

**Molekularbiologische und genetische Untersuchungen  
zur Regulation des zentralen Regulators der  
Stickstofffixierung NifA in *Rhizobium leguminosarum*  
bv. *viciae* VF39**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des  
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Nico Saeglitz, geb. Esser

aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ursula B. Prierer

Universitätsprofessor Alan J. Slusarenko, Ph. D.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online  
verfügbar



## Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	3
1 Zusammenfassung .....	7
2 Einleitung.....	9
2.1 Endosymbiontische Stickstofffixierung in den Wurzelknöllchen der Leguminosen.....	11
2.2 Die Stickstofffixierungsgene in <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> .....	17
2.3 NifA, der zentrale Regulator der Stickstofffixierungsgene in Rhizobien.....	21
2.4 Kontrolle der <i>nifA</i> -Expression und –Aktivität.....	24
2.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	28
3 Material und Methoden.....	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Plasmidliste.....	29
3.1.2 Bakterienstämme .....	34
3.1.3 Nährmedien.....	38
3.1.3.1 LB-Medium (Luria-Bertani Broth, Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	38
3.1.3.2 TY-Medium (Medium für <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , Beringer 1974) .....	38
3.1.3.3 PA-Medium (Penassay Broth).....	39
3.1.3.4 Pflanzennodulationsmedium (Rolfe <i>et al.</i> , 1980).....	39
3.1.4 Zusätze zu Nährmedien .....	39
3.1.4.1 Festmedien .....	39
3.1.4.2 Antibiotikazusätze zu den Nährmedien .....	40
3.1.4.3 Weitere Zusätze .....	40
3.1.5 Verwendete Primer .....	40
3.1.5.1 <i>fixA</i> .....	40
3.1.5.2 <i>nifH</i> .....	40
3.1.5.3 Rep XbaI .....	41
3.1.5.4 Rep HindIII .....	41
3.1.5.5 <i>nifA</i> complete BamHI.....	41
3.1.5.6 <i>nifA</i> complete XbaI .....	41
3.1.5.7 M13 universe .....	41
3.1.5.8 M13 reverse .....	41
3.1.6 Enzyme .....	42
3.1.7 Puffer und Lösungen.....	43
3.1.7.1 DNA- und Enzympuffer .....	43
3.1.7.2 Elektrophoreselösungen und –puffer.....	44
3.1.7.3 Lösungen und Puffer für Plasmid-DNA-Isolierungen.....	44
3.1.7.4 Lösungen und Puffer für Gesamt-DNA-Isolierungen (CTAB).....	45
3.1.7.5 Vakuumblotting und nicht radioaktive Hybridisierungen .....	45
3.1.7.6 Lösungen zur Sondenentfernung (Stripping).....	47
3.1.7.7 Lösungen und Puffer für $\beta$ -Glucuronidase-Tests.....	47
3.1.8 Chemikalien.....	49
3.1.9 Weitere Materialien .....	50
3.1.10 Verwendete Kits .....	50
3.1.11 Geräte.....	51
3.1.12 Computerprogramme .....	51
3.2 Methoden .....	52
3.2.1 Bakterienanzucht .....	52
3.2.2 Messung des Bakterientiters .....	52

3.2.3	Konservierung von Bakterienstämmen .....	52
3.2.4	Mobilisierung von Plasmiden aus E. coli nach Rhizobium .....	52
3.2.5	Isolierung von DNA aus Bakterien .....	53
3.2.5.1	Präparation von Gesamt-DNA aus Gram-negativen Bakterien (CTAB-Methode) 53	
3.2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA .....	54
3.2.5.2.1	Adsorptionschromatographie – QIAprep Spin Miniprep Kit .....	54
3.2.5.2.2	Adsorptionschromatographie – Machery-Nagel Miniprep Kit .....	55
3.2.5.2.3	Ionenaustauscherchromatographie – Plasmid Mini Purification Kit 55	
3.2.5.2.4	Hot Boiling Prep (nach Holmes und Quigley, 1981) .....	56
3.2.5.2.5	Eckhardt-Lyse von Plasmid-DNA (modifiziert nach Eckhardt, 1978) 56	
3.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	57
3.2.6.1	Gelabschätzung .....	57
3.2.6.2	UV-Absorptionsspektrometrie .....	57
3.2.7	Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion .....	58
3.2.8	Konzentrierung der DNA durch Ethanol-Fällung .....	58
3.2.9	Die Manipulation der gereinigten DNA .....	59
3.2.9.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	59
3.2.9.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	59
3.2.9.3	Größenabschätzung von DNA-Fragmenten nach Gelelektrophorese .60	
3.2.9.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel – QIAquick Gel Extraction Kit .....	61
3.2.9.4.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel – Machery-Nagel Extraction Kit .....	62
3.2.9.5	Das Auffüllen von Restriktionsenden - Filling-in-Reaktionen .....	62
3.2.9.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	62
3.2.10	Southern-Blot und Hybridisierung .....	63
3.2.10.1	Markierung der Hybridisierungssonde mit Digoxigenin-dUTP .....	64
3.2.10.2	Labelkontrolle (Dot-Blot) .....	64
3.2.10.3	Transfer der DNA auf eine Nylonmembran mittels Vakuum-Blotting 65	
3.2.10.4	Vorhybridisierung .....	65
3.2.10.5	Hybridisierung .....	66
3.2.10.6	Immunologische Nachweisreaktion .....	66
3.2.10.7	Sondenwechsel-Stripping .....	67
3.2.11	PCR – Die Polymerasekettenreaktion .....	67
3.2.12	Nicht-radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	69
3.2.13	Konstruktion der Deletionsmutanten .....	70
3.2.14	Klonierungsexperimente .....	71
3.2.14.1	Herstellung kompetenter Zellen (Calciumchlorid-Methode) .....	71
3.2.14.2	Herstellung Kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode), nach Hanahan, 1983 .....	72
3.2.14.3	Transformation .....	72
3.2.15	$\beta$ -Glukuronidase-Tests .....	72
3.2.15.1	Bestimmung der $\beta$ -Glukuronidaseaktivität in freilebenden Rhizobien - Bakterien aus Flüssigkulturen (PNPG-Test) .....	73
3.2.15.2	Histochemischer Nachweis von $\beta$ -Glukuronidaseaktivität in Wurzelknöllchen .....	73
3.2.15.2.1	Pflanzenkultivierung und Inokulation mit Rhizobien .....	73

3.2.15.2.2	Knöllchen-Schnitte, Färbung und Dokumentation .....	74
3.2.16	Bestimmung der Nitrogenaseaktivität im Acetylen-Reduktionstest.....	75
4	Ergebnisse und Diskussion .....	76
4.1	Kartierung der <i>nifA</i> Promotorregion.....	76
4.1.1	Grobkartierung der <i>nifA</i> Promotorregion über vorhandene Restriktionsschnittstellen .....	76
4.1.1.1	Klonierung der <i>nifA</i> Promotorfragmente und Konstruktion der Reporterfusionen .....	77
4.1.1.2	Mobilisierung der Reporterfusionen in <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 .....	81
4.1.1.3	Bestimmung der Aktivität der <i>nifA</i> -Reporterfusionen unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend) .....	81
4.1.1.4	Bestimmung der Aktivität der <i>nifA</i> -Reporterfusionen in der Symbiose mit <i>Pisum sativum</i> .....	83
4.1.1.5	Interpretation der bisherigen Ergebnisse .....	85
4.1.2	Feinkartierung der <i>nifA</i> Promotorregion – Unidirektionale Deletion der stromaufwärts des P1-Promotors gelegenen Sequenzen .....	88
4.1.2.1	Konstruktion von Vektoren, Strategie und Durchführung der Deletionsreihe .....	88
4.1.2.2	Aktivitätsbestimmung der <i>nifA</i> -Deletionsderivate unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend) .....	91
4.1.2.3	Aktivitätsbestimmung der <i>nifA</i> -Deletionsderivate in der Symbiose mit <i>Pisum sativum</i> .....	94
4.1.2.4	Interpretation der bisherigen Ergebnisse .....	95
4.1.3	Feinkartierung der <i>nifA</i> Promotorregion – Unidirektionale Deletion der stromabwärts der Promotoren P1 und P2 gelegenen Sequenzen.....	98
4.1.3.1	Konstruktion von Vektoren, Strategie und Durchführung der Deletionsreihe .....	98
4.1.3.2	Aktivitätsbestimmung der <i>nifA</i> - Deletionsderivate unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend) .....	101
4.1.3.3	Interpretation der bisherigen Ergebnisse .....	102
4.2	Die Kernsequenz der <i>nifA</i> Promotorregion .....	104
4.2.1	Identifizierung und Amplifikation der Kernsequenz der <i>nifA</i> Promotorregion .....	104
4.2.2	Aktivitätsbestimmung der <i>nifA</i> -Kernpromotorregion.....	106
4.2.3	Interpretation der bisherigen Ergebnisse .....	107
4.3	Einfluss der Sequenzen stromabwärts des Kernpromotors auf die <i>nifA</i> - Expression.....	110
4.3.1	Konstruktion von VF39-Derivaten zur Untersuchung einer potentiell regulativen Region stromabwärts des P1 .....	110
4.3.2	Aktivitäten der <i>nptII-nifA</i> -Derivate zur Bestimmung des Einflusses der Sequenzen stromabwärts des Kernpromotors auf die <i>nifA</i> -Expression.....	112
4.3.3	Interpretation der bisherigen Ergebnisse .....	114
4.4	Identifizierung regulativer Elemente durch generelle Transposonmutagenese unter Verwendung des Transposons Tn5.....	115
4.4.1	Tn5-Mutagenese und phänotypische Identifizierung möglicher Mutanten 116	
4.4.2	Nachweis der Tn5-Insertionen durch Hybridisierung, Sequenzierung und Klonierung der getroffenen Genregion.....	119
4.4.3	Erzeugung von <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 Interposon- Mutanten 121	

4.4.4	Einfluss der Interposoninsertion im Bereich des Transkriptionsregulators auf die <i>nifA</i> -Expression von <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	124
4.4.5	Einfluss der Interposoninsertion im Bereich des Transkriptionsregulators auf verschiedene andere Promotoren – Klonierung der <i>nifH</i> - und <i>fixA</i> -Promotoren 129	
4.4.6	Untersuchung einer <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 Transkriptionsregulator-Deletionsmutante.....	133
4.4.7	Interpretation der bisherigen Ergebnisse.....	138
4.5	Autoregulation der <i>nifA</i> -Expression.....	139
4.5.1	Abhängigkeit der <i>nifH</i> - und <i>fixA</i> -Expression von NifA.....	139
4.5.2	Konstruktion und Klonierung der vollständigen, für die <i>nifA</i> -Expression benötigten Region.....	142
4.5.3	Aktivitätsbestimmung des <i>fixA</i> - und des vollständigen <i>nifA</i> -Promotors unter verschiedenen Bedingungen .....	143
4.5.4	Einfluss des <i>fixLJ</i> -Systems auf die Expression von <i>nifA</i> in <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 .....	148
4.5.5	Bestimmung der <i>nifA</i> -Expression in verschiedenen <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39- <i>fixL</i> Mutanten .....	148
4.5.6	Interpretation der Ergebnisse .....	151
5	Ausblick .....	157
6	Verzeichnisse .....	158
6.1	Literaturverzeichnis.....	158
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	168
7	Anhang .....	170
7.1	Sequenzen.....	170
7.2	Abkürzungen .....	182
7.3	Danksagung.....	184

# 1 Zusammenfassung

Die Expression der Stickstofffixierungsgene unterliegt in allen Rhizobien einer strikten Regulation. Der zentrale Regulator bei der Expression dieser Gene ist dabei das Protein NifA. In vorangegangenen Untersuchungen konnten in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 zwei Transkriptionsstartpunkte mittels Primer Extension Analysen identifiziert werden. Die diesen Signalen zugrunde liegenden Promotoren wurden mit P1 und P2 bezeichnet, wobei P1 4-5 bp stromabwärts des *fixX* Stopcodons und P2 120 bp stromabwärts des P1 lokalisiert sind.

In dieser Arbeit konnte durch umfangreiche Deletionsanalysen gezeigt werden, dass der P2 Promotor ohne negative Auswirkungen auf die *nifA* Expression deletiert werden kann. Das diesem Promotor zugrunde liegende Signal, welches bei der Kartierung der Transkriptionsstartpunkte identifiziert wurde, liegt in einer Region, in der die Ausbildung mehrerer starker Sekundärstrukturen wahrscheinlich ist. P2 kann daher als Artefakt angesehen werden.

Bei der Analyse der P2-Region mit dem *nifA* unabhängigen, konstitutiven *nptII*-Promotor konnte gezeigt werden, dass diese Region die Aktivität sämtlicher stromaufwärts lokalisierter Promotoren (P1,  $P_{fixA}$ , *nptII*) um 60 bis 70 Prozent drosselt. Auf diese Weise wäre eine Feinregulation der Aktivitäten von P1 und  $P_{fixA}$  denkbar, die eine Expression von *nifA* nur unter symbiontischen Bedingungen in ausreichendem Umfang zulässt.

Untersuchungen an den Promotoren des *nifHDK* und des *fixABCX* Genclusters zeigten eine stark promovierende Wirkung von NifA auf die jeweiligen Promotoren  $P_{nifH}$  und  $P_{fixA}$ . Dies konnte insbesondere dadurch gezeigt werden, dass diese Promotoren in einer *nifA* minus Mutante, selbst während der Symbiose nicht aktiviert wurden. Die Analysen zeigten weiterhin, dass die NifA abhängige Aktivierung des *fixA* Promotors sehr viel stärker ist als die des *nifH* Promotors, was sehr wahrscheinlich auf eine besser lokalisierte und konservierte NifA-Box zurück zu führen ist.

Durch die NifA Abhängigkeit des *fixA* Promotors und durch die Stärke seiner Aktivität konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des *nifA*-Gens in dem stickstofffixierenden Bodenbakterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 von zwei Promotoren aus reguliert wird. Bei diesen Promotoren handelt es sich um den P1-Promotor und um den *fixA*-Promotor ( $P_{fixA}$ ). Letzterer befindet sich etwa 3600bp stromaufwärts des P1. Bei der Expression von *nifA* agieren die Promotoren P1 und  $P_{fixA}$  zusammen. Der NifA unabhängige Promotor P1 sorgt dabei in der Symbiose mit der Wirtspflanze *Pisum sativum* für eine Grundlevelexpression von *nifA*. NifA aktiviert

nachfolgend seinerseits den  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor  $P_{fixA}$ , indem es an die stromaufwärts dieses Promotors lokalisierte NifA-Box (UAS) bindet. Der *fixA*-Promotor expremiert das *fixABCX*-Operon und *nifA*. Durch die so gesteigerte Menge an NifA erfolgt über  $P_{fixA}$  ein Aufschaukeln der *nifA*-Expression in Form einer Feedback-Schleife, wodurch die Abhängigkeit der *nifA*-Expression von NifA erklärt werden kann. Diese P1 induzierte und durch  $P_{fixA}$  amplifizierte *nifA* Expression konnte vor allem dadurch bestätigt werden, dass  $P_{fix}$  in Mutanten, in denen der P1 Promotor durch Interposon-Mutagenesen ausgeschaltet wurde, symbiontisch nicht aktiviert wurde. Eine Reporterfusion, in der die gesamte  $P_{fix}$  - P1 Region kloniert wurde, bestätigte diese Messungen und unterstrich damit die autoregulatorische Expression von *nifA*.

Durch welche übergeordneten Faktoren der P1-Promotor symbiontisch aktiviert wird konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass sowohl FixL als auch FnrN dabei eine nicht unwesentliche Rolle spielen, da P1 deutlich von FixL aktiviert zu werden scheint, FnrN unentbehrlich für die Expression von *nifA* ist und der *fnrN*-Promotor seinerseits FixL für seine mikroaerobe Aktivierung benötigt. Dies wird insbesondere an Expressionsuntersuchungen des P1-Kernpromotors in verschiedenen *fixL* Deletionsmutanten deutlich. Diese Messungen liefern weiterhin auch Hinweise auf eine Beteiligung von FixK an der Regulation des P1-Promotors.

Weiterhin konnte durch eine generelle (TN5) Mutagenese ein Gen identifiziert werden, welches große Homologien zu einem Transkriptionsregulator aufweist. Dieser Regulator scheint in Abhängigkeit des Sauerstoffstatus der Umgebung regulierend in die *nifA* Expression einzugreifen, da Mutationen in diesem Gen unter aeroben Bedingungen in einer verstärkten Aktivität des P1 resultieren. Diese erhöhte Aktivität ist weder unter mikroaeroben Bedingungen noch während der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum* zu beobachten und bedarf weiterführender Untersuchungen.

## 2 Einleitung

Das Element Stickstoff ist ein wesentlicher, charakteristischer Bestandteil von Proteinen und Nukleinsäuren und somit eines der für das Leben auf der Erde essentiellen Elemente. Stickstoff kommt in verschiedenen Erscheinungsformen vor. Als molekularer Stickstoff und in Form stickstoffhaltiger, chemischer Verbindungen. Elementarer Stickstoff,  $N_2$  ist ein wenig reaktives Molekül aus zwei Stickstoffatomen, und stellt in der Gasphase 78 % der in der Atmosphäre vorkommenden Gase dar. In seiner chemisch gebundenen Form ist Stickstoff neben Proteinen und Nukleinsäuren vor allen in Ammonium-Ionen ( $NH_4^+$ ) und Nitraten ( $NO_3^-$ ) zu finden. Da die meisten Lebewesen jedoch ausschließlich in der Lage sind, chemisch gebundenen Stickstoff für die Synthese von Aminosäuren, Nukleotiden und anderen Biomolekülen zu verwerten, wird in einem Ökosystem der für das Pflanzenwachstum erforderliche Stickstoff vor allem in Form von Nitrat aus dem Boden aufgenommen. Dieses Nitrat stammt zum größten Teil aus dem Abbau von Biomasse. Dieser Abbauvorgang ist Bestandteil eines biogeochemischen Stoffumwandlungsprozesses, dem Stickstoffkreislauf (Abb. 2.1), an dem neben Pflanzen und Tieren vor allem Mikroorganismen beteiligt sind. In diesem Kreislauf wird der in Form von Ammonium und Nitraten gebundene Stickstoff direkt von den Pflanzen aufgenommen und über verschiedene Stoffwechselforgänge in ihrem Gewebe als Pflanzenprotein eingelagert. Anschließend gelangt der im Pflanzenprotein gebundene Stickstoff dann über die Nahrungskette von den Pflanzen über die Pflanzenfresser bis zu den Fleischfressern. Wenn Pflanzen und Tiere sterben, werden die organisch gebundenen Stickstoffbestandteile bei der Mineralisierung durch verschiedene Mikroorganismen umgewandelt. Ammonium spielt eine zentrale Rolle bei diesem Umwandlungsprozess und wird in einem Vorgang, der Ammonifikation, aus den stickstoffhaltigen Biomolekülen gebildet. Ein Teil dieses Ammoniums wird von den Pflanzen wieder aufgenommen oder verbleibt im Boden. Dort wird es teilweise unter aeroben Bedingungen durch chemolithotrophe Bakterien (*Nitrosomas*) zu Nitrit umgewandelt. Die folgende Oxidation zu Nitrat (Nitrifikation) erfolgt hauptsächlich durch Bakterien der Gattung *Nitrobacter*. Nicht umgesetzte Ammonium-Ionen binden im Boden durch Adsorption an Tonmineralien und gehen mehr oder weniger feste Verbindungen mit Humus ein. Nitrate werden dagegen leicht aus dem Boden ausgewaschen. Sie können aber auch unter anaeroben Bedingungen durch Bakterien wie z.B. *Pseudomonas denitrificans* im Rahmen einer anaeroben Atmung wieder zu molekularem Stickstoff ( $N_2$ ) reduziert werden (Denitrifikation) und als Gas ( $N_2O$ ,  $N_2$ ) in die Atmosphäre entweichen. Das Nitrat dient den beteiligten Bakterien dabei als  $H^+$  - und  $e^-$ -Akzeptor.

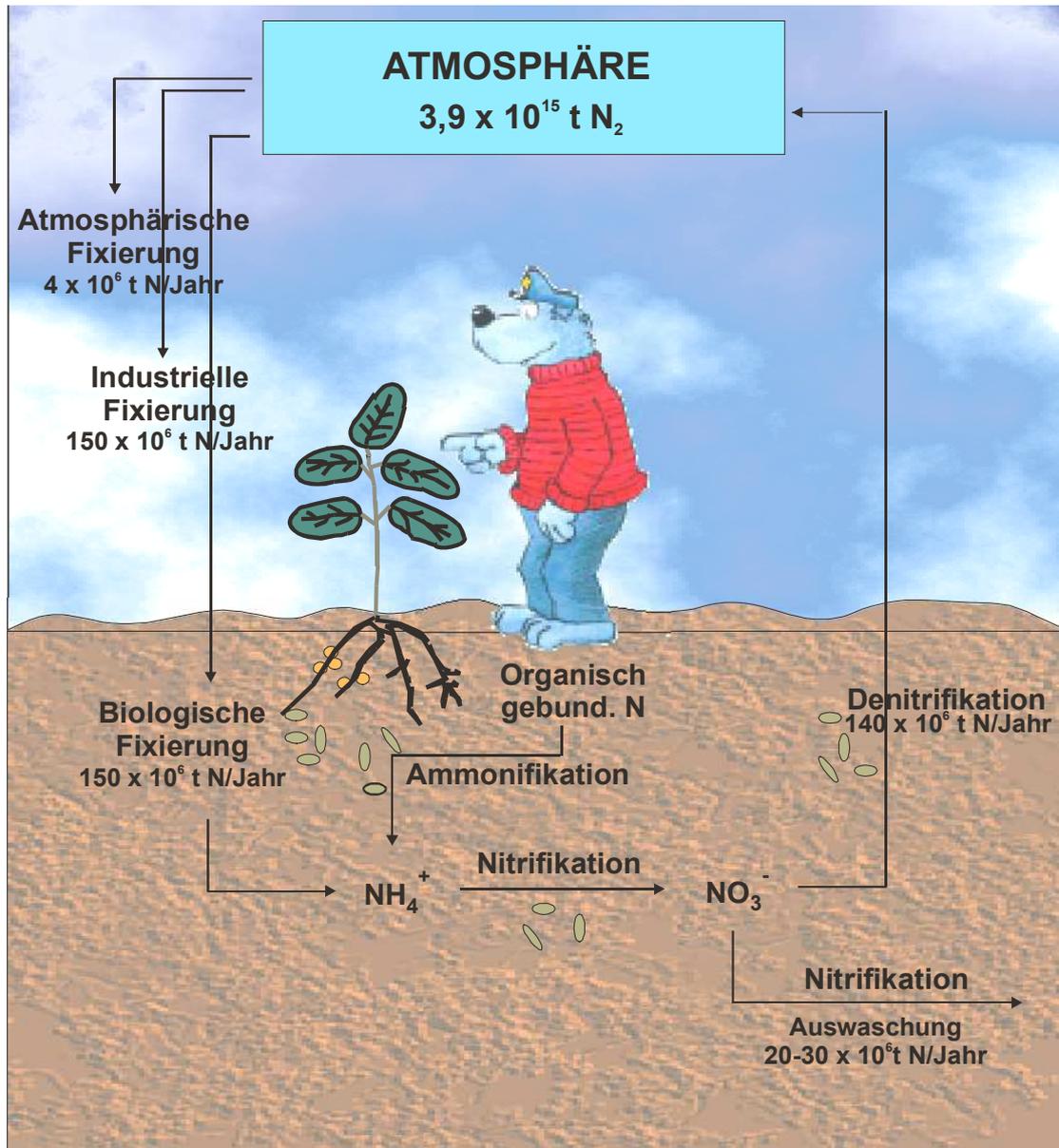


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufs.

Diese Denitrifikation, auch Stickstoffendbindung genannt, ist der einzige biologische Prozess, durch den organisch oder anorganisch gebundener Stickstoff zu  $\text{N}_2$  entbunden und rezykliert werden kann. Der durch Auswaschung und Denitrifikation folgende, immer weiter fortschreitende Stickstoffverlust wird zusätzlich durch eine Intensivierung der Erntemaßnahmen im Zuge gesteigerter landwirtschaftlicher Aktivitäten noch verstärkt. Da Nitrat jedoch nicht wie andere Mineralien durch eine Verwitterung von Gestein nachgeliefert werden kann, muss dieses demnach durch einen gegenläufigen Prozess oder durch Düngung wieder in den Boden eingebracht werden, um eine ausreichende Nitratversorgung der Pflanzen zu gewährleisten. Dieser gegenläufige Prozess wird als Stickstofffixierung bezeichnet. Die Bezeichnung

Stickstofffixierung umfasst alle Vorgänge, in denen molekularer Stickstoff ( $N_2$ ) aus der Atmosphäre chemisch gebunden und so in eine für Pflanzen verwertbare Form umgewandelt wird. Kleinere Mengen an Nitrat werden im Zuge geophysikalischer Vorgänge gebildet. Unter dem Einfluss hoher Energien, wie sie durch Blitze und kosmische Strahlung geliefert werden, können sich atmosphärischer Stickstoff und Sauerstoff miteinander zu Nitraten verbinden (in unseren Breiten jährlich ca. 5 kg/ha), die wiederum mit den Niederschlägen auf die Erdoberfläche gelangen. Den größten Teil der Stickstoffumwandlung macht jedoch die biologische Fixierung aus. Nur verhältnismäßig wenige Spezies, darunter Cyanobakterien und Rhizobien, sind in der Lage molekularen Stickstoff ( $N_2$ ) in chemischen Verbindungen ( $NH_4^+$ ) zu fixieren. Es handelt sich bei diesen Organismen ausschließlich um Prokaryoten, die aufgrund der fixierten Menge an atmosphärischem Stickstoff eine besonders wichtige Rolle im Stickstoffkreislauf übernehmen. Man kann zwei Gruppen von stickstofffixierenden Bakterien unterscheiden. Zum einen die freilebenden Bakterien, wie *Klebsiella pneumoniae* und *Azotobacter vinelandii*, die den Stickstoff nur für ihre eigenen Zwecke fixieren. Ihre Fixierungsleistung ist mit jährlich 1-3 kg/ha verhältnismäßig gering. Auf der anderen Seite geht eine Vielzahl von Pflanzen Symbiosen mit stickstofffixierenden Bakterien ein, um sich mit verwertbarem Stickstoff zu versorgen. Die Pflanzen übernehmen in dieser Symbiose die Ernährung der Bakterien und werden als Gegenleistung mit verwertbaren Stickstoffverbindungen versorgt. Bei der im weiteren besprochenen endosymbiontischen  $N_2$ -Fixierung leben die Bakterien in speziell von der Pflanze ausgebildeten Strukturen, den Knöllchen (Mohr & Schopfer, 1992). Die mengenmäßig wichtigste Symbiose ist dabei die Symbiose von Leguminosen mit den Knöllchenbakterien (Rhizobien). Von den etwa 12000 Leguminosenarten, zu denen z.B. Erbsen, Bohnen, Sojabohne und Klee gehören, können etwa 90 % eine Symbiose mit Rhizobien eingehen. Die dabei fixierte Menge an Stickstoff liegt jährlich bei ca. 100-400 kg/ha (Heldt, 1996) und stellt somit eine hervorragende Alternative zum Kunstdünger dar.

## 2.1 Endosymbiontische Stickstofffixierung in den Wurzelknöllchen der Leguminosen

Die Wurzelknöllchen der Leguminosen wurden zunächst als Zeichen eines Krankheitsbefalls der Pflanze angesehen, bis sie 1888 durch Hellriegel und Wilfarth mit der  $N_2$ -Fixierung in Zusammenhang gebracht wurden. Die zur Symbiose mit Leguminosen befähigten Bakterien werden unter dem Begriff „Rhizobien“ zusammengefasst. Zu ihnen gehören die Bakterien der Gattungen *Rhizobium*,

*Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* und *Azorhizobium*. Zusammen mit den Gattungen *Agrobacterium* und *Phyllobacterium* bilden sie die Familie der Rhizobiaceae, in der  $\alpha$ -Untereinheit der Proteobakterien (Young, 1992). Es handelt sich um aerobe Gram-negative Stäbchen, die im Boden leben und mit organischen Verbindungen heterotroph wachsen.

Die Interaktion zwischen Rhizobien und den korrespondierenden Wirtspflanzen beginnt mit dem Austausch molekularer Signale. Vor allem bei Stickstoffmangel bilden die Wirtspflanzen Flavonoide oder Isoflavonoide und geben sie in die Umgebung ab. Diese durch die Pflanzen exudierten Stoffe haben eine chemotaktische Anlockung der Rhizobien zur Folge. Darüber hinaus induzieren diese Pflanzenexsudate die Expression einer Vielzahl von bakteriellen Nodulationsgenen (*nod*-Genen) (Hirsch, 1992). Die Expression der *nod*-Gene steht unter der Kontrolle des regulatorischen Proteins NodD, das durch die Flavonoide und Isoflavonoide aktiviert wird (Denarie *et al.*, 1992). Die Genprodukte der *nod*-Gene sind an der Synthese von artspezifischen Nodulationsfaktoren (Nod-Faktoren) beteiligt. Dabei handelt es sich um Lipooligosaccharide, die durch Acetylierung, Acylierung und Sulfatierung eine hohe strukturelle Spezifität erreichen. Diese von den Bakterien abgesonderten Substanzen lösen unter anderem die Krümmung der Wurzelhaare (root hair curling) aus, wodurch die angehefteten Bakterien eingeschlossen werden. Das calciumbindende Protein Rhizadhesin vermittelt die Bindung der Rhizobienzelle an das Wurzelhaar. Gleichzeitig induzieren die Nod-Faktoren die Bildung von Teilungsgewebe im inneren Kortex der Wurzel (Meristematisierung), was letztendlich, bei einer erfolgreichen Infektion, zur Bildung eines Wurzelknöllchen führt (Schultze und Kondorosi, 1998). Nachdem die Bakterien die Zellwand der Wurzelhaare durchdrungen haben, gelangen sie in einen von der Pflanze gebildeten Infektionsschlauch, der sie vom Cytoplasma der Wurzelhaarzelle trennt. Der Infektionsschlauch kann sich verzweigen, während er in Richtung des Rindengewebes wächst. Es werden nachfolgend etwa die Hälfte der Zellen des Teilungsgewebes infiziert, indem die Bakterien durch Endocytose in das Cytoplasma der Wirtszellen entlassen werden. Meist sind mehrere dieser Bakterien von einer Symbiosemembran (Peribacteroidmembranen) eingeschlossen und so in einem Symbiosom vom Cytoplasma der Wirtszelle abgetrennt. Im Weiteren differenzieren sich die Bakterien in Bakterioide um, in einem Prozess der eine physiologische und meist auch morphologische Umwandlung der Rhizobien beinhaltet und von weitreichenden Veränderungen in der pflanzlichen und bakteriellen Genexpression begleitet wird (Trepp *et al.*, 1999). Die durch diese kontrollierte Infektion morphologisch und physiologisch umstrukturierten Bakterioide sind im Gegensatz zu der freilebenden Rhizobienform in der Lage atmosphärischen Stickstoff

zu fixieren ( $\text{NH}_4^+$ ) und durch Abgabe an die Pflanze für diese verfügbar zu machen. Im Gegenzug übernimmt die Pflanze, die auf diese Weise auf stickstoffarmen Böden wachsen kann (ökologische Nische), die Versorgung der Bakterioide mit Photosyntheseprodukten. Diese Photosyntheseprodukte werden in der „dunklen“ Kohlenstofffixierung über PEPC im Zytosol der Wirtspflanzenzellen, vor allem in Form der Dikarbonsäure Malat, gebildet und von den Bakteroiden aufgenommen und verstoffwechselt (S. O. Salminen und J. S. Streeter, 1992).

Die Morphologie der Knöllchen wird hauptsächlich durch die Wirtspflanze und nicht durch den Mikro-Symbionten determiniert. Man kann grundsätzlich zwischen zwei Erscheinungsformen von Knöllchen unterscheiden, den determinierten und den nicht-determinierten. Die determinierten Knöllchen sind globulär, weisen ein nur zeitweise aktives Meristem auf und stellen ihr Wachstum nach einiger Zeit ein. Sie durchlaufen als ganzes Knöllchen einen Entwicklungsprozess und enden in reifen stickstofffixierenden Knöllchen. Dieser Knöllchentyp ist vor allem bei tropischen Leguminosen wie *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* und *Sesbania rostrata* zu finden. Die nicht-determinierten Knöllchen, wie sie z.B. bei *Pisum sativum* oder *Vicia hirsuta* vorkommen, haben ein eher zylindrisches oder keulenförmiges Erscheinungsbild. Diese Knöllchen zeichnen sich durch ein fortlaufendes Wachstum und ein immer aktives Apikalmeristem aus (Abb. 2.2).

Im Gegensatz zu den determinierten Knöllchen, bei denen sich jedes immer in einem individuellen Entwicklungsstadium befindet, sind in den ausgereiften nicht-determinierten Knöllchen immer alle Entwicklungsstufen anzutreffen (Abb. 2.2). Zone I wird von dem apikalen Meristem gebildet. In dieser Region erfolgen fortlaufend Zellteilungen, wodurch das zentrale symbiontische Gewebe und das periphere nicht infizierte Gewebe gebildet wird. Auf diese Weise wächst das Knöllchen in die Länge. Das periphere Gewebe besteht aus dem Knöllchenkortex und dem Knöllchenparenchym mit dem vaskulären System. Das vaskuläre System schließt sich im Gegensatz zu den determinierten Knöllchen nicht über dem Apex. Anschließend an die teilungsaktive Zone I im Apikalmeristem folgen in Richtung Knöllchenbasis die frühsymbiontische Zone II mit Invasionszone und Präfixierungsregion, die Interzone II-III, die stickstofffixierende Zone III und die Seneszenzzone IV. In der Invasionszone, die direkt im Anschluss an das Meristem zu finden ist, werden die Bakterien aus den Infektionsschläuchen freigesetzt und infizieren etwa die Hälfte der Pflanzenzellen. Die Bakterien bleiben jedoch von einer zusätzlichen Membran (Peribakteroidmembran) umgeben, die aus der Zytoplasmamembran der Pflanzenzelle hervorgeht. In der frühsymbiontischen Zone lassen sich infizierte und nicht-infizierte Zellen erstmals voneinander unterscheiden.

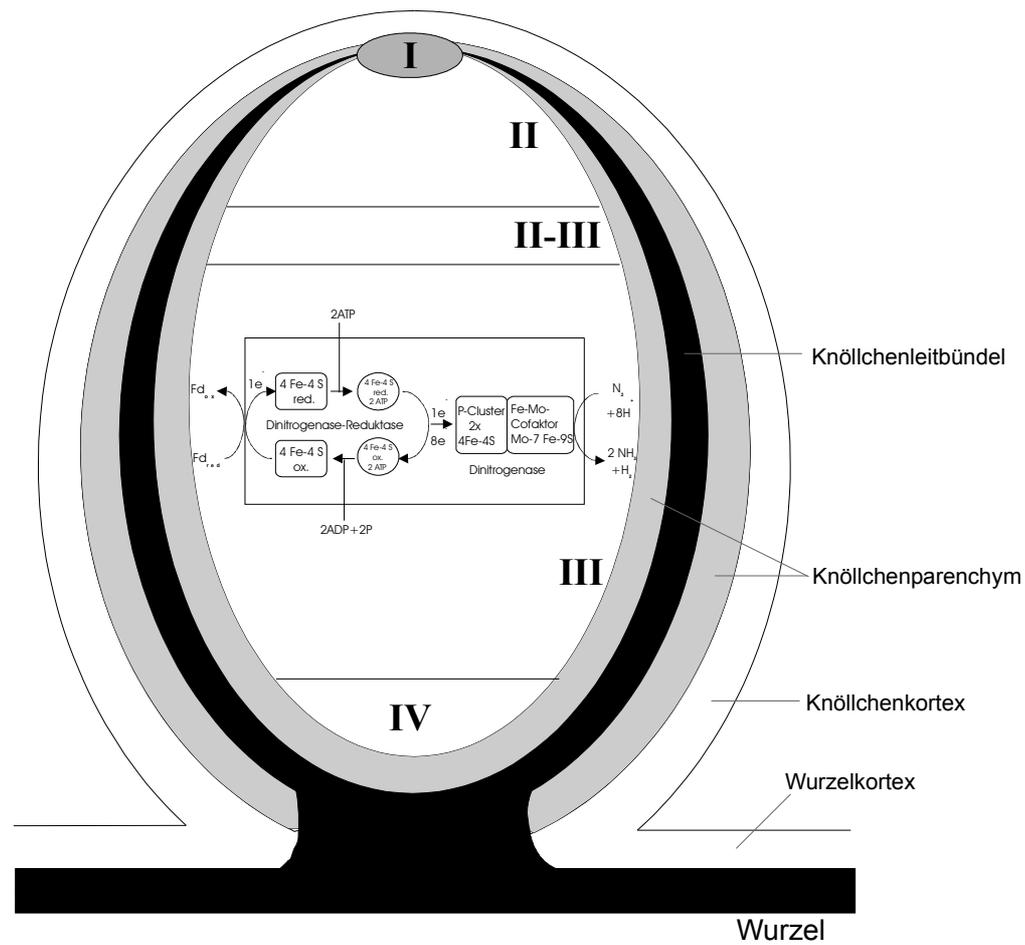


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines medial longitudinalen Querschnitts durch ein nicht-determiniertes Wurzelknöllchen.

Innerhalb des zentralen symbiontischen Gewebes kann zwischen folgenden Zonen unterschieden werden: I: apikale meristematische Zone, II: präfixierende Zone, II-III: Interzone, III: stickstofffixierende Zone und IV: Seneszenzzone. Die Zonen II und III werden in Unterbereiche eingeteilt: Zone II beinhaltet die Invasionszone nahe dem Apikalmeristem und eine Präfixierungszone neben der Interzone. Zone III besteht aus einem stickstofffixierenden Bereich neben der Interzone und einem ineffizienten Bereich nahe der Seneszenzzone. Innerhalb der Zone III ist schematisch der innerhalb der Bakterioide ablaufende Prozess der enzymatischen Reduktion des  $N_2$  zu Ammonium mit einigen daran beteiligten Komponenten dargestellt. Abkürzungen: Fd: Ferredoxin, Fe-S: Eisen-Schwefelzentrum, Fe-Mo: Eisen-Molybdän, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, P: Phosphat, ox.: oxidiert, red.: reduziert

Die Bakterien vermehren sich und differenzieren sich zu Bakteroiden um. In der Interzone II-III verlieren die Bakterien ihre Teilungsfähigkeit und stellen ihr Wachstum ein. Die Differenzierung zu Bakteroiden ist abgeschlossen. Die Fähigkeit zur Fixierung von atmosphärischem Stickstoff erlangen die Bakterioide jedoch erst im Bereich der stickstofffixierenden Zone III, da erst hier alle für die Stickstofffixierung notwendigen Komponenten, vor allem der Nitrogenasekomplex, exprimiert werden. Die Seneszenzzone IV weist nur noch degenerierte Pflanzenzellen und Bakterioide auf und spielt demnach bei der Stickstofffixierung keine Rolle mehr.

Die Fixierung von molekularem Stickstoff ( $N_2$ ) findet in der stickstofffixierenden Zone III statt und wird durch den Nitrogenasekomplex ermöglicht. Der Nitrogenasekomplex ist ein hochkonservierter Enzymkomplex, bestehend aus den zwei Komponenten, der Dinitrogenase-Reduktase und der Dinitrogenase. Unter Beteiligung eines löslichen Ferredoxins als Einelektronenüberträger wird jeweils ein Elektron von im Zitratcyklus gebildetem NADH auf die Dinitrogenase-Reduktase übertragen (Heldt, 1996). Diese stellt wiederum einen aus zwei identischen Untereinheiten aufgebauten Einelektronenüberträger dar. Zusammen binden diese Untereinheiten ein 4Fe-4S-Zentrum und weisen zwei Bindungsstellen für ATP auf. Durch die Bindung von zwei ATP erfährt die Dinitrogenase-Reduktase nach der Reduktion eine Konformationsänderung und ist nun ihrerseits in der Lage ein Elektron auf die Dinitrogenase zu übertragen (Heldt, 1996). Durch ATP-Spaltung und Ablösung der Spaltungsprodukte ADP und P wird die oxidierte Ausgangsform der Dinitrogenase-Reduktase wieder hergestellt, so dass ein weiteres Elektron aufgenommen und übertragen werden kann. Die Dinitrogenase ist ein  $\alpha\beta_2$ -Tetramer, das zwei, wahrscheinlich unabhängig voneinander reagierende katalytische Zentren enthält. Jedes dieser Zentren enthält einen sogenannten P-Cluster, der jeweils aus einem 4Fe-4S-Zentrum, sowie einem Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMoCo) besteht (Heldt, 1996). Die  $N_2$ -Moleküle werden möglicherweise im Hohlraum des FeMoCo-Redoxzentrums gebunden und durch Elektronen, die vom P-Cluster geliefert werden, reduziert. Der im Bakteroid fixierte Stickstoff wird wahrscheinlich anschließend in Form von  $NH_4^+$  in das Cytosol der Wirtszelle transferiert (Y. Li *et al.*, 2002) und erst dort von pflanzlichen Enzymen (Glutamin Synthetase, GS und Glutamat Synthase, GOGAT) in Aminosäuren (Glutamin, Glutamat und Asparagin) eingebaut. Neben molekularem Stickstoff kann die Dinitrogenase auch andere Substrate reduzieren. So werden Protonen zu molekularem Wasserstoff und Acetylen zu Ethen reduziert, sofern dies in ausreichend hohen Konzentrationen vorhanden ist. Die Bildung von Wasserstoff stellt eine bei der Stickstofffixierung unvermeidbare Nebenreaktion dar, während die Acetylenreduktion zur Messung der Nitrogenaseaktivität eingesetzt wird.

Da die Dinitrogenase extrem sauerstoffempfindlich ist, kann die  $N_2$ -Fixierung nur bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ablaufen. Eine sinnvolle Maßnahme um eine Inaktivierung der Nitrogenase durch Sauerstoff zu verhindern, ist ihre Expression nur unter mikroaeroben Bedingungen zu gestatten. Eine geringe Sauerstoffkonzentration, wie sie im Knöllchen zu finden ist, wird durch verschiedene Maßnahmen gewährleistet. Zum einen stellt die äußere Schicht der Knöllchen, der Knöllchenkortex durch die wassergefüllten Interzellularräume eine effektive Diffusionsbarriere für den Sauerstoff dar. Daraus folgt, dass die Sauerstoffkonzentration im Bereich der Bakteroiden sehr

gering ist, was unter „normalen“ Umständen eine Zellatmung unmöglich machen würde. Abhilfe bei diesem Problem schafft eine symbiosespezifische Cytochrom  $cbb_3$ -Oxidase (Preisig *et al.*, 1996), die die geringe Menge an eindiffundiertem Sauerstoff in effektiver Weise verwertet. Durch die hohe Sauerstoffaffinität dieser Oxidase ist eine Atmung auch bei einer Konzentration von nur  $10^{-9}$  mol/l möglich. Dadurch, dass die bakterielle Atmungskette in der Membran und die Dinitrogenase im Inneren der Bakterioide lokalisiert ist, wird der Sauerstoff in sehr effektiver Weise von der Dinitrogenase ferngehalten. Die bei einigen Rhizobien beobachtete Hydrogenaseaktivität steigert den Sauerstoffverbrauch zusätzlich.

Bei der Stickstofffixierung handelt es sich um einen sehr energieaufwendigen Prozess. Pro Mol fixiertem  $N_2$  werden 16 Mol ATP verbraucht. Die Bilanz ist im Folgenden dargestellt:



Da der Kopplungsgrad der bakteriellen Atmungskette im allgemeinen niedriger ist, als bei der mitochondrialen Atmungskette, werden bei der Bildung von 16 mol ATP etwa 4 Mol  $O_2$  verbraucht. Dies entspricht einem Sauerstoffbedarf von mindestens 4 Mol  $O_2$  pro fixiertem  $N_2$  (Heldt, 1996). Dagegen beträgt das  $O_2/N_2$ -Verhältnis in der Luft ca. 0,25. Dies führt zu der erstaunlichen Tatsache, dass der Sauerstoff zum limitierenden Faktor bei der  $N_2$ -Fixierung wird, obwohl seine Konzentration zum Schutz der Nitrogenase möglichst gering sein muss. Dieser Widerspruch wird durch das, für die Rhizobien-Leguminosen-Symbiose charakteristische sauerstoffbindende Protein, Leghämoglobin bereinigt. Das Leghämoglobin liegt außerhalb der Symbiosmembran im Cytosol der Wirtszellen und kommt dort in außergewöhnlich hohen Konzentrationen vor. Dies verleiht den Knöllchen eine rosa Färbung. An seiner Synthese sind Pflanze und Bakterioide gleichermaßen beteiligt. Die Wirtszelle bildet dabei den Proteinanteil, das Globin, während die Bakterioide die Synthese der prosthetischen Gruppe, des Häms, übernehmen (Smith und Douglas, 1987). Die Funktion des Leghämoglobins liegt weniger darin, den Sauerstofftransport in das Knöllchen zu erleichtern, sondern vielmehr in einer Art  $O_2$ -Puffer, der eine ATP-Synthese auch bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen gewährleisten soll. Gleichzeitig kann Leghämoglobin durch seine Fähigkeit Sauerstoff zu binden, die Dinitrogenase bei zu hohen  $O_2$ -Partialdrücken vor Schäden durch Oxidation schützen.

## 2.2 Die Stickstofffixierungsgene in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

Bei *Rhizobium leguminosarum* können drei Biovarietäten voneinander unterschieden werden, die jeweils verschiedene Wirtsspektren aufweisen. Dabei stellt beispielsweise die Pflanze *Phaseolus vulgaris* den Wirt für *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* und Pflanzen der Gattung *Trifolium* den Wirt für *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* dar. Rhizobien der Biovarietät *viciae* können mit Pflanzen der Gattungen *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* und *Lens* Symbiosen eingehen und diese nodulieren.

Im Allgemeinen können zwei Gruppen von rhizobiellen Genen, die direkt an der Stickstofffixierung beteiligt sind, unterschieden werden. Dabei handelt es sich um die *fix*- (fixation) und die *nif*-Gene (nitrogen fixation). Auf die *nod*-Gene, die zu den ersten aktivierten Genen während der symbiontischen Stickstofffixierung gehören und für die ersten Schritte der Symbiose bis zur Knöllchenbildung wichtig sind, wird im weiteren nicht eingegangen. Es sei jedoch darauf verwiesen, dass eine Symbiose ohne eine Beteiligung der *nod*-Gene nicht denkbar ist. Die *fix*- und *nif*-Gene von *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* und *Azorhizobium caulinodans* sind in verschiedenen Clustern angeordnet, deren Struktur und Lage im Genom spezies-spezifisch ist (Fischer, 1994). In *B. japonicum* und *A. caulinodans* sind die *nif*- und *fix*-Gene chromosomal lokalisiert. Im Gegensatz dazu trägt *S. meliloti* zwei große Megaplasmide, von 1,4 Mb (Megaplasmid 1) und 1,7 Mb Größe (Megaplasmid 2) (Burkhardt *et al.*, 1987). Die *nif*- und *fix*-Gene sind in zwei Clustern auf dem Megaplasmid 1 lokalisiert (Fischer, 1994). *Rhizobium leguminosarum* weist ebenfalls Plasmide auf. Der Stamm *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39, der Gegenstand dieser Arbeit ist, trägt sechs verschiedene Plasmide (a-f), von denen die Plasmide c und d (pSym-Plasmid) die *nif*- und *fix*-Gene beinhalten (Zhang *et al.*, 2001). Die Organisation der *nif*- und *fix*-Gene auf den Plasmiden c und d entspricht im wesentlichen der der *nif*- und *fix*-Gene auf dem Megaplasmid 1 in *S. meliloti*. Wie in *S. meliloti*, sind die Operons *nifHDKE* und *fixABCX* nahe beieinander (auf dem Plasmid d; Abb. 2.3) lokalisiert. Zu allen (Ausnahme *fixW*) bekannten in *R. leguminosarum* vorkommenden *nif*- und *fix*-Genen sind homologe Äquivalente in den oben genannten Rhizobien zu finden. Die Anordnung der Gene *nifHDKE*, *nifA*, *nifB*, *fixL*, *fixK*, *fixNOQP*, *fixWABCX* und *fixGHIS* auf den Plasmiden c und d in *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 ist in Abb. 2.3 dargestellt. Im Folgenden wird nun kurz die Funktion der genannten Gene, soweit bekannt, dargestellt, bevor auf die Regulation der *fix*- und *nif*-Gene eingegangen wird. Die Gene *nifHDK* kodieren den Nitrogenasekomplex, wobei die Gene *nifD* und *nifK* die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit der Komponente I, der Dinitrogenase, bilden und *nifH* für die Komponente II, die Dinitrogenase-Reduktase

kodiert. Zusammen mit *nifE* bilden *nifHDK* in *R. leguminosarum* und *S. meliloti* ein Operon (*nifHDKE*). *nifE*, *nifB* und *nifN* kodieren gemeinsam für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors. Das Gen *nifN* ist jedoch bisher nur in *S. meliloti* und *B. japonicum* nachgewiesen. Interessanterweise zeigen die Aminosäuresequenzen der Proteine NifE und NifN signifikante Homologien zu den *nifDK*-Genprodukten. Das *nifA*-Genprodukt, NifA, gehört, ebenso wie die beiden Fnr-ähnlichen Proteine FixK und FnrN, zu regulatorischen Komponenten, die in den verschiedenen Rhizobien in ähnlicher Weise Einfluss auf die Expression der *nif*- und *fix*-Gene nehmen. Die Gene *fixABCX* sind in allen Rhizobien außer in *B. japonicum* in einem Operon organisiert (Fischer, 1994). Man nimmt an, dass die *fixABCX*-Genprodukte im Elektronentransport zur Nitrogenase involviert sind (Earl et al., 1987). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass im FixX aller Rhizobien konservierte Cysteinreste eines typischen Ferredoxins zu finden sind (Brushi & Guerlesquin, 1988). Sicher ist jedoch nur, dass Mutationen in der *fixABCX*-Genregion die Stickstofffixierung verhindern. Die Funktion des zusätzlich in *R. leguminosarum* zu findenden FixW ist noch unbekannt (Hontelez et al., 1989). Die Gene *fixNOQP* sind in den Rhizobien *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *B. japonicum* und *A. caulinodans* je in einem Operon organisiert und kodieren für eine membranverankerte Cytochrom c-enthaltende Oxidase (Preisig et al., 1996) mit erhöhter Sauerstoffaffinität, die unter mikroaeroben Bedingungen gebildet wird. Es wird postuliert, dass diese Oxidase den Bakteroiden unter mikroaeroben Verhältnissen, wie sie in den Knöllchen anzutreffen sind, eine effektive Sauerstoffatmung ermöglicht (Preisig et al., 1993; Fischer et al., 1994). In *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 konnten zwei Kopien des *fixNOQP*-Operons identifiziert werden, eine auf dem c- und eine auf dem d-Plasmid. Die *fixN* (c,d) Promotoren werden durch FnrN aktiviert. Dieses und die Tatsache, dass die Expression der *fixNOQP*-Gene in einer *fixL*-Mutante deutlich reduziert ist, lassen darauf schließen, dass FixL in der Expression von *fnrN* involviert sein könnte (Boesten & Priefer, 2004). Die Gene *fixGHIS* sind in *S. meliloti* und *R. leguminosarum* ebenfalls in einem Operon organisiert. Die Funktion der Genprodukte dieses Operons ist nicht eindeutig geklärt, man nimmt jedoch an, dass die Genprodukte einen Komplex bilden, der den Transport eines Kations durch die Bakteroid-Membran an einen Redox-Prozess koppelt (Batut et al., 1994). Unterstützt wird diese Annahme zum einen dadurch, dass FixG aufgrund zweier für bakterielle Ferredoxine typischer Cystein-Cluster an Redoxprozessen beteiligt sein könnte (Fischer, 1994). Weiterhin weist FixI Homologien zur katalytischen Untereinheit bakterieller und eukaryotischer ATPasen auf könnte und somit die Funktion einer symbiosespezifischen Kationenpumpe übernehmen (Kahn et al., 1989).

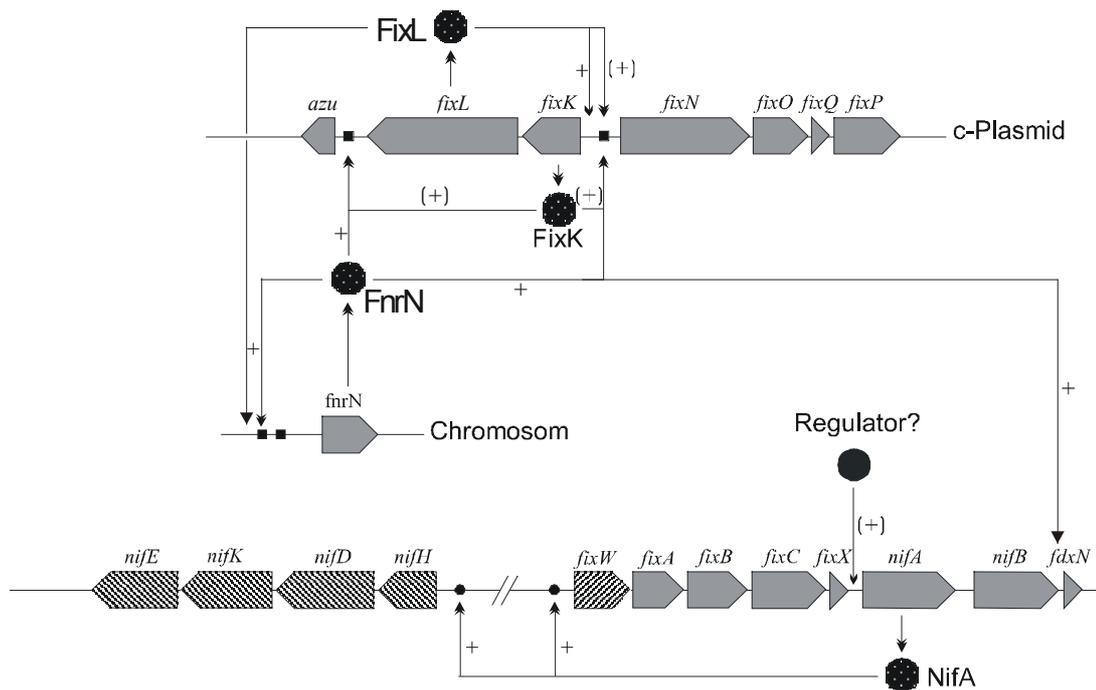


Abb. 2.3: Hypothetische Organisation und Regulation der *nif* und *fix* Gene in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. Die Stickstofffixierungsgene sind in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 auf zwei verschiedenen Plasmiden (pRleVF39c und pRleVF39d) lokalisiert. Das *fnrN*-Gen befindet sich auf dem Chromosom. Die offenen Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Gene an. Schwarze, ausgefüllte Kreise symbolisieren NifA-abhängige Promotoren, während schwarze ausgefüllte Rechtecke die Positionen von Anaeroboxen kennzeichnen. „+“ steht für positiven Einfluss auf die Genexpression und „(+“ steht für einen hypothetischen bzw. geringen Einfluss auf die Genexpression. Die Gene *fixW* und *nifHDKE* (gestreift) sind für den Stamm VF39 bisher nicht nachgewiesen worden, wurden hier jedoch basierend auf Erkenntnissen aus anderen Stämmen vervollständigend zugefügt.

Die *fixL*/*fixJ*-Genprodukte sind in *S. meliloti*, *B. japonicum* und *A. caulinodans* in die Kontrolle der Gene *fixK* (*S.m.*, *B.j.*, *A.c.*) und *nifA* (*S.m.*) involviert. Bei den Proteinen FixL und FixJ handelt es sich um die beiden Komponenten eines Zwei-Komponenten-Regulatorischen Systems, mit dem die Bakterioide den Sauerstoffstatus in den Knöllchen detektieren können. Über die Regulation der Expression der Stickstofffixierungsgene in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 ist bislang wenig bekannt. Da jedoch die Regulation der Expression der Stickstofffixierungsgene in *S. meliloti* von allen Rhizobien am Besten untersucht ist und da die Anordnung der Stickstofffixierungsgene auf den jeweiligen Plasmiden in beiden Organismen sehr ähnlich ist, wird im folgenden die Regulation der Expression der Stickstofffixierungsgene am Beispiel von *Sinorhizobium meliloti* vergleichend mit den bekannten regulatorischen Zusammenhängen in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 dargestellt. In *Sinorhizobium meliloti* sind die Elemente FixL, FixJ, FixK sowie NifA an der Regulation der Expression der *nif*- und *fix*-Gene beteiligt (Abb. 2.5). Diese Elemente sind auch in allen anderen Rhizobien vorhanden. Die Detektion des

Sauerstoffstatus der Umgebung wird in *S. meliloti* durch das Sensorprotein FixL ermöglicht. FixL ist eine membrangebundene sauerstoffregulierte Hemoprotein Kinase/Phosphatase, die durch eine Hämgruppe an der zentralen ihrer drei Domänen den Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung detektieren kann. Unter mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen wird die Autophosphorylierungs-Aktivität der Autophosphorylierungsstelle (wahrscheinlich das Histidin an Position 285; Monson *et al.*, 1993) in der C-terminalen Domäne von FixL stimuliert, wodurch es zu einer Phosphorylierung des FixL-Sensorproteins kommt. Gleichzeitig wird die Phosphatase-Aktivität von FixL-Phosphat gehemmt. FixL ist nun in der Lage die Phosphatgruppe auf die zweite Komponente des Zweikomponenten-Regulationssystem, FixJ durch Phosphorylierung zu übertragen. Ein weiteres Protein, FixT interagiert mit dem FixLJ Zwei-Komponenten Regulatorischen System, indem es vor allem die Bildung von FixL-Phosphat unterbindet (A.-M. Garnerone *et al.*, 1999). FixT könnte daher als eine Art Feintuning des FixLJ-Systems fungieren, oder die Aktivierung des FixLJ-Systems unter falschen Bedingungen (z.B. hohen Nitratkonzentrationen, bei gleichzeitig mikroaeroben Bedingungen) verhindern (A.-M. Garnerone *et al.*, 1999). Bei der Phosphorylierung von FixJ durch FixL kommt ein Aspartat an Position 54 im N-Terminus von FixJ als Ort der Phosphorylierung in Frage (Birck *et al.*, 1999). Durch diese Phosphorylierung am N-Terminus wird ein DNA-Bindemotiv im C-Terminus „freigeschaltet“. In *Sinorhizobium meliloti* wirkt das aktivierte FixJ nun als Transkriptionsaktivator für die Gene *nifA* und *fixK*. Die FixK Proteine gehören zur Klasse I der Crp-Fnr-Proteinfamilie (Batut & Boistard, 1994). Dabei handelt es sich um prokaryotische Transkriptionsregulatoren, die sich oft durch eine Sauerstoffkontrolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen auszeichnen. Neben vier konservierten Cysteinresten im N-Terminus (wahrscheinlich an der Sauerstoffkontrolle beteiligt), zeichnen sich FixK Proteine der Klassen IA und IB vor allen durch ein Helix-Turn-Helix-Motiv in C-Terminalen Ende aus. FixK-Proteine der Klasse IC, zu denen die FixK-Proteine von *Sinorhizobium meliloti* und *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 gehören, weisen diese Cysteinmotive nicht auf und sind somit wahrscheinlich sauerstoffunabhängig. Das für DNA bindende Proteine charakteristische Helix-Turn-Helix-Motiv ist jedoch auch vorhanden. Über das Helix-Turn-Helix-Motiv bindet FixK spezifisch an eine sogenannte Anaerobox, stromaufwärts von Zielgenen. Diese Anaerobox weist ein Konsensus-Motiv 5'-TTGA-C- -GATCAA-G-3' auf und zeigt starke Übereinstimmung mit dem Kern der Bindestelle des *E. coli* Fnr (Fnr box) (Fischer, 1994). Wie in *B. japonicum* und *A. caulinodans* aktiviert FixK in *S. meliloti* die Expression des *fixNOQP*-Operons. Wahrscheinlich kontrollieren die FixK-Proteine in *S. meliloti* und *B. japonicum* auch die Expression des *fixGHIS*-Operons (Kahn *et al.*, 1983). Ein sehr auffälliger Unterschied in der Funktion der FixK-Proteine

ist in der Kontrolle der *nifA*-Expression und somit im Einfluss von FixK auf NifA, dem zentralen Transkriptionsaktivator der *nif*- und einiger *fix*-Gene zu erkennen. In *S. meliloti* hat das FixK-Protein einen negativen Effekt auf die *nifA*-Expression, wohingegen das *A. caulinodans*-FixK die *nifA*-Expression fördert. Im Vergleich dazu ist die FixLJ-K2-Kaskade in *B. japonicum* überhaupt nicht an der Kontrolle der *nifA*-Expression beteiligt, sondern wirkt lediglich fördernd auf die Expression der Operons *fixGHIS* und *fixNOQP* (Abb. 2.5).

Bisher konnte in *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 zwar ein *fixL*-homologes Gen nachgewiesen werden, die zweite Komponente eines Zwei-Komponenten Regulationssystems, *fixJ*, jedoch nicht. Das FixL-Protein in *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 zeigt im Gegensatz zu allen anderen bekannten FixL-Proteinen eine ungewöhnliche Domänenorganisation (Patschkowski *et al.*, 1996, Boesten & Priefer, 2004). Zusätzlich zu konservierten Häm-bindenden Histidinresten und einem weiterem Histidinrest, der als Autophosphorylierungsstelle dient, ist eine weitere Domänenstruktur, die Homologien zur sogenannten Receiver-Domäne von FixJ-Proteinen aufweist, vorhanden (Patschkowski, 1996). Neben weiteren für Response-Regulatoren typischen Aspartat- und Lysin-Resten ist auch ein Aspartat-Rest (Asp-54) konserviert, der im *S. meliloti* FixJ als Phosphorylierungsstelle fungiert. Das für die Funktion des FixJ-Proteins als Transkriptionsaktivator charakteristische DNA-bindende Helix-Turn-Helix-Motiv fehlt jedoch im *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 FixL-Protein (Patschkowski, 1996).

## 2.3 NifA, der zentrale Regulator der Stickstofffixierungsgene in Rhizobien

In allen Rhizobien spielt NifA als zentraler Transkriptionsaktivator eine entscheidende Rolle bei der Expression der Gene, die an der Stickstofffixierung beteiligt sind. NifA gehört zu einer Gruppe bakterieller, regulatorischer Proteine (enhancer binding activator protein), die für die Aktivierung der Genexpression eine RNA-Polymerase mit dem alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^{54}$  benötigen (Abb. 2.4). Zu dieser Gruppe von Transkriptionsaktivatoren gehören neben NifA unter anderem das Regulatorprotein NtrC, welches Gene aktiviert, die für die  $N_2$ -Assimilation benötigt werden und DctC, welches das *dctA*-Gen in *Rhizobium leguminosarum* aktiviert. Alle untersuchten NifA-Proteine zeigen Ähnlichkeiten sowohl in ihrer Länge als auch in ihren Aminosäuresequenzen und können in verschiedene Domänen unterteilt werden, die untereinander verschieden große Sequenzhomologien aufweisen (Fischer, 1994). Die

N-Terminale Domäne variiert in ihrer Länge zwischen 164 und 216 Aminosäuren und zeigt geringe Sequenzhomologien im Vergleich der verschiedenen NifA-Proteine untereinander. Die in der N-terminalen Region von NtrC und DctA vorhandenen Sequenzen, die an einer Interaktion mit einem Sensorprotein beteiligt sein könnten und die Aktivität dieser Transkriptionsaktivatoren durch einen äußeren Stimulus beeinflussen (Huala & Ausubel, 1989), fehlen in NifA. Dieses, sowie die Tatsache, dass die N-terminale Domäne in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* fehlt und dass die N-terminale Domäne deletiert werden kann ohne die regulatorische Aktivität von NifA zu beeinträchtigen (Fischer, 1994), stellt die Frage nach der Bedeutung dieser Domäne in NifA. Zudem haben derartige Deletionen keinen Einfluss auf die für alle NifA-Proteine typischen sauerstoffsensitiven Eigenschaften. Die N-terminale Domäne wird durch einen sogenannten Q-linker von der zentralen Domäne getrennt. Die zentrale Domäne der NifA-Proteine hat eine Länge von etwa 240 Aminosäuren und weist signifikante Sequenzhomologien im Vergleich der verschiedenen NifA-Proteine untereinander und im Vergleich mit anderen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Regulatorproteinen auf. Da alle diese Regulatorproteine die  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase zur Genexpression benötigen, kann davon ausgegangen werden, dass die konservierte zentrale Domäne in der Interaktion mit dieser Polymerase involviert ist (B. Thöny & H. Hennecke, 1989). Eine besonders stark konservierte Region liegt am N-terminalen Ende der zentralen Domäne aller NifA- und NtrC-ähnlichen Proteine. Dabei handelt es sich um eine potentielle Bindestelle für ATP. Vermutlich sind die ATP-Bindung und -Hydrolyse in dieser Region essentielle Schritte bei der Aktivierung  $\sigma^{54}$ -abhängiger Transkriptionsaktivatoren (Oguiza, 1999). Die zentrale Domäne interagiert vermutlich mit dem  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerasekomplex und wird in allen sauerstoffsensitiven NifA-Proteinen durch eine zusätzliche Interdomänen-Verbindungsregion (IDL, interdomain linker) von der C-terminalen Region getrennt (Krey *et al.*, 1992). Durch diese zusätzliche Sequenz unterscheiden sich sämtliche untersuchten rhizobiellen NifA-Proteine von denen in *Klebsiella pneumoniae* und *Azotobacter vinelandii*. Zwei Cystein-Reste im IDL bilden zusammen mit zwei Cystein-Resten im C-terminalen Teil der zentralen Region ein absolut invariantes Motiv der Form Cys-X<sub>11</sub>-Cys-X<sub>19</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-Cys (Fischer, 1994), dessen korrekte Struktur essentiell für die Funktionalität eines sauerstoffsensitiven NifA-Proteins ist (Fischer *et al.*, 1989). Dieses Motiv stellt eine Bindungsstelle für einen Eisen-Schwefel-Kluster dar, über den die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung gemessen werden kann (Krey *et al.*, 1992) und weist die typische Struktur eines Helix-Turn-Helix-Motivs auf. Der Redoxstatus des gebundenen Metall-Ions ist dabei ausschlaggebend.

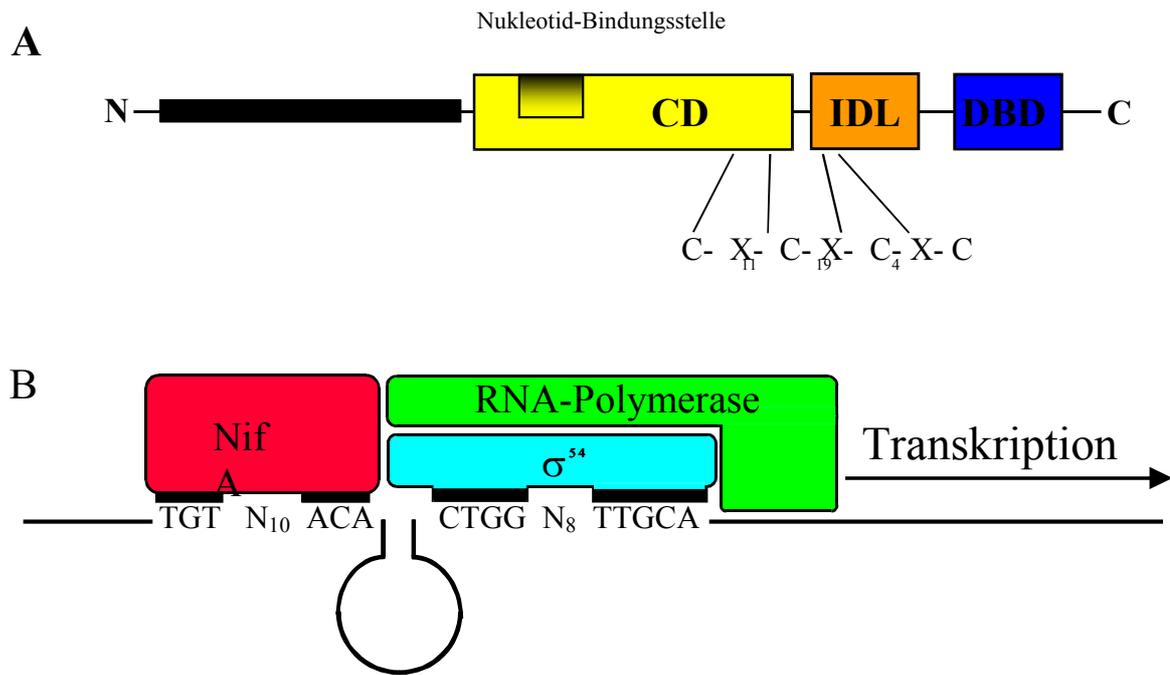


Abb. 2.4: Darstellung der Domänenorganisation von NifA in Rhizobien (A), sowie der Interaktion von NifA mit der DNA und der  $\sigma^{54}$ -abhängigen RNA-Polymerase (B).

Im Teil A dieser Abbildung ist ein rhizobielles NifA-Protein dargestellt. Man erkennt deutlich die einzelnen Domänen. Von links nach rechts: N-terminale Domäne, CD: zentrale Domäne mit eingezeichneter Nukleotidbindungsstelle, IDL: Verbindungssequenz (Inter domaine linker) zwischen zentraler - und C-terminaler Domäne (DBD). Die Abkürzung DBD steht für DNA-bindende Domäne. Am C-terminalen Ende der zentralen Domäne sowie im IDL befindet sich ein stark konserviertes Cystein-Motiv, welches wahrscheinlich an der Koordinierung eines Eisen-Schwefel-Kusters beteiligt ist.

In Teil B ist die Interaktion von NifA mit der DNA, sowie der  $\sigma^{54}$ -abhängigen RNA-Polymerase dargestellt. Dabei sind die stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt gelegene Konsensussequenz (TGT-N<sub>10</sub>-ACA) an die NifA bindet, sowie die Konsensussequenz des RpoN-abhängigen Promotors (CTGG-N<sub>8</sub>-TTGCA) eingezeichnet. Des Weiteren ist die DNA-Schleifenbildung zu erkennen, die durch die Interaktion von NifA mit der DNA und der  $\sigma^{54}$ -abhängigen RNA-Polymerase zustande kommt.

Dabei zeigt die erste Helix dieses DNA-bindenden Motivs eine starke Ähnlichkeit in allen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Aktivatorproteinen, wohingegen die zweite Helix (Erkennungshelix) spezifisch für die jeweiligen NifA-Aktivatorproteine ist. Mit diesem DNA-bindenden Motiv bindet NifA an konservierte NifA-spezifische Bindungsstellen, die in den meisten, aber nicht allen NifA-regulierten Promotoren zu finden sind (Fischer, 1994). Es handelt sich dabei um sogenannte UAS-Regionen (upstream activator sequences), mit der Konsensussequenz 5'-TGT-N<sub>10</sub>-ACA-3', die 80 bis 150 Nukleotide stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle eines NifA-regulierten Gens liegen. Die Funktion der UAS besteht wahrscheinlich darin, die lokale Konzentration von NifA in der Nähe eines -12/-24-Promotors zu erhöhen und/oder das NifA-Protein richtig zu positionieren, um eine Interaktion mit dem  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerasekomplex zu gewährleisten (Buck *et al.*, 1986, 1987; Gussin *et al.*, 1986). Da die UAS-Bindungsstelle und die Bindungsstelle für die  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase relativ weit

voneinander entfernt liegen, muss es bei einer Interaktion von NifA mit der  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase zu einer DNA-Schleifenbildung (DNA-loop formation) kommen (Buck *et al.*, 1987). Alle RpoN ( $\sigma^{54}$ ) abhängigen Promotoren weisen eine charakteristische Struktur auf. Die Konsensus-Sequenz solcher Promotoren ist 5'-TGGCAC-N5-TTGCA/T-3' und liegt in einer Region von -26 und -11 Nukleotiden stromaufwärts des zugehörigen Transkriptionsstartpunktes. Auf Grund der absolut konservierten GG und GC Paare an den Positionen -24 und -12 wird ein solcher Promotor auch als „-24/-12-Promotor“ bezeichnet.

## 2.4 Kontrolle der *nifA*-Expression und –Aktivität

Obwohl die Schlüsselenzyme der Stickstofffixierung, die Dinitrogenase-Reduktase und die Dinitrogenase, in allen stickstofffixierenden Bakterien hoch konserviert vorliegen, wird ihre Expression durch unterschiedliche Umweltreize gesteuert. In freilebenden Bakterien wird z.B. die Expression der *nif*-Gene bei Verfügbarkeit von gebundenem Stickstoff über das *ntr* System unterdrückt. In Rhizobien verläuft die Regulation der Expression der Fixierungsgene jedoch weitgehend unabhängig vom *ntr*-System, sondern wird durch andere Umweltstimuli reguliert. Ein weit verbreiteter Faktor in der Regulation bakterieller Gene ist die Sauerstoffkonzentration der Umgebung. Da dies auch für Rhizobien zutrifft, exprimieren viele Rhizobien die Fixierungsgene nur unter mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen und vermeiden so eine Synthese der sauerstoffsensitiven Enzyme des Nitrogenasekomplexes bei zu hohen Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebung (Bauer *et al.*, 1998). In *S. meliloti*, *B. japonicum* und *A. caulinodans* wird die Sauerstoffkonzentration über das FixLJ-FixK-System detektiert und auf den Level der Genexpression weitergeleitet. Da der zentrale Transkriptionsaktivator NifA in allen Rhizobien die Transkription sämtlicher für die Enzyme des Nitrogenasekomplexes kodierenden Gene reguliert, stellt sich die Frage wodurch die Expression des *nifA*-Gens reguliert wird. Soweit bekannt, unterliegt die Expression von *nifA* in den verschiedenen Spezies unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Der Sauerstoffgehalt spielt dabei in allen Rhizobien eine entscheidende Rolle, nicht nur in der Regulation der Genexpression, sondern auch in der Regulation der Aktivität von NifA. Eine Hypothese besagt, dass NifA unter mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen über die Cystein-Motive in der zentralen- und C-terminalen Region ein Metall-Ion im reduzierten Zustand koordiniert und dadurch die zentrale Domäne und das DNA-bindende Motiv richtig im Protein positioniert (Fischer *et al.*, 1988, Fischer, 1994). NifA liegt somit unter mikroaeroben Bedingungen in seiner aktiven Form vor. Auf der anderen Seite wird unter aeroben

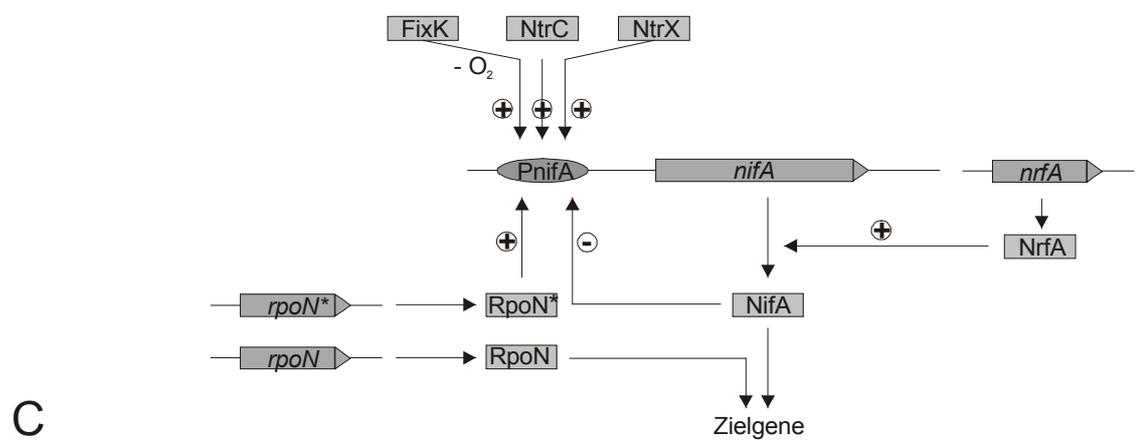
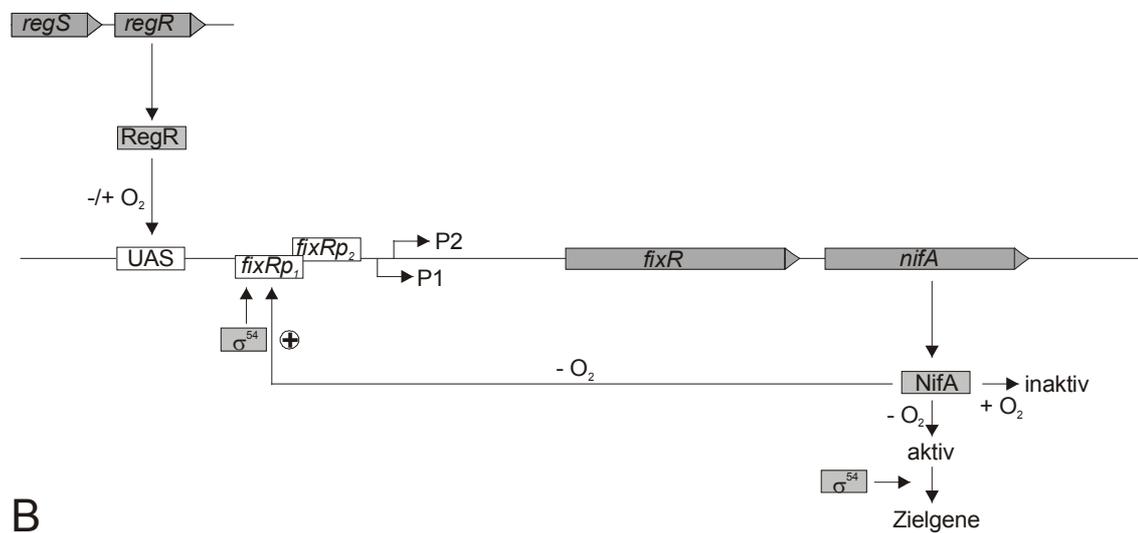
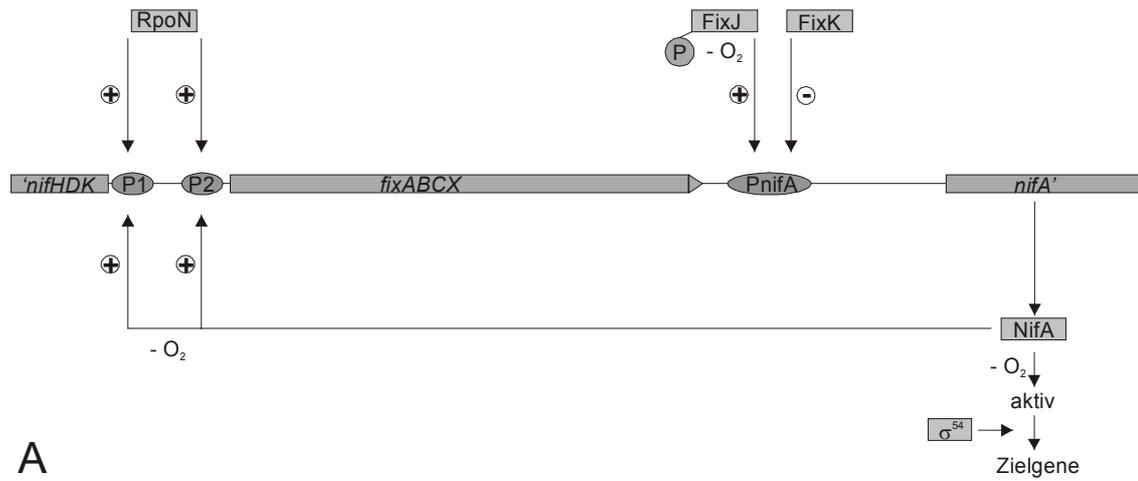


Abb. 2.5: Vergleichende Darstellung der Regulation des *nifA*-Genes in den Bakterien *Sinorhizobium melliloti* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (B) und *Azorhizobium caulinodans* (C).

Bedingungen dieses Metall-Ion oxidiert, was in einer inaktiven Variante von NifA resultiert.

In *S. meliloti* (Abb. 2.5 A) wird die *nifA*-Expression über zwei Wege gesteuert. Primär wird *nifA* über den FixJ-abhängigen Promotor *PnifA* transkribiert (Agron *et al.*, 1992), welcher in der *fixX-nifA*-intergenischen Region lokalisiert ist. FixJ-Phosphat aktiviert dabei diesen Promotor in Abhängigkeit vom Sauerstoffstatus der Zelle. NifA aktiviert nachfolgend im Zusammenspiel mit der  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase NifA-abhängige Promotoren (z.B. P1), darunter den *fixABCX* Promotor (P2) (Kim *et al.*, 1986, Ditta *et al.*, 1987). Der Promotor P1 liegt ca. 2 Kb stromaufwärts von P2 und ist für die Expression der Gene im *nifHDK*-Operon zuständig. Der Promotor P2 liegt ca. 4 Kb stromaufwärts von *PnifA* in gleicher Orientierung. Von ihm geht die Expression des *fixABCX*-Operons aus. Es wurde gezeigt, dass mehr als die Hälfte der *nifA*-Expression in Bakteroiden daher stammt, dass ausgehend vom P2-Promotor das *fixABCX*-Operon bis in das *nifA*-Gen durchgelesen wird (Kim *et al.*, 1986). Zusätzlich zu dieser Autoregulation ist *nifA* Gegenstand einer negativen Kontrolle durch FixK. Das Protein FixT, welches zusammen mit FixK exprimiert wird, greift dabei regulierend in die Phosphorylierungsaktivität des FixL ein (s.o.).

In *Bradyrhizobium japonicum* (Abb. 2.5 B) kommt *nifA* zusammen mit *fixR* in einem Operon vor. Dieses *fixRnifA*-Operon wird von zwei Promotoren, dem *fixRp1* und dem *fixRp2* aus transkribiert, deren jeweilige Transkriptionsstartpunkte nur zwei Nukleotide entfernt voneinander liegen (Barrios *et al.*, 1998). Da es sich bei dem Promotor *fixRp1* um einen -24/-12 Promotor und bei *fixRp2* um einen -10/-35 Promotor handelt, müssen sich die -12 und die -10 Region der beiden Promotoren überlappen. Die -24 und die -35 Region hingegen liegen eine Helixumdrehung voneinander entfernt. NifA wird in *Bradyrhizobium japonicum* sowohl unter aeroben Bedingungen (inaktive Form), als auch unter mikroaeroben Bedingungen synthetisiert, jedoch kommt es unter  $O_2$ -limitierenden Bedingungen zu einer fünffach höheren Induktion der *nifA*-Expression (Fischer, 1994). Die Grundlevel-Expression und ein geringer Teil der anaeroben Expression von NifA stammen von dem Promotor *fixRp2*, der für seine Aktivität eine etwa 68 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt gelegene DNA-Region (UAS) benötigt (Bauer *et al.*, 1998). An diese DNA-Region bindet das regulatorische Protein RegR, welches zur Familie der „Response Regulatoren“ von Zweikomponenten Regulationssystemen gehört. Unter mikroaeroben Bedingungen wird die *nifA*-Expression dann durch die aktive Form des NifA auf das Fünffache gesteigert. NifA bindet dazu an den  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor *fixRp1* und aktiviert seine eigene Expression im Zuge einer Autoregulation (Bauer *et al.*, 1998).

In *Azorhizobium caulinodans* (Abb. 2.5 C) sind drei cis aktive Elemente, eine Anaerobox (Bindestelle für FixK), eine NifA-Box (bindet NifA) und eine  $\sigma^{54}$ -Box (bindet  $\sigma^{54}$ -abhängige RNA-Polymerase) zu finden, die die Aktivität von zwei überlappenden Promotoren regulieren (Loroch *et al.*, 1995). Diese beiden Promotoren (in Abb. 2.5 C zusammen dargestellt als PnifA) interagieren untereinander und regulieren somit gegenseitig ihre Aktivität. Der stromaufwärts gelegene Promotor wird durch den Sauerstoffstatus der Umgebung über das FixLJK-Sensorsystem und über NifA in seiner Aktivität reguliert und reguliert seinerseits positiv den stromabwärts gelegenen Promotor. Dieser steht unter einer Stickstoffkontrolle durch die beiden Zweikomponenten-Regulationssysteme NtrBC und NtrXY und reguliert über NifA negativ den stromaufwärts gelegenen Promotor (Loroch *et al.*, 1995). Zusätzlich zu diesen Kontrollmechanismen über den Sauerstoffgehalt, die Verfügbarkeit von Stickstoff und die negative Autoregulation von NifA (Fischer, 1994), wird die *nifA*-Expression über einen posttranskriptionalen Mechanismus reguliert. Kaminski und Elmerich (1998) zeigten, dass das Protein NrfA sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die Stabilität der *nifA* mRNA und/oder ihre Translation ausübt. Das *nrfA*-Genprodukt weist Ähnlichkeiten zu dem *hfq*-codierten HF-1 Genprodukt in *E. coli* auf, bei dem es sich um ein Protein handelt, welches einzelsträngige RNA bindet (Fischer, 1994).

Der Mechanismus der Regulation des zentralen Regulatorproteins NifA in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 ist bislang unbekannt. In einer vorangegangenen Arbeit (Esser, 2000) konnten zwei *nifA*-Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden. Dies lässt auf zwei Promotoren (P1 und P2) schließen, die an der *nifA*-Expression beteiligt sein könnten. Experimentell konnten die beiden Promotoren nicht isoliert voneinander untersucht werden, ohne die *nifA*-Expression massiv zu beeinträchtigen. Daher musste davon ausgegangen werden, dass diese miteinander interagieren könnten bzw. abhängig voneinander sind. Wie Patschkowski *et al.* (1996) zeigten, verläuft die *nifA*-Expression jedoch unabhängig von FixL, FixK und FnrN. Dies lässt vermuten, dass die Expression des *nifA*-Gens in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 unter der Kontrolle eines noch unbekanntes Regulatorproteins steht. Die Expression von *nifA* ist jedoch in einer *nifA*-Mutante stark, um etwa 75% reduziert (Esser, 2000). Dies lässt darauf schließen, dass NifA an seiner eigenen Expression beteiligt ist. Da jedoch stromaufwärts der potentiellen Promotoren P1 und P2 keinerlei Bindestellen für NifA ausgemacht werden konnten, kann dieser Effekt nicht in Zusammenhang mit diesen Promotoren gebracht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *nifA*-Expression in einer *fnrN*-minus Mutante deutlich um 50-75% reduziert ist (Esser, 2000). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vorangegangenen Messungen.

## 2.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Über die Regulation der Expression des zentrale Transkriptionsaktivator NifA in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 ist im Vergleich zu anderen Rhizobien wie z.B. *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* oder *Azorhizobium caulinodans* immer noch sehr wenig bekannt. Da NifA auch in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 eine zentrale Rolle bei der Regulation der Fixierungsgene spielt, ist die Frage, wie die Transkription von *nifA* reguliert wird, von großer Bedeutung. Dies ist insbesondere deshalb interessant, da NifA im Gegensatz zu den anderen gut untersuchten Rhizobien, in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 anscheinend unabhängig von FixL und FixK exprimiert wird, aber dennoch unter seiner eigenen Kontrolle zu stehen scheint. Es ist daher gut möglich, dass die *nifA*-Expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 durch einen neuen bisher unbekanntes Mechanismus oder vielleicht sogar durch ein unbekanntes Regulatorprotein kontrolliert wird. Ziel dieser Arbeit war es daher den Mechanismus der Regulation der Genexpression von *nifA* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 zu analysieren. Dazu sollten in einem ersten Schritt vor allem die Promotoren P1 und P2 untersucht werden. Mittels gerichteter Deletionen sollte geklärt werden, welche Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts dieser Promotoren für deren Funktionalität essentiell sind. Sollte es möglich sein einen Kernpromotorbereich minimaler Ausdehnung bei gleichzeitig voller Aktivität zu identifizieren, so sollte dieser Gegenstand fortführender Experimente werden. Außerdem sollten im Zuge dieser Arbeit mittels einer Tn5-Mutagenese nach *cis*- und *trans*-aktiven Elementen gesucht werden, die an der Expression und Regulation des *nifA*-Gens beteiligt sein könnten.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Plasmidliste

Plasmid	Genotyp / Eigenschaften	Referenz
pBlueskriptIIKS	lacZ $\alpha$ , Apr <sup>r</sup> , Klonier- und Sequenziervektor	Stratagene
pUC18/19	lacZ $\alpha$ , Apr <sup>r</sup> , Klonier- und Sequenziervektor	Yannish-Perron et al., 1985
pK18/19mob	lacZ $\alpha$ , Kmr <sup>r</sup> , Klonier- und Sequenziervektor, mob	Schäfer et al., 1994
pAS269	Kloniervektor, mob, Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Schlüter, et al., 1992
pBI221.1	pUC19-Derivat, <i>gusA</i> -Kassette	Jefferson, 1987
pUM24	pUC19-Derivat, sacR-sacB, Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Ried&Collmer, 1987
pSL2-25	pK18-mob-Derivat, sacR-sacB, Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup> , mob	
pUC8neo	pUC8-Derivat, 2kb Nm <sup>r</sup> -tragendes <i>HindIII</i> -Fragment aus Tn5	
pUC18HE <i>nifA</i>	pUC18-Derivat, Insert :2,8 Kb <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> -Insert mit <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae nifA</i> , Ap <sup>r</sup>	Schlüter, RWTH Aachen
pUC18HE <i>nifA</i> <sub>Bdown</sub>	pUC18HE <i>nifA</i> -Derivat, neu eingeführte <i>BamHI</i> -Schnittstelle 3bp stromabwärts des <i>fixX</i> -TGA, Ap <sup>r</sup>	Esser, 2000
pUC18HE <i>nifA</i> <sub>Bup</sub>	pUC18HE <i>nifA</i> -Derivat, neu eingeführte <i>BamHI</i> -Schnittstelle 35bp stromabwärts des <i>fixX</i> -TGA, Ap <sup>r</sup>	Esser, 2000
pJP2	pTR102-Derivat, mob, Tc <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , <i>parDE</i> , <i>parCBA</i>	Prell, 2002
pSUP 1021	Derivat von pACYC184 und pSUP102, TN5 (Nm <sup>r</sup> bzw. Km <sup>r</sup> ), mob, Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Simon et al.
Topo-Vektor	Kloniervektor, Topoisomerase, Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Invitrogen
pBlue <i>Alw44I/SalI nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>Alw44I/SalI</i> -Fragmentes aus pUC18HE <i>nifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>Bsp119I/SalI nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>Bsp119I/SalI</i> - Fragmentes aus pUC18HE <i>nifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>Bsp143I/SalI nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>Bsp143I/SalI</i> - Fragmentes aus pUC18HE <i>nifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>BamHI/HindIII nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>BamHI/HindIII</i> - Fragmentes aus pUC18HE <i>nifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>XbaI/SmaI nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/SmaI</i> - Fragmentes aus pUC18HE <i>nifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung Plasmide		
pBlue <i>BglII/HindIII nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>BglII/HindIII</i> - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>BglII/XhoI nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>BglII/XhoI</i> - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>BamHI/SmaI nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>BamHI/SmaI</i> - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>BamHI/SaI nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>BamHI/SaI</i> - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> del. ( <i>BamHI/SmaI</i> )	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , Deletion des <i>BamHI/SmaI</i> -Bereiches, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR1	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines PCR- Fragmentes, Primer: <i>XbaI</i> <sub>down</sub> <i>HindIII</i> <sub>up</sub> , Template: pUC18H <i>EnifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR3	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines PCR- Fragmentes, Primer: <i>XbaI</i> <sub>down</sub> <i>HindIII</i> <sub>up</sub> , Template: pUC18H <i>EnifA</i> <sub>Bup</sub> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR4	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines PCR- Fragmentes, Primer: <i>XbaI</i> <sub>down</sub> <i>HindIII</i> <sub>up</sub> , Template: pUC18H <i>EnifA</i> <sub>Bdown</sub> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR5	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines PCR- Fragmentes, Primer: <i>XbaI</i> <sub>down</sub> M13 Universe, Template: pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR6	pBlue PCR4-Derivat, Auffüllung der in der Schnittstelle <i>BamHI</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR7	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines PCR- Fragmentes, Primer: <i>XbaI</i> <sub>down</sub> M13 Universe, Template: pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> <sub>Bdown</sub> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR8	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines PCR- Fragmentes, Primer: <i>XbaI</i> <sub>down</sub> M13 Universe, Template: pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> <sub>Bup</sub> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue PCR9	pBlue PCR8-Derivat, Auffüllung der in der Schnittstelle <i>BamHI</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> <sub>Bup</sub>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>BamHI/HindIII</i> - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> <sub>Bup</sub> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> <sub>Bdo</sub>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>BamHI/HindIII</i> - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> <sub>Bdown</sub> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue 4h	Tn5-Transposonmutante, zur Sequenzierung	diese Arbeit

Fortsetzung Plasmide		
pBlue TraReg	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines PCR-Fragmentes, Primer: Rep XbaI, Rep HindIII, Template: VF39 Wt Gesamt-DNA, Ap <sup>r</sup> , Gen: Transkriptionsregulator	diese Arbeit
pBlueTraReg Neol	pBlue TraReg-Derivat, Insertion einer Nm <sup>r</sup> -Kassette aus pUC8 neo in die SmaI-Schnittstelle mit Orientierung Richtung Oxidoreduktasegen, Ap <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlueTraReg Neoll	pBlue TraReg-Derivat, Insertion einer Nm <sup>r</sup> -Kassette aus pUC8 neo in die SmaI-Schnittstelle mit Orientierung Richtung ABC Transporter, Ap <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlueTraReg Del. <i>Kpn2I</i>	pBlue TraReg-Derivat, Deletion der zentralen Region unter Verwendung der Endonuklease <i>Kpn2I</i> und anschließender Religation	diese Arbeit
Topo nifH-fixA	Topo-Derivat, Insertion eines PCR-Fragmentes, Primer: fixA, nifH, Template: VF39 Wt Gesamt-DNA, Gen: <i>fixA</i> , <i>nifH</i> -Promotorregion, IS3, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue fixA	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragmentes (567bp) aus Topo nifH-fixA	diese Arbeit
pBlue nifH	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragmentes (423bp) aus Topo nifH-fixA	diese Arbeit
pBlueXbaI/HindIII <i>nifA</i> Deletionsmutanten 1–60	pBlueXbaI/HindIII <i>nifA</i> -Derivate, Ringöffnung an der <i>Bg</i> II-Schnittstelle, Nukleasebehandlung Bal31, Schneiden mit <i>Hind</i> III, Auffüllen der Restriktionsenden, Religation, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>Eco</i> RI/HindIII <i>nifA</i>	pBlueskript KSII-Derivat, Insertion eines <i>Eco</i> RI/HindIII - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBlue <i>Eco</i> RI/HindIII <i>nifA</i> Deletionsmutanten 1-15	pBlueXbaI/HindIII <i>nifA</i> -Derivate, Ringöffnung an der <i>Nhe</i> I-Schnittstelle, Nukleasebehandlung Bal31, Schneiden mit <i>Eco</i> RI, Auffüllen der Restriktionsenden, Religation, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP XbaI/HindIII <i>nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines XbaI/HindIII-Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP XhoI/HindIII <i>nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines XhoI/HindIII-Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP XbaI/XhoI <i>nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines XbaI/XhoI- Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP XbaI/BgII <i>nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines XbaI/BgII( <i>Bam</i> HI) - Fragmentes aus pUC18H <i>EnifA nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP XbaI/SalI <i>nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines XbaI/SalI( <i>Xho</i> I) - Fragmentes aus pBlue XbaI/SalI <i>nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung Plasmide		
pJP <i>SalI/HindIII nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>SalI (XhoI)/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue <i>SalI/HindIII nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>Alw44I/SalI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/XhoI</i> -Fragmentes aus pBlue <i>Alw44I/SalI nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>Bsp119I/SalI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/XhoI</i> -Fragmentes aus pBlue <i>XbaI/SalI nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>Bsp143I/SalI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/XhoI</i> -Fragmentes aus pBlue <i>Bsp143I/SalI nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>BamHI/HindIII nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>BamHI/HindIII nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>SmaI/HindIII nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>SmaI/HindIII nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>XbaI/SmaI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>XbaI/SmaI nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>BglII/HindIII nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>BglII/HindIII nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>BglII/XhoI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>BglII/XhoI nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>BamHI/SmaI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>BamHI/SmaI nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>BamHI/SalI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>BamHI/SalI nifA</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>XbaI/BamHI nifA</i>	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pUC18HEnifA <sub>Bdown</sub> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>XbaI/HindIII nifA</i> del.	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> -Fragmentes aus pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> del., Deletion des <i>BamHI/SmaI</i> -Bereiches, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>XbaI/HindIII nifA</i> Deletionsmutanten (24–55)	pJP2-Derivat, Insertion je eines <i>XbaI/KpnI</i> -Fragmentes aus pBlue <i>XbaI/HindIII nifA</i> Deletionsmutanten 24–55, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP <i>EcoRI/HindIII nifA</i> Deletionsmutanten 1-15	pJP2-Derivat, Insertion je eines <i>XbaI/BglII(BamHI)</i> - Fragmentes aus <i>EcoRI/HindIII nifA</i> Deletionsmutanten 24–55, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP PCR1	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR1, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP PCR3	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR3, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung Plasmide		
pJP PCR4	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR4, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP PCR5	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR5, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP PCR6	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR6, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP PCR7	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR7, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP PCR8	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR8, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP PCR9	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR9, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>SmaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pUC8neo, Auffüllen der Restriktionsenden, Insertion in <i>KpnI</i> , mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1	pJP Neo-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR1, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR5	pJP Neo-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> - Fragmentes aus pBlue PCR5, mob, <i>uidA</i> , Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo <i>Bam</i> HI down	pJP Neo-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/BamHI</i> - Fragmentes aus pUC18HE <i>nifA</i> B <sub>down</sub> , <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo <i>Bam</i> HI up	pJP Neo-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/BamHI</i> - Fragmentes aus pUC18HE <i>nifA</i> B <sub>down</sub> , <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1-2e	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1-2H	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1-4H	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1-4L	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1-5m	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1-1E	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , mob, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung Plasmide		
pJP Neo PCR1-5A	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup>/Km<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pJP Neo PCR1-4H	pJP PCR1-Derivat, Tn5-Mutante, <i>uidA</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup>/Km<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pJP nifH	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> –Fragmentes aus pBlue nifH, <i>uidA</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pJP fixA	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> –Fragmentes aus pBlue nifA, <i>uidA</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pAS TraReg Neol	pAS269-Derivat, Insertion eines <i>Ecl136II(EcoRI</i> f.i.) <i>HindIII</i> – Fragmentes aus pBlue TraReg Neol, <i>uidA</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup>/Km<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pAS TraReg Neoll	pAS269-Derivat, Insertion eines <i>Ecl136II(EcoRI</i> f.i.) <i>HindIII</i> – Fragmentes aus pBlue TraReg Neoll, <i>uidA</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup>/Km<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pAS270	pAS269-Derivat, Insertion eines <i>EcoRI/HindIII</i> – Fragmentes aus pUC19 (Polyklonierstelle), <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pSL2-25TraRegDel <i>Kpn2I</i>	pSL2-25-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/HindIII</i> – Fragmentes aus pBlue TraRegDel. <i>Kpn2I</i> , <i>SacR-SacB</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup>/Km<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pAS TraRegDel	pAS270-Derivat, Insertion eines <i>SdaI/SacI</i> – Fragmentes aus pSL2-25 TraRegDel <i>Kpn2I</i> , <i>SacR-SacB</i> , <i>mob</i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
Topo <i>nifA</i> complete	Topo-Derivat, Insertion eines 4,2Kb <i>fixA-fixB-fixC-fixX-nifA</i> – PCR Produktes, Primer: <i>nifA</i> complete ( <i>XbaI</i> ), <i>fixA</i> complete ( <i>BamHI</i> ), Template DNA: VF39 Wt, <i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pJP <i>nifA</i> complete	pJP2-Derivat, Insertion eines <i>XbaI/BamHI</i> – Fragmentes aus Topo <i>nifA</i> complete	diese Arbeit

### 3.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp / Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
Dh5 $\alpha$	<i>SupE44<math>\Delta</math></i> , <i>lacU169</i> , ( $\theta$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>hsdR17</i> , <i>ercA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
S17-1	<i>E.coli</i> 294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)], <i>pro</i> , <i>res.</i> , <i>recA</i> , <i>Tp<sup>r</sup></i> , <i>Ap<sup>s</sup></i> , <i>Kms</i> , <i>Tc<sup>s</sup></i> , <i>Spc<sup>s</sup></i>	Simon <i>et al.</i> , 1983

Fortsetzung Bakterienstämme		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39		
VF39	Wildtyp, Sm <sup>r</sup>	Priefer, 1989
VF39-NE2	VF39-Derivat Insertion einer Nm <sup>r</sup> -Kassette in einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle 3bp stromabwärts des <i>fixX</i> -TGA, Orientierung: <i>fixA-neo-nptII-nifA</i> , Sm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	Esser, 2000
VF39-NE9	VF39-Derivat Insertion einer Nm <sup>r</sup> -Kassette in einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle 3bp stromabwärts des <i>fixX</i> -TGA, Orientierung: <i>fixA-nptII-neo-nifA</i> , Sm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	Esser, 2000
VF39 <i>fixL</i> <sub>1</sub>	VF39-Derivat, Deletion der <i>fixL</i> <sub>1</sub> - <i>fixK</i> <sub>1</sub> -Region, Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Boesten
VF39 <i>fixL</i> <sub>2</sub>	VF39-Derivat, Deletion der <i>fixL</i> <sub>2</sub> - <i>fixK</i> <sub>2</sub> -Region, Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Boesten
VF39 <i>fixL</i> <sub>1/2</sub>	VF39 <i>fixL</i> <sub>1</sub> -Derivat, Deletion der <i>fixL</i> <sub>1</sub> - <i>fixK</i> <sub>1</sub> -Region und <i>fixL</i> <sub>2</sub> - <i>fixK</i> <sub>2</sub> -Region, Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Boesten
VF39 UBP <i>nifA</i>	VF39-Derivat, <i>nifA</i> ::Gm, Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Priefer, 1996
VF39 <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Xho</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Xho</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Sal</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Sal</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Alw</i> 44I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Alw</i> 44I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Bsp</i> 119I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Bsp</i> 119I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Bsp</i> 143I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Bsp</i> 143I/ <i>Sal</i> I <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Sma</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Sma</i> I/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterplasmids pJP <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39		
VF39 <i>XbaI/SmaI nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP <i>XbaI/SmaI nifA, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 <i>BglII/XhoI nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP <i>BglII/XhoI nifA, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 <i>Alw44I/SalI nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP <i>BglII/HindIII nifA, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 <i>BamHI/SmaI nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP <i>BamHI/SmaI nifA, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 <i>BamHI/SalI nifA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP <i>BamHI/SalI nifA, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 <i>XbaI/HindIII nifA</i> del.	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP <i>XbaI/HindIII nifA del, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR1	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR1, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR3	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR3, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR4	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR4, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR5	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR5, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR6	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR6, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR7	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR7, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR8	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR8, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 PCR9	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP PCR9, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 Neo PCR1	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP Neo PCR1, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 Neo PCR5	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP Neo PCR5, <i>uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 Neo <i>BamHI<sub>down</sub></i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP Neo <i>BamHI<sub>down</sub>, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 Neo <i>BamHI<sub>up</sub></i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporterengenplasmids pJP Neo <i>BamHI<sub>up</sub>, uidA, Sm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
VF39 K1a1	VF39-Derivat, Insertion einer Nm <sup>r</sup> -Kassette in einer <i>SmaI</i> -Schnittstelle (Transkriptionsregulator), Orientierung: ABC Transp.-nptII-neo-Oxidoreduktase, Sm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39		
VF39 K6c1	VF39-Derivat, Insertion einer Nm <sup>r</sup> -Kassette in einer <i>Sma</i> I-Schnittstelle (Transkriptionsregulator), Orientierung: ABC Transp.-neo-nptII-Oxidoreduktase, Sm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K1a1 PCR1	VF39 K1a1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP PCR1, <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K1a1 <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i>	VF39 K1a1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K6c1 PCR1	VF39 K6c1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP PCR1, <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K6c1 <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i>	VF39 K6c1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 TraRegDel	VF39-Derivat, Deletion des zentralen <i>Kpn</i> 2I-Fragmentes im Transkriptionsregulator, Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 TraRegDel PCR1	VF39 TraRegDel-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP PCR1, <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 TraRegDel <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i>	VF39 TraRegDel-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II <i>nifA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>fixA</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>fixA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>nifH</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>nifH</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K1a1 <i>fixA</i>	VF39 K1a1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>fixA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K1a1 <i>nifH</i>	VF39 K1a1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>fixA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K6c1 <i>fixA</i>	VF39 K6c1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>fixA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 K6c1 <i>nifH</i>	VF39 K6c1-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>nifH</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 UBP <i>nifA</i> <i>fixA</i>	VF39 UBP <i>nifA</i> Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>fixA</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 UBP <i>nifA</i> <i>nifH</i>	VF39-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP <i>nifH</i> , <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>fixL</i> <sub>1</sub> PCR1	VF39 <i>fixL</i> <sub>1</sub> -Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP PCR1, <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>fixL</i> <sub>2</sub> PCR1	VF39 <i>fixL</i> <sub>2</sub> -Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP PCR1, <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 <i>fixL</i> <sub>1/2</sub> PCR1	VF39 <i>fixL</i> <sub>1/2</sub> -Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP PCR1, <i>uidA</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39		
VF39 fixL <sub>1</sub> XbaI/BglII nifA	VF39 fixL <sub>1</sub> -Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP XbaI/BglII nifA, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 fixL <sub>2</sub> XbaI/BglII nifA	VF39 fixL <sub>1</sub> -Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP XbaI/BglII nifA, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39fixL <sub>1/2</sub> XbaI/BglII nifA	VF39 fixL <sub>1</sub> -Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP XbaI/BglII nifA, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39 nifA complete	VF39-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP nifA complete, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39-NE2 nifA complete	VF39-NE2-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP nifA complete, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39-NE2 fixA	VF39-NE2-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP fixA, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39-NE9 nifA complete	VF39-NE9-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP nifA complete, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit
VF39-NE9 fixA	VF39-NE9-Derivat, Transfer des Reporter-genplasmids pJP fixA, uidA, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	diese Arbeit

### 3.1.3 Nährmedien

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

Bacto Tryptone	10,0 g/l
Yeast Extract	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Glucose	1,0 g/l
pH 7,2	

#### 3.1.3.2 TY-Medium (Medium für *R. leguminosarum* bv. *viciae*, Beringer 1974)

Bacto Tryptone	5,0 g/l
Yeast Extract	3,0 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,7 g/l
pH 7,5	

### 3.1.3.3 PA-Medium (Penassay Broth)

17,5 g Antibiotic Medium No.3 (Oxoid) pro Liter einwiegen.

Nach Herstellerangaben setzt sich dieses Medium wie folgt zusammen:

Pepton	5,0 g/l
Yeast Extract	1,5 g/l
Lab-Lemco powder	1,5 g/l
Glucose	1,0 g/l
NaCl	3,5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,68 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,32 g/l
pH 7,0	

### 3.1.3.4 Pflanzennodulationsmedium (Rolfe *et al.*, 1980)

Stammlösung A	294,0 g/l	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
Stammlösung B	136,0 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Stammlösung B <sub>1</sub>	58,0 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Stammlösung C	6,7 g/l	Fe <sub>3</sub> -Citrat X 3H <sub>2</sub> O
Stammlösung D	123,0 g/l	MgSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O
87,0 g/l		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,333 g/l		MnSO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O
0,25 g/l		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,288 g/l		ZnSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O
0,10 g/l		CuSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O
0,056 g/l		CoSO <sub>4</sub>
0,048 g/l		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>

Die Stammlösungen A, B, B<sub>1</sub>, C, und D wurden mit Milliporewasser angesetzt und getrennt autoklaviert. Zur Herstellung des Nodulationsmediums wurde 1l Milliporewasser autoklaviert und anschließend mit je 0,5 ml der Lösungen A, B, C, und D sowie 1 ml der Lösung B<sub>1</sub> versetzt.

## 3.1.4 Zusätze zu Nährmedien

### 3.1.4.1 Festmedien

Agar

Zur Herstellung fester Medien wurden 14 g/l Agar zugesetzt.

Sucrose

Zur Herstellung sucrosehaltiger Medien wurden 200 g/l Sucrose zugesetzt.

### 3.1.4.2 Antibiotikazusätze zu den Nährmedien

Antibiotikum	Abkürzung	Endkonzentration für <i>E.Coli</i> (µg/ml)	Endkonzentration für Rhizobien (µg/ml)
Ampicillin	Ap	125	-
Chloramphenicol	Cm	50	-
Gentamycin	Gm	10	25
Kanamycin	Km	25	-
Neomycin	Nm	-	90
Streptomycin	Sm	300	600
Tetracyclin	Tc	10	10

### 3.1.4.3 Weitere Zusätze

Substanz	Stammlösung
X-Gal	20 mg/ml in N-N-Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C; 2 ml/l Medium einsetzen
X-Gluc	20 mg/ml in Wasser, Lagerung bei -20°C; 1 ml/l Medium zugeben

## 3.1.5 Verwendete Primer

### 3.1.5.1 *fixA*

5' -GCG TAT CTG CGC TGG ATC CGG CAC TTG - 3'

$T_m$ : 71,0°C

Primer zur Amplifikation der *fixA-nifH* Promotorregion (VF39 Wt), zusätzlich eingeführte *Bam*HI-Schnittstelle zur Klonierung, Bindestelle im *fixA*

### 3.1.5.2 *nifH*

5' -GTT AAA TGC GCG ACC GGA TCC TCC TTC TC- 3'

$T_m$ : 69,5°C

Primer zur Amplifikation der *fixA-nifH* Promotorregion (VF39 Wt), zusätzlich eingeführte *Bam*HI-Schnittstelle zur Klonierung, Bindestelle im *nifH*

### 3.1.5.3 Rep XbaI

5' –CGT GGT GTT CTA GAC CGT AGC CGC- 3'

$T_m$ : 67,8°C

Primer zur Amplifikation des Transkriptionsregulators (VF39 Wt), zusätzlich eingeführte *Bam*HI-Schnittstelle zur Klonierung des PCR-Produktes

### 3.1.5.4 Rep HindIII

5' –GCA GCG CAA GCT TGC GCA GGC C- 3'

$T_m$ : 69,8°C

Primer zur Amplifikation des Transkriptionsregulators (VF39 Wt), zusätzlich eingeführte *Hind*III-Schnittstelle zur Klonierung des PCR-Produktes

### 3.1.5.5 nifA complete BamHI

5' –CTT CTG GCA AGG ATC CTG TTC ACG CC- 3'

Primer zur Amplifikation der *fixA-nifA* Region (VF39 Wt), zusätzlich eingeführte *Bam*HI-Schnittstelle zur Klonierung, Bindestelle stromaufwärts des *fixA*-Promotors, zusätzlich eingeführte *Bam*HI-Schnittstelle zur Klonierung des PCR-Produktes

### 3.1.5.6 nifA complete XbaI

5' –GGA CGT TGT CTA GAG GAA AAG AAG AGA TAA GC- 3'

Primer zur Amplifikation der *fixA-nifA* Region (VF39 Wt), zusätzlich eingeführte *Bam*HI-Schnittstelle zur Klonierung, Bindestelle im Bereich der *Xba*I-Schnittstelle im *nifA*, *Xba*I-Schnittstelle zur Klonierung des PCR-Produktes

### 3.1.5.7 M13 universe

5' –TAA AAC GAC GGC CAG T- 3'

$T_m$ : 49,2°C

Primer zur Sequenzierung aus pBlueskript KSII und pUC-Vektoren, wurde zusätzlich genutzt um die Insertgröße in pBlueskript-Derivaten direkt aus den Bakterienkolonien zu bestimmen

### 3.1.5.8 M13 reverse

5' –GGA AAC AGC TAT GAC CAT G- 3'

$T_m$ : 54,5°C

Primer zur Sequenzierung aus pBlueskript KSII und pUC-Vektoren, wurde zusätzlich genutzt um die Insertgröße in pBlueskript-Derivaten direkt aus den Bakterienkolonien zu bestimmen

### 3.1.6 Enzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme		
<i>Acc65I</i>	G↓GTACC	MBI-Fermentas
<i>Alw44I</i>	G↓TGCAC	MBI-Fermentas
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	MBI-Fermentas
<i>BglII</i>	A↓GATCT	MBI-Fermentas
<i>Bsp119I</i>	TT↓CGAA	MBI-Fermentas
<i>Bsp143I</i>	RGCGC↓Y	MBI-Fermentas
<i>Ecl136II</i>	GAG↓CTC	MBI-Fermentas
<i>Eco47III</i>	AGC↓GCT	MBI-Fermentas
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	MBI-Fermentas
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC	MBI-Fermentas
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	MBI-Fermentas
<i>KpnI</i>	GGTAC↓C	MBI-Fermentas
<i>NdeI</i>	CA↓TATG	MBI-Fermentas
<i>NheI</i>	G↓CTAGC	MBI-Fermentas
<i>NotI</i>	GC↓GGCCGC	MBI-Fermentas
<i>PaeI</i>	GCATG↓C	MBI-Fermentas
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	MBI-Fermentas
<i>SacI</i>	GAGCT↓C	MBI-Fermentas
<i>SalI</i>	G↓TCGAC	MBI-Fermentas
<i>SdaI</i>	CCTGCA↓GG	MBI-Fermentas
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	MBI-Fermentas
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA	MBI-Fermentas
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	MBI-Fermentas
T4 DNA Polymerase	-	MBI-Fermentas
Thermus aquaticus DNA polymerase	-	MBI-Fermentas
Klenow Fragment	-	MBI-Fermentas
T4 DNA Ligase	-	MBI-Fermentas
CIAP	-	MBI-Fermentas
Bal31 Nuklease	-	MBI-Fermentas
RNase A	-	MBI-Fermentas
Proteinase K	-	MBI-Fermentas
Lysozym	-	MBI-Fermentas

Puffer für die entsprechenden Restriktionsenzyme bei Einzel- und Mehrfachrestriktionen laut Angaben [www.fermentas.com/support/doubledigest](http://www.fermentas.com/support/doubledigest).

### 3.1.7 Puffer und Lösungen

#### 3.1.7.1 DNA- und Enzypuffer

##### TE-Puffer

Tris-HCl	10,0 mM
EDTA	1,0 mM
pH 7,5	

##### 5 x Ligationspuffer

Tris-HCl	330,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	25,0 mM
Dithiothreitol	25,0 mM
ATP	5,0 mM
pH 7,6	

##### 10 x TA-Restriktionspuffer

###### Komponente A:

Tris	4,0 g
Kaliumacetat	6,5 g
Magnesiumacetat	2,1 g

In wenig Wasser lösen und mit Eisessig auf pH 7,9 einstellen, dann auf 80,0 ml auffüllen und autoklavieren. Lagerung bei 4°C.

###### Komponente B:

Dithiothreitol	50,0 mM (7,7 g/ml)
----------------	--------------------

Dithiothreitol muss steril eingewogen und in sterilem A. bidest. resuspendiert werden, da die Lösung nicht autoklavierbar ist. Lagerung bei -20°C.

###### Komponente C:

BSA	10,0 mg/ml
-----	------------

Lagerung bei -20°C.

Für 1ml 10 x TA-Restriktionspuffer werden benötigt:

Komponente A	0,8 ml
Komponente B	0,1 ml
Komponente C	0,1 ml

Lagerung bei 4°C. Dieser Puffer ist für alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme geeignet.

**Nukleotidmix (dNTP-Mix)**

Stammlösung der Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 mM

Gebrauchslösung (Mix) 1,0  $\mu$ M: je 2,0  $\mu$ l dNTPs dann auf 20,0  $\mu$ l mit sterilem A. bidest. auffüllen.

**3.1.7.2 Elektrophoreselösungen und -puffer****1 x TA-Puffer (Laufpuffer)**

Tris-HCl	40,0 mM
Na-Acetat	10,0 mM
EDTA	1,0 mM
pH 7,8 mit Eisessig einstellen	

**1 x TB Puffer (Laufpuffer)**

Tris-HCl	90,0 mM
Borsäure	90,0 mM
EDTA	2,5 mM

**SRL-Lösung (Lyselösung für Eckhardt-Gele)**

Sucrose	25% (in 1 x TB-Puffer lösen und 10 min kochen)
Ficoll	10%
RNase A	30-40 $\mu$ l (10 mg/ml)
Lysozym	1,0 mg/ml (jeweils erst kurz vor Gebrauch zugeben)

**Auftragemix (nach Manniatis *et al.*, 1982)**

Glyzerin	50% (v/v)
EDTA	50,0 mM
Tris	100,0 mM
Bromphenolblau	2,0 mg/ml
pH 8,0	

**Ethidiumbromid-Färbelösung**

Ethidiumbromid	1,0 mg/l
----------------	----------

**3.1.7.3 Lösungen und Puffer für Plasmid-DNA-Isolierungen**

Hot Boiling Prep (Holmes & Quigley, 1981)

**Stet Puffer**

Saccharose	8,0 %
------------	-------

Triton X 100	5,0 %
EDTA	50,0 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	50,0 mM
Lysozym	1,0 mg/ml
RNaseA	10,0 µl (10,0 mg/ml)

### 3.1.7.4 Lösungen und Puffer für Gesamt-DNA-Isolierungen (CTAB)

#### TE-Puffer

Tris	10,0 mM
EDTA	1,0 mM
pH 8,0	

#### SDS-Lösung (10%)

10 g SDS in 100 ml A. bidest lösen und autoklavieren.

#### Proteinase K-Lösung:

Proteinase K 20 mg/ml; Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$

#### CTAB/NaCl-Lösung

10% (w/v) Cethyltrimethylammoniumbromid (CTAB) in 0,7 M NaCl-Lösung  
2,05 g NaCl in 35 ml A. bidest lösen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen 5,0 g CTAB unter Rühren zugeben und eine halbe Stunde bei  $65^{\circ}\text{C}$  lösen lassen, mit sterilem A. bidest auf 50 ml auffüllen.

CIA: Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 49 : 1 ansetzen.

Phenol/Chloroform 1 : 1

### 3.1.7.5 Vakuumblootting und nicht radioaktive Hybridisierungen

#### Depurinierungslösung

HCl	0,25 M
-----	--------

#### Denaturierungslösung

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M (erst kurz vor Gebrauch einwiegen)

#### Neutralisierungslösung

NaCl	2,0 M
Tris-HCl	1,0 M
pH 8,0	

## 20 x SSC

NaCl	3,0 M
Na <sub>3</sub> -Citrat	0,3 M
pH 7,4	

## 2 x Waschpuffer

20 x SSC	10,0 ml
SDS (10%)	1,0 ml
auf 100 ml mit A. dest auffüllen.	

## 0,1 x Waschpuffer

20 x SSC	0,5 ml
SDS (10%)	1,0 ml
auf 100 ml mit A. dest. auffüllen	

## Waschpuffer

0,3% (w/v) Tween 20 in Puffer 1  
Diesen Puffer erst unmittelbar vor Gebrauch ansetzen.

## Puffer 1

Maleinsäure	0,10 M
NaCl	0,15 M
pH 7,5	mit NaOH (Plätzchen) einstellen

## Puffer 2

1% (w/v) Blocking Reagenz (Casein) in Puffer 1 durch Erwärmen lösen

## Puffer 3

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	50,0 mM
pH 9,5	

## Puffer 4

Tris-HCl	10,0 mM
EDTA	1,0 mM

## Hybridisierungslösung

SSC	5,0 x
Blocking-Reagenz (Casein)	1,00 % (w/v)
N-Laurosylysarkosin (10%)	0,10 % (w/v)
SDS (10%)	0,02 % (w/v)

Färbelösung (Lösung ist hochgiftig und lichtempfindlich)

NBT	45,0 µl (Nitroblau-Tetrazolium-Lösung)
BCIP	35,0 µl (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-Toluidin-salz; X-Phosphat)
Puffer 3	10,0 ml

### 3.1.7.6 Lösungen zur Sondenentfernung (Stripping)

NaOH	0,5M
SDS	1,0M

### 3.1.7.7 Lösungen und Puffer für $\beta$ -Glucuronidase-Tests

Histochemische Untersuchungen an Wurzelknöllchen

GUS-Puffer	pH 7,0
Tris-HCl	100,0 mM
NaCl	50,0 mM
K-Ferricyanid	2,0 mM
K-Ferrocyanid	2,0 mM
X-Gluc	2,0 mM

$\beta$ -Glucuronidase Aktivitätsmessung (Miller, 1972)

Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,33 M (63 g/l)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1,0 M (138 g/l)

183 ml 0,33 M Dinatriumphosphat-Lösung und 39 ml 1,0 M Natriumdihydrogenphosphat-Lösung mischen und mit A. bidest auf 1000 ml auffüllen.

GUS-Extraktionspuffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.33 M (45 ml)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1,00 M (10 ml)
N-Lauroylsarkosin	8,0 ml
Triton X-100	8,0 ml
KCl	10,0 mM (2,5 ml)
$\text{MgSO}_4$	1,0 mM (250 µl)

mit sterilem A. bidest. auf 400 ml auffüllen.

PNPG-Stammlösung

Die Konzentration der Lösung beträgt 4 mg/ml. PNPG in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) lösen.

Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Chlorid-Methode)

CaCl <sub>2</sub>	100mM
-------------------	-------

## Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen (Rhubidium-Chlorid-Methode)

TfBI	Kaliumacetat	30mM
	MnCl <sub>2</sub>	50mM
	RbCl	100mM
	CaCl <sub>2</sub>	10mM
	Glycerin	15% (v/v)
		pH = 5,8
TfBII	RbCl	10mM
	CaCl <sub>2</sub>	75mM
	MOPS	10mM
	Glycerin	15% (v/v)
		pH = 6,8

### 3.1.8 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Agar, Agarose	GIBCO BRL
Ampicillin	Sigma
Antibiotic Medium No.3	Oxoid
BCIP (5-bromo-4-chloro- 3-indolylphospat)	Promega
Bromphenolblau	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Chloramphenicol	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll 400	Pharmacia
Gentamycin	Serva
Kanamycin	Serva
Maleinsäure	Merck-Schuchardt
Mineralöl	Sigma
Mononukleotide	MBI-Fermentas
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz)	Promega
Neomycin	Serva
N-Laurosylysarkosin	Serva
Phenol/Chloroform	Roth
PNPG (p-Nitrophenyl-Glucuronid)	Serva
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva
Streptomycin	Serva
Tetracyclin	Serva
Tris (Tris-Hydroxymethyl-aminomethan)	Sigma
Trypton	Oxoid
Tween 20	Merck-Schuchardt
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid)	MBI-Fermentas
X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid)	MBI-Fermentas
Yeast Extrakt	GIBCO BRL

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

### 3.1.9 Weitere Materialien

Material	Bezugsquelle und Einsatzgebiet
1 Kb DNA Ladder	MBI-Fermentas; Längenstandard in Agarosegelen und Southern-Blots (Sonde: pUC-basiert)
100 bp DNA Ladder	MBI-Fermentas; Längenstandard
$\lambda$ -EcoRI/HindIII DNA-Ladder	MBI; Längenstandard
$\lambda$ -EcoRI/HindIII Dig-Labelled Step Ladder	MBI; Längenstandard für Southern-Blots
Nitrozellulose Filter, Type 0,22 $\mu$ m, 13 mm	Millipore, für Kreuzungsexperimente
Sephacryl MicroSpin™ S-200 HR Columns	Pharmacia; Aufreinigung von Sonden DNA für Southern-Hybridisierungen; Reinigung von PCR-Produkten
Vermiculit	Asperg; Pflanzenanzucht ( <i>Pisum sativum</i> )
Qiabrane	QIAGEN; Nylonmembran für Southern-Blots
Pisum sativum Samen	Samen Weiser, Aachen

Übliche Materialien für molekularbiologische und mikrobiologische Arbeiten sind nicht aufgeführt

### 3.1.10 Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
DIG Luminescent Detection Kit	Boehringer Mannheim
DIG Luminescent Labelling Kit	Boehringer Mannheim
Machery-Nagel Miniprep Kit	Machery-Nagel
Machery-Nagel Extraction Kit	Machery-Nagel
QIAGEN Plasmid Miniprep Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Ready Mix™ Red Taq™ 2X PCR Mix	Sigma
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle Kit with 7-deaza-dGTP	Amersham-Pharmacia Biotech
Topo Cloning Kit	Invitrogen

### 3.1.11 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Gaschromatograph	HP 5890, Series II	Hewlett & Packard
Integrator	HP 3396, Series II	Hewlett & Packard
Mikroskop	Olympus BX50	Olympus
PCR-Thermocycler	Trio-Thermoblock	Biometra
Spectro-Photometer	Novaspec II (325-900 nm)	Pharmacia Biotech
Vakuumblot-Kammer	Vacu-Gene	Pharmacia
Vibratom	Leica VT 1000S	Leica

Übliche Geräte für molekularbiologische und mikrobiologische Arbeiten sind nicht aufgeführt.

### 3.1.12 Computerprogramme

Programm	Charakteristika
BLAST	Programm zum Vergleich DNA- oder Proteinsequenzen über E-Mail ( <a href="mailto:blast@ncbi.nlm.nih.gov">blast@ncbi.nlm.nih.gov</a> )
Clone Manager	Programm zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen und Erstellung von Klonierungsstrategien
DNasis	Programm zur Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bakterienanzucht

*E. coli* Stämme werden durch Suspension einer Einzelkolonie im Reagenzglas in 10 ml LB-Medium bei 37°C über Nacht im Roller angezogen. Auf Festmedium (PA-Medium) werden ausgehend von einer Einzelkolonie fraktionierte Ausstriche hergestellt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Anzucht erfolgt, wenn möglich unter selektiven Bedingungen durch Antibiotikazusätze ins Medium. Die Anzucht von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 erfolgt ebenfalls durch Suspension einer Einzelkolonie in Flüssigmedium oder durch fraktionierte Ausstriche einer Einzelkolonie auf Festmedium. Jedoch wird hier ausschließlich TY-Medium verwendet. Die Inkubationstemperatur beträgt 30°C. Die Generationszeit von *E. coli* liegt bei 30 bis 60 Minuten und von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bei ca. 3 Stunden.

### 3.2.2 Messung des Bakterientiters

Die Dichte einer Bakterienkultur im Reagenzglas wird photometrisch bei 580 nm ermittelt (Novaspec II). Eine optische Dichte o.D.<sub>580</sub> von 0,1 entspricht bei *E. coli* einem Titer von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml und bei *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 einer Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml. Als Referenz dient ein Reagenzglas mit unbeimpftem Medium.

### 3.2.3 Konservierung von Bakterienstämmen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen werden von diesen Glycerinkulturen angelegt. Dazu werden auf Festmedium gewachsene Bakterien in 0,5 ml LB-Medium (*E. coli*) oder 0,5 ml TY-Medium (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39) resuspendiert, mit 0,6 ml 87% (v/v) Glycerin vermischt und bei -20°C aufbewahrt. Es ist sinnvoll diese Glycerinkulturen in 100µl-Portionen zu aliquotieren.

### 3.2.4 Mobilisierung von Plasmiden aus *E. coli* nach *Rhizobium*

(nach Simon *et al.*, 1983)

Um Plasmide über Konjugation aus dem Mobilisierungsstamm S17-1 (*E. coli*), welcher integriert in seinem Chromosom ein RP4-Derivat mit Transferfunktion enthält, nach *Rhizobium* übertragen zu können, müssen diese über eine Mobilisierungsstelle (mob) verfügen. Im Folgenden ist das Prinzip der Filterkreuzung dargestellt:

- Der mit dem mobilisierbaren Plasmid versehene Donorstamm *E. coli* S17-1 wird in LB-Flüssigmedium selektiv bis zu einer o.D.<sub>580</sub> von 0,5-0,7 (log-Phase) angezogen.

- Der Rezipientenstamm (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39) wird in TY-Medium unselektiv bis zu einer o.D.<sub>580</sub> von 0,6-0,8 (Stationärphase) angezogen.
- 0,5 ml Donorkultur und 1,0 ml Rezipientenkultur werden miteinander vermischt und anschließend abzentrifugiert (1,5 min, 12000 rpm).
- Den Überstand möglichst vollständig entfernen und das Pellet dann im Rücklauf vorsichtig resuspendieren; Nicht vortexen!
- Die Suspension auf Nitrocellulose-Filter (1,3 cm Durchmesser, 0,22 µm Porengröße) auf vorgewärmten nichtselektiven TY-Platten pipettieren und ü.N. bei 30°C inkubieren.
- Die Filter werden in 1,0 ml sterilem A. dest. durch vortexen resuspendiert und auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert. Danach für mehrere (4-6) Tage bei 30°C im Brutschrank inkubieren, bis Einzelkolonien sichtbar werden.

### 3.2.5 Isolierung von DNA aus Bakterien

#### 3.2.5.1 Präparation von Gesamt-DNA aus Gram-negativen Bakterien (CTAB-Methode)

Diese Methode dient der Isolierung sowohl der chromosomalen als auch der plasmidären DNA aus bakteriellen Zellen.

- 2 x 1,5 ml einer spät-logarithmischen Kultur für 3 min bei 13000 rpm abzentrifugieren.
- Pellet in 567 µl TE-Puffer resuspendieren.
- Zell-Lyse: Zugabe von 30 µl 10%iger SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K-Lösung, gut mischen und 1 h bei 37°C inkubieren.
- 100 µl 5M NaCl-Lösung zugeben und gründlich mischen.
- 80 µl CTAB/NaCl-Lösung zugeben, mischen und 10 min bei 65°C inkubieren.  
CTAB/NaCl-Lösung vorher auf 65°C im Wasserbad vorwärmen und mischen.
- Phenol/Chloroform-Extraktion : Obere (wässrige) Phase (ca. 600 µl) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen, 600 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugeben, gründlich schütteln und 10 min abzentrifugieren (13000 rpm).
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion: 600 µl CIA (49:1) zugeben und mischen.
- DNA-Fällung: Obere (wässrige) Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen, mit 0,6 Vol% (v/v) Isopropanol versetzen, gründlich mischen und mind. 20 min. bei -20°C stehen lassen.
- 10 min bei 13000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Pellet mit 700 µl 70% Ethanol waschen.
- 10 min. bei RT stehen lassen und dann 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand entfernen, kurz zentrifugieren und Rücklauf entfernen.

- Pellet kurz trocknen und dann in 100 µl sterilem A. dest. aufnehmen.
- Die Gesamt-DNA kann 1-2 Wochen bei 4°C und über einen längeren Zeitraum bei -20°C aufbewahrt werden. Eine lange Lagerung bei 4°C ist nicht empfehlenswert, da die DNA ohne geeignete Pufferbedingungen leicht hydrolysiert. Das Einfrieren der DNA kann sich als nachteilig erweisen, da hierbei DNA-Strangbrüche auftreten. Dies ist aber ein zu vernachlässigender Punkt, wenn man eine Gesamt-DNA-Restiktion durchführen will.
- Kontrolle der isolierten DNA bezüglich Qualität und Quantität mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Minigels.

### 3.2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Alle nachfolgend beschriebenen Kits wurden in dieser Arbeit für die Isolierung von high-copy-, sowie low-copy-Plasmiden aus *E. coli* und *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 verwendet. Wichtig bei der Isolation von low-copy-Plasmiden (z.B. pAS269, pJP) ist, dass zu Beginn eine wesentlich größere Zellzahl (4,5-6,0 ml einer ü.N.-Kultur) eingesetzt wurde.

#### 3.2.5.2.1 Adsorptionschromatographie – QIAprep Spin Miniprep Kit

Vorschrift siehe QIAprep Miniprep Handbook 07/99 der Firma QIAGEN.

Die Schritte dieser Methode sind:

- Abzentrifugieren (13000 rpm) von 1,5-3,0 ml einer ü.N.-Kultur in LB-Medium. (Low-copy-Plasmide: 4,5-6,0 ml)
- Überstand möglichst gründlich entfernen und Pellet in 250 µl Puffer P1 gründlich resuspendieren. Die im Puffer P1 enthaltene RNaseA baut die kontaminierende RNA ab; Lagerung bei 4°C.
- Alkalische Zell-Lyse durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 (NaOH/SDS). SDS solubilisiert Phospholipide und Proteine der Zellmembran, so dass die Zellen lysieren. Da NaOH sowohl die chromosomale- als auch die Plasmid-DNA denaturiert, wird die Dauer der Lyse auf 3-5 min beschränkt, um eine irreversible Denaturierung der Plasmid-DNA zu unterbinden.
- Durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 wird das Lysat neutralisiert (Lyse gestoppt) und die Salzkonzentration erhöht. Dadurch werden denaturierte Proteine, zellwandgebundene chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS präzipitiert. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert und bleibt gelöst.
- Unter hohen Salzkonzentrationen kann die Plasmid-DNA an die Silica-Matrix (Silica-Gel-Membran) der Spin-Säulen binden.
- Es folgen einige Waschschrte, wobei unter anderem die Salzkonzentration gesenkt wird. Es ist unbedingt wichtig sämtlichen Waschpuffer von den Säulen zu entfernen, da das darin enthaltene Ethanol nachfolgende enzymatische Reaktionen beeinträchtigen kann.

- Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt bei niedriger Salzkonzentration durch Zugabe von 50 µl A. bidest. Die DNA-Ausbeute kann erhöht werden, wenn man das Wasser vor dem Abzentrifugieren 1 min auf der Membran einwirken lässt.

Das Kit ermöglicht eine schnelle Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien und liefert aufgereinigte, konzentrierte DNA, die auch bei Sequenzier-Reaktionen eingesetzt werden kann. Lagerung der Plasmid-DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Die Durchführung der Plasmid-Präparation unter Verwendung des Plasmid-Mini-Prep-Kits der Firma Machery-Nagel entspricht im wesentlichen der oben dargestellten Methode. Genaue Anleitung: siehe Handbuch Plasmid Mini Prep-Kit 12/99 der Firma Machery-Nagel.

#### **3.2.5.2 Adsorptionschromatographie – Machery-Nagel Miniprep Kit**

Vorschrift siehe Machery-Nagel Miniprep Kit Handbook. Durchführung und Prinzip der Methode ähnlich dem QIAprep Spin Miniprep Kit.

#### **3.2.5.2.3 Ionenaustauscherchromatographie – Plasmid Mini Purification Kit**

Vorschrift siehe QIAGEN Plasmid Mini Handbook 03/97 der Firma QIAGEN.

Die Schritte dieser Methode:

- Abzentrifugieren (13000 rpm) von 1,5-3,0 ml einer ü.N.-Kultur in LB-Medium.
- Zell-Lyse unter alkalischen Bedingungen: NaOH, SDS, RNaseA (s.o.).
- Die Plasmid-DNA wird über Anionen-Austauscher-Säulen aufgereinigt. Diese Säulen enthalten ein Anionenaustauscherharz mit positiv geladenen Festionen. Letztere binden DNA in Gegenwart mittlerer Ionenstärke. PH-Werte und Salzkonzentrationen der Puffer spielen bei dieser Methode eine wichtige Rolle. Da RNA mit der Plasmid-DNA um die Bindungsstellen in der Säule konkurrieren würde, muss diese entfernt werden (RNaseA-haltiger Puffer1).
- Es folgen verschiedene Waschschrte.
- Die an die Säulen gebundene Plasmid-DNA wird durch einen salzreichen Puffer eluiert. Sie wird gegen freie gelöste Ionen aus dem Puffer ausgetauscht, welche mit der DNA um die Bindungsstellen konkurrieren. Diese binden statt der DNA an die Säulen und die DNA wird ausgewaschen.
- Durch eine Isopropanol-Fällung werden überschüssige Salze entfernt und die Plasmid-DNA ausgefällt und somit aufkonzentriert.
- Durch Ethanol-Waschschrte werden weiterhin Salze entfernt.
- Nach dem Trocknen wird das Plasmid-DNA-Pellet in 50 µl A. bidest. aufgenommen. Bei dieser Methode handelt es sich um eine im Vergleich zum Spin Miniprep Kit viel aufwendigere Methode, deren Einsatz sich nur lohnt, wenn hoch aufgereinigte Plasmid-DNA benötigt wird; z.B. bei Sequenzier-Reaktionen.

#### 3.2.5.2.4 Hot Boiling Prep (nach Holmes und Quigley, 1981)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit Plasmid-DNA aus Bakterienzellen zu präparieren. Proteine werden bei dieser Methode im Gegensatz zur alkalischen Lyse nicht durch SDS/NaOH-Behandlung, sondern durch Hitzebehandlung (45 sec. kochendes Wasser) denaturiert, nachdem die Zellwände durch Lysozym aufgelöst wurden. Die Zelltrümmer verklumpen bei der Hitzebehandlung mit den Proteinen und der chromosomalen DNA und können nach Zentrifugation einfach entfernt werden. Unerwünschte RNA wird durch den Zusatz von RNaseA abgebaut. Diese Methode eignet sich ausschließlich für *E. coli*-Stämme mit einem *endA1*-Genotyp.

Die Schritte dieser Methode:

- 1,5-3,0 ml einer ü.N.-Kultur 1 min bei 13000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand gründlich entfernen und Pellet in 110 µl STET-Puffer (+ Lysozym + RNaseA) resuspendieren.
- 30 sec. im kochendem Wasser inkubieren und anschließend 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Das resultierende Pellet kann vorsichtig mit einem sterilen Zahnstocher entfernt werden.
- DNA durch Zugabe von 110 µl Isopropanol fällen und 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Pellet mit 70%igem Ethanol waschen und erneut 5 min zentrifugieren.
- Pellet bei 37°C trocknen und in 20-30 µl sterilem A. bidest. aufnehmen.

#### 3.2.5.2.5 Eckhardt-Lyse von Plasmid-DNA (modifiziert nach Eckhardt, 1978)

Die Eckhardt-Lyse ist eine schnelle Methode zur Analyse des Plasmidgehalts eines Bakteriums, mit der man die Plasmidgrößen bestimmen kann. Eine durch Lysozym und SDS vermittelte Lyse schließt die Zellen während der Vorlaufphase in den Geltaschen auf und setzt die Plasmide frei. Diese werden dann im Hauptlauf im Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Vorbereitung des Eckhardt-Gels

- Aufkochen von 0,8-1,0% (w/v) Agarose in TB-Puffer.
- Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 60°C.
- Zugabe von 2 ml 10% (w/v) SDS-Lösung pro 100 ml Agaroselösung.
- Gießen des Gels und Einsetzen des Kamms.
- nach dem Erkalten wird das Gel in die Gelkammer eingesetzt oder in Folie bei 4°C aufbewahrt. Erst unmittelbar vor dem Lauf wird das Gel in der Kammer mit 1 x TB-Puffer überschichtet.

### Vorbereitung der Zellen

- Zellen einer bakteriellen Einzelkolonie werden mit einem sterilen Zahnstocher auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
- Eine Impföse voll Zellen dieser Ausstriche werden in 10 µl TB-Puffer gründlich resuspendiert.
- 20 µl SRL-Lösung mit 2 mg/ml Lysozym zugeben, vorsichtig mischen (Schaumbildung) und sofort 20 µl dieser Suspension auf das Gel auftragen.
- ca. 15 min stehen lassen, bis die Slots wieder klar werden.
- Vorlauf: 20-30 min, 20 V  
Hauptlauf: 1-3 h, 100-120 V  
Färben: ca. 15 min in Ethidiumbromid-Färbelösung  
Entfärben: ca. 15 min im Wasserbad
- Detektion der angefärbten DNA im UV-Licht auf dem Transluminator oder Gel-Dokumentationssystem.

## 3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

### 3.2.6.1 Gelabschätzung

Die Konzentration einer DNA-Lösung kann durch Vergleich einer DNA-Lösung bekannter Konzentration im Agarosegel abgeschätzt werden. Von beiden DNA-Lösungen wird eine Verdünnungsreihe angefertigt und diese in einem Minigel elektrophoretisch aufgetrennt. Das mit Ethidiumbromid angefärbte Gel wird anschließend fotografiert. Die Konzentrationsabschätzung erfolgt nun durch Vergleich der Intensität der einzelnen Banden. Als Referenz kann z.B. eine 1kb-DNA-Leiter (MBI-Fermentas) verwendet werden. Jede Bande enthält ca. 25 ng DNA, ausgenommen die 5 Kb-Bande, welche ca. 75 ng DNA enthält. Bei dieser Methode handelt es sich zwar um eine sehr schnelle und einfache, jedoch auch sehr unsichere Methode.

### 3.2.6.2 UV-Absorptionsspektrometrie

Wird UV-Strahlung durch eine Küvette mit definiertem Durchmesser (1,0 cm) geschickt, so ist die absorbierte Menge UV-Strahlung dem DNA-Gehalt der Lösung proportional. Die Absorption wird bei 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Absorption von 1,0 einem DNA-Gehalt (doppelsträngig) von 50 µg/ml. Anhand der UV-Absorption kann man auch die Reinheit einer DNA-Lösung überprüfen. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Protein und/oder Phenol hin.

### 3.2.7 Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Präpariert man DNA aus Bakterien, so enthält der Bakterienzelleextrakt außer der DNA auch erhebliche Mengen an Proteinen und RNA. Die Standardmethode, um die Proteine aus einem Zelleextrakt zu entfernen, besteht darin, dass man der DNA-Lösung Phenol oder ein Gemisch von Phenol und Chloroform (1:1) im gleichen Volumen zusetzt. Diese organischen Lösungsmittel fällen die Proteine aus, während die Nukleinsäuren (DNA und RNA) in der wässrigen Lösung bleiben. Wenn man den Zelleextrakt mit den Lösungsmitteln mischt und die Phasen dann durch Zentrifugation trennt, sammeln sich die ausgefällten Proteine als weiße Schicht in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase. Die wässrige (obere) Phase stellt die von Proteinen befreite Nukleinsäurelösung dar. Da Proteine durch dieses Verfahren denaturiert werden, kann es auch genutzt werden, um Enzymreaktionen (z.B. Bal31) zu stoppen.

Manche Zelleextrakte enthalten so viel Protein, dass eine einmalige Phenolextraktion nicht ausreicht, um die Nukleinsäuren vollständig zu reinigen. Um das Problem einer mehrfachen Wiederholung der Extraktion (führt zu DNA-Strangbrüchen) zu umgehen kann man den Zelleextrakt vor der Extraktion mit Proteasen (z.B. Proteinase K) behandeln. Diese Enzyme bauen Proteine zu kleineren Polypeptiden ab, die sich leichter mit Phenol entfernen lassen.

### 3.2.8 Konzentrierung der DNA durch Ethanol-Fällung

(Maniatis et al., 1982)

Die am häufigsten benutzte Anreicherungs-methode ist die Ethanolpräzipitation. In Gegenwart von einwertigen Kationen wie  $\text{Na}^+$  und bei Temperaturen unter  $-20^\circ\text{C}$  fällt absolutes Ethanol die Nukleinsäuren sehr wirksam aus. Das Präzipitat kann schließlich durch Zentrifugation pelletiert werden.

- Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung oder 5 M NaCl-Lösung und 2 Volumen 100% Ethanol, mischen!
- Mindestens 30-60 min bei  $-20^\circ\text{C}$  fällen.
- 10 min. bei 13000 rpm zentrifugieren, dann Überstand verwerfen.
- Pellet mit 700  $\mu\text{l}$  70%igem Ethanol waschen, erneut 5 min zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen und Pellet bei  $37^\circ\text{C}$  oder RT trocknen, DNA dann in angemessenem Volumen A. bidest. oder 1 x TE-Puffer aufnehmen.

## 3.2.9 Die Manipulation der gereinigten DNA

### 3.2.9.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen lassen sich in drei Klassen einteilen, die sich in ihrer Wirkungsweise geringfügig unterscheiden. Die Typen I und III sind ziemlich kompliziert und für die Gentechnik nur von geringer Bedeutung. Bei den für die DNA-Klonierung wichtigen Schneideenzyme handelt es sich um Restriktionsendonukleasen des Typs II. Sie katalysieren die Spaltung von DNA-Molekülen an spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen von meist 4 oder 6 bp. Es entstehen diskrete DNA-Fragmente, die in Hybridisierungen, Längenanalysen und vor allem bei Klonierungsarbeiten eingesetzt werden können. Optimale Spaltungsbedingungen werden durch geeignete Puffer geschaffen. Die meisten Restriktionsendonukleasen arbeiten gut bei pH 7,4. Alle Restriktionsendonukleasen des Typs II benötigen  $Mg^{2+}$ -Ionen für ihre Funktion. Außerdem ist es ratsam ein reduzierendes Agens wie Dithiothreitol zuzusetzen, welches das Enzym stabilisiert und seine Inaktivierung verhindert. Diese Bedingungen wurden in dieser Arbeit durch 10 x TA-Restriktionspuffer geschaffen, welcher ein für alle verwendeten Restriktionsendonukleasen optimierter Puffer ist.

Typische Restriktionsansätze:

Zusammensetzung	Plasmid-DNA (40 µl) Klonierungsansatz	Plasmid-DNA (20 µl) Testverdau	Gesamt-DNA
DNA	8 µl	3 µl	30 µl
10 x TA-Puffer	4 µl	2 µl	5 µl
Enzym (jeweils)	0,6 µl (6 Units)	0,3 µl (3 Units)	0,6 µl (6 Units)
A. bidest.	ad 40 µl	ad 20 µl	ad 50 µl
Dauer	1,0 h	ca. 30 min	2-3 h
Temperatur	meist 37°C	meist 37°C	37°C

Die optimale Spaltungstemperatur ist abhängig vom jeweiligen Enzym und kann um mehrere Grad Celsius variieren.

Eine Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch Inkubation des Restriktionsansatzes bei 65°C für 10 min (*Bam*HI, 10 min 85°C) und durch zweimaliges Einfrieren bei -20°C.

Die eingesetzte Menge an DNA-Lösung ist abhängig von deren Konzentration und kann insbesondere bei Lösungen von low-copy-Plasmid-DNA-Präparationen erheblich erhöht werden.

### 3.2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode ermöglicht eine Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld. Wie Proteine und viele andere Biomoleküle trägt auch die DNA eine elektrische Ladung und zwar aufgrund der Phosphatgruppen als Hauptladungsträger eine Negative. Deshalb wandert die DNA in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls

hängt von zwei Eigenschaften ab: von seiner Form und seiner elektrischen Ladung. Da aber die meisten DNA-Moleküle die gleiche Form und im Verhältnis zu ihrer Größe annähernd die gleiche Ladung besitzen wird die Größe zum wichtigsten Faktor bei der elektrophoretischen Auftrennung in einem Gel. Ein solches Gel, das gewöhnlich aus Agarose, einem Galactosepolymer aus Meeresalgen besteht, kann die DNA auf Grund seiner komplizierten Matrix der Größe nach auftrennen. Dieser Molekularsiebeffekt wirkt sich folgendermaßen aus: Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen. Man kann die Porengröße in einem solchen Gel variieren, indem man mehr oder weniger Agarose einsetzt. Die Trenneigenschaften des Gels werden somit besser bzw. schlechter.

- 0,8-1,5% (w/v) Agarose in 1 x TA-Puffer aufkochen und lösen.
- Auf ca. 60-80°C abkühlen lassen und die Agaroselösung blasenfrei in den Gelträger mit eingesetzten Gelkamm gießen. Durch den Gelkamm werden die Geltaschen geformt.
- Das Gel wird mit 1 x TA-Puffer überschichtet, dann wird der Gelkamm vorsichtig entfernt. Durch das vorherige Überschichten mit 1 x TA-Puffer wird verhindert, dass die Geltaschen beim Entfernen des Kamms kollabieren.
- Die DNA-Proben werden mit Auftragemix versetzt, dadurch werden sie sowohl gefärbt (Bromphenolblau dient der Sichtbarmachung der vorderen Lauffront) als auch in ihrer Dichte erhöht (Glyzerin), damit sie in die Geltaschen absinken.
- Laufbedingungen:
  - Minigele grobe Auftrennung: 0,8% Agarose, 60 V, 1h
  - Minigele feine Auftrennung: 1,5-2,0% Agarose, 60 V, 2h
  - 100-120 ml Gele: 0,8% Agarose, 120 V, 2-3 h
- Färben der Gele im Ethidiumbromidbad, Minigele 5-10 min, große Gele 20 min.
- Anschließend werden die Gele kurz im Wasserbad entfärbt, um die Hintergrundfärbung des Gels zu entfernen. Fotografieren des Gels im UV-Durchlicht des Transluminators.

### 3.2.9.3 Größenabschätzung von DNA-Fragmenten nach Gelelektrophorese

Am genauesten gelingt die Größenabschätzung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der mathematischen Beziehung zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und molarer Masse; die entscheidende Formel lautet:

$$D = a - b (\log M)$$

Dabei ist D die Wanderungstrecke, M die molare Masse und a und b sind Konstanten, die von den Elektrophoresebedingungen abhängen. Im Allgemeinen verwendet man jedoch eine viel einfachere, allerdings auch weniger genauere Methode, um die Größe der DNA-Fragmente abzuschätzen. Man lässt dazu in einem Agarosegel einen Satz von Restriktionsfragmenten bekannter Größe neben den DNA-Proben mitlaufen. Als einen solchen Größenmarker benutzt man häufig *EcoRI/HindIII*-geschnittene  $\lambda$ -DNA

oder eine 1 Kb DNA-Leiter. Durch den Vergleich mit dem Längenmarker kann die Größe der DNA-Fragmente der untersuchten Probe abgeschätzt werden.

Längenstandards:

$\lambda$ -EcoRI/HindIII-Fragmente (bp)	1 Kb DNA-Leiter (bp)
(24756)	10000
21226	9000
5184	8000
4973	7000
4268	6000
3530	5000
2027	4000
1904	3000
1584	2000
1375	1000
947	750
831	500
564	250
125	

### 3.2.9.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel – QIAquick Gel Extraction Kit

Vorschrift: siehe QIAquick Spin Handbook 07/97 der Firma QIAGEN

Die gewünschten Banden werden unter UV-Licht vorsichtig aus einem Gel herausgeschnitten und die darin enthaltenen DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits isoliert. Die Agarose-Stücke schmelzen in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen und gleichzeitiger Erwärmung. Die Präparation der DNA aus dieser Lösung basiert auf Absorptionschromatographie: bei hohen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert  $\leq 7,5$  absorbiert die DNA an die Silicagel-Membran der Spin-Säule. Verunreinigungen wie Agarose, Ethidiumbromid, Salze, sowie Enzyme werden durch Waschschrte mit ethanolhaltigen PE-Puffern entfernt.

Die Schritte dieser Methode:

- DNA-Fragment mit scharfem sauberem Skalpell aus dem Gel ausschneiden.
- Gelfragment wiegen und 3 Vol. Puffer QG zu einem Vol. Gel zufügen.
- 10 min bei 50°C inkubieren, dabei alle 2-3 min durch Vortexen mischen.
- 1 Gel Vol. Isopropanol zufügen, wenn die Farbe der Lösung gelb ist.
- Die Lösung auf eine QIAquick Säule geben, um die DNA zu binden, zentrifugieren (1min, 13000 rpm).
- Durchfluss verwerfen, 500  $\mu$ l Puffer QG zugeben, um verbliebene Agarose auszuwaschen, zentrifugieren (1 min, 13000 rpm).
- Durchfluss verwerfen, 750  $\mu$ l Puffer PE zugeben, zentrifugieren (1 min, 13000 rpm).

- Durchfluss verwerfen, erneut zentrifugieren (1 min, 13000 rpm), um den restlichen Puffer PE zu entfernen.
- Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und DNA mit 30-50 µl A. bidest. eluieren. Dazu Wasser auf das Zentrum der Säule geben, 1 min stehen lassen und dann zentrifugieren (1 min, 13000 rpm).
- Die aufgereinigte, meist geschnittene DNA kann nun in weiteren Reaktionen, wie z.B. Ligation oder Auffüllreaktionen eingesetzt werden. Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.9.4.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel –Machery-Nagel Extraction Kit**

Vorschrift siehe Machery-Nagel Extraction Kit Handbook. Durchführung und Prinzip der Methode ähnlich dem QIAquick Gel Extraction Kit.

#### **3.2.9.5 Das Auffüllen von Restriktionsenden - Filling-in-Reaktionen**

Das Auffüllen von Restriktionsenden (klebrigen Enden) geschnittener DNA-Fragmente kann mehrere Funktionen erfüllen. Zum Einen können DNA-Fragmente so effektiv markiert werden, wenn man radioaktiv markierte Nukleotide bei dieser Reaktion einsetzt und zum Anderen können durch das Auffüllen von „klebrigen“ Enden Schnittstellen zerstört werden. Als Enzym benutzt man das Klenow-Fragment (DNA Polymerase I Large Fragment), das 5'-überhängende Enden durch Synthese eines Komplementärstranges „auffüllt“, oder die T4-DANN Polymerase, die 3'-überhängende Enden entfernt.

Die wesentlichen Schritte dieser Methode:

- Die DNA wird mit dem Enzym geschnitten dessen Schnittstelle (Erkennungs-Sequenz) zerstört werden soll.
- Nach der Restriktion wird das Enzym inaktiviert (z.B. 10 min,  $65^{\circ}\text{C}$ ).
- Zum Restriktionsansatz wird nun hinzugefügt:
  - 2 µl Nukleotidmix (ACGT, 1 mM)
  - 3 U Klenow-Fragment oder T4 DNA-Polymerase
- Der Ansatz wird für 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.
- Der Ansatz wird auf Sephacryl S-200 HR-Säulen aufgereinigt oder die Reaktion durch 10min  $65^{\circ}\text{C}$  gestoppt und die DANN sofort weiter genutzt.
  - Genauere Anweisungen zur Aufreinigung im Handbuch MicroSpin™ Columns der Firma Pharmacia Biotech.
- DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern.

#### **3.2.9.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Das Enzym T4-DNA-Ligase, das in der Gentechnik gewöhnlich verwendet wird, stammt aus *E. coli*-Bakterien, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind. In den Zellen repariert das Enzym alle Brüche, die in einem Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls auftreten können. Ein solcher Bruch ist eine Stelle, an der die

Phosphordiesterbindung zwischen zwei benachbarten Nukleotiden fehlt. Im Reagenzglas können gereinigte T4-DNA-Ligasen in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und ATP unter geeigneten Pufferbedingungen verschiedene DNA-Moleküle oder die beiden Enden eines DNA-Moleküls verbinden. Die Effizienz einer Ligation wird durch die Anwesenheit kompatibler „klebriger“ Enden erhöht. Solche zueinander passenden Enden können sich über die Wasserstoffbrücken der Basen miteinander verbinden, so dass sich eine relativ stabile Struktur ausbildet, auf die das Enzym einwirken kann. Ligationen „glatter“ Enden sind daher problematisch, da sich keine stabilen Strukturen ausbilden können und die Ligase die zu verbindenden Enden nicht „festhalten“ kann. Die Enden müssen vielmehr zufällig miteinander in Kontakt geraten. Daher sollte man die Ligation „glatter“ Enden bei hoher DNA-Konzentration durchführen, um die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens der Moleküleenden zu erhöhen. Das Verhältnis zwischen Insert-DNA und Vektor-DNA sollte bei einer Ligation im Verhältnis 3:1 liegen. Grundschemata eines Ligationsansatzes:

Zusammensetzung	Standardansatz (Grundschemata)
Insert-DNA	3 X $\mu$ l
Vektor-DNA	X $\mu$ l
10 x Ligase-Puffer	5,0 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase	1,0 $\mu$ l (1 Unit)
A. bidest.	ad 50,0 $\mu$ l
Polyetylglycol (PEG 50%)	5,0 $\mu$ l (nur bei blunt-end-Ligationen)

Der Ligationsansatz sollte mindestens 1-3h bei 20°C (Wasserbad) oder ü.N. bei 14°C inkubiert werden. Durch einen „Temperatur-Shift“ kann insbesondere die Effizienz einer blunt-end-Ligation erhöht werden. Das heißt nach Inkubation bei 20°C, Ansatz im Wasserbad (Becherglas, 400 ml) in den Kühlschrank (4°C) stellen und mindestens 3h abkühlen lassen.

### 3.2.10 Southern-Blot und Hybridisierung

Die Southern-Hybridisierung ist eine Methode zur Identifizierung homologer DNA-Bereiche. Dazu werden DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, danach aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen und auf dieser durch UV-Bestrahlung fixiert. Als Hybridisierungsprobe gegen die immobilisierte einzelsträngige DNA auf der Membran wird bei dem nicht-radioaktiven Verfahren Digoxigenin markierte Einzelstrang-DNA als Sonde verwendet. Der Nachweis der stattgefundenen Hybridisierungen erfolgt durch einen *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) unter Verwendung eines Antikörper-Konjugates mit anschließender Färbung.

### 3.2.10.1 Markierung der Hybridisierungssonde mit Digoxigenin-dUTP

Die als Hybridisierungssonde verwendete DNA wird zunächst mit dem Restriktionsenzym *SauIII*A partiell gespalten und anschließend denaturiert. Zu der denaturierten DNA wird zunächst ein Gemisch aus Hexanukleotiden mit zufallsbedingter Sequenz (Random Primer) und ein Gemisch aus dNTPs gegeben. Die Hexanukleotide binden zufällig an komplementäre Bereiche der einzelsträngigen DNA. Das Klenow-Fragment (DNA Polymerase I Large Fragment) katalysiert ausgehend von diesen Primern die Auffüllreaktion des Einzelstranges zum Doppelstrang. Zur Markierung der Sonden-DNA wird dem Reaktionsgemisch Digoxigenin-markiertes dUTP (DIG-dUTP) zugesetzt. Die Sonden-DNA wird anschließend auf Sephacryl MicroSpin S-200 Säulen aufgereinigt. Die Reaktionen werden mit dem „Labelling and Detection Kit“ der Firma Boehringer durchgeführt. (Substanzen aus dem Kit sind mit # gekennzeichnet).

Die Schritte der Sondenmarkierung durch „Random Priming“:

- 30 µl Proben-DNA in 10 x TA-Puffer mit *SauIII*A (6 Units) spalten.
- 15-30 min bei 37°C inkubieren.
- Reaktion durch Inkubation bei 65°C für 10 min stoppen (Enzym inaktivieren).
- Spaltungsansatz bei 100°C für 10 min denaturieren, sofort 5 min auf Eis inkubieren.
- Folgende Komponenten zugeben:

Hexanukleotid-Gemisch #	2,0 µl
dNTP Markierungs-Mix #	2,0 µl
Klenow-Fragment #	1,0 µl (2 Units)
- Ansatz bei 37°C für 4 h inkubieren. Danach sofort bei -20°C wegfrieren (Reaktion stoppen).
- Reinigung der Sonden-DNA auf Sephacryl MicroSpin S-200 Säulen (Anweisung siehe Handbuch: MicroSpin™ Columns der Firma Pharmacia Biotech).
- Die gereinigte Sonden-DNA bis zum Gebrauch bei -20°C lagern.

### 3.2.10.2 Labelkontrolle (Dot-Blot)

- Von der Sonden-DNA und der Digoxigenin-markierten Kontroll-DNA (aus dem Labelling und Detection Kit) werden Verdünnungsreihen ( $10^0 - 10^{-5}$ ) angesetzt.
- Je 1 µl jeder Verdünnungsstufe wird auf eine beschriftete Nylonmembran pipettiert und durch UV-Bestrahlung an der Membran fixiert.
- Die Membran wird in eine Färbeschale überführt und gewaschen.
- Waschschritte und Nachweisreaktionen werden wie unter 2.9.8.6 durchgeführt.

Die Farbintensitäten der Proben- und Kontroll-DNA werden miteinander verglichen. Da die Konzentration der Kontroll-DNA (10 ng/µl) bekannt ist, können die aufgetragenen Mengen Kontroll-DNA und durch Vergleich, die Nachweisgrenze der hergestellten Sonde bestimmt werden.

### 3.2.10.3 Transfer der DNA auf eine Nylonmembran mittels Vakuum-Blotting

Die zu testende DNA wird mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und das Spaltungsprodukt, ein Gemisch aus Fragmenten unterschiedlicher Größen, in zwei Parallelansätzen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein Gel wird anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografisch dokumentiert. Das andere Gel wird für den Vakuum-Blot verwendet. Auf diese Weise kann eine Kontamination der Blotting-Apparatur mit Ethidiumbromid, bei gleichzeitiger fotografischer Dokumentation des Spaltungsansatzes verhindert werden. Die Übertragung der DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgt mit Hilfe einer Vakuum-Blot Apparatur. Dazu wird eine Nylonmembran geeigneter Größe auf die poröse Trägerplatte der Apparatur gebracht und mit einer Kunststoffmaske bedeckt, deren Ausschnitt um etwa 0,5 cm kürzer als die Kantenlänge des Agarosegels sein sollte. Dann wird das Agarosegel blasenfrei auf die Membran gelegt. Nach dem Abdichten der Apparatur wird unter der Trägerplatte ein Vakuum (55-60 mbar) angelegt, welches nur über das Gel ausgeglichen werden kann. Auf diese Weise werden die DNA-Fragmente durch das Gel auf die Membran gezogen. Die Schritte dieser Methode:

- Poröse Trägerplatte befeuchten und mit der glatten Seite nach oben in die Kammer legen und Vakuumschlauch mit Kühlfalle anbringen.
- Die Membran zurecht schneiden, befeuchten und auf Trägerplatte legen und mit der Kunststoffmaske bedecken. Die Maske sollte die Membran an allen Seiten mindestens 5,0 mm überdecken.
- Das Gel auflegen, Apparatur kreuzweise verschließen und Vakuum anlegen.
- Das Gel sofort für ca. 15 min mit Depurinierungspuffer überschichten, bis der Bromphenolblaumarker gelb wird.
- Depurinierungspuffer absaugen und das Gel sofort für ca. 15 min mit Denaturierungslösung überschichten.
- Denaturierungslösung absaugen und das Gel sofort für ca. 20 min mit Neutralisierungslösung überschichten.
- Neutralisierungslösung absaugen und das Gel sofort mit 20 x SSC (Transferpuffer) überschichten und 60 min blotten. Bei allen Schritten ist darauf zu achten, dass das Gel nicht „trocken läuft“. Es muss immer wieder mit Lösungen überschichtet werden.
- Nach dem Blotvorgang wird die Nylonmembran in Frischhaltefolie eingewickelt und die DNA durch UV-Bestrahlung (ca. 5 min) an der Membran fixiert. Die Membran kann einige Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

### 3.2.10.4 Vorhybridisierung

Mit diesem Schritt wird die unspezifische Bindung der Sonden-DNA an die Nylonmembran unterbunden, indem freie Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden.

- Die Membran mit der fixierten DNA wird luftblasenfrei in einen Hybridisierungszylinder eingerollt. Dabei muss die Fläche mit der DNA-Seite nach innen zeigen und die Membran sollte so wenig wie möglich überlappen.
- 20 ml Hybridisierungslösung (ohne DNA-Sonde) einfüllen und für 1-3 h bei 68°C rollern.

### 3.2.10.5 Hybridisierung

- Markierte Sonden-DNA zu 5 ml Hybridisierungslösung geben und 15 min bei 95-100°C denaturieren.
- Vorhybridisierungslösung im Zylinder durch Hybridisierungslösung mit markierter Sonden-DNA ersetzen und für mindestens 6 h, besser ü.N. im Rollerbrutschrank bei 68°C inkubieren.

Nach der Hybridisierungsreaktion wird die Hybridisierungslösung aufgefangen und bei -20°C gelagert, da die Sonden-DNA mehrmals wiederverwendet werden kann.

### 3.2.10.6 Immunologische Nachweisreaktion

Die Membran wird zunächst gewaschen, um überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Mit dem Salzgehalt der Waschpuffer kann man die Stringenz bestimmen.

Alle nachfolgenden Schritte erfolgen bei Raumtemperatur in Färbeschälchen. Substanzen aus dem Kit sind mit # gekennzeichnet.

Die Detektion DIG-markierter DNA-Banden basiert auf dem Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung mit einer nachfolgenden enzymatischen Reaktion (ELISA). Ein Anti-DIG-AP-Konjugat, bestehend aus einem Anti-Digoxygenin-Fab-Fragment und einer alkalischen Phosphatase, bindet an das dUTP-gebundene Digoxygenin. Die alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Dephosphorylierung seines Substrates BCIP, welches in das entsprechende Indoxyl überführt wird. Dieses tautomerisiert seinerseits zu einem Keton. Dieses Keton dimerisiert zu einem blauen Indigo-Farbstoff, wobei H<sup>+</sup>-Ionen freigesetzt werden. Durch diese Ansäuerung wird das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zu Diformazan (purpurfarben) reduziert. Beide Farbstoffe fallen dabei gemeinsam in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle aus, wodurch die mit den DNA-Sonden markierten DNA-Bereiche dunkelviolett angefärbt werden.

- Hybridisierungslösung entnehmen und bei -20°C einfrieren.
- 2 x 5 min mit 50 ml 2 x Waschpuffer bei RT rollern.
- 2 x 15 min mit 50 ml 0,1 x Waschpuffer bei 68°C rollern.
- 1 min mit 50 ml Waschpuffer mit 0,3% Tween 20 äquilibrieren.
- 30 min in 100 ml Puffer 2 inkubieren.
- 4 µl Anti-Digoxygenin-AP-Konjugat<sup>#</sup> in 20 ml Puffer 2 (1 : 5000) verdünnen und Membran 30 min darin inkubieren.
- ungebundenes Antikörper-Konjugat durch 2 x 15 min waschen in 100 ml Puffer 1 entfernen.
- Membran 2 min in 20 ml Puffer 3 äquilibrieren.

- Membran mit 20 ml Färbelösung im Dunkeln inkubieren, bis die Farbreaktion deutlich genug ist.
- Stoppen der Färbereaktion durch 5 min Waschen mit 50 ml Puffer 4.
- Die Membran kann nach dem Trocknen aufbewahrt werden.

### 3.2.10.7 Sondenwechsel-Stripping

Die als Hybridisierungsprobe verwendete DNA Sonde kann bei Bedarf auch wieder von der immobilisierten einzelsträngigen DNA auf der Membran entfernt werden, um z.B. eine Hybridisierung mit einer anderen Sonde durchzuführen.

Die Schritte dieser Methode:

### 3.2.11 PCR – Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion-PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation eines beliebigen Abschnittes in einem DNA-Molekül. Man kann dazu jeden Bereich auswählen, vorausgesetzt, seine ihn flankierenden Sequenzen sind bekannt. Dies ist notwendig, da zu Beginn der PCR zwei kurze, definierte Oligonukleotide mit dem DNA-Molekül hybridisieren müssen - an jedem Strang der Doppelhelix eines. Diese synthetischen Oligonukleotide, die an die flankierenden Sequenzen, der zu amplifizierenden Region binden, dienen als Primer der DNA-Synthesereaktion und begrenzen den zu vervielfältigenden Abschnitt. Gewöhnlich benutzt man als Enzym für die Synthesereaktion die aufgereinigte DNA-Polymerase I aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Da diese Mikroorganismen in heißen Quellen leben, sind viele ihrer Enzyme, so auch die *Taq*-Polymerase I, hitzestabil. Die Hitzestabilität der *Taq*-Polymerase ist eine wesentliche Voraussetzung für die PCR. Um die PCR zu starten wird dem Gemisch aus Primern, Template-DNA und Nukleotiden das Enzym zugefügt. Anschließend erhitzt man das Gemisch im ersten Schritt auf 95°C, um die DNA-Matrizenstränge zu denaturieren. Im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen wird die *Taq*-Polymerase bei diesem Schritt nicht inaktiviert. Danach wird das Gemisch bis zu einer vorher berechneten Temperatur, der Hybridisierungstemperatur, abgekühlt. Diese Temperatur wird durch die Sequenz und Länge der Primermoleküle bestimmt und muss einerseits so niedrig gewählt sein, dass es zur Hybridisierung zwischen Primer und Matrize kommt und andererseits so hoch, dass sich keine fehlgepaarten Hybride bilden. Diese Temperatur kann man abschätzen, indem man die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Hybrides aus Primer und Matrize ermittelt und ca. 1-5°C darunter einstellt. Nach der Hybridisierungsreaktion folgt im dritten Schritt die Strangsynthesereaktion durch die *Taq*-Polymerase bei 72°C. An den mit Primern versehenen DNA-Einzelsträngen werden nun neue Komplementärstränge synthetisiert. Nach diesem Syntheseschritt folgt nun wieder die Denaturierung der DNA, womit ein neuer Zyklus beginnen kann. In der Regel wird dieser Kreislauf aus Denaturieren, Hybridisieren und Synthese 30 bis 35 mal wiederholt, so dass das gewünschte DNA-Fragment schließlich in mehreren hundert

Millionen Exemplaren vorliegt. Zum Abschluss folgt eine 3 minütige Extension der Amplifikationsprodukte (72°C), um zu gewährleisten, dass alle Fragmente vollständig verlängert werden. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt gelelektrophoretisch.

PCR-Ansatz:

Template-DNA	x	µl (50-300 ng)
Oligonukleotid A	x	µl (max. 100 pmol)
Oligonukleotid B	x	µl (max. 100 pmol)
dNTP-Mix	6,0	µl (1,0 mM)
10 x Puffer	3,0	µl
MgSO <sub>4</sub>	1,8	µl (25 mM)
Taq-Polymerase	0,3	µl (10 u/µl)
A. bidest.		ad 30 µl

Abweichend von dieser Anleitung kann auch der „Ready Mix™ Red Taq™ 2X PCR Mix“ verwendet werden. Dieser enthält bereits die DNA Taq-Polymerase, die dNTPs, den Puffer und sonstige Ionen, sowie einen Ladepuffer für die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung. Es müssen demnach lediglich DNA, Primer und Wasser zugefügt werden, um den PCR-Mix zu vervollständigen.

PCR-Ansatz (Ready Mix™ Red Taq™ 2X PCR Mix):

Template-DNA	1	µl µl (50-300 ng)
Oligonukleotid A	1	µl µl (max. 100 pmol)
Oligonukleotid B	1	µl µl (max. 100 pmol)
2 X PCR Mix	15	µl
A. bidest.		ad 30 µl

Die Bestandteile der Reaktion werden in einem 500 µl Reaktionsgefäß gemischt und mit 10 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet. Die Reaktion erfolgt in einem Thermocycler (Biometra, Trio-Thermoblock), beispielsweise mit folgendem Temperaturprogramm:

Denaturierung:	2 min, 94°C
Annealing:	30 sec. XX°C (je nach Primer und Anwendung)
Extension:	40 sec, 72°C (mindestens)
Anzahl der Zyklen:	35-40, je nach Anwendung
Abschließende Extension	3 min, 72°C

Die Extentionszeit ist vor allem abhängig von der Länge des zu amplifizierenden PCR-Produktes. In der Regel kann von einer Geschwindigkeit der Taq DNA-Polymerase von 1000bp pro min ausgegangen werden.

### 3.2.12 Nicht-radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ der Firma Amersham benutzt.

Die Cycle Sequencing Methode beruht auf der Kombination zweier Verfahren, der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und der Didesoxy- bzw. Kettenabbruchsmethode für Sequenzierungen (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierungsreaktion startet hierbei mit der Synthese eines neuen DNA-Stranges an einer spezifischen Primersequenz und endet mit dem zufälligen Einbau eines Didesoxynukleosidtriphosphats (ddNTPs). An dieser Position kann die Kette nicht weiter verlängert werden, da die zur Ausbildung der Phosphodiesterbindung notwendige 3'-Hydroxygruppe fehlt. Zur Detektion der unterschiedlich langen Syntheseprodukte werden beim „cycle sequencing“ am 5'-Ende IRD-markierte Primer verwendet. Die relativen Konzentrationen der dNTPs und ddNTPs, die in der Synthesereaktion eingesetzt werden, sind so aufeinander abgestimmt, dass in jeder Position des neu synthetisierten Stranges sowohl ein dNTP als auch ein ddNTP eingebaut werden kann. Durch wiederholte Zyklen von Hitze-denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Strang-Verlängerung (Extension) bzw. -Abbruch (Termination) werden IRD-markierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert. Da die eingesetzte DNA bei jedem Zyklus als Template für ein neues Primermolekül dient, kann die eingesetzte Menge DNA sehr gering gehalten werden.

Reaktionsansätze:

- DNA/Primer-Prämix

DNA (150 ng/Kb)	x µl
Primer 1 (1 pmol) oder	1,0 µl
Primer 2 (1 pmol)	1,0 µl
DMSO	1,0 µl
A. bidest	ad 21 µl

- Jeweils 1,5 µl A, C, G und T aus dem AMERSHAM-Kit werden in beschriftete 200 µl PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und mit jeweils 4,5 µl DNA/Primer-Prämix vermischt.
- Nach dem Überschichten mit Mineralöl werden die Ansätze in einem Thermocycler (Biometra, Trio-Thermoblock) mit folgendem Programm inkubiert.:

Primärdenaturierung:	2 min, 95°C	} 35 Zyklen
Denaturierung:	30 sec., 95°C	
Annealing:	30 sec., 52°C	
Extension:	30 sec., 72°C	
Finale Extension	3 min 72°C	

Nach Beendigung des Programms werden jedem der vier Ansätze 3 µl des 3 x DNA Ladepuffers (Amersham, Pharmacia) zugesetzt. Die Proben können nun bis zur Auftragung auf ein Sequenziergel 1-2 Wochen bei -20°C gelagert werden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte und Signaldetektion erfolgte mit dem automatischen „Licor DNA Sequencer“ (MWG). Das Gerät nimmt die Messdaten auf und verarbeitet die gesammelten Rohdaten mit Hilfe eines system-

eigenen Computerprogramms zu einem Sequenzausdruck. Dieser wird anschließend auf eventuelle Fehler hin überprüft und mit weiteren Analyseprogrammen ausgewertet.

### 3.2.13 Konstruktion der Deletionsmutanten

- a) Linearisierung des Plasmidringes mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease
- gegebenenfalls Aufkonzentrieren durch Ethanol-fällung
- b) Behandlung der linearisierten Plasmid-DNA mit der Exonuklease Bal31. Die Deletionsgeschwindigkeit liegt bei 60bp/min; 30°C >> Zeitreihe

Beispielansatz:	77µl	linearisierte DNA
	80µl	Bal31 2X Puffer
	3µl	Bal31 (12U)

- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von Zugabe von je (Zeitreihe)

	13µl	Ansatz
zu Mix aus	47µl	H <sub>2</sub> O
	und 60µl	Phenol/Chloroform (1:1)

- sofort gut schütteln!
  - 10min zentrifugieren
  - Obere (wässrige) Phase abnehmen und neues Reaktionsgefäß überführen
  - 1 Vol. Chloroform zugeben, schütteln, 10min zentrifugieren und obere (wässrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
  - Fällung der DNA mit 2 Vol. Ethanol und 0,1 Vol 3M Na-Acetat, gut mischen, 1h bei -20°C fällen, 10min zentrifugieren.
  - Pellet (nicht immer sichtbar) mit 700 µl 70% Ethanol waschen, 5min zentrifugieren, Überstand möglichst vollständig verwerfen.
  - Pellet kurz trocknen und in 20µl H<sub>2</sub>O aufnehmen.
- c) Nachschneiden mit geeigneter Restriktionsendonuklease, um definierte Enden zu generieren.
- d) Auffüllen der Restriktionsenden
- e) Religation der linearisierten, deletierten Plasmid-DNA zu einem Ring
- f) Transformation in DH5α

### 3.2.14 Klonierungsexperimente

Streng genommen bezeichnet das Wort „Klonieren“ nur die Phasen nach der Erstellung der rekombinanten DNA und nicht die Konstruktion des rekombinierten DNA-Moleküls als solche. Die Klonierung von DNA-Molekülen hat vor allem zwei Ziele: Zum Einen kann man auf diese Weise aus einer begrenzten Menge an Ausgangsmaterial eine große Menge rekombinierter DNA-Moleküle erzeugen und zum Anderen kann man sein Ausgangsmaterial auf diese Weise von unerwünschten Nebenprodukten reinigen. Zwei Möglichkeiten dieser Reinigung sind die Antibiotikaselektion oder die Lac-Selektion, bei *lacZ $\alpha$* -Gen tragenden Plasmiden. Um rekombinierte DNA-Moleküle klonieren zu können, müssen diese jedoch erst von Bakterienzellen aufgenommen werden. Besonders wirksam geht dies, wenn die DNA als ringförmiges Plasmid vorliegt und die Zellen eine hohe Bereitschaft zeigen DNA aufzunehmen. Diese Aufnahmebereitschaft bezeichnet man als Kompetenz und die Aufnahme der DNA als Transformation.

#### 3.2.14.1 Herstellung kompetenter Zellen (Calciumchlorid-Methode)

Die meisten Bakterienarten, darunter auch *E. coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Um solche Arten wirksam transformieren zu können, muss man die Zellen einer physikalischen und/oder chemischen Behandlung unterziehen, die ihre Fähigkeit DNA in ihr Inneres aufzunehmen, verstärkt. Eine Möglichkeit *E. coli* „kompetent“ zu machen, ist die Behandlung dieser Zellen mit eisgekühlter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung. Diese Behandlung verändert wahrscheinlich die Oberflächen der Bakterienzellen (Kompensierung negativer Ladungen), was zu einer besseren Anlagerung der DNA an die Zellen führt. Die eigentliche Aufnahme wird durch die Behandlung nicht beeinflusst.

- Anzucht des zu transformierenden *E. coli*-Stammes (DH5 $\alpha$ , S17-1) in 10 ml LB-Flüssigmedium bis zu einer o.D. von 0,6-0,8 (log-Phase, nach 2-3 h)
- Zellen abzentrifugieren (5 min, 8000 rpm, 4°C)
- Überstand verwerfen und Pellet in 5,0 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (4°C) vorsichtig resuspendieren. Im Folgenden sind zwei Vorgehensweisen möglich:
  - a) Zellen mindestens 30 min bei 4°C inkubieren, dann abzentrifugieren (5 min, 5000 rpm, 4°C) und Pellet in 1,0 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (4°C) resuspendieren.
  - b) Zellen ü.N. bei 4°C in der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung stehen lassen. Nachdem sich die Zellen am Boden abgesetzt haben, 4,0 ml vom Überstand entfernen.
- Die kompetenten Zellen (aus a und b) dürfen niemals warm werden. Lagerung bei 4°C im Kühlschrank ist für 1-2 Wochen möglich.

### 3.2.14.2 Herstellung Kompetenter Zellen (RubidiumChlorid-Methode), nach Hanahan, 1983

- 100 bis 250ml LB-Medium mit 5ml einer ü.N. Kultur des entsprechenden *E.coli* Stammes animpfen.
- Die Kultur bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,8 auf einem Schüttler inkubieren und anschließend abzentrifugieren.
- Das Pellet in 30-50ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendieren und mindestens 10 min auf Eis inkubieren.
- Erneut abzentrifugieren (4°C) und das Pellet in 4-10ml eiskaltem TfbII-Puffer resuspendieren. Alternativ ü.N. bei 4°C stehen lassen bis sich die Zellen am Boden abgesetzt haben. Überstand vorsichtig entfernen und das Pellet in 4-10ml eiskaltem TfbII-Puffer resuspendieren.
- Aliquots zu 200µl werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 3.2.14.3 Transformation

- 200 µl kompetente Zellen werden zusammen mit 5-15 µl Plasmid-DNA in ein vorgekühltes Kulturröhrchen (17 x 100 mm) oder ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig aber gründlich gemischt (nicht auf und ab pipettieren).
- Der Transformationsansatz wird 30 min auf Eis inkubiert.
- Hitzeschock: Das Kulturröhrchen für 2 min bei 42°C im Wasserbad inkubieren. In dieser Phase nicht schütteln.
- Kurze Inkubation auf Eis (2min) um den Ansatz abzukühlen und sofort 1,0 ml LB-Medium zugeben.
- Regenerationsphase: Die Zellen werden nun für 1 h bei 37°C geschüttelt.
- Ausplattieren der Zellen auf geeigneten antibiotikahaltigen TA-Selektionsplatten:  
100 µl des Ansatzes entnehmen und ausplattieren.  
Den Rest abzentrifugieren (1,5 min, 12000 rpm).  
Überstand entfernen, Pellet im Rücklauf resuspendieren und ausplattieren.
- Selektionsplatten ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubieren.

### 3.2.15 β-Glukuronidase-Tests

Die β-Glukuronidase (Abk. Gus) ist ein in vielen Bakterien vorkommendes Enzym, das Glukuronide spaltet. Als unphysiologische Substrate werden häufig 4-Nitrophenyl-β-D-glukuronid (PNPG) und 5-Bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-glukuronid (X-Gluc) eingesetzt. Die nach der Hydrolyse gebildeten Spaltungsprodukte, o-Nitrophenol bzw. 5-Brom-4-chlor-indigo, erlauben sowohl eine spektrophotometrisch leicht messbare *in vitro*-Aktivitätsbestimmung des Enzyms, als auch eine *in vivo*-Anfärbung von Zellen in denen β-Glukuronidase gebildet wird. Das für das Enzym kodierende Gen, *uidA*, wird in der Molekularbiologie häufig speziell als Reportergen für Expressionsstudien eingesetzt.

### 3.2.15.1 Bestimmung der $\beta$ -Glukuronidaseaktivität in freilebenden Rhizobien - Bakterien aus Flüssigkulturen (PNPG-Test)

Bei der Spaltung von PNPG durch die  $\beta$ -Glukuronidase wird gelb gefärbtes o-Nitrophenol freigesetzt, das bei 415 nm photometrisch gemessen werden kann. Liegt PNPG im Überschuss vor, so ist die Menge an gebildetem o-Nitrophenol nach einer definierten Reaktionszeit der Enzymmenge proportional. Die Enzymmenge kann mit Hilfe der unten angegebenen Formel nach Miller (1972) berechnet werden.

Die Schritte dieser Methode:

- Selektive Anzucht der Rhizobien in 10 ml TY-Flüssigmedium bei 30°C (2-3 Tage).
- Bestimmung der o.D.<sub>600</sub> von 1000 $\mu$ l der Kultur, TY-Medium als Referenz.
- 250  $\mu$ l Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben.
- 250  $\mu$ l Extraktionspuffer zugeben und 2 min bei 37°C inkubieren.
- 50  $\mu$ l PNPG-Lösung zugeben, sofort Zeit messen und bei 37°C inkubieren.
- Reaktion nach 5-30 min (je nach Farbintensität) durch Zugabe von 200  $\mu$ l (1 M) Natriumcarbonat-Lösung stoppen, gründlich mischen. Exakte Inkubationsdauer notieren.
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Sofort die o.D.<sub>415</sub> des Überstandes messen. Referenz TY-Medium mit gleicher Behandlung.

Berechnung der  $\beta$ -Glukuronidase-Units nach Miller (1972):

$$\beta\text{-Glukuronidase-Units: } 1000 \times \text{o.D.}_{415} \times V_{\text{Ges.}} \times (\text{o.D.}_{600} \times t \times V_{\text{Kultur}} \times 1,7)^{-1}$$

### 3.2.15.2 Histochemischer Nachweis von $\beta$ -Glukuronidaseaktivität in Wurzelknöllchen

#### 3.2.15.2.1 Pflanzenkultivierung und Inokulation mit Rhizobien

a) Sterilisation der *Pisum sativum*-Samen

- Erbsen in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkoblen füllen, mit konz. Schwefelsäure bedecken und leicht rühren.
- Nach 12-14 min beginnen, die Schwefelsäure abzuziehen. Dabei den Kolben auf Eis vorkühlen.
- Die Schwefelsäure anschließend mit sterilem Leitungswasser abwaschen. Beim ersten Waschschrift viel Wasser verwenden, um die Hitzeentwicklung gering zu halten und dieses schnell wieder gegen neues Wasser auswechseln. Im Nachfolgenden das Wasser ca. alle 20 min auswechseln (5-6 mal).

## b) Quellen der Erbsen

- Erbsen mit ausreichend frischem, sterilen Wasser überschichten und ü.N. bei 4°C im Kühlschrank quellen lassen.

## c) Keimung

- Autoklaviertes, feuchtes Vermiculit steril in Petrischalen füllen (ca. 5-6 Teelöffel).
- Wasser von den gequollenen Erbsen abgießen und ca. 20-30 Erbsen steril in die Petrischalen einbetten.
- Erbsen bei 22°C unter Spezial Pflanzenlampen (Fluora) nicht länger als 2,5 Tage keimen lassen.
- Jeweils 5 gekeimte Erbsen in sterilem Vermiculit (Behälter 15 x 15 x 10 cm, verschließbar) einpflanzen und mindestens eine Woche weiter wachsen lassen (22°C, Kunstlicht).

## d) Inokulation

- Wenn an den Erbsenkeimlingen deutlich Blätter zu sehen sind, können die Pflanzen inokuliert werden. Dazu Rhizobien mit einer (blauen) Pipettenspitze von einer frischen Selektionsplatte (2-3 Tage) herunternehmen und in 30 ml Pflanzennodulationsmedium resuspendieren.
- Diese Suspension gleichmäßig im Bereich der Wurzeln auf das Vermiculit tropfen.

## e) Wachstum und Ernte

- Die Pflanzen werden in der Klimakammer kultiviert und dabei nur mit Pflanzen-Nodulationsmedium gegossen. Darauf achten, dass das Vermiculit nicht zu nass ist.
- Nach 21-28 Tagen können die Wurzelknöllchen geerntet werden.

**3.2.15.2.2 Knöllchen-Schnitte, Färbung und Dokumentation**

Erst kurz vor Gebrauch werden die Pflanzen aus dem Vermiculit geerntet und gewaschen. Die Knöllchen werden mit einer Rasierklinge dicht an der Wurzel abgetrennt und mit Spezialkleber auf die Schnittunterlage des Vibratoms geklebt. Diese wird dann in die mit 50 mM Phosphatpuffer gefüllte Wanne eingesetzt. Die Schnitte werden mit Hilfe des Vibratoms in einer Dicke von 80-120 µm als Longitudinalschnitte angefertigt und gleich in 3,0 ml Gus-Puffer für 1-3 h bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wird der Puffer durch 3,0 ml Fixierungslösung (2% w/v Glutardialdehyd in 50 mM PO<sub>4</sub>-Puffer) ersetzt und für mindestens 45 min oder ü.N. inkubiert. Zur Entfernung möglicher Klebstoffreste können die Schnitte anschließend für wenige Minuten in Aceton gebadet werden. Die Dokumentation erfolgt fotografisch.

### 3.2.16 Bestimmung der Nitrogenaseaktivität im Acetylen-Reduktionstest

Die Nitrogenase akzeptiert nicht nur molekularen Stickstoff, sondern auch einige andere Substanzen, wie z.B. Acetylen als Substrat. Dieses wird durch die Nitrogenase zu Ethen umgesetzt (reduziert). Da sowohl Acetylen als auch Ethen leicht gaschromatographisch getrennt und quantifiziert werden können eignet sich diese Methode zur Messung der Nitrogenaseaktivität.

In der Gaschromatographie macht man sich die unterschiedliche Flüchtigkeit der Probenmoleküle zunutze. Sie ermöglicht die Trennung von gasförmigen Substanzen oder auch verdampfbaren Mischungen. Die gasförmige Mischung wird mit dem Strom eines inerten (nicht reagierenden) Gases durch eine  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -beschichtete Kapillarsäule großer Länge transportiert. Üblicherweise besteht eine Säule für die Gaschromatographie aus einem spiralförmig gebogenen Metallrohr. Im Inneren des Rohres befindet sich, wie bei der Säulenchromatographie, die stationäre Phase. Am Ende des Rohres werden die zu unterschiedlichen Zeitpunkten eintreffenden Bestandteile der Mischung durch einen Flammen-Ionisations-Detektor nachgewiesen.

Bei der Ionenchromatographie wird das zu untersuchende Gas ionisiert, d.h. in elektrisch geladene Fragmente zerlegt. Dies gelingt z.B. mit Hilfe einer heißen Flamme, durch Röntgenstrahlung oder durch radioaktive Strahlung.

Die Schritte dieser Methode:

- Die mit Knöllchen bewachsenen Teile der Wurzel einer Pflanze werden trocken-geputzt in ein Kulturröhrchen (17 x 100 mm) gegeben und mit einem Gummistopfen verschlossen. Knöllchen nach der Messung ohne Wurzelmaterial wiegen.
- 1,0 ml Acetylen gas wird durch den Gummistopfen in das Röhrchen injiziert.
- Inkubation der Röhrchen für 3-5 h bei Raumtemperatur.
- 100  $\mu\text{l}$  Gas werden aus dem Röhrchen entnommen und in den vorbereiteten Gaschromatographen injiziert.
- Die beiden zu untersuchenden Gase Acetylen und Ethen werden im Gaschromatographen (Hewlett-Packard HP5890; Säule: HP Plot  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 15 m, 0,53 mm, 15  $\mu\text{m}$  Filmdicke) getrennt und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors quantitativ bestimmt.
- Ein angeschlossener Integrator ermittelt direkt die Flächen unter den Peaks der entsprechenden Gase und errechnet deren prozentuale Anteile im Gasgemisch.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Kartierung der *nifA* Promotorregion

#### 4.1.1 Grobkartierung der *nifA* Promotorregion über vorhandene Restriktionsschnittstellen

Vorausgegangene Untersuchungen des *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 *nifA*-Promotors hatten gezeigt, dass dieser nicht mehr funktionell ist, sobald die Region stromaufwärts des *nifA* Gens auf weniger als 129 bp verkürzt wird. In diesem Teil der Arbeit sollte nun untersucht werden, welche der stromaufwärts des *nifA* Gens gelegenen Elemente tatsächlich einen funktionellen Promotor beinhalten. Dazu wurden mittels auf dieser Region vorhandener Schnittstellen DNA Fragmente ausgeschnitten und vor ein *uidA* Reporter gen kloniert. Auf diese Weise konnte die Transkriptionsaktivität jedes einzelnen Fragmentes bestimmt werden.

Als Ausgangsplasmid diente das Plasmid pUC18HE*nifA*up, welches ein 2883bp großes *HindIII/EcoRI nifA*-Fragment kloniert in ein pUC18 Vektor darstellt (Abb. 4.1). Auf diesem *HindIII/EcoRI nifA*-Fragment wurde zuvor *in vitro* mittels einer ortsgerechten Mutagenese eine zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt.

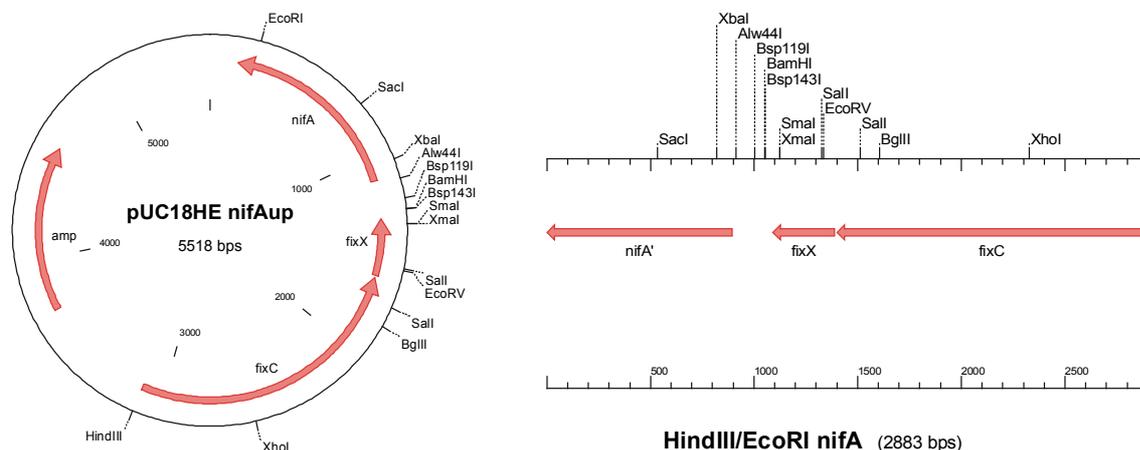


Abb. 4.1: Darstellung des diesen Versuchsteiles zu Grunde liegenden Plasmides pUC18HE*nifA*up, sowie der auf diesem Plasmid klonierten *HindIII/EcoRI nifA* Sequenzen.

Der Vektoranteil dieses Plasmides wird durch pUC18 gestellt. Die rechts aufgeführte Genregion aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 wurde als *HindIII/EcoRI* Fragment in den pUC18 Vektor umklontiert. Das Plasmid trägt im Bereich der *fixX-nifA* intergenischen Region eine zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle, die *in vitro* über eine ortsgerechte Mutagenese eingeführt wurde. Abkürzungen: *amp*: Ampicillinresistenz.

#### 4.1.1.1 Klonierung der *nifA* Promotorfragmente und Konstruktion der Reporterfusionen

Alle Reporterfusionen wurden mit Hilfe des Plasmids pJP2 (Prell *et al.*, 2002; Abb. 4.2) erstellt, das in Rhizobien stabil replizierbar ist. Der Einsatz von Plasmidkonstrukten bei der Bestimmung der Promotoraktivität bietet im Gegensatz zu chromosomalen Integrationen verschiedene Vorteile. Mit Plasmidkonstrukten ist es möglich, Reporteraktivitäten im Wildtypintergrund sowie in verschiedenen Mutanten zu messen. Im Gegensatz dazu entsprechen chromosomale Integrationen nie dem Wildtyp und erzeugen in der Regel Mutationen, Genduplikationen oder unterbrechen Operonstrukturen. Dies kann wiederum unerwünschte Sekundäreffekte hervorrufen (z.B. auf die Expression von Nachbargenen), wodurch die eigentlich erwünschten Effekte verfälscht werden können. Ein weiterer Nachteil bei chromosomalen Integrationen ist, dass deren genaue und richtige Lokalisation immer erst über PCR oder Southern Hybridisierung nachgewiesen werden muss. Neben der einfachen Handhabung von Reporterplasmiden muss jedoch auch erwähnt werden, dass die nicht genau zu bestimmende Kopienzahl der Plasmide und die damit verbundene Promotorvervielfältigung ein Problem darstellen kann. Weiterhin müssen *in trans* wirkende Plasmidkonstrukte in der Regel durch Selektionsdruck stabil gehalten werden, was vor allen unter symbiontischen Bedingungen im Wurzelknöllchen ein Problem darstellt, da das Selektionsagens hier schwer zu applizieren ist. Das pJP2-Plasmid ist jedoch so konstruiert, dass eine Stabilität im Wurzelknöllchen während der Symbiose weitgehend gewährleistet ist. Die Basis des pJP2 Vektors bildet pTR102, ein Konstrukt von Weinstein *et al.* (1992). Neben seinem weiten Wirtsbereich unter *Gram*-negativen Bakterien und der Eigenschaft, dass es in geringer Kopienzahl vorliegt, bietet dieses Plasmid den Vorteil, dass es durch Konjugation mobilisierbar ist. Neben den Stabilitätsgenen und zwei Resistenzgenkassetten, die eine Selektionierbarkeit gegen Ampicillin und Tetracyclin ermöglichen, trägt das pJP2 Plasmid eine künstliche Polyklonierstelle (Multiple Cloning Site) und eine promotorlose *uidA* Gus-Kassette. Zwischen der Polyklonierstelle und der *uidA* Gus-Kassette wurden weiterhin eine Ribosomenbindestelle (GAGG, Abstand 5 Basenpaare vom Startcodon) und drei Stopcodons in allen drei Leserahmen eingefügt. Letztere sollen die Ausbildung unerwünschter Translationsfusionen unterbinden (Abb.4.2).

Zur Erzeugung der *nifA*-Promotor Reporterenderivate wurden 18 verschiedene Restriktionsfragmente aus pUC18HEnifA ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pJP2 umkloniert. Da nicht alle *nifA*-Fragmente auf Grund ihrer Schnittstellen mit der Polyklonierstelle im pJP2-Vektor direkt kompatibel waren, musste zur Klonierung

dieser Fragmente der Klonier- und Sequenziervektor pBlueskript KSII als Klonierhilfe genutzt werden.

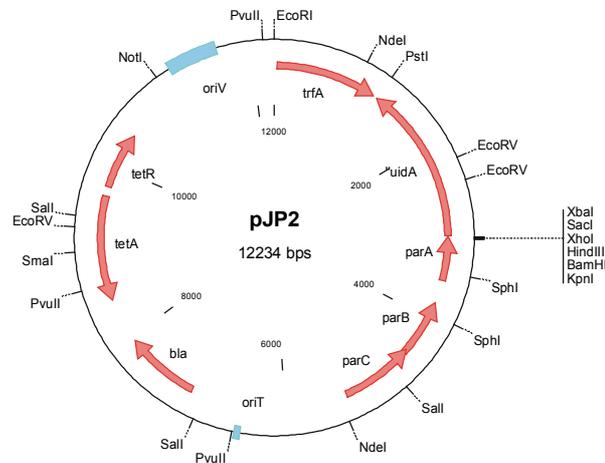


Abb. 4.2: Plasmidkarte des zur Konstruktion von Reporterengenfusionen genutzten Plasmides pJP2.

Die Stabilität während der Differenzierung im Wurzelknöllchen wird durch die *par* Stabilitätsfunktionen aus RK2 gewährleistet. Die *par* Region auf dem pJP2 Vektor kodiert für 5 Gene in zwei entgegengesetzt orientierten Operons (*parDE* und *parCBA*). Wichtig für die Stabilität ist anscheinend nur das *parDE* Operon, welches Gene eines "postsegregational killing mechanism" expremiert. Durch ein Toxin/Antitoxin System wird so das Überleben plasmidfreier Tochterzellen unterbunden (Easter et al. 1997, 1998). Die Funktion des *parCBA* Operons ist noch nicht geklärt. Abkürzungen: *trfA*: Replikationsstart von RK2, *oriT*: Konjugationsstart von RK2, *uidA*:  $\beta$ -Glukuronidase (GUS), *parCBADE*: Stabilitätsfunktionen aus RK2, *bla*: Ampicillinresistenz, *tetAR*: Tetracyclinresistenz, *oriV*: Replikationsstart aus RK2.

Zur Konstruktion der Reporterengenkonstrukte der pJP *Alw44I/SaI-nifA*, pJP *Bsp119I/SaI-nifA* und pJP *Bsp143I/SaI-nifA* wurde der Vektor pUC18HEnifA in drei verschiedenen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen *Alw44I*, *Bsp119I* und *Bsp143I* geschnitten. Nach dieser Restriktion erfolgte das Auffüllen der Restriktionsenden, so dass glatte Schnittstellen entstanden. In einer zweiten Restriktion wurde die DNA aller drei Ansätze mit der Restriktionsendonuklease *SaI* gespalten und diese dann gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aus dem Gel wurden gemäß der oben aufgeführten Reihenfolge drei Fragmente der Größe 411bp, 320bp und 273bp eluiert, aufgereinigt und *SaI/SmaI* in den Vektor pBlueskriptKSII umkloniert. Aus den drei resultierenden Vektoren erfolgte dann über die Schnittstellen *XbaI* und *XhoI* die Klonierung in den Vektor pJP2 (Abb.4.3).

Die Konstruktion der Reporterengenfusionen pJP *BamHI/HindIII-nifA*, pJP *SmaI/HindIII-nifA*, pJP *XbaI/SmaI-nifA*, pJP *BglII/HindIII-nifA*, pJP *BglII/XhoI-nifA*, pJP *BamHI/SmaI-nifA* und pJP *BamHI/SaI* erfolgte ebenfalls unter Verwendung von pBlueskriptKSII. Die *nifA*-Fragmente wurden in verschiedenen Klonierungen *BamHI/HindIII*, *SmaI/HindIII*, *XbaI/SmaI*, *BglII/HindIII*, *BglII/XhoI*, *BamHI/SmaI* und

*Bam*HI/*Sal*I aus dem Ausgangsvektor in pBlueskript umklontiert und von dort aus unter Verwendung der Schnittstellen *Xba*I und *Xho*I in pJP2 eingebracht (Abb.4.3).

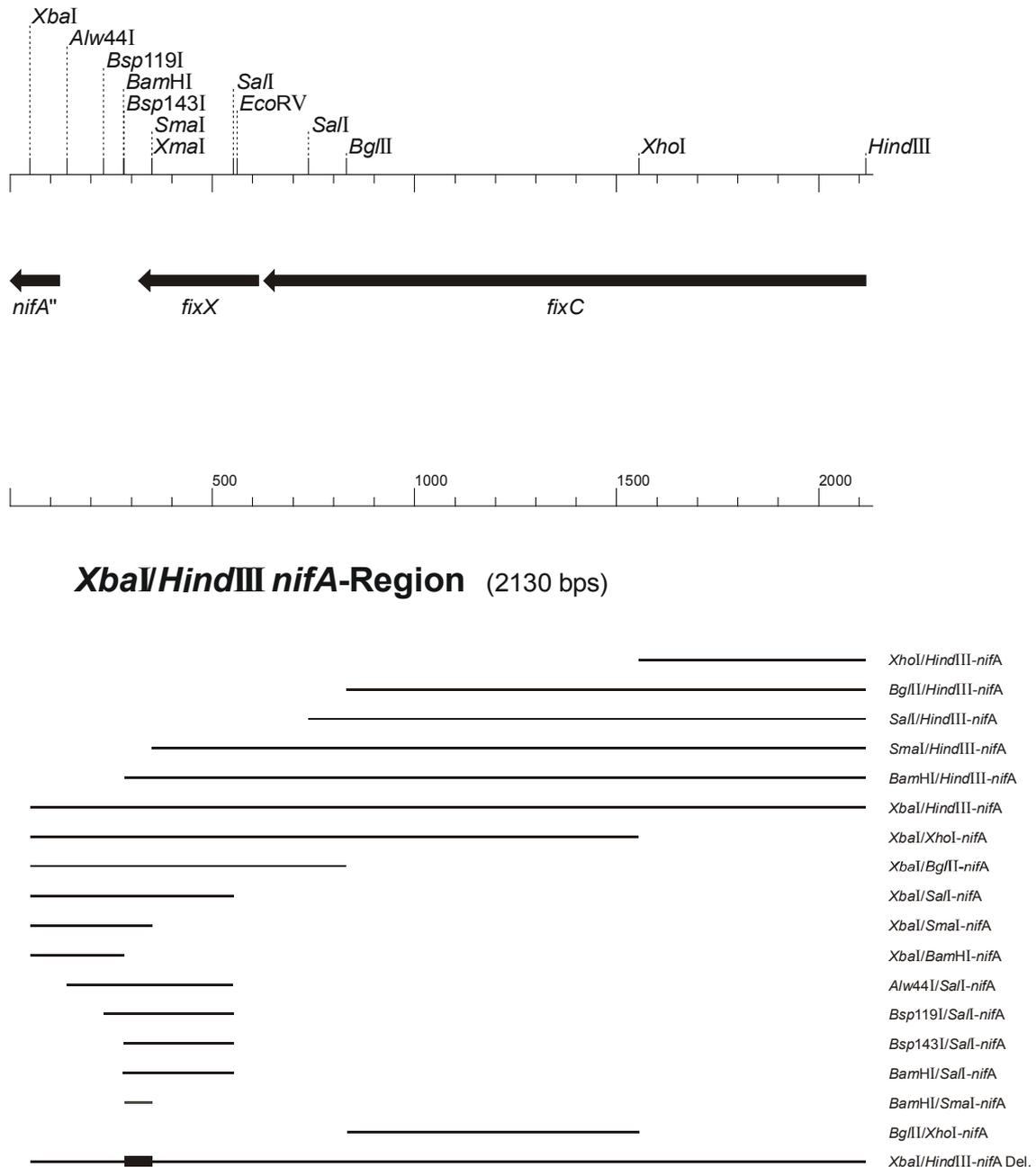


Abb. 4.3: Konstruktion der Reporterfusionen zur Grobkartierung des *nifA*-Promotors.

Die schwarzen Balken geben die Regionen an, die zur Aktivitätsbestimmung des *nifA*-Promotors in der Vektor pJP2 kloniert wurden. Bei allen 18 verschiedenen Konstrukten wurde auf vorhandene Schnittstellen des *Xba*I/*Hind*III-Fragmentes zurückgegriffen. Die Position der Schnittstellen, die Lage der auf diesem Fragment lokalisierten Gene, sowie Gen-Fragmente (dicke schwarze Pfeile) und die dazu gehörigen Größenangaben (in Basenpaaren; bps) sind auf der Restriktionskarte zu ersehen. Der schwarze Balken auf der Deletionsmutante *Xba*I/*Hind*III-*nifA* Del. gibt den deletierten Bereich dieser Mutante an.

Bei den Konstrukten pJP *XbaI/HindIII-nifA* (Abb.4.4), pJP *XhoI/HindIII-nifA*, pJP *XbaI/XhoI-nifA*, pJP *XbaI/BamHI-nifA*, pJP *XbaI/BglII-nifA*, pJP *XbaI/SalI-nifA* und pJP *SalI/HindIII-nifA* konnten die jeweiligen Schnittstellen genutzt werden, um die Fragmente direkt aus pUC18HEnifAup in pJP2 zu klonieren. Es wurde lediglich bei den Konstrukten pJP *XbaI/BglII-nifA*, pJP *XbaI/SalI-nifA* und pJP *SalI/HindIII-nifA* ausgenutzt, dass die Schnittstellen *XhoI* und *SalI* bzw. *BamHI* und *BglII* zueinander kompatible Enden ausbilden und somit kloniert werden können. Da bei solchen Klonierungen die Erkennungssequenzen der beteiligten Restriktionsendonukleasen verändert werden, gehen die Schnittstellen hier verloren (Abb. 4.3).

Das letzte Konstrukt dieser Klonierungsreihe stellt eine pJP *XbaI/HindIII-nifA* Fusion dar, aus der jedoch der zentrale *BamHI/SmaI*-Bereich entfernt wurde. Aus dem Ausgangsplasmid wurde dazu mit Hilfe der Enzyme *XbaI* und *HindIII* die *nifA* Region ausgeschnitten und in pBlueskriptKSII umkloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SmaI* und *BamHI* geschnitten, die Restriktionsenden aufgefüllt und das geschnittene Plasmid religiert. Durch diese Prozedur wurde der zentrale Bereich auf einfache Weise deletiert. Aus dem resultierenden Plasmid wurde die *nifA*-Region *XbaI/XhoI* in den pJP2-Vektor umkloniert (Abb. 4.3).

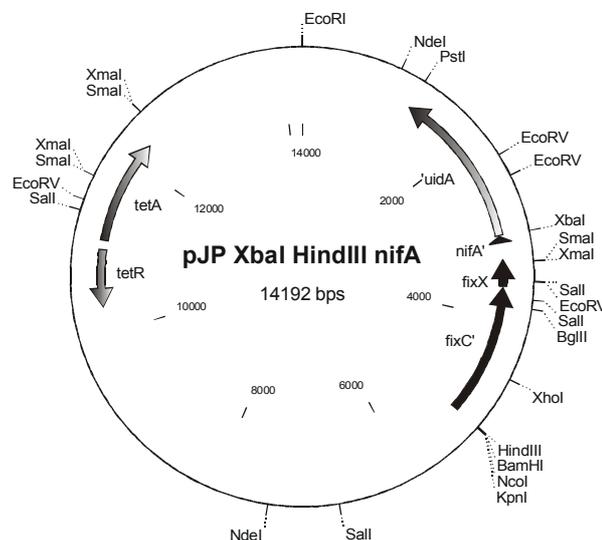


Abb. 4.4: Exemplarische Darstellung eines pJP-*nifA* Reportergenkonstruktes.

Die hier vor das Gus-Reportergen *uidA* klonierte *nifA* Region ist ein 2063bp großes *XbaI/HindIII-nifA* Fragment. Darauf enthalten sind die ersten 74 Basen des *nifA*-Gens, das vollständige *fixX*-Gen sowie der größte Teil des *fixC*-Gens (schwarz durchgefärbte Pfeile). Alle anderen in diesem Versuch konstruierten Reportergenfusionen sind prinzipiell nach dem gleichen Muster aufgebaut. Es wurden jedoch andere *nifA*-Fragmente vor das *uidA*-Gen kloniert. Abkürzungen: *tetAR*: Tetracyclinresistenz, *uidA*:  $\beta$ -Glukuronidase (Gus).

#### 4.1.1.2 Mobilisierung der Reporterfusionen in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39

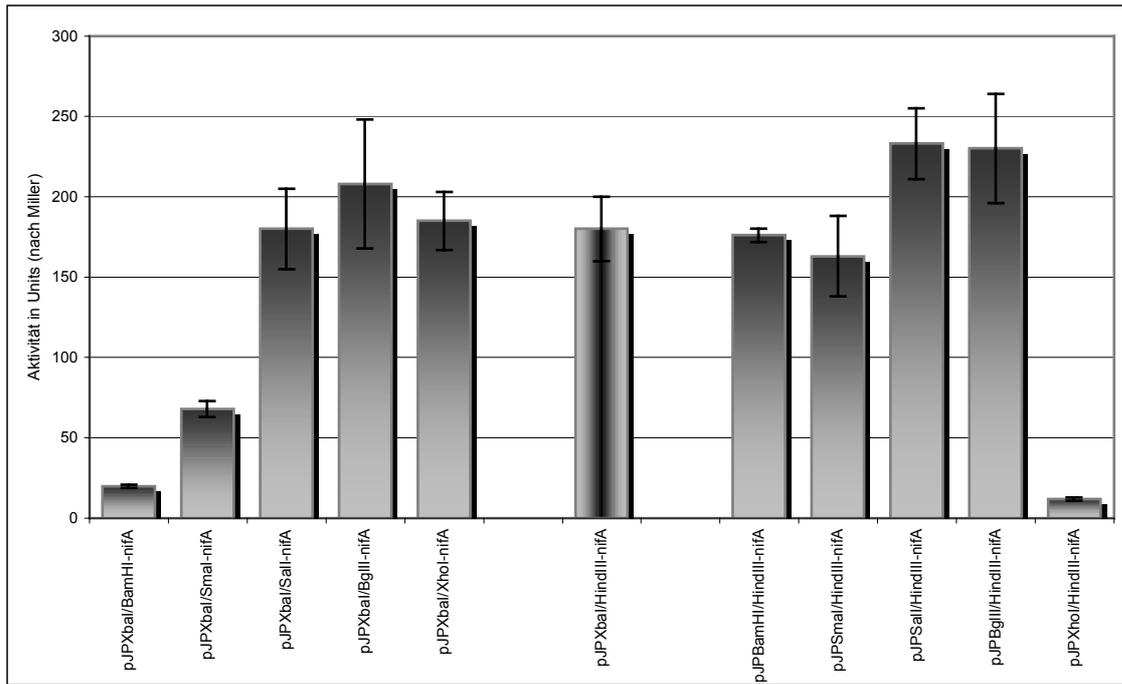
Mobilisierbare Vektoren, wie die *nifA*-Reporterfusionen, basieren auf dem Vektor pJP2 und zeichnen sich durch den Besitz einer Mobilisierungsregion (*mob*-site, *oriT*) aus, die von Transferfunktionen als Startstelle für einen Plasmidtransfer erkannt wird. Weiterhin hat der Vektor pJP2 und alle auf ihm basierenden Konstrukte die Eigenschaft sowohl in *E. coli* als auch in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 replizierbar zu sein (broad host range). Die Mobilisierung aus *E. coli* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 erfolgte über den *E. coli*-Stamm S17-1. Dieser besitzt integriert im Genom die Transferfunktionen aus RP4 und kann daher Plasmide, die einen *oriT* bzw. eine *mob*-Site tragen, mobilisieren (Simon *et al.*, 1983).

Nach der Mobilisierung wurden die Bakterien auf streptomycin- und tetracyclinhaltigen TY-Platten ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert. Über die Tetracyclinresistenz erfolgte eine Selektion auf Derivate, die die auf pJP2 basierten Konstrukte enthielten, wohingegen die Streptomycinresistenz auf eine Selektion gegen *E. coli* und auf *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 abzielte. Letztere wird durch eine chromosomal in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 verankerte Streptomycinresistenz ermöglicht. Von den gewachsenen Kolonien wurden jeweils vier Kolonien in TY-Flüssigmedium (Streptomycin/Tetracyclin) übertragen und für 2-4 Tage bei 30°C langsam gerollert (mikroaerobe Bedingungen), bis die Kultur eine optische Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,4 bis 0,8 erreicht hatte. Als Referenz diente das Derivat VF39 pJP *XbaI/HindIII-nifA*. Das darin enthaltene pJP-Konstrukt beinhaltet einen kleinen Teil des *nifA*-Gens, die vollständige *nifA*-Promotorregion, das vollständige *fixX*-, sowie große Teile des *fixC*-Gens (Abb.4.4) und spiegelt somit die Wildtypsituation dieser Region vollständig wieder. Elemente wie eine "Upstream Activator Sequence", die gewöhnlich stromaufwärts des *nifA* Promotors lokalisiert sind, sollten ebenso auf diesem Fragment vorhanden sein, wie Bereiche, die eventuell von stromabwärts des *nifA* Promotors einen Einfluss auf diesen ausüben könnten.

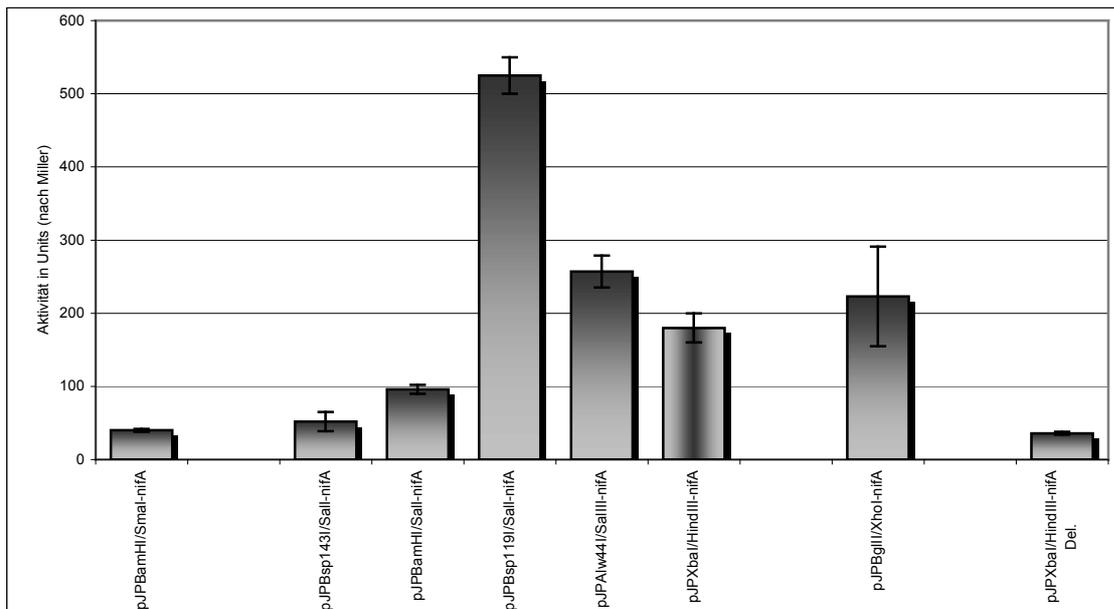
#### 4.1.1.3 Bestimmung der Aktivität der *nifA*-Reporterfusionen unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend)

Die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität wurde in allen Versuchsansätzen mit Hilfe des PNP-G-Tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.5A/B dargestellt.

Aus Abb. 4.5 A wird deutlich, dass die Aktivität des *nifA*-Promotors bei Deletionen in Richtung *nifA* bis zum Derivat VF39 *XbaI/SalI-nifA* konstant auf einem Level bei etwa 180-200 Units bleibt. Deletionen in dieser Region haben also keinen Effekt auf die *nifA*-Expression. Dehnt man die Deletionen weiter in Richtung *nifA*, über die *SalI*-



A)



B)

Abb. 4.5: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der 18 *nifA*-Reportergenkonstrukte (Grobkartierung) unter mikroaeroben Bedingungen.

In Abb. 4.5 A sind zur besseren Übersicht nur 11 der 18 Deletionsmutanten dargestellt. Der Wildtyp (Referenz, Mitte) *XbaI/HindIII-nifA* ist durch ein anderes Muster hervorgehoben. Die zwei Blöcke rechts und links der Referenz spiegeln die Deletionen ausgehend von der Referenz wieder. Links die Deletionen Richtung *nifA* (stromabwärts) und rechts die Deletionen Richtung *fixA* (stromaufwärts).

In Abb. 4.5 B sind die weiteren Deletionsmutanten dargestellt. Als Referenz steht wieder der Wildtyp *XbaI/HindIII-nifA* und ist wiederum zur deutlicheren Darstellung in einem anderen Muster hervorgehoben.

Schnittstelle hinweg aus, ist eine deutliche Abnahme der Promotoraktivität auszumachen. Die Aktivitäten, die im Derivat VF39 *XbaI/SmaI-nifA* bzw. im Derivat

VF39 *XbaI/BamHI-nifA* gemessen werden, sind mit etwa 96 und 40 Units deutlich auf die Hälfte bzw. ein Fünftel der Wildtypaktivität reduziert.

#### **4.1.1.4 Bestimmung der Aktivität der *nifA*-Reporterfusionen in der Symbiose mit *Pisum sativum***

In diesem Versuch sollte untersucht werden, welche Aktivitäten die in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 mobilisierten *nifA*-Reporterfusionen in der Symbiose mit *Pisum sativum* aufweisen. Dazu wurden Versuchspflanzen mit den verschiedenen *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39-Mutanten angeimpft und für etwa 21 Tage in einer Klimakammer kultiviert. Im Folgenden wurden die Wurzelknöllchen geerntet und die *nifA*-Expression der darin enthaltenen Bakteroiden bestimmt. Da alle Transkonjuganten in ihrer Basis dem Wildtyp entsprechen und daher auf jeden Fall in der Lage sind, Stickstoff zu fixieren, wurde hier die *nifA*-Genaktivitäten lediglich unter Verwendung des PNPG-Tests bestimmt und auf eine Bestimmung der Nitrogenaseaktivität verzichtet.

Die Untersuchung der VF39-Derivate unter symbiontischen Bedingungen (Abb. 4.6) zeigt deutlich, dass für eine vollständige *nifA*-Expression mindestens der Bereich von der *XbaI*-Schnittstelle im *nifA*-kodierenden Bereich bis zur *SalI*-Schnittstelle vorhanden sein muss. Werden die Deletionen weiter in Richtung *nifA* ausgedehnt, wie das bei den Derivaten VF39 *XbaI/SmaI-nifA* und VF39 *XbaI/BamHI-nifA* der Fall ist, so zeigen diese mit 125 Units bzw. 31 Units nur ein fünftel bzw. ein zwanzigstel der Kontrollaktivität (650-700 Units). Zwar sind diese beiden Derivate im Vergleich zu den mikroaeroben Bedingungen in ihrer Aktivität um den Faktor 1,5 - 2 erhöht, dennoch kann man hier nicht von einer Induktion der *nifA*-Expression unter symbiontischen Bedingungen sprechen.

Eine solche eindeutige Induktion liegt bei den Derivaten VF39 *XbaI/SalI-nifA*, VF39 *XbaI/BglII-nifA*, VF39 *XbaI/XhoI-nifA* und VF39 *XbaI/HindIII-nifA* vor. Hier steigt die Aktivität um den Faktor 4 von etwa 180 Units (mikroaerob) auf etwa 700 Units (symbiontisch). Betrachtet man auf der anderen Seite die Aktivitäten der Derivate VF39 *BamHI/SmaI-nifA* und VF39 *BamHI/SalI* so wird deutlich, dass der *nifA* Promotor auch Sequenzen stromabwärts der *BamHI*-Schnittstelle benötigt, um vollständig aktiviert und induziert werden zu können. Obwohl alle notwendigen Sequenzen im stromaufwärts gelegenen Bereich (*SalI*) auf dem Derivat VF39 *BamHI/SalI* vorhanden sind, zeigt dieses nur ein Drittel bis ein Viertel der Kontrollaktivität in der Symbiose. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Messung unter mikroaeroben Bedingungen, wo das gleiche Phänomen beobachtet werden konnte.

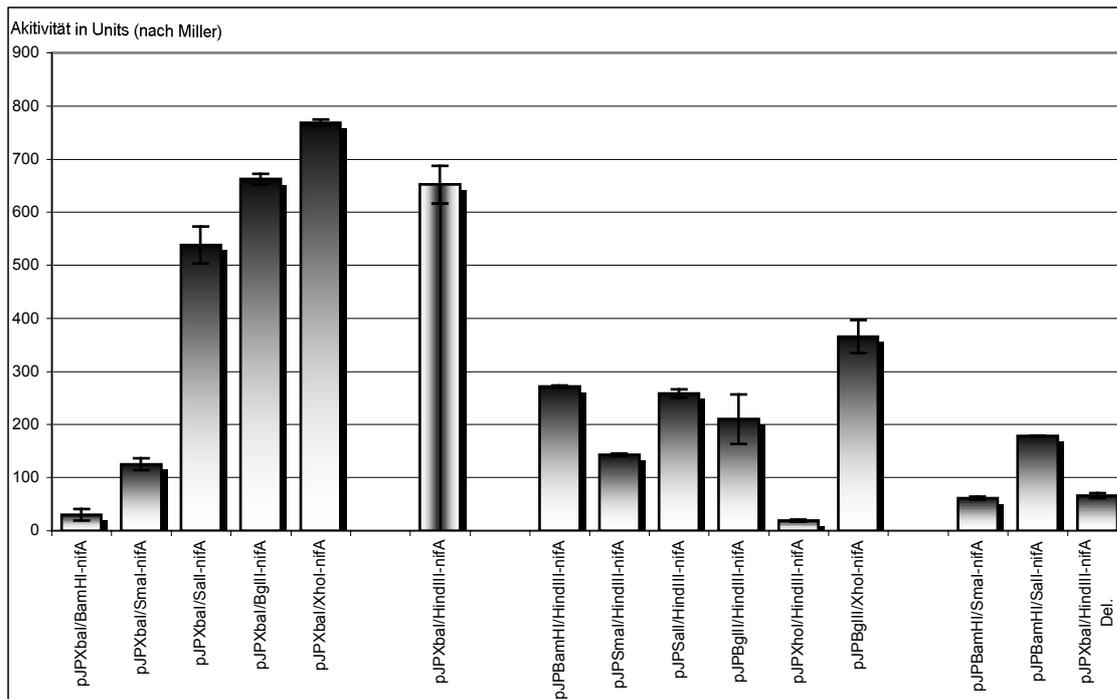


Abb. 4.6: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der *nifA*-Reportergerkonstrukte (Grobkartierung) unter symbiotischen Bedingungen.

Die Kontrolle (Wildtyp, Mitte) *XbaI/HindIII-nifA* ist durch ein anderes Muster hervorgehoben. Die zwei Blöcke rechts und links der Referenz spiegeln die Deletionen ausgehend von der Referenz wieder. Links die Deletionen Richtung *nifA* (stromabwärts) und rechts die Deletionen Richtung *fixA* (stromaufwärts).

Die drei Säulen im rechten Block stellen Mutanten dar, bei denen gezielt nur der P1-Promotor untersucht wurde.

Im Vergleich zum P1- und P2-Promotor zeigt der P3-Promotor (siehe 4.1.1.5) keinerlei Induktion während der Symbiose. Seine Aktivität liegt sowohl während der Symbiose als auch unter mikroaeroben Bedingungen bei unverändert 200-250 Units. Die um 50% erhöhte Aktivität des Derivates VF39 *BglII/XhoI-nifA* fällt ein wenig aus diesem Muster und könnte eventuell durch Messungenauigkeiten erklärt werden, da es das einzige Derivat ist, das derart abweicht. Weiterhin zeigt das Derivat VF39 *SmaI/HindIII-nifA* genau wie unter mikroaeroben Bedingungen eine leicht aber deutlich reduzierte P3-Promotoraktivität. Das Derivat VF39 *XbaI/BamHI-nifA* Del. zeigt in der Symbiose die gleiche reduzierte Aktivität wie unter mikroaeroben Bedingungen. Obwohl der Promotor P2 vollständig vorhanden ist, liegt die Aktivität dieser Mutante mit nur 70 Units um den Faktor zehn unter Kontrollaktivität. Interessant ist weiterhin, dass die Aktivität dieses Derivates derart niedrig ist, obwohl der P3-Promotor vollständig vorhanden ist. Die von ihm ausgehende Aktivität von 200-250 Units ist jedoch nicht messbar.

#### 4.1.1.5 Interpretation der bisherigen Ergebnisse

Vorausgegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass das *nifA*-Gen von zwei Promotoren aus transkribiert werden könnte. Bei der Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte mittels "Primer extension" in der Symbiose konnten zwei deutlich voneinander separierbare Signale detektiert werden. Die auf diese Signale zurückzuführenden Promotoren wurden mit P1 und P2 bezeichnet. Der zum Promotor P1 gehörige Transkriptionsstartpunkt liegt 4-5 bp stromabwärts des *fixX*-Stopcodons, der Transkriptionsstartpunkt des P2-Promotors liegt inmitten der *fixX-nifA*-intergenischen Region, 120 bp stromabwärts des *fixX*-Stopcodons. Auf Grund der Signalstärke, die unter symbiontischen Bedingungen bei P2 etwa um den Faktor 3-5 höher liegt als bei P1, wurde dem P2-Promotor die bedeutendere Rolle bei der Expression von *nifA* zugesprochen.

Die Ergebnisse der mikroaeroben Messung und der Messung unter symbiontischen Bedingungen geben Grund zu einigen Spekulationen bezüglich der Aktivität der *nifA*-Promotoren. Bei Betrachtung der Messergebnisse unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Lage von P1, scheinen die Resultate der Messung mit den Erwartungen an eine Promotoraktivität an dieser Position in Einklang zu stehen. Das Derivat VF39 *XbaI/SalI-nifA* stellt auf die Größe bezogen alle notwendigen Voraussetzungen für eine 100%ige Promotoraktivität zu Verfügung. Dies wird durch die Messwerte bestätigt. Das Derivat VF39 *XbaI/SmaI-nifA* kann jedoch schon alleine auf Grund des geringen DNA-Bereiches stromaufwärts des P1-Promotors keine volle Aktivität erlangen. Ein -12/-24 Promotor würde zwar gut und ein -10/-35 Promotor würde gerade eben auf diesen etwa 38 bp umfassenden Bereich stromaufwärts des P1-Transkriptionsstarts passen, jedoch ist der DNA-Bereich nicht groß genug, um mögliche, für eine volle Promotoraktivität notwendige, stromaufwärts gelegene Elemente, wie eine UAS oder ähnliches zu beinhalten. Die Messwerte bestätigen das deutlich. Verwunderlich ist jedoch die noch verhältnismäßig hohe Aktivität von etwa 68 Units (mikroaerob), die einem Aktivitätsverlust des P1-Promotors von 60-70% entspricht. Unter symbiontischen Bedingungen ist ein nahezu identischer Effekt festzustellen. Der Promotor scheint auf diesem Reporter-genkonstrukt demnach noch auf einem Basislevel zu funktionieren. Für seine volle Aktivität notwendige Elemente können anscheinend jedoch nicht fördernd eingreifen. Das Derivat VF39 *XbaI/BamHI-nifA* hat mit seiner geringen Aktivität von etwa 20 Units (mikroaerob und symbiontisch) eine so geringe Expressionsrate, dass hier nicht von einer tatsächlichen Promotoraktivität gesprochen werden kann. Dieser fast als "Hintergrundrauschen" anzusehende Wert ist konform damit, dass der P1-Promotor in dieser Mutante deletiert

ist. Diese Überlegungen können jedoch nur dann als richtig bezeichnet werden, wenn der P1-Promotor, wie hier geschehen, für sich alleine betrachtet wird.

Der P2-Promotor ist dagegen auf dem Derivat VF39 *XbaI/BamHI-nifA* nicht deletiert. Wenn die Aktivitäten der zuvor besprochenen VF39-Derivate in Bezug auf den P2-Promotor analysiert werden, so hat es den Anschein, als ob der P2-Promotor einen sehr großen stromaufwärts gelegenen Bereich braucht, um seine vollständige Aktivität entfalten zu können. Die etwa 85 stromaufwärts des P2-Promotors vorhandenen Nukleotide des Derivates VF39 *XbaI/BamHI-nifA*, wie auch die etwa 150 Nukleotide des Derivates VF39 *XbaI/SmaI-nifA* scheinen nicht für die volle Aktivierung dieses Promotors auszureichen. Die bei anderen Spezies für die *nifA*-Expression notwendige UAS liegt in einem Bereich bis etwa 180 bp stromaufwärts des *nifA*-Promotors. Da die Bereiche auf den *BamHI*- und *SmaI*-Derivaten diesen Bereich nicht mit einschließen, könnte dies eine Erklärung für die niedrige Aktivität sein. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass auch auf dem pJP-Expressionsvektor, der in das VF39-Derivat *XbaI/SalI-nifA* mobilisiert wurde, keine Sequenzen zu erkennen sind, die auf das Vorhandensein einer derartigen "Upstream Activator Sequence" hindeuten.

Die Resultate der Deletionen in Richtung stromaufwärts der Promotoren P1 und P2 (Abb. 4.5a, Abb. 4.6 Säulenblock rechts der Kontrolle) geben einige Fragen zu bedenken. Obwohl der P2-Promotor auf dem Derivat VF39 pJP *BamHI/HindIII-nifA* deletiert ist, zeigt dieses Derivat eine erstaunlich hohe Aktivität. Diese liegt mikroaerob auf Wildtypniveau bei etwa 180 Units und unter symbiontischen Bedingungen bei etwa 250 Units. Ähnlich verhält es sich mit dem Derivat VF39 *SmaI/HindIII-nifA*. Die symbiontische Aktivität ist jedoch hier geringer, was wahrscheinlich in der fehlenden P1-Promotoraktivität begründet ist. Erstaunlich ist, dass obwohl hier sowohl der P2- als auch der P1-Promotor deletiert sind, eine deutliche Aktivität gemessen werden kann. Eine Erklärung hierfür liefern die beiden Derivate VF39 *SalI/HindIII-nifA* und VF39 *BglII/HindIII-nifA* und geben Grund zu der Annahme, dass sich stromaufwärts des P1-Promotors ein weiterer Promotor befindet. Bestätigt werden kann diese Annahme eindeutig durch das Derivat VF39 *BglII/XhoI-nifA* (Abb. 4.5b, Abb. 4.6), dessen Aktivität mit etwa 220 Units (mikroaerob) sogar über der Expressionsrate der Kontrolle liegt. Dieser zusätzliche Promotor wird mit P3 bezeichnet. Vergleicht man die mikroaerobe Aktivität der Derivate VF39 *SalI/HindIII-nifA* und VF39 *BglII/HindIII-nifA* mit den Aktivitäten der Derivate VF39 *BamHI/HindIII-nifA* und VF39 *SmaI/HindIII-nifA*, so fällt auf, dass die Aktivität der ersteren um circa 20-30% über dem Level der letzten beiden Derivate liegt. Unter symbiontischen Bedingungen werden die Aktivitäten der Derivate VF39 *BamHI/HindIII-nifA* und VF39 *SmaI/HindIII-nifA* deutlich durch die

symbiontische Induktion von P1 beeinflusst. Geht man davon aus, dass die Promotoraktivität aller vier Derivate vom P3-Promotor ausgehen muss, da P1 (nicht bei VF39 *BamHI/HindIII-nifA*) und P2 deletiert sind, stellt sich die Frage, wodurch die Unterschiede in der Expression hervorgerufen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Sekundärstrukturen oder an die DNA gebundene Proteine (P1-Promotor) im Bereich zwischen der *BamHI*- bzw. *SmaI* und der *SaI*-Schnittstelle sein, welche eine mechanische Barriere für die RNA-Polymerase darstellen. Die Folge könnte ein vorzeitiges Ablösen der Polymerase vom DNA-Strang sein, was in einer messbar verringerten Expression des P3-Promotors resultieren würde, obwohl sich die Promotoraktivität an sich nicht ändert. Auf die Rolle des P3-Promotors soll im Folgenden jedoch nicht weiter eingegangen werden, da er unter symbiontischen Bedingungen nicht induziert wird und daher nicht interessant ist.

Die Analyse der in Abb. 4.5 B und Abb. 4.6 dargestellten Ergebnisse geben Grund dazu, an der tatsächlichen Existenz des P2-Promotors zu zweifeln. Das Derivat VF39 *XbaI/HindIII -nifA Del.* trägt das mobilisierte pJP-Konstrukt *XbaI/HindIII -nifA Del.* Hier wurde der P1-Promotor deletiert (*BamHI/SmaI*-Deletion). Obwohl P2 und P3 vorhanden sind, ist keine nennenswerte Aktivität feststellbar. Dies könnte entweder bedeuten, dass auf dem deletierten Stück essentiell wichtige Elemente für den P2-Promotor lokalisiert sind oder dass der eigentlich wichtige Promotor der P1-Promotor ist. Interessant ist die extrem niedrige Aktivität dieses Derivates weiterhin, da der P3 auf dieser Mutante vollständig vorhanden ist und seine Aktivität daher auch messbar sein sollte. Da die Strukturen, die zwischen der *SmaI*- und *SaI*-Schnittstelle liegen könnten, die Aktivität des P3 alleine jedoch nicht so extrem reduzieren (s.o.), muss davon ausgegangen werden, dass sich stromabwärts der *BamHI*-Schnittstelle weitere Elemente befinden, die sich negativ auf die P3-Aktivität auswirken.

Die Messwerte von Derivat VF39 *Bsp119I/SaI-nifA* (Abb. 4.5B) sprechen jedoch dafür, dass der P1-der wichtigere Promotor ist. Verwunderlich an diesem Derivat ist die enorme mikroaerobe Aktivität, die mit weit über 500 Units mehr als zweieinhalb mal höher liegt als die Aktivität der Kontrolle und das, obwohl der P2-Promotor auf diesem Derivat deletiert wurde. Da dieses Derivat stromaufwärts ebenfalls nur Sequenzen bis zur *SaI*-Schnittstelle aufweist, kann eine Beteiligung des P3-Promotors ebenfalls ausgeschlossen werden. Der einzige Promotor auf diesem Bereich ist daher der P1-Promotor. Vergleicht man die Aktivität dieses Derivates mit den Derivaten VF39 pJP *XbaI/SaI-nifA* und VF39 pJP *Alw44I/SaI-nifA*, so stellt sich die Frage, worin der Grund für eine derart stark erhöhte Aktivität liegt. Die beiden Derivate, VF39 *XbaI/SaI-nifA* und VF39 *Alw44I/SaI-nifA*, zeigen eine Expression auf Wildtypniveau bei etwa 200

Units. Da sämtliche Derivate Sequenzen bis zur *SaI*-Schnittstelle beinhalten, kann die Ursache für den Unterschied nicht in diesem Bereich zu finden sein. Folglich müssen die Sequenzen stromabwärts des P1-Promotors Charakteristika aufweisen, die eine Erklärung für derartige Unterschiede bieten.

Um die Sequenzen, die für eine vollständige *nifA*-Expression notwendig sind, noch genauer eingrenzen zu können, sollten im Folgenden gerichtete, unidirektionale Deletionen der interessanten Bereiche durchgeführt werden.

#### **4.1.2 Feinkartierung der *nifA* Promotorregion – Unidirektionale Deletion der stromaufwärts des P1-Promotors gelegenen Sequenzen**

Die vorausgegangene Grobkartierung dieser Region hatte gezeigt, dass das Derivat VF39 *XbaI/SaI-nifA* eine Aktivität auf Wildtypniveau zeigte, also alle essentiellen Elemente für eine vollständige *nifA*-Expression beinhalten muss. Das Derivat VF39 *XbaI/SmaI-nifA* hingegen zeigte schon deutliche Aktivitätseinbußen. In diesem Versuchsteil sollte nun mittels einer unidirektionalen Deletionsreihe genauer bestimmt werden, welche Sequenzen zwischen dieser *SaI*- und dieser *SmaI*-Schnittstelle tatsächlich essentiell für die *nifA*-Expression sind. Wie weit kann ausgehend von der *SaI*-Schnittstelle in Richtung der *SmaI*-Schnittstelle ohne Aktivitätsverluste deletiert werden? Diese Feinkartierung sollte dann bei der Charakterisierung des *nifA*-Promotors hilfreich sein.

##### **4.1.2.1 Konstruktion von Vektoren, Strategie und Durchführung der Deletionsreihe**

Die Deletionen sollten mit Hilfe der Exonuklease Bal31 durchgeführt werden. Diese katalysiert die Degradation einzelsträngiger und linearisierter Doppelstrang-DNA und – RNA. Lineare Duplex-DNA wird dabei progressiv sowohl am 3'- als auch am 5'- Ende zu 5'-Mononukleotiden degradiert. Auf Grund der Eigenschaft der Nuklease, sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende zu deletieren, wurde für die Deletionsreihe ein Plasmid gewählt, welches statt dem *XbaI/SaI-nifA*-Fragment, das *XbaI/HindIII-nifA*-Fragment trägt. Zur besseren Klonierung im Anschluss an die Deletionen wurde dieses *XbaI/HindIII-nifA*-Fragment zuvor aus dem Vektor pUC18 *EcoRI/HindIII nifA* in den Vektor pBlueskriptKSII umklontiert. Bei einer Ringöffnung des Plasmids an der *BglII*-Schnittstelle würde die Nuklease Bal31 die linearisierte Duplex-DNA sowohl in

Richtung der *Xba*I-Schnittstelle (*nifA*) als in Richtung der *Hind*III-Schnittstelle (*fixA*) deletieren. Gewünscht waren jedoch nur Mutanten in denen Deletionen in Richtung der *Xba*I-Schnittstelle (*nifA*) generiert werden. Führt man die Deletionsreihe auf diese Weise durch, so generiert man zwar auch Deletionen in den gewünschten Bereichen, jedoch auch im gleichen Maße am anderen Ende des geöffneten Plasmidringes (Abb. 4.7). Ein anschließend herbeigeführter Ringschluss durch Religation hätte dann pBlue *Eco*RI/*Hind*III *nifA*-Derivate zur Folge, die zwar in den gewünschten Bereichen verkürzt sind, jedoch stromaufwärts dieser Bereiche keine definierten DNA-Bereiche aufweisen, da diese ebenfalls progressiv deletiert wären. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das linearisierte Plasmid pBlue *Eco*RI/*Hind*III *nifA* nach der Behandlung mit Nuklease Bal31 mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III geschnitten, die Restriktionsenden aufgefüllt und anschließend religiert. Auf diese Weise gingen die unerwünschten stromaufwärts gelegenen Bereiche verloren. Es konnten so Plasmide mit definierten stromaufwärts gelegenen Bereichen aber dennoch unterschiedlich verkürzten *nifA*-Promotorbereichen konstruiert werden.

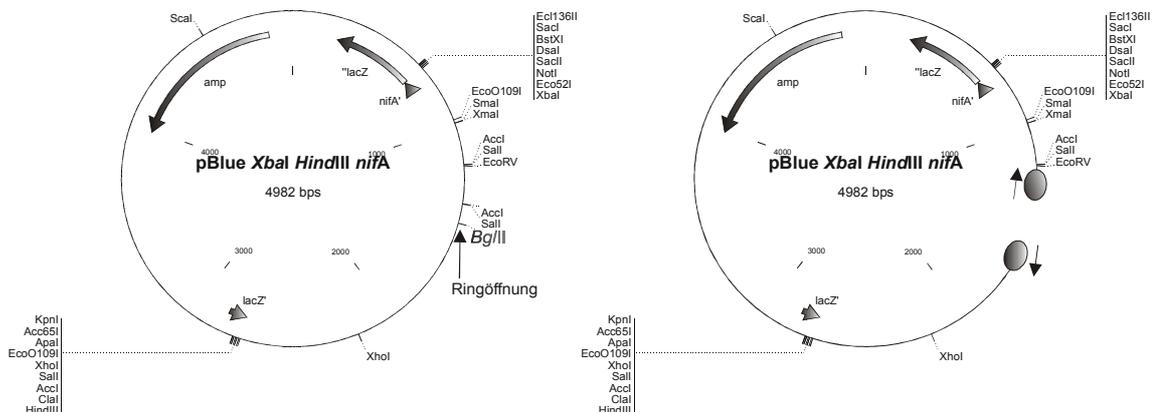


Abb. 4.7: Darstellung der Arbeitsweise der Nuklease Bal31 und der daraus resultierenden möglichen Probleme bei der Konstruktion der Deletionsmutanten für die Feinkartierung.

Die Ringöffnung des Plasmids erfolgt an der *Bgl*II-Schnittstelle. Durch die Behandlung der linearisierten DNA mit der Nuklease Bal31 (oval, schattiert dargestellt) werden die beiden Enden progressiv in Richtung der Pfeile verkürzt.

Die Deletionsgeschwindigkeit der Nuklease Bal31 beträgt bei 30°C und 2 µg eingesetzter DNA etwa 60 bp/min. Daher wurde zur Deletion des gewünschten Bereiches eine Zeitreihe durchgeführt. Die Deletion wurde zum Zeitpunkt t=0 gestartet. Zu zwölf Zeitpunkten (1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 und 8 min) wurden dem Ansatz Aliquots entnommen und die Reaktion darin gestoppt. Nach der Religation (s.o.) wurden die Ansätze in den Stamm *E. coli* DH5α transformiert und selektiv auf

ampicillinhaltigen LB-Platten ausplattiert. Aus je einer Kolonie dieser Transformation wurde Plasmid-DNA präpariert und die darauf befindliche Promotorregion sequenziert. Die deletierten *nifA* Bereiche wurden anschließend jeweils mit *Xba*I und *Kpn*I in den Expressionsvektor pJP2 umkloniert. Nach der folgenden Transformation erfolgte eine Selektion auf tetracyclinhaltigen LB-Platten. Die Sequenzierung ergab, dass der richtige Zeitbereich der Deletionsreihe zwischen 5 und 7 min lag. Hier waren Mutanten zu finden, die derart verkürzt waren, dass sie Deletionen im Bereich kurz stromaufwärts der *Sma*I Schnittstelle bis stromabwärts der *Sal*I Schnittstelle aufwiesen. Die Fragmentlängen von jeweils zwölf Deletionsmutanten der Zeitpunkte 5; 5,5; 6; 6,5; und 7 min wurden anschließend mittels PCR direkt aus den Kolonien bestimmt. Auf diese Weise konnten aufwändige und kostenintensive Plasmidpräparationen sowie die anschließenden Restriktionen eingespart werden. Die Größenabschätzung der PCR-Fragmente erfolgte in einem hochprozentigen Agarosegel unter Verwendung eines 100bp DNA-Längenmarkers. Daraus konnte die eigentliche Größe der Deletionsfragmente berechnet werden (Abb. 4.8).

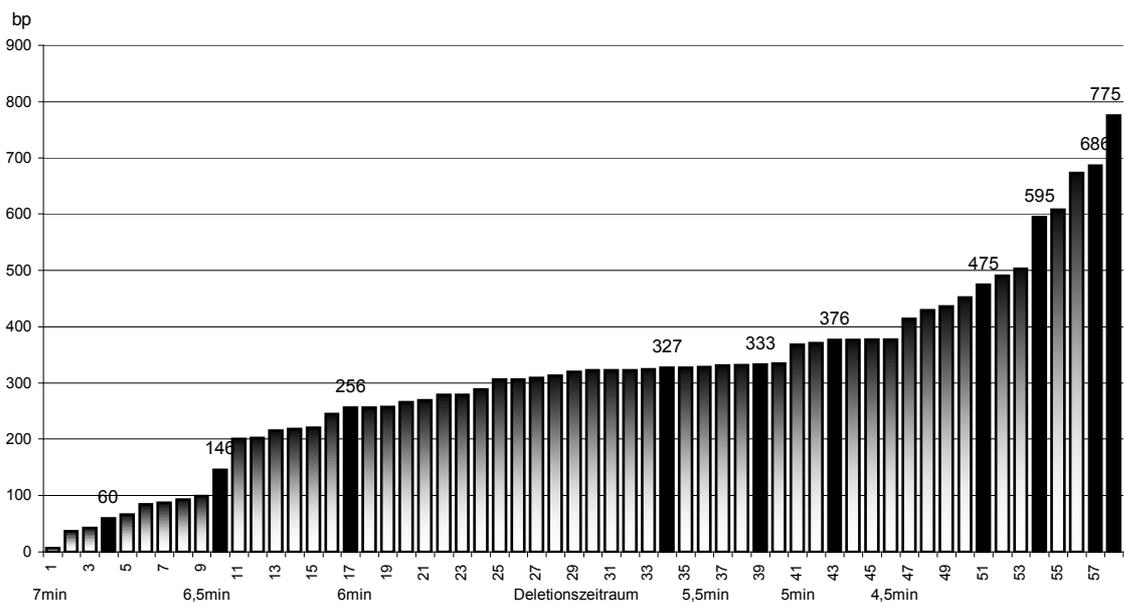


Abb.4.8: Darstellung der nach ihrer Größe geordneten Deletionsfragmente.

Die Fragmente, die mittels PCR aus den unterschiedlichen Deletionsmutanten amplifiziert wurden, sind um den Bereich der Primerbindungsstellen und der Polyklonierstellen größer, als die hier dargestellten tatsächlich zur Klonierung eingesetzten Fragmente. Man erkennt deutlich die progressive Verkürzung der Fragmente. Die zehn sequenzierten Mutanten sind in einem durchgängig schwarzen Muster gehalten und mit exakten Größenangaben versehen. Dabei beträgt die Inkubationszeit der Mutante mit der Fragmentlänge 60 bp 7min und die der Mutante mit der Fragmentlänge 775 bp 1min. Die Bezeichnungen 4, 3, 2 und 1min konnten auf der X-Achsenbeschriftung nicht dargestellt werden

Nach der Größenbestimmung der Deletionsfragmente der verschiedenen Derivate, erfolgte die Auswahl der Konstrukte, die auf Grund ihrer Fragmentgröße potentiell interessante Kandidaten für eine Messung der Promotoraktivitäten waren. Alle Derivate von 1-23 (Abb. 4.8) enthielten offensichtlich Promotorfragmente, die zu weit verkürzt waren, um überhaupt eine messbare Promotoraktivität zeigen zu können. Daher waren für weitere Klonierungen nur die Konstrukte 24 bis 55 geeignet, von denen dann tatsächlich nur die Konstrukte 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 53, und 55 verwendet wurden (Abb. 4.8). Alle anderen Konstrukte wiesen Fragmentlängen auf, die den hier verwendeten in ihrer Größe zu ähnlich waren. Nach der Plasmidpräparation aus den oben aufgeführten Mutanten wurden die pBlue *EcoRI/HindIII nifA*-Derivate jeweils mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *KpnI* in den Expressionsvektor pJP2 umkloniert. Die nach der Transformation folgende Selektion wurde auf tetracyclinhaltigen LB-Platten durchgeführt. Nach der Überführung der als richtig befundenen pJP-Deletionskonstrukte in den *E. coli*-Stamm S17-1 erfolgte die Mobilisierung der 22 Konstrukte nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39.

#### **4.1.2.2 Aktivitätsbestimmung der *nifA*-Deletionsderivate unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend)**

Die Aktivitätsbestimmung der Reporterergenfusionen der *nifA*-Deletionsderivate erfolgte wie bereits beschrieben. Drei Kolonien jedes Derivates wurden jeweils in 10 ml TY-Flüssigmedium überführt und selektiv (Streptomycin 600 $\mu$ g/ $\mu$ l /Tetracyclin 10 $\mu$ g/ $\mu$ l) für drei Tage bei 30°C langsam gerollert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität mittels PNP-G-Test.

In Abbildung 4.9 ist deutlich zu erkennen, dass es unter mikroaeroben Bedingungen drei strikt voneinander getrennte Aktivitätsbereiche gibt. Derivate, die Reportergenplasmide mit stark verkürzten Promotorbereichen tragen, weisen nur eine geringe Restaktivität von etwa 10 Units auf. Dies war bei der Grobkartierung ebenfalls zu beobachten und zwar bei Derivat VF39 *XbaI/BamHI-nifA* und gilt hier für die Derivate 4 bis 35. Es müssen folglich sämtliche essentiellen Bereiche des *nifA*-Promotors deletiert worden sein. Betrachtet man nun diejenigen Derivate, deren *nifA*-Promotorregion laut Abb. 4.8 nur sehr geringfügig größer ist, so fällt auf, dass deren Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Wt) zwar um 50-70% reduziert ist, aber eine deutlich messbare Aktivität zeigen. Diese liegt bei den Derivaten 29 bis 41 bei etwa 40 bis 70 Units. Dies entspricht relativ genau der Aktivität von Derivat VF39 *XbaI/SmaI-nifA* in der Messung zur Grobkartierung. Eine vollständige *nifA*-Expressionsrate wird

erst in den Derivaten erreicht, deren *nifA*-Promotorregion auf dem Reporter-genplasmid nur geringfügig deletiert ist. Dazu zählen die Derivate 42 bis 58.

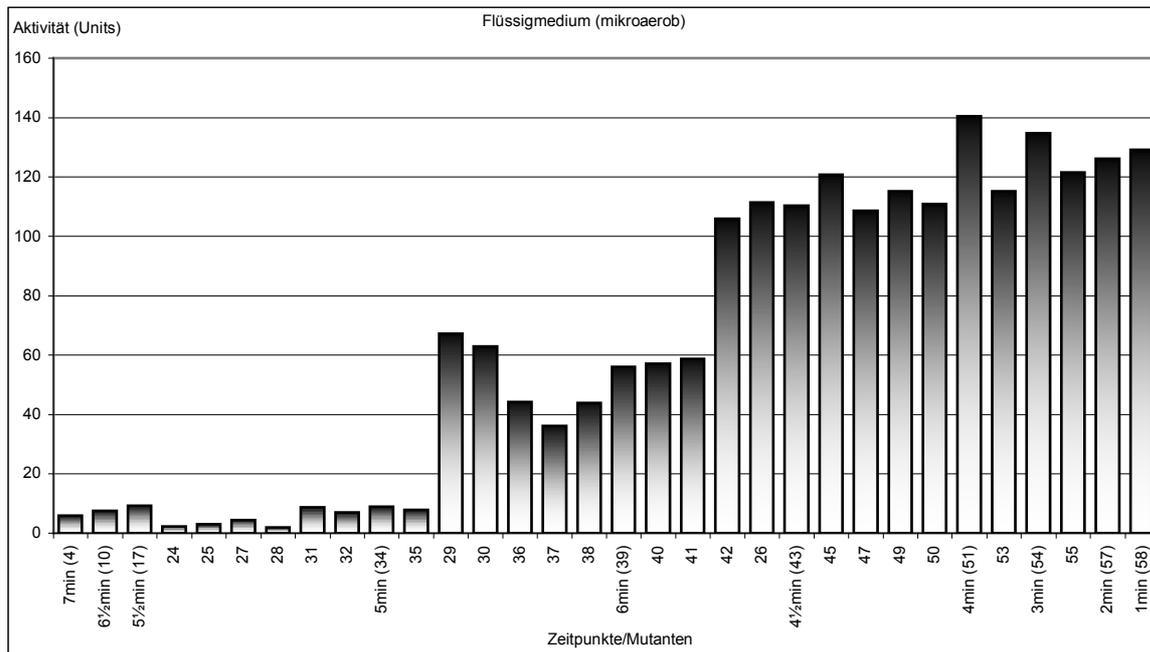


Abb. 4.9: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der Reporter-genkonstrukte der *nifA*-Deletionsmutanten (Feinkartierung) unter mikroaeroben Bedingungen.

Die Zeitangaben stehen für die Dauer der Behandlung mit der Nuklease Bal31 in Minuten. Somit ist eine progressive (Deletions-)Reihe von rechts nach links gegeben. Die Bezeichnung der VF39-Derivate mit Nummern ist entsprechend den Nummern in Abb. 4.8, steht also gleich größer werdender Werte für längere Fragmente. Das gleiche gilt für die Nummern in Klammern. Die Größen der Mutanten 29, 30 und 26 wurden zuvor falsch berechnet und werden daher aus der Diskussion ausgeschlossen.

Die Aktivitätsmessung der *nifA*-Reporter-genfusionen (Deletionsreihe) zeigt, wie die Messung der Grobkartierung, dass zwei deutliche „Aktivitätssprünge“ identifiziert werden können. Diese liegen bezüglich des Sprunges „Inaktivität“ zu „Basislevel“ zwischen Derivat 35 und 36 und bezüglich des Sprunges „Basislevel“ zu Wildtypaktivität zwischen Derivat 41 und 42.

Durch Sequenzierung der interessanten Kandidaten konnten die Deletionsendpunkte identifiziert und in die bekannten Sequenzen dieser Region eingeordnet werden (Abb. 4.10). Die Konstrukte 31, 32, 34 und 35 waren so stark verkürzt, dass die Deletionen bis in die P1-Promotor hineinreichten. Diese Derivate konnten daher keine Aktivität aufweisen. Die Konstrukte 36, 37, 38, 40 und 41 zeigten eine Aktivität auf mittlerem, aber deutlich reduziertem Niveau. Der P1 scheint auf diesen Reporter-genkonstrukten zumindest partiell funktionell zu sein. Mit Derivat 42 wird ein Bereich erreicht, ab dem der P1 seine volle Aktivität erhält. Die 65bp stromaufwärts des P1-Transkriptions-

startpunktes scheinen demnach ausreichend für die mikroaerobe Aktivierung von P1 zu sein.

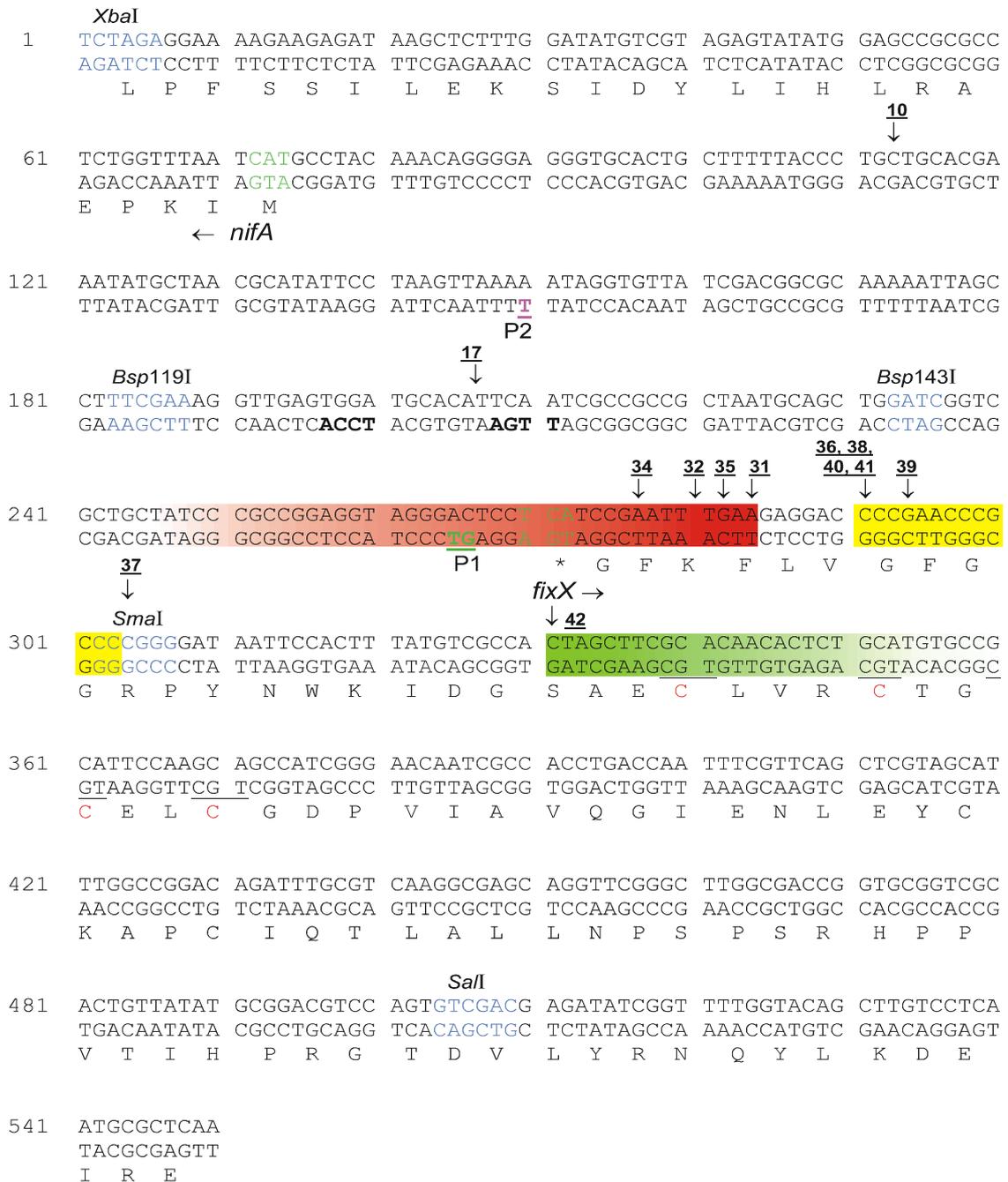


Abb. 4.10: Darstellung der genauen Positionen der stromaufwärts gelegenen Endpunkte der Deletionen der aufgeführten Derivate.

Die Derivate sind durch unterstrichene Ziffern gekennzeichnet. Die Pfeile zeigen die laut der Sequenzierung letzten Base der einzelnen Derivate an. Der rot hinterlegte Bereich ist derjenige ohne jegliche Promotoraktivität. Die gelb bzw. grün hinterlegten Bereiche zeigen die Regionen mit niedriger bzw. Wildtypaktivität an. Die Transkriptionsstartpunkte der potentiellen Promotoren sind mit P1 und P2 angegeben. Ebenso sind die Gene *fixX* und *nifA* gekennzeichnet.

#### 4.1.2.3 Aktivitätsbestimmung der *nifA*-Deletionsderivate in der Symbiose mit *Pisum sativum*

Dieses Experiment sollte Klarheit darüber bringen, welche Aktivitäten die in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 mobilisierten Reporterfusionen der *nifA*-Deletionsmutanten in der Symbiose mit *Pisum sativum* aufweisen. Dazu wurden pro Derivat in drei parallelen Ansätzen Versuchspflanzen mit den verschiedenen *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39-Derivaten angeimpft und für etwa 21 Tage in einer Klimakammer kultiviert. Anschließend wurden die Wurzelknöllchen geerntet und der Level der *nifA*-Expression mittels PNP-Test bestimmt.

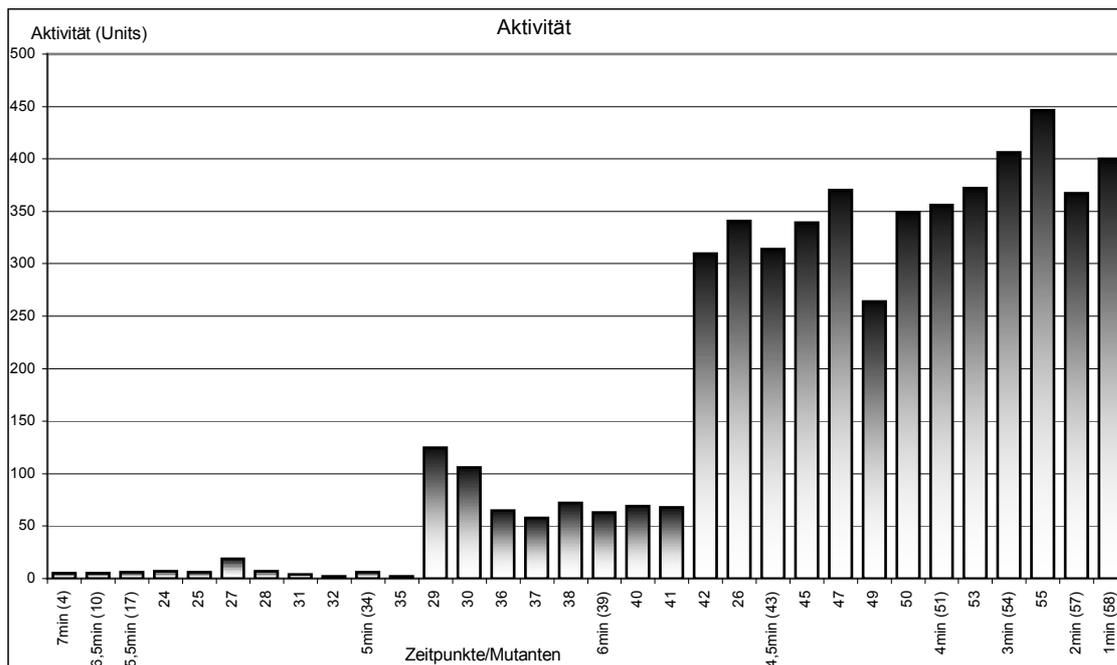


Abb. 4.11: Darstellung der Ergebnisse zur Aktivitätsbestimmung der *nifA*-Deletionsderivate (Feinkartierung) in der Symbiose mit *Pisum sativum*.

Die Zeitangaben stehen für die Dauer der Behandlung mit der Nuklease Bal31 in Minuten. Somit ist eine progressive (Deletions-)Reihe von rechts nach links gegeben. Die Bezeichnung der Derivate mit Nummern ist entsprechend den Nummern in Abb. 4.8 und Abb. 4.10, steht also gleich größer werdender Werte für längere Fragmente. Das gleiche gilt für die Nummern in Klammern. Die Größen der Mutanten 29, 30, und 26 wurden zuvor falsch berechnet und werden daher aus der Diskussion ausgeschlossen.

Die in Abb. 4.11 dargestellten Ergebnisse zeigen wie die erste Messreihe dieses Versuches, die unter mikroaeroben Bedingungen durchgeführt wurde, drei deutlich voneinander unterscheidende Blöcke mit unterschiedlichen Aktivitäten. Die Derivate 4 bis 35 zeigen analog zur ersten Messreihe nur eine sehr geringe Restaktivität. Diese liegt ebenfalls bei etwa 10 Units. Die Region bis 18 bp (Abb. 4.10; rot unterlegt) stromaufwärts des vermutlichen P1-Promotors ist also definitiv nicht ausreichend für jegliche *nifA*-Promotoraktivität. In Bezug auf den P1-Promotor wäre dies einfach zu erklären, da diese Region sowohl für einen  $-10/-35$  - als auch für einen  $-12/-24$  - Promotor zu klein wäre. Der hypothetische P2-Promotor, der seinerseits 154 bp

stromabwärts von Derivat 31 (vergleiche Abb. 4.10) lokalisiert wäre, zeigt jedoch ebenfalls keinerlei Aktivität. Dieses Phänomen könnte im Zweifelsfall nur dadurch erklärt werden, dass der Promotor P2 für seine Aktivierung Bereiche jenseits von Derivat 31 benötigt. Die Promotorregion an sich sollte hier ausgeprägt genug sein.

#### 4.1.2.4 Interpretation der bisherigen Ergebnisse

Betrachtet man die Sequenzanalysen des P2-Promotors, so kann man davon ausgehen, dass es sich nicht um einen *RpoN*-abhängigen -24/-12 handelt. Es konnten keinerlei bekannte Sequenzmotive gefunden werden. Vor allem zeigt diese Region keine Konsensussequenzen für eine  $\sigma^{54}$ -Box, wie die Region des *fixRp1* in *Bradyrhizobium japonicum* (Barrios *et al.*, 1995) oder in *Azorhizobium caulinodans* (Loroch *et al.*, 1995) auf. NifA wird dementsprechend sehr wahrscheinlich nicht im Zuge einer direkten Autoregulation an der Aktivierung dieses Promotors beteiligt sein. Dies steht im Einklang damit, dass stromaufwärts des P2-Promotors keinerlei NifA-Boxen gefunden wurden. Diese Boxen sind in den meisten, jedoch nicht allen NifA-abhängigen Promotoren in einer Entfernung von 80 bis 150 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes zu finden (Morett *et al.*, 1991; Fischer, 1994; Alvarez-Morales *et al.*, 1986; Buck *et al.* 1987, 1986, Morett *et al.*, 1991, 1988). Die Funktion dieser Boxen besteht wahrscheinlich darin, die Konzentration an NifA in der Umgebung eines -24/-12 Promotors zu erhöhen und/oder darin NifA richtig zu orientieren, um die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit dem  $\sigma^{54}$ -RNA Polymerasekomplex zu erhöhen (Fischer, 1994; Buck *et al.*, 1987). In einem Abstand von etwa 48 bp stromaufwärts des P2-Transkriptionsstartpunktes liegt jedoch eine Sequenz 5'-GAATGTGCATCCACTCAACCTTT-3' (Abb. 4.10), die Übereinstimmungen zu einem möglichen stickstoffunabhängigen Promotor aufweist. Diese zeigt Homologien zum (*Brady*)*Rhizobium* spp. FixK-Konsensus und zum *E. coli* Fnr-Konsensus mit der Sequenz 5'-AAA-TTGAT- - - ATCAA-TTT-3' (Fischer, 1994). In *E. coli* ist diese Box in einem Abstand von etwa 40 bp stromaufwärts zum Transkriptionsstartpunkt zu finden. Konservierte Elemente dieser Box sind durch fett gedruckte Buchstaben hervorgehoben. Somit wäre eine Beteiligung des in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 identifizierten FnrN an der Regulation der Expression des P2-Promotors zumindest theoretisch möglich. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass die Positionierung dieses Elementes in Bezug auf P2 in VF39 nicht optimal ist.

Die Derivate 36 bis 41 zeigen eine geringe "Grundaktivität" der *nifA*-Promotoren (Abb. 4.11). Diese liegt mit etwa 70 Units nur leicht über der Aktivität dieser Derivate unter mikroaeroben Bedingungen. In dieser Region wäre auf Grund ihrer Ausdehnung (Derivat 36, 25bp stromaufwärts des P1) theoretisch das Vorhandensein eines RpoN

abhängigen -12/-24 Promotors denkbar. Dagegen spricht, dass in dieser Region keine konservierten Sequenzen eines solchen Promotors zu finden sind. Sicher ist nur, dass dieser sehr deutlich in seiner Aktivität im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Faktor 4 bis 6) ist. Das Wildtypniveau von 300 bis 400 Units wird erstmals von Derivat 42 erreicht. Dieses Niveau wird dann ebenfalls von den weiteren Derivaten 43 bis 58 gehalten. Dies bedeutet, dass Derivat 42 sehr wahrscheinlich alle Elemente aufweist, die für die vollständige Aktivierung der *nifA*-Promotoren notwendig sind und entspricht einer Region etwa 180 bp stromaufwärts des P2 bzw. 64 bp stromaufwärts des P1. Frühere Untersuchungen hatten die Überlegung zugelassen, dass zwei Sequenzmotive stromaufwärts des P1 einen Einfluss auf die *nifA* Transkription haben könnten. Das eine Motiv mit der Sequenz 5'- TCGCCT**TGACGCAAATCT**GTCC-3' zeigt eine signifikante Ähnlichkeit zum FnrN-Konsensus in *E. coli* (Eigelmeier *et al.*, 1989) und ist 159 bp stromaufwärts des P1 Transkriptionsstarts lokalisiert. Bezüglich dieser Sequenz ist jedoch der Abstand zum Promotor, der im Idealfall mit 41 bp angegeben ist, nicht korrekt. Ebenso besteht eine ebenso deutliche Ähnlichkeit zum (*Brady*)*Rhizobium* spp. FixK Konsensus mit der Sequenz 5'- **TTGA** – C - - **GTACAA** – G –3'(Fischer, 1994). Die deutlichste Homologie dieser Region besteht jedoch mit der FixK Bindestelle des *fixGHIS*-Operons in *Sinorhizobium meliloti* (Kahn *et al.*, 1989). Konservierte Nukleotide sind wiederum durch fett gedruckte Buchstaben hervorgehoben: 5'- **AGACTT**GACG**CAGATCAAGGT** –3'. Das zweite Motiv befindet sich 97 bp stromaufwärts vom P1-Transkriptionsstart und zeigt mit der Sequenz 5'- GCGCT**TGTTCCCGATGGCTGCT**-3' wiederum Homologien zum (*Brady*)*Rhizobium* spp. FixK-Konsensus. Unter Betrachtung der aktuellen Ergebnisse ist eine Beteiligung beider Motive an der Regulation der *nifA* Expression jedoch unwahrscheinlich, da Derivat 42 einen DNA Bereich von nur 64 bp stromaufwärts des P1-Transkriptionsstarts für eine volle Aktivität benötigt. Die oben aufgeführten Motive wären auf dem Reportergerätkonstrukt dieses Derivates folglich nicht vorhanden. Eine zuvor angestellte Vermutung, dass eine 75%ige Reduktion der Stickstofffixierungsaktivität in einer *fnrN*<sup>-</sup>-Mutante (Patschkowski, 1994), sowie eine vollständige Unterdrückung der Stickstofffixierungsaktivität in einer *fnrN*<sup>-</sup> / *fixK*<sup>-</sup> Doppelmutante auch in einer Beteiligung der *nifA*-Promotorregion begründet ist, findet durch diese Daten keine Unterstützung mehr. Zumindest wirken FnrN und FixK nicht unmittelbar auf den *nifA* Promotor ein. Die Erklärung, dass FnrN in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 das *fixNOQP* Operon reguliert und es dadurch zu einer Reduzierung der Stickstofffixierung kommt, scheint wahrscheinlicher zu sein (Patschkowski, 1996; Gutierrez *et al.*, 1997). Das *fixNOQP*-Operon kodiert eine cbb<sub>3</sub>-cytochrom Oxidase mit besseren O<sub>2</sub>-Bindeeigenschaften, deren Bildung unter

mikroaeroben Bedingungen induziert wird, um eine effektive Respiration während der Symbiose zu garantieren. Unter diesen Bedingungen ist die Sauerstoffkonzentration zum Schutz des sauerstoffempfindlichen Nitrogenasekomplexes drastisch reduziert. Verwunderlich sind jedoch die Ergebnisse zum Einfluss von FnrN und NifA auf die Expression von *nifA* aus früheren Untersuchungen. Hier wurden die *nifA*-Expression chromosomaler *uidA::nifA*-Mutanten jeweils in einem *fnrN*<sup>-</sup> - Hintergrund und einem *nifA*<sup>-</sup> - Hintergrund gemessen. In beiden Fällen war eine deutliche Reduktion der *nifA* Expression festzustellen (Esser, 2000). Für NifA kann diese Beteiligung an der eigenen Expression im Zuge einer Autoregulation nur bedeuten, dass diese Autoregulation nur indirekter Natur sein kann, da in keinem der untersuchten und für mindestens notwendig befundenen Bereiche typische NifA-Bindestellen identifiziert werden konnten. Ebenso scheint es sich bei FnrN zu verhalten. Es konnten zwar Homologien zu FnrN-Bindestellen ausgemacht werden, diese scheinen jedoch außerhalb der unbedingt notwendigen Bereiche zu liegen. Dieser Frage sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit nachgegangen werden.

### 4.1.3 Feinkartierung der *nifA* Promotorregion – Unidirektionale Deletion der stromabwärts der Promotoren P1 und P2 gelegenen Sequenzen

Nachdem die essentiellen Elemente stromaufwärts von P1 eingegrenzt wurden, sollte die Frage geklärt werden, welche Elemente stromabwärts der Promotoren P1 und P2 essentiell für die *nifA* Expression sind. Diese Frage stellte sich zuvor bereits bei den Untersuchungen der Grobkartierung. Besonders Derivat VF39 Bsp119I/*Sall*-*nifA* (Abb. 4.5b) ließ hier einige Fragen bezüglich des P2 Promotors offen.

#### 4.1.3.1 Konstruktion von Vektoren, Strategie und Durchführung der Deletionsreihe

Dieses Experiment wurde in Analogie zur ersten Deletionsreihe durchgeführt. Da jedoch hier aus dem *nifA*-Kodierbereich Richtung der *nifA*-Promotorregion deletiert werden sollte, wurde ein anderes Ausgangsplasmid benötigt. Dieses sollte über einen erweiterten Bereich Richtung *nifB* verfügen, damit im späteren Verlauf dieser Deletionsreihe durch ein gezieltes Herausschneiden dieses Bereiches Mutanten mit definierten (gleichen) Regionen stromabwärts der Deletionsendpunkte konstruiert werden konnten. Dieses Plasmid war die Konstruktion pBlue *EcoRI/HindIII nifA*. Hier wurde die gesamte Region *EcoRI/HindIII nifA* aus dem Ausgangsplasmid pUC *EcoRI/HindIII nifA* in den Vektor pBlueskriptKSII umkloniert. Die Deletionen erfolgten erneut mit der Nuklease Bal31. Hierzu wurde der Plasmidring (Abb. 4.12) durch die Endonuklease *NheI* an einer spezifischen Position 257 bp stromabwärts des *nifA* Startcodons im *nifA* Kodierbereich geöffnet. Der Abstand zur *XbaI* Schnittstelle im *nifA* beträgt 184 bp. Diese musste auf Grund der Klonierstrategie auf jeden Fall deletiert werden. Daher wurden Aliquots der Nukleasereaktion (etwa 60 bp /min) nach 120, 180, 225, 240, 270, 300, 315, 330, 360, 390, 405, 420, 450 und 480 Sekunden entnommen und die Reaktion abgestoppt. Durch das Schneiden mit der Endonuklease *EcoRI* wurden die erwähnten stromabwärts gelegenen Bereiche entfernt und so die definierten Enden geschaffen. Nach dem Auffüllen der Restriktionsenden in allen 14 Ansätzen konnte jeweils der Ringschluss durch Religation vollzogen werden. Die Transformationen erfolgten in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  und die Selektion auf ampicillinhaltigen LB-Platten. Um die Größenbereiche der Deletionsfragmente der einzelnen Ansätze und somit die Effizienz der Nukleasebehandlung abschätzen zu können, wurde eine PCR-Reaktion direkt aus den Bakterienkolonien durchgeführt.

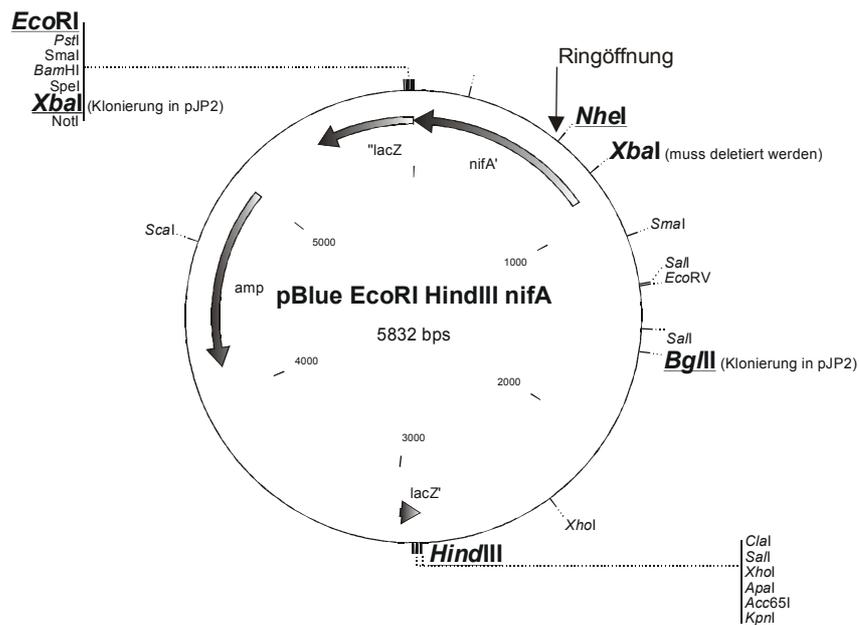


Abb. 4.12: Darstellung des Plasmides pBlue EcoRI/HindIII nifA .

Die für die Deletionen und Klonierungen wichtigen Schnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben, sowie zum Teil mit erklärenden Fußnoten versehen. Vergleiche Abb. 4.7. Abkürzungen: amp: Ampicillinresistenzgen

Unter Verwendung der Primer M13 Universe und Reverse, konnten die Deletionsinserts verschiedener Größe direkt aus je einer Kolonie je Zeitpunkt amplifiziert werden. Eine Größenabschätzung der Amplifikationsprodukte ( $\cong$  Deletionsinserts zuzüglich Primerbindungsstellen) erfolgte gelelektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel. Dieses "Vorabscreening" ergab, dass die Zeitpunkte 120, 180 und 225 Sekunden (Deletionsdauer) sehr wahrscheinlich Konstrukte enthielten, deren stromabwärts gelegene Endpunkte zwischen dem *nifA*-Startcodon und dem *fixX*-Stopcodon lokalisiert sind. Anschließend wurden von den oben genannten Zeitpunkten 30 Mutanten willkürlich ausgesucht und von diesen die Plasmide präpariert. Davon wurden die Konstrukte: pBlue120b, -120g, -120k, -180a, -180b, -180c, -180d, -180f, -180g, -180i, -180k, -225a, -225b, -225h im Verlauf dieses Experimentes weiterverwendet. Die Namensgebung der Konstrukte erfolgte in Abhängigkeit der Zeitpunkte. Die *nifA*-Promotorregionen der Konstrukte wurden anschließend jeweils mit *Xba*I und *Bg*II (vergleiche Abb. 4.12, Deletion der *Xba*I Schnittstelle) in den Expressionsvektor pJP2 (*Xba*I/BamHI) umkloniert. Parallel dazu erfolgte die Sequenzierung (Abb. 4.13) der jeweiligen *nifA*-Promotorregionen.

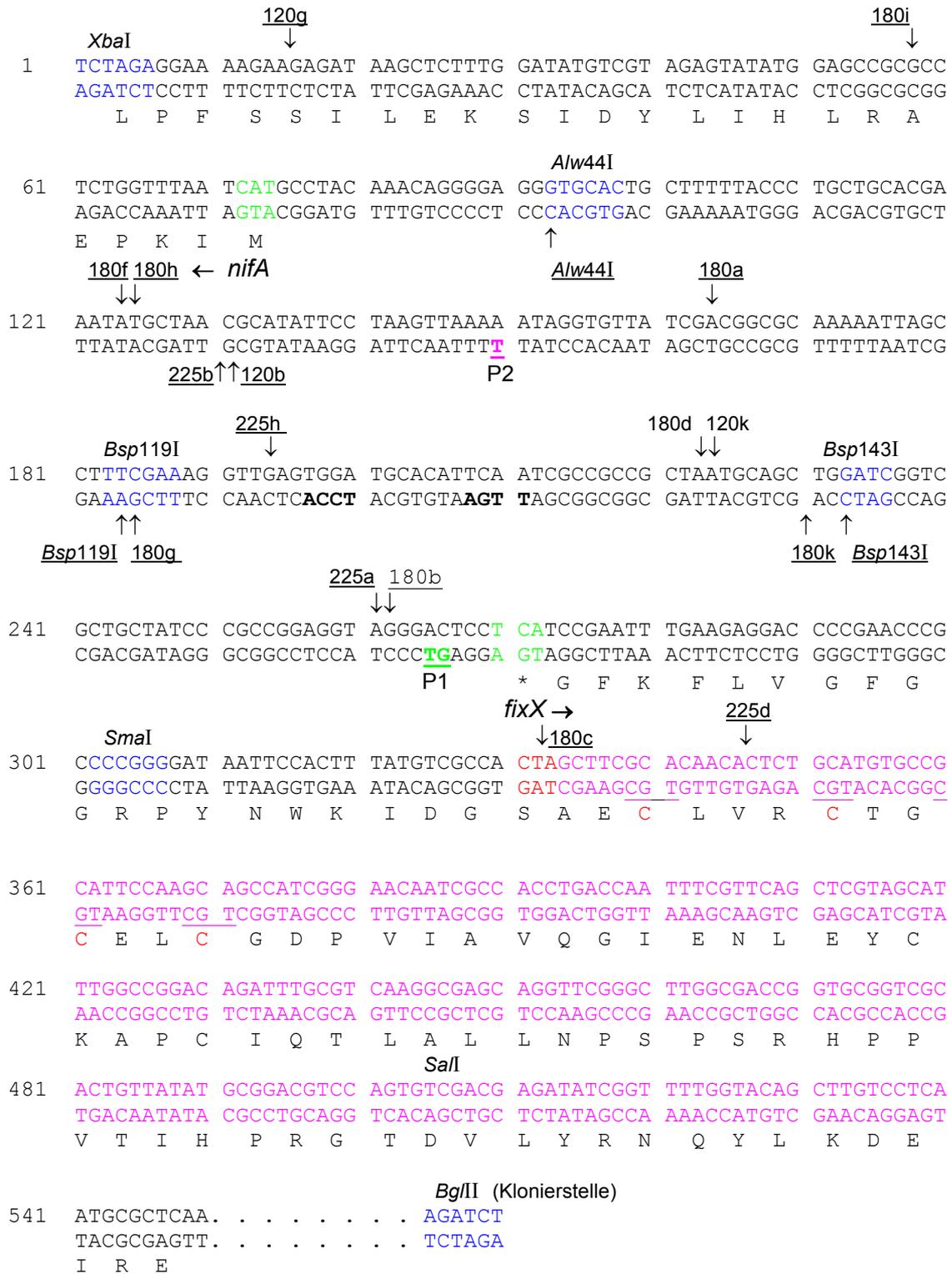


Abb. 4.13: Darstellung der genauen Positionen der stromabwärts gelegenen Endpunkte der Deletionen der aufgeführten pJP-Konstrukte.

Die Reportergenfusionen sind durch unterstrichene Ziffern-Buchstabenkombinationen gekennzeichnet. Die Pfeile zeigen, die laut der Sequenzierung letzten Base der einzelnen Konstrukte an. Die Transkriptionsstartpunkte der potentiellen Promotoren sind mit P1 und P2 angegeben. Ebenso sind die Gene *fixX* und *nifA* und die zur Klonierung der Promotordeletion in den Expressionsvektor pJP2 verwendete Schnittstelle *Bg/II* gekennzeichnet. Der rosa eingefärbte Bereich zeigt die Sequenzen an, die im vorausgegangenen Deletionsexperiment nicht essentiell waren und deletiert werden konnten.

#### 4.1.3.2 Aktivitätsbestimmung der *nifA*- Deletionsderivate unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend)

Nachdem die Deletionsinserts erfolgreich in den Expressionsvektor pJP2 eingebracht wurden, erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm S17-1 um die Reporterfusionen von dort aus nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 zu mobilisieren. Die Selektion erfolgte auf tetracyclin- und streptomycinhaltigen TY-Platten. Mit Tetracyclin wurde auf Erhalt des Reportergenplasmides und mit Streptomycin gegen *E. coli* selektioniert.

Zur Messung der Aktivitäten der (deletierten) *nifA*-Reporterfusionen wurden von jedem Konjugationsansatz vier Einzelkolonien in 10ml tetracyclin- und streptomycinhaltigen TY-Flüssigmedium angeimpft und für zwei Tage bei 30°C langsam gerollert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels PNPG-Test.

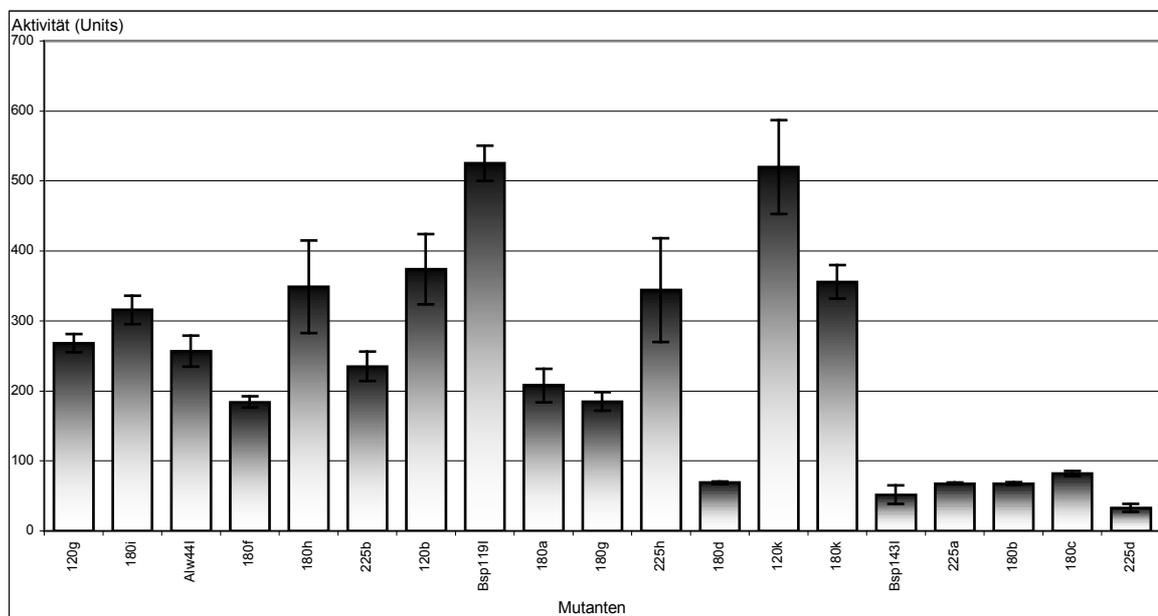


Abb. 4.14: Darstellung der Ergebnisse zur Aktivitätsbestimmung der *nifA*-Deletionsderivate (Feinkartierung) unter mikroaeroben Bedingungen.

Da die VF39 Derivate ihrer Größe nach geordnet sind, handelt es sich hierbei um eine progressive (Deletions-)Reihe von links nach rechts. Die Bezeichnung der Derivate mit Nummern ist entsprechend den Nummern in Abb. 4.13. Zusätzlich zu den Deletionsderivate sind drei Konstrukte aus dem Experiment zur Grobkartierung mit in diese Abbildung eingefügt.

Die Aktivitätsbestimmung der *nifA*-Deletionskonstrukte in Abb. 4.14 zeigt, dass man diese in zwei Bereiche unterteilen kann. Der eine Bereich umfasst Derivat VF39 *Bsp143I/SaII nifA*, sowie die Derivate VF39 225a, VF39 180b, VF39 180c und VF39 225d. Diese zeigen eine sehr geringe Aktivität von etwa 50 bis 70 Units. Der andere Bereich umfasst die übrigen Derivate, die eine hohe bis zum Teil sehr hohe Aktivität von etwa 200 bis 500 Units aufweisen. Eine Ausnahme bildet Derivat VF39 180d mit

einer Aktivität von nur 70 Units. Dabei könnte es sich um eine Fehlkonstruktion handeln. Dieses wird daher im Folgenden von der Diskussion ausgeschlossen.

#### 4.1.3.3 Interpretation der bisherigen Ergebnisse

Unter Verwendung der Sequenzierergebnisse (Abb. 4.13) fallen bei der Analyse der Daten zur Aktivitätsmessung mehrere wichtige Dinge sofort auf. Zum einen ist es möglich den hypothetischen Promotor P2 zu deletieren, ohne dass diese Deletion einen Aktivitätsverlust zur Folge hätte. Zu sehen ist dies bei Derivat VF39 *Bsp143I/SaII nifA*, sowie den Derivaten VF39 180g, VF39 225h, VF39 120k und VF39 180k. Die Aktivität dieser Derivate liegt zwischen 200 und 500 Units. Wenn P2 deletiert werden kann, ohne dass diese Deletion negative Konsequenzen für die *nifA* Expression hat, kann das nur bedeuten, dass P2 nicht essentiell für die Expression von *nifA* ist. Noch wahrscheinlicher ist, dass dieser Promotor, so wie er hier kartiert wurde, gar nicht existiert. Wie könnte man sich aber dann die eindeutigen Signale des P2 bei der Kartierung der Transkriptionsstartpunkte mittels Primer extension vorangegangener Arbeiten (Esser 2000) erklären? Die plausibelste Erklärung hierfür liefern die Aktivitäten der Deletionsmutanten VF39 120g bis VF39 180k (Abb. 4.14). Diese sind durch starke Aktivitätsschwankungen gekennzeichnet. Da im Bereich stromabwärts des P2 kein weiterer Promotor existiert (Abb. 4.9) und P2 seinerseits als gegenstandslos erklärt werden kann, ist P1 folglich der einzige relevante Promotor bei der *nifA* Expression in dieser Region. Die Region stromabwärts des P1 hat das Potential mehrere stabile Sekundärstrukturen auszubilden, welche die Aktivität des P1 von einem hohen Level auf ein mittleres Niveau reduzieren könnten. Je nachdem wie weit die Deletionen aus Richtung *nifA* in Richtung P1 fortgeschritten sind, werden dadurch Sequenzen deletiert, die an der Ausbildung von Sekundärstrukturen beteiligt sein könnten. Werden diese deletiert, könnte sich das in einer gesteigerten P1-Aktivität widerspiegeln. Unmittelbar vor und in der Region, in der das Signal detektiert wurde, welches zunächst als P2-Transkriptionsstart interpretiert wurde, sind eine Vielzahl möglicher Sekundärstrukturen zu finden. DNA-Sequenzwiederholungen (Repeats) sind z.B. an den Positionen 120bp bis 149bp und 147bp bis 171bp (Abb. 4.13) zu finden. Die zugehörigen Sequenzen lauten 3'- AAATA -<sub>n<sub>22</sub></sub>- AAATA -5' bzw. 3'- AAAAAT -<sub>n<sub>18</sub></sub>- AAAAAT -5'. Letztere bildet auch eine invertierte Sequenzwiederholung (Inverted-Repeat) an den Positionen 102bp bis 151bp mit der Sequenz 3'- **TTTTTACCCT** -<sub>n<sub>30</sub></sub>- **AAGTTAAAAA** -5'. Komplementäre Sequenzen sind fett gedruckt. Inmitten dieses Inverted-Repeats (-<sub>n<sub>30</sub></sub>-) liegt ein weiterer mit der Sequenz 3'- **G-A-AATATGC-TAAC-GCATATT-C-C** -5', so dass sich zusammengefasst potentiell sehr stabile Sekundärstrukturen ausbilden könnten. Derartige

Sekundärstrukturen können bei der Kartierung der *nifA* Transkriptionsstartpunkte (Reverse Transkriptase) dazu geführt haben, dass die Reaktion an der Stelle, an der P2 später lokalisiert wurde, zu einem großen Teil gestoppt wurde. Ein weiterer Punkt, der bei der Analyse der Daten unter Berücksichtigung der Sequenziererergebnisse auffällt, ist die Aktivität der Derivate VF39 180k, VF39 *Bsp143I/SaI* *nifA*, VF39 225a und VF39 180b. Eine effektive *nifA* Expression kann demnach nur dann stattfinden, solange die Deletionen sich nicht in einen Bereich bis 42bp stromabwärts des P1 erstrecken. Wird bis in diesen Bereich deletiert, wird die *nifA*-Expression drastisch auf 50 bis 70 Units reduziert (Abb. 4.13, 4.14). Wird die intakte Region um nur 2bp in Richtung *nifA* ausgedehnt, so steigt die Aktivität sprunghaft auf etwa 350 Units (175% Wildtypniveau, Derivat VF39 180k) weitere 7bp zusätzlich resultieren sogar in einer Aktivität von über 500 Units. Damit ist die Aktivität von Derivat VF39 120k im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.5a, Derivat VF39 pJP *XbaI/BglII*-*nifA*) um etwa 250% erhöht. Die Sequenzanalyse dieser stromabwärts von P1 gelegenen Region zeigt, dass genau dort ein auffälliges Palindrom der Sequenz 3'-CGTCG – n<sub>10</sub> – CGACG-5' liegt. Da in diesem keine Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzmotiven zu erkennen sind, muss die Frage, ob diesem Palindrom eine essentielle Funktion zukommt, vorerst unbeantwortet bleiben.

## 4.2 Die Kernsequenz der *nifA* Promotorregion

### 4.2.1 Identifizierung und Amplifikation der Kernsequenz der *nifA* Promotorregion

Entsprechend der Resultate der Kartierungsexperimente konnte im Anschluss eine Region des *nifA* Promotors mit einer maximalen Aktivität bei gleichzeitig minimaler Größe identifiziert werden. Dieser P1-Promotorkernbereich hat eine Größe von etwa 100bp und wurde so konzipiert, dass er entsprechend der Promotorkartierung über alle essentiellen Elemente stromauf- sowie stromabwärts des P1 Promotors verfügen sollte. Darin ist der P2-Promotor, wie er in früheren Arbeiten (Esser, 2000) kartiert wurde, nicht enthalten. Die Sequenz dieser Region ist in Abb. 4.15 dargestellt.

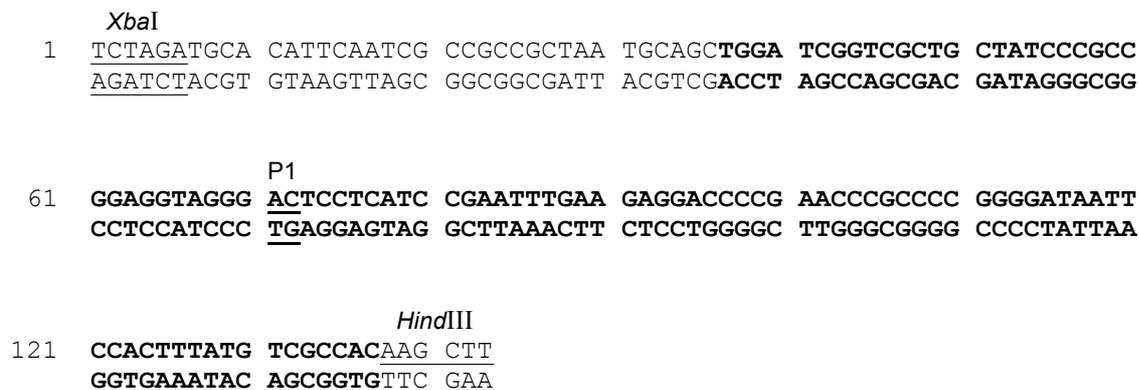


Abb. 4.15: Darstellung der Kernpromotorregion des *nifA*-Promotors.

Der essentielle Bereich dieses PCR-Fragmentes beträgt etwa 101bp. Die tatsächliche Größe des Fragmentes von 143bp (*nifA*-Promotorregion) beruht darauf, dass der stromabwärtige Bereich zur Klonierung dieses Fragmentes um 36bp und der stromaufwärts gelegene Bereich um 6bp erweitert werden musste, um geeignete Schnittstellen einfügen zu können. Die neu eingefügten Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* sind unterstrichen. Der Kernbereich des *nifA*-Promotors ist durch Fettdruck hervorgehoben. Ebenfalls unterstrichen ist der P1 Transkriptionsstart.

Die Region wurde unter Verwendung der Primer “*XbaI*<sub>down</sub>” und “*HindIII*<sub>up</sub>” aus dem Plasmid pUC18H*nifA* amplifiziert und nach entsprechender Aufreinigung des PCR-Produktes über die Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* in den Vektor pBlueskriptKSII kloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pBluePCR1 wurde der Kernpromotorbereich anschließend (*XbaI/HindIII*) in den Expressionsvektor pJP2 umkloniert. Das resultierende Plasmid wurde pJP PCR1 (Abb. 4.16) genannt. Weitere Konstruktionen, die in ähnlicher Weise vollzogen wurden, waren pJP PCR3, pJP PCR4, pJP PCR5, pJP PCR6, pJP PCR7 und pJP PCR8 (Abb. 4.16). Bei den Konstrukten PCR3 und PCR4 handelt es sich prinzipiell um die gleichen Konstrukte wie PCR1, nur dass hier

als Template-DNA die Plasmide pUC18HEnifA<sub>Bup</sub> (Abb. 4.1) bzw. pUC18HEnifA<sub>Bdown</sub> verwendet wurden. Diese beiden Plasmide wurden in einer früheren Arbeit (Esser, 2000) konstruiert und enthielten jeweils eine neu eingeführte *Bam*HI-Schnittstelle. Die *Bam*HI-Schnittstelle des ersten Plasmides liegt 32bp stromabwärts des *fixX*-Stopcodons, wohingegen die des zweiten Plasmides direkt stromabwärts des *fixX*-Stopcodons eingefügt wurde. Beide liegen somit in der für die *nifA*-Expression essentiellen Region stromabwärts von P1. Die PCR-Produkte, die unter Verwendung dieser Templates amplifiziert wurden (gleiche Primer wie PCR1) verfügen demnach über Mutationen an definierten, bekannten Positionen. Diese wurden wie zuvor das PCR1-Fragment über die Schnittstellen *Xba*I und *Hind*III erst in den Vektor pBlueskriptKSII und von dort aus in den Vektor pJP2 kloniert. Die resultierenden Plasmide erhielten die Bezeichnungen pJP PCR3 und pJP PCR4. Einem weiteren Plasmid, dem pJP PCR5, diente das Plasmid pBlue *Hind*III/*Xba*I *nifA* als Template. Hier wurden jedoch die Primer "HindIII<sub>up</sub>" und der Sequenzierprimer M13 Universe verwendet. Das resultierende PCR-Produkt war damit stromaufwärts bis zu der neu eingefügten *Hind*III-Schnittstelle begrenzt, verfügte aber stromabwärts über einen DNA-Bereich, der sich bis zu der *Xba*I-Schnittstelle im *nifA*-Kodierbereich erstreckte und entsprach somit einem stromaufwärts deletierten Wildtypfragment mit voller *nifA*-Expression. Dieses konnte dann unter Nutzung der Schnittstellen *Xba*I und *Hind*III wie die vorangegangenen PCR-Produkte kloniert werden. Analog dazu wurden die Plasmide pJP PCR7 und pJP PCR8 konstruiert. Als Template DNA dienten hier jedoch die Plasmide pBlue *Hind*III/*Xba*I<sub>Bup</sub> und pBlue *Hind*III/*Xba*I<sub>Bdown</sub> in denen jeweils die entsprechenden *Bam*HI-Schnittstellen zu finden waren. Die letzten beiden Plasmide, die in diesem Versuchsteil zur Charakterisierung des *nifA*-Kernpromotorbereiches konstruiert wurden, erhielten die Bezeichnung pJP PCR6 und pJP PCR9. Ihre Konstruktion erfolgte auf Basis der Plasmide pBluePCR4 und pBluePCR8. Diese wurden jeweils mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI geschnitten. Im Anschluss daran erfolgte das Auffüllen der Restriktionsenden und eine Religation zum ringförmigen Plasmid. Auf diese Weise wurden die auf diesen Plasmiden vorhandenen definierten Mutationen (*Bam*HI-Schnittstellen) ausgedehnt. Die Übertragung des mutierten *nifA*-Kernpromotorbereiches in den Vektor pJP2 erfolgte im Anschluss über die Schnittstellen *Xba*I und *Hind*III. Sämtliche pJP-Konstrukte wurden danach nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 mobilisiert. Die Namensgebung der Mutanten erfolgte analog zu der der Plasmidkonstrukte. Es wurde lediglich das Kürzel VF39 vorangesetzt um den verwendeten Rhizobienstamm zu kennzeichnen.

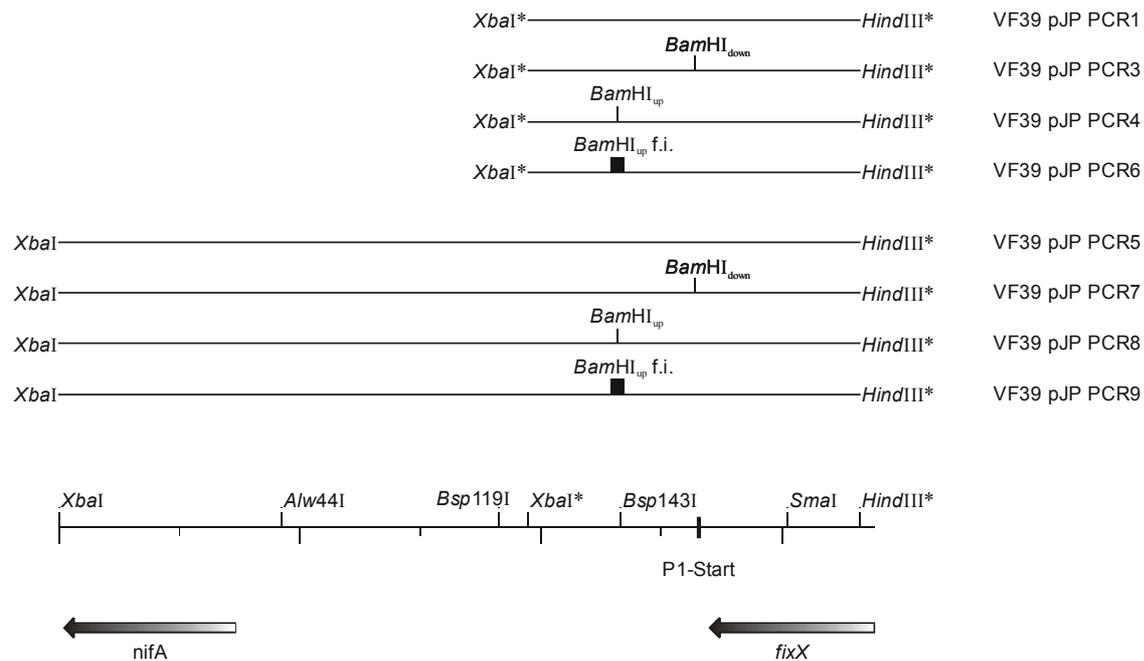


Abb. 4.16: Darstellung der in diesem Versuchsteil zur Charakterisierung der *nifA*-Kernpromotorregion verwendeten Reporterfusionen.

Die Position der wichtigsten Restriktionsschnittstellen ist angegeben, ebenso die Position der beiden in dieser Region zum Teil vorhandenen Gene *nifA* und *fixX*. Der Transkriptionsstart von P1 ist mit P1-Start bezeichnet. Die Abkürzung f.i. der Konstrukte PCR6 und PCR9 steht für eine an dieser *BamHI*-Schnittstellen durchgeführten Auffüllungsreaktion. Entsprechend der eingefügten Nukleotide in diesem Bereich ist die dargestellte Region verdickt dargestellt. Durch PCR-Reaktionen neu eingeführte Schnittstellen sind mit einem \* versehen.

## 4.2.2 Aktivitätsbestimmung der *nifA*-Kernpromotorregion

Nach Mobilisierung der Reportergenkonstrukte in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 (Abb. 4.16) wurde die Aktivität von P1 unter mikroaeroben Bedingungen bestimmt. Dazu wurden je Konjugationsansatz drei Kolonien im TY-Flüssigmedium angeimpft und für zwei Tage bei 30°C langsam gerollert. Die Messung der  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität erfolgte mittels PNPG-Test. Ebenso wurde ein Pflanzentest, sowie eine Aktivitätsbestimmung unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der in diesen Testreihen eingesetzten Derivate sind in Abb. 4.17 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass der *nifA*-Kernpromotor (PCR1) im Vergleich zum Wildtyp (PCR5) unter mikroaeroben Bedingungen eine Aktivität zeigt, die mit etwa 500 Units bei 330% liegt, wenn die Aktivität des Wildtypkonstruktes im gleichen Versuchsansatz mit 100% bewertet wird. Dies bedeutet folglich, dass die Region stromabwärts der neu eingeführten *XbaI*\*-Schnittstelle (Abb. 4.16) einen negativen Einfluss auf die Aktivität des *nifA*-Promotors P1 hat. Mögliche Sekundärstrukturen in dieser Region und deren Effekte auf P1 wurden bereits diskutiert.

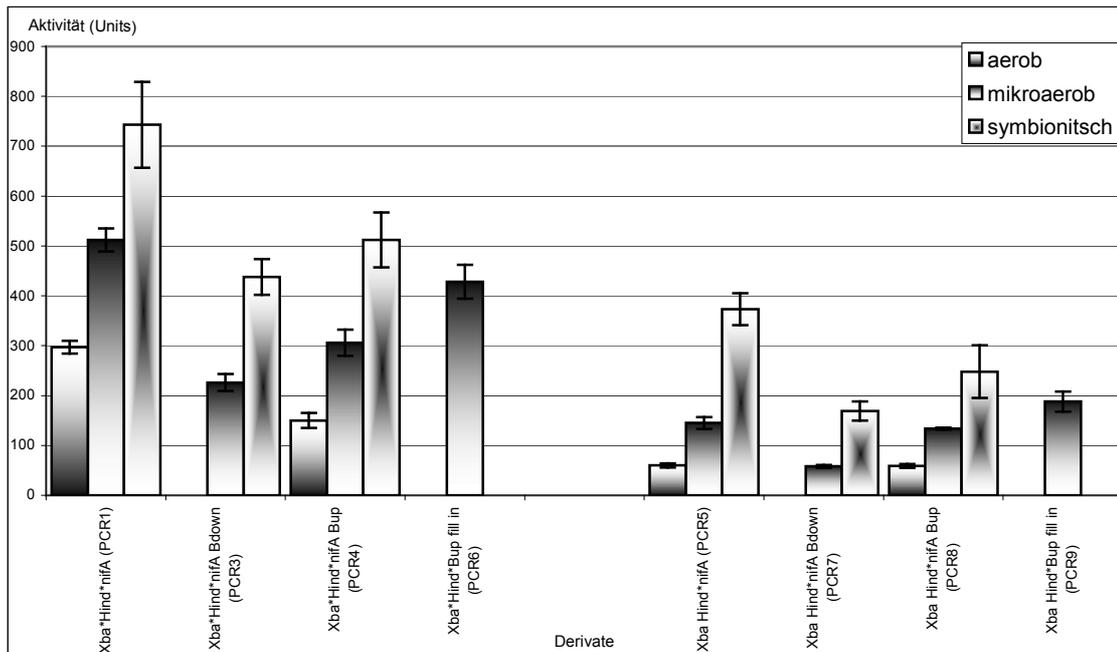


Abb. 4.17: Aktivitätsbestimmung der über PCR amplifizierten Kernpromotorregion in Vergleich zum Wildtyppromotor. Der Block auf der linken Seite stellt Konstrukte basierend auf dem Kernpromotor und der Block auf der rechten Seite stellt Konstrukte basierend auf der vollständigen Promotorsequenz dar. Gemessen wurde, wie dargestellt, unter aeroben, mikroaeroben sowie unter symbiontischen Bedingungen.

In der Symbiose mit *Pisum sativum* erhöht sich die Aktivität von Derivat VF39 pJP PCR1 deutlich um +50% auf etwa 750 Units (Abb. 4.17). Auch bei Derivat VF39 pJP PCR5 ist eine deutliche Aktivitätssteigerung zu messen, nur fällt die symbiontische Aktivierung erheblich stärker aus und beträgt etwa +150%. Dennoch liegt das Niveau von Derivat VF39 pJP PCR5 mit 375 Units bei 50% deutlich unter dem von Derivat VF39 pJP PCR1. Dieser Niveauunterschied ist wahrscheinlich in den angesprochenen Strukturen begründet und hat daher nichts mit der tatsächlichen symbiontischen Aktivierung zu tun.

### 4.2.3 Interpretation der bisherigen Ergebnisse

Zusammenfassend werden folgende Punkte festgehalten:

- Für seine Aktivität benötigt der *nifA*-Promotor eine Region die etwa 101bp umfasst.
- Der zuvor identifizierte Promotor P2 ist auf dieser Region nicht vorhanden und scheint daher für die *nifA*-Expression nicht essentiell, wenn überhaupt vorhanden zu sein.
- Die Aktivität eines isolierten *nifA*-Kernpromotors liegt sowohl unter mikroaeroben, symbiontischen als auch unter aeroben Bedingungen weit über der des Wildtyppromotors.

- Die symbiontische Aktivierung des Kernpromotors fällt um den Faktor drei geringer als die des Wildtyppromotors aus.
- Die Region zwischen Kernpromotor und *nifA*-Genregion hat einen negativen (repressiven) Einfluss auf die *nifA*-Promotorregion.

Dies würde bedeuten, dass der *nifA*-Promotor an zwei Punkten reguliert wird. Zum einen in der Kernpromotorregion selbst, denn ansonsten würde der *nifA*-Kernpromotor (PCR1) unter symbiontischen Bedingungen nicht aktiviert werden (Abb. 4.17). Jedoch konnten, wie bereits erwähnt, keine bekannten Sequenzmotive in dieser Region ausgemacht werden, um diese Theorie zu untermauern. Da ein Einfluss von NifA in dieser Region ausgeschlossen werden kann, handelt es sich bei P1 um einen NifA unabhängigen Promotor. Zum anderen wäre es auch möglich, dass sich regulative Elemente in der Region zwischen dem Kernpromotor und der *nifA*-Genregion befinden. Diese würden jedoch nicht positiv, sondern negativ auf den *nifA*-Promotor wirken müssen. Es wäre denkbar, dass derartige Elemente die *nifA*-Expression unter mikroaeroben Bedingungen herunterregulieren und eine volle Promotoraktivität nur in der Symbiose zulassen. Eine derartige Regulierung ist jedoch bei der *nifA*-Regulation anderer Rhizobien bisher nicht beschrieben worden. Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 4.17 so kann man weiterhin zu dem Schluss kommen, dass der Einfluss der repressiven Elemente auf die *nifA*-Expression größer ist, als der Einfluss der Elemente, die auf den Promotor selbst (in positiver Weise) wirken. Bekräftigt würde diese Hypothese durch das Verhältnis der symbiontischen Aktivierung der Derivate VF39 pJP PCR1 und VF39 pJP PCR5. Ersteres verfügt nicht mehr über eventuelle repressive Elemente und wäre somit von vornherein dereguliert, was die enorme Aktivität unter mikroaeroben Bedingungen erklären könnte. In der Symbiose hätte es keinerlei Effekt, ob das repressive Potential dieser Elemente verringert bzw. ganz ausgeschaltet würde. Die symbiontische Aktivierung dieses Derivates kann demnach nur durch Faktoren hervorgerufen werden, die positiv auf die *nifA*-Kernpromotorregion wirken. Da dieses Derivat dereguliert ist, fällt diese Aktivierung geringer aus. Im Gegensatz dazu wäre Derivat VF39 pJP PCR5 unter mikroaeroben Bedingungen durch die repressiven Elemente herunterreguliert. Eine "Deregulation" erfolgte dann erst in der Symbiose. Betrachtet man nur die Aktivitätssteigerungen der beiden Derivate von +50% (PCR1) bzw. +150% (PCR5), könnte man annehmen, dass der Effekt der "Deregulation" (Kap. 4.3) der wichtigere ist. Weiterhin interessant sind die in Abb. 4.17 dargestellten Ergebnisse zur Messung der Promotoraktivitäten der Derivate VF39 pJP PCR3, VF39 pJP PCR4 sowie der Derivate VF39 pJP PCR7 und VF39 pJP PCR8. Diese wurden, wie beschrieben, so konstruiert, dass *Bam*HI-Schnittstellen an zwei unterschiedlichen Stellen eingefügt wurden. Auf diese Weise verfügten die oben

aufgeführten Derivate über definierte Mutationen an bekannten Positionen (Abb. 4.16). Auffällig ist, dass die Aktivität aller Derivate unter mikroaeroben Bedingungen (zum Teil) stark reduziert ist. Ein deutlicher Effekt ist dabei in den unterschiedlichen Mutationen in der *BamHI*<sub>up</sub> und *BamHI*<sub>down</sub> zu erkennen. Die Nukleotidaustausche, die zur Ausbildung der Schnittstelle *BamHI*<sub>down</sub> führten, umfassen zwei bp. Dabei wurden das Nukleotid Guanin drei bp stromabwärts des *fixX* Stopkodons gegen ein Thymin und das Thymin ein bp weiter stromabwärts gegen ein Cytosin ausgetauscht. Die Mutation liegt somit exakt in dem Bereich, in dem im Wildtyp der P1-Transkriptionsstartpunkt detektiert wurde. Folglich zeigen alle Derivate, die diese Mutation tragen, unter allen untersuchten Bedingungen starke Aktivitätseinbußen (Vergleich PCR1 – PCR3 und PCR5 – PCR7). Die Mutation in der Schnittstelle *BamHI*<sub>up</sub> liegt 32bp stromabwärts der Position, an der die erste Schnittstelle eingefügt wurde. Diese umfasst nur ein Nukleotid. Hier wurde ein Cytosin gegen ein Guanin ersetzt. Es fällt auf, dass die Aktivität von Derivat VF39 pJP PCR4 (300 Units) im Vergleich zu Derivat VF39 pJP PCR1 (500 Units) unter mikroaeroben Bedingungen deutlich reduziert ist und das obwohl die Mutation deutlich stromabwärts von P1 liegt. Unter symbiontischen Bedingungen bleibt dieser Aktivitätsunterschied von etwa 200 Units jedoch fast exakt bestehen. Die Aktivitäten der beiden Derivate erhöhen sich nur parallel auf etwa 700 Units (PCR1) bzw. 500 Units (PCR4). Die Mutation in dieser Schnittstelle scheint bezogen auf den Kernpromotor an sich zwar einen negativen Effekt auf die Promotoraktivität zu haben, bei der symbiontischen Aktivierung jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen. Betrachtet man den Einfluss der Mutation auf die Aktivität der gesamten Promotorregion, zeigen die Derivate VF39 pJP PCR1 und VF39 pJP PCR8 unter mikroaeroben Bedingungen im Grunde genommen sehr ähnliche Expressionsraten. Diese liegen bei jeweils etwa 140 Units. Während der Symbiose steigt die Aktivität von PCR1 um etwa 150%, was in einer Aktivität von 375 Units resultiert. Die Aktivität von PCR8 steigt jedoch nur um etwa 65% auf 245 Units an. Eine Mutation an dieser Position, stromabwärts von P1 zeigt folglich nur dann eine messbare Reduzierung der symbiontischen Aktivierung, wenn der vollständige Promotorbereich vorhanden ist. Dies bedeutet, dass die Regionen stromabwärts des Kernpromotors definitiv eine Rolle bei der Regulation der *nifA*-Expression spielen.

### 4.3 Einfluss der Sequenzen stromabwärts des Kernpromotors auf die *nifA*-Expression

Durch die Identifizierung des *nifA*-Kernpromotors und durch seine im Verhältnis zum Wildtyp enorm gesteigerte Aktivität stellte sich die Frage, welchen Einfluss der Bereich stromabwärts des Kernpromotors auf die *nifA*-Expression hat. Die bisherigen Daten lassen den Schluss zu, dass dieser Bereich die Aktivität des P1 im Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen auf ein niedrigeres Niveau herunterreguliert und somit einen repressiven Einfluss auf die *nifA*-Promotoraktivität ausübt. Auf diese Weise würde eine überhöhte *nifA*-Expression unter falschen Bedingungen verhindert werden. Da das NifA Protein sauerstoffempfindlich ist (Fischer, 1994) und eine Fixierung atmosphärischen Stickstoffs in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 und anderen Rhizobien nur in der Symbiose mit ihren entsprechenden Wirtspflanzen stattfindet, wäre eine solche regulative Maßnahme sehr sinnvoll, um eine zwecklose *nifA*-Expression und NifA-Translation zu unterbinden. Die weitaus wichtigere Frage ist jedoch, ob diese Region regulative Eigenschaften besitzt, welche die *nifA*-Expression nicht nur herunterregulieren, sondern in der Symbiose auch ein höheres Expressionsniveau zulassen und den *nifA*-Promotor so in gewisser Weise "freischalten" könnte. Ein ähnliches System, wo ein regulatives Element (Attenuator) stromabwärts eines Promotors die Expressionsrate mitreguliert, findet man bei Prokaryoten z.B. bei der Regulation des Tryptophan-Operons in *E. coli* (Yanofsky, 1981). Wenn es sich dabei um die einzige regulative Maßnahme bei der *nifA*-Expression handeln würde, wäre Grundvoraussetzung einer solchen Idee sicherlich, dass es sich bei dem *nifA*-Promotor um einen konstitutiven Promotor handelt.

#### 4.3.1 Konstruktion von VF39-Derivaten zur Untersuchung einer potentiell regulativen Region stromabwärts des P1

In diesem Experiment sollten unter Verwendung geeigneter Reporter-genkonstrukte die oben aufgeführten Fragestellungen geklärt werden. Um die regulativen und repressiven Eigenschaften der zu untersuchenden Region zu charakterisieren, sollte ein starker *nifA* unabhängiger Promotor vor diese Region kloniert werden. Anhand der Auswirkungen dieser Region auf die messbare Aktivität des verwendeten Promotors sollten Rückschlüsse auf ihre Funktion möglich sein. Verwendet wurde der *nptII*-Promotor. Dieser wurde inklusive der kompletten Neomycinresistenzgenkassette über die Schnittstellen *Sma*I und *Hind*III aus dem Vektor pUC8neo entnommen und konnte

nach dem Auffüllen der Restriktionsenden in den Vektor pJP2 umkloniert werden. Dieser wurde zuvor mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* linearisiert und die Restriktionsenden aufgefüllt. Bei dem resultierenden Plasmid, pJP Neo war es essentiell darauf zu achten, dass die Kasette in der richtigen Orientierung und zwar *nptII*-Promotor → Neomycinresistenzgen → Polyklonierstelle → *uidA* kloniert wurde, um eine in Richtung *uidA* Reporter gen gerichtete *nptII*-Promotorgenaktivität zu gewährleisten. Da die Polyklonierstelle des pJP2 in diesem pJP Neo-Grundkonstrukt, mit Ausnahmen der *KpnI*-Schnittstelle noch vollständig intakt war, konnte diese genutzt werden, um verschiedene Fragmente zwischen die Neomycinresistenzgenkassette und *uidA* zu klonieren. Auf diese Weise konnte deren Einfluss auf den vorangeschalteten Promotor (*nptII*) bestimmt werden. Die dabei verwendeten Fragmente (Abb. 4.18) waren erstens das 137bp PCR1-Fragment *XbaI*\*/*HindIII*\* aus dem Vektor pBlue PCR1 und zweitens das 331bp PCR5-Fragment *XbaI*/*HindIII*\* aus dem Vektor pBlue PCR5. Die resultierenden Konstrukte wurden mit pJP Neo PCR1 bzw. pJP Neo PCR5 bezeichnet. Es handelte sich bei den Inserts um den Kernpromotor (PCR1) und um den stromaufwärts deletierten Wildtyppromotor (PCR5). Bei den Fragmenten drei und vier handelte es sich um zwei promotorlose Bereiche stromabwärts des

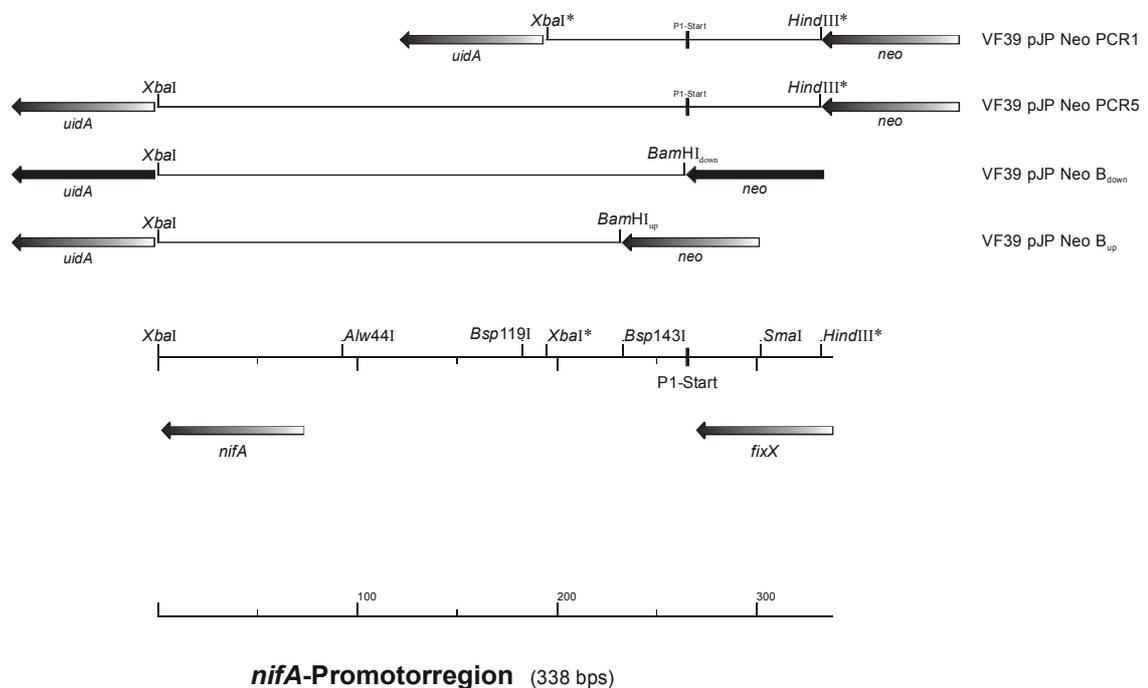


Abb. 4.18: Darstellung der Konstrukte zur Charakterisierung der Kernpromotor-*nifA*-intergenischen Region. Angegeben sind sämtliche zur Klonierung verwendeten Schnittstellen, wobei über PCR neu eingeführte Schnittstellen mit einem \* versehen sind. Weiterhin sind die relative Lage und Orientierung des promotorlosen Reportergens *uidA*, der Neomycinresistenzgenkassette, des *nifA* und des *fixX*-Kodierbereiches dargestellt. Abkürzungen: *uidA*:  $\beta$ -Glukuronidase, *neo*: Neomycinresistenzgenkassette inkl. *nptII*-Promotor.

Kernpromotors, die im Gegensatz zu den beiden anderen Insertionen keine eigene Promotoraktivität aufwiesen. Um Konstrukt drei zu erstellen, wurde der 262bp *Bam*HI/*Xba*I Bereich aus dem Plasmid pUC18HE *nifA* B<sub>down</sub> über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in pJP Neo eingebracht. In gleicher Weise wurde das Konstrukt vier erstellt. Hier wurde ein 231bp *Bam*HI/*Xba*I-Fragment aus dem Vektor pUC18HE *nifA* B<sub>up</sub> in den Vektor pJP Neo umkloniert. Die resultierenden Plasmide wurden mit pJP Neo B<sub>down</sub> und pJP Neo B<sub>up</sub> bezeichnet.

Alle Konstrukte wurden im Anschluss wie beschrieben nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 mobilisiert.

#### **4.3.2 Aktivitäten der *nptII-nifA*-Derivate zur Bestimmung des Einflusses der Sequenzen stromabwärts des Kernpromotors auf die *nifA*-Expression**

Die Aktivität der nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 mobilisierten *nptII-nifA*-Konstrukte wurde freilebend, unter mikroaeroben Bedingungen und in der Symbiose mit *Pisum sativum* bestimmt. Die Messung der Aktivität erfolgte unter Verwendung des PNPG-Tests. Die aufbereiteten Resultate dieser Messungen sind in Abb. 4.19 dargestellt.

Ziel dieses Versuches war, den Einfluss der Strukturen stromabwärts des Kernpromotorbereiches auf stromaufwärts davon gelegene Promotoren zu charakterisieren. Dazu wurde ein starker *nifA* unabhängiger Promotor (Neo-Resistenzgenkassette inklusive *nptII*-Promotor) wie beschrieben vor diesen Bereich kloniert und das Maß der Aktivitätsminderung unter mikroaeroben sowie unter symbiontischen Bedingungen bestimmt. Als Start- bzw. Leerwert diente dabei die Aktivität von Derivat VF39 pJP Neo. Das mobilisierte Reporterplasmid dieses Derivats stellt eine Neomycinresistenzgenkassette kloniert vor das *uidA*-Reporter des pJP2 dar, gibt also nur die Aktivität der Neomycinkassette unter den verschiedenen Bedingungen wieder. Da die Aktivitäten des *nptII*-Promotors unter den verschiedenen Bedingungen stark variieren, sind Rohdaten zu dieser Messreihe wenig aussagekräftig. Daher wurde eine Darstellung wie in Abb. 4.19 gewählt, in der die relativen Aktivitäten der einzelnen Derivate unter verschiedenen Bedingungen angegeben sind. Die Aktivitäten von Derivat VF39 pJP Neo wurde als Referenzwert verwendet und seine Aktivität unter mikroaeroben, als auch unter symbiontischen Bedingungen als jeweils 100% festgesetzt. Die Aktivitäten der verschiedenen Derivate wurden in beiden Messreihen (mikroaerob, symbiontisch) jeweils relativ zu diesen

Ausgangsaktivitäten prozentual umgerechnet. Dieser Schritt war legitim, da in diesem Versuch nicht die gemessenen, absoluten Werte interessieren, als vielmehr die "relativen Aktivitäten". Mit "relativen Aktivitäten" ist in diesem Fall der Einfluss der Sequenzen stromabwärts des Kernpromotors auf stromaufwärts davon lokalisierte Promotoren (hier dem Neopromotor) gemeint. Die Folge einer solchen Darstellungsweise ist eine weitaus übersichtlichere Grafik, da vor allem keine Rücksicht auf die unterschiedlichen Aktivitäten des *nptII*-Promotors unter verschiedenen Bedingungen genommen werden muss. Diese betrug etwa 1800 Units unter mikroaeroben Bedingungen, jedoch nur etwa 1100 Units in der Symbiose. Im Folgenden können beide Aktivitäten mit 100% "Ausgangsaktivität" bezeichnet werden (Abb. 4.19).

Bei Betrachtung der Aktivitäten von Derivat VF39 pJP Neo B<sub>down</sub> und VF39 pJP Neo B<sub>up</sub> im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.19) ist zu erkennen, dass die stromabwärts des Kernpromotorbereiches gelegenen Sequenzen einen repressiven Einfluss auf stromaufwärts davon gelegene Promotoren haben. Die Aktivität der Kontrolle VF39 pJP Neo beträgt nach der oben beschriebenen Festlegung unter mikroaeroben Bedingungen, sowie in der Symbiose 100%. Diese Aktivität wird durch das promotorlose *Bam*HI/*Xba*I-Fragment aus dem Plasmid pUC18HE *nifA* B<sub>down</sub> (Abb. 4.18) unter mikroaeroben Bedingungen um etwa 60% auf 40% reduziert (Abb. 4.19).

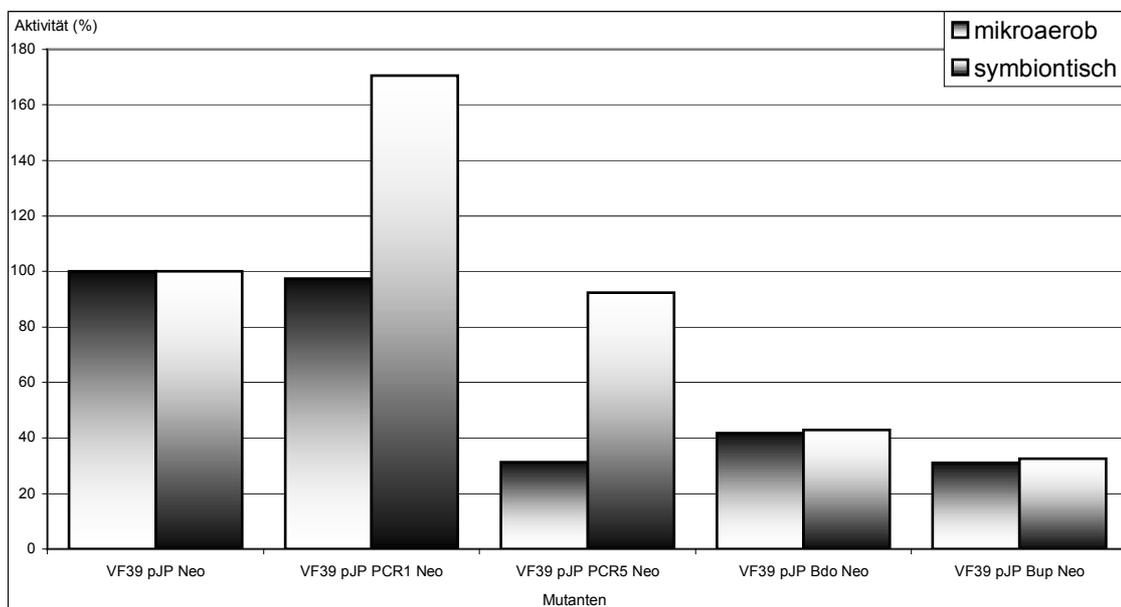


Abb. 4.19: Darstellung der relativen Aktivitäten (in %) der verwendeten VF39 pJP *nptII-nifA*-Derivate.

Derivat VF39 pJP Neo stellt in diesem Versuch den Kontrollwert dar. Ihre Ausgangsaktivität ist mit 100% festgelegt, sowohl unter mikroaeroben Bedingungen, als auch während der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum*. Die weiteren Derivate sind konstruiert wie beschrieben und in Abb. 4.18 dargestellt. Die Aktivitäten dieser Derivate wurden entsprechend der Rohdaten prozentual (Bezug VF39 pJP Neo = 100%) umgerechnet. Die Resultate der mikroaeroben Messreihen, sowie der symbiontischen Aktivitätsbestimmungen sind wie angegeben grafisch unterschiedlich dargestellt.

Eine nahezu identische Drosselung der Aktivität durch dieses Fragment wird in der Symbiose erreicht. Auch das promotorlose *Bam*HI/*Xba*I-Fragment aus dem Plasmid pUC18HE *nifA* B<sub>up</sub> (Abb. 4.18) reduziert die *nptII*-Aktivität unter mikroaeroben Bedingungen um 70% auf etwa 30%. Sehr ähnliches gilt für die Messung der Aktivität während der Symbiose (Abb. 4.19).

### 4.3.3 Interpretation der bisherigen Ergebnisse

Die Interpretation der Messergebnisse lässt drei Feststellungen eindeutig zu. Erstens haben die Strukturen stromabwärts des *nifA* Kernpromotorbereiches einen repressiven Einfluss auf die Aktivitäten stromaufwärts dieser Region lokalisierter Promotoren. Wodurch diese "Herunterregulierung" der Promotoraktivität zustande kommt, kann nur vermutet werden. Es scheint jedoch sehr wahrscheinlich, dass dieser Effekt vor allem auf die bereits erwähnten Sekundärstrukturen und ihre destabilisierende Wirkung auf den RNA-Polymerase-DNA Komplex zurück zu führen ist. Zweitens ist dieser negative Einfluss dabei unabhängig vom Promotor, d.h. es ist irrelevant, ob es sich um den *nifA*-Promotor oder einen beliebig anderen Promotor (*nptII*) handelt. Drittens kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die zu charakterisierenden Strukturen kein regulatives Potenzial aufweisen. Dies ist deutlich daran zu erkennen, dass die relative Aktivitätsminderung, die von dieser Region ausgeht, unter mikroaeroben Bedingungen und während der Symbiose gleich ist. Hätte diese Region ein regulatives Potential auf stromaufwärts gelegene Promotoren, so wäre unter symbiontischen Bedingungen ein deutlicher Aktivitätsanstieg von Derivat VF39 pJP Neo B<sub>down</sub> und VF39 pJP Neo B<sub>up</sub> zu erwarten gewesen. Ein solcher "Freischaltungsprozess" ist hier jedoch eindeutig nicht gegeben. Folglich handelt es sich hier definitiv nicht um eine Regulation im Sinne einer Attenuation wie dies in *E. coli* bei der Expressionskontrolle des *trp*-Operons der Fall ist. Das heißt zusammenfassend, der *nifA*-Promotor zeigt eine deutlich höhere Aktivität als die, die im Wildtyp gemessen werden kann, wird jedoch stark herunterreguliert.

Schwieriger zu erklären sind die Aktivitäten der Derivate VF39 pJP Neo PCR1 und VF39 pJP Neo PCR5. Es scheint logisch zu sein, dass die Aktivität von Derivat VF39 pJP Neo PCR1 unter mikroaeroben Bedingungen eine ähnliche Aktivität wie die Kontrolle zeigt, da hier die Region stromabwärts des Kernpromotorbereiches nicht vorhanden ist. Gleichzeitig hat P1 unter diesen Bedingungen nur eine geringe Basisaktivität, so dass sich seine Eigenaktivität wenig auf die Gesamtexpression auswirken sollte. Auf der anderen Seite ist die Aktivität von Derivat VF39 pJP Neo PCR5 unter mikroaeroben Bedingungen deutlich auf etwa 30% (Abb. 4.19) reduziert. Dieser Effekt kann wiederum nur durch die Sequenzen stromabwärts des

Kernpromotorbereiches hervorgerufen werden. Betrachtet man jedoch die Aktivitäten dieser Derivate während der Symbiose, so fällt die jeweils starke Aktivitätszunahme auf. Beide Derivate verfügen neben dem *nptII*-Promotor der Neomycinresistenzgenkassette auch über den *nifA*-Promotor. Daher kann dieser Effekt nur auf den letzteren zurückzuführen sein. Die absolute Aktivität von Derivat VF39 pJP Neo PCR1 ist mit 170% (1800 Units) zwar doppelt so hoch wie die von Derivat VF39 pJP Neo PCR5 (92%, 984 Units), dennoch zeigt VF39 pJP Neo PCR5 eine im Verhältnis zur Aktivität unter mikroaeroben Bedingungen weitaus höhere Induktion der *nifA*-Expression. Diese beträgt bei Derivat VF39 pJP Neo PCR1 etwa 75%. Die symbiontische Aktivierung von Derivat VF39 pJP Neo PCR5 liegt jedoch bei ungefähr 200%, was im Vergleich zur Induktion des Kernpromotors einer Steigerung um das 2,6-fache entspricht. Dieses Verhältnis einer etwa dreifach höheren Induktion des Wildtyps in Vergleich zum Kernpromotor wurde bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben und bestätigt somit die bisherigen Messergebnisse.

#### **4.4 Identifizierung regulativer Elemente durch generelle Transposonmutagenese unter Verwendung des Transposons Tn5**

Der einzige Baustein, der bei der Regulation der *nifA*-Expression bisher eindeutig identifiziert werden konnte, war der P1-Promotor, der innerhalb einer für die Expression essentiellen Kernpromotorregion lokalisiert ist. Die bisherigen Versuchsergebnisse legten den Schluss nahe, dass P1 wahrscheinlich ein *NifA*-unabhängiger Promotor ist. Ob und durch welche sonstigen Faktoren dieser Promotor reguliert bzw. beeinflusst wird, sollte in diesem Experiment untersucht werden. Mittels einer generellen Transposonmutagenese (Tn5) sollten auf die *nifA*-Expression wirkenden Faktoren identifiziert werden. Um eine derartige Untersuchung im Wildtyp vornehmen zu können, wurde die Mutagenese mit Hilfe von Derivat VF39 pJP PCR1 (Kernpromotor) durchgeführt. Die Kolonien, die VF39 pJP PCR1 auf X-Gluc-haltigen TY-Platten ausbildet, wiesen auf Grund ihrer höheren Expressionsrate eine deutlich intensivere Blaufärbung auf, als Wildtypkolonien (VF39 *XbaI/HindIII nifA*) unter gleichen Bedingungen. Daher sollte es mit diesem Derivat einfacher sein, solche Tn5-Mutanten zu identifizieren, die eine geringere  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität und somit geringere *nifA*-Expression zeigen. Werden durch das Transposon Tn5, welches bei dieser Mutagenese eingesetzt wurde, Faktoren getroffen, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die *nifA*-Expression haben, so würde sich dies in der  $\beta$ -

Glucuronidaseaktivität von VF39 pJP PCR1 zeigen. Diese Faktoren würden dann *in trans* auch auf das Reporterplasmid dieses Derivates wirken und die *nifA* Expressionsrate erhöhen oder erniedrigen, je nachdem ob ein repressives Element oder ein aktivierender Faktor getroffen wurde.

#### 4.4.1 Tn5-Mutagenese und phänotypische Identifizierung möglicher Mutanten

Die Tn5-Mutagenese wurde wie beschrieben durchgeführt. Als Rezipientenstamm wurde der Stamm VF39 pJP PCR1 und als Tn5-spendender Donorstamm der Stamm pSUP 1021 in der Mutagenese eingesetzt. Die Selektion erfolgte auf TY-Platten, denen die Antibiotika Streptomycin (Selektion gegen *E. coli*), Tetracyclin (Selektion auf das pJP PCR1-Plasmid) und Neomycin (Selektion auf Tn5), sowie X-Gluc zugesetzt wurden. Nach 2-4 Tagen Wachstum bei 30°C im Brutschrank erfolgte die Auswertung der Kolonien. Es wurden sämtliche Kolonien ausgewählt, die eine von Derivat VF39 pJP PCR1 abweichende Farbgebung zeigten. Diese wurden wiederum auf TY-Platten (s.o.) ausplattiert und erneut für 3 Tage inkubiert.

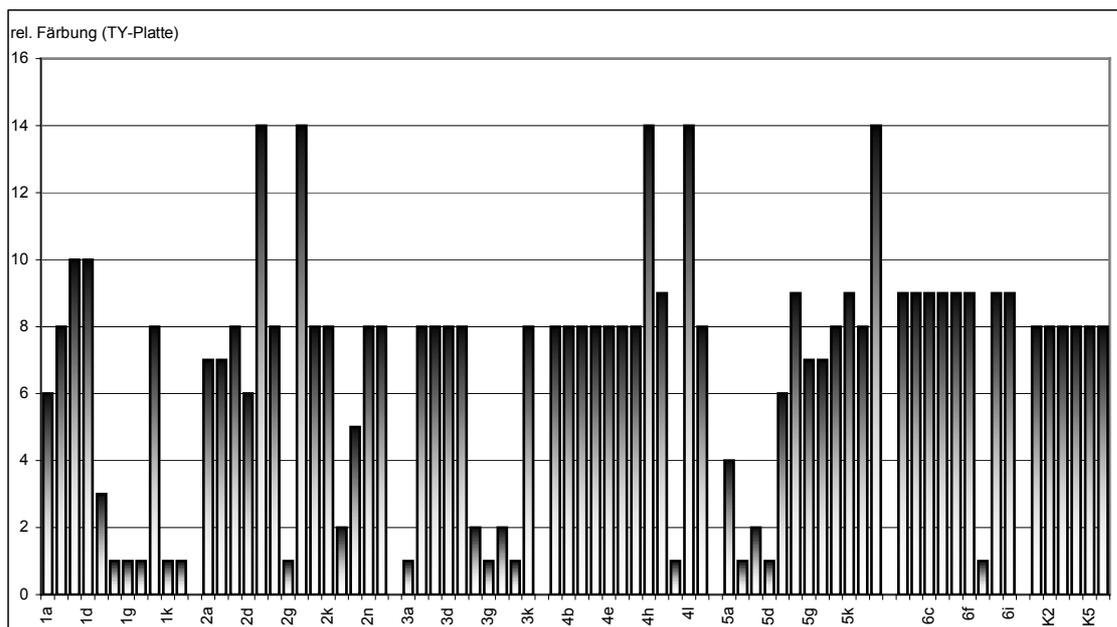


Abb. 4.20: Darstellung der relativen Farbintensitäten der 49 in diesem Versuchsansatz ausgewählten Mutanten unter freilebenden Bedingungen auf selektiven X-Gluc-haltigen TY-Platten.

Die Skalierung der relativen Farbintensitäten reicht von 0 bis 14, wobei 0 für weiße Kolonien und 14 für tief blaue Kolonien steht. Die Farbintensität von Derivat VF39 pJP PCR1 ohne Tn5 Mutagenese (K1 bis K6) liegt bei etwa 8 bis 9.

Dieser Schritt diente dazu, solche Kolonien deren Farbgebung nur auf Wachstumseffekten beruhte, von tatsächlich interessanten Kandidaten zu unterscheiden. Von diesen wurde im Anschluss die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität mittels

PNPG-Test bestimmt. Da im Laufe der Arbeit eine Vielzahl dieser Versuche zur Identifizierung möglicher regulatorischer Elemente durch Tn5-Mutagenese durchgeführt wurden und sich daher eine sehr große Datenmenge anhäufte, werden in Abb. 4.20 und 4.21 nur die Ergebnisse der letzten und erfolgreichen Mutagenese dargestellt. In Abb. 4.20 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Mutanten in drei große Gruppen einteilen lassen. Die eine Gruppe umfasst jene Mutanten die auf den TY-Platten bis auf geringfügige Abweichungen eine ähnliche Färbung zeigten wie die Kontrolle. Die zweite Gruppe, zu der die Mutanten VF39 pJP PCR1 - (1e, 1f, 1g, 1h, 1k, 1l, 2g, 2e, 3a, 3f, 3g, 3h, 3i, 4k, 5a, 5b, 5c, 5d und 6g) gehören, bezeichnen jene Mutanten, deren Kolonien eine stark verringerte bzw. keine Färbung zeigten. Mutanten mit einer erheblich intensiveren Färbung als die Kontrolle umfassen die Gruppe zu denen VF39 pJP PCR1 - (1b, 2e, 2h, 4h, 4l und 5m) gehören und somit die dritte Gruppe bilden. Unter mikroaeroben Bedingungen im Flüssigmedium zeigten jedoch nur die 19 Mutanten der zweiten Gruppe eine von der Kontrolle abweichende Aktivität.

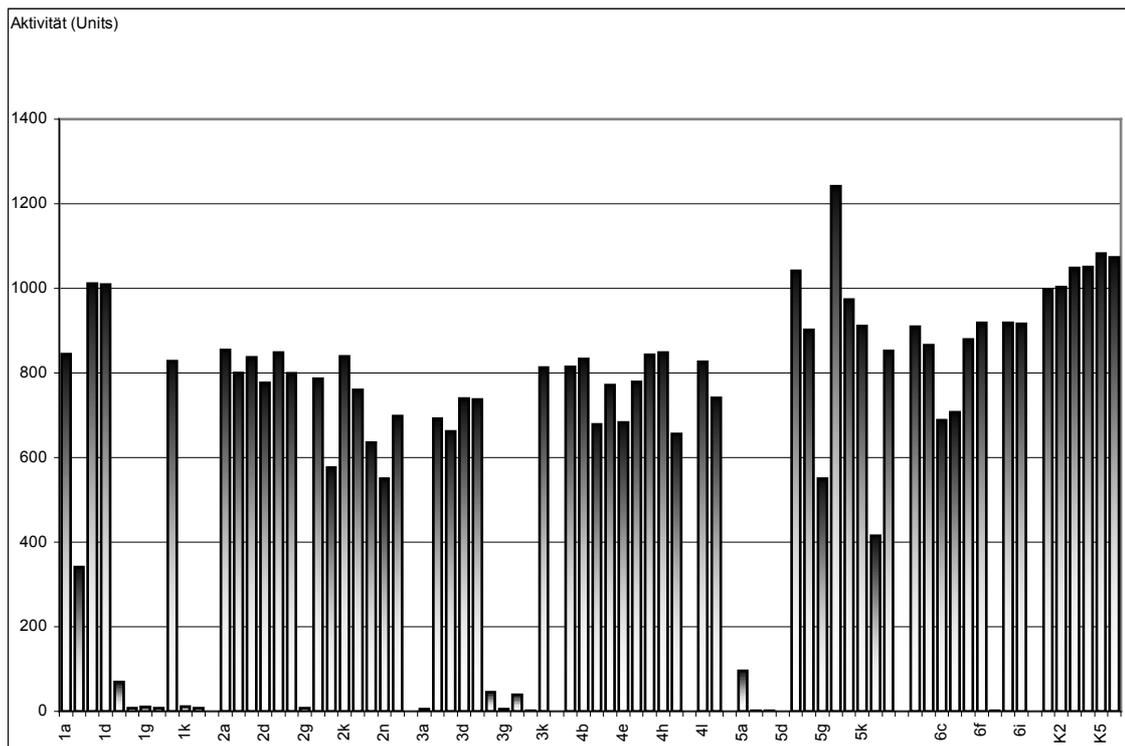


Abb. 4.21: Darstellung der Messergebnisse zur Bestimmung der  $\beta$ -Glukuronidaseaktivitäten der 49 in diesem Versuchsansatz ausgewählten Mutanten unter freilebenden, mikroaeroben Bedingungen (TY-Flüssigmedium). Die Derivate VF39 pJP PCR1 (K1 bis K6) stellen die Referenzwerte dar. Diese wurden keiner Tn5-Mutagenese unterzogen. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte mittels PNPG Test.

Die Mutanten der dritten Gruppe, die auf den TY-Platten eine stark intensivierte Färbung aufwiesen, zeigten unter diesen Bedingungen Aktivitäten wie die Kontrollen (Abb. 4.21). Da sich das Transposon Tn5 willkürlich in jede beliebige Position des

Genoms inserieren kann, musste bei der Interpretation der Ergebnisse darauf geachtet werden, dass es auch möglich war, dass sich das Tn5 in das Plasmid pJP PCR1 integriert. Mutanten bei denen dies passiert ist, können zwei deutliche Phänotypen zeigen. Inaktivierung des plasmidären *uidA*-Gens resultiert in Derivaten, die vollkommen farblos sind. Setzt sich das Tn5 unmittelbar stromaufwärts des *uidA*-Gens, so resultiert dieses Ereignis in Derivaten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine intensivere Blaufärbung aufweisen, da das Tn5 einen starken konstitutiven Promotor, den *nptII*-Promotor der Neomycinresistenzgenkassette, besitzt. Die Orientierung des Tn5 ist hierbei ausschlaggebend für den Phänotyp der Mutanten. Solche Tn5-pJP PCR1 Insertionen galt es zunächst von den "tatsächlichen" Mutanten zu unterscheiden. Dazu wurden die Mutanten zunächst in 10 ml TY-Flüssigmedium selektiv angezogen und bei 30°C gerollert, bis eine oD von 0,4 - 0,8 erreicht war. Aus dem kompletten Ansatz wurde im Anschluss das pJP PCR1-Plasmid der Mutanten isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Xba*I geschnitten. Als Kontrolle wurde das Plasmid pJP PCR1 (ohne Tn5-Mutagenese) der gleichen Restriktion unterworfen. Diese Restriktion resultierte bei der Kontrolle in vier DNA-Fragmenten, die eine Größe von 109 bp, 775 bp, 4833 bp und 6549 bp aufwiesen. Dieses Bandenmuster wurde ebenfalls bei allen "tatsächlichen" Mutanten beobachtet, da sich das Tn5 hier nicht im Plasmid integriert hatte. Die Tn5-pJP PCR1 Insertionsderivate wiesen hingegen ein abweichendes Bandenmuster auf. Hier waren, je nachdem wo sich das Tn5 im Plasmid integriert hatte zwei Fragmente um 2518 bp und 3300 bp erweitert, da das Tn5 mit seiner Größe von 5818 bp eine *Sma*I – Schnittstelle aber keine Erkennungssequenz für *Xba*I besitzt. Die abweichenden Fragmentgrößen konnten eindeutig mittels einer Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden. Dieser Teilversuch zeigte, dass es sich bei allen Derivaten, die eine reduzierte Farbtintensität aufwiesen bzw. auf den Platten ganz weiß erschienen, um Derivate handelte, bei denen sich das Tn5 auf dem Plasmid integriert hatte. Diese waren daher im Weiteren zu vernachlässigen. Die Mutanten 1b, 2e, 2h, 4h, 4l und 5m zeigten jedoch ein Bandenmuster wie das Kontrollplasmid pJP PCR1. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Mutanten um genomische Tn5 Insertionen handelte. Um sicher zu gehen, dass sich das Tn5, welches eine Resistenz gegen Kanamycin/Neomycin vermittelt, tatsächlich nicht auf dem Plasmid dieser Mutanten integriert hatte, wurden die aus diesen Mutanten isolierten pJP PCR1 Plasmide in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Die erste Selektion erfolgte auf tetracyklinhaltigen LB-Platten. Im Anschluss wurden einige der resultierenden Kolonien jeweils auf tetracyklinhaltigen und kanamycinhaltigen LB-Platten parallel ausgestrichen. Auf die gleiche Weise wurde mit den isolierten Plasmiden der Mutanten VF39 pJP PCR1 - (1e und 5a) verfahren.

Diese dienten als Negativkontrolle, da hier das Tn5 auf dem pJP-Plasmid integriert wurde. Es zeigte sich, dass die Plasmide der Mutanten VF39 pJP PCR1 - (1b, 2e, 2h, 4h, 4l und 5m) keine Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelten. Daher konnte sicher davon ausgegangen werden, dass sich das Tn5 nicht auf diesen Plasmiden befand, und es sich daher um echte Mutanten handeln musste. Hingegen vermittelten die Plasmide der Mutanten VF39 pJP PCR1 - (1e und 5a) eine Resistenz gegenüber Kanamycin, womit die Ergebnisse aus der Restriktionsanalyse bestätigt wurden.

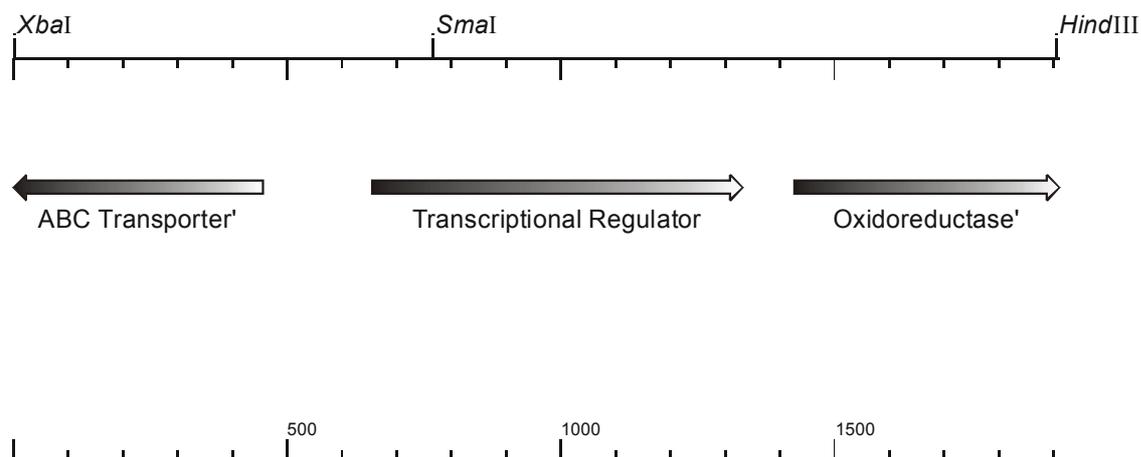
#### **4.4.2 Nachweis der Tn5-Insertionen durch Hybridisierung, Sequenzierung und Klonierung der getroffenen Genregion**

Wie zuvor gezeigt, konnten durch die Tn5 Mutagenesen sechs Mutanten identifiziert werden. Im Folgenden sollte mittels Southern Blot und Hybridisierung festgestellt werden, ob die Mutationen der einzelnen Mutanten in verschiedenen Regionen des *Rhizobium leguminosarum* VF39 bv. *viciae* Genoms lokalisiert waren, also unterschiedliche Gene getroffen wurden. Dazu wurden die Mutanten selektiv in Flüssigmedium bei 30°C angezogen, bis eine oD von etwa 0,4 bis 0,7 erreicht war. Die Mutante VF39 pJP PCR1-1b war aus bisher ungeklärten Gründen nicht in der Lage zu wachsen. Daher konnten keine weiterführenden Untersuchungen mit dieser Mutante vorgenommen werden. Aus den übrigen Mutanten wurde mit Hilfe der CTAB-Methode die Gesamt-DNA präpariert und im Anschluss verschiedenen Restriktionen unterworfen. Hierbei wurden die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *XbaI* und die Kombination dieser Enzyme in unterschiedlichen Ansätzen eingesetzt.

Die geschnittene DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und danach durch Vakuumblootting auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte unter Verwendung einer Tn5-Sonde, die zuvor ausgehend von den Plasmid pSUP 1021 über "Random Priming" hergestellt wurde. Bei sämtlichen Mutanten konnte in jedem der Restriktionsansätze ein Hybridisierungssignal gleicher Größe detektiert werden. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass sich das Tn5 in allen Mutanten in die gleiche Region integriert hatte. Die besagten Banden hatten bei der Restriktion mit *EcoRI* eine Größe von etwa 7 bis 8 kb. Dieses *EcoRI* Fragment konnte daher kloniert werden, um die betroffene Genregion zu sequenzieren. Die mit *EcoRI* geschnittene Gesamt-DNA der Mutante VF39 pJP PCR1 - 4h wurde dazu in den Klonier- und Sequenziervektor pBlueskript KSII kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit pBlue 4h bezeichnet. Durch eine Selektion auf das Tn5 auf kanamycinhaltigen LB-Platten konnte ein Klon

identifiziert werden, der diese *EcoRI* Region in pBlueskript KSII integriert hatte. Die Richtigkeit des Plasmids pBlue 4h konnte durch mehrere Restriktionen bestätigt werden. Sequenzierung und der anschließende Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit verschiedenen Datenbanken zeigten, dass ein Gen getroffen wurde, welches starke Homologien zu einem potentiellen Transkriptionsregulator aufwies. Die Sequenz dieser Genregion ist im Anhang aufgeführt.

Nachdem die Sequenzen der mutagenisierten Region bekannt waren, konnte die Klonierung des Transkriptionsregulators durchgeführt werden. Da keine geeigneten Schnittstellen für eine solche Klonierung vorhanden waren, wurden zwei neue Schnittstellen mittels PCR-Amplifikation eingeführt. Günstige Sequenzen für die Einführung der Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* wurden im Kodierbereich des potentiellen ABC-Transporters und im Kodierbereich des potentiellen Oxidoreduktasegens identifiziert (Abb. 4.22). Bei beiden Sequenzen musste jeweils nur ein Nukleotid ausgetauscht werden, um eine neue Schnittstelle zu generieren. Die ausgetauschten Nukleotide sind in der Sequenz im Anhang durch eine rote



### Transkriptionsregulator\*\* (1910 bps)

Abb. 4.22: Darstellung des PCR-Produktes, welches durch die Primer Rep *XbaI* und Rep *HindIII* aus dem Wildtypstamm *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 amplifiziert wurde.

Die Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* wurden über die beiden Primer eingefügt. Nach der Restriktion mit diesen Enzymen resultiert ein 1902 bp großes, klonierbares Fragment.

Unterlegung hervorgehoben. Die verwendeten Primer Rep *XbaI* und Rep *HindIII* wurden so konzipiert, dass im Amplifikationsprodukt die Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* neu eingefügt wurden. Das aufgereinigte PCR-Produkt konnte im Anschluss mit diesen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Das resultierende 1902 bp große

Fragment (Abb. 4.22) wurde darauf hin in den Vektor pBlueskript KSII kloniert und das resultierende Plasmid mit pBlue TraReg bezeichnet (Abb. 4.23).

#### 4.4.3 Erzeugung von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 Interposon-Mutanten

Ziel dieses Versuchsteiles war, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 Interposon-Mutanten herzustellen, um die Auswirkung der Mutation im Bereich des potentiellen Transkriptionsregulators auf den *nifA*-Promotor und andere Promotoren untersuchen zu können. Eine Untersuchung anderer Promotoren war in der Mutante VF39 pJP PCR1 - 4h nicht möglich, da diese bereits das stabile Plasmid pJP PCR1 integriert hatte. Die neu zu konstruierende Interposonmutante sollte lediglich über eine genomische Insertion verfügen, daher sollten in diese weitere pJP-Reporterfusionen mobilisiert werden können.

Zur Konstruktion der Interposonmutante wurde das Plasmid pBlue TraReg mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I linearisiert. Das Plasmid pUC8neo (Abb. 4.23) wurde parallel dazu mit *Hind*III linearisiert und die Restriktionsenden aufgefüllt.

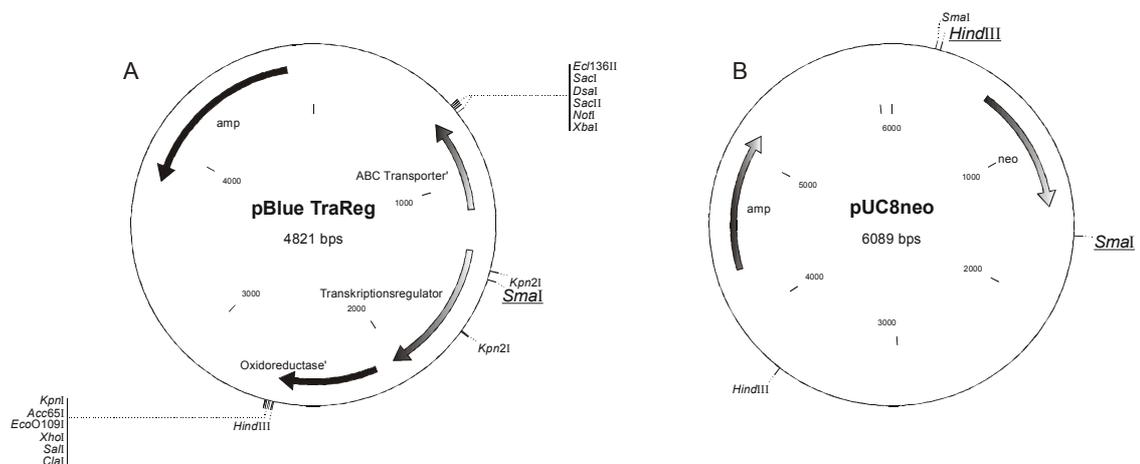


Abb. 4.23: (A) Darstellung des Plasmids pBlue TraReg.

Über die Schnittstellen *Xba*I und *Hind*III wurde das 1902 bp große, geschnittene PCR-Produkt in den Ursprungsvektor pBlueskript KSII eingeführt. (B) Schema des Vektors pUC8neo. Aus diesem Vektor stammt die zur Erzeugung der Interposonmutanten verwendete Neomycinresistenzgenkassette. Das 1323 bp große Fragment wurde über die Schnittstellen *Sma*I und *Hind*III aus dem Vektor entnommen. Zur Klonierung verwendete Schnittstellen sind unterstrichen und durch größere Darstellung hervorgehoben. Abkürzungen: *amp*: Ampicillinresistenzgen, *neo*: Neomycinresistenzgenkassette.

Die Neomycinresistenzgenkassette wurde dann mit *Sma*I ausgeschnitten und das resultierende, 1323 bp große, aufgereinigte Fragment, in das linearisierte Plasmid pBlue TraReg umkloniert. Da es sich bei dieser Ligation um eine "blunt-end"-Ligation, also eine Ligation mit glatten Restriktionsenden handelte, konnte die Neomycin-

resistenzgenkassette in zwei Orientierungen in den linearisierten Vektor pBlue TraReg integrieren. Die beiden resultierenden Plasmide wurden mit pBlue TraRegNeol und

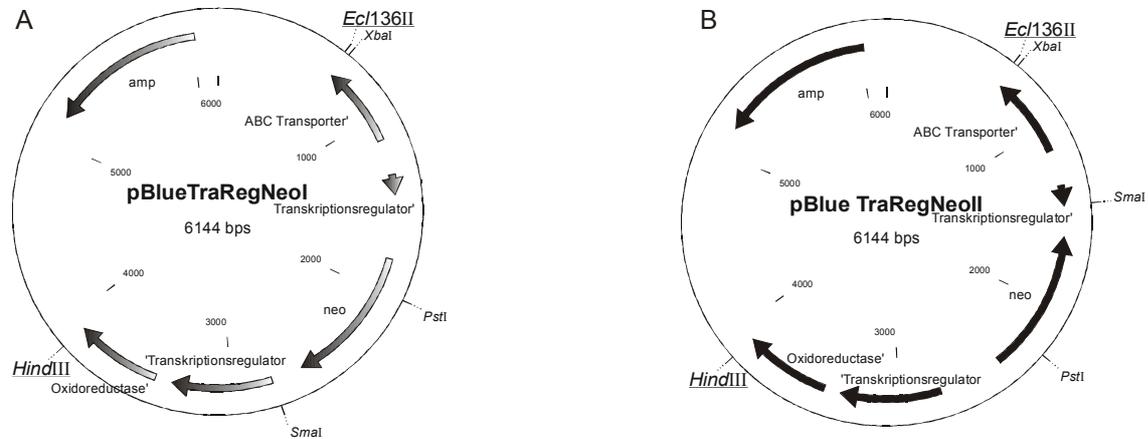


Abb. 4.24: Darstellung der Plasmide pBlue TraRegNeol und pBlue TraRegNeoll.

In Orientierung I ist die Neomycinresistenzgenkassette in Richtung (Expressionsrichtung) Oxidoreduktasegen in den Transkriptionsregulator eingeführt. In Orientierung II in Richtung des ABC-Transporters. Zur weiteren Klonierung verwendete Schnittstellen sind durch Unterstreichung und besondere Größe hervorgehoben. Abkürzungen: amp: Ampicillinresistenzgen, neo: Neomycinresistenzgenkassette.

pBlue TraRegNeoll bezeichnet (Abb. 4.24). Die Plasmide pBlue TraRegNeol und -II wurden mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *Ecl136II* geschnitten und die aufgereinigten 3247 bp großen Fragmente (Orientierung I und II) anschließend in den mobilisierbaren Vektor pAS269 umkloniert. Dieser wurde zuvor mit *EcoRI* geschnitten und die Restriktionsenden aufgefüllt, um glatte Enden zu generieren (*Ecl136II*). Danach wurde mit *HindIII* nachgeschnitten und der Vektoranteil aufgereinigt.

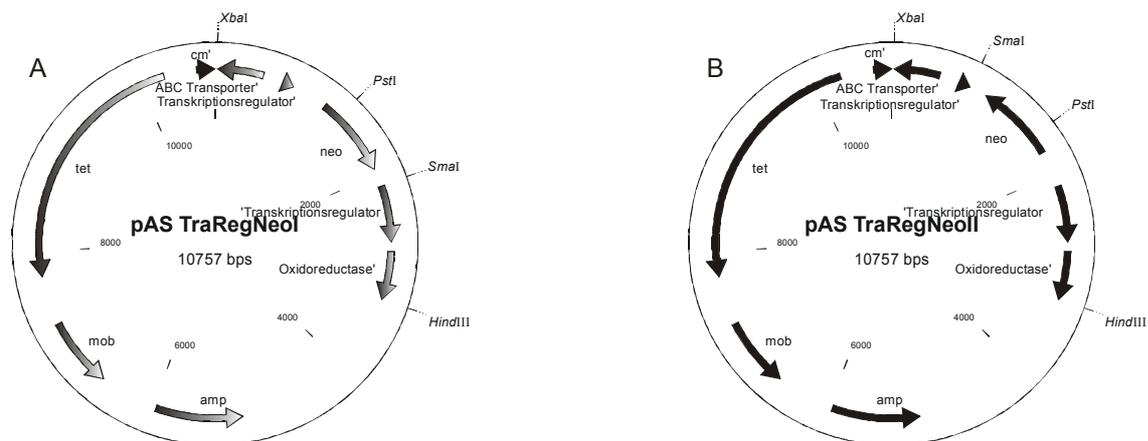


Abb. 4.25: Darstellung der mobilisierbaren Plasmide pAS TraRegNeol I und pAS TraRegNeoll.

In Orientierung I ist die Neomycinresistenzgenkassette in Richtung (Expressionsrichtung) Oxidoreduktasegen in den Transkriptionsregulator eingeführt. In Orientierung II in Richtung des ABC-Transporters. Abkürzungen: amp: Ampicillinresistenzgen, neo: Neomycinresistenzgenkassette, cm: Chloramphenicolresistenzgen, tet: Tetracyclin, mob: Konjugationsstartpunkt.

Die resultierenden Plasmide wurden mit pAS TraRegNeol und –II bezeichnet (Abb. 4.25). Nach der Transformation der als richtig befundenen Plasmide in den Mobilisatorstamm S17-1, erfolgte die Mobilisierung der Plasmide nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. Die erste Selektion zur Integration des Plasmids in das VF39-Genom durch homologe Rekombination erfolgte auf neomycinhaltigen TY-Platten. Die Kolonien, die nach 4-5 Tagen Wachstum bei 30°C im Klimaschrank zu erkennen waren, wurden anschließend auf neomycin- bzw. tetracyclinhaltigen Platten parallel ausgestrichen. Es wurde nach Kolonien gesucht, die neomycinresistent und gleichzeitig tetracyclinsensitiv waren. Auf diese Weise wurde auf den Verlust des Vektoranteils bei gleichzeitigem Erhalt der Neomycin-Resistenzgenkassetteninsertion getestet. Bei den Mutanten, die tetracyclinsensitiv und zugleich neomycinresistent waren, wurde die Neomycinresistenzgenkassette über homologe Rekombination in das *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 Wildtypgenom integriert. Die korrekte Homogenisierung wurde durch Hybridisierung überprüft (Abb. 4.26).

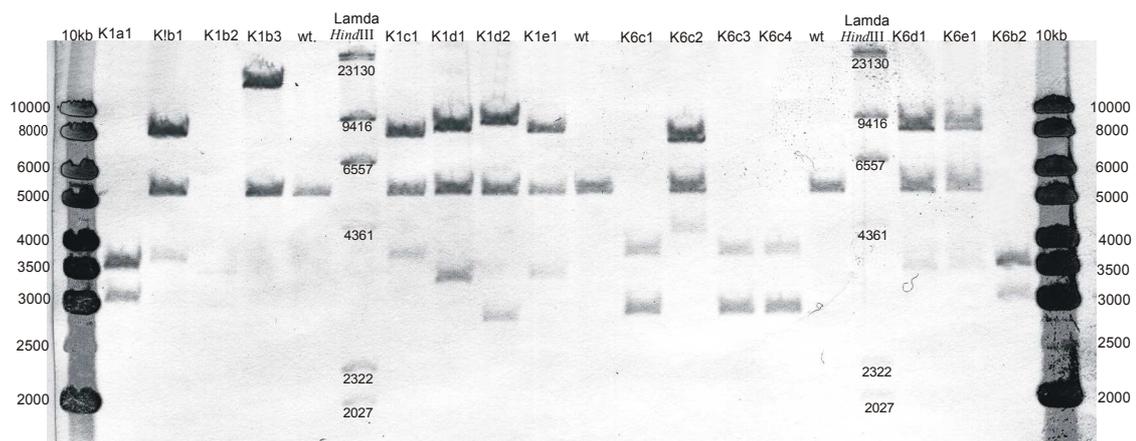


Abb. 4.26: Darstellung des Southern-Blots zur Identifizierung der korrekten Interposon-Mutanten.

Als Marker wurde der Dig-markierte MarkerII (*Hind*III geschnittene  $\lambda$ -DNA) genutzt. Zur besseren Darstellung und einfacheren Größenabschätzung der Banden wurde zusätzlich die nicht markierte 10 kb Leiter (Fermentas) mit aufgetragen (2-3  $\mu$ l). Diese ist nur als Marker zu gebrauchen, wenn die Sonde aus einem pUC basierten Plasmid erstellt wurde. Nur in diesem Fall dann hybridisiert die Sonde mit dem Marker.

Dazu wurde die Gesamt-DNA von 15 ausgewählten Mutanten, ebenso wie die DNA des Wildtyps mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II geschnitten. Letzterer zeigte eine Bande von 5261 bp, wohingegen die Interposonmutanten auf Grund der zusätzlichen *Bgl*II Schnittstelle in der neu eingeführten Neomycinresistenzgenkassette zwei Banden aufweisen sollten. Diese beiden Banden, die bei Mutanten der Orientierung I eine Größe von 3535 bp und 3049 bp aufwiesen, waren bei den Mutanten VF39 K1a1 und VF39 K1b2 zu erkennen (Abb. 4.26). Mutanten der Orientierung II sollten Banden der

Größe 2856 bp und 3728 bp zeigen. Dies war bei den Mutanten VF39 K6c1, VF39 K6c3 und VF39 K6c4 der Fall (Abb. 4.26). Bei diesen fünf spezifisch aufgeführten Mutanten wurde die Neomycinresistenzgenkassette an der richtigen Position im Transkriptionsregulator eingefügt.

#### **4.4.4 Einfluss der Interposoninsertion im Bereich des Transkriptionsregulators auf die *nifA*-Expression von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen**

Um den Einfluss der Interposoninsertion im Bereich des potentiellen Transkriptionsregulators auf die *nifA*-Expression bestimmen zu können, wurden verschiedene *nifA*-pJP-Reporterfusionen in die Interposonmutanten VF39 K1a1 (Orientierung I) und VF39 K6c1 (Orientierung II) eingebracht. Bei diesen Reporterfusionen handelte es sich um den Kernpromotor auf dem Plasmid pJP PCR1 und um den Wildtyp-Promotorbereich auf dem Plasmid pJP *XbaI/BglII nifA*. Nach Mobilisierung beider Plasmide in die Interposonmutanten beider Orientierungen, konnte die *nifA* Expression mittels PNPG Test bestimmt werden. Als Kontrolle dienten VF39 pJP PCR1 und VF39 pJP *XbaI/BglII nifA*. Unter mikroaeroben Bedingungen zeigte der Kernpromotor (PCR1) im Wildtyp, sowie in den beiden Mutanten die gleiche Aktivität. Dies konnte bereits bei den Mutanten der Tn5-Mutagenese (Abb. 4.21) beobachtet werden. Im nächsten Versuch wurde die Aktivität der Reporterfusionen unter aeroben Bedingungen gemessen. Zur Einstellung aerober Verhältnisse wurden die Kulturen in 100 ml selektivem Flüssigmedium, in einem Rundhalsrlenmeyerkolben bei 220 rpm und 30°C auf dem Schüttler angezogen. Nach 24h, 42h, 48h und 66h wurden den Kulturen Proben entnommen und die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität mittels PNPG-Test bestimmt. Der Wildtyppromotor zeigte die gleichen Kurvenverläufe wie der Kernpromotor, nur dass die absoluten Aktivitäten des Kernpromotors wie schon zuvor beschrieben, deutlich erhöht waren. Daher wurden im Folgenden nur die Aktivitäten erläutert und dargestellt, die mit dem Kernpromotor (pJP PCR1) gemessen wurden.

In Abb. 4.27 ist zu erkennen, dass die Aktivität des Kernpromotors im Wildtyp nach 24h Wachstum unter aeroben Bedingungen deutlich geringer ausfällt, als in den beiden Mutanten VF39 K1a1 und VF39 K6c1. Die Aktivität ist in den Mutanten etwa 1,5-fach erhöht. Weiterhin ist zu erkennen, dass die *nifA*-Expressionsrate im Wildtyp während der Wachstumsphase kontinuierlich abnimmt und nach 66 Stunden bei nur noch 72 Units liegt. Im Gegensatz dazu steigt die *nifA*-Expressionsrate in den beiden Mutanten

kontinuierlich an. Nach 48 Stunden ist die Aktivität in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp um das 2,6 fache erhöht. Erst wenn die Wachstumsdauer weiter ausgedehnt wird, tritt auch bei den Mutanten, ein deutlicher Aktivitätsverlust ein. Dieser fällt jedoch absolut gesehen nicht so drastisch aus, wie im Wildtyp, so dass die Mutanten nach 66 Stunden mit etwa 230-260 Units eine *nifA*-Aktivität zeigen, die 3,2 bis 3,6-fach im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist.

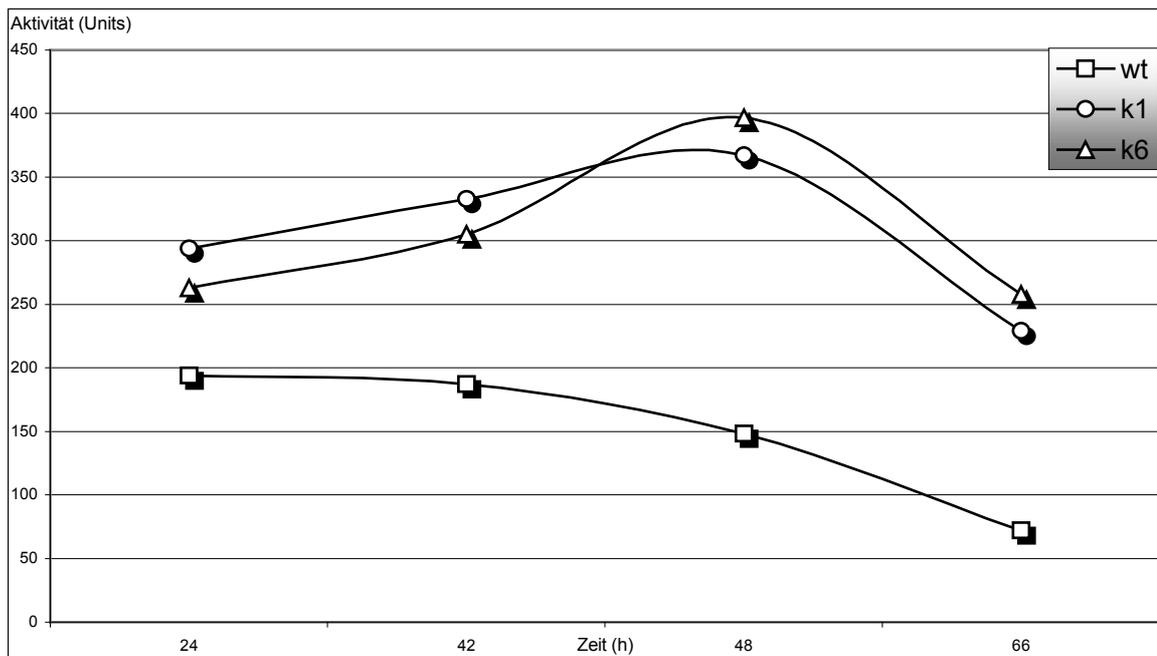


Abb. 4.27: Zeitlicher Verlauf der *nifA*-Expression (Kernpromotor pJP PCR1) im Wildtyp (Quadrate) und in den Mutanten VF39 K1a1 (Kreise) und VF39 K6c1 (Dreiecke).

Die Probenahme erfolgte nach 24, 42, 48 und 66 Stunden. Die Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen selektiv bei 30°C und 220 rpm angezogen.

Die Orientierung der Neomycinresistenzgeninsertionen spielt hierbei keine Rolle. Dennoch waren zu diesem Zeitpunkt Sekundäreffekte, die durch den Neomycinpromotor hervorgerufen werden könnten, nicht auszuschließen.

Die Versuchsergebnisse legen den Schluss nahe, dass die stark erhöhte Aktivität der Mutanten unter diesen Bedingungen mit der Sauerstoffkonzentration im Medium in Verbindung stehen könnte. Dieser Schluss wird durch die Messergebnisse (Abb. 4.21) unter mikroaeroben Bedingungen (gleiche Aktivitäten von Wildtyp und Mutanten) bekräftigt. Dies würde bedeuten, dass der potentielle Transkriptionsregulator in Abhängigkeit des Sauerstoffstatus der Umgebung regulierend in die *nifA*-Expression eingreift. Unter aeroben Bedingungen würde dieser im Wildtyp dazu beitragen, dass die *nifA*-Expression auf einem niedrigen Niveau gehalten wird. Da dieses Element und somit auch dessen regulativer Einfluss in beiden Mutanten durch die

Interposoninsertionen ausgeschaltet wurde, wäre die *nifA*-Expression hier dereguliert. Da der Sauerstoffstatus der Umgebung wichtig für die regulativen Eigenschaften des Transkriptionsregulators zu sein scheint, wurde in einem fortführenden Experiment eine Messreihe unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Messung verlief in den ersten 66 Stunden analog zu der Messung unter aeroben Bedingungen. Nach dieser Zeit wurden die Kulturen in luftdicht verschlossene Flaschen überführt und unter gleichen Bedingungen (30°C, 220 rpm) weitere 26 Stunden inkubiert (anaerob). Die Probenentnahme erfolgte dann nach 4, 8, 21 und 26 Stunden durch eine Spritze, die durch die Gummidichtung im Deckel eingeführt werden konnte.

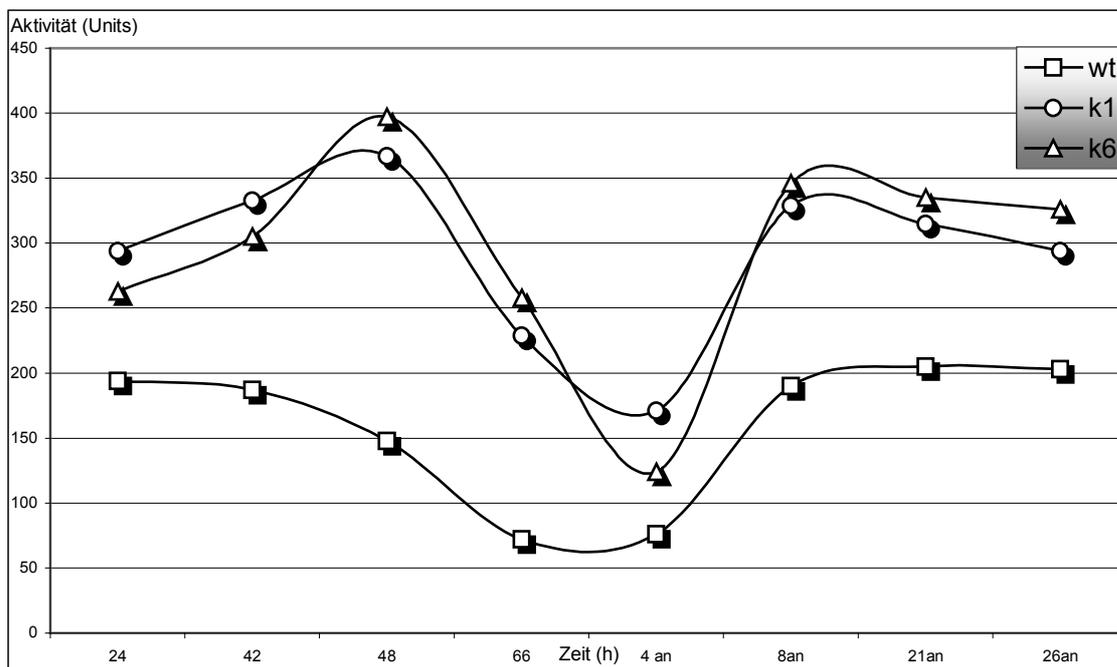


Abb. 4.28: Zeitlicher Verlauf der Kernpromotor-*nifA*-Expression (pJP PCR1) im Wildtyp (Quadrate) und in den Mutanten VF39 K1a1 (Kreise) und VF39 K6c1 (Dreiecke).

Die Probenentnahme erfolgte nach 24, 42, 48 und 66 Stunden aeroben Wachstums (30°C, 220 rpm, Belüftung) und weiteren 4, 8, 21 und 26 Stunden anaeroben Wachstums (30°C, 220 rpm, keine Belüftung). Die Kulturen wurden zunächst unter aeroben Bedingungen selektiv angezogen und dann unter anaeroben Bedingungen weiter inkubiert.

Wie in Abb. 4.28 deutlich zu erkennen ist, erfolgt eine erneute Aktivitätszunahme in allen getesteten Kulturen. Diese beginnt im Wildtyp noch sehr moderat bereits 4 Stunden nachdem die Sauerstoffzufuhr unterbunden wurde und erreicht ihren absoluten Höhepunkt nach etwa 8 bis 10 Stunden. Während dieser 10 Stunden verdreifacht sich die *nifA*-Expressionsrate im Wildtyp. Diese Zunahme entspricht in etwa den zuvor gemessenen Aktivitäten von Derivat VF39 pJP PCR5 unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen (Abb. 4.17) und zeigt, dass der Wildtyp innerhalb sehr kurzer Zeit auf veränderte Sauerstoffbedingungen reagiert. Die Rate der *nifA*-Expression (Kernpromotor) in den Mutanten VF39 K1a1 (Orientierung I) und VF39

K6c1 (Orientierung II) hingegen sinkt während der ersten vier Stunden unter anaeroben Bedingungen weiter ab, bis die absoluten Tiefpunkte von 130 Units (VF39 K1a1) und 170 Units (K6c1) erreicht werden. Die Aktivitäten liegen zu diesem Zeitpunkt jedoch immer noch 2-3 mal über den Aktivitäten des Wildtyps. Diese verzögerte Reaktion zeigt wiederum deutlich, dass die Fähigkeit der Mutanten, den Sauerstoffstatus zu detektieren, gestört zu sein scheint. Erst innerhalb der nächsten 4 Stunden steigt die Expressionsrate der Mutante wieder an, bis die Maximalwerte fast wieder erreicht werden. Mit etwa 330 Units ist die Aktivität dann wieder um den Faktor 1,8 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Verwunderlich ist jedoch die relativ niedrige Aktivität des Kernpromotors im Wildtyp, zeigte dieser doch unter mikroaeroben Bedingungen eine Aktivität auf dem Niveau des Kernpromotors in den Mutanten. Die anaeroben Verhältnisse spiegeln nicht die Verhältnisse in den Wurzelknöllchen wider, so dass es nicht zu einer realen Induktion der *nifA*-Expression kommt. Daher wurde im folgenden Experiment versucht, einen Wechsel der Sauerstoffbedingungen von aerob nach mikroaerob durchzuführen. In der aeroben Wachstumsphase wurden die Kulturen wie zuvor auch bei 220 rpm und 30°C selektiv angezogen. Nach 36 Stunden wurde dann die Rotationsgeschwindigkeit des Schüttlers auf etwa 80 rpm reduziert. Dadurch sollten die Kulturen den gelösten Sauerstoff möglichst schnell verbrauchen, aber permanent eine geringe Menge an Sauerstoff zur Verfügung gestellt bekommen, ähnlich den Bedingungen in den Reagenzgläsern auf dem Roller im 30°C Schrank. Proben wurden nach 36h aeroben Wachstums und nach 4 bzw. 10 Stunden mikroaeroben Wachstums genommen und die Aktivitäten mittels PNP Test bestimmt. In Abb. 4.29 ist zu erkennen, dass die *nifA*-Expression (Kernpromotor) in den Mutanten nach 36h aeroben Wachstums wiederum deutlich höherer (1,6-fach) ausfällt, als im Wildtyp. Bereits nach 4 Stunden mikroaeroben Wachstums steigt die Aktivität in den Mutanten auf das Zweifache an. Die Rate der *nifA*-Expression im Wildtyp steigt jedoch im gleichen Zeitraum auf das Dreifache an, was dazu führt, dass die Aktivität in allen Kulturen nach 4 Stunden auf dem gleichen Niveau bei etwa 900 Units liegt. Auch nach 10 Stunden mikroaeroben Wachstums liegen die Aktivitäten aller Kulturen weiterhin auf einem Niveau. Die absolute Aktivität ist bis zu diesem Zeitpunkt noch ein wenig auf etwa 1000 Units angestiegen. Dieser Versuch zeigt zusammen mit den anderen Versuchsteilen dieses Experiments (Interposonmutagenese des potentiellen Transkriptionsregulators) recht eindeutig, dass der potentielle Transkriptionsregulator in Abhängigkeit von Sauerstoffstatus der Umgebung regulierend in die *nifA*-Expression eingreift.

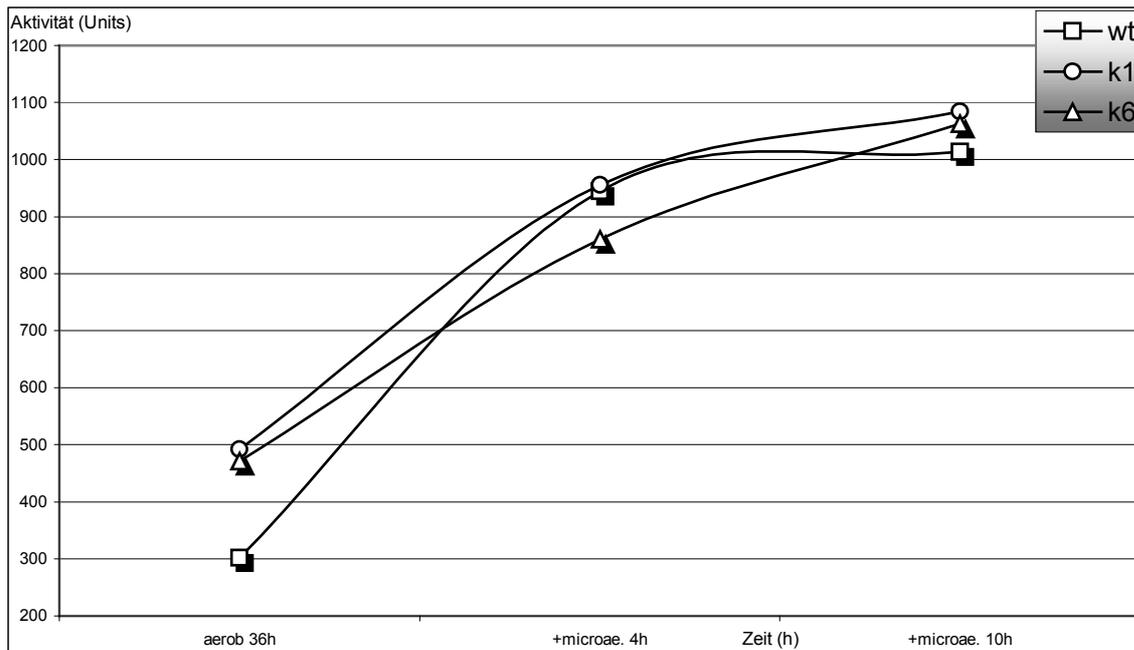


Abb. 4.29: Zeitlicher Verlauf der Kernpromotor-*nifA*-Expression (pJP PCR1) im Wildtyp (Quadrate) und in den Mutanten VF39 K1a1 (Kreise) und VF39 K6c1 (Dreiecke).

Die Probennahme erfolgte nach 36 Stunden aeroben Wachstums (30°C, 220 rpm, Belüftung) und weiteren 4 und 10 Stunden Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen (30°C, 80 rpm, Belüftung). Die Kulturen wurden zunächst unter aeroben Bedingungen selektiv angezogen und dann unter mikroaeroben Bedingungen weiter inkubiert.

Ob der Transkriptionsregulator direkt auf den *nifA*-Promotor wirkt oder ob dieser Effekt indirekt ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Sollte der Sauerstoffstatus und dessen Detektion tatsächlich der ausschlaggebende Faktor sein, der bei den Interposonmutanten unter aeroben Bedingungen zu einer im Vergleich zum Wildtyp gesteigerten *nifA*-Expression führt, so sollte man davon ausgehen können, dass die Rate der *nifA*-Expression während der Symbiose im Wildtyp und in den Interposonmutanten auf einem Niveau liegt. Während der Symbiose ist die Sauerstoffkonzentration für die Bakteroiden deutlich reduziert, um die sauerstoffempfindliche Nitrogenase zu schützen. Dieser Zustand ähnelt am ehesten den Sauerstoffbedingungen, die während des Wachstums unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend, Roller, 30°C) vorherrschen. Hier konnte kein Unterschied in Bezug auf die *nifA*-Expression zwischen Wildtyp- und Interposonmutanten festgestellt werden. Zur Messung der *nifA*-Expression unter symbiontischen Bedingungen wurden steril angezogene *Pisum sativum* Pflanzen mit Wildtyp- und Interposonkulturen inokuliert. Diese enthielten jeweils das Reportergenplasmid pJP PCR1 (Kernpromotor). Nach 21 Tagen Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte nach der Ernte der Knöllchen die Messung der *nifA*-Expressionsaktivität mittels PNPG-Test.

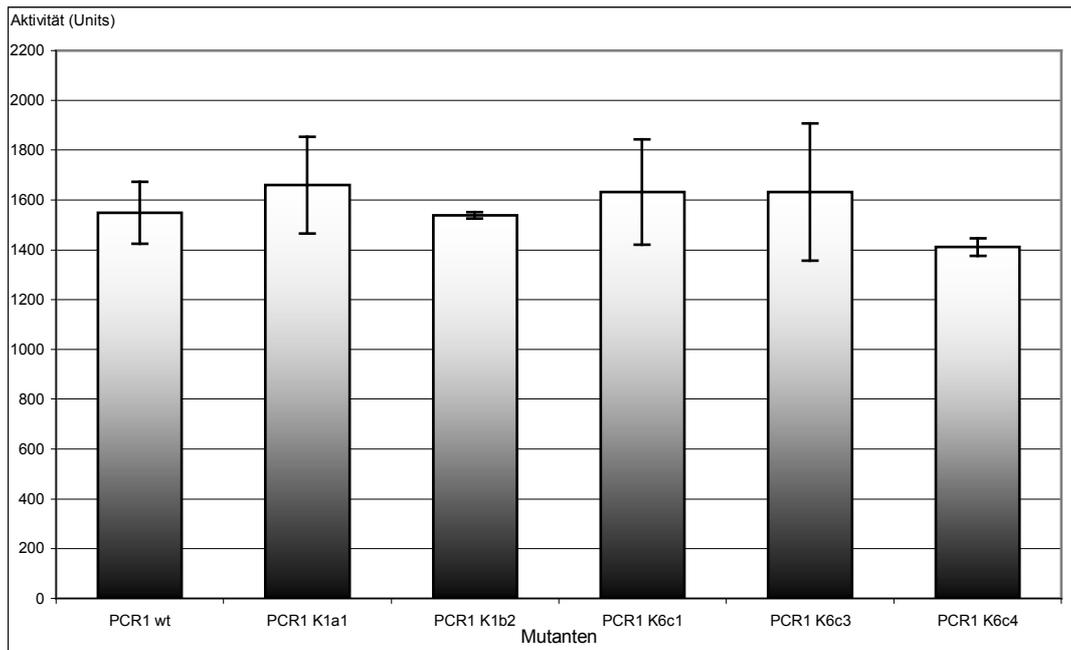


Abb. 4.30: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der *nifA*-Promotoraktivität (Kernpromotor, pJP PCR1) im Wildtyp und in den Interposonmutanten VF39 K1a1, VF39 K1b2, VF39 K6c1, VF39 K6c3 und VF39 K6c4 in der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum*.

In Abb. 4.30 ist zu erkennen, dass die Rate der *nifA*-Expression im Wildtyp sowie in den Interposonmutanten während der Symbiose auf einem Niveau liegt. Dies bekräftigt die Vermutung, dass der Transkriptionsregulator die *nifA*-Expression in Abhängigkeit des Sauerstoffniveaus mitreguliert.

#### 4.4.5 Einfluss der Interposoninsertion im Bereich des Transkriptionsregulators auf verschiedene andere Promotoren – Klonierung der *nifH*- und *fixA*-Promotoren

Generell ist es auch möglich, dass der gefundene Transkriptionsregulator nicht nur spezifisch auf den *nifA*-Promotor, sondern auch auf Promotoren anderer Gene wirkt. Daher sollten in einem weiteren Versuch verschiedene andere, in das pJP Reporter-genplasmid klonierte Promotoren in die Interposonmutanten, sowie in den Wildtyp eingebracht werden. Der Einfluss der Geninsertion im Bereich des Transkriptionsregulators auf diese Promotoraktivitäten konnte dann mittels der  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität ermittelt werden. Als Referenzen dienten die entsprechenden, in den Wildtyp VF39 eingebrachten Reporter-genfusionen. Getestet wurden die Promotoren der Gene *fnrN*, *fixK*, *fixA*, *nifH* und des *fixNOQP*-Operons.

Bis auf die Promotoren der Gene *fixA* und *nifH* standen alle Promotoren kloniert in das pJP-Reportergenplasmid zur Verfügung. Daher mussten diese beiden Promotoren zunächst kloniert werden. Anhand von Sequenzen aus der Datenbank (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841) wurden zwei Primer, *nifH* und *fixA* entworfen, mit deren Hilfe die Promotoren von *nifH* und *fixA* zusammen amplifiziert werden konnten. In diesen beiden Primern wurden einige Nukleotide so ausgetauscht, dass zwei neue *Bam*HI-Schnittstelle geschaffen wurden, welche für spätere Klonierungsschritte wichtig waren. Laut Datenbank wäre ein Amplifikationsprodukt mit einer Größe von etwa 1000 bp zu erwarten gewesen. Das tatsächlich 2300 bp große Amplifikationsprodukt ist in Abb. 4.31 dargestellt.

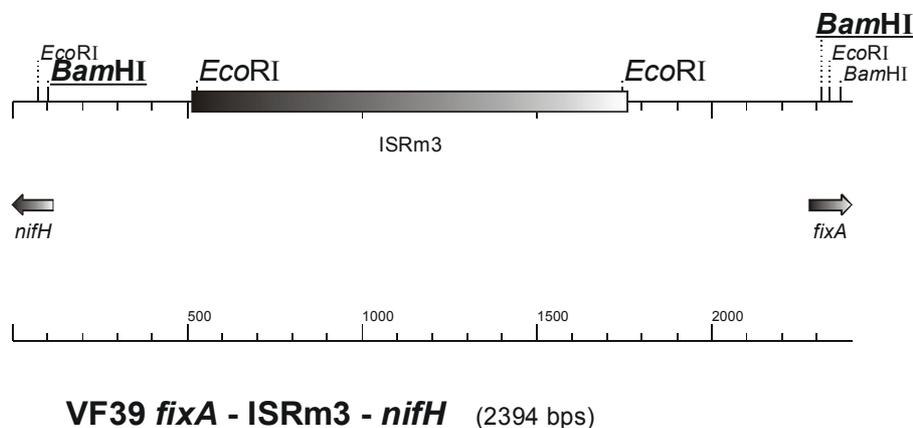


Abb. 4.31: Organisation der Gene *fixA* und *nifH* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39.

Eine zu einem IS3-Element aus *Sinorhizobium meliloti* homologe Region ist eingezeichnet. Zur Klonierung verwendete Schnittstellen sind durch eine gesonderte Schriftgröße hervorgehoben. Die durch die Primer *nifH* und *fixA* neu eingefügten *Bam*HI-Schnittstellen sind zusätzlich fett gedruckt und unterstrichen.

Sequenzierung des VF39 PCR-Produkts ergab, dass die zusätzlichen 1300 bp aus einer Region stammten, die sehr große Homologien zu einem Insertionselement aufweist, welches auch in *Sinorhizobium meliloti* zu finden ist. Diese Region ist im Stamm *Rhizobium leguminosarum* 3841 nicht zu finden. Das aus diesem Stamm zu erwartende Amplifikationsprodukt einer Größe von 1000 bp wurde durch PCR nachgewiesen und dadurch der Unterschied zum Stamm VF39 belegt. Das 2,3 kb große PCR-Produkt aus VF39 wurde im Anschluss in den Topo Vektor (TA-Cloning Kit) eingebracht, der resultierende Vektor Topo *nifH-fixA* darauf hin mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und die resultierenden Fragmente der Größe 423 bp (*nifA*) und 567 bp (*fixA*) in den Vektor pBlueskriptKSII umkloniert. Aus den Plasmiden pBlue *nifH* und pBlue *fixA* wurden die entsprechenden

Promotoren im folgenden über *Xba*I und *Hind*III in den Expressionsvektor pJP2 umkloniert und die Plasmide pJP *nifH* und pJP *fixA* nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 Wildtyp, sowie die Mutanten VF39 K1a1 und VF39 K6c1 mobilisiert. Zudem wurden diese pJP Konstrukte in einem VF39 *nifA* minus Stamm getestet, um den in der Literatur beschriebenen Einfluss von NifA auf die Promotoren von *fixA* und *nifH* (Perret *et al.*, 1999) untersuchen zu können. Die Bestimmung der Promotoraktivitäten in TY-Flüssigmedium und in der Symbiose mit *Pisum sativum* erfolgte jeweils mittels PNPG-Test.

Nach der Mobilisierung der Promotoren der Gene *fnrN*, *fixK*, *fixA*, *nifH* und des *fixNOQP*-Operons in den VF39 Wildtyp, VF39 K1a1 und VF39 K6c1 erfolgte die erste Selektion auf streptomycin- und tetracyklinhaltigen TY-Platten. Jeweils drei Kolonien wurden anschließend erneut auf selektiven TY-Platten ausgestrichen. Dabei erfolgte jeweils der Vergleich der Promotoraktivitäten im VF39 Wildtyp, in VF39 K1a1 und in VF39 K6c1. Diesen Platten wurde zusätzlich X-Gluc zugesetzt, um die *nifA*-Expression der unterschiedlichen Transkonjuganten unter diesen Bedingungen (aerob, TY-Platte), anhand der Blaufärbung abschätzen zu können. Die Promotoren der Gene *fnrN*, *fixK* und des *fixNOQP*-Operons zeigten in den verschiedenen Hintergründen keine Unterschiede in Bezug auf die Blaufärbung. Somit konnte unter diesen Bedingungen ein Einfluss des potentiellen Transkriptionsregulators auf die Expression dieser Promotoren ausgeschlossen werden. Die Ausstriche der Mutanten VF39 K1a1 und VF39 K6c1, welche die Reporterplasmide pJP *fixA* bzw. pJP *nifH* trugen, waren hingegen leicht intensiver blau gefärbt, als die Wildtypderivate VF39 pJP *fixA* und VF39 pJP *nifH*. Dies zeigte, dass die Inaktivierung des Transkriptionsregulators unter aeroben Bedingungen neben der Wirkung auf den *nifA*-Promotor auch eine leichte Wirkung auf die *nifH*- und *fixA*-Promotoren zu haben scheint.

Bei den Promotoren von *fixA* und *nifH* handelt es sich um NifA-abhängige -24/-12 Promotoren. Beide weisen gut konservierte NifA-Boxen auf (5'-TGT-n<sub>10</sub>-ACA-3', Fischer 1994). Die NifA-Box des *nifH*-Promotors liegt 179 bp stromaufwärts des potentiellen *nifH* Startcodons und die des *fixA*-Promotors 132 bp stromaufwärts des potentiellen *fixA* Startcodons. Zusätzlich lassen sich bei beiden Promotoren die konservierten Sequenzmotive eines -24/-12 Promotors (5'-GG-N<sub>10</sub>-GC-3') erkennen, was darauf hindeutet, dass die Expression beider Promotoren abhängig vom  $\sigma^{54}$  Faktor ist (Fischer, 1994). Da die Promotoren von *fixA* und *nifH* beide NifA abhängig sind (Ditta, 1987; Fischer 1994) und die *nifA* Expressionsrate in den Mutanten VF39 K1a1 und K6c1 unter diesen Bedingungen (freilebend, TY-Platte, 30°C) enorm gesteigert ist, ist es wahrscheinlich, dass der Transkriptionsregulator keinen direkten Effekt auf die Promotoren von *nifH* und *fixA* ausübt, sondern dass dieser Effekt auf Grund der

NifA-Abhängigkeit dieser Promotoren eine indirekte Auswirkung der gesteigerten *nifA* Expression in den Interposonmutanten sein könnte. Auf Abbildungen wurde verzichtet. Alle Mutanten, mit denen die Aktivitätsabschätzung auf den TY-Platten unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurde, wurden auch in der mikroaeroben Messreihe in selektivem TY-Flüssigmedium getestet. Die Bestimmung der  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität erfolgte mittels PNPG-Test.

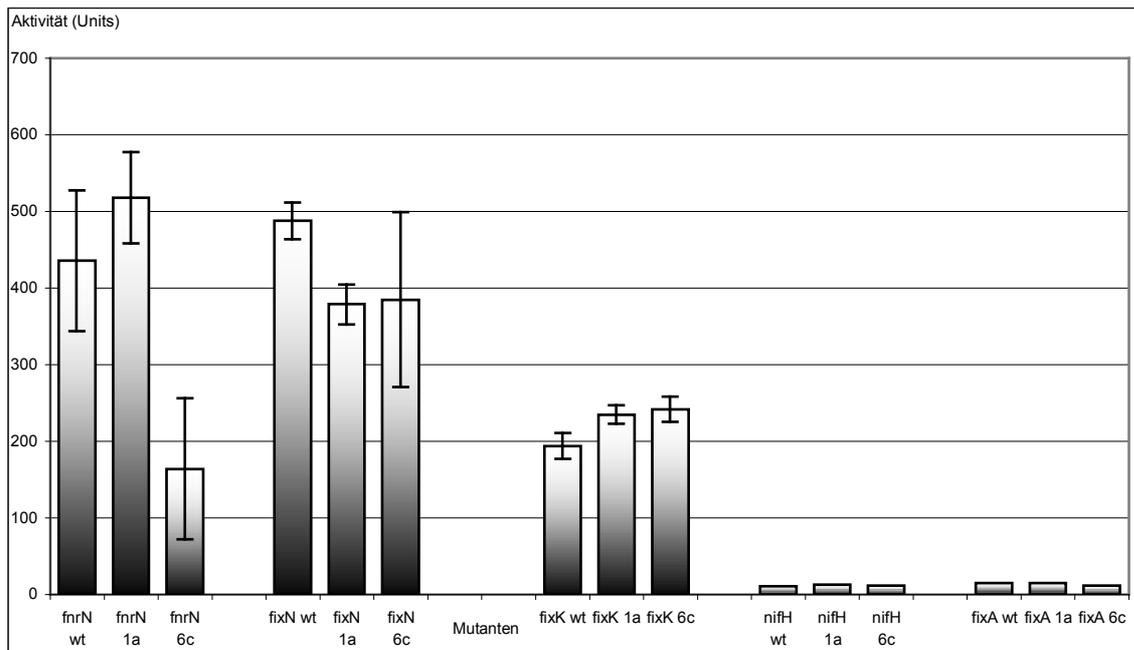


Abb. 4.32: Darstellung der Promotoraktivitäten der Promotoren von *fnrN*, *fixK*, *fixA*, *nifH* und des *fixNOQP*-Operons. Wt steht für den VF39 Wildtyphintergrund und 1a bzw. 6c für die Transkriptionsaktivatormutantenhintergründe von VF39 K1a1 bzw. K6c1. Die Promotoraktivitäten wurden mit Hilfe von pJP Reporterfusionen gemessen.

In Abb. 4.32 ist zu erkennen, dass die Mutation im Bereich des potentiellen Transkriptionsaktivators unter mikroaeroben Bedingungen keinen Effekt auf die Promotoren der NifA abhängigen Gene *nifH* und *fixA* hat. Die Aktivität beider Promotoren liegt sowohl im VF39 Wildtyp, als auch in den Mutanten VF39 K1a1 und VF 39 K6c1 auf dem gleichen Niveau bei etwa 15 Units. Sie sind also fast inaktiv. Die Aktivität beider Promotoren auf einem derartig niedrigen Niveau sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten spricht für die Vermutung, dass die Inaktivierung des potentiellen Transkriptionsregulators keinen direkten Effekt auf die Promotoren von *nifH* und *fixA* hat. Unter gleichen Bedingungen ist auch in Bezug auf den *nifA* Promotor kein Effekt auszumachen gewesen. Zusammenfassend würde dies bedeuten, dass die *nifA* Expression unter aeroben Bedingungen in den Mutanten VF39 K1a1 und VF39 K6c1 dereguliert und somit um das 1,5 bis 2-fache gesteigert ist. Diese gesteigerte *nifA*-Expression und die damit einhergehende erhöhte Konzentration von NifA würde dann

eine leicht gesteigerte Aktivität der Promotoren von *nifA* und *fixA* zur Folge haben. Diese Aktivitätssteigerung dürfte erwartungsgemäß nicht sehr stark ausfallen, da NifA sauerstoffsensitiv ist und unter aeroben Bedingungen leicht inaktiviert wird (Huala *et al.*, 1991).

#### **4.4.6 Untersuchung einer *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 Transkriptionsregulator-Deletionsmutante**

In Versuchsteil 4.4.4 konnte durch die Aktivitätsmessung von *nifA*-Reporterfusionen in verschiedenen Interposon-Mutanten gezeigt werden, dass der potentielle Transkriptionsregulator Einfluss auf den *nifA*-Promotor ausübt. Die Neomycinresistenzkassetteninsertionen, durch die diese Interposonmutanten erzeugt wurden, machen es theoretisch möglich, dass der Neomycinpromotor einen unerwünschten Einfluss auf die flankierenden Gene (z.B. Oxidoreduktase, ABC Transporter) ausübt und so die Versuchsergebnisse verfälschen könnte. Um derartige Sekundäreffekte ausschließen zu können, sollte in diesem Versuch eine Transkriptionsregulator-Deletionsmutante konstruiert werden, in welcher der Transkriptionsregulator inaktiviert ist, ohne neue Elemente in das Genom einzuführen. Im ersten Schritt wurde unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *Kpn2I*, von der innerhalb des Zielgenes zwei Erkennungssequenzen vorhanden waren (Abb. 4.33), ein großer Teil des Transkriptionsregulators auf dem Plasmid pBlue TraReg deletiert. Durch Religation wurde anschließend erneut ein ringförmiges Plasmid generiert. Aus dem resultierenden Plasmid pBlue TraRegDel Kpn2I wurde die deletierte Region dann über die Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII* in den Vektor pK19 mob SacB umkloniert (Abb. 4.33). Um das Fragment in die Schnittstellen *XbaI* und *SmaI* des Vektors klonieren zu können, wurden die Restriktionsenden der Schnittstelle *HindIII* zuvor zu glatten Enden aufgefüllt. Der Vektor pK19 mob SacB (Abb. 4.33) verfügt über das Gen Levansucrase, welches für spätere Selektionsschritte benötigt wurde. Dieses ermöglicht eine Negativselektion auf sucrosehaltigen Nährmedien. Bakterien, die ein Plasmid mit diesem Gen tragen, sind nicht in der Lage auf diesen Medien zu wachsen. Auf diese Weise kann bei Doppel crossing-over Experimenten auf elegante Weise, ohne die Verwendung eines Selektionsmarkers (Antibiotikaresistenz), auf den Verlust des Vektoranteils selektioniert werden.

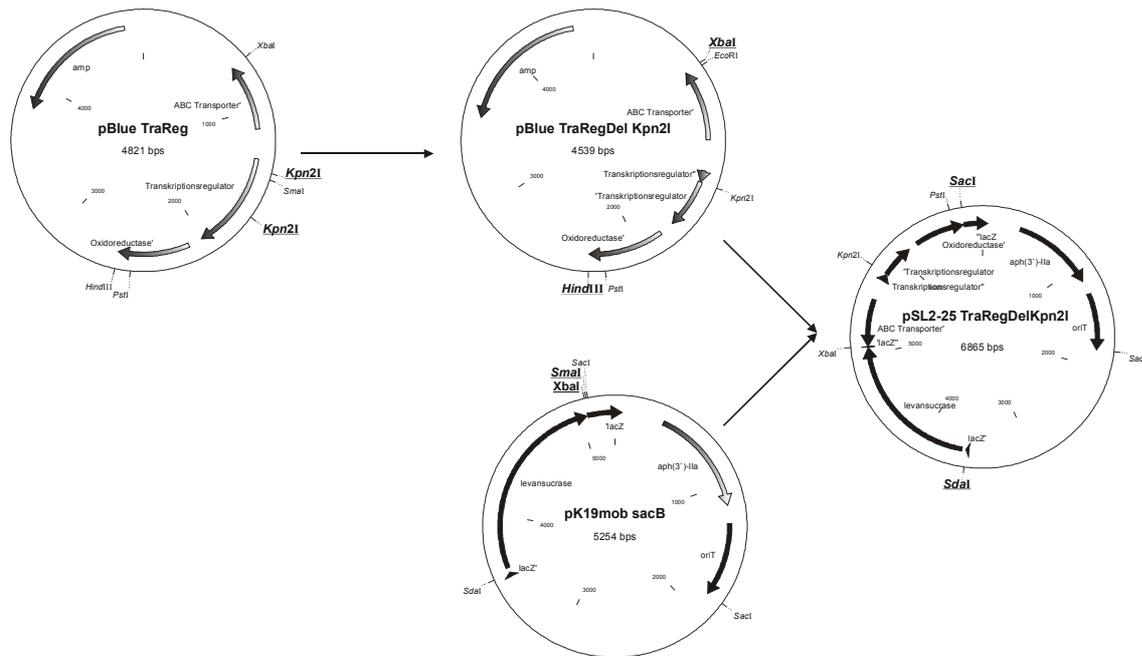


Abb. 4.33: Konstruktion der Mutanten pBlue TraReg Del Kpn2I und pSL2-25 TraRegDelKpn2I.

Zur Klonierung verwendete Restriktionsendonukleasen sind durch eine besondere Schriftgröße, Unterstreichung und Fettdruck hervorgehoben. Abkürzungen: amp: Ampicillinresistenzgen, aph: Neomycinresistenzgen, oriT: Konjugationsstart.

Die Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Deletionsmutante sah vor, das Plasmid mit dem deletierten Transkriptionsregulator nicht in den Wildtyp, sondern in die Mutante VF39 K1a1 zu mobilisieren. Dieser Schritt war nötig, da eine Deletionsmutante erzeugt werden sollte, ohne neue Markergene in das Genom einzuschleusen. Die Wildtypregion sollte lediglich gegen die deletierte Region ausgetauscht werden. Da dies jedoch ohne Marker kaum möglich war, sollte die deletierte Region stattdessen gegen das Interposon (Neomycinresistenzgenkassette) der Mutante VF39 K1a1 ausgetauscht werden. Es sollte also nach Mutanten gesucht werden, die ihre Neomycinresistenzgenkassette und somit die durch das Interposon vermittelte Resistenz gegenüber Neomycin verloren hatten. Diese Strategie hatte zur Folge, dass das Plasmid pSL2-25 TraRegDel Kpn2I zur Konjugation ungeeignet war, da es genau wie die Rezipienten-DNA über eine Neomycinresistenzgenkassette verfügte. Eine unerwünschte Hybridisierung über diese Region wäre folglich sehr wahrscheinlich gewesen. Daher sollte die deletierte Region inklusive Levansucrasegen vom Plasmid

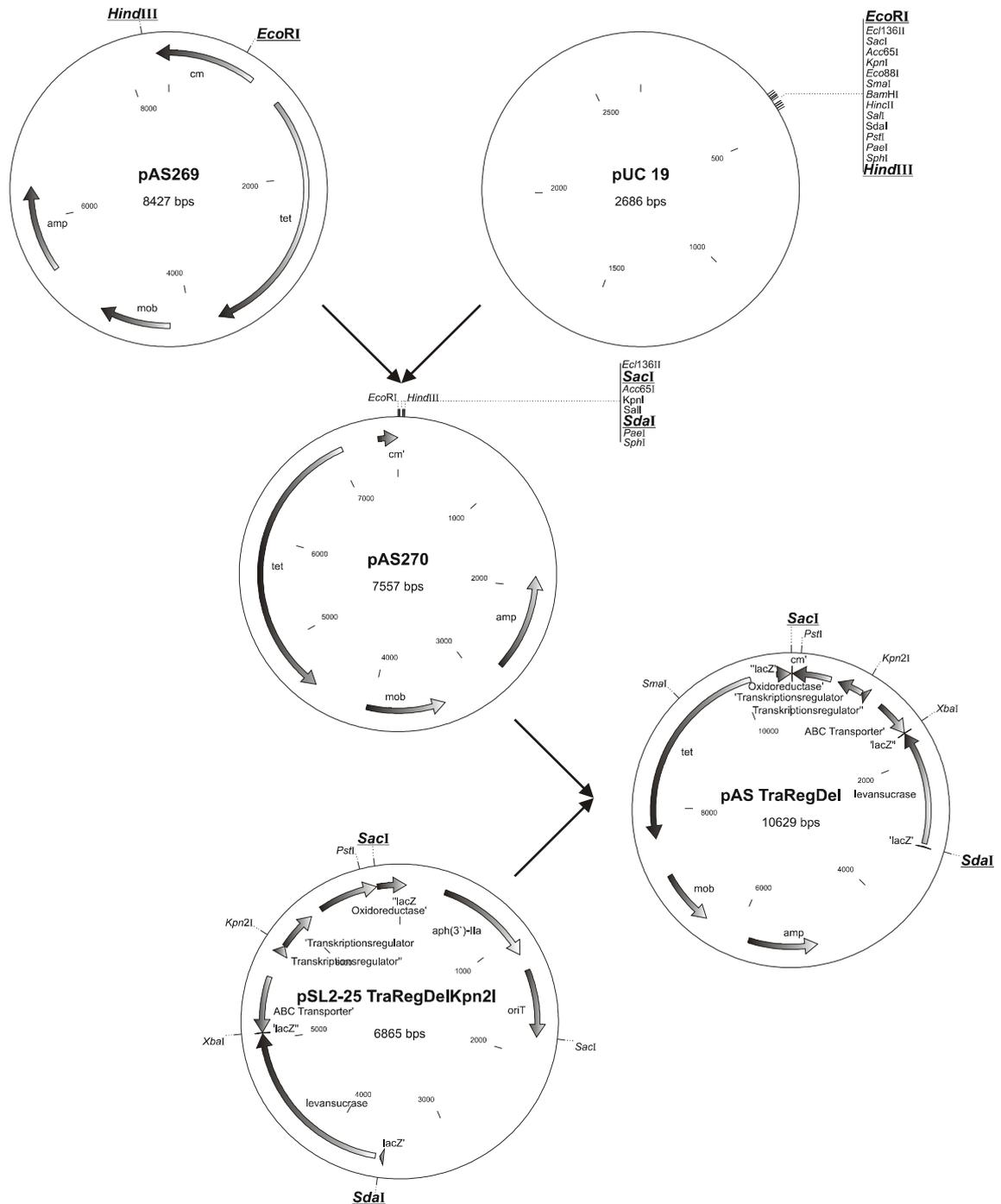


Abb. 4.34: Konstruktion der Plasmide pAS 270NS und pAS TraRegDel.

Zur Klonierung verwendete Restriktionsendonukleasen sind durch eine besondere Schriftgröße, Unterstrichung und Fettdruck hervorgehoben. Abkürzungen: amp: Ampicillinresistenzgen, tet: Tetracyclinresistenzgen, cm: Chloramphenicolresistenzgen, mob: Konjugationsstart.

pSL2-25 TraRegDel Kpn2I in das Plasmid pAS269 umkloniert werden, welches ebenfalls mobilisierbar ist, jedoch statt einer Resistenz gegenüber Neomycin eine Resistenz gegenüber Tetracyclin vermittelt. Eine homologe Rekombination über die Neomycinresistenzgenkassette konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden.

Aus Mangel an geeigneten Schnittstellen in pAS269 musste zunächst die Polyklonierstelle (MCS) aus dem Plasmid pUC19 über die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* in das Plasmid pAS269 umkloniert werden (Abb. 4.34). Das resultierende Plasmid wurde mit pAS270NS bezeichnet. Erst im Anschluss konnte die deletierte Region inklusive Levansucrasegen vom Plasmid pSL2-25 TraRegDel Kpn2I über die Schnittstellen *SacI* und *SdaI* in das Plasmid pAS270NS umkloniert werden (Abb. 4.34). Das resultierende Plasmid wurde mit pAS TraRegDel bezeichnet und konnte über den Mobilisatorstamm *E. coli* S17-1 nach *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 K1a1 mobilisiert werden. Die erste Selektion zur Integration des Plasmids in das VF39 K1a1 Genom über single-crossing-over erfolgte auf streptomycin- und tetracyclinhaltigen TY-Platten.

Nach mehreren Tagen im Brutschrank bei 30°C wurde eine Kolonie ausgewählt, auf eine streptomycinhaltige TY-Platte übertragen und erneut für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die deletierte Region über homologe Rekombination (doppel-crossing-over) vollständig in das VF39 K1a1 Genom zu integrieren. Dabei sollte der Vektoranteil inklusive Tetracyclinresistenzgen und Levansucrasegen verloren gehen und die Neomycinresistenzgenkassette der Mutante VF39 K1a1 gegen den deletierten Transkriptionsregulator ausgetauscht werden. Die gesuchte Mutante sollte weder über Levansucrase-, Tetracyclinresistenz- noch Neomycinresistenzgen verfügen und folglich auf sucrosehaltigen TY-Medien wachsen können, aber zugleich neomycin- und tetracyclinsensitiv sein. Daher wurde die Kultur im nächsten Schritt auf sucrose- und streptomycinhaltigem TY-Medium ausgestrichen, um auf den Verlust des Vektors zu selektionieren. Gewachsene Kolonien wurden im Anschluss auf neomycin-/streptomycin- und sucrosehaltigen TY-Medien parallel ausgestrichen. Von den neomycinsensitiven Kolonien wurde dann die Gesamt-DNA isoliert und die Deletion des Transkriptionsregulators mittels Southern-Hybridisierung überprüft. Die Mutante wurde mit VF39 TraReg Del bezeichnet.

In Abb. 4.35 sind die Aktivitäten der Reporterengenkonstrukte pJP PCR1 (Kernpromotor) und pJP *XbaI/BglII nifA* in der Mutante VF39 TraRegDel dargestellt. Nach der Mobilisierung erfolgte die Bestimmung der  $\beta$ -Glukuronidaseaktivitäten nach 24h bzw. 48h Wachstums unter aeroben Bedingungen (30°C, 220 rpm). Zusätzlich erfolgte eine Aktivitätsbestimmung nach weiteren 48h Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen (30°C, 80 rpm). Nach 24h lagen die Aktivitäten des Kernpromotors im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante auf etwa dem gleichen Niveau bei 550 bis 600 Units. Nach 48 Stunden aeroben Wachstums wurde die Reporterengenfusion, welche in die Deletionsmutante mobilisiert wurde, auf 700 Units aktiviert und lag damit etwa 200 Units über der Aktivität des Wildtypderivats.

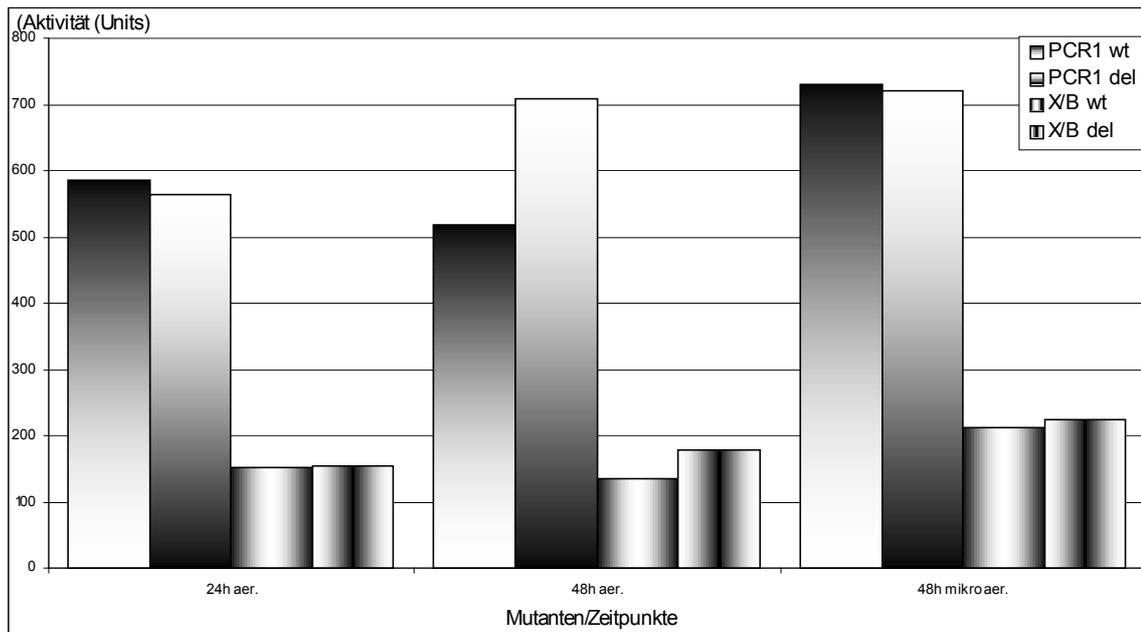


Abb. 4.35: Darstellung der Aktivitäten der *nifA*-Reporterfusionen pJP PCR1 (Kernpromotor, horizontal schattiert) und pJP *XbaI/BglII nifA* (vertikal schattiert).

Die Promotoraktivitäten wurden im VF39 Wildtyp (Wt), sowie in der Deletionsmutante VF39 TraReg Del (del) bestimmt. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte mittels PNPG-Test nach 24h, 48h aeroben Wachstums (30°C, 220rpm) und nach 48h mikroaeroben Wachstums (30°C, 80rpm). Die Kulturen wurden in selektivem TY-Medium kultiviert.

Diese verstärkte Promotoraktivität der Deletionsmutante in TY-Flüssigmedium unter aeroben Bedingungen entspricht den Beobachtungen, die bezüglich dieser Mutante auf selektiven TY-Platten gemacht wurden. Auf X-Gluc-haltigen TY Platten konnte nach zwei Tagen ein deutlicher Unterschied in der Blaufärbung der Kolonien festgestellt werden. Die pJP PCR1 Fusion zeigte dabei in der Deletionsmutante eine sehr viel intensivere Blaufärbung als im Wildtyp. Gleiches konnte auch bei der Fusion pJP *XbaI/BglII nifA* beobachtet werden. Auf den TY-Platten war das Niveau der Blaufärbung jedoch bei allen Kolonien wegen der niedrigeren Grundaktivität dieser Fusion (vergl. Abb. 4.17, 4.35) niedriger, ebenso wie das Aktivitätsniveau im TY-Flüssigmedium niedriger war.

Nach weitem 48h Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen stieg nur die Aktivität der pJP PCR1 Fusion, die in den Wildtyp eingebracht wurde und erreichte mit etwa 700 Units das Niveau der Fusion in der Deletionsmutante. Eine deutliche Aktivierung der Deletionsmutante wie bei der Interposonmutanten (Abb. 4.29) konnte in diesem Versuch zwar nicht gezeigt werden, dafür aber die Aktivierung des *nifA*-Promotors im Wildtyp. Dies bestätigt die Resultate aus Versuchsteil 4.4.4.

#### 4.4.7 Interpretation der bisherigen Ergebnisse

Mittels einer generellen Tn5 Mutagenese konnte eine VF39 Mutante identifiziert werden, die unter aeroben Bedingungen eine gesteigerte *nifA*-Expression zeigte. Sequenzierung der getroffenen Region ergab, dass ein Gen getroffen wurde, welches starke Homologien zu einem potentiellen Transkriptionsregulator aufwies. Mit Hilfe von gezielten Mutationen in diesem Gen durch Interposoninsertionen konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsregulator spezifisch auf den *nifA*-Promotor wirkt. Andere Promotoren, die auf den Einfluss dieses Regulators hin untersucht wurden, zeigten keinen Effekt. Da die gesteigerte Aktivität des *nifA*-Promotors weiterhin vor allem unter aeroben Bedingungen zu beobachten war, hingegen unter mikroaeroben Bedingungen und während der Symbiose mit der Wirtspflanze *Pisum sativum* nicht auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass der potentielle Transkriptionsregulator in Abhängigkeit vom Sauerstoffstatus der Umgebung regulierend in die *nifA*-Expression eingreift. Unter Verwendung einer neu konstruierten Deletionsmutante (Transkriptionsregulatordeletion) konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Neomycinresistenzgenkassette die mit den Interposonmutanten erlangten Versuchsergebnisse nicht verfälscht. Unerwünschte Sekundäreffekte durch die Neomycinresistenzgenkassette konnten ausgeschlossen werden, da die mit der Deletionsmutante erzielten Ergebnisse die vorherigen Ergebnisse bestätigten.

## 4.5 Autoregulation der *nifA*-Expression

### 4.5.1 Abhängigkeit der *nifH*- und *fixA*-Expression von NifA

Wie bereits beschrieben (Kap. 4.4.5) ist die Expression der Gene *nifH* und *fixA* abhängig von NifA, also indirekt von der *nifA*-Expression beeinflusst. In diesem Versuchsteil sollte diese für andere Rhizobien (*Sinorhizobium meliloti*) beschriebene Abhängigkeit (Ditta *et al.*, 1983; Fischer, 1994) auch für *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 nachgewiesen werden. Dazu wurden die Expressionsraten der Derivate VF39 pJP *fixA* und VF39 *nifH* unter mikroaeroben Bedingungen und in der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum* gemessen. Zusätzlich wurden die Promotoraktivitäten von *nifH* und *fixA* in einem *nifA* minus Stamm unter symbiontischen Bedingungen bestimmt, um den Einfluss einer *nifA*-Deletion beschreiben zu können. Die Kulturen wurden unter Standardbedingungen angezogen, ebenso wie die Pflanzentests unter Standardbedingungen durchgeführt wurden. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels PNPG-Test.

In Abb. 4.36 ist zu erkennen, dass die Promotoren von *nifH* und *fixA* im VF39 Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen in TY-Flüssigmedium praktisch inaktiv sind. Die Aktivität beider Promotoren liegt hier deutlich unter 20 Units.

Während der Symbiose mit *Pisum sativum* steigt die Aktivität des *nifH*-Promotors im Wildtyp um das Zwölfwache (12x) von 18 Units auf 220 Units an. In der *nifA*-Deletionsmutante ist die *nifH*-Promotoraktivität in der Symbiose mit etwa 100 Units im Vergleich zu mikroaeroben Bedingungen um das Fünffache (5x) erhöht. Die Verlässlichkeit dieses Wertes kann jedoch nicht vollständig garantiert werden, da die Aktivität in nur einer Pflanze gemessen werden konnte und eine statistische Auswertung daher nicht möglich war. Deutlich ist jedoch die Aktivierung des *nifH*-Promotors während der Symbiose zu erkennen. NifA scheint dabei eine nicht unwesentliche Rolle zu spielen. Wie bereits beschrieben, sind stromaufwärts des *nifH*-Startkodons deutliche NifA-Boxen auszumachen, was für eine Beteiligung von NifA an der symbiontischen *nifH*-Aktivierung spricht. Die symbiontische Aktivierung des *fixA*-Promotors fällt hingegen sehr viel deutlicher aus. Hier liegt im Wildtyp eine Steigerung der Expressionsrate um das Achtzigfache (80x) vor, wenn man die Aktivität unter mikroaeroben und symbiontischen Bedingungen vergleicht. Auch die NifA Abhängigkeit des *fixA*-Promotors kommt sehr viel deutlicher zum Ausdruck. Unter symbiontischen Bedingungen zeigt der *fixA*-Promotor in der *nifA*-Deletionsmutante eine Aktivität von nur 50 Units. Im Vergleich dazu ist die Expressionsrate im Wildtyp auch hier noch Fünfundzwanzigfach (25x) erhöht. Vergleicht man die symbiontische Aktivierung der

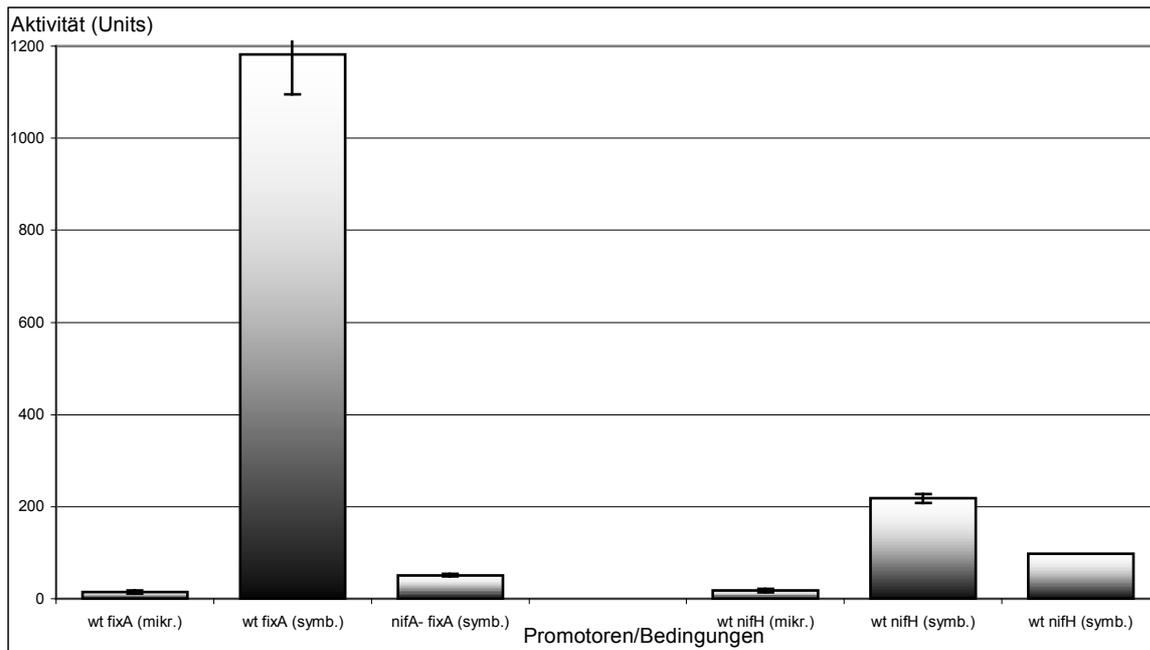


Abb. 4.36: Darstellung der Ergebnisse zu Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren *fixA* und *nifH* unter mikroaeroben (freilebend) Bedingungen sowie in der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum*.

Die Promotoraktivitäten während der Symbiose wurden im Wildtyp VF39 sowie in einer *nifA* minus Mutante bestimmt.

Promotoren *nifH* und *fixA* so fällt auf, dass der *fixA*-Promotor etwa 5 bis 6 mal stärker aktiviert wird, als der *nifH* Promotor. Dieser deutliche Unterschied in der NifA Abhängigkeit der Promotoren von *nifH* und *fixA* könnte durch die Positionierung der NifA-Boxen (UAS) vor den jeweiligen Promotoren erklärt werden. In anderen Rhizobien liegen solche NifA-Boxen etwa 80 bp bis 150 bp (Alvarez-Morales *et al.*, 1985; Buck *et al.*, 1986, 1987; Morett *et al.*, 1991) stromaufwärts der zugehörigen Transkriptionsstartpunkte. Da die Transkriptionsstartpunkte von *nifH* und *fixA* bis zu jetzigen Zeitpunkt in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 noch nicht kartiert wurden, kann nur eine grobe Abschätzung ihrer Positionen anhand der Sequenzen aus der Datenbank erfolgen. Davon ausgehend, dass es sich bei diesen Promotoren um -24/-12 Promotoren handelt kann die Position des *fixA*-Transkriptionsstartpunktes auf etwa 44 bp stromaufwärts des *fixA*-ATG festgelegt werden. Weitere 12 bzw. 24 Nukleotide stromaufwärts sind konservierte GG/GC-Motive eines  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotors zu finden. Die NifA-Box läge dann etwa an Position minus 90. Eine ähnliche Abschätzung der Lage des Transkriptionsstartpunktes kann in Bezug auf den *nifH*-Promotor erfolgen. Auch hier sind konservierte GG/GC-Motive zu finden. Der Transkriptionsstartpunkt läge dann hier 30 bp bis 35 bp stromaufwärts des *nifH*-ATG und die NifA-Box entsprechend an Position -140. Es wäre denkbar, dass die NifA-Box des *fixA*-Promotors günstiger positioniert ist, als die des *nifH*-Promotors und so eine gesteigerte NifA-Abhängigkeit zustande kommt. Ebenso könnte die NifA-Box des *fixA*-

Promotors eine günstigere Sequenz aufweisen und so eine effektivere Bindung von NifA zustande kommen. Eine NifA-Abhängigkeit der *nifA*-Expression wurde für *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 beschrieben (Esser, 2000). Dass es sich dabei um eine Autoregulation handelt, konnte nicht gezeigt werden, da der *fixA*-Promotor bisher nicht in die Untersuchungen einbezogen wurde. Bei dem *fixA*-Promotor handelt es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor. Die potentielle  $\sigma^{54}$ -Bindungsstelle (5'-**TGGCAC**-N<sub>5</sub>-**GTGCT**-3') zeigt zumindest sehr große Homologien zur Konsensussequenz (5'-**TGGCAC**-N<sub>5</sub>-**TTGCT**/A-3', Fischer, 1994) und ist besser konserviert als die  $\sigma^{54}$ -Bindungsstelle des *nifH*-Promotors (5'-**CGGAAC**-N<sub>5</sub>-**TCGCA**-3'). Auch dies könnte die deutlichere Aktivität des *fixA*-Promotors während der Symbiose erklären. Wie in *Sinorhizobium meliloti* könnten also auch in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 zwei Promotoren an der *nifA*-Expression beteiligt sein. Der P1-Promotor würde in diesem Fall die primäre Kontrolle für die *nifA*-Expression darstellen. Wie der *Sinorhizobium meliloti* P<sub>nifA</sub> ist der VF39 P1 ebenfalls zwischen dem *fixABCX*-Operon und *nifA* lokalisiert. Weiterhin wird der P<sub>nifA</sub> in *Sinorhizobium meliloti* als ein Promotor beschrieben, der strukturell von  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren abweicht und auch sonst nicht näher charakterisiert ist. Auch beim P1 konnten weder konservierte GG/GC-Motive ausgemacht werden, die auf einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor hindeuten, noch andere bekannte Promotorstrukturen ausgemacht werden.

Unter freilebenden aeroben Bedingungen ist die P1-Expressionsrate genau wie die des P<sub>nifA</sub> in *S. meliloti* sehr gering (60 Units, Abb.4.17). Die Aktivität des P<sub>nifA</sub> wird jedoch in der Symbiose, sowie in freilebenden Zellen unter mikroaeroben Bedingungen durch den positiven Einfluss von FixJ-Phosphat stark induziert. Eine Aktivierung konnte bei freilebenden Zellen unter mikroaeroben Bedingungen, sowie in den Bakteroiden während Symbiose ebenfalls für den VF39-P1 gezeigt werden (Abb. 4.17). Diese gesteigerte Aktivität des P<sub>nifA</sub> (*S. meliloti*) führt zu einer erhöhten NifA-Synthese, welche ihrerseits im Zusammenspiel mit der  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase sämtliche NifA abhängigen Promotoren, darunter auch den *fixA* Promotor aktiviert. Dieser hat eine derart hohe Aktivität, dass er das *nifA*-Gen mit exprimiert. Durch eine solche „Feedback-Schleife“ (NifA>p*fixA*>*nifA*>NifA) wird dann eine starke Expression von *nifA* erreicht. Da die Voraussetzungen für ein solches Szenario, wie beschrieben auch in VF39 gegeben sind, führt auch hier eine gesteigerte P1-Expression zu einer gesteigerten (80x, Abb. 4.39) Expression des *fixABCX*-Operons. Das einzige, was für *S. meliloti*, jedoch noch nicht eindeutig für *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 gezeigt werden konnte, ist, dass der *fixA*-Promotor durch ein „Durchlesen“ bis in das *nifA* für eine dann noch weiter gesteigerte *nifA*-Expression verantwortlich ist.

#### 4.5.2 Konstruktion und Klonierung der vollständigen, für die *nifA*-Expression benötigten Region

Die bisherigen Messwerte geben Grund zu der Annahme, dass das *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 *nifA* sowohl vom P1, als auch vom P<sub>fixA</sub> aus expremiert wird. Vor allem letzterer wird während der Symbiose aktiviert, wenn u.a. die Sauerstoffkonzentrationen für ein funktionelles NifA optimal sind. NifA aktiviert dann wahrscheinlich im Zusammenspiel mit der  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase den P<sub>fixA</sub> (Abb. 4.36). Um das Zusammenspiel dieser Promotoren bei der *nifA*-Expression untersuchen zu können, sollte in diesem Versuchsteil die gesamte Region, stromaufwärts des P<sub>fixA</sub> bis in das *nifA* hinein kloniert und in einen Expressionsvektor eingebracht werden. Dazu wurden zwei Primer, „XbaI *nifA* complete“ und „BamHI *nifA* complete“ entworfen. Über diese wurden gleichzeitig zwei neue Schnittstellen, XbaI und BamHI, in das 4,3 kb große Amplifikationsprodukt („*nifA*-Komplett“, Sequenz im Anhang) eingeführt. Ein erster Klonierungsschritt erfolgte unter Verwendung des TA-Kloning Kits, mit dessen Hilfe das „*nifA*-Komplett“-PCR-Produkt in den Topo-Vektor eingebracht wurde. Aus diesem Vektor konnte der „*nifA* Komplett“-Promotor dann unter Verwendung der neu eingebrachten Schnittstellen, XbaI und BamHI in den Expressionvektor pJP2 umklont werden. Das resultierende Plasmid wurde mit pJP *nifA* K. bezeichnet. Mit Hilfe des *E. coli* Stammes S-17-1 erfolgte die Mobilisierung des Plasmids pJP *nifA* K. in verschiedene VF39-Stämme. Als Kontrollstamm wurde wie bisher der Wildtypstamm verwendet. Ferner wurde das Plasmid in die Stämme VF39 NE2 und VF39 NE9 eingebracht. Bei den Stämmen VF39 NE2 und VF39 NE9 handelt es sich um Interposonmutanten, in denen jeweils eine Neomycinresistenzgenkassette chromosomal in die BamHI-Schnittstelle (BamHI<sub>down</sub>, Abb. 4.18) eingebracht wurde (Esser, 2000). In der Mutante VF39 NE2 ist diese Kassette in Richtung *fixX* (Expressionsrichtung *nptII*) und in der Mutante VF39 NE9 in Richtung *nifA* orientiert. Auf diese Weise wird in ersterer die P1 basierte *nifA*-Expression unterbunden, während es in letzterer zu einer konstitutiven (Über-) Expression von *nifA* kommt. Frühere Arbeiten (Esser, 2000) haben gezeigt, dass die *nptII* vermittelte *nifA*-Expression (VF39 NE9) unter mikroaeroben Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp um mehr als den Faktor zwei erhöht ist. In der Symbiose liegt die absolute *nifA*-Expression dieser Mutante auf dem gleichen Niveau, beträgt jedoch im Vergleich zum Wildtyp nur noch etwa 50%, da der *nptII*-Promotor unter diesen Bedingungen im Gegensatz zum *nifA*-Promotor symbiontisch nicht aktiviert wird. Eine Überexpression ist demnach nur unter freilebenden Bedingungen gegeben, wohingegen die *nifA*-Expressionsrate dieser Mutante während der Symbiose reduziert ist.

Die nach der Mobilisierung resultierenden Stämme wurden mit VF39 Wt *nifA* K., VF39 NE2 *nifA* K. und VF39 NE9 *nifA* K. bezeichnet. Weiterhin wurden Expressionsmutanten konstruiert, bei denen der *fixA*-Promotor (pJP *fixA*) in die Mutanten VF39 NE2 und VF39 NE9 eingebracht wurde. Die resultierenden Mutanten wurden mit VF39 NE2 *fixA* und VF39 NE9 *fixA* bezeichnet. Mit diesen Mutanten konnte der Effekt Interposoninsertionen spezifisch für den  $P_{fixA}$  untersucht werden.

#### 4.5.3 Aktivitätsbestimmung des *fixA*- und des vollständigen *nifA*-Promotors unter verschiedenen Bedingungen

Ziel dieses Versuches war, herauszufinden ob eine sich eine Manipulation der P1-vermittelten *nifA*-Expression auf die Aktivität des *fixA*-Promotors (pJP *fixA*) bzw. des vollständigen *nifA*-Promotors (pJP *nifA*) auswirkt. Auf diese Weise könnte gezeigt werden, dass *nifA* sowohl vom P1, als auch vom  $P_{fixA}$  expremiert wird. Dazu sollten die Aktivitäten von Derivat VF39 Wt *nifA* K., den Mutanten VF39 NE2 *nifA* K., VF39 NE9 *nifA* K., von Derivat VF39 Wt *fixA* und den Mutanten VF39 NE2 *fixA* und VF39 NE9 *fixA* unter mikroaeroben Bedingungen und während der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum* bestimmt werden.

In Abb. 4.37 sind die  $P_{fixA}$ - und  $P_{nifA}$ - Expressionsraten in den oben beschriebenen Mutanten, sowie in einer *nifA*-minus Mutante und im Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der *fixA*-Promotor unter diesen Bedingungen nur eine Basisaktivität zeigt. Die Unterschiede der *fixA*-Promotoraktivitäten in den verschiedenen Mutanten sind auf Grund der allgemein niedrigen Expression dieses Promotors äußerst gering und können daher kaum von Messungenauigkeiten unterschieden werden. Dennoch kann tendenziell festgestellt werden, dass der *fixA*-Promotor in der *nifA*-minus Mutante nahezu inaktiv und in der Mutante VF39 NE9 im Vergleich zu Wildtyp leicht erhöht ist. Diese Aktivitäten würden theoretisch in das bisherige Bild der Regulation des *fixA*-Promotors hineinpassen. Ohne NifA (*nifA*-minus) ist der Promotor vollkommen inaktiv, wohingegen er in der Mutante VF39 NE9 leicht in seiner Aktivität erhöht sein kann. In dieser Mutante wird *nifA* unter den gegebenen Bedingungen durch die Neomycinresistenzgenkassette (konstitutiv) leicht überexprimiert. Dieses resultiert in einer, im Vergleich zu Wildtyp, leicht erhöhten NifA-Konzentration, die auf Grund der NifA-Abhängigkeit des *fixA*-Promotors auch in einer leicht gesteigerten Expressionsrate dieses Promotors resultiert.

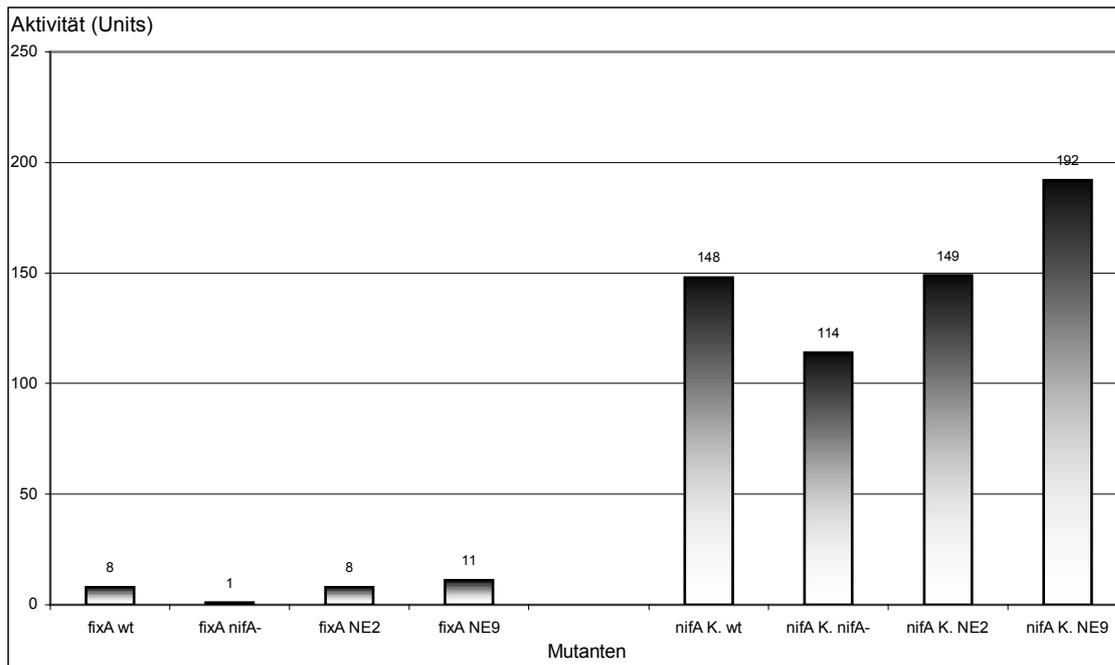


Abb. 4.37: Darstellung der  $P_{fixA}$ - und  $nifA$  K.-Promotoraktivitäten unter mikroaeroben Bedingungen.

Die Aktivitäten des  $fixA$ -Promotors sowie die Aktivitäten des Konstruktes  $nifA$  K. ( $P_{fixA}$  und P1) in den Mutanten VF39 NE2, VF39 NE9, VF39  $nifA$ - sowie im Wildtyp sind angegeben (Units nach Miller). Die Mutanten VF39 NE2 und VF39 NE9 zeichnen sich durch die chromosomale Insertion einer Neomycinresistenzgenkassette in der  $Bam$ HI-Schnittstelle  $Bam$ HI<sub>down</sub> (Abb. 4.18) aus. In der Mutante VF39 NE2 ist diese Kassette in Richtung  $fixX$  (Expressionsrichtung  $nptII$ ) und in der Mutante VF39 NE9 in Richtung  $nifA$  orientiert. Auf diese Weise wird in ersterer die P1 basierte  $nifA$ -Expression unterbunden, während es in letzterer zu einer konstitutiven (Über-) Expression von  $nifA$  kommt. Die  $nifA$ - Mutante ist durch die Insertion einer Gentamycinresistenzgenkassette im  $nifA$  charakterisiert.

Die vollständige  $nifA$ -Promotorregion ( $P_{nifA}$ ), die sich stromaufwärts des  $fixA$ -Promotors bis in das  $nifA$ -Gen hinein erstreckt, demnach sowohl den  $P_{fixA}$ , als auch den P1 beinhaltet, zeigt eine deutlich höhere Aktivität als der  $P_{fixA}$  alleine. Sie liegt im Wildtyp bei etwa 150 Units. In der Mutante VF39 NE9 ist die Aktivität leicht, auf 190 Units erhöht, wohingegen sie in der  $nifA$ -minus Mutante leicht reduziert ist. Die Aktivitäten in diesen beiden Mutanten deuten darauf hin, dass NifA bei der Aktivität des  $P_{nifA}$  auch unter mikroaeroben Bedingungen eine, wenn auch untergeordnete Rolle spielt. Wird  $nifA$  überexprimiert (VF39 NE9), so resultiert dies in einer leicht gesteigerten  $P_{nifA}$ -Aktivität. Ohne NifA verliert  $P_{nifA}$  ein wenig seiner Aktivität. Beide Effekte können daher wahrscheinlich auf den Einfluss von NifA auf den  $P_{fixA}$  zurückgeführt werden. Die Hauptaktivität des  $P_{nifA}$  stammt unter diesen Bedingungen jedoch vom P1-Promotor, der NifA-unabhängig ist und demnach seine Grundlevelaktivität in allen Mutanten beibehält.

In der Symbiose mit der Wirtspflanze *Pisum sativum* wird der  $P_{nifA}$  in deutlicher Weise aktiviert. Seine Aktivität steigt im Wildtyp im Vergleich zu mikroaeroben Bedingungen um mehr als das 6-fache auf etwa 900 Units (diese Messung) an. Die Messergebnisse

in Abb. 4.38 sind als relative Aktivitäten in Prozent angegeben, da bei verschiedenen Pflanzentestreihen unterschiedliche absolute Aktivitäten gemessen werden können. Diese Unterschiede kommen wahrscheinlich durch nicht immer gleiche Wachstumsbedingungen und demnach in ihrer Qualität nicht immer gleiche Pflanzen zustande. Durch die Angabe der Aktivitäten in Prozent können diese Messreihen untereinander besser verglichen und auf eine Diskussion der Unterschiede verzichtet werden. Die Aktivitäten im Wildtyp wurden dabei als Referenzwert angesehen und als 100 Prozent definiert. Dementsprechend wurden die Aktivitäten in den verschiedenen Mutanten auf diesen Referenzwert bezogen umgerechnet.

In Abb. 4.38 ist deutlich zu erkennen, dass der vollständige Promotor ( $P_{nifA}$ ) im Wildtyp die größte Aktivität aufweist. Die Expression von *nifA* durch P1 resultiert in der Bildung von aktivem NifA. Dieses wirkt seinerseits positiv auf den  $P_{fixA}$ , welcher das vollständige *fixABCX*-Operon exprimiert und durch ein Durchlesen bis in das *nifA* Gen hinein zusätzlich weiteres NifA bildet. Auf diese Weise steigt die Konzentration von NifA, was letztendlich in einer noch weiter gesteigerten Aktivität des  $P_{fixA}$  resultiert. Durch dieses Aufschaukeln in Form einer Feed-Back-Schleife kommt es zu einer hohen Konzentration von NifA und weiterhin zu einer enormen Expressionsrate des *fixABCX*-Operons, was auf der einen Seite eine starke Expression aller NifA-abhängigen Promotoren (z.B. *nifHDKE*) und auf der anderen Seite eine Bereitstellung der Komponenten der Elektronentransportkette (*fixABCX*-Operon) garantiert.

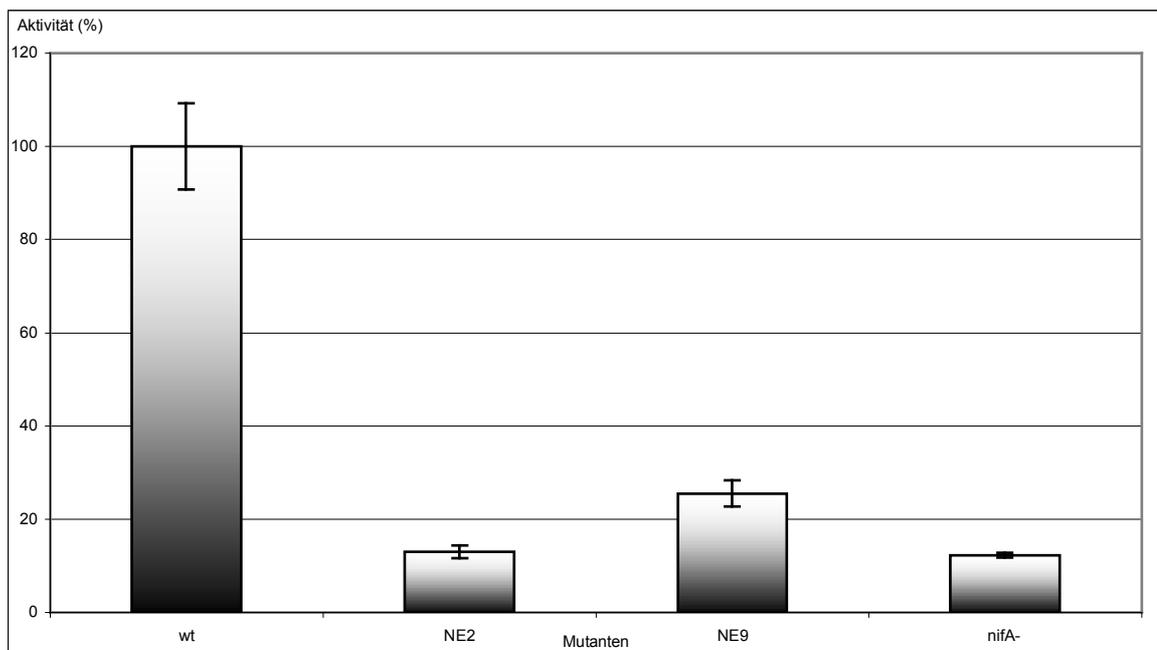


Abb. 4.38: Darstellung der Aktivitäten des vollständigen *nifA*-Promotors ( $P_{nifA}$ ) in der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum*.

Getestet wurden die Promotoraktivitäten im Wildtyp, in den Mutanten VF39 NE2, VF39 NE9 sowie in einer *nifA*-minus Mutante.

In der Mutante VF39 NE2 *nifA* K. ist dieses Aufschaukeln nicht möglich. Die P1-basierte *nifA*-Expression ist in dieser Mutante durch die Insertion der Neomycinresistenzgenkassette unterbunden. Dennoch zeigt diese Mutante, genau wie die *nifA*-minus Mutante eine geringe Restaktivität von etwa 10-15%. Diese Aktivität stammt ausschließlich vom plasmidären P1-Promotor, der in seiner Wildtypform kloniert wurde. Eine Feed-Back-Schleife ist trotz dieser P1-Aktivität nicht möglich, da auf dem Reporterplasmid kein funktionelles NifA, sondern UidA gebildet wird. Dies zeigt, dass der P1 in der Symbiose mit etwa 15% an der *nifA*-Expression beteiligt ist.

Die Mutante VF39 NE9 *nifA* K. zeigt erwartungsgemäß eine leicht höhere *nifA*-Expression als VF39 NE2 *nifA* K. Durch die chromosomale Insertion der Neomycinresistenzgenkassette (Richtung *nifA*) kommt es zu einer konstitutiven Expression von *nifA*. Der *nptII*-Promotor ersetzt in dieser Mutante den P1-Promotor. Dennoch wirkt sich die gegebene *nifA*-Expressionsrate nicht in Form einer Feed-Back-Schleife auf die *nifA*-Expression aus, da die Aktivität des chromosomalen  $P_{fixA}$  wahrscheinlich zu größten Teil durch die Neomycinresistenzgenkassette blockiert wird und es so nicht zu einem Aufschaukeln der *nifA*-Expression kommen kann.

Die konstitutive Expression von *nifA* und die durch die Unterbindung der Feed-Back-Schleife konstante Menge an NifA führt bei dem plasmidären  $P_{fixA}$  zu einer konstitutiven Aktivität, welche zusammen mit der plasmidären P1-Promotoraktivität in dieser Mutante gemessen wird. Mit etwa 25% der Wildtypaktivität liegt die Aktivität dieser Mutante etwa doppelt so hoch, wie in den beiden Mutanten, VF39 NE2 und VF39 *nifA*-, bei denen kein funktionelles NifA gebildet wird. Der Anteil der  $P_{fixA}$ -basierten *nifA*-Expression in der Mutante VF39 NE9 macht demnach etwa die Hälfte ihrer Aktivität aus.

In der *nifA* minus Mutante hingegen funktionieren der P1-Promotor, als auch der  $P_{fixA}$  wie im Wildtyp. Da jedoch kein funktionelles NifA exprimiert werden kann, erfolgt auch in dieser Mutante keine Aktivierung der *nifA*-Expression über  $P_{fixA}$  in Form einer Feed-Back-Schleife. Dies zeigt, dass der  $P_{fixA}$  erstens in Abhängigkeit von NifA exprimiert wird (Kap. 4.5.1, Abb. 4.36) und bestätigt zweitens, dass die *nifA*-Expression zu einem sehr großen Teil über den  $P_{fixA}$  erfolgt.

In Abb. 4.39 sind die Aktivitäten des  $P_{fixA}$  in den Mutanten VF39 NE2, VF39 NE9, VF39 *nifA*- sowie im Wildtyp unter symbiontischen Bedingungen dargestellt.

Wie in der vorherigen Messung des vollständigen *nifA*-Promotors  $P_{nifA}$  ist auch beim  $P_{fixA}$  eine eindeutige Abhängigkeit der Aktivität von NifA zu erkennen. In den Mutanten VF39 NE2 sowie VF39 *nifA*-, in denen es zu keiner Bildung von NifA kommt, wird der  $P_{fixA}$  nur sehr geringfügig aktiviert. Im Vergleich dazu wird der  $P_{fixA}$  im Wildtyp etwa 20 mal stärker aktiviert (vergl. Abb. 4.36). Die Aktivität in der Mutante VF39 NE9 liegt

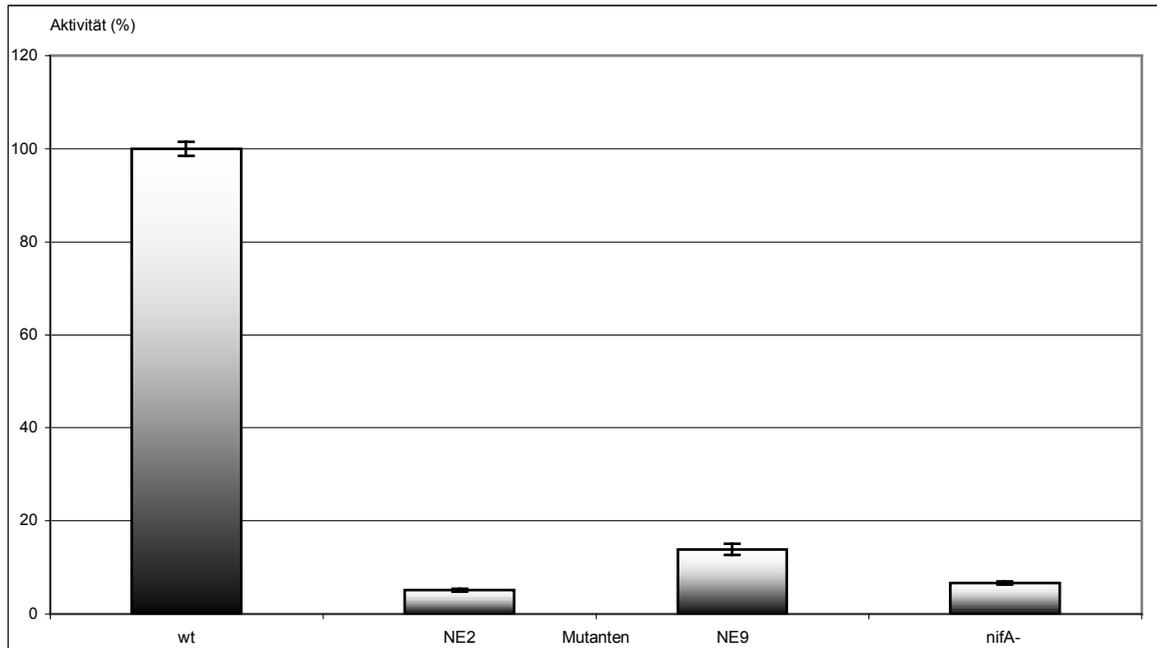


Abb. 4.39: Darstellung der Aktivitäten des  $P_{fixA}$  in der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum*. Getestet wurden die Promotoraktivitäten im Wildtyp, in den Mutanten VF39 NE2, VF39 NE9 sowie in einer *nifA*-minus Mutante.

erwartungsgemäß unter gleichen Bedingungen etwa doppelt so hoch wie in den Mutanten VF39 NE2 und VF39 *nifA*-. Diese Daten bestätigen die Messergebnisse und die Erklärungen aus den vorangegangenen Messungen zur Aktivität des  $P_{nifA}$  (vergl. Abb. 4.38). Der *fixA*-Promotor wird extrem in Abhängigkeit von einem funktionellen NifA exprimiert. Ohne NifA ist dieser Promotor praktisch inaktiv (*nifA* minus-Mutante). Bei einer konstitutiven Expression von NifA und einer Unterbindung der Feed-Back-Schleife wird der Promotor zwar aktiviert, kann seine eigene Expression jedoch nicht weiter steigern, so dass es zu einer konstitutiven Expression des *fixABCX*-Operons kommt (VF39 NE9). Nur im Wildtyp kann der *fixA*-Promotor durch eine Autoregulation über die *nifA*-Expression seine vollständige symbiontische Aktivität erreichen.

#### 4.5.4 Einfluss des *fixLJ*-Systems auf die Expression von *nifA* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39

In anderen Rhizobien, wie z.B. in *Sinorhizobium meliloti* ist die *nifA*-Expression stark vom Sauerstoffstatus der Umgebung abhängig (David *et al.*, 1988, Fischer, 1994). Die Detektion der Sauerstoffkonzentration erfolgt in *S. meliloti*, *B. japonicum* und *A. caulinodans* über das Zweikomponenten Regulatorische System *fixLJ* (Anthamatten *et al.*, 1991; David *et al.*, 1988; Kaminski *et al.*, 1991). In *B. japonicum* und *A. caulinodans* kontrolliert dieses System primär die mikroaerobe Induktion der *fixK*-Gene (Fischer, 1994). In *S. meliloti* dagegen kontrolliert FixJ direkt die Expression von *nifA*. In diesem Versuch soll geklärt werden, ob das *fixLJ*-System auch in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 eine Rolle bei der *nifA*-Expression spielt. Dazu wurden zwei pJP Reporter-genkonstrukte, pJP PCR1 (Kernpromotor) und pJP *XbaI/BgIII-nifA*, in verschiedene VF39-*fixL*-Mutanten eingebracht und die Expression dieser *nifA*-Promotoren in diesen Mutanten unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen gemessen.

#### 4.5.5 Bestimmung der *nifA*-Expression in verschiedenen *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39-*fixL* Mutanten

Die pJP-Reporter-genfusionen pJP PCR1 und pJP *XbaI/BgIII-nifA* wurden in die VF39-*fixL* Mutanten VF39 *fixL*<sub>1</sub>, VF39 *fixL*<sub>2</sub> und VF39 *fixL*<sub>1/2</sub> mobilisiert. Die resultierenden Mutanten wurden mit VF39 *fixL*<sub>1</sub>-*XbaI/BgIII*, VF39 *fixL*<sub>2</sub>-*XbaI/BgIII*, VF39 *fixL*<sub>1/2</sub>-*XbaI/BgIII*, VF39 *fixL*<sub>1</sub>-PCR1, VF39 *fixL*<sub>2</sub>-PCR1 und VF39 *fixL*<sub>1/2</sub>-PCR1 bezeichnet. Die Bestimmung der *nifA*-Expression erfolgte mit Hilfe des PNPG Tests unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen, sowie während der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum*. Als Kontrollen dienten jeweils die Derivate VF39 pJP PCR1 und VF39 pJP *XbaI/BgIII-nifA*.

In Abb. 4.40 ist wie in zuvor durchgeführten Versuchen deutlich zu erkennen, dass es einen deutlichen Aktivitätsunterschied zwischen den Aktivitäten der pJP PCR1-Mutanten (Kernpromotor) und der pJP *XbaI/BgIII-nifA* Mutanten gibt. Dieser Unterschied ist wie beschrieben auf die Region stromabwärts des Kernpromotors zurückzuführen, welche sämtliche Promotoraktivitäten von stromaufwärts um 60-70% reduziert und durch diese generelle Aktivitätsreduzierung indirekt eine Feinsteuerung dieser Promotoren ermöglicht.

Unter aeroben Bedingungen war in keiner Mutante ein deutlicher Effekt durch die *fixL*-Mutationen zu erkennen. Es konnten höchstens kleine Aktivitätsschwankungen

ausgemacht werden, die auf Grund der niedrigen Aktivitäten jedoch durchaus auf Messungenauigkeiten zurückgeführt werden konnten.

Unter mikroaeroben Bedingungen (freilebend, 30°C, Roller) war in den Mutanten, die das pJP *XbaI/Bg/II-nifA* Konstrukt tragen, ebenfalls kein gravierender Unterschied in Bezug auf die *nifA*-Expression festzustellen. Lediglich die Mutanten VF39 *fixL*<sub>1</sub>-*XbaI/Bg/II* und VF39 *fixL*<sub>1/2</sub>-*XbaI/Bg/II*, welche beide die Mutation “*fixL*<sub>1</sub>” aufwiesen, zeigten eine leichte, um 25% reduzierte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.

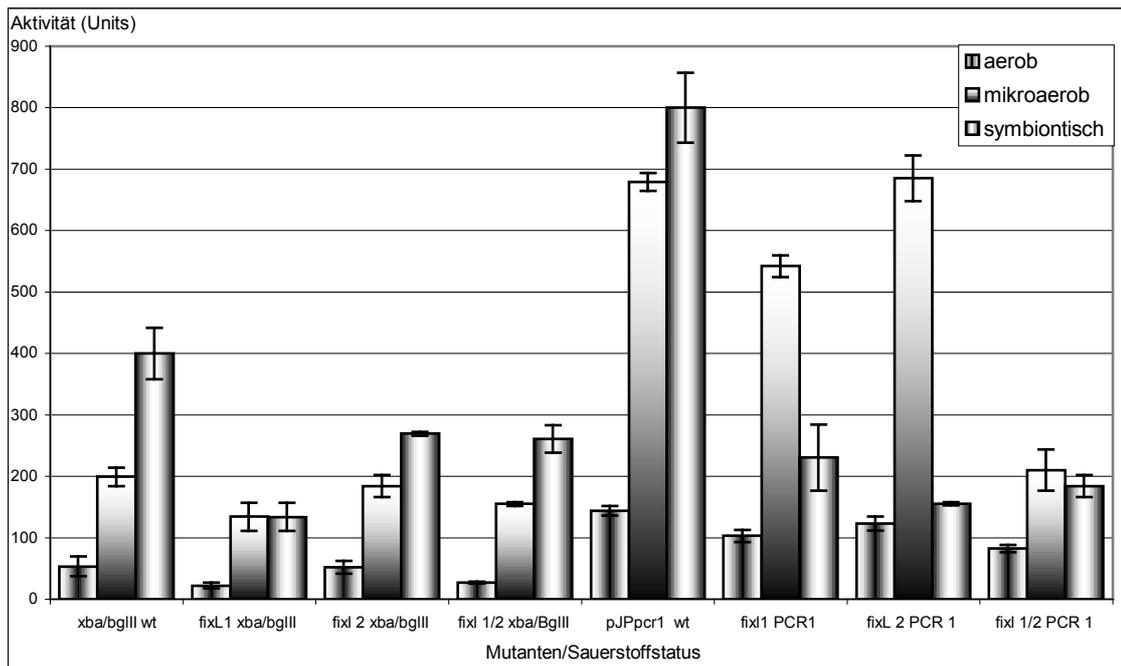


Abb. 4.40: Darstellung der Aktivitäten der *nifA*-Reportergenfusionen pJP PCR1 (Datenblock rechts) und pJP *XbaI/Bg/II nifA* (Datenblock links).

Die Promotoraktivitäten wurden im VF39 Wildtyp (wt), sowie in den Mutanten VF39 *fixL*<sub>1</sub>, VF39 *fixL*<sub>2</sub> und VF39 *fixL*<sub>1/2</sub> bestimmt. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte mittels PNP-Test unter aeroben, mikroaeroben und symbiontischen Bedingungen. Kulturen wurden in selektiven TY-Medium kultiviert.

Die Mutante VF39 *fixL*<sub>2</sub>-*XbaI/Bg/II* zeigte unter diesen Bedingungen keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Von den Mutanten, die das Konstrukt pJP PCR1 trugen, war bei Mutante VF39 *fixL*<sub>2</sub>-pJP PCR1 ebenfalls kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Die Mutante VF39 *fixL*<sub>1</sub>-pJP PCR1 zeigte wie die Mutante VF39 *fixL*<sub>1</sub>-*XbaI/Bg/II* nur eine leichte Reduktion der Aktivität um etwa 20%. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante VF39 *fixL*<sub>1/2</sub>- PCR1 eine deutliche Reduktion der *nifA*-Expression um etwa 70% im Vergleich zu Wildtyp.

In der Symbiose mit der Versuchspflanze *Pisum sativum* war hingegen bei allen Mutanten ein deutlicher Effekt zu erkennen. Innerhalb der Mutanten, die das

Reportergenkonstrukt pJP *XbaI/BglII-nifA* trugen, war dieser am deutlichsten bei der Mutante VF39 *fixL*<sub>1</sub>. Hier wurde die *nifA*-Expression um 60 bis 70% im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Dies zeigt, dass FixL auch in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 eine Rolle bei der *nifA*-Expression zu spielen scheint. Der Effekt der Mutante VF39 *fixL*<sub>2</sub> auf dieses Promotorkonstrukt ist zwar deutlich, jedoch mit etwa 30% Aktivitätsreduktion nicht so stark ausgeprägt. Verwunderlich ist jedoch die relativ hohe Aktivität der Mutante VF39 *fixL*<sub>1/2</sub>-*XbaI/BglII*. Schon alleine auf Grund der Mutation im *fixL*<sub>1</sub> (Reduktion der Aktivität um 60-70%) war ein ausgeprägterer Aktivitätsverlust als nur 30% zu erwarten gewesen. Da bei den Mutationen „*fixL*<sub>1</sub>“ und „*fixL*<sub>2</sub>“ jedoch nicht nur die beiden Kopien des *fixL*-Gens, sondern auch die Gene *fixK*<sub>1</sub> und *fixK*<sub>2</sub> ausgeschaltet wurden, kann ein Einfluss dieser Mutationen auf die *nifA*-Expression nicht ausgeschlossen werden. Die relativ hohe Aktivität der Mutante VF39 *fixL*<sub>1/2</sub>-*XbaI/BglII* könnte auf diese Mutationen in *fixK*<sub>1</sub> und *fixK*<sub>2</sub> zurückgeführt werden.

In *S. meliloti* hat FixK einen negativen Effekt auf die *nifA*-Expression (Batut *et al.*, 1989). Dieser negative Effekt wäre in den Mutanten VF39 *fixL*<sub>2</sub>-*XbaI/BglII* und VF39 *fixL*<sub>1/2</sub>-*XbaI/BglII* nicht mehr gegeben, so dass die Aktivität in diesen Mutanten zwar einerseits durch die Mutationen im *fixL* reduziert, jedoch zugleich durch die Mutation im *fixK* erhöht würde. Dies könnte dann insgesamt zu der beschriebenen, leichter reduzierten Aktivität dieser Mutante führen. Stromaufwärts des P1 konnten zwei Sequenzmotive identifiziert werden, welche Homologien zu bekannten FixK-Bindestellen aufweisen. Das erste Motiv liegt 159 bp stromaufwärts des P1-Transkriptionstartpunktes und zeigt große Homologien zur *fixGHIS*-Bindestelle in *S. meliloti*. In der Sequenz sind konservierte Nukleotide durch einen fetten Druck und Kursivschrift hervorgehoben: 5'-AGACTT**GACGCAGAT**CAAGGT-3' (Kahn *et al.* 1989). Das zweite Motiv befindet sich etwa 97 bp stromaufwärts des P1-Starts und zeigt mit der Sequenz 5'-GCGCT**TTGTTCCCGAT**GGCTGCT-3' Homologien zum (*Brady*)*rhizobium* spp. FixK-Konsensus. Ein Einfluss von FixK scheint auf Grund der Messergebnisse und der Sequenzhomologien möglich. Ob jedoch die Sequenzhomologien für eine effektive Bindung von FixK oder FnrN ausreichend sind kann bezweifelt werden. Generell gilt, dass der Abstand derartiger Bindestellen etwa 40bp bzw. 60 bp vom Transkriptionsstartpunkt betragen muss, damit FixK bzw. FnrN einen Effekt auf den jeweiligen Promotor zeigen kann. Wie beschrieben liegen beide Sequenzmotive jedoch zu weit vom P1 entfernt und erfüllen diese Grundvoraussetzung somit nicht. Es ist jedoch denkbar, dass FixK/FnrN unspezifisch an eines oder beide beschriebenen Sequenzmotive bindet und somit die RNA-Polymerase (*pfixA*) im Wildtyp „behindert“. Dies hätte eine Reduzierung, der vom *pfixA* ausgehenden *nifA*-Expression zur Folge. Unterstützt wird diese Theorie durch die Ergebnisse der

Aktivitätsmessungen in den Mutanten, die das Konstrukt pJP PCR1 tragen. Hier sind die Aktivitäten der Mutanten VF39 *fixL<sub>2</sub>*- PCR1 (150 Units) und VF39 *fixL<sub>1/2</sub>*- PCR1 (184 Units) im Vergleich zur Mutante VF39 *fixL<sub>1</sub>*- PCR1 (230 Units) nicht erhöht, sondern liegen auf einem ähnlichen Level, bei etwa 200 Units. Im Vergleich zum Wildtyp sind die Aktivitäten aller Mutanten somit um 70 bis 80% reduziert. Der nicht gegebene (unspezifische) Einfluss von FixK auf diese Mutanten wäre ganz einfach damit zu erklären, dass das Kernpromotorkonstrukt pJP PCR1 keine FixK homologen Bindestellen aufweist, da sich der Kernpromotor nur bis 66 bp stromaufwärts des P1-Starts erstreckt. In diesen Mutanten würden sich demnach nur die Mutationen im *fixL<sub>1</sub>* und/oder *fixL<sub>2</sub>* auf die *nifA*-Expression auswirken können. Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass sich Mutationen im *fixL<sub>1</sub>* und/oder *fixL<sub>2</sub>* auf die *nifA*-Expression (P1) auswirken (Reduktion um 70 bis 80%).

Da der Einfluss der Mutationen im *fixL<sub>1</sub>* und *fixL<sub>2</sub>* auch in der Kernpromotormutanten zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich entsprechende Bindestelle auf diesem DNA-Bereich befinden. In *S. meliloti* handelt es sich bei dieser Bindestelle mit großer Wahrscheinlichkeit um eine FixJ-Bindestelle. Wie in *S. meliloti* (Agron *et al.*, 1992) liegt auch in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 eine A+T reiche Region stromaufwärts des P1 vor. Die Nukleotide an den Positionen -59 bis -43 sind essentiell für die *nifA*-Expression (Kap. 4.1.2.2, Abb. 4.10).

#### 4.5.6 Interpretation der Ergebnisse

Die Regulation der *nifA* Expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 (Abb. 4.41) zeigt große Ähnlichkeiten zu der Regulation der *nifA* Expression in *Sinorhizobium meliloti* und *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. Wie dort wird die *nifA* Expression in VF39 von einem Promotor (P1) aus initiiert, der sich in der *fixX-nifA* intergenischen Region befindet (Kim *et al.*, 1986; Ruiz-Argüeso, 2004). Bei diesem Promotor handelt es sich in beiden Spezies um einen NifA- und  $\sigma^{54}$  unabhängigen Promotor (Kim *et al.*, 1986, Ruiz-Argüeso, 2004; diese Arbeit). In *S. meliloti* erfolgt die Aktivierung dieses Promotors ( $P_{nifA}$ ) in Abhängigkeit vom FixLJ Zweikomponenten Regulatorischen System (Fischer, 1994). Der Sauerstoffstatus der Umgebung wird dabei von FixL detektiert (Jason *et al.*, 2001). Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen aktiviert FixL durch Phosphorylierung FixJ (Cabanes *et al.*, 2000). FixJ-Phosphat wirkt dann aktivierend auf den  $P_{nifA}$  (*S. meliloti*) ein (vergl. Abb. 2.5 A) (Cabanes *et al.*, 2000). Gleichzeitig hemmt FixK, dessen Expression ebenfalls positiv von FixJ-Phosphat beeinflusst wird, die  $P_{nifA}$  Aktivität (Fischer, 1994; Batut und Boistard, 1994).

In VF39 konnte gezeigt werden, dass die P1 Promotoraktivität bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen positiv von FixL beeinflusst wird, jedoch nicht, dass FixJ als Verbindungsglied zwischen Sauerstoffdetektion und Informationsweitergabe an P1 beteiligt ist, da bisher kein *fixJ* identifiziert werden konnte (Patschkowski *et al.*, 1996; Boesten und Priefer, 2004). Der VF39 P1 weist zwar Sequenzen auf, die Homologien zu FixK und FnrN Bindestellen haben, jedoch in Bezug auf den P1 falsch positioniert sind. Daher ist es fragwürdig ob FixK in die Regulation der P1 Aktivität eingreift. Sollte dies der Fall sein, so kann höchstens von einem unspezifischen Effekt ausgegangen werden. Zusammengefasst resultiert in VF39 eine P1 generierte *nifA* Expression, die unter freilebenden Bedingungen deutlich reduziert und in während der Symbiose stark erhöht ist, so dass es zu einer Grundlevel *nifA* Expression kommt.

Die Regulation der Gencluster *nifHDKE* und *fixABCX* ist in *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 abhängig von NifA. Diese Abhängigkeit ist in Rhizobien weit verbreitet und wurde beispielsweise auch in *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM 791 (Riuz-Argüeso, 2004) nachgewiesen. In VF39 konnte diese Abhängigkeit vor allem durch die Untersuchung der *fixA*-/*nifH*-Promotoraktivitäten in *nifA* Deletionsmutanten und Sequenzanalysen dieser Promotorregionen gezeigt werden. Wie auch in anderen gut untersuchten Rhizobien zeigen auch die Promotorregionen von *fixA* und *nifH* die charakteristischen Strukturen NifA regulierter Promotoren. In beiden sind deutliche NifA Boxen zu finden und beide weisen die typischen Sequenzen  $\sigma^{54}$  abhängiger Promotoren auf. Durch die Klonierung des *fixA* Promotors sowie der vollständigen *fixA-nifA* Region in den PJP2 Expressionsvektor, sowie deren Untersuchung in Interposonmutanten konnte weiterhin eindeutig gezeigt werden, dass der Hauptteil der symbiontischen *nifA* Expression auf den *fixA* Promotor zurückgeht. Der VF39 P1 wird symbiontisch stark aktiviert und führt zu einer erhöhten *nifA* Expression. NifA aktiviert seinerseits im Zusammenspiel mit RpoN den *fixA* Promotor. Dessen Aktivität ist so stark, dass durch ein durchlesen bis in *nifA* auch weiteres NifA gebildet wird. Der Mechanismus einer solchen Autoregulation, wie er schon länger in *S. meliloti* (Ditta *et al.*, 1987; Fischer 1994; Kim *et al.*, 1986; Buikema *et al.*, 1985) bekannt ist, wurde auch für *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM 791 (Riuz-Argüeso, 2004) nachgewiesen.

## 4.6 Zusammenfassung

Bei der Untersuchung zur Regulation der Transkription des *nifA* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 wurden bei einer Primer Extension Analyse zwei Signale detektiert, die auf Transkriptionsstartstellen für das *nifA* hindeuteten. Die auf diese Startpunkte zurück zu führenden Promotoren wurden mit P1 und P2 bezeichnet, wobei der zu P1 gehörige Startpunkt 4-5 bp stromabwärts des *fixX* Stopcodons und der zu P2 gehörige Startpunkt inmitten der *fixX-nifA* intergenischen Region, 120 bp stromabwärts des *fixX* Stopcodons zu finden ist. Durch die Konstruktion zahlreicher Reporterfusionen, in denen verschiedene Teile der P1 und P2 Promotorregionen deletiert wurden, konnte im weiteren Verlauf der Untersuchungen gezeigt werden, dass nur der P1 Promotor essentiell wichtig für die *nifA* Expression ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen, aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. Auch hier wurde ein Promotor stromaufwärts von *nifA* identifiziert, welcher für eine Basislevel *nifA* Transkription verantwortlich ist (Ruiz-Argüeso, 2004). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es sich bei Signal P2 der Primer Extension Analyse wahrscheinlich nur um ein Artefakt handelt, da die angenommenen P2 Promotorregion deletiert werden konnte, ohne dass sich dies negativ auf die Expression von *nifA* auswirkte. Viel mehr zeigten Reporterfusionen in denen gewisse Bereiche der P2 Promotorregion deletiert wurden sogar eine gesteigerte *nifA* Expressionsrate. Eine Sequenzanalyse dieser Bereiche zeigte, dass in dieser Region vermehrt stabile Sekundärstrukturen ausgebildet werden können, denen jedoch keine bestimmte Funktion zugewiesen werden konnte. Diese Strukturen haben jedoch den auffälligen Effekt, dass diese jegliche von stromaufwärts her rührenden Promotoraktivitäten um etwa 70 % reduzieren und somit gewissermaßen als Feintuning Mechanismus funktionierten. Weiterhin wäre durch diese stabilen Strukturen auch das starke Signal zu erklären, welches bei den Versuchen zur Kartierung der Transkriptionsstartpunkte aufgetreten ist. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Reverse Transkriptase an diesen Strukturen sehr oft von der mRNA abgelöst hat. Die dadurch entstandene Vielzahl gleich langer Artefakte wurde dann fälschlicher Weise als P2 Transkriptionsstartpunkt interpretiert.

Der P1 Promotor seinerseits reagiert sehr sensibel auf jegliche Veränderungen, die stromaufwärts des P1 Transkriptionsstarts und innerhalb des Startpunktes vorgenommen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch gewisse Sequenzen stromabwärts des P1 Starts essentiell für die P1 Promotoraktivität zu sein scheinen. Auf Grund der Reporterfusionen die während der Deletionsanalysen angefertigt wurden, konnte eine Kernsequenz identifiziert werden, die für die P1 vermittelte *nifA* Promotoraktivität essentiell ist. Dieser P1-Promotorkernbereich (Abb.

4.15) umfasst etwa 101 bp und zeigt sowohl unter mikroaeroben, symbiontischen als auch unter aeroben Bedingungen eine Aktivität, die weit über der des Wildtyppromotors liegt. Da diese Region zwar symbiontisch aktiviert wird, diese Aktivierung jedoch im Vergleich zur Aktivierung des Wildtyppromotors um den Faktor zwei bis drei geringer ausfällt, kann außerdem die Schlussfolgerung gezogen werden, dass dieser Kernpromotor für sich alleine dereguliert ist, da die negativ auf die P1 Promotoraktivität wirkenden Elemente aus der P2 Region hier fehlen.

Dieser regulativ wirkende Einfluss der Sequenzen stromabwärts des Kernpromotors konnte in einer weiteren Versuchsreihe mit Hilfe von *nptII* Reporterfusionen bestätigt werden. Auch hier wurden die Aktivitäten des *nptII* Promotors im gleichen Maße reduziert wie die des P1, was wiederum bedeutet, dass diese Wirkung unspezifisch ist und auf alle stromaufwärts gelegenen Promotoren wirkt.

Die eigentliche Expression des *nifA* während der Symbiose ist jedoch nicht auf den P1 Promotor zurück zu führen. Durch Reporterfusionen konnte gezeigt werden, dass sowohl ein Promotor stromaufwärts des *fixABCX* Genclusters als auch ein Promotor stromaufwärts des *nifHDKE* Genclusters stark von NifA aktiviert werden. Diese Aktivierung blieb in Mutanten, in denen das *nifA* deletiert wurde aus. Sequenzanalysen zeigten weiterhin, dass es sich bei beiden untersuchten und klonierten Promotoren um -24/-12 Promotoren handelt, da beide deutlich konservierte  $\delta^{54}$  – Bindungsstellen ausweisen. Weiterhin konnten gut konservierte NifA-Boxen, wie sie typischer Weise bei NifA regulierten Promotoren vorkommen, bei beiden Promotoren identifiziert werden. Dass dabei die NifA Box des *fixA* Promotors besser positioniert und konserviert ist als die des *nifH* Promotors könnte erklären warum die Messergebnisse eine stärkere Aktivierung des *fixA* Promotors durch NifA zeigen.

Durch eine Klonierung der vollständigen von *fixABCXnifA* Region konnte schließlich gezeigt werden, dass es sich bei der Regulation der *nifA* Expression um eine Autoregulation handelt, wie sie in *S. meliloti* und *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 beschrieben ist. Der *fixA* Promotor wird dabei so stark aktiviert, dass seine Aktivität bis in *nifA* und *nifB* hineinreicht.

Unter freilebenden Bedingungen zeigt der P1 in *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 eine Basisaktivität. Diese von vorne herein schwache Aktivität wird durch die Region stromabwärts des P1 Kernpromotors weiter reduziert, so dass *nifA* nur sehr geringfügig exprimiert wird. Da NifA nur bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck, wie er in den Knöllchen der Wirtspflanze (hier *Pisum sativum*) herrscht, aktiv ist, ist die Wirkung des wenigen gebildeten NifA auf die den *fixA* Promotor zu vernachlässigen. Daher zeigt dieser selbst unter mikroaeroben Bedingungen kaum Aktivität. Das gleiche gilt für den *nifH* Promotor.

Während der Symbiose mit der Wirtspflanze *Pisum sativum* wird dann der P1 Promotor aktiviert. Der Mechanismus für diese Aktivierung konnte bisher noch nicht erklärt werden, da es sich um einen bisher nicht näher beschriebenen Promotor handelt, der keine bekannten Sequenzmotive aufweist. Sicher ist nur, dass die P1 Promotoraktivität in VF39 positiv von FixL beeinflusst wird, jedoch nicht, dass FixJ als Verbindungsglied zwischen der Sauerstoffdetektion durch FixL und der Informationsweitergabe an P1 beteiligt ist, da in VF39 bisher kein *fixJ* identifiziert werden konnte (Patschkowski *et al.* 1996; Boesten und Priefer, 2004). Weiterhin weist der VF39 P1 zwar Sequenzen auf, die Homologien zu FixK und FnrN Bindestellen haben, jedoch in Bezug auf den P1 falsch positioniert sind. Daher ist es fragwürdig, ob FixK in die Regulation des P1 eingreift.

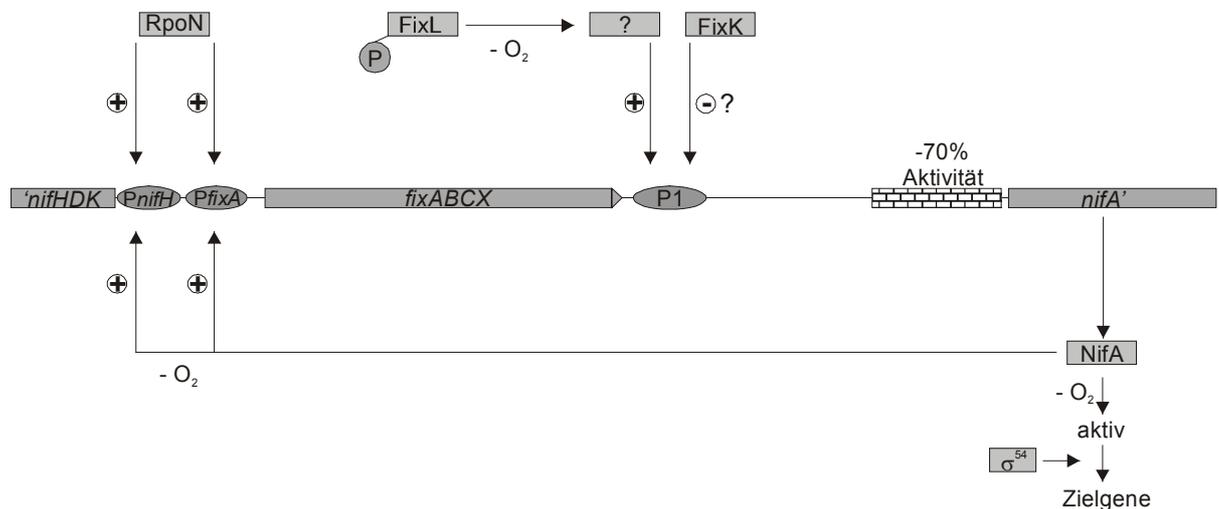


Abb. 4.41: Schematische Darstellung der *nifA*-Regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39.

Das von der P1 Promotoraktivität ausgehend gebildete NifA ist unter den Bedingungen, wie sie im Knöllchen herrschen stabil und aktiv. Somit kann dieses positiv auf NifA regulierte Promotoren, wie den *fixA*- oder *nifH*- Promotor, wirken. NifA bindet an die NifA Box dieser Promotoren und aktiviert diese dann im Zusammenspiel mit der  $\delta^{54}$  RNA Polymerase. Beim *fixA* Promotor ist diese Aktivierung so stark, dass die Aktivität des P *fixA* bis in das *nifA* hineinreicht und weiteres NifA gebildet wird. Diese aktiviert seinerseits dann wieder alle NifA regulierten Promotoren, darunter den P *fixA*, so dass es zu einer Feedbackschleife kommt, in der immer mehr NifA gebildet wird. Bei der Regulation der *nifA* Expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 handelt es sich daher um eine NifA Autoregulation, wie sie auch für *S. meliloti* (Fischer, 1994)

und *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM 791 (Ruiz-Argüeso, 2004) beschrieben ist.

Ähnlich wie in *Sinorhizobium meliloti* kommt es in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 nach der Grundlevel-expression von *nifA*, durch  $P_{nifA}$  bzw. P1 zu einer Autoregulation der *nifA* Expression während der Symbiose. In *Sinorhizobium meliloti* wird der *fixA*-Promotor im Zusammenspiel mit der  $\sigma^{54}$  RNA-Polymerase stark durch NifA aktiviert (Ditta et al., 1987; Fischer 1994). Diese *fixA*-Transkription wird bis in das *nifA*-Gen fortgeführt und führt somit zu einer zusätzlichen Erhöhung der *nifA*-Expression (Kim et al., 1986; Buikema et al., 1985). Diese zusätzliche *nifA*-Transkription, die mindestens 50 % der Gesamt-*nifA*-Transkription ausmacht, scheint in *Sinorhizobium meliloti* unentbehrlich für eine vollständige symbiontische Aktivierung der *nifA*-Expression zu sein. Die Messdaten zur Aktivität des *fixA*-Promotors und des vollständigen  $P_{nifA}$  ( $P1$  und  $P_{fixA}$ ) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 (Kap. 4.5.1 und 4.5.3), sowie die NifA-Abhängigkeit der *nifA* Expression (Esser, 2000) zeigen, dass eine NifA-Autoregulation, wie sie für *Sinorhizobium meliloti* beschrieben ist, auch auf diesem Organismus übertragbar ist. In *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 scheint der Anteil der  $P_{fixA}$  generierten *nifA* Expression mit etwa 80% noch etwas höher auszufallen als in *Sinorhizobium meliloti*, wodurch die Bedeutung dieser Feedbackschleife an der *nifA* Expression in VF39 unterstrichen wird. Weitere Unterstützung findet dieser vorgeschlagene Regulationsmechanismus darin, dass in einer günstigen Entfernung zum  $P_{fixA}$  eine gut konservierte NifA-Box identifiziert werden konnten und dass es sich beim  $P_{fixA}$  mit größter Wahrscheinlichkeit um einen  $\sigma^{54}$  abhängigen Promotor handelt.

## 5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *nifA* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* von zwei Promotoren aus transkribiert wird. Dabei handelt es sich um den P1-Promotor, der NifA-unabhängig ist und den  $P_{fixA}$ , der in Abhängigkeit von NifA aktiviert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich bei einem zuvor identifizierten und dem Promotor P2 zugeordneten Transkriptionsstartpunkt um ein Artefakt handelt, welches durch potentielle Sekundärstrukturen stromabwärts des P1 zustande kommt. In weiterführenden Arbeiten sollte die Rolle des  $P_{fixA}$  bei der *nifA*-Expression weiter untersucht werden um seine Beteiligung an der *nifA*-Expression weiter zu untermauern. Einfache Experimente in dieser Richtung wären z.B. Mutagenesen der NifA-Box und des -12/-24 Promotors von *fixA* sowie die Kartierung der Transkriptionsstartpunkte von *fixA* und *nifH*.

Neue Ergebnisse haben gezeigt, dass FnrN in Abhängigkeit von FixL gebildet wird. Da in früheren Arbeiten (Esser, 2000) gezeigt werden konnte, dass *nifA* in Abhängigkeit von FnrN exprimiert wird und da *nifA* außerdem in Abhängigkeit von FixL exprimiert wird, ist es möglich, dass es sich bei FnrN um ein Bindeglied zwischen FixL und *nifA* handelt. Unterstützung findet diese Theorie in relativ gut konservierten FnrN Bindestellen, welche stromaufwärts von P1 zu finden sind und in der Abhängigkeit des P1 von FixL. Eine mögliche Regulation des P1 über FixL und FnrN sollte daher untersucht werden.

Ein in die *nifA*-Expression involvierter Transkriptionsregulator, welcher in dieser Arbeit identifiziert wurde, konnte bis zu jetzigen Zeitpunkt nur unzureichend charakterisiert werden. Diese Charakterisierung und die tatsächliche Rolle dieses Regulators könnten weiterhin Gegenstand fortführender Arbeiten sein.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

Agron, P. G., Ditta, G. S., Helinski, D. R. (1992) Mutational Analysis of the *Sinorhizobium meliloti nifA* Promotor. Journal of Bacteriology, 174(12): 4120-4129.

Alvarez-Morales, A., M. Betancourt-Alvarez, K. Kaluza and H. Hennecke (1986) Activation of the *Bradyrhizobium japonicum nifH* and *nifDK* operon is dependent on promotor upstream sequences. Nucleic Acids Res. 1986 May 27;14(10):4207-27

Alvarez-Morales, A. and H. Hennecke (1985) Expression of *Rhizobium japonicum nifH* and *nifDK* operons can be activated by the *Klebsiella pneumonia nifA* protein but not by the product of *ntnC*. Mol Gen Genet. 1985;199(2):306-14

Anthamatten, D. and H. Hennecke (1991) The regulatory status of the *fixL*- and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. Mol Gen Genet. 1991 Jan;225(1):38-48.

Barrios, H., Fischer, H.-M., Hennecke, H., Morett, E. (1995) Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum nifA* expression. J Bacteriol. 1995 Apr;177(7):1760-5.

Barrios, H., Grande, R., Olvera, L., Morett, E. (1998) *In vivo* genomic footprinting analysis reveals that the complex *Bradyrhizobium japonicum fixRnifA* promoter region is differently occupied by two distinct RNA polymerase holoenzymes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 3;95(3):1014-9.

Batut, J. & Boistard, P. (1994) Oxygen control in *Rhizobium*. Antonie Van Leeuwenhoek. 1994;66(1-3):129-50. Review.

Batut, J., M. L. Daveran-Mingot, M. David, J.Jacobs, A. M. Garnerone and D. Kahn (1989) *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. EMBO J. 1989 Apr;8(4):1279-86

- Batut, J., P. de Philip, J. M. Reyrat, F. Waelkens and P. Boistard (1993) Oxygen-regulated *in vitro* transcription of *Rhizobium meliloti nifA* and *fixK* genes. J Bacteriol. 1993 Nov;175(21):6867-72.
- Bauer, C .E., Elsen, S., Bird, T H. (1999) Mechanisms for redox control of gene expression. Annu Rev Microbiol. 1999;53:495-523. Review.
- Bauer, E., Kaspar, T., Fischer, H.-M., Hennecke, H. (1998) Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR. J Bacteriol. 1998 Aug;180(15):3853-63.
- Beringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol. 1974 Sep;84(1):188-98.
- Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P., Kahn, D., Samama, J. P. (1999): Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. Structure. 1999 Dec 15;7(12):1505-15.
- Boesten, B. & U. B. Priefer, 2004 The C-terminal receiver domain of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* FixL protein is required for free-living microaerobic induction of the *fnrN* promoter. Microbiology. 2004 Nov;150(Pt 11):3703-13.
- Brushi, M. & Guerlesquin, F. (1988) Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. FEMS Microbiol Rev. 1988 Apr-Jun;4(2):155-75. Review.
- Buck, M., Cannon, W., Woodcock, J. (1987) Mutational analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter. Nucleic Acids Res. 1987 Dec 10;15(23):9945-56.
- Buck, M., Cannon, W., Woodcock, J. (1987) Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter may involve DNA loop formation. Mol Microbiol. 1987 Sep;1(2):243-9.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M., and Dixon, R. (1986) Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. Nature, 320: 374-378.

Buikema, W. J., J. A. Klingensmith, S. L. Gibbons and F. M. Ausubel (1985) Nitrogen fixation specific regulatory genes of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* share homology with the general nitrogen regulatory gene *ntrC* of *K. pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 1985 Jun 25;13(12):4539-55.

Burckhardt, B., Schillik, D. and Pühler, A. (1987) Physical characterization of *Sinorhizobium meliloti* megaplasmids. Plasmid 17: 13-25.

Cabanes, D., Boistard, P. and Batut, J. (2000) Identification of *Sinorhizobium meliloti* Genes Regulated during Symbiosis. Journal of Bacteriology, July 2000, p. 3632-3637, Vol. 182, No. 13

Coppard J R, Merrick M J. Cassette mutagenesis implicates a helix-turn-helix motif in promoter recognition by the novel RNA polymerase sigma factor sigma 54. Mol Microbiol. 1991;5:1309–1317.

David, M, M.-L. Daveran, J. Batut, A. Dedieu, O. Domerque, J. Ghai, C. Hertig, P. Boistard and D. Kahn (1988) Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. Cell, Vol 54, 671-683, 26 August 1988

Ditta, G., E. Virts, A. Palomares and K. Choong Hyun (1987) The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. J. Bacteriol. 169: 3217- 3223

Denarie, J., Debelle, F., and Rosenberg, C. (1992) Signaling and host range variation in nodulation. Ann. Rev. Microbiol. , 46: 497-531.

Earl, C. D. , Ronson, C. W., and Ausubel, F. M. (1987) Genetic and structural analysis of the *Sinorhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes. Journal of Bacteriology, 169: 1127-1136.

Eckhardt, T. (1978) A rapid method for identification of plasmid-DNA in bacteria. Plasmid, 1: 584-588.

Eiglmeier, K., Honore, N., Luchi, S., Lin, E. C. C., Cole, S. T. (1989) Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters. Mol Microbiol. 1989 Jul;3(7):869-78.

Erfkamp, J., Müller, A. (1990) Die Stickstoff-Fixierung. *Chemie in unserer Zeit*, 24: 267-279.

Esser, N. (2000) Genetische und molekularbiologische Untersuchungen zur Regulation der *nifA*-Expression in dem stickstofffixierenden Bodenbakterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. Diplomarbeit, RWTH-Aachen, Institut Biologie I, Ökologie des Bodens

Fischer, H. M., Fritsche, S., Herzog, B., and Hennecke, H. (1989): Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. *FEBS Lett.* 1989 Sep 11;255(1):167-71.

Fischer, H.-M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev.* 1994 Sep;58(3):352-86. Review.

Garnerone, Anne-Marie, Didier Cabanes, Marie Foussard, Pierre Boistard and Jaques Batut (1999) Inhibition of the FixL Sensor Kinase by the FixT Protein in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 1999 Nov 5;274(45):32500-6.

Grönger, P., S. S. Manian, H. Reoländer, M. O'Connell, U. B. Priefer and A. Pühler (1987) Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6JI containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. *Nucleic Acids Res.* 1987 Jan 12;15(1):31-49.

Gussin, N., Ronson, C. W., Ausubel, F. M., (1986) Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu Rev Genet.* 1986;20:567-91. Review.

Gutierrez, D., Hernando, Y., Palacios, J.-M., Imperial, J., Ruiz-Argueoso, T. (1997) FnrN controls symbiotic nitrogen fixation and hydrogenase activities in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* UPM791. *J Bacteriol.* 1997 Sep;179(17):5264-70.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580.

Heldt, H. W. (1996) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.

Hirsch, A. M. (1992, Review) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.*, 122: 211-237.

Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 1981 Jun;114(1):193-7.

Hontelez, J. G., Lankhorst, R. K., Katinaskis, P., van den Bos, R. C., and van Kammen, A. (1989) Characterization and nucleotide sequence of a novel gene *fixW* upstream of the *fixABC* operon in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.*, 218: 536-544.

Huala, E., Anne L. Moon and Frederick M. Ausubel (1991) Aerobic inactivation of *Rhizobium meliloti NifA* in *Escherichia coli* is mediated by *lon* and two newly identified genes, *snoB* and *snoC*. *J Bacteriol.* 1991 Jan;173(1):382-90.

Huala, E., Ausubel, F. M. (1989) The central domain of *Rhizobium meliloti NifA* is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. *J Bacteriol.* 1989 Jun;171(6):3354-65.

Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system. *Plant Mol. Biol. Reporter* 5: 387-405.

Kahn, D., David, M., Domergue, O., Daveran, M.-L., Ghai, J., Hirsch, P. R., and Batut, J. (1989) *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol.* 1989 Feb;171(2):929-39..

Kaminski, A. and Elmerich, C. (1991) Involvement of *fixLJ* in the regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol Microbiol.* 1991 Mar;5(3):665-73.

Kaminski, A. and Elmerich, C. (1991) Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. *Mol Microbiol.* 1991 Aug;5(8):1983-91.

Kaminski, A. and Elmerich, C. (1998) The control of *Azorhizobium caulinodans nifA* expression by oxygen, ammonia and by the HF-I-like protein, NrfA. *Mol Microbiol.* 1998 May;28(3):603-13.

Kim, C.-H., Helinski, D. R., Ditta, G. (1986) Overlapping transcription of the *nifA* regulatory gene in *Rhizobium meliloti*. *Gene*. 1986;50(1-3):141-8.

Krey, R., Pühler, A., Klipp, W. (1992) A defined amino acid exchange close to the putative nucleotide binding site is responsible for an oxygen-tolerant variant of the *Rhizobium meliloti* NifA protein. *Mol. Mol Gen Genet*. 1992 Sep;234(3):433-41.

Li, Y., Parsons, R., Day, D. A. and Bergersen F. J. (2002) Reassessment of major products of N<sub>2</sub> fixation by bacteroids of soybean nodules. *Microbiology* 148: 1959-1966

Loroch, A. I., Nguyen, B. G., Ludwig, R. A. (1995) Interactive regulation of *Azorhizobium nifA* transkription via overlapping promoters. *Journal of Bacteriology*, 177(24): 7210-7221.

Manniatis, T. E., Fritsch, E., F., and Sambrook, J. (1982) *Molekular cloning*. Cold Spring Harbor, New York.

Miller, J. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mohr, H., Schopfer, P. (1992) *Pflanzenphysiologie*. 4. Aufl. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Monson, E. K., Lois, A. F., Agron, P. G., Weinstein, M., Stanfield, S. W., Ditta, G. S., and Helinski (1993) Oxygen sensing by the *Sinorhizobium meliloti* two-component regulatory system, FixLJ, p. 405- 410. In R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Morett, E. and M. Buck (1988) NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(24):9401-5.

Morett, E., Fischer, H.-M., and Henecke, H. (1991) Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. *J Bacteriol*. 1991 Jun;173(11):3478-87.

Nees D. W., P. A. Stein and R. A. Ludwig (1988) The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene: identification of upstream-activating sequences including a new element, the 'anaerobox'. Nucleic Acids Res. 1988 Oct 25;16(20):9839-53.

Oguiza, J. A., Gallegos, M. T., Chaney, M. K., Cannon, W. V., Buck, M. (1999): Involvement of the sigmaN DNA-binding domain in open complex formation. Mol. Microbiol. 33 (4): 873-885

Patschkowski, T. (1996) Molekulare und funktionelle Analyse regulatorischer Stickstofffixierungsgene in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. Dissertation, Uni Bielefeld.

Patschkowski, T., Schlüter, A., and Priefer, U. B. (1996) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains a second *fnr/fixK*-like gene and an unusual *fixL* homologue. Mol Microbiol. 1996 Jul;21(2):267-80.

Perret, Xavier, Christoph Freiberg, Andre Rosenthal William J. Broughton and Remy Fellay (1999) High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. Mol Microbiol. 1999 Apr;32(2):415-25

Preisig, O., Anthamatten, D. & Hennecke, H., (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Apr 15;90(8):3309-13.

Preisig, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C.A., and Hennecke, H. (1996): A high-affinity *cbb3*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol. 1996 Mar;178(6):1532-8.

Prell, J., Boesten, B., Poole, P., Priefer, U. B. (2002) The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 gamma-aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. Microbiology. 2002 Feb;148(Pt 2):615-23.

Priefer, U. B. (1989) Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. J Bacteriol. 1989 Nov;171(11):6161-8.

- Ratet, P., K. Pawlowski, J. Schell and F. J. de Bruijn (1989) The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen-fixation regulatory gene, *nifA*, is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. *Mol. Microbiol.* 3: 825- 838
- Ried, J. L. & Collmer, A. (1987) An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene*, 57: 239-246.
- Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M., and Shine, J. (1980) Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. *Plant Sci. Lett.*, 19: 277-284.
- Ruvkun, G. B., V. Sundraresan and F. Ausubel (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell*. 1982 Jun;29(2):551-9.
- Samninen, S. O. & Streeter J. G. (1992) Labelling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bacteroids following incubation of intact nodules with <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. *Plant physiol.* 100: 597-604
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F. S., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992;24:104-8.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 1994 Jul 22;145(1):69-73.
- Schlüter, A., Patschkowski, T., Uden, G., Priefer, U. B. (1992) The *Rhizobium leguminosarum* FnrN protein is functionally similar to *Escherichia coli* Fnr and promotes heterologous oxygen-dependent activation of transcription. *Mol Microbiol.* 1992 Nov;6(22):3395-404.

Schlüter, A., Patschkowski, T., Quandt, J., Selinger, L. B., Weidener, S., Krämer, M., Zouh, L., Hynes, M. F., Priefer, U. B. (1997) Functional and regulatory analysis of the two copies of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF39. *Mol Plant Microbe Interact.* 1997 Jul;10(5):605-16.

Schulze, M. & Konderosi A. (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32: 33-37

Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilisation system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technologie*, 1: 784-791.

Smith, D. C. and Douglas A. E., *The Biology of Symbiosis* Edward Arnold, London (1987)

Thöny, B., D. Anthamatten and H. Hennecke (1989) Dual control of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic nitrogen fixation regulatory operon *fixR nifA*: analysis of cis- and trans-acting elements. *J Bacteriol.* 1989 Aug;171(8):4162-9.

Thöny, B., H. M. Fischer, D. Anthamatten, T. Bruderer and H. Hennecke (1987) The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucleic Acids Res.* 1987 Oct 26;15(20):8479-99

Trepp, G. B., Temple, S. J., Bucciarelli, B. Li, F.S. and Vance C. P., (1999) Expression map for genes involved in nitrogen and carbon metabolism in *alfalfa* root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 526-535

Tuckerman, J. C., Gonzalez G. and Gilles-Gonzalez, M.-A., (2001) Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Biol.* 2001 May 4;308(3):449-55.

Yannish-Perron, C., Vierira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33: 103-119.

Virts, E. L., S. W. Stanfield, D. R. Helinski and G. S. Ditta (1988) Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 May;85(9):3062-5.

Weinstein, M., Roberts R. C. and Helinski, D. R. (1992) A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in planta inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. J Bacteriol. 1992 Nov;174(22):7486-9.

Young, J. P. W. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. 43-86. In Stacey, G., Burris, R. H., and Evans, H. J., (ed.), Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, New York.

Zhang, X. X., Kosier, B. and Priefer, U. B. (2001) Symbiotic plasmid rearrangement in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM. J Bacteriol. 2001 Mar;183(6):2141-4.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufs.....	10
Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines medial longitudinalen Querschnittes durch ein nicht-derterminiertes Wurzelknöllchen.....	14
Abb. 2.3: Hypothetische Organisation und Regulation der <i>nif</i> und <i>fix</i> Gene in <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39.....	19
Abb. 2.4: Darstellung der Domänenorganisation von NifA in Rhizobien (A), sowie der Interaktion von NifA mit der DNA und der $\sigma$ 54-abhängigen RNA-Polymerase (B).....	23
Abb. 2.5: Vergleichende Darstellung der Regulation des <i>nifA</i> -Gens in den Bakterien <i>Sinorhizobium meliloti</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (B) und <i>Azorhizobium caulinodans</i> (C).....	25
Abb. 4.1: Darstellung des diesen Versuchsteiles zu Grunde liegenden Plasmides pUC18H <i>nifA</i> <sub>up</sub> , sowie der auf diesem Plasmid klonierten <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> R1 <i>nifA</i> Sequenzen.....	76
Abb. 4.2: Plasmidkarte des zur Konstruktion von Reporterfusionen genutzten Plasmides pJP2.....	78
Abb. 4.3: Konstruktion der Reporterfusionen zur Grobkartierung des <i>nifA</i> -Promotors.....	79
Abb. 4.4: Exemplarische Darstellung eines pJP- <i>nifA</i> Reportergenkonstruktes.....	80
Abb. 4.5: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der 18 <i>nifA</i> -Reportergenkonstrukte (Grobkartierung) unter mikroaeroben Bedingungen.....	82
Abb. 4.6: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der <i>nifA</i> -Reportergenkonstrukte (Grobkartierung) unter symbiontischen Bedingungen.....	84
Abb. 4.7: Darstellung der Arbeitsweise der Nuklease Bal31 und der daraus resultierenden möglichen Probleme bei der Konstruktion der Deletionsmutanten für die Feinkartierung.....	89
Abb. 4.8: Darstellung der nach ihrer Größe geordneten Deletionsfragmente.....	90
Abb. 4.9: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der Reportergenkonstrukte der <i>nifA</i> -Deletionsmutanten (Feinkartierung) unter mikroaeroben Bedingungen.....	92
Abb. 4.12: Darstellung des Plasmides pBlue <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III <i>nifA</i> .....	99
Abb. 4.13: Darstellung der genauen Positionen der stromabwärts gelegenen Endpunkte der Deletionen der aufgeführten pJP-Konstrukte.....	100
Abb. 4.14: Darstellung der Ergebnisse zur Aktivitätsbestimmung der <i>nifA</i> -Deletionsderivate (Feinkartierung) unter mikroaeroben Bedingungen.....	101
Abb. 4.15: Darstellung der Kernpromotorregion des <i>nifA</i> -Promotors.....	104
Abb. 4.16: Darstellung der in diesem Versuchsteil zur Charakterisierung der <i>nifA</i> -Kernpromotorregion verwendeten Reporterfusionen.....	106
Abb. 4.18: Darstellung der Konstrukte zur Charakterisierung der Kernpromotor- <i>nifA</i> -intergenischen Region.....	111
Abb. 4.19: Darstellung der relativen Aktivitäten (in %) der verwendeten VF39 pJP <i>npt</i> II- <i>nifA</i> -Derivate.....	113
Abb. 4.20: Darstellung der relativen Farbintensitäten der 49 in diesem Versuchsansatz ausgewählten Mutanten unter freilebenden Bedingungen auf selektiven X-Gluc-haltigen TY-Platten.....	116
Abb. 4.21: Darstellung der Messergebnisse zur Bestimmung der $\beta$ -Glukuronidaseaktivitäten der 49 in diesem Versuchsansatz ausgewählten Mutanten unter freilebenden, mikroaeroben Bedingungen (TY-Flüssigmedium).....	117

Abb. 4.22: Darstellung des PCR-Produktes, welches durch die Primer Rep XbaI und Rep HindIII aus dem Wildtypstamm <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 amplifiziert wurde.....	120
Abb. 4.23: (A) Darstellung des Plasmids pBlue TraReg.....	121
Abb. 4.24: Darstellung der Plasmide pBlue TraRegNeoI und pBlue TraRegNeoII.....	122
Abb. 4.25: Darstellung der mobilisierbaren Plasmide pAS TraRegNeoI I und pAS TraRegNeoII.....	122
Abb. 4.26: Darstellung des Southern-Blots zur Identifizierung der korrekten Interposon-Mutanten.....	123
Abb. 4.27: Zeitlicher Verlauf der <i>nifA</i> -Expression (Kernpromotor pJP PCR1) im Wildtyp (Quadrate) und in den Mutanten VF39 K1a1 (Kreise) und VF39 K6c1 (Dreiecke).....	125
Abb. 4.28: Zeitlicher Verlauf der Kernpromotor- <i>nifA</i> -Expression (pJP PCR1) im Wildtyp (Quadrate) und in den Mutanten VF39 K1a1 (Kreise) und VF39 K6c1 (Dreiecke).....	126
Abb. 4.29: Zeitlicher Verlauf der Kernpromotor- <i>nifA</i> -Expression (pJP PCR1) im Wildtyp (Quadrate) und in den Mutanten VF39 K1a1 (Kreise) und VF39 K6c1 (Dreiecke).....	128
Abb. 4.30: Darstellung der Ergebnisse zur Messung der <i>nifA</i> -Promotoraktivität (Kernpromotor, pJP PCR1) im Wildtyp und in den Interposonmutanten VF39 K1a1, VF39 K1b2, VF39 K6c1, VF39 K6c3 und VF39 K6c4 in der Symbiose mit der Versuchspflanze <i>Pisum sativum</i> .....	129
Abb. 4.31: Organisation der Gene <i>fixA</i> und <i>nifH</i> in <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39.....	130
Abb. 4.32: Darstellung der Promotoraktivitäten der Promotoren von <i>fnrN</i> , <i>fixK</i> , <i>fixA</i> , <i>nifH</i> und des <i>fixNOQP</i> -Operons.....	132
Abb. 4.33: Konstruktion der Mutanten pBlue TraReg Del Kpn2I und pSL2-25 TraRegDelKpn2I.....	134
Abb. 4.34: Konstruktion der Plasmide pAS 270NS und pAS TraRegDel.....	135
Abb. 4.35: Darstellung der Aktivitäten der <i>nifA</i> -Reporterfusionen pJP PCR1 (Kernpromotor, horizontal schattiert) und pJP <i>XbaI/Bg/II nifA</i> (vertikal schattiert).....	137
Abb. 4.36: Darstellung der Ergebnisse zu Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren <i>fixA</i> und <i>nifH</i> unter mikroaeroben (freilebend) Bedingungen sowie in der Symbiose mit der Versuchspflanze <i>Pisum sativum</i> .....	140
Abb. 4.37: Darstellung der $P_{fixA}$ und <i>nifA</i> K. –Promotoraktivitäten unter mikroaeroben Bedingungen.....	144
Abb. 4.38: Darstellung der Aktivitäten des vollständigen <i>nifA</i> -Promotors ( $P_{nifA}$ ) in der Symbiose mit der Versuchspflanze <i>Pisum sativum</i> .....	145
Abb. 4.39: Darstellung der Aktivitäten des $P_{fixA}$ in der Symbiose mit der Versuchspflanze <i>Pisum sativum</i> .....	147
Abb. 4.40: Darstellung der Aktivitäten der <i>nifA</i> -Reporterfusionen pJP PCR1 (Datenblock rechts) und pJP <i>XbaI/Bg/II nifA</i> (Datenblock links).....	149
Abb. 4.41: Schematische Darstellung der <i>nifA</i> -Regulation in <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39.....	155

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenzen

1 CGAGAGGGAG ATTGATCGTC GTCACGGCT**TC** **AG**AACTCCAG TCGGGGAACG TCGAGCCAGC  
 GCTCTCCCTC TAACTAGCAG CAGTGCC**AG** **TC**TTGAGGTC ACGCCCTTGC AGCTCGGTGC  
 ←-----

61 GACGCTCGGC CCAGGATTC AGGCCGAGTT CGGCAAGCTG CACGCCCTTG GCGCCGGCTT  
 CTGCGAGCCG GGTCTAAAG TCCGGCTCAA GCCGTTGAC GTGCGGGAAC CGCGGCCGAA  
 ←-----Oxidoreduktase-----

121 CCAGGCCATA GGGCCACGGT GCGTCTTCGA CGACATGGCG GATGAACATT TCCACTGCG  
 GGTCCGGTAT CCCGGTGCCA CGCAGAAGCT GCTGTACCGC CTACTTGTAAGGTTGACGC  
 ←-----Oxidoreduktase-----

181 CCTGAAACC GTTGTCGAAG GCCTGCGTGT CCGGAACCTC ATCCCAGGTC TTGTAGAAGT  
 GGAACCTTGG CAACAGCTTC CGGACGCACA GGCCTTGAG TAGGGTCCAG AACATCTTCA  
 ←-----Oxidoreduktase-----

241 CGATCGTCTG CGGCTGATCC GGGTTCCAGA CCGGCTTCGG CGTGTTGACG CGGTGCTGAC  
 GCTAGCAGAC GCCGACTAGG CCCAAGGTCT GGCCGAAGCC GCACAACCTGC GCCACGACTG  
 ←-----Oxidoreduktase-----

301 TCCAGCATTT CGTCAGACCG GCAACGGCCG AACCATGCGT GCCGTCGACC TGGAAGGTGA  
 AGGTGCTAAA GCAGTCTGGC CGTTGCCGGC TTGGTACGCA CGGCAGCTGG ACCTTCCACT  
 ←-----Oxidoreduktase-----

361 CGAGGTCGTC GCGGCGGACG CGGACGGCCC AGGAGGAATT GACCTGCGCG ATCGCGCCGC  
 GCTCCAGCAG CGCCGCCTGC GCCTGCCGGG TCCTCCTTAA CTGGACGCGC TAGCGCGGGC  
 ←-----Oxidoreduktase-----

421 CTTCGAGCTC GAAGGTCGCA TAGGCCGCAT CGTCCGTGTC GCAGTCATAG GGCTTGCCCT  
 GAAGCTCGAG CTTCCAGCGT ATCCGGCGTA GCAGGCACAG CGTCAGTATC CCGAACGGGA  
 ←-----Oxidoreduktase-----

481 GCTCGTCGAT GCGGCGCGGA ATATGCGTAG CACCGAGGCA GGATACGGCT TTGACTTCAC  
 CGAGCAGCTA CGCCGCGCCT TATACGCATC GTGGCTCCGT CCTATGCCGA AACTGAAGTG  
 ←-----Oxidoreduktase-----

541 CGAACAGATT GTCGAGCACG TAGCGCCAGT GGCAGAGCAT GTCGAGGATG ATGCCGCCGC  
GCTTGTCTAA CAGCTCGTGC ATCGCGGTCA CCGTCTCGTA CAGCTCCTAC TACGGCGGCG  
←-----Oxidoreduktase-----

601 CGTCGCCCTT ACGGTAGTTC CAGGAGGGGC GCTGGGCCGG TACGCCCAA TCGCCTTCGA  
GCAGCGGGAA TGCCATCAAG GTCCTCCCCG GCACCCGGCC ATGCGGGGT AGCGGAAGCT  
←-----Oxidoreduktase-----

661 AAACCCAGTA GCCGAATTCG CCGCGCACCG AGAGGATCTT GCCGAAGAAG CCGGAATCCC  
TTTGGGTCAT CGGCTTAAGC GGC CGTGGC TCTCCTAGAA CGGCTTCTTC GGCCTTAGGG  
←-----Oxidoreduktase-----  
5' -GCAGCGC **CAGCTT**GCGC AGGCC-3' (Rep HindIII)

721 TGAGCAGCGC **CAGCTT**GCGC AGGCCGGCA GGAAGAGTTT GTCCTGCACG ACGCCATGTT  
ACTCGTCGCG **GTCGAA**CGCG TCCGGCCCGT CCTTCTCAA CAGGACGTGC TCGCGTACAA  
←-----Oxidoreduktase-----

781 TGAGGCCGGA GCGGCGGCC TTGCGGGCAA GTCGAGGGC CACCTGCAGA TCGTCGGAGA  
ACTCCGGCCT CGCCGCGCG AACGCCCGTT CCAGCTCCCC GTGGACGTCT AGCAGCCTCT  
←-----Oxidoreduktase-----

841 TCGGCTTTTC GCAATAGACA TGCTTGCCGG CGTCGAGCGC CTTGGACAGA AGTTCGGCGC  
AGCCGAAAAG CGTTATCTGT ACGAACGGCC GCAGCTCGCG GAACCTGTCT TCAAGCCGCG  
←-----Oxidoreduktase-----

901 GCATCAGCGT CGTGCCGGCG TCGAAGAAGA TCGTGTCGTC GGGATTGGCG AGAGCGGCAT  
CGTAGTCGCA GCACGGCCGC AGCTTCTTCT AGCACAGCAG CCCTAACCGC TCTCGCCGTA  
←-----Oxidoreduktase-----

961 CAAGATCGGT CGACCAGCGC TTGATGTTAT GCTTCTTCGC CAGCTCTTCC ATCTTGGCGC  
GTTCTAGCCA GCTGGTCGCG AACTACAATA CGAAGAAGCG GTCGAGAAGG TAGAACC GCG  
←-----Oxidoreduktase-----

1021 CGTTGCGGCC GACGATGATC GGGTCGATCT CGAGTTTCTC ACCCGATTTT AGCGTGATGC  
GCAACGCCCG CTGCTACTAG CCCAGCTAGA GCTCAAAGAG TGGGCTAAAG TCGCACTACG  
←-----Oxidoreduktase-----

1081 CGCCCTGGTC GCGGAAGGCG AGAATCGAGC GCACCAGGTG CTGATTGTAA CCCATGCGGC  
GCGGGACCAG CGCCTTCCGC TCTTAGCTCG CGTGGTCCAC GACTAACATT GGGTACGCCG  
←-----Oxidoreduktase-----

1141 CGGTGACGCC GTGCAAGATG ATCCCCAAGC GTGCCATTTT TTCCTCCCAG CAGATTTTGT  
GCCACTGCGG CACGTTCTAC TAGGGGTTTCG CACGGTAAAA AAGGAGGGTC GTCTAAAAAC  
←-----Oxidoreduktase-----

1201 CGGCGGGAGC GGG**CAT**CCTC GTCCGGTCCT CCCGAGCCGG TAACTAAACA GTTACTTGAT  
GCCGCCCTCG CCC**GTA**GGAG CAGGCCAGGA GGGCTCGGCC ATTGATTTGT CAATGAACTA  
←-----

1261 GGCAGAAGAG CAACGCGGCT GTCAATAGTC AATTCGATT TTCGAAAT**TC** **AG**CGCTTGAT  
CCGTCTTCTC GTTGCGCCGA CAGTTATCAG TTAAGGCTAA AAGCTTT**AAG** **TC**CGGAACTA  
←-----

1321 CGAGGCGAGC GTGACGTGGA CGATATGCCT TTCCCAGGCA TTGAGATGGG TCGGCTCCAT  
GCTCCGCTCG CACTGCACCT GCTATACGGA AAGGGTCCGT AACTCTACCC AGCCGAGGTA  
←-----Transkriptionsregulator-----

1381 CAGGTCGCGG CCGAAGATCG TCGAAAGCGT GTATTGATTG GACAGGTAGA AATAACCGAG  
GTCCAGCGCC GGCTTCTAGC AGCTTTCGCA CATAACTAAC CTGTCCATCT TTATTGGCTC  
←-----Transkriptionsregulator-----

1441 CGAGGCGATC GTCAGGTAGA CATGCAGGGG ATCGGCAGTC TCGATGAAGA CCCCTGTTT  
GCTCCGCTAG CAGTCCATCT GTACGTCCCC TAGCCGTCAG AGCTACTTCT GGGGGACAAA  
←-----Transkriptionsregulator-----

1501 CTTTCCCTGC TCGAGCACGT CCGAAAGCTC GCCGATCAGA TCGGAGTGCA GTTCCTTGAG  
GAAAGGGACG AGCTCGTGCA GGCTTTCGAG CGGCTAGTCT ACGCTCACGT CAAGGAACTC  
←-----Transkriptionsregulator-----

1561 CCGGACGGAC TGGCGCAGCC AGCGGGCCCG ATGCAGATTT TCCGTGCCGA GCAGGCTGAG  
GGCCTGCCTG ACCGCGTCGG TCGCCCGGGC TACGTCTAAA AGGCACGGCT CGTCCGACTC  
←-----Transkriptionsregulator-----

1621 GAATTCGGGA TGCTGGAGAA AATAACGCCA GGTGAAGAGC GCCAGTTCGC TGATGCCTTC  
CTAAGGCCT ACGACCTCTT TTATTGCGGT CCACTTCTCG CGGTCAAGCG ACTACGGAAG  
←-----Transkriptionsregulator-----

1681 CTCGGGGCTG CGGTCGCCGA TATGCAGCGC GCGCTCGGCG GTGCGGATGC CGACATAGGC  
GAGCCCCGAC GCCAGCGGCT ATACGTCGCG CGCGAGCCGC CACGCCTACG GCTGTATCCG  
←-----Transkriptionsregulator-----

1741 CTCTTCGAGC ACTCTGAGGT AGAGCTGCTC CTTGTCGCCG AAATAATGAT AGAGCATGCG  
GAGAAGCTCG TGAGACTCCA TCTCGACGAG GAACAGCGGC TTTATTACTA TCTCGTACGC  
←-----Transkriptionsregulator-----

1801 CTTGTTGGTG CCGGCGCGCT CGGCGATGGC GTCGACACGA GCCCCGCCCA TGCCGTTTTTC  
 GAACAACCAC GGCCGCGCGA GCCGCTACCG CAGCTGTGCT CGGGGCGGGT ACGGCAAAAAG  
 ←-----Transkriptionsregulator-----

1861 GGCAAATTCC CGGGTTGCCG CGTCAAGGAT AGCAGCGCGT GTCCGCTCCG GATCGCGTTG  
 CCGTTTTAAGG GCCCAACGGC GCAGTTCCTA TCGTCGCGCA CAGGCGAGGC CTAGCGCAAC  
 ←-----Transkriptionsregulator-----

1921 GGCCGTCCGT TCGGCAGATG GGCGCCGAGA CCTTTTCTTT TCCCCATTCC CCCCCTGTTC  
 CCGGCAGGCA AGCCGTCTAC CCGCGGCTCT GGAAAAGAAA AGGGGTAAGG GGGGCGACAG  
 ←-----Transkriptionsregulator-----

1981 GTT**CAT**CTCT CCACCTCCGT CTCACATGTT GCGCTCATAA GCCTTCGGTG CGAAATTGTA  
 CAA**GTA**GAGA GGTGGAGGCA GAGTGTACAA CGCGAGTATT CGGAAGCCAC GCTTTAACAT  
 ←-----

2041 AAAACCGAAT TTGAAAGCCC CGCGAGCGAC ACCGCTTGAC ACGCTCGCCG CTTTGCCCGT  
 TTTTGGCTTA AACTTTCGGG GCGCTCGCTG TGGCGAACTG TGCGAGCGGC GAAACGGGCA

2101 AGCTTGTAAC CAATTAGTTA TTTATGCAAG GGTAACCAGG TTCGGAAGCG TGTGGAGGCG  
 TCGAACATTG GTTAATCAAT AAATACGTTC CCATTGGTCC AAGCCTTCGC ACACCTCCGC

2161 CTTCCCTTTG GAGGAGGAAA AGAA**ATG**ACA TTCCGTGTAA GCAGACGTAA TTTCGTGCGG  
 GAAGGGAAAC CTCCTCCTTT TCTT**TACT**GT AAGGCACATT CGTCTGCATT AAAGCAGCGC  
 -----

2221 GGAGGCGCCA CGCTTCTCTC GCTCTCGGCG CTGGGAACCA GCGCTTTGGC ACAGGAAACG  
 CCTCCGCGGT GCGAAGAGAG CGAGAGCCGC GACCCTTGGT CGCGAAACCG TGTCCCTTTC  
 -----ABC Transporter-----→

2281 CGACTGCGTC TCCTGTGGTG GGGCTCGCAG CCGCGCGCCG ACCGCACCAA CAAGGTATCG  
 GCTGACGCAG AGGACACCAC CCCGAGCGTC GCGCGCGGC TGGCGTGGTT GTTCCATAGC  
 -----ABC Transporter-----→

2341 CAGCTCTATC AGTCGAAGAA GCCGGGCACG TCGATCACCG GCGAATTCCT CGGCTGGGGC  
 GTCGAGATAG TCAGCTTCTT CGGCCCGTGC AGCTAGTGGC CGCTTAAGGA GCCGACCCCG  
 -----ABC Transporter-----→

2401 GACTACTGGC CGCGCCTCGC GACCCAGGTC GCCGGCCGCA ACGCGCCCGA TGTCATCCAG  
 CTGATGACCG GCGCGGAGCG CTGGGTCCAG CGGCCGGCGT TGCGCGGGCT ACAGTAGGTC  
 -----ABC Transporter-----→

2461 ATGGA CTATC GCTATATCGT CCAATATGCG CGGCGCGGCG CGCTCGCCCC GCTCGAATCC  
TACCTGATAG CGATATAGCA GGTATATACGC GCCGCGCCGC GCGAGCGGGG CGAGCTTAGG  
-----ABC Transporter----->

2521 TATATGCCGG CCAAGCTCAA CCTCGACGAT TTCGACAAGG CGCAGATCGA AGGCGGCAGC  
ATATACGGCC GGTTCGAGTT GGAGCTGCTA AAGCTGTTC GCGTCTAGCT TCCGCCGTCTG  
-----ABC Transporter----->  
3' -CGCCGATG **CCAGACTTG**

2581 GTCGACGGTC ATCTCTATGG CGTCAGCCTG GCGCGAATT CGGCGGCTAC **GGTCTTGAAC**  
CAGCTGCCAG TAGAGATACC GCAGTCGGAC CCGCGCTTAA **GCCGCCGATG CCAGACTTG**  
-----ABC Transporter----->  
**TGGTGC**-5' (Rep XbaI)

2641 **ACCACGGCCT** TCAAGGAGGC CGGCGTCGAT CTGCCGACCC AGGCGACCAC CTGGGAAGAA  
**TGGTGC**CGGA AGTTCCCTCCG GCCGAGCTA GACGGCTGGG TCCGCTGGTG GACCCCTCTT  
-----ABC Transporter----->

2701 TTCGGCCGCA TCGGTGCGGA GATCACCAAG GCGGGCAAAC GCAAGGGCAT GTTCGGCATC  
AAGCCGGCGT AGCCACGCCT CTAGTGGTTC CGCCCGTTTG CGTTCCCGTA CAAGCCGTAG  
-----ABC Transporter----->

2761 GCCGACGGCA GCGGCGGCGA ACCGCTGTTC GAAACTGGC TCGTTCAGCG CGGCAAGGCG  
CGGCTGCCGT CGCCGCCGCT TGGCGACAAG CTTTGTGACCG ACGCAGTCGC GCCGTTCGCG  
-----ABC Transporter----->

2821 CTTTATACCG CTGACGGCAA GATCGCCTTC GACGTGGACG ATGCCTCCGA ATGGTACGAC  
GAAATATGGC GACTGCCGTT CTAGCGGAAG CTGCACCTGC TACGGAGGCT TACCATGCTG  
-----ABC Transporter----->

2881 ATGTGGGCCA AGTTCCGTGA GGCCGGTGCC TGTGTTCCCTG CCGATATCCA GGCTCTCGAC  
TACACCCGGT TCAAGGCACT CCGGCCACGG ACACAAGGAC GGCTATAGGT CCGAGAGCTG  
-----ABC Transporter----->

2941 AAGAACGATA TCGAAACCAA CACGGTCTCG CTCGGCAAGT CGGCCGCCGG TTTTGCCCAT  
TTCTTGCTAT AGCTTTGGTT GTGCCAGAGC GAGCCGTTCA GCCGGCGGCC AAAACGGGTA  
-----ABC Transporter----->

3001 TCCAACCAGT TCGTCGCCTA TCAGGCAATG AACAAGGACA AGCTGGCGCT GACCAACTAC  
AGGTTGGTCA AGCAGCGGAT AGTCCGTTAC TTGTTCCCTGT TCGACCGCGA CTGGTTGATG  
-----ABC Transporter----->

```

3061  ATGCGCATCA AGCCGGAATC GAAGGGCGGC CACTATCGCA AGCCTTCGAT GTTCTTCTCG
      TACGCGTAGT TCGGCCTTAG CTTCCCGCCG GTGATAGCGT TCGGAAGCTA CAAGAAGAGC
      -----ABC Transporter----->

3121  GTGTCCGCCC AGTCGAAAGC CGTGGACCTG GCCGTGGACT ACGTCAATTT CTTCGTCAAG
      CACAGGCGGG TCAGCTTTCG GCACCTGGAC CGGCACCTGA TGCAGTAAA GAAGCAGTTC
      -----ABC Transporter----->

3181  AATCCCGAGG CAGCGCTGCT TCTGGATGTC GAACGCGGCA TTCCGGAATC GAGCGCCATG
      TTAGGGCTCC GTCGCGACGA AGACCTACAG CTTGCGCCGT AAGGCCTTAG CTCGCGGTAC
      -----ABC Transporter----->

3241  CGCGAGGTCG TCGCGCGGAA GCTTGATGAG AACGGCAAGG TTGCGCTGGC CTATGTCAGC
      GCGCTCCAGC AGCGCCGCTT CGAACTACTC TTGCCGTTCC AACGCGACCG GATACAGTCG
      -----ABC Transporter----->

3301  GGCCTCGGCG ATCTCGCCGG CAAATTGCCG CCCCCGCCGC CGGCCGGCGC CGGTGAAGGT
      CCGGAGCCGC TAGAGCGGCC GTTTAACGGC GGGGGCGGCG GCCGGCCGCG GCCACTTCCA
      -----ABC Transporter----->

3361  GAGCTGATGT TACGCAACAT CGCCGAACAG GTCGGCTTCG GACAGCTGTC TCCCTCCGAC
      CTCGACTACA ATGCGTTGTA GCGGCTTGTC CAGCCGAAGC CTGTCGACAG AGGGAGGCTG
      -----ABC Transporter----->

3421  GGCGGCAAAC AGCTTGTCGC TGAAATCACG CAGATTCTCG CACGAGGCTG ATCCCGTATG
      CCGCCGTTTG TCGAACAGCG ACTTTAGTGC GTCTAAGAGC GTGCTCCGAC TAGGGCATAC
      -----ABC Transporter----->

3481  AGCAATGCGA TGCGCACGCC
      TCGTTACGCT ACGCGTGCGG

```

Darstellung der Sequenzen der Region des Transkriptionsregulators, welcher durch die Tn5-Mutagenese identifiziert wurde. Die Lage des Transkriptionsregulators sowie der flankierenden Gene, Oxidoreduktase und ABC Transporter sind angegeben. Ebenso sind die Primerbindungsstellen der Primer Rep XbaI und Rep HindIII sowie im weiteren Verlauf des Experimentes wichtige Restriktionsschnittstellen gekennzeichnet. Die Primer sind in einem blauen Farbton und die Bindungsstellen in einem roten Farbton gehalten. Darin ausgetauschte Nukleotide zur Generierung neuer Schnittstellen sind rot unterlegt und ebenso wie die neu generierten Schnittstellen fett gedruckt und unterstrichen.

Die Sequenz stammt zum größten Teil aus der Datenbank des vollständig sequenzierten *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Stammes 3841.

**GGACGTTGTC TAGAGGAAAA GAAGAGATAA GC Primer nifA complete XbaI**  
 1 **GGACGTTGTC TAGAGGAAAA GAAGAGATAA GC**TCTTTGGA TATGTCGTAG AGTATATGGA  
 CCTGCAACAG ATCTCCTTTT CTTCTCTATT CGAGAAACCT ATACAGCATC TCATATACCT  
  
 61 GCCGCGCCTC TGGTTTAATC ATGCCTACAA ACAGGGGAGG GTGCACTGCT TTTTACCCTG  
 CGGCGCGGAG ACCAAAT**TAG TA**CGGATGTT TGTCCCTCC CACGTGACGA AAAATGGGAC  
 ←-----nifA  
  
 121 CTGCACGAAA TATGCTAACG CATATTCCTA AGTTAAAAAT AGGTGTTATC GACGGCGCAA  
 GACGTGCTTT ATACGATTGC GTATAAGGAT TCAATTTTA TCCACAATAG CTGCCCGGTT  
  
 181 AAATTAGCCT TTCGAAAGGT TGAGTGGATG CACATTCAAT CGCCGCCGCT AATGCAGCTG  
 TTTAATCGGA AAGCTTTCCA ACTCACCTAC GTGTAAGTTA GCGGCGCGA TTACGTGCGAC  
  
 241 GATCGGTCGC TGCTATCCCG CCGGAGGTAG GGACTCCTCA TCCGAATTTG AAGAGGACCC  
 CTAGCCAGCG ACGATAGGGC GGCCTCCATC **CTGAGGAGT** AGGCTTAAAC TTCTCCTGGG  
 P1 *fixX*-----→  
  
 301 CGAACCCGCC CCGGGGATAA TTCCACTTTA TGTCGCCACT AGCTTCGCAC AACACTCTGC  
 GCTTGGGCGG GGCCCTATT AAGGTGAAAT ACAGCGGTGA TCGAAGCGTG TTGTGAGACG  
  
 361 ATGTGCCGCA TTCCAAGCAG CCATCGGGAA CAATCGCCAC CTGACCAATT TCGTTCAGCT  
 TACACGGCGT AAGGTTTCGTC GGTAGCCCTT GTTAGCGGTG GACTGGTTAA AGCAAAGTCGA  
  
 421 CGTAGCATTT GGCCGGACAG ATTTGCGTCA AGGCGAGCAG GTTCGGGCTT GGCGACCGGT  
 GCATCGTAAA CCGGCCTGTC TAAACGCAGT TCCGCTCGTC CAAGCCCGAA CCGCTGGCCA  
  
 481 GCGGTGCGAC TGTTATATGC GGACGTCCAG TGTCGACGAG ATATCGGTTT TGGTACAGCT  
 CGCCAGCGTG ACAATATACG CCTGCAGGTC ACAGCTGCTC TATAGCCAAA ACCATGTGCGA  
  
 541 TGTCCTCAAT GCGCTCAATG ATGGTCGCCT TCATCGAATT TTCCTTTAAC GCCAAGATAC  
 ACAGGAGTTA CGCGAGTTAC TACCAGCGGA AGTAGCTTAA AAGGAAATTG CGGTTCTATG  
  
 601 GGCGGAGCGG ACCGCGTCGC TAATCAACCC CCAACGGGAT CGTGCCTTGA TAAAGGAGGC  
 CCGCCTCGCC TGCGCAGCG ATTAGTTGGG GGTGCGCCTA GCACGGAACCT ATTTCTCCG  
  
 661 GGCTGTGGCC TTCTCCCTGT TGATTTTAGG TTCACCGTCG ACGCGCACAA AATTTTGCGC  
 CCGACACCGG AAGAGGGACA ACTAAAATCC AAGTGGCAGC TGCGCGTGTT TTAAAACCGC  
  
 721 TGCCTGAGAT ATAAGCGTTG GATACGTCAT GAAAAAGTTG TGA CTGTCAG TGTGGAGGAG  
 ACGGACTCTA TATTCGCAAC CTATGCAGTA CTTTTTCAAC ACTGACAGTC ACACCTCCTC

781 GCTTGAAGA TCTTTGTGTT TTATCAGATC TTTCATGACG AACGACTTAT CCAGCATGCC  
CGAACCTTCT AGAAACACAA AATAGTCTAG AAAGTACTGC TTGCTGAATA GGTCGTACGG

841 CTTATATAGA GAGAGATTGC GCTTCGTCAT CAAGCCGCCA CGGCTCTTTA TCTGACAGAT  
GAATATATCT CTCTCTAACG CGAAGCAGTA GTTCGGCGGT GCCGAGAAAT AGACTGTCTA

901 CGCTTCGCCG GCCATGAGGC CTGATGTCAT CGCGAGGTTT GATCCCTCCC TATGCACGGC  
GCGAAGCGGC CGGTACTCCG GACTACAGTA GCGCTCCAAA CTAGGGAGGG ATACGTGCCG

961 ATTGTTTAGT TGCGCCGCAT CGCCCACGAC CACCCACCCG TCGCCAAAGA GTTGCGGGAT  
TAACAAATCA ACGCGGCGTA GCGGGTGCTG GTGGGTGGGC AGCGGTTTCT CAACGCCCTA

1021 TGCCTTGAAG CCCCTTCGG GAATAAGATG CGCGGCGTAT TCTTTTATCT CTGATCCGGC  
ACGGAACTTC GGGGAAGCC CTTATTCTAC GCGCCGATA AGAAAATAGA GACTAGGCCG

1081 CAGTAATGGT CGGATCGAGG GATGTCGCTT GAAGGCGTCA AGAAGGCGGT ACGGATTTTC  
GTCATTACCA GCCTAGCTCC CTACAGCGAA CTCCGCAGT TCTCCGCCA TGCTAAAAG

1141 CATGCCTCCC GCTAAACCGG AGACGAGGCA GCCGATCCCC ACCGAGATCG ACTCCTTGTT  
GTACGGAGGG CGATTTGCC TCTGCTCCGT CGGCTAGGGG TGGCTCTAGC TGAGGAACAA

1201 GGTATAAAGG AAGCCCAGTC CGGCCATTCC GCGTGAGATC GTGCCGCCGG CTTGATCAC  
CCATATTTCC TTCGGGTCAG GCCGGTAAGG CGCACTCTAG CACGGCGGCC GAAGCTAGTG

1261 ACAGCCTTCG CTACCGTTGA GGCCGAAGCG CTCTGCGATG ACCTCTCCG GCATGAAATG  
TGTCGGAAGC GATGGCAACT CCGGCTTCGC GAGACGCTAC TGGAGAAGGC CGTACTTTAC

1321 CATTTCTTGG ACAGCGAGGG CCACATTTTC TGGCCTCGGT ATATCGCGTA AGCCGGCTCG  
GTAAAGGAAC TGTCGCTCCC GGTGTAAAAG ACCGGAGCCA TATAGCGCAT TCGGCCGAGC

1381 AGTTCCAAGC AGTCCGTTTA CGCCCTCAGC GAGGACGACC ACGTCCGCGA GGATCACACC  
TCAAGGTTTCG TCAGGCAAAT GCGGGAGTCG CTCCTGCTGG TGCAGGCGCT CCTAGTGTGG

1441 GCCCTCCCGG TCCGTGTGAA CGCCTACTAC TTTACCTCTC AGGTTCCGAG CGAGCCTAGT  
CGGGAGGGCC AGGCACACTT GCGGATGATG AAATGGAGAG TCCAAGGCTC GCTCGGATCA

1501 CGCTGTCGTT TCACAAAGGA TTGTGCCGCC GGCATCGCGC ACCTTGATG AGAACCACTT  
GCGACAGCAA AGTGTTTCCT AACACGGCGG CCGTAGCGCG TGGAACCTAC TCTTGGTGAA

1561 GTCAAACCTGG GCGCGGATGA TCGTATACCG GTTGGCTTTC AGTTCGTTAA AGTCATCAGA  
CAGTTTGACC CGCGCCTACT AGCATATGGC CAAACCGAAG TCAAGCAATT TCAGTAGTCT

1621 GCGATAGTGC ACGCCCGTGT GCGACGAGTC ATCCATTAGC CAGAATCGTT GCTCTACCAG  
CGCTATCACG TGCGGGCACA CGCTGCTCAG TAGGTAATCG GTCTTAGCAA CGAGATGGTC

1681 ATGCCGTTCA AGAGGAGCGT CATCGCGGAA GTTTGGGATA ATCGCCTCCA ACATGTTGGC  
TACGGCAAGT TCTCCTCGCA GTAGCGCCTT CAAACCCTAT TAGCGGAGGT TGTACAACCG

1741 GTACAATATA GCCCCTTGAA CATTTTTAGA GCCTGAATGT TCTCCGCGCT CCAGCTGCAG  
CATGTTATAT CGGGGAACCT GTAAAAATCT CGGACTTACA AGAGGCGCGA GGTCGACGTC

1801 CACTTTTAGA CCGCGACTAG CCATCGAATA CGCTGCGGCG TTGCCGGACA TACCGGCGCC  
GTGAAAATCT GCGCCTGATC GGTAGCTTAT GCGACGCCGC AACGGCCTGT ATGGCCGCGG

1861 AATGACTATC GCGTCGAACT TACCCTTGGT CATCTAGCCT TCCTCGGTCC ATAACCTTGA  
TTACTGATAG CGCAGCTTGA ATGGGAACCA GTAGATCGGA AGGAGCCAGG TATTGGAAC

1921 TAGAGTTGTG CGGTGGCATT CGCTTGGCGA AAGCTTCTGT CAACGCCGGC AAGAACTCCA  
ATCTCAACAC GCCACCGTAA GCGAACCCTT TTCGAAGACA GTTGC GGCCG TTTCTGAGGT

1981 GCGCGCATGC GACAACGCCG ATGTGGGCGA AGTCAAAGAT CGGAGCGTTC TCGTCAAGGT  
CGCGCGTACG CTGTTGCGGC TACACCCGCT TCAGTTTCTA GCCTCGCAAG AGCAGTTCCA

2041 TGATAGCCAC AATCAGATCG GCTCCTTCGA CGCCAACGCG ATGTTGGACC GCGCCAGATA  
ACTATCGGTG TTAGTCTAGC CGAGGAAGCT GCGGTTGCGC TACAACCTGG CGCGGTCTAT

2101 TTCCCGCCGC GATGTAGAGC TTGGGTCTAA TGGTATGGCC GGA CTGACCA ATTTGTCGAT  
AAGGGCGGCG CTACATCTCG AACCCAGATT ACCATACCGG CCTGACTGGT TAAACAGCTA

2161 CAGCAGGCAT CCAGCCTTTT TGGACCAGTG GCGCGAGCA CCCGACTCCC CCGCCGATCG  
GTCGTCCGTA GGTTCGAAAA ACCTGGTCAC CCGCGCTCGT GGGCTGAGGG GCGGCTAGC

2221 TCGTTGCCAG GTTTCTCAAG TATTGAAGGT TTCCTGCAGC GCCGAGGCCG AGTCCGCCCC  
AGCAACGGTC CAAAGAGTTC ATA ACTTCCA AAGGACGTCG CGGCTCCGGC TCAGGCGGGG

2281 CAACCACGAT GTCGGAGTTG GCCAGATCGG ATTGCTCAGA CCCGCTGTTA CAAAGGAACG  
GTTGGTGCTA CAGCCTCAAC CGGTCTAGCC TAACGAGTCT GGGCGACAAT GTTTCCTTGC

2341 CGAGCACTTT GGTGACGATC TCCTCCTCAA CCATCAGGAG TTGATGTTGG ATAACCGGTC  
GCTCGTGAAA CCACTGCTAG AGGAGGAGTT GGTAGTCCTC AACTACAACC TATTGCGCAG

2401 CAATTGGCTT ATCCGAGCGT TGTGGCGTCG CCATGACCCT GGACCGCACC GTTGCCATTT  
GTTAACCGAA TAGGCTCGCA ACACCGCAGC GGTACTGGGA CCTGGCGTGG CAACGGTAAA

2461 GCGGCCGGCT GTTCAGCGTG TAGATCGTGC ACAACAAGGA CCCGCCGAAA GTTGGCCGCG  
CGCCGGCCGA CAAGTCGCAC ATCTAGCACG TGTGTTCCTT GGGCGGCTTT CAACCGGCGC

2521 TCGCTGCGAG TGAACCATCT CCATCAACAT CCAGCTCGGT GCAATCAGCC GTGAGCCCTG  
AGCGACGCTC ACTTGGTAGA GGTAGTTGTA GGTCGAGCCA CGTTAGTCGG CACTCGGGAC

2581 TTTGTAAGGT CGTTGCAACA GCACCGGCGA GGTGCGGCC GAGCGTAGTC GCGCCGAGAA  
AAACATTCCA GCAACGTTGT CGTGGCCGCT CCAGCGCCGG CTCGCATCAG CGCGGCTCTT

2641 GGAGAATTTT TGGTTTGTGA GTAGTGACCA GATCCGTCAA AGCCTTGGTG AAGGGTTCGT  
CCTCTTAAAG ACCAAACACT CATCACTGGT CTAGGCAGTT TCGGAACCAC TTCCCAAGCA

2701 TTCGATAGTT GCGGAGGAGG GCGACTCTA CCAGATAGGC GACATCAGCT CCGTAAGCGA  
AAGCTATCAA CCGCTCCTCC CCGCTGAGAT GGTCTATCCG CTGTAGTCGA GGCATTGCT

2761 AGGCCTCTTC GATCGCCGGC TTGGTGCCCA CGCCTTCAGA CGAACCGAGG ATTACCCCGG  
TCCGGAGAAG CTAGCGGCCG AACCACGGGT GCGGAAGTCT GCTTGGCTCC TAATGGGGCC

2821 CCAGTTGGAC ACCCAGTTTG TCAGCTAGTC TCGGCCTTC GCCGAGGAGT TCAATCGATA  
GGTCAACCTG TGGGTCAAAC AGTCGATCAG ACGCCGGAAG CGGCTCCTCA AGTTAGCTAT

2881 CGGGATGAAC ATTGCCGCC TCAAGTTCCA TGAAGACCCA GACGTGCCGG TGATCTTCGA  
GCCCTACTTG TAACGGCGGG AGTTCAAGGT ACTTCTGGGT CTGCACGGCC ACTAGAAGCT

2941 AACACTTAAG CAGCTTTTTC CCTGAGCTGG CGCGGCCGAC CGCGTTTGAC GCGTTCAT  
TTGTGAATTC GTCGAAAAG GGACTIONGACC GCGCCGGCTG GCGCAAACCTG CCGCAAAGTA

3001 TTTTTCTAGC GACCAAAATC TACTCCTCGC TGCTCACCGA TTGCCATGGG ACGTGAGCTT  
AAAAAGATCG CTGGTTTTAG ATGAGGAGCG ACGAGTGGCT AACGGTACCC TGCACTCGAA

3061 GCGTTCCAAA ACGGGCTGGC GGGCAAAAAT TGCAACGACC GTGTCCGCGG CGACCTCGGC  
CGCAAGGTTT TGCCCGACCG CCCGTTTTTA ACGTTGCTGG CACAGGCGCC GCTGGAGCCG

3121 CAACGTTTTG TCGTTAATGT CCACTTGCAT AGCTTTTTTCG GCGCGCGGAC CAGGAGCGAA  
GTTGCAAAAC AGCAATTACA GGTGAACGTA TCGAAAAGC GCGCGCCTG GTCCTCGCTT

3181 TACTCGCTTC ACGACCGTCG GCGATCCTCG TAGGCCGCAT TTGGTCAACT CCCCAATGCC  
ATGAGCGAAG TGCTGGCAGC CGCTAGGAGC ATCCGGCGTA AACCAGTTGA GGGGTTACGG

3241 GCGTCAGCG GCCCCCCATT TAAGACCCTG GCTTCGCGCT GCACGGAAG CATCATCGAG  
CCGCAGTCGC CGGGGGTAA ATTCTGGGAC CGAAGCGCGA CGTGCCTTTC GTAGTAGCTC

3301 AGAGCCCCCG CGGATAGCAT TGACACCTTC CAGCACGGTG ATGAGACATG GCAACGTGCT  
TCTCGGGGCC GCCTATCGTA ACTGTGGAAG GTCGTGCCAC TACTCTGTAC CGTTGCACGA

3361 CTTACAGCATC TGCGTGCCGC TCTCCGCGTG CCGTTCAACC ATGAGCTCGC GCGAAGTGGG  
GAAGTCGTAG ACGCACGGCG AGAGGCGCAC GGCAAGTTGG TACTCGAGCG CGCTTACCC

3421 ATCAATGGAG ACAATCTTCG TTACGTAAGT CAGTTGCTGG AGGTTAGCC TCTTTGCAAT  
TAGTTACCTC TGTTAGAAGC AATGCATTCA GTCAACGACC TCCAAGTCGG AGAAACGTTA

3481 TCCGGGTCCG ACCTGGGCCG TGTCGCCGTC AATTGTCTGC TTTCCCGTAA AGACGATATC  
 AGGCCCAGGC TGGACCCGGC ACAGCGGCAG TTAACAGACG AAAGGGCATT TCTGCTATAG

3541 AGGCCCCCA TAGCTCTCGC CAATCTTCGC TACTGCTTGA GAAAGAGCAT ACGAGGTCGC  
 TCCGGGGGGT ATCGAGAGCG GTTAGAAGCG ATGACGAACT CTTTCTCGTA TGCTCCAGCG

3601 CAGCGTGTCA GATCCGGCAA AGTGGCGGTC GGTCAGAAGC ACTGCGCGAT CTGCGCCGTG  
 GTCGCACAGT CTAGGCCGTT TCACCGCCAG CCAGTCTTCG TGACGCGCTA GACGCGGCAC

3661 GGTAAGGGCT TTGCGTAGCG CTTGCTCAGC CATGGGCGGT CCCATCGTTA GAACGGTCAC  
 CCATTCCCGA AACGCATCGC GAACGAGTCG GTACCCGCCA GGGTAGCAAT CTTGCCAGTG

3721 CTCGCCCCCA TAGCGGTCAC GAACCTGAAG TGCCTCTTCG AGAGCAAACA GGTCGTATGG  
 GAGCGGGGGT ATCGCCAGTG CTTGGACTTC ACGGAGAAGC TCTCGTTTGT CCAGCATACC

3781 GTTAATGATG GTCGGTACGC CTTGGCGCAT GATCGTATTT GTCACCGGGT GGACGCGTAT  
 CAATTACTAC CAGCCATGCG GAACCGCGTA CTAGCATAAA CAGTGGCCCA CCTGCGCATA

3841 CTGCGCTGAG TCCGGCACTT GTTTGATACA GACCACGATG TGCATCGTCG TTTAAGCTCC  
 GACGCGACTC AGGCCGTGAA CAAACTATGT CTGGTGCTAC **ACGTA**GCAGC AAATTCGAGG

←-----*fixA*

3901 CAATCGGATT CGGGCTTTAG GGACCCGGCT AACTCTGAGC ACTGCTCGTG CCAATCAGGT  
 GTTAGCCTAA GCCCGAAATC CCTGGGCCGA TTGAGACT**CG TGACGAGCAC GGT**TAGTCCA

RpoN-Bindestelle

3961 TGCGCCGGTA AGCCTTCGAG ATTGCACATG TTTCGTTGTC GCTATGCGAA GGGGTTTTGT  
 ACGCGGCCAT TCGGAAGCTC TAACGTGTAC AAAGCAACAG CGATACGCTT CCCCCAA**ACA**

4021 AGGGTTGCCG ACATGTCGTG TCGCAATCCG CCCCATCAC CACCGCGAGT GGAGGGGCGG  
**TCCCAACGGC TGT**ACAGCAC AGCGTTAGGC GGGGCTAGTG GTGGCGCTCA CCTCCCCGCC

NifA-Box

4081 TTCGATAGCC TTCAGGTCGG ACAAGTCCAT GATAGCTGCG CCACGAGTTG GAAGATTTCA  
 AAGCTATCGG AAGTCCAGCC TGTTCAGGTA CTATCGACGC GGTGCTCAAC CTTCTAAAGT

4141 ACGCCGAATA ATCCCCGGG AGATAGCACG GGGACTGAAG CTCTGGTGCG GTGGGCGTGT  
 TGCGGCTTAT TAGGGGGCCC TCTATCGTGC CCCTGACTTC GAGACCACGC CACCCGCACA

4201 ATCGCGCTTC GGTTTGCCGT TGATAATCTG ACTAGCGACA CCGTATGCGC GATCAGAAGC  
 TAGCGCGAAG CCAAACGGCA ACTATTAGAC TGATCGCTGT GGCATACGCG CTAGTCTTCG

4261 ACAGCGATCG AGAAAATAAC GCTGCGGGCG CCTAGTGAGG CTTGGACAAG CGGTTTAGCT  
 TGTCGCTAGC TCTTTTATTG CGACGCCCGC GGATCACTCC GAACCTGTTC GCCAAATCGA

```
4321 GATGTTGCGG GCGTGAACAG GATGATTGCC AGAAG
      CTACAACGCC CGCACTTGTC CTACTAACGG TCTTC
              C CGCACTTGTC CTAGGAACGG TCTTC Primer nifA complete BamHI
```

Darstellung der Sequenzen der Region des vollständigen *nifA* Promotors  $P_{nifA}$ . Angegeben sind die Startpunkte Promotoren P1 und  $P_{fixA}$ . Ebenso sind die Primerbindungsstellen der Primer *nifA* complete *Xba*I und *nifA* complete *Bam*HI sowie im weiteren Verlauf des Experimentes wichtige Restriktionsschnittstellen gekennzeichnet. Die Primer sind in einem blauen Farbton gehalten. Darin ausgetauschte Nukleotide zur Generierung neuer Schnittstellen sind rot unterlegt und ebenso wie die neu generierten Schnittstellen fett gedruckt, jedoch zusätzlich unterstrichen. Die NifA-Box und die RpoN-Bindestelle sind fett gedruckt und unterstrichen essentielle Elemente darin grün hervorgehoben. Die Sequenz stammt zum größten Teil aus der Datenbank des vollständig sequenzierten *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Stammes 3841. Sequenzierte Bereiche wurden ersetzt.

## 7.2 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest	deionisiertes und destilliertes Wasser
A. dest	destilliertes Wasser
Ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bv.	biovar, Biovarietät
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	day, Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> , und andere
g	Gramm
G	Guanin
Gm	Gentamycin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
ha	Hektar
Kb	Kilobase(n)
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Broth
log	logarithmisch
Lsg.	Lösung

M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site, Multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Salz
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
Nm	Neomycin
o.D.	optische Dichte
PA	Penassay
PNPG	4-Nitrophenyl-β-D-glucuronid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der [H <sup>+</sup> ]
r	resistent
RT	Raumtemperatur
s	sensitiv
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SRL-Lösung	Sucrose-RNase-Lysozym-Lösung
sec.	Sekunden
Sm	Streptomycin
s.o.	siehe oben
ss-DNA	Einzelsträngige DNA
T	Thymin
TA	Tris-Acetat-Puffer
Tab.	Tabelle
TB	Tris-Borat-Puffer
Tc	Tetracyclin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Ammonium
U	Enzymeinheit (Unit)
ü.N.	über Nacht
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronid
%(v/v)	Volumenprozente
%(w/v)	Gewichtsprozente

## 7.3 Danksagung

An dieser Stelle will ich zum Abschluss meiner Arbeit versuchen, meinen Dank gegenüber den direkt und indirekt an dieser Arbeit beteiligten Personen gebührend zu äußern.

An erster Stelle ist da natürlich meine liebe und geduldige Doktormamma Prof. Dr. Ursula B. Priefer zu nennen. Dir gilt natürlich mein ganz besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas und für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Du hast es immer wieder geschafft mir neue Wege aufzuzeigen und mich mit Verständnis durch diese Arbeit gelenkt. Dabei hast Du mit deiner netten und humorvollen Art ein ganz besonders angenehmes Arbeitsklima in Deinem Institut geschaffen. Für die angenehme Zeit und die gewonnenen Erfahrungen möchte ich Dir ganz herzlich danken.

Eine gute Leitung macht noch kein gutes Institut. Dazu gehören dann immer auch noch die Kollegen mit denen man sein Tagewerk vollbringt. Auch wenn man schon mit dem nötigen Ernst seine Arbeit machen muss, darf der Spaß daran nicht zu kurz kommen. Ihr habt es geschafft, dass die Arbeit wirklich Spaß gemacht hat. Dafür und für Eure tatkräftige Unterstützung bei all den vielen, kleinen und großen Problemen möchte ich Euch danken. Besonderen Dank hierbei an Maria Krämer, Dr. Jürgen Prell, Dr. Hubertus Boesten, Dr. Joachim Jahnke, Ina Horst und Corinna Lantin.

Vielen lieben Dank an meine Eltern, die mir stets ein starker und zuverlässiger Rückhalt sind. Gleiches gilt natürlich ebenso für meine Brüder und den Rest meiner Familie und meine Freunde, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und für die nötige Ablenkung gesorgt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Chef, Herrn Dr. Horst Hoeck. Er hat ein ruhendes Potential in mir erkannt und mich in bewundernswerter Weise aufgebaut und gefördert. So habe ich bei der GNT meine Bestimmung gefunden.

Zum Abschluss bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alan Slusarenko. Sie haben sich bereit erklärt diese Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten. In Ihren Vorlesungen haben Sie mich für die faszinierende Welt der Pflanzen begeistern können. Das Gelernte ist sehr hilfreich und findet in ungeahnter Weise Anwendung.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name : Nico Saeglitz, geb. Esser  
Geburtsdatum : 10.11.1972  
Geburtsort : Aachen

### Schulbildung

1985-1991 Wirteltor-Gymnasium, Düren  
1991-1993 Gymnasium Peter-Paul, Eschweiler  
Abschluss Abitur

### Wehrdienst

01.07.1993 – 30.06.1994

### Universitätsausbildung

1994-2000 Studium der Biologie an der RWTH in Aachen  
Diplomarbeit 05.1999 – 05.2000 am Institut für Biologie I, Ökologie des Bodens  
Diplom 09.05.2000

### Promotion

Promotionsstudium Biologie an der RWTH in Aachen  
Beginn: 01.08. 2000 am Institut für Biologie I, Ökologie des Bodens  
Thema der Arbeit: Molekularbiologische und genetische Untersuchungen  
zur Regulation des zentralen Regulators NifA in  
*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39

---

Datum

Unterschrift

