

Physiologische und genetische  
Charakterisierung der  $\gamma$ -Amino-  
butyrat (GABA) Aminotransferase 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

Jürgen Prell

aus Aachen

Berichter: Frau Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Ursula B. Prierer  
Herr Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Ulrich Klinner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Vorfeld publiziert:

**Priefer, U.B., Aurag, J., Boesten, B., Bouhmouch, I., Defez, R., Filali-Maltouf, A., Miklis, M., Moawad, H., Mouhsine, B., Prell, J., Schlüter, A. & Senatore, B. (2001)** Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J. Biotech.* **91**, 223-236

**Prell, J., Boeston, B., Poole, P. & Priefer, U.B. (2002)** The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. *Microbiology* **148**, 615-623

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1.	Die <i>Rhizobium-Leguminosen</i> Symbiose.....	7
1.2.	Der Kohlen- und Stickstoffhaushalt der Symbionten .....	8
1.3.	Die Rolle von GABA in <i>Rhizobium</i> .....	11
1.3.1.	Der GABA-Shunt .....	12
1.3.2.	GABA Aminotransferasen.....	14
1.3.3.	Glutamat Dekarboxylase .....	16
1.4.	Die Rolle von GABA in anderen Bakterien .....	17
1.5.	Die Rolle von GABA in Pflanzen .....	19
1.6.	Auffinden eines <i>gabT</i> homologen Gens in <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 und Zielsetzungen dieser Arbeit .....	20
<b>2.</b>	<b>Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.	Chemikalien und Enzyme.....	21
2.2.	Bakterienstämme .....	21
2.3.	Pflanzenmaterial.....	21
2.4.	Plasmide .....	21
2.5.	Synthetische Oligonukleotide .....	22
2.6.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	22
<b>3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1.	Molekularbiologische Methoden .....	24
3.1.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	24
3.1.2.	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>R. leguminosarum</i> .....	24
3.1.3.	Agarosegelelektrophorese.....	25
3.1.4.	Auftrennung von Plasmidprofilen (Eckhardt Gel).....	25
3.1.5.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
3.1.6.	Klonierungsmethoden.....	26
3.1.7.	Klonierung synthetischer Oligonukleotide .....	26
3.1.8.	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	27
3.1.9.	Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylon-Membranen .....	28
3.1.10.	Herstellung Digoxigenin-dUTP markierter Sonden.....	29
3.1.11.	Southern Hybridisierung.....	30
3.1.12.	Sondennachweis.....	31
3.2.	Plasmidkonstruktionen .....	32
3.2.1.	pK19mob- <i>gabT</i> .....	32

3.2.2.	pK18mob- <i>gabR</i> .....	32
3.2.3.	pK19mob- <i>gabD</i> .....	34
3.2.4.	pJP2 .....	34
3.2.5.	pJP2- <i>gabT</i> .....	34
3.2.6.	pJP2- <i>gabR</i> .....	36
3.2.7.	pJP2- <i>gabD</i> .....	36
3.3.	Mikrobiologische Methoden.....	37
3.3.1.	Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	37
3.3.2.	Kultivierung von <i>R. leguminosarum</i> Stämmen .....	38
3.3.3.	Kultivierung von Erbsenpflanzen und Inokulation mit <i>Rhizobien</i> .....	39
3.3.4.	Acetylen-Reduktions-Assay (ARA) .....	40
3.3.5.	Präparation von Bakteroidensuspensionen .....	41
3.3.6.	Dünnschnitte von Knöllchen und histologische GUS Färbungen.....	41
3.3.7.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	41
3.3.8.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	43
3.3.9.	Mobilisierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> nach <i>R. leguminosarum</i> .....	43
3.3.10.	Transposonmutagenese .....	44
3.4.	Biochemische Methoden .....	44
3.4.1.	Proteinextraktion aus <i>R. leguminosarum</i> Kulturen.....	44
3.4.2.	Bestimmung des Proteingehalts der Rohextrakte.....	45
3.4.3.	GABA Aminotransferase Enzymaktivitäten.....	45
3.4.4.	Succinatsemialdehyd Dehydrogenase Enzymaktivitäten.....	47
3.4.5.	GUS und LacZ Assay .....	48
3.5.	Computergestützte Auswertung .....	49
3.5.1.	Clone Manager 5.03 .....	49
3.5.2.	NCBI BLAST2.....	49
3.5.3.	ClustalX 1.81 .....	50
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1.	Genetische Karte und Sequenz des <i>gabT</i> tragenden 2,5 kb <i>Sall</i> Fragments.....	51
4.1.1.	Ermittlung der Sequenz .....	53
4.1.2.	Sequenz und relevante genetische Strukturen .....	53
4.1.3.	Identifizierung von <i>gabT</i> .....	56
4.1.4.	Identifizierung von <i>gabD'</i> und <i>gabR'</i> .....	60

4.1.5.	Sequenz-Hinweise auf eine <i>gabTD</i> Operonstruktur.....	61
4.2.	Lokalisierung von <i>gabT</i> innerhalb des Genoms .....	62
4.3.	Phänotypische Analyse von <i>gabT</i> Mutanten .....	63
4.3.1.	Wachstumsphänotypen der Transposonmutante PH10 .....	63
4.3.2.	GABA Aminotransferase Enzymaktivitäten.....	65
4.3.3.	Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase Aktivitäten .....	65
4.3.4.	Symbiontischer Phänotyp .....	66
4.3.5.	Bestätigung der phänotypischen Ergebnisse mit Hilfe einer <i>gabT</i> -Integrationsmutante .....	66
4.4.	Expression von <i>gabT</i> .....	69
4.4.1.	Das <i>uidA</i> (GUS) Reportergen .....	69
4.4.2.	Konstruktion des Promotor-Probe Vektors pJP2 .....	69
4.4.3.	GUS Expression von pJP2 .....	72
4.4.4.	Einsatz von pJP2 während der Symbiose .....	72
4.4.5.	Klonierung der vermuteten <i>gabT</i> Promotorregion.....	73
4.4.6.	pH induzierte Expression von <i>gabT</i> im Wildtyphintergrund .....	73
4.4.7.	Expression von <i>gabT</i> auf verschiedenen Kohlen- und Stickstoffquellen. 76	
4.4.8.	Symbiontische Expression von <i>gabT</i> .....	80
4.4.9.	Expression von <i>gabT</i> im <i>gabT</i> Mutanten Hintergrund.....	81
4.4.10.	Expression von <i>gabT</i> in einem <i>sucA</i> Mutanten Hintergrund .....	83
4.5.	Regulation von <i>gabT</i> .....	86
4.5.1.	Konstruktion einer <i>gabR</i> Mutante .....	86
4.5.2.	Expression von <i>gabT</i> in VF39-18R.....	87
4.5.3.	Expression von <i>gabT</i> in einer <i>gabD</i> -Mutante.....	90
4.6.	Eigene Promotoraktivitäten von <i>gabR'</i> und <i>gabD'</i> .....	93
4.7.	Weitere Arbeitsansätze zum Auffinden GABA metabolisierender Enzyme 95	
<b>5.</b>	<b>Abschlußdiskussion und Ausblick .....</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
7.1.	Verzeichnis der Abkürzungen .....	107
7.2.	Abbildungsverzeichnis.....	109
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	110
7.4.	N-Terminale Proteinsequenzen von <i>gabD'</i> und <i>gabR'</i> .....	111
<b>8.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>112</b>

<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>126</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>127</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Die *Rhizobium*-Leguminosen Symbiose

Die taxonomische Gruppe der *Rhizobien* wird heute in fünf Gattungen unterteilt: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* und *Azorhizobium*. Alle sind in der Lage molekularen Stickstoff zu reduzieren. Dies tun sie jedoch nur in symbiontischen Beziehungen in Wurzelknöllchen (engl. nodules) von Schmetterlingsblütern (*Fabales*, *Leguminosae*) oder als Ausnahme auch in sproßbürtigen Knöllchen von *Sesbania* Spezies (*Azorhizobium*). Ein großer Teil der „Leguminosen“ Unterfamilien *Papilionoideae* (*Fabaceae*) und *Mimosoideae*, sowie ein kleinerer Teil der *Caesalpinioideae* werden dabei „noduliert“. Eine systematische Ausnahme stellen einige Vertreter der Gattung *Parasponia* dar, die als Vertreter der *Ulmaceae* ebenfalls Wurzelknöllchen mit *Rhizobien* bilden können (Trinick, 1988).

Der Prozess der Knöllchenbildung ist ein hochregulierter Vorgang, der mit der chemotaktischen Anlockung der *Rhizobien* durch von der Pflanze exudierte Flavonoide beginnt. Diese Flavonoide induzieren in der Bakterienzelle während der physikalischen Kontaktaufnahme mit einem Wurzelhaar die sogenannten *nod* Gene. Deren Genprodukte synthetisieren spezifische Lipochitooligosaccharide. Sie leiten das sogenannte „root hair curling“ ein und induzieren neue meristematische Aktivität im inneren Kortex der Wurzel, was den Beginn der eigentlichen Knöllchenbildung darstellt (Schultze & Kondorosi, 1998).

Die Bakterienzellen werden in Infektionsschläuche eingeschlossen und beginnen sich dort zu teilen. Diese Infektionsschläuche wachsen in die sich entwickelnden Knöllchenstrukturen ein. Später kommt es dann zum endozytotischen Einschluß der Zellen in Peribakteroidmembranen (PBM) und der Differenzierung zu stickstofffixierenden Bakteroiden. Dieser Vorgang wird von gravierenden Veränderungen in der bakteriellen und pflanzlichen Genexpression begleitet (z.B. Trepp *et al.*, 1999) und ist auf die extrem sauerstoffreduzierten Verhältnisse im Inneren des Knöllchens zurückzuführen. Diese mikroaeroben Bedingungen sind obligatorisch für die Funktionalität der bakteriellen Nitrogenase, dem Schlüsselenzym der Stickstoffreduktion, das extrem Sauerstoff sensitiv ist.

Um den energieaufwendigen Vorgang der Stickstofffixierung zu Ammoniak (Ammonium) aufrecht zu erhalten (zur Reduktion von 1 Mol N<sub>2</sub> werden 16 Mol ATP

benötigt), müssen die Bakterioide permanent und ausreichend mit reduziertem Kohlenstoff versorgt werden. Zusammenfassend kann die Symbiose zwischen *Rhizobien* und *Leguminosen* als ein hochregulierter Austausch von Kohlenstoff und Stickstoff angesehen werden (Poole & Allaway, 2000).

## 1.2. Der Kohlen- und Stickstoffhaushalt der Symbionten

1981 veröffentlichten C.W. Ronson *et al.* den ersten Phänotyp einer *dctA* Mutante ( $C_4$ -dicarboxylate transport) von *Rhizobium trifolii*. Diese Mutation verhinderte die Aufnahme von Dikarbonsäuren wie Malat und Succinat über die bakterielle Zellmembran. Mutanten induzierten auf ihrer Wirtspflanze zwar die Knöllchenbildung ( $Nod^+$ ), waren aber nicht in der Lage Stickstoff zu fixieren ( $Fix^-$ ). Dies veranlaßte zu der Überlegung, daß Dikarbonsäuren die primäre Kohlenstoffquelle für die symbiontische Stickstofffixierung der Bakterioide sein könnte.

Im folgenden Jahrzehnt wurde an der Bestätigung dieser Hypothese gearbeitet. Im Jahr 1991 folgte eine erste Zusammenfassung der Ergebnisse in mehreren Reviews (Vance & Heichel, 1991; Streeter, 1991).

C.P. Vance und G.H. Heichel (1991) faßten abschließend zusammen, daß:

- Bakterioide in ihrem Kohlenhydratmetabolismus limitiert sind und keine vollständige Glykolyse durchführen;
- Mutanten, die Glukose und Fruktose nicht verstoffwechseln können, jedoch in der Lage sind, effektive Symbiosen auszubilden;
- *dctA* Mutanten keine effiziente Stickstofffixierung durchführen;
- über  $^{14}CO_2$  und PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase; EC 4.1.1.31) im pflanzlichen Zytosol markiertes Malat und Succinat von Bakteroiden schnell aufgenommen und veratmet wird;
- „Malatenzym“-Aktivität (malic enzyme; EC 1.1.1.38) in den Bakteroiden den direkten Gebrauch von Malat erlaubt (anaplerotische Reaktion über Pyruvat, Acetyl-CoA und Kondensation mit Oxalacetat zu Zitrat; siehe Abb. 1);
- die Aufnahmesysteme der Bakterioide für Dikarbonsäuren hocheffizient sind, im Gegensatz zu denen für Zucker;
- die PBM in der Lage ist, einen hohen Fluß von Dikarbonsäuren zu vermitteln, aber nicht für Zucker und Aminosäuren (außer Aspartat).

1992 bestätigten S.O. Salminen und J.S. Streeter die Hypothese von L. Rosendahl *et al.* (1990), daß über eine „dunkle“ Kohlenstofffixierung durch PEPC im Knöllchenzytosol die benötigten Dikarbonsäuren (in der Hauptsache Malat) gebildet und von den Bakteroiden aufgenommen und verstoffwechselt werden. Die Bildung ausreichender Mengen von Dikarbonsäuren in den Mitochondrien der Wirtspflanze wurde wegen der sauerstofflimitierten Bedingungen im Knöllchen ausgeschlossen (Rawsthorne & LaRue, 1986; Day & Mannix, 1988) und durch die präsentierten Ergebnisse bestätigt.

Somit ergibt sich für die Kohlenstoffversorgung durch die Wirtspflanze folgendes Gesamtbild (Abb. 1). Die Hauptkohlenstofftransportform der Pflanze (Saccharose) wird im Knöllchen glykolytisch bis zum Phosphoenolpyruvat abgebaut, dann über PEPC und Malatdehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) zu Malat reduziert und über spezifische Transporter (in der PBM und DctA in der bakteriellen Zellmembran) von den Bakteroiden aufgenommen. Im Bakteroid stellt Malat sogleich ein Intermediat des Zitratzyklus dar, muß aber zum Teil anaplerotisch über „malic enzyme“ zu Pyruvat und weiter zu Acetyl-CoA umgewandelt werden, um die Kondensation von Oxalacetat zu Zitrat zu gewährleisten. Diese Reaktion ist essentiell für einen funktionellen Zitratzyklus, der im Bakteroid den energieliefernden Hauptreaktionsweg darzustellen scheint. Die entsprechenden Enzymaktivitäten sind in Bakteroiden der verschiedenen Symbiosen vorhanden und Mutanten ergeben in der Regel Fix<sup>-</sup> Phänotypen (zusammengefaßt von Dunn, 1998).

Die Regulation des Zitratzyklus ist dabei von großer Bedeutung. Unter mikroaeroben Bedingungen, wie sie im Knöllchen vorliegen, wäre eine Funktionalität wegen des Überschusses an Reduktionsäquivalenten nicht unbedingt zu erwarten (siehe z.B. *E. coli*). In Bakteroiden führt dieser Überschuß unter Umständen zu einer Hemmung der 2-Oxoglutarat Dehydrogenase (EC 1.2.4.2) oder der Zitrat Synthase (EC 4.1.3.7) und weiter zur Synthese von Glutamat bzw. Polyhydroxybutyrat (PHB) (Salminen & Streeter, 1987, 1990, 1992; McDermott *et al.*, 1989; Dunn, 1998; Poole & Allaway, 2000).

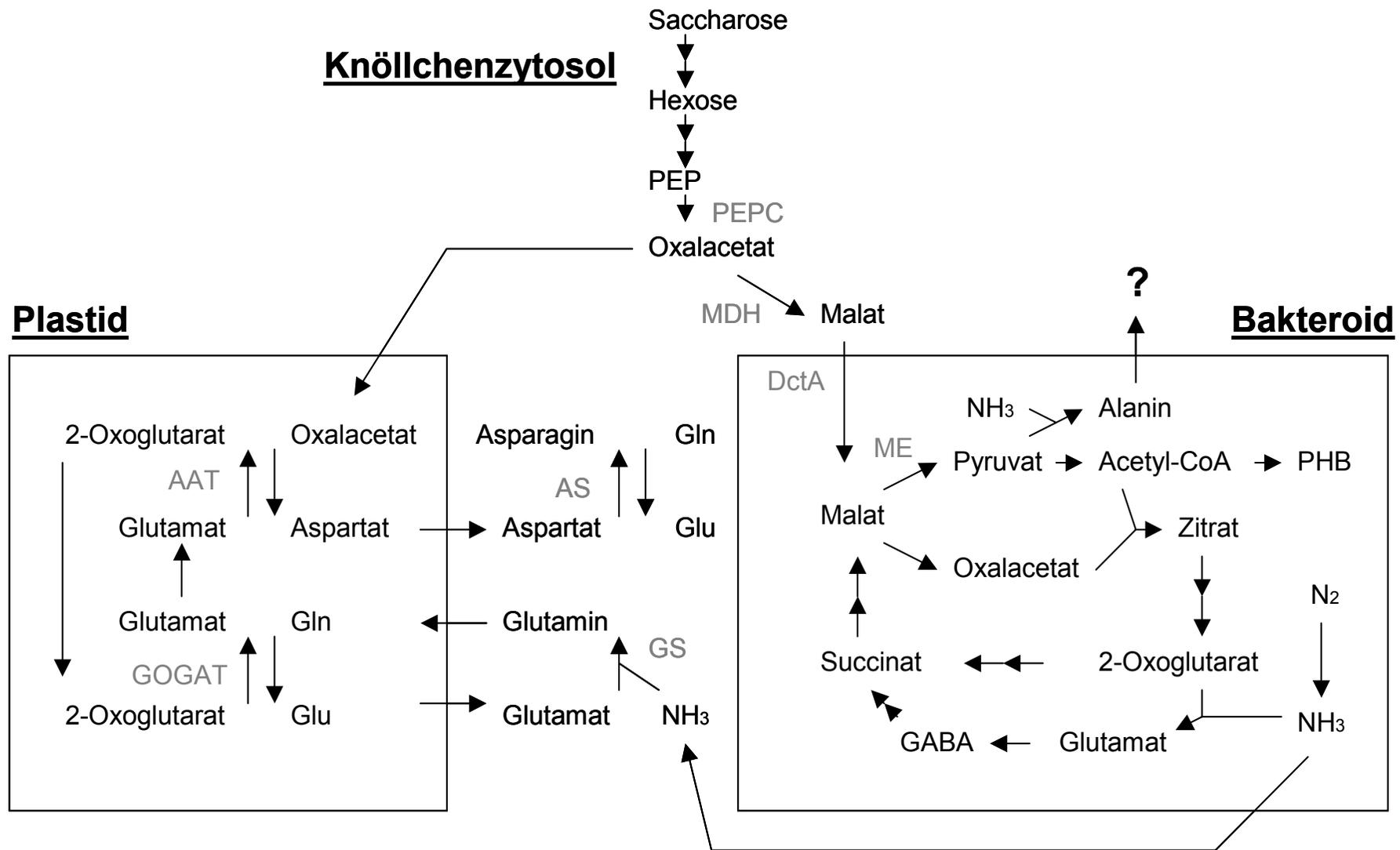


Abb. 1: Kohlen- und Stickstoffhaushalt im Knöllchen (angelehnt an Streeter, 1991). PEP: Phosphoenolpyruvat; PHB: Polyhydroxybutyrat; GABA: 4-Aminobutyrat; PEPC: PEP-Karboxylase; MDH: Malatdehydrogenase; ME: „Malatenzym“; GS: Glutaminsynthetase; GOGAT: Glutamatsynthase; AAT: Aspartataminotransferase; AS: Asparaginsynthetase; Gln: Glutamin; Glu: Glutamat.

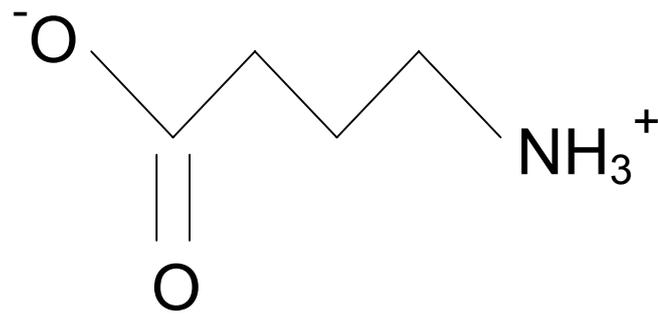
Auf Seiten des Stickstoffs herrschte seit 1956 die einhellige Meinung, daß der reduzierte Stickstoff in Form von Ammoniak oder Ammonium ins Wirtszytosol diffundiert oder transportiert wird (Abb. 1). Dort sollte er dann von pflanzlichen Enzymen (Glutamin Synthetase (GS), Glutamat Synthase (GOGAT)) in Aminosäuren (Glutamin, Glutamat und weiter in Asparagin) oder andere Polyamine inkorporiert werden.

Diese Ansicht wird seit 1998 neu und widersprüchlich diskutiert. J.K. Waters *et al.* veröffentlichten, daß in Bakteroiden von *Bradyrhizobium japonicum*, die auf Saccharosegradienten gereinigt wurden, das Hauptexkretionsprodukt Alanin und nicht Ammonium ist. Sie gaben auch klare, methodische Ursachen für die früher publizierten Befunde von Ammonium als einzigem Exkretionsprodukt an. Eine weitere Arbeit an *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Bakteroiden unter ähnlichen Bedingungen zeigte eine gemischte Exkretion von Alanin und Ammonium (Allaway *et al.*, 2000). Das Ammonium assimilierende Enzym der Bakterioide konnte in beiden Fällen als Alanin Dehydrogenase (ADH; EC 1.4.1.1) identifiziert werden, das Pyruvat zu Alanin aminierte. Y. Li *et al.* (2002) lieferten in jüngster Zeit neue Daten, die wiederum Ammonium als erstes Exkretionsprodukt in *B. japonicum* Bakteroiden bevorzugen. Sie versuchten auch methodische Probleme, die zu den fundamental unterschiedlichen Ergebnissen führten, zu klären.

Wäre Alanin ein bevorzugtes Exkretionsprodukt der Symbiose würde an dieser Stelle eine Kopplung von Kohlenstoff- und Stickstoffhaushalt der Bakterioide stattfinden. Dies wurde bisher immer völlig getrennt betrachtet (Poole & Allaway, 2000).

### **1.3. Die Rolle von GABA in *Rhizobium***

In den radioaktiven Tracerstudien zu Beginn der 90er Jahre trat in der Regel Glutamat als erstes Labelprodukt in den basischen Aminosäurefraktionen auf (Salminen & Streeter, 1987, 1990; Rosendahl *et al.*, 1990; Kouchi *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991). Als eine weitere zum Teil in hohen Konzentrationen auftretende Aminosäure wurde auch GABA genannt (Streeter, 1987; Ta *et al.*, 1988; Rosendahl *et al.*, 1990; Kouchi *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991).



GABA ist eine Aminosäure, die in Proteinen nicht enthalten ist. Sie spielt aber in biologischen Systemen unterschiedlichste Rollen. GABA enthält ein Karbonskelett aus 4 Kohlenstoffatomen und ist im Gegensatz zu den üblichen Aminosäuren nicht in der  $\alpha$ - sondern in der  $\gamma$ -Position aminiert.

GABA ist in Wasser sehr gut löslich und liegt unter physiologischen pH Werten als Zwitterion vor (pK Werte von 4,03 und 10,56). GABA kann auch in gebundenen Formen vorliegen, außerdem ist ein Ringschluß ähnlich dem in Prolin möglich.

Über eine mögliche Rolle GABAs während der Symbiose wurden nachfolgend mehrere Arbeiten veröffentlicht (Miller *et al.*, 1991; Kouchi *et al.*, 1991; Salminen & Streeter, 1990; Ta *et al.*, 1988; Jin *et al.*, 1990; Fitzmaurice & O'Gara, 1991, 1993). Diese betrachteten unterschiedliche Aspekte in den verschiedenen Symbiosen und sollen im Weiteren den Stand der Forschung näher beleuchten.

### 1.3.1. Der GABA-Shunt

Der sogenannte GABA-Shunt fungiert als Umweg für die Dekarboxylierung von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA und die Weiterreaktion zu Succinat durch 2-Oxoglutarat Dehydrogenase und Succinyl-CoA Synthetase (EC 6.2.1.6) innerhalb des Zitratzyklus (Abb. 2). Der Umweg verläuft zunächst über die Aminierung oder Transaminierung von 2-Oxoglutarat zu Glutamat. Dies kann über Glutamat Dehydrogenase (EC 1.4.1.2) oder jede Aminotransferase geschehen, die 2-Oxoglutarat als Aminoakzeptor nutzt. Glutamat kann dann von Glutamat Dekarboxylase (EC 4.1.1.15) zu GABA dekarboxyliert und weiter von GABA Aminotransferase (EC 2.6.1.19) zu Succinatsemialdehyd (SSA) transaminiert werden. Succinatsemialdehyd Dehydrogenase (EC 1.2.1.16) oxidiert SSA weiter zu Succinat. Dies schließt den Kreis.

Eine im Vorfeld bereits angesprochene eventuelle Hemmung des 2-Oxoglutarat Dehydrogenase Komplexes könnte dem GABA-Shunt unter symbiontischen Bedingungen Bedeutung als einen anaplerotischen Umweg zukommen lassen.

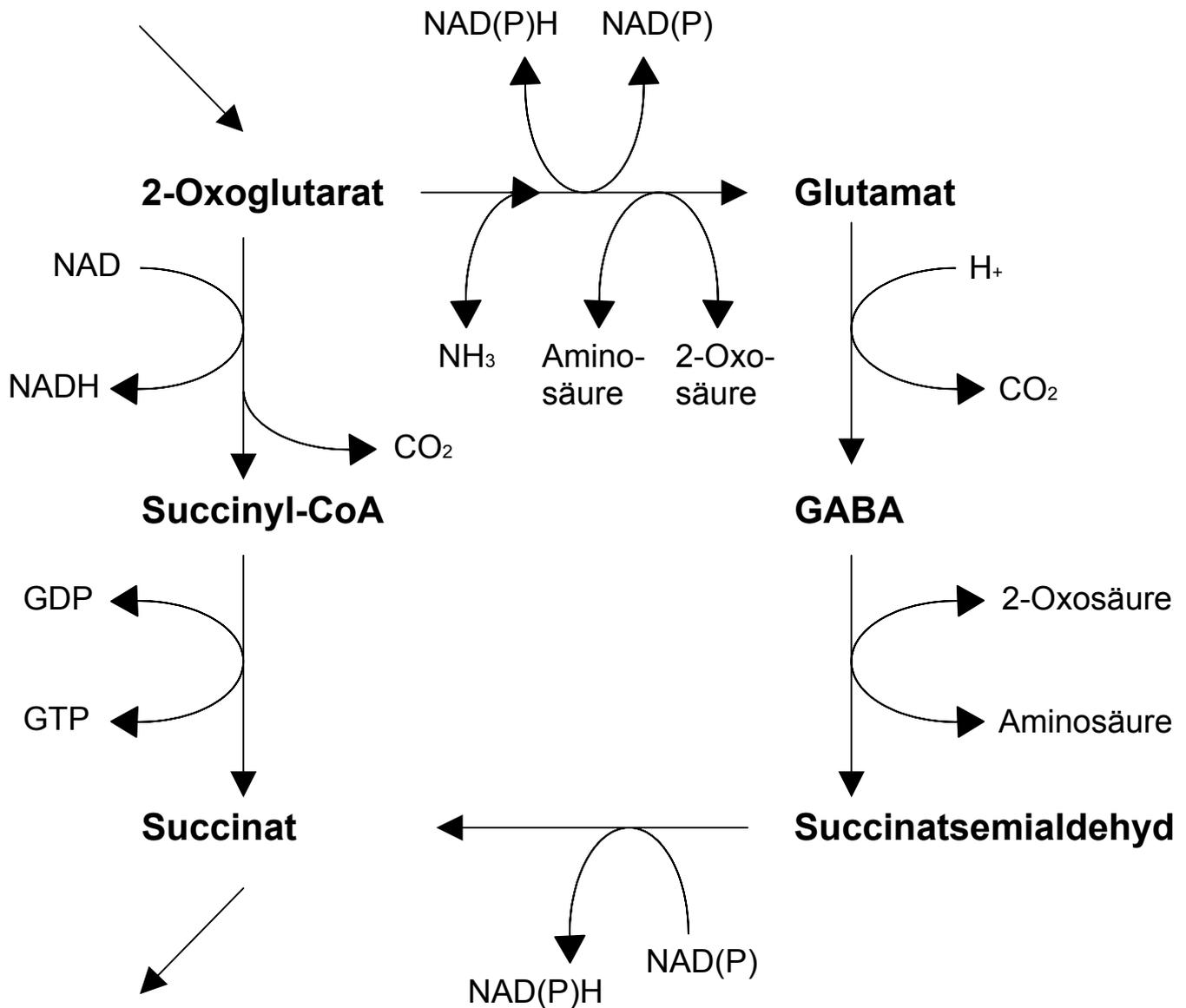


Abb. 2: Der GABA-Shunt (rechter Teil) stellt einen theoretischen Umweg für die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat zu Succinat im Zitratzyklus dar (linker Teil).

Die Tracerstudien von Salminen und Streeter (1987 und 1992) zeigten, daß Glutamat die bevorzugt gelabelte und akkumulierende Aminosäure in Sojabohnen Knöllchen ist. Sie untersuchten ebenfalls, ob diese Akkumulation auf eine Hemmung des 2-Oxoglutarat Dehydrogenase Komplexes durch NADH zurückzuführen sein könnte (Salminen & Streeter, 1990). Die Daten zeigten eine mögliche 50%ige Inhibierung

des Enzyms, die allerdings für den massiven Strom in den Glutamat Pool als alleine nicht ausreichend diskutiert wurde. Sie konnten weiterhin nicht zeigen, daß ein Teil des Labels in den GABA Pool floß und führten dies auf das Fehlen von Glutamat Dekarboxylase Aktivität in *B. japonicum* Bakteroiden zurück.

D.L. Walshaw *et al.* (1997) zeigten, daß eine *sucA* Mutante (2-Oxoglutarat Dehydrogenase) von *R. leguminosarum* bv. *viciae* während des Wachstums auf Succinat Glutamat in großen Mengen akkumulierte und ausschied und verglichen dies mit den vorher besprochenen Beobachtungen aus der Symbiose mit Sojabohnen.

Eine Arbeit von T.C. Ta *et al.* (1988) zeigte, daß in Alfalfa (*Medicago sativa*)-Knöllchen gelabeltes Glutamat zu 20% in den GABA Pool überging. Eine Inhibierung dekarboxylierender und transaminierender Enzyme durch Aminooxyacetat (AOA) unterband diese Reaktion zu 80%. Dort wurde ebenfalls eine Transaminierung von <sup>15</sup>N gelabeltem GABA zu Glutamat und Alanin gezeigt. Diese Beobachtungen wurden durch Enzymaktivitätsdaten von R.W. Miller *et al.* (1991) gestützt, die sowohl Glutamat Dekarboxylase- als auch 2-Oxoglutarat und Pyruvat abhängige GABA Aminotransferaseaktivitäten nachwiesen. Miller *et al.* konnten allerdings durch Zugabe von Hemmstoffen (AOA) den Abbau von GABA nicht unterbinden, was sie zu der Vermutung der Existenz eines weiteren Metabolisierungswegs veranlaßte.

A.M. Fitzmaurice und F. O’Gara (1991, 1993) beschrieben den Glutamat Metabolismus in freilebenden Zellen und Bakteroiden von *Sinorhizobium meliloti* über Glutamat Dehydrogenase und den GABA Shunt. Sie maßen dem GABA Shunt auf Grund der vorhandenen Enzymaktivitäten in Bakteroiden eine hohe Bedeutung zu. Anschließend wurde eine Tn5 generierte Mutante beschrieben. Sie war Glutamat auxotroph und hatte reduzierte Succinatsemialdehyd Dehydrogenase Aktivitäten (NAD und NADP abhängige). Sie hatte ebenfalls stark reduzierte symbiontische Aktivitäten. Es muß allerdings angemerkt werden, daß die Rohdaten dieser Arbeiten Auffälligkeiten aufweisen, da insbesondere die GABA Aminotransferase Aktivitäten alle übrigen vorhandenen Aktivitätsdaten um 3 Zehnerpotenzen übersteigen (siehe Tab. 1). Des Weiteren wurde leider die Art der Tn5 Mutation nicht näher beschrieben.

### **1.3.2. GABA Aminotransferasen**

In Tab. 1 sind die verschiedenen in *Rhizobien* ermittelten Enzymaktivitätsdaten zusammengefaßt und angepaßt ( $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$ ). M. Dunn stellte 1998 zusammenfassend fest, daß *B. japonicum* und *S. meliloti* bzw. *Rhizobium* MNF2030

entgegengesetzte Präferenzen für den Aminoakzeptor der GABA Aminotransferase haben. Man muß weiterhin bemerken, daß die Daten auf sehr unterschiedliche Weise gewonnen wurden. Die Bedingungen der Assays und der Nachweis der Reaktionsprodukte sind zum Teil sehr verschieden (siehe Kouchi *et al.*, 1991; Salminen & Streeter, 1990; Miller *et al.*, 1991; Fitzmaurice & O’Gara, 1991; Jin *et al.*, 1990).

H. Kouchi *et al.* fanden 1991 bei Zugabe von  $^{15}\text{N}$  markiertem Aspartat bzw. Glutamat zu Bakteroidsuspensionen hohe Anteile des Labels im Glutamat und GABA Pool wieder. Das gelabelte Glutamat war dabei eher erwartungsgemäß. Aus dem gelabelte GABA schlossen sie auf eine Funktionalität des GABA Shunts, obwohl sie mit  $^{14}\text{C}$  markiertem Aspartat bzw. Glutamat nur Spuren des Labels im GABA Pool nachwiesen.

Eine andere Interpretation dieser Rohdaten könnte allerdings auch Oxalacetat- bzw. 2-Oxoglutarat abhängigen GABA Aminotransferase Aktivitäten für dieses Ergebnis verantwortlich machen. Beide Aktivitäten wurden nachgewiesen (siehe Tab. 1). Aspartat bzw. Glutamat könnten dabei Succinatsemialdehyd zu GABA transaminieren. Dabei würde lediglich die Reaktionsrichtung umgekehrt. Mit  $^{14}\text{C}$  gelabelten Substraten sollte dabei keine Radioaktivität in den GABA Pool gelangen, weil bei Transaminierung der Stickstoff das Molekül wechselt und nicht der Kohlenstoff.

Tab. 1: Zusammenstellung der in der Literatur vorhandenen GABA Aminotransferase Aktivitätsdaten aus *Rhizobien*.

Stamm	Wachstumsbedingungen	Aminoakzeptor	Aktivität (nmol·min <sup>-1</sup> ·mg Protein <sup>-1</sup> )	Zitat
<i>B. japonicum</i> A1017	Bakteroide	Pyruvat	2,1 (±0,44)	Kouchi <i>et al.</i> , 1991
		Oxalacetat	2,4 (±0,32)	
		2-Oxoglutarat	0,11 (±0,06)	
<i>B. japonicum</i>	Bakteroide	Pyruvat 2-Oxoglutarat	4,9 ~0,49	Salminen & Streeter, 1990
<i>S. meliloti</i> Balsac	Bakteroide	2-Oxoglutarat	1,58	Miller <i>et al.</i> , 1991
		Glyoxalat	1,40	
		Pyruvat	0,45	
<i>S. meliloti</i> CMF1	0,5% Glutamat	2-Oxoglutarat	33,24·10 <sup>3</sup> (±5,24·10 <sup>3</sup> )	Fitzmaurice & O’Gara, 1991
	Bakteroide	2-Oxoglutarat	12,23·10 <sup>3</sup> (±2,33·10 <sup>3</sup> )	
<i>Rhizobium</i> MNF2030	10 mM GABA Bakteroide	2-Oxoglutarat (NADP)	399 (±18)	Jin <i>et al.</i> , 1990
		Pyruvat	40 (±11)	
		Oxalacetat	11 (±0)	
		2-Oxoglutarat	1,7 (±0,1) *	

\* in dieser Veröffentlichung sind die Aktivitätsdaten aus Bakteroiden (inkl. SD) identisch zu den Daten aus Kulturen mit 10 mM Succinat. Hier liegt unter Umständen ein Fehler in der Übertragung von Daten vor.

### 1.3.3. Glutamat Dekarboxylase

Glutamat Dekarboxylase Aktivitäten in *Rhizobien* wurden seltener bestimmt. In *B. japonicum* Bakteroiden konnten Salminen & Streeter (1990) keine Aktivitäten nachweisen, obwohl im Knöllchenzytosol Werte von 4-5 nmol·min<sup>-1</sup>·mg Protein<sup>-1</sup> gemessen wurden. Laura Green *et al.* (2000) bestimmten Aktivitäten bis zu 0,42 nmol·min<sup>-1</sup>·mg Protein<sup>-1</sup> in *B. japonicum* Bakteroiden. Sie stellten diese Aktivität als vernachlässigbar dar, da sie hohe 2-Oxoglutarat Dekarboxylase Aktivität nachweisen konnten, die zur Deutung des Fix<sup>+</sup> Phänotyps einer *sucA* Mutante (2-Oxoglutarat Dehydrogenase) diene. Kouchi *et al.* (1991) ermittelten Glutamat Dekarboxylase Aktivitäten von 0,64 nmol·min<sup>-1</sup>·mg Protein<sup>-1</sup> in Bakteroiden, gaben aber im Text

„extrem niedrige Aktivitäten im Vergleich zum Pflanzenzytosol“ ( $0,12 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$ ) an. Hier liegt eventuell eine Verwechslung von Daten vor.

Werte aus *S. meliloti* ergeben Aktivitäten von  $1,37 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$  (Miller *et al.*, 1991) bzw.  $51 (\pm 5,1) \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$  (Fitzmaurice & O’Gara, 1991). In *Rhizobium* MNF2030 konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (Jin *et al.*, 1990).

Auch im Falle von Glutamat Dekarboxylase sind die einzelnen Daten aus den jeweiligen Organismen sehr unterschiedlich, was auf methodische oder stamm-spezifische Unterschiede zurückzuführen ist. Ein relativ einheitliches Bild existiert nur für *B. japonicum*.

#### **1.4. Die Rolle von GABA in anderen Bakterien**

Die ersten Berichte über den GABA Metabolismus in *E. coli* K-12 erschienen 1972a von S. Dover und Y.S. Halpern. Sie berichteten, daß *E. coli* K-12 auf GABA als alleiniger Kohlen- und Stickstoffquelle kein Wachstum zeigte. Eine erste Generation von UV induzierten Mutanten konnte GABA zumindest als alleinige Stickstoffquelle nutzen. Diese Mutanten zeigten 6- bis 9-fach höhere GABA Aminotransferase- und Succinatsemialdehyd Dehydrogenase Aktivitäten. Eine zweite Generation von Mutanten wuchs auch auf GABA als alleinigem Substrat und zeigte erhöhte GABA Aufnahmeraten. Die hohe Übereinstimmung in der Änderung der GABA Aminotransferase- und Succinatsemialdehyd Dehydrogenase Aktivitätsdaten unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen veranlaßte die Autoren zu der Annahme, daß es sich bei der ersten Mutation um eine regulatorische Mutation handelte (Dover & Halpern, 1972b). In den folgenden Jahren erschienen weitere Veröffentlichungen zum GABA Metabolismus und zur Kartierung der involvierten Gene (Dover & Halpern, 1974; Zaboura & Halpern, 1978; Metzger *et al.*, 1979; Metzger & Halpern, 1990; Bartsch *et al.*, 1990). Es zeigte sich, daß GABA Aminotransferase (*gabT*), Succinatsemialdehyd Dehydrogenase (*gabD*) und eine vermutliche GABA Permease (*gabP*) zusammen mit einem Regulator (*gabC*) in enger Nachbarschaft oder möglicherweise sogar in einem Regulon organisiert sind. Die Aufklärung der exakten Anordnung des Regulons erfolgte aber erst 1993 durch E. Niegemann *et al.* und letztendlich 1997 durch die von Blattner *et al.* ermittelte Genomsequenz von K-12.

Weitere Arbeiten in *E. coli* K-12 wurden über Glutamat Dekarboxylase (*gadA* und *gadBC*) und deren Rolle in der Resistenz gegenüber sauren pH Werten während der Magenpassage in Säugern veröffentlicht (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Castanie-Cornet & Foster, 2001). Dabei sollte die Aufnahme von Glutamat und seine Dekarboxylierung zu GABA sowie dessen Exkretion zu einer Nettoerzeugung von Protonen im Zytosol der Bakterienzelle führen. Mittlerweile sind weitere Arbeiten über die Dekarboxylierung von Aminosäuren und den Austausch der Reaktionsprodukte mit dem Medium im Zusammenhang mit der damit einhergehenden Resistenz gegenüber sauren pH Bedingungen publiziert (z.B. Hersh *et al.* 1996, Waterman & Small, 1996; Meng & Bennett, 1992).

J.W. Sanders *et al.* (1998) gelangen in *Lactococcus lactis* die Klonierung der verantwortlichen Gene für die Glutamat Dekarboxylierung und den GABA Austausch (*gadRCB*). Arbeiten von T. Higuchi *et al.* (1997) über *Lactobacillus* sp. und D. Molenaar *et al.* (1993) über *Lactobacillus buchneri* verbinden die Dekarboxylierung von Glutamat bzw. Histidin und den eins-zu-eins Austausch gegen GABA bzw. Histamin gar mit dem Aufbau eines Protonengradienten und der Synthese von ATP.

D.O. Mountfort und V. Pybus (1992) berichteten von einem marinen *Pseudomonaden*, der in der Lage war GABA zu bilden und auszuscheiden. Dies geschah nur, wenn dem Wachstumsmedium Glutamat und Succinatsemialdehyd beigefügt wurde. Diese Reaktion könnte also allein von 2-Oxoglutarat abhängiger GABA Aminotransferase durchgeführt werden. Die Syntheseraten stiegen mit zunehmendem pH Wert. In dieser Arbeit wurde diskutiert, ob der bakteriellen Exkretion von GABA in marinem Freiwasser eine Rolle beim Siedlungsverhalten von Mollusken zukommen könnte.

In *Ralstonia eutropha* H16 ist Succinatsemialdehyd Dehydrogenase am 4-Hydroxybutyrat Metabolismus beteiligt (Lütke-Eversloh & Steinbüchel, 1999). Eine Tn5 induzierte Mutante in *gabD* zeigte einen „4-hydroxybutyrate-leaky“ Phänotyp. Nach Klonierung und Sequenzierung der flankierenden Sequenzen des Transposons fand sich stromaufwärts von *gabD* auch ein *gabT* Homolog.

R.R. Baca-DeLancey *et al.* fanden 1999 eine „quorum sensing“ Induktion von *gabT* in *E. coli* Kulturen. Im Weiteren wurde Indol als ein mögliches Signalmolekül für diese Erscheinung identifiziert (Wang *et al.*, 2001). Glutamat Dekarboxylase (*gadA*) wurde ebenfalls in den bereits erwähnten Arbeiten von M.P. Castanie-Cornet (s.o.) zur pH Toleranz von *E. coli* in stationären Kulturen induziert (quorum sensing!).

Die erste gereinigte und kristallisierte bakterielle GABA Aminotransferase stammte aus *Pseudomonas* sp. F-126 (Yonaha & Tomaya, 1980). Das Enzym transaminierte bevorzugt GABA mit 2-Oxoglutarat. Dabei war die Spezifität für den Aminodonor (GABA) im Gegensatz zu einer zweiten, vom gleichen Stamm exprimierten, Pyruvat abhängigen  $\omega$ -Aminosäure Aminotransferase sehr hoch (Yonaha *et al.*, 1976). Die Spezifität für den Aminoakzeptor (2-Oxoglutarat bzw. Pyruvat) war für beide Enzyme hoch. GABA Aminotransferasen enthalten generell Pyridoxalphosphat als Kofaktor, was ihnen eine hohe thermische Stabilität verleiht. Das pH Optimum liegt im Basischen (für *Pseudomonas* sp. F-126 bei 8,5-9,0; Yonaha & Tomaya, 1980).

### 1.5. Die Rolle von GABA in Pflanzen

Da GABA während der Symbiose in Knöllchen von *Leguminosen* auch eine Rolle im pflanzlichen Zytosol spielen könnte, soll hier noch kurz der Stand der Dinge in Pflanzen erläutert werden.

In Pflanzen liegt GABA im Pool der freien Aminosäuren meist in signifikanten Mengen vor. Es wird seit 1970 immer wieder im Zusammenhang mit Streßinduktion von pflanzlichen Geweben genannt und untersucht. Dies wurde von B.J. Shelp *et al.* (1999) zusammengefaßt. Dabei wird der GABA Shunt als Metabolisierungsweg beschrieben und die Bildung von GABA findet klar über die Dekarboxylierung von Glutamat statt. Glutamat Dekarboxylasen (GDC) sind in verschiedenen Pflanzen näher beschrieben. In *Arabidopsis thaliana* finden sich bis zu 5 Isoformen (Shelp *et al.*, 1999). Die Regulation des Enzyms scheint über das niedrige pH Optimum ( $\sim 5,8$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin möglich. Als Streßfaktoren, die zur GABA Akkumulation führen, werden Hitzeschock, Kälteschock, mechanische Stimulation (auch Verletzungen), Hypoxie (Anoxie) und die Behandlung mit Säuren genannt.

Als möglicher Funktionsweg wird ein durch Streß verursachter Anstieg von zytosolischem Glutamat,  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{H}^+$ -Ionen vorgeschlagen, der GDC aktiviert. Das resultierende GABA könnte anschließend durch Transport oder Transaminierung durch GABA Aminotransferase wieder entfernt werden. Dies wäre theoretisch alleine durch die pH Optima der beiden beteiligten Enzyme möglich (Streeter & Thompson, 1972). GDC würde bei Ansäuerung aktiviert. Durch den Protonenverbrauch bei der Dekarboxylierung zu GABA würde das Medium wieder neutralisiert, was zu einer Aktivierung von GABA Aminotransferase führte.

Des Weiteren wird der GABA Shunt auch in Pflanzen als alternativer Metabolisierungsweg unter anoxischen Bedingungen diskutiert. Weitere mögliche Aufgaben werden GABA als Stickstoffspeicher, als Osmolytikum oder als Fraßschutz gegen Schadinsekten beigemessen (Shelp *et al.*, 1999).

## **1.6. Auffinden eines *gabT* homologen Gens in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 und Zielsetzungen dieser Arbeit**

In den Jahren 1993-94 wurde von V. Lipka im Lehr- und Forschungsgebiet Bodenökologie, Botanik I der RWTH-Aachen eine Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in Abhängigkeit von Umweltfaktoren in dem Bodenbakterium *Rhizobium leguminosarum* mit Hilfe des Indikatortransposons Tn5-*lacZ* B20“ durchgeführt.

Das in dieser Arbeit verwendete Tn5-B20 Transposon (Simon *et al.*, 1989) trug im linken IS50 Element eine promotorlose *lacZ* Kasette. Die Insertion des Transposons in eine kodierende Sequenz erzeugte dabei nicht nur eine Mutation, sondern bei entsprechender Orientierung auch eine Transkriptionsfusion mit dem *lacZ* Leserahmen. Dies ermöglichte die Messung der Expression des Zielgens unter verschiedenen Bedingungen.

Ein in seiner *lacZ* Expression reduziertes Derivat von *R. leguminosarum* VF39 (VF39-TP2; T. Patschkowski, RWTH-Aachen) wurde mit Tn5-B20 mutagenisiert und auf differentielle *lacZ* Expression auf unterschiedlichen pH Medien untersucht. Unter 11000 getesteten Mutanten zeigte ein Stamm eine erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität auf pH 5,4 TY Platten. In TY Flüssigkulturen stieg die Aktivität von 16,9 Miller Units (pH 8,0) stufenweise auf 100,0 Units (pH 5,4) an. Diese Mutante wird im Folgenden PH10 genannt.

Der unterbrochene Leserahmen wurde als *gabT* Homolog identifiziert (siehe 4.1.3), kodiert also für eine GABA Aminotransferase. Die Aktivität dieses Enzyms ist zwar in *Rhizobien* zur Genüge nachgewiesen (Tab.1), es liegen jedoch keine klaren genetischen Untersuchungen vor.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Art der pH Induktion sowie die generelle Expression des Gens unter verschiedenen physiologischen, wie auch symbiontischen Bedingungen untersucht werden. Des Weiteren sollte der Phänotyp der Mutante analysiert und dessen Relevanz im Kohlenstoffhaushalt des Bakteriums beleuchtet werden.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden in *p.A.*-Qualität von den Firmen BIO-RAD FLUKA, MERCK, ROTH, SERVA und SIGMA ALDRICH bezogen.

Hefeextrakt und Trypton waren von OXOID, Agar von ICN und ULTRA-CLEAN Agarose von GIBCO-BRL.

Alle Restriktionsenzyme und weitere DNA-modifizierende Enzyme, inklusive Puffer stammten von MBI-FERMENTAS.

Reaktionskits kamen von BOEHRINGER, MACHEREY-NAGEL, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH und QIAGEN.

### 2.2. Bakterienstämme

- *E. coli* DH5 $\alpha$

F<sup>-</sup> ( $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *supE44 relA1 deoR*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 (Hanahan, 1983)

- *E. coli* S17-1

*E. coli* 294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] *pro res*  $\Delta$ *recA*, Tp<sup>r</sup> (Simon *et al.*, 1983)

- *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39

Wildtyp, Sm<sup>r</sup> (Priefer, 1989)

- *R. leguminosarum* bv. *viciae* PH10

VF39-TP2 *lacZ*::Tc (Thomas Patschkowski, RWTH-Aachen) *gabT*::Tn5-B20 (Volker Lipka, Diplomarbeit, RWTH-Aachen)

### 2.3. Pflanzenmaterial

Die Erbsensorte *Pisum sativum* cv. Rondo (Consortio Agrario Parma) wurde zur Inokulation mit *Rhizobien* verwendet.

### 2.4. Plasmide

- pUC18/19

NCBI Accesionnummer L09136/L09137, Ap<sup>r</sup>

- pK18/19mob

pK18/19 Derivate mit zusätzlichem origin of transfer, Km<sup>r</sup> (Schäfer *et al.*, 1994)

- pSVB28

pUC8 Derivat mit neuem Polylinker, Ap<sup>r</sup> (Arnold & Pühler, 1988)

- pTR102

Mini-RK2 Derivat, Ap<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup> (Weinstein *et al.*, 1992)

- pCCO GUS

pUC19 Derivat mit promotorloser GUS Kasette, Ap<sup>r</sup> (Axelos *et al.*, 1989)

## 2.5. Synthetische Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG-BIOTECH synthetisiert.

- IS50out

5'-CGGGAAAGGTTCCGTTTCAGGACG-3'

mit 5'-IRD700 Label

- MCS1

5'-CATGGATCCAAGCTTCTCGAGCTCTAGACTGAGGTAAT-3'

- MCS2

5'-CATGATTACCTCAGTCTAGAGCTCGAGAAGCTTGGATCCATGGTAC-3'

Die Sequenzierungen erfolgten mit Standardprimern (M13 5'-IRD700-universal und 5'-IRD800-reverse). Zur Amplifikation der *gabT* Sonde (3.1.10.) wurden nicht markierte M13 Primer verwendet.

## 2.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Zentrifugen

HERMLE Z200 M/H Tischzentrifuge, HETTICH Universal 30RF Kühlzentrifuge, SORVALL RC-5B mit SLA-3000 und SS-34 Rotor.

- Photometer

PHARMACIA LKB Novaspec II, KONTRON Uvicon 930

- Sequenzierautomat

LI-COR 4200L

- PCR Thermocycler

BIOMETRA TRIO-Thermobloc

- Thermoblock

BIOMETRA Thermobloc TB1

- Netzgeräte

PHARMACIA LKB EPS 500/400

- Ultraschall

BRAUN Labsonic U

- Vibratom

LEICA VT1000S

- Mikroskop

OLYMPUS B201 mit FUJI Digital Camera MX 2900 Zoom

- Hybridisierungssofen

BIOMETRA APT Line

- Gaschromatograph

HEWLETT-PACKARD HP5890

- Nylon-Membran

QIAGEN Qiabrane

- Küvetten

LABOMEDIC Einwegküvetten (1 ml)

Gelelektrophoresekammern, Schüttler und weiteres Zubehör wurde von der Technischen Werkstatt der Biologischen Institute der RWTH-Aachen hergestellt.

## 3. Methoden

### 3.1. Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit von MACHEREY-NAGEL nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 3.1.2. Isolierung von Gesamt-DNA aus *R. leguminosarum*

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus *R. leguminosarum* Stämmen erfolgte nach der CTAB-Methode von K. Wilson (in Ausubel *et al.*, 1987) mit einigen Abänderungen.

- 1,5-3 ml einer Kultur ( $OD_{600}$  0,5-0,8) abzentrifugieren (1 min, 12000 rpm).
- Pellet in 570  $\mu$ l TE Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5) resuspendieren.
- 30  $\mu$ l 10% (w/v) SDS und 3  $\mu$ l Proteinase K ( $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) zugeben, gut mischen und 1 h bei 37°C inkubieren.
- 100  $\mu$ l 5 M NaCl zugeben und gründlich mischen.
- 80  $\mu$ l CTAB/NaCl (10% (w/v)/0,7 M) zugeben, mischen und 10 min bei 65°C inkubieren.
- Mit 600  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausschütteln und Phasen durch Zentrifugation trennen (5 min, 12000 rpm).
- Wäßrige Phase vorsichtig abziehen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
- Mit 600  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) erneut ausschütteln und Phasen durch Zentrifugation trennen (5 min, 12000 rpm).
- Wäßrige Phase erneut abziehen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
- 500  $\mu$ l kaltes Isopropanol zugeben und vorsichtig mischen. Dabei wird die ausfallende DNA sichtbar.
- DNA abzentrifugieren (10 min, 12000 rpm) und Überstand abziehen.
- Pellet mit 500  $\mu$ l 70% (v/v) Ethanol waschen und erneut abzentrifugieren (5 min, 12000 rpm).

- Überstand entfernen und Pellet trocknen.
- Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O lösen und bei 4°C lagern.

### 3.1.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten wurden Restriktionsansätze auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden je nach gewünschtem Auftrennungsverhalten aus 0,8-1,5% (w/v) Agarose (in 1 x TA Puffer) gegossen, abgekühlt und mit 1 x TA Puffer überschichtet. DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Gele liefen bei Spannungen von 5-10 V·cm<sup>-1</sup> und wurden anschließend in einem Ethidiumbromid Bad gefärbt. Die Dokumentation erfolgte auf einem ImaGo Geldokumentations-system (B+L SYSTEMS).

50 x TA-Puffer:	Tris-HCl	2 M
	Na-Acetat	500 mM
	EDTA	50 mM
	pH 7,8	
Ladepuffer :	Glycerin	50% (v/v)
	Tris-HCl	100 mM
	EDTA	50 mM
	Bromphenolblau	2 mg·ml <sup>-1</sup>
	pH 8,0	

### 3.1.4. Auftrennung von Plasmidprofilen (Eckhardt Gel)

Die Eckhardt-Lyse ist eine schnelle Methode zur Analyse des Plasmidgehalts eines Bakteriums. Die Lyse erfolgt in den Geltaschen eines Agarosegels durch Lysozym und SDS. Der anschließende Elektrophoreselauf trennt die Plasmide nach ihrer Größe auf, das Bakterienchromosom bleibt in der Geltasche zurück. Die hier beschriebene Vorgehensweise ist modifiziert nach Eckhardt (1978).

- Nach Aufkochen und Abkühlen von 0,7% (w/v) Agarose, 0,1% (w/v) SDS zugesetzen und Gel gießen.

- 200 µl von Kulturen bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 in ein Eppendorfgefäß pipettieren (für andere OD<sub>600</sub> Werte die einzusetzenden Mengen entsprechend variieren).
- 1 min abzentrifugieren, Überstand abziehen.
- 20 µl SRL-Lösung auf das Zellpellet pipettieren und Zellen resuspendieren.
- Zellsuspension sofort in eine Tasche des Gels pipettieren.
- alle Proben nacheinander auf diese Weise bearbeiten.
- 20 min stehen lassen, bis Zellsuspensionen völlig klar sind.
- Vorlauf: 20 min, 0,5 V·cm<sup>-1</sup>
- Lauf: bei 6-10 V·cm<sup>-1</sup>
- Anschließend färben und dokumentieren oder zum Blotten auf Nylonmembran überführen.

SRL-Lösung: 25% (w/v) Saccharose in Laufpuffer lösen und 10 min kochen  
 50 µg·ml<sup>-1</sup> RNase  
 vor Gebrauch: 1 mg·ml<sup>-1</sup> Lysozym zusetzen

### **3.1.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoSpin Extract Kit von MACHEREY-NAGEL nach Herstellerangaben. Die DNA wurde am Ende in 20 µl H<sub>2</sub>O von den Säulen extrahiert.

### **3.1.6. Klonierungsmethoden**

Die Restriktion von DNA (in der Regel in 10-30 µl Volumen), die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten, „Klenow-fill-in“ Reaktionen, sowie Ligationen wurden gemäß den Angaben des Enzymherstellers durchgeführt.

### **3.1.7. Klonierung synthetischer Oligonukleotide**

Zur Klonierung synthetischer Oligonukleotide wurden diese auf 10 µM Konzentrationen verdünnt und 1:1 gemischt. Nach kurzem Erhitzen auf 95°C und langsamem Abkühlen wurde das Gemisch direkt in Ligationen eingesetzt (1 µM).

### 3.1.8. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für Sequenzierungsreaktionen wurde das „Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ von AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH verwendet. Die Sequenzierungstechnik beruht hierbei auf der Synthese von neuen DNA-Strängen, die mit einer spezifischen Primersequenz beginnen und nach statistischem Strangabbruch durch beigemischte ddNTPs enden. Der Primer ist zur Detektion 5'-fluoreszenzmarkiert. Die Sequenzierungsreaktion, die in einer PCR mehrere Zyklen durchläuft, kommt dabei mit relativ geringen Mengen Template-DNA zurecht. Als Template wurden je 150 ng DNA pro Kilobase Plasmid eingesetzt.

Reaktionsansatz:	DNA Template	x µl
	Primer 1	1 µl (1µM)
	Primer 2	1 µl (1µM)
	DMSO	1 µl
	H <sub>2</sub> O	bis 21µl

Die Reaktion kann natürlich auch mit nur einem Primer durchgeführt werden.

Zu je 4,5 µl dieses Gemisches wurden je 1,5 µl der entsprechenden A,C,G,T-Reagenzien des Kits pipettiert. Die Proben wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in die PCR eingesetzt.

PCR-Programm:	Primärdenaturierung	2 min, 95°C
35 Zyklen:	Denaturierung	30 sek, 95°C
	Annealing	30 sek, 52°C
	Elongation	1 min, 72°C
	Terminale Elongation	2 min, 72°C

Die Proben wurden anschließend auf einem LI-COR 4200L Sequenzierer aufgetrennt und ausgewertet (Sequenzierservice, Institut für molekulare Biotechnologie, RWTH-Aachen).

### 3.1.9. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylon-Membranen

Die Übertragung von DNA-Fragmenten (in der Regel gespaltene Gesamt-DNA) aus Agarosegelen auf eine Nylon-Membran erfolgte mit Hilfe einer Vakuum-Blot Apparatur (PHARMACIA LKB). Dazu wurde eine Nylon-Membran geeigneter Größe auf die poröse Trägerplatte der Apparatur aufgelegt und mit einer Plastikmaske abgedeckt. Nach luftblasenfreiem Auflegen des Agarosegels auf die Membran, erfolgte das Abdichten der Apparatur und das Anlegen eines Vakuums (50-80 mbar), welches nur über das Gel ausgeglichen werden konnte. Auf diese Weise gelangten die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf die Nylon-Membran.

Während das Vakuum anlag, erfolgte die Depurinierung, Denaturierung und Neutralisierung der im Gel enthaltenen DNA durch Überschichten des Gels mit den entsprechenden Puffern:

- Unmittelbar nach Einschalten des Vakuums das Gel mit 0,25 M HCl überschichten (Depurinierung), bis die Farbe des Bromphenolblaus im Gel nach gelb umschlägt.
- Anschließend die Depurinierungslösung abgesaugen und durch Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) ersetzen bis die Farbe des Indikators wieder nach Blau umschlägt.
- Dann mit Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,5) neutralisieren (15 min).
- Anschließend das Gel für 60 min mit 20 x SSC (Transferpuffer) überschichten. Während dieser Zeit wird die einzelsträngige DNA aus dem Gel auf den Filter transferiert.

20 x SSC:	NaCl	3 M
	Na <sub>3</sub> -Zitrat	0,3 M
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	

Die Nylon-Membran wurde in Frischhaltefolie eingepackt und die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (5 min) an dieser fixiert. So präparierte Membranen können

entweder sofort oder zu einem späteren Zeitpunkt für eine Hybridisierung eingesetzt werden.

### 3.1.10. Herstellung Digoxigenin-dUTP markierter Sonden

Bei der nicht-radioaktiven Hybridisierung werden die als Sonden verwendeten DNA-Fragmente durch Einbau des Steroid-Haptens Digoxigenin markiert.

Die Herstellung der Sonde erfolgte in dieser Arbeit mittels PCR. Dazu wurde Plasmid-DNA, die den als Sonde gewünschten DNA Bereich enthielt, als Template in eine PCR Reaktion eingesetzt und mit entsprechenden Primern (M13 universal und reverse) amplifiziert. Hierbei enthält der Nukleotidmix DIG-dUTPs (BOEHRINGER), die bei der Amplifikation anstelle von dTTPs eingebaut werden, so daß das Amplifikationsprodukt markiert wird.

PCR-Ansatz:	Endkonzentration:
10 x PCR Puffer	1 x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 mM
dNTP-Mix für DIG (A,C,G: 1 mM; T: 0,65 mM)	A,C,G: 100µM; T: 65µM
DIG-dUTP (0,35 mM)	35 µM
universal Primer (5 µM)	1 µM
reverse Primer (5 µM)	1 µM
Taq Polymerase (5 U µl <sup>-1</sup> )	2,5 U
DNA Template	1 µl
In einem Gesamtvolumen von	25 µl

PCR-Programm:	Primärdenaturierung	4 min, 94°C
35 Zyklen:	Denaturierung	45 sek, 94°C
	Annealing	45 sek, 52°C
	Elongation	1 min, 72°C
	Terminale Elongation	5 min, 72°C

Die markierte Sonden-DNA wurde anschließend einer Reinigung durch Zentrifugation über eine Sephacryl Microspin S-200 Säule (PHARMACIA LBK) unterzogen.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Tn5 Sonde verwendet, die über „random-priming“ und „Klenow-Amplifikation“ des Stammplasmids pSUP1021 (Simon *et al.*, 1986) hergestellt wurde.

### 3.1.11. Southern Hybridisierung

Zunächst wurde der Filter durch eine sogenannte Vorhybridisierung mit einem proteinhaltigen Blocking Reagenz gegen unspezifische Bindungen abgesättigt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der eigentlichen DNA-Sonde.

Vorhybridisierung:

- Filter mit fixierter DNA luftblasenfrei in einen Hybridisierungszylinder rollen, wobei die Seite mit der DNA nach innen zeigen muß. Der Filter sollte dabei so wenig wie möglich überlappen.
- 10 ml Hybridisierungslösung zugeben und für 1-3 h bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubieren.

Hybridisierung:

- Markierte DNA-Sonde zu 10 ml Hybridisierungslösung geben und 10 min bei 95-100°C denaturieren
- Lösung im Zylinder durch Hybridisierungslösung mit markierter DNA-Sonde ersetzen
- Filter über Nacht bei 68°C inkubieren

Nach der Hybridisierung kann die Lösung mit der Sonden-DNA aufgefangen und eingefroren werden. Die Sonde ist mehrmals verwendbar.

Hybridisierungslösung:	SSC (s.o.)	5 x
	Blocking Reagenz (Casein)	1% (w/v)
	N-Lauroylsarkosin	0,1% (w/v)
	SDS	0,02% (w/v)

Der Filter wurde anschließend 10 min mit 50 ml 2 x SSC; 0,1% SDS gewaschen und nochmals 30 min mit 50 ml 0,1 x SSC; 0,1% SDS bei 68°C im Ofen inkubiert.

### 3.1.12. Sondennachweis

Die Digoxigenin-Markierung der Sonden-DNA wird durch Bindung eines Antikörper-konjugats markiert. Der Antikörper trägt kovalent gebunden das Enzym Alkalische Phosphatase, das bei der Nachweisreaktion das Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) dephosphoryliert und in das entsprechende Indoxyl überführt. Dieses tautomerisiert zu einem Keton, das unter den Detektionsbedingungen zu einem blauen Indigofarbstoff dimerisiert. Als "Farbverstärker" dient das beigesezte Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT), das durch die freigesetzten Protonen zum purpurnen Diformazan reduziert wird.

Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Filter kurz in Waschpuffer waschen.
- 30 min mit 50 ml Puffer 2 inkubieren.
- 3 µl Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat (BOEHRINGER) zu 10 ml Puffer 2 geben und Filter damit 30 min inkubieren.
- Ungebundenes Antikörper-Konjugat durch 2 x 15 min Waschen mit je 50 ml Puffer 1 entfernen.
- Membran 2 min mit 20 ml Puffer 3 waschen.
- Filter in Schale mit 5 ml Färbelösung mit DNA Seite nach unten im Dunkeln inkubieren, bis die Banden in der gewünschten Intensität sichtbar werden.
- Stoppen der Farbreaktion durch Zugabe von Puffer 4.
- Zur Dokumentation der Ergebnisse wird der Filter eingescannt.

Waschpuffer:	Tween 20	0,3% (w/v)
	in Puffer 1	

Puffer 1:	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	

Puffer 2:	Blocking Reagenz (Casein)	
		1% (w/v)
	in Puffer 1 lösen	
Puffer 3:	Tris-HCl	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
	mit HCl auf pH 9,5 einstellen	
Puffer 4:	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	mit HCl auf pH 8,0 einstellen	
Färbelösung:	45 µl Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (NBT; 50 mg·ml <sup>-1</sup> von PROMEGA)	
	35 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-Toluidin-Salz (BCIP; 50 mg·ml <sup>-1</sup> von PROMEGA)	
	in 10 ml Puffer 3	

## 3.2. Plasmidkonstruktionen

### 3.2.1. pK19mob-*gabT*

Die Konstruktion von pK19mob-*gabT* diente der Erzeugung der *gabT* Mutante VF39-19T (siehe 4.3.5.). Dabei wurde ein 393 bp *Ecl136II/EcoRI* Fragment (siehe Abb. 15) in die *SmaI/EcoRI* Schnittstellen von pK19mob kloniert. Das Ergebnis ist der Vektor pK19mob-*gabT* (Abb. 3).

### 3.2.2. pK18mob-*gabR*

Die Konstruktion von pK18mob-*gabR* diente der Erzeugung der *gabR* Mutante VF39-18R (siehe 4.5.1.). Dabei wurde ein 392 bp *HindIII/SalI* Fragment (siehe Abb. 28) in die *HindIII/SalI* Schnittstellen von pK18mob kloniert. Das Ergebnis ist der Vektor pK18mob-*gabR* (Abb. 4). Der *lacZ* Promotor von pK18mob ist dabei entgegengesetzt zum *gabR* Leserahmen orientiert.

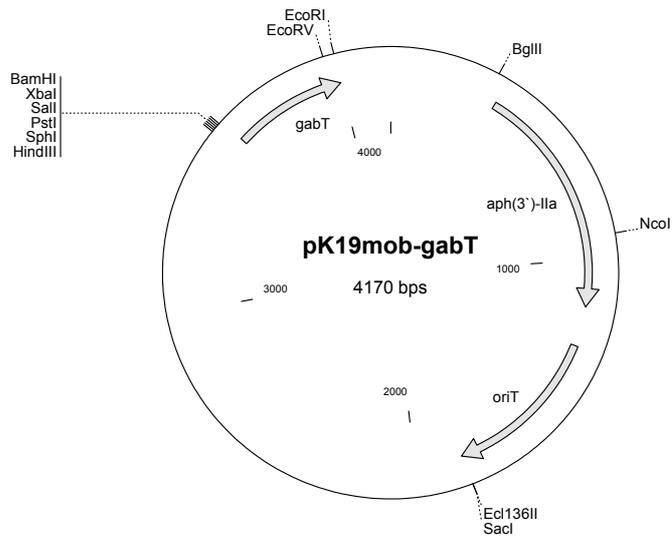


Abb. 3: Plasmidkarte von pK19mob-*gabT*. *aph(3')-IIa*: Kanamycin-/Neomycinresistenz; *oriT*: RP4 „origin of transfer“ zur konjugativen Mobilisierung.

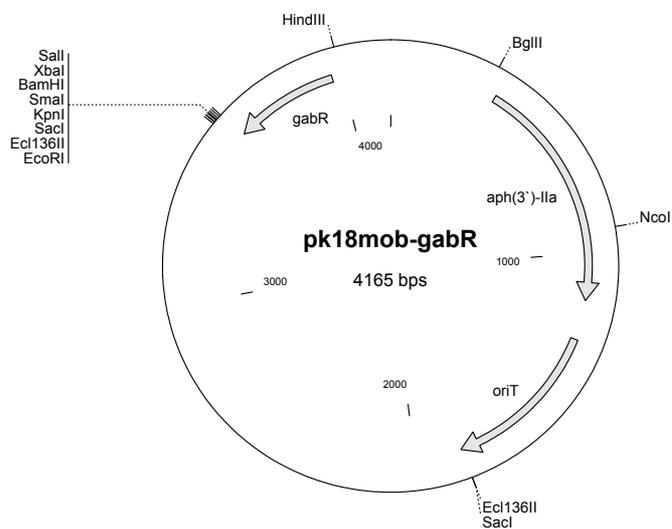


Abb. 4: Plasmidkarte von pk18mob-*gabR*. *aph(3')-IIa*: Kanamycin-/Neomycinresistenz; *oriT*: RP4 „origin of transfer“ zur konjugativen Mobilisierung.

### 3.2.3. pK19mob-*gabD*

Die Konstruktion von pK19mob-*gabD* diente der Erzeugung der *gabD* Mutante VF39-19D (siehe 4.5.3.). Dabei wurde ein 766 bp *XbaI/SalI* Fragment (siehe Abb. 32) in die *XbaI/SalI* Schnittstellen von pK19mob kloniert. Das Ergebnis ist der Vektor pK19mob-*gabD* (Abb. 5). Der *lacZ* Promotor von pK19mob ist dabei entgegengesetzt zum *gabD* Leserahmen orientiert.

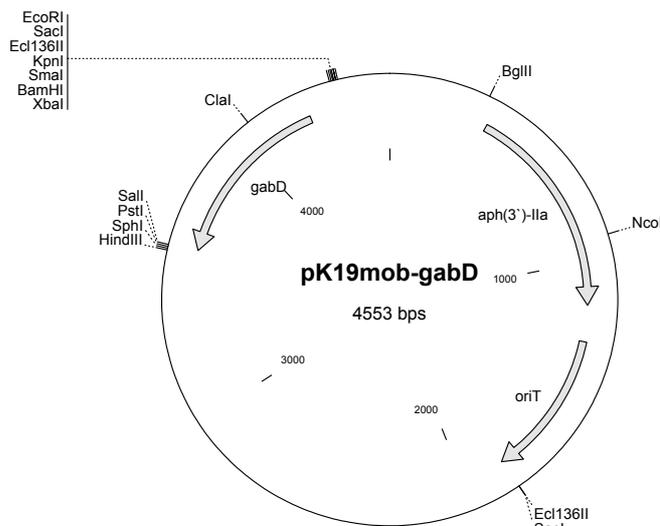


Abb. 5: Plasmidkarte von pK19mob-*gabD*. *aph(3')-IIa*: Kanamycin-/Neomycinresistenz; *oriT*: RP4 „origin of transfer“ zur konjugativen Mobilisierung.

### 3.2.4. pJP2

Die Konstruktion von pJP2 wird im Ergebnisteil näher beschrieben (siehe 4.4.2.). An dieser Stelle soll nur der Vollständigkeit halber eine Plasmidkarte präsentiert werden (Abb. 6).

### 3.2.5. pJP2-*gabT*

Dieses Konstrukt enthält die vermutete *gabT* Promotorregion (siehe 4.4.5.). Es entstand aus der Klonierung eines 572 bp *Sau3A* Fragments in die *BamHI* Schnittstelle von pJP2 (Abb. 7).

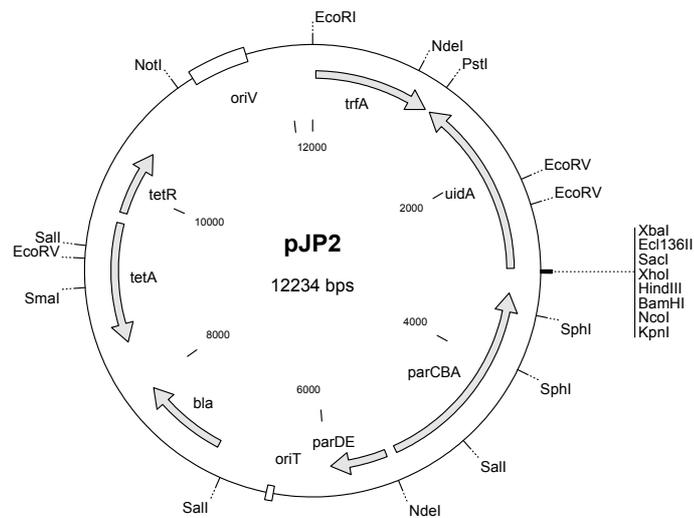


Abb. 6: Plasmidkarte von pJP2. *trfA*: Replikationsstart von RK2; *oriT*: Konjugationsstart von RK2; *uidA*:  $\beta$ -Glukuronidase (GUS); *parCBAD*E: Stabilitätsfunktionen aus RK2; *bla*: Ampicillinresistenz; *tetAR*: Tetracyclinresistenz; *oriV*: Replikationsstart aus RK2.

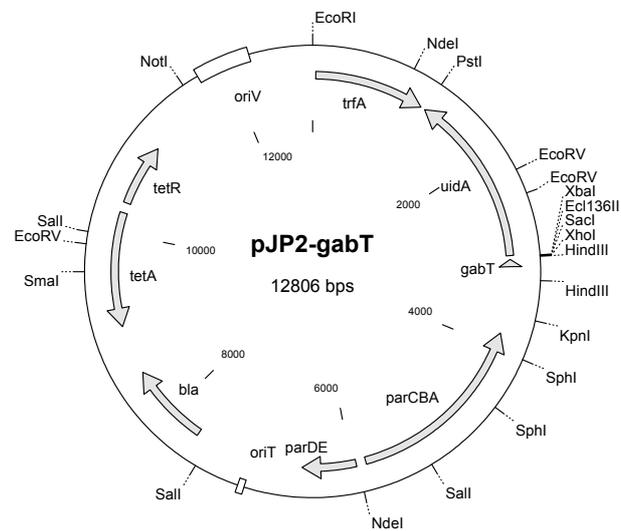


Abb. 7: Plasmidkarte von pJP2-*gabT*. *trfA*: Replikationsstart von RK2; *oriT*: Konjugationsstart von RK2; *uidA*:  $\beta$ -Glukuronidase (GUS); *parCBAD*E: Stabilitätsfunktionen aus RK2; *bla*: Ampicillinresistenz; *tetAR*: Tetracyclinresistenz; *oriV*: Replikationsstart aus RK2.

### 3.2.6. pJP2-gabR

Als Produkt der pJP2-gabT Klonierung entstand durch Insertion des *Sau3A* Fragments in umgekehrter Richtung auch das pJP2-gabR Konstrukt (Abb. 8).

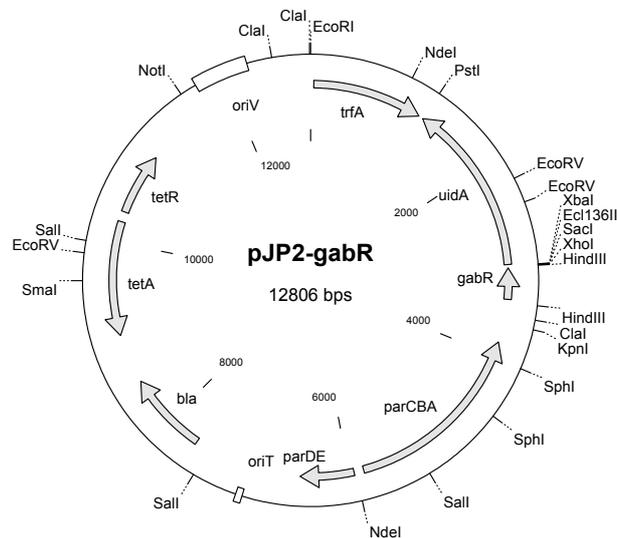


Abb. 8: Plasmidkarte von pJP2-gabR. *trfA*: Replikationsstart von RK2; *oriT*: Konjugationsstart von RK2; *uidA*: β-Glucuronidase (GUS); *parCBADE*: Stabilitätsfunktionen aus RK2; *bla*: Ampicillinresistenz; *tetAR*: Tetracyclinresistenz; *oriV*: Replikationsstart aus RK2.

### 3.2.7. pJP2-gabD

Zur Konstruktion von pJP2-gabD wurde ein 791 bp *BglII/SalI* Fragment (siehe 4.6.) in die *BamHI/XhoI* Schnittstellen von pJP2 kloniert (Abb. 9).

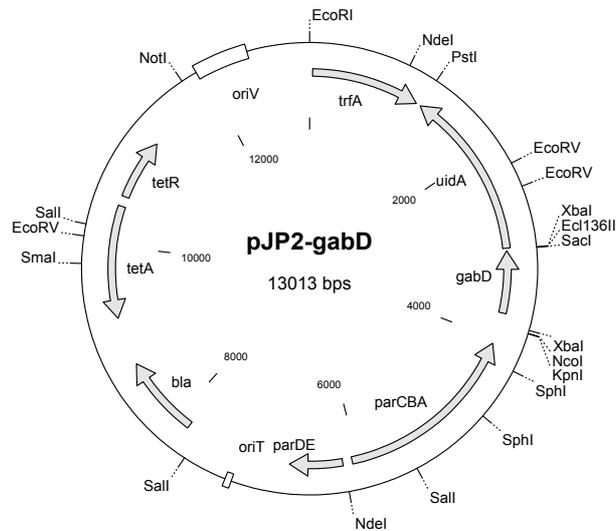


Abb. 9: Plasmidkarte von pJP2-*gabD*. *trfA*: Replikationsstart von RK2; *oriT*: Konjugationsstart von RK2; *uidA*:  $\beta$ -Glukuronidase (GUS); *parCBADE*: Stabilitätsfunktionen aus RK2; *bla*: Ampicillinresistenz; *tetAR*: Tetracyclinresistenz; *oriV*: Replikationsstart aus RK2.

### 3.3. Mikrobiologische Methoden

#### 3.3.1. Kultivierung von *E. coli* Stämmen

*E. coli* Stämme wurden generell auf LB Festmedien oder in LB Flüssigkulturen bei 37°C ü. N. angezogen (Maniatis *et al.*, 1982).

LB-Medium:	Trypton	10 g·l <sup>-1</sup>
	Hefeextrakt	5 g·l <sup>-1</sup>
	NaCl	5 g·l <sup>-1</sup>
für Festmedien:	Agar	15 g·l <sup>-1</sup>

Zur Selektion wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Kanamycin	25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Gentamycin	10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

### 3.3.2. Kultivierung von *R. leguminosarum* Stämmen

*R. leguminosarum* Stämme wurden in oder auf TY (Beringer, 1974) oder VMM (Vincent, 1970) Medium bei 30°C in der Regel über 1-3 Tage angezogen.

TY-Medium:	Trypton	5 g·l <sup>-1</sup>
	Hefeextrakt	3 g·l <sup>-1</sup>
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,7 g·l <sup>-1</sup>
für Festmedien:	Agar	15 g·l <sup>-1</sup>
VMM-Medium:	10 x Lösung A (autoklavieren):	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g·l <sup>-1</sup>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g·l <sup>-1</sup>
	10 x Lösung B (autoklavieren):	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5 g·l <sup>-1</sup>
	CaCl x 2 H <sub>2</sub> O	1 g·l <sup>-1</sup>
	FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g·l <sup>-1</sup>
	100 x Lösung C (sterilfiltrieren):	
	Biotin	10 mg·l <sup>-1</sup>
	Thiamin	10 mg·l <sup>-1</sup>
	Ca-Pantothemat	10 mg·l <sup>-1</sup>

Alleinige Kohlenstoffquellen bzw. Kohlenstoff- und Stickstoffquellen wurden in Konzentrationen von 0,2% (w/v) zugesetzt. NH<sub>4</sub>Cl wurde als ergänzende Stickstoffquelle zu alleinigen Kohlenstoffquellen in einer Konzentration von 0,1% (w/v) verwendet.

Als Substrate für GUS bzw. LacZ Färbungen wurde X-Glc bzw. X-Gal in Konzentrationen von 40 µg·ml<sup>-1</sup> eingesetzt.

pH Medien wurden mit 40 mM MES (pH 5,3-6,0) und 40 mM MOPS (pH 7,0) gepuffert und mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

Zur Selektion wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Streptomycin	500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Neomycin	80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Tetracyclin	10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Gentamycin	20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

### 3.3.3. Kultivierung von Erbsenpflanzen und Inokulation mit *Rhizobien*

Zur Inokulation mit definierten *Rhizobien*stämmen mußten zunächst Samen der entsprechenden Wirtspflanze oberflächensterilisiert und *rhizobien*-frei angezogen werden. Anschließend wurden die Pflanzen mit dem entsprechende Stamm beimpft und in sterilem Vermiculit unter semisterilen Bedingungen aufgezogen. Als Kontrolle wurden Pflanzen ohne *Rhizobien* angezogen. Die Pflanzen wurden regelmäßig mit stickstofffreiem Nodulations(NOD)-Medium gegossen.

Sterilisation und Anzucht von *Pisum sativum* Samen:

- *Pisum sativum* Samen 5 min in 2% Natrium-Hypochlorid-Lösung rühren.
- Anschließend Erbsen in sterilem Wasser mehrmals waschen und ü. N. im Kühlschrank quellen lassen.
- Die sterilisierten Erbsen auf sterilem Vermiculite ausgelegt und bei 23°C unter künstlichem Licht keimen.
- Gekeimte Samen in sterile Duranröhrchen (mit 10 cm feuchtem Vermiculit) oder in 10 x 10 cm Plastiktöpfe (mit 4 cm feuchtem Vermiculit) pflanzen und bei 23°C unter künstlichem Licht anziehen.

Nach mehrtägigem Wachstum der Pflanzen wurden zwei Impfösen frisch ausgestrichener *Rhizobien* in 5 ml NOD-Medium suspendiert. Mit dieser Suspension wurden die entsprechenden Pflanzen beimpft.

NOD-Medium:

Stammlösung A:	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	294 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Stammlösung B:	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Stammlösung B1:	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	58 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

Stammlösung C:  $\text{Fe}_3\text{-Zitrat} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$   $6,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Stammlösung D:  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   $123 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$   
 $\text{K}_2\text{SO}_4$   $87 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$   
 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   $0,333 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$   
 $\text{H}_3\text{BO}_3$   $0,247 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$   
 $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   $0,288 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$   
 $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$   $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$   
 $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   $0,056 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$   
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   $0,048 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Zu je 1 l autoklaviertem Milliporewasser wurden je 0,5 ml der Lösungen A, B, C und D sowie 1 ml der Lösung B1 zugegeben.

Nach vier Wochen wurden die Pflanzen geerntet.

### 3.3.4. Acetylen-Reduktions-Assay (ARA)

Die Nitrogenase akzeptiert als Substrat nicht nur molekularen Stickstoff, sondern auch einige andere Substrate. Ethin (Acetylen) z.B. wird von der Nitrogenase zu Ethen (Ethylen) reduziert. Dieses diffundiert schnell zurück in die Gasphase. Da sowohl Ethin als auch Ethen leicht gaschromatographisch getrennt und quantifiziert werden können, eignet sich diese Methode zur Messung der relativen Nitrogenaseaktivität.

- Die Duran-Glasröhrchen mit nodulierten Pflanzen luftdicht verschließen.
- 1ml Ethin in jedes Röhrchen injizieren.
- Inkubation der Plastikröhrchen ü. N..
- 100  $\mu\text{l}$  Gas aus den Röhrchen entnehmen und in den Gaschromatographen einspritzen.
- Die beiden Gase Ethin und Ethen wurden im Gaschromatographen (HEWLETT-PACKARD HP5890, Säule: HP Plot  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; Länge 15 m;  $\varnothing$  0,53 mm; 15  $\mu\text{m}$  Filmdicke) getrennt und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors quantitativ bestimmt. Ein angeschlossener Integrator ermittelte direkt die Flächen unter den Peaks der entsprechenden Gase und gab

prozentuale Verhältnisse aus (Bedingungen: Injektor-Temperatur 100°C, Detektor-Temperatur 150°C, Ofen-Temperatur 40°C).

- Standardmäßig wurden mehrere Pflanzen pro *Rhizobien* Stamm gemessen.

### 3.3.5. Präparation von Bakteroidensuspensionen

Zur Gewinnung von Bakteroidensuspensionen wurden 5-10 Knöllchen (oder 20-30 bei Fix<sup>-</sup> Phänotypen) in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt. Mit einem entsprechend geformten Metallmörser wurden die Knöllchen in Na-Phosphat Puffer (50 mM; pH 7,0) aufgeschlossen. Knöllchengewebe wurde durch vorsichtige Zentrifugation (5 min, 1250 rpm) entfernt. Der Überstand wurde dann pelletiert (5 min, 4500 rpm) und erneut in 500 µl Phospat Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde dann direkt in Reporterogenaktivitätsmessungen eingesetzt (siehe 3.4.5.).

### 3.3.6. Dünnschnitte von Knöllchen und histologische GUS Färbungen

Histologische Schnitte von Knöllchen wurden auf einem LEICA Vibratom hergestellt. Dazu wurden frische Knöllchen mit einem Skalpell von den Wurzeln abgetrennt und mit Sekundenkleber in Längsrichtung auf einen Vibratomträger aufgeklebt. Es wurden 80-100 µm dicke Longitudinalschnitte in Na-Phosphat Puffer (50 mM; pH 7,0) angefertigt und gesammelt. Anschließend wurde der Puffer entfernt und durch GUS-Färbepuffer ersetzt. Nach 30-60 min waren die Schnitte ausreichend gefärbt und wurden in Glutaraldehyd (2 mM) fixiert.

Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop ausgewertet und dokumentiert.

GUS-Färbepuffer:	Tris-HCl	100 mM
		pH 7,0
	NaCl	50 mM
	K-Ferricyanid	2 mM
	K-Ferrocyanid	2 mM
	X-Glc	2 mM

### 3.3.7. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA aus dem Medium durch bakterielle Zellen. Arten der Gattung *Bacillus* und *Pseudomonas* sind im Gegensatz

zu der Spezies *E. coli* unter normalen Bedingungen in der Lage, freie DNA aufzunehmen. *E. coli* kann durch die Behandlung mit Rubidiumchlorid oder Calciumchlorid für die Transformation kompetent gemacht werden. Es wird vermutet, daß durch eine Inaktivierung membrangebundener Nukleasen sowie einer Komplexierung negativer Ladungen Zellwandveränderungen hervorgerufen werden. Die veränderte Zellwand erhöht möglicherweise die Anheftungsfrequenz für freie DNA. Die eigentliche DNA Aufnahme in die Zelle hinein wird durch einen kurzzeitigen Hitzeschock erhöht.

Die Herstellung RbCl kompetenter Zellen erfolgte nach Hanahan (1983):

- 100-250 ml LB-Medium mit einer 5 ml ü. N. Kultur des entsprechenden *E. coli* Stamms animpfen.
- Die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 auf einem Schüttler inkubieren und anschließend abzentrifugieren.
- Das Pellet mit 30-50 ml kaltem Tfb I Puffer waschen und mindestens 10 min auf Eis inkubieren.
- Nach erneutem Abzentrifugieren (4°C) das Pellet in 4-10 ml kaltem Tfb II Puffer aufnehmen, vorsichtig resuspendieren und in 200 µl Aliquots separieren.
- Diese in flüssigem Stickstoff schockgefrieren.
- So präparierte Zellen können anschließend mehrere Monate bei -70°C gelagert werden.

Alle Schritte der Präparation müssen absolut steril durchgeführt werden.

Tfb I:	Kaliumacetat	30 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	RbCl	100 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)
		pH 5,8

TfB II:	RbCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	MOPS	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)
		pH 6,8

Die Puffer müssen steril filtriert werden.

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

- Ein Aliquot von kompetenten Zellen auf Eis auftauen und mit dem entsprechenden Ligationsansatz mischen.
- 30 min Inkubation auf Eis.
- Anschließend für 1 min einen Hitzeschock bei 42°C durchführen.
- Zugabe von 800 µl LB-Medium und Inkubation für 30-60 min bei 37°C.
- Je nach Ligation 50 µl bis 1 ml auf Selektivmedien ausplattieren (1 ml abzentrifugieren, im Rücklauf resuspendieren und ausplattieren).
- Inkubation der Platten ü. N. bei 37°C.

### 3.3.9. Mobilisierung von Plasmiden aus *E. coli* nach *R. leguminosarum*

Um Plasmide über Konjugation aus einem Donorstamm zu mobilisieren, muß dieser mit dem gewünschten Rezipientenstamm gekreuzt werden. Der Stamm *E. coli* S17-1 trägt die Transferfunktionen von RP4 (RK2) im Chromosom integriert (Simon *et al.*, 1983) und ist somit als Donor zur Konjugation geeignet.

Im Folgenden ist das Prinzip der effizienteren Filterkreuzung dargestellt.

- Den *Rhizobien* Rezipientenstamm in 10 ml TY-Medium bei 30°C bis zur späten logarithmischen Phase inkubieren (etwa 2-3 Tage).
- Am Tag vor der Kreuzung eine selektive Vorkultur des *E. coli* Donorstamms in 5 ml LB-Medium ansetzen und ü. N. inkubieren.
- Am nächsten Tag aus dieser Vorkultur eine frische Kultur animpfen und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 wachsen lassen.
- Die Kreuzung auf kleinen, sterilen Nitrozellulose-Filtern (Durchmesser 1 cm) auf unselektiven TY-Platten durchführen.

- Zur Kreuzung 0,5 ml der logarithmischen Donorkultur und 1 ml der Rezipientenkultur in einem Eppendorfgesäß mischen und 1 min abzentrifugieren. Das Pellet im Rücklauf resuspendieren und vorsichtig auf die Nitrozellulose-Filter auftragen.
- Die Konjugation fand ü. N. bei 30°C im Brutschrank statt.
- Die Kreuzungsfilter steril von der Platte nehmen, in ein Eppendorfgesäß überführen und in 1 ml sterilem Wasser vortexen, bis sich die Bakterienzellen vom Filter ablösen.
- Von dieser Suspension geeignete Verdünnungsstufen auf TY-Selektionsmedium ausplattieren.
- Die Platten 2-3 Tage bei 30°C inkubieren.

Zum Transfer stabiler Plasmidkonstrukte konnten der Donor- und Rezipientenstamm auch einfach auf einer unselektiven TY-Platte „übereinander gestrichen“ und ü. N. bei 30°C inkubiert werden. Anschließend wurde eine Impföse Zellmaterial auf Selektivmedium vereinzelt. Die Transferfrequenz bei dieser Methode ist deutlich niedriger als bei einer Filterkreuzung, reicht aber zum einfachen Plasmidtransfer aus, um genügend Transkonjuganten zu erhalten.

### **3.3.10. Transposonmutagenese**

Transposonmutagenesen wurden nach Simon *et al.* (1983) durchgeführt (Einzelheiten zur Konjugation, siehe 3.3.9.). Zur Mutagenese wurde der Tn5 tragende Suizidvektor pSUP1021 (Simon *et al.*, 1986) verwendet.

## **3.4. Biochemische Methoden**

### **3.4.1. Proteinextraktion aus *R. leguminosarum* Kulturen**

Kulturen der entsprechenden *Rhizobien* Stämme wurden über Nacht in 50-250 ml VMM mit 0,2% GABA und Glutamat angezogen und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,8 in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert (10 min, 8000 rpm, Sorvall SLA-3000). Das Pellet wurde in 20-50 ml eines 20 mM Phosphatpuffers (pH 7,2) resuspendiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1-4 ml Aufschlußpuffer (40 mM HEPES; 1 mM DTT; pH 7,0) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschallbehandlung (3 min, 90 Watt, 0,6 sek Intervalle).

Anschließend wurde der Extrakt durch Zentrifugation (25 min, 17000 rpm, Sorvall SS-34) geklärt.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und die Proteinextrakte innerhalb der nächsten 2 Stunden zu Aktivitätsbestimmungen verwendet.

### **3.4.2. Bestimmung des Proteingehalts der Rohextrakte**

Der Proteingehalt der Proteinextrakte wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

Dazu wurde eine Eichreihe mit einem Bovine Serum Albumine (BSA) Standard (0-20 µg) angelegt und parallel zu Verdünnungen der Proteinextrakte gemessen. 800 µl der einzelnen Proben wurden mit 200 µl BIO-RAD Protein Assay Solution versetzt, gemischt und nach 2 min die OD<sub>595</sub> bestimmt. Der Eichstandard erwies sich als so stabil (Regressionsgerade:  $y = 0,0455 x + 0,0075$ ; Bestimmtheitsgrad:  $R^2 = 0,9998$ ), daß er nach mehrmaligen Messungen nicht weiter wiederholt wurde. Die Verdünnungen der Proteinextrakte wurden von 1:200, 1:400 bis 1:800 angelegt und ein Mittelwert aus den im linearen Bereich der Eichgeraden liegenden Werte genommen. Die Proteingehalte der gewonnenen Rohextrakte lagen in der Regel zwischen 1 und 3 mg·ml<sup>-1</sup>.

### **3.4.3. GABA Aminotransferase Enzymaktivitäten**

Zur Bestimmung 2-Oxoglutarat abhängiger GABA Aminotransferase Aktivitäten wurde ein Assay nach Bartsch *et al.* (1990) gewählt. Dabei wurden in der Regel 250 µl Proteinextrakt in einem Gesamtvolumen von 500 µl gemessen. Die Assaybedingungen sahen dabei wie folgt aus.

2-Oxoglutarat	50 mM
GABA	150 mM
Tris-HCl	100 mM
Pyridoxalphosphat	0,1 mM

Die Reaktion wurde nach 1 h bei 37°C durch 5 min kochen abgestoppt. Es wurden 3 parallele Proben angesetzt.

Durch ein gekoppeltes Enzymassay wurde die Menge des gebildeten Glutamats bestimmt. Hier wurden folgende Bedingungen in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml eingestellt.

Hydrazin/Glycin	40 mM/50 mM
	pH 7,6
NAD <sup>+</sup>	2,7 mM
Glutamat Dehydrogenase	3 Units
(GDH; SIGMA ALDRICH, G-2626)	

Parallel dazu wurde eine doppelte Eichreihe eines Glutamatstandards angelegt (0-120 nmol pro Ansatz). Die Ansätze der Proben wurden als Doppelansätze mit einer GDH freien Probe gemessen. Die enzymfreie Probe galt als Nullwert für die eigentlichen Meßwerte. Die Proben wurden 1,5 h bei 37°C inkubiert, präzipitiertes Protein abzentrifugiert (10 min, 12000 rpm) und anschließend die OD<sub>340</sub> bestimmt. Bei 340 nm läßt sich dabei die Menge des gebildeten NADHs quantifizieren und mit dem Standard vergleichen. Die Enzymaktivitäten wurden dann als Menge des gebildeten Glutamats in nmol·min<sup>-1</sup>·mg Protein<sup>-1</sup> angegeben.

Pyruvat abhängige GABA Aminotrasferase Aktivitäten wurden auf gleiche Weise bestimmt. Anstelle des 2-Oxoglutarats wurde Pyruvat (ebenfalls 50 mM) ins Assay eingesetzt. Von den Rohextrakten wurde auf Grund der viel höheren Aktivitäten nur 10-20 µl verwendet.

Die anschließende Alaninbestimmung erfolgte wieder parallel zur Glutamatbestimmung, mit folgenden Abweichungen:

Hydrazin/Glycin	40 mM/50 mM
	pH 9,0
NAD <sup>+</sup>	2,7 mM
Alanin Dehydrogenase	0,5 Units
(ADH; SIGMA ALDRICH, A-7653)	

Zur Ermittlung Pyruvat abhängiger β-Alanin Aminotransferase Aktivitäten wurde im Assay GABA gegen β-Alanin ausgetauscht. Ansonsten wurde gleich verfahren.

### 3.4.4. Succinatsemialdehyd Dehydrogenase Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Succinatsemialdehyd Dehydrogenase (SSDH) Aktivitäten wurde ein Assay von L. Green *et al.* (2000) modifiziert. Da nach dem ursprünglichen Protokoll keine Linearität der enzymatischen Umsetzung erreicht werden konnte wurde zur Vermeidung der Rückoxidation des Reaktionsprodukts NADH durch CytochromC Oxidase KCN zugesetzt. Diese Maßnahme erbrachte stabilere Reaktionsverläufe. Das Assay setzte sich wie folgt zusammen:

Succinatsemialdehyd	2,5 mM
NAD <sup>+</sup>	1 mM
Tris-HCl	50 mM
	pH 8,0
DTT	1 mM
KCN	10 mM

Succinatsemialdehyd neigt in neutralem Medium mit Sauerstoff zur Polymerisierung. Dies wurde nach Öffnen der Stickstoff befüllten Lieferverpackung durch Mischen der Ausgangslösung mit 0,2 M HCl (1:1) vermieden. Diese angesäuerte Stammlösung ist stabil und wurde anschließend mit 0,1 M HCl entsprechend verdünnt und durch Zugabe der gleichen Menge 0,1 M NaOH kurz vor Reaktionsstart neutralisiert (L. Green, persönliche Mitteilung).

Die Enzymaktivität wurde durch Zunahme der Absorption bei 340 nm detektiert. Durch Zugabe verschiedener Mengen der Proteinextrakte wurde die Linearität der Reaktion bezüglich der Proteinmenge überprüft, um Substratmangel oder -hemmung auszuschließen. Aus den Steigungen der Kurven ließen sich nach Abzug der Kontrolle ohne Protein die Enzymaktivitäten berechnen. Dabei wurde der äquivalente Umsatz von Succinatsemialdehyd und NAD<sup>+</sup> vorausgesetzt. Ein typischer Datensatz ist in Abb. 10 dargestellt. Die Aktivitäten wurden als Menge gebildetes NADH in  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$  dargestellt.

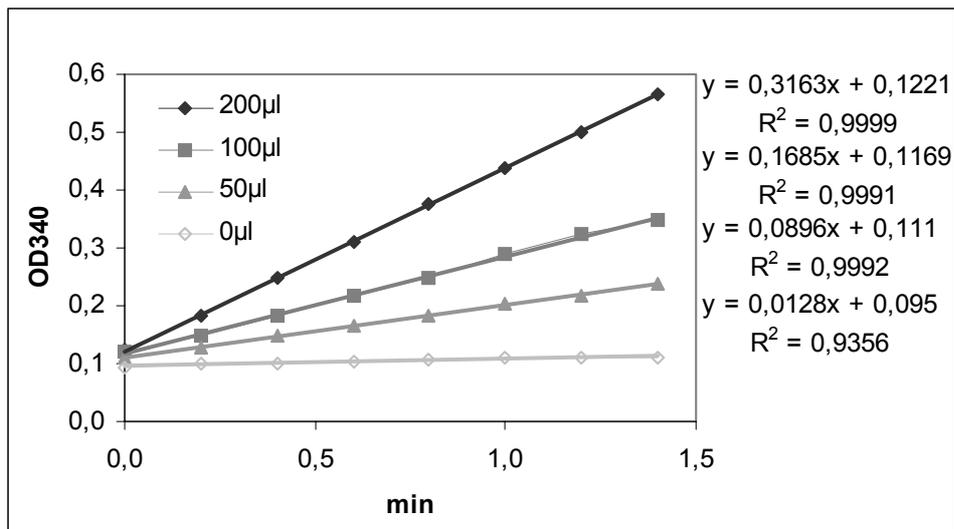


Abb. 10: Typische Daten einer SSDH Aktivitätsbestimmung. Die einzelnen Geraden stellen die Zunahme des Reaktionsprodukts NADH (Absorption bei 340 nm) bei Zugabe verschiedener Rohextraktmengen dar. Rechts sind die Steigungen der entsprechenden Regressionsgeraden angegeben, die zur Berechnung der Aktivitäten dienen.  $R^2$  stellt das Bestimmtheitsmaß der Regression dar.

### 3.4.5. GUS und LacZ Assay

Zur Bestimmung von Reporterogenaktivitäten wurden 700 µl Aliquots aus den zu messenden Kulturen entnommen und ihre  $OD_{600}$  bestimmt. Aus der Küvette wurden anschließend 250 µl Kultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Extraktionspuffer gemischt. Das Gefäß wurde in einen 37°C Thermoblock gestellt und eine Minute inkubiert. Anschließend wurde das Assay durch Zugabe von 50 µl PNPG (p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucuronid) Lösung ( $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) gestartet und für 20 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch 200 µl  $\text{CaCO}_3$  Lösung (1 M) gestoppt.

Extraktionspuffer:	15 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1 M
	10 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1 M
	8 ml Sarkosyl	10% (w/v)
	8 ml Triton-X-100	10% (v/v)
	2,5 ml KCl	1 M
	250 µl $\text{MgSO}_4$	1 M
	675 µl $\beta$ -Mercaptoethanol	
	auf 400 ml mit $\text{H}_2\text{O}$ auffüllen und kühl lagern	

Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min, 12000 rpm) entfernt und die verbleibende Lösung in eine Küvette überführt. Die durch das p-Nitrophenolat entstandene Gelbfärbung wurde bei 415 nm bestimmt.

Hierbei wurde festgestellt, daß die Linearität von GUS oder LacZ Assays in Bezug auf die Faktoren Zeit, Verdünnung der eingesetzten Kultur oder Verdünnung der Reaktionslösung starken Abweichungen unterliegt (Bert Boesten, RWTH-Aachen, persönliche Mitteilung und eigene Erfahrungen). Deshalb wurde zur besseren Vergleichbarkeit die Zeit in allen Messungen konstant (20 min) gehalten. Die Kulturen mußten nicht verdünnt werden, da sie eine OD<sub>600</sub> von 1 selten überschritten. Bei OD<sub>415</sub> Werten über 1,1 wurden Verdünnungen mit Wasser vorgenommen. Diese zeigten im Vergleich zu den anderen oben genannten Faktoren relativ gute Linearitäten.

Aus diesen Daten wurden Reporterenzymaktivitäten berechnet. Die Daten wurden als Menge gebildeten p-Nitrophenols (PNP) in nmol·min<sup>-1</sup>·OD<sub>600</sub> Unit<sup>-1</sup> ausgedrückt.

Im Falle von LacZ Messungen wurde gleich verfahren. Anstelle von PNPG wurde ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid) in gleicher Konzentration eingesetzt. o-Nitrophenolat wurde bei 420 nm detektiert. Die Aktivitäten wurden je nach Gebrauch zur besseren Vergleichbarkeit in Miller-Units (Miller, 1972) umgerechnet.

### **3.5. Computergestützte Auswertung**

#### **3.5.1. Clone Manager 5.03**

Im Clone Manager 5.03 (Scientific & Educational Software, © 1995-98) wurden sämtliche Klonierungen geplant und dokumentiert (siehe 3.2.). Die Sequenzierdaten wurden nach BLAST Analysen mit Hilfe dieser Software zusammengeführt und eine erste Identifizierung von unbekanntem ORFs (open reading frame) in den Tn5-B20 flankierenden Sequenzen vorgenommen.

#### **3.5.2. NCBI BLAST2**

Die NCBI BLAST2 Software (Altschul *et al.*, 1997) erlaubt Vergleiche von Protein und Nukleotidsequenzen mit der NCBI-nr Datenbank. Hiermit war die Identifizierung und letztendliche Positionierung der ORFs der sequenzierten Bereiche, die in dieser

Arbeit präsentiert werden, möglich. Außerdem konnten die Sequenzierdaten beider Stränge hiermit auf ihre Identität überprüft werden.

### **3.5.3. ClustalX 1.81**

Die ClustalX 1.81 Software (Thompson *et al.*, 1997) erlaubt Homologievergleiche von Sequenzdaten. In dieser Arbeit wurde das Programm zum Vergleich der zur untersuchten GABA Aminotransferase ähnlichsten Proteinsequenzen aus der NCBI-nr Datenbank verwendet. Als Ergebnis wird eine Konsensusanalyse ausgegeben (Details hierzu siehe unter „Help“-Funktion des Programms).

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Genetische Karte und Sequenz des *gabT* tragenden 2,5 kb *Sall* Fragments

Zu Beginn dieser Arbeit stand die eingangs beschriebene Mutante PH10 zur Verfügung. Nach Klonierung eines Kanamycinresistenz vermittelnden 10,7 kb *Sall* Fragments aus der Gesamt DNA der Mutante in den Vektor pSVB28 (pSVB28-PH10*Sall*), wurde von den das Transposon begrenzenden, chromosomalen Sequenzen zunächst eine Restriktionskartierung vorgenommen.

In Abb. 11 ist das 2,5 kb *Sall* Fragment dargestellt, das den gesamten kodierenden Bereich der *R. leguminosarum* VF39 spezifischen GABA Aminotransferase (*gabT*) trägt. Die Abbildung enthält alle, für weitere Klonierungen verwendete Restriktionsschnittstellen, sowie die Insertionsstelle des Transposon Tn5-B20 (8,2 kb). Des Weiteren sind die im späteren Verlauf näher beschriebenen Fragmente der doppelsträngigen Sequenzierung als Pfeile im unteren Bereich der Abbildung angegeben. Die eingetragenen kodierenden Bereiche sind aufgrund von ebenfalls im späteren Verlauf näher beschriebenen Homologievergleichen als solche bezeichnet worden.

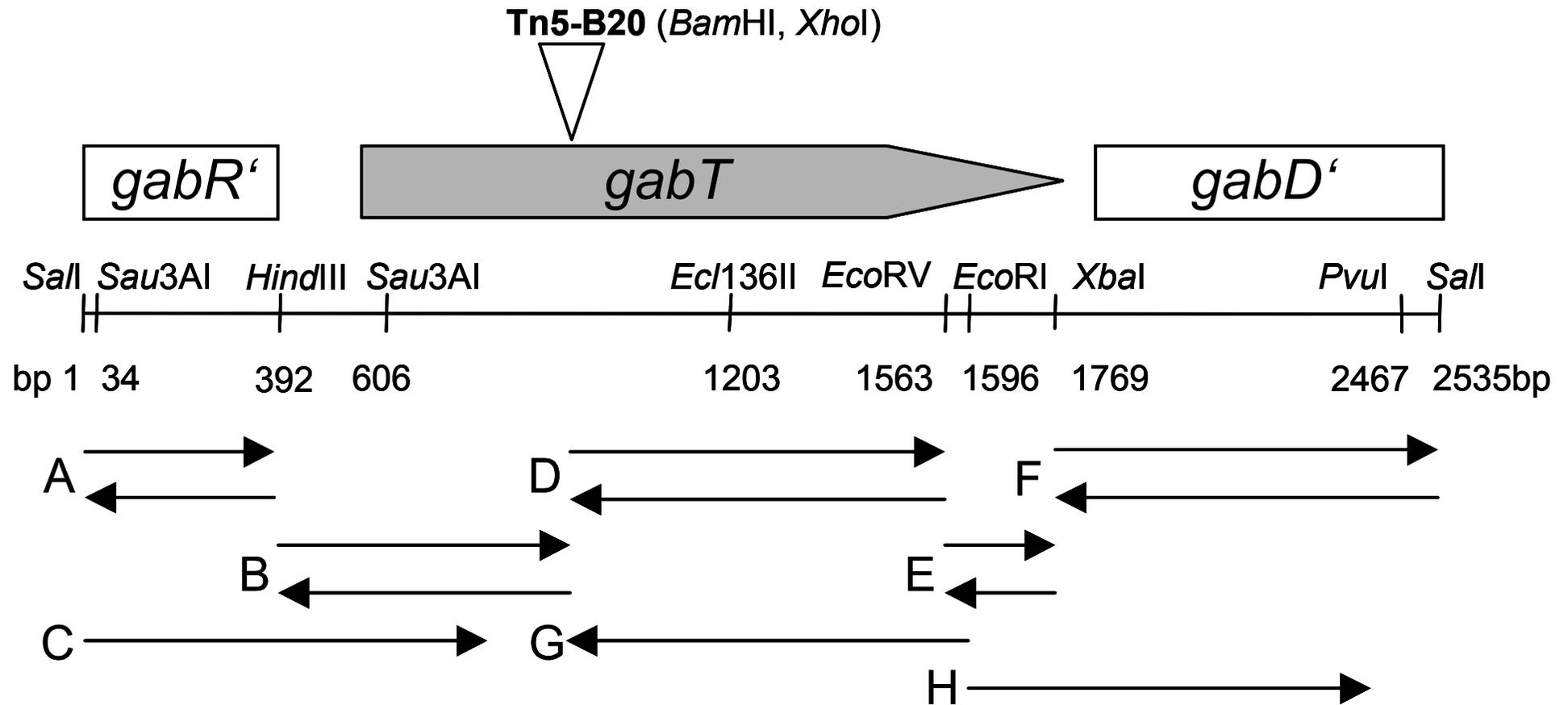


Abb. 11: Genetische Karte des *gabT* tragenden 2,5 kb *SalI* Fragments. Angegeben sind die Lage der identifizierten Leserahmen, relevanten Restriktionsschnittstellen und die Insertionsstelle des Transposons. *Bam*HI und *Xho*I sind Schnittstellen innerhalb des Transposons, die zur Erzeugung von Subklonen verwendet wurden. Die mit Buchstaben bezeichneten Pfeile im unteren Teil geben die zur Ermittlung der Sequenz verwendeten Bereiche der einzelnen Subklone wieder (siehe auch 4.1.1).

#### 4.1.1. Ermittlung der Sequenz

Zur korrekten Ermittlung der Sequenz des 2,5 kb *gabT* tragenden *Sall* Fragments mußten verschiedenste Sequenzdaten zusammengefügt werden.

Zunächst einmal wurde ein 392 bp großes *Sall-HindIII* (Abb. 11: A) und ein ca. 600 bp *HindIII-BamHI* Fragment (B) aus pSVB28-PH10*Sall* kloniert und doppelsträngig sequenziert. Die *BamHI* Schnittstelle ist dabei im linken IS50 Element von Tn5-B20 lokalisiert. In einem ca. 1000 bp *Sall-BamHI* Fragment (C) wurde über die für die Subklone verwendete *HindIII* Schnittstelle hinweggelesen.

Ein ca. 2100 bp großes *XhoI-Sall* Fragment diente als Grundlage zur Sequenzierung der downstream Sequenzen. Die *XhoI* Schnittstelle liegt dabei im rechten IS50 Element des Transposons. Zunächst wurde ein ca. 1100 bp *XhoI-EcoRV* Fragment (D), ein 206 bp *EcoRV-XbaI* (E) und ein 766 bp *XbaI-Sall* Fragment (F) kloniert und jeweils doppelsträngig sequenziert. Das 1100 bp *XhoI-EcoRV* Fragment wurde dabei in einer Richtung mit dem Transposon spezifischen IS50out Primer sequenziert, was die Sequenzierlänge des Fragments auf ca. 700 bp verkürzte. Jeweils ein *XhoI-EcoRI* (G) bzw. ein *EcoRI-Sall* Fragment (H) diente dem Überlesen der für die Subklone verwendeten Schnittstellen.

Die ermittelten Sequenzen wurden verglichen und im Clone Manager 5.03 per Hand zusammengesetzt. Dabei konnten auch die 9 duplizierten Basen des durch die Transposoninsertion eingeführten „direct repeats“ identifiziert und entfernt werden.

Die Sequenz wurde unter der Accessionnummer AF335502 in der NCBI Genbank deponiert.

#### 4.1.2. Sequenz und relevante genetische Strukturen

Die Sequenz des 2535 bp *gabT* tragenden Fragments ist in Abb. 12 angegeben. Die Abbildung zeigt alle relevanten Restriktionsschnittstellen, inklusive der 9 bp des durch die Transposoninsertion hinterlassenen „direct repeats“ (Box).

Die vermuteten offenen Leseraster (open reading frame, ORF) wurden mit Hilfe von Clone Manager 5.03 (Funktion: „ORF Search“) und dem NCBI BLASTX System (Altschul *et al.*, 1997) aufgefunden und anschließend wie im folgenden beschrieben identifiziert. Die jeweiligen Startkodons sind durch Boxen markiert, Stopkodons

(Stop) und vermutete Ribosomenbindungsstellen (RBS) wurden entsprechend gekennzeichnet.

*SalI* *Sau3A*

1 TCGACGAGGTGACGCCGATGTCGCCGGCCACCTGATCGAGCGTCTTGCCGTTTCGCATGGC

61 GCAGGCTGCGCAGCTTGCGGCCGAGGCCGGTATCCTGGCTTGCCCTCGGCGCCATCGGCGG

121 AAGGCTCCTCGCTCTCCAGCGCCTCGCGAATTGCTGCGGGATTAAGGCCCGCTCGACAC

181 GATACCAGGAAATGCGCTTTAGCCGCGCCACATCGTCGGCGCTGTATTGCCGATGGCCGG

241 TTTCCGAACGGCCGGGAACCACCAAACCCTGGCTTTCCCAAAGGCGCAGCGTCGAGGCCG

301 ACACGCCCGCCAGCCGCGCGGCTTCCGCCACCTTGTAGCGCACAGGCCCGTTATCGTTCA

◀ *Start gabR'* *HindIII*

361 TCCGCCAGTATCCCTGAATCCAATCGCCCCAAAGCTTTCATCAAAAAACGTGATGTTTGA

421 AGCAAAAATGCCGCTTGTTTTCTTGCAGGAAAATGTAGGTGTTTTATATACATCTTGCA

*Start gabT* ▶

481 GAAAATATACAAGATAGTTTTCAACCCTTTCAGCGGAGGAGCCATCGATGAACGCGACAA

RBS m n a t s

541 GCCTTACGGACCGGAAGAACGCCGCCATTTCCCGCGGCGTCGGCATGACGACCCAGATTT

l t d r k n a a i s r g v g m t t q i y

*Sau3A*

601 ATGCGGATCGTGCAGAGAATGCCGAGATCTGGGACAAGGAGGGCCGCGTTACATCGATT

a d r a e n a e i w d k e g r r y i d f

661 TCGCCGCCGGCATCGCCGTTCTCAATACCGGCCACCGCCATCCCCGGGTCATCGCAGCGG

a a g i a v l n t g h r h p r v i a a v

721 TCAAGGATCAGCTCGACCGATTCACCCATACCTGCCATCAGGTGGTGCCCTATGAAAGCT

k d q l d r f t h t c h q v v p y e s y

781 ACGTACACCTTGCCGAACGACTGAACGCGCTGCTGCCTGGTGATTTTCGAGAAGAAGACGA

v h l a e r l n a l l p g d f e k k t i

841 TCTTCGTCACGACGGGTGCCGAAGCGGTTCGAGAACGCCGTCAAGATCGCGCGCGCCGCAA

f v t t g a e a v e n a v k i a r a a t

„direct repeat“ der Tn5-B20 Insertion

901 CCGGCCGCTCGGCCGTCATCGCCTTTGGCGGGCGGGTTCCATGGCCGCACCTTCATGGGCA  
g r s a v i a f g g g f h g r t f m g m

961 TGGCGCTGACCGGCAAGGTCGTGCCCTACAAGGTCGGCTTCGGCGCGATGCCCCGGCGACG  
a l t g k v v p y k v g f g a m p g d v

1021 TGTTCCATATTCCCTTCCCGGTCGAGCTGCACGGCGTCACCGCCGATCAGTCGCTGGCGG  
f h i p f p v e l h g v t a d q s l a a

1081 CACTGAAGAAGCTCTTCGCCGCCGATGTCGATCCGCAGCGCGTCGCGGCCATCATCATCG  
l k k l f a a d v d p q r v a a i i i e

1141 AGCCGGTACAGGGCGAAGGCGGCTTCTACTCCGCACCTGCTGCCTTCATGAAGGCGCTGC  
p v q g e g g f y s a p a a f m k a l r  
*Ecl136II*

1201 GCGAGCTCTGCGACCAGCACGGCATCCTGCTGATCGCCGACGAGGTGCAGACCGGTTTTG  
e l c d q h g i l l i a d e v q t g f a

1261 CCCGCACCGGCAGAATGTTTCGCGATGGATCATCACGAGGTGGCGCCCGACCTGACGACGA  
r t g r m f a m d h h e v a p d l t t m

1321 TGGCAAAGAGCCTGGCCGGCGGCTTTCGCTCGCCGCCGTCACCGGCCGCGCCGCGATCA  
a k s l a g g f p l a a v t g r a a I m

1381 TGGATGCGCCGGGACCTGGCGGGCTCGGCGGCACCTATGGCGGCAATCCGCTTGGGATCG  
d a p g p g g l g g t y g g n p l g I a

1441 CCGCTGCCCATGCCGTGCTCGACGTCATTGTGGACGAGGATCTCTGCAACCGCGCCAACC  
a a h a v l d v I v d e d l c n r a n l

1501 TGCTCGGCGGACGGCTGAAGCAGCGGCTGGAATCAATGCGCGAGACGGTGCCGGAGATCG  
l g g r l k q r l e s m r e t v p e I v  
*EcoRV* *EcoRI*

1561 TCGATATCCGCGGGCCGGGCTTCATGAACGCCGTCAATTCGAATTCCAACGACCGGACGACGGGAC  
d I r g p g f m n a v e f n d r t t g l

1621 TGCCAAGTGCGGAATTCGCCAACC GGGTGCGGCTGATCGCACTCGACAAGGGCCTGATCC  
p s a e f a n r v r l I a l d k g l I l

1681 TGCTCACCTGCGGCGTCCACGGAAACGTCATCCGCTTCCCTCGCGCCAATCACCATCCAGG  
l t c g v h g n v I r f l a p I t I q d  
*BglIII* *XbaI*

1741 ACGAGATCTTCGGCGAAGCGCTCGATATTCTAGAGGCCTCCATGCTGCAAGCAAGCGCGG  
e I f g e a l d i l e a s m l q a s a a  
Stop ◀

1801 CCAAGTGATCGCACCCGAACCTGGATTTCAATGGCTGCCGGCAACCGGCAGCCGCACTCCC  
k  
*Start gabD'* ▶

1861 AAGGAGGATATGACATGGCTTTCACCAGCGCACTGACCAAGCACGTTCCCTTCTCCTCGC  
RBS

1921 CCCTGCTGCGCGATGCCGGCTATATCGACGGCGTCTGGACATCAGGCGATGCCACAAAGA

1981 CTTTCGACGTGCTGAACCCGGCAACCGGCGAGCTGCTCGCCTCGCTGCCCGATATGGGTG

2041 CGGCCGAGACGCGGGCGGCAATCGATGCGGCCCATGCCGCCAGCCGGGCTGGGCTGCC

2101 GTCCGGCCAGGGAGCGCAGCACGATCCTGCGCAAATGGTTCGACCTGATGGTCGCCAATG

2161 CCGACGAACTCGCGGCGATCCTGACCGCCGAAATGGGCAAGCCGTCCCCGGAAGCGCGCG

2221 GCGAGATCCTTTATGCCGCGGCCTATATCGAATGGTACGCGGAAGAAGCCAAGCGCATCT

2281 ACGGCGAGACGATCCCCGCGCCTTCCGACGATAAACGGATGATCGTCATCAGGCAGCCGG

2341 TCGGCGTCGTCCGGCACGATCACGCCGTGGAATTTCCCGGCGGCGATGATCACTCGCAAGA

2401 TCGCCCCGGCGCTTGCCGTCCGGCTGCACCGTGGTCTCGAAGCCCCGCCGAACAGACGCCGC

*PvuI*

2461 TGACGGCGATCGGCTTGCCGTGCTCGCCGAGCAGGCCGGCATTCCGGCCGGCGTCTTCA

*SalI*

2521 ACGTCATCGTCGGGGTCGA

Abb. 12: Sequenz des *gabT* tragenden 2535 bp *SalI* Fragments. Angegeben sind alle verwendeten Restriktionsschnittstellen, vermutliche Start- und Stopkodons (Boxen), Ribosomenbindungsstellen (RBS) und die 9 Basen des „direct repeats“ der Tn5-B20 Insertion. Weiterhin sind die 426 Aminosäuren der translatierten, theoretischen GabT Proteinsequenz eingefügt.

#### 4.1.3. Identifizierung von *gabT*

Die Identifizierung der ORFs erfolgte durch Homologievergleiche auf Proteinebene. Die translatierte, theoretische Aminosäuresequenz des *R. leguminosarum* VF39 GabT Genproduktes besteht aus 426 Aminosäuren (aa) und hat ein hypothetisches Molekulargewicht von 45,4 kDa. Die Sequenz wurde mit Hilfe der NCBI BLASTP Software (Altschul *et al.*, 1997) mit der NCBI-nr Datenbank verglichen.

Im Folgenden werden Ergebnisse eines Homologievergleiches vom 08.03.2002 vorgestellt. Die Homologiedaten sowie die entsprechenden Zitate sind in Tab. 2 aufgelistet. Ein visualisierter Homologievergleich wurde mit ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt und ist in Abb. 13 dargestellt.

Tab. 2: Homologiedaten der translatierten *GabT* Sequenz eines BLASTP Vergleichs vom 08.03.2002. Angegeben sind die in der NCBI Datenbank angegebenen Proteinbezeichnungen, die NCBI Protein Accessionnummer, die Länge der entsprechenden Sequenz, sowie der Anteil identischer Aminosäuren (in %).

Organismus	Proteinbezeichnung	Accesion	Aminosäuren	Identität (%)	Zitat
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	„putative 4-aminobutyrate aminotransferase“	NP437392	426	88	Finan <i>et al.</i> , 2001
<i>Mesorhizobium loti</i>	„4-aminobutyrate aminotransferase“	NP106172	429	81	Kaneko <i>et al.</i> , 2000
<i>Ralstonia solanacearum</i>	“probable 4-aminobutyrate aminotransferase”	NP518150	426	64	Salanoubat <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> K12	“4-aminobutyrate aminotransferase, <i>goaG</i> ”	P50457	421	61	Janovic & Model, 1997
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933	“4-aminobutyrate aminotransferase”	AAG56502	421	60	Perna <i>et al.</i> , 2001
<i>Yersinia pestis</i>	“putative aminobutyrate aminotransferase”	NP406352	429	57	Parkhill <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas putida</i>	“delta-aminovalerate aminotransferase”	AAK97868	425	57	Espinosa-Urgel & Ramos, 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	“4-aminobutyrate aminotransferase activity”	AAG03655	426	57	Stover <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i> O157:H7	“4-aminobutyrate aminotransferase activity”	NP311550	426	56	Makino <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> K12	„4-aminobutyrate aminotransferase activity, <i>gabT</i> “	P22256	426	56	Bartsch <i>et al.</i> , 1990

Auch auf Nukleotidebene weist *gabT* aus *R. leguminosarum* VF39 hohe Homologien (~80% Identität) zu den entsprechenden Genen in den vollständigen Genomsequenzen von *S. meliloti* und *M. loti* auf. Diese hohen Homologiewerte zwischen den Spezies scheinen typisch, was Vergleiche mit anderen Sequenzendaten zeigte.

Weitere vermutliche GABA Aminotransferasen sind in den Genomsequenzen der beiden Spezies nicht annotiert.

Als funktional verwandt muß eventuell eine „ $\omega$ -amino acid pyruvate aminotransferase“ (EC 2.6.1.18) in der Sequenz des *S. meliloti* Genoms (SMc01534) angesehen werden, die mit 83% Homologie auf Proteinebene wahrscheinlich identisch mit einer „ $\beta$ -alanine pyruvate aminotransferase“ aus *M. loti* (mll1632) ist. Zu beiden Proteinsequenzen zeigt GabT aus *R. leguminosarum* VF39 eine Identität von 31% bzw. 28%.

Ein solches Enzym ist aus *Pseudomonas* sp. F-126 bekannt und wurde dort durch beide oben genannte Namen bezeichnet (Yonaha *et al.*, 1976). Die höchste Aktivität dieses Enzyms bezüglich des Aminodonors zeigte sich in Assays mit  $\beta$ -Alanin, aber auch mit GABA wies das Enzym 40% seiner maximalen Aktivität auf.

Auf dieses Gen wird gegen Ende dieser Arbeit noch einmal eingegangen werden.

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

NP437392      -----MTSLTD-----RKNAAISRGVGMTTQVYADRAENAEIWDKEGNRYIDFAAGIA
NP106172      MKDIMKNSAISE-----RKNQISIRGVGMTTQIYADRAENSEIWDVEGRRYIDFSSGIA
P50457        ----MSNNEFHQ-----RRLSATPRGVGVMCNFFAQSAENATLKDVEGNEYIDFAAGIA
AAG56502      ----MSNNEFHQ-----RRLSATPRGVGVMCNFFAQSAENATLKDVEGNEYIDFAAGIA
NP406352      ----MSHRELEQ-----RRKEATPRGIGVLCDFYAVRAENATLWDEQGREYIDFTAGIA
NP518150      ----MNARDPQHNAQWNARRLAATPRGVGVMTRDYAEHAENAQFWDVEGKRYIDFAAGIA
AAK97868      --MSKTNESLMQ-----RRVAAVPRGVGQIHPIFVDTAKNSTVIDVEGRELIDFAGGIA
AAG03655      --MSKTNESLLK-----RRQAAVPRGVGQIHPVVAERAENSTVWDVEGREYIDFAGGIA
NP311550      ---MSSNKELMQ-----RRSQAI PRGVGQIHPIFADRAENCRVWDVEGREYLDFAGGIA
P22256        ---MNSNKELMQ-----RRSQAI PRGVGQIHPIFADRAENCRVWDVEGREYLDFAGGIA
Konsensus          .          *:   : .**:*          .  *:* . . * :*.. :**:.***

```

```

NP437392      VVNTGHRHPKVIAAVKAQLDRFTHTCHQVVPYENYVHLAERLNAIVPGD-----FAKK
NP106172      VVNTGHRHPRVIEAVKAQLDRFTHTCHQVVPYESYVRLAERLNAMLPGK-----FEKK
P50457        VLNTGHRHPDLVAAVEQQLQQFTHTAYQIVPYESYVTLAEKINALAPVS-----GQAK
AAG56502      VLNTGHRHPDLVAAVEQQLQQFTHTAYQIVPYESYVTLAEKINALAPVS-----GQAK
NP406352      TLNIGHRHPKVMMAVRQQLDQFTHTAYQVVPYASYVTLAEKINSLAPISDSNMTAAGNSK
NP518150      VVNTGHRHPRLVQAVREQLERFTHTAFQIVPYASYVELAERLNTLTPGA-----HAKK
AAK97868      VLNTGHLHPKVVAAVQEQLTKVSHTCFQVFLAYEPYVELCEKINKLVPGD-----FDKK
AAG03655      VLNTGHLHPKVIAAVQEQLGKLSHTCFQVFLAYEPYIELAEEIAKRVPGD-----FPKK
NP311550      VLNTGHLHPKVVAAVEAQLKKSHTCFQVFLAYEPYELCEIMNQKVPGD-----FAKK
P22256        VLNTGHLHPKVVAAVEAQLKKSHTCFQVFLAYEPYELCEIMNQKVPGD-----FAKK
Konsensus      .:* ** ** * : : ** . ** :.:**..*.:.* * : * . * : *

```

NP437392 TIFVTTGAEAVENAVKIIARAATGRQAVVAFGGGFHGRFTFMGMALTKGVVVPYKVGFGAMPA  
NP106172 TIFVTTGAEAVENAIKIARNATGRPAVIAFAGGFHGRFTFMGMALTKGVVVPYKVGFGAMPG  
P50457 TAFFTTGAEAVENAVKIIARAHTGRPGVIAFSGGFHGRTYMTMALTKGVVVPYKIGFGPFPG  
AAG56502 TAFFTTGAEAVENAVKIIARAHTGRPGVIAFSGGFHGRTYMTMALTKGVVVPYKIGFGPFPG  
NP406352 TAFFTTGVEAIENAVKIIARAATGRPGVIAFSGAFHGRLLAMALTKGRAVPYKVGFGPFPA  
NP518150 TAFFSTGAEAVENAIKIARAHTGRPGVIALTGAFHGRFTFMGMSLTGKVVPYKTGFGPFPG  
AAK97868 TLLVTTGSEAVENAVKIIARAATGRAGVIAFTGGYHGRMTMTLGLTGKVVPYSAGMGLMPG  
AAG03655 TLLVTTGSEAVENAVKIIARAATGRAGVIAFTGAYHGRMTMTLGLTGKVVPYSAGMGLMPG  
NP311550 TLLVTTGSEAVENAVKIIARAATKRSGTIAFSGAYHGRTHYTLALTKGVNPPYSAGMGLMPG  
P22256 TLLVTTGSEAVENAVKIIARAATKRSGTIAFSGAYHGRTHYTLALTKGVNPPYSAGMGLMPG  
Konsensus \* :.:.\* \*\*:\*:\*:\*:\*:\* \* \* ..:.\* \*.:\*\*\*\*\* :.\*\*\*:. \*\*.\*:\* :.\*.

NP437392 DVFHAPFPIELHGVTVSEQSLSALKKLF AADVDPARVAAI IIEPVQEGGGFYVPVPTAFMKA  
NP106172 DVYHAPFPVPLHGVSVADSLAALDRLFKADVDPARVAAI IVEPVQEGGGFYVAPREFLTA  
P50457 SVYHVPYPSDLHGISTQDSLDAIERLFKSDIEAKQVAAI IFEVPQEGGGFNVAPKELVAA  
AAG56502 SVYHVPYPSDLHGISTQDSLDAIERLFKSDIEAKQVAAI IFEVPQEGGGFNVAPKELVAA  
NP406352 SIFHALYPNELYGVSVEEAIISSVERLFRCDISPTQVAAI LFEPIQEGGGFNIAPPEFVSA  
NP518150 SIYHVPAPIALHGVSTQDSLDAI GR LFKADIDPRQVAAI IFEVPQEGGGFYQMPADFVRA  
AAK97868 GIFRALFPSELHGISVDDAIASVERIFKNDAPEDIAAI ILEPVQEGGGFLPAPKELMKR  
AAG03655 GIFRALAPCELHGVSEDDSIASIERIFKNDAPQDIAAI IIEPVQEGGGFYVNSKSFMQR  
NP311550 HVYRALYPCPLHGISEDDAIASIHRIFKNDAPEDIAAI VIEPVQEGGGFYAATPAFMQR  
P22256 HVYRALYPCPLHGISEDDAIASIHRIFKNDAPEDIAAI VIEPVQEGGGFYASSPAFMQR  
Konsensus :.:. \* \*:\*:\* :.: :. :.\* \* . :\*\*\*:.\*\*:\*:\*:\* \* . ::

NP437392 LREVCQDQHGILLIADEVQTFGARTGKLFAMEHHGV-APDLTMAKSLAGGFPLAAVTGRA  
NP106172 LRKLCQDQHGMLLIADEVQTFGARTGKMFAMDHHEV-AADITMAKSLAGGFPLSAVTGRA  
P50457 IRRLCDEHGIVMIADEVQSGFARTGKLFAMDHAD-KPDLMTMAKSLAGGMPLSGVVGNA  
AAG56502 IRRLCDEHGIVMIADEVQSGFARTGKLFAMDHAD-KPDLMTMAKSLAGGMPLSGVVGNA  
NP406352 LRTLCDQDQHGILLIADEVQTFGARTGKLFAMEYYPDTKVDVITMAKSLGGMPISAVTGRA  
NP518150 LRALCDEHGIVMIADEVQTFGARTGKLFAMEHTGV-LPDLVTMAKGLAGGLPLSAVTGRA  
AAK97868 LRALCDQDQHGILLIADEVQTFGAGRTGTF FAMEQMGV-APDLTTFAKSIAGGFPLAGVCGKA  
AAG03655 LRALCDQDQHGILLIADEVQTFGAGRTGTF FATEQLGI-VPDLTTFAKSVGGGFPIAGVAGKA  
NP311550 LRALCDEHGIMLIADEVQSGAGRTGTLFAMEQMGV-APDLTTFAKSIAGGFPLAGVTGRA  
P22256 LRALCDEHGIMLIADEVQSGAGRTGTLFAMEQMGV-APDLTTFAKSIAGGFPLAGVTGRA  
Konsensus :.\* :\*\*\*:\*:\*:.\*:\*:\*:\* \* .\*\*\*.:\*\* : \* : \*:\*:\*:\*:\*:\* \* .\*

NP437392 EIMDAPGPGGLGGTYGGNPLGIAAAHAVLDVIAEENLCERANQLGNRLKQRLAAIREKAP  
NP106172 EIMDAPGPGGLGGTYGGSPIGVAAAHAVLDVIEDEKLCDRANTLGARLKQRLQSIRDDVP  
P50457 NIMDAPAPGGLGGTYAGNPLAVAAAHAVLNI IDKESLCERANQLGQRLKNTLIDAKESVP  
AAG56502 NIMDAPAPGGLGGTYAGNPLAVAAAHAVLNI IDKESLCERANQLGQRLTKTLIDAKENVP  
NP406352 DIMDAPLPGLGGTYAGNPLAVAAASLAVLDI IAEKLCERALI LGAKLVLDVLEKAQMSNA  
NP518150 EIMDAPAPGGLGGTYAGNPLAVAAAHAVLDI IDEEKLCSAALGRRLVDALDAKAGQP  
AAK97868 EYMDAIPGGLGGTYAGSPIACAAALAVIEVFEEKLLDRSKAVGERLTAGLREIQKKYP  
AAG03655 EIMDAIPGGLGGTYAGSPIACAAALAVLKVFEKLLERSQAVGERLKAGLREIQAKHK  
NP311550 EVMDAVAPGGLGGTYAGNPIACVAALEVLKVFEQENLLQKANDLGQKLKDLLAIAEKHP  
P22256 EVMDAVAPGGLGGTYAGNPIACVAALEVLKVFEQENLLQKANDLGQKLKDLLAIAEKHP  
Konsensus : \*\*\* \*\*.\*\*\*\*\*\*.\*:\*..\*:\* :\*:.:.\*.\* :.: :\* :\* \*

NP437392 EIVDIRGPGFMNAVE-FNDVVRTNLP SAEFANKVRLLEKGLILLTCGVHGNVIRFLAPI  
NP106172 EIVDIRGLGFMNAVE-FNDVKKGMPSAEIANAIRLKALDKGLILLTCGVYGNVIRFLAPI  
P50457 AIAAVRGLGSMIAVE-FNDPQTGEP SAAIAQKIQQRALAQGLLLLTTCGAYGNVIRFLYPL  
AAG56502 AIAAVRGLGSMIAAE-FNDPQTGEP SAAIAQKIQQRALAQGLLLLTTCGAYGNVIRFLYPL  
NP406352 AIVGIRARGSMVAVE-FNDPVSGKPSPELTRAYQRQALEEGLLLSCGVHNSVIRFLYPL  
NP518150 RIAEVRGVGAMVAIE-FNTP-DGKPDADFTRTVQQRALAEAGLLLLSCGVYGNVIRFLFPL  
AAK97868 IIGDVRGLGSMIAVEVFKEG-THTPNAAVGVVAKAREKGLILLSCGTYGNVLRILVPL  
AAG03655 VIGDVRGLGSMVAIELFEGGDTHKPAELVSKIVVRAREKGLILLSCGTYGNVLRILVPL  
NP311550 EIGDVRGLGAMIAIELFEDGDHNKPAKLTAEIVARARDKGLILLSCGPPYVLRILVPL  
P22256 EIGDVRGLGAMIAIELFEDGDHNKPAKLTAEIVARARDKGLILLSCGPPYVLRILVPL  
Konsensus \* :.\* \* \* \* \* \* : \* . . \* \*\*:\*:\*:\* : \*:\*:\* \* \*

NP437392	TIQDEVFAEALDTIEASILEARG-
NP106172	TIQDEVMEALDILESSIREVCAA
P50457	TIPDAQFDAAMKILQDALSD----
AAG56502	TIPDAQFDAAMKILQDALRD----
NP406352	TIPDKQFKQAMNILTRLLAS----
NP518150	TIEDAVFEEGLAILKHALEG----
AAK97868	TAEDALLDKGLAIIIEECFAEIA--
AAG03655	TIPDAQLEKGLAILAECFDELA--
NP311550	TIEDAQIRQGLEIISQCFAEAKQ-
P22256	TIEDAQIRQGLEIISQCFDEAKQ-
Konsensus	* * : .: : :

Abb. 13: Alignment der in Tab. 2 aufgezeigten GabT verwandten Proteinsequenzen. Angegeben sind die entsprechenden Accessionnummern und eine Konsensusanalyse. (\*) „voll“- (: ) „stark“- (.) „schwach“-konservierte Aminosäure (für weiterführende Erläuterungen, siehe ClustalX 1.81, „Help“-Funktion).

#### 4.1.4. Identifizierung von *gabD'* und *gabR'*

Entsprechende Homologievergleiche wurden mit den N-terminalen Proteinsequenzen der vermuteten *GabD'* bzw. *GabR'* Genprodukte angestellt. Die folgenden Angaben stammen ebenfalls aus Homologievergleichen vom 08.03.2002.

Über 220 aa (siehe 7.4.) zeigte *GabD'* dabei eine 63%ige Identität zu einem Protein aus *S. meliloti*. Dieses Protein ist eine der fünf in der *S. meliloti* Sequenz mit der Anmerkung „putative succinate-semialdehyde dehydrogenase“ (SSDH) versehenen Genprodukte (NP437391). Das zugehörige Gen wird als *gabD2* bezeichnet. Zu den weiteren, als SSDH (*gabD1*; *gabD3-5*) bezeichneten Genen aus *S. meliloti* fanden sich keine größeren Homologien. Die nächstbesten Ähnlichkeiten wurden zu einer SSDH aus *P. aeruginosa* PA01 (AAG03654), zu einer SSDH aus *E. coli* K-12 (P25526) und einer SSDH aus *E. coli* O157:H7 (NP311549) mit jeweils 61% Identität festgestellt.

Auf Nukleotidebene besteht zu *gabD2* aus *S. meliloti* ebenfalls eine Identität von ~80% (s. o.).

Die Lage einer SSDH im Anschluß an den *gabT* Leserahmen erscheint in diesem Zusammenhang nicht verwunderlich, da das Enzym auch im metabolischen Kontext folgt (siehe Abb. 2). Das Zwischenprodukt Succinatsemialdehyd gilt im Allgemeinen als toxisch (Dover & Halpern, 1974; Belitzky & Sonenshein, 2002), so daß es logisch erscheint die Transkription der verantwortlichen Gene zu koppeln.

GabR' zeigte über 120 aa (siehe 7.4.) Homologien zu Transkriptionsregulatoren der MerR Familie. Die beste Identität mit 70% besteht zu einem Regulator der MerR und LacI Familie aus *S. meliloti* (NP437393). Die nächstbesten Homologien bestehen zu einem „probable transcriptional regulator“ aus *P. aeruginosa* PA01 (AAG08046) und einem „transcriptional regulator of *pmrA*, MerR family“ aus *Streptococcus pneumonia* (Tettelin *et al.*, 2001; AAK74878) mit 46% bzw. 42%. Hier erstreckt sich die homologe Region aber deutlich nur über die ersten 80 aa des N-Terminus, welche ein vermutliches „Helix-Turn-Helix“ Motiv beinhaltet.

Regulatorproteine des MerR Typs wirken in der Regel als Transkriptionsregulatoren in Repressor/Aktivator-Weise. Sie binden als Repressoren im Promotorbereich der Strukturgene (z.B. *merTPCAD* in Tn21; (Park *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993)) und bilden einen inaktiven Komplex mit der RNA-Polymerase. Sie werden durch spezifische Signale aktiviert (z.B. Hg(II) bei Tn21) und führen zu einem „offenen“ Komplex, der die Synthese der mRNA einleitet. Eine Ausnahme bildet MerR in *Streptomyces lividans* 1326 (Brünker *et al.*, 1996), dort wirkt das Protein ausschließlich als Repressor. Charakteristisch für Regulatoren der MerR Familie ist ein „Helix-Turn-Helix“ Motiv im N-Terminus (Park *et al.*, 1992).

#### **4.1.5. Sequenz-Hinweise auf eine *gabTD* Operonstruktur**

Die Organisation der Leserahmen von *gabRTD* legen die Vermutung nahe, daß es sich bei der vorhandenen Struktur um ein Operon aus *gabTD* handelt, das möglicherweise von *gabR* reguliert wird.

Die intergenische Region zwischen *gabT* und *gabD* besteht aus nur 66 Nukleotiden (Abb. 12), was wenig Raum für *gabT*-eigene Terminations- oder *gabD*-eigene Promotorstrukturen läßt. Im Abstand von 6 bp findet sich vor dem *gabD* Startkodon eine RBS (GGAGGA) identisch zu der von *gabT* (Abstand 7 bp).

Ein alternatives *gabD* Startkodon liegt im gleichen Leserahmen 45 bp stromaufwärts (siehe Abb. 12, bp 1830 (Box)) und somit näher zum *gabT* Stopkodon. Hier findet sich allerdings keine geeignete RBS und Proteinsequenzvergleiche mit dem verwandten *gabD2* aus *S. meliloti* weisen auf das weiter stromabwärts gelegene ATG als Startkodon für *gabD* aus *R. leguminosarum* VF39 hin.

In der *S. meliloti* Sequenz des symB Plasmids sind die Leserahmen für *gabTD2* und einen Regulator der MerR Familie in identischer Weise angeordnet (NC003078). Alle drei Gene weisen dabei jeweils die besten Homologien auf Protein- wie Nukleotidebene zu den entsprechenden Genen aus *R. leguminosarum* VF39 auf (siehe Homologievergleiche in 4.1.3. und 4.1.4.). Dies zeigt eine hohe strukturelle Verwandtschaft zwischen den beiden Spezies bezüglich dieses Operons.

T. Lütke-Eversloh und A. Steinbüchel stellten 1999 einen strukturellen Vergleich der Lage von *gab* Genen in verschiedenen Organismen an. In *Bacillus subtilis* und *E. coli* sind die Operons ähnlich organisiert (*gabRTDP* bzw. *gabRDTP*). GabP stellt dabei eine vermutliche GABA Permease dar. In *Mycobacterium tuberculosis* sind *gabD2* und *gabT* durch 2,6 kb DNA voneinander getrennt, in *R. eutropa* liegt *gabT* unmittelbar vor *gabD* und in *P. aeruginosa* ist die Folge *gabDT* (NC002516). Dort findet sich kein Regulator in den angrenzenden Sequenzen. In *M. loti* liegt in der unmittelbaren und weiteren Umgebung von *gabT* kein *gabD* Homolog (NC002678).

Diese Analyse zeigt in Verbindung mit den neu ermittelten Daten, daß die Gene des GABA Metabolismus unterschiedlich organisiert sein können, oft aber in Operonstrukturen angelegt sind.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die Frage nach der gemeinsamen Expression von *gabTD* an verschiedenen Stellen erneut aufgegriffen und diskutiert werden.

## 4.2. Lokalisierung von *gabT* innerhalb des Genoms

In der *S. meliloti* 1021 Genomsequenz ist die *gabRTD2* Region auf dem symB Plasmid lokalisiert. Das „symbiontische Plasmid“ von *S. meliloti* ist symA. Dort liegen sämtliche Cluster der stickstofffixierenden Gene (*fixNOQP*; *nifBA-fixXCBA*; *nifHDKX*; *nod*-Gene; *fixLTJK*). Zur Lokalisierung der *gabRTD* Region in *R. leguminosarum* VF39 wurde ein Eckhardt Gel auf eine Nylon-Membran geblottet und mit einer *gabT* Probe hybridisiert (Abb. 14). Auf diesem Blot hybridisierte die *gabT* Probe mit dem b-Plasmid von *R. leguminosarum* VF39. Das b-Plasmid ist mit 240 kb das zweit kleinste der 6 Plasmide von VF39 (Hynes *et al.*, 1988). Die symbiontischen Plasmide sind in diesem Organismus die Plasmide c und d (Hynes *et al.*, 1988, 1990; Patschkowski *et al.*, 1996). Allerdings ist ein Plasmid Rearrangement zwischen dem d- und dem b-Plasmid beobachtet worden (Zhang *et al.*, 2001).

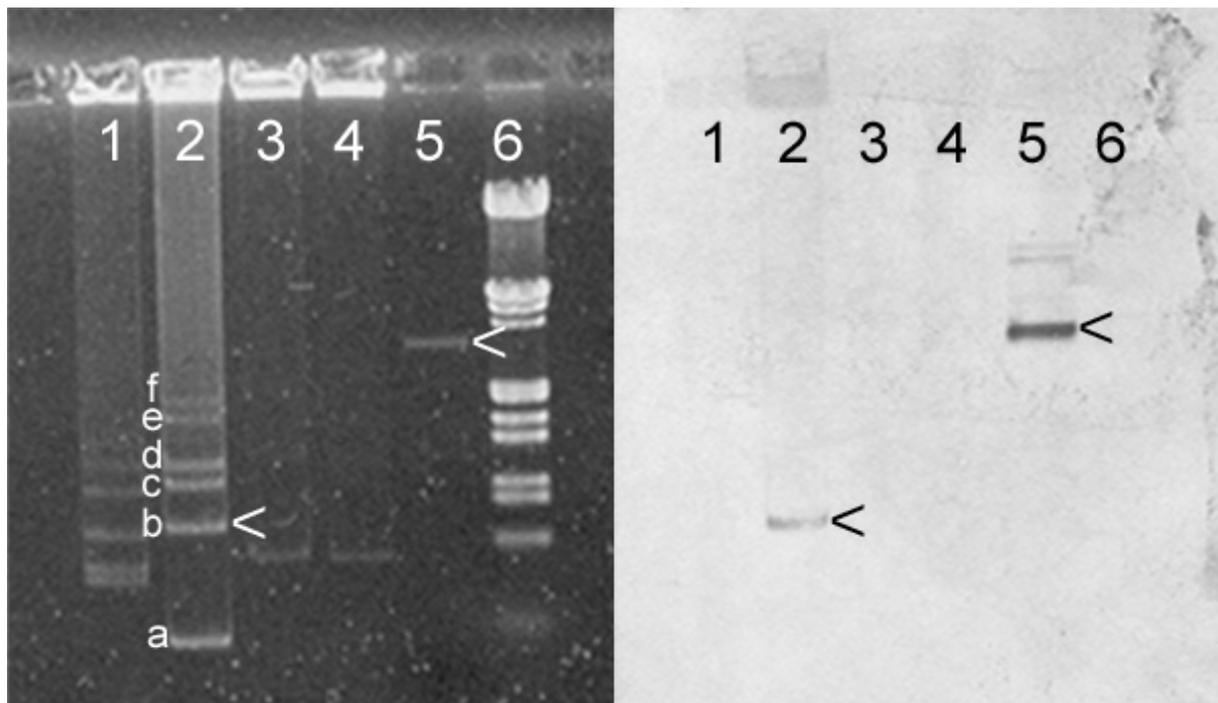


Abb. 14: Lokalisierung der *gabRTD* Region. Dargestellt ist ein Eckhardt-Gel (links) und die korrespondierende Southern Hybridisierung (rechts) mit der auch in 4.3.5. verwendeten *gabT* Sonde. In Spur 2 sind die 6 Plasmide (a-f) von *R. leguminosarum* VF39 aufgetrennt. Plasmid b zeigt ein deutliches Hybridisierungssignal mit der *gabT* Sonde. Die Spuren 1, 3 und 4 zeigen Plasmidprofile von verwandten *Rhizobien* Spezies. Als Positivkontrolle ist in Spur 5 Plasmid-DNA von pK19mob-*gabT* aufgetragen. Spur 6 zeigt als Größenmarker  $\lambda$  DNA (*EcoRI/HindIII* verdaut). Spur 5 und 6 wurden zu einem späteren Zeitpunkt des Laufs aufgetragen. Der Marker steht also in keinem Größenverhältnis zu den Plasmiden der *Rhizobien*-Spezies.

### 4.3. Phänotypische Analyse von *gabT* Mutanten

#### 4.3.1. Wachstumsphänotypen der Transposonmutante PH10

Da GABA Aminotransferase als primäres GABA metabolisierendes Enzym angesehen werden muß (siehe Abb. 2) wurde zunächst das Wachstum auf GABA als alleiniger Kohlen- und Stickstoffquelle getestet. Der Wildtyp VF39 zeigte Wachstum auf VMM Platten mit 0,2% GABA. Die PH10 Mutante wuchs auf diesem Medium allerdings ohne erkennbaren Unterschied. In Flüssigkulturen zeigte sich ebenfalls keinerlei Unterschied in den Wachstumsraten (Tab. 3).

Tab. 3 : Wachstumsraten, Enzymaktivitäten und symbiontische Phänotypen von *R. leguminosarum* VF39 und verschiedenen Mutanten.

Phänotypen	VF39	PH10	VF39-19T <sup>c</sup>	VF39-18R <sup>d</sup>
Wachstumsraten in VMM Flüssigmedium + 0,2% GABA (Verdopplungszeiten in Stunden) <sup>a</sup>	16,0 (±1,8)	16,0 (±1,8)	17,8 (±0,6)	14,3 (±0,9)
2-Oxoglutarat abhängige GABA Aminotransferase Aktivitäten (nmol Glutamat·min <sup>-1</sup> ·mg Protein <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	1,32 (±0,38)	-0,09 (±0,20)	0,09 (±0,15)	6,82 (±1,17)
Pyruvat abhängige GABA Aminotransferase Aktivitäten (nmol Alanin·min <sup>-1</sup> ·mg Protein <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	213 (±33)	227 (±27)	203 (±22)	148 (±17)
SSDH Aktivitäten (nmol NADH·min <sup>-1</sup> ·mg Protein <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	182 (±17)	199 (±32)	155 (±26)	228 (±22)
Symbiontischer Phänotyp mit <i>Pisum sativum</i> als Wirtspflanze	Fix <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Wachstumsraten wurden aus logarithmischen Kulturen berechnet. Daten entsprechen dem Mittelwert aus 3 unabhängigen Kulturen (Standardabweichung)

<sup>b</sup> Enzymaktivitätsdaten sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Kulturen (Standardabweichung).

<sup>c</sup> auf diese Ergebnisse wird später unter 4.3.5. eingegangen.

<sup>d</sup> auf diese Ergebnisse wird später unter 4.5.2. eingegangen.

Auffällig war allerdings, daß während des relativ langsamen Wachstums auf Festmedien mit GABA in einer geringen Frequenz größere Kolonien auftauchten. Dies geschah in gleicher Weise bei Wildtyp und Mutanten. Vereinzelt der beiden Kolonietypen führte zu stabilen „großen“ Kolonien und „kleinen“ Kolonien, die mit geringer Frequenz wieder „mutierten“. Diese Frequenz war allerdings niedriger als bei Ausstrich der Ursprungsstämme.

Im Zusammenhang damit sollen an dieser Stelle Beobachtungen von P. Poole und A. Hosie (Reading University, England) erwähnt werden. Sie identifizierten als ein vermutliches Aufnahmesystem für GABA in *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 eine „branched-chain amino acid permease“ (Bra). Dieser ABC (ATP-binding cassette) Transporter ist neben einer „general amino acid permease“ (Aap) für den bidirektionalen Transport mehrerer Aminosäuren verantwortlich (Hosie *et al.*, 2001). Eine Bra

Mutante zeigte im Gegensatz zu einer Aap Mutante kein Wachstum auf GABA (Hosie *et al.*, 2002). Allerdings zeigten sich einige wenige Revertanten, die auf die Mutation eines weiteren Transporters hindeuten könnten (P. Poole, persönliche Mitteilung).

Möglicherweise ist das indifferente Wachstum von VF39 auf GABA Medien ebenfalls auf eine solche Mutation zurückzuführen.

#### **4.3.2. GABA Aminotransferase Enzymaktivitäten**

Die Tatsache eines indifferenten Wachstumsphänotyps von PH10 erforderte die direkte Feststellung der Enzymaktivität der GABA Aminotransferase. Die Aktivitäten wurden aus Rohextrakten logarithmischer VMM Kulturen bestimmt, die zur maximalen Induktion mit 0,2% GABA und Glutamat versetzt waren. In diesem Medium wurde in Expressionsstudien (siehe 4.4.7.) maximale Induktion des *gabT* Promotors beobachtet (Abb. 21).

Dabei wurden zunächst 2-Oxoglutarat abhängige GABA Aminotransferase Aktivitäten bestimmt. Der Wildtyp VF39 zeigte moderate Aktivitäten (Tab. 3). PH10 hingegen exprimierte keinerlei 2-Oxoglutarat abhängige Aktivität. Dies bestätigte zunächst die Erwartung an den enzymatischen Phänotyp der *gabT* Mutation.

Des Weiteren wurden Pyruvat abhängige Aktivitäten bestimmt. Hier zeigten sich in Wildtyp- wie auch PH10 Proteinextrakten hohe Enzymaktivitäten (Tab. 3). Diese lagen um mindestens zwei Zehnerpotenzen höher als die 2-Oxoglutarat spezifischen GABA Aminotransferase Aktivitäten.

Das Ausbleiben der 2-Oxoglutarat abhängigen Enzymaktivität, bei gleichzeitigem Vorhandensein einer Pyruvat abhängigen Aktivität, erklärt zum Einen den Wachstumsphänotyp der *gabT* Mutante auf GABA Minimalmedium und stellt zum Anderen die Frage nach einem zweiten Gen für eine Pyruvat abhängige GABA Aminotransferase.

Auf diese Frage wird im späteren Verlauf dieser Arbeit noch einmal eingegangen werden.

#### **4.3.3. Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase Aktivitäten**

Aus Proteinextrakten des Wildtyps und der PH10 Mutante wurden ebenfalls NAD abhängige Succinatsemialdehyd Dehydrogenase (SSDH) Aktivitäten bestimmt (Tab. 3).

Die Aktivitäten waren recht hoch und zeigten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten.

Dies läßt zunächst vermuten, daß die *gabT* Mutation keinen polaren Effekt auf *gabD* und damit auf eine mögliche Succinatsemialdehyd Dehydrogenase zeigt. Somit würden *gabTD* doch nicht innerhalb eines Operons vom gleichen Promotor expremiert.

Allerdings kann das Ausbleiben eines Phänotyps in den Enzymassays von *R. leguminosarum* VF39 auch andere Ursachen haben. Angesichts der vermuteten multiplen Kopien von *gabD* Sequenzen in den bekannten Genomen von *S. meliloti* und *M. loti* (5 Kopien bzw. 8 (!)), könnte die gemessene Aktivität auch von einem homologen Enzym expremiert werden.

Über Regulation, Spezifität für Kofaktoren und metabolische Aufgaben von SSDHs ist generell wenig bekannt. Sie werden nur im Zusammenhang mit der Metabolisierung von GABA, 4-Hydroxybutansäure (Lütke-Eversloh & Steinbüchel, 1999) und p-Hydroxyphenylacetat (Donnelly & Cooper, 1981) genannt.

#### **4.3.4. Symbiontischer Phänotyp**

In Symbiose mit Erbsenpflanzen bildeten Zellen der PH10 Mutante normalaussehende, rosafarbene Knöllchen (Tab. 3). Im Acetylen-Reduktions-Assay war keinerlei Abweichung von Fixierungsraten des Wildtyps VF39 meßbar.

#### **4.3.5. Bestätigung der phänotypischen Ergebnisse mit Hilfe einer *gabT*-Integrationsmutante**

Zur Bestätigung des enzymatischen Phänotyps von PH10 sollte eine weitere *gabT* Mutante erzeugt werden. Am einfachsten erschien dabei eine Plasmidintegration in den *gabT* Leserahmen. Die Konstruktion ist in Abb. 15 gezeigt.

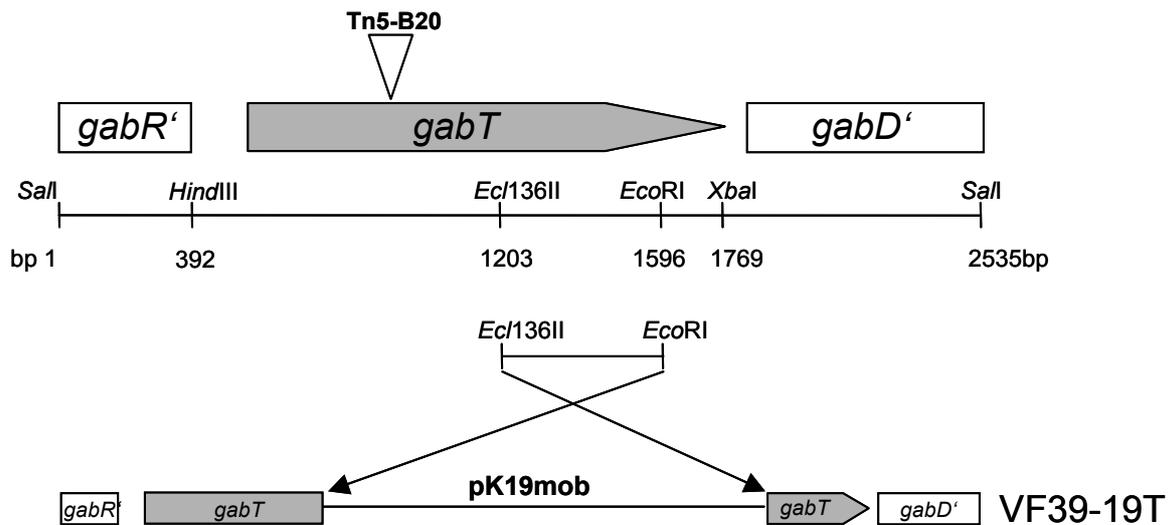


Abb. 15: Konstruktion der Plasmidintegrationsmutante VF39-19T. Das zur Erzeugung der Mutante verwendete Ausgangsplasmid ist in Abb. 3 gezeigt. Der „single crossover“ führte zur Integration des Plasmids und zur Duplikation des eingesetzten homologen Fragments.

Zur Überprüfung der Plasmidintegration wurde eine Southern Hybridisierung mit *SalI* bzw. *EcoRI* verdauter Gesamt-DNA der Mutante VF39-19T, sowie PH10 und VF39 durchgeführt (Abb. 16). Als Sonde diente das *gabT* interne 393 bp *EcI136II/EcoRI* Fragment, das aus *pK19mob-gabT* per PCR amplifiziert und DIG markiert wurde (siehe 3.1.10.).

Die *SalI* verdaute Gesamt-DNA von VF39 bzw. PH10 hybridisierte erwartungsgemäß mit einem 2,5 kb bzw. 10,7 kb Fragment (siehe 4.1.). Die Gesamt-DNA der Plasmidintegrationsmutante hybridisierte jedoch mit einem 6,7 kb Fragment, was der Größe des *gabRTD* Fragments plus des integrierten Vektors (2,5+4,2 kb) entspricht. Dies ist aber nicht unbedingt zu erwarten, da der integrierte Vektor (*pK19mob-gabT*) eine weitere *SalI* Schnittstelle besitzt (siehe Abb. 3) und diese somit ins Genom einführen müßte.

Zu erwarten wäre im Falle von VF39-19T ein 5,3 kb Fragment. Das Fragment ist auf dem Blot auch schwach zu erkennen, zuzüglich der Fragmentgröße, die zu 6,7 kb ergänzt (1,4 kb). Hier liegt die Vermutung nah, daß die integrierte *SalI* Schnittstelle nicht vollständig verdaut wird, was wiederum an der Herkunft der DNA aus *E. coli* S17-1 liegen muß. Dies könnte bei näherer Betrachtung zu interessanten, weiterführenden Einsichten in Bezug auf eventuelle DNA-Methylierungssystemen von *R. legu-*

*minosarum* VF39 führen, die allerdings in dieser Arbeit keine nähere Bearbeitung finden konnten.

Die Hybridisierungssignale mit den *EcoRI* verdauten Gesamt-DNAs bestätigen ebenfalls die Richtigkeit der Plasmidintegration.

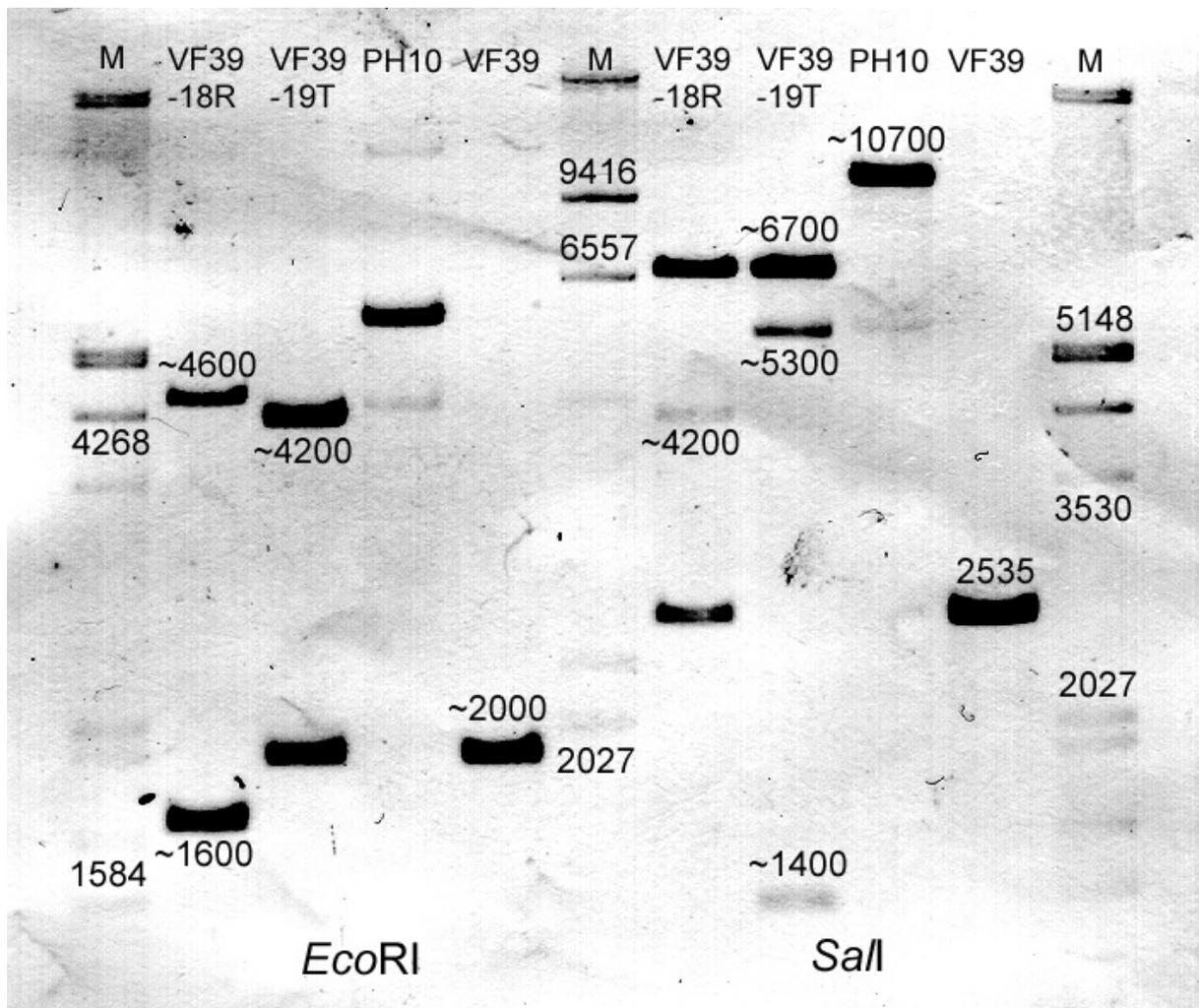


Abb. 16: Southern Hybridisierung *SalI* bzw. *EcoRI* verdauter Gesamt-DNA aus VF39, PH10 und VF39-19T. Zusätzlich ist Gesamt DNA der Mutante VF39-18R aufgetragen, die im späteren Verlauf unter 4.5.1. besprochen wird. Als Sonde wurde die bereits in 4.2. (Abb. 14) verwendete, DIG markierte *gabT*-Sonde eingesetzt (siehe auch Fragment in Abb. 15). M: Marker.

Die *gabT* Mutante VF39-19T zeigte den gleichen Wachstumsphänotyp wie PH10 und expremierte entsprechende Enzymaktivitäten (Tab. 3). Damit wurde die Mutation der Transposonmutante PH10 eindeutig bestätigt.

#### **4.4. Expression von *gabT***

Eine Expressionsanalyse mit Hilfe von Reporter genen in *Rhizobien* unterliegt besonders unter symbiontischen Bedingungen einigen Problemen. Diese Probleme werden im Folgenden dargestellt und ihre Lösung beschrieben.

##### **4.4.1. Das *uidA* (GUS) Reporter gen**

Das *uidA* Reporter gen aus *E. coli* findet in *R. leguminosarum* VF39 ideale Verwendung, da im Gegensatz zu *lacZ* weder in freilebenden noch in symbiontisch-aktiven Zellen eine eigene  $\beta$ -Glukuronidase Aktivität nachweisbar ist. Auch der Wirtspflanzenhintergrund exprimiert keinerlei GUS Aktivität.

##### **4.4.2. Konstruktion des Promotor-Probe Vektors pJP2**

Die Konstruktion des Promotor-Probe Vektors pJP2 soll an dieser Stelle und nicht in Kapitel: 3 (Methoden) beschrieben werden, da sie ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit darstellt.

Die Notwendigkeit zur Herstellung des Konstrukts ergibt sich primär aus der Tatsache, daß Plasmidkonstrukte zur Bestimmung von Promotoraktivitäten verschiedene Vorteile bieten.

Mit Plasmiden ist es möglich Reporter genaktivitäten im Wildtyp hintergrund, sowie parallel dazu in verschiedenen Mutanten zu messen. Chromosomale Konstrukte entsprechen nie dem Wildtyp. Sie erzeugen in der Regel Mutationen, partielle Genduplikationen oder unterbrechen Operonstrukturen. Des Weiteren können Effekte auf die Expression von benachbarten Genen nicht ausgeschlossen werden. Die genaue Lokalisierung chromosomaler Konstrukte muß weiterhin immer über Southern Hybridisierungen oder PCR überprüft werden. Plasmide hingegen sind in der Regel einfacher zu handhaben.

Als Nachteile von Plasmiden ist deren meist nicht genau bestimmbare Kopienzahl und die damit verbundene Promotorvervielfältigung zu nennen. Außerdem müssen *in trans* wirkende Plasmidkonstrukte in der Regel durch Selektion stabil gehalten werden. Selektionsdruck ist unter symbiontischen Bedingungen im Knöllchen aber schwer zu applizieren. Deshalb besteht generell Nachfrage nach Plasmidkonstrukten, die Stabilität während der Differenzierung im Wurzelknöllchen sicherstellen.

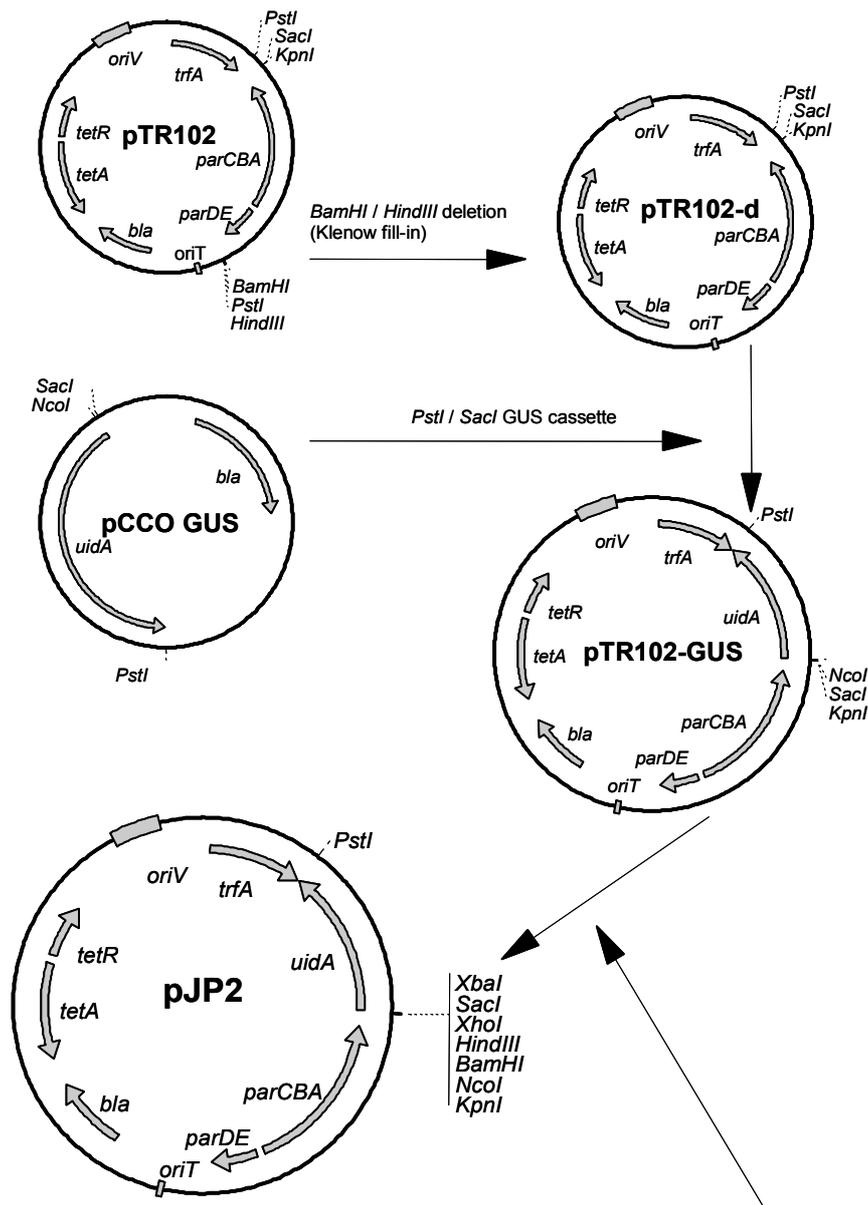
Die Basis des pJP2 Vektors bildet pTR102, ein Konstrukt von Weinstein *et al.* (1992). Dieses Plasmid hat einen weiten Wirtsbereich unter *Gram*-negativen Bakterien, liegt in geringer Kopienzahl vor, ist durch Konjugation mobilisierbar und trägt die *par* Stabilitätsfunktionen von RK2. Diese *par* Region kodiert für 5 Gene in zwei entgegengesetzt orientierten Operons (*parDE* und *parCBA*). Das Operon *parDE* expremiert einen „postsegregational killing mechanism“, der durch ein Toxin/Antitoxin System das Überleben von plasmidfreien Tochterzellen verhindert (Easter *et al.*, 1997 und 1998). Die Funktion von *parCBA* ist noch ungeklärt.

Die durch die einzelnen Systeme vermittelte Plasmidstabilität ist unterschiedlich in verschiedenen Spezies, eine höchstmögliche Stabilität wird aber in der Regel durch Expremieren beider Systeme erreicht (Easter *et al.*, 1997). Verschiedene Ansätze zur Herstellung stabiler Plasmidkonstrukte sind in den letzten Jahren publiziert worden (Weinstein *et al.*, 1992; Blatny *et al.*, 1997; Dombrecht *et al.*, 2001; Stuurman *et al.*, 2000). Die meisten dieser Arbeiten (außer Stuurman *et al.*, 2000) bedienen sich dabei der *par* Stabilitätsfunktion von RK2.

Die Konstruktion von pJP2 erfolgte im Detail wie folgt.

Zuerst wurden die pTR102 eigenen Schnittstellen *Bam*HI, *Pst*I und *Hind*III durch einen *Bam*HI-*Hind*III Verdau, „Klenow-fill-in“ Reaktion und anschließender Religation deletiert. Der resultierende Vektor wurde pTR102-d genannt (Abb. 17).

Anschließend wurde aus pCCO GUS (Axelos *et al.*, 1989) eine promotorlose *uidA* GUS Kasette in die *Pst*I und *Sac*I Schnittstellen von pTR102-d kloniert, was zum Konstrukt pTR102-GUS führte. Eine künstliche Polyklonierstelle (multiple cloning site, MCS) wurde in die *Nco*I und *Kpn*I Schnittstellen von pTR102-GUS inseriert. Dazu wurden zwei künstliche Oligonukleotide (MCS1 und MCS2, siehe 2.5.) synthetisiert. Diese Oligonukleotide enthielten eine RBS (GAGG, im Abstand von 5 Basen zum Startkodon der GUS Kasette), drei Stopkodons in allen drei Leserastern und zusätzliche Restriktionsschnittstellen (siehe Abb. 17). Die künstliche RBS stellt eine Konsensussequenz aus mehreren *R. leguminosarum* VF39 spezifischen *fix* und *nif* Promotorregionen dar. Die Stopkodons sollen die Bildung von nicht erwünschten Translationsfusionen verhindern. Die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen sind allesamt Einzelschnittstellen und erleichtern das Klonieren von Fremd-DNA. Das erhaltene Produkt ist der Vektor pJP2.



5' - CATGGATCCAAGCTTCTCGAGCTCTAGACTGAGGTAA - 3'  
 3' - CATGGTACCTAGGTTCTGAAGAGCTCGAGATCTGACTCCATTAGTAC - 5'

KpnI NcoI BamHI HindIII XhoI SacI XbaI

Abb. 17: Konstruktion des Promotor-Probe Vektors pJP2. Einzelheiten der Konstruktion sind im Text (s.o.) beschrieben. *trfA*: Replikationsstart von RK2; *oriT*: Konjugationsstart von RK2; *uidA*:  $\beta$ -Glukuronidase (GUS); *parCBADE*: Stabilitätsfunktionen aus RK2; *bla*: Ampicillinresistenz; *tetAR*: Tetracyclinresistenz; *oriV*: Replikationsstart aus RK2. Das synthetische Fragment (unten) besteht aus den hybridisierenden Primern MCS1/2 (siehe 2.5.). Es enthält Schnittstellen für Restriktionsenzyme und **Stopkodons** in allen Leserastern, sowie eine Konsensus RBS (GAGG) im Abstand von 5 bp zum *uidA* Startkodon.

#### 4.4.3. GUS Expression von pJP2

Der „leere“ Vektor zeigte in TY Vollmedium keinerlei vektoreigene Promotoraktivität auf das *uidA* Gen (siehe auch Abb. 19). Auch während der Symbiose war in Erbsenknöllchen keine Aktivität nachweisbar.

Starke knöllchenspezifische Promotoren wie die *R. leguminosarum* VF39 eigenen *dctA* bzw. *nifA* Promotoren hingegen, expremierten hohe GUS Aktivitäten:

Eine pJP2-*dctA* Fusion lieferte z.B. freilebend in VMM (0,2% Glukose; 0,1% NH<sub>4</sub>Cl) nach 24 h ca. 60 nmol PNP·min<sup>-1</sup>·OD<sub>600</sub> Unit<sup>-1</sup> (B. Boesten, persönliche Mitteilung).

Bei Induktion durch zusätzlich 0,2% Succinat wurden ca. 760 nmol PNP·min<sup>-1</sup>·OD<sub>600</sub> Unit<sup>-1</sup> expremiert. Auch in aus Knöllchen isolierten Bakteroiden ließen sich hohe GUS Aktivitäten der *dctA::uidA* Fusion messen (ca. 490 nmol PNP·min<sup>-1</sup>·OD<sub>600</sub> Unit<sup>-1</sup>).

#### 4.4.4. Einsatz von pJP2 während der Symbiose

Dünnschnitte von Wurzelknöllchen sind histochemisch anfärbbar und der Ort der Expression des Reporters kann dabei lokalisiert werden.

Der Verlust eines Plasmids fällt in Dünnschnitten reifer Knöllchen durch nicht gefärbte, sich trichterförmig fortsetzende Regionen auf. Ein Plasmidverlust, wie er für gewöhnlich z.B. bei nicht vollkommen stabilen Vektoren in Dünnschnitten 3 Wochen alter Luzerneknöllchen sichtbar wird (Boesten *et al.*, 1998 und persönliche Mitteilung), konnte in über zweijährigem Umgang mit dem pJP2 Konstrukt in mindestens 4 Wochen alten Erbsenknöllchen nie beobachtet werden.

Direkte Aktivitätsmessungen von Reprtergenen in Bakteroiden können mit instabilen Vektoren großen Fehlern unterworfen sein. Diesen Fehler versucht man für gewöhnlich durch die Bestimmung des Anteils plasmidfreier Zellen zu minimieren. Über diese Methodik wird auch generell die Stabilität von Plasmiden in bakteriellen Zellen des Wurzelknöllchens bestimmt (Weinstein *et al.*, 1992; Dombrecht *et al.*, 2001; Stuurman *et al.*, 2000). Dieses Vorgehen übersieht aber die Tatsache, daß man heute im Allgemeinen davon ausgeht, daß ausdifferenzierte Bakterioide nicht mehr in einen freilebenden Zustand zurückkehren können (siehe z.B. McRae *et al.*, 1989). Man bestimmt also immer nur den Anteil plasmidtragender „freilebender“ Zellen (z.B. in den Infektionsschläuchen) und nicht den Anteil plasmidtragender Bakterioide. Reporter-gen-expremierende Bakterioide lassen sich nur im Dünnschnitt eines Knöllchens darstellen.

#### 4.4.5. Klonierung der vermuteten *gabT* Promotorregion

Zur Klonierung des vermuteten *gabT* Promotors sollte die gesamte intergenische Sequenz zwischen dem *gabT* Startkodon und dem upstream gelegenen, vermuteten *gabR'* Leseraster verwendet werden. Es bot sich nach Erhalt der Sequenz ein 572 bp großes *Sau3A* Fragment an, das 77 bp des 5'-Endes von *gabT* mit einschließt (Abb. 11). Dieses Fragment wurde in die *Bam*HI Schnittstelle von pJP2 kloniert und durch die Lage einer internen *Hind*III Schnittstelle auf seine korrekte Orientierung hin überprüft. Das resultierende Konstrukt wurde pJP2-*gabT* genannt (Abb. 7), das Kontrollkonstrukt mit der entgegengesetzten Orientierung pJP2-*gabR* (Abb. 8).

#### 4.4.6. pH induzierte Expression von *gabT* im Wildtyphintergrund

Die Herkunft der Mutante PH10 aus einem pH abhängigen Screening veranlaßte zunächst die Untersuchung der pH induzierten *gabT* Expression.

Zuerst sollten die Daten aus der zugrunde liegenden Diplomarbeit überprüft werden. Abb. 18 zeigt die *lacZ* Induktion des Tn5-B20 von PH10 nach 24 h und 48 h in Flüssigkulturen bei verschiedenen pH Werten unter ähnlichen Bedingungen wie in der genannten Diplomarbeit. Die Kulturen wurden allerdings zur besseren Durchlüftung in Schottflaschen auf einem Schüttler inkubiert (ca. 120 rpm), anstatt in Glasröhrchen auf einem langsamen Roller (ca. 40 rpm) wie in der Originalarbeit. Auch waren die Bedingungen des *lacZ* Assays geringfügig anders gewählt (vergleiche 3.4.5. mit Miller (1972)).

Die Daten sind sich jedoch in Art und Größenordnung im Vergleich mit der damals gefundenen Induktion recht ähnlich (siehe 1.6.). Allerdings fällt auf, daß bei Eintritt der Kulturen in die stationäre Phase (48 h) eine Reprimierung der Fusion erfolgt.

Parallel dazu wurden GUS Aktivitätsmessungen mit dem pJP2-*gabT* Konstrukt im Wildtyp VF39 durchgeführt (Abb. 19). Das Verhalten des Konstrukts in VF39 zeigte sich als absolut identisch zur *lacZ* Fusion von PH10. Auch hier trat eine Reduktion der Expression bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase auf.

Der „leere“ pJP2 Vektor zeigte als Kontrolle in diesem Experiment GUS Expressionen in vernachlässigbaren Größenordnungen (siehe auch 4.4.3.).

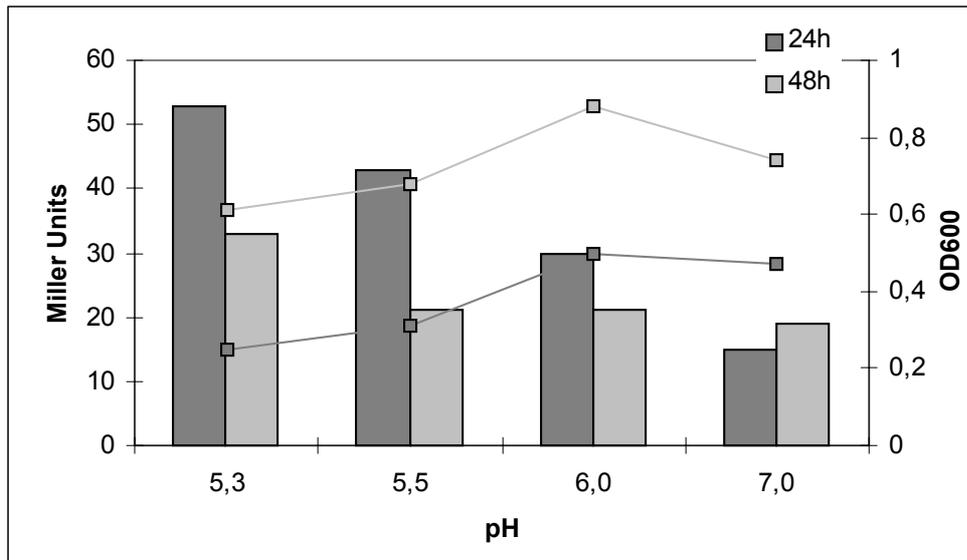


Abb. 18: LacZ Induktion der PH10 Mutante in gepufferten TY Kulturen unterschiedlicher pH Werte (Säulen). Die Kulturdichten zu den Meßzeitpunkten sind als Punkte dargestellt und zum Vergleich durch Linien verbunden.

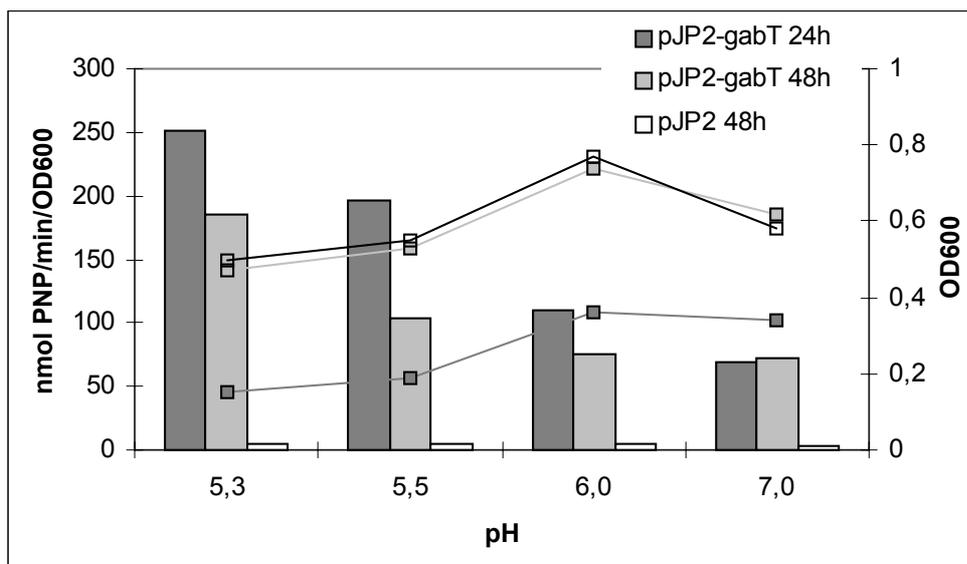


Abb. 19: GUS Induktion von pJP2-*gabT* im Wildtyp VF39 in gepufferten TY Kulturen unterschiedlicher pH Werte (Säulen), sowie die Expression des „leeren“ pJP2 Vektors. Die Kulturdichten zu den Meßzeitpunkten sind als Punkte dargestellt und zum Vergleich durch Linien verbunden.

Auffällig an diesen Daten ist, daß die Induktion von *gabT* mit zunehmender Kulturdichte auf einen Basiswert hin abfällt (siehe 48h Werte in Abb. 18 und 19). Leider sind Kulturen, die in unterschiedlichen pH Medien wachsen schlecht im Wachstum zu synchronisieren, was die Vergleichbarkeit der Reporterogenaktivitätsdaten erschwert. Auf niedrigen pH Werten tritt immer verlangsamtes Wachstum auf.

Dies ist dadurch zu begründen, daß Proliferation der Zellen erst dann einsetzt, wenn die pH Bedingungen des umgebenden Mediums angepaßt sind (Stancik *et al.*, 2002; Boesten & Prell, unveröffentlicht). In Wachstumsexperimenten mit unterschiedlichen Pufferkapazitäten war zu beobachten, daß die Wachstumsrate einer Kultur mit zunehmender Pufferkapazität abnimmt. Mißt man parallel den pH Wert des umgebenden Mediums so stellt man fest, daß Wachstum erst dann einsetzt, wenn ein Schwellenwert überschritten wird. Der Organismus versucht also zunächst die Bedingungen im Medium zu optimieren, bevor er proliferiert. Dabei ist die Art der Nährstoffquelle von entscheidender Bedeutung für die pH Wert-Änderung im Medium (Stancik *et al.*, 2002; Boesten & Prell, unveröffentlicht). Aminosäuren als alleinige Kohlen- und Stickstoffquellen fördern einen Anstieg des pH Werts, Karbonsäuren verhindern dies. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Auffinden von Aminosäuredekarboxylierungssystemen, die in verschiedenen Organismen dem Schutz vor extrem sauren pH Werten dienen (siehe 1.5.).

Die oben dargestellten Induktionsdaten von *gabT* in *R. leguminosarum* VF39 unter sauren Bedingungen lassen vermuten, daß das *gabT* Gen nur solange expremiert wird, bis schnelleres Wachstum möglich wird, d. h. bis der pH Wert des Kulturmediums angepaßt ist.

Physiologisch könnte das bedeuten, daß GABA über die protonenzehrende Dekarboxylierung von Glutamat entsteht und anschließend zur Neutralisierung des pH Werts ausgeschieden wird (Abb. 20 A). GABA Aminotransferase könnte dabei als Folgereaktion einen Teil des entstehenden GABAs über Succinat in den energieliefernden Zitratzyklus einschleusen. Als Voraussetzung dafür müßte allerdings zunächst einmal der Nachweis von Glutamat Dekarboxylase Aktivität erfolgen oder zumindest die Existenz des entsprechenden Gens (*gadA*) in *R. leguminosarum* gezeigt werden, was bisher noch nicht geschah.

Eine andere Überlegung könnte auch 2-Oxoglutarat Dekarboxylierung einbeziehen. 2-Oxoglutarat Dekarboxylase Aktivitäten sind in *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 gezeigt worden (Green *et al.*, 2000). Die Transaminierung des Reaktionsprodukts Succinatsemialdehyd mit Glutamat zu GABA könnte durch GABA Aminotransferase in umgekehrter Richtung erfolgen und zugleich 2-Oxoglutarat regenerieren (Abb. 20 B). Die Nettoreaktionsgleichungen beider Wege wären identisch.

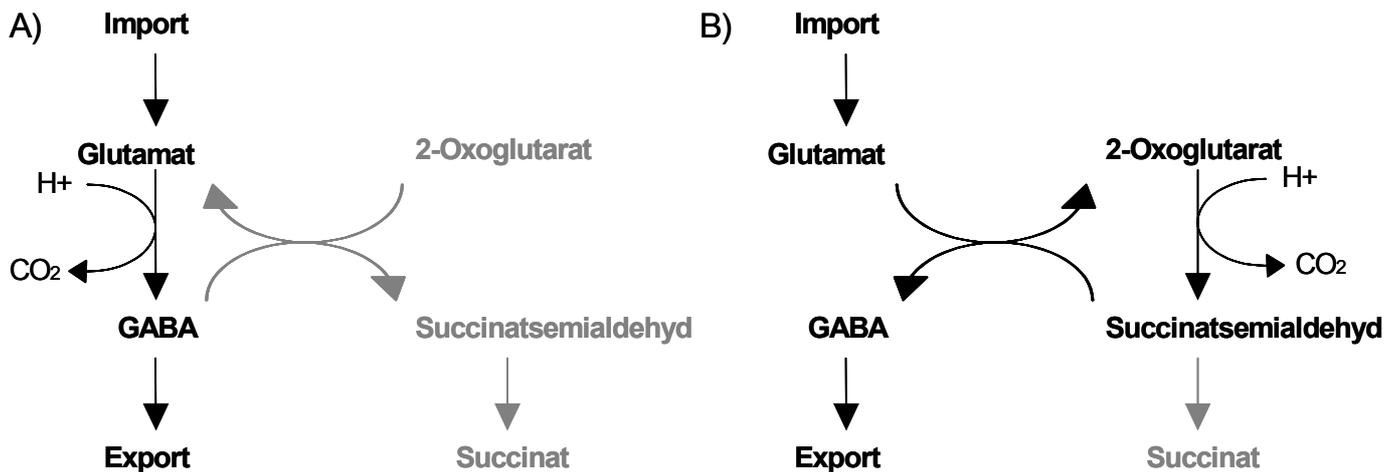


Abb. 20: A) Reaktionsverlauf von Glutamat Dekarboxylierung und Glutamat/GABA Antiport zur Anpassung an saure pH Werte. Zusätzliche GABA Aminotransferase Aktivität zur Entnahme von Kohlenstoff in Form von Succinat (grau). B) Gleicher Reaktionsverlauf mit 2-Oxoglutarat Dekarboxylierung und GABA Aminotransferase Aktivität in umgekehrter Richtung. Hier kann ebenfalls Succinat abgeführt werden (grau).

#### 4.4.7. Expression von *gabT* auf verschiedenen Kohlen- und Stickstoffquellen

Die Induktion von *gabT* durch verschiedene Kohlen- und Stickstoffquellen sollte weiteren Aufschluß über die physiologische Rolle von 2-Oxoglutarat abhängiger GABA Aminotransferase in *R. leguminosarum* VF39 geben.

Die Messungen wurden in VMM unter Zusatz von 0,2%igen Kohlen- und Stickstoffquellen durchgeführt. VMM alleine induzierte die pJP2-*gabT* Fusion in Wildtyphintergrund nicht, noch war Wachstum der Stämme zu beobachten.

Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt. Man erkennt dort eine grundsätzliche Induktion durch GABA, die in den ersten 3 h einen über dreifachen Anstieg der GUS-Aktivität gegenüber der Basisaktivität der TY Vorkultur (Zeitpunkt 0) erreicht. Diese Aktivität scheint aber nur transienter Natur zu sein, da sie nach 24 h, noch vor Eintritt in eine stationäre Phase der Kultur auf das Basislevel hin abfällt. Succinat, als Endprodukt des GABA Shunts, induziert nicht. Zusammen mit GABA reprimiert es die Fusion aber deutlich. Glutamat, als theoretische Vorstufe des GABA Shunts, zeigt ebenfalls keinerlei Induktion von *gabT*. Zusammen mit GABA fördert es die Expression allerdings immens. Diese wird dabei fast verdoppelt (auf über 500 nmol PNP\*min<sup>-1</sup>\*OD<sub>600</sub> Unit<sup>-1</sup>) und erhält konstitutiven Charakter.

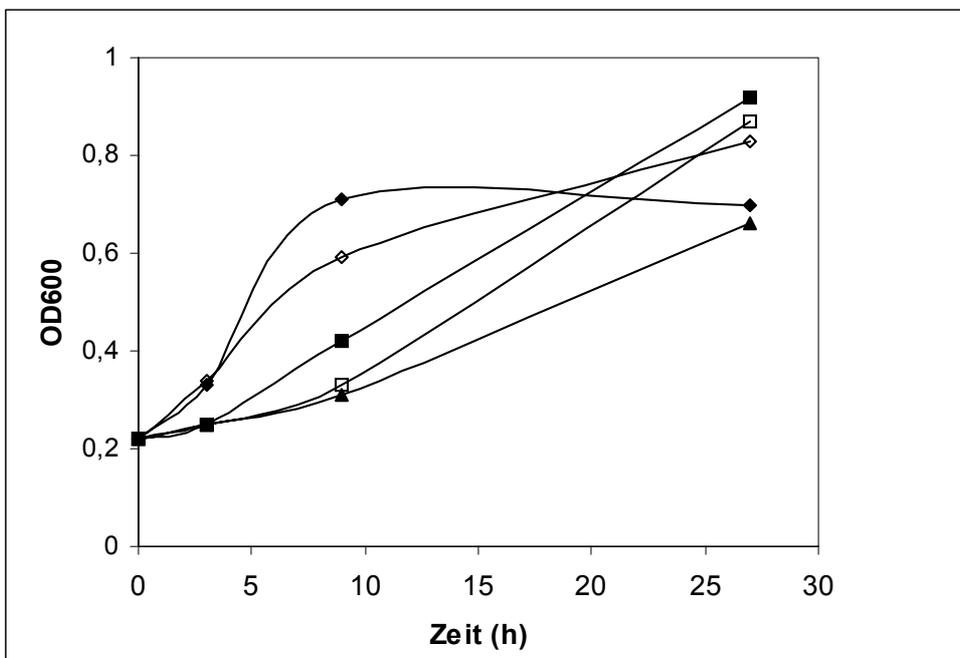
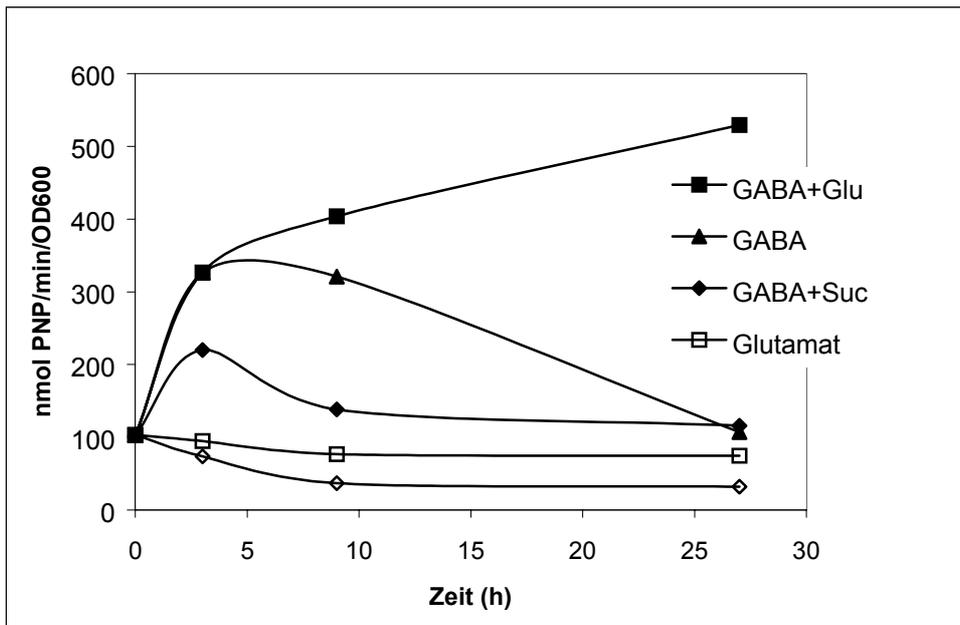


Abb. 21: GUS Induktion und Wachstum von VF39 mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten entsprechen Mittelwerten aus 3 unabhängigen Kulturen. Die Standardabweichung betrug maximal 16% des Mittelwerts. Glu: Glutamat; Suc: Succinat.

In diesem Zusammenhang wurde ein weiteres Experiment durchgeführt (siehe Abb. 22). Hier sollte in einer langsam wachsenden Kultur die Art der transienten bzw. konstitutiven Induktion durch GABA bzw. GABA+Glutamat bestätigt werden. Nach 120 Stunden Wachstum wurde den Kulturen je 0,2% Glutamat bzw. 0,2% Succinat

zugesetzt. Dabei zeigte sich zunächst, daß in beiden Kulturen erneutes Wachstum eintrat, was auf Nährstofflimitation zu diesem Zeitpunkt hindeutet. Des Weiteren ist ersichtlich, daß die dauerhaft stark induzierte GABA+Glutamat Kultur durch die Zugabe von Succinat in ihrer *gabT* Expression stark reduziert wird. In der GABA Kultur wird *gabT* durch die alleinige Zugabe von Glutamat wieder induziert.

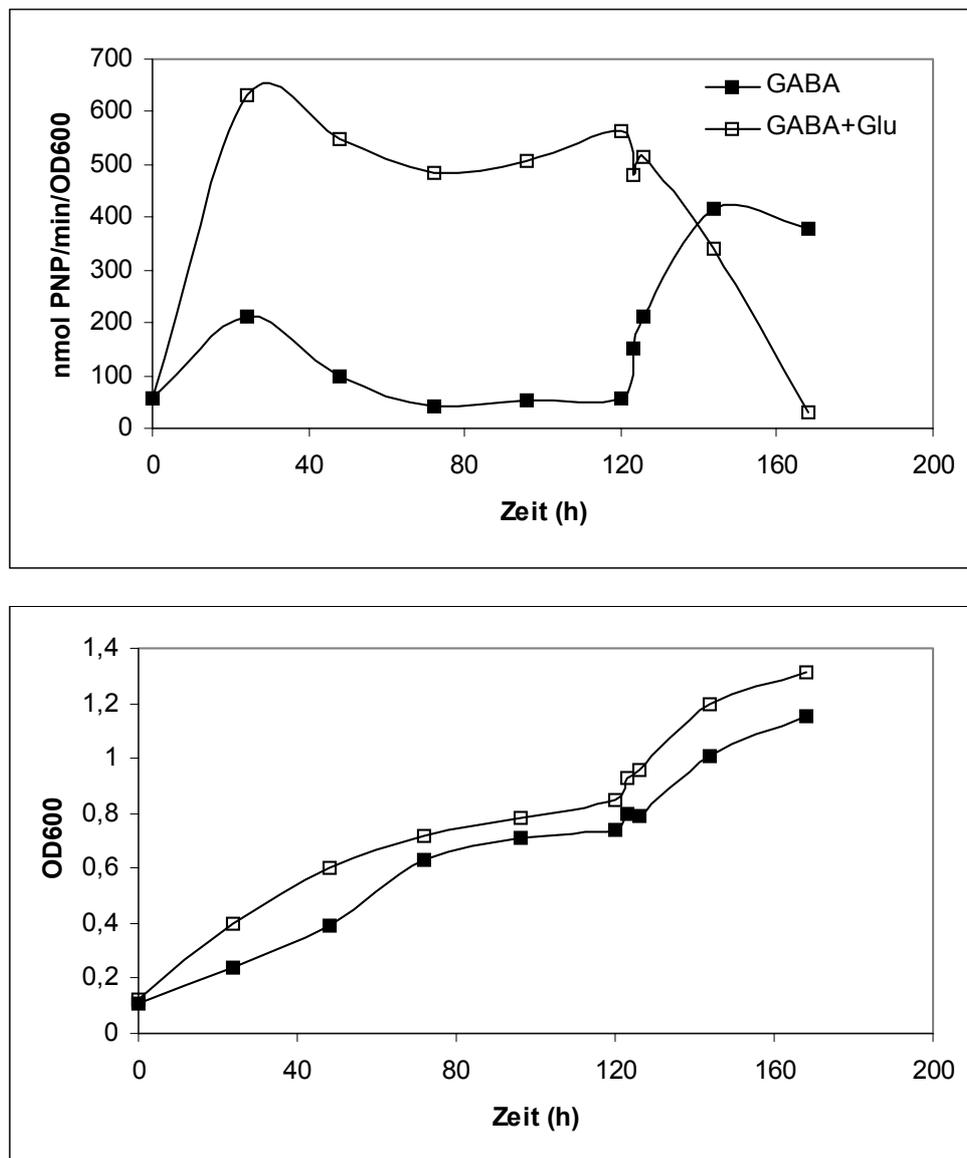


Abb. 22: GUS Induktion und Wachstum von VF39 mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit GABA und GABA+Glutamat. Nach 120 h wurden 0,2% (w/v) Glutamat zu der GABA Kultur bzw. 0,2% Succinat zu der GABA+Glutamat Kultur zugegeben. Die Daten stammen aus jeweils nur einer Kultur. Glu: Glutamat.

Eine Erklärung für die transiente *gabT* Expression durch GABA als alleinige Kohlen- und Stickstoffquelle liegt möglicherweise in der Existenz des alternativen Pyruvat abhängigen Enzyms begründet.

Der Wechsel zu einer konstitutiven Expression bei Zugabe von Glutamat ist allerdings schwer zu erklären. Möglicherweise wird bei Induktion von *gabT* durch GABA+Glutamat auch Glutamat über dieses Enzym metabolisiert und andere glutamatmetabolisierende Enzyme (GDH oder andere Aminotransferasen) durch GABA reprimiert.

Als weitere Substrate wurden die Polyamine Arginin und Ornithin auf Induktion des *gabT* Promotors untersucht. Sie können aus dem Harnstoffmetabolismus über Putreszin zu GABA metabolisiert werden. In Abb. 23 sind die Induktionsdaten dargestellt. GABA diente hier als Kontrolle und verhielt sich in typischer Weise.

Als weitere induzierende Substanz ergab sich Putreszin, obwohl es als alleinige Kohlenstoffquelle kein Wachstum förderte. Ornithin zeigte sich als gute Nährstoffquelle, induzierte *gabT* aber nicht. Arginin war weder als Nährstoffquelle noch zur Induktion geeignet.

Als weitere, nichtinduzierende Substanzen wurden 2-Oxoglutarat und Arabinose sowie Succinatsemialdehyd identifiziert. Succinatsemialdehyd unterstützte durch seine bereits erwähnte Toxizität ebenfalls kein Wachstum.

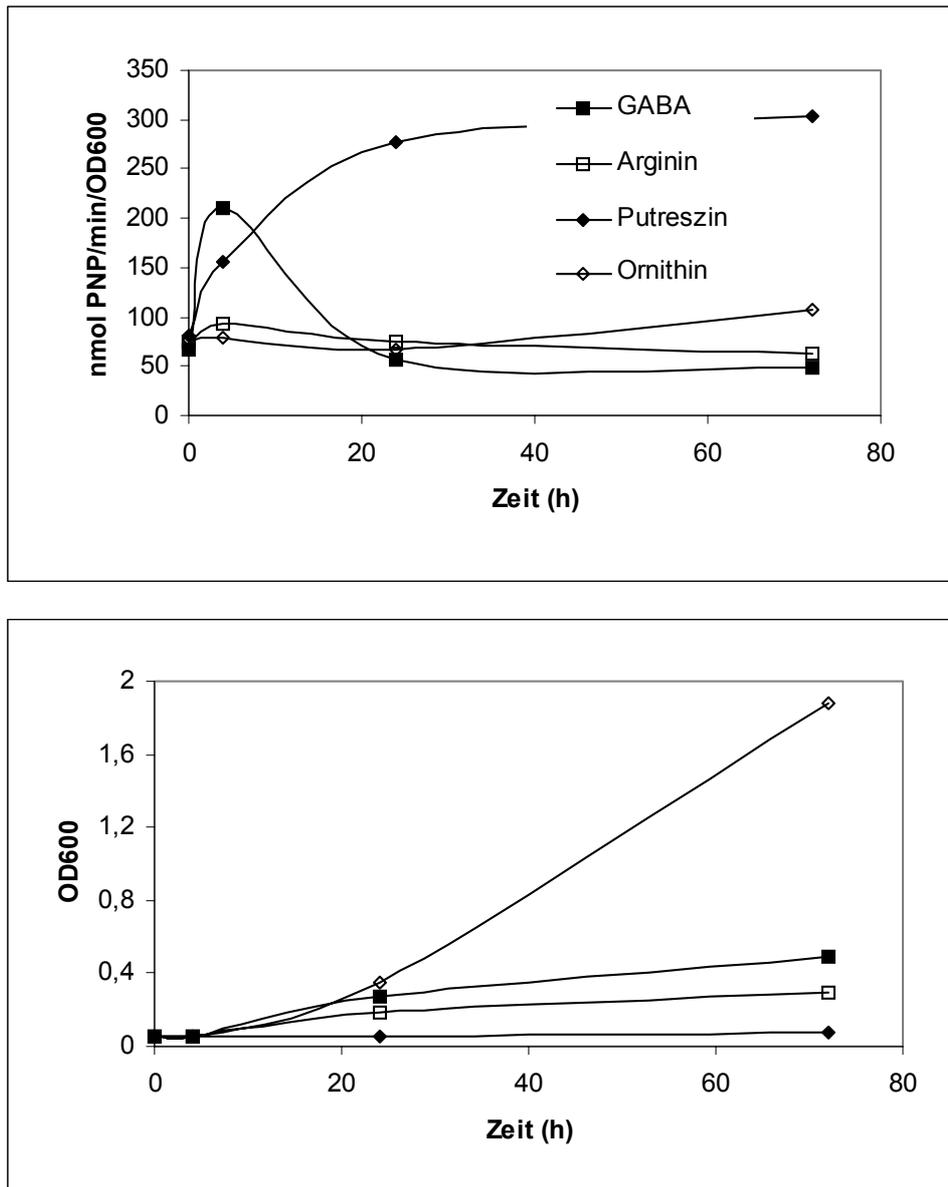


Abb. 23: GUS Induktion und Wachstum von VF39 mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten stammen aus jeweils einer Kultur.

#### 4.4.8. Symbiontische Expression von *gabT*

Zur Lokalisierung der symbiontischen Expression von *gabT* wurden Knöllchen durch *R. leguminosarum* VF39 mit pJP2-*gabT* auf *Pisum sativum* induziert. Die Reporter-genaktivität wurde durch GUS-Färbungen in 80  $\mu$ m Longitudinalschnitten von 28 Tage alten Knöllchen visualisiert (Abb. 24). Die Induktion der *gabT::uidA* Fusion beginnt im proximalen Teil der Infektionszone II (Zone der bakteriellen Infektion der Pflanzenzellen und Beginn der Differenzierung zu Bakteroiden), in der Nähe der Interzone II-III (Zone der Ausdifferenzierung zu Bakteroiden und Induktion der stickstofffixierenden Gene) und setzt sich in die späte symbiontische Zone III (Zone der

symbiontischen Stickstofffixierung) fort. Dort wird die Fusion stark exprimiert, wie quantitative Messungen von Bakteroidensuspensionen bestätigen. Die Aktivität der Reporterfusion wurde mit  $813 \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{OD}_{600} \text{ Unit}^{-1}$  ( $\pm 63$ ,  $n=3$ ) gemessen und liegt damit höher als die maximale Induktion von freilebenden Kulturen in VMM mit 0,2% GABA und Glutamat (siehe Abb. 21).

Die Induktion der GABA Aminotransferase beginnt also mit der Differenzierung zum Bakteroid und läßt somit auf eine eventuelle, allerdings nicht essentielle Relevanz während der Stickstofffixierung schließen.

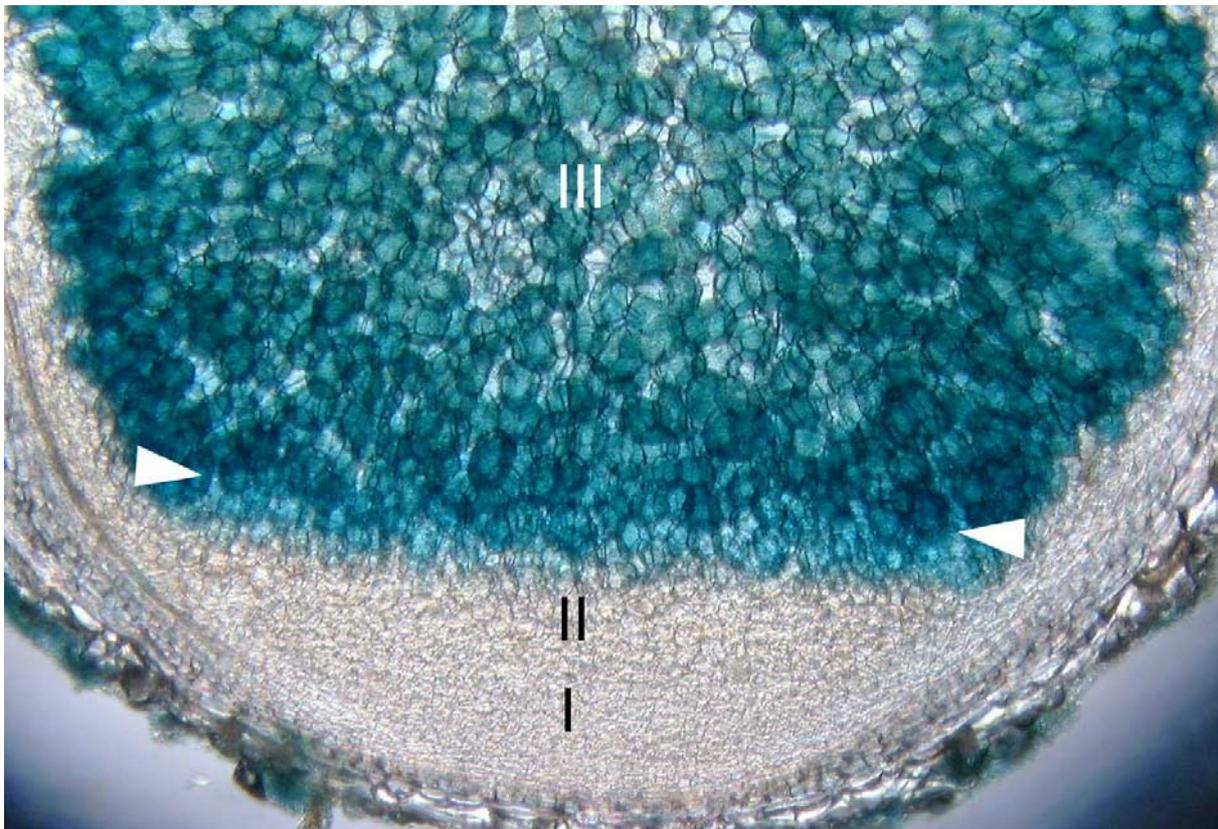


Abb. 24: Symbiontische Expression von pJP2-*gabT*. Die Knöllchen wurden durch VF39 pJP2-*gabT* auf der Wirtspflanze *Pisum sativum* induziert. Die Dünnschnitte haben eine Dicke von 80  $\mu\text{m}$ . I, Meristematische Zone; II, Infektionsszone; III, Symbiontische Zone. Die Pfeile markieren den Beginn von Interzone II-III (gekennzeichnet durch eingelagerte Stärkekörner, dunklerer Bereich).

#### 4.4.9. Expression von *gabT* im *gabT* Mutanten Hintergrund

Die GUS Aktivitäten der *gabT::uidA* Fusion in *gabT* Mutanten (VF39-19T und PH10) zeigten ähnliche Verläufe (qualitativ wie quantitativ) wie im Wildtyphintergrund. Auffällig war allerdings, daß sich die konstitutive Natur der Induktion durch GABA

und Glutamat in *gabT* Mutanten in eine transiente verwandelte. Die Induktionskurven von Kulturen mit GABA und GABA+Glutamat verhielten sich demnach gleich. Dieses Phänomen war in allen *gabT* Mutanten zu beobachten (Abb. 25 und 26).

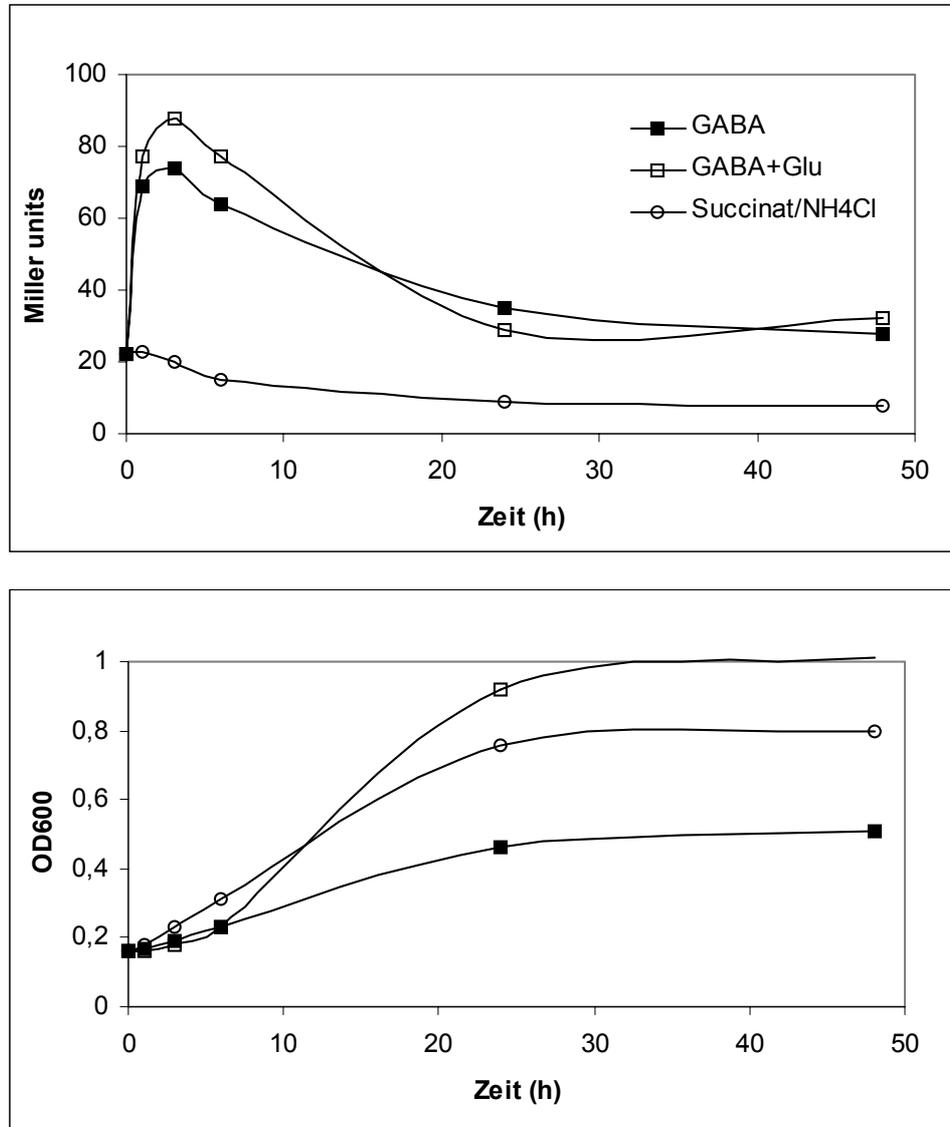


Abb. 25: LacZ Induktion und Wachstum von PH10 in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten stellen ein Beispiel aus mindestens zwei vergleichbaren Experimenten dar.

Eine Interpretation dieser Beobachtung fällt schwer. Vielleicht wird bei Ausbleiben einer möglichen Metabolisierung von Glutamat durch GABA Aminotransferase (siehe dazu Diskussion transienter und konstitutiver *gabT* Expression unter 4.4.7.) auch das Gen reprimiert.

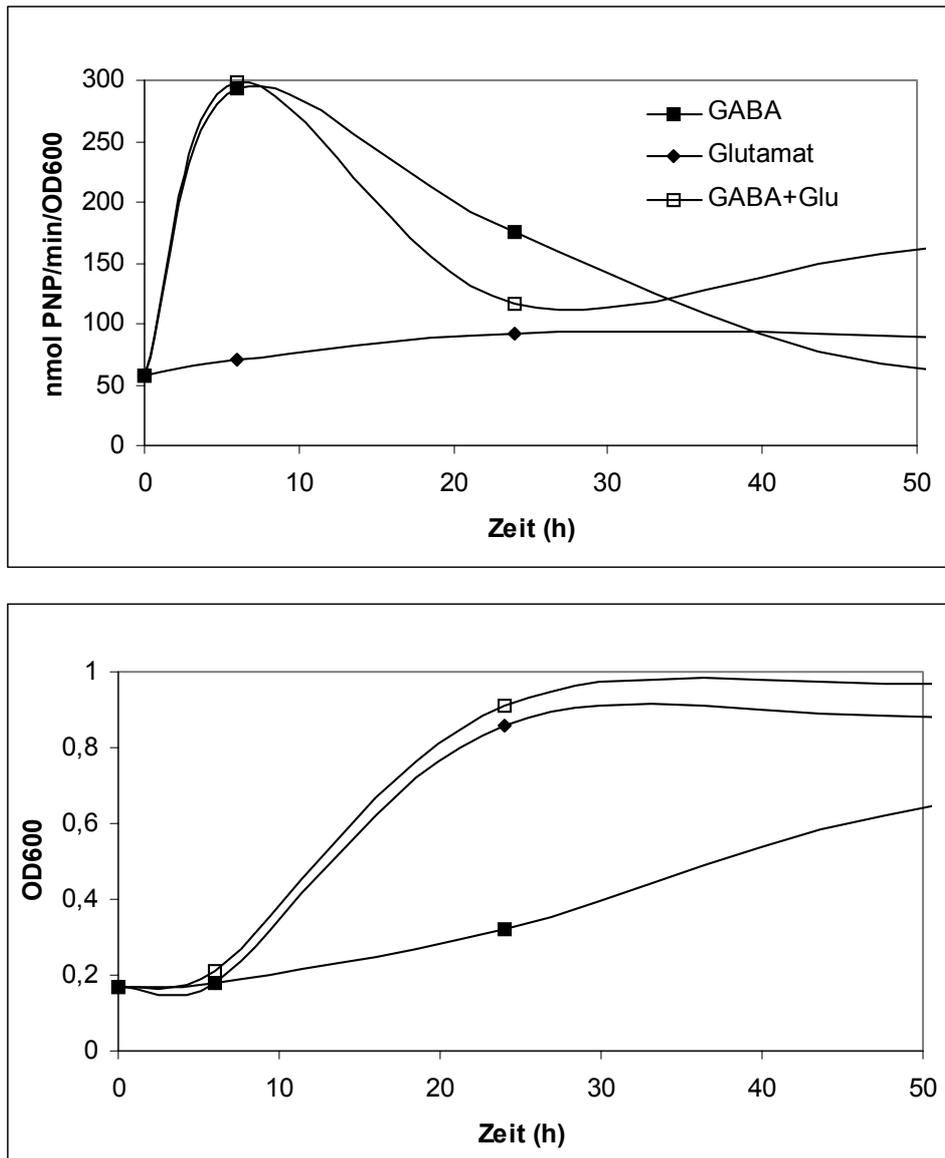


Abb. 26: GUS Induktion und Wachstum von VF39-19T mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten stellen ein Beispiel aus mindestens zwei vergleichbaren Experimenten dar.

#### 4.4.10. Expression von *gabT* in einem *sucA* Mutanten Hintergrund

Zur weiteren Betrachtung der Relevanz des GABA Shunts in *R. leguminosarum* wurde die Expression von *gabT* in einem *sucA* Mutantenhintergrund gemessen.

2-Oxoglutarat Dehydrogenase (*sucAB*) ist ein Schlüsselenzym des Zitratzyklus (siehe 1.2.). Es wird in vielen Bakterienspezies zusammen mit der im Zyklus nachfolgenden Succinyl-CoA Synthetase (*sucCD*) in einem Operon expremiert (z.B. Walshaw *et al.*, 1997; Poole *et al.*, 1999; Green & Emerich, 1997; Darlison *et al.*, 1984; Spencer *et al.*, 1984; Buck *et al.*, 1985; Park *et al.*, 1997). In *R. leguminosarum*

wird das *sucCDAB* Operon sogar zusammen mit der ebenfalls im Zitratzyklus lokalisierten Malat Dehydrogenase (*mdh*) expremiert (Walshaw *et al.*, 1997; Poole *et al.*, 1999). Dabei scheint der *mdh* Promotor alleine für die Expression des gesamten Operons verantwortlich zu sein. Die gleiche Anordnung der Strukturgene findet sich in der Sequenz von *S. meliloti* (Finan *et al.*, 2001). In *E. coli* wird das *suc* Operon zusammen mit der Succinat Dehydrogenase (*sdhCDAB*; Park *et al.*, 1997) expremiert. Es scheint also, daß die Expression verschiedener Enzyme des Zitratzyklus transkriptionell gekoppelt sein kann und folglich auch zusammen reguliert wird.

Wichtig im Zusammenhang mit dem GABA Metabolismus ist, daß der GABA Shunt oder Teile dessen als alternativer Umweg für den 2-Oxoglutarat Dehydrogenase- und Succinyl-CoA Synthetase Komplex fungieren könnten (siehe 1.3.1.). Deshalb sollte die Expression der GABA Aminotransferase in einer *sucA* Mutante möglicherweise interessante Ergebnisse liefern.

Von *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Johnston & Beringer, 1975) lag eine *sucA* Transposonmutante vor (Walshaw *et al.*, 1997). Ihr Phänotyp wurde folgendermaßen beschrieben: Kein Wachstum auf Arabinose und Glutamat. Beide Substrate werden über 2-Oxoglutarat metabolisiert (Dilworth *et al.*, 1986). Der symbiontische Phänotyp war Fix<sup>-</sup>.

In dieser Arbeit zeigte die *sucA* Mutante auf Vollmedium generell schlechtes Wachstum. Ihr symbiontischer Fix<sup>-</sup> Phänotyp konnte bestätigt werden. Auf VMM mit 0,2% GABA wuchs sie ähnlich gut wie der Wildtyp 3841. Auf VMM mit 0,2% Glutamat hingegen wurde im Gegensatz zu den Angaben von Walshaw *et al.* (1997) ebenfalls geringfügiges Wachstum festgestellt. Dies berichteten ebenfalls L. Green & D. Emeric (1997) von einer *sucA* Mutante von *B. japonicum*.

Nach Konjugation von pJP2-*gabT* in die *R. leguminosarum* 3841 *sucA* Mutante zeigte sich auf TY Medium mit X-Glc sofort eine deutlich stärkere Blaufärbung im Verhältnis zum Wildtyp. In VMM Kulturen mit 0,2% Substrat wurden folgende GUS Induktionen ermittelt (Abb. 27). Die Induktion der TY Vorkultur (Zeitpunkt 0) zeigte im Durchschnitt eine Induktion von ca. 250 nmol PNP\*min<sup>-1</sup>\*OD<sub>600</sub> Unit<sup>-1</sup>. Das Wachstum in VMM mit GABA war moderat aber vergleichbar mit den bekannten Wildtypdaten. Die Induktion auf das dreifache des Ausgangswertes und der transiente Verlauf waren auch ähnlich den Erfahrungen mit *R. leguminosarum* VF39. Ein deutlicher Unterschied trat allerdings bei Wachstum in VMM mit 0,2% Glutamat auf. Zunächst zeigte die Kultur wie erwartet kein Wachstum. Nach 24 h setzte allerdings Wachstum

gekoppelt mit *gabT* Induktion ein. Der Verlauf dieser Induktion war demjenigen auf GABA ähnlich.

Die Vermutung, daß eine „second site“ Mutation diesen Phänotyp verursachte, konnte durch Ausstreichen der Kultur nach Beendigung des Experiments auf VMM mit Glutamat im Vergleich zum Ausgangsstamm ausgeschlossen werden, da beide gleich schlechtes Wachstum zeigten. Diese Daten widersprechen den Angaben von Walshaw *et al.* (1997). Der einzige Unterschied im Versuchsansatz ist die Art des Minimalmediums (AMS und VMM) und die Konzentration der Substrate (10 mMol und 0,2%).

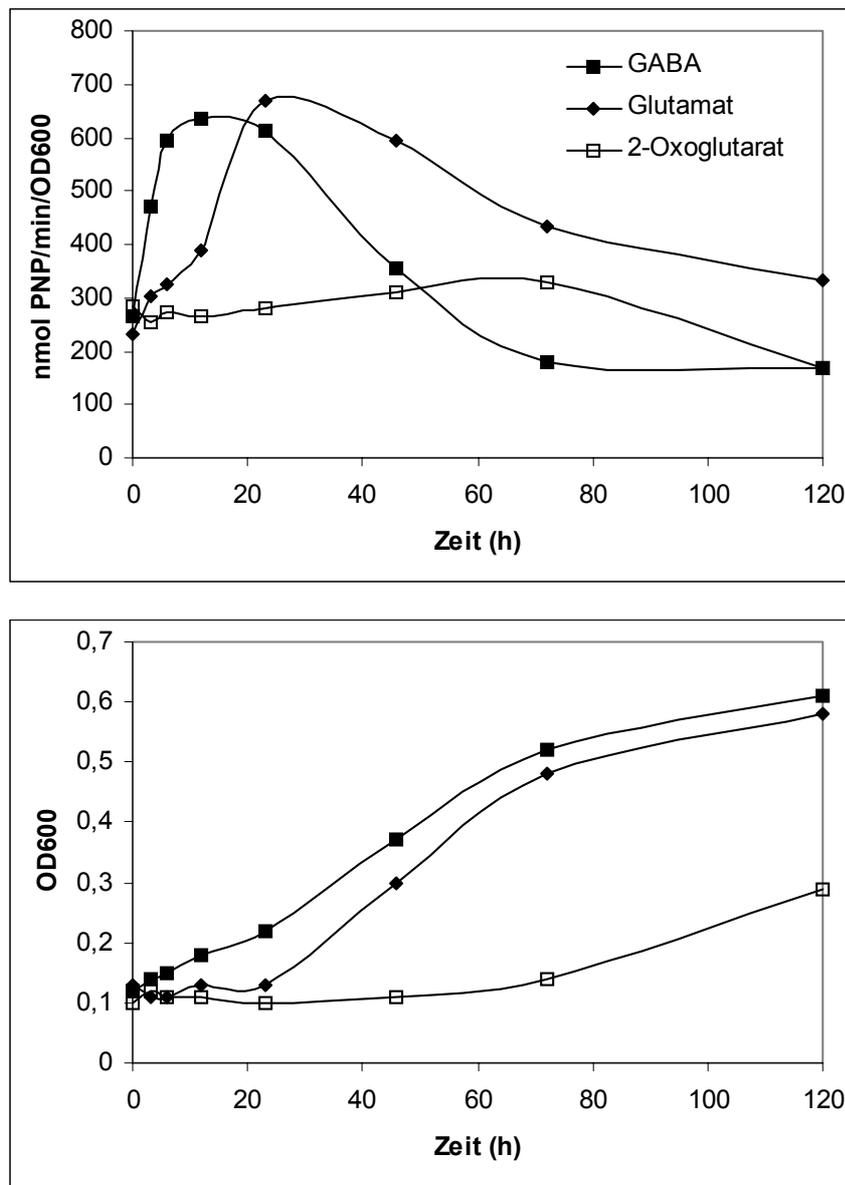


Abb. 27: GUS Induktion und Wachstum von 3841 *sucA* mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten stellen ein Beispiel aus mindestens zwei vergleichbaren Experimenten dar.

Das Versuchsergebnis zeigt, daß der GABA Shunt in einer *sucA* Mutante wie im Wildtyp der Metabolisierung von GABA dient. Dies ist gemäß der Erwartung, weil die *sucA* Mutation die Metabolisierung von GABA nicht behindert. Im Gegensatz zum Wildtyp scheint es aber in dieser Mutante auch möglich Glutamat über den GABA Shunt zu metabolisieren. Dies könnte allerdings nur nach Expression zusätzlicher Enzyme, wie Glutamat Dekarboxylase oder möglicherweise auch 2-Oxoglutarat Dekarboxylase (siehe Abb. 20) geschehen.

#### **4.5. Regulation von *gabT***

Die Vermutung, daß *gabT* über das Genprodukt von *gabR* reguliert wird, sollte am einfachsten in einer *gabR* Mutante überprüft werden.

##### **4.5.1. Konstruktion einer *gabR* Mutante**

Die Konstruktion der *gabR* Mutante VF39-18R ist in Abb. 28 dargestellt. Leider lagen zum Zeitpunkt der Konstruktion nur unvollständige Sequenz- und Homologiedaten vor. Die genaue Lokalisierung des *gabR* Startkodons war noch nicht eindeutig erfolgt, so daß der Stamm VF39-18R im Nachhinein keine „echte“ Mutante darstellt. Die *Hind*III Schnittstelle, die zum Erzeugen von VF39-18R diente liegt etwa 30 bp vor dem *gabR* Startkodon (Abb. 12). Die später beschriebenen Phänotypen von VF39-18R lassen aber trotzdem auf eine Mutante schließen. Anscheinend trennt die Plasmidintegration den Leserahmen vom Promotor und erzeugt deshalb den *gabR* Phänotyp.

Die korrekte Plasmidintegration von VF39-18R wurde durch eine Southern Hybridisierung bestätigt (Abb. 16). Auch hier war ein unvollständiger *Sal*I Verdau der durch die Integration zusätzlich eingeführten *Sal*I Schnittstelle des Vektors zu beobachten (siehe 4.3.5.).

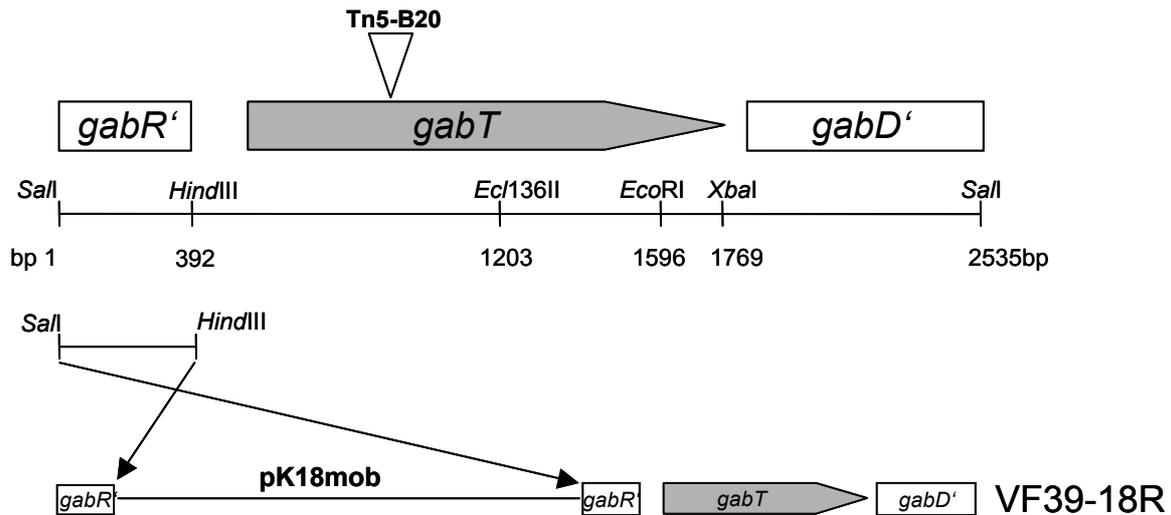


Abb. 28: Konstruktion der Plasmidintegrationsmutante VF39-18R. Das zur Erzeugung der Mutante verwendete Ausgangsplasmid ist in Abb. 4 gezeigt. Der „single crossover“ führte zur Integration des Plasmids und zur Duplikation des eingesetzten homologen Fragments.

#### 4.5.2. Expression von *gabT* in VF39-18R

Nach Konjugation von pJP2-*gabT* in VF39-18R zeigte sich auf TY Platten mit X-Glc als zusätzlichem Substrat eine rasche und intensive Blaufärbung der Kolonien. Enzymaktivitätsmessungen zeigten, daß die Aktivität von 2-Oxoglutarat abhängiger GABA Aminotransferase in Rohextrakten von VF39-18R um das 5-Fache höher lag als im Wildtyp (Tab. 3). Die Pyruvat abhängige Aktivität war nicht beeinflusst. Ebenfalls zeigte sich keine signifikante Änderung in der SSDH Aktivität.

Die Interpretation dieser Ergebnisse wird darin vermutet, daß die Plasmidintegration in das klonierte *Sall-HindIII* Fragment den *gabR* Promotor vom Leserahmen trennt (siehe Abb. 12). Es resultiert eine *gabR* Mutante. In dieser Mutante (VF39-18R) wird *gabT* stärker expremiert. Das legt den Schluß nahe, daß GabR als Repressor oder Repressor/Aktivator auf den *gabT* Promotor wirkt (siehe 4.1.4.).

Zur weiteren Kontrolle dieser Vermutung wurde das Konstrukt VF39-19R erzeugt. Hierzu diente das gleiche *Sall-HindIII* Fragment. Allerdings wurde es in den Vektor pK19mob kloniert, was zur Folge hatte, daß der vektoreigene *lacZ* Promotor vor die *HindIII* Schnittstelle und somit vor den *gabR* Leserahmen kloniert wurde. Der *E. coli* eigene Promotor wird in *R. leguminosarum* VF39 konstitutiv expremiert (z.B. Poole et

al., 1999) und sollte somit in VF39-19R zu einer konstitutiven Expression von *gabR* führen.

Nach Konjugation von pJP2-*gabT* in die Mutante VF39-19R zeigten sich auf TY Platten mit X-Glc gänzlich weiße Kolonien. Kolonien des Wildtyps VF39 mit pJP2-*gabT* waren verglichen dazu auf den gleichen Platten schwach blau.

Die Expression von *gabR* scheint also in VF39-19R durch den *E. coli lacZ* Promotor stärker zu sein als im Wildtyp. Dies bestätigt die Trennung des *gabR* Promotors vom Leserahmen in beiden Mutantenkonstruktionen (VF39-18R und VF39-19R).

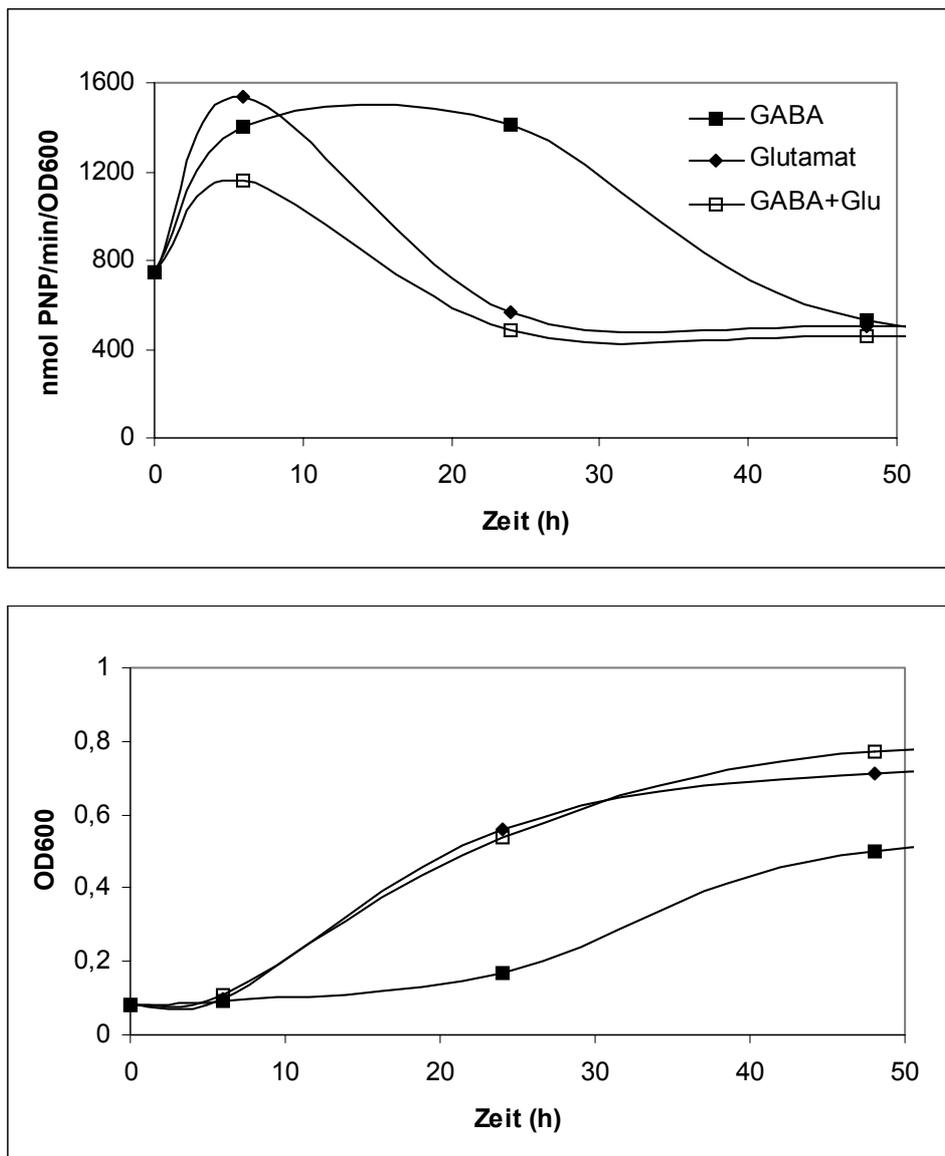


Abb. 29: GUS Induktion und Wachstum von VF39-18R mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten stellen ein Beispiel aus mindestens zwei vergleichbaren Experimenten dar.

Quantitative Messungen in VMM Kulturen bestätigen diese Vermutungen (Abb. 29 und 30; Y-Achsen Skalierung beachten).

Die Daten zeigen im Fall von VF39-18R sehr hohe Expressionen, die dereguliert und wachstumsabhängig erscheinen. VF39-19R ist im Vergleich zum Wildtyp in seiner Expression reduziert. Auch hier ist keine typische Regulation mehr ersichtlich.

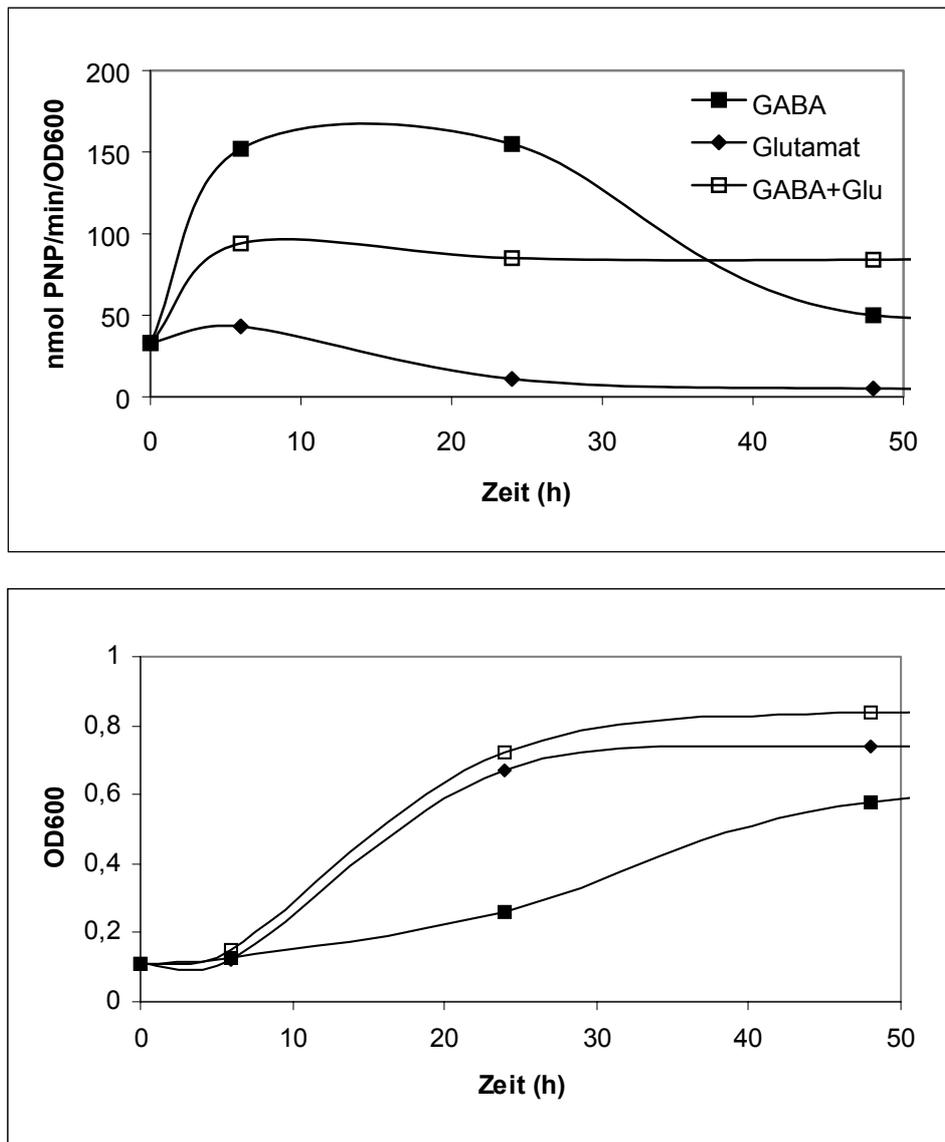


Abb. 30: GUS Induktion und Wachstum von VF39-19R mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten stellen ein Beispiel aus mindestens zwei vergleichbaren Experimenten dar.

In den frühen Arbeiten von S. Dover und Y.S. Halpern (1972) über das *gab* Operon in *E. coli* wurde schnell vermutet, daß die Mutanten, die erhöhte GABA Aminotransferase- und SSDH Aktivitäten aufwiesen und somit GABA metabolisieren konnten,

wahrscheinlich regulatorische Mutanten sein müssten. Auch hier schien eine repressorische Regulation am wahrscheinlichsten.

In der jüngsten Arbeit über das *gabTD* Operon von *B. subtilis* (Belitsky & Sonenshein, 2002) wird *gabR* als transkriptioneller Aktivator beschrieben. *GabR* Mutanten exprimierten unter induzierenden Bedingungen keine GABA Aminotransferase- und SSDH Aktivitäten mehr.

Als weiteres Resultat konnte durch den Verdau von VF39-19R Gesamt-DNA mit *PvuI* und anschließender Religation und Transformation von *E. coli* ein Plasmid gewonnen werden, das annähernd das gesamte *gabT* tragende 2,5 kb Fragment enthielt (siehe *PvuI* Schnittstelle in Abb. 12). Das resultierende Plasmid ist in Abb. 31 dargestellt.

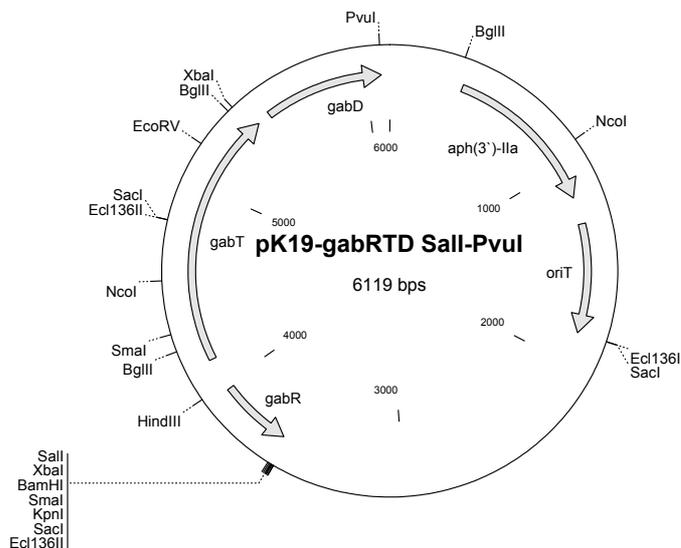


Abb. 31: Plasmidkarte von pK19mob-*gabRTD* Sall-*PvuI*. *aph(3')-IIa*: Kanamycin-/Neomycin-resistenz; *oriT*: RP4 „origin of transfer“ zur konjugativen Mobilisierung.

#### 4.5.3. Expression von *gabT* in einer *gabD*-Mutante

Parallel zur Konstruktion der Mutanten VF39-18R und VF39-19R sollte eine *gabD* Mutante VF39-19D (Abb. 32) erzeugt werden. Auch hier wurde aus Mangel an korrekten Sequenzinformationen zu diesem Zeitpunkt keine „echte“ *gabD* Mutante erzeugt. Die zur Klonierung verwendete *XbaI* Schnittstelle liegt in diesem Fall sogar noch innerhalb des *gabT* Leserahmens (Abb. 12). Die im Folgenden beschriebenen

Ergebnisse lassen jedoch auch hier auf eigene *gabD* Phänotypen schließen. Möglicherweise trennt hier die Plasmidintegration die Leserahmen von *gabT* und *gabD* innerhalb der Operonstruktur, was einen polaren Effekt auf *gabD* haben könnte.

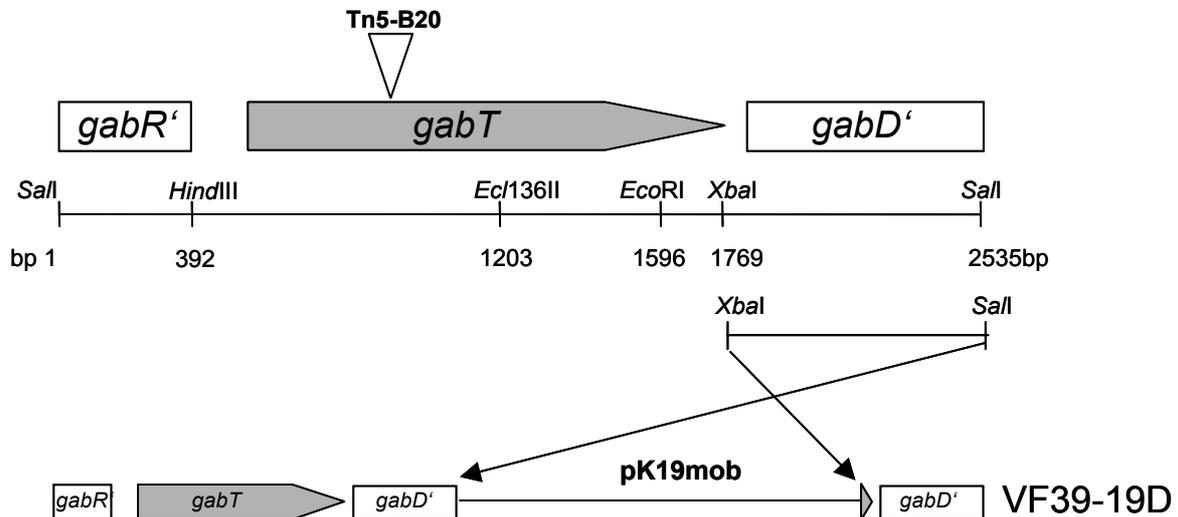


Abb. 32: Konstruktion der Plasmidintegrationsmutante VF39-19D. Das zur Erzeugung der Mutante verwendete Ausgangsplasmid ist in Abb. 5 gezeigt. Der „single crossover“ führte zur Integration des Plasmids und zur Duplikation des eingesetzten homologen Fragments.

Die korrekte Plasmidintegration von VF39-19D wurde nicht per Southern Hybridisierung überprüft.

VF39-19D zeigte jedoch auf TY Platten mit X-Glc im Vergleich zum Wildtyp deutlich stärkere Blaufärbung.

Messungen in VF39-19D Rohextrakten ergaben 2-Oxoglutarat abhängige GABA Aminotransferaseaktivitäten von  $3,87 \text{ nmol Glutamat min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  ( $n=4$ ). Dies ist ein Aktivitätsanstieg auf das etwa 3-Fache.

Expressionsstudien in VMM Flüssigmedien zeigten ähnliche Induktionsverläufe wie in *gabT* Mutantenhintergründen (siehe Abb. 33 und vergleiche 4.4.9.). Die Induktion der *gabT::uidA* Fusion war jedoch ebenfalls um ein etwa 3-Faches höher. Dies bestätigte die stärkere *gabT* Expression in dieser Mutante.

Die SSDH Aktivität war allerdings nicht signifikant niedriger als im Wildtyp oder den *gabT* Mutanten (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle muß, ähnlich wie schon unter

4.3.3. diskutiert wurde, auf mangelnden Kenntnisstand bezüglich der verschiedenen SSDH Gene und deren Kofaktoren verwiesen werden.

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist natürlich spekulativ. Anscheinend hat die Unterbrechung des Operons zwischen *gabT* und *gabD* bei gleichzeitigem Erhalt eines vollständigen *gabD* Leserahmens (siehe Abb. 32) einen Einfluß auf die *gabT* Expression am stromaufwärts gelegenen *gabT* Promotor.

Walshaw *et al.* (1997) berichteten den gleichen Effekt auf den *mdh* Promotor und die *mdh* Enzymaktivität in *sucD* und *sucA* Mutanten. Das gesamte Operon (*mdh-sucCDAB*) wurde vom *mdh* Promotor reguliert und „downstream“ Mutationen erhöhten die Operon eigene Transkription. In diesem Fall könnte die Erklärung darin liegen, daß in „downstream“ Mutanten 2-Oxoglutarat wegen der fehlenden 2-Oxoglutarat Dehydrogenaseaktivität (*sucAB*) akkumulierte. Wachstum des Wildtyps auf Arabinose (Metabolismus über 2-Oxoglutarat) zeigte die größte substratabhängige Induktion des *mdh* Promotors, was diese Erscheinung erklären würde.

B.R. Belitsky und A.L. Sonenshein (2002) berichteten in der jüngst veröffentlichten Arbeit über das homologe *gabTD* Operon in *B. subtilis* von einem ähnlichen Phänomen. In einer *gabD* Mutante wurde in normalerweise nicht induzierendem Glutamat Medium plötzlich *gabT* expremiert. Sie versuchten dies durch einen zweiten metabolischen Weg, der bei Succinatsemialdehyd endet und durch dessen Akkumulation *gabT* induziert und eine Reaktion zu GABA ermöglicht wird, zu erklären.

Im Falle von VF39-19D sind diese Erklärungsversuche beide schwer vorstellbar.

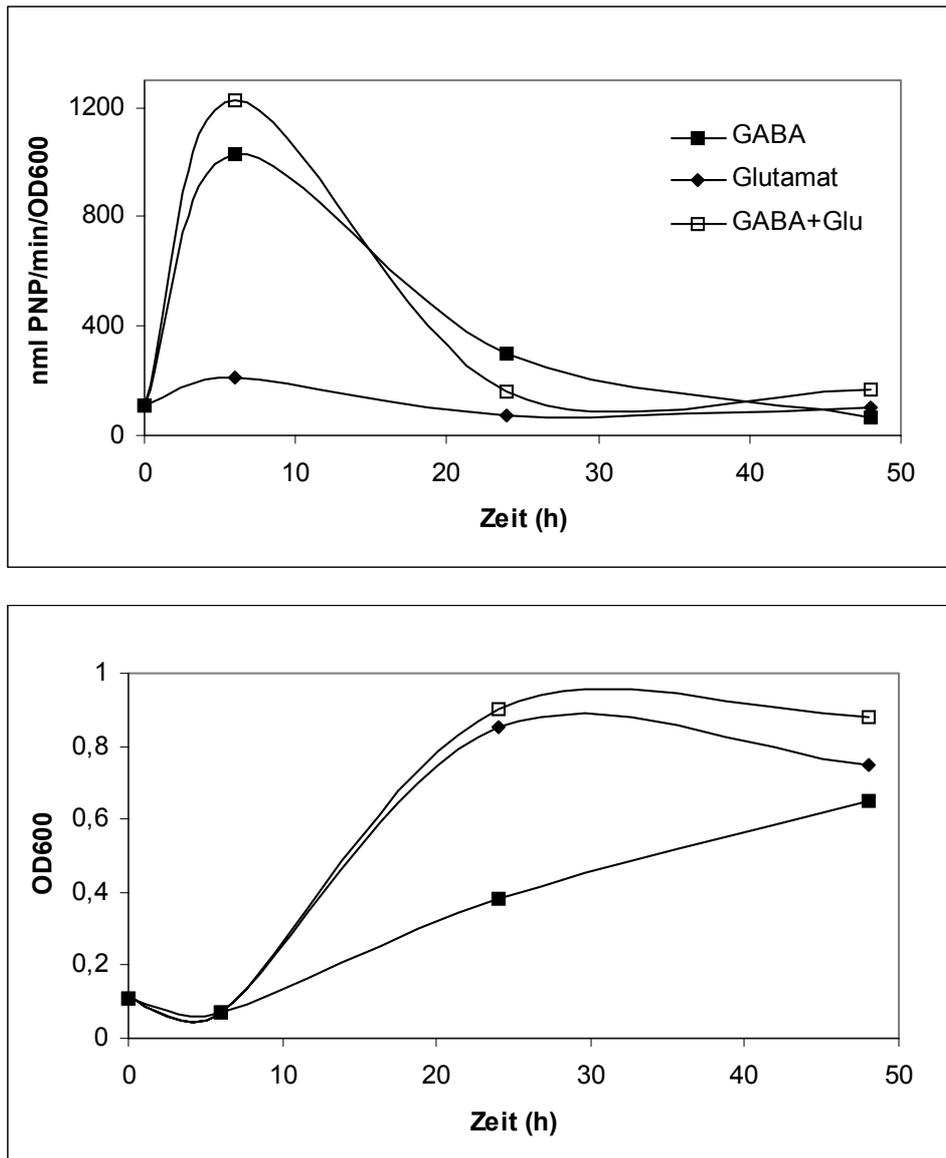


Abb. 33: GUS Induktion und Wachstum von VF39-19D mit pJP2-*gabT* in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen. Die Daten stellen ein Beispiel aus mindestens zwei vergleichbaren Experimenten dar.

#### 4.6. Eigene Promotoraktivitäten von *gabR'* und *gabD'*

Zur weiteren Analyse der Expression des *gabTD* Operons in *R. leguminosarum* VF39 sollte zusätzlich noch auf eine mögliche *gabD* eigene Expression in der *gabTD* intergenischen Region untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein 791 bp *BglII-SalI* Fragment (siehe Abb. 12) in die *BamHI* und *XhoI* Schnittstellen von pJP2 kloniert. Dieses Fragment beinhaltet 59 bp des 3'-Endes von *gabT*, die gesamte intergenische Region und das bekannte 5'-Ende von *gabD'*. Es resultierte das Plasmid pJP2-*gabD* (Abb. 9).

Im Wildtyphintergrund war auf TY Platten mit X-Glc keinerlei Blaufärbung zu erkennen. VMM Flüssigkulturen mit verschiedenen Substraten (0,2% Succinat, GABA, Glutamat oder GABA+Glutamat) exprimierten durchschnittlich  $11 (\pm 4)$  nmol  $\text{PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{OD}_{600} \text{ Unit}^{-1}$  (n=18). Damit ist davon auszugehen, daß kein *gabD* eigener Promotor in der *gabTD* intergenischen Region vorliegt, und *gabTD* wahrscheinlich in einem Operon exprimiert wird. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß innerhalb des *gabT* Leserahmens, upstream der letzten 59 bp *gabD* eigene Promotorsequenzen vorhanden sind.

Des Weiteren sollte die Expression des *gabR* eigenen Promotors gemessen werden. Zu diesem Zweck wurde pJP2-*gabR* (siehe 4.4.5. und Abb. 8) in den Wildtyphintergrund mobilisiert. Auf TY Platten mit X-Glc war eine schwache, ähnlich der durch pJP2-*gabT* induzierte Blaufärbung zu beobachten. In VMM Flüssigkulturen mit verschiedenen Substraten (0,2% Succinat, GABA, Glutamat oder GABA+Glutamat) war eine durchschnittliche Induktion von  $47 (\pm 26)$  nmol  $\text{PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{OD}_{600} \text{ Unit}^{-1}$  (n=18) zu messen.

GABA zeigte dabei keinen erkennbaren Einfluß auf die *gabR* Expression.

Eine eingehendere Untersuchung des *gab* Operons erfolgte bisher nur in *B. subtilis* (Belitzky & Sonenshein, 2002). Dort war die *gabR* Expression relativ schwach und zeigte negative Autoregulation, auf die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. GABA zeigte ebenfalls keinerlei direkten Einfluß auf die *gabR* Expression. Die sehr homolog erscheinende Struktur des *gabRTD2* Operons in *S. meliloti* 1021 wurde bisher nicht untersucht.

#### 4.7. Weitere Arbeitsansätze zum Auffinden GABA metabolisierender Enzyme

Auf Grund der schon angesprochenen Problematik des Ausbleibens eines Wachstumsphänotyps von PH10 (siehe 4.3.1.) und der vorhandenen Pyruvat abhängigen GABA Aminotransferaseaktivität (siehe 4.3.2.) wurden weitere Versuche zum Auffinden GABA metabolisierender Enzyme unternommen.

Zunächst sollte eine Tn5 Mutagenese einer *gabT* Mutante mit anschließendem Wachstumsscreening auf VMM mit 0,2% GABA durchgeführt werden. Dazu mußte zunächst der Resistenzmarker gewechselt werden, da in beiden *gabT* Mutanten (PH10 und VF39-19T) eine Tn5 Mutagenese wegen identischer Selektion (beide Neomycin) unmöglich war. In das Plasmid pK19mob-*gabRTD* *Sall*-*PvuI* (Abb. 31) wurde eine Gentamycinkassette inseriert und dabei ein Teil von *gabT* deletiert. Die Insertion des Resistenzgens erfolgte in beide Richtungen und erzeugte die Konstrukte pK19mob-*gabRTD*-genta1 und -genta2. Die über „double crossover“ aus dem zweiten Konstrukt (Abb. 34) resultierende *gabT* Mutante VF39-*gabT*-genta2 zeigte etwas schlechteres Wachstum auf GABA Minimalmedien, was eventuell auf einen polaren Effekt der Gentamycinkassette auf den Regulator *gabR* zurückzuführen sein könnte. Diese Deletionsmutante zeigte allerdings auch die bereits unter 4.3.1. besprochenen spontanen Wachstumsphänotypen, die letztendlich eine saubere Selektion auf VMM mit 0,2% GABA (Streptomycin 600  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  und Neomycin 80  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) unmöglich machten.

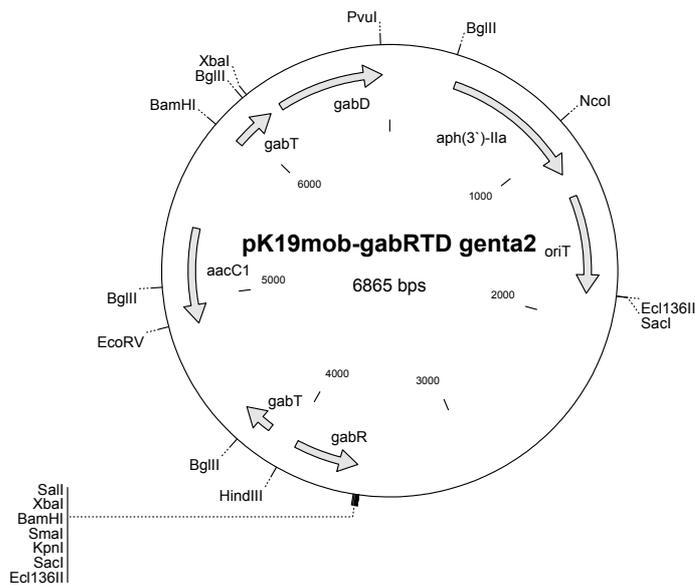


Abb. 34: Plasmidkarte von pK19mob-*gabRTD genta2*. *aph(3')-IIa*: Kanamycin-/Neomycinresistenz; *aacC1*: Gentamycinresistenz; *oriT*: RP4 „origin of transfer“ zur konjugativen Mobilisierung.

Eine parallel durchgeführte Tn5 Mutagenese vom Wildtyp VF39 verlief unter gleichen Selektionsbedingungen zwar besser, erbrachte jedoch auch keine verwertbaren Ergebnisse. Hier war eine Selektion wegen des besseren Wachstums auf GABA Medien möglich.

Von ca. 12000 auf VMM mit 0,2% GABA (Streptomycin 600  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  und Neomycin 80  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) getesteten VF39 Tn5 Mutanten wurden 56 schlecht oder gar nicht wachsende Stämme näher betrachtet.

Das Wachstum der Mutanten wurde auf weiteren Medien getestet (Abb. 35, A). Bei den interessantesten Stämme erfolgte die Überprüfung ihrer Tn5 Insertion (Abb. 35, B) per Southern Hybridisierung. Anschließend wurde auf die Insertion in den bereits bekannten *gabT* Leserahmen hin getestet (Abb. 35, C).

Die Stämme 22, 35, 36 und 56 wurden schließlich auf ihre Pyruvat abhängige GABA Aminotransferase Aktivität überprüft. Alle Mutanten exprimierten normale Aktivitäten (zwischen 165 und 215  $\text{nmol Alanin} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ ). Die Klonierung und Anse-

quenzierung der Tn5 flankierenden Sequenzen zeigte Homologien zu Genen des Grundstoffwechsels (z.B. Enzyme des Purinstoffwechsels und Ribonuklease P).

Dieses Ergebnis ist im Prinzip nicht ungewöhnlich, da vom Wildtyp aufgrund des intakten *gabT* Gens kein eindeutiger Wachstumsphänotyp zu erwarten war. Erstaunlich ist allerdings, daß GABA Auxotrophie auch ohne das Ausschalten eines direkt GABA metabolisierenden Gens herbeigeführt werden kann.

A	2	3	4	12	14	15	21	22	24	25	31	32	33	35	36	37	38	39	41	42	43	44	45	47	56
TY	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
GABA	--	-+	--	-+	-+	--	--	-	-+	-+	-+	--	-	-	-	-+	-+	-+	-+	-+	-+	-+	-+	-+	--
Glutamat	-	+	-	+	++	--	--	+	+	++	++	-	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
GABA/Glut	+	++	-	++	++	+	+	++	++	++	++	-	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glukose/NH4	+	++	++	+	++	+	+	++	++	++	++	+	-+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
Gluk/GABA	+	++	++	+	++	+	+	++	++	++	++	++	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++
Arabinose/NH4	+	++	--	+	++	+	+	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++
Arab/GABA	+	++	--	++	++	+	+	++	++	++	++	+	++	+	++	+	++	-+	++	++	+	++	-+	-+	+

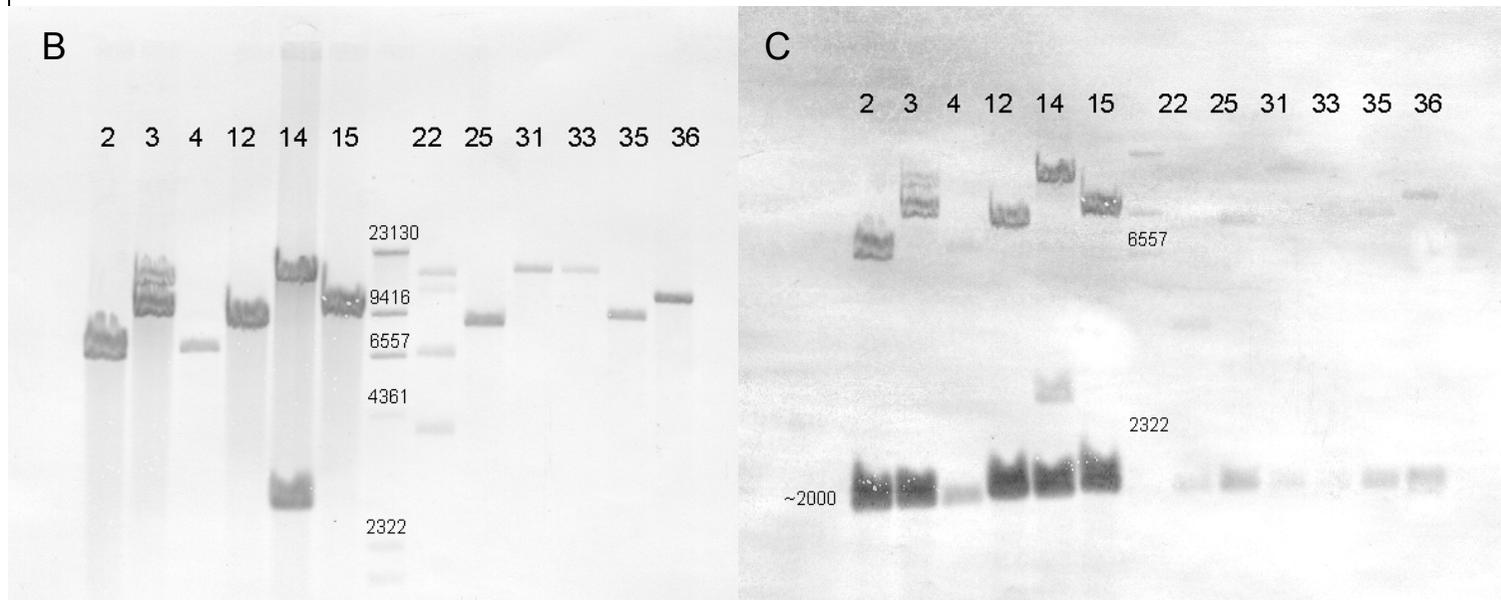


Abb. 35: Analyse von *R. leguminosarum* VF39 Tn5 Mutanten. A) 56 Mutanten wurden aus einem Screening auf VMM mit 0,2% GABA (Streptomycin 600  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  und Neomycin 80  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) ausgewählt und zum größten Teil auf weiteren Wachstumsmedien getestet (Wachstum: ++ gut; + mäßig; - sehr schlecht; -- kein; +- unklar, spontanes Wachstum einzelner Kolonien). Interessante Phänotypen wurden auf ihre Tn5 Insertion hin überprüft (B). Die Gesamt-DNA der Mutanten wurde *Eco*RI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und gegen eine Tn5 Sonde hybridisiert. Die Mutanten 3, 14 und 22 zeigen mehrere Hybridisierungssignale. Die Mutanten wuchsen auf Tetracyclin haltigen Medien, so daß auf Plasmidintegration geschlossen werden mußte. Nach Herunterwaschen der Tn5 Sonde (unvollständig) und Hybridisierung mit einer *gabT* Sonde (C) konnte gezeigt werden, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit in keiner der Mutanten der *gabT* Leserahmen vom Transposon getroffen wurde. Die Zahlen am Standard in der Mitte der beiden Blots geben Fragmentlängen von *Eco*RI/*Hind*III verdauter  $\lambda$  DNA an. Glut: Glutamat; Gluk: Glukose; Arab: Arabinose.

Als vielversprechender Ansatz des Auffindens eines weiteren GABA metabolisierenden Enzymes wird bei Verfügbarkeit der *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 Genomsequenz die Identifikation einer Pyruvat abhängigen  $\beta$ -Alanin Aminotrasferase angesehen. Wie schon unter 4.1.3. angesprochen, findet sich in den Genomsequenzen von *S. meliloti* und *M. loti* ein identisches Gen, das als mögliche „ $\omega$ -amino acid pyruvate aminotransferase“ oder „ $\beta$ -alanine pyruvate aminotransferase“ annotiert wurde.

Mit  $\beta$ -Alanin zeigte sich in 2-Oxoglutarat abhängigen Aminotransferaseassays in Proteinextrakten von *R. leguminosarum* VF39 keine Aktivität. In Pyruvat abhängigen Assays wurde jedoch mit  $\beta$ -Alanin als Aminodonor eine recht konstante im Verhältnis zu GABA auf etwa 40% reduzierte Enzymaktivität gemessen (Daten nicht gezeigt). Das Verhältnis von GABA- zu  $\beta$ -Alanin spezifischer Aktivität war dabei in verschiedenen Induktionskulturen sehr stabil, was auf ein Enzym für beide Aktivitäten hindeutet (Abb. 36).

Die Identifizierung und Klonierung dieses Gens könnte durch das laufende Sequenzierprojekt von *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 am Sanger Institut in York, England möglich werden (Andrew Johnston, UEA Norwich, England, persönliche Mitteilung).

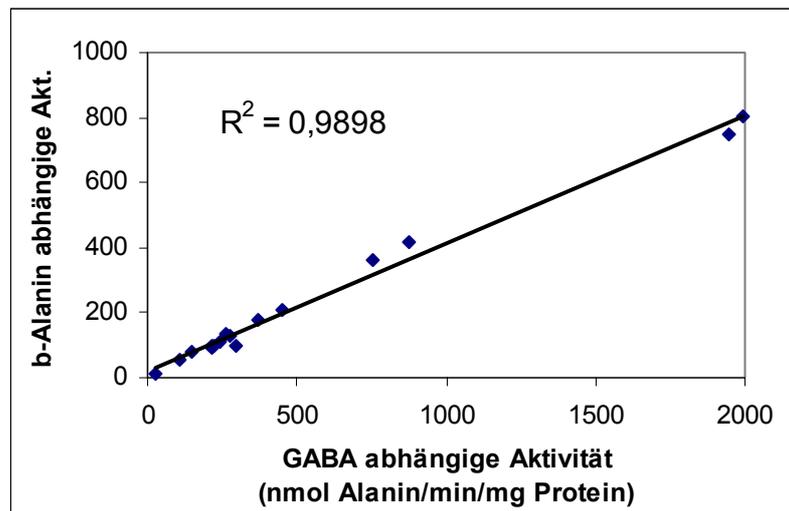


Abb. 36: Korrelation zwischen Enzymdaten von Pyruvat abhängiger GABA Amiotransferase und Pyruvat abhängiger  $\beta$ -Alanin Aminotransferase Aktivität aus Rohextrakten von *R. leguminosarum* VF39. Zugrunde liegen Werte aus 16 Kulturen unter 4 verschiedenen Induktionsbedingungen (VMM mit 0,2% GABA;  $\beta$ -Alanin; GABA+Glutamat; Succinat).

## 5. Abschlußdiskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Identifizierung und systematische Analyse der *gabRTD* Region aus *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 beschrieben. Schwerpunkt war dabei die Expression des *gabT* Promotors in Abhängigkeit vom externen pH Wert, bei Gabe verschiedener Kohlen- und Stickstoffquellen, sowie während der Symbiose mit *Pisum sativum*.

Das Ergebnis der Induktion von *gabT* in sauren Medien ist dabei etwas überraschend und schwer schlüssig zu erklären. Das bereits mehrfach in Zusammenhang mit pH Toleranz erwähnte Glutamat Dekarboxylase System setzt für seine Funktionalität eigentlich den Export von GABA aus der Zelle voraus. Es wurde der Versuch unternommen, eine Involvierung von *gabT* bei der Versorgung des Grundstoffwechsels über die Entnahme reduzierten Kohlenstoffs in Form von Succinat zu erklären (Abb. 20 A). Da generell begründeter Zweifel am Vorhandensein von Glutamat Dekarboxylasen in *Rhizobien* besteht, wurde weiterhin der Versuch unternommen, über das Zusammenspiel von 2-Oxoglutarat Dekarboxylierung und GABA Transaminierung ein ähnliches Reaktionsmodell mit identischer Nettoreaktionsgleichung zu entwerfen (Abb. 20 B). Dessen Überprüfung steht aber noch aus.

L.M. Stancik *et al.* (2002) untersuchten eine *gabT::lacZ* Fusion in *E. coli*, deren Induktion zuvor durch „quorum sensing“ (Baca-DeLancey *et al.*, 1999) und Indol (Wang *et al.*, 2001) gezeigt werden konnte. Sie beschrieben die Expression unter verschiedenen pH Bedingungen. Hier zeigte sich allerdings erhöhte Expression von *gabT* in basischen Medien. Die weitere Interpretation dieses Ergebnisses beruhte auf der Existenz von Glutamat Dekarboxylase, deren Induktion unter basischen Bedingungen in anaeroben Kulturen in 2D-Proteingelen gezeigt wurde (Blankenhorn *et al.*, 1999). Dabei wurden in den Arbeiten von M.P. Castanie-Cornet *et al.* (1999 und 2001) Glutamat Dekarboxylasen (*gadA* und *gadBC*) immer zum Schutz vor extrem niedrigen pH-Werten induziert (siehe auch 1.4.).

Die Interpretationen zur Expression von Glutamat Dekarboxylasen erscheinen also generell sehr inkonsistent.

Interessanter wird es allerdings, wenn man nach Gründen für die Expression von *gabT* während der Symbiose sucht. Schon 1991 schrieben C.P. Vance und G.H. Heichel ein eigenständiges Kapitel über „A role for GABA“ in ihrer Publikation über

den Kohlenstoffhaushalt während der Stickstofffixierung. Ihnen waren die hohen Gehalte an freiem und gebundenem GABA in Knöllchen- und Pflanzengewebe aufgefallen und sie stellten sich die Frage nach deren Ursache. Sie diskutierten das Vorkommen von GABA im Zusammenhang mit der durch die dunkle CO<sub>2</sub>-Fixierung durch PEPC einhergehenden Ansäuerung der Pflanzenzellen. Die Dekarboxylierung von Malat durch „malic enzyme“ (Abb. 1) in den Bakteroiden könnte dieser Reaktion zwar entgegenwirken, allerdings wäre die Dekarboxylierung von Glutamat zu GABA zum Gegensteuern auch denkbar. Ob dies nun im Bakteroid oder Pflanzenzytosol stattfinden könnte, ist schwer zu sagen. In jedem Fall wäre hier eine mögliche Erklärung für die Induktion von *gabT* durch GABA während der Symbiose zu finden.

In diesem Zusammenhang müssen auch weitere Daten von R.W. Miller *et al.* (1991) genannt werden, die hohe Gehalte an GABA nur in differenzierten und anaerob isolierten Bakteroiden von *Medicago sativa* Knöllchen fanden, nicht jedoch in undifferenzierten Zellen oder aerob isolierten Bakteroiden. Damit brachten sie die Synthese von GABA mit der Stickstofffixierung in Zusammenhang. Ein funktioneller GABA shunt ließ sich in dieser Arbeit in Alfalfa Knöllchen anhand von Enzymaktivitäten beschreiben. Ein weiteres interessantes Ergebnis war, daß die GABA Metabolisierung unter bestimmten Bedingungen von der Anwesenheit von Succinat abhing und von Aminoxyacetat (AOA) als Inhibitor nicht unterbunden werden konnte. Dies führte zu der Annahme, daß ein weiterer, von Transaminierung unabhängiger, GABA Metabolisierungsweg existieren müsse.

Dies ist ein weiterer Gesichtspunkt, der die Klärung des GABA Metabolismus in *Rhizobien* erschwert.

Eine *sucA* Mutante von *B. japonicum* bildete auf Sojabohnen Fix<sup>+</sup> Phänotypen aus, die nach Verzögerungen in der Entwicklung normale Stickstofffixierungsraten aufwiesen (Green & Emerich, 1997). Diese Fixierungsraten wurden durch einen alternativen metabolischen Umweg unter symbiontischen Bedingungen erklärt, der eine mögliche Inhibierung von Enzymen des Zitratzyklus umgeht (Green *et al.*, 2000).

Zur Umgehung der 2-Oxoglutarat Dehydrogenase des Zitratzyklus wurde anstelle des GABA shunts, für den keine ausreichenden Enzymaktivitäten gemessen werden konnten, eine direkte Dekarboxylierung von 2-Oxoglutarat vorgeschlagen und nach-

gewiesen. Diese Aktivität wurde ebenfalls in *R. leguminosarum* 3841 gemessen (Green *et al.*, 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *sucA* Mutante von *R. leguminosarum* 3841 wurde auch auf ihren symbiontischen Phänotyp hin untersucht (siehe 4.4.10.). Die Knöllchen waren erwartungsgemäß  $\text{Fix}^-$  (Walshaw *et al.*, 1997). Der Phänotyp muß an dieser Stelle aber nicht unbedingt mit dem symbiontischen Kohlenstoffmetabolismus zur Stickstofffixierung in Zusammenhang stehen, sondern könnte auch einfach das Wachstum in den Infektionsschläuchen behindern oder unmöglich machen.

Ob der  $\text{Fix}^-$  Phänotyp von 3841 *sucA* nun auf das Unvermögen zur Besiedlung des Knöllchens oder metabolische Defizite während der Stickstofffixierung zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. D.L. Walshaw *et al.* (1997) berichteten allerdings, daß eine Isolierung von Km resistenten Zellen aus diesen  $\text{Fix}^-$  Knöllchen unmöglich war. Sie implizierten damit, daß die Knöllchenstruktur nicht besiedelt wird.

GUS gefärbte Dünnschnitte von durch *R. leguminosarum* 3841 *sucA* Mutanten mit pJP2-*gabT* induzierten Knöllchen zeigten folgendes Aussehen (Abb. 37). Die Knöllchen waren klein und weißlich und die Pflanzenzellen enthielten die für  $\text{Fix}^-$  Phänotypen typischen großen Mengen an Stärkegranula (Abb. 37, Pfeile). Allerdings waren einzelne Zellen mit *gabT* exprimierenden Bakterien oder Bakteroiden angefüllt (Abb. 37, unten), was zumindest eine teilweise Besiedlung des Knöllchens zeigte.

Dieses Resultat müßte eigentlich die Isolation von Bakterien aus diesen Knöllchen erlauben, was leider erst zu einem späteren Zeitpunkt erkannt wurde und somit nicht getestet werden konnte.

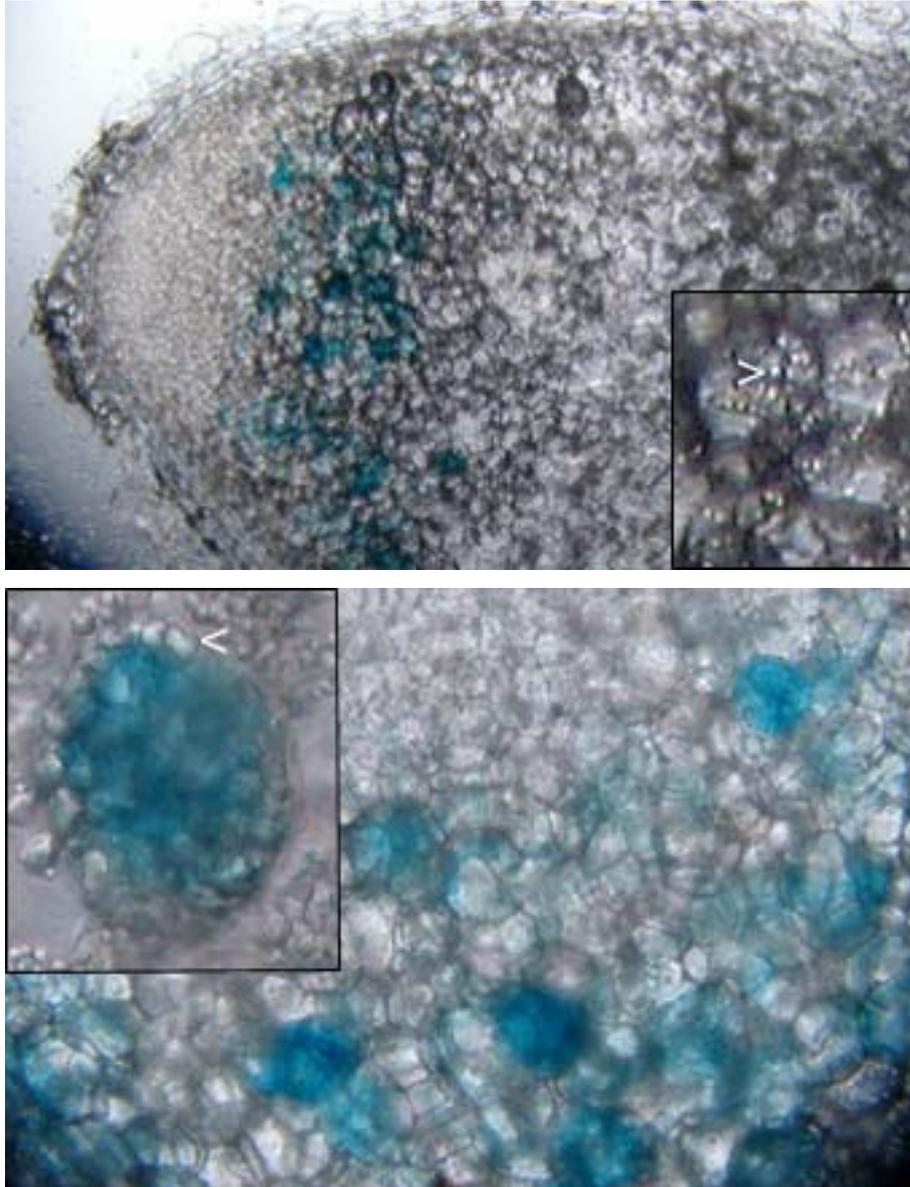


Abb. 37: GUS gefärbte 80µm Dünnschnitte von Knöllchen, die durch eine *R. leguminosarum* 3841 *sucA* Mutante mit pJP2-*gabT* induziert wurden. Die Knöllchen sind  $\text{Fix}^-$  (oben). Trotzdem sieht man einzelne mit gefärbten Bakterienzellen angefüllte Pflanzenzellen (unten). Pfeile markieren Stärkegranula.

Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist die Konstanz von Succinatsemialdehyd Dehydrogenase Aktivitäten in sämtlichen *gab* Mutanten (Tab. 3). Problematisch ist dies besonders in Bezug auf die Frage nach einer gemeinsamen Expression von *gabT* und *gabD*.

In der Regel wurden in Arbeiten über Enzymaktivitäten in *Rhizobien*  $\text{NAD}^+$  abhängige SSDH Aktivitäten gemessen. Nur einige wenige Autoren untersuchten  $\text{NADP}^+$  abhängige Aktivitäten (z.B. Miller *et al.*, 1991). Ein verwirrendes Bild liefern dabei die

Annotierungen in den publizierten *Rhizobien* Genomen, die bis zu 8 „mögliche“ SSDHs beschreiben (im *M. loti* Genom).

Eine einfache Erklärung für das Ausbleiben von SSDH Phänotypen in der hier dargestellten Arbeit wäre eine NADP<sup>+</sup> Abhängigkeit von GabD. Dies sollte bei nächster Gelegenheit geklärt werden.

Des Weiteren konnte ein in dieser Untersuchung bereits mehrfach vorgestellter Ausblick mit Beendigung der Arbeit noch einen Schritt vorangetrieben werden.

Die Aussicht auf die Existenz einer möglichen Pyruvat abhängigen GABA- oder  $\beta$ -Alanin Aminotransferase ließ über Homologievergleiche mit der mittlerweile zumindest provisorisch einsehbaren Genomsequenz von *R. leguminosarum* 3841 ([www.sanger.co.uk/Projects/R\\_leguminosarum](http://www.sanger.co.uk/Projects/R_leguminosarum)) die Identifikation eines Leserahmens zu, der 90% Identität zu der bereits unter 4.1.3. und 4.7. erwähnten „ $\omega$ -amino acid pyruvat aminotransferase“ aus *S. meliloti* (SMc01534) besitzt.

Das Gen konnte aus *R. leguminosarum* VF39 Gesamt-DNA mit spezifischen Primern amplifiziert werden. Alle getesteten Restriktionsschnittstellen aus der 3841 Sequenz waren vorhanden. Ein internes Fragment wurde in pK18mob kloniert und durch homologe Rekombination ins VF39 Genom integriert.

Allerdings konnte bislang keine Mutante mit korrekter Plasmidintegration isoliert werden.

Ein Homologievergleich des in dieser Arbeit untersuchten gesamten 2,5 kb *gabT* tragenden Fragments aus *R. leguminosarum* VF39 mit der 3841 Genomsequenz erbrachte auf Nukleotidebene Identitäten von nahezu 100%. Allerdings fanden sich in der intergenischen Region zwischen *gabT* und *gabD* 105 zusätzliche Basen. Dies deutet möglicherweise auf eine differentielle Regulation hin, was in Zukunft zu untersuchen wäre.

Als primäres Ziel weitergehender Untersuchungen muß in jedem Fall das Auffinden der Pyruvat abhängigen GABA Aminotransferase gelten. Nur so ist der GABA Metabolismus eventuell zu unterbinden und dessen Relevanz während der Symbiose weiter zu analysieren. Mit Hilfe der Sequenzdaten des *R. leguminosarum* Genoms werden allerdings noch weitere Felder eröffnet. Der gezielte „knock-out“ von Genen wird viele unvollendete Fragestellungen dieser Arbeit beantworten helfen.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *gabRTD* Region aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 identifiziert und systematisch analysiert.

Zugrunde lag die Tn5-B20 Mutante PH10, die in einem Screening auf unterschiedlichen pH Werten ansteigende Induktion des *lacZ*-Reporters auf niedrigen pH Werten zeigte.

Nach Klonierung des Transposons konnten ca. 2,5 kb flankierende DNA sequenziert werden. Die Sequenz beinhaltet den vollständigen *gabT* Leserahmen, der für eine GABA Aminotransferase kodiert. Im Anschluß an *gabT* fand sich der 5'-kodierende Bereich von *gabD*, einer vermutlichen Succinatsemialdehyd Dehydrogenase. Beide Enzyme sind Teil des sogenannten GABA shunts, der für die Metabolisierung von GABA verantwortlich ist und zusammen mit Glutamat Dekarboxylase eine theoretische Umgehung des 2-Oxoglutarat Dehydrogenase Komplexes im Zitratzyklus darstellt. Upstream von *gabT* liegt ein Leserahmen *gabR* in umgekehrter Orientierung, der für einen Regulator der MerR Familie kodiert.

Im Verlauf der Arbeit wurde zunächst der Phänotyp der PH10 Mutante analysiert. Da sich auf Minimalmedien mit GABA als einziger Kohlen- und Stickstoffquelle kein Wachstumsunterschied zum Wildtyp zeigte, wurden Enzymassays von 2-Oxoglutarat abhängiger GABA Aminotransferase aus Rohextrakten der Mutante und des Wildtyps verglichen. Es zeigten sich moderate Aktivitäten im Wildtyp, jedoch keine meßbare Aktivität in der Mutante. Allerdings wurden in PH10 so wie im Wildtyp hohe Pyruvat abhängige GABA Aminotransferase Aktivitäten festgestellt, die das Wachstum der Mutante auf GABA als alleiniger Nährstoffquelle erklärt.

Zur Analyse der Expression von *gabT* wurde zunächst der Promotor-Probe Vektor pJP2 konstruiert. Dieser Vektor enthält ein promotorloses *uidA* Gen, das zur Expression von GUS als Reporterenzym dient. Des Weiteren ist der Vektor durch die *par* Gene von RK2 auch unter symbiontischen Bedingungen stabil. Stabile Plasmide sind in der genetischen *Rhizobien*-Forschung interessante Werkzeuge. Deshalb stellt pJP2 ein wichtiges Produkt dieser Arbeit dar.

Nach Klonierung der *gabT* Promotorregion in pJP2 wurde die Expression im Wildtyphintergrund VF39 zunächst auf unterschiedlichen pH Werten getestet. Dabei

konnten die *lacZ* Induktionsdaten von PH10 bestätigt werden. Als nächstes wurden verschiedene Kohlen- und Stickstoffquellen, die am GABA Metabolismus innerhalb des GABA shunts beteiligt sein könnten, auf ihre Induktion von *gabT* hin untersucht. Es zeigte sich, daß *gabT* in der Tat von GABA induziert wird.

Während der Symbiose mit *Pisum sativum* wurde *gabT* während der Bakteroidendifferenzierung induziert und in der symbiontischen Zone stark expremiert. Die *gabT* Mutante PH10 bildete allerdings normal fixierende Knöllchen.

Der bereits erwähnte Leserahmen *gabR* upstream von *gabT* wurde auf Grund seiner Homologie zu regulatorischen Genen auf eine eventuelle Rolle als Regulator für *gabT* hin überprüft. In einer *gabR* Mutante nahm die *gabT* Expression stark zu, was zu dem Schluß führte, daß *gabR* als Repressor oder Repressor/Aktivator von *gabT* fungiert. Über die Rolle von *gabD* konnten nur wenige Aussagen gemacht werden. Es konnten weder reduzierte NAD<sup>+</sup> abhängige SSDH Enzymaktivitäten in *gabT* Mutanten nachgewiesen werden, noch gingen von der intergenischen Region zwischen *gabT* und *gabD* eigene Promotoraktivitäten aus.

Des Weiteren konnten keine zusätzlichen GABA metabolisierenden Gene über klassische Transposon Mutagenesen identifiziert werden.

## 7. Anhang

### 7.1. Verzeichnis der Abkürzungen

(v/v)	„volume per volume“, Volumenanteil
(w/v)	„weight per volume“, Gewichtsanteil
A,C,G,T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
<i>aacC1</i>	Gentamycinresistenzgen
Aap	general amino acid permease
AAT	Aspartataminotransferase
Abb.	Abbildung
ADH	Alanindehydrogenase
AMS	„Acid minimal salt“, Minimalmedium
AOA	Aminooxyacetat
AP	Alkalische Phosphatase
<i>aph(3')-IIa</i>	Kanamycin-/Neomycinresistenzgen
ARA	Acetylen-Reduktions-Assay
AS	Asparaginsynthetase
ATG	Startkodon
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (p-Toluidin-Salz)
<i>bla</i>	Ampicillinresistenzgen
bp	Basenpaar
Bra	branched-chain amino acid permease
BSA	Kälber Serum Albumin
bv.	Biovarietät
CoA	Coenzym A
CTAB	Hexadecyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid
<i>dctA</i>	Gen für C <sub>4</sub> -Dikarbonsäuretransport
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythmidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>fix</i>	Stickstoffixierungsgen
Fix <sup>+</sup> /Fix <sup>-</sup>	Fixierungsphänotyp
GABA	γ-Aminobutan(butter)säure
<i>gabC/gabR</i>	Regulatorgen des <i>gab</i> Operons
<i>gabD</i>	Strukturgen der Succinatsemialdehyd Dehydrogenase
<i>gabP</i>	Strukturgen der GABA Permease
<i>gabT</i>	Strukturgen der 2-Oxoglutarat abhängigen GABA Aminotransferase
<i>gadA/B</i>	Strukturgen der Glutamatdecarboxylase
<i>gadC</i>	Strukturgen eines vermutlichen Glutamat/GABA Antiporters
<i>gadR</i>	Regulator des <i>gad</i> Operons
GDC	Glutamatdecarboxylase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GDP/GTP	Guanosindi(tri)phosphat
GFP	„green fluorescent protein“

Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GOGAT	Glutamatsynthase
GS	Glutaminsynthetase
GUS	$\beta$ -Glukuronidase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperacin-ethansulfonsäure
IS50	Insertionselement
kb	Kilobase
<i>lacZ</i>	Strukturgen der $\beta$ -Galaktosidase
<i>M. loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>
MCS	“multiple cloning site”
MDH	Malatdehydrogenase
ME	Malatenzym
<i>merR</i>	Regulator des <i>mer</i> Operons
<i>merTPCAD</i>	Strukturgene der Quecksilberresistenz
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
mob	siehe <i>oriT</i>
MOPS	2-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MUG	4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nikotinamid-Dinukleotid (oxidiert/reduziert)
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nikotinamid-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCBI	“National center for biological information”
<i>nif</i>	Stickstofffixierungsgene
<i>nod</i>	Nodulationsgene
Nod <sup>+</sup> /Nod <sup>-</sup>	Nodulationsphänotyp
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600nm
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
ORF	“open reading frame”, offenes Leseraster
<i>oriT</i>	Transferstartpunkt der Konjugation
<i>oriV</i>	Replikationsstartpunkt
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>parCBAD</i>	Stabilitätsfaktor von RK2
PBM	Peribakteroidenmembran
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat Karboxylase
PHB	Polyhydroxybutyrat
<i>pmrA</i>	“multidrug” Resistenzgen
PNP	p-Nitrophenol
PNPG	p-Nitrophenyl-Glukuronid
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA verdauendes Enzym
rpm	Umdrehungen pro Minute
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>sdhCDAB</i>	Strukturgene des Succinatdehydrogenase Komplexes
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSA	Succinatsemialdehyd
SSDH	Succinatsemialdehyd Dehydrogenase
Suc	Succinat

<i>sucCDAB</i>	Strukturgene des 2-Oxoglutaratdehydrogenase und Succinyl-CoA Synthetase Komplexes
Tab.	Tabelle
Taq Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
<i>tetAR</i>	Tetracyclinresistenzgene
TGA, TAA, TAG	Stopkodons
Tn5	Transposon
<i>trfA</i>	siehe <i>oriV</i>
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UEA	University of East Anglia
<i>uidA</i>	Strukturgen der $\beta$ -Glukuronidase
UV	Ultraviolett
VMM	Minimal Medium nach Vincent, 1970
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
X-Glc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Glukuronid
$\lambda$ DNA	DNA des Phagen $\lambda$

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kohlen- und Stickstoffhaushalt im Knöllchen (angelehnt an Streeter, 1991).	10
Abb. 2: Der GABA-Shunt.	13
Abb. 3: Plasmidkarte von pK19mob- <i>gabT</i> .	33
Abb. 4: Plasmidkarte von pK18mob- <i>gabR</i> .	33
Abb. 5: Plasmidkarte von pK19mob- <i>gabD</i> .	34
Abb. 6: Plasmidkarte von pJP2.	35
Abb. 7: Plasmidkarte von pJP2- <i>gabT</i> .	35
Abb. 8: Plasmidkarte von pJP2- <i>gabR</i> .	36
Abb. 9: Plasmidkarte von pJP2- <i>gabD</i> .	37
Abb. 10: Typische Daten einer SSDH Aktivitätsbestimmung.	48
Abb. 11: Genetische Karte des <i>gabT</i> tragenden 2,5 kb <i>SalI</i> Fragments.	52
Abb. 12: Sequenz des <i>gabT</i> tragenden 2535 bp <i>SalI</i> Fragments.	56
Abb. 13: Alignment der in Tab. 2 aufgezeigten GabT verwandten Proteinsequenzen.	60
Abb. 14: Lokalisierung des <i>gabTD</i> Operons.	63
Abb. 15: Konstruktion der Plasmidintegrationsmutante VF39-19T.	67
Abb. 16: Southern Hybridisierung <i>SalI</i> bzw. <i>EcoRI</i> verdauter Gesamt-DNA aus VF39, PH10 und VF39-19T.	68
Abb. 17: Konstruktion des Promotor-Probe Vektors pJP2.	71
Abb. 18: LacZ Induktion der PH10 Mutante in gepufferten TY Kulturen unterschiedlicher pH Werte (Säulen).	74
Abb. 19: GUS Induktion von pJP2- <i>gabT</i> im Wildtyp VF39 in gepufferten TY Kulturen unterschiedlicher pH Werte (Säulen), sowie die Expression des „leeren“ pJP2 Vektors.	74
Abb. 20: A) Reaktionsverlauf von Glutamat Dekarboxylierung und Glutamat/GABA Antiport zur Anpassung an saure pH Werte. B) Gleicher Reaktionsverlauf mit 2-Oxoglutarat Dekarboxylierung und GABA Aminotransferase Aktivität in umgekehrter Richtung.	76

Abb. 21: GUS Induktion und Wachstum von VF39 mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	77
Abb. 22: GUS Induktion und Wachstum von VF39 mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit GABA und GABA+Glutamat.....	78
Abb. 23: GUS Induktion und Wachstum von VF39 mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	80
Abb. 24: Symbiotische Expression von pJP2- <i>gabT</i> .....	81
Abb. 25: LacZ Induktion und Wachstum von PH10 in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	82
Abb. 26: GUS Induktion und Wachstum von VF39-19T mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	83
Abb. 27: GUS Induktion und Wachstum von 3841 <i>sucA</i> mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	85
Abb. 28: Konstruktion der Plasmidintegrationsmutante VF39-18R.....	87
Abb. 29: GUS Induktion und Wachstum von VF39-18R mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	88
Abb. 30: GUS Induktion und Wachstum von VF39-19R mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	89
Abb. 31: Plasmidkarte von pK19mob- <i>gabRTD Sall-PvuI</i> .....	90
Abb. 32: Konstruktion der Plasmidintegrationsmutante VF39-19D.....	91
Abb. 33: GUS Induktion und Wachstum von VF39-19D mit pJP2- <i>gabT</i> in VMM Kulturen mit unterschiedlichen Kohlen- und Stickstoffquellen.....	93
Abb. 34: Plasmidkarte von pK19mob- <i>gabRTD genta2</i> .....	96
Abb. 35: Analyse von <i>R. leguminosarum</i> VF39 Tn5 Mutanten.....	98
Abb. 36: Korrelation zwischen Enzymdaten von Pyruvat abhängiger GABA Aminotransferase und Pyruvat abhängiger $\beta$ -Alanin Aminotransferase Aktivität aus Rohextrakten von <i>R. leguminosarum</i> VF39.....	99
Abb. 37: GUS gefärbte 80 $\mu$ m Dünnschnitte von Knöllchen, die durch eine <i>R. leguminosarum</i> 3841 <i>sucA</i> Mutante mit pJP2- <i>gabT</i> induziert wurden.....	103

### 7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenstellung der in der Literatur vorhandenen GABA Aminotransferase Aktivitätsdaten aus <i>Rhizobien</i> .....	16
Tab. 2: Homologiedaten der translatierten GabT Sequenz eines BLASTP Vergleichs vom 08.03.2002.....	57
Tab. 3 : Wachstumsraten, Enzymaktivitäten und symbiotische Phänotypen von <i>R. leguminosarum</i> VF39 und verschiedenen Mutanten.....	64

#### **7.4. N-Terminale Proteinsequenzen von gabD' und gabR'**

Hypothetische N-terminale Proteinsequenz von gabD':

maftsaltkhvpfsspllrdayidgvwtsgdatktdvlnpatgellaslpdmgaetr  
aaidaahaapggwaarparerstilrkwfdlmvanadelaailtaemgkpfpeargeily  
aaayiewyaeekriygetipapsddkrmivirqpvgvgtitpwnfpaamitrkiapal  
avgctvvskpaeqtpltalavlaeqagipagvfnvivi

Hypothetische N-terminale Proteinsequenz von gabR':

mndngpvrykvaearlagvsastlrlwesqglvvpgrsetghrqysaddvarlkriswy  
rverglnpaairealeseepsadgaeasqdtglgrklrslrhangktldqvagdigvtss

## 8. Literatur

**Allaway, D., Lodwig, E., Crompton, L.A., Wood, M., Parsons, R., Wheeler, T.R. & Poole, P.S. (2000)** Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* **36**, 508-515

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

**Arnold, W. & Pühler, A. (1988)** A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing. *Gene* **70**, 171-179

**Ausubel, F.M., Brent, R. & Kingston, R. (editors) (1987)** Current protocols in molecular biology. *New York: Wiley*

**Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C. & Lescure, B. (1989)** The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translational elongation factor EF-1 $\alpha$ : Molecular cloning, characterisation and expression. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 106-112

**Baca-DeLancey, R.R., South, M.M.T., Ding, X. & Rather, P.N. (1999)** *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4610-4614

**Bartsch, K., von Johnn-Marteville, A. & Schulz, A. (1990)** Molecular analysis of two genes of the *Escherichia coli* *gab* cluster: Nucleotide sequence of the glutamate: succinic semialdehyde transaminase gene (*gabT*) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (*gabD*). *J. Bacteriol.* **172**, 7035-7042

**Belitzky, B.R. & Sonenshein, A.L. (2002)** GabR, a member of a novel protein family, regulates the utilisation of  $\gamma$ -aminobutyrate in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **45**, 569-583

**Beringer, J.E. (1974)** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**, 188-198

**Blankenhorn, D., Phillips, J. & Slonczewski, J.L. (1999)** Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **181**, 2209-2216

**Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K. & Valla, S. (1997)** Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *App. Env. Microbiol.* **63**, 370-379

**Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y. (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474

**Boeston, B., Batut, J. & Boistard, P. (1998)** DctBD-dependent and -independent expression of the *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti* C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport gene (*dctA*) during symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 878-886

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

**Brünker, P., Rother, D., Sedlmeier, R., Klein, J., Mattes, R. & Altenbuchner, J. (1996)** Regulation of the operon responsible for broad-spectrum mercury resistance in *Streptomyces lividans* 1326. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 307-315

**Buck, D., Spencer, M.E. & Guest, J.R. (1985)** Primary structure of the succinyl-CoA synthetase of *Escherichia coli*. *Biochem.* **24**, 6245-6252

**Castanie-Cornet, M.P. & Foster, J.W. (2001)** *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp *cis*-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology* **147**, 709-715

**Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. & Foster, J.W. (1999)** Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 3525-3535

**Colonna-Romano, S., Arnold, W., Schlüter, A., Boistard, P., Pühler, A. & Priefer, U.B. (1990)** An Fnr-like protein encoded in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* shows structural and functional homology to *Rhizobium meliloti* FixK. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 138-147

**Darlison, M.G., Spencer, M.E. & Guest, J.R. (1984)** Nucleotide sequence of the *sucA* gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **141**, 351-359

**Day, D.A. & Mannix, M. (1988)** Malate oxidation by soybean nodule mitochondria and the possible consequences for nitrogen fixation. *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 567-573

**Dilworth, M.J., Arwas, R., McKay, E.A., Saroso, S. & Glenn, A.R. (1986)** Pentose metabolism in *Rhizobium leguminosarum* MNF300 and in cowpea *Rhizobium* NGR234. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2733-2742

**Dombrecht, B., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2001)** Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in *Gram*-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 426-430

**Donnelly, M.I. & Cooper, R.A. (1981)** Succinic semialdehyde dehydrogenases of *Escherichia coli*: Their role in the degradation of p-hydroxyphenylacetate and  $\gamma$ -aminobutyrate. *Eur. J. Biochem.* **113**, 555-561

**Dover, S. & Halpern, Y.S. (1972a)** Utilisation of  $\gamma$ -aminobutyric acid as sole carbon and nitrogen source by *Escherichia coli* K-12 mutants. *J. Bacteriol.* **109**, 835-843

**Dover, S. & Halpern, Y.S. (1972b)** Control of the pathway of  $\gamma$ -aminobutyrate breakdown in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **110**, 165-170

**Dover, S. & Halpern, Y.S. (1974)** Genetic analysis of the  $\gamma$ -aminobutyrate utilisation pathway in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **117**, 494-501

**Dunn, M.F. (1998)** Tricarboxylic acid cycle and anapleurotic enzymes in *Rhizobia*. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 105-123

**Easter, C.L., Schwab, H. & Helinski, D.R. (1998)** Role of the *parCBA* operon of the broad-host-range plasmid RK2 in stable plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* **180**, 6023-6030

**Easter, C.L., Sobecky, P.A. & Helinski, D.R. (1997)** Contribution of different segments of the *par* region to stable maintenance of the broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* **179**, 6472-6479

**Eckert, R. & Randall, D. (1986)** Tierphysiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*

**Eckhardt, T. (1978)** A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588

**Espinosa-Urgel, M. & Ramos, J.L. (2001)** Expression of a *Pseudomonas putida* aminotransferase involved in lysine catabolism is induced in the rhizosphere. *App. Env. Microbiol.* **67**, 5219-5224.

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

**Fitzmaurice, A.M. & O’Gara, F. (1991)** Glutamate catabolism in *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* **155**, 422-427

**Fitzmaurice, A.M. & O’Gara, F. (1993)** A *Rhizobium meliloti* mutant, lacking a functional  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) bypass, is defective in glutamate catabolism and symbiotic nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**, 195-202

**Green, L.S. & Emerich, D.W. (1997)** *Bradyrhizobium japonicum* does not require  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase for growth on succinate or malate. *J. Bacteriol.* **179**, 194-201

**Green, L.S., Li, Y., Emerich, D.W., Bergersen, F.J. & Day, D.A. (2000)** Catabolism of  $\alpha$ -ketoglutarate by a *sucA* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: Evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* **182**, 2838-2844

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

**Hersh, B.M., Farooq, F.T., Barstad, D.N. Blankenhorn, D.L. & Slonczewski, J.L. (1996)** A glutamate dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 3978-3981

**Higushi, T., Hayashi, H. & Abe, K. (1997)** Exchange of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriol.* **179**, 3362-3364

**Hosie, A.H.F., Allaway, D., Galloway, C.S., Dunsby, H.A. & Poole, P.S. (2002)** *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *J. Bacteriol.* **184**, 4071-4080

**Hosie, A.H.F., Allaway, D., Jones, M.A., Walshaw, D.L., Johnston, A.W.B. & Poole, P.S. (2001)** Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Mol. Microbiol.* **40**, 1449-1459

**Hynes, M.F. & McGregor, N.F. (1990)** Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **4**, 567-574

**Hynes, M.F., Bruksch, K. & Priefer, U.B. (1988)** Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. *Arch. Microbiol.* **150**, 326-332

**Jin, H.N., Dilworth, M.J. & Glenn, A.R. (1990)** 4-Aminobutyrate is not available to bacteroids of cowpea *Rhizobium* MNF2030 in snake bean nodules. *Arch. Microbiol.* **153**, 455-462

**Johnston, A.W.B. & Beringer, J.E. (1975)** Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 343-350

**Jovanovic, G. & Model, P. (1997)** PspF and IHF bind co-operatively in the *psp* promoter-regulatory region of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **25**, 473-81

**Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2000)** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* (supplement). *DNA Res.* **7**, 381-406

**Kouchi, H., Fukai, K. & Kihara, A. (1991)** Metabolism of glutamate and aspartate in bacteroids isolated from soybean root nodules. *J. Gen. Microbiology* **137**, 2901-2910

**Lee, I.W., Livrelli, V., Park, S.J., Totis, P.A. & Summers, A.O. (1993)** *In vivo* DNA-protein interactions at the divergent mercury resistance (*mer*) promoters. *J. Biol. Chem.* **268**, 2632-2639

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

**Lipka, V. (1994)** Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in Abhängigkeit von Umweltfaktoren in dem Bodenbakterium *Rhizobium leguminosarum* mit Hilfe des Indikatortransposons Tn5-lacZ B20. *Diplomarbeit, Bodenökologie, Botanik I der RWTH-Aachen.*

**Lütke-Eversloh, T. & Steinbüchel, A. (1999)** Biochemical and molecular characterisation of a succinatesemialdehyde dehydrogenase involved in the catabolism of 4-hydroxybutyric acid in *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**, 63-71

**Makino, K., Yokoyama, K., Kubota, Y., Yutsudo, C.H., Kimura, S., Kurokawa, K., Ishii, K., Hattori, M., Tatsuno, I., Abe, H., Iida, T., Yamamoto, K., Onishi, M., Hayashi, T., Yasunaga, T., Honda, T., Sasakawa, C. & Shinagawa, H. (1999)** Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes. Genet. Syst.* **74**, 227-239

**Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982)** Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor, New York*

**McDermott, T.R., Griffith, S.M., Vance, C.P. & Graham, P.H. (1989)** Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *FEMS Microbiol. Lett.* **63**, 327-340

**McRae, D.G., Miller, R.W. & Berndt, W.B. (1989)** Viability of alfalfa nodule bacteroids isolated by density gradient centrifugation. *Symbiosis* **7**, 67-80

**Meng, S. & Bennett, G.N. (1992)** Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: A system for neutralization of low extracellular pH. *J. Bacteriol.* **174**, 2659-2669

**Metzer, E. & Halpern, Y.S. (1990)** *In vivo* cloning and characterization of the *gabCTDP* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**, 3250-3256

**Metzer, E., Levitz, R. & Halpern, Y.S. (1979)** Isolation and properties of *Escherichia coli* K-12 mutants impaired in the utilisation of  $\gamma$ -aminobutyrate. *J. Bacteriol.* **137**, 1111-1118

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

**Miller, R.W., McRae, D.G. & Joy, K. (1991)** Glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate metabolism in isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 37-45

**Molenaar, D., Bosscher, J.S., ten Brink, B. Driessen, A.J. & Konings, W.N. (1993)** Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* **175**, 2864-2870

**Mountfort, D.O. & Pybus, V. (1992)** Regulatory influences on the production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by a marine Pseudomonad. *App. Env. Microbiol.* **58**, 237-242

**Niegemann, E., Schulz, A. & Bartsch, K. (1993)** Molecular organisation of the *Escherichia coli* *gab* cluster: Nucleotide sequence of the structural genes *gabD* and *gabP* and expression of the GABA permease gene. *Arch. Microbiol.* **160**, 454-460

**Park, S.J., Chao, G. & Gunsalus, R.P. (1997)** Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli* which encode  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase and succinyl-coenzymeA synthetase: Roles of ArcA, Fnr and the upstream *sdhCDAB* promoter. *J. Bacteriol.* **179**, 4138-4142

**Park, S.J., Wireman, J. & Summers, A.O. (1992)** Genetic analysis of the Tn21 *mer* operator-promoter. *J. Bacteriol.* **174**, 2160-2171

Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. & Barrell, B.G. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523-527

Patschkowski, T., Schlüter, A. & Priefer, U.B. (1996) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains a second *fnr/fixK*-like gene and an unusual *fixL* homologue. *Mol. Microbiol.* **21**, 267-280

Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamosis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. & Blattner, F.R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529-533

Poole, P.S. & Allaway, D. (2000) Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv. Microbial. Physiol.* **43**, 117-163

Poole, P.S., Blyth, A., Reid, C.J. & Walters, K. (1994) *myo*-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology* **140**, 2787-2795

Poole, P.S., Reid, C.J., East, A.K., Allaway, D., Day, M. & Leonard, M. (1999) Regulation of the *mdh-sucCDAB* operon in *Rhizobium leguminosarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 247-255

Priefer, U.B. (1989) Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. *J. Bacteriol.* **171**, 6161-6168

**Ramputh, A.L. & Bown, A.W. (1996)** Rapid  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of obelique-bended leaf-roller larvae. *Plant Physiol.* **111**, 1349-1352

**Rawsthorne, S. & LaRue, T.A. (1986)** Metabolism under microaerobic conditions of mitochondria from cowpea nodules. *Plant Physiol.* **81**, 1097-1102

**Ronson, C.W., Lyttelton, P. & Robertson, J.G. (1981)** C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 4284-4288

**Rosendahl, L. Vance, C.P. & Pedersen, W.B. (1990)** Products of dark CO<sub>2</sub> fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* **93**, 12-19

**Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. & Boucher, C.A. (2002)** Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502

**Salminen, S.O. & Streeter, J.G. (1987)** Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* **169**, 495-499

**Salminen, S.O. & Streeter, J.G. (1990)** Factors contributing to the accumulation of glutamate in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids under microaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2119-2126

**Salminen, 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

**Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G. & Kok, J. (1998)** A chloride inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.* **27**, 299-310

**Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994)** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.

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

**Shelp, B.J., Bown, A.W. & McLean, M.D. (1999)** Metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Trends Plant Sci. Rev.* **4**, 446-452

**Simon, R., Priefer, U.B. & Pühler, A. (1983)** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in *Gram*-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784-791

**Simon, R., O'Connell, M., Labes, M. & Pühler, A. (1986)** Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other *Gram*-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**, 640-659

**Simon, R., Quandt, J. & Klipp, W. (1989)** New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in *Gram*-negative bacteria. *Gene* **80**, 161-169

**Spencer, M.E., Darlison, M.G., Stephens, P.E., Duckenfield, I.K. & Guest, J.R. (1984)** Nucleotide sequence of the *sucB* gene encoding the dehydrolipoamid succinyltransferase of *Escherichia coli* K-12 and homology with the corresponding acetyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **141**, 361-374

**Stancik, L.M., Stancik, D.M., Schmidt, B., Barnhart, D.M., Joncheva, Y.N. & Slonczewski, J.L. (2002)** pH-Dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 4246-4258

**Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z. & Paulsen, I.T. (2000)** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964

**Streeter, J.G. (1987)** Carbohydrate, organic acid and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiol.* **85**, 768-773

**Streeter, J.G. (1991)** Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Adv. Botan. Res. Incorpor. Adv. Plant. Pathol.* **18**, 129-187

**Streeter, J.G & Thompson, J.F. (1972)** *In vivo* and *in vitro* studies on  $\gamma$ -aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiol.* **49**, 579-584

**Stuurman, N., Bras, C.P., Schlaman, H.R., Wijfjes, A.H., Bloemberg, G. & Spaik, H.P. (2000)** Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 1163-1169

**Ta, T.C., MacDowall, F.D.H., Faris, M.A. & Joy, K.W. (1988)** Metabolism of nitrogen fixed by root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.): I. Utilisation of [ $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]glutamat and [ $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]glutamine in the synthesis of  $\gamma$ -aminobutyrate. *Biochem. Cell Biol.* **66**, 1342-1348

**Tettelin ,H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K. & Fraser, C.M. (2001)** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae* *Science* **293**, 498-506

**Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997)** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**, 4876-4882

**Trepp, G.B., Temple, S.J., Bucciarelli, B., Li, F.S. & 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

**Trinick, M.J. (1988)** Biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. *Plant Soil* **110**, 177-185

**Vance, C.P. & Heichel, G.H. (1991)** Carbon in N<sub>2</sub> fixation: Limitation or exquisite adaptation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **42**, 373-392

**Vincent, J.M. (1970)** A manual for the practical study of root nodule bacteria. *Blackwell Scientific, Oxford*

**Walshaw, D.L., Wilkinson, A., Mundy, M., Smith, M. & Poole, P.S. (1997)** Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **143**, 2209-2221

**Wang, D., Ding, X. & Rather, P.N. (2001)** Indole can act as an extra cellular signal in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 4210-4216

**Waterman, S.R. & Small, P.L.C. (1996)** Identification of  $\sigma^S$ -dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **21**, 925-940

**Waters, J.K., Hughes, B.L., Purcell, L.C., Gerhardt, K.O., Mawhinney, T.P. & Emerich, D.W. (1998)** Alanine, not ammonia, is excreted from N<sub>2</sub>-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12038-12042

**Weinstein, M., Roberts, R.C. & 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.* **174**, 7486-7489

**Yonaha, K. & Tomaya, S. (1980)**  $\gamma$ -Aminobutyrate:  $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase from *Pseudomonas* sp. F-126: Purification, crystallisation and enzymologic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **200**, 156-164

**Yonaha, K., Tomaya, S., Yasuda, M. & Soda, K. (1976)** Purification and crystallisation of bacterial  $\omega$ -amino acid-pyruvate aminotransferase. *FEBS Lett.* **71**, 21-24

**Zaboura, M. & Halpern, Y.S. (1978)** Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid degradation in *Escherichia coli* by nitrogen metabolism enzymes. *J. Bacteriol.* **133**, 447-451

**Zhang, X.X., Kosier, B. & Priefer, U.B. (2001)** Symbiotic plasmid rearrangement in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM. *J. Bacteriol.* **183**, 2141-2144

## 9. Danksagung

Herzlicher Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern danke ich für die nicht immer leichte Unterstützung während des Studiums.

Prof. Dr. U.B. Priefer gebührt Dank für die Bereitstellung des Labors und Erstellung des Erstgutachtens.

Prof. Dr. Kliner danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Dr. Bert Boesten hat mir die weite, weite Welt der Wissenschaft nähergebracht und mir die Lösung kleiner und großer Probleme gezeigt.

Dr. Phillip Poole I have to thank for his support during my stay in his lab in Reading, UK and for the neverending, fruitful discussions. He taught me, never start an experiment, if you don't know the title of the publication yet.

Dr. Thomas Rademacher danke ich, daß er mir die Kunst des Klonierens beibrachte.

Den lieben Kollegen im Labor danke ich für eine schöne Zeit:

Nico, Bob, Maria, Herr Jahnke (Danke für die täglichen Gespräche über nichtmolekulare Themen), Sonja, Marco, Susi und wie sie alle heißen.

Anja danke ich für die gegenseitige Unterstützung in der „Harten Phase“ und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Frau Diederer gebührt großer Dank für ihre Geduld aus mir einen ordentlichen Menschen zu machen.

Uli Commandeur danke ich für den Glauben an die Wissenschaft und die Benutzung seines Druckers.

Zuletzt möchte ich noch Bouchra dafür danken, daß sie übers Meer kam, um in unserem Labor zu arbeiten (Hamdullah).

## 10. Lebenslauf

Name: Jürgen Josef Prell  
Geboren: am 25.01.1970 in Aachen  
Anschrift: Vaalserstr. 69, 52074 Aachen

### Schulische Laufbahn:

1976-80: Besuch der Grundschule Forster-Linde  
1980-82: Besuch der Hugo-Junkers-Realschule  
1982-89: Besuch des Geschwister-Scholl-Gymnasiums  
1989: Erlangung des *Abiturs*

1998-90: Zivildienst im Klinikum der RWTH-Aachen

### Studium:

1990-97: Studium der Biologie an der RWTH-Aachen  
1997: Erlangung des Grades eines *Diplombiologen*

1997-98: Tätigkeit als selbstständiger Fahrradmechaniker

1998: Beginn der *Promotion* am Lehrstuhl für Botanik, Institut für Ökologie des Bodens, der RWTH-Aachen

### Weitere Tätigkeiten:

1994-95: Hilfswissenschaftliche Tätigkeit am Lehrstuhl für Botanik, Institut für Ökologie des Bodens, der RWTH-Aachen