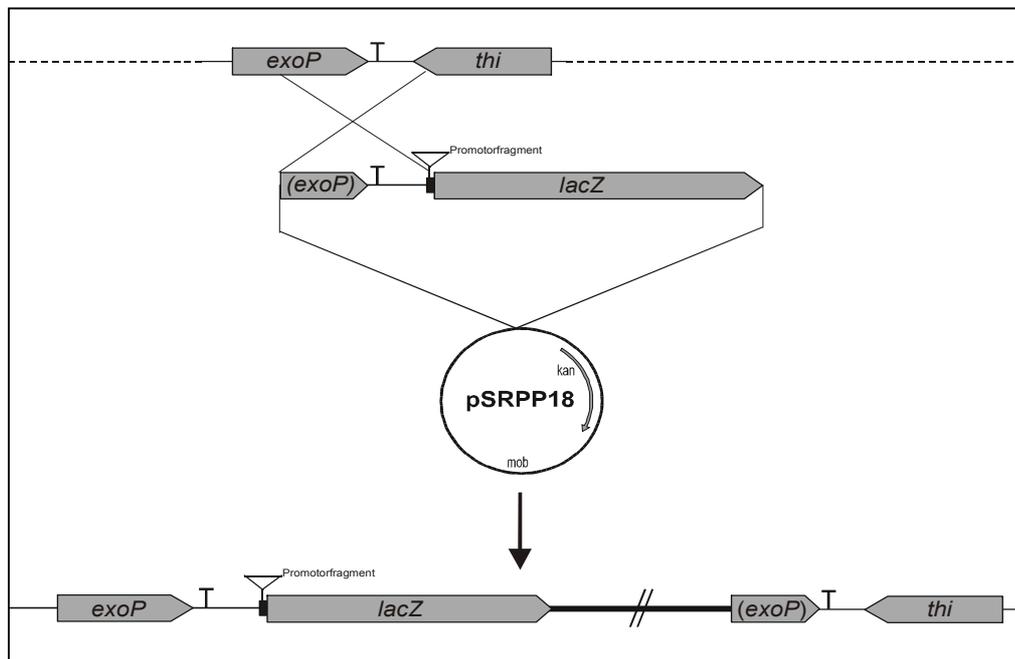
	Monomer	Dimer
$K_{d \text{ expD/expG}} =$	$2,5 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1,2 \times 10^{-9} \text{ M}$
$K_{d \text{ expE1}} =$	$2,2 \times 10^{-9} \text{ M}$	$5,8 \times 10^{-10} \text{ M}$
$K_{d \text{ expA1}} =$	$2,6 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1,3 \times 10^{-9} \text{ M}$

Die ermittelten Werte der on-Raten, off-Raten und Dissoziationskonstanten der Komplexe zwischen dem ExpG-Protein und den entsprechenden *exp*-Promotorfragmenten sind in der vorangestellten Tabelle IV.3 zusammengefasst.

## 8. Promotoranalysen

Der regulatorische Einfluss der drei Gene *mucR*, *phoB* und *expG* auf die Transkription der *exp*-Gene ist bekannt (Astete & Leigh, 1996; Becker et al., 1997; Keller et al., 1995; Rüberg, 1999; Rüberg et al., 1999; Zhan et al., 1989). Der zentrale Regulator MucR der EPS-Biosynthese reprimiert die Expression der Galactoglucan-Biosynthesegene. Eine *mucR*-Mutation zeigt einen deutlichen Effekt auf transkriptioneller Ebene für die *expA*-, *expD*-, *expE*-, *expC*- und *expG*-Komplementationsgruppe (Rüberg et al., 1999), aber eine potentielle MucR-Bindestelle oder -Bindemotiv in der *exp*-Genregion ist bislang unbekannt. Für das Verständnis der *exp*-Genregulation ist insbesondere die Kenntnis der Promotoren der *exp*-Gene eine wichtige Voraussetzung. Bislang konnten jeweils zwei potentielle PHO Boxen in der *exp*-Genregion identifiziert werden, die für eine Phosphat-abhängige Regulation der Promotoraktivität des *expA*- und des *expE*-Operons essentiell sind. Des Weiteren sind die PHO Boxen in der intergenische *expD/expG*-Region an der komplexen Regulation der durch Phosphatmangel induzierbaren *expG*-Expression beteiligt (Rüberg et al., 1999). Ein weiterer interessanter Befund ist der Nachweis der Bindung des transkriptionellen Aktivators ExpG an die Promotorregionen von *expA1* und *expE1* sowie an die intergenische *expD/expG*-Region und die genaue Identifizierung der Bindestelle (→ IV.3, IV.4 und IV.5). In den nachfolgenden Promotoranalysen sollte daher die MucR-, PhoB- und ExpG-abhängige Promotoraktivität der *expA1*-, *expE1*- und *expD/expG*-Promotorregionen und die möglicherweise gegenseitige Beeinflussung der drei regulatorischen Proteine aufgeklärt werden. Für die Promotoranalysen standen die Promotorregionen des *expA1*-, *expE1*-, *expG*- und *expD1*-Gens inseriert in den Promotor-Testvektor pSRPP18 (→ Abb. IV.16) zur Verfügung (→ III.1.2.2, (Rüberg, 1999)). Promotor-Testvektoren tragen ein promotorloses Reportergen, das nur nach korrekter Insertion eines DNA-Fragmentes mit Promotoreigenschaften vor dessen Kodierbereich exprimiert werden kann. Die Promotoraktivität des getesteten Promotors kann durch die Messung der Menge des gebildeten Reportergen-Produkts bestimmt werden. Ein durch *E. coli* S17-1 vermittelter konjugativer Transfer der Plasmide die die auf die Promotoraktivität zu testenden DNA-Fragmente tragen und als Kontrolle der Promotor-Testvektor ohne Insert erfolgte in verschiedenen *S. meliloti* Stämme. Um einen Einfluss der Regulatoren MucR, PhoB und ExpG auf die klonierten Promotorregionen zu überprüfen, wurden als Rezipientenstämme neben dem Wildtyp Rm2011, die *mucR*-Mutante Rm101 (*mucR101*-Spc), die *phoB*-Mutante RmH406 (*phoB3::Tn5-132*), die *expG*-Deletionsmutante SmSR $\Delta$ G und die *expG/mucR*-Doppelmutante SmBB $\Delta$ G101 ( $\Delta$ G*mucR101*-Spc) gewählt. Um die Phosphat-Abhängigkeit der Promotoraktivität der Promotorregionen zu untersuchen erfolgte die Anzucht der Transkonjuganten in MOPS-Medium mit 2 mM Phosphat und 0,1 mM Phosphat. Durch die Messung der

$\beta$ -Galaktosidaseaktivität konnte die Promotoraktivität der klonierten *exp*-Genbereiche bestimmt werden.

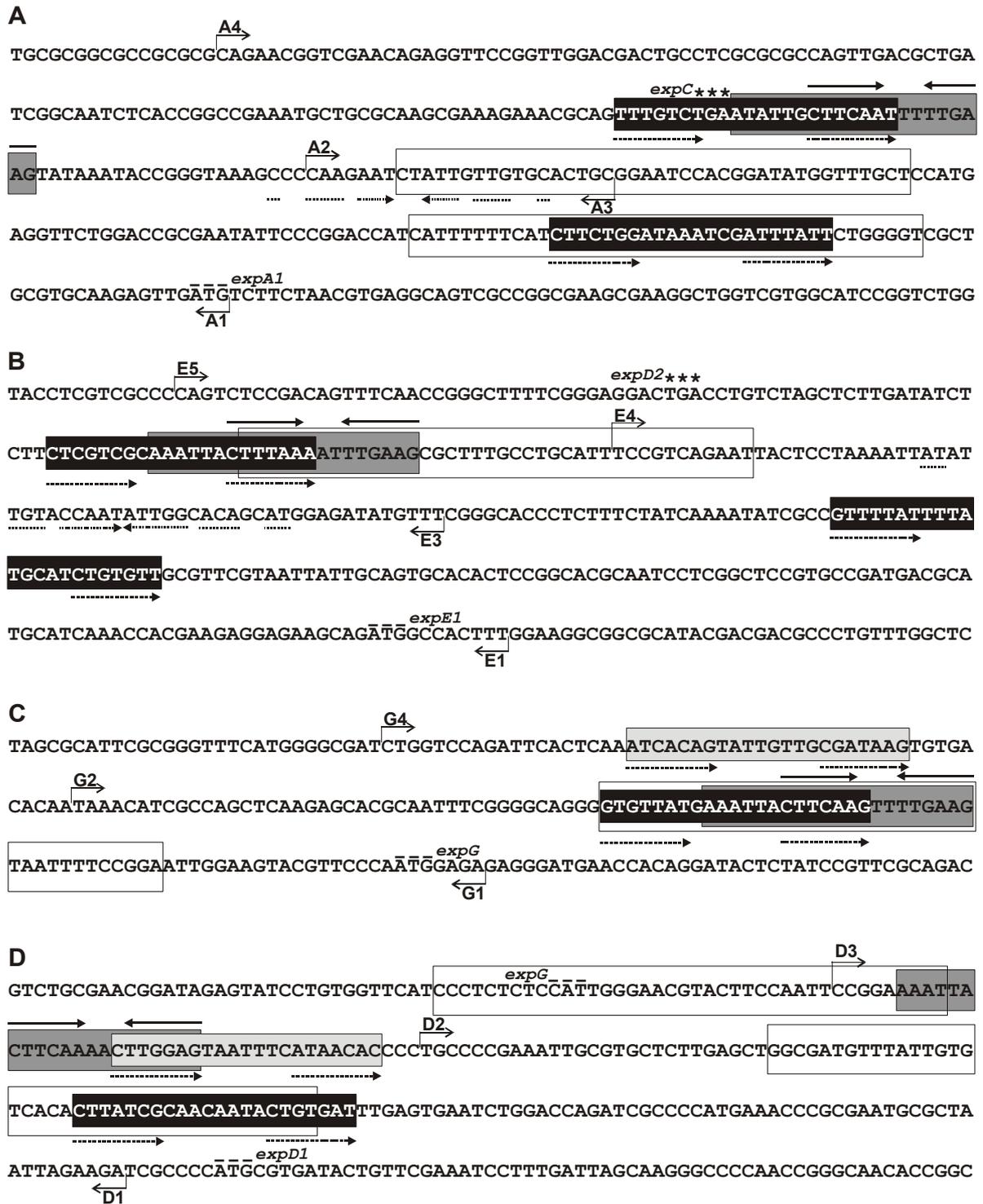


**Abb IV.16: Funktion des Promotor-Testvektors pSRPP18 in *S. meliloti*.** Die schematische Darstellung zeigt den Promotor-Testvektor pSRPP18 und die genomische Struktur des *exo*-Genbereichs im *S. meliloti* Genom vor und nach der Integration des pSRPP18 über einfache homologe Rekombination, die durch das Kreuz angedeutet ist. Der Vektor und die Gene sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Der Terminator nach dem *exoP* Gen ist durch ein T gekennzeichnet, die multiple Klonierungsstelle des pSRPP18 durch ein schwarzes Kästchen. Unvollständige Gene sind in Klammern angegeben. Die fette Linie markiert den Vektoranteil des integrierten pSRPP18. Abkürzungen: *lacZ*,  $\beta$ -Galaktosidasegen; *kan*, Kanamycinresistenzgen; *mob*, Mobilisierungsregion.

Da bereits durch Promotoraktivitätsstudien gezeigt werden konnte, dass für eine Phosphat-abhängige Regulation der Galactoglucan-Biosynthese beide PHO Boxen in den jeweiligen *exp*-Promotorregionen essentiell sind (Rüberg et al., 1999), war das Ziel dieser Arbeit, das Zusammenspiel zwischen den Proteinen ExpG und PhoB sowie MucR bei der Regulation der EPSII-Biosynthese aufzuklären. Dazu wurden die von Rüberg (1999) durchgeführten Promotoraktivitätsstudien zum Teil wiederholt und durch zusätzliche Messungen der Promotoraktivitäten der *exp*-Promotorregionen ergänzt.

## 8.1 Die identifizierten ExpG-Bindestellen in den *exp*-Promotorregionen überlappen mit den potentiellen PHO Boxen

In dieser Arbeit konnte die Bindung des ExpG-Proteins an die Promotorregionen von *expA1* und *expE1* sowie an die intergenische Region zwischen *expD1* und *expG* nachgewiesen und die genaue Bindestelle identifiziert werden. Die 21 bp konservierte Kernregion der ExpG-Bindestelle überschneidet sich jeweils mit der distalen PHO Box in der *expA1*- und *expE1*-Promotorregion sowie mit der PHO Box vor dem *expG*-Gen (→ Abb. IV.17). Mit Hilfe des *NNPP*-Programms (→ III.1.9) ließen sich potentielle Promotoren für das *expA1*-, *expE1*-, *expG*- sowie *expD1*-Gen vorhersagen, die in Abb. IV.17, IV.18 und IV.19 aufgeführt sind. Frühere Ergebnisse aus *Primer Extension* Experimenten zeigten potentielle Transkriptionsstarts, die ebenfalls in der Abb. IV.18 und IV.19 berücksichtigt sind. Des weiteren konnte eine zusätzliche palindromische Sequenz in der *expA1*- und *expE1*-Promotorregion identifiziert werden, die vermutlich eine Bindestelle eines weiteren bislang unbekanntes aber möglicherweise regulatorischen Proteins darstellt (→ Abb. IV.17).



**Abb. IV.17: Konservierte Kernregion der ExpG-Bindestelle und potentielle PHO Boxen in den exp-Promotorregionen.** Dargestellt ist die einzelsträngige DNA-Sequenz in 5' → 3'-Richtung **A)** zwischen den Genen *expC* und *expA1* sowie der 3'-Bereich des *expC* und der 5'-Bereich des *expA1*-Gens; **B)** zwischen den Genen *expD2* und *expE1* sowie der 3'-Bereich des *expD2* und der 5'-Bereich des *expE1*-Gens; **C)** zwischen den Genen *expD1* und *expG* sowie der 5'-Bereich des *expG*-Gens; **D)** zwischen den Genen *expG* und *expD1* sowie der 5'-Bereich des *expG*- und *expD1*-Gens. Die potentiellen PHO Boxen sind durch schwarze und die pseudo PHO Boxen durch hellgraue Kästen gekennzeichnet. Die dunkelgrauen Kästen markieren die 21 bp konservierte Kernregion der ExpG-Bindestelle. Die weißen Kästen stellen die potentiellen Promotoren des *expA1*-, *expE1*-, *expG*- und *expD1*-Gens dar. Gewinkelte Pfeile: Start und Richtung der für die Amplifizierung der Promotorfragmente verwandten Primer. Schwarze Pfeile: Palindrom der konservierten Kernregion der ExpG-Bindestelle. Gestrichelte Pfeile: *direct repeats* der potentiellen und pseudo PHO Boxen. Gepunktete Pfeile: weitere identifizierte palindromische Sequenz.

## 8.2 PhoB und ExpG haben einen direkten und MucR einen indirekten regulatorischen Einfluss auf das *expA*- und *expE*-Operon

Zur Untersuchung der Promotoraktivität der Promotorregionen vor dem *expA*-Operon wurden die Plasmide pSRPPA1-4, pSRPPA1-2 und pSRPPA3-4 (Rüberg, 1999), die integriert in das Genom des Wildtyps sowie der *phoB*-, *mucR*-, *expG*- und *expG/mucR*-Mutanten vorlagen, eingesetzt. Nach Integration der Plasmide pSRPPE1-5, pSRPPE1-4 und pSRPPE3-5 (Rüberg, 1999) in die entsprechenden Mutanten wurden die resultierenden Konjuganten zur Analyse der Promotoraktivität der Promotorregionen vor dem *expE*-Operon verwandt. Die Plasmide tragen unterschiedlich lange DNA-Sequenzen der jeweiligen Promotorregionen. Zum einen konnte der regulatorische Einfluss von MucR, PhoB sowie ExpG auf die distale PHO Box, die überlappende Kernregion der ExpG-Bindestelle und die proximale PHO Box untersucht werden (→ IV.18 A, pSRPPA1-4 und IV.18 B, pSRPPE1-5). Die Plasmide pSRPPA1-2 und pSRPPE1-4 tragen nur die proximale PHO Box der *expA1*- bzw. *expE1*-Promotorregion (→ IV.18 A und B) und die Plasmide pSRPPA3-4 und pSRPPE3-5 weisen nur die distale PHO Box mit die überlappende Kernregion der ExpG-Bindestelle auf (→ IV.18 A und B). Die zusätzlich identifizierte palindromische Sequenz vor dem *expA1*- und dem *expE1*-Operon liegt nur auf dem Plasmid pSRPPA1-2 nicht vollständig vor (→ IV.17 A und IV.18 A). Die in Abb. IV.18 dargestellten Untersuchungen der Promotoraktivitäten der *expA1*- und *expE1*-Promotorfragmente wurden durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten ermittelt.

Unter hohen Phosphatkonzentrationen vermittelten die Plasmide pSRPPA1-4 und pSRPPE1-5 im Hintergrund des Wildtyps, der *phoB*- und der *expG*-Mutante basale  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten (→ IV.18 A und B). Durch die *mucR*- und  $\Delta G/mucR$ -Mutation erfolgte eine deutliche Erhöhung der Aktivität, sowohl unter hohen als auch unter niedrigen Phosphatkonzentrationen, die für pSRPPE1-5 in beiden Hintergründen nahezu keinen Unterschied zeigten. Die durch das Plasmid pSRPPA1-4 vermittelte Aktivität ließ sich unter Phosphatmangel-Bedingungen im  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund leicht steigern. Ein wesentlich stärkerer „Phosphat-Effekt“ konnte für beide Plasmide im Wildtyp-Hintergrund festgestellt werden. Die Kultivierung in MOPS-Medium mit 0,1 mM Phosphat führte zu einer deutlichen Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten (→ IV.18 A und B). Durch die Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der *phoB*-Mutanten, die die Plasmide pSRPPA1-4 bzw. pSRPPE1-5 tragen, konnte bestätigt werden, dass die Steigerung der Promotoraktivität der klonierten DNA-Fragmente durch Phosphatmangel abhängig von PhoB ist (Rüberg, 1999), da auch nach Kultivierung der Bakterien in 0,1 mM Phosphat nur eine basale

$\beta$ -Galaktosidaseaktivität gemessen werden konnte ( $\rightarrow$  IV.18 A und B). Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der *expG*-Deletionsmutanten mit dem Plasmid pSRPPA1-4 bzw. pSRPPE1-5 blieben sowohl unter hohen wie auch unter niedrigen Phosphatkonzentrationen auf einem basalen Wert ( $\rightarrow$  IV.18 A und B). Diese Ergebnisse bestätigen den regulatorischen Einfluss von *expG* auf die Phosphat-abhängige Expression des *expA*- bzw. *expE*-Operons (Rüberg, 1999).

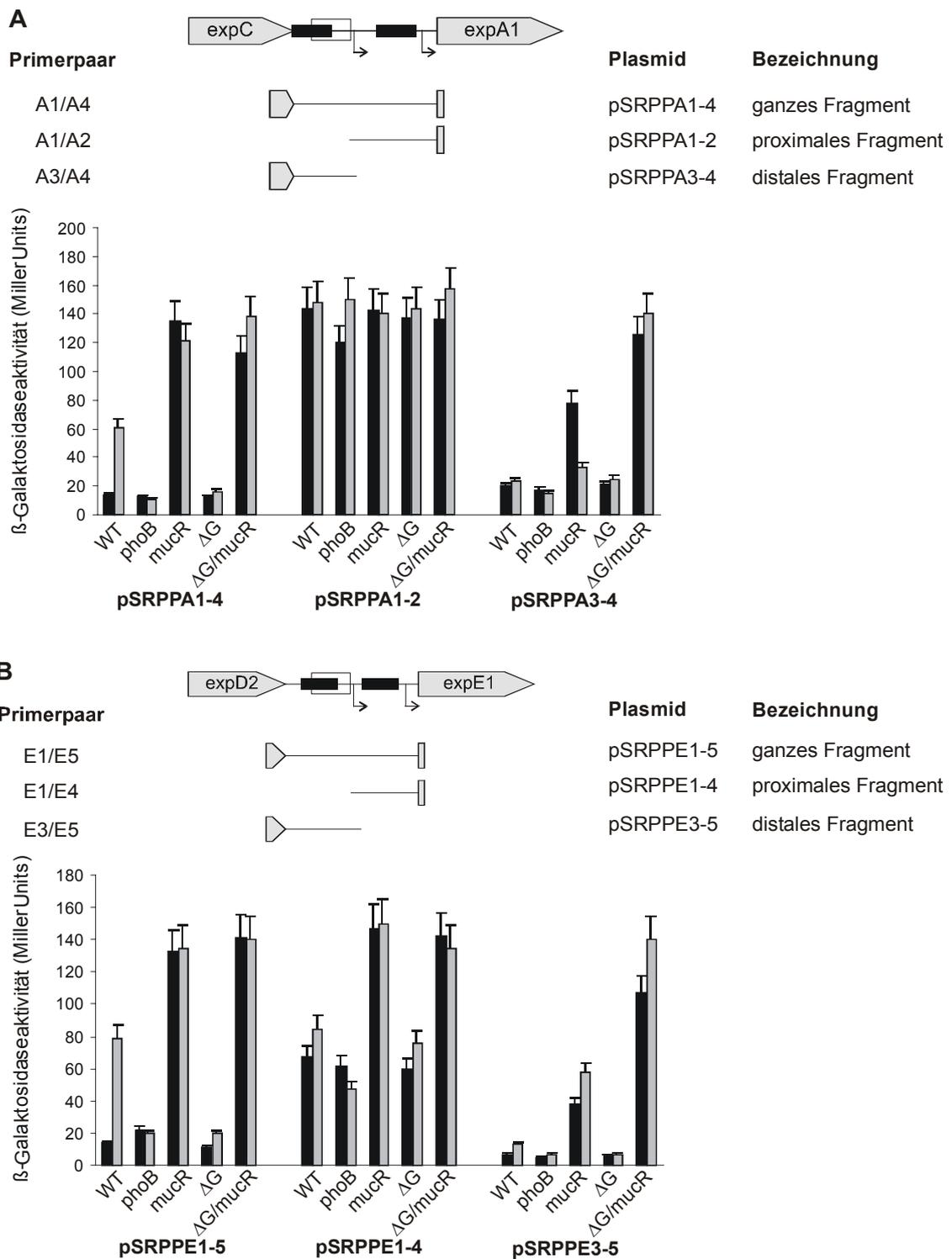
Im Gegensatz dazu vermittelten die Plasmide pSRPPA3-4 und pSRPPE3-5 mit den Promotorregionen, die nur die distale PHO Box mit der überlappenden Kernregion der ExpG-Bindestelle umfasst, nach Integration in das Genom des Wildtyps, der *phoB*-Mutante und der  $\Delta G$ -Mutante  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten, die den basalen Level der Kontrolle kaum überstiegen, wobei die Werte für das Plasmid pSRPPA3-4 etwas höher als die für pSRPPE3-5 waren ( $\rightarrow$  IV.18 A und B). Im Hintergrund der *mucR*-Mutante konnte mit ca. 40 bzw. 80 Miller Units eine Erhöhung der durch beide Plasmide vermittelten Aktivität unter ausreichenden Phosphatkonzentrationen festgestellt werden, die sich unter Phosphatmangelbedingungen für das Plasmid pSRPPE3-5 leicht steigern ließen. Die niedrige Phosphatkonzentration führte jedoch zu einem Abfall der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten bei dem durch das Plasmid pSRPPA3-4 vermittelten Promotoraktivität ( $\rightarrow$  IV.18 A und B). Durch die  $\Delta G$ /*mucR*-Mutation ließ sich die erhöhte Aktivität beider Promotorregionen im *mucR*-Hintergrund noch deutlich steigern, wobei eine zusätzliche Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten durch niedrige Phosphatkonzentrationen zu verzeichnen war ( $\rightarrow$  IV.18 A und B).

Für alle *S. meliloti* Stämme mit dem integrierten Plasmid pSRPPA1-2, das nur die proximale PHO Box und die unvollständige zusätzlich identifizierte palindromische Sequenz umfasst, wurden stark erhöhte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten gemessen. In allen fünf Hintergründen lagen die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten, die unter hohen Phosphatkonzentrationen gemessen worden sind zwischen 120 und 144 Miller Units ( $\rightarrow$  IV.18 A). Auch die unter niedrigen Phosphatkonzentrationen festgestellten Aktivitäten im Wildtyphintergrund bzw. im Hintergrund der *phoB*-, *mucR*-,  $\Delta G$ - und  $\Delta G$ /*mucR*-Mutanten zeigten ähnlich hohe Werte zwischen 140 und 157 Miller Units ( $\rightarrow$  IV.18 A).

Im Vergleich zum Plasmid pSRPPA1-2 wiesen die durch das Plasmid pSRPPE1-4 vermittelten Promotoraktivitäten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Hintergründen auf. Im Hintergrund der *mucR*- und  $\Delta G$ /*mucR*-Mutation lagen die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten sowohl unter hohen, als auch unter niedrigen Phosphatkonzentrationen zwischen 135 und 155 Miller Units ( $\rightarrow$  IV.18 B) und sind vergleichbar mit den Aktivitäten vermittelt durch pSRPPA1-2 ( $\rightarrow$  IV.18 A). Die Promotoraktivitäten im Hintergrund des Wildtyps, der *phoB*- und der  $\Delta G$ -Mutante zeigten

deutlich geringere Werte. Bei den Zellen kultiviert in MOPS-Medium mit 2 mM Phosphat lagen die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten zwischen 60 und 67 Miller Units und zwischen 47 und 84 Miller Units bei Anzucht der Bakterien unter Phosphatmangel-Bedingungen ( $\rightarrow$  IV.18 B). Auf dem Plasmid pSRPPE1-4 ist neben der proximalen PHO Box auch die vollständige zusätzlich identifizierte palindromische Sequenz vorhanden.

Zusammengefasst bestätigten die dargestellten Ergebnisse, dass nur die DNA-Bereiche vor dem *expA*-Operon bzw. dem *expE*-Operon, die jeweils beide PHO Boxen tragen, eine Phosphat-abhängige Regulation der Promotoraktivitäten aufwiesen. Voraussetzung für die erhöhte Promotoraktivität unter niedrigen Phosphatkonzentrationen war neben dem Vorhandensein des Regulators PhoB auch der Regulator ExpG (Rüberg, 1999). Zusätzlich zu dem Einfluss der *mucR*-Mutation auf die *expA1*- und *expE1*-Promotorregionen (Rüberg, 1999) konnte eine vergleichbare deutliche Steigerung der Promotoraktivitäten im  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund festgestellt werden. Umfassen die getesteten Promotorbereiche nur die distale PHO Box mit der überlappenden Kernregion der ExpG-Bindestelle ließen sich auch im Hintergrund der  $\Delta G$ -Mutante nur sehr geringe Promotoraktivitäten, wie bereits für den Wildtyp und die *phoB*-Mutante gezeigt wurde (Rüberg, 1999), nachweisen. Auch hier konnte neben dem Einfluss der *mucR*-Mutation auf die *expA1*- und *expE1*-Promotorregionen (Rüberg, 1999) eine zusätzliche Steigerung der Promotoraktivitäten im  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund gezeigt werden. Eine stark erhöhte Promotoraktivität konnte zusätzlich zu dem Hintergrund des Wildtyps, der *phoB*- und *mucR*-Mutante (Rüberg, 1999) auch im Hintergrund der  $\Delta G$ - und der  $\Delta G/mucR$ -Mutation für die Promotorregion des *expA*-Operons, die nur die proximale PHO Box aufweist, festgestellt werden. Einen regulatorischen Einfluss des MucR-Proteins zeigte der Vergleich der Promotoraktivitäten vermittelt durch die *expA*- und *expE*-Promotorfragmente mit der distalen PHO Box. Die zusätzlich identifizierte palindromische Sequenz, die nur auf dem *expE*-Promotorfragment das die proximale PHO Box aufweist, vorhanden ist, könnte möglicherweise die Bindestelle eines bislang unbekanntes MucR-abhängigen regulatorischen Proteins sein. Ein Modell das für die komplexe Regulation der Transkription der *exp*-Gene vorgeschlagen wird ist nachfolgend in der Diskussion unter Abb. V.1 aufgeführt.



**Abb. IV.18: Promotoraktivitäten potentieller Promotorregionen vor dem *expA*- und dem *expE*-Operon.** Schematische Darstellung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente. Neben dem jeweiligen Primerpaar ist die Bezeichnung der Plasmide, die aus der Klonierung der amplifizierten Fragmente in den Promotor-Testvektor pSRPP18 resultieren, und die Bezeichnung der resultierenden Fragmente der Promotorregionen angegeben. Die PHO Boxen sind durch schwarze Kästchen markiert. Die weißen Kästchen kennzeichnen die konservierte Kernregion der ExpG-Bindestelle. Die gewinkelten Pfeile repräsentieren die potentiellen Transkriptionsstarts. Die Histogramme zeigen die relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten des Wildtyps (WT), der  $\Omega$ *phoB3::Tn5-132* Mutante (*phoB*), der *mucR101*-Spc-Mutante (*mucR*), der *expG*-Deletionsmutante SmSR $\Delta$ G ( $\Delta$ G) und der Doppelmutante SmBB $\Delta$ G101 ( $\Delta$ G/*mucR*), die jeweils das Plasmid mit der potentiellen Promotorregion tragen. **A)** *expA1*- **B)** *expE1*-Promotorregion. Die schwarze und weiße Farbe der Säulen kennzeichnet jeweils die Kultivierung der Stämme in MOPS-Medium mit 2 mM bzw. 0,1 mM Phosphat. Die relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden in jeweils fünf unabhängigen Messungen ermittelt. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben. Die Hintergrundaktivität der Kontrolle (Rm2011 mit integriertem pSRPP18) lag bei  $15 \pm 1$  Miller Units.

### 8.3 Die *expG*- und *expD1*-Promotoren zeigen vergleichbare Aktivitäten zu den *expA*- und *expE*-Promotorregionen

Sowohl vor dem *expG*- als auch vor dem *expD1*-Gen konnte nur eine PHO Box gefunden werden (Rüberg, 1999). Die 21 bp Kernregion der in dieser Arbeit identifizierten ExpG-Bindestelle überlappt in der *expG*- sowie in der *expD1*-Promotorregion mit der PHO Box, die direkt vor dem *expG*-Gen liegt (→ IV.17 A und B sowie IV.19 A und B). Für die Analyse der Promotoraktivitäten der Promotorregionen vor dem jeweiligen Gen standen die Plasmide pSRPPG1-2, pSRPPG1-4, pSRPPD1-2 und pSRPPD1-3 zur Verfügung (Rüberg, 1999). Auch diese Plasmide umfassen unterschiedlich lange Fragmente der *expG*- bzw. der *expD1*-Promotorbereiche.

Die durch das Plasmid pSRPP1-2, das nur die PHO Box mit der überlappenden Kernregion der ExpG-Bindestelle vor dem *expG*-Gen trägt, vermittelten Promotoraktivitäten zeigten basale  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten im Wildtyp-, *phoB*-, *mucR*- und  $\Delta G$ -Hintergrund. Die Promotoraktivitäten wiesen sowohl unter hohen, als auch unter niedrigen Phosphatkonzentrationen keine Unterschiede auf (→ IV.19 A). Nur in der Doppelmutante  $\Delta G/mucR$  war eine ca. 8-fache Steigerung der Promotoraktivität bei Verwendung von MOPS-Medium mit 2 mM Phosphat zu erkennen, die sich unter Phosphatmangelbedingungen noch leicht steigern ließen (→ IV.19 A).

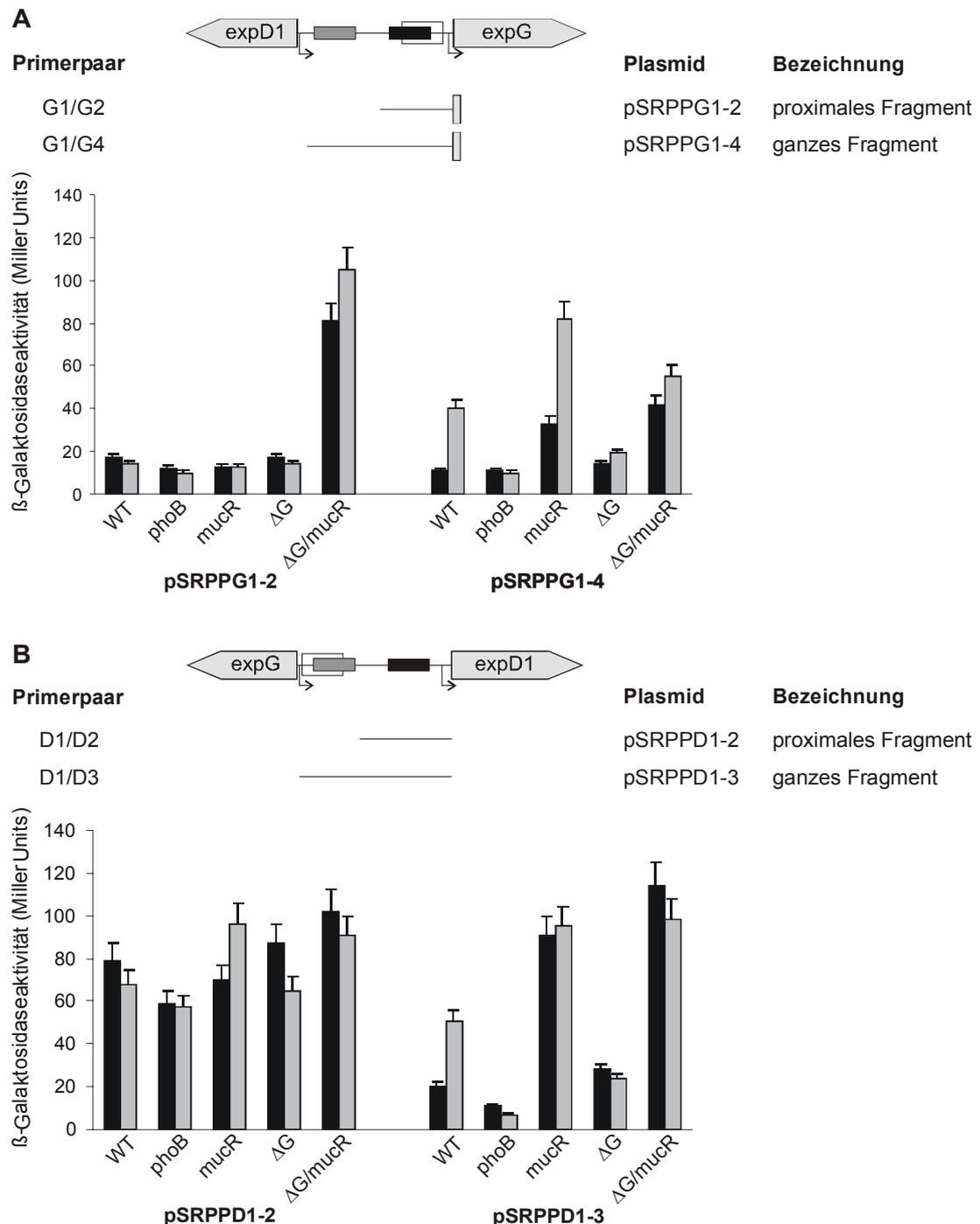
Im Gegensatz dazu zeigte das Plasmid pSRPPD1-2 mit der Promotorregion, die nur die PHO Box vor dem *expD1*-Gen ohne überlappende Kernregion der ExpG-Bindestelle umfasste, nach Integration in das Genom aller fünf Stämme stark erhöhte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten (→ IV.19 B). Im Hintergrund der *mucR*-Mutante konnte eine zusätzliche Steigerung der Promotoraktivität durch niedrige Phosphatkonzentrationen beobachtet werden, wo hingegen Phosphatmangel im WT-,  $\Delta G$ - und  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund zu einer Verringerung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten führte (→ IV.19 B).

Die Plasmide pSRPPG1-4 und pSRPPD1-3 umfassen die vollständigen Promotorregionen des entsprechenden Gens und tragen sowohl die eigene, als auch die PHO Box vor dem benachbarten Gen. Die Kernregion der ExpG-Bindestelle überlappt nur mit der vor dem *expG*-Gen lokalisierten PHO Box (→ IV.17 C und D sowie IV.19 A und B). Die Promotorregionen dieser Plasmide vermittelten im Hintergrund des Wildtyps, der *phoB*-, *mucR*-,  $\Delta G$ - und  $\Delta G/mucR$ -Mutante  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wie sie auch in den entsprechenden Hintergründen für die vollständigen Promotorregionen vor dem *expA1*- und dem *expE1*-Gen festgestellt werden konnten (→ IV.18 A. B und IV.19 A, B). Unter hohen Phosphatkonzentrationen zeigten der Wildtyp, die *phoB*- und die  $\Delta G$ -Mutante mit den Plasmiden pSRPPG1-4 bzw. pSRPPD1-3 basale  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten, die nur im

Wildtyp durch niedrige Phosphatkonzentrationen gesteigert werden konnten. Im Hintergrund der *phoB*- und  $\Delta G$ -Mutanten entfiel die Phosphat-abhängige Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten ( $\rightarrow$  IV.19 A und B). Eine deutliche Erhöhung der Promotoraktivitäten, vermittelt durch das inserierte Fragment im Plasmid pSRPPD1-3, war erst durch die *mucR*- und die  $\Delta G/mucR$ -Mutation zu beobachten ( $\rightarrow$  IV.19 B). In der *mucR*- und  $\Delta G/mucR$ -Mutante mit dem integrierten Plasmid pSRPPG1-4, das ebenfalls die vollständige Promotorregion aufweist, konnte nur eine leichte Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten festgestellt werden, die dann noch im Hintergrund der *mucR*-Mutation zusätzlich durch Phosphatmangel gesteigert werden konnte ( $\rightarrow$  IV.19 A).

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen die gegenseitige Beeinflussung der Promotorregionen des *expG*- und des *expD1*-Gens durch Überlappung (Rüberg, 1999). Die untersuchten Promotorregionen, die die eigentliche PHO Box und zusätzlich die PHO Box vor dem benachbarten Gen enthielten, zeigten Promotoraktivitäten, die vergleichbar zu den Resultaten aus den Untersuchungen der Promotoraktivitäten der potentiellen *expA1*- und *expE1*-Promotorregionen sind ( $\rightarrow$  IV.8.2).

Ein Modell das für die komplexe Regulation der Transkription der *exp*-Gene vorgeschlagen wird ist nachfolgend in der Diskussion unter Abb. V.1 aufgeführt.



**Abb. IV.19: Promotoraktivitäten potentieller Promotorregionen vor dem *expG*-Gen und dem *expD*-Operon.** Schematische Darstellung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente. Neben dem jeweiligen Primerpaar ist die Bezeichnung der Plasmide, die aus der Klonierung der amplifizierten Fragmente in den Promotor-Testvektor pSRPP18 resultieren, und die Bezeichnung der resultierenden Fragmente der Promotorregionen angegeben. Die PHO Boxen sind durch schwarze und die pseudo PHO Boxen durch graue Kästchen markiert. Die weißen Kästchen kennzeichnen die konservierte Kernregion der ExpG-Bindestelle. Die gewinkelten Pfeile repräsentieren die potentiellen Transkriptionsstarts. Die Histogramme zeigen die relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten des Wildtyps (WT), der  $\Omega phoB3::Tn5-132$  Mutante (*phoB*), der *mucR101-Spc*-Mutante (*mucR*), der *expG*-Deletionsmutante SmSR $\Delta G$  ( $\Delta G$ ) und der Doppelmutante SmBB $\Delta G101$  ( $\Delta G/mucR$ ), die jeweils das Plasmid mit der potentiellen Promotorregion tragen. **A)** *expG*- **B)** *expD1*-Promotorregion. Die schwarze und weiße Farbe der Säulen kennzeichnet jeweils die Kultivierung der Stämme in MOPS-Medium mit 2 mM bzw. 0,1 mM Phosphat. Die relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden in jeweils fünf unabhängigen Messungen ermittelt. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben. Die Hintergrundaktivität der Kontrolle (Rm2011 mit integriertem pSRPP18) lag bei  $15 \pm 1$  Miller Units.

## V DISKUSSION

### 1. Die komplexe Regulation der EPS II-Biosynthese

Das symbiontische Bodenbakterium *S. meliloti* ist in der Lage zusätzlich zu dem Exopolysaccharid Succinoglycan (EPS I) auch das alternative Exopolysaccharid Galactoglucan (EPS II) zu synthetisieren. Mittelpunkt meiner Arbeit war die Regulation der EPS II-Biosynthese. Von besonderem Interesse waren die Wirkung und die Interaktion der an dieser Regulation beteiligten Proteine.

Die strengregulierte Biosynthese des Exopolysaccharids Galactoglucan durch MucR, PhoB, ExpG und ExpR ist bislang nur ansatzweise charakterisiert. Durch diese komplexe Regulation ist nicht nur ein simples An- oder Abschalten der EPS II-Produktion möglich, da in Abhängigkeit verschiedener Regulatoren Galactoglucan mit unterschiedlicher Molekulargewichtsverteilung produziert wird. Diese Exopolysaccharide haben neben ihrer Rolle bei der Anpassung an die verschiedenen Umweltbedingungen und ihrer Schutzfunktion (Beveridge & Graham, 1991; Costerton, 1997; Sutherland, 1988; Whitfield, 1988) auch eine essentielle Aufgabe in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion, wie für das Gram-negative Bodenbakterium *S. meliloti* und seiner Wirtspflanze Luzerne (*Medicago sativa*) gezeigt werden konnte (Niehaus & Becker, 1998).

Im Kulturüberstand einer *mucR*-Mutante konnten neben HMW EPS II nur geringe Mengen LMW EPS I nachgewiesen werden (Bertram-Drogatz et al., 1998; Keller et al., 1995; Zhan et al., 1989). Sehr wahrscheinlich übernimmt das LMW EPS I in der *mucR*-Mutante die essentielle Rolle des Signalmoleküls für die Symbiose, da eine *exoY-mucR*-Doppelmutante, in der kein EPS I mehr produziert wird, Pseudoknöllchen induziert, während in einer *mucR*-Mutante noch normale Stickstoff-Fixierung stattfindet (Keller et al., 1995).

Eine Mutation in dem regulatorischen *expR*-Gen, dessen Aufgabe bei der Regulation der Biosynthese von EPS II in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht worden ist, führt zusätzlich zu der Produktion von HMW EPS II auch zu der von LMW EPS II (Gonzalez et al., 1996). Für LMW EPS II konnte Gonzales et al. (1996) zeigen, dass es das für die Induktion Stickstoff-fixierender Knöllchen essentielle EPS I ersetzen kann. Das ExpR-Protein kann der LuxR-Protein-Familie zugeordnet werden, in der neben vielen Rezeptoren für *N*-Acylhomoserinlactonen (AHLs) auch Transkriptionsregulatoren für das „Quorum Sensing“ zu finden sind. Eine Aktivierung der ExpR-abhängigen Expression durch AHLs konnte für das *expE*-Operon festgestellt werden (Pellock et al., 2002).

Die Zusammensetzung des unter Phosphatmangel produzierten EPS II ist nicht bekannt (Mendrygal & Gonzalez, 2000). Eine *S. meliloti phoB*-Mutante induziert Stickstoff-fixierende Knöllchen, die vom Wildtyp nicht zu unterscheiden sind (Al-Niemi et al., 1997). Auch in dem nah verwandten Bodenbakterium *Bradyrhizobium japonicum* beeinflusst eine Mutation des *phoB*-Gens die Symbiose mit der Wirtspflanze Sojabohne nicht (Minder et al., 1998). Für das *phoB*-Genprodukt konnte in der Phosphat-abhängigen Regulation eine essentielle aktivierende Funktion der *exp*-Genexpression in *S. meliloti* nachgewiesen werden (Rüberg et al., 1999). Fasst man die Ergebnisse zusammen, so scheint die durch Phosphatmangel induzierten EPS II-Biosynthese vorrangig bei der Anpassung an den Lebensraum Boden von Bedeutung zu sein, der vornehmlich durch Phosphatmangel gekennzeichnet ist (Bielecki, 1973).

Die Beobachtungen aus den Untersuchungen von Zhan et al. (1989) und Astete & Leigh (1996) ergeben zusammengefasst, das wahrscheinlich durch zusätzliche Kopien des *expG*-Gens die Produktion eines EPS II induziert wird, das den symbiontischen Phänotyp einer *exoA*-Mutante, die in der EPS I-Biosynthese blockiert ist, wieder herstellen kann. Das *expG*-Genprodukt fungiert als transkriptioneller Aktivator der Expression der *exp*-Gene (Rüberg et al., 1999). Eine Beeinflussung der Transkription der *exp*-Gene erfolgt durch die Regulatoren MucR und ExpG sowie PhoB bei Phosphatmangel unabhängig voneinander (Rüberg et al., 1999).

Die komplexe und strenge Regulation der EPS II-Biosynthese ermöglicht dem symbiontischen Bodenbakterium *S. meliloti* sich schnell durch ein entsprechend modifiziertes Exopolysaccharid an veränderte Umweltbedingungen anzupassen, denen es sowohl freilebend im Boden als auch als Mikrosymbiont im Wurzelknöllchen der Pflanze ausgesetzt ist.

Diese Arbeit setzt die Untersuchungen zur Regulation der Galactoglucan-Biosynthese durch MucR, PhoB und ExpG von Rüberg (1999) fort, wobei der Schwerpunkt bei dem *expG*-Genprodukt liegt. Es erfolgt der Nachweis, dass die regulatorische Funktion des ExpG-Proteins durch direkte Bindung an die *exp*-Promotorregionen ausgeübt wird, wobei die direkte Zielsequenz bzw. Struktur der ExpG-Bindestelle in diesen Promotorregionen identifiziert wurde. Des weiteren wird die Bindungskinetik der verschiedenen Protein-DNA-Komplexe ermittelt. Untermuert werden diese Resultate der Protein-DNA-Interaktion durch Untersuchungen auf Einzelmolekül-Ebene, die durch Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften entstanden sind.

Durch Promotoranalysen der Promotorregionen, die unter anderem die identifizierte ExpG-Bindestelle aufweisen, konnte die Regulation der EPS II-Biosynthese weiter aufgeklärt und schließlich ein hypothetisches Modell, das diese Regulation durch MucR, PhoB und ExpG zusammenfasst, erstellt werden.

Die Diskussion der vorliegenden Ergebnisse erfolgt in zwei Hauptabschnitten in der oben aufgeführten Reihenfolge. Abschließend werden mögliche Perspektiven für weiterführende Untersuchungen aufgezeigt.

### **1.1 Das ExpG-Protein aktiviert die Transkription der *exp*-Gene durch direkte Bindung an *exp*-Promotorregionen**

Der regulatorische Einfluss von ExpG auf die EPS II-Biosynthese war zu Beginn dieser Arbeit bekannt (Rüberg et al., 1999). Der Sequenzvergleich der *expA1*-, *expG*-, *expD1*- und *expE1*-Promotorregion führte zur Identifizierung einer Kernregion mit einer palindromischen, AT-reichen Sequenz. Solche Sequenzen sind charakteristische Eigenschaften für Bindestellen an die HTH-Proteine wie ExpG binden (Becker et al., 1997). Auch der putative Operator *marO*, in der Promotorregion des *marRAB*-Operons in *E. coli* weist eine palindromische AT-reiche Sequenz auf, mit der das Repressor-Protein MarR agiert (Cohen et al., 1993). Der Vergleich der durch die EMSAs ermittelten Ergebnisse zeigt, dass das ExpG-Protein nur an die Promotorfragmente bindet, die die palindromische Kernregion aufweisen und lassen darauf schließen, dass diese konservierte Region sehr wahrscheinlich an der Bindung von ExpG beteiligt ist. Die Kernregion zeigt auch hohe Homologien zu der *muc* Box aus *S. meliloti* EFB1, die ebenfalls ein Palindrom aufweist und als Zielsequenz für das MucS-Protein vorgeschlagen wird (Lloret et al., 2002). Das *mucS*-Genprodukt ist identisch zum ExpG-Protein. Auch für *mucS* konnte gezeigt werden, dass es für die Induktion der EPS II-Biosynthese unter niedrigen Phosphatkonzentrationen und durch extra Kopien des *exp*-Genclusters verantwortlich ist (Astete & Leigh, 1996). Die EMSA-Resultate zusammengefasst mit den Ergebnissen von Rüberg et al. (1999) zeigen, dass der stimulierende Effekt von ExpG auf die *exp*-Gene durch direkte Bindung an die Promotorregionen des *expA*-, *expD*-, *expG* und *expE*-Operons vermittelt wird.

### **1.2 Die Interaktion zwischen ExpG und den *exp*-Promotorregionen stellt eine spezifische Bindung dar**

Die Spezifität der Bindung des *expG*-Genprodukts an die jeweiligen *exp*-Promotorregionen wurde durch Konkurrenzexperimente nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Protein-DNA-Interaktion durch die eingesetzte spezifische Konkurrent-DNA effektiv unterbunden werden konnte. Im Gegensatz dazu übten die nicht spezifischen Konkurrent-DNA-Fragmente keinen Einfluss aus, wodurch die Spezifität der Bindung bestätigt wird.

Zum ersten Mal konnte die sequenzspezifische Bindung eines regulatorischen Proteins sowohl durch Standard-Ensemble- als auch durch Einzelmolekül-Methoden, gemessen durch Einzelmolekül-Kraftspektroskopie am *Atomic Force Microscope* (AFM), bestätigt werden. Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Ros am Lehrstuhl für Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften. Das in den Experimenten eingesetzte Protein sowie die DNA-Fragmente und Kompetitor-DNA wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit hergestellt und der kooperierenden Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Bei dem verwendeten ExpG-Protein handelt es sich um das selbe N-terminale bzw. C-terminale Fusionsprotein, das auch für die Standard-Ensemble-Methoden genutzt wurde. Durch Zugabe von freier Kompetitor-DNA wurden die Abrisswahrscheinlichkeiten zwischen dem auf der Oberfläche des Probenträgers immobilisierten ExpG-Proteins und der an der AFM-Spitze befestigten Ziel-DNA deutlich reduziert (Bartels et al., 2003). Das System konnte durch Waschen der Spitze und der Probenträger-Oberfläche sowie Zugabe von Kompetitor-freiem Puffer reaktiviert werden und zeigte nahezu die gleichen Abrisswahrscheinlichkeiten wie in ursprünglichen AFM-Einzelmolekül-Kraftspektroskopie Analysen (Bartels et al., 2003). Der deutliche Einfluss der spezifischen aber nicht der unspezifischen Kompetitor-Fragmente in den AFM-Experimenten bestärkt die Spezifität des Bindungsprozesses.

### **1.3 Die Bindung des ExpG-Proteins an die *exp*-Promotorregionen erfordert mehr als nur die palindromische Sequenz**

Kompetitionsexperimente mit acht verschiedenen speziell konstruierten Kompetitor-DNA-Fragmenten erbrachten den eindeutigen Nachweis das die palindromische Kernregion innerhalb der *exp*-Promotorregionen essentiell für die Bindestelle des *expG*-Genprodukts ist. Darüber hinaus sind die flankierenden Sequenzen der Elemente Box1 und Box2 maßgeblich an einer effizienten Protein-DNA-Interaktion beteiligt. Die Kompetitor-Fragmente mit der mutierten Box1 bzw. der mutierten Box2 zeigten nur eine unvollständige Konkurrenz der Bindung zwischen Protein und DNA, d.h. sie konnten die Protein-DNA-Interaktion nicht effizient unterbinden. Möglicherweise ist der Austausch von einer bzw. 2 Basen in diesen Motiven nicht ausreichend um die Funktion komplett zu beeinträchtigen, wie es der Austausch von vier Basen in der palindromischen Kernregion bewirkt hat. Diese Ergebnisse konnten durch AFM-Kraftspektroskopie-Experimente, bei denen die Bindung des ExpG-Proteins an unterschiedliche DNA-Fragmente auf der Basis von Einzelmolekülen beobachtet wurden, bestätigt werden. Auch diese Analysen erfolgten im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Ros und die verwendeten DNA-Fragmente und das

ExpG-Protein wurden ebenfalls im Verlauf der vorliegenden Arbeit hergestellt. Für die Untersuchungen wurden sowohl das Protein, als auch die DNA kovalent an die Oberfläche des Probenträgers bzw. an die AFM-Spitze gebunden. Die Abrisskräfte bei der Dissoziation des Protein-DNA-Komplexes können durch Zyklen, bei denen sich die Spitze der Oberfläche des Probenträgers wiederholt annähert, gemessen werden. Auch hier wurde die Protein-DNA-Interaktion durch die Mutation im Palindrom unterbunden, wo hingegen die Mutationen in Box1 und Box2 keinen derartigen Effekt zeigten. Die durch dynamische Kraftspektroskopie ermittelten Dissoziationsraten zeigten jedoch deutliche Unterschiede zwischen der Wildtyp-Sequenz und den mutierten, aber weiterhin bindenden Derivaten. Hier lagen die off-Raten bei  $k_{\text{off}}=(4,4\pm 2,5)\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$  für die Bindung von ExpG an das Wildtyp-DNA-Fragment, jedoch bei  $k_{\text{off}}=(5,3\pm 1,5)\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$  für das DNA-Fragment mit der Mutation in Box2 und sogar bei  $k_{\text{off}}=(1,3\pm 0,2)\times 10^{-2}\text{s}^{-1}$  für das DNA-Fragment mit der Mutation in Box1. Trotz der Mutationen in Box1 und Box2 konnten die entsprechenden DNA-Fragmente auch weiterhin eine Bindung mit dem ExpG-Protein eingehen, aber die Protein-DNA-Komplexe zeigen eine weitaus höhere Dissoziationsrate. Die Motive Box1 und Box2 übernehmen vermutlich eine strukturelle Funktion bei der Bindung von ExpG und zwar die Stabilisierung des Protein-DNA-Komplexes.

Die GPC-Analysen deuten auf eine Multimerisierung des ExpG-Proteins hin, bzw. lassen darauf schließen, dass das Protein als Dimer vorliegt und zumindest auch als Dimer an die *exp*-Promotorregionen bindet. Die unvollständige Kompetition der Bindung durch die Fragmente, auf denen die mutierte Box1 bzw. die mutierte Box2 sowie die verkürzte Box2 vorliegen, zeigt vermutlich die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes, in dem möglicherweise ein Protein-Dimer gebunden wurde, da hier jeweils nur ein reduzierter „shift“ zu erkennen ist. Die vollständigen „shifts“, bei dem jeweils die DNA-Sequenz der *exp*-Promotorregionen aus dem Wildtyp eingesetzt wurden, könnten hingegen Protein-DNA-Komplexe darstellen, in dem ein Tetramer oder höher multimerisierte Protein-Moleküle gebunden vorliegen.

Die Funktion und Struktur von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren der MarR-Familie sind gut untersucht (Alekshun et al., 2001; Cohen et al., 1993; Sulavik et al., 1995), es ist jedoch nur sehr wenig über die direkte Bindestelle bekannt. Basierend auf den im Verlauf dieser Arbeit entstandenen Ergebnissen ist es möglich, die für die Bindung von ExpG erforderliche Region auf 63 bp für den *expA1*-Promotor, 62 bp für den *expG*-Promotor und 72 bp für den *expE1*-Promotor einzuschränken. In diesen Regionen, an die vermutlich ein Tetramer des ExpG-Proteins bindet, sind neben der für die Bindung erforderliche palindromische Sequenz auch Box1 und Box2 lokalisiert, die sehr wahrscheinlich die vollständige Protein-DNA-Interaktion ermöglichen. Eine ähnliche Situation wird für die LysR-Typ-Regulatoren (LTTR), die ebenfalls ein HTH-Motiv aufweisen, vorgeschlagen. Ein typischer LTTR bindet an eine

Sequenz von ca. 50 bis 60 bp, die zwei verschiedene Motive beinhaltet, die *recognition-binding site* (RBS), die zuerst vom LTTR erkannt wird, und eine *activation-binding site* ABS (Muraoka et al., 2003; Schell, 1993). Dieser lange DNA-Sequenzbereich, der das RBS- und ABS-Motiv beinhaltet, und die Größenordnung der aktiven Formen der LTTRs lassen darauf schließen, dass auch diese Regulatoren *in vivo* als Multimere vorliegen und an die DNA wahrscheinlich als Dimere oder Tetramere binden (Henikoff et al., 1988; Muraoka et al., 2003).

Bei ExpG ist das HTH-MarR-Motiv am C-terminalen Ende (Aminosäure 70 bis 164) des Proteins lokalisiert. ExpG ist ein Mitglied der MarR-Familie, die wiederum zu einer *supergroup* bestehend aus acht Regulator-Familien gehört. Diese Familien sind durch eine verlängerte konservierte Sequenz gekennzeichnet, die das klassische HTH-Motiv beinhaltet (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2001). Das HTH-Motiv ist eines der gebräuchlichsten Bindemotive bei Proteinen, die die Transkription kontrollieren (Sauer et al., 1982). In Repressoren befindet sich das HTH-Motiv überwiegend am N-Terminus, bei Aktivatoren hingegen hauptsächlich am C-Terminus des Proteins (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2001). Diese Beobachtungen stimmen mit der identifizierten C-terminalen Position des HTH-Motivs im transkriptionellen Aktivator ExpG überein.

#### **1.4 Die ExpG-DNA-Komplexe zeigen Dissoziationskonstanten, die vergleichbar zu transkriptionellen Regulatoren aus anderen Regulatorprotein-Familien sind**

Die Bindungskinetiken vieler regulatorischer Proteine sind bislang analysiert worden. Mit den in dieser Arbeit ermittelten Dissoziations- und Assoziationsraten ließen sich die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) berechnen. Die  $K_d$ -Werte für die ExpG-DNA-Komplexe von  $2,2 \times 10^{-9}$  bis  $2,6 \times 10^{-9}$  M liegen, wie auch bei vielen anderen transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren, im nanomolaren Bereich. So wurde z.B. für das MucR-Protein, das als zentraler Regulator der Succinoglycan- und Galactoglucan-Biosynthese in *S. meliloti* fungiert, ein  $K_d$ -Wert von  $9,4 \times 10^{-8}$  M für den Protein-DNA-Komplex zwischen MucR und der *mucR*-Promotorregion ermittelt (Bertram-Drogatz et al., 1997). Das Protein Lrp (*leucin-responsive regulatory protein*) ist ein globaler Regulator des Stoffwechsels in *E. coli*. Die Dissoziationskonstante für den Komplex zwischen Lrp und den Bindestellen stromaufwärts des *ilvIH*-Operons beträgt ca.  $5 \times 10^{-9}$  M (Calvo & Matthews, 1994). Der transkriptionelle Regulator PcaU aus *Acinetobacter* sp. Stamm ADP1 kann die Expression der *pca*-Gene, die für den Abbau von Protocatechuat verantwortlich sind, sowohl reprimieren als auch aktivieren. Für die Bindung zwischen PcaU und der Bindestelle stromabwärts des *pcaU*-Gens konnte ein  $K_d$ -Wert von  $8 \times 10^{-9}$  M festgestellt werden (Popp et al., 2002).

Die anhand der EMSAs ermittelten Dissoziationsraten ( $k_{\text{off}}$ ) von  $1,3 \times 10^{-4}$  bis  $4,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für die ExpG-DNA-Komplexe liegen an der unteren Grenze der für alle drei DNA-Zielsequenzen gemittelten off-Raten von  $k_{\text{off}} = (1,2 \pm 1,0) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , die im Verlauf der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Ros durch AFM-Kraftspektroskopie-Experimente festgestellt werden konnten (Bartels et al., 2003).

## **2. Durch die Analysen der *exp*-Promotorregionen läßt sich ein hypothetisches Modell für die komplexe Regulation der EPS II-Biosynthese entwickeln**

Die in dieser Arbeit durch die Promotoranalysen ermittelten Promotoraktivitäten der *exp*-Promotorregionen liefern einen ersten Ansatz zur Aufklärung der komplexen Regulation der *exp*-Genexpression und somit für die Galactoglucan-Biosynthese. Die Lage der potentiellen PHO Boxen in den *exp*-Promotorregionen waren bereits bekannt (Rüberg et al., 1999). Durch den Nachweis der direkten Bindung des ExpG-Proteins an die *exp*-Promotorregionen und die genaue Identifizierung der Bindestelle konnte nicht nur der regulatorische Einfluss von ExpG bestätigt, sondern auch die Position der Bindestelle in den Promotorregionen lokalisiert werden (→ IV.8.1). Diese Bindestellen überlappen mit den distalen PHO Boxen in der *expA1*- und *expE1*-Promotorregionen sowie mit der PHO Box vor dem *expG*-Gen. Die Überschneidung dieser beiden Erkennungssequenzen lassen auf ein Zusammenspiel von PhoB und ExpG während der komplexen Regulation der Galactoglucan-Biosynthese schließen. Der regulatorische Einfluss von MucR auf die Transkription der *exp*-Gene erfolgt vermutlich über die zusätzliche palindromische Sequenz in der *expA1*- und *expE1*-Promotorregion. Hier bindet möglicherweise ein bislang unbekannter Regulator, der wiederum direkt oder indirekt MucR-abhängig ist. Aufgrund der vorhergesagten potentiellen Promotoren und durch vorherige *Primer Extension* Experimente (S. Rüberg, Universität Bielefeld, persönliche Mitteilung) lassen sich je zwei eventuelle Transkriptionsstarts vor dem *expA1*-, *expE1*-, *expG*- und *expD1*-Gen lokalisieren. Die komplexe Regulation der EPS II-Biosynthese wird exemplarisch anhand der Promotoraktivitäten der einzelnen Fragmente der *expA1*-Promotorregion im Vergleich mit den Fragmenten der drei weiteren Promotorregionen diskutiert. Nachfolgend werden diese Fragmente als distale, proximale und ganze Fragmente bezeichnet (→ Abb. IV.18 und IV.19). Sowohl das distale als auch das proximale Fragment der jeweiligen *exp*-Promotorregionen zeigt zumindest unter einer der gemessenen Bedingungen (Phosphat-Konzentration bzw. entsprechender Hintergrund) Promotoraktivität, wodurch die Existenz mindestens eines Promotors bestätigt wird, auf die die Proteine MucR, PhoB und ExpG ihren regulatorischen Einfluss ausüben können.

Unter Phosphat-suffizienten Bedingungen konnte im Wildtyp (WT), in der *phoB*- und  $\Delta G$ -Mutante nur eine sehr geringe Aktivität für das distale *expA1*-Fragment gemessen werden. Im *mucR*-Hintergrund wurde eine deutlich höhere Aktivität festgestellt, die im  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund noch zusätzlich gesteigert werden konnte. Die gemessenen Promotoraktivitäten des distalen *expE1*-Fragmentes zeigten das gleiche Verhalten unter hohen Phosphatkonzentrationen. MucR wirkt hier offensichtlich als Repressor auf den distalen Promotor. ExpG hat bei hoher Phosphatkonzentration sehr wahrscheinlich ebenfalls eine reprimierende Wirkung, da nur die volle Induktion des potentiellen distalen Promotor gezeigt werden konnte, wenn die Regulatoren MucR und ExpG nicht vorhanden waren.

Das proximale *expA1*-Fragment zeigte unter hohen Phosphatkonzentrationen in allen Hintergründen eine konstitutive Expression des Reportergens. Auf diesem Fragment sind sowohl der potentielle proximale als auch der distale Promotor, aber nicht die Kernregion der ExpG-Bindestelle und die zusätzlich identifizierte palindromische Sequenz vorhanden. Die zuvor festgestellte reprimierende Wirkung von ExpG und MucR auf das distale Fragment konnte für das proximale Fragment nicht gezeigt werden, da sowohl die ExpG-Bindestelle als auch die Bindestelle für den MucR-abhängigen Regulator auf diesem Fragment fehlen. Das proximale *expD1*-Promotorfragment verhielt sich bei ausreichenden Phosphat-Bedingungen vergleichbar zum proximalen *expA1*-Fragment. Dieses Verhalten lässt darauf schließen, dass die Regulatoren ExpG und MucR nicht als Repressoren auf die Transkription des *expD1*-Gens wirken können, wenn nur einer der beiden potentiellen Promotoren vorhanden ist. Für das proximale *expE1*-Fragment, das die zusätzliche palindromische Sequenz trägt, konnte eine deutlich verringerte Promotoraktivität im WT-, *phoB*- und  $\Delta G$ -Hintergrund im Vergleich zum proximalen Fragment der *expA1*-Promotorregion bei hohen Phosphatkonzentrationen festgestellt werden. Das Vorhandensein des zusätzlichen Sequenzbereiches auf dem proximalen *expE1*-Fragment im Gegensatz zum proximalen *expA1*-Fragment korreliert mit dem von MucR vermittelten Effekt auf die potentiellen Promotoren. Dies ist ein Hinweis dafür, dass MucR oder ein von MucR reguliertes Protein an die palindromische Sequenz binden könnte. In der *exp*-Genregion ließen sich jedoch keine MucR-Bindestellen identifizieren. Eine Bindung des Regulators MucR an seine Zielsequenz konnte bislang nur für die Region stromaufwärts des *mucR*-Gens sowie für die Regionen vor dem *exoH*- und dem *exoY*-Gen gezeigt werden (Bertram-Drogatz et al., 1998; Bertram-Drogatz et al., 1997). PhoB ist unter phosphat-suffizienten Bedingungen offensichtlich für die proximalen Promotoren nicht als Aktivator notwendig, bzw. übt keinen reprimierenden Einfluss aus, da die Promotoraktivitäten in den *phoB*-Mutanten keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten. Eine erhöhte Promotoraktivität zeigte nur das proximale *expG*-Fragment im  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund. Offensichtlich ist unter hohen Phosphat-Konzentrationen der

proximale Promotor vor dem *expG*-Gen nur aktiv, wenn beide Repressoren, nicht mehr vorhanden sind.

Die Ergebnisse der Promotoranalysen gemessen mit den ganzen Promotorfragmenten im Vergleich mit den proximalen und den distalen Fragmenten jeweils mit 2 mM Phosphat im Medium, lassen die Regulation der Transkription der *exp*-Gene durch MucR und ExpG bei ausreichenden Phosphat-Bedingungen erkennen. Nur im *mucR*- und im  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund konnten erhöhte Promotoraktivitäten bei den ganzen Promotorfragmenten festgestellt werden, die keine wesentlichen Unterschiede zu den Werten des proximalen Fragmentes aufwiesen und auch nicht die im  $\Delta G/mucR$ -Hintergrund gesteigerte Aktivität wie bei den distalen Fragmenten zeigten. Unter Phosphat-suffizienten Bedingungen werden beide Promotoren vor dem *expA1*- und *expE1*-Gen und der proximale Promotor vor *expG* und *expD1* durch den dominierenden repressorischen Einfluss von MucR inaktiviert. Für den Regulator MucR konnte bereits Keller et al. (1995) zeigen, dass er eine zentrale Rolle für die EPS II-Biosynthese spielt, da eine Mutation im *mucR*-Gen zur Induktion der EPS II-Produktion unter normalen Kulturbedingungen führte, bei denen sonst nur die EPS I-Produktion angeschaltet ist. Das ExpG-Protein kann als Repressor nur auf den distalen Promotor wirken, spielt jedoch eine Rolle als Aktivator für den proximalen Promotor. Den aktivierenden Effekt zusätzlicher Kopien von ExpG auf diverse *exp-lacZ*-Transkriptionsfusionen konnte bereits Rüberg et al. (1999) zeigen. Im *phoB*-Hintergrund konnte bei keinem Fragment ein aktivierender oder reprimierender Einfluss im Vergleich zu den gemessenen Promotoraktivitäten im Wildtyp festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Response Regulator PhoB für die Expression der *exp*-Gene unter hohen Phosphat-Konzentrationen nicht benötigt wird (→ Abb V.1 A und V.1 B).

Unter Phosphat-limitierenden Bedingungen spielt das PhoB-Protein jedoch eine wichtige Rolle. Nicht nur die beiden PHO Boxen vor dem *expA1*- bzw. *expE1*-Gen sowie die PHO Boxen vor dem *expG* und *expD1*-Gen und zusätzlich die revers orientierte PHO Box vor dem jeweiligen Nachbarn, sondern auch der Regulator PhoB ist essentiell für die Phosphat-abhängige Promotoraktivität (Rüberg et al., 1999). Auch bei den Promotoranalysen in dieser Arbeit konnte eine deutliche Steigerung der Promotoraktivitäten im Wildtyp durch Verringerung der Phosphatkonzentration im Medium nur bei den ganzen Fragmenten, die beide PHO Boxen tragen, festgestellt werden. In der *phoB*-Mutante entfiel die Phosphat-abhängige Induktion, da der Regulator PhoB nicht exprimiert werden konnte. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese das PhoB als Aktivator der *exp*-Transkription zumindest den proximalen Promotor aber sehr wahrscheinlich auch den distalen Promotor reguliert.

Die Messungen der Promotoraktivitäten im *mucR*-Hintergrund zeigten unter Phosphatmangel-Bedingungen bei allen Fragmenten nahezu die gleichen Ergebnisse wie

unter hohen Phosphatkonzentrationen. Erst bei Abwesenheit des Repressors MucR konnte die volle Induktion beider Promotoren vor dem *expA1*- und *expE1*-Gen beobachtet werden. Eine Phosphat-unabhängige Funktion für MucR als transkriptioneller Repressor der *exp*-Gene wurde bereits von Rüberg et al. (1999) nachgewiesen. In Analogie zum Zwei-Komponenten-Regulationssystem PhoR-PhoB aus *E. coli*, das die zum Phosphat (PHO) Regulon gehörenden Gene, deren Genprodukte an der Bereitstellung und Assimilation von Phosphat beteiligt sind, reguliert (Wanner, 1996), ist anzunehmen, dass auch in *S. meliloti* ein Sensor wie PhoR unter Phosphatmangel autophosphoryliert und anschließend PhoB durch Phosphorylierung aktivieren kann. Unter Phosphat-limitierenden Bedingungen hebt das phosphorylierte und dadurch aktivierte PhoB-Protein sehr wahrscheinlich die reprimierende Wirkung von MucR nur zum Teil wieder auf, da sich die unter niedrigen Phosphatkonzentrationen im Wildtyp gemessene Promotoraktivität in der *mucR*-Mutante noch steigern ließ.

Neben den beiden PHO Boxen vor den jeweiligen *exp*-Promotorregionen und dem *Response* Regulator PhoB ist auch der Regulator ExpG essentiell für die Phosphat-abhängige Promotoraktivität (Rüberg et al., 1999). Im  $\Delta G$ -Hintergrund entfiel die Induktion der proximalen Promotoren durch den transkriptionellen Aktivator ExpG und es konnten für die ganzen Fragmente nur wesentlich geringere Aktivitäten unter Phosphat-limitierenden Bedingungen als im Wildtyp gemessen werden. Der regulatorische Einfluss von ExpG auf die Transkription der *exp*-Gene läßt sich unter Berücksichtigung zwei verschiedener Aspekte diskutieren. Entweder bindet ExpG an seine Bindestelle unabhängig von PhoB, wie die Aktivierung der EPS II-Produktion durch eine Erhöhung der *expG*-Kopienzahl unter normalen Kulturbedingungen vermuten läßt, oder ExpG kann nur in Anwesenheit von PhoB an die ExpG-Zielsequenz binden und die Induktion der Galactoglucan-Biosynthese erfolgt durch Kooperation zwischen den Regulatoren ExpG und PhoB. Unter Phosphat-limitierenden Bedingungen ist die Expression der *exp*-Gene angeschaltet und es wird zwangsläufig auch vermehrt das ExpG-Protein exprimiert. Der kooperative aktivierende Effekt könnte durch eine simultane Bindung von PhoB und ExpG an die jeweilige Bindestelle vor dem distalen Promotor ausgelöst werden und die Proteine agieren gemeinsam als Aktivatoren der *exp*-Genexpression, wie es die Messungen der Promotoraktivitäten im Wildtyp bei niedrigen Phosphatkonzentrationen vermuten lassen. Es ist aber auch denkbar, dass die Expression des *expG*-Gens nur durch das PhoB-Protein aktiviert, und die Transkription der weiteren *exp*-Gene durch den transkriptionellen Aktivator ExpG reguliert wird. Diese Hypothese wird durch die nahezu gleichen Promotoraktivitäten der ganzen Fragmente, gemessen unter niedrigen Phosphatkonzentrationen im *phoB*- und  $\Delta G$ -Hintergrund, untermauert. Berücksichtigt man nur die Promotoraktivitäten der ganzen Fragmente, gemessen unter den verschiedenen Bedingungen und in den diversen Hintergründen, läßt sich offensichtlich

keine der beiden theoretischen Regulationsmöglichkeiten favorisieren. Erst die Resultate der Promotoranalysen mit den distalen und proximalen Fragmenten im Vergleich zu den ganzen Fragmenten lieferten Hinweise für die wahrscheinlichste Theorie der gemeinsamen Regulation durch ExpG und PhoB. Zum einen konnten vor dem *expA1*- und dem *expE1*-Gen jeweils zwei PHO Box-ähnliche Sequenzen identifiziert werden (Rüberg et al., 1999). Zum anderen zeigten nur die ganzen Fragmente der *expA1*- und *expE1*-Promotregionen, auf denen zusätzlich zu den beiden PHO Boxen auch die ExpG-Bindestelle vorhanden ist, einen Phosphat-abhängigen Effekt. Sehr wahrscheinlich binden PhoB und ExpG gemeinsam an die jeweiligen Bindestellen vor dem distalen Promotor, wobei PhoB vermutlich die Bindung von ExpG stabilisiert und darüber hinaus auch die Bindung eines weiteren PhoB-Moleküls in seiner aktiven Form an die proximale PHO Box unterstützt. Der reprimierende Einfluss von ExpG auf den distalen Promotor kann möglicherweise die repressorische Wirkung des MucR-abhängigen Regulators auf den distalen und proximalen Promotor verhindern bzw. teilweise aufheben. Dies könnte z.B. durch eine Strukturveränderung der Promotorregion durch Interaktion der beiden gebundenen PhoB-Moleküle stattfinden, oder die Interaktion des MucR-abhängigen Regulators mit der potentiellen Bindestelle vor dem distalen Promotor ist möglicherweise durch die gebundenen Regulatoren PhoB und ExpG beeinträchtigt. Die Transkription der *exp*-Gene wird wahrscheinlich durch einen kooperativen Effekt von PhoB als Aktivator und ExpG als Repressor und Aktivator induziert.

Basierend auf den bisher diskutierten Ergebnissen zur komplexen Regulation der EPS II-Biosynthese wird das in Abb. V.1 dargestellte Regulationsmodell vorgeschlagen, bei dem vier verschiedene Zustände unterschieden werden: die Regulation unter Phosphat-suffizienten Bedingungen im Wildtyp- und im *mucR*-Hintergrund (A und B) sowie die Regulation unter Phosphat-limitierenden Bedingungen im Wildtyp- und im *mucR*-Hintergrund (C und D).



### 3. Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktion von ExpG als transkriptioneller Aktivator der EPS II-Biosynthese durch direkte Bindung an die Promotorregionen von vier *exp*-Genen nachgewiesen werden. Darüber hinaus erfolgte die Identifizierung und Charakterisierung der Bindestelle des ExpG-Proteins. Basierend auf den Ergebnissen der Promotoranalysen ließ sich ein hypothetisches Modell entwickeln, dass die Regulation der *exp*-Genexpression durch ExpG, PhoB und MucR zeigt. Die identifizierten ExpG-Bindestellen in den Promotorregionen überlappen teilweise mit der proximalen oder distalen PHO Box, die bereits in den *exp*-Promotorregionen bekannt waren und an die vermutlich der *Response* Regulator PhoB bindet. Die Induktion der *exp*-Genexpression unter Phosphatmangel erfolgt wahrscheinlich durch einen kooperativen Effekt der beiden Regulatoren PhoB und ExpG. Diese Hypothese könnte zukünftig durch den Nachweis der Bindung von PhoB an die *exp*-Promotorregionen mittels Gelretardationsexperimente überprüft werden. Sollte eine Bindung von PhoB festgestellt werden, könnten durch anschließende Kompetitions- oder *Footprinting*-Experimente aufgeklärt werden, ob die PHO Boxen die tatsächlichen Bindestellen sind. Die mögliche Wechselwirkung bei der Bindung von ExpG und PhoB an die Promotorbereiche der *exp*-Genregion könnte durch entsprechende Gelretardationsexperimente überprüft werden. Dabei könnte auch die Affinität von PhoB zu seiner Bindestelle bzw. die Affinität von ExpG gemeinsam mit PhoB zu den entsprechenden Bindestellen bestimmt werden. Für diese Untersuchungen könnten ebenfalls die vielversprechenden biophysikalische Verfahren, die die *Atomic Force Microscopy* ermöglicht, genutzt werden.

Die zusätzlich identifizierte palindromische Sequenz in den Promotorregionen von zwei *exp*-Genen wird als Zielsequenz für ein weiteres regulatorisches Protein, das offensichtlich von MucR beeinflusst wird, vorgeschlagen. Durch weiterführende biochemische Analysen könnte möglicherweise dieses bislang unbekannte Protein identifiziert und dessen regulatorische Funktion genauer charakterisiert sowie der Einfluss von MucR aufgeklärt werden.

Da in dieser Arbeit die Zielsequenz von ExpG für die Protein-DNA-Interaktion näher charakterisiert wurde, wäre ein anderer interessanter Aspekt die Konformation und damit auch die Bindedomäne des ExpG-Proteins durch biochemische Verfahren, wie z.B. CD- oder NMR-Spektroskopie, aufzuzeigen. Auch die Bindungseigenschaften von ExpG könnten z.B. durch Oberflächenplasmonresonanz untersucht werden.

Mit ExpR ist ein weiterer aktivierender Regulator der *exp*-Genexpression bekannt. Dieses Protein kann der LuxR-Protein-Familie zugeordnet werden und aktiviert abhängig von der Populationsdichte die an der EPS II-Biosynthese beteiligten Gene. Ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten wäre der Nachweis der Aktivierung von ExpR durch *N*-Acylhomoserinlactone und der Bindung des aktivierten Proteins an seine Bindestelle, wodurch die weitere Aufklärung der komplexen Regulation der EPS II-Biosynthese möglich wäre.

## VI ABKÜRZUNGEN

aa	Aminosäuren
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AFM	Atomic Force Microscope, Rasterkraft-Mikroskop
AHL(s)	<i>N</i> -Acylhomoserinlacton(e)
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
°C	Grad Celsius
C-terminal	am Carboxy-Ende eines Protein befindlich
CTP	Cytosintriphosphat
DISKPAGE	diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	DNA abbauendes Enzym
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA(s)	Electrophoretic Mobility Shift Assay(s), Gelretardationsexperiment(e)
EPS	Exopolysaccharid(e)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
Gm	Gentamicin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
His	Histidin(e)
HMW	high molecular weight, hochmolekular
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobase(n)

kDa	Kilo-Dalton
Km	Kanamycin
KPS	kapsuläre Polysaccharide
l	Liter
LB	Luria Broth
LMW	low molecular weight, niedermolekular
LPS	Lipopolysaccharid(e)
LTTR(s)	LysR-type regulator(s), LysR-Typ-Regulator(en)
m	Meter
M	Molar
m...	Milli...(x10 <sup>-3</sup> )
mA	Milliampere
mcs	multiple cloning site
min	Minute
<i>mob</i>	Mobilisierungsregion aus RP4
MOPS	Morpholinopropionsäure
MW	Molekulargewicht
MWCO	molecular weight cut off, Ausschlussgrenze
μ...	Mikro...(x10 <sup>-6</sup> )
n...	Nano...(x10 <sup>-9</sup> )
n. d.	nicht detektiert
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic
NBT	Nitroblau Tetrazoliumsals
Nm	Neomycin
nt	Nukleotid(e)
N-terminal	am Amino-Ende eines Proteins befindlich
o.D.	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PA	Penassay Broth
PBJR	Proteingel-Ladepuffer, reduzierend
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
r	resistent
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	rounds per minute, Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	sensitiv
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Sm	Streptomycin
SSC	Sodium Saline Citrate
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tn	Transposon
TY	Trypton-Yeast-Medium
U	unit; Enzymeinheit
UDP	Uridindiphosphat
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid
% (v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent

## VII LITERATUR

**Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (1999).** The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol* **7**, 410-3.

**Alekshun, M. N., Levy, S. B., Mealy, T. R., Seaton, B. A. & Head, J. F. (2001).** The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat Struct Biol* **8**, 710-4.

**Al-Niemi, T. S., Summers, M. L., G., E. J., Kahn, M. L. & McDermott, T. R. (1997).** Regulation of the Phosphate Stress Response in *Rhizobium meliloti* by PhoB. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4978-81.

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.

**Astete, S. G. & Leigh, J. A. (1996).** *mucS*, a gene involved in activation of galactoglucan (EPS II) synthesis gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 395-400.

**Bartels, F. W., Baumgarth, B., Anselmetti, D., Ros, R. & Becker, A. (2003).** Specific binding of the regulatory protein ExpG to promoter regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of *Sinorhizobium meliloti* - a combined molecular biology and force spectroscopy investigation. *J Struct Biol* **143**, 145-52.

**Battisti, L., Lara, J. C. & Leigh, J. A. (1992).** Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5625-9.

**Becker, A., Kleickmann, A., Arnold, W. & Pühler, A. (1993a).** Analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted endo-beta-1,3-1,4-glucanases and ExoH resembles membrane proteins. *Mol Gen Genet* **238**, 145-54.

**Becker, A., Kleickmann, A., Keller, M., Arnold, W. & Pühler, A. (1993b).** Identification and analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. *Mol Gen Genet* **241**, 367-79.

**Becker, A., Kleickmann, A., Küster, H., Keller, M., Arnold, W. & Pühler, A. (1993c).** Analysis of the *Rhizobium meliloti* genes *exoU*, *exoV*, *exoW*, *exoT*, and *exoI* involved in exopolysaccharide biosynthesis and nodule invasion: *exoU* and *exoW* probably encode glucosyltransferases. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 735-44.

**Becker, A., Küster, H., Niehaus, K. & Pühler, A. (1995a).** Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. *Mol Gen Genet* **249**, 487-97.

**Becker, A., Niehaus, K. & Pühler, A. (1995b).** Low-molecular-weight succinoglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. *Mol Microbiol* **16**, 191-203.

**Becker, A., Rüberg, S., Küster, H., Roxlau, A. A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H. P., Walker, G. C. & Pühler, A. (1997).** The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J Bacteriol* **179**, 1375-84.

**Becker, A. & Pühler, A. (1998).** Production of exopolysaccharide by rhizobia. In: *Spaink, H. P., Kondorosí, A., Hooykaas, P. J. J. (eds.). The Rhizobiceae. Molecular biology of Model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.* 97-118.

**Berg, J. M. (1990).** Zinc finger domains: Hypothesis and current knowledge. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 405-21.

**Bertram-Drogatz, P. A., Rüberg, S., Becker, A. & Pühler, A. (1997).** The regulatory protein MucR binds to a short DNA region located upstream of the *mucR* coding region in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* **254**, 529-38.

**Bertram-Drogatz, P. A., Quester, I., Becker, A. & Pühler, A. (1998).** The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY*. *Mol Gen Genet* **257**, 433-41.

**Beveridge, T. J. & Graham, L. L. (1991).** Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* **55**, 684-705.

**Bialeski, R. L. (1973).** Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Ann Rev Plant Physiol* **24**, 225-52.

**Bisswanger, H. (1994).** *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976** **72**, 248-54.

**Breedveld, M. W., Zevenhuisen, L. P. Z. M. & Zehnder, A. J. B. (1990).** Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU47. *J Gen Microbiol* **136**, 2511-9.

**Brightwell, G., Hussain, H., Tiburtius, A., Yeoman, K. H. & Johnston, A. W. (1995).** Pleiotropic effects of regulatory *ros* mutants of *Agrobacterium radiobacter* and their interaction with Fe and glucose. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 747-54.

**Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. (2003).** The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 145-63.

**Buendia, A. M., Enenkel, B., Koplín, R., Niehaus, K., Arnold, W. & Pühler, A. (1991).** The *Rhizobium meliloti* *exoZ1* *exoB* fragment of megaplasmid 2: ExoB functions as a UDP-glucose 4-epimerase and ExoZ shows homology to NodX of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM. *Mol Microbiol* **5**, 1519-30.

**Bullock, W. C., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987).** XI1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactoside selection. *BioTechniques* **5**, 376-9.

**Calvo, J. M. & Matthews, R. G. (1994).** The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**, 466-90.

**Casse, F., Boucher, C., Hulliot, J. S., Michel, M. & Dénarié, F. (1979).** Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Bacteriol* **113**, 229-42.

**Chapuy-Regaud, S., Ogunniyi, A. D., Diallo, N., Huet, Y., Desnottes, J. F., Paton, J. C., Escaich, S. & Trombe, M. C. (2003).** RegR, a global LacI/GalR family regulator, modulates virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**, 2615-25.

**Cheng, H. P. & Walker, G. C. (1998).** Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol* **180**, 20-6.

**Cheng, H. P. & Yao, S. Y. (2004).** The key *Sinorhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene *exoY* is expressed from two promoters. *FEMS Microbiol Lett* **231**, 131-6.

**Chou, A. Y., Archdeacon, J. & Kado, C. I. (1998).** *Agrobacterium* transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene *ipt*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5293-8.

**Cohen, S. P., Hachler, H. & Levy, S. B. (1993).** Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 1484-92.

**Cooley, M. B., D'Souza, M. R. & Kado, C. I. (1991).** The *virC* and *virD* operons of the *Agrobacterium* Ti plasmid are regulated by the *ros* chromosomal gene: analysis of the cloned *ros* gene. *J Bacteriol* **173**, 2608-16.

**Costerton, J. W. (1997).** Cleaning techniques for medical devices: biofilms. *Biomed Instrum Technol* **31**, 222-6, 247.

**de Jong, W. W., Caspers, G. J. & Leunissen, J. A. (1998).** Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol* **22**, 151-62.

**De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettnick, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K. & Gillis, M. (1994).** Polyphasic taxonomy of *Rhizobiae*: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov. *Sinorhizobium saheli* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 715-33.

**Doherty, D., Leigh, J. A., Glazebrook, J. & Walker, G. C. (1988).** *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J Bacteriol* **170**, 4249-56.

**D'Souza-Ault, M. R., Cooley, M. B. & Kado, C. I. (1993).** Analysis of the Ros repressor of *Agrobacterium virC* and *virD* operons: molecular intercommunication between plasmid and chromosomal genes. *J Bacteriol* **175**, 3486-90.

**Finan, T. M., Hartweig, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G. C. & Signer, E. R. (1984).** General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **159**, 120-4.

**Finan, T. M., Kunkel, B., De Vos, G. F. & Signer, E. R. (1986).** Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J Bacteriol* **167**, 66-72.

**Fried, M. & Crothers, D. M. (1981).** Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**, 6505-25.

**Gish, W. & States, D. J. (1993).** Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266-72.

**Glazebrook, J. & Walker, G. C. (1989).** A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**, 661-72.

**Glucksmann, M. A., Reuber, T. & Walker, G. C. (1993a).** Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **175**, 7033-44

**Glucksmann, M. A., Reuber, T. L. & Walker, G. C. (1993b).** Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J Bacteriol* **175**, 7045-55.

**Gonzalez, J. E., Reuhs, B. L. & Walker, G. C. (1996).** Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8636-41.

**Gonzalez, J. E., Semino, C. E., Wang, L. X., Castellano-Torres, L. E. & Walker, G. C. (1998).** Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13477-82.

**Gottesman, S., Halpern, E. & Trisler, P. (1981).** Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **148**, 265-73.

**Gray, J. X., Djordjevic, M. A. & Rolfe, B. G. (1990).** Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. *J Bacteriol* **172**, 193-203.

**Gray, J. X. & Rolfe, B. G. (1990).** Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol Microbiol* **4**, 1425-31.

**Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. & Wallace, J. C. (1988).** A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6602-6.

**Her, G. R., Glazebrook, J., Walker, G. C. & Reinhold, V. N. (1990).** Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm1021. *Carbohydr Res* **198**, 305-12.

**Huffman, J. L. & Brennan, R. G. (2002).** Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 98-106.

**Keller, M., Roxlau, A., Weng, W. M., Schmidt, M., Quandt, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W. & Pühler, A. (1995).** Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 267-77.

**Khyse-Anderson, J. (1984).** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* **10**, 203-9.

**Lane, D., Prentki, P. & Chandler, M. (1992).** Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol Rev* **56**, 509-28.

**Leigh, J. A., Signer, E. R. & Walker, G. C. (1985).** Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6231-5.

**Leigh, J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M. & Walker, G. C. (1987).** *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* **51**, 579-87.

**Leigh, J. A., Battisti, L., Lee, C. C., Ozga, D. A., Zhan, H. & Astete, S. (1993).** Role in nodulation and genetic regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium meliloti*. In: Nester, E. W., Verma, D. P. S. (eds.). *Advances in molecular genetics in plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Publishers. 175-181.

**Leigh, J. A. & Walker, G. C. (1994).** Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet* **10**, 63-7.

**Lloret, J., Martin, M., Oruezabal, R. I., Bonilla, I. & Rivilla, R. (2002).** MucR and *mucS* activate *exp* genes transcription and galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 54-9.

**Long, S. R. (2001).** Genes and signals in the *rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol* **125**, 69-72.

**Madden, T. L., Tatusov, R. L. & Zhang, J. (1996).** Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol* **266**, 131-41.

**Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbour Laboratory.

**Mendrygal, K. E. & Gonzalez, J. E. (2000).** Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **182**, 599-606.

**Miller, J. H. (1972).** *Experiments in Molecular genetics*. New York, USA: cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Miller, P. F. & Sulavik, M. C. (1996).** Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**, 441-8.
- Minder, A. C., Narberhaus, F., Fischer, H. M. & Hennecke, H. (1998).** The *Bradyrhizobium japonicum* *phoB* gene is required for phosphate-limited growth but not for symbiotic nitrogen fixation. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 47-52.
- Moreira, L. M., Becker, J. D., Pühler, A. & Becker, A. (2000).** The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microbiology* **146**, 2237-48.
- Müller, P., Keller, M., Weng, W. M., Quandt, J., Arnold, W. & Pühler, A. (1993).** Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoYFQ* operon: ExoY is homologous to sugar transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 55-65.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. & Senda, T. (2003).** Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* **328**, 555-66.
- Niehaus, K. & Becker, A. (1998).** The role of microbial surface polysaccharides in the Rhizobium-legume interaction. *Subcell Biochem* **29**, 73-116.
- Niemeyer, D. & Becker, A. (2001).** The molecular weight distribution of succinoglycan produced by *Sinorhizobium meliloti* is influenced by specific tyrosine phosphorylation and ATPase activity of the cytoplasmic domain of the ExoP protein. *J Bacteriol* **183**, 5163-70.
- Oke, V. & Long, S. R. (1999).** Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol* **2**, 641-6.
- Osteras, M., Stanley, J. & Finan, T. M. (1995).** Identification of Rhizobium-specific intergenic mosaic elements within an essential two-component regulatory system of *Rhizobium* species. *J Bacteriol* **177**, 5485-94.

**Ozga, D. A., Lara, J. C. & Leig, J. A. (1994).** The regulation of exopolysaccharide production is important at two levels of nodule development in *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 758-65.

**Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2444-8.

**Pellock, B. J., Teplitski, M., Boinay, R. P., Bauer, W. D. & Walker, G. C. (2002).** A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 5067-76.

**Perez-Rueda, E. & Collado-Vides, J. (2001).** Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. *J Mol Evol* **53**, 172-9.

**Popp, R., Kohl, T., Patz, P., Trautwein, G. & Gerischer, U. (2002).** Differential DNA binding of transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Bacteriol* **184**, 1988-97.

**Quester, I. & Becker, A. (2004).** Four promoters being subject to regulation by ExoR and PhoB direct transcription of the *Sinorhizobium meliloti* *exoYFQ* operon involved in biosynthesis of succinoglycan. *J Mol Microbiol Biotechnol* : in press .

**Rawlins, D. R., Milman, G., Hayward, S. D. & Hayward, G. S. (1985).** Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* **42**, 859-68.

**Reed, J. W., Capage, M. & Walker, G. C. (1991a).** *Rhizobium meliloti* *exoG* and *exoJ* mutations affect the *exoX-exoY* system for modulation of exopolysaccharide production. *J Bacteriol* **173**, 3776-88.

**Reed, J. W., Glazebrook, J. & Walker, G. C. (1991b).** The *exoR* gene of *Rhizobium meliloti* affects RNA levels of other *exo* genes but lacks homology to known transcriptional regulators. *J Bacteriol* **173**, 3789-94.

**Reed, J. W. & Walker, G. C. (1991).** The *exoD* gene of *Rhizobium meliloti* encodes a novel function needed for alfalfa nodule invasion. *J Bacteriol* **173**, 664-77.

- Reese, M. G. (2000).** Computational prediction of gene structure and regulation in the genome of *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Hohenheim.
- Reese, M. G. (2001).** Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**, 51-6.
- Reinhold, B. B., Chan, S. Y., Reuber, T. L., Marra, A., Walker, G. C. & Reinhold, V. N. (1994).** Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J Bacteriol* **176**, 1997-2002.
- Reuber, T. L. & Walker, G. C. (1993a).** The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J Bacteriol* **175**, 3653-5.
- Reuber, T. L. & Walker, G. C. (1993b).** Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**, 269-80.
- Rüberg, S. (1999).** Die Galaktoglukan-Biosyntheseregion in *Sinorhizobium meliloti*: Sequenzanalyse, genetische Charakterisierung und Untersuchungen zur komplexen Regulation der *exp*-Genexpression. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Rüberg, S., Pühler, A. & Becker, A. (1999).** Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglukan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology* **145**, 603-11.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, R. T., Yocum, R. R., Doolittle, R. F., Lewis, M. & Pabo, C. O. (1982).** Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* **298**, 447-51.
- Schell, M. A. (1993).** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**, 597-626.

**Schirmer, F., Ehrt, S. & Hillen, W. (1997).** Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *J Bacteriol* **179**, 1329-36.

**Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**, 784-91.

**Southern, E. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.

**Spaink, H. P. (2000).** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 257-88.

**Stoye, J. (1998).** Multiple sequence alignment with the Divide-and-Conquer method. *Gene* **211**, GC45-56.

**Sulavik, M. C., Gambino, L. F. & Miller, P. F. (1995).** The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. *Mol Med* **1**, 436-46.

**Sutherland, I. W. (1988).** Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int Rev Cytol* **113**, 187-231.

**Tobes, R. & Ramos, J. L. (2002).** AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria. *Nucleic Acids Res* **30**, 318-21.

**Uttaro, A. D., Cangelosi, G. A., Geremia, R. A., Nester, E. W. & Ugalde, R. A. (1990).** Biochemical characterization of avirulent *exoC* mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **172**, 1640-6.

**Wang, L. X., Wang, Y., Pellock, B. & Walker, G. C. (1999).** Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **181**, 6788-96.

- Wanner, B. L. (1996).** Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.*, pp. 1357-81. Edited by F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington, D. C.: ASM Press.
- Whitfield, C. (1988).** Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol* **34**, 415-20.
- Whitfield, C. (1995).** Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol* **3**, 178-85.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- York, G. M. & Walker, G. C. (1997).** The *Rhizobium meliloti* *exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. *Mol Microbiol* **25**, 117-34.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. & van Neerven, A. R. W. (1983).** (1-2)- $\beta$ -D-glucan and acidic oligosaccharides produced by *Rhizobium meliloti*. *Carbohydr. Res.* **118**, 127-34.
- Zhan, H. J., Levery, S. B., Lee, C. C. & Leigh, J. A. (1989).** A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 that can function in root nodule invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3055-9.
- Zhan, H. J., Lee, C. C. & Leigh, J. A. (1991).** Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J Bacteriol* **173**, 7391-4.
- Zhang, J. & Madden, T. L. (1997).** PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* **7**, 649-56.

# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Genetik bedanken, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion am Lehrstuhl für Genetik in Bielefeld anfertigen zu können, und für die fortwährende Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau HD Dr. Anke Becker für ihre wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während jeder Phase dieser Arbeit. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft, aus der viele weiterführende Aspekte hervorgingen, hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des weiteren möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Dario Anselmetti, Dr. Robert Ros und Frank Wilco Bartels vom Lehrstuhl für Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften für die gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere bei Frank für die unzähligen Messungen der Protein-DNA-Wechselwirkungen auf Einzelmolekül-Ebene.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die immer freundliche Hilfsbereitschaft. Mein besonderer Dank geht an Dr. Silvia Rüberg, nicht nur für ihre ständige fachliche Hilfe, sondern auch für ihre Freundschaft. Ein weiterer Dank geht nach Leipzig an meine ehemalige Kollegin Dr. Dagmar Niemeyer. Ingmar Quester möchte ich für die nie endende Geduld während der Unterstützung bei den immer wiederkehrenden Computerproblemen danken. Eva Schulte-Bernd und Manuela Meyer danke ich für die praktische Unterstützung.

Danke an Alex, Angela, Ella, Eva, Maria, Mila, Tanja und Victoria, nicht nur für den Spaß in den Pausen.

Meiner Familie und meinem Freund Christian Meyer zur Heyde danke ich für ihr Verständnis und ihre beständige Unterstützung während meiner Promotion.