

**Untersuchungen zur Bedeutung der sinorhizobiellen
Phosphor-freien Membranlipide bei der
Wurzelknöllchensymbiose**

**vorgelegt von
Diplom-Biologin
Barbara Anna Weissenmayer**

**Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -**

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulf Stahl

Berichter: Prof. Dr. Ulrich Szewzyk

Berichter: Prof. Dr. Otto Geiger

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 21.12.2000

Berlin 2000

D 83

Abstract

Untersuchungen zur Bedeutung der sinorhizobiellen Phosphor-freien Membranlipide bei der Wurzelknöllchensymbiose

Das Bakterium *Sinorhizobium meliloti*, welches symbiontisch mit Leguminosen Stickstoff-fixierende Wurzelknöllchen bilden kann, besitzt außer den typischen Phosphor-haltigen Membranlipiden auch die Phosphor-freien Membran-bildenden Lipide Sulfolipid, Ornithinlipid und Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS). Diese Phosphor-freien Membranlipide werden verstärkt (Sulfolipid und Ornithinlipid) oder ausschließlich (DGTS) unter Phosphat-limitierenden Wachstumsbedingungen anstelle der Phospholipide gebildet. Da über die Funktion dieser ungewöhnlichen Phosphor-freien Membranlipide von *S. meliloti* bisher nichts bekannt war, sollte geklärt werden, ob diese Lipide eine Rolle bei der Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose spielen. Da die Bildung von DGTS nur erfolgt, wenn ein funktioneller PhoB-Regulator im Bakterium vorhanden ist und da PhoB-defiziente Mutanten immer noch Stickstoff-fixierende Knöllchen bilden können, scheint DGTS für die symbiontische Lebensweise von *S. meliloti* nicht von Bedeutung zu sein.

Die Isolierung der an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten Gene (*sqdB*, *sqdC*, *sqdD*) aus *S. meliloti* zeigte, dass diese Gene bakteriellen Ursprungs sind und nicht durch horizontalen Gentransfer von Wirtspflanzen erhalten wurden. Die Inaktivierung des für die Sulfolipid-Biosynthese essentiellen *sqdB*-Gens führte zu einer Sulfolipid-defizienten Mutante, die Wachstumseigenschaften wie der Wildtyp besaß und auf den Wirtspflanzen Alfalfa genauso gut Stickstoff-fixierende Knöllchen bilden konnte wie der Wildtyp.

Komplementierung chemischer Ornithinlipid-defizienter Mutanten mit einer sinorhizobiellen Genbank führten zur Identifizierung der an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Gene *olsA* und *olsB*. Eine sinorhizobielle *OlsA*-inaktivierte Mutante besaß Wachstumseigenschaften wie der Wildtyp und konnte auf den Wirtspflanzen Alfalfa genauso gut Stickstoff-fixierende Knöllchen bilden wie der Wildtyp.

Weitere Befunde ließen zudem vermuten, dass *OlsB* für eine *N*-Acyltransferase codiert, welche die Kondensation einer 3-Hydroxyfettsäure an Ornithin unter Bildung von Lyso-Ornithinlipid katalysiert, während *OlsA* für eine *O*-Acyltransferase codiert, welche die Umwandlung von Lyso-Ornithinlipid in Ornithinlipid vermittelt.

Da keines der Phosphor-freien Membranlipide (Sulfolipid, Ornithinlipid oder DGTS) von *S. meliloti* essentiell für die Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose ist, vermuten wir, dass diese Lipide eine wichtige Funktion beim Überleben unter Phosphatmangelbedingungen, wie sie in Böden häufig herrschen, spielen.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein(e)
AEP	2-Aminoethylphosphonat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
Cb	Carbenicillin
CL	Cardiolipin
Cm	Chloramphenicol
cpm	Impulse pro Minute (Counts per minute)
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1. ^{3.7.}] decan}-4-yl) phenylphosphat
d	Tag
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DGTS	Diacylglycerol- <i>N, N, N</i> -Trimethylhomoserin
DIG	Digoxigenin
DMPE	Dimethyl-Phosphatidylethanolamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo (10 ³)
<i>kan</i>	Kanamycin/Neomycin-vermittelnde Resistenzkassette
kb	Kilobase
Km	Kanamycin
konz.	Konzentriert
l	Liter
M	Mega (10 ⁶)
MeOH	Methanol
MES	2(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter, 10 ⁻³ l
MM	Minimalmedium

Abkürzungen, Fortsetzung

MMPE	Monomethyl-Phosphatidylethanolamin
MNNG	1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin
NBT	Nitroblautetrazolium
<i>neo</i>	Kanamycin/Neomycin-vermittelnde Resistenzkassette
nm	Nanometer
n.n.	Nicht nachweisbar
OD _{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm
OL	Ornithinlipid
OL-Mutante	Ornithinlipid-defiziente Mutante
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phosphatidylethanolamin
Pi	anorganisches Phosphat
PG	Phosphatidylglycerol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Sulfolipid (Sulfoquinovosyl-Diacylglycerol)
Sm	Streptomycin
<i>spec</i>	Spectinomycin-vermittelnde Resistenzkassette
STW	Standardabweichung
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
μl	Mikroliter, 10 ⁻⁶ l

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Phosphor-freien Membranlipide von <i>Sinorhizobium meliloti</i>	1
1.1.1 Auswirkungen von Phosphatstress auf die Membranlipid- biosynthese	1
1.1.2 Membranlipidzusammensetzung von <i>Sinorhizobium meliloti</i>	1
1.1.3 Das Phosphor-freie Membranlipid Diacylglycerol- <i>N,N,N</i> - Trimethylhomoserin (DGTS)	4
1.1.3.1 Vorkommen von DGTS	4
1.1.3.2 Biosynthese von DGTS	4
1.1.4 Das Phosphor-freie Membranlipid Sulfolipid	6
1.1.4.1 Vorkommen von Sulfolipid	6
1.1.4.2 Biosynthese von Sulfolipid	6
1.1.5 Das Phosphor-freie Membranlipid Ornithinlipid	7
1.1.5.1 Vorkommen von Ornithinlipid	7
1.1.5.2 Wirkung von Ornithinlipid auf Säugetierzellen	8
1.1.5.3 Biosynthese von Ornithinlipid	9
1.2 Regulation der Phosphor-freien Membranlipide	10
1.3 Mögliche Bedeutung der Phosphor-freien Membranlipide	11
1.3.1 Ersatzfunktion der Phosphor-freien Membranlipide bei Phosphatmangel	11
1.3.2 Die Rolle der Phosphor-freien Membranlipide bei der Wurzelknöllchensymbiose	12
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	12
1.4.1 Untersuchungen zum Sulfolipid	12
1.4.2 Untersuchungen zum Ornithinlipid	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Bakterienstämme	15
2.2 Plasmide und Cosmide	16
2.3 Kulturmedien und Zellzüchtung	19
2.3.1 Medien und Anzucht	19
2.3.2 Medienzusätze	21
2.3.3 Bestimmung der Generationszeiten	22
2.4 Lagerung von Bakterienkulturen	22
2.5 Chemische Mutagenese mit MNNG	22
2.6 Wurzelknöllchentests	23
2.6.1 Sterilisation und Keimung	23

2.6.2 Aussetzen der Keimlinge auf Kulturmedien	23
2.6.3 Inokulation der Alfalfa-Keimlinge mit <i>S. meliloti</i>	24
2.6.4 Untersuchung der Knöllchenbildung.....	24
2.7 Enzyme und Marker	24
2.8 Radiochemikalien	24
2.9 Reaktionskits	25
2.10 Synthetische Oligonukleotide.....	25
2.11 Genbank von <i>S. meliloti</i>	28
2.12 DNA-Arbeiten	28
2.12.1 DNA-Isolierung.....	28
2.12.1.1 Isolierung genomischer DNA.....	28
2.12.1.2 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>S. meliloti</i>	28
2.12.2 Reinigung und Fällung von DNA.....	29
2.12.2.1 Reinigung von DNA mit einer Silikamatrix.....	29
2.12.3 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA	29
2.12.4 Enzymatische Modifizierung von DNA	29
2.12.4.1 Restriktionshydrolyse	29
2.12.4.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	29
2.12.4.3 Auffüllen überhängender Enden mit Klenow-Fragment	30
2.12.4.4 Entfernen überhängender Enden mit T4 DNA-Polymerase	30
2.12.4.5 Ligation.....	30
2.12.5 Agarosegel-Elektrophorese von DNA.....	30
2.12.6 Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.12.6.1 Transformation nach der CaCl ₂ -Methode.....	31
2.12.6.2 Transformation durch Elektroporation	31
2.12.7 Transfer mobilisierbarer Vektoren durch Konjugation	32
2.12.7.1 Drei-Punkt-Kreuzung	32
2.12.7.2 "Knock-out-Mutagenese"	33
2.12.8 Identifizierung homologer DNA durch Hybridisierung	34
2.12.8.1 Southern Blot.....	34
2.12.8.2 Durchmustern einer Cosmid-Bank von <i>S. meliloti</i> mittels Kolonie-Lift.....	34
2.12.8.3 Hybridisierung mit Chemilumineszenz.....	34
2.12.8.3.1 Präparation DIG-markierter DNA	34
2.12.8.3.2 Hybridisierung und immunologischer Nachweis	35
2.12.8.3.3 Phosphatase-Nachweis der DIG-markierten Gensonde	35
2.12.8.3.4 Entwicklung des Röntgenfilms.....	35
2.12.8.4 Hybridisierung mit [³² P]-markierten Sonden	36
2.12.8.4.1 Präparation [³² P]-markierter DNA.....	36

2.12.8.4.2 Hybridisierung und Waschen von Southern Blots	36
2.12.9 Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.12.10 DNA-Sequenzierung	37
2.12.11 DNA-Analyse Software und Internetdienste	37
2.13 Lipidanalyse.....	38
2.13.1 Lipidextraktion	38
2.13.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide.....	38
2.13.3 Präparation radioaktiv markierter Lipide	39
2.13.3.1 [³⁵ S]-Sulfat-Markierung.....	39
2.13.3.2 [1- ¹⁴ C]-Acetat-Markierung	39
2.13.3.2.1 [1- ¹⁴ C]-Acetat-Markierung bis zur stationären Phase	39
2.13.3.2.2 Pulse-Markierung mit [1- ¹⁴ C]-Acetat.....	39
2.13.3.3 Quantifizierung [1- ¹⁴ C]-Acetat markierter Lipide.....	40
2.13.3.4 Herstellung von radiomarkiertem Lyso-Ornithinlipid.....	40
2.14 Suche nach Ornithinlipid-defizienten Mutanten.....	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Identifizierung von sinorhizobiellen Genen, die an der Sulfolipid- Biosynthese beteiligt sind	42
3.2 Inaktivierung des an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten <i>sqdB</i> -Gens	43
3.3 Lipid-Phänotyp der <i>sqdB</i> -inaktivierten Mutante SLD11	44
3.4 [³⁵ S]-Sulfat-Markierung der <i>sqdB</i> -inaktivierten Mutante SLD11	46
3.5 Membranlipidzusammensetzung der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 im Vergleich zum Wildtyp.....	48
3.6 Funktionsanalysen der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11	49
3.6.1 Wachstum von SLD11 in Hoch- und Niedrigphosphat-Medien	49
3.6.2 Wurzelknöllchensymbiose von SLD11	50
3.7 Isolierung von <i>Sinorhizobium meliloti</i> -Mutanten mit defizienter Ornithinlipid-Biosynthese	52
3.7.1 MNNG-Mutagenese von <i>Sinorhizobium meliloti</i> G439	52
3.7.2 Identifizierung von Ornithinlipid-defizienten Mutanten	53
3.8 Genetische Komplementierung der Ornithinlipid-defizienten Mutanten	54
3.8.1 Komplementierung der Mutanten mit einer sinorhizobiellen Genbank	54
3.8.2 Subklonale Komplementierung von BW103 und BW908	54
3.8.3 Subklonale Komplementierung von BW803.....	55
3.9 Sequenzierung der komplementierenden DNA-Bereiche	55
3.9.1 Sequenzierung von pBW33 und Teilsequenzierung von pBW25	55

3.9.2 Sequenzierung von pBW65	55
3.10 Genetische Kartierung der komplementierenden Bereiche	55
3.10.1 Identifizierung der Offenen Leserahmen von pBW25 und pBW33	55
3.10.2 Identifizierung der Offenen Leserahmen von pBW65	56
3.11 Vergleich der Sequenzen mit Datenbankeinträgen	57
3.11.1 Analyse der Offenen Leserahmen von pBW33 und pBW25	57
3.11.2 Analyse der Offenen Leserahmen von pBW65	57
3.12 Analyse der Genprodukte	58
3.12.1 Analyse von <i>OlsA</i>	58
3.12.2 Analyse von <i>OlsB</i>	59
3.13 Identifizierung der Punktmutationen in BW103 und BW908	59
3.14 Inaktivierung von Offenen Leserahmen, die an der Ornithinlipid- Biosynthese beteiligt sein könnten	60
3.14.1 Inaktivierung von <i>olsA</i>	60
3.14.2 Inaktivierung von <i>orf167</i>	62
3.14.3 Inaktivierung von <i>olsB</i>	62
3.14.4 Inaktivierung von <i>orf759</i>	64
3.15 Lipid-Phänotypen der Gen-inaktivierten Mutanten	65
3.15.1 Analyse der <i>olsA</i> -inaktivierten Mutante ORLD1	65
3.15.2 Analyse der <i>orf167</i> -inaktivierten Mutante ATKO1	67
3.15.3 Analyse der <i>olsB</i> -inaktivierten Mutante AAK1	67
3.15.4 Analyse der <i>orf759</i> -inaktivierten Mutante TCK1	68
3.16 Genetische Komplementierung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1	68
3.17 Membranlipidzusammensetzung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1	70
3.18 Funktionsanalysen der Ornithinlipid-defizienten Mutanten ORLD1	73
3.18.1 Wachstum von ORLD1 in Hoch- und Niedrigphosphat-Medien ..	73
3.18.2 Wurzelknöllchensymbiose von ORLD1	74
3.19 Nachweis einer Ornithinlipid-Vorstufe durch Pulse-Markierung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 mit [1- ¹⁴ C]-Acetat	76
3.20 Herstellung einer Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante	78
3.21 Lipid-Phänotyp der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante OSD1	80
3.22 Wurzelknöllchensymbiose von OSD1	81

4. Diskussion.....	83
4.1 Die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten sinorhizobiellen <i>sqd</i> - Gene stammen phylogenetisch von Bakterien ab	83
4.2 Die Gene <i>olsA</i> und <i>olsB</i> sind die ersten, an der Ornithinlipid- Biosynthese beteiligten Gene, die bisher identifiziert wurden	86
4.3 Das sinorhizobielle <i>olsA</i> -Gen gehört zur Familie der Lyso- Phosphatidsäure-Acyltransferasen	89
4.4 Die Aminosäuresequenz des sinorhizobiellen <i>olsB</i> -Genprodukts enthält einige hochkonservierte Peptid-Motive	92
4.5 Die Inaktiervierung von <i>olsA</i> erbrachte die Anreicherung eines möglichen Ornithinlipid-Biosynthese-Zwischenproduktes	95
4.6 Die Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutanten ORLD1 und SLD11 waren in ihrem Wachstumsverhalten nicht beeinträchtigt	96
4.7 Die Phosphor-freien Membranlipide von <i>Sinorhizobium meliloti</i> scheinen keinen Einfluss auf die Wurzelknöllchensymbiose zu haben	98
5. Zusammenfassung.....	99
6. Literaturverzeichnis	101
7. Anhang	111
7.1 Aminosäuren- und DNA-Sequenz des <i>sqd</i> -codierenden Genbereichs von <i>S. meliloti</i> 1021	111
7.2 Aminosäuren- und DNA-Sequenz der <i>olsA</i> -Genregion von <i>S. meliloti</i> 1021	114
7.3 Aminosäuren- und DNA-Sequenz der <i>olsB</i> -Genregion von <i>S. meliloti</i> 1021	117
7.4 Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung des <i>S. meliloti</i> 1021- Wildtyps und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 auf Alfalfa-Keimlingen	120
7.5 Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung des <i>S. meliloti</i> 1021- Wildtyps und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 auf Alfalfa-Keimlingen	123
7.6 Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung des <i>S. meliloti</i> 1021- Wildtyps sowie der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Doppelmutante OSD1 auf Alfalfa-Keimlingen	126
7.7 Danksagung	128
7.8 Eigene Veröffentlichungen	129
7.9 Lebenslauf	130

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Membran-bildende Phospholipide von <i>Sinorhizobium meliloti</i>	2
Abb. 2: Die Phosphor-freie Membranlipide Sulfolipid, Ornithinlipid und Diacylglycerol- <i>N,N,N</i> -Trimethylhomoserin (DGTS) von <i>Sinorhizobium meliloti</i>	3
Abb. 3: Biosynthese von Diacylglycerol- <i>N,N,N</i> -Trimethylhomoserin (DGTS) nach Hofmann & Eichenberger, 1996.....	5
Abb. 4: Biosynthese von Sulfolipid nach Benning, 1998	7
Abb. 5: Lipid A von <i>Escherichia coli</i> nach Onishi <i>et al.</i> , 1996	9
Abb. 6: Mögliche Biosynthese von Ornithinlipid analog zur Lipid A- Bildung.....	10
Abb. 7: Karte der genomischen DNA-Region, welche die an der Sulfolipid- Biosynthese beteiligten <i>sqd</i> -Gene des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021- Wildtyps enthält	42
Abb. 8: Autoradiogramm der DIG-markierten Southern-Hybridisierung des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der Sulfolipid-defizien- ten Mutante SLD11	44
Abb. 9: Zweidimensionale dünnsschichtchromatographische Auftrennung der [1- ¹⁴ C]-Acetat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium</i> <i>meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>sqdB</i> -inaktivierten Mutante SLD11 (Hochphosphat)	45
Abb. 10: Zweidimensionale dünnsschichtchromatographische Auftrennung der [1- ¹⁴ C]-Acetat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium</i> <i>meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>sqdB</i> -inaktivierten Mutante SLD11 (Niedrigphosphat).....	46
Abb. 11: Autoradiogramm der dünnsschichtchromatographisch aufge- trennten [³⁵ S]-Sulfat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>sqdB</i> - inaktivierten Mutante SLD11.....	47
Abb. 12: Wachstum von <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 und SLD11	50
Abb. 13: Autoradiogramm der dünnsschichtchromatographisch aufge- trennten [1- ¹⁴ C]-Acetat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps, des Stammes G439 und der Ornithinlipid-defizienten Mutanten BW103, BW873 und BW908	53
Abb. 14: Physikalische Restriktionskarte des Cosmids cosOL553, welches die Ornithinlipid-defizienten Mutanten BW103, BW873 und BW908 komplementiert.....	56

Abb. 15: Lage der Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette (<i>neo</i>) im <i>olsA</i> -Gen	60
Abb. 16: Autoradiogramm der DIG-markierten Southern-Hybridisierung des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>olsA</i> -inaktivierten Mutante ORLD1	61
Abb. 17: Lage der Spectinomycin-Resistenz-Kassette in <i>orf167</i>	62
Abb. 18: Lage der Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette im <i>olsB</i> -Gen	63
Abb. 19: Autoradiogramm der α -[32 P]dCTP-markierten Southern-Hybridisierung des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>olsB</i> -inaktivierten Mutante AAK1	64
Abb. 20: Lage der Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette in <i>orf759</i>	65
Abb. 21: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>olsA</i> -inaktivierten Mutante ORLD1 (Hochphosphat)	66
Abb. 22: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>olsA</i> -inaktivierten Mutante ORLD1 (Niedrigphosphat)	66
Abb. 23: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide der <i>olsB</i> -inaktivierten Mutante AAK1	68
Abb. 24: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide der Stämme ORLD1 x pBW51 und ORLD1 x pMP3510 (Hochphosphat)	69
Abb. 25: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide der Stämme ORLD1 x pBW51 und ORLD1 x pMP3510 (Niedrigphosphat) ..	70
Abb. 26: Wachstum von <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, ORLD1, ORLD1 x pBW51 und ORLD1 x pMP3510	73
Abb. 27: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pulse-[1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 nach Wachstum in TY-Medien	77
Abb. 28: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps. Dem Extrakt wurde vor der Chromatographie [1- 14 C]-Acetat-markiertes Lyso-Ornithinlipid zugefügt ..	77
Abb. 29: Lage der Spectinomycin-Resistenz-Kassette im <i>olsA</i> -Gen	78

Abb. 30: Autoradiogramm der α -[^{32}P]dCTP-markierten Southern-Hybridisierung des <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021-Wildtyps und der <i>olsA</i> - und <i>sqdB</i> -inaktivierten Mutante OSD1	79
Abb. 31: Zweidimensionale dünnsschichtchromatographische Auftrennung der [1- ^{14}C]-Acetat-markierten Membranlipide der <i>sqdB</i> - und <i>olsA</i> -inaktivierten Mutante OSD1	80
Abb. 32: Alignment des an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten <i>sqdB</i> -Genprodukts von <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 mit orthologen <i>sqdB</i> -Genprodukten anderer Bakterien und dem <i>SQD1</i> -Genprodukt von <i>A. thaliana</i>	84
Abb. 33: Dendrogramm der an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten <i>sqdB</i> / <i>SQD1</i> -Genprodukte verschiedener Organismen	85
Abb. 34: Bisher bekannte mögliche Offene Leserahmen, die zwischen den an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Genen <i>olsB</i> und <i>olsA</i> von <i>S. meliloti</i> 1021 liegen	87
Abb. 35: Alignment der Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen verschiedener Bakterien mit dem, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten <i>olsA</i> -Genprodukt von <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	89
Abb. 36: Dendrogramm verschiedener Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen pro- und eukaryontischer Herkunft und dem an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten <i>olsA</i> -Genprodukt von <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	91
Abb. 37: Alignment potentieller " <i>olsB</i> "-Genprodukte verschiedener Bakterien mit dem, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten <i>olsB</i> -Genprodukt von <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	93
Abb. 38: Dendrogramm der " <i>olsB</i> "-Genprodukte verschiedener Bakterien und dem an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten <i>olsB</i> -Genprodukt von <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	94
Abb. 39: Mögliche Biosynthese von Ornithinlipid bei <i>S. meliloti</i> 1021. Das <i>olsB</i> -Genprodukt würde demnach in einem ersten Schritt die 3-Hydroxyfettsäure auf Ornithin übertragen. Das <i>olsA</i> -Genprodukt würde in einem zweiten Schritt die erste Hydroxyfettsäure mit einer zweiten Fettsäure verestern	96

1. Einleitung

1.1 Die Phosphor-freien Membranlipide von *Sinorhizobium meliloti*

1.1.1 Auswirkungen von Phosphatstress auf die Membranlipid-biosynthese

Das Wachstum von Organismen wird in natürlichen Biotopen häufig durch die geringen Mengen an gebundenem Stickstoff und verfügbaren Phosphaten limitiert. Um diese Stress-Situationen zu minimieren, sind höhere Pflanzen während der Evolution spezielle Symbiosen eingegangen, die zur Bildung von Stickstoff-fixierenden Wurzelknöllchen oder zur Assoziation mit Phosphat-aufnehmenden Mycorrhizen führten.

Auch Bakterien sind oft umweltbedingten Phosphatlimitierungen ausgesetzt und haben im Laufe der Zeit spezielle Mechanismen entwickelt, um darauf zu reagieren. Bei *Escherichia coli* zum Beispiel kontrolliert das Zwei-Komponenten-Regulator-System PhoR-PhoB das so genannte Pho-Regulon, welches aus mehr als 30, vielleicht sogar bis zu 137 Genen besteht (van Bogelen *et al.*, 1996). Einige dieser Gene sind am Transport und der Assimilation von anorganischem Phosphat und Phosphat-haltigen Verbindungen beteiligt. Ähnliche Systeme wurden für *Bacillus subtilis* (Hulett *et al.*, 1994) und *Pseudomonas aeruginosa* (Anba *et al.*, 1990) beschrieben.

Das Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* (früher: *Rhizobium meliloti*), das mit Schmetterlingsblütlern (Leguminosen) der Gattungen *Melilotus*, *Medicago* oder *Trigonella* eine Stickstoff-fixierende Wurzelknöllchensymbiose eingehen kann, hat zur Phosphoreinsparung einen zusätzlichen Mechanismus entwickelt. Unter Phosphat-limitierenden Bedingungen kann es seine Membran-bildenden Phospholipide durch Phosphor-freie Lipide ersetzen (Geiger *et al.*, 1999). Ähnliche Reaktionen wurden auch für *Bacillus subtilis* (Minnikin *et al.*, 1972), *Pseudomonas diminuta* (Minnikin *et al.*, 1974) und *Rhodobacter sphaeroides* (Benning *et al.*, 1995) beschrieben. Der Mechanismus, welcher die Bildung der Phosphor-freien Membranlipide reguliert, war allerdings bis vor kurzem nicht bekannt.

1.1.2 Membranlipidzusammensetzung von *Sinorhizobium meliloti*

Sinorhizobium meliloti 1021 bildet unter Kulturbedingungen mit ausreichend verfügbarem Phosphat überwiegend die Phospholipide Phosphatidylethanolamin (PE), Monomethyl-Phosphatidylethanolamin (MMPE),

Dimethyl-Phosphatidylethanolamin (DMPE), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) (Geiger *et al.*, 1999) (Abbildung 1).

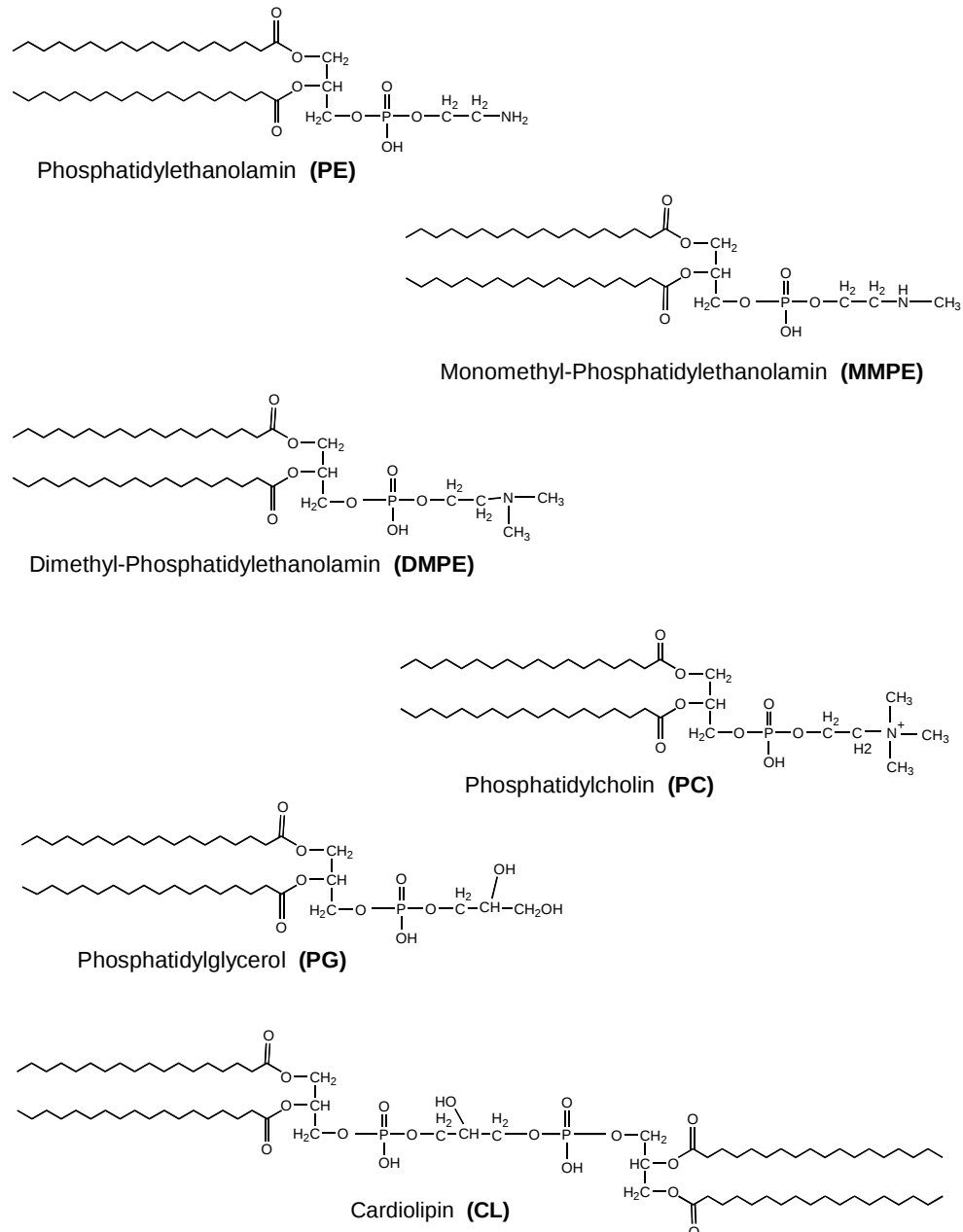


Abb. 1: Membran-bildende Phospholipide von *Sinorhizobium meliloti*.

Wenn der Phosphatgehalt im Kulturmedium allerdings wachstums-limitierend wird, dann bildet *S. meliloti* 1021 vor allem die drei Phosphor-freien Membranlipide Sulfolipid (Sulfoquinovosyl-Diacylglycerol, SL), Ornithinlipid (OL) und Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS) (Abbildung 2).

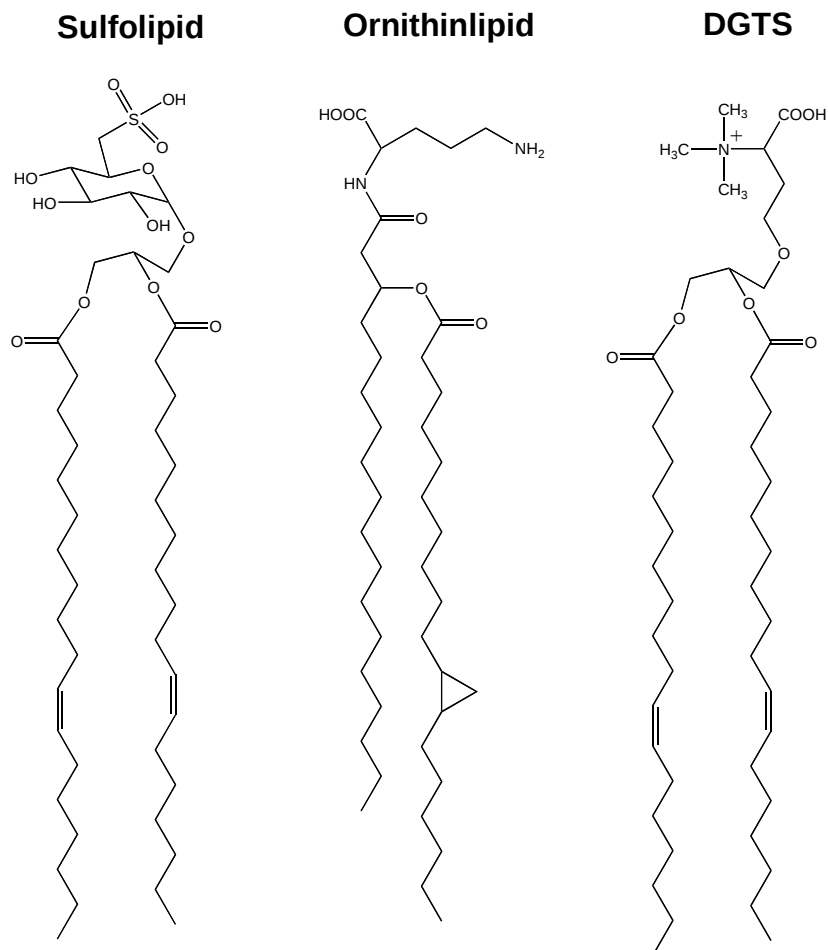


Abb. 2: Die Phosphor-freie Membranlipide Sulfolipid, Ornithinlipid und Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS) von *Sinorhizobium meliloti*.

Beträgt der Anteil der Phospholipide bei *S. meliloti* 1021 auf Vollmedium oder Minimalmedium mit ausreichend verfügbarem Phosphat noch über 95 %, so sinkt dieser Anteil auf etwa 30 % ab, wenn niedrige Phosphat-konzentrationen das Wachstum der Bakterien beeinträchtigen. Dagegen verdoppelt sich unter Phosphat-limitierenden Bedingungen der Gehalt von Sulfolipid und Ornithinlipid und es kommt zu einer *de novo*-Synthese von

Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS). DGTS stellt dann sogar den größten Anteil aller Lipide mit über 50 % dar (Geiger *et al.*, 1999).

1.1.3 Das Phosphor-freie Membranlipid Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS)

1.1.3.1 Vorkommen von DGTS

Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS, siehe Abbildung 2) ist ein Betainlipid, welches bei Algen, Moosen, Farnen, nicht-blühenden Pflanzen sowie bei Protozoen und höheren Pilzen weit verbreitet ist (Sato, 1992; Dembitsky, 1996). Bei Prokaryonten konnte DGTS bisher nur bei *Rhodobacter sphaeroides* (Benning *et al.*, 1995) und *Sinorhizobium meliloti* (Geiger *et al.* 1999) identifiziert werden. Bei diesen Bakterien wird, im Gegensatz zu den Eukaryonten (Künzler & Eichenberger, 1997), DGTS nur unter Phosphatmangelbedingungen gebildet.

Betainlipide haben als Kopfgruppe eine permethylierte Hydroxyaminosäure, die über eine Etherbindung mit Diacylglycerol verbunden ist. Sie besitzen daher eine positiv geladene Trimethylammoniumgruppe und eine negativ geladene Carboxylgruppe und liegen bei neutralem pH-Wert zwitterionisch vor. Die molekulare Struktur und die Ladungsverteilung der Betainlipide zeigen Ähnlichkeiten zum Phospholipid Phosphatidylcholin (PC, siehe Abbildung 1). Zahlreiche höhere Organismen, die DGTS synthetisieren können, bilden nur wenig oder kein PC (Eichenberger, 1982). Es wurde deshalb öfters spekuliert, ob DGTS das PC in Membranen funktionell ersetzen könne (Künzler & Eichenberger, 1997). Der Nachweis für diese Hypothese steht jedoch noch aus.

1.1.3.2 Biosynthese von DGTS

Die Biosynthese von Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin wurde von Hofmann & Eichenberger (1996) am Beispiel von *Rhodobacter sphaeroides* untersucht. Durch Pulse- und Pulse-Chase-Experimente mit L-[1- C^{14}]-Methionin und L-[Methyl-1- C^{14}]-Methionin konnte neben DGTS ein zweifach methyliertes Diacylglycerol-*N,N*-Dimethylhomoserin (DGDS), ein einfach methyliertes Diacylglycerol-*N*-Methylhomoserin (DGMS) und ein Diacylglycerol-Homoserin (DGHS) nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Befunde wurde von Hofmann & Eichenberger ein Biosyntheseweg

für DGTS vorgeschlagen (Abbildung 3). Nach diesem Modell wird im ersten Schritt der Homoserinrest des *S*-Adenosyl-Methionins auf ein freies oder aktiviertes Diacylglycerol unter Bildung von DGHS übertragen. Dieser Schritt sollte von einer DGHS-Synthase katalysiert werden. In drei weiteren Schritten wird dann DGHS an seiner freien Aminogruppe, wahrscheinlich durch eine einzige DGHS-*N*-Methyltransferase, methyliert. Vor kurzem gelang es Klug und Benning zwei an der DGTS-Biosynthese beteiligte Gene aus *R. sphaeroides* zu isolieren (persönliche Mitteilung).

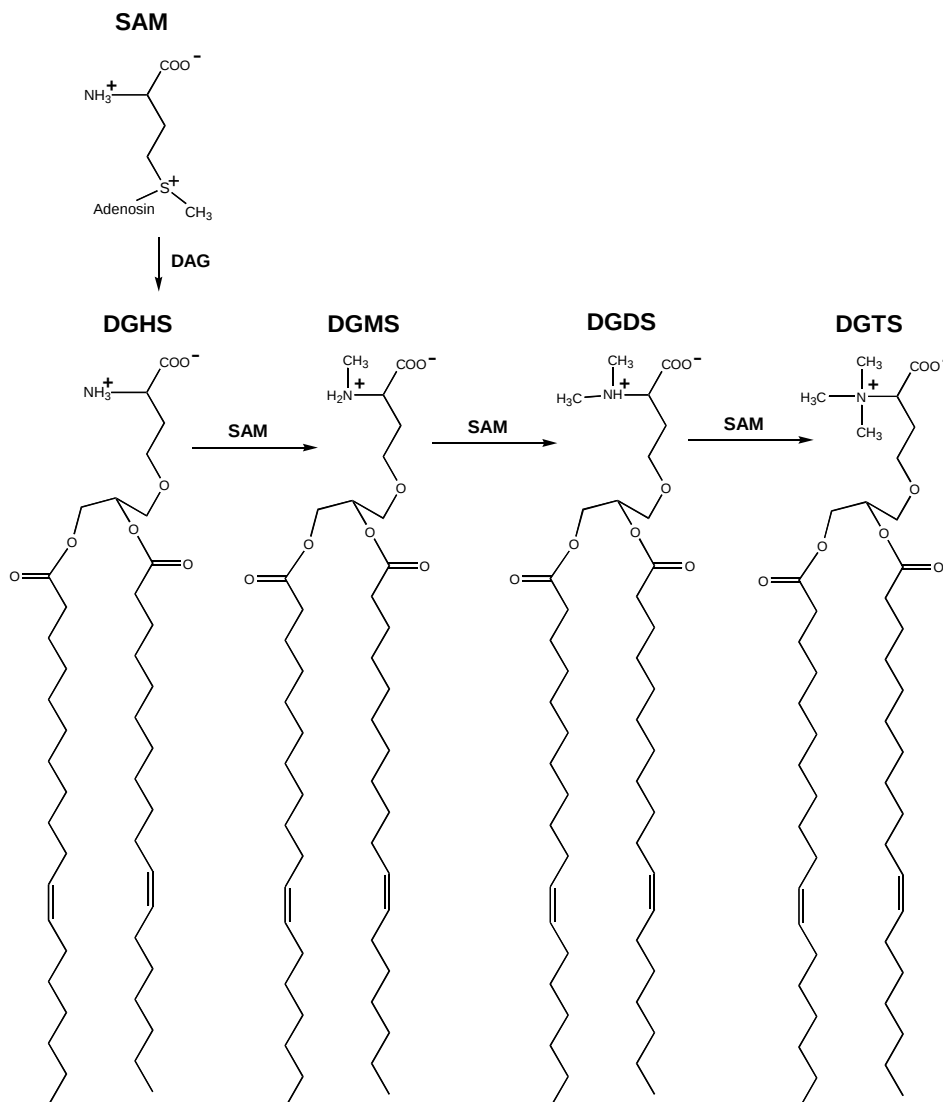


Abb. 3: Biosynthese von Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS) nach Hofmann & Eichenberger, 1996. DAG, Diacylglycerol; DGDS, Diacylglycerol-*N,N*-Dimethylhomoserin; DGHS, Diacylglycerolhomoserin; DGMS, Diacylglycerol-*N*-Methylhomoserin; SAM, *S*-Adenosyl-Methionin.

1.1.4 Das Phosphor-freie Membranlipid Sulfolipid

1.1.4.1 Vorkommen von Sulfolipid

Bereits Ende der 50'er Jahre wurde das Vorkommen von Sulfolipid Sulfoquinovosyl-Diacylglycerol (SL, Abbildung 2) bei Pflanzen beschrieben (Benson *et al.*, 1959; Benson, 1963). Das charakteristische Merkmal dieses Lipids ist eine Sulfonatgruppe am C₆-Atom der 6-Desoxy-Glucose (Quinovose), die bei physiologischen pH-Werten negativ geladen ist.

Sulfolipid wurde bislang in allen Organismen mit oxygener Photosynthese gefunden, dagegen scheinen anoxygen photosynthetische Organismen zu existieren, denen dieses Lipid fehlt (Imhoff & Bias-Imhoff, 1995). Aber auch in photosynthetisch-inaktiven Stämmen von Knöllchenbakterien, unter anderem in *Sinorhizobium meliloti*, wurde Sulfolipid nachgewiesen (Cedergren & Hollingsworth, 1994).

1.1.4.2 Biosynthese von Sulfolipid

Die Biosynthese von Sulfolipid (Abbildung 4) ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Wie die Bildung des ersten isolierbaren Intermediats UDP-Sulfoquinovose (Rossak *et al.*, 1995) detailliert erfolgt, ist bisher unbekannt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqdB*-Gens von *Rhodobacter sphaeroides* zeigt jedoch hohe Sequenzähnlichkeiten zu Zucker-Nukleotid-modifizierenden Enzymen wie der UDP-Glucose-Epimerase oder der dTDP-Glucose-Dehydratase (Benning & Somerville, 1992b). Ein Zwischenprodukt der Zucker-Nukleotid-Dehydratase ist ein 4-keto-5,6-Glucoseen-Derivat (Gabriel, 1987). Für die Sulfolipid-Biosynthese wurde eine analoge Reaktion vorgeschlagen, wobei UDP-4-keto-5,6-Glucoseen als Substrat für die Ausbildung einer Bindung zwischen dem Schwefel- und dem C₆-Kohlenstoffatom durch Addition einer entsprechend reduzierten Schwefelgruppe dienen könnte (Benning, 1998).

Einige Sicherheit gibt es über die letzte Reaktion der Sulfolipid-Biosynthese, der Kondensation des Intermediats UDP-Sulfoquinovose mit Diacylglycerol. Bei *R. sphaeroides* wird die UDP-Sulfoquinovose wahrscheinlich von einem Sulfoquinovosyl-Nukleotid durch eine Glykosyltransferase auf Diacylglycerol übertragen (Rossak *et al.*, 1995).

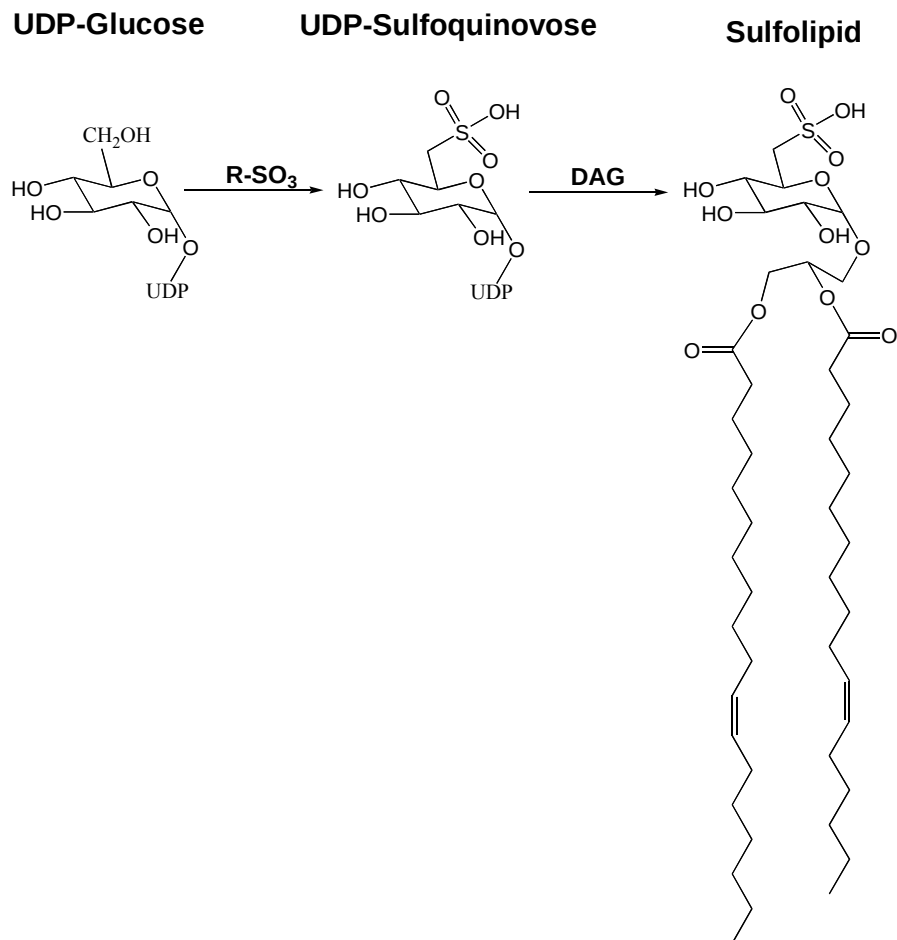


Abb. 4: Biosynthese von Sulfolipid nach Benning, 1998.

DAG, Diacylglycerol; $R-SO_3$, hypothetischer Schwefeldonor.

1.1.5 Das Phosphor-freie Membranlipid Ornithinlipid

1.1.5.1 Vorkommen von Ornithinlipid

Ornithinlipid (OL, Abbildung 2) ist bei Gram-negativen Bakterien, wie *Bordetella*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* und *Thiobacillus* weit verbreitet (Ratledge & Wilkinson, 1988; Asselineau, 1991). Es wurde jedoch auch für einige Gram-positive Bakterien, wie *Mycobacterium* und *Streptomyces* beschrieben (Lanéelle *et al.*, 1990).

Ornithinlipide besitzen eine positiv geladene Aminogruppe und eine negativ geladene Carboxylgruppe und liegen bei neutralem pH-Wert zwitterionisch vor. Die molekulare Struktur von Ornithinlipid besitzt Ähnlichkeiten zu

dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE, Abbildung 1). Deshalb wurde in der Literatur öfters diskutiert, ob Ornithinlipid unter Phosphatmangelbedingungen ein Ersatzlipid für PE sein könne (Minnikin & Abdolrahimzadeh, 1974; Batrakov & Nikitin, 1996; Yagi *et al.*, 1997). Dies konnte bisher aber noch nicht schlüssig gezeigt werden. Viele Autoren sprechen im Zusammenhang von Ornithinlipid auch von Lipiden, die von der Aminosäure Ornithin abgeleitet sind oder Ornithin enthalten. Zur Vereinfachung werden diese Lipide alle unter dem Begriff Ornithinlipid zusammengefasst.

1.1.5.2 Wirkung von Ornithinlipid auf Säugetierzellen

Ornithinlipid wurde bei etlichen pathogenen Bakterien wie *Bordetella*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* und *Pseudomonas* nachgewiesen. In *Flavobacterium indologenes* und *Flavobacterium meningosepticum* repräsentiert Ornithinlipid mit circa 60 % sogar die größte Lipidfraktion (Kawai *et al.*, 1988a). Es wurde deshalb spekuliert, ob es für die Pathogenität dieser Bakterien nicht sogar essentiell sei.

Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Rolle von Ornithinlipid bei pathogenen Bakterien ergab sich Anfang der 80'er Jahre. Aus *Bordetella pertussis* isoliertes Ornithinlipid stimuliert die Verklumpung (Hemagglutination) von Erythrozyten (Kawai *et al.*, 1982b).

Wie Lipid A besitzt Ornithinlipid eine N-(Acyloxyacyl)-Konfiguration und weist deshalb gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zum Endotoxin Lipid A auf (Abbildung 5). Zudem scheint Ornithinlipid wie Lipid A vor allem in der äußeren Membran vorhanden zu sein (Dees & Shively, 1982). Darüber hinaus bewirken beide Molekültypen bei Makrophagen eine starke Bildung von Interleukin-1 und Prostaglandin E2 (Kato & Goto, 1997; Kawai *et al.*, 1999). Aber es gibt auch Unterschiede zwischen den beiden Substanzen. Lipid A ist, im Gegensatz zum Ornithinlipid, für Säugetiere sehr toxisch (Raetz, 1996). Ornithinlipid, welches Mäusen vor einer Lipid A-Injektion gegeben wurde, konnte sogar die tödlichen Effekte von Lipid A verhindern. Es wurde deshalb spekuliert, dass Ornithinlipid vielleicht in Zukunft als antagonistischer Blocker bei Lipid A-ausgelösten Erkrankungen eingesetzt werden könnte (Kawai *et al.*, 1991).

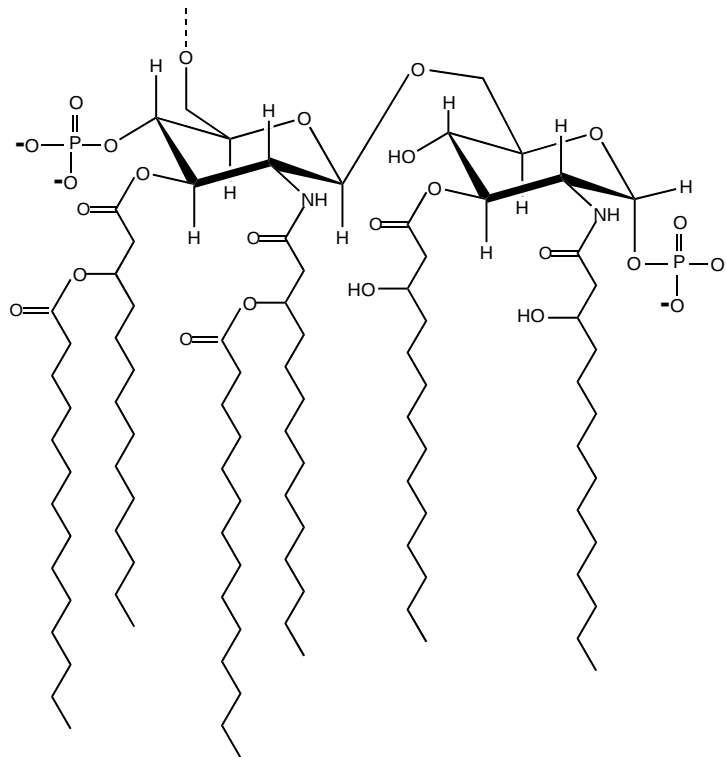


Abb. 5: Lipid A von *Escherichia coli* nach Onishi *et al.*, 1996.

Da Ornithinlipid im Organismus von Testtieren keine toxischen, jedoch Immunsystem-stimulierende Effekte zeigt, besitzt es auch die Charakteristiken eines guten Adjuvans. Adjuvantien sind unspezifische Stimulatoren des Immunsystems, die Immunreaktionen gegen lösliche Antigene verstärken und normalerweise für Impfungen mit löslichen Antigenen benötigt werden. Gegenwärtig wird untersucht, ob sich Ornithinlipid diesbezüglich für die medizinische Praxis eignen könnte (Kato & Goto, 1997; Kawai *et al.*, 1999).

1.1.5.3 Biosynthese von Ornithinlipid

Über die Biosynthese von Ornithinlipid war bisher nichts bekannt. Dies gilt auch für die Gene oder Enzyme, die an dieser Biosynthese beteiligt sind. Die Struktur von Ornithinlipid wurde schon früh als ein α -N-(Acyloxyacyl)-Ornithin identifiziert (Knoche & Shively, 1972). In dieser Struktur befindet sich an der α -Aminogruppe von Ornithin ein 3-Hydroxyfettsäurerest amidi- sch gebunden. Über die 3-Hydroxygruppe des Fettsäurerestes ist eine zweite Fettsäure verestert (Abbildung 6). Für die Biosynthese solch einer

Verbindung sind minimal zwei verschiedene enzymatische Aktivitäten notwendig. Falls Ornithinlipid ähnlich wie Lipid A gebildet werden sollte, wäre ein Enzym, wahrscheinlich eine *N*-Acyltransferase, demnach erforderlich für die Bildung einer Amidbindung zwischen der α -Aminogruppe des Ornithins und der Carboxylgruppe der 3-Hydroxyfettsäure. Ein zweites Enzym, wahrscheinlich eine *O*-Acyltransferase, würde dann die Ausbildung eines Esters zwischen der Hydroxylgruppe der 3-Hydroxyfettsäure und der Carboxylgruppe der zweiten Fettsäure katalysieren.

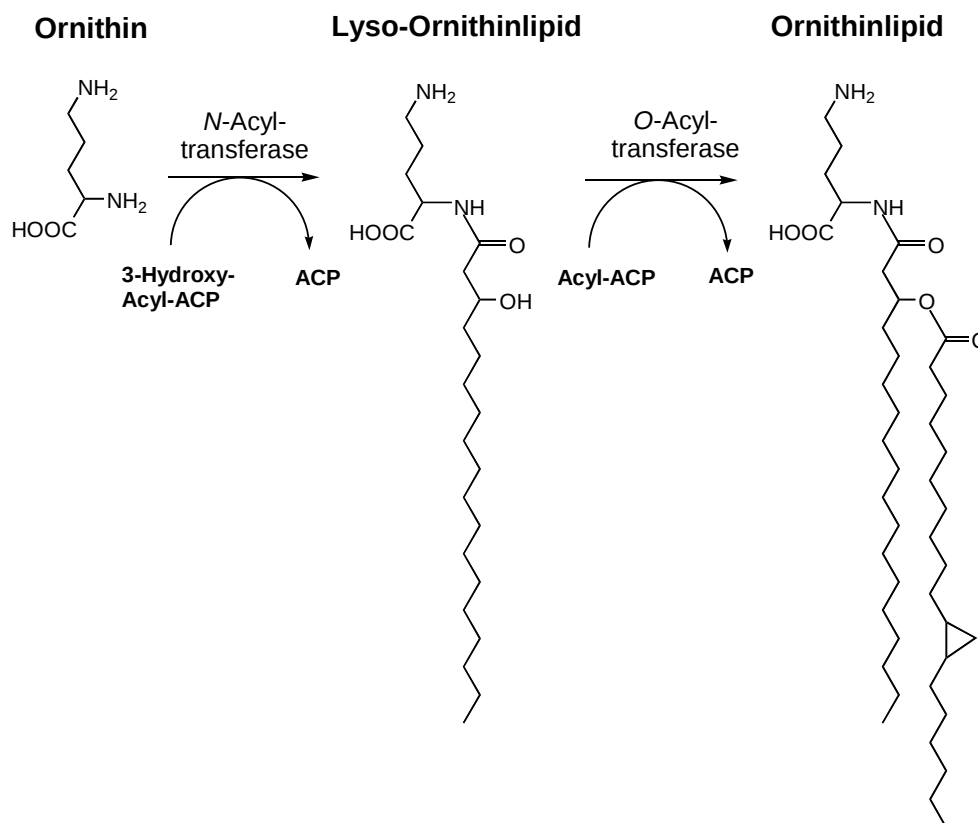


Abb. 6: Mögliche Biosynthese von Ornithinlipid analog zur Lipid A-Bildung. ACP, Acyl-Carrier-Protein.

1.2 Regulation der Phosphor-freien Membranlipide

Die *phoCDET*-Gene von *Sinorhizobium meliloti* codieren für ein hoch-affines Phosphat-Aufnahmesystem. *phoCDET*-defiziente Mutanten bilden nur "leere" Wurzelknöllchen aus und können keinen Stickstoff mehr

fixieren (Bardin *et al.*, 1996; Voegelé *et al.*, 1997). In derartigen Mutanten scheinen niedrige Phosphatkonzentration im Cytoplasma zu einer Aktivierung des Regulators PhoB zu führen. Im Vergleich zum Wildtyp, der ungefähr 95 % Phospholipide auf Medien mit ausreichend verfügbarem Phosphat synthetisiert, sinkt der relative Anteil von Phospholipiden bei *phoCDET*-Mutanten auf fast 16 % ab (Geiger *et al.*, 1999). Dagegen steigt der Anteil von Sulfolipid um das Fünffache, der von Ornithinlipid sogar auf das Achtfache an. DGTS, das unter Phosphat-reichen Bedingungen nicht gebildet wird, repräsentiert unter Phosphat-limitierenden Bedingungen mit über 50 % den Hauptanteil der Membranlipide.

Im Gegensatz dazu können *phoB*-defiziente Mutanten von *S. meliloti* weder auf Hoch-, noch auf Niedrigphosphat-Medien DGTS bilden. Vermutlich stellt das aktivierte, phosphorylierte PhoB einen positiven Regulator für die Transkription der DGTS-Biosynthese-Gene dar. Auch die Gene der Ornithinlipid-Biosynthese könnten von PhoB reguliert werden, da der Gehalt an Ornithinlipid bei *phoB*-Mutanten ebenfalls deutlich absinkt. Nur die Bildung von Sulfolipid ist von PhoB kaum beeinflusst und besitzt anscheinend einen anderen Regulator (Geiger *et al.*, 1999).

1.3 Mögliche Bedeutung der Phosphor-freien Membranlipide

1.3.1 Ersatzfunktion der Phosphor-freien Membranlipide bei Phosphatmangel

Im Boden finden sich oft nur sehr geringe Konzentrationen (0,1-10 μM) von anorganischem Phosphat (Bielecki, 1973). Für das Überleben des im Boden lebenden Bakteriums *Sinorhizobium meliloti* ist es deshalb möglicherweise von Vorteil, einen Teil seiner Phospholipide durch Phosphor-freie Membranlipide ersetzen zu können. Untersuchungen zur Funktion der Phosphor-freien Membranlipide bei *S. meliloti* geben Anlass zu dieser Vermutung (Geiger *et al.*, 1999). Wenn unter Phosphatmangelbedingungen die Phospholipidbildung stark eingeschränkt ist, könnte es sein, dass die Phosphor-freien Membranlipide die Funktionen dieser Lipide übernehmen. Dies wird besonders deutlich bei dem Phosphor-freien Membranlipid DGTS. In Medien mit ausreichend verfügbarem Phosphat wird so gut wie kein DGTS gebildet, aber unter Phosphatmangelbedingungen wird es zum wichtigsten Membranlipid. Aber auch die Anteile von Ornithinlipid und Sulfolipid werden deutlich erhöht, wenn *S. meliloti* in Phosphatstress gerät (Geiger *et al.*, 1999).

1.3.2 Die Rolle der Phosphor-freien Membranlipide bei der Wurzelknöllchensymbiose

Wie eingangs erwähnt, kann *Sinorhizobium meliloti* mit Leguminosen der Gattungen *Medicago* (Alfalfa), *Melilotus* und *Trigonella* stickstoff-fixierende Wurzelknöllchensymbiosen eingehen. Die frühen Stadien der Wurzelknöllchenbildung (Nodulation) sind gut untersucht. Die Pflanzenwurzeln scheiden unter anderem Flavonoide aus, welche die Expression von rhizobiellen Nodulationsgenen (*nod*-Gene) induzieren. Die Produkte der *nod*-Gene sind an der Bildung und der Freisetzung so genannter Nod-Faktoren (Lipochitin-Oligosacchariden) beteiligt, welche die Knöllchenbildung bei den Pflanzen einleiten und dadurch die Invasion der Bakterien in die Wurzel ermöglichen (Dénarié *et al.*, 1996).

Die Freisetzung von Nod-Faktoren ist allerdings bei Rhizobien, die auf Medien mit niedrigen Phosphatkonzentrationen (5 µM) gewachsen sind, deutlich eingeschränkt (McKay & Djordjevic, 1993). Es wäre demnach möglich, dass für eine effiziente Symbiose auch die Membranlipidzusammensetzung eine Rolle spielen könnte. Inwiefern die Phosphor-freien Membranlipide daran mittelbar oder unmittelbar beteiligt sind, war jedoch noch nicht geklärt. DGTS scheint allerdings nicht für die Symbiose benötigt zu werden, da *phoB*-Mutanten, die kein DGTS mehr bilden können, vollständig intakte Knöllchen ausbilden (Geiger *et al.*, 1999).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

1.4.1 Untersuchungen zum Sulfolipid

Da Sulfolipid bei dem photosynthetisch-inaktiven Bakterium *Sinorhizobium meliloti* gefunden wurde, stellte sich die Frage, ob Sulfolipid nicht eine spezifische Rolle bei der Wurzelknöllchensymbiose spielt.

Aus anderen Untersuchungen war bekannt, dass zum Beispiel *Agrobacterium tumefaciens* einen Teil seiner Gene in das Chromosom der Zellen seiner Wirtspflanzen einbauen kann. Auch ein Gentransfer von der Pflanze in das Bakteriengenom wäre bei derart engen Symbiosen, wie sie zwischen Leguminosen und Rhizobien herrschen, vorstellbar gewesen und möglicherweise hätten die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten Gene von der Pflanze durch horizontalen Transfer auf den Symbionten übertragen worden sein können.

Zur Beantwortung dieser Frage sollten die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqd*-Gene, die ich während meiner Diplomarbeit aus *S. meliloti* 1021 isoliert hatte, näher charakterisiert werden. Ein Sequenzvergleich der schon bekannten *sqd*-Gene von *Rhodobacter sphaeroides*, *Synechococcus*, *Synechocystis* und *Arabidopsis thaliana* mit den *sqd*-Genen aus *S. meliloti* sollte Hinweise über die Herkunft der Gene liefern und Ähnlichkeiten und mögliche Verwandtschaften aufdecken. Für Funktionsanalysen sollten durch gezielte Geninaktivierung Sulfolipid-Nullmutanten erzeugt werden. Mit Hilfe dieser Sulfolipid-defizienten Mutanten sollten mögliche Änderungen des Wachstumsverhaltens und der Membranlipidzusammensetzung auf Medien mit ausreichenden oder wachstumslimitierenden Konzentrationen an Phosphat gemessen werden. Des Weiteren sollten Wurzelknöllchentests im Vergleich zum Wildtyp Auskunft darüber geben, ob Sulfolipid bei *S. meliloti* eine Rolle bei der Symbiose mit der Pflanze spielt.

1.4.2 Untersuchungen zum Ornithinlipid

Bei den Untersuchungen zum Ornithinlipid sollte zunächst geklärt werden, welche Gene an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligt sind, da diese bisher noch von keinem Organismus bekannt waren. Auf Grund der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der gefundenen Gene sollte eine Zuordnung der Genprodukte zu bekannten Enzymgruppen erfolgen. Die Frage nach der spezifischen Funktion von Ornithinlipid bei *Sinorhizobium meliloti* sollte durch Untersuchungen des Wachstumsverhaltens und der Symbiosefähigkeit von Ornithinlipid-defizienten Mutanten beantwortet werden. Darüber hinaus sollte eine Anreicherung von Stoffwechsel-Intermediaten bei Ornithinlipid-defizienten Mutanten Hinweise auf eine mögliche Ornithinlipid-Biosynthese liefern.

Für die Bearbeitung dieser Aufgaben sollten zunächst die Gene, die an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligt sind, aus *S. meliloti* isoliert werden. Hierfür sollte *S. meliloti* mutagenisiert und auf Ornithinlipid-Mutanten hin untersucht werden. Die erhaltenen chemischen Mutanten sollten mit Hilfe einer genomischen Cosmidbank genetisch komplementiert werden. Nach Identifikation von Komplementationsgruppen sollten komplementierende Cosmide in möglichst kleine Fragmente subkloniert werden. Die Sequenzierung und Sequenzanalyse der kleinsten komplementierenden Klone sollten die Offenen Leserahmen (ORFs) liefern, welche für die Ornithinlipid-Biosynthese notwendig sind.

Gezielte Geninaktivierungen der an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Gene sollten zu Ornithinlipid-Nullmutanten führen, die mit den intakten Genabschnitten wieder komplementierbar sind. Anschließend sollten die Ornithinlipid-defizienten Mutanten bezüglich ihres Wachstumsverhaltens und ihrer Membranlipidzusammensetzung unter Hoch- und Niedrigphosphat-Bedingungen, sowie bezüglich ihrer Fähigkeit zur Wurzelknöllchenbildung phänotypisch charakterisiert werden. Durch Aminosäuresequenzanalysen der an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Genprodukte mit schon bekannten Enzymklassen und durch die Anreicherung einer möglichen Ornithinlipid-Vorstufe sollte der bisher hypothetische Weg der Ornithinlipid-Biosynthese konkretisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Wenn im Folgenden von *Sinorhizobium meliloti* die Rede ist, so handelt es sich dabei immer, falls nicht anders erwähnt, um den Wildtyp-Stamm *S. meliloti* 1021.

Die Stämme BW103, BW873 und BW908 sind, mit dem Mutagen 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG) erzeugte, chemische Mutanten von *S. meliloti* G439, die kein Ornithinlipid mehr bilden können.

AAK1 und ORLD1 sind Insertionsmutanten, bei denen die Gene, die für die Ornithinlipid-Biosynthese benötigt werden, durch Resistenz-Kassetten unterbrochen sind. SLD11 ist eine Insertionsmutante, die eine Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette im *sqdB*-Gen enthält. Ein intaktes *sqdB*-Gen ist normalerweise essentiell für die Sulfolipid-Biosynthese. Eine Doppel-Insertionsmutante, die weder Sulfolipid noch Ornithinlipid bilden kann, wurde als OSD1 bezeichnet.

Tab. 1: Bakterienstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA1</i> , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15	Hanahan, 1983
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lacUV5</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
J53 R751-pGM2		Jacoby <i>et al.</i> , 1976
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021		
	SU47 <i>str-21</i> , Wildtyp	Meade <i>et al.</i> , 1982
Sm 1021-Derivate		
G439	<i>ndvF</i> -Locus wurde ersetzt durch ein Neomycin-Resistenz vermittelndes <i>Hind</i> III-Fragment des Transposons Tn5	Charles <i>et al.</i> , 1991

Tab. 1: Bakterienstämme, Teil 2

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
BW103	G439-Derivat, Ornithinlipid-defiziente chemische Mutante	Diese Arbeit
BW873	G439-Derivat, Ornithinlipid-defiziente chemische Mutante	Diese Arbeit
BW908	G439-Derivat, Ornithinlipid-defiziente chemische Mutante	Diese Arbeit
AAK1	<i>olsB::kan</i>	Diese Arbeit
ATKO1	<i>orf167::sp</i>	Diese Arbeit
ORLD1	<i>olsA::kan</i>	Diese Arbeit
OSD1	<i>olsA::sp, sqdB::kan</i>	Diese Arbeit
SLD11	<i>sqdB::kan</i>	Diese Arbeit
TCK1	<i>orf759::kan</i>	Diese Arbeit

2.2 Plasmide und Cosmide

Die während der Doktorarbeit hergestellten und verwendeten Plasmide und Cosmide sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Tab. 2: Plasmide, die zur Klonierung verwendet wurden

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pLAFR3	Cosmidvektor, Tetracyclin-resistent	Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
pRK2013	Helfer-Plasmid, Kanamycin-resistent	Figurski <i>et al.</i> , 1979
pUC19	Klonierungsvektor, Carbenicillin-resistent	Yanisch-Perron, 1985
pBK-CMV	Klonierungsvektor, Kanamycin-resistent	Stratagene, La Jolla, CA
pBSIIKS+	Klonierungsvektor, Carbenicillin-resistent	Stratagene, La Jolla, CA
pET9a	Expressionsvektor, Kanamycin-resistent	Studier <i>et al.</i> , 1990

Tab. 2: Plasmide, die zur Klonierung verwendet wurden, Teil 2

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pMP92	IncP, Klonierungsvektor, Tetracyclin-resistent	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP3510	IncP, Expressionsvektor, der den Promotor von <i>nodABC</i> enthält, Tetracyclin-resistent	
pRK404	Broad-host-range-Vektor, Tetracyclin-resistent	Spaink <i>et al.</i> , 1995
pHY109	Spectinomycin-Resistenz- vermittelndes Ω	Ditta <i>et al.</i> , 1985
pTB2154	Interposon	
pTB3131	Spectinomycin-Kassette von pY109 in pUC18 <i>neo</i> -Kassette von Tn5 in pUC19	Østerås <i>et al.</i> , 1998 K. de Rudder M. Schobert

Tab. 3: Angefertigte Plasmide und identifizierte Cosmide

Vektor	Relevante Eigenschaften
cosSL1	pLAFR3 mit einem 24 kb großen sinorhizobiellen Fragment, enthält die <i>sqdB</i> -, <i>sqdD</i> - und <i>sqdC</i> -Gene
cosOL553	pLAFR3 mit einem 25,5 kb sinorhizobiellen Fragment, enthält die <i>olsA</i> - und <i>olsB</i> -Gene
pBW1	pBSIISK+ mit einem 700 bp großen PCR-Produkt eines Teiles von <i>sqdB</i> , amplifiziert mit <i>Pfu</i> -Polymerase, blunt- end kloniert
pBW9	pBK-CMV mit einem 3,5 kb großen Fragment, welches die sinorhizobiellen <i>sqdB</i> - und <i>sqdD</i> -Gene vollständig sowie <i>sqdC</i> teilweise enthält
pBW20	pUC19 mit einem 3,3 kb <i>AgeI/XbaI</i> -Fragment von pBW9
pBW22	pBW20 mit einer Neomycin-Phosphotransferase- Resistenz-Kassette aus pTB3131, eingefügt in die <i>NcoI</i> - Schnittstelle von <i>sqdB</i>

Tab. 3: Angefertigte Plasmide und identifizierte Cosmide, Teil 2

Vektor	Relevante Eigenschaften
pBW24	pMP3510 mit dem 4,2 kb <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment von pBW22
pBW25	pUC19 mit einem 5,5 kb <i>BamHI</i> -Fragment von cosOL553
pBW26	pUC19 mit einem 4,2 kb <i>BamHI</i> -Fragment von cosOL553
pBW27	pUC19 mit einem 2,1 kb <i>BamHI</i> -Fragment von cosOL553
pBW28	pUC19 mit einem 1,9 kb <i>BamHI</i> -Fragment von cosOL553
pBW29	pLAFR3 mit einem 10 kb <i>BamHI</i> -Fragment von cosOL553
pBW30	pUC19 mit einem 6,0 kb <i>PstI</i> -Fragment von cosOL553
pBW31	pRK404 mit einem 6,0 kb <i>PstI</i> -Fragment von cosOL553
pBW33	pBSIIS+ mit einem 2,6 kb <i>PstI/XhoI</i> -Fragment von pBW32
pBW35	pMP92 mit dem 2,6 kb <i>PstI/XhoI</i> -Fragment von pBW33
pBW41	pUC19 mit einem 10 kb <i>PstI</i> -Fragment von cosSL1
pBW43	pET9a mit dem 876 bp großen PCR-Produkt der möglichen Acyltransferase <i>olsA</i> , amplifiziert mit <i>Pfu</i> -Polymerase, kloniert mit <i>NdeI/BglII</i>
pBW51	pBW43, mit <i>XbaI</i> in pMP3510 kloniert
pBW63	pUC19 mit einem 3,2 kb großen PCR-Produkt von cosOL553, enthält <i>olsA</i> und <i>orf167</i> , amplifiziert mit <i>Pfu</i> -Polymerase, kloniert mit <i>KpnI/XbaI</i>
pBW65	pUC19 mit einem 4,1 kb <i>PstI</i> -Fragment von cosOL553
pBW66	pRK404 mit einem 4,1 kb <i>PstI</i> -Fragment von cosOL553
pBW70	pBW63 mit einer Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette aus pTB3131, eingefügt in die <i>AgeI</i> -Schnittstelle von <i>olsA</i>
pBW71	pBW63 mit einer Spectinomycin-Resistenz-Kassette aus pTB2154, eingefügt in die <i>AgeI</i> -Schnittstelle von <i>olsA</i>
pBW75	pMP3510 mit einem 4,2 kb <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment von pBW70
pBW76	pMP3510 mit einem 5,3 kb <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment von pBW71
pBW77	pMP3510 mit einem 5,3 kb <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment von pBW78

Tab. 3: Angefertigte Plasmide und identifizierte Cosmide, Teil 3

Vektor	Relevante Eigenschaften
pBW78	pBW63 mit einer Spectinomycin-Resistenz-Kassette, eingefügt in die <i>Eco47III</i> -Schnittstelle von <i>orf167</i>
pBW81	pUC19 mit einem 1,1 kb großen PCR-Produkt der <i>olsA</i> -Region, mit <i>Pfu</i> -Polymerase amplifiziert von der OL-defizienten Mutante BW103, blunt-end kloniert
pBW82	pUC19 mit einem 1,1 kb großen PCR-Produkt der <i>olsA</i> -Region, mit <i>Pfu</i> -Polymerase amplifiziert von der OL-defizienten Mutante BW908, blunt-end kloniert
pBW83	pBW65 mit einer Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette aus pTB3131, eingefügt in die <i>CpoI</i> -Schnittstelle von <i>olsB</i>
pBW85	pBW66 mit einer Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette aus pTB3131, eingefügt in die <i>KpnI</i> -Schnittstelle von <i>orf759</i>
pBW87	pRK404 mit einem 5,1 kb <i>BamHI/HindIII</i> -Fragment von pBW83

2.3 Kulturmedien und Zellzüchtung

2.3.1 Medien und Anzucht

Alle Medien wurden direkt nach dem Ansetzen 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Für feste Medien wurde vor dem Autoklavieren 1,8 % Agar hinzugefügt.

E. coli wurde auf LB-Medium (Miller, 1972) bei 37°C angezogen.

S. meliloti wurde bei 29°C kultiviert. Als Vollmedium wurde TY-Medium (Beringer, 1974) verwendet, dem bei der Züchtung von *S. meliloti* G439 1 mM 2-Aminoethylphosphonat (AEP) zugegeben wurde. Wachstumseigenschaften wurden in Minimalmedium (Sherwood, 1970) mit Succinat, (8,3 mM) an Stelle von Mannitol, als Kohlenstoffquelle bestimmt.

Flüssigkulturen von *E. coli* oder *S. meliloti* wurden jeweils bei 150 rpm geschüttelt.

Um die Fähigkeit von *S. meliloti* zu überprüfen, auf Alfalfa-Keimlingen Stickstoff-fixierende Wurzelknöllchen bilden zu können (Wurzelknöllchentests), wurden zwei verschiedene Medien gewählt. Tests auf Festmedium

wurden mit Jensen-Agar (van Brussel *et al.* 1986) durchgeführt, während für Versuche in Flüssigkultur ein Medium nach Rigaud & Puppo (1975) verwendet wurde.

LB-Medium (1 l)

10,0 g NaCl
10,0 g Bacto Trypton
5,0 g Hefeextrakt

Medium nach Jensen (1 l)

1,26 g $\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0,2 g K_2HPO_4
0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0,2 g NaCl
0,1 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
20 mM MES
2,5 ml Spurenelementlösung

Spurenelementlösung
für Jensen-Medium (1 l)

0,51 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,1 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1,27 g H_3BO_3
0,4 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0,06 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

Medium nach Rigaud & Puppo (1 l)

100 x Stammlösung (1 l)

17,4 g K_2SO_4
6,8 g KH_2PO_4
4,4 g K_2HPO_4
12,3 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

1000 x Stammlösung (1 l)

0,11 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
2,85 g H_3BO_3
0,2 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
0,55 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
3,07 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

Für 1 l Medium wurden vermischt:

10 ml 100 x Stammlösung
1 ml 1000 x Stammlösung
0,12 g $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0,05 g EDTA-Fe

Mit KOH wurde der pH auf 7,5 eingestellt.

Medium nach Sherwood (1 l)	100 ml 1,1%-ige Glutamatlösung, pH 6,8
	8,5 ml 1 M Na ₂ -Succinat-Lösung
	0,4 ml 1 M MgSO ₄ -Lösung
	0,8 ml 0,45 M CaCl ₂ -Lösung
	0,5 ml 2%-ige FeCl ₃ -Lösung in 0,1 N HCl
	2 ml 0,1%-ige Thiamin-Lösung
	4 ml 0,1%-ige Biotin-Lösung
	882 ml Aqua bidest.

Für Medien mit hohen (1,3 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat (Pi) wurden pro Liter 1,3 ml eines 1 M Kalium-Phosphat-Puffers, pH 7 zugegeben. Für Medien mit niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an Pi wurden pro Liter 2 ml eines 0,01 M Kalium-Phosphat-Puffers, pH 7 zugefügt.

TY-Medium (1 l)	5 g Bacto Trypton
	3 g Hefeextrakt
	10 ml einer 0,45 M CaCl ₂ -Lösung (getrennt autoklaviert)

2.3.2 Medienzusätze

Die Medienzusätze wurden, falls erforderlich, in den folgenden Konzentrationen zugegeben:

Carbenicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 µg/ml
Gentamycin	60 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Neomycin	100 µg/ml
Piperacillin	40 µg/ml
Rifampicin	5 µg/ml
Spectinomycin	300 µg/ml
Streptomycin	500 µg/ml
Tetracyclin	2 µg/ml (<i>S. meliloti</i>), 20 µg/ml (<i>E. coli</i>)
X-Gal	40 µg/ml

2.3.3 Bestimmung der Generationszeiten

Zur Ermittlung der Generationszeiten wurden die Optischen Dichten bei 620 nm (OD_{620}) von *S. meliloti*-Kulturen (10 ml) zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dafür wurde mit einer über Nacht in Minimalmedium (Sherwood) gewachsenen Kultur morgens die Start- OD_{620} in frischen Minimalmedium auf 0,05 eingestellt und bei 29°C in Photometerkolben geschüttelt. Die OD_{620} wurden alle zwei, drei oder sechs Stunden mit Hilfe eines Photometers (Digital Photometer LP1W, Dr. Lange) bestimmt.

2.4 Lagerung von Bakterienkulturen

E. coli wurde in LB mit 15% (v/v) Glycerol, *S. meliloti* in Pepton (6 g/l) mit 15 % Glycerol bei – 80°C gelagert.

2.5 Chemische Mutagenese mit MNNG

Zur Mutagenese von *S. meliloti* G439 wurde eine Vorkultur in 10 ml TY mit 1 mM AEP hergestellt und über Nacht bei 29°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur zu einer Start- $OD_{620}=0,05$ überimpft und bis zur $OD_{620}=0,2$ angezogen. Die Kultur wurde anschließend bei 7000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert. Die Bakterien wurden einmal mit Saline gewaschen und danach in 300 µl Saline resuspendiert. Zur Bakteriensuspension wurden 300 µl CP-Puffer gegeben. 500 µl dieser Suspension wurden mit 40 µl einer 1%-igen (w/v) MNNG-Lösung versetzt und kurz gevortext. Die Bakteriensuspension wurde bis zu 120 min bei 29°C mit 100 rpm schüttelnd inkubiert. Alle 30 min wurden 50 µl entnommen, zweimal mit jeweils 500 µl CP-Puffer gewaschen und zur Mutantenexpression mit 2 ml TY/AEP/Sm vermischt und schüttelnd bis zu einer OD_{620} von mindestens 0,5 bei 29°C angezogen. Die Kulturen wurden dann mit 800 µl Glycerol (99 %) vermischt und bei –80°C gelagert.

Aliquots der Bakteriensuspension wurden zur Bestimmung der Überlebensrate und zur Ermittlung des Anteils Rifampicin-resistenter Zellen in den jeweiligen Populationen eingesetzt. Hierfür wurden Verdünnungsreihen der Aliquots auf TY/AEP-Platten mit und ohne Rifampicin ausplattiert. Die Überlebensrate wurde nach 3 Tagen bestimmt, die Rifampicin-Resistenz nach 6 Tagen.

CP-Puffer:	7,6 g/l	Citronensäure, Monohydrat
	22,6 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
Saline:	5 g/l	NaCl
	0,12 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O

2.6 Wurzelknöllchentests

Zur Ermittlung der Wurzelknöllchenbildung von *S. meliloti* 1021 mit seinem Wirt *Medicago sativa* (Saatluzerne/Alfalfa) wurden zwei verschiedene Methoden (nach Jensen oder nach Rigaud & Puppo, siehe 2.3.1) eingesetzt.

2.6.1 Sterilisation und Keimung

Bei beiden Methoden wurden die Alfalfa-Samen zur Sterilisation für 15 min in H₂SO₄ konz. eingelegt. Danach wurden die Samen dreimal mit sterilem Aqua bidest. gewaschen und anschließend für 15 min mit einer 6%-igen NaOCl-Lösung behandelt. Nach erneutem fünfmaligen Waschen der Samen mit sterilem Aqua bidest, wurden diese auf Wasseragar-Platten verteilt und für 7 Tage bei 4°C im Dunkeln gelagert. Für die Keimung der Samen wurden die Platten für einen Tag bei 29°C inkubiert.

2.6.2 Aussetzen der Keimlinge auf Kulturmedien

Methode nach Jensen:

Für Nodulationstest auf Festagar wurden je 2 Keimlinge auf Jensen-Medium enthaltenden Agar, welcher schräg in 20 cm hohe, dicke Reagenzgläser gegossen worden war, ausgebracht. Vor Beimpfung der Pflanzenwurzeln mit Rhizobien, wurden die Keimlinge 7 Tage ohne Bakterien angezogen.

Methode nach Rigaud und Puppo:

Für Knöllchentest in Flüssigkultur nach Rigaud & Puppo wurden 20 ml Medium in 20 cm hohe Reagenzgläser gefüllt. Als Wachstumsstützen und Dochte dienten Filterpapiere (14 cm x 2 cm), welche ins Medium eingetaucht waren. Auf den Dochten konnten je 2 Pflanzen pro Glas wachsen. Die Keimlinge waren zum Zeitpunkt der Inokulation mit Rhizobien 7 Tage alt.

2.6.3 Inokulation der Alfalfa-Keimlinge mit *S. meliloti*

S. meliloti-Kulturen wurden in Sherwood-Medium über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen mit Sherwood-Medium bis zu einer $OD_{620}=0,05$ verdünnt. *Medicago sativa*-Keimlinge auf Jensen-Agar wurden direkt mit 50 μ l/ Pflanze dieser Kultur beimpft. Zum Animpfen der Keimlinge nach Rigaud & Puppo wurden die Kulturen ($OD_{620}=0,05$) nochmals 1:100 mit Sherwood-Medium verdünnt, und je 500 μ l/Pflanze dieser Verdünnung wurden dem Flüssigmedium zugesetzt. Für Kontrollen wurde steriles Sherwood-Medium verwendet.

2.6.4 Untersuchung der Knöllchenbildung

Die inokulierten Pflanzen wurden, je nach Gegebenheiten, unterschiedlich inkubiert. Bevorzugt wuchsen sie auf einer Fensterbank bei etwa 22°C. Pflanzenversuche, die in Mexiko durchgeführt wurden, fanden in einer Wachstumskammer statt, die 24 h Kunstlicht und eine Temperatur gleichbleibend von 22°C oder 28°C hatte. Alle 5 Tage wurde kontrolliert wie viele Knöllchen pro Pflanze sichtbar waren.

2.7 Enzyme und Marker

Restriktionsenzyme	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Pharmacia, Lippsale MBI Fermentas, Vilnius
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Vilnius
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, Madison, WI
Phosphatase (CIP)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
λ -DNA	MBI Fermentas, Vilnius

2.8 Radiochemikalien

Chemikalie	Aktivität	spez. Radioaktivität
α -[32 P]dCTP	37 MBq/ml	110 TBq/mMol
[1- 14 C]-Acetat	7,4 MBq/ml	2,1 GBq/mMol
[35 S]-Sulfat	37 MBq/ml	> 37 TBq/mMol (carrier-free)

Alle Radiochemikalien wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden geliefert.

2.9 Reaktionskits

DIG DNA Labeling/Detection Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Gene DNA Purification System	BioRad, München
rediprime TM II Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
QIAGEN Plasmid Kit	Qiagen, Hilden

2.10 Synthetische Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, München hergestellt. Die Primer sind jeweils sind 5'-3'-Richtung angegeben.

oTBC450	CCg Tgg ATg CCg gTg TAg gA Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC451	ggA TAg AAT CgC AAg TgT gA Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC452	gAC gCg gAC gCg CAg gCC gA Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC453	ggA TCA CCA CgC TTC ACg TC Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC454	CgA gCT TTC CgT AgA ggC Cg Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC455	AAg ACg CCA TTC gCg CgT AT Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC456	CgC CgA gAT Cgg CCT CTT CA Sequenzierungsprimer für pBW33

oTBC458	ACC TCg TCC CgT TTg gCg TC Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC459	ggC ATg CTg CTC gTC ATg gT Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC460	CTg CgA gCg gTg Cgg CTg Cg Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC461	AAg gAA CgA CCT CCg ACg gC Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC463	gCg ACg gCT ATg TTg CgA CC Sequenzierungsprimer für pBW25
oTBC465	gCA Agg CCT ATT ATC Agg Cg Sequenzierungsprimer für pBW33
oTBC466	gAC Agg TgT TgA gCA ggA Cg Sequenzierungsprimer für pBW25
oTBC467	gTC gTC gAT CTC ggA TgA ccg Sequenzierungsprimer für pBW41
oTBC471	ggA ATA CAT ATg AgC CTT ACC gAC TAC TTC ACC Primer für die Amplifikation von <i>orf167</i>
oTBC472	ggA ATA CAT ATg ATC AAT Tgg gTg Cgg gTC gCT Primer für die Amplifikation von <i>olsA</i>
oTBC473	AAA AgA TCT TCA Cgg CgC gAg CCg CgA CCT TTg Primer für die Amplifikation von <i>olsA</i>
oTBC475	AAA AgA TCT CTA gCg AAg ATC gAg CCg CAT gAC Primer für die Amplifikation von <i>orf167</i>
oTBC477	ggA TCT AgA CAg AAC TTg TCg CAg CCT TC Primer für die PCR des pBW63-Inserts
oTBC478	AAA ggT ACC TCA Agg ACg gAA Cgg TgT Primer für die PCR des pBW63-Inserts

oTBC481	gTg gTA CCC TAC ACg CgC gg Sequenzierungsprimer für pBW25
oTBC482	gCg ATT TCA TCg TCg gCT TCC Sequenzierungsprimer für pBW25
oTBC483	ggA TCT AgA gAg gAA AgT gTg TgC ggT TT Primer für die PCR des pBW81- und des pBW82-Inserts
oTBC484	AAA ggT ACC ATg Cgg gTT CTT TAg TgC AT Primer für die PCR des pBW81- und des pBW82-Inserts
oTBC487	gAT CTg CTC CTC CgC ATC gC Sequenzierungsprimer für pBW65
oTBC488	ACg TCA TCA CCg TCg CTg TCg gC Sequenzierungsprimer für pBW65
oTBC492	gCC ggA CAT gCT CgT ggC ggT Sequenzierungsprimer für pBW65
oTBC493	ACC ACg TTC TCg ACT gTC Tg Sequenzierungsprimer für pBW65
oTBC495	CCg AAA TCg ACA TCg ACC TC Sequenzierungsprimer für pBW81 und 82
oTBC496	gAA gCC CgA ATA TCg gCC Ag Sequenzierungsprimer für pBW81 und 82
oTBC497	Tgg CAT CgC gTC gCC TgT CT Sequenzierungsprimer für pBW81 und 82
oTBC498	ATT TCC TAC ACC ggC ATC CA Sequenzierungsprimer für pBW81 und 82
oTBC499	CCA TTg gCC TgC ATg ATC TT Sequenzierungsprimer für pBW65
oTBC500	CTC ATA CgC TCT CgA AAC AT Sequenzierungsprimer für pBW65

- oTBC501 AgC AgC ATT gCC gCA ACg AT
Sequenzierungsprimer für pBW65
- oTBC502 gTT TCg AgA gCg TAT gAg gg
Sequenzierungsprimer für pBW65
- oTBC503 Agg CCg TCC gCC TgC AAg C
Sequenzierungsprimer für pBW65

2.11 Genbank von *S. meliloti*

Eine, nach der Methode von Staskawicz *et al.*, 1987 hergestellte, *S. meliloti* 1021-Wildtyp Cosmidbank wurde verwendet (Sohlenkamp *et al.*, 2000).

2.12 DNA-Arbeiten

2.12.1 DNA-Isolierung

2.12.1.1 Isolierung genomischer DNA

1 ml einer über Nacht gewachsenen *S. meliloti*-Kultur wurde durch Zentrifugation geerntet und mit 1 ml TE-Puffer, pH 8.0 gewaschen. Die Bakterien wurden in 400 µl TE-Puffer, 50 µl 10%-iger SDS und 50 µl (5 mg/ml) Proteinase K (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit einer Injektionskanüle G 20-11/2 geschert. Die wässrige Phase wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol, einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1 v/v) und einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) extrahiert und die genomische DNA in der Wasserphase nachfolgend mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA

2.12.1.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* und *S. meliloti*

Plasmid-DNA wurde nach der in Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode von Birnboim & Doly isoliert. Für Sequenzierungsreaktionen

wurde die Plasmid-DNA mit dem "QIAGEN Plasmid Kit" der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt.

2.12.2 Reinigung und Fällung von DNA

Die Reinigung der DNA durch Extraktion mit Phenol/Chloroform, sowie die Fällung der DNA mit Ethanol oder Isopropanol wurde, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt. Zur Reinigung der DNA für die Elektroporation wurde die Silikamatrix-Methode verwendet.

2.12.2.1 Reinigung von DNA mit einer Silikamatrix

Aus Agarosegelen und für die Elektroporation wurde die DNA mit dem "Gene DNA Purification System" der Firma BioRad (München) gereinigt.

2.12.3 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Reinheit und Konzentrationen von DNA-Lösungen wurden spektrophotometrisch, wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, bestimmt. Geringe DNA-Mengen und kleine Volumina wurden durch Vergleich der Ethidiumbromidfluoreszenz mit einem DNA-Standard quantifiziert.

2.12.4 Enzymatische Modifizierung von DNA

2.12.4.1 Restriktionshydrolyse

Restriktionshydrolysen wurden nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, Freiburg; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; Fermentas, Vilnius) durchgeführt. Üblicherweise wurde 1 h bei 37°C im Wasserbad in einem Mindestvolumen von 20 µl inkubiert.

2.12.4.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung von Selbstligationen der gespaltenen Vektoren bei der Klonierung wurden die überhängenden Enden dephosphoryliert. Dafür wurde dem Restriktionsansatz nach der Restriktion 1 U alkalische

Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) zugegeben. Für 30 min wurde bei 37°C inkubiert. Die Enzyme wurden danach, nach Angaben des Herstellers, durch Hitze inaktiviert.

2.12.4.3 Auffüllen überhängender Enden mit Klenow-Fragment

Die 5'-überhängenden Enden geschnittener DNA wurden mit dem Klenow-Fragment nach der in Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Vorschrift aufgefüllt. Zum Restriktionsansatz von 20 µl wurden 3 µl dNTPs (10 mM), 3 µl Puffer und 1 U Klenow-Fragment gegeben und auf 50 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Nach der Inkubation für 30 min bei 37°C wurde für 10 min bei 75°C eine Hitzedenaturierung durchgeführt.

2.12.4.4 Entfernen überhängender Enden mit T4 DNA-Polymerase

Die 3'-überhängenden Enden geschnittener DNA wurden mit T4 DNA-Polymerase nach der in Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Vorschrift entfernt. Zum Restriktionsansatz von 20 µl wurden 3 µl dNTPs (10 mM), 3 µl Puffer und 0,1 U T4 DNA-Polymerase gegeben und auf 50 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Nach der Inkubation für 5 min bei 16°C wurde für 10 min bei 80°C eine Hitzedenaturierung durchgeführt.

2.12.4.5 Ligation

Die Ligation wurde nach Vorschrift des Herstellers (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen von 10 µl mit 1 U T4 Ligase wurde für 16 h bei 16°C inkubiert.

2.12.5 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Die Agarosegel-Elektrophoresen wurden, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, für 1 h bei RT mit 100 V in TAE-Puffer durchgeführt. Die Agarose-Konzentration betrug 1 %. Vor der Elektrophorese wurde der DNA-Lösung 1/5 Vol. Auftragspuffer (Sambrook *et al.*, 1989) mit Bromphenolblau zugegeben. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel 15-30 min in Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) inkubiert. Unter UV-Licht war die DNA durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids

sichtbar. Als Größenstandard wurde λ -DNA (Pharmacia, Freiburg), mit *Hind*III oder mit *Eco*RI und *Hind*III gespalten, eingesetzt.

2.12.6 Transformation von *E. coli*

2.12.6.1 Transformation nach der CaCl_2 -Methode

Herstellung kompetenter Zellen:

50 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur von *E. coli* DH5 α beimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zur $\text{OD}_{600}=0,4$ gezüchtet. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis gestellt und danach 5 min mit 2000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen vorsichtig in 30 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde über Nacht in einem Eisbad im Kühlschrank inkubiert. 27 ml der CaCl_2 -Lösung wurden vorsichtig abpipettiert, und die sedimentierten Zellen wurden in den restlichen 3 ml resuspendiert und in Anteilen von je 200 μl bei -80°C eingefroren.

CaCl_2 -Lösung:	60 mM	CaCl_2
	15 % (v/v)	Glycerol

Transformation kompetenter Zellen:

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-10 μl Plasmid-DNA-Lösung vorsichtig vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellsuspensionen für 1 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend sofort für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 μl LB-Medium wurden die Zellen 1-1,5 h bei 37°C und 150 rpm geschüttelt, danach auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.12.6.2 Transformation durch Elektroporation

Für die Elektroporation von *E. coli* wurde der Genepulser II der Firma BioRad (München) verwendet. Die Züchtung und Vorbereitung der Zellen sowie die Elektroporation mit 0,2 cm Küvetten wurden nach dem Protokoll des Herstellers (BioRad) durchgeführt. Es wurden entweder 1-2 μl nicht entsalzter Ligationsansatz für die Elektroporation von 100 μl einer Zellsuspension verwendet, oder der gesamte Ligationsansatz wurde mit

Silikamilch gereinigt, in H₂O bidest. aufgenommen und komplett zur Elektroporation eingesetzt.

2.12.7 Transfer mobilisierbarer Vektoren durch Konjugation

2.12.7.1 Drei-Punkt-Kreuzung

Zur Einschleusung von Plasmiden in *S. meliloti*-Zellen wurde die Konjugation verwendet. Bei der Konjugation kommt es zum Austausch von genetischen Material zwischen einem Donorstamm und einem Empfängerstamm (Rezipient) über eine Brückenbildung zwischen beiden Stämmen. Normalerweise enthält der *E. coli*-Donorstamm das zu übertragende Plasmid, welches eine Mobilisierungsstelle (Mob-site) besitzt. Um den Transfer auszulösen bedarf es zusätzlich eines Helfer-Stammes, der die *tra*-Gene enthält. Die drei verschiedenen Stämme Donor, Helfer und Rezipient werden in einem bestimmten Verhältnis miteinander vermischt und für einige Stunden miteinander inkubiert.

Für diese Drei-Punkt-Kreuzung wurde eine, über Nacht gewachsene, *S. meliloti*-Kultur (Rezipient) in frisches TY-Medium zu einer OD₆₂₀=0,15 überimpft und für 3 h bei 30°C inkubiert. Die über Nacht auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum gewachsenen Helfer- und Donor-Stämme wurden 1 h Stunde vor der Kreuzung in LB-Medium bis zu einer OD₆₂₀=0,15 angeimpft. Die Kulturen wurden, falls Antibiotikareste entfernt werden mussten, mit TY-Medium gewaschen. Jeweils Suspensionen mit 100 µl Rezipient, 40 µl Helfer-Stamm und 20 µl Donor wurden in einem Eppendorfgefäß miteinander vermischt und in 10 µl-Portionen auf TY-Platten getropft. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden sie bei 29°C über Nacht inkubiert. Als Kontrollen dienten Kreuzungen ohne Helfer-Stamm oder ohne Donor. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen mit einer Impföse im 3-Strich-Verfahren auf TY-Platten ausgestrichen. Als selektierende Antibiotika wurden Streptomycin (Selektion für *S. meliloti*), Piperacillin (Selektion gegen *E. coli*) und Tetracyclin (Selektion für das Plasmid) verwendet.

Nach etwa 5 Tagen waren Einzelkolonien auf den Platten sichtbar. Die Bakterien wurden in zwei weiteren Durchgängen vereinzelt. Die erfolgreich isolierten Transkonjuganten wurden bei -80°C gelagert.

2.12.7.2 "Knock-out-Mutagenese"

Die "knock-out-Mutagenese" wurde in zwei Schritten vollzogen. Im ersten Schritt wurden Transkonjuganten, wie unter 2.12.7.1 beschrieben, hergestellt. Diese Transkonjuganten enthielten auf dem Plasmid eine Resistenz-Kassette im Gen, welches unterbrochen werden sollte. Im zweiten Schritt wurde ein zweiter broad-host-range-Vektor der gleichen Inkompatibilitätsgruppe (IncP) in die Transkonjuganten eingekreuzt. Dafür wurde der *E. coli*-Stamm J53 R751-pGM2 (Jacobi *et al.*, 1976) verwendet. Er besitzt die *tra*-Gene in seinem Genom, weshalb kein zusätzlicher Helfer-Stamm notwendig war.

Eine, über Nacht in TY-Medium mit Tetracyclin gewachsene, *S. meliloti*-Transkonjuganten-Kultur (Rezipient) wurde 3 h vor der Kreuzung in frischem TY-Medium zu einer $OD_{620}=0,15$ überimpft. Der Donor *E. coli*-Stamm J53 R751-pGM2, welcher über Nacht auf einer LB-Platte mit 30 µl/ml Gentamycin gewachsen war, wurde 1 h vor der Kreuzung zu einer $OD_{620}=0,15$ angeimpft. Für die Kreuzung wurde 1 ml der *S. meliloti*-Kultur in ein Eppendorfgefäß gegeben und anschließend bei 4 000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und 1 ml der J53 R751-pGM2-Kultur wurde auf die Zellen pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 100 µl TY-Medium resuspendiert und in 10 µl-Portionen auf TY-Platten getropft. Nach dem Trocknen der Platten wurden sie bei 29°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Kulturen mit einer Impföse im 3-Strich-Verfahren auf TY-Platten ausgestrichen. Als selektierende Antibiotika wurden Piperacillin (Selektion gegen *E. coli*), Gentamycin (Selektion für pGM2) und Neomycin oder Spectinomycin (Selektion für Resistenz-Kassette) verwendet.

Nach etwa 5 Tagen waren Einzelkolonien sichtbar, die auf frischen Platten weitervereinzelt wurden. Bei einfachen Rekombinationen wäre das ganze Plasmid und damit auch die Tetracyclin-vermittelnde Resistenz des Vektors ins Genom integriert. Solche Tetracyclin-resistente Transkonjuganten wurden verworfen. Tetracyclin-sensitive, doppelt rekombinierte Transkonjuganten wurde in einem weiteren Durchgang vereinzelt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.12.8 Identifizierung homologer DNA durch Hybridisierung

2.12.8.1 Southern Blot

Für die Herstellung von Southern Blots wurde genomische DNA (5-10 µg) mit Restriktionsendonucleasen gespalten und auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA mit der "Downward Capillary Blot"-Methode nach Chomcynski (1992) einzelsträngig auf eine Nylonmembran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 2 x SSC für 2 min gewaschen und anschließend bei RT für 15 min getrocknet. Die DNA wurde durch 4-minütige UV-Bestrahlung fixiert.

2.12.8.2 Durchmustern einer Cosmid-Bank von *S. meliloti* mittels Kolonie-Lift

Für das Durchmustern einer Cosmid-Bank von *S. meliloti* 1021 wurden Verdünnungsreihen eines Teils der Cosmid-Bank-Population auf LB-Platten mit Tetracyclin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten für 2 Stunden bei 4°C gelagert. Die Einzelkolonien wurden auf Nylonfilter, nach Angaben der Hersteller (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), abgeklatscht. Die Lysis der Zellen und die Fixierung der DNA erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Die Membranen wurden anschließend mit dem "DIG DNA Labeling/Detection Kit" der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) hybridisiert.

2.12.8.3 Hybridisierung mit Chemilumineszenz

2.12.8.3.1 Präparation DIG-markierter DNA

Zur Identifizierung homologer DNA mit einer DIG-markierten Gensonde wurde ein "DIG DNA Labeling/Detection Kit" der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) verwendet. Die zu untersuchende DNA wurde einzelsträngig auf eine Nylonmembran (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) transferiert (2.12.8.1) und mit der Gensonde hybridisiert. Anschließend konnte die DIG-Markierung durch einen Antikörper immunologisch nachgewiesen werden. Durch eine alkalische Phosphatase, die an den Antikörper gebunden ist, konnte entweder eine Farbreaktion mit NBT

und BCIP ausgelöst oder durch Chemilumineszenz nach Behandlung mit dem Substrat CSPD ein Röntgenfilm belichtet werden.

Die DIG-markierte Sonde wurde mittels PCR oder mit Hilfe von Klenow-Fragment, nach Angaben des Herstellers, hergestellt. Mindestens 3 µg DNA wurden für die Markierungsreaktion eingesetzt.

2.12.8.3.2 Hybridisierung und immunologischer Nachweis

Zur Hybridisierung wurde das Protokoll des Herstellers (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) verwendet. Die Membran wurde für die Hybridisierung in einem Plastikbeutel eingeschweißt und in einem Hoefer HB400 Hybridisierungssofen (Pharmacia, Freiburg) inkubiert.

Markierte DNA-Fragmente als Gensonden wurden über Nacht bei 68°C mit einer Konzentration von 25 ng/ml in einem, nach Angaben des Herstellers bereiteten, Hybridisierungspuffer hybridisiert. Nach Waschen der Membran wurde der immunologische Nachweis, ebenfalls nach Angabe des Herstellers (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), durchgeführt.

2.12.8.3.3 Phosphatase-Nachweis der DIG-markierten Gensonde

Die Farbreaktion der am Anti-DIG-Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase mit NBT-BCIP oder die Chemilumineszenzreaktion mit CSPD wurden jeweils nach Protokollen des Herstellers (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) ausgeführt. Die Farbreaktion wurde nach 16 h beendet. Um die Chemilumineszenzreaktion sichtbar zu machen, wurde die Nylonmembran in Frischhaltefolie (Roan-Fol, Merseburg) eingewickelt und an einen Röntgenfilm (Kodak BIOMAX MR I; Sigma, Deisenhofen) gepresst. Die Lichtentwicklung hielt ca. 24 h an. Die optimale Exposition des Röntgenfilms wurde durch Variation der Inkubationsdauer ermittelt.

2.12.8.3.4 Entwicklung des Röntgenfilms

Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm für 3-5 min in Entwickler-Lösung (GBX Developer; Sigma, Deisenhofen) gelegt, kurz in Wasser gewaschen und für 1-3 min in Fixierungslösung (GBX Fixer; Sigma, Deisenhofen) geschwenkt. Der Film wurde anschließend in Wasser gewaschen und bei RT getrocknet.

2.12.8.4 Hybridisierung mit [^{32}P]-markierten Sonden

2.12.8.4.1 Präparation [^{32}P]-markierter DNA

Eine Gensonde wurde mit Hilfe des "rediprimeTMII Kit" (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) mit α -[^{32}P]dCTP, nach den Angaben des Herstellers, radioaktiv markiert.

2.12.8.4.2 Hybridisierung und Waschen von Southern Blots

Southern Blots wurden für mindestens 3 Stunden mit "Rapid-hyp buffer" von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden bei 66°C prähybridisiert. Nach der Prähybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 66°C.

Die Nylonmembran wurde je zweimal für 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % SDS; 1 x SSC, 0,1 % SDS; 0,5 x SSC, 0,1 % SDS bei RT gewaschen. Die restliche ungebundene Radioaktivität wurde durch zweimaliges Waschen der Membran mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS und 0,1 x SSC bei 60°C für je 10 min entfernt. Anschließend wurde der Southern Blot autoradiographiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte wie unter 2.12.8.3.4 beschrieben.

2.12.9 Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA-Stücken, und besonders zum Einfügen neuer Restriktionsschnittstellen für die Ligation wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Routinemäßig wurden 500 pg DNA und stöchiometrische Mengen der beiden Primer (5 μMol) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im Reaktionspuffer des Herstellers und in Gegenwart einer Mischung aus dNTPs, wobei die Endkonzentration jedes einzelnen dNTP 250 μM betrug. Das Endvolumen der Ansätze umfasste 100 μl wenn *Pfu*-Polymerase oder 25 μl wenn *Taq*-Polymerase verwendet wurde. In einem programmierbaren Heizblock ("Cycler") durchlief die Probe dann ein Temperaturprogramm mit üblicherweise 30 Zyklen. Die Temperaturschritte betrugen meist 1 min bei 95°C, 1 min bei 58°C und 2 min bei 72°C.

2.12.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Meixner, Berlin durchgeführt.

2.12.11 DNA-Analyse Software und Internetdienste

DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe verschiedener Versionen des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) mit den Sequenzen der Datenbanken am "National Center for Biotechnology Information NCBI", USA verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Das Suchergebnis lieferte Hinweise auf mögliche Strukturen und Funktionen ähnlicher Gene und Genprodukte. Auch die lokalen Server für die Genomprojekte von *S. meliloti* (<http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti.html>) und *Rhodobacter sphaeroides* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Microb_blast/unfinishedgenome.html) erbrachten Hinweise auf Sequenzähnlichkeiten.

Zur Errechnung der Wahrscheinlichkeit von Offenen Leserahmen (ORFs) wurde das Programm Frameplot verwendet (<http://www-dhw.ch.cam.ac.uk/tools.html>).

Proteinalignments wurden mit dem Programm Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Das Auffinden und Markieren von übereinstimmenden Aminosäuren wurde mit dem Programm BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) vorgenommen. Die Erstellung von Dendrogrammen auf Grund der Proteinalignments erfolgte mit dem Programm TreeView (Page, 1996).

Zur Suche nach Sequenzmotiven in Proteinsequenzen wurde die PROSITE Datenbank (Bairoch *et al.*, 1997) verwendet. Theoretische Berechnungen für sekundäre Proteinstrukturen wurden auf den Servern von SOSUI (<http://azusa.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui>) oder Embnet (<http://www.ch.embnet.org/index.html>) durchgeführt.

Für allgemeine DNA-Analysen wurde das Programm OMIGA der Firma Oxford Molecular Ltd. verwendet.

2.13 Lipidanalyse

2.13.1 Lipidextraktion

Die Extraktion von Lipiden erfolgte meistens nach der Methode von Bligh & Dyer (1959). Für die Suche nach Ornithinlipid-defizienten Mutanten wurden Lipide nach einer modifizierten Methode von Benning *et al.* (1992a) extrahiert. Dafür wurden 1 ml Bakterienkultur in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert, oder 1 cm² eines 4-Tage alten Bakterienrasens wurde von einer Platte gekratzt. Die Bakterien wurden mit 60 µl Chloroform/Methanol (1:1 v/v) und 20 µl 1 M KCl/0,2 M H₃PO₄ resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch gevortext und für 2 Minuten mit der Tischzentrifuge bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die untere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und vor der dünnschichtchromatographischen Analyse bei -20°C gelagert. Je 10 µl der Lipidextrakte wurden für die Dünnschicht-Analyse eingesetzt.

2.13.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide

Die Lipidextrakte wurden mit Hilfe von Kristallspitzen auf den unteren Bereich einer Dünnschichtchromatographie-Platte (HPTLC silica gel 60 F254 von Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel diente in der ersten Dimension ein Gemisch aus 140 ml Chloroform, 60 ml Methanol und 10 ml Wasser. Für die zweite Dimension wurde ein Gemisch aus 130 ml Chloroform, 50 ml Methanol und 20 ml Eisessig verwendet. Die Platten wurden in jeder Dimension für 75 min entwickelt.

Nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Lipide wurden diese durch Joddämpfe sichtbar gemacht. Ornithinlipid und PE wurden nachfolgend durch Besprühen der Platten mit 0,2 % Ninhydrin in Aceton und Erhitzen auf 120°C für 1 min gefärbt.

HPTLC-Platten von radiomarkierten Lipiden wurden nach der zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Auftrennung für 1 h getrocknet und dann autoradiographiert.

2.13.3 Präparation radioaktiv markierter Lipide

2.13.3.1 [^{35}S]-Sulfat-Markierung

Um eine möglichst effiziente Markierung mit [^{35}S]-Sulfat zu erhalten, sollte die minimale Sulfatkonzentration ermittelt werden, die gerade noch nicht wachstumslimitierend für *S. meliloti* ist. Dazu wurde das Wachstum von *S. meliloti* in modifiziertem Sherwood-Medium untersucht, wobei MgSO_4 durch MgCl_2 ersetzt und die Sulfatkonzentration von 0,4 mM bis 0,0 mM variiert wurde. Ein modifiziertes Sherwood-Medium mit einer Sulfatkonzentration von 0,01 mM erfüllte diese Anforderung.

Die *S. meliloti*-Kulturen wurden in 10 ml des modifiziertem MM, das 0,01 mM Sulfat enthielt, zu einer $\text{OD}_{620}=0,05$ inokuliert. Ein Aliquot (1 ml) dieser Kultur wurde in ein steriles Plastikröhrchen überführt und es wurde 1 μl , d.h. 37 KBq [^{35}S]-Sulfat zugegeben. Nach 24 h bei 29°C wurden die Kulturen geerntet und die Lipide nach Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Bis zur dünnschichtchromatographischen Analyse wurden die Lipide bei -20°C gelagert. Ein Aliquot von circa 30 000 cpm wurde für die DC verwendet.

2.13.3.2 [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat-Markierung

2.13.3.2.1 [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat-Markierung bis zur stationären Phase

In Voll- oder Minimalmedium über Nacht gewachsene Bakterienkulturen wurden in 10 ml frischem Medium zu einer $\text{OD}_{620}=0,05$ überimpft. Aliquots (1 ml) dieser Kulturen wurden in ein sterile Plastikröhrchen überführt und es wurden je 2 μl [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat (14,8 KBq) zugegeben. Kulturen wurden bei 29°C bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert. Von nicht markierten Parallelkulturen wurde die OD verfolgt. Lipide wurden nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Bis zur dünnschichtchromatographischen Analyse wurden die Lipidextrakte bei -20°C gelagert. Aliquots von circa 20 000 bis 30 000 cpm wurde für die DC verwendet.

2.13.3.2.2 Pulse-Markierung mit [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat

Eine, über Nacht in TY-Medium gewachsene, *S. meliloti*-Kultur wurde in 10 ml frisches Medium zu einer $\text{OD}_{620}=0,3$ überimpft. Ein Aliquot (1 ml) dieser Kultur wurden in ein steriles Plastikröhrchen überführt und es wurden 2 μl [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat (14,8 KBq) zugegeben. Die Kulturen wurden bei 29°C

für 30 min inkubiert und die Lipide wurden anschließend nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Bis zur dünnschichtchromatographischen Analyse wurden die Lipideextrakte bei -20°C gelagert. Ein Aliquot von circa 20 000 bis 30 000 cpm wurde für die DC verwendet.

2.13.3.3 Quantifizierung $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat markierter Lipide

Nach Autoradiographie der Dünnschichtplatten wurden die einzelnen radioaktiven Lipid-Substanzen mit einem Bleistift markiert und aus den Kieselgel-Platten gekratzt. Das Substanz-enhaltende Kieselgel wurde in organische Szintillationsflüssigkeit gegeben und gevortext. Einen Tag später wurden die Proben im Szintillationszähler vermessen.

2.13.3.4 Herstellung von radiomarkiertem Lyso-Ornithinlipid

Lyso-Ornithinlipid ist eine mögliche Vorstufe bei der Biosynthese von Ornithinlipid, die nur eine Fettsäurekette besitzt. Um Lyso-Ornithinlipid herzustellen, wurde $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat markiertes Ornithinlipid einer milden alkalischen Hydrolyse unterzogen.

Dafür wurde der *S. meliloti*-Wildtyp in TY-Medium mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat, wie unter 2.13.3.2.1 beschrieben, markiert und dünnschichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Das radiomarkierte Ornithinlipid wurde anschließend aus der der HPTLC-Platte gekratzt. Das Kieselgel wurde mit 200 μl Aqua bidest. gevortext und es wurden 600 μl CHCl_3 :MeOH (1:1) sowie 200 μl 1 M KCl/0,2 N H_3PO_4 zugesetzt. Die Suspension wurde für 20 s gevortext und für 10 min bei 6 000 rpm und RT zentrifugiert. Die Chloroformphase (circa 0,3 ml) wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

Für die milde alkalische Hydrolyse wurde Ornithinlipid im Stickstoffstrom getrocknet und durch Vortexen mit 400 μl 0,3 M KOH in MeOH gelöst. Die Mischung wurde bei 37°C für 3 h inkubiert. Die Lipidextraktion erfolgte anschließend mit 400 μl CHCl_3 und 266 μl 1 M KCl/0,2 N H_3PO_4 . Danach wurde die Chloroformphase mit dem Lyso-Ornithinlipid in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.14 Suche nach Ornithinlipid-defizienten Mutanten

Zur Identifizierung von Ornithinlipid-defizienten Mutanten wurden von den mutagenisierten *S. meliloti* G439-Kulturen Verdünnungsreihen mit Saline angefertigt und auf TY/Sm/AEP-Platten ausplattiert. Die Platten wurden für 4 Tage bei 29°C inkubiert. Einzelkolonien der Platten wurden gepickt und flächig (1 cm²) auf TY/Sm-Platten ohne AEP ausgestrichen. Da AEP von Rhizobien aufgenommen und als P-Quelle verwendet werden kann, wird die Bildung von Phosphor-freien Lipiden unterdrückt und eine Selektion von Supressormutanten des *phoCDET*-defizienten Phänotyps verhindert. Gesichert wurden die Einzelkolonien zusätzlich auf TY/Sm-Platten mit 1 mM AEP. Nach 4 Tagen Inkubation bei 29°C wurden die Zellen geerntet und die polaren Lipide nach der Methode von Benning extrahiert (2.13.1). 10 µl des Lipidextraktes wurde auf HPTLC-Dünnschichtplatten aufgetragen und in der ersten Dimension dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (2.13.2). Zur Identifizierung von Ornithinlipid-defizienten Mutanten wurden HPTLC-Platten mit 0,2 % Ninhydrin besprüht (2.13.2).

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von sinorhizobiellen Genen, die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligt sind

Während meiner Diplomarbeit wurden die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqd*-Gene aus *Sinorhizobium meliloti* 1021 teilweise isoliert. Da die DNA-Sequenzen der *sqd*-Gene anderer Bakterien schon bekannt waren, gelang es uns damals mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden das erste Gen eines Operons, welches an der Sulfolipid-Biosynthese in *S. meliloti* 1021 beteiligt ist, zu identifizieren. Das 700 bp große PCR-Produkt wurde in einen Bluescript-Vektor kloniert und ergab das Plasmid pBW1. Das Durchmustern einer lambda-ZAP-Express-Genbank von *S. meliloti* 1021 mit dem Insert von pBW1 führte zur Isolierung des Plasmides pBW9, welches die sinorhizobiellen *sqd*-Gene *sqdB* und *sqdD* vollständig sowie das *sqdC*-Gen partiell enthielt (Abbildung 7).

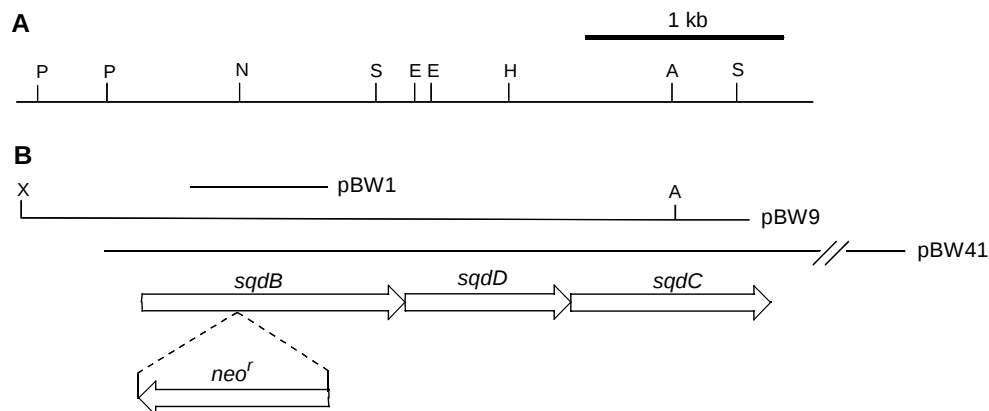


Abb. 7: Karte der genomischen DNA-Region, welche die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqd*-Gene des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps enthält.

A) Restriktionskarte.

B) Lage der vollständigen Offenen Leserahmen der *sqd*-Gene. Die Insertion einer Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette (*neo*) in die *Nco*I-Schnittstelle von *sqdB* ist angedeutet. Restriktionsstellen: A, *Age*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I; X, *Xba*I.

Um die vollständige DNA-Sequenz des gesamten Operons zu erhalten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Cosmid-Genbank von *S. meliloti* 1021 durch Einzelkolonien-Hybridisierung (2.12.8.2) mit dem DIG-markierten Insert von pBW1 durchgemustert. Auf dem erhaltenen Cosmid cosSL1 befand sich das vollständige Operon der drei *sqd*-Gene. Ein 10 kb großer *Pst*I-Subklon (pBW41) des Cosmids cosSL1 enthielt ebenfalls das gesamte Operon. Die DNA-Sequenz des vollständigen Operons wurde bei der internationalen Gendatenbank NCBI hinterlegt (Zugangsnummer AF194444). Der Datenbankeintrag der DNA-Sequenz findet sich im Anhang 7.1.

3.2 Inaktivierung des an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqdB*-Gens

Um nachzuweisen, dass es sich bei den isolierten sinorhizobiellen *sqd*-Genen tatsächlich um Gene handelt, die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligt sind, wurde das *sqdB*-Gen gezielt inaktiviert. Dafür wurde zunächst das Plasmid pBW9 mit *Age*I und *Xba*I gespalten. Das erhaltene 3,3 kb große DNA-Fragment wurde an den Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (2.12.4.3) und in einen, mit *Sma*I gespaltenen pUC19-Vektor kloniert. Das neue Plasmid pBW20 wurde im Offenen Leserahmen von *sqdB* an der Position 635 bp mit *Nco*I gespalten und die 5'-überhängenden Enden wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt. Eine 1,0 kb große Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette wurde mit *Sma*I aus dem Plasmid pTB3131 isoliert und in die *Nco*I-Restriktionsstelle blunt-end ligiert. Eine Restriktionsanalyse des neuen Plasmids pBW22 ergab, dass sich die Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette in entgegengesetzter Orientierung zur Transkriptionsrichtung von *sqdB* befand (Abbildung 7B). Das 4,2 kb große Insert von pBW22 wurde mit *Kpn*I und *Xba*I aus dem Vektor gespalten und in den broad-host-range-Vektor pMP3510 kloniert. Dieses Plasmid (pBW24) wurde anschließend für die "knock-out-Mutagenese" verwendet (2.12.7). Eine nach erfolgreicher "knock-out-Mutagenese" erhaltene *sqdB*-inaktivierte Mutante wurde SLD11 genannt.

Zur Untersuchung der korrekten Insertion des, durch eine Resistenz-Kassette unterbrochenen, *sqdB*-Gens in das *S. meliloti* 1021-Wildtyp-Genom wurden Southern Blots mit einer DIG-markierten *sqdB*-Sonde angefertigt (2.12.8). Dafür wurde die genomische DNA des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 mit *Eco*RI oder *Pst*I gespalten. Weder das *sqdB*-Gen, noch die Neomycin-Phosphotransferase-Kassette besitzen eine *Eco*RI-Schnittstelle. *Pst*I dagegen schneidet zwar in der 1,0 kb

großen Neomycin-Phosphotransferase-Kassette, nicht jedoch in *sqdB*. Das Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung ist in Abbildung 8 dargestellt. Als Sonde wurde das 0,7 kb große Insert von pBW1 verwendet.

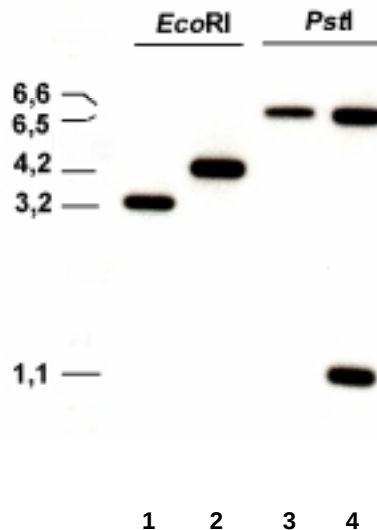


Abb. 8: Autoradiogramm der DIG-markierten Southern-Hybridisierung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11. Spur 1: Wildtyp-DNA/*EcoRI*-verdaut; Spur 2: SLD11-DNA/*EcoRI*-verdaut; Spur 3: Wildtyp-DNA/*PstI*-verdaut; Spur 4: SLD11-DNA/*PstI*-verdaut. Die ungefähren Fragmentgrößen (kb) sind angedeutet.

Wie erwartet ergab die Southern-Hybridisierung der mit *EcoRI* gespaltenen genomischen DNA der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 ein 1,0 kb größeres Fragment als beim Wildtyp (4,2 kb statt 3,2 kb). Bei der mit *PstI* gespaltenen genomischen DNA hybridisierte beim Wildtyp ein 6,6 kb großes Fragment, bei der Mutante SLD11 hybridisierten zwei Fragmente, die zusammen 7,6 kb ergaben. Die erfolgreiche *sqdB*-Inaktivierung konnte damit bestätigt werden.

3.3 Lipid-Phänotyp der *sqdB*-inaktivierten Mutante SLD11

Für die Untersuchung des Lipid-Phänotyps der *sqdB*-inaktivierten Mutante SLD11 wurden der Wildtyp und die Mutante, wie unter 2.13.3.2.1 beschrieben, mit [1-¹⁴C]-Acetat markiert. Dafür wurden der *S. meliloti* 1021-Wildtyp und die Mutante SLD11 in Minimalmedium mit hohen oder niedrigen

Konzentrationen an anorganischem Phosphat angezogen. Die Phosphatkonzentration für das Hochphosphat-Medium betrug 1,3 mM und ist ausreichend für ein normales Wachstum der Bakterien. Das Niedrigphosphat-Medium enthielt eine 65-fach geringere Phosphatkonzentration (0,02 mM), welche für *S. meliloti* 1021 wachstumslimitierend ist. In einer zweiten Passage wurden je 1 ml der Bakterienkulturen mit [1- 14 C]-Acetat markiert. Nach 24 Stunden wurden die Bakterien geerntet und die Lipide wurden nach der Methode von Bligh & Dyer (2.13.1) extrahiert und anschließend dünn-schichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt (2.13.2). Die Autoradiogramme der radiomarkierten Membranlipide sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

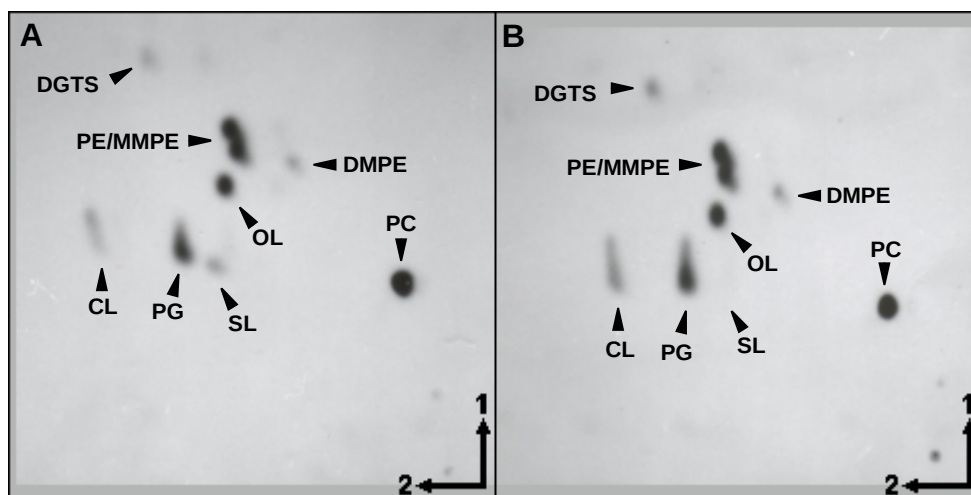


Abb. 9: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps (A) und der *sqdB*-inaktivierte Mutante SLD11 (B) nach Wachstum der Stämme in Medien mit hohen (1,3 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat. Die Membranlipide Cardiolipin (CL), Dimethyl-Phosphatidylethanolamin (DMPE), Diacylglycerol-N, N, N-Trimethylhomoserin (DGTS), Monomethyl-Phosphatidylethanolamin (MMPE), Ornithinlipid (OL), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Sulfolipid (SL) sowie die Laufrichtungen in der ersten (1) und der zweiten (2) Dimension sind angedeutet.

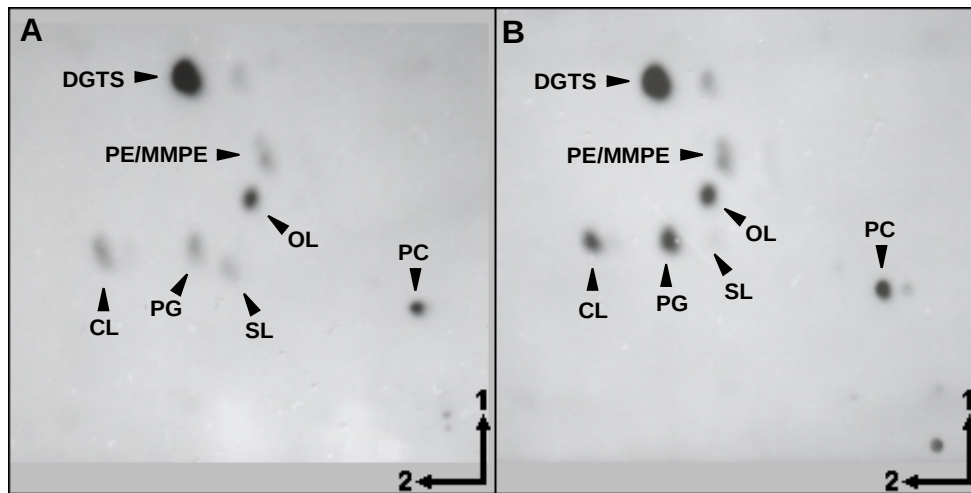


Abb. 10: Zweidimensionale dünnenschichtchromatographische Auftrennung der [1-¹⁴C]-Acetat-markierten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps (A) und der *sqdB*-inaktivierten Mutante SLD11 (B) nach Wachstum der Stämme in Medien mit niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat.

Unabhängig davon, ob die *sqdB*-inaktivierte Mutante SLD11 in Medien mit hohen oder niedrigen Konzentrationen an anorganischem Phosphat gewachsen war, konnte auf den Autoradiogrammen der Mutante kein Sulfolipid-Signal mehr nachgewiesen werden. Sie wurde deshalb als Sulfolipid-defiziente Mutante SLD11 bezeichnet.

3.4 [³⁵S]-Sulfat-Markierung der *sqdB*-inaktivierten Mutante SLD11

Sulfolipide enthalten eine Sulfonatgruppe und können daher durch [^{35}S]-Sulfat-Markierungen nachgewiesen werden. Für diese Nachweisreaktion wurden der *S. meliloti* 1021-Wildtyp und die *sqdB*-inaktivierte Mutante SLD11 wie unter 2.13.3.1 beschrieben in modifiziertem Minimalmedium angezogen und mit [^{35}S]-Sulfat markiert. Am nächsten Tag wurden die Lipidextrakte nach der Methode von Bligh & Dyer extrahiert und dünn-schichtchromatographisch in einer Dimension aufgetrennt (2.13.2). Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 140 ml Chloroform, 60 ml Methanol und 10 ml Wasser verwendet. Das Autoradiogramm der Dünnschichtplatte ist in der Abbildung 11 dargestellt.

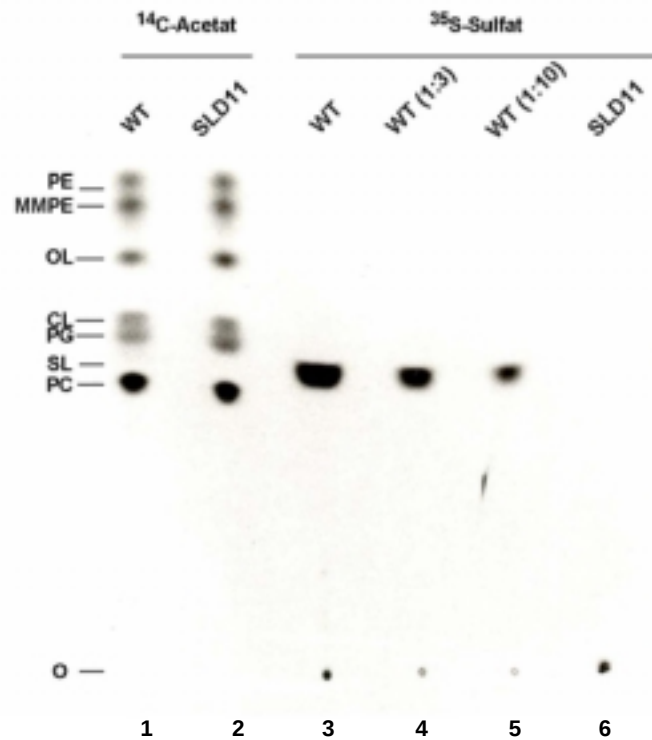


Abb. 11: Autoradiogramm der dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der *sqdB*-inaktivierten Mutante SLD11. Spur 1: WT, [^{14}C]-Acetat-markiert; Spur 2: SLD11, [^{14}C]-Acetat-markiert; Spur 3: WT, [^{35}S]-Sulfat-markiert (unverdünnter Extrakt); Spur 4: WT, [^{35}S]-Sulfat-markiert (1:3 verdünnter Extrakt); Spur 5: WT, [^{35}S]-Sulfat-markiert (1:10 verdünnter Extrakt); Spur 6: SLD11, [^{35}S]-Sulfat-markiert (unverdünnter Extrakt). O, Startpunkt.

Beim Vergleich [^{14}C]-Acetat-markierter Lipide des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der *sqdB*-inaktivierten Mutante SLD11 (Spur 1 und 2) war nur bei den Wildtyp-Lipidextrakten ein schwaches Sulfolipid-Signal zu erkennen. Das [^{35}S]-Sulfat-markierte Sulfolipid lief beim Wildtyp (Spur 3, 4 und 5) auf der gleichen Höhe, wie bei den [^{14}C]-Acetat-markierten Wildtyp-Lipidextrakten. Für die *sqdB*-inaktivierte Mutante SLD11 (Spur 6) konnte auch durch diese, für Sulfolipid spezifische und empfindliche Nachweismethode kein Sulfolipid-Signal festgestellt werden.

3.5 Membranlipidzusammensetzung der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 im Vergleich zum Wildtyp

Der Defekt in der Sulfolipid-Biosynthese bei der *sqdB*-inaktivierten Mutante SLD11 sollte sich auf die Zusammensetzung der Membranlipide im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp auswirken. Da *S. meliloti* Sulfolipid vor allem unter Phosphatstress bildet, wurde die Membranlipidzusammensetzung auch unter diesen Bedingungen bestimmt. Dafür wurden der *S. meliloti* 1021-Wildtyp und die Sulfolipid-defiziente Mutante SLD11 in Minimalmedium mit hohen oder niedrigen Konzentrationen an anorganischem Phosphat angezogen. In einer zweiten Passage wurden je 1 ml der Bakterienkulturen mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat markiert. Nach 24 Stunden wurden die Bakterien geerntet. Die Lipide wurden anschließend nach der Methode von Bligh & Dyer extrahiert und dünnschichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Quantifizierung der einzelnen Lipide erfolgte wie unter 2.13.3.3 beschrieben. Bei dieser Methode wird der Einbau von $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat gleichgesetzt mit der Synthese der jeweiligen Membranlipide (% Gesamt- ^{14}C). Die Mittelwerte von jeweils drei voneinander unabhängigen Messungen sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tab.: 4 Membranlipidzusammensetzung (% Gesamt- ^{14}C) des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 nach Wachstum in Minimalmedium mit hohen (1,3 mM) oder niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat.

Lipid	Membranlipidzusammensetzung (% Gesamt- ^{14}C)			
	Hochphosphat-Medien		Niedrigphosphat-Medien	
	WT ^a	SLD11 ^a	WT ^a	SLD11 ^a
PG	11,7±0,3	12,8±0,8	4,2±0,3	10,4±0,6
CL	4,2±1,1	4,1±0,7	5,3±0,7	6,0±0,8
PE/MMPE/DMPE	22,8±3,3	20,6±1,0	5,4±0,3	5,0±1,8
PC	46,5±3,3	49,7±0,3	6,2±0,6	10,1±1,1
SL	2,2±0,2	n. n. ^b	3,2±0,1	n. n. ^b
OL	10,1±0,4	10,0±0,7	8,6±3,3	8,9±0,4
DGTS	2,5±0,7	2,7±0,3	67,1±3,0	59,5±3,5

^aDie dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

^bn.n., nicht nachweisbar.

Bei der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 konnte weder unter normalen, noch unter wachstumslimitierenden Bedingungen eine Sulfolipidbildung nachgewiesen werden. Unter Hochphosphat-Bedingungen wurden dafür bei der Mutante die prozentualen Anteile von PC und PG leicht erhöht.

In Medien mit einem wachstumslimitierenden Gehalt an Phosphat bildete der Wildtyp fast 1,5-mal mehr Sulfolipid als unter normalen Wachstumsbedingungen. Unter diesen Bedingungen synthetisierte die Sulfolipid-defiziente Mutante SLD11 fast 3-mal so viel PG wie der Wildtyp. Gleichzeitig stieg auch der Gehalt an PC auf das 1,6-fache an, während der Anteil an DGTS leicht verringert wurde. Die Anteile der anderen Membranlipide zeigten bei der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 im Vergleich zum Wildtyp keine auffälligen Veränderungen.

3.6 Funktionsanalysen der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11

3.6.1 Wachstum von SLD11 in Hoch- und Niedrigphosphat-Medien

Für die Untersuchung des Wachstums der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 im Vergleich zum Wildtyp wurden Wachstumskurven von beiden Stämmen erstellt. Die Stämme wurden dafür in Minimalmedium mit hohen oder niedrigen Konzentrationen an anorganischem Phosphat (Pi) angezogen und die Zelldichten der Kulturen wurden alle zwei Stunden, wie unter 2.3.3 beschrieben, mit dem Photometer bestimmt. Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden die Mittelwerte der optischen Dichten aus je drei voneinander unabhängigen Messwerten errechnet und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 12).

Das Wachstum der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 setzte sowohl in Medien mit ausreichend verfügbarem, als auch in Medien mit einem wachstumslimitierenden Gehalt an Phosphat mit einer geringen Verzögerung im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp ein. Nach dieser längeren Anlaufphase wuchs die Mutante aber genauso schnell wie der Wildtyp.

So betrugen die Verdopplungszeiten (Generationszeiten) für die exponentielle Wachstumsphase sowohl für den Wildtyp, als auch für die Sulfolipid-defiziente Mutante SLD11 3,4 h auf Hochphosphat-Medien und 7,7 h auf Niedrigphosphat-Medien. Beide Stämme erreichten nach 21 h in Hochphosphat bzw. 33 h in Niedrigphosphat die stationäre Phase mit der jeweils gleichen End-OD.

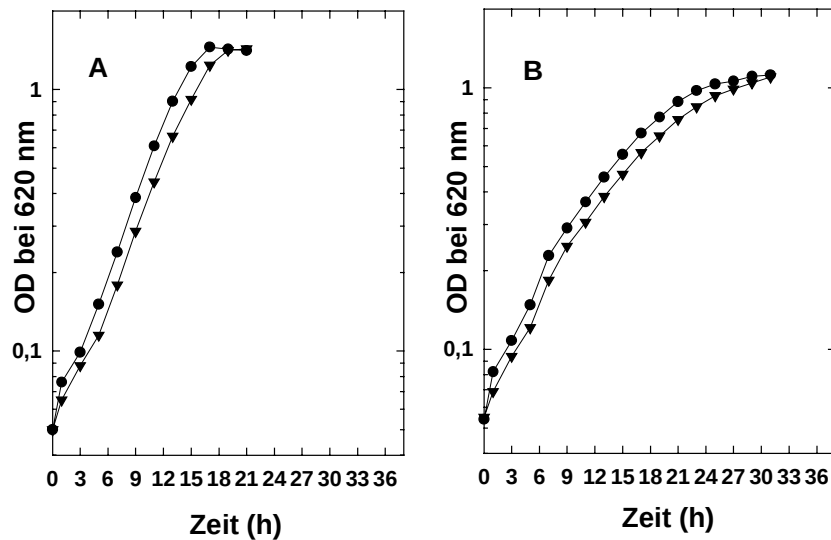


Abb. 12: Wachstum von *Sinorhizobium meliloti* 1021 in Abhängigkeit von der Zeit. Halblogarithmische Darstellung. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Messwerten. Die Fehlerbalken waren kleiner als die Symbole und wurden deshalb nicht dargestellt.

- A) *S. meliloti* 1021-Wildtyp (●) und Sulfolipid-defiziente Mutante SLD11 (▼) nach Wachstum in Minimalmedium mit hohen (1,3 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat (Pi).
 B) *S. meliloti* 1021-Wildtyp (●) und Sulfolipid-defiziente Mutante SLD11 (▼) nach Wachstum in Minimalmedium mit niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat (Pi).

Die Wachstumsdichten aller Stämme waren, wie erwartet, in Niedrigphosphat-Medien reduziert, aber unter den gewählten Bedingungen konnte außer einer leicht verzögerten Anlaufphase der Mutante kein signifikanter Unterschied im Wachstum zwischen dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 festgestellt werden.

3.6.2 Wurzelknöllchensymbiose von SLD11

Zur Überprüfung der Symbiosefähigkeit der Sulfolipid-defizienten Mutante wurden Keimlinge von *Medicago sativa* (Alfalfa) mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp und der Mutante SLD11 inokuliert. Die Bakterien wurden in Mini-

malmedium mit einer normalen Konzentration (1,3 mM) an anorganischem Phosphat angezogen. Als Kontrolle diente steriles Minimalmedium. Die Wurzelknöllchentests wurden, wie unter 2.6 beschrieben, auf Jensen-Agar durchgeführt. Die Knöllchenbildung, der auf Fensterbank angezogenen Pflanzen, wurde alle 5 Tage kontrolliert. Es wurden zwei voneinander unabhängige Wurzelknöllchentest durchgeführt. Die Ergebnisse der Einzelwerte sind im Anhang 7.4 aufgelistet. Die Mittelwerte von jeweils 6 Pflanzen, die entweder mit dem Wildtyp oder mit der Sulfolipid-defizienten Mutanten SLD11 inokuliert worden waren, sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Wurzelknöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 auf Alfalfa-Wurzeln.

Tage ^a	Durchschnittliche Knöllchen pro Pflanze			
	Experiment 1		Experiment 2	
	WT ^b	SLD11 ^b	WT ^b	SLD11 ^b
5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
10	0,7±0,8	0,3±0,8	1,2±0,5	0,3±0,5
15	1,0±0,8	1,0±0,9	1,5±1,0	1,3±1,2
20	1,3±1,2	1,8±0,8	3,0±0,8	2,3±2,3
25	1,3±1,2	2,0±0,6	3,0±0,9	2,7±2,7
30	1,7±1,2	2,0±0,6	3,2±1,0	3,5±2,5
35	2,3±1,6	2,0±0,6	3,2±1,0	3,5±2,5
40	2,5±1,9	2,0±0,6	3,2±1,0	3,5±2,5
45	2,5±2,1	2,0±0,5	—	—

^aDer Zeitraum in Tagen beschreibt die Zeit nach der Inokulation der Wurzeln mit Bakterien.

^bDie Werte sind Mittelwerte von jeweils 6 Pflanzen ± Standardabweichung.

Pflanzen, die mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp oder mit der Mutante SLD11 inokuliert worden waren, bildeten nach etwa 10 Tagen Wurzelknöllchen und blieben über den ganzen Testzeitraum hinweg grün. Im Gegensatz dazu konnte bei den mit sterilen Minimalmedium inokulierten Pflanzen (Kontrollpflanzen) keine Wurzelknöllchenbildung festgestellt werden. Die Kontrollpflanzen blieben nach einiger Zeit im Wachstum zurück und bekamen auf Grund von Stickstoffmangel gelb gefärbte Blätter. Die gebildeten Wurzelknöllchen waren, sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutante, rötlich gefärbt. Da bei der Stickstoff-Fixierung rotfarbenes Leghämoglobin gebildet wird, kann man davon ausgehen, dass die Voraussetzungen für eine effiziente Stickstoff-Fixierung bei der Mutante ebenfalls vorhanden waren. Auch in der Knöllchenbildungskinetik gab es zwischen

dem Wildtyp und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 keinen signifikanten Unterschied. Die Anzahl der gebildeten Wurzelknöllchen pro Pflanze nach 40 bzw. 45 Tagen war bei beiden Stämmen nahezu identisch.

3.7 Isolierung von *Sinorhizobium meliloti*-Mutanten mit defizienter Ornithinlipid-Biosynthese

3.7.1 MNNG-Mutagenese von *Sinorhizobium meliloti* G439

Zur Erzeugung von Ornithinlipid-defizienten Mutanten wurde der Stamm *S. meliloti* G439 mit 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG) wie unter 2.5 beschrieben mutagenisiert. MNNG methyliert Guanin an der O⁶-Position, wodurch Guanin mit Thymin, anstatt mit Cytosin paart (Günther, 1991). Der Stamm G439 repräsentiert *phoCDET*-Mutanten, die auf Vollmedium etwa 8-mal so viel Ornithinlipid wie der Wildtyp synthetisieren. Für die Überprüfung der Mutagenese-Effizienz wurden die beiden Parameter Überlebensrate und Rifampicin-Resistenz bestimmt (Tabelle 6).

Tab. 6: Überlebensrate und Rifampicin-Resistenz der mutagenisierten *Sinorhizobium meliloti* G439-Kulturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Mutagen.

Inkubationszeit [min]	Überlebensrate [%]	Anteil Rifampicin- resistenter Mutanten
0	100	$5,7 \times 10^{-6}$
30	0,424	$6,2 \times 10^{-5}$
60	0,014	$5,2 \times 10^{-5}$
90	0,004	$1,3 \times 10^{-5}$
120	0,001	$5,0 \times 10^{-7}$

Optimal für eine hohe Mutantenausbeute ist eine hohe Abtötungsrate in Kombination mit einem stark erhöhten Anteil Rifampicin-resistenter Mutanten. Für die nachfolgende Suche nach Ornithinlipid-defizienten Mutanten wurden Populationen verwendet, die 60 und 90 min mit MNNG behandelt worden waren.

3.7.2 Identifizierung von Ornithinlipid-defizienten Mutanten

Die Suche und Identifizierung von Ornithinlipid-defizienten Mutanten wurde wie unter 2.14 beschrieben durchgeführt. Von insgesamt 1 000 untersuchten Kolonien zeigten die Mutanten BW103, BW873 und BW908 einen Ornithinlipid-defizienten Phänotyp.

Zur Überprüfung des Ornithinlipid-Biosynthese-Defekts wurden die Mutanten in TY-Medium mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat markiert. Die Lipide wurden nach der Methode von Bligh & Dyer extrahiert und anschließend dünnschichtchromatographisch in einer Dimension aufgetrennt. Auf dem Autoradiogramm der Dünnschichtplatte war im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp und zum Stamm G439 bei keiner der Mutanten ein Ornithinlipid-Signal mehr sichtbar (Abbildung 13).

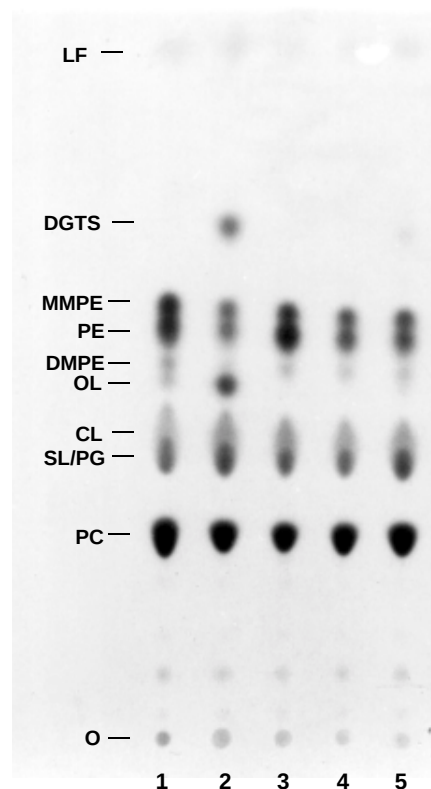


Abb. 13: Autoradiogramm der dünnschichtchromatographisch aufgetrennten $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat-markierten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps, des Stammes G439 und der Ornithinlipid-defizienten Mutanten BW103, BW873 und BW908.

Spur 1: WT; Spur 2: G439; Spur 3: BW103; Spur 4: BW873; Spur 5: BW908. O, Startpunkt, LF, Laufmittelfront.

3.8 Genetische Komplementierung der Ornithinlipid-defizienten Mutanten

3.8.1 Komplementierung der Mutanten mit einer sinorhizobiellen Genbank

Zur Identifizierung der an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Gene wurde die Ornithinlipid-defiziente Mutante BW103 mit einer sinorhizobiellen Cosmidbank mittels Drei-Punkt-Kreuzung komplementiert (2.11 und 2.12.7.1). Insgesamt wurden 600 Einzelkolonien der Kreuzung auf Rekonstitution des Wildtyp-Phänotyps hin untersucht. Bei der Exkonjuganten 553 war der Defekt in der Ornithinlipid-Biosynthese wieder behoben. Das komplementierende Cosmid cosOL553 wurde aus der Exkonjuganten 553 isoliert (2.12.1.2) und in *E. coli* transformiert (2.12.6.2). Einkreuzungen des Cosmids cosOL553 in die Ornithinlipid-defizienten Mutanten BW873 und BW908 führten ebenfalls zur Wiederherstellung der Ornithinlipid-Biosynthese in diesen Stämmen.

3.8.2 Subklonale Komplementierung von BW103 und BW908

Zur Einschränkung der komplementierenden DNA-Region wurde das Cosmid cosOL553 in kleinere Stücke kloniert (subkloniert). Dafür wurde das circa 25,5 kb große Insert des Cosmids cosOL553 mit *Bam*HI und *Pst*II gespalten und die DNA-Fragmente wurden in Klonierungs- und broad-host-range-Vektoren eingefügt.

Mittels Drei-Punkt-Kreuzung wurden die Subklone auf Komplementierung von BW103 hin untersucht. Der *Pst*II-Subklon pBW31 mit einem circa 6 kb großen Insert konnte die Ornithinlipid-Biosynthese bei der Mutante BW103 wieder herstellen. Da das Insert immer noch zu groß für eine Sequenzierung war, wurde es erneut subkloniert. Der *Pst*II/*Xho*I-Subklon pBW35 mit einem 2,6 kb großen Insert konnte ebenfalls die Ornithinlipid-defiziente Mutante BW103 komplementieren. Auch die Ornithinlipid-defiziente Mutante BW908, nicht jedoch die Ornithinlipid-defiziente Mutante BW873, konnte mit pBW35 komplementiert werden.

3.8.3 Subklonale Komplementierung von BW803

Da die Ornithinlipid-defiziente Mutante BW873 mit cosOL553, aber nicht mit dem Plasmid pBW35 komplementierbar war, musste eine andere DNA-Region des Cosmids den Defekt in der Ornithinlipid-Biosynthese bei BW873 beheben können. Die Einkreuzung weiterer Subklone von cosOL553 in die Mutante BW873 führte zu einem *Pst*I-Subklon (pBW66), dessen 4,1 kb großes Insert die Ornithinlipid-Biosynthese in BW873 wiederherstellen konnte.

3.9 Sequenzierung der komplementierenden DNA-Bereiche

3.9.1 Sequenzierung von pBW33 und Teilsequenzierung von pBW25

Zur Identifizierung der an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Gene wurde das komplementierende Insert von pBW35 mit *Pst*I/*Xho*I in einen pBluescript-Vektor umklontiert (pBW33) und mittels Primerwalk doppelsträngig sequenziert (2.12.10). Da ein Offener Leserahmen nicht vollständig auf dem Insert von pBW33 vorhanden war, wurde das Plasmid pBW25, dessen Insert eine überlappenden DNA-Region mit pBW33 besitzt, ansequenziert. Die verwendeten Primer sind unter 2.10 aufgelistet. Der sequenzierte Bereich ist in Abbildung 14B dargestellt.

3.9.2 Sequenzierung von pBW65

Das Insert von pBW66 wurde mit *Pst*I in einen pUC19-Vektor umklontiert und anschließend teilweise sequenziert. Die verwendeten Primer finden sich unter Punkt 2.10. Da mittlerweile das Genomprojekt von *S. meliloti* 1021 weit fortgeschritten war, wurde ein Teil der Sequenz vom Konsortium des Genomprojekts zur Verfügung gestellt (2.12.11).

3.10 Genetische Kartierung der komplementierenden Bereiche

3.10.1 Identifizierung der Offenen Leserahmen von pBW25 und pBW33

Die Sequenzierung des gesamten Inserts von pBW33 (2,6 kb) und weiteren 300 bp von pBW25 führte zu einer Gesamtsequenz von 2 844 bp. Die DNA-

Sequenz wurde bei der internationalen Gendatenbank NCBI hinterlegt (Zugangsnummer AF232919). Der Datenbankeintrag der DNA-Sequenz befindet sich im Anhang 7.2.

Eine Analyse der DNA-Sequenz mit dem Programm ORF-Finder von NCBI ergab zwei partielle und drei vollständige Offene Leserahmen (ORFs) (siehe Abbildung 14B). Zur Überprüfung der Wahrscheinlichkeit dieser Offenen Leserahmen wurde das Programm Frameplot verwendet (2.12.11).

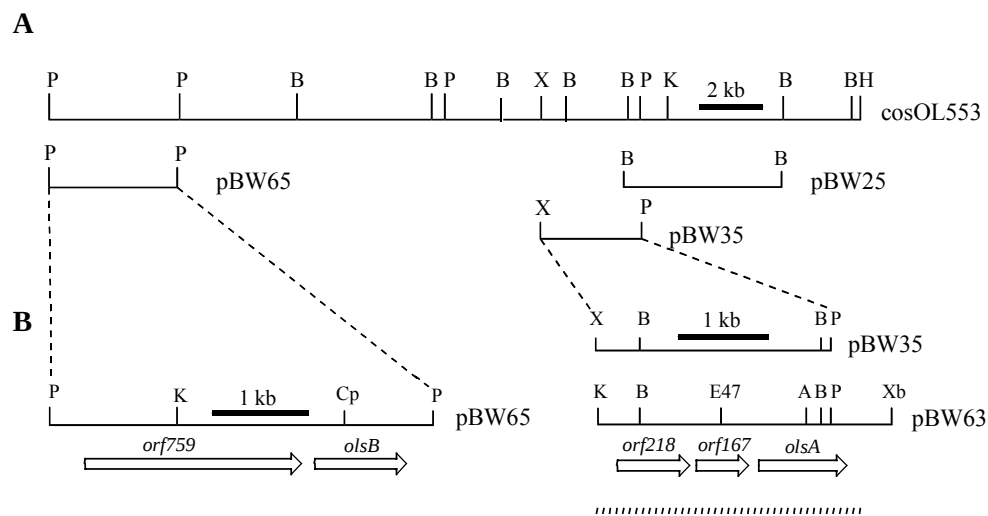


Abb. 14: A) Physikalische Restriktionskarte des Cosmids cosOL553, welches die Ornithinlipid-defizienten Mutanten BW103, BW873 und BW908 komplementiert.

B) Lage der vollständigen Offenen Leserahmen von pBW65 und pBW25/pBW33. Der sequenzierte Bereich ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Restriktionsstellen: A, *AgeI*; B, *BamHI*; Cp, *CpoI*; E47, *Eco47III*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; P, *PstI*; X, *XhoI*; Xb, *XbaI*.

3.10.2 Identifizierung der Offenen Leserahmen von pBW65

Die DNA-Sequenz des 4 125 bp großen Inserts von pBW65 ist im Detail im Anhang 7.3 aufgeführt. Auf der DNA-Sequenz befanden sich ein partieller und zwei vollständige Offene Leserahmen (Abbildung 14B). Zur Überprüfung der Wahrscheinlichkeit dieser Offenen Leserahmen wurde ebenfalls das Programm Frameplot verwendet.

3.11 Vergleich der Sequenzen mit Datenbankeinträgen

3.11.1 Analyse der Offenen Leserahmen von pBW33 und pBW25

Genbanksuchen mit dem NCBI BLAST-Programm (2.12.11) ergaben für den ersten unvollständigen ORF (Position 1 bis 94 bp) von pBW63 Homologien zum NifU-Protein von *Anabaena* sp. L31 (P33179) (44 % Aminosäuren-Identität).

Der erste vollständige ORF (Position 431 bis 1090 bp) codiert für ein Protein von 218 Aminosäuren, welches Ähnlichkeiten zu einer O-Sialoglycoprotein-Endopeptidase von *Pasteurella haemolytica* (P36175) (29 % Aminosäuren-Identität) und zu einer hypothetischen Alaninacyltransferase des Ribosomalproteins S18 der 30 S-Untereinheit von *Mycobacterium leprae* (Q49857) (34 % Aminosäuren-Identität) zeigt.

Der zweite vollständige ORF (Position 1142 bis 1648 bp) codiert für ein Protein mit 167 Aminosäuren und besitzt Homologien zur Peptid-N-Acetyltransferase RimI von *Escherichia coli* (S56597) (32 % Aminosäuren-Identität). RimI ist verantwortlich für eine Acetylierung am N-Terminus des ribosomalen Proteins S18 (Yoshikawa *et al.*, 1987).

Der dritte vollständige ORF (Position 1765 bis 2646 bp) codiert für ein Protein von 292 Aminosäuren und besitzt Homologien zur 1-Acyl-sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase NlaA von *Neisseria gonorrhoeae* (Q59601) (31 % Aminosäuren-Identität) und zur putativen 1-Acyl-sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase PlsC von *Burkholderia pseudomallei* (AAD05452) (34 % Aminosäuren-Identität). Bei *N. gonorrhoeae* katalysiert NlaA die Konversion von Lyso-Phosphatidsäure zu Phosphatidsäure (sn-Glycerol-3-Phosphorsäure) (Swartley *et al.*, 1995).

Der zweite unvollständige ORF (Position 2693 bis 2844 bp) codiert für eine Aminosäuresequenz, die Homologien zum *miaA*-Genprodukt von *Salmonella typhimurium* (CAB62263) (58 % Aminosäuren-Identität) zeigt. MiaA ist an der Methylthiolierung von Isopentenylierten A37-Derivaten der tRNA beteiligt (Esberg *et al.*, 1999). Zudem besitzt der zweite unvollständige ORF Homologien zu einer Reihe hoch konservierter Enzyme unbekannter Funktion bei verschiedenen Bakterien.

3.11.2 Analyse der Offenen Leserahmen von pBW65

Das NCBI BLAST-Programm ermittelte für den ersten vollständigen ORF (Position 346 bis 2625 bp) ein Protein mit 759 Aminosäuren, welches Homologien zu einem Zwei-Komponenten-Sensor aus *Pseudomonas aerugi-*

nosa (AAB86557) (30 % Aminosäuren-Identität) und aus *Escherichia coli* (P26607) (27 % Aminosäuren-Identität) besitzt. Bei *E. coli* gehört dieses Sensor-Regulator-Protein zu einer Familie von Signaltransduktionsproteinen, die an osmoregulatorischen Prozessen des Bakteriums beteiligt sind (Nagasawa *et al.*, 1992).

Der zweite vollständige ORF (Position 2743 bis 3720 bp) codiert für ein Protein mit 325 Aminosäuren und zeigt Homologien zu dem hypothetischen Protein SCM10.10c von *Streptomyces coelicolor* (CAB63170.1) (37 % Aminosäuren-Identität) und zu dem hypothetischen Protein Rv3027c von *Mycobacterium tuberculosis* (F70858) (36 % Aminosäuren-Identität).

Stromabwärts vom zweiten vollständigen ORF befindet sich ein partieller ORF (Position 3847 bis 4125 bp), der eine 100%-ige Übereinstimmung mit dem NADP-abhängigen Malat-Enzym von *S. meliloti* 1021 (AAB82460) besitzt. Malat-Enzym konvertiert Malat zu Pyruvat unter Decarboxylierung bei gleichzeitiger Reduktion des Nicotinamid-Cofaktors (Voegelé *et al.*, 1999).

3.12 Analyse der Genprodukte

3.12.1 Analyse von OlsA

Die Ähnlichkeit des dritten vollständigen Offenen Leserahmens von pBW33 zu einer 1-Acyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase verwies auf die gesuchte sinorhizobielle O-Acyltransferase, welche die Konvertierung von Lyso-Ornithinlipid zu Ornithinlipid katalysieren sollte (hypothetische Ornithinlipid-Biosynthese siehe Abbildung 6). Da dieser Offene Leserahmen wahrscheinlich an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligt ist, wurde das Gen als *olsA*, sein Genprodukt entsprechend als OlsA bezeichnet.

OlsA besitzt mit 292 Aminosäuren ein theoretisches Molekulargewicht von 32 kDa und einen theoretischen pI-Wert von 11,0. Sekundäre Strukturvorhersagen auf zwei verschiedenen Servern (SOSUI und Embnet, 2.12.11) ergaben, dass es sich bei OlsA um ein Membranprotein mit zwei Transmembran-Helices handelt. Die erste Transmembran-Helix reicht von Aminosäure 7 bis 29, die zweite Transmembran-Helix reicht nach Angaben von SOSUI von Aminosäure 68 bis 90, nach Embnet-Angaben von Aminosäure 76 bis 94.

3.12.2 Analyse von OlsB

Der zweite vollständige Offene Leserahmen von pBW65 zeigte zwar keine Ähnlichkeiten zu einem Enzym, dessen Funktion bekannt war, aber er besaß Homologien zu Proteinen der Ornithinlipid-synthetisierenden Bakterien *Streptomyces coelicolor* und *Mycobacterium tuberculosis*.

Davon ausgehend, dass es sich bei diesem Offenen Leserahmen von 325 Aminosäuren um die gesuchte *N*-Acyltransferase handelt, die bei der hypothetischen Ornithinlipid-Biosynthese die Amidbindung zwischen Ornithin und einer β -Hydroxyfettsäure katalysieren sollte, wurde das Gen als *olsB*, das Genprodukt als OlsB bezeichnet. OlsB hat ein theoretisches Molekulargewicht von 36 kDa und einen theoretischen pI-Wert von 8,8. Im Gegensatz zu OlsA scheint OlsB ein cytosolisches Protein zu sein.

3.13 Identifizierung der Punktmutationen in BW103 und BW908

Für die Untersuchung, welche Punktmutationen bei den chemischen Ornithinlipid-Mutanten BW103 und BW908 zum Defekt in der Ornithinlipid-Biosynthese führten, wurde der Offene Leserahmen *olsA* und je 100 Basenpaar stromauf- und stromabwärts davon von der genomischen DNA der beiden Mutanten mit *Pfu*-Polymerase und den Primern oTBC483 und oTBC484 (2.10) amplifiziert. Die circa 1,0 kb großen PCR-Produkte wurden in einen, mit *SmaI* geschnittenen pUC19-Vektor blunt-end kloniert und ergaben die Plasmide pBW81 und pBW82, deren Inserts doppelsträngig sequenziert wurden. Die Sequenzierungsprimer sind unter 2.10 aufgeführt. Ein Vergleich der amplifizierten *olsA*-Sequenzen mit der *olsA*-Sequenz des *S. meliloti* 1021-Wildtyps ergab, dass bei der Ornithinlipid-defizienten Mutante BW103 die Base Guanin an der Position 1893 der bei NCBI abgelegten Sequenz (Zugangsnummer: AF232919) durch ein Adenin ersetzt worden war. Das Original-Codon für W (Tryptophan) wurde dadurch an der Aminosäureposition 43 des *olsA*-Genprodukts zum Stopcodon. Bei der Ornithinlipid-defizienten Mutante BW908 wurde Guanin an der Position 1796 der bei NCBI abgelegten Sequenz gegen ein Adenin ausgetauscht. Dies führte zur Veränderung der Aminosäure G (Glycin) zur Aminosäure D (Asparaginsäure) an der Position 11 des *olsA*-Genprodukts. Sekundäre Strukturvorhersagen auf dem Embnet-Server (2.12.11) ergaben, dass bei OlsA von BW908 die erste Transmembran-Helix nur von Aminosäure 13 bis 29, anstatt von Aminosäure 7 bis 29 wie beim Wildtyp-OlsA, reicht. Somit scheint die erste OlsA-Transmembran-Helix bei der Ornithinlipid-defizienten Mutante BW908 nicht mehr komplett ausgebildet zu werden.

3.14 Inaktivierung von Offenen Leserahmen, die an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligt sein könnten

3.14.1 Inaktivierung von *olsA*

Zur Überprüfung der Funktion von *olsA* und zur Erzeugung einer Ornithinlipid-defizienten Mutante im Wildtyp von *S. meliloti* 1021, wurde *olsA* durch "knock-out-Mutagenese" gezielt im Gen unterbrochen. Dafür wurde der gesamte DNA-Bereich, der die drei vollständigen Offenen Leserahmen von pBW25 und pBW33 enthielt, mit *Pfu*-Polymerase und den Primern oTBC477 und oTBC478 (2.10) amplifiziert. Das erhaltene, 3,2 kb große PCR-Produkt wurde an den, durch die Primer eingefügten Restriktionsstellen *KpnI* und *XbaI* gespalten und in einen pUC19-Vektor kloniert. Das neue Plasmid pBW63 wurde im Offenen Leserahmen von *olsA* mit *AgeI* an der Position 364 bp gespalten, und die 5'-überhängenden Enden wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt.

Eine 1,0 kb große Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette wurde mit *SmaI* aus dem Plasmid pTB3131 isoliert und anschließend in die *AgeI*-Restriktionsstelle blunt-end ligiert. Die darauf folgende Restriktionsanalyse des neuen Plasmides pBW70 ergab, dass sich die eingefügte Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette in entgegengesetzter Orientierung zur Transkriptionsrichtung von *olsA* befand (siehe Abbildung 15). Das nun 4,2 kb große Insert von pBW70 wurde anschließend mit *KpnI* und *XbaI* in den broad-host-range-Vektor pMP3510 kloniert und ergab das Plasmid pBW75. Mit diesem Plasmid wurde die "knock-out-Mutagenese" (2.12.7) durchgeführt.

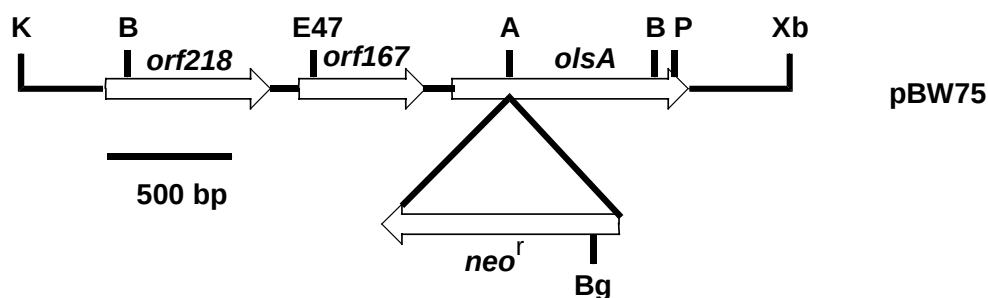


Abb. 15: Lage der Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette (*neo*) im *olsA*-Gen. Restriktionsstellen: A, *AgeI*; B, *BamHI*; Bg, *BglIII*; E47, *Eco47III*; K, *KpnI*; P, *PstI*; Xb, *XbaI*.

Eine nach erfolgreicher "knock-out-Mutagenese" erhaltene *olsA*-inaktivierte Mutante wurde ORLD1 genannt.

Zur Untersuchung der korrekten Insertion des, durch eine Resistenz-Kassette unterbrochenen, *olsA*-Gens in das Wildtyp-Genom wurde eine Southern-Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde durchgeführt (2.12.8, Abbildung 16). Dafür wurde die genomische DNA des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der Mutante ORLD1 mit *Bam*HI und *Pst*I gespalten. Das Restriktionsenzym *Bam*HI schneidet weder in *olsA*, noch im Neomycin-Phosphotransferase-Gen. *Pst*I dagegen schneidet im 1,0 kb großen Neomycin-Phosphotransferase-Gen, jedoch nicht in *olsA*. Als Sonde für den Southern Blot wurde ein 1,9 kb großes *Bam*HI-Fragment aus pBW63 verwendet (siehe Abbildung 15).

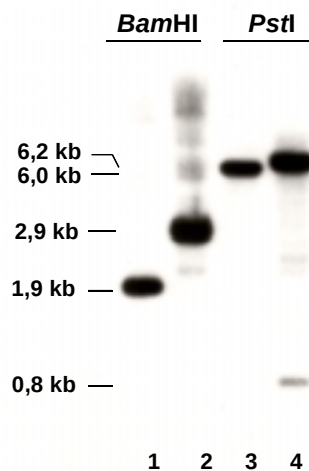


Abb. 16: Autoradiogramm der DIG-markierten Southern-Hybridisierung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der *olsA*-inaktivierten Mutante ORLD1. Spur 1: WT-DNA/*Bam*HI-verdaut; Spur 2: ORLD1-DNA/*Bam*HI-verdaut, Spur 3: WT-DNA/*Pst*I-verdaut; Spur 4: ORLD1-DNA/*Pst*I-verdaut. Die ungefähren Fragmentgrößen (kb) sind angedeutet.

Wie erwartet ergab die Southern-Hybridisierung der mit *Bam*HI gespaltenen genomischen DNA von ORLD1 ein 1,0 kb größeres Fragment als beim Wildtyp (2,9 kb statt 1,9 kb). Bei der mit *Pst*I gespaltenen genomischen DNA hybridisierte beim Wildtyp ein 6,0 kb großes Fragment, bei der Mutante ORLD1 hybridisierten zwei Fragmente, die zusammen 7,0 kb ergaben. Die erfolgreiche *olsA*-Inaktivierung konnte damit bestätigt werden.

3.14.2 Inaktivierung von *orf167*

orf167 zeigte Homologien zu einer *N*-Acetyltransferase und kam deshalb als Kandidat für den ersten Schritt der Ornithinlipid-Biosynthese, den Transfer der 3-Hydroxy-Fettsäure auf die α -Aminogruppe des Ornithins, in Frage. Für die Inaktivierung dieses Gens wurde das Plasmid pBW63 im Offenen Leserahmen von *orf167* an der Position 97 bp mit *Eco47III* gespalten. Eine 2,1 kb große Spectinomycin-Resistenz-Kassette, die für das Gen *aad* co-diirt, wurde aus dem Plasmid pTB2154 mit *SmaI* isoliert und blunt-end in die *Eco47III* Stelle von pBW63 kloniert. Die Orientierung der Spectinomycin-Resistenz-Kassette im neuen Plasmid pBW78 war entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung von *orf167* (siehe Abbildung 17). Anschließend wurde das 5,3 kb große Insert mit *KpnI* und *XbaI* in den broad-host-range-Vektor pMP3510 kloniert. Das neue Plasmid pBW77 konnte nun für die "knock-out-Mutagenese" verwendet werden.

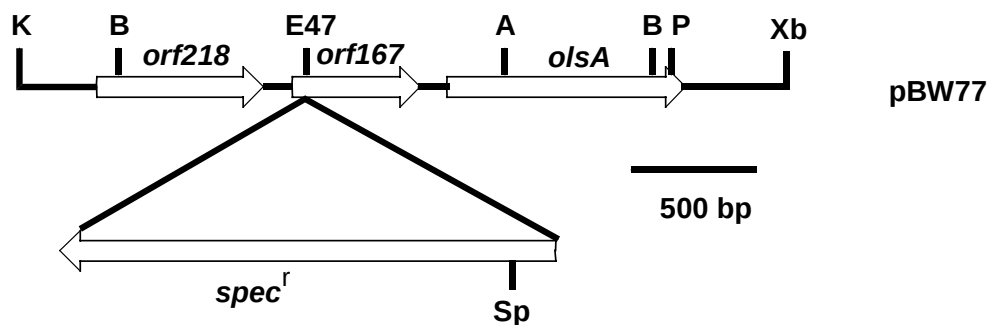


Abb. 17: Lage der Spectinomycin-Resistenz-Kassette in *orf167*.

Restriktionsstellen: A, *AgeI*; B, *BamHI*; E47, *Eco47III*;

K, *KpnI*; P, *PstI*; Sp, *SphI*; Xb, *XbaI*.

Eine, nach erfolgreicher "knock-out-Mutagenese" erhaltene *orf167*-inaktivierte Mutante, wurde ATKO1 genannt. Southern Blot-Analysen bestätigten die korrekte Inaktivierung von *orf167* bei der Mutante ATKO1 (Daten nicht gezeigt).

3.14.3 Inaktivierung von *olsB*

Für eine Insertions-Mutagenese von *olsB* wurde eine Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette in die *CpoI*-Schnittstelle von *olsB* eingefügt. Dafür wurde zunächst das 4,1 kb große Insert von pBW65 im Offenen

Leserahmen von *olsB* an der Position 350 bp mit *CpoI* gespalten und die 5'-überhängenden Enden wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Eine Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette wurde mit *SmaI* aus pTB3131 isoliert und in entgegengesetzter Orientierung zur Transkriptionsrichtung von *olsB* kloniert (siehe Abbildung 18). Das 5,1 kb große Insert des neuen Plasmids pBW83 wurde mit *BamHI* und *HindIII* aus dem Vektor isoliert und in den broad-host-range-Vektor pRK404 kloniert. Anschließend wurde mit dem so erhaltenen Plasmid pBW87 eine "knock-out-Mutagenese" durchgeführt.

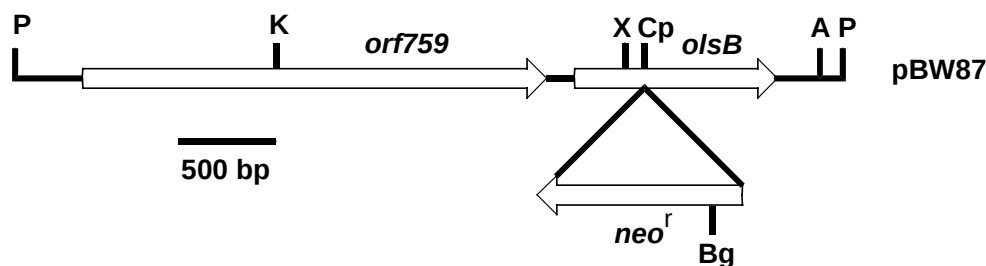


Abb. 18: Lage der Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette im *olsB*-Gen. Restriktionsstellen: A, *AspI*; Bg, *BglIII*; Cp, *CpoI*; K, *KpnI*; P, *PstI*; X, *XhoI*.

Eine nach erfolgreicher "knock-out-Mutagenese" erhaltene *olsB*-inaktivierte Mutante wurde AAK1 genannt. Zur Untersuchung der korrekten Insertion des, durch eine Resistenz-Kassette unterbrochenen, *olsB*-Gens in das Wildtyp-Genom wurde eine Southern-Hybridisierung mit einer α -[^{32}P]dCTP-markierten Sonde durchgeführt (2.12.8.4). Dafür wurde die genomische DNA des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der Mutante AAK1 mit *EcoRI* und *PstI* gespalten. Das Restriktionsenzym *EcoRI* schneidet weder in *olsB*, noch im Neomycin-Phosphotransferase-Gen. *PstI* dagegen schneidet nicht im *olsB*-Gen, jedoch im 1,0 kb großen *neo*-Gen. Das Ergebnis der Southern-Hybridisierung ist in Abbildung 19 dargestellt. Als Sonde wurde ein 1,1 kb großes *AspI/XhoI*-Fragment verwendet (siehe Abbildung 18).

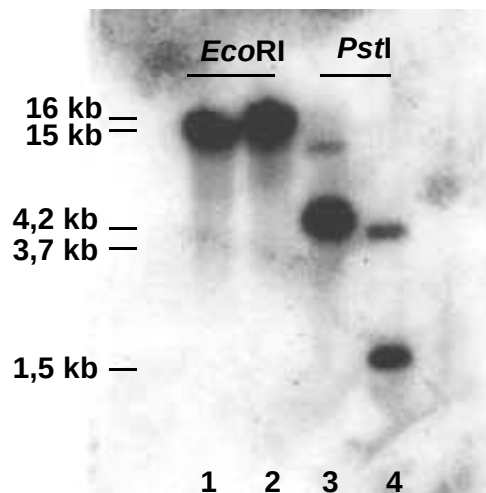


Abb. 19: Autoradiogramm der α -[^{32}P]dCTP-markierten Southern-Hybridisierung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der *olsB*-inaktivierten Mutante AAK1. Spur 1: WT/*EcoRI*-verdaut; Spur 2: AAK1/*EcoRI*-verdaut, Spur 3: WT/*PstI*-verdaut; Spur 4: AAK1/*PstI*-verdaut. Die ungefähren Fragmentgrößen (kb) sind angegeben.

Wie erwartet ergab die Southern-Hybridisierung der mit *EcoRI* gespaltenen genomischen DNA von AAK1 ein etwa 1,0 kb größeres Fragment als beim Wildtyp (circa 16 kb statt 15 kb).

Bei der mit *PstI* gespaltenen genomischen DNA hybridisierte beim Wildtyp ein 4,2 kb großes Fragment, bei der Mutante AAK1 hybridisierten zwei Fragmente, die zusammen 5,2 kb ergaben. Die erfolgreiche *olsB*-Inaktivierung konnte damit bestätigt werden.

3.14.4 Inaktivierung von *orf759*

Um zu testen, ob der stromaufwärts von *olsB* liegende *orf759* auch an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligt ist, wurde das Plasmid pBW66 im Offenen Leserahmen von *orf759* an der Position 1048 bp mit *KpnI* gespalten. Die 3'-überhängenden Enden wurden mit T4 DNA-Polymerase entfernt (2.12.4.4) und eine 1,0 kb große Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette wurde in entgegengesetzter Orientierung zur Transkriptionsrichtung von *orf759* eingefügt (siehe Abbildung 20).

Das neue Plasmid pBW85 mit einem Insert von 5,1 kb wurde anschließend für die "knock-out-Mutagenese" verwendet.

Eine erfolgreich isolierte *orf759*-inaktivierte Mutante wurde als TCK1 bezeichnet. Southern Blot-Analysen bestätigten die korrekte Inaktivierung von *orf759* bei der Mutante TCK1 (Daten nicht gezeigt).

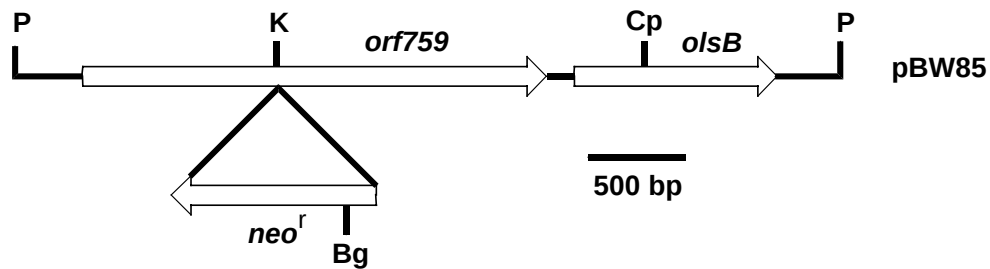


Abb. 20: Lage der Neomycin-Phosphotransferase-Resistenz-Kassette in *orf759*. Restriktionsstellen: Bg, *Bgl*II; Cp, *Cpn*I; K, *Kpn*I; P, *Pst*I.

3.15 Lipid-Phänotypen der Gen-inaktivierten Mutanten

3.15.1 Analyse der *olsA*-inaktivierten Mutante ORLD1

Zur Untersuchung des Lipid-Phänotyps der in *olsA* unterbrochenen Mutante ORLD1, wurden der *S. meliloti* 1021-Wildtyp und die Mutante in Medien mit einem hohen oder einem limitierenden Gehalt an anorganischem Phosphat mit [1-¹⁴C]-Acetat markiert. Die Lipide wurden anschließend nach der Methode von Bligh & Dyer extrahiert und dünnschichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt.

Die Autoradiogramme der markierten Lipide sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

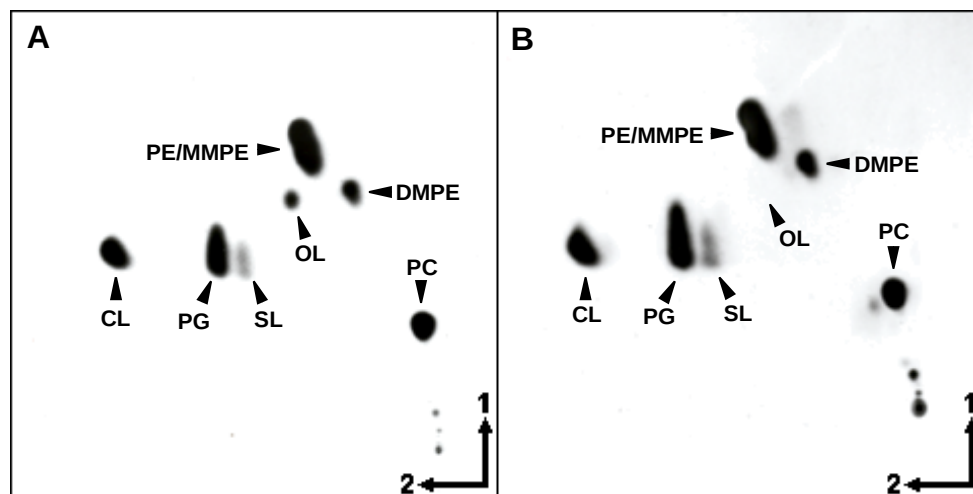


Abb. 21: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat-markierten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps (A) und der *olsA*-inaktivierten Mutante ORLD1 (B) nach Wachstum der Stämme in Medien mit hohen (1,3 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat. Die Laufrichtungen in der ersten (1) und zweiten (2) Dimension sind angedeutet.

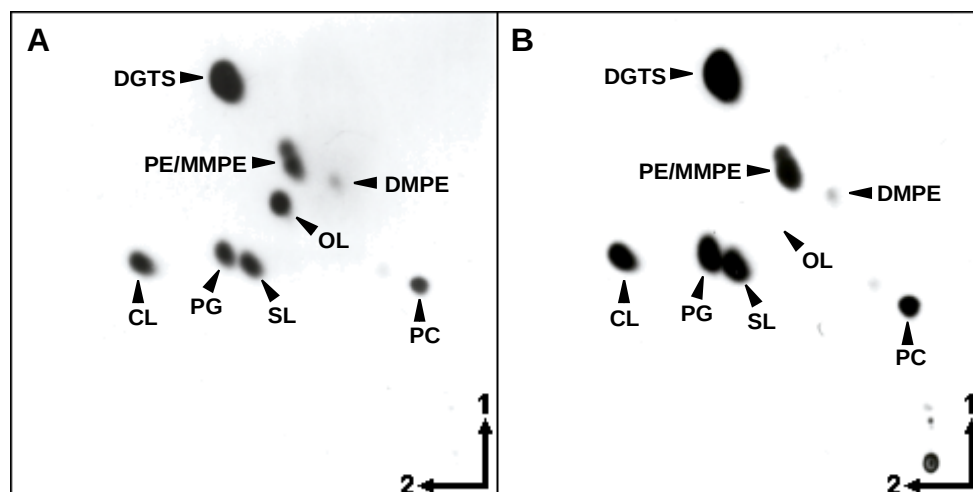


Abb. 22: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat-markierten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps (A) und der *olsA*-inaktivierten Mutante ORLD1 (B) nach Wachstum der Stämme in Medien mit niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat.

Weder eine Markierung der *olsA*-inaktivierten Mutante ORLD1 in Minimalmedium mit hohen, noch in Medien mit niedrigen Konzentrationen an anorganischem Phosphat erbrachte ein Ornithinlipid-Signal. *olsA* war somit das erste, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligte Gen, das isoliert werden konnte.

3.15.2 Analyse der *orf167*-inaktivierten Mutante ATKO1

Lipide der *orf167*-inaktivierten Mutante ATKO1 wurden nach Wachstum in TY-Medium nach der Methode von Bligh und Dyer extrahiert und dünnenschichtchromatographisch in einer Dimension aufgetrennt. Der Lipid-Phänotyp der Mutante unterschied sich nicht vom Phänotyp des *S. meliloti* 1021-Wildtyps. Nach Färbung der HPTLC-Platte mit Ninhydrin konnte beim Wildtyp, aber auch bei der *orf167*-inaktivierten Mutante ATKO1 eine deutliche Ornithinlipid-Bande festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass *orf167* für die Ornithinlipid-Biosynthese nicht benötigt wird.

3.15.3 Analyse der *olsB*-inaktivierten Mutante AAK1

Zur Untersuchung des Lipid-Phänotyps der *olsB*-inaktivierten Mutante AAK1, wurden der *S. meliloti* 1021-Wildtyp und die Mutante in Medien mit einem normalen Gehalt an anorganischem Phosphat mit [1-¹⁴C]-Acetat markiert. Die Lipide wurden anschließend nach der Methode von Bligh & Dyer extrahiert und dünnenschichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt.

Das Autoradiogramm der [1-¹⁴C]-Acetat-markierten Membranlipide der *olsB*-inaktivierten Mutante AAK1 ist in Abbildung 23 dargestellt. Das Autoradiogramm der *olsB*-inaktivierten Mutante AAK1 enthielt im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp kein Ornithinlipid-Signal mehr. Somit war auch die *olsB*-inaktivierte Mutante AAK1 nicht mehr in der Lage, Ornithinlipid zu bilden. *olsB* war deshalb das zweite, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligte Gen, das isoliert werden konnte.

Restriktionsstellen *Nde*I und *Bgl*II gespalten und in den, mit *Nde*I und *Bam*HI geschnittenen, Expressionvektor pET9a kloniert. Das erhaltene Plasmid pBW43 wurde mit *Xba*I gespalten und in den broad-host-range-Vektor pMP3510 kloniert. Das neue Plasmid pBW51 wurde anschließend mittels Drei-Punkt-Kreuzung in die Mutante ORLD1 eingekreuzt. Eine Lipidanalyse des Stammes ORLD1 x pBW51 nach Markierung mit [1-¹⁴C]-Acetat ergab, dass der Wildtyp-Phänotyp in dem nun *olsA*-überexprimierenden Stamm, sowohl unter Hochphosphat-, als auch unter Niedrigphosphat-Bedingungen wieder vollständig rekonstituiert worden war (Abbildungen 24 und 25).

Um auszuschließen, dass der Vektor alleine den Wildtyp-Phänotyp wiederherstellen konnte, wurde der Stamm ORLD1, der einen leeren broad-host-range-Vektor enthielt (ORLD1 x pMP3510) in analoger Weise untersucht.

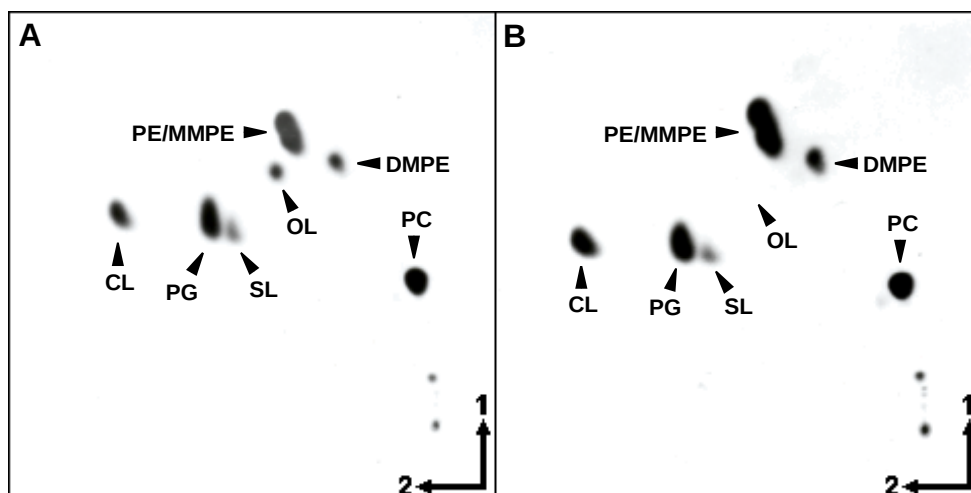


Abb. 24: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1-¹⁴C]-Acetat-markierten Membranlipide der Stämme ORLD1 x pBW51 (A) und ORLD1 x pMP3510 (B) nach Wachstum in Medien mit hohen (1,3 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat. Die Laufrichtungen in der ersten (1) und zweiten (2) Dimension sind angedeutet.

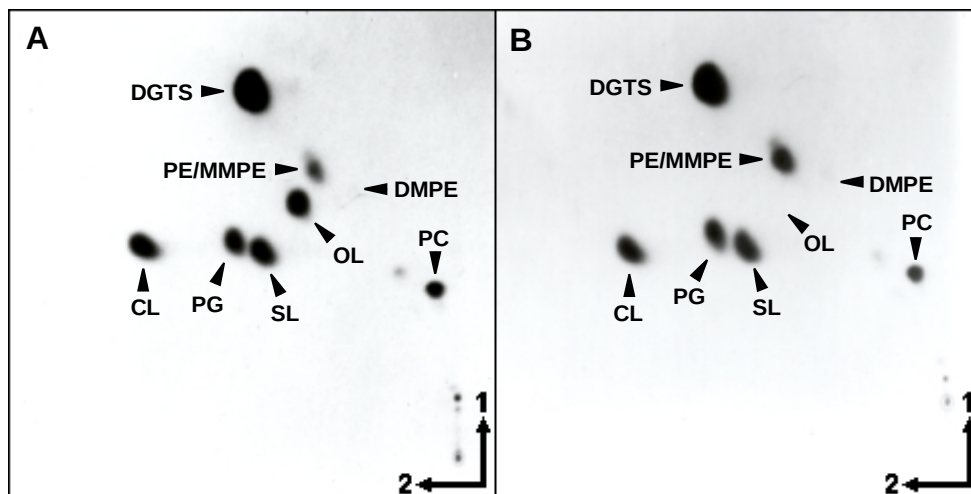


Abb. 25: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat-markierten Membranlipide der Stämme ORLD1 x pBW51 (A) und ORLD1 x pMP3510 (B) nach Wachstum in Medien mit niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat. Die Laufrichtungen in der ersten (1) und zweiten (2) Dimension sind angedeutet.

3.17 Membranlipidzusammensetzung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1

Zur Untersuchung der Membranlipidzusammensetzung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp, wurden die beiden Stämme in Minimalmedium mit hohen oder niedrigen Konzentrationen an anorganischem Phosphat angezogen. In einer zweiten Passage wurden je 1 ml der Kulturen mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat markiert. Die in Hochphosphat-Medien gewachsenen Kulturen wurden nach 24 Stunden geerntet. Die in Niedrigphosphat-Medien gewachsenen Bakterien erreichten die stationäre Phase erst nach 30 Stunden und wurden deshalb erst zu diesem Zeitpunkt geerntet. Die Lipide wurden nach der Methode von Bligh & Dyer extrahiert und dünnschichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Quantifizierung der einzelnen Lipid-Signale erfolgte wie unter 2.13.4.3 beschrieben. Die Mittelwerte von je drei voneinander unabhängigen Messungen sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

Tab. 7: Membranlipidzusammensetzung (% Gesamt- ^{14}C) des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 nach Wachstum in Minimalmedium mit hohen (1,3 mM) oder niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat.

Lipid	Membranlipidzusammensetzung (% Gesamt- ^{14}C)			
	Hochphosphat-Medien		Niedrigphosphat-Medien	
	WT ^a	ORLD1 ^a	WT ^a	ORLD1 ^a
PG	9,2±0,1	9,8±0,7	4,7±0,6	6,5±0,1
CL	6,5±0,9	5,8±0,4	4,7±0,6	4,5±0,4
PE + MMPE	30,4±1,0	30,8±1,4	5,6±0,9	9,3±0,5
DMPE	2,8±0,2	3,0±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1
PC	48,1±1,8	49,0±2,0	4,7±0,5	6,2±0,1
SL	1,6±0,2	1,6±0,1	4,9±0,1	4,7±0,8
OL	1,5±0,2	n. n. ^b	6,7±1,4	n. n. ^b
DGTS	n. n. ^b	n. n. ^b	68,5±1,9	68,5±1,6

^aDie dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

^bn.n., nicht nachweisbar.

In Medien mit ausreichend verfügbarem Phosphat war der einzig signifikante Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante ORLD1 der Verlust von Ornithinlipid. In Medien mit einem wachstumslimitierenden Gehalt an Phosphat synthetisierte der Wildtyp 4,5-mal so viel Ornithinlipid wie unter normalen Wachstumsbedingungen. Bei der Mutante dagegen zeigte sich unter diesen Bedingungen eine Erhöhung der Syntheseraten anderer Lipide. So bildete ORLD1 etwa 1,5-mal mehr PC und PG als der Wildtyp und der Gehalt an PE/MMPE wurde fast verdoppelt.

Auch vom *olsA*-überexprimierenden Stamm ORLD1 x pBW51 wurde die Membranlipidzusammensetzung bestimmt. Als Vergleich diente die Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1, die einen leeren broad-host-range-Vektor enthielt (ORLD1 x pMP3510). Die Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Experimenten sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

Tab. 8: Membranlipidzusammensetzung (% Gesamt- ^{14}C) der komplementierten Mutante ORLD1 x pBW51 und ORLD1 x pMP3510 nach Wachstum in Minimalmedium mit hohen (1,3 mM) oder niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat.

Lipid	Membranlipidzusammensetzung (% Gesamt- ^{14}C)			
	Hochphosphat-Medien		Niedrigphosphat-Medien	
	pBW51 ^a	pMP3510 ^a	pBW51 ^a	pMP3510 ^a
PG	8,7±0,7	8,9±0,3	3,8±0,3	5,2±0,3
CL	4,6±0,5	5,1±0,3	5,2±0,1	5,5±0,1
PE + MMPE	27,1±0,7	31,9±0,8	1,8±0,1	6,4±0,0
DMPE	2,5±0,1	3,0±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0
PC	53,0±1,4	49,7±0,7	3,3±0,9	4,0±0,3
SL	1,9±0,3	1,4±0,2	5,1±0,5	5,1±0,9
OL	2,2±0,1	n. n. ^b	8,1±0,3	n. n. ^b
DGTS	n. n. ^b	n. n. ^b	72,7±1,4	73,7±1,2

^aDie dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Abkürzungen: pBW51 entspricht dem Stamm ORLD1 x pBW51, pMP3510 dem Stamm ORLD1 x pMP3510.

^bn.n., nicht nachweisbar.

Die *olsA*-Überexpression in ORLD1 bewirkte eine leichte Erhöhung des Ornithinlipid-Gehalts unter Hochphosphat-Bedingungen im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp (2,2 % bei ORLD1 x pBW51 zu 1,5 % beim Wildtyp). Gleichzeitig scheint unter diesen Bedingungen der relative Anteil von PE und MMPE leicht zurückzugehen (27,1 % bei ORLD1 x pBW51 zu 30,4 % beim Wildtyp).

Unter Niedrigphosphat-Bedingungen betrug beim *olsA*-überexprimierenden Stamm ORLD1 x pBW51 der relative Anteil von Ornithinlipid 8,1 % und lag damit fast 4-mal so hoch wie unter normalen Bedingungen. Der Stamm ORLD1 x pMP3510 zeigte, wie erwartet, keine Ornithinlipidbildung. Bei diesem Stamm schien ebenfalls der Mangel an Ornithinlipid durch eine Zunahme der Lipide PC, PG und PE/MMPE ausgeglichen zu werden. Während die Membranlipide PC und PG nur leicht (bis 1,5-mal) erhöht waren, war der relative Anteil von PE/MMPE fast 4-mal höher als in dem *olsA*-überexprimierenden Stamm ORLD1 x pBW51.

3.18 Funktionsanalysen der Ornithinlipid-defizienten Mutanten ORLD1

3.18.1 Wachstum von ORLD1 in Hoch- und Niedrigphosphat-Medien

Es wurde untersucht, ob der Verlust von Ornithinlipid sich auf das Wachstum von *S. meliloti* 1021 auswirkt. Dafür wurden Wachstumskurven des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 erstellt (Abbildung 26).

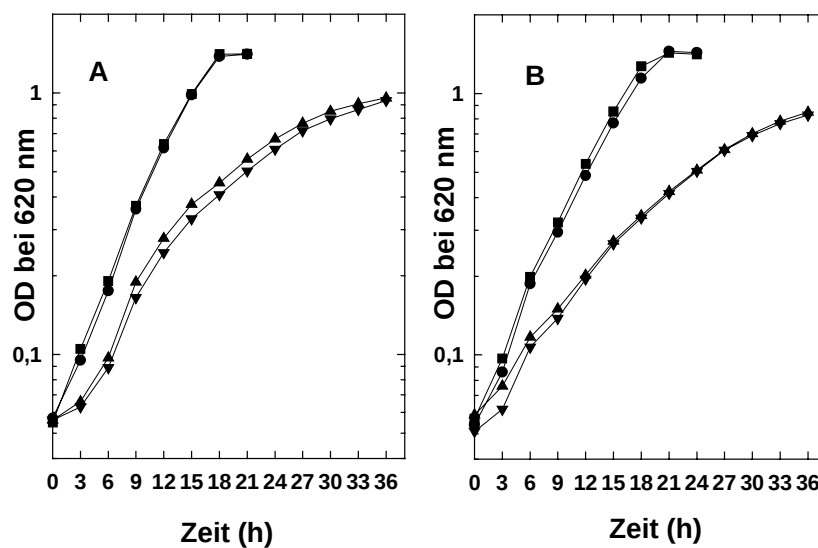


Abb. 26: Wachstum von *Sinorhizobium meliloti* 1021 in Abhängigkeit von der Zeit. Halblogarithmische Darstellung. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Messwerten. Die Fehlerbalken waren kleiner als die Symbole und wurden deshalb nicht abgebildet.

- A) *S. meliloti* 1021-Wildtyp (■) und Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1 (●) nach Wachstum in Minimalmedium mit hohen (1,3 mM), und *S. meliloti* 1021-Wildtyp (▲) und Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1 (▼) nach Wachstum in Minimalmedium mit niedrigen (0,02 mM) Konzentrationen an anorganischem Phosphat (Pi).
- B) ORLD1 x pBW51 (■) und ORLD1 x pMP3510 (●) nach Wachstum in Minimalmedium mit hohen, und ORLD1 x pBW51 (▲) und ORLD1 x pMP3510 (▼) nach Wachstum in Minimalmedium mit niedrigen Konzentrationen an anorganischem Phosphat (Pi).

Die jeweiligen Wachstumsdichten wurden für Kulturen, die in Medien mit hohen oder niedrigen Konzentrationen an anorganischem Phosphat gewachsen waren, wie unter 2.3.3 beschrieben, gemessen. Die Wachstumsdichten wurden sowohl für die Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1 im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp, als auch für den *olsA*-überexprimierenden Stammes ORLD1 x pBW51 bestimmt. Als Kontrollstamm fungierte im Fall von ORLD1 x pBW51 die Mutante, die einen leeren broad-host-range-Vektor pMP3510 enthielt (Abbildung 26B).

Wie in Abbildung 26A zu erkennen ist, besteht kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 in Medien mit ausreichend anorganischem Phosphat. Die Generationszeiten betrugen unter diesen Bedingungen 3,6 h für den Wildtyp und 3,7 h für die Mutante.

In Medien mit niedrigen Konzentrationen an Phosphat war das Wachstum der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 im Vergleich zum Wildtyp zu Beginn leicht verzögert. In der exponentiellen Wachstumsphase lag die Generationszeit aber bei beide Stämme bei 7,0 h. Nach 36 Stunden Wachstum erreichten sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante ORLD1 die gleiche End-OD.

Komplementierte man die Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1 mit dem *olsA*-Gen, so bestand beim Wachstum in Medien mit hohen Konzentrationen an Phosphat kein Unterschied dieses Stammes im Vergleich zum Kontrollstamm, der einen leeren broad-host-range-Vektor enthielt. Die Generationszeiten dieser Stämme betrugen 4,4 h für ORLD1 x pBW51 und 4,6 h für ORLD1 x pMP3510.

Auf Medien mit einem niedrigen Gehalt an Phosphat wuchs der Stamm ORLD1 x pMP3510 am Anfang leicht verzögert im Vergleich zum Stamm ORLD1 x pBW51. Aber auch hier besaßen die beiden Stämme während der exponentiellen Wachstumsphase die gleiche Generationszeit von 8,7 h und erreichten nach 36 Stunden die gleiche End-OD.

Die Wachstumsraten aller Stämme waren im Niedrigphosphat-Medium reduziert, aber unter den gewählten Bedingungen konnte kein wirklich signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp, den verschiedenen Ornithinlipid-defizienten oder Ornithinlipid-komplementierten Stämmen festgestellt werden.

3.18.2 Wurzelknöllchensymbiose von ORLD1

Zur Überprüfung der Symbiosefähigkeit der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 im Vergleich zum Wildtyp wurden Keimlinge von *Medicago*

sativa (Alfalfa) mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp oder der Mutante ORLD1 inokuliert. Als Kontrolle diente steriles Minimalmedium. Es wurden zwei voneinander unabhängige Wurzelknöllchentests, wie unter 2.6 beschrieben, durchgeführt. Beim ersten Experiment wuchsen die Pflanzen in einer Wachstumskammer mit konstant 28°C, beim zweiten Wurzelknöllchentest in einer Wachstumskammer mit einer Dauertemperatur von 22°C. Die Keimlinge wurden auf Stickstoff-freiem Jensen-Agar angezogen und die Knöllchenbildung wurde alle 5 Tage kontrolliert.

Die Ergebnisse der Einzelwerte finden sich in Anhang 7.5. Die Mittelwerte von jeweils 6 Pflanzen, inokuliert mit dem Wildtyp oder der Ornithinlipid-defizienten Mutanten ORLD1, sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Wurzelknöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 auf Alfalfa-Wurzeln.

Tage ^a	Durchschnittliche Knöllchen pro Pflanze			
	Experiment 1		Experiment 2	
	WT ^b	ORLD1 ^b	WT ^b	ORLD1 ^b
5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
10	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
15	2,2±1,2	1,3±0,7	0,0±0,0	0,0±0,0
20	4,0±1,0	2,0±1,0	2,3±1,0	0,2±0,3
25	4,2±1,2	2,8±1,8	4,8±2,8	3,2±1,3
30	4,8±1,8	3,0±1,3	5,5±3,7	3,5±1,3
35	5,0±1,7	3,7±1,1	6,7±4,2	5,5±2,3
40	5,3±2,0	3,7±1,1	6,7±4,2	5,5±2,3
45	5,3±2,0	3,7±1,1	9,0±3,0	8,0±2,7

^aDer Zeitraum in Tagen beschreibt die Zeit nach der Inokulation der Wurzeln mit Bakterien.

^bDie Werte sind Mittelwerte von jeweils 6 Pflanzen ± Standardabweichung.

Pflanzen, die mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp oder mit der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 inokuliert worden waren, bildeten nach 10 bzw. 15 Tagen Wurzelknöllchen und blieben über den ganzen Testzeitraum hinweg grün. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollpflanzen, die nicht mit Rhizobien beimpft wurden, keine Knöllchenbildung, hatten nach etwa 30 Tagen gelbe Blätter und blieben daraufhin im Wachstum zurück.

Die gebildeten Wurzelknöllchen der Keimlinge waren rosafarben, unabhängig davon, ob die Pflanzen mit dem Wildtyp oder der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 inokuliert worden waren. Die Stickstoff-

Fixierung schien somit auch bei den mit Mutanten inokulierten Pflanzen nicht beeinträchtigt zu sein.

In der Knöllchenbildungskinetik gab es allerdings einen geringen Unterschied: Die Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1 nodulierte im Vergleich zum Wildtyp mit einer leichten Verzögerung. Beim ersten Experiment hatten die Wildtyp-inokulierten Pflanzen nach 20 Tagen im Mittel schon circa 4,0 Knöllchen, die Mutanten-inokulierten Pflanzen dagegen nur 2,0 Knöllchen gebildet. Beim zweiten Experiment zeigten sich nach diesem Zeitraum auf den Pflanzenwurzeln, die mit dem Wildtyp inokuliert waren, im Durchschnitt 2,3 Knöllchen, bei den Mutanten-inokulierten nur 0,2 Knöllchen. Bezieht man jedoch die teilweise sehr hohen Standardabweichungen in die Ergebnisse mit ein und berücksichtigt man, dass die Anzahl der gebildeten Wurzelknöllchen nach 45 Tagen bei beiden Stämmen nahezu gleich war, so konnte kein wirklich signifikanter Unterschied in der Wurzelknöllchensymbiose zwischen dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp und der Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1 festgestellt werden.

3.19 Nachweis einer Ornithinlipid-Vorstufe durch Pulse-Markierung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 mit [1-¹⁴C]-Acetat

Wenn ein bestimmter Schritt in einem Biosyntheseweg wegen einer Mutation inaktiviert ist, wird häufig das Intermediat, welches als Substrat dieses Schrittes dient, akkumuliert. Aus Vorversuchen war jedoch bekannt, dass auf Autoradiogrammen der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1, die über 24 Stunden hinweg mit [1-¹⁴C]-Acetat markiert wurde, kein neues Lipid-Signal im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp zu erkennen war. Um die potentielle Zwischenstufe Lyso-Ornithinlipid nachweisen zu können, wurde der *S. meliloti* 1021-Wildtyp und die *olsA*-defiziente Mutante ORLD1 für nur 30 Minuten wie unter 2.13.3.2.2 beschrieben mit [1-¹⁴C]-Acetat markiert. Anschließend wurden die Lipide nach der Methode von Bligh & Dyer extrahiert und die Lipidextrakte dünnenschichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Als Referenz wurde [1-¹⁴C]-Acetat-markiertes Ornithinlipid mittels milder alkalischer Hydrolyse zu Lyso-Ornithinlipid wie unter 2.13.3.4 beschrieben umgesetzt. Das [1-¹⁴C]-Acetat-markierte Lyso-Ornithinlipid wurde anschließend zu einem [1-¹⁴C]-Acetat-markierten Wildtyp-Lipidextrakt gegeben und die Lipidmischung wurde dünnenschichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Autoradiogramme der HPTLC-Platten finden sich in den Abbildungen 27 und 28.

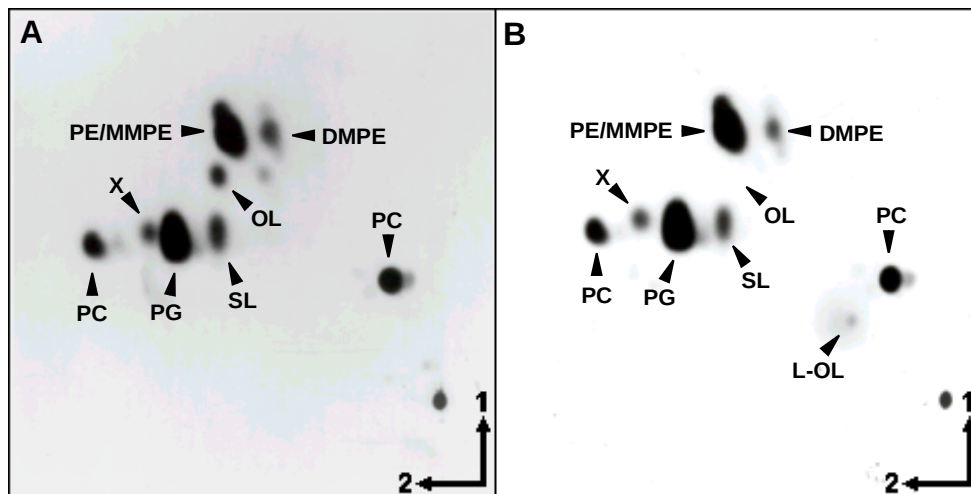


Abb. 27: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pulse-[1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps (A) und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 (B) nach Wachstum in TY-Medien. L-OL, Lyso-Ornithinlipid, X, unbekanntes Lipid. Die Laufrichtungen in der ersten (1) und zweiten (2) Dimension sind angedeutet.

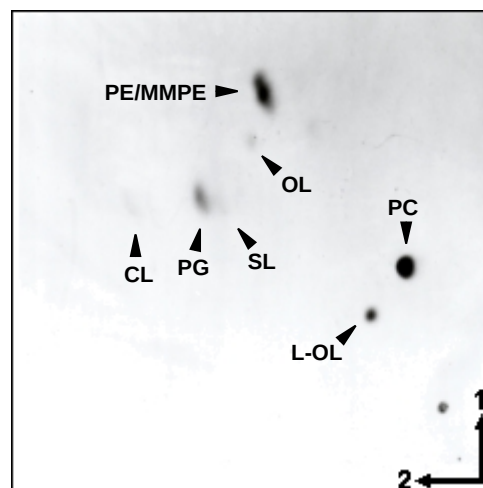


Abb. 28: Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung der [1- 14 C]-Acetat-markierten Membranlipide des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps. Dem Extrakt wurde vor der Chromatographie [1- 14 C]-Acetat-markiertes Lyso-Ornithinlipid zugefügt. L-OL, Lyso-Ornithinlipid. Die Laufrichtungen in der ersten (1) und zweiten (2) Dimension sind angedeutet.

Die Abbildung 27B zeigt im Unterschied zur Abbildung 27A, dass die Ornithinlipid-defiziente Mutante ORLD1 ein zusätzliches Lipid-Signal im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp enthält. Radiomarkiertes, aus Ornithinlipid hergestelltes Lyso-Ornithinlipid lief bei einer dünnschichtchromatographischen Analyse mit Wildtypextrakten (Abbildung 28) an der gleichen Position, wie das neue Lipid-Signal der Mutante. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die *olsA*-defiziente Mutante ORLD1 tatsächlich Lyso-Ornithinlipid, zumindest in geringen Mengen, akkumuliert.

3.20 Herstellung einer Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante

Zur Untersuchung des Einflusses der Phosphor-freien Membranlipide Ornithinlipid und Sulfolipid zusammen auf die Wurzelknöllchensymbiose von *S. meliloti* 1021 wurde eine Doppelmutante erzeugt, die weder Ornithinlipid noch Sulfolipid bilden konnte. Dafür wurde das an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligte *olsA*-Gen in der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 durch eine Spectinomycin-Resistenz-Kassette unterbrochen. Zur Inaktivierung wurde im Plasmid pBW63 der Offene Leserahmen von *olsA* an der Position 364 bp mit *AgeI* gespalten, und die 5'-überhängenden Enden wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt.

Eine 2,1 kb große Spectinomycin-Resistenz-Kassette, die für das Gen *aad* codiert, wurde aus dem Plasmid pTB2154 mit *SmaI* isoliert und blunt-end in die *AgeI*-Stelle von pBW63 kloniert. Die Orientierung der Spectinomycin-Resistenz-Kassette im neuen Plasmid pBW71 war entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung von *olsA* (siehe Abbildung 29).

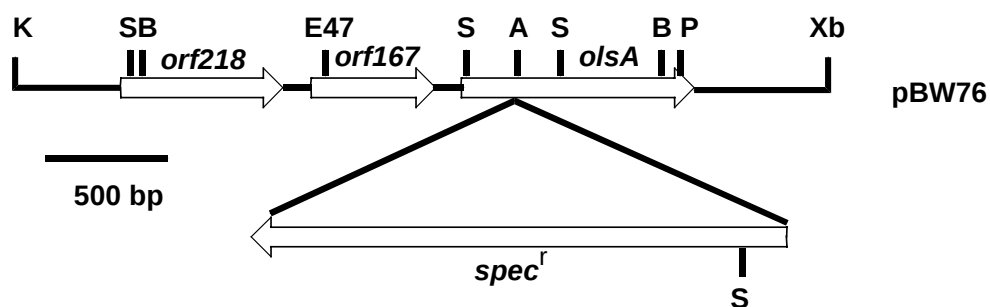


Abb. 29: Lage der Spectinomycin-Resistenz-Kassette im *olsA*-Gen.

Restriktionsstellen: A, *AgeI*; B, *BamHI*; E47, *Eco47III*;

K, *KpnI*; P, *PstI*; S, *SphI*; Xb, *XbaI*.

Anschließend wurde das nun 5,3 kb große Insert mit *KpnI* und *XbaI* in den broad-host-range-Vektor pMP3510 kloniert. Das so erhaltene Plasmid pBW76 konnte nun für die "knock-out-Mutagenese" mit der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 verwendet werden. Die, nach erfolgreicher "knock-out-Mutagenese" erhaltene, Ornithin- und Sulfolipid-defiziente Mutante wurde OSD1 genannt.

Zur Untersuchung der korrekten Insertion des durch eine Resistenz-Kassette unterbrochenen *olsA*-Gens in das Genom von SLD11 wurde eine Southern-Hybridisierung mit einer α -[^{32}P]dCTP-markierten Sonde durchgeführt (2.12.8).

Dafür wurde die genomische DNA des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der Mutante OSD1 mit *PstI* und *SphI* gespalten. Das Restriktionsenzym *PstI* schneidet weder in *olsA*, noch in der Spectinomycin-Resistenz-Kassette. *SphI* dagegen schneidet in der 2,1 kb großen Spectinomycin-Resistenz-Kassette. Das Ergebnis der Southern-Hybridisierung ist in Abbildung 30 dargestellt. Als Sonde wurde ein 1,9 kb großes *BamHI*-Fragment verwendet (siehe Abbildung 29).

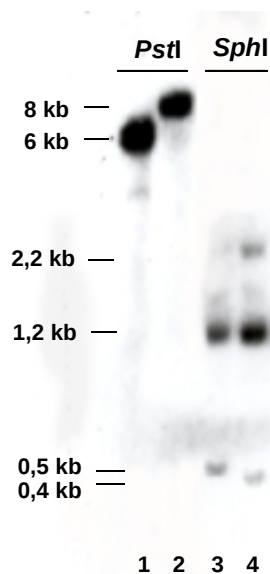


Abb. 30: Autoradiogramm der α -[^{32}P]dCTP-markierten Southern-Hybridisierung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps und der *olsA*- und *sqdB*-inaktivierten Mutante OSD1.

Spur 1: WT-DNA/*PstI*-verdaut; Spur 2: OSD1-DNA/*PstI*-verdaut, Spur 3: WT-DNA/*SphI*-verdaut; Spur 4: OSD1-DNA/*SphI*-verdaut. Die ungefähren Fragmentgrößen (kb) sind angedeutet.

Wie erwartet ergab die Southern-Hybridisierung der mit *Pst*I gespaltenen genomischen DNA von OSD1 ein cirka 2,0 kb größeres Fragment als beim Wildtyp (cirka 8 kb statt 6 kb). Bei der mit *Sph*I gespaltenen genomischen DNA hybridisierten beim Wildtyp ein 1,3 kb und 0,5 kb großes Fragment, bei der Mutante OSD1 hybridisierten drei Fragmente, die zusammen 3,9 kb ergaben. Die erfolgreiche *olsA*-Inaktivierung in der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 konnte damit bestätigt werden.

3.21 Lipid-Phänotyp der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante OSD1

Zur Untersuchung des Lipid-Phänotyps der *sqdB*- und *olsA*-inaktivierten Mutante OSD1 wurde die Mutante mit [1-¹⁴C]-Acetat markiert und die markierten Lipidextrakte wurden dünn-schichtchromatographisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Das Autoradiogramm der radiomarkierten Membranlipide ist in Abbildung 31 dargestellt.

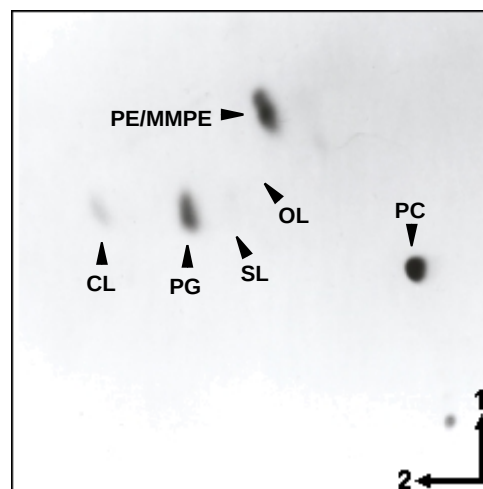


Abb. 31: Zweidimensionale dünn-schichtchromatographische Auftrennung der [1-¹⁴C]-Acetat-markierten Membranlipide der *sqdB*- und *olsA*-inaktivierten Mutante OSD1 nach Wachstum in Minimalmedium mit einem normalen Gehalt (1,3 mM) an anorganischem Phosphat.

Auf dem Autoradiogramm der Mutante OSD1 konnte im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp weder ein Ornithin-, noch ein Sulfolipid-Signal nachgewiesen werden.

3.22 Wurzelknöllchensymbiose von OSD1

Zur Überprüfung der Symbiosefähigkeit der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Doppelmutante OSD1 im Vergleich zum Wildtyp und zu den Einfachmutanten ORLD1 und SLD11, wurden Keimlinge von *Medicago sativa* (Alfalfa) mit den, in Minimalmedium angezogenen, Stämmen inokuliert. Als Kontrolle diente steriles Minimalmedium.

Die Wurzelknöllchentests wurden wie unter 2.6 beschrieben in Flüssigmedium nach der Methode von Rigaud & Puppo durchgeführt. Die Pflanzen wuchsen in einer Wachstumskammer mit 24 h Dauerbelichtung und einer Temperatur von konstant 28°C. Die Knöllchenbildung wurde alle 5 Tage kontrolliert. Die Ergebnisse der Einzelwerte sind im Anhang 7.6 aufgelistet. Die Mittelwerte von jeweils 6 Pflanzen, inokuliert mit dem Wildtyp oder den Mutanten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Wurzelknöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps, der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1, der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 und der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante OSD1 auf Alfalfa-Wurzeln.

Tage ^a	Durchschnittliche Knöllchen pro Pflanze			
	WT ^b	ORLD1 ^b	SLD11 ^b	OSD1 ^b
5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
10	0,2±0,4	0,2±0,4	0,0±0,0	0,2±0,4
15	0,7±0,8	0,3±0,5	0,7±0,8	1,0±0,9
20	2,2±2,5	2,0±1,3	1,3±1,4	2,7±1,2
25	4,0±2,3	2,8±0,8	1,7±1,5	3,0±1,1
30	5,2±2,6	4,2±1,2	3,0±2,4	3,2±1,0

^aDer Zeitraum in Tagen beschreibt die Zeit nach der Inokulation der Wurzeln mit Bakterien.

^bDie Werte sind Mittelwerte von jeweils 6 Pflanzen ± Standardabweichung.

Pflanzen, die mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp oder den verschiedenen Mutanten inokuliert worden waren, bildeten nach circa 10 Tagen Knöllchen und blieben den ganzen Testzeitraum über grün. Die Kontrollpflanzen dagegen zeigten keine Knöllchenbildung, hatten nach einiger Zeit gelbe Blätter und blieben im Wachstum zurück.

Die gebildeten Wurzelknöllchen der Keimlinge waren rosafarben, unabhängig davon, ob die Pflanzen mit dem Wildtyp oder den Mutanten inokuliert worden waren. Da auch die Blätter der Pflanzen, die mit der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante OSD1 inokuliert waren, grün blieben, kann

man davon ausgehen, dass auch die Lipid-Doppelmutante effizient Stickstoff fixierte. Bezieht man die teilweise sehr hohen Standardabweichungen in die Betrachtung mit ein, so war die Anzahl der gebildeten Wurzelknöllchen pro Pflanze, gleichgültig ob sie mit dem Wildtyp oder einer der Mutanten inokuliert wurde, nach Abschluss des Experiments nahezu gleich. Somit konnte gezeigt werden, dass Rhizobien, denen beide Membranlipide Ornithinlipid und Sulfolipid fehlen, eine effiziente Stickstoff-fixierende Wurzelknöllchensymbiose ausbilden können.

4. Diskussion

4.1 Die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten sinorhizobiellen *sqd*-Gene stammen phylogenetisch von Bakterien ab

Ein naher Verwandter von *Sinorhizobium meliloti* ist das photosynthetische Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides*. Basierend auf der 16S-rRNA-Analyse wurden sowohl *R. sphaeroides*, als auch *S. meliloti* in die α -Gruppe der Proteobakterien, in der sich sowohl photosynthetische als auch nicht-photosynthetische Bakterien befinden, eingeordnet (Woese, 1987). Deshalb wurde schon bei der Entdeckung von Sulfolipid in *S. meliloti* 1021 die Frage nach der Herkunft der an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqd*-Gene gestellt (Cedergren & Hollingsworth, 1994). Einerseits könnten die sinorhizobiellen *sqd*-Gene von einem gemeinsamen Vorfahren von *R. sphaeroides* und *S. meliloti* abstammen. Andererseits hätten die *sqd*-Gene aber auch durch horizontalen Gentransfer während der Symbiose von der Wirtspflanze auf den Symbionten übertragen worden sein können. Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Sulfolipid kann diese Frage nun beantwortet werden. Vergleiche des an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten sinorhizobiellen *sqdB*-Gens mit orthologen *sqdB*-Genen anderer Bakterien und dem orthologen *SQD1* der Pflanze *Arabidopsis thaliana* zeigen, dass das sinorhizobielle *sqdB*-Gen am weitesten vom pflanzlichen *SQD1* entfernt ist. Ein mit Clustal W und Boxshade (2.12.11) erstellter Aminosäuresequenz-Vergleich (Alignment) findet sich in Abbildung 32.

S.melilo	1	-----
R.sphaer	1	-----
Scoccus	1	-----
Scystis	1	-----
A.thalia	1	MAHLLSASCPVISLSSSSSKNSVKPFVSGQTFNAQLLSRSLKGLLFQEKKPRKSCVF
S.melilo	1	-----MKIAVLGGDGFVGWPTALHLSDAGHEVHILDNLSRR
R.sphaer	1	-----MRIAVLGGDGFVGWPTALHLSDLGHEHIVDNLSRR
Scoccus	1	-----MKILVLGGDGFVGWPTALHLSAAGHAVTIVDNLSRR
Scystis	1	-----MRALVLGGDGFVGWPTALHLSNKGVEVGLDLSLVR
A.thalia	61	RATAVPITQQAPPETSTNNSSSKPKRMVVLGGDGFVGWPTALHLSKKNYEVCIIVNLVRR
S.melilo	37	WIDTELGVQSLTPMDSIQERTRIWHAEAGRIHFNLDLARDYELLKNWLAHRPDAVVH
R.sphaer	37	WIDTELGVQSLTPMDSIQERCRHWHQETGQRLHFLDLR-EYDRIRAWLAHYRPEATIH
Scoccus	37	KTDVELGVQSLTPIATIERRLKAWQETGGQPISEVNLDAADYDRICALLLETQPDIVH
Scystis	37	YWDALGAEITLTPAPIRQRLDRMYELTGKKIDLEFGDIN-DYPELTNALRQFQPDVVH
A.thalia	121	LFDHQLGLESITPIASIHDRISRWKALTGKSTIELYVGDIC-DFEFLAESFKSEFPDSVVH
S.melilo	97	FAEQRAAPYSMKSDRHKNYTVNNNVNATHNLLNALVELELDAHLVHLGTMGVYGY-STIG
R.sphaer	96	FAEQRAAPYSMKSDRHKVYTVNNNVNATHNLLAAVETGDAHLVHLGTMGVYGY-STVG
Scoccus	97	FAEQRAAPYSMKSAWHKRFVNNNVNATHNLLCAQVDVGLKSHIVHLGTMGVYGYGSHRG
Scystis	96	FGEQRSAPESMIDREHAVLTQANNVLGNLNLLYALKEDFPDCHLVKLGTMEYGY---TPN
A.thalia	180	FGEQRSAPYSMIDRSRAVYTHQNNVIGTLNVLFAIKFGECHLVKLGTMEYGY---TPN

S.melilo	156	AAIPEGYLPVGIETMGEETVNEETLYPSNPGSVYHMTKCLDQLLEQFYAKNDGLRITDLH
R.sphaer	155	APIPEGYLDVSVETPAGPKE-LEILYPTRPGSVYHMTKSLDQILEQYYAQNDGLRITDLH
Scoccus	157	ATIPEGYLEVEVQRDGGQRFEEKILHPVDPGSVYHMTKITLDQLLEFYNNKNDNIQVTDLH
Scystis	153	IDIEEGYITIEHK---GRKD--TLPYPKOPGSFYHLSKVHDSHNIHFACKIWLGRATDLN
A.thalia	237	IDIEEGYITITHN---GRTD--TLPYPKQASSFYHLSKVHDSHNIHFTCKAWGIRATDLN
S.melilo	216	QGIVWGTHTETRRHPQLINRFDYDGDYGTVLNRFLIQAAIDYPLTVHGTGGQTRAFIHI
R.sphaer	214	QGIVWGTHTNQTRRHQPQLINRFDYDGDYGTVLNRFLIQSAIGYPLTVHGTGGQTRAFIHI
Scoccus	217	QGIVWGTNTDHCNHPDLINRFDYDGDYGTVLNRFLMQAAIGYPLTVHGVGGQTRAFIHI
Scystis	208	QGIVYGVLTETGMDMLNRLDYDGVFGTALNRFQIAAIGHPLTVYGGGGQTRGLLDI
A.thalia	292	QGVVYGVKTDETEMHEELRNRLDYDAVFGTALNRFQVQAAVGHPLTVYGGGGQTRGYLDI
S.melilo	276	QDSVRCIELALRNPPARGSRVEIFNQMTETHRIRDLAEMVARMTG-----AKIAWLPNPR
R.sphaer	274	QDSVRCVELALSDAPKAGERVKIFNQMTETHRVRDLAELVAKMTG-----AKVSLPNPR
Scoccus	277	RDSVRCVQLAIENPPAANEKVRIFNQMTETTYQVKDLAEKVAALTG-----AEIAYLPNPR
Scystis	268	RDIVRCIELAIANPADKGF-FRVFNQYTELF-SVGDLAQMVQKAGADLGLKVEIDHLENPR
A.thalia	352	RDIVQCVELAIANPAKAGE-FRVFNQFTEQFSVNELASLVTKAGSKLGLDVKKMTVPNPR
S.melilo	331	KEAAENELVVRNEKFLALGLNPVRLDGLLSEIVDVAKKFAYRVDRSRVPAVSAWTKDIA
R.sphaer	329	KEADENELVVRNDQFLALGLKPITLQEGLLGEVVDVAKKFAHRTDRSRVPCVSAWTKDIA
Scoccus	332	KEALENDLIVDNRLIDLGLNPPTLDNGLNSEVVEIAQKFADRCRAKIPCVSAWTRNQA
Scystis	327	VELEEYHFNANTNLLDLGLQPHFLSDSLLDSLNFATKVKDRVDQKHILPKVITMRG---
A.thalia	411	VEAEEHYNAKHTKLMELGLEPHYLSDSLLDSLNFQVQFKDRVDTKQIMPSVSWKKIGV
S.melilo	391	PLNHDPEGKRLKSVS
R.sphaer	389	QRVEHDPEGRRLRSVS
Scoccus	392	EALS-APET-ALR---
Scystis		-----
A.thalia	471	KTKSMTT-----

Abb. 32: Mit Clustal W und Boxshade erstelltes Alignment des an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqdB*-Genprodukts von *Sinorhizobium meliloti* 1021 mit orthologen *sqdB*-Genprodukten anderer Bakterien und dem *SQD1*-Genprodukt von *A. thaliana*. *A.thalia*, *SQD1* von *Arabidopsis thaliana* (Essigmann *et al.*, 1998); *R.sphaer*, *SqdB* von *Rhodobacter sphaeroides* (Benning & Somerville, 1992b); *Scoccus*, *SqdB* von *Synechococcus* PCC7942 (Güler *et al.*, 1996); *Scystis*, *SqdB* von *Synechocystis* sp. (Zugangsnummer bei NCBI: S75240); *S.melilo*, *SqdB* von *S. meliloti* 1021 (Weissenmayer *et al.*, 2000). Identische Aminosäuren sind mit einem schwarzen, ähnliche mit einem grauen Kasten gekennzeichnet.

Aus dem Alignment ist ersichtlich, dass die an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqdB*-Genprodukte bei *R. sphaeroides* und *S. meliloti* über weite Bereiche hinweg fast identisch sind (79 % Aminosäure-Identität). Die phylogenetisch nahe Verwandtschaft dieser beiden Bakterien wurde auch durch ein, mit dem Programm TreeView (2.12.11) erstelltes Dendrogramm der Aminosäuresequenzen von *SqdB/SQD1* bestätigt (Abbildung 33).

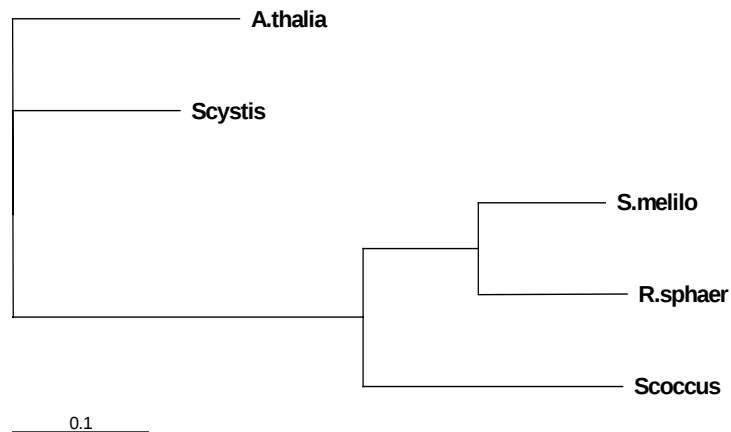


Abb. 33: Dendrogramm der an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqdB/SQD1*-Genprodukte verschiedener Organismen. Das Dendrogramm wurde mit dem Programm TreeView auf Grund des Clustal W-Alignments der verschiedenen SqdB/SQD1-Aminosäuresequenzen errechnet. Die Skalierung bedeutet 0.1 Aminosäureaustausch pro Position. A.thalia, SQD1 von *A. thaliana*; R.sphaer, SqdB von *R. sphaeroides*; Scoccus, SqdB von *Synechococcus* PCC7942; Scystis, SqdB von *Synechocystis* sp.; S.melilo, SqdB von *S. meliloti* 1021.

Die ebenfalls an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten *sqd*-Gene *sqdD* und *sqdC* finden sich nur bei *R. sphaeroides* und *S. meliloti*. Die Aminosäuresequenzen ihrer Genprodukte sind mit 62 % Aminosäure-Identität für SqdD und 47 % Aminosäure-Identität für SqdC bei beiden Bakterien ebenfalls sehr ähnlich.

R. sphaeroides und *S. meliloti* scheinen von einem gemeinsamen Vorfahren abzustammen, aber während *R. sphaeroides* photosynthetisch aktiv geblieben ist, scheint *S. meliloti* seine Fähigkeit zur Photosynthese, unter Beibehaltung funktionsfähiger *sqd*-Gene, im Laufe der Evolution verloren zu haben.

4.2 Die Gene *olsA* und *olsB* sind die ersten, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Gene, die bisher identifiziert wurden

Nicht nur die relativ weite Verbreitung von Ornithinlipid bei Bakterien machen Ornithinlipid zu einem interessanten Forschungsgegenstand, sondern auch das Vorkommen dieses Phosphor-freien Membranlipids bei pathogenen Bakterien wie *Bordetella*, *Mycobacterium* und *Pseudomonas*. Durch funktionelle Komplementierung von Ornithinlipid-defizienten Mutanten konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit zum ersten Mal Gene, die an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligt sind, isoliert werden. Gezielte Geninaktivierung der beiden an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Gene *olsA* und *olsB* führten zu Ornithinlipid-Nullmutanten, die keine Ornithinlipidbildung mehr zeigten.

Datenbanksuchen bei den noch nicht vollständig sequenzierten Genomen bei NCBI mit den Sequenzen von *olsA* und *olsB* ergaben, dass sich Aminosäure-Identitäten von mehr als 30 % über einen Bereich von 70 Aminosäuren bei beiden Enzymen nur zu Bakterien ergaben, bei denen das Vorkommen von Ornithinlipid schon beschrieben war (Tabelle 11).

Tab. 11: Vorkommen von Ornithinlipid in verschiedenen Bakterien und die dazugehörigen Aminosäure-Identitäten ihrer möglichen "OlsA"- und "OlsB"-Homologen mit den, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten, sinorhizobiellen *olsA*- und *olsB*-Genprodukten über einen Bereich von mindestens 70 Aminosäuren. Die angegebene Referenz beschreibt die Identifizierung von Ornithinlipid im jeweiligen Organismus.

Spezies	"OlsA"	"OlsB"	Referenz
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	34 %	36 %	Kawai & Moribayashi, 1982a
<i>Bordetella pertussis</i>	36 %	43 %	Kawai & Moribayashi, 1982a
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36 %	36 %	Lanéelle <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33 %	-	Kawai <i>et al.</i> , 1988b
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	33 %	43 %	Benning <i>et al.</i> , 1995
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	32 %	36 %	Ghosh & Mishra, 1987

BLAST-Suchergebnisse in der Datenbank des derzeit durchgeführten Genomprojekts zur Sequenzierung von *R. sphaeroides* (2.12.11) zeigen, dass das *olsA*-Gen von *S. meliloti* 1021 mit einem Genabschnitt von *R. sphaeroides* eine Aminosäuren-Identität von 33 % besitzt, während das sinorhizobielle *olsB*-Gen mit einem zweiten Genabschnitt auf dem

identischen Contig eine Aminosäuren-Identität von 43 % aufweist (gnl|UTHSC 1063|rsphaer X8503contig6). Die beiden gefunden Genabschnitte liegen bei *R. sphaeroides* in einem Operon, wobei das *olsB*-Homologe sich stromaufwärts vom *olsA*-Homologen befindet und das Stopcodon von "*olsB*" sich mit dem Startcodon von "*olsA*" überlappt. Auch bei *Streptomyces coelicolor* und *Mycobacterium tuberculosis* liegen die *olsA*- und *olsB*-homologen Gene in einem Operon vor und auch in diesen Organismen befindet sich "*olsB*", verbunden durch verschränkte Stop- und Startcodons, stromaufwärts von "*olsA*". Die Zugangsnummern bei NCBI für "*OlsA*" und "*OlsB*" von *Streptomyces coelicolor* sind CAB63169.1 und CAB63170.1 sowie von *Mycobacterium tuberculosis* CAA16111.1 und CAA16112.1.

Um so überraschender ist es, dass sich die beiden an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Gene *olsA* und *olsB* bei *S. meliloti* 14,2 kb voneinander entfernt auf dem Chromosom von *S. meliloti* 1021 befinden. Das *olsB*-Gen liegt dabei stromaufwärts von *olsA* (siehe Abbildung 34).

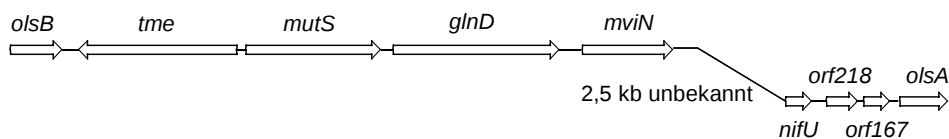


Abb. 34: Bisher bekannte mögliche Offene Leserahmen, die zwischen den an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten Genen *olsB* und *olsA* von *S. meliloti* 1021 liegen. Außer den drei ORFs (NifU, ORF218, ORF167) stromaufwärts von *olsA*, die im Ergebnisteil beschrieben worden sind, gibt es stromabwärts von *olsB* mindestens vier weitere ORFs: Das *tme*-Gen, welches für ein NADP-abhängiges Malat-Enzym codiert, *mutS*, welches für ein DNA-Mismatch-Repair-Protein codiert, *glnD*, welches für Uridylyltransferase codiert und *mviN*, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu einem Virulenzfaktor in *Salmonella typhimurium* aufweist.

Durch Genbanksuchen auf den Servern von NCBI und dem Genomprojekt von *S. meliloti* 1021 konnten mehrere mögliche Offene Leserahmen, die auf der 14,2 kb großen DNA-Region zwischen *olsB* und *olsA* liegen, ermittelt werden. Der erste Offenen Leserahmen (*tme*) stromabwärts von *olsB* codiert mit 764 Aminosäuren für das NADP-abhängige Malat-Enzym (AAB82460).

Der zweite Offene Leserahmen (*mutS*) codiert für ein Protein mit 916 Aminosäuren (P56883). Das Genprodukt dieses Offenen Leserahmens repräsentiert ein DNA-Mismatch-Reparatur-Protein von *S. meliloti* (unveröffentlichte Angabe).

Beim dritten Offenen Leserahmen (*glnD*) stromabwärts von *olsB* handelt es sich um ein Protein mit 950 Aminosäuren (AF227730), welches für eine Uridylyltransferase bei *S. meliloti* codiert.

Der vierte Offene Leserahmen (*mviN*) codiert für ein Protein mit 535 Aminosäuren, welches Ähnlichkeiten zum Virulenzfaktor MviN von *Salmonella typhimurium* zeigt (S40271).

Stromabwärts von *mviN* befindet sich ein circa 2,5 kb großer Genbereich, dessen Sequenz noch nicht bekannt ist. Erst etwa 2,5 kb stromaufwärts von *olsA* beginnen die, unter 3.11.1 beschriebenen Offenen Leserahmen *nifU*, *orf218* und *orf167*.

Keiner der identifizierten Offenen Leserahmen, die auf der 14,2 kb großen Genregion zwischen *olsB* und *olsA* liegen, scheint an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligt zu sein und man könnte vermuten, dass dieser DNA-Bereich während der Evolution der Rhizobien zwischen *olsB* und *olsA* intergriert ist. In diesem Zusammenhang ist es äußerst interessant, dass dieser Bereich doch zumindest zwei Gene (*tme*, *glnD*) enthält, die bei der symbiotischen Lebensweise von Rhizobien einen entscheidenden Unterschied machen könnten. *S. meliloti* besitzt außer dem NADP-abhängigen Malat-Enzym (Tme) ein weiteres Malat-Enzym (Dme), welches NAD oder NADP als Cosubstrat verwenden kann (Voegelé *et al.*, 1999). Dme-defiziente Mutanten sind nicht mehr in der Lage Stickstoff-fixierende Knöllchen zu bilden (Driscoll & Finan, 1993). Auch für Tme kann deshalb vermutet werden, dass es eine wichtige Rolle für die Symbiose spielt. GlnD kontrolliert über die Modifikation des PII-Systems die Assimilation von Stickstoff (Atkinson & Ninfa, 1998) und könnte ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Symbiose spielen.

Bardin *et al.* (1996) beschrieben auf Grund von Promotor-Studien zwei mögliche PhoB-Bindungsstellen (PHO-Boxen), die den PhoB-regulierten *phoCDET*-Genen von *S. meliloti* vorgelagert sind. Obwohl die Ornithinlipid-Synthese durch cytoplasmatisches Phosphat und über den Regulator PhoB reguliert wird (Geiger *et al.*, 1999), konnte stromaufwärts der Ornithinlipid-Biosynthese-Gene *olsA* und *olsB* keine PHO-Box oder andere regulatorische Sequenzen gefunden werden. Somit bleibt die Frage, ob die Synthese von Ornithinlipid tatsächlich durch PhoB reguliert wird, oder ob die PhoB-Bindungsstellen von Gen zu Gen variieren können, weiterhin offen.

4.3 Das sinorhizobielle *olsA*-Gen gehört zur Familie der Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen

Eine NCBI Datenbanksuche mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997), führte bei *olsA* zu einer Reihe von Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen pro- und eukaryontischer Herkunft (Abbildung 35).

```

N.gono_PlsC      1 MSSNKASFFTRLRRLCRITVWFKTGKNLRGIDGGCPKSNRAVIALG--KGALALD--
N.meni_NlaA     1 MSSNKASFFTRLRRLCRITVWFKTGKNLRGIDGGCPESNRAVIELG--RGALTALD--
S.meli_OlsA      1 -----MTNMRVA-LCGMLLVMSLVLPVQILCLWLDLKPRRWLRH--WHRVACLL--
E.coli_PlsC      1 -----MLYIFRLI-----ITVIYSILVCFGSIYCLFSPRNPKHVATFGHMFGRAPLFG-
N.meni_NlaB      1 -----MLIIRNLIY---WLILCSTLIFFPFMLLASPRDGAHKMARV--WVKILNLSLK

N.gono_PlsC     57 --TGLEVGRLP-APEHPN-GVLVAANHVSWLDIFAMS-AVYPSSFIAKQETKSW-PVLGKM
N.meni_NlaA     57 --TGLEVGRLP-APEHPN-GVLVAANHVSWLDIFAMS-AVYPSSFIAKQETKSW-PVLGKM
S.meli_OlsA     51 --LGLRVRVH-GELDRRRPLLSANHVSWKDIIVLS-SVADVVEVAKSDVKSW-PIFGLL
E.coli_PlsC     51 --LKVECRKP-TDAESYGNATYIANHQNNYDMVTASNIYQPPITVVGKSLLLWIPFFGQL
N.meni_NlaB     51 HIVGLKYRIIGAENIPDRPAVICAQHOSGWETLALQDIFPPQVYVAKREIFKI-PFFGWG

N.gono_PlsC    111 GQNAGTVFINRNSRRDIEPINRAVCETLORGQN-VSFFPEARTSSGLGLLP--FKAALFQ
N.meni_NlaA    111 GQNAGTVFINRNSRRDIEPINRAYETLORGQN-VSFFPEARTSSGLGLWISAFKAALFQ
S.meli_OlsA    106 ARIQASVFEVEREQKRTTGHQVNDIGRRADGEI-VVLFPEGTSDGNRLD--IKTSLFG
E.coli_PlsC    108 YWLTGNLIDRNNRTKAHGTTAEVNHFKRRISLWMFPEGTRSRGRGLLP--FKTGAFH
N.meni_NlaB    110 LKLVKTTIGIDRNNRREANEQLIKQGLARKNEGYWITIFPEGTRLAPGKRGK--YKLGGAR

N.gono_PlsC    168 SAIDAG-----AKVLAVLRYYDETGK---RTARPS---YADVGLPTCLWRIVSMKKL
N.meni_NlaA    170 SAIDAG-----AKVLAVLRYYDETGK---RTARPS---YADVGLPTCLWRIVSMKKL
S.meli_OlsA    163 AASAVPQSPTGVVHVQPLAISVTGIHGMPMGRYHRPIAAWPGDIGLVPHLLGLVREGAL
E.coli_PlsC    166 AATAAG-----VPIIPVCVSTTSNKIN----LNR-----LHNGLVIVEMLPPI
N.meni_NlaB    168 MAKMFE-----MDIVPVALNSGEFWPK-----NS-----FLKYPGEITVVICPTI

N.gono_PlsC    215 TIKVDFVCVADAASEDRYALKDKIEESIRAVVADDADIIV-----
N.meni_NlaA    217 TIKVDFVCVADAASEDRYALKDKIEESIRAVVADDADIIV-----
S.meli_OlsA    223 EVDVDFGEAVDYDRHANRKEVSRLLIGQIRKMLSDRLGRSRSAAKGEPAPACSAAPDIP
E.coli_PlsC    205 DVSYQYGDQVRELAHCRSIMEQKIAELDKVAEREAAAGKV-----
N.meni_NlaB    208 PHASGSEALMGKCEHLIETQQLISGAGPFAAKMPSETA-----

N.gono_PlsC      -----
N.meni_NlaA      -----
S.meli_OlsA     283 SDAQRSRLAP
E.coli_PlsC      -----
N.meni_NlaB      -----

```

Abb. 35: Alignment der Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen verschiedener Bakterien mit dem, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten *olsA*-Genprodukt von *Sinorhizobium meliloti* 1021.

E.coli_PlsC, PlsC von *Escherichia coli* (Coleman, 1992);

N.gono_PlsC, PlsC von *Neisseria gonorrhoeae* (Swartley *et al.*, 1995); N.meni_NlaA, NlaA von *Neisseria meningitidis* (Swartley *et al.*, 1995); N.meni_NlaB, NlaB von *Neisseria meningitidis* (Shih *et al.*, 1999); S.meli_OlsA, OlsA von *S. meliloti* 1021.

Identische Aminosäuren sind mit einem schwarzen, ähnliche mit einem grauen Kasten gekennzeichnet.

Die Enzymgruppe der Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen katalysiert normalerweise die Konversion von Lyso-Phosphatidsäure zu Phosphatidsäure. Die erste, als PlsC bezeichnete, 1-Acyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase wurde Anfang der 90'er Jahre aus *Escherichia coli* isoliert (Coleman, 1992). Phosphatidsäure ist eine wichtige Vorstufe für die Biosynthese der Glycerophospholipide Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Cardiolipin und Phosphatidylcholin.

Bei den Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen gelten die beiden Motive NHQS und PEGTR als besonders stark konserviert (West *et al.*, 1997). In leicht abgeänderter Form, NHVS von Aminosäure 72 bis 75 und PEGTT von Aminosäure 143 bis 147, finden sich die beiden hochkonservierten Motive auch in der OlsA-Sequenz von *S. meliloti* (Abbildung 35).

Vor kurzem beschrieben Heath & Rock (1998) ein Konsensus-Peptid-Motiv (H(X)4D), welches in allen bisher bekannten Glycerolipid-Acyltransferasen vorhanden sein soll. Histidin (H) an Position 73 und Asparaginsäure (D) an Position 78 der sinorhizobiellen OlsA-Sequenz könnten diesem Motiv entsprechen.

Interessanterweise variieren die Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen außerhalb der konservierten Bereiche sehr stark. Bei *Neisseria meningitidis* zum Beispiel gibt es mindestens drei verschiedene Enzyme, NlaA, NlaB und eine dritte Aktivität, die in *nlaA*- und *nlaB*-Doppelmutanten nachgewiesen werden konnte, die eine Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferase-Aktivität *in vitro* besitzen (Shih *et al.*, 1999). Aber obwohl NlaA und NlaB vom gleichen Organismus stammen, ist ihre Aminosäuresequenz sehr verschieden (Abbildung 36). Mutanten, die in NlaA oder NlaB inaktiviert sind, zeigen ein unterschiedliches phänotypisches Verhalten. Dies lässt vermuten, dass die beiden Enzyme unterschiedliche biochemische Funktionen im Bakterium besitzen. In Abbildung 36 ist ein, mit dem Program TreeView erstelltes Dendrogramm verschiedener Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen mit dem *olsA*-Genprodukt von *S. meliloti* dargestellt. Von den Sequenzähnlichkeiten her gesehen, gehört OlsA eindeutig zur Gruppe der Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen. Trotzdem zeigt die sinorhizobielle *olsA*-inaktivierte Mutante ORLD1 weder eine Anreicherung von Lyso-Phosphatidsäure, noch eine Beeinträchtigung ihrer Glycerophospholipid-Biosynthese unter normalen Wachstumsbedingungen. Der einzige erkennbare, veränderte Membranlipid-Phänotyp bei dieser Mutante ist der Verlust von Ornithinlipid. Für die Bildung der Glycerophospholipide müsste somit eine andere Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferase-Aktivität in *S. meliloti* vorhanden sein.

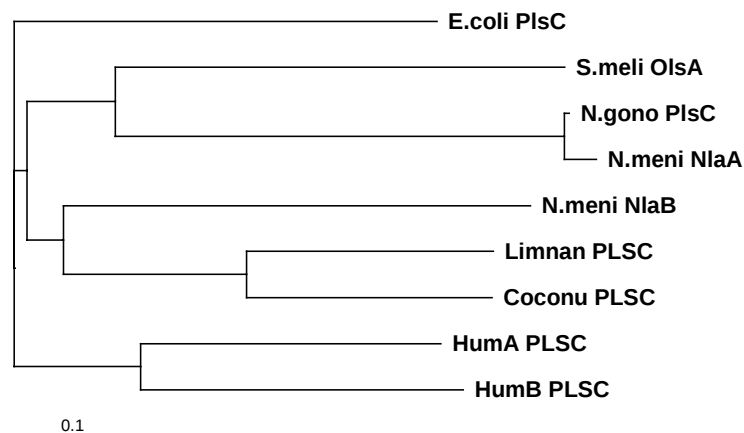


Abb. 36: Dendrogramm verschiedener Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferasen pro- und eukaryontischer Herkunft und dem an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten *olsA*-Genprodukt von *Sinorhizobium meliloti* 1021. Das Dendrogramm wurde mit dem Programm TreeView auf Grund des Clustal W-Alignments der verschiedenen Sequenzen errechnet. Die Skalierung bedeutet 0.1 Aminosäurenaustausch pro Position. Coconu PLSC, PLSC von *Cocos nucifera* (Knutzon *et al.*, 1995); E.coli PlsC, PlsC von *Escherichia coli* (Coleman, 1992); HumA PLSC, PLCA von *Homo sapiens* (West *et al.*, 1997); HumB PLSC, PLCB von *Homo sapiens* (West *et al.*, 1997); Limnan PLSC, PLSC von *Limnanthes douglasii* (Brown *et al.*, 1995); N.gono PlsC, PlsC von *Neisseria gonorrhoeae* (Swartley *et al.*, 1995); N.meni NlaA, NlaA von *Neisseria meningitidis* (Swartley *et al.*, 1995); N.meni NlaB, NlaB von *Neisseria meningitidis* (Shih *et al.*, 1999); S.meli OlsA, OlsA von *S. meliloti* 1021.

Die Sequenzierung der *olsA*-Genregion der chemischen Ornithinlipid-defizienten Mutante BW908 zeigt zudem, dass der Austausch von nur einer Base an der Aminosäureposition 11 des Enzyms ausreichte, um einen Defekt in der Ornithinlipid-Biosynthese herbeizuführen (siehe 3.13).

B. bronch	1	-----MLELVRITDGTAAATAWPGAAP-----RTLAVGLARTAEVEEQIQRLRY
B. pertus	1	-----MLELVRITDGTAAATAWPGAAP-----RTLAVGLARTAEVEEQIQRLRY
M. tuberc	1	-----MLELVRITDGTAAATAWPGAAP-----RTLAVGLARTAEVEEQIQRLRY
S. coelic	1	-----MTGVLTADRPPKPAAP-----RRYTVALARDEDDVRAAQLRLH
T. ferrox	1	MGRDLLSFLHGLCMLSTQSHGSTSHAATRK-----ERSRLRYLARHQDDVEAAQLRLY
P. aerugi	1	-----MTQTAITREPVAARR-----LKAERNGAR---ALREAQALRY
R. sphaer	1	-----MTADD-----PHLELRLAASERDLRAAQLRLY
S. melilo	1	---MTIELDSMGVVDTSNAYIRKVAAPASDVLGRIANLETRLARSAEIDAQAVRY
B. bronch	1	-----MG--AVFPQAQDG--VEQDRFDQWCEHLMVRELDT-----GRVVGTYRILTPEK
B. pertus	45	DVFTEPMG--AVFPQAQDG--VEQDRFDQWCEHLMVRELDT-----GRVVGTYRILTPEK
M. tuberc	11	DVFSTTPG--FALPAAQDTR-RDGRDFDEYCDHLLVRDDT-----GELVGYRMLAPAG
S. coelic	39	DVFAGEMG--ALLASPPG--HDVDAFDAYCDHLLVREETT-----GQVVGTYRLLPPER
T. ferrox	55	DVFSAEYG--AQLS-GRPG--LDQDEYDPFCEHLIVDEAR-----QEVVGTYRFLPEK
P. aerugi	36	RVFSAEFD--AKLEGAEDG--LDRDDYDRHCAHIGVRDLS-----GALVATIRLLDHRA
R. sphaer	28	TVFVEELGGDGLVDHAE--LERDEFDDLCDHLLLTDRRRDAAALDVGVRLLPGER
S. melilo	57	RVFVEEMK--AQVAPEAGRRKRIDSNDACDHLVLVDTSIEGDAEEQIVGTYRLLQDV
B. bronch	46	AREAGGYSESEFDLSGLGALRE--QLVEVGRSCTHADYRNGAVIMLLWSGLAEYLRGG
B. pertus	93	AREAGGYSESEFDLSGLGALRE--QLVEVGRSCTHADYRNGAVIMLLWSGLAEYLRGG
M. tuberc	66	ATAAGGLYTATEFDVCAFDPLRP--SLVEMGRVVRGHRNGGVLLMWAGLAYLDYRG
S. coelic	90	AAVAGRLYAESEFDLAALDPIRS--SLVEVGRSCVHPDHRDGAVIGLLWAGIARYMTDRG
T. ferrox	105	VARVGRYYAETFDLSRLLTNA--RLMELGRSCVHPGYRGAVIALWSGLAEATMWQ
P. aerugi	87	AERLGRFYSEFEHLSGLDALFG--PVLEIGRTCVAPYRNGATIALWSGLAEVLNEG
R. sphaer	86	AAGAGRYCDSEYDLPLRASGR--RVLEGRSCVHPDYRGGAFFLLWSGLADYALAQR
S. melilo	115	AERTGGFYSAEFATGELLSPGPKGRFVMEGRSCVLPYRTRKRTVELLWQGNWAYALKRG

B.bronch	104	YEYVLGCASVSLRDDGVTAAEVWRNVAR-HLDDPALP----	RVRPL-----H--RYPIER
B.pertus	154	YEYVLGCASVSLRDDGVTAAEVWRNVAR-HLDDPALP----	RVRPL-----H--RYPIER
M.tuberc	121	YDYVTGCVSVPIGGDGETPESRLRGVRDFILNRHAAPPQ-CQVYPY	-----RPVRVDGRS
S.coelic	148	HAWLAGCCSLPLADGCGALAAAGAWDRVRT----	KHLAPEE-YRVRPL-----LP-WVP---
T.ferrox	163	IDYLMGCASVHS-TDQAVGALYQSLGT-----	HLTPLE-QRVFPL-----R--SLPHFD
P.aerugi	145	YRYLMGCASIPMRDGMQAKAMQRLRE---	R-YLCTDY-LQAEPK-----N--PLPPLD
R.sphaer	144	TELLFGVASFHG-TDIEALAEPLSYLHA---	FHLAPEE-LRVRARSEGGQMDLIPPER
S.melilo	175	IDAMFGCGSFFG-VVPEEHALALSFLHH---	NVRVRDEWAVSARPELYR--TMDLMPPEA
B.bronch	152	LNSTLP-AR--VPPLIKG-Y-LKLGAK--VCGE--PAW-----	DP-DFN--AADFP--
B.pertus	202	LNSTLP-AR--VPPLIKG-Y-LKLGAK--VCGE--PAW-----	DP-DFN--AADFP--
M.tuberc	175	LDDILPPRPAPVPLMRG-Y-LRLGAR--ACGE--PAH-----	DP-DFG-VGDFC--
S.coelic	194	-RPAAPAARTELPALLRG-Y-LRLGAW--VCGE--PAH-----	DV-DFG-VADLY--
T.ferrox	209	AQAQVEPAP--LPSLLKG-Y-LRAGVR--LCGE--PFW-----	DP-QFH-CADFF--
P.aerugi	193	VPENLT-AE--LPPLTKA-Y-MRLGAK--LCGE--PCW-----	DP-DFQ-VADVVF--
R.sphaer	198	IDRRAAMLA--MPPLTKA-Y-LRLGQ--VCGE--GAWI-----	DR-AFN-TTQVC--
S.melilo	229	INPKALAA--LPAADQGLYAARCNRRRCGRSSVPHHRRADRPAD	RQNFRLSELRLR
B.bronch	191	----VLLSMAGMDERYRRHFG-----LDREARR-----	
B.pertus	241	----VLLSMAGMDERYRRHFG-----LDREARR-----	
M.tuberc	217	----LLDKDHADTRYLRRLRSVAAASEMVNDAR-----	
S.coelic	235	----VLLPMNRVDPYLRHFLS-----LAPA-----	
T.ferrox	249	----VWCESTLISPRYQQRFLP-----VDARK-----	
P.aerugi	232	----TLLKRDELCPRYARHFK-----AAV-----	
R.sphaer	238	----LLMDTARMSARHRDFYAR-----RTVSAE-----	
S.melilo	287	RCGALFLAGILIVYRCTSNFHDG---SILNHKGEHSPLCLRG	

Abb. 37: Alignment potentieller "olsB"-Genprodukte verschiedener Bakterien mit dem, an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten olsB-Genprodukt von *Sinorhizobium meliloti* 1021.

B.bronch, "OlsB" von *Bordetella bronchiseptica* (gnl|Sanger_518|bbronchi_Contig2085); B.pertus, "OlsB" von *Bordetella pertussis* (gnl|Sanger_520|B.pertussis_Contig382); M.tuberc, "OlsB" von *Mycobacterium tuberculosis* (CAA16112.1); P.aerugi, "OlsB" von *Pseudomonas aeruginosa* (AE004851_6); R.sphaer, "OlsB" von *Rhodobacter sphaeroides* (gnl|UTHSC 1063|rsphaerX8503 contig6); S.coelic, "OlsB" von *Streptomyces coelicolor* (CAB 63170.1); S.melilo, OlsB von *S. meliloti* 1021; T.ferrox, "OlsB" von *Thiobacillus ferrooxidans* (gnl|TIGR|t_ferrooxidans_6149). Identische Aminosäuren sind mit einem schwarzen, ähnliche mit einem grauen Kasten gekennzeichnet.

Zur graphischen Veranschaulichung, welche "OlsB"-Sequenzen sich am ähnlichsten sind, wurde das mit Clustal W erstellte Alignment mit Hilfe des Programms TreeView in ein Dendrogramm umgewandelt (Abbildung 38).

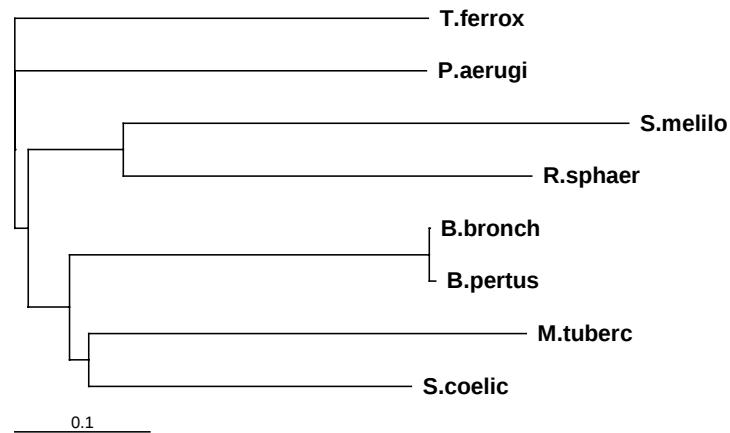


Abb. 38: Dendrogramm der "olsB"-Genprodukte verschiedener Bakterien und dem an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten *olsB*-Genprodukt von *Sinorhizobium meliloti* 1021. Das Dendrogramm wurde mit dem Programm TreeView auf Grund des Clustal W-Alignments der verschiedenen Sequenzen errechnet. Die Skalierung bedeutet 0.1 Aminosäureaustausch pro Position. B.bronch, *Bordetella bronchiseptica*; B.pertus, *Bordetella pertussis*; M.tuberc, *Mycobacterium tuberculosis*; P.aerugi, *Pseudomonas aeruginosa*; R.sphaer, *Rhodobacter sphaeroides*; S.coelic, *Streptomyces coelicolor*; S.melilo, *S. meliloti* 1021; T.ferrox, *Thiobacillus ferrooxidans*.

Nach diesem Dendrogramm ist die OlsB-Aminosäuresequenz von *S. meliloti* 1021 der "OlsB"-Aminosäuresequenz von *R. sphaeroides* am ähnlichsten. Wie schon bei SqdB-Aminosäuresequenz, so zeigte sich auch bei den OlsA- und OlsB-Aminosäuresequenzen die nahe Verwandtschaft dieser beiden α -Proteobakterien.

4.5 Die Inaktivierung von *olsA* erbrachte die Anreicherung eines möglichen Ornithinlipid-Biosynthese-Zwischenproduktes

Über die Ornithinlipid-Biosynthese konnte bisher nur spekuliert werden, da kein Zwischenprodukt des Stoffwechselweges bekannt war. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Inaktivierung des an der Ornithinlipid-Biosynthese beteiligten, sinorhizobiellen *olsA*-Gens zum ersten Mal eine mögliche Ornithinlipid-Vorstufe angereichert werden. Auf Autoradiogrammen der mit [1-¹⁴C]-Acetat-Pulse-markierten Membranlipide der *olsA*-inaktivierten Mutante ORLD1 war im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp ein neues Lipid-Signal sichtbar (Abbildung 27).

Ein, durch milde alkalische Hydrolyse hergestelltes, [1-¹⁴C]-Acetat-markiertes Lyso-Ornithinlipid, welches nur eine Fettsäurekette besitzt, befand sich nach Mischung des Lipids mit [1-¹⁴C]-Acetat-markierten Lipidextrakten des *S. meliloti* 1021-Wildtyps an etwa der gleichen Position auf dem Autoradiogramm wie das neue Lipid-Signal von ORLD1 (Abbildung 28). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Inaktivierung des sinorhizobiellen *olsA*-Gens zur Anreicherung von Lyso-Ornithinlipid führte.

Der, in der Einleitung vorgeschlagene mögliche Biosyntheseweg für die Bildung von Ornithinlipid konnte somit von der Zwischenstufe erstmalig experimentell bestätigt werden (Abbildung 39), wobei der endgültige Beweis, bestehend aus den *OlsB*- und *OlsA*-Enzymreaktionen, noch aussteht.

Die Akkumulation von Lyso-OL in *OlsA*-defizienten Mutanten lassen zudem vermuten, dass *olsA* den zweiten Schritt der Ornithinlipid-Biosynthese, die Veresterung der Hydroxylgruppe der 3-Hydroxyfettsäure mit der Carboxylgruppe der zweiten Fettsäure katalysiert. *olsB* wäre demnach für den ersten Schritt der Ornithinlipid-Biosynthese, die Bildung der Amidbindung zwischen der α -Aminogruppe des Ornithins und der Carboxylgruppe der 3-Hydroxyfettsäure zuständig. Diese Vermutung wird erhärtet durch die Tatsache, dass sich *olsB* bei anderen Bakterien in einem Operon, bei *S. meliloti* in derselben Leserichtung jedoch 14,2 kb stromaufwärts von *olsA* befindet.

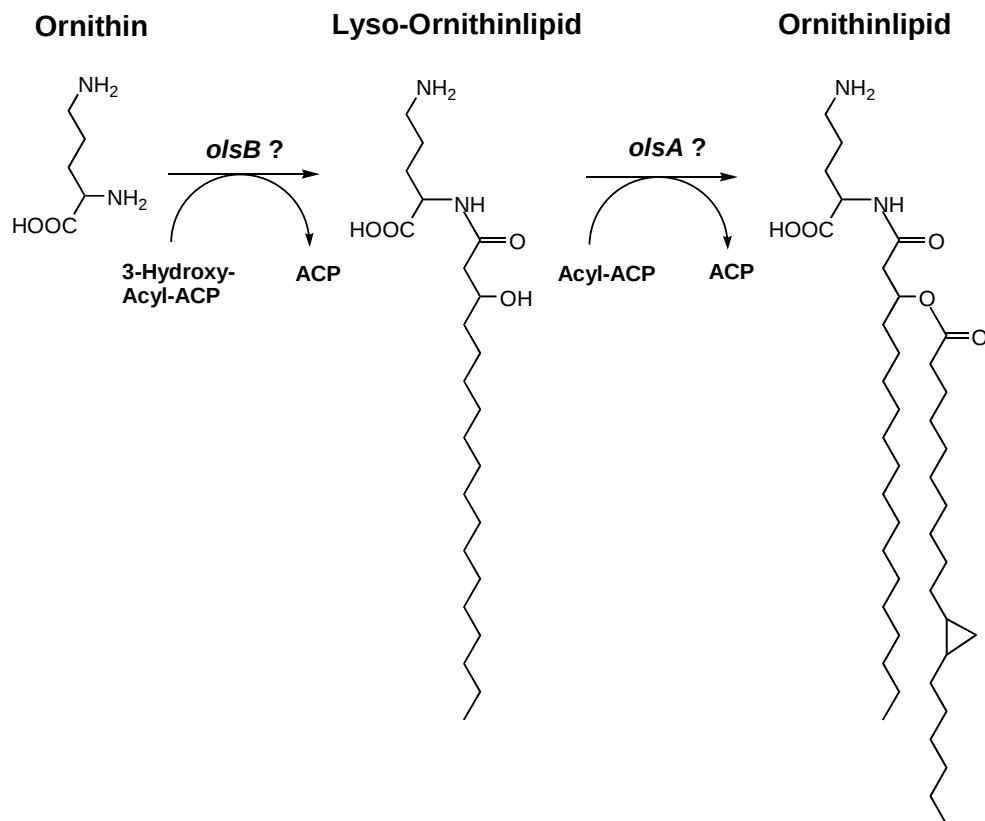


Abb. 39: Mögliche Biosynthese von Ornithinlipid bei *S. meliloti* 1021.

Das *olsB*-Genprodukt würde demnach in einem ersten Schritt die 3-Hydroxyfettsäure auf Ornithin übertragen. Das *olsA*-Genprodukt würde in einem zweiten Schritt die erste Hydroxyfettsäure mit einer zweiten Fettsäure verestern. ACP, Acyl-Carrier-Protein.

4.6 Die Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutanten ORLD1 und SLD11 waren in ihrem Wachstumsverhalten nicht beeinträchtigt

Bei *R. sphaeroides* und *Synechococcus* spielt das Phosphor-freie Sulfolipid vor allem eine Rolle für das Wachstum der Bakterien unter Phosphat-mangelbedingungen. Im Vergleich zu ihren jeweiligen Wildtypen zeigten die Sulfolipid-defizienten Mutanten dieser photosynthetischen Bakterien eine deutlichen Wachstumsbeeinträchtigung in Medien ohne verfügbarem Phosphat (Benning *et al.*, 1993; Güler *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu beeinflusste der Verlust von Sulfolipid das Wachstum von *S. meliloti* 1021 nicht signifikant (siehe Abbildung 12). Zwar setzte das Wachstum der sinorhizobiellen Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 in Medien mit einem ausreichenden oder wachstumslimitierenden Gehalt an anorganischem

Phosphat im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp mit einer leichten Verzögerung ein, aber in der stationären Phase erreichten beide Stämme die gleiche End-OD.

Beim Vergleich der Membranlipidzusammensetzung der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp zeigte sich, dass unter Phosphatmangelbedingungen bei der Mutante der Gehalt an Phosphatidylglycerol fast verdreifacht wurde (siehe 3.5). Der Defekt in der Sulfolipid-Biosynthese wirkte sich somit vor allem auf die Syntheserate von Phosphatidylglycerol aus.

Bei der sinorhizobiellen Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 war, im Gegensatz zur Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11, eine leichte Verzögerung des Wachstums der Ornithinlipid-Nullmutante im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp nur unter Phosphatmangelbedingungen zu verzeichnen. Aber auch diese Ornithinlipid-Nullmutante erreichte in der stationären Phase die gleiche End-OD wie der Wildtyp (siehe Abbildung 26A und 26 B). Der Verlust von Ornithinlipid wurde bei der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp in erster Linie ausgeglichen durch eine erhöhte Syntheserate von Phosphatidylethanolamin (3.17).

Somit konnte weder unter Hochphosphat-, noch unter Niedrigphosphat-Bedingungen ein Einfluss der Phosphor-freien Membranlipide Ornithinlipid oder Sulfolipid auf das Wachstum von *S. meliloti* 1021 festgestellt werden. Sicherlich wäre es zukünftig von Interesse, das dritte Phosphor-freie Membranlipid DGTS mit in die Untersuchungen einzubeziehen. Da unter wachstumslimitierenden Bedingungen der Phosphatkonzentration *S. meliloti* 1021 überwiegend DGTS bildet, würde sich ein Verlust dieses Lipids sicherlich auf das Wachstum des Bakteriums in Niedrigphosphat-Medien auswirken. Vor allem in Hinblick darauf, dass DGTS, aber vielleicht auch Ornithinlipid, in erster Linie vom Regulator-Protein PhoB kontrolliert werden, Sulfolipid im Gegensatz dazu aber anscheinend einen anderen Regulator besitzt (Geiger *et al.*, 1999), wäre es interessant zu untersuchen, inwiefern sich der Verlust von DGTS und Ornithinlipid möglicherweise auf die Sulfolipid-Biosyntheserate auswirken könnte.

Bisher wurden Mutanten, die eine Defizienz an Phosphor-freien Lipiden aufweisen, nur in der exponentiellen Wachstumsphase ausführlicher untersucht. Ob eine veränderte Überlebensfähigkeit unter Mangelbedingungen besteht, ist bisher nicht geklärt. Generell ist deshalb nach wie vor davon auszugehen, dass die Phosphor-freien Membranlipide für das Überleben von *S. meliloti* unter Mangelbedingungen, wie sie in Phosphat-armen Böden herrschen, von Bedeutung sind.

4.7 Die Phosphor-freien Membranlipide von *Sinorhizobium meliloti* scheinen keinen Einfluss auf die Wurzelknöllchensymbiose zu haben

Seit längerem ist bekannt, dass *phoB*-Mutanten, die kein DGTS mehr bilden können, in ihrer Fähigkeit zur Wurzelknöllchensymbiose nicht beeinträchtigt sind. DGTS wird bei *S. meliloti* 1021 aber normalerweise nur unter Phosphatmangelbedingungen synthetisiert (Geiger *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu DGTS werden die zwei anderen sinorhizobiellen Phosphor-freien Membranlipide Ornithinlipid und Sulfolipid bei *S. meliloti* auch unter Kulturbedingungen mit einer ausreichenden Konzentration von verfügbarem Phosphat gebildet. Auch im Innern der Pflanze und in den Wurzelknöllchen scheinen die Bakterien genügend verfügbares Phosphat vorzufinden (Bieleski *et al.*, 1973).

Studien zur Wurzelknöllchensymbiose mit den sinorhizobiellen Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutanten während dieser Doktorarbeit führten zu dem Ergebnis, dass weder Ornithinlipid, noch Sulfolipid für eine effiziente Wurzelknöllchenbildung erforderlich sind (3.6.2 und 3.19.2). Zwar nodulierte die Ornithinlipid-defiziente Mutanten ORLD1 im Vergleich zum *S. meliloti* 1021-Wildtyp mit einer leichten Verzögerung, aber am Ende des Testzeitraums war die Anzahl der gebildeten Knöllchen, die sich auf den Pflanzenwurzeln zeigten, bei beiden Stämmen annähernd gleich. Auch die sinorhizobielle Ornithin- und Sulfolipid-defiziente Doppelmutante OSD1 war in der Lage, wie der *S. meliloti* 1021-Wildtyp zu nodulieren (3.23.2). Die rötliche Färbung der von den verschiedenen Mutante gebildeten Wurzelknöllchen und die Grünfärbung der Pflanzenblätter im Vergleich zu den Kontrollpflanzen über den ganzen Testzeitraum hinweg, verweist zudem auf eine effiziente Stickstoff-Fixierung bei allen Mutanten.

Wie eingangs erwähnt, scheint das dritte Phosphor-freie Membranlipid DGTS ebenfalls keinen Einfluss auf die Wurzelknöllchensymbiose zu haben, da *phoB*-Mutanten, die kein DGTS mehr bilden können, vollständig intakte Knöllchen ausbilden (Geiger *et al.*, 1999).

Somit scheint unter den untersuchten Bedingungen keines der drei Phosphor-freien Membranlipide von *S. meliloti* 1021 für die Symbiose mit der Wirtspflanze erforderlich zu sein.

5. Zusammenfassung

Das Bakterium *Sinorhizobium meliloti*, welches symbiontisch mit Leguminosen Stickstoff-fixierende Wurzelknöllchen bilden kann, besitzt außer den typischen Phosphor-haltigen Membranlipiden auch die Phosphor-freien Membran-bildenden Lipide Sulfolipid, Ornithinlipid und Diacylglycerol-*N,N,N*-Trimethylhomoserin (DGTS). Diese Phosphor-freien Membranlipide werden verstärkt (Sulfolipid und Ornithinlipid) oder ausschließlich (DGTS) unter Phosphat-limitierenden Wachstumsbedingungen anstelle der Phospholipide gebildet und scheinen durch diesen Sparmechanismus den Bedarf des Bakteriums für Phosphat erheblich zu reduzieren. Da über die Funktion dieser ungewöhnlichen Phosphor-freien Membranlipide von *S. meliloti* bisher nichts bekannt war, sollte geklärt werden, ob diese Lipide eine Rolle bei der Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose spielen. Da die Bildung von DGTS nur erfolgt, wenn ein funktioneller PhoB-Regulator im Bakterium vorhanden ist, und da PhoB-defiziente Mutanten immer noch Stickstoff-fixierende Knöllchen bilden können, scheint DGTS für die symbiontische Lebensweise von *S. meliloti* nicht von Bedeutung zu sein. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung der anderen Phosphor-freien Membranlipide, Sulfolipid und Ornithinlipid, für die Wurzelknöllchensymbiose untersucht.

Das Sulfolipid Sulfoquinovosyldiacylglycerol findet sich häufig in den Thylakoidmembranen photosynthetischer Bakterien und Pflanzen. Der Nachweis von Sulfolipid in Rhizobien brachte die Fragen auf, ob Sulfolipid bei diesen nicht-photosynthetischen Organismen eventuell von der Wirtspflanze stammen könnte und ob es eine Rolle bei der Wurzelknöllchensymbiose spielt. Die Isolierung der an der Sulfolipid-Biosynthese beteiligten Gene (*sqdB*, *sqdC*, *sqdD*) aus *S. meliloti* zeigte, dass diese Gene bakteriellen Ursprungs sind und nicht durch horizontalen Gentransfer von Wirtspflanzen erhalten wurden. Die Inaktivierung des für die Sulfolipid-Biosynthese essentiellen *sqdB*-Gens führte zu einer Sulfolipid-defizienten Mutante von *S. meliloti*. Diese sinorhizobielle Sulfolipid-defiziente Mutante besaß Wachstumseigenschaften wie der Wildtyp und konnte auf den Wirtspflanzen Alfalfa genauso gut Stickstoff-fixierende Knöllchen bilden wie der Wildtyp. Dies zeigt, dass sinorhizobielles Sulfolipid nicht für die Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose benötigt wird.

Obwohl das Ornithinlipid α -N-(Acylxyacyl)-Ornithin bei Bakterien weit verbreitet ist, war bisher weder seine Biosynthese noch Gene, die daran beteiligt sind, bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche chemische Mutanten isoliert, die nicht mehr in der Lage waren Ornithinlipid zu bilden. Ornithinlipid-defiziente Mutanten wurden mit einer Genbank komplementiert und die Sequenzierung komplementierender Subklone führte zur Identifizierung von einem Gen (*olsA*), das zwei der chemischen Mutanten komplementieren konnte und zu einem zweiten Gen (*olsB*), das eine der chemischen Mutanten komplementierte. Inaktivierung von *olsA* oder von *olsB* führt in beiden Fällen zu Ornithinlipid-defizienten Mutanten. Die sinorhizobielle *OlsA*-inaktivierte Mutante besaß Wachstumseigenschaften wie der Wildtyp und konnte auf den Wirtspflanzen Alfalfa genauso gut Stickstoff-fixierende Knöllchen bilden wie der Wildtyp. Dies zeigt, dass sinorhizobielles Ornithinlipid nicht für die Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose benötigt wird.

Basierend auf der Struktur des Ornithinlipids wurde davon ausgegangen, dass minimal zwei Strukturgene für seine Biosynthese benötigt werden. Da das *OlsA*-Genprodukt Ähnlichkeiten zu Lysophosphatidsäure-Acyltransferasen besitzt und da die mögliche Zwischenstufe Lyso-Ornithinlipid in *OlsA*-defizienten Mutanten akkumuliert, vermuten wir, dass *OlsA* für eine O-Acyltransferase codiert, welche die Umwandlung von Lyso-Ornithinlipid in Ornithinlipid katalysiert. *OlsB* zeigt bisher nur Ähnlichkeiten zu Offenen Leserahmen deren Funktion nicht bekannt ist. Bei einigen Bakterien liegen *olsB*- und *olsA*-homologe Gene hintereinander in einem Operon, was vermuten lässt, dass sie auch funktionell zusammengehören. Daher schlagen wir vor, dass *OlsB* für eine N-Acyltransferase codiert, welche die Kondensation einer 3-Hydroxyfettsäure an Ornithin unter Bildung von Lyso-Ornithinlipid katalysiert. Überraschenderweise sind bei *S. meliloti* die *olsB*- und *olsA*-Gene etwa 14,2 kb voneinander auf dem Chromosom entfernt und möglicherweise ist während der Evolution zwischen beiden Genen ein DNA-Fragment integriert, das wichtige Gene (*tme*, *glnD*) für die Symbiose enthält.

Da keines der Phosphor-freien Membranlipide (Sulfolipid, Ornithinlipid oder DGTS) von *S. meliloti* essentiell für die Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose ist, vermuten wir, dass diese Lipide eine wichtige Funktion beim Überleben unter Phosphatmangelbedingungen, wie sie in Böden häufig herrschen, spielen.

6. Literaturverzeichnis

- 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.
- Anba, J., Bidaud, M., Vasil, M. L. & Lazdunski, A. (1990) Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *phoB* gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. *J Bacteriol* **172**: 4685-4689.
- Asselineau, J. (1991) Bacterial lipids containing amino acids or peptides linked by amide bonds. *Fortschr Chem Org Naturst* **56**: 1-85.
- Atkinson, M. R. & Ninfa, A. J. (1998) Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**: 431-447.
- Bairoch, A., Bucher, P. & Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res* **25**: 217-221.
- Bardin, S., Dan, S., Østerås, M. & Finan, T. M. (1996) A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **178**: 4540-4547.
- Bardin, S. D. & Finan, T. M. (1998) Regulation of phosphate assimilation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Genetics* **148**: 1689-1700.
- Batrakov, S. G. & Nikitin, D. I. (1996) Lipid composition of the phosphatidylcholine-producing bacterium *Hyphomicrobium vulgare* NP-160. *Biochim Biophys Acta* **1302**: 129-137.
- Benning, C. & Somerville, C. R. (1992a) Isolation and genetic complementation of a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **174**: 2352-2360.
- Benning, C. & Somerville, C. R. (1992b). Identification of an operon involved in sulfolipid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **174**: 6479-6487.

- Benning, C., Beatty, J. T., Prince, R. C. & Somerville, C. R. (1993). The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1561-1565.
- Benning, C., Huang, Z.-H. & Gage, D. A. (1995) Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch Biochem Biophys* **317**: 103-111.
- Benning, C. (1998) Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 53-75.
- Benson, A. A., Daniel, H. & Wiser, R. (1959). A sulfolipid in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **45**: 1582-1587.
- Benson, A. A. (1963). The plant sulfolipid. *Adv Lipid Res* **1**: 387-394.
- Beringer, J. E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.
- Bieleski, R. L. (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* **24**: 225-252.
- Bligh, E. G. & Dyer, J. W. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.
- Brown, A. P., Brough, C. L., Kroon, J. T. & Slabas, A. R. (1995) Identification of a cDNA that encodes a 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferases from *Limnanthes douglasii*. *Plant Mol Biol* **29**: 267-278.
- Cedergren, R. A. & Hollingsworth, R. I. (1994) Occurrence of sulfoquinovosyl diacylglycerol in some members of the family Rhizobiaceae. *J Lipid Res* **35**: 1452-1461.

- Charles, T. C., Newcomb, W. & Finan, T. M. (1991) *ndvF*, a novel locus located on megaplasmid pRmeSU47b (pEXO) of *Rhizobium meliloti*, is required for normal nodule development. *J Bacteriol* **173**: 3981-3992.
- Chomczynski, P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* **201**: 134-139.
- Coleman, J. (1992) Characterization of the *Escherichia coli* gene for 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferases (*plsC*). *Mol Gen Genet* **232**: 295-303.
- Dees, C. & Shively, J. M. (1982) Localization and quantification of the ornithine lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. *J Bacteriol* **149**: 798-799.
- Dembitsky, V. M. (1996) Betaine ether-linked glycerolipids. *Prog Lipid Res* **35**: 1-51.
- Dénarié, J., Debellé, F. & Promé, J.-C. (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**: 503-535.
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yacobson, E., Lu, P., Liang, X.-W., Finlay, D. R., Guiney, D. & Helinski, D. R. (1985) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring expression. *Plasmid* **13**: 149-153.
- Driscoll, B. T. & Finan, T. M. (1993) NAD⁺-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol Microbiol* **7**: 865-873.
- Eichenberger, W. (1982) Distribution of diacylglycerol-O-4'-(*N,N,N*-trimethyl)homoserine in different algae. *Plant Sci Lett* **24**: 91-95.
- Esberg, B., Leung, H. C., Tsui, H. C., Bjork, G. R. & Winkler, M. E. (1999) Identification of the *miaB* gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 7256-7265.

- Essigmann, B., Güler, S., Narang, R. A., Linke, D. & Benning, C. (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1950-1955.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1648-1652.
- Gabriel, O. (1987). Biosynthesis of sugar residues for glycogen, peptidoglycan, lipopolysaccharide, and related systems. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellul Mol Biol* **1**: 504-511.
- Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T. M. & Thomas-Oates, J. E. (1999) The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol Microbiol* **32**: 63-73.
- Ghosh, M. & Mishra, A. K. (1987) Occurrence, identification and possible significance of ornithine lipid in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochem Biophys Res Commun* **142**: 925-931.
- Güler, S., Seeliger, A., Härtel, H., Renger, G. & Benning, C. (1996) A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *J Biol Chem* **271**: 7501-7507.
- Günther, E. (1991) *Lehrbuch der Genetik*. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Heath, R. J. & Rock, C. O. (1998) A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol* **180**: 1425-1430.
- Hofmann, M. & Eichenberger, W. (1996) Biosynthesis of diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence for lipid-linked N methylation. *J Bacteriol* **178**: 6140-6144.

- Hulett, F. M., Lee, J., Shi, L., Sun, G., Chesnut, R., Sharkova, E., Duggan, M. F. & Kapp, N. (1994) Sequential action of a two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 1348-1358.
- Imhoff, J. F. & Bias-Imhoff, U. (1995). Lipids, quinones and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, pp. 179-205. R. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer (Hrsg.). Dordrecht: Kluwer Academic Pub.
- Jacoby, G. A., Jacob, A. E. & Hedges, R. W. (1976) Recombination between plasmids of incompatibility groups P-1 and P-2. *J Bacteriol* **127**: 1278-1285.
- Kato, H. & Goto, N. (1997) Adjuvanticity of an ornithine-containing lipid of *Flavobacterium meningosepticum* as a candidate vaccine adjuvant. *Microbiol Immunol* **41**: 101-106.
- Kawai, Y. & Moribayashi, A. (1982a) Characteristic lipids of *Bordetella pertussis*: Simple fatty acid composition, hydroxy fatty acids and an Ornithine-containing lipid. *J Bacteriol* **151**: 996-1005.
- Kawai, Y., Moribayashi, A. & Yano, I. (1982b) Ornithine-containing lipid of *Bordetella pertussis* that carries hemagglutinating activity. *J Bacteriol* **152**: 907-910.
- Kawai, Y., Yano, I. & Kaneda, K. (1988a) Various kinds of lipoamino acids including a novel serine-containing lipid in an opportunistic pathogen *Flavobacterium*. *Eur J Biochem* **171**: 73-80.
- Kawai, Y., Yano, I., Kaneda, K. & Yabuuchi, E. (1988b) Ornithine-containing lipids of some *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* **175**: 633-641.
- Kawai, Y., Kaneda, K., Morisawa, Y. & Akagawa, K. (1991) Protection of mice from lethal endotoxemia by use of an ornithine-containing lipid or a serine-containing lipid. *Infect Immun* **59**: 2560-2566.

- Kawai, Y., Nakagawa, Y., Matuyama, T., Akagawa, K., Itagawa, K., Fukase, K., Kusumoto, S., Nishijima, M. & Yano, I. (1999) A typical bacterial ornithine-containing lipid *N*-(D)-3-(hexadecanoyloxy) hexadecanoyl-ornithine is a strong stimulant for macrophages and a useful adjuvant. *FEMS Immunol Med Microbiol* **23**: 67-73.
- Knoche, H. W. & Shively, J. M. (1972) The structure of an ornithine-containing lipid from *Thiobacillus thiooxydans*. *J Biol Chem* **247**: 170-178.
- Knutzon, D. S., Lardizabal, K. D., Nelsen, J. S. Bleibaum, J. L., Davies, H. M. & Metz, J. G. (1995) Cloning of a coconut endosperm cDNA encoding a 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase that accepts medium-chain-length substrates. *Plant Physiol* **109**: 999-1006.
- Künzler, K. & Eichenberger, W. (1997) Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry* **46**: 883-892.
- Lanéelle, M.-A., Promé, D., Lanéelle, G. & Promé, J.-C. (1990) Ornithine lipid of *Mycobacterium tuberculosis*: its distribution in some slow and fast-growing mycobacteria. *J Gen Microbiol* **136**: 773-778.
- McKay, I. A. & Djordjevic, M. A. (1993) Production and Excretion of Nod Metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3385-3392.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**: 114-122.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory.
- Minnikin, D. E., Abdolrahimzadeh, H. & Baddiley, J. (1972) Variation of polar lipid composition of *Bacillus subtilis* Marburg with different growth conditions. *FEBS Lett* **27**: 16-18.

- Minnikin, D. E. & Abdolrahimzadeh, H. (1974) The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorous-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett* **43**: 257-260.
- Nagasawa, S., Tokishita, S., Aiba, H. & Mizuno, T. (1992) A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 799-807.
- Onishi, H. R., Pelak, B. A., Gerckens, L. S., Silver, L. L., Kahan, F. M., Chen, M., Patchett, A. A., Galloway, S. M., Hyland, S. A., Anderson, M. S. & Raetz, C. R. H. (1996) Antibacterial agents that inhibit Lipid A biosynthesis. *Science* **274**: 980-982.
- Østerås, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M. C. & Le Rudulier, D. (1998) Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: Choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11394-11399.
- Page, R. D. M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Com Appli Bio* **12**: 357-358.
- Raetz, C. R. H. (1996) Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli and Salmonella*, pp. 1035-1063, 2nd edn. Neidhardt, F. C., et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Ratledge, C. & Wilkinson, S. G. (1988) *Microbial lipids*. London: Academic Press Limited.
- Rigaud, J. & Puppo, A. (1975) Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* **88**: 223-228.
- Rossak, M., Tietje, C., Heinz, E. & Benning, C. (1995) Accumulation of UDP-sulfoquinovose in a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* **270**: 25792-25797.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sato, N. (1992) Betaine Lipids. *Bot Mag Tokyo* **105**: 185-197.
- Sherwood, M. T. (1970) Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J Appl Bacteriol* **33**: 708-713.
- Shih, G. C., Kahler, C. M., Swartley, J. S., Rahman, M. M., Coleman, J., Carlson, R. W. & Stephens, D. S. (1999) Multiple lysophosphatidic acid acyltransferases in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **32**: 942-952.
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K. E., Röhrs, V., López-Lara, I. M. & Geiger, O. (2000) Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem* **275**: 18919-18925.
- Spaink, H. P., Wijffelman, C. A., Pees, E., Okker, R. J. H. & Lugtenberg, B. J. J. (1987) *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**: 337-340.
- Spaink, H. P., Wijffjes, A. H. M. & Lugtenberg, B. J. J. (1995) *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J Bacteriol* **177**: 6276-6281.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. & Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169**: 5789-5794.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Swartley, J. S., Balthazar, J. T., Coleman, J., Shafer, W. M. & Stephens, D. S. (1995) Membrane glycerophospholipid biosynthesis in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: identification, characterization, and mutagenesis of a lysophosphatidic acid acyltransferase. *Mol Microbiol* **18**: 401-412.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

- van Bogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L. & Neidhardt, F. C. (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 4344-4366.
- van Brussel, A. A. N., Zaat, S. A. J., Canter Cremers, H. J. C., Wijffelman, C. A., Pees, E., Tak, T. & Lugtenberg, B. J. J. (1986) Role of plant root exudate and Sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of Tsr factor, which causes thick and short roots on common vetch. *J Bacteriol* **165**: 517-522.
- Voegele, R. T., Bardin, S. & Finan, T. M. (1997) Characterization of the *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* high- and low-affinity phosphate uptake systems. *J Bacteriol* **179**: 7226-7232.
- Voegele, R. T., Mitsch, M. J. & Finan, T. M. (1999) Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *Biochim Biophys Acta* **1432**: 275-285.
- Weissenmayer, B., Geiger, O. & Benning, C. (2000) Disruption of a gene essential for sulfoquinovosyldiacylglycerol biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* has no detectable effect on root nodule symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 666-672.
- West, J., Tompkins, C. K., Balantac, N., Nudelman, E., Meengs, B., White, T., Bursten, S., Coleman, J., Kumar, A., Singer, J. W. & Leung, D. W. (1997) Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA Cell Biol* **16**: 691-701.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Yagi, H., Corzo, G. & Nakahara T. (1997) *N*-acyl amino acid biosynthesis in marine bacterium *Deleya marina*. *Biochim Biophys Acta* **1336**: 28-32.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

- Yoshikawa, A., Isono, S., Sheback, A. & Isono, K. (1987) Cloning and nucleotide sequencing of the genes *rimI* and *rimJ* which encode enzymes acetylating ribosomal proteins S18 and S5 of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **209**: 481-488.

7. Anhang

7.1 Aminosäuren- und DNA-Sequenz des *sqd*-codierenden Genbereichs von *S. meliloti* 1021

Die Aminosäuren- und DNA-Sequenz des *sqd*-codierenden Genbereichs von *S. meliloti* 1021 wurde bei der NCBI Datenbank hinterlegt. Die Zugangsnummer ist AF194444.

LOCUS AF194444 3989 bp DNA BCT 23-FEB-2000
DEFINITION Sinorhizobium meliloti SqdB (sqdB), glycosyl transferase SqdD (sqdD), and SqdC (sqdC) genes, complete cds.
ACCESSION AF194444
VERSION AF194444.1 GI:7021337
KEYWORDS .
SOURCE Sinorhizobium meliloti.
ORGANISM Sinorhizobium meliloti
Bacteria; Proteobacteria; alpha subdivision; Rhizobiaceae group; Rhizobiaceae; Sinorhizobium.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3989)
AUTHORS Weissenmayer,B., Geiger,O. and Benning,C.
TITLE Disruption of a gene essential for sulfoquinovosyldiacylglycerol biosynthesis in Sinorhizobium meliloti has no detectable effect on root nodule symbiosis
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 3989)
AUTHORS Weissenmayer,B., Geiger,O. and Benning,C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-OCT-1999) Biochemistry, MSU, 224, East Lansing, MI 48824-1319, USA
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..3989
/organism="Sinorhizobium meliloti"
/strain="1021"
/db_xref="taxon:382"
gene 612..1832
/gene="sqdB"
CDS 612..1832
/gene="sqdB"
/function="involved in sulfolipid synthesis specifically in UDP-sulfoquinovose production"
/note="similar to Rhodobacter sphaeroides SQDB"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="SqdB"
/protein_id="AAF35288.1"
/db_xref="GI:7021338"

/translation="MKIAVLGGDGFVGWPTALHLSDAGHEVHILDNLSRRWIDTELGV
QSLTPMDSIQERTRIWAETGRRIFHFNLDLARDYELLKNWLAEHRPDVAVHFAEQRA
APYSMKSDRHKNYTVNNNVNATHNLLNALVELEDAHLVHLGTMGVYGYSTIGAAIPE
GYLPVGIETMGEETVNQEILYPSNPGSVYHMTKCLDQLLFQFYAKNDGLRITDLHQGI
VWGTHTEQTRRHPQLINRFDYDGDYGTVLNRFLLQAAIDYPLTVHGTGGQTRAFIHQI
DSVRCIELALRNPPARGSRVEIFNQMTETHRIRDLAEMVARMTGAKIAWLPNPRKEAA
ENELVVRNEKFLALGLNPVRLEDGLLSEIVDVAKKFAYRVDRSRVPAVSAWTKDIAPL
INHDPGKRLKSVS"

```

gene      1829..2704
          /gene="sqdD"
CDS       1829..2704
          /gene="sqdD"
          /function="involved in sulfolipid biosynthesis"
          /note="similar to Rhodobacter sphaeroides SQDD"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="glycosyl transferase SqdD"
          /protein_id="AAF35289.1"
          /db_xref="GI:7021339"

```

```

/translation="MSRVFASPEGLSPSSTVTARHAFVTLVTNSDYALGARALLRSIR
LTRTPADIVVLHTGGVDAASLEPLTEFDCRLIQTDLLPLSDEFNARHQRRNVHEQAPF
TKGRKPDFHSPLDNFCKIRLWQLVEYERCIFIDADAIVLRNIDKLFLYPEFAAAPNVY
ESLADFHLNSGVFVAEPAVATFEKMLAALDAPDAFWPRTDQTFQLQSFFPDWHGLPVT
MNMLQYVWFNLPDLWDWRSIGVLHYQYEKPWEKDHPRADALRPLIDLWHAFLTGEQIP
DIAGLPNPQAGLTSP"

```

```

gene      2701..3627
          /gene="sqdC"
CDS       2701..3627
          /gene="sqdC"
          /function="involved in sulfolipid biosynthesis"
          /note="similar to Rhodobacter sphaeroides SQDC"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="SqdC"
          /protein_id="AAF35290.1"
          /db_xref="GI:7021340"

```

```

/translation="MTRVLVSGGTGFVGRFIIHLLANGYEVTVGGRSPPPAGFYSPQ
VSHVPLRLDADADQAGAFDDIYYFVHAAFEHVEGRYRGEGDDPTSFRRANLDGSVRL
FEEARAAGVRRRCVFLSSRAVYGETAPPVVAETSPVEPDFTYQVKLATENALKSMTDH
SFVTTSLRVTGVYGPAGSGRKHKWSDLFSDYIAGRPVPRRIGTEVHGDDVAQAVRLML
ETEPARISGQVFNVDVLTDNREILSFLQAATGCPHPLPPAAEAAAFKTMSTEKLRL
GWVPGGRERLAATIRELAVQAVTVEPRFRPSP"

```

```

BASE COUNT      767 a   1308 c   1168 g   746 t
ORIGIN

```

```

   1 attgaactcg gtcgaatgag ccggccgctc acgcggaagc cgcttgcgca gccaggaatt
  61 tcgttgccag tgcctccggc agacgccgtg gccgtccctg accgttgatg accgcaatga
121 ttaccttggc cgcgatcagc agcgcgtcgc cgcgcctgat ctgctgctgc aggatcattt
181 ttgcgccgcc ggccttttcg gtcgcggtct cgatagtcag gacgtcgtcc atgcgcgccg
241 gcgccttgaa gtcgatttcc atacggtgga cgacgaagac gaggccttcc acgtcgcctt
301 cgatcgccag cgacgcctgc tcgacgccga gaagccgcag atagtcggtc cgggcgcgct
361 ccatgaaatg cagatagcgc gcatggtaga cgacgccgga aaaatcggtg tcctcgtaat
421 agacccgctg gatcagtcgg tggccggtct cggtcagctc gccggcaagc gaaatcagtg
481 acatggcatt ctccgggagg atttattgctg ttttcctgtg caggaacaaa aagacatttg
541 caagcactgc agctttgtca caatcctatc ctatcaggac cctgtcctct tcccgagcag
601 gagaatcgtg catgaagatt gcagtccctg gcggtgatgg tttcgtcggc tggcccaccg
661 ccctgcattt gtccgatgcg ggccacgagg ttcacatcct cgacaatctc tccgcgcgct
721 ggatcgacac ggaactcggc gttcaatccc tgacgccgat ggattccatc caggagcgca
781 cgcgcactct gcacgcggaa accggccggc gtattcactt caatctgacg gatctcgccc
841 gcgactacga actcctgaag aactggctgg cggagcatcg gcccgatgcg gtcgtccact
901 tcgcccagca gcggggccgc ccctattcga tgaagagcga caggcacaag aactacacgg
961 tcaacaacaa cgtcaacgcg acccacaatc tcctgaacgc actggtcgaa ctcgaactcg
1021 atgcccatct cgtgcattct ggtacgatgg gcgtttacgg ctattccacg atcggggcgg
1081 cgatccctga aggctacctg cccgtcggca tcgagaccat gggcgaagag acggtgaacc

```

```

1141 aggaaatcct ctatccttcc aatccgggct ccgtctatca catgaccaag tgcctggatc
1201 agctgctctt ccagttctat gcgaagaatg acggcctcag gatcaccgat ctgcatcagg
1261 gcatcgtctg gggcacgcat acggagcaga cgcgcgctca tccgcagctc atcaaccgct
1321 tcgactatga cggggattac ggaaccgtcc tcaatcgttt cctgatccag gcagcaatcg
1381 actatccgct gacggttcac ggaaccggcg gccagacgcg cgccttcate catattcagg
1441 actcgggtgcg ctgcatcgag ctgcgcgtca ggaaccggcc ggcgcgcggc agccgcgtcg
1501 agatattcaa ccagatgacg gaaacgcacg gcatccgcga tctcgccgag atggtcgcac
1561 gcatgaccgg cgcgaaaatc gcctgggtgc ccaatccgcg caaggaagcg gccgagaacg
1621 aactcgtggg gcggaacgag aaattcctcg cgctcggcct caatccggtt cgcctatcgc
1681 acgggctgct ttcggagatc gtcgacgtgg cgaagaaatt cgcctatcgc gtgcatcgct
1741 cgcgcggtgcc ggcggtttcc gcctggacga aggacatcgc ccccttgatc aaccacgatc
1801 cggagggcaa gcggctgaaa tcggtttcat gagccgcgtc ttcgccagtc cggaggggct
1861 cagtccctcc tccacggtga ctgcgcgcca cgctttcgtg acgctcgtca ccaacagcga
1921 ctacgcgctc ggtgcgcggg ccctgctcag atcgatccgt ctcaccggga cgccgcgaga
1981 tatcgtcgtg ctccataaccg gcggggtgga tgccgcctcc ctcgagccgc tgaccgaatt
2041 cgactgccgc ctgatccaaa ccgacctgct gccgctttcg gacgaattca acgcccggca
2101 tcagcgccgc aacgtgcatg agcaggcacc cttcacaaaa ggacgcaagc ccgatttcca
2161 ttcgccgctc gacaatttct gcaagataag gctgtggcaa ctcgtcgaat acgaacgctg
2221 catcttcate gatgccgacg cgatecgtgtt gcgcaacatc gacaagctgt tcctctatcc
2281 ggaatttgcc gcagcgccga acgtctatga gactctcgcg gacttccacc gcctgaactc
2341 cggcgctctt gtcgccgagc cggcagtcgc gaccttcgag aagatgctcg cggccctcga
2401 tgcgccggac gccttctggc cgcgcacgga ccagaccttt ctgcaaagct tcttccccga
2461 ttggcatggc ctgccggtga cgatgaacat gctgcaatat gtgtggttca acctgcctga
2521 gctttgggac tggcgctcga tcggggtgct ccattaccag tacgaaaagc cgtgggagaa
2581 ggatcatccg cgcgcggtat gcgtgcgccc gctgatcgat ctctggcacg cttttctgac
2641 cggcgagcag attcccgata ttgccggtct tcccaatccg caagccggcc tcacgtcgcc
2701 atgacccgcg ttctcgtctc cggcggcacc ggattcgtcg gccgcttcac catcgagcac
2761 ctgctggcaa acggctatga ggtcacggtc ggtggcgct ctccgccgcc tgccggcttt
2821 tattcgcaac ccgtgtccca tgtgccgctc cgtctcgatg cggatgcgga ccaggccggc
2881 gccttcgacg atatctatta tttcgtccat gcggctttcg agcatgtcga gggcagatat
2941 cgcgaggcg aggtgacga tcccacgagt tccgccgcg ccaatctcga cggctccgtt
3001 cgccttttcg aggaagcgcg cgccgccggc gtacggcgct gcgttttct gtgagccgc
3061 gccgtctatg gcgagacggc gccgcgggtt gtcgctgaga cgtcacctgt cgagccggac
3121 acgttctacg gacaggtaaa gctcgccacc gagaacgcct tgaaatcgat gaccgaccac
3181 agtttcgtca cgacgagcct gcgcgtcacc ggtgtctacg gcccccggg ctcgggacga
3241 aaacacaagt ggagcgatct cttttccgat tacattgccg gccgaccggt gccaaaggcg
3301 atcggcacgg aagtccacgg cgacgatgtc gccaggccg tccgcctcat gctcgaaacc
3361 gaaccggcga gaatatccgg tcaggtgttc aacgtctccg acgtgctgac cgacaaccgc
3421 gagatcctct cttttctcca ggctgcaacc ggctgcccgc accctctgcc gccggcagcg
3481 gaagcggcag cattcaagac gatgtcgacg gagaagctgc gcgcgctcg ctgggtgccg
3541 ggcggaagg aaagactggc tgcgacgatc cgggagcttg ccgtgcaagc tgtgaccgtt
3601 gaaccaagat ttcgccccct accctaacc tctccccgcg agcggggaga ggggacatgc
3661 cccctgcgaa tgcgcggccg atattggttg caatgacgaa acccgagtc ctttctcccc
3721 gcatgcgggg agaagggtggc ggcagccgga tgaggggcaa ttccggtcat ccgagatcga
3781 cgaccacaat ttccggcggc acgccgaaac ggatcgggtg gatggagcag ccaaggccgc
3841 ccgagacgat gaggttgcca tctccctcga caatatgacc ataggcgtac cggtcgccga
3901 aacgcgatgg cacgacgggc gaatggccgg caaagcgcac ctgtccgcca tgcgtgtgac
3961 cggatagtgt caatgccacc cgcgagggc

```

//

7.2 Aminosäuren- und DNA-Sequenz der *olsA*-Genregion von *S. meliloti* 1021

olsA befand sich auf dem Insert von pBW33 und pBW25. Die Sequenz des gesamten Inserts von pBW33 und die überlappende Teilsequenz auf pBW25 wurden bei der NCBI Datenbank hinterlegt. Die Zugangsnummer ist AF232919.

```

LOCUS      AF232919      2844 bp      DNA                      BCT          18-JUN-2000
DEFINITION Sinorhizobium meliloti NifU-like protein gene, partial cds;
            putative endopeptidase, putative N-acetyltransferase (rimI), and
            putative acyltransferase (olsA) genes, complete cds; and MiaB-like
            protein gene, partial cds.
ACCESSION  AF232919
VERSION    AF232919.1  GI:8571391
KEYWORDS   .
SOURCE     Sinorhizobium meliloti.
  ORGANISM Sinorhizobium meliloti
            Bacteria; Proteobacteria; alpha subdivision; Rhizobiaceae group;
            Rhizobiaceae; Sinorhizobium.
REFERENCE  1  (bases 1 to 2844)
  AUTHORS  Weissenmayer,B. and Geiger,O.
  TITLE    Identification of a gene required for ornithine lipid biosynthesis
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2  (bases 1 to 2844)
  AUTHORS  Weissenmayer,B. and Geiger,O.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (08-FEB-2000) Centro de Investigacion sobre Fijacion de
            Nitrogeno, UNAM, Av. Universidad, Cuernavaca, Morelos 62210,
            Mexico
FEATURES   Location/Qualifiers
  source    1..2844
            /organism="Sinorhizobium meliloti"
            /db_xref="taxon:382"
  CDS       <1..194
            /note="Orf64; similar to the Anabaena sp. L31 NifU
            deposited in SwissProt Accession number P33179"
            /codon_start=3
            /transl_table=11
            /product="NifU-like protein"
            /protein_id="AAF76865.1"
            /db_xref="GI:8571395"

/translation="TRVRPAVAQDGGDITFRGFKDGTVFLNMKGACSGCPSSTATLRH
            GVQNLLRRHFVPEVEAVESV"
  CDS       431..1087
            /note="Orf218; similar to the Pasteurella haemolytica
            O-sialoglycoprotein endopeptidase deposited in SwissProt
            Accession number P36175"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="putative endopeptidase"
            /protein_id="AAF76862.1"
            /db_xref="GI:8571392"

```

```

/translation="MLVLAIDTSGSGCFAAVYDGGAGELLACAGADIGRGHAERLMEF
VDEALSASGRELGEIDRIAVTIGPGSFTGIRVGVAARGLALALGKPAVGITTLHVVA
ESARLNQAGQPVLVVLDAKRDEVYLQAFDASGRPQGEAEILPAEEARLRFSAFAGIAC
GSGAPAVTGAAGGKPDEIDMAALARLGAAADPV SARPKPLYLRGPDAKPQAGFAVTRA
"

```

```

    gene          1142..1645
                  /gene="rimI"
    CDS           1142..1645
                  /gene="rimI"
                  /note="RimI; Orf167; similar to the Escherichia coli
                  peptide N-acetyltransferase deposited in SwissProt
                  Accession number S56597"
                  /codon_start=1
                  /transl_table=11
                  /product="putative N-acetyltransferase"
                  /protein_id="AAF76863.1"
                  /db_xref="GI:8571393"

```

```

/translation="MSLTDYFTRRTEFDIFALEEADLGAAAALHRQRFAAAWSDGEIH
GLLSQETVFGFVARQTNANGMFRPAFGGFVLSRAVAGEAEILTIGVDSRYARSGLGWR
LMQAAMREAAVKGAELFLEVDETNQAAIGLYGKLGFRKVGGERKAYYQARPGERSAAL
VMRLDLR"

```

```

    misc_feature  1646..1689
                  /note="similar to RIME2"
    gene          1765..2643
                  /gene="olsA"
    CDS           1765..2643
                  /gene="olsA"
                  /function="ornithine lipid biosynthesis"
                  /note="OlsA; similar to the Neisseria gonorrhoeae
                  1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase encoded by
                  sequence deposited in SwissProt Accession number Q59601;
                  NlaA"
                  /codon_start=1
                  /transl_table=11
                  /product="putative acyltransferase"
                  /protein_id="AAF76864.1"
                  /db_xref="GI:8571394"

```

```

/translation="MINWVRVALCGMLLVMVSLVLMVPVQILCLWLDLKPRRWLPRHWH
RVACLLLGLRVRVHGEIDRRRPLLLSANHVSWKDILVLSSVADVVFVAKSDVKSUPIF
GLLARLQASVFVEREQKRTTGHQVNDIGRRRLADGEIVVLFPEGTTSDGNRLLDIKTSL
FGAAASAVPQSPTGVVHVQPLAISYTGIHGMPMGRYHRPIAAWPGDIGLVPHLLGVLR
EGALEVDVDFGEAVDYDRHANRKEVSRLIGQRIKMLSDRLRGRSRSAAKGEPAPACS
AAPDIPSDAQRSRLAP"

```

```

    CDS           2693..>2844
                  /note="Orf50; similar to the Salmonella typhimurium MiaB
                  encoded by sequence deposited in GenBank Accession Number
                  CAB62263"
                  /codon_start=1
                  /transl_table=11
                  /product="MiaB-like protein"
                  /protein_id="AAF76866.1"
                  /db_xref="GI:8571396"

```

```

/translation="MTQETALLSTSPEGGDLNVPARKVFVKTYGCQMNVDSDRMSDA
LSRDGYV"

```

```

BASE COUNT      455 a      925 c      932 g      532 t
ORIGIN

```

```

1 agacgcgggt tcggcccgcc gtcgcccagg acggcggcga catcaccttc cgcggcttca
61 aggacggaac ggtgttcctg aacatgaaag gcgcatgctc cggctgcccc tcctcgacgg
121 cgaccttgag gcacggcgtg cagaacctgc tgcgccactt cgttcgggaa gtcgaagcgg
181 tcgaatccgt ctgatccgaa gcggatcggg gcgcgggaat ctgcatggca ggcccgcgca
241 tcctttgctt actgtttggc ttcattttcc ttacatcgtc tttccatatt ctttatcccg
301 gtgtggtttt tgggatagaa tcgcaagtgt gattccgaag ggccgcagcg acttgacat
361 gcggtaaactg cggctgcgca ccctgcgagc cgcaccgctc gcaggcgagc gggaggagac
421 cgcggctgaa atgctagtgc ttgccattga tacatccggg tccggttggt tcgctgccgt
481 ctacgacggc ggcgccggag aacttctggc atgcgcgggc gcggatatcg gacgtggcca
541 cgcggagcgc ctcatggaat tcgtggatga ggccttgagc gcctcggggc gggaactcgg
601 cgaaatcgat cggattgccg tgacgatagg tccaggatcg ttcaccggga tccgtgtcgg
661 cgttgccgct gcgcgcggcc tcgcgctggc gtcgggaaag cccgcggtcg ggatcaccac
721 gcttcacgtc gtcgccgaaa gcgcgaggct gaaccaggct ggccagccgg tgctcgtcgt
781 cctcgacgcc aaacgggacg aggtttacct ccaggccttc gatgttcggg gacggccgca
841 gggggaggcg gaaatcctgc ccgccgagga agcgcgcctg cgtttttccg ctttcgcggc
901 catcgccctg ggctccgggt cccctgccgt caccggcgcg gcgggcggca agccggacga
961 gatcgatatg gcggccctcg cccggctggg ggctgcggcc gatccggttt cagcgcgtcc
1021 taagccgctt tatctgcgcg gaccggagcg caagccccag gccggattcg ccgtgaccgg
1081 cgcctgaccg gaagacgcca ttcgcccgtg tttctccag aacgtccaag aaacgcccc
1141 gatgagcctt accgactact tcaccggccg caccgaattc gacattttcg cgcttgaaga
1201 ggccgatctc ggccgcgcgg ccgcgctgca tcgccagcgc tttgccgcgg cctggagcga
1261 cggcgaaatc catgggctcc tgagtcagga gacggtattc ggattcgtcg cgcgccagac
1321 caatgccaat ggcattgtcc ggccggcctt cggcggttc gtcctgtcgc gggcggtcgc
1381 gggcgaagcc gagatactga cgatcggggg cgactccgcg tacgcgcgct ccggtctcgg
1441 ctggcgccctc atgcaggcgg ccatgcggga ggccgcgcgc aaaggggccc aggcactgtt
1501 cctggaagtc gacgagacga accaggccgc aatcggcctc tacggaagc tcggcttccg
1561 caaggtcggc gagcgcaagg cctattatca ggcgcgccc ggcaacgca gcgcggcgct
1621 tgtcatgcgg ctcatcttc gctagagcgg gatgaggaaa gtgtgtgcgg ttttcgccc
1681 gcatcccgcg tctcaacctg ttggaataga tcacgttcac tgtttcacgc aaacggtgaa
1741 gcgcagtttg gaaggtgcct gcggatgac aattgggtgc gggtcgctct ttgcggcatg
1801 ctgctcgtca tggctcgcgt ggtgctgat ccggtccaga tttttgcct ctggctcgat
1861 ctgaaaccgc ggcgctggct gccgcgtcac tggcatcgcg tcgctgtct cgtgctcggc
1921 ctgcgcgtcc gcgtccatgg cgagctcgac cgccggcgct cttgtcctt gagcgccaat
1981 cacgtctcct ggaaggatat cctggtgctt tcctcggtgg cggacgtcgt tttcgttggc
2041 aagtcgggacg tcaagagctg gccgatattc gggcttctcg cccgccttca ggcacgggtt
2101 ttcgtggaac gcgagcagaa gcgcaccacc ggtcaccagg tcaatgacat cgggcggcgg
2161 ctgcgccgatg gggaaatcgt cgtgctcttc ccggaaggaa cgacctccga cggcaaccgg
2221 ctgctcgaca tcaagacctc gctgttcggc gcggccgctt cggcggtccc gcagtcgccg
2281 accggcggtg tccacgtcca gccgctggcg atttctaca ccggcatcca cggcatgccg
2341 atggggcgct atcatcggcc gatcgccgca tggccggggg acatcggtt ggtgccgcac
2401 cttctcgggg tgctcagaga gggagccctg gaggtcgat tcgatttcgg cgaggcgggtg
2461 gactatgacc ggcacgcgaa ccgcaaggaa gtaagccgcc tcacgggtca gcggatccgc
2521 aagatgctgt cggatcggct gcgagggcgc tcccgatccg ccgcaaggg cgagccggcc
2581 cccgcgtgct ctgcagcgcc ggacatcccg tcagacgcgc aaaggtcgcg gctcgcgccg
2641 tgacggccccg aaaatgcttc aactttgggg cgctatgcac taaagaacct gcatgaccga
2701 ggaaaccgct cttctgtcga cgtcgcccga gggggcgac ctgaacgttc cggcgcgcaa
2761 ggtcttcgtc aagacctatg gctgtcagat gaacgtctat gactccgacc gcatgtcggg
2821 tgcgctctcg cgcgacggct atgt

```

//

7.3 Aminosäuren- und DNA-Sequenz der *olsB*-Genregion von *S. meliloti* 1021

Die *olsB*-Genregion von *S. meliloti* 1021 befand sich auf dem Insert von pBW65. Die Aminosäuren- und DNA-Sequenz von pBW65 ist unten aufgelistet. Die Sequenz wurde teilweise selbst bestimmt und zum Teil vom Konsortium des *S. meliloti* 1021-Genomprojekts zur Verfügung gestellt.

```

LOCUS      nkit360605    4125 bp    DNA                BCT          04-OCT-2000
DEFINITION Sinorhizobium meliloti putative acyltransferase (olsB).
ACCESSION  ;
KEYWORDS   .
SOURCE     Sinorhizobium meliloti.
  ORGANISM Sinorhizobium meliloti
            Bacteria; Proteobacteria; alpha subdivision; Rhizobiaceae group;
            Rhizobiaceae; Sinorhizobium.
REFERENCE  1 (bases 1 to 4125)
  AUTHORS  Weissenmayer,B. and Geiger,O.
  TITLE    Ornithine lipid biosynthesis
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 4125)
  AUTHORS  Weissenmayer,B. and Geiger,O.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (04-OCT-2000) Centro de Investigacion sobre Fijacion de
            Nitrogeno, UNAM, Av. Universidad, Cuernavaca, Morelos 62210,
            Mexico

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..4125
                       /organism="Sinorhizobium meliloti"
                       /db_xref="taxon:382"
     CDS               346..2625
                       /note="orf759; similar to the Pseudomonas aeruginosa
                       two-component sensor deposited in Accession number
                       AAB86557"
                       /codon_start=1
                       /product="Orf759"

/translation="MSERMFRRMRAGAGTGSGAGRTASAAPAVNLGAAVIRQRRPLG
DPSAGGARVAYALAGIVAAMLLAVGAGAGLHLLPAIIAAGGLVGAFLLLSGRDEASG
KRVAGAGETAQDPARHGIETAALLATIHDAMGDLAIVRDLGKIMQANGAFHELGCAG
DARGLTCAELGLRFEPKTGPDRYFVHIYTPSGTRLYDWHDLVRDPARGRPMRHSIAR
DVTEEMLAASQREEARRRAEEASRAKSRLATVSHEIRTPLSGILGMSRLLAETRLSE
EQKNYLAGMQQSGHTLVQLVEDLIDFSSLAVGRFQLRPSQEDLRQTVENVVEMLSRA
HEKNIEIGATVAIEVPERMLFDAARLRQVLFNVVGNAVKFTEKGGVFVSVDIENGSVR
IRIDDSGPGMSADELARVFEEFEQAGDDAQRAKGTGLGLAISRRIMEAFGGSLTATSM
SGKGSRFEIRFPMAGAGLSGVPVRRGILAGAQVLVMAPEGPSSAALAATIETLGGTCH
RASTLAVAGRVVAGALGNRLPLTDVIVDHRHAAQFRELLALEPAIAGLRLRRTYLISP
EERTSHPVSRLGGYEAWLIRPLRERSLVEVLLGRLRGMEKRDAINDNRPVLREEPTAT
VMTSDVRGILLAEDDPVNALVLRSLLSRAGRAVDHVGDFKALEAALRSAGSAPPLIV
TDLNMPGGDGLDVLRRRLREAEAAGGRRRVPVLVLTADARGDLDERLRAAGADAVLAKP
ADPQRLLAEVTRLMDPVAK"

     gene             2743..3720
                       /gene="olsB"
     CDS              2743..3720
                       /gene="olsB"

```

```

/note="OlsB; similar to the Streptomyces coelicolor
Protein SCM10.10c deposited in Accession number
CAB63170.1"
/codon_start=1
/product="OlsB"

```

```

/translation="MTIELLD SMGVV DTSNAYIRKAVAAPASDVLGRIANLETRLARS
AAEIDAAQAVRYRVFVEEMKAQVAPEAGRRKRDI DSWDAICDHLVL DTSIEGDAEEQ
IVGTYRLLRQDVAERTGGFYSASEFAIGELLSRHPGKRFMELGRSCVLPEYRTKRTE
LLWQGNWAYALKHGIDAMFGCGSFPGVVEEHALALSFLHNNVRVRDEWAVSARPELY
RTMDLMPPEAINPKKALAALPAADQGLYAARCNRRRGCGRSSVPHHRRADRPADRQN
FRPLSELLRRRCGALFLAGILIVYRCTSNFHDGSILNHKGEHSPLCLRG"
gene complement(3847..>4125)
/ gene="tme"
CDS complement(3847..>4125)
/ gene="tme"
/note="identical to the Sinorhizobium meliloti
NADP-dependent malic enzym deposited in Accession number
AAB82460"
/codon_start=1
/product="TME"

```

```

/translation="CRLSGTANVLVMPAFHSASISTKMLQELGGSTVIGPLLVLGDKS
VQIASMSAKDSDLVNLAIAAYNAGTRRGS AESRKTAGTSSVAASPDG"
BASE COUNT      690 a    1285 c    1392 g    758 t
ORIGIN

```

```

    1 gaaaaaggag cgttcgctaa aactttaggc gtcggctgaa ggcattcgga aggcttgccg
   61 tgctaggacc tgtggacact tatggatagg ggtttgattt tgcacaaatc ggtcaatgcc
  121 aaggattttt ccgcagcaaa ggggtgcccc ctttgcaagg gaaaagccgc cggcagtggg
  181 cgatttggtc aaaacccttc gggcagccca tattgcggtg ccttgctcgc aaaaatccgg
  241 cttgcaggcg gacggcctgc ggcgcgggat ttccacgaa agtcctcgc aatatgggcc
  301 gtcaaacccc tatccataag tgtccacagg tcctaggccg cgggcatgag cgagcggatg
  361 tttcgagagc gtatgagggc tggcgcgggc acggggtcgg gggcgcggag gaccgatca
  421 gcggcgcccc cgggtgaacct cggtgccgcc gtcacccggc agcgcggcc gttgggcgat
  481 ccttcggcag ggggcgcgcg cgtgccttat gctctcgccg gcatcgttgc ggcaatgctg
  541 ctcccttgccg tcggtgcggg cgcggttctg cacctgctgc cggcgatcat cgcggtggtg
  601 ggccgtggtc gcgccttcct gctattgtcc ggccgcgacg aggcgtcggg gaagcgggtt
  661 gccggcgccg gcgagactgc gcaggacccc gcacggcatg gcattgaaac cgcgcgctc
  721 cttgcgacga tccatgacgc catgggcgat ctccgccatg tccgcgacct tgacggcaag
  781 atcatgcagg ccaatggcgc cttccatgag ctttgcggat gcgcgacgc gcgggggctg
  841 acctgcgcgg agctgggatt gcgcttcgag ccgaagacgg gccagaccg ctactttgtc
  901 catatctata cgccctcggg cacgcggctc tacgattggc acgacgtgct tgtccgcgac
  961 ccggcgcgcg gccgaccgat gcgccacagc atcgctcgcg atgttacgga ggaaatgctg
 1021 gcggcaagcc agagggagga ggcgcggcgg cgcgccgagg aggcgagccg ggcaagtcc
 1081 cgtctgctcg ccaccgtcag tcacgaaatc cgtacccgcg tttccggcat cctcggcatg
 1141 agccggctcc ttgccgagac gcggttgcg gaagagcaga agaactatct cgccggcatg
 1201 cagcagtcgg gccacaccct ggttcaattg gtcgaggatc tgatcgattt ttcgtcgctt
 1261 gccgtcggac ggttccagct gcgccgctc caggaggatc tgcgccagac agtcgagaac
 1321 gtggtcgaga tgctgtcgcc ccgcgcacac gagaagaaca tcgagatcgg tgcgaggtc
 1381 gccatcgagg taccgagcg gatgcttttc gacgcggcgc gcctgcgcca ggtgctgttc
 1441 aacgtgggtc gcaacgcggt gaaattcacg gagaagggcg gcgtcttcgt ctccgtcgat
 1501 atcgagaacg gctccgtgcg catccggatc gacgatagcg gtcccggcat gtccgccgat
 1561 gagctcgcgc gcgttttcga agagttcgag caggcaggcg acgacgcca gcgtgccaaa
 1621 ggcaccggcc tcggcctcgc gatatcccgg cggatcatgg aggccttcgg cggcagcctg
 1681 accgccacga gcatgtccgg caagggaagc cggttcgaga tccggttccc gatggctggc
 1741 gccggtctct cgggcgttcc cgttcggcgc ggcattctgg cgggcgcaca ggtgcttgct
 1801 atggcgcccc aggggccctc ctccggccgc cttgccgcca cgatcgagac gctgggcggg
 1861 acgtgccatc gggcttcgac acttgccgtc gcgggacggg tcgtcgccgg cgcgctcggc
 1921 aatcggtctg cgctgacgga tgtcatcgtc gatcaccgcc atgcggcgca gtttcgcgag

```

```

1981 cttcttgctc tcgagccggc gatcgccggc ctgcgtttgc gcagaacctc tctcatcagc
2041 cccgaggagc gcacaagcca tccggtgagc cggctcggcg gctatgaggc ctggctgac
2101 cgccctcttc gcgagagatc gctggtcgag gtgctgctcg ggcggctcag aggaatggag
2161 aaacgcgacg cgatcaacga caacagaccg gtgctgcggg aagagccgac agcgacggtg
2221 atgacgtcgg atgttcgcgg catcctgctt gccgaggacg accctgtgaa tgcactcgtc
2281 ctgcggtcgc ttctcagccg tgccggggcgt gccgtcgatc atgtcgggtga cttcaaggcg
2341 ctcgaagccg cactccgctc ggccgggttcc gcccgcgcgc cgctgatcgt caccgacctc
2401 aacatgccgg gcggcgatgg tctcgacgtg ctccggcgctc tacgtgaagc ggaggcggcc
2461 ggaggcaggc ggcggtgccc ggtgctcgtc ctgaccgcgg atgcgcgcgg cgatctcgat
2521 gagcgccctc gagccgcggg agcggacgcc gtgctggcga agcccgcga cccgcagcgg
2581 ctcccttgccg aagtcacccg cctcatggac cccgttgcaa aatagaatcc cagcttcggg
2641 gcaccggggc ggggtcgggg ttgtatactg ccctggtgtc actatgttgt tgcagaaacg
2701 tggctaaagc ccggcagcaa tgacggttcg ggatgacacg atatgacgat cgaacttctg
2761 gattcgatgg gcgtggttga cacctccaat gcttacatcc gcaaggcagt tgcggctccg
2821 gcgagcgatg ttctcggacg gatcgccaat ctcgagaccg gccttgcccg atcggcagcc
2881 gaaatcgatg ccgcgcaggc ggtgcgctac aggggtgttcg tcgaggagat gaaggcgag
2941 gtggcccccg aggcgggccg acgcaagcgc gacatcgaca gctgggatgc gatctgcgac
3001 cacctgctgg tgctcgatac ctcgatcgag ggcgatgcgg aggagcagat cgtcgggaacc
3061 taccgcctgc tgcgccagga cgttgccgag cggaccggcg gcttctactc ggcttcggag
3121 tttgcaatag gcgaacttct ctcgcgtcat cccggcaagc gcttcatgga actcggacgt
3181 tcctgcgtgc tgccggaata tcgcaccaag cgcacggtgg agctgctgtg gcagggcaat
3241 tgggcctatg cgctgaagca cgggatcgat gcgatgttcg gatgcggttc gtttcggggc
3301 gtggttcccg aagagcacgc gctcgcgctc tccttcctgc atcataacgt ccgggtccgg
3361 gacgagtggg cggtttccgc ccggccggag ctttaccgga cgatggacct gatgcctccg
3421 gaggcgatca acccgaagaa ggcgctcgcg gcgctgcccg ccgctgatca agggctatat
3481 gcggctcggg gcaatggtcg gcgacggggc tgtggtcgat caagcgttcc gcaccaccga
3541 cgtgctgacg gtcctgccga tcggcaaaat ttccggccgt tatctgaatt attacggcgc
3601 cgatgcgggg cgcttttcct cgccggtatc ctgattgtct atcgtgcac ctcgaatttt
3661 catgacggaa gcatattgaa ccataaagga gaacattcgc cgctctgcct gcgagggtag
3721 gctccgcgag caaatctcga attttcatca cgaacgaaat tggtcagcca tgatagattg
3781 agcccgccct cgttccggga agcgggctct tgttttctga gcgctcgcgc gatcttgagg
3841 cttgcttcaa ccgtctggcg acgcggcaac agacgaggtg ccggcagttt tccggctttc
3901 ggccgacccg cgtctcgtcc ccgcgttata ggccgcgata gcggccaggt tgacgaggtc
3961 cgagtccttt gccgacatcg aggcgatctg gaccgacttg tcgagaccga ccagcagcgg
4021 gccgatcacg gtcgagccgc ccagttcctg gagcatcttc gtcgagatcg aggccgagtg
4081 gaacgcgggg atgacgagca cgttcgcggt gccggaaagc ctgca

```

//

7.4 Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 auf Alfalfa-Keimlingen

Die Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung auf Alfalfa-Keimlingen, die mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp oder der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 inokuliert worden waren, sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet. Aus den Werten von je sechs Pflanzen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung gebildet. Der Zeitraum in Tagen beschreibt die Zeit nach der Inokulation der Wurzeln mit Bakterien. Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Abkürzungen: WT-1, Pflanze 1 mit dem Wildtyp inokuliert; SLD11-1, Pflanze 1 mit der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 inokuliert; MW, Mittelwert; STW, Standardabweichung.

Tab. 12: Knöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1.

Tage	Knöllchenbildung des WT auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1							
	WT-1	WT-2	WT-3	WT-4	WT-5	WT-6	MW	STW
7	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	1	2	0	0	1	0	0,7	0,8
14	1	2	0	0	1	0	1,0	0,8
16	1	2	2	0	1	0	1,3	0,9
21	3	2	2	0	1	0	1,3	1,2
24	3	2	2	0	1	0	1,3	1,2
27	3	2	2	0	1	0	1,3	1,2
30	3	2	2	0	1	0	1,7	1,2
34	3	4	2	0	1	0	2,3	1,6
37	4	5	2	2	1	0	2,3	1,9
41	4	5	2	2	1	0	2,5	1,9
44	5	5	2	2	1	0	2,5	2,1
48	5	5	2	2	1	0	2,5	2,1

Tab. 13: Knöllchenbildung der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1.

Tage	Knöllchenbildung von SLD11 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1						MW	STW
	SLD11- 1	SLD11- 2	SLD11- 3	SLD11- 4	SLD11- 5	SLD11- 6		
7	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	0	2	0	0	0	0	0,3	0,8
14	0	2	2	0	1	1	1,0	0,9
16	1	2	2	0	1	2	1,3	0,8
21	1	2	2	3	1	2	1,8	0,8
24	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6
27	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6
30	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6
34	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6
37	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6
41	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6
44	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6
48	2	2	2	3	1	2	2,0	0,6

Tab. 14: Knöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2.

Tage	Knöllchenbildung des WT auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2						MW	STW
	WT-1	WT-2	WT-3	WT-4	WT-5	WT-6		
7	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	1	1	1	1	0	0	1,2	0,5
13	2	1	2	2	0	0	1,5	1,0
16	2	1	2	3	0	1	2,5	1,0
20	3	2	2	4	2	2	3,0	0,8
23	3	2	2	4	4	3	3,0	0,9
27	3	2	2	4	4	3	3,2	0,9
30	3	2	2	4	4	4	3,2	1,0
34	3	2	2	4	4	4	3,2	1,0
41	3	2	2	4	4	4	3,2	1,0

Tab. 15: Knöllchenbildung der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2.

Tage	Knöllchenbildung von SLD11 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2						MW	STW
	SLD11- 1	SLD11- 2	SLD11- 3	SLD11- 4	SLD11- 5	SLD11- 6		
7	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	1	1	0	0	0	0	0,3	0,5
13	3	2	0	0	2	1	1,3	1,2
16	4	4	0	0	2	2	2,0	1,8
20	5	5	0	0	2	2	2,3	2,3
23	6	6	0	0	2	2	2,7	2,7
27	6	6	0	5	2	2	3,5	2,5
30	6	6	0	5	2	2	3,5	2,5
34	6	6	0	5	2	2	3,5	2,5
41	6	6	0	5	2	2	3,5	2,5

7.5 Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung des *S. meliloti* 1021-Wildtyps und der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 auf Alfalfa-Keimlingen

Die Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung auf Alfalfa-Keimlingen, die mit dem mit *S. meliloti* 1021-Wildtyp oder der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 inokuliert worden waren, sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet. Aus den Werten von je sechs Pflanzen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung gebildet. Der Zeitraum in Tagen beschreibt die Zeit nach der Inokulation der Wurzeln mit Bakterien. Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Abkürzungen: WT-1, Pflanze 1 mit dem Wildtyp inokuliert; ORLD1-1, Pflanze 1 mit der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 inokuliert; MW, Mittelwert; STW, Standardabweichung.

Tab. 16: Knöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1.

Tage	Knöllchenbildung des WT auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1							
	WT-1	WT-2	WT-3	WT-4	WT-5	WT-6	MW	STW
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	2	4	0	1	3	3	2,2	1,2
20	5	5	5	1	4	4	4,0	1,0
25	5	6	5	1	4	4	4,2	1,2
30	8	6	6	1	4	4	4,8	1,8
35	8	6	6	2	4	4	5,0	1,7
40	8	6	8	2	4	4	5,3	2,0
45	8	6	8	2	4	4	5,3	2,0

Tab. 17: Knöllchenbildung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1.

Tage	Knöllchenbildung von ORLD1 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 1							
	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	MW	STW
	-1	-2	-3	-4	-5	-6		
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	2	0	2	1	1	2	1,3	0,7
20	3	0	3	1	2	3	2,0	1,0
25	3	2	3	1	2	6	2,8	1,2
30	3	2	4	1	2	6	3,0	1,3
35	4	2	4	4	2	6	3,7	1,1
40	4	2	4	4	2	6	3,7	1,1
45	4	2	4	4	2	6	3,7	1,1

Tab. 18: Knöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2.

Tage	Knöllchenbildung des WT auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2						MW	STW
	WT-1	WT-2	WT-3	WT-4	WT-5	WT-6		
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
20	0	2	4	3	2	3	2,3	1,0
25	0	3	5	8	3	10	4,8	2,8
30	0	3	5	12	3	10	5,5	3,7
35	1	5	5	12	3	14	6,7	4,2
40	1	5	5	12	3	14	6,7	4,2
45	2	8	10	12	8	14	9,0	3,0

Tab. 19: Knöllchenbildung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2.

Tage	Knöllchenbildung von ORLD1 auf Alfalfa-Wurzeln, Experiment 2							
	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	MW	STW
	-1	-2	-3	-4	-5	-6		
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
20	0	1	0	0	0	0	0,2	0,3
25	2	7	1	3	3	3	3,2	1,3
30	3	7	1	3	3	4	3,5	1,3
35	4	12	5	3	3	6	5,5	2,3
40	4	12	5	3	3	6	5,5	2,3
45	9	12	9	3	5	10	8,0	2,7

7.6 Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung des *S. meliloti* 1021-Wildtyps sowie der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Doppelmutante OSD1 auf Alfalfa-Keimlingen

Die Einzelwerte der Wurzelknöllchenbildung auf Alfalfa-Keimlingen, die mit dem *S. meliloti* 1021-Wildtyp, der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1, der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 oder der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante OSD1 inokuliert worden waren, sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet. Aus den Werten von je sechs Pflanzen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung gebildet. Der Zeitraum in Tagen beschreibt die Zeit nach der Inokulation der Wurzeln mit Bakterien. Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Abkürzungen: WT-1, Pflanze 1 mit dem Wildtyp inokuliert; ORLD1-1, Pflanze 1 mit der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 inokuliert; SLD11-1, Pflanze 1 mit der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 inokuliert; OSD1-1, Pflanze 1 mit der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Mutante OSD1 inokuliert; MW, Mittelwert; STW, Standardabweichung.

Tab. 20: Knöllchenbildung des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Wildtyps auf Alfalfa-Wurzeln.

Tage	Knöllchenbildung des WT auf Alfalfa-Wurzeln							
	WT-1	WT-2	WT-3	WT-4	WT-5	WT-6	MW	STW
5	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	0	1	0	0	0	0	0,2	0,4
15	1	2	0	0	1	0	0,7	0,8
20	2	7	2	1	1	0	2,2	2,5
25	4	7	6	2	1	4	4,0	2,3
30	7	7	8	4	1	4	5,2	2,6

Tab. 21: Knöllchenbildung der Ornithinlipid-defizienten Mutante ORLD1 auf Alfalfa-Wurzeln.

Tage	Knöllchenbildung der Mutante ORLD1 auf Alfalfa-Wurzeln						MW	STW
	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1	ORLD1		
	-1	-2	-3	-4	-5	-6		
5	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	0	0	0	0	0	1	0,2	0,4
15	0	0	0	0	1	1	0,3	0,5
20	1	2	1	1	3	4	2,0	1,3
25	3	2	2	3	3	4	2,8	0,8
30	6	4	3	5	3	4	4,2	1,2

Tab. 22: Knöllchenbildung der Sulfolipid-defizienten Mutante SLD11 auf Alfalfa-Wurzeln.

Tage	Knöllchenbildung der Mutante SLD11 auf Alfalfa-Wurzeln						MW	STW
	SLD11-	SLD11-	SLD11-	SLD11-	SLD11-	SLD11-		
	1	2	3	4	5	6		
5	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
15	1	0	2	0	0	1	0,7	0,8
20	1	3	3	0	0	1	1,3	1,4
25	3	3	3	0	0	1	1,7	1,5
30	5	5	3	0	0	5	3,0	2,4

Tab. 23: Knöllchenbildung der Ornithin- und Sulfolipid-defizienten Doppelmutante OSD1 auf Alfalfa-Wurzeln.

Tage	Knöllchenbildung der Mutante OSD1 auf Alfalfa-Wurzeln						MW	STW
	OSD1-	OSD1-	OSD1-	OSD1-	OSD1-	OSD1-		
	1	2	3	4	5	6		
5	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
10	0	1	0	0	0	0	0,2	0,4
15	2	1	1	0	0	2	1,0	0,9
20	3	2	2	1	4	4	2,7	1,2
25	4	2	2	2	4	4	3,0	1,1
30	4	2	2	3	4	4	3,2	1,0

7.7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Fakultät III der Technischen Universität Berlin und am Zentrum für Stickstoff-Fixierung der UNAM in Cuernavaca, Mexiko unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Otto Geiger angefertigt.

Besonders herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Otto Geiger für die Betreuung der Arbeit, seine wertvollen Anregungen und kritischen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Szewzyk danke ich für sein Engagement bei der Fertigstellung und Begutachtung dieser Arbeit.

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helmut Görisch vom Fachgebiet Technische Biochemie am Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin und bei Frau Prof. Dr. Esperanza Martínez-Romero vom Centro de Investigacion sobre Fijacion de Nitrogeno der UNAM in Cuernavaca, Mexiko.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Turlough Finan für die Bereitstellung des *S. meliloti* G439-Stammes und an das Konsortium des *Sinorhizobium meliloti* 1021-Genomprojekts für die Übersendung der DNA-Sequenzen.

Allen Kollegen und Kolleginnen aus den Labors in Berlin und Cuernavaca danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit. Besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Isabel López-Lara, Guido Epple, Viola Röhrs, Karel de Rudder, Christian Sohlenkamp und Dr. Max Schobert aussprechen.

7.8 Eigene Veröffentlichungen

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T. M. & Thomas-Oates, J. E. (1999)
The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*.
Mol Microbiol **32**: 63-73.

Weissenmayer, B., Geiger, O. & Benning, C. (2000)
Disruption of a gene essential for sulfoquinovosyl-diacylglycerol biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* has no detectable effect on root nodule symbiosis.
Mol Plant Microbe Interact **13**: 666-672.

7.9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Barbara Anna Weissenmayer
Geburtsdatum und -ort 21.09.1963, Ludwigshafen/Rh.

Schulausbildung

07-1970 - 06-1974 Grundschule Nord, Schifferstadt
08-1974 - 06-1983 Schwerd-Gymnasium, Speyer/Rh.
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

07-1983 - 07-1985 Ausbildung zur landwirtschaftlichen
Gehilfin mit Berufsabschluss, Koblenz

Erststudium

10-1985 - 09-1987 Studium der Germanistik, Philosophie und
Ethnologie (MA), Universität Heidelberg
10-1987 - 12-1996 Fortsetzung des Germanistikstudiums,
FU Berlin
09.12.1996 Erlangung des Magister Artium, FU Berlin

Zweitstudium

04-1991 - 03-1998 Studium der Biologie (Diplom),
FU Berlin
31.03.1998 Diplomabschluss Biologie, FU Berlin

Dissertation

05-1998 - 12-1999 Arbeit an der Dissertation an der Fakultät III -
Prozesswissenschaften, FG Technische Biochemie
bei Priv.-Doz. Dr. Otto Geiger, TU Berlin
Seit 01-2000 Fortsetzung der Dissertation am Zentrum für
Stickstoff-Fixierung der UNAM bei Prof. Dr.
Otto Geiger, Cuernavaca, Mexiko