

6 Molekulare Biologie der symbiontischen Stickstoff-Fixierung

Hauke Hennecke, ETH Zürich

Die biologische N_2 -Fixierung nimmt im Stickstoffkreislauf der Natur eine wichtige Stellung ein. Sie gleicht die Verluste aus, die durch Denitrifikation, Nitratauswaschung und Ammoniumdiffusion dem Boden entstehen. Man schätzt, dass auf unserem Planeten bis zu 200 Mio. Tonnen N pro Jahr über N_2 -Fixierung dem Boden zugeführt werden. Diese Menge würde ausreichen, um den Stickstoffbedarf eines natürlichen Pflanzenwachstums zu ermöglichen. Die intensive Kultivierung landwirtschaftlicher Nutzflächen hat aber eine zusätzliche «industrielle N_2 -Fixierung» (nach dem Haber-Bosch-Verfahren) notwendig gemacht. Dieser energievereschlingende Prozess wird jedoch immer teurer, weshalb eine intensive praktische Nutzung der biologischen N_2 -Fixierung zunehmend von Interesse sein wird.

Die biologische Stickstoff-Fixierung verläuft nach der Bruttogleichung $N_2 + 8H^+ + 6e^- \rightarrow 2 NH_4^+$ und wird durch das Enzymsystem Nitrogenase katalysiert. Ausschliesslich prokaryontische Mikroorganismen (darunter Vertreter der Cyanobakterien, der Gram-positiven und Gram-negativen Eubakterien, sowie der Archaeobakterien) besitzen diesen Stoffwechselweg. Einige N_2 -fixierende Bakterien sind zur Ausbildung einer echten Symbiose mit höheren Pflanzen befähigt. Diese Symbiosen sind meist spezifisch: Das Bakterium löst bei «seiner» Wirtspflanze die Bildung von hochentwickelten Organstrukturen aus, um diese zu besiedeln und sich darin zu vermehren. Normalerweise sind solche Bakterien erst in der Pflanze zur N_2 -Fixierung befähigt. Das pflanzliche Gewebe bietet den Bakterien eine für die N_2 -Fixierung optimale Umgebung, indem es sie mit Assimilaten versorgt und den Zutritt des für die Nitrogenase toxischen Sauerstoffs begrenzt. Umgekehrt wird die Pflanze mit gebundenem Stickstoff versorgt, der häufig der wachstumsbegrenzende Faktor im Boden ist.

Rhizobium-Leguminosen-Symbiosen

Von besonderer Bedeutung ist die Symbiose von Bakterien der Gattungen *Rhizobium* (sog. schnell wachsende Rhizobien) und *Bradyrhizobium* (sog. langsam wachsende Rhizobien) mit den Leguminosen. Diese Bakterien dringen in die Wurzeln ihrer Wirtspflanzen ein und veranlassen die Bildung von Wurzelknöllchen, in denen sie dann als endosymbiontische Bakterioide die N_2 -Fixierung durchführen. Ein besonderes Merkmal der Wurzelknöllchen ist ihr hoher Gehalt an Leghämoglobin; es ist makroskopisch an der roten Färbung in einem angeschnittenen Wurzelknöllchen erkennbar. Wie das Hämoglobin oder Myoglobin der Wirbeltiere ist auch Leghämoglobin für einen dosierten Transport von Sauerstoff verantwortlich, in diesem Fall zur Aufrechterhaltung des aeroben Energiemetabolismus N_2 -fixierender Bakterioide.

In unseren Laboratorien am Mikrobiologischen Institut der ETH Zürich versuchen wir die molekularen Grundlagen der *Rhizobium*-Leguminosen-Interaktion und der symbiontischen N_2 -Fixierung aufzuspüren. Als Forschungsobjekt haben wir uns *Bradyrhizobium japonicum*, den Symbionten der Sojabohne (*Glycine max*), ausgesucht. Dieses Bakterium ist nicht nur wegen seiner weltweiten Bedeutung als Inokulationsstamm für die Sojabohnenproduktion von praktischem Interesse, sondern es bietet auch den Vorteil, dass es in Gegenwart eines sehr niedrigen Sauerstoffpartialdruckes in freilebender (ex planta) Kultur N_2 zu NH_3 reduzieren kann. Dies erlaubt die Untersuchung manch wichtiger physiologischer Fragestellung, die mit schnell wachsenden Rhizobien nicht zu beantworten wäre. Das langsame Wachstum von *Bradyrhizobium japonicum* ist allerdings für genetische Experimente nicht gerade von Vorteil, aber nach sorgfältiger Planung zeitlich gestaffelter Versuche haben wir gelernt, mit dieser Schwierigkeit zu leben.

Im Mittelpunkt unserer Forschungen stehen zwei wichtige Themenkreise. (1.) Wir möchten wissen, welche bakteriellen Gene und Genprodukte dafür sorgen, dass *B. japonicum* spezifisch die Sojapflanze erkennt und welche Gene für die Induktion der Knöllchenbildung verantwortlich sind. (2.) Es interessiert uns, welche bakteriellen Gene exprimiert werden müssen, damit es

schlussendlich zu einer effizienten symbiontischen N_2 -Fixierung kommt; hier faszinieren insbesondere die genetischen Regelmechanismen, wie Gene als Antwort auf veränderte physiologische Bedingungen an- und abgeschaltet werden.

Der Prozess der Knöllchenbildung

Was sich während dieses Prozesses einem mikroskopbewaffneten Auge offenbart, lässt sich in wenigen Sätzen schildern. Die erste Stufe der Bakterien-Pflanzen-Interaktion besteht in der Anheftung der Rhizobien an die Oberfläche von Wurzeln in einem relativ eng begrenzten Bereich oberhalb der Wurzelspitze. Die aus Wurzelrindenzellen auswachsenden Wurzelhaare krümmen sich um die Bakterien («root hair curling»). Nach offensichtlich lokaler Aufweichung der Pflanzenzellwand dringen die Bakterien durch einen sog. Infektionsschlauch in das Innere des Wurzelhaares vor. Gleichzeitig steigt die Teilungsrate der pflanzlichen Rindengewebszellen am Infektionsort stark an, was schon frühzeitig an der Bildung knöllchenartiger Schwellungen erkannt wird. Schliesslich werden die Bakterien aus dem Infektionsschlauch in die Pflanzenzellen entlassen, wo sie sich vermehren und von einer Peribakteroidmembran, die nur im Elektronenmikroskop sichtbar ist, umgeben werden (Bild 1). Das fertig ausdifferenzierte Sojaknöllchen beherbergt ca. 10^7 Bakterioide.

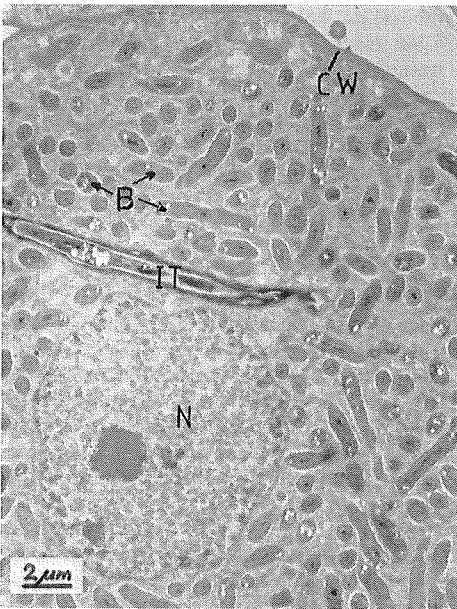


Bild 1 Elektronenmikroskopischer Einblick in eine infizierte Pflanzenzelle aus Knöllchen der Sojabohne. Der Dünnschnitt zeigt einen Teil der umgebenden Pflanzenzellwand (CW), den Nukleus der Pflanzenzelle (N), den angeschnittenen Infektionsschlauch (IT), aus dem *Bradyrhizobium japonicum* in die Pflanzenzelle entlassen wird, und die grosse Zahl fertig ausdifferenzierter Bakterioide (B).

Trotz des immensen Fortschritts der molekulargenetischen Forschung wissen wir bis heute keine einzige definierte biochemische Funktion (z. B. eine enzymatische Reaktion), die das Bakterium während des Infektionsprozesses beisteuert. Wohl aber wissen wir schon einiges über Gene und die physikalischen Eigenschaften ihre Genprodukte. Solche Gene werden nod-Gene (aus dem englischen «nodulation» = Knöllchenbildung) genannt. Alle bisher untersuchten Rhizobien besitzen zum Beispiel eine Gruppe von drei Genen, nodA, nodB und nodC («common nodulation genes»). Mutationen in diesen Genen führen zu einem Verlust des einleitenden Schrittes der Wurzelhaarkrümmung («hair curling negative», Hac⁻). Damit sind die nodABC-Gene auf jeden Fall als «frühe» Nodulationsgene charakterisiert. Wie Bild 2 zeigt, müssen die nodABC-Gene aktiviert werden. Dafür braucht es einen aktivierenden Faktor der Genexpression, das Genprodukt

(ein Protein) des *nodD*-Gens sowie einen zusätzlichen Faktor unbekannter Natur, der sich aus den Wurzelsekretionsprodukten der Wirtspflanze anreichern lässt. An diesem einfachen Beispiel der Regulation auf der Ebene der Genexpression lässt sich sehr schön das intime Zusammenwirken zwischen bakteriellem und pflanzlichem Symbiosepartner demonstrieren: die *nodABC*-Genprodukte werden nur dann gebildet, wenn die Wirtspflanze den diffusiblen Faktor beisteuert, denn ohne ihn vermag das *nodD*-Protein die *nodABC*-Gene nicht zu aktivieren. Die nächste Frage stellt sich natürlich nach der Funktion der *nodABC*-Genprodukte. Aus der Nukleotidsequenz der DNA (und damit aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Genprodukte) resultierte die Information, dass es sich um sehr hydrophobe Proteine handeln muss, die also möglicherweise mit der bakteriellen Zytoplasmamembran assoziiert sind. Welche strukturellen oder gar enzymatischen Funktionen sie dort ausüben, ist bislang Gegenstand unterschiedlichster Spekulationen. Da sie vermutlich bei allen Rhizobien vorkommen, sind sie als Determinanten für die Wirtsspezifität wohl auszuschließen. Dagegen sind sie eher an frühen Prozessen beteiligt, die für alle Symbiosen charakteristisch sind: die lokale Auflösung der Pflanzenzellwand oder die Induktion des Wachstums und der Teilung pflanzlicher Zellen oder die Unterdrückung pflanzlicher Abwehrmechanismen gegen bakterielle Eindringlinge. Andere Alternativen sind denkbar, und wir müssen gespannt auf weitere Forschungsergebnisse warten.

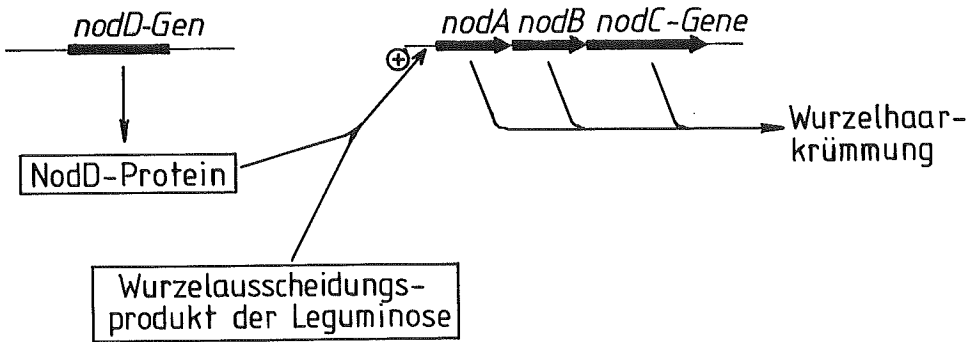


Bild 2 Modell der genetischen Aktivierung der bakteriellen «root-hair curling genes», dem einleitenden Schritt in der Interaktion zwischen *Rhizobium* und der Wirtspflanze (detaillierte Erläuterungen im Text). In *Bradyrhizobium japonicum* liegt das *nodD*-Gen getrennt von den *nodABC*-Genen auf der chromosomalen DNA.

Die Entwicklung endosymbiontischer, N₂-fixierender Bakterioide

Hierbei handelt es sich um ein typisches Problem der differentiellen Genaktivierung: Gene werden abgeschaltet (reprimiert), andere werden aktiviert (dereprimiert oder induziert). So muss sich das Bodenbakterium z. B. von einem freilebenden, aeroben Metabolismus auf einen symbiontischen, mikroaeroben Stoffwechsel umstellen. Daneben kann es weitgehend auf NH₄⁺-Assimilation verzichten, da es mit Stickstoff in Form von Aminosäuren durch die Pflanze beliefert wird. Und «last but not least» dereprimiert es die Gene für symbiontische N₂-Fixierung (allgemein fix genannt, oder spezifisch *nif*, wenn sie für Funktionen des Nitrogenasesystems kodieren).

Wie finden wir experimentellen Zugang zu den bakteriellen Genen, die im Verlauf der Bakterioidentwicklung so wichtig sind? Ein vielversprechender Weg führt über Mutanten, die in den letzten zwei Jahren in unserem Labor isoliert und charakterisiert worden sind. Es sind dies *B. japonicum*-Stämme, die Sojabohnen zwar noch nodulieren können (Nod⁺), aber keine symbiontische N₂-Fixierung durchführen können (Fix⁻), was sich äusserlich am kümmerlichen Pflanzenwuchs zeigt (siehe Bild 3). Eine weitergehende phänotypische Untersuchung ergab, dass die Mu-



Bild 3 Test des Wachstums von Sojabohnen unter kontrollierten Umweltbedingungen in einer Klimakammer. Die mittlere Gruppe von Pflanzen wurde mit einem N_2 -fixierenden Wildtyp-Stamm von *Bradyrhizobium japonicum* infiziert, die linke Gruppe von Pflanzen wurde nicht infiziert. Die rechte Gruppe von Pflanzen wurde mit einer knöllchenbildenden (Nod^+), aber nicht N_2 -fixierenden (Fix^-) *B. japonicum* Mutanten infiziert. Schon 3–4 Wochen nach der Samenkeimung wird der Unterschied deutlich: N_2 -fixierende Pflanzen sind grün und grösser als die nicht fixierenden Pflanzen (kleiner, gelbe Blätter).

tanten auf unterschiedlichen Stufen der Bakteroidentwicklung defekt sind. Drei Beispiele aus unserer Mutantenkollektion mögen dies veranschaulichen. Eine der Mutanten scheint gar nicht erst aus dem Infektionsschlauch in die Pflanzenzellen entlassen zu werden, denn diese sind gänzlich frei von Bakterien. Eine andere Mutante schafft immerhin ihren Weg bis in die parenchymatischen Pflanzenzellen, aber proliferiert dort nicht weiter und wird schliesslich abgebaut. Wiederum eine andere Mutante durchläuft gleich dem Wildtyp sämtliche Stadien der Bakteroidentwicklung, ist aber dennoch ausserstande, N_2 zu fixieren. Von der zuletzt genannten Mutante wissen wir bereits, dass die Mutation in einem der Nitrogenase-Gene lokalisiert ist. Aus einigen der zahlreichen Mutanten konnten wir die betroffenen Gene inzwischen isolieren (klonieren), und das ehrgeizige Ziel für die Zukunft wird sein, die Funktionen der Gene und Genprodukte abzuklären.

Am weitesten fortgeschritten sind unsere Kenntnisse über die Struktur, Organisation und Regulation der Nitrogenase-Gene. Es gibt deren drei (*nifD*, *nifK*, *nifH*), die für die Proteine des Nitrogenasekomplexes kodieren. Auf der DNA liegen vor den eigentlichen Genen die Kontrollsequenzen für deren Expression (Promotoren). Es handelt sich strukturell um höchstunübliche bakterielle Promotoren, die charakteristisch für *nif*, *fix* und verwandte Gene sind. Auch die *nif*-Gene müssen ähnlich wie die *nod*-Gene aktiviert werden (Bild 4), wobei eben jene *nif*-Promotoren als Zielort für die Aktivierung dienen. Es war ein erfreulicher Durchbruch, als wir kürzlich in

B. japonicum eines der Aktivatorproteine und dessen Strukturgen (*nifA*) identifizieren konnten. Aus Experimenten zur *nif*-Genexpression mussten wir aber schliessen, dass noch ein weiterer Faktor σ zu postulieren ist, der der RNA-Polymerase (dem Schlüsselenzym der Genablesung) die Fähigkeit verleiht, spezifisch *nif* und nicht andere Promotoren zu erkennen.

Die Entdeckung des *nifA*-Aktivators verlagert das Problem der *nif*-Genregulation sofort auf eine andere Ebene. Die Frage, die sich nun stellt, ist: wie wird denn das *nifA*-Gen selbst reguliert? Wann und unter welchen Bedingungen während der Bakteroidentwicklung wird es exprimiert, damit das *nifA*-Genprodukt seinerseits die Nitrogenase-Gene aktivieren kann? Zurzeit favorisieren wir die Hypothese, dass e. c. *nifA* zu einer Gruppe von Genen gehört, deren Expression allein durch den Sauerstoffpartialdruck in der Zelle reguliert wird, in diesem Falle also bei niedriger O_2 -Konzentration dereprimiert wird. Dies würde auf einleuchtende Weise erklären, warum *nif*-Genexpression erst relativ spät in der Bakteroidentwicklung und zudem erst zwei Tage nach der pflanzlichen Leghämoglobinsynthese messbar ist. Die Hypothese verdient es, experimentell getestet zu werden!

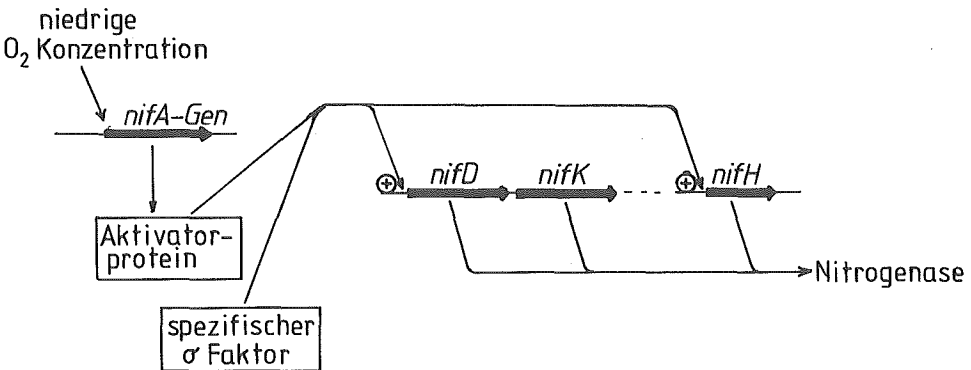


Bild 4 Modell der genetischen Kaskadenaktivierung von symbiontischen *nif*-Genen in *Bradyrhizobium japonicum*. Zuerst wird bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck das *nifA*-Gen aktiviert, dessen Genprodukt zusammen mit einem weiteren Faktor dann weitere *nif*-Gene aktiviert.

Perspektiven für die genetische Konstruktion von *Rhizobium*-Stämmen mit verbesserten symbiontischen Eigenschaften

Es besteht heute in der Tat ein Bedarf nach effizienteren Rhizobien, insbesondere nach *Bradyrhizobium japonicum*-Stämmen, die in grossem Ausmass vor allem in den USA zur Inokulation der Sojakeimlinge eingesetzt werden. Unter vielen guten Eigenschaften, die man einem solchen «Superbakterium» wünschen mag, seien lediglich zwei herausgegriffen:

- erhöhte Kompetitivität gegen andere Bodenbakterien, insbesondere gegen die eigenen Artgenossen, d. h. Stämme der gleichen Spezies; Inokulationsversuche im Felde führten nämlich oft zu dem enttäuschenden Ergebnis, dass sich der verwendete Inokulationsstamm nur zu einem geringen Prozentsatz in den Knöllchen wiederfand.
- erhöhte Effizienz der N_2 -Fixierung; hier stellt man sich vor, dass das Energieangebot der Pflanze von den Bakteroiden besser nutzbar gemacht wird oder die zeitliche Periode, während der eine nodulierte Pflanze N_2 fixiert, ausgedehnt wird (früheres Einsetzen und späteres Aufhören der Nitrogenaseaktivität).

Die in den vorstehenden Kapiteln erläuterten genetischen Regulationsmechanismen sind nicht nur Schlüssel zum Verständnis der komplexen Vorgänge in der *Rhizobium*-Leguminosen-Interaktion, sondern über sie führt auch der Weg, wenn man gentechnologische Manipulationen zum Zwecke der Stammverbesserung anvisiert.

Vielleicht offerieren die frühen Nodulationsgene bereits eine Möglichkeit, zu kompetitiven Stämmen zu gelangen. Man ist geneigt zu vermuten, dass eine erhöhte Synthese des nodD-Regulatorgenprodukts (Abb. 2) einem Stamm zu früher, schneller oder häufiger Nodulation verhilft. In ähnlicher Weise wäre es auch denkbar, dass ein Stamm mit unregulierter (konstitutiver) Synthese des nifA-Aktivatorproteins (Abb. 4) zu einem früheren Zeitpunkt mit der symbiontischen N_2 -Fixierung beginnt. Möglicherweise werden uns die Experimente lehren, dass diese Ideen zu naiv sind. In einem solch komplizierten System wie der *Rhizobium*-Leguminosen-Symbiose darf man auf spektakuläre Erfolge der Gentechnologie für die praktische Anwendung wohl erst in ferner Zukunft hoffen.